

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-536591**(P2004-536591A)**

(43) 公表日 平成16年12月9日(2004.12.9)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 45/00	4 B O 2 9
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 48/00	4 B O 6 3
A 6 1 K 48/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 4
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 243 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-500215 (P2003-500215)	(71) 出願人	391022430
(86) (22) 出願日	平成14年5月28日 (2002.5.28)		アムジェン インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成15年11月20日 (2003.11.20)		AMGEN INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/016740		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91
(87) 国際公開番号	W02002/097046		320-1799, サウザント オークス
(87) 国際公開日	平成14年12月5日 (2002.12.5)		, ワン アムジェン センター ドライブ
(31) 優先権主張番号	60/293, 629	(74) 代理人	100062007
(32) 優先日	平成13年5月25日 (2001.5.25)		弁理士 川口 義雄
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113332
			弁理士 一入 章夫
		(74) 代理人	100114188
			弁理士 小野 誠
		(74) 代理人	100103920
			弁理士 大崎 勝真
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 B 7 関連タンパク質-2 分子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、B 7 関連プロテイン-2 (B 7 R P-2) ポリペプチドおよび B 7 R P-2 ポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、B 7 R P-2 ポリペプチドを産生するための選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法を提供する。本発明は、B 7 R L P-2 ポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態を診断、処置、緩和、および／または予防するための薬学的組成物および方法をさらに提供する。1つの実施形態において、本発明は、本発明の核酸分子を含む、ベクターを提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a) または (b) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に、少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(d) (a) ~ (c) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、

を含む、単離された核酸分子。

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70 % 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1、配列番号 3 もしくは配列番号 5 のいずれかに示されるヌクレオチド配列または (a) のヌクレオチド配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 3 もしくは配列番号 5 のいずれかのヌクレオチド配列の領域、または (a) もしくは (b) のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるコードされるポリペプチドの活性を有するかまたは抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3、もしくは配列番号 5 のいずれか、または (a) ~ (c) のヌクレオチド配列の領域；

(e) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a) ~ (d) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(f) (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列に対して相補的なヌクレオチド配列、

を含む、単離された核酸分子。

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれか

10

20

30

40

50

に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮である少なくとも1つの改変を有する配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a)～(e)のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) 少なくとも中程度にストリンジェントな条件下で、(a)～(f)のいずれかのヌクレオチド配列の相補体にハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(h) (a)～(g)のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列、を含む、単離された核酸分子。

【請求項4】

請求項1、請求項2または請求項3のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項5】

請求項4に記載のベクターを含む、宿主細胞。

【請求項6】

真核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項7】

原核生物細胞である、請求項5に記載の宿主細胞。

【請求項8】

B7RP-2ポリペプチドを生成するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現させるのに適切な条件下で請求項5に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程、を包含する、プロセス。

【請求項9】

請求項8に記載のプロセスによって生成される、ポリペプチド。

【請求項10】

請求項8に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、該ネイティブのB7RP-2ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結された、B7RP-2ポリペプチドのプロモーターDNA以外のプロモーターDNAを含む、プロセス。

【請求項11】

請求項2に記載の単離された核酸分子であって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTN、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、またはSmith-Watermanアルゴリズムであるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。

【請求項12】

化合物がB7RP-2ポリペプチド活性またはB7RP-2ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項5、請求項6、または請求項7のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞におけるB7RP-2ポリペプチド活性またはB7RP-2ポリペプチド産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項13】

配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

10

20

30

40

50

【請求項 14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのオルソログについてのアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するかまたは抗原性である、フラグメント；あるいは

(d) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列、または (a) もしくは (b) のいずれかのアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体についてのアミノ酸配列、を含む、単離されたポリペプチド。

10

【請求項 15】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

20

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

30

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；あるいは

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、または N 末端短縮である少なくとも 1 つの改変を有する配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 16】

40

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで該ポリペプチドが、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、前記同一性パーセントが、GAP、BLASTP、FASTA、BLASTA、BLASTX、BestFit、または Smith-Waterman アルゴリズムであるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。

【請求項 18】

50

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 19】

配列番号 2、配列番号 4、もしくは配列番号 6 またはそのフラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する、請求項 18 に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 20】

抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 21】

ヒト化抗体である、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

10

【請求項 22】

ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 23】

ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 24】

モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 25】

キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

20

【請求項 26】

C D R 移植抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 27】

抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 29】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 28 に記載の可変領域フラグメント。

30

【請求項 30】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を有するポリペプチドに対する特異性を有する少なくとも 1 つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。

【請求項 31】

検出可能な標識に結合されている、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 32】

B 7 R P - 2 ポリペプチドの生物学的活性に拮抗する、請求項 18 に記載の選択的結合因子。

【請求項 33】

40

医学的疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、有効量の請求項 18 に記載の選択的結合因子を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 34】

前記医学的疾患、状態、または障害が、骨粗鬆症、パジェット病、骨髄炎、高カルシウム血症、骨減少症、または骨壊死である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記医学的疾患、状態、または障害が、自己免疫疾患である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、変形性関節症、免疫性血小板減少性紫斑病 (I T P)、または乾癬である、請求項 35 に記載

50

の方法。

【請求項 37】

前記医学的疾患、状態、または障害が、慢性炎症性疾患である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 38】

前記慢性炎症性疾患が、炎症性腸疾患、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、または糖尿病である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

前記医学的疾患、状態、または障害が、癌である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 40】

前記医学的疾患、状態、または障害が、感染症である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 41】

配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドを用いて動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。

【請求項 42】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載のポリペプチドに結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。

【請求項 43】

請求項 18 の選択的結合因子またはそのフラグメントを用いて B7RP-2 ポリペプチドの量を検出または定量するための方法。

【請求項 44】

請求項 18 に記載の選択的結合因子を備える、生物学的サンプル中の GPCR ポリペプチドの量を検出または定量するためのキット。

【請求項 45】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドおよび薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 46】

前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、可溶化剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 47】

請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含む、ポリペプチド。

【請求項 48】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 47 に記載のポリペプチド。

【請求項 49】

請求項 48 に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ（N-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、またはポリビニルアルコールである、ポリペプチド。

【請求項 50】

請求項 1、請求項 2 または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。

【請求項 51】

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 50 に記載の組成物。

【請求項 52】

請求項 1、請求項 2 または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項 53】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 13、請求項 14、または請求項 15 のいずれか

10

20

30

40

50

に記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。

【請求項 5 4】

前記異種アミノ酸配列が、I g G 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 5 3 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 5 5】

医学的疾患、状態または障害を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドの有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 5 6】

前記医学的疾患、状態、または障害が、骨粗鬆症、パジェット病、骨髄炎、高カルシウム血症、骨減少症、または骨壊死である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記医学的疾患、状態、または障害が、自己免疫疾患である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記自己免疫疾患が、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、変形性関節症、免疫性血小板減少性紫斑病（I T P）、または乾癬である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

前記医学的疾患、状態、または障害が、慢性炎症性疾患である、請求項 5 5 に記載の方法。 20

【請求項 6 0】

前記慢性炎症性疾患が、炎症性腸疾患、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、または糖尿病である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記医学的疾患、状態、または障害が、癌である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 2】

前記医学的疾患、状態、または障害が、感染症である、請求項 5 5 に記載の方法。

【請求項 6 3】

被験体における病理的状态または病理的状态に対する感受性を診断する方法であって、以下： 30

（a）サンプル中の、請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および

（b）該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づき、病理的状态または病理的状态に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。

【請求項 6 4】

デバイスであって、以下： 40

（a）移植に適した膜；および

（b）該膜内にカプセル化された細胞、

を備え、ここで、該細胞は、請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のタンパク質を分泌し；

ここで、該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。

【請求項 6 5】

B 7 R P-2 ポリペプチドに結合する化合物を同定するための方法であって、以下：

（a）請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および 50

(b) 該化合物に対する該 B 7 R P - 2 ポリペプチドの結合の程度を決定する工程、を包含する、方法。

【請求項 6 6】

前記化合物に結合したときの前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

動物においてポリペプチドのレベルを調節するための方法であって、請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。

【請求項 6 8】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 に記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。

【請求項 6 9】

化合物が B 7 R P - 2 ポリペプチド活性または B 7 R P - 2 ポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項 6 8 に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該トランスジェニック哺乳動物における B 7 R P - 2 ポリペプチド活性または B 7 R P - 2 ポリペプチド産生を測定する工程、を包含する、プロセス。

【請求項 7 0】

固体支持体に付着された請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項 7 1】

請求項 1、請求項 2、または請求項 3 のいずれかに記載の少なくとも 1 つの核酸分子を含む、核酸分子のアレイ。

【請求項 7 2】

配列番号 2 に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドであって、該ポリペプチドは、20 位のバリン；29 位のバリン；101 位のバリン；120 位のチロシン；184 位のロイシン；260 位のバリン；261 位のバリンもしくはイソロイシン；291 位のアスパラギン酸；または306 位のグルタミン酸である少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有し、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2 に示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 7 3】

配列番号 32 に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、その開示が本明細書中で参考として明示的に援用される、2001 年 5 月 25 日出願の米国仮特許出願第 60 / 293, 629 号の優先権の利益を主張する。

【0002】

(発明の分野)

本発明は、B 7 関連タンパク質 2 (B 7 R P - 2) ポリペプチドおよびこのポリペプチドをコードする核酸分子に関する。本発明はまた、B 7 R P - 2 ポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、薬学的組成物、および方法に関する。本発明はさらに、B 7 R P - 2 ポリペプチドと関連する疾患、障害および状態の診断、処置、改善、および／または予防のための、薬学的組成物および方法に関する。

【背景技術】

【0003】

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読は、新規治療剤の発見を大きく加速した。現在、高速核酸配列決定技術は、前例の

10

20

30

40

50

ない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と合わされて、ゲノムの一部および全体へと重複配列を集合させこと、ならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および／または構造の目印に対して相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤としての使用に関して生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0004】

過去10年間にわたるゲノム研究における有意な技術進歩にも関わらず、ヒトゲノムに基づく新規治療剤の開発に関する可能性は、未だほとんど実現されていない。潜在的に有利なポリペプチド治療剤をコードする多くの遺伝子またはこれらがコードするポリペプチド（これらは、治療分子に対して「標的」として作用し得る）は、未だ同定されていない。従って、診断的な利点または治療的な利点を有する、新規ポリペプチドおよびこれらをコードする核酸分子を同定することが、本発明の目的である。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

（発明の要旨）

本発明は、新規のB7RP-2核酸分子およびコードされたポリペプチドに関する。

【0006】

20

本発明は、以下を含む単離された核酸分子を提供する：

（a）配列番号1、配列番号3、または配列番号5のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

（b）配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

（c）（a）または（b）のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に、少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、コードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

（d）（a）～（c）のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

30

【0007】

本発明はまた、以下を含む単離された核酸分子を提供する：

（a）配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドに対して少なくとも70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

（b）配列番号1、配列番号3、または配列番号5のいずれかに示されるヌクレオチド配列または（a）のヌクレオチド配列の、対立遺伝子改変体もしくはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

（c）少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、配列番号3、もしくは配列番号5のいずれかのヌクレオチド配列、または（a）もしくは（b）のヌクレオチド配列の領域であって、ここで、このポリペプチドフラグメントは、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6に示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、ヌクレオチド配列領域；

40

（d）少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号1、配列番号3、もしくは配列番号5のいずれかのヌクレオチド配列または（a）～（c）のいずれかのヌクレオチド配列領域；

（e）（a）～（d）のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に対して少なくとも中程度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれ

50

かに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは
(f) (a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

【0008】

本発明は、以下を含む単離された核酸分子をさらに提供する：

(a) 少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮である少なくとも1つの改変を含む、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(f) 少なくとも約16ヌクレオチドのフラグメントを含む、(a) ~ (e) のいずれかのヌクレオチド配列；

(g) (a) ~ (f) のいずれかのヌクレオチド配列の相補体に対して、少なくとも中程度のストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされるポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；あるいは

(h) (a) ~ (g) のいずれかのヌクレオチド配列に相補的なヌクレオチド配列。

【0009】

本発明は、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。

【0010】

本発明はまた、以下を含む単離されたポリペプチドを提供する：

(a) 配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかのオルソログのアミノ酸；

(b) 配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも約70%同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約25アミノ酸残基を含む、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、アミノ酸配列のフラグメント；あるいは

(d) 配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列、または(a)もしくは(b)のいずれかのアミノ酸配列の、または(a)もしくは(b)のいずれかのアミノ酸配列対立遺伝子改変体もしくはスプライス改変体の、アミノ酸配列。

10

20

30

40

50

【0011】

本発明は、以下を含む単離されたポリペプチドをさらに提供する：

(a) 少なくとも1つの保存されたアミノ酸置換を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このフラグメントは、配列番号2、配列番号4、もしくは配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C末端短縮および／またはN末端短縮を有する、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；あるいは

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C末端短縮、またはN末端短縮である少なくとも1つの改変を含む、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列。

【0012】

本発明は、20位がバリンであるか；29位がバリンであるか；101位がバリンであるか；120位がチロシンであるか；184位がロイシンであるか；260位がバリンであるか；261位がバリンまたはイソロイシンであるか；291位がアスパラギン酸であるか；または306位がグルタミン酸である、少なくとも1つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号2に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドをなおさらに提供し、ここで、このポリペプチドは、配列番号2に示されるポリペプチドの活性を有する。

【0013】

B7RP-2のアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【0014】

本発明はまた、本明細書中に示される単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示される組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、ならびにB7RP-2ポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、宿主細胞を培養する工程およびこのように産生されたポリペプチドを必要に応じて単離する工程を包含する。

【0015】

B7RP-2ポリペプチドをコードする核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト動物はまた、本発明に含まれる。B7RP-2核酸分子は、B7RP-2ポリペプチドの発現および増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、このB7RP-2核酸分子は、内因性B7RP-2ポリペプチドの発現を防止する（すなわち、B7RP-2ポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）様式で、動物中に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは、哺乳動物であり、そしてより好ましくは、ラットまたはマウスのようなげっ歯類である。

【0016】

本発明のB7RP-2ポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0017】

10

20

30

40

50

さらに、本発明の B 7 R P - 2 ポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。

【0018】

本発明のヌクレオチド、ポリペプチド、または選択的結合因子と、1以上の薬学的に受容可能な処方剤とを含む、薬学的組成物もまた、本発明に含まれる。この薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、上記のポリペプチド、核酸分子、および選択的結合因子を使用する方法に関する。

【0019】

本発明の B 7 R P - 2 ポリペプチドおよび B 7 R P - 2 核酸分子は、疾患および障害（本明細書中で記載されるものを含む）を処置、予防、改善、および／または検出するために使用され得る。

【0020】

本発明はまた、B 7 R P - 2 ポリペプチドと結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、B 7 R P - 2 ポリペプチドを試験分子と接触させて、試験分子がそのポリペプチドに結合する程度を決定する工程、およびこの試験分子のこのポリペプチドに結合する範囲を決定する工程を包含する。この方法は、さらに、このような試験分子が、B 7 R P - 2 ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるかどうかを決定する工程を包含する。本発明は、さらに、B 7 R P - 2 ポリペプチドの発現または B 7 R P - 2 ポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【0021】

B 7 R P - 2 ポリペプチドの発現を調節する方法およびレベルを調整（すなわち、増加または減少）する方法もまた、本発明に含まれる。1つの方法は、B 7 R P - 2 ポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、B 7 R P - 2 ポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中でさらに記載されているような、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0022】

本発明の別の局面において、B 7 R P - 2 ポリペプチドは、それらのレセプター（「B 7 R P - 2 ポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。「発現クローニング」の種々の形態は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローニングするために広範に使用されている。例えば、Simonsen および Lodish, Trends, Pharmacological Sciences、第15巻、437～441、ならびに Tartaglia ら、1995、Cell、83：1263～1271を参照のこと。B 7 R P - 2 ポリペプチドレセプターの単離は、B 7 R P - 2 ポリペプチドシグナル伝達経路の新規なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性 B 7 R P - 2 ポリペプチドレセプター、抗 B 7 R P - 2 ポリペプチドレセプター選択的結合因子（例えば、抗体およびそれらの誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチド（これらのいずれかは、1以上の疾患または障害（本明細書中で開示されるものを含む）を処置するために使用され得る）が挙げられる。

【0023】

（発明の詳細な説明）

本明細書中で使用される節の表題は、組織的な目的のみのためであり、そして記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本願において引用される全ての参考文献は、本明細書中に明示的に参考として援用される。

【0024】

（定義）

10

20

30

40

50

用語「B7RP-2 遺伝子」または「B7RP-2 核酸分子」あるいは「B7RP-2 ポリヌクレオチド」とは、配列番号1、配列番号3、または配列番号5に示されるヌクレオチド配列、配列番号2、配列番号4、または配列番号6に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる核酸分子および本明細書中で定義される核酸分子をいう。

【0025】

用語「B7RP-2 ポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的形態のうちの1つをいう。

【0026】

用語「B7RP-2 ポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかに示されるB7RP-2 ポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子（通常はRNA）をいう。

【0027】

用語「単離された核酸分子」とは、（1）総核酸が供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、糖質、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離されている本発明の核酸分子、（2）「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、（3）天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、または（4）より大きなポリヌクレオチド配列の一部として、天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、いかなる他の混入核酸分子、またはその天然の環境において見出される他の混入物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）も実質的に含まない。

【0028】

用語「核酸配列」または「核酸分子」は、DNA配列またはRNA配列をいう。これらの用語は、DNAおよびRNAの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、その塩基アナログは、例えば、以下であるがこれらに限定されない：4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン（*pseudoisocytosine*）、5-（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルアデニン、1-メチルプソイドウラシル、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2, 2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-メチルアデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノ-メチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルキューオシン（ *β -D-mannosylqueosine*）、5'-メトキシカルボニル-メチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、オキシブトキシシン（*oxybutoxosine*）、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、N-ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

【0029】

用語「ベクター」は、コード情報を宿主細胞へと移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）を言及するために使用される。

【0030】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切なベクターであって、そして挿入さ

10

20

30

40

50

れた異種核酸配列の発現を指示および／または制御する核酸配列を含む、ベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびRNAスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。

【0031】

用語「作動可能に連結された」を用いて、本明細書中では、このように記載された隣接配列が、その通常の機能を発揮するように構成または構築されている隣接配列の配置をいう。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳をもたらすことが可能であり得る。例えば、コード配列は、このプロモーターがこのコード配列の転写を指示し得る場合に、プロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、これが正確に機能する限り、このコード配列と連続する必要はない。したがって、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、このプロモーター配列とこのコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。

10

【0032】

用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または核酸配列で形質転換されて、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞を言及するために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態または遺伝子構造において元々の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を包含する。

【0033】

用語「B7RP-2ポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：B7RP-2ポリペプチドフラグメント、B7RP-2ポリペプチドオルソログ、B7RP-2ポリペプチド改変体、およびB7RP-2ポリペプチド誘導体であって、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するもの。B7RP-2ポリペプチドは、本明細書中で定義されるような、成熟ポリペプチドであり得、そして調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。

20

【0034】

用語「B7RP-2ポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドのアミノ酸末端での短縮（リーダー配列を含むかまたは含まない）および／またはカルボキシル末端での短縮を含むポリペプチドをいう。用語「B7RP-2ポリペプチドフラグメント」はまた、B7RP-2ポリペプチドオルソログ、B7RP-2ポリペプチド誘導体、もしくはB7RP-2ポリペプチド改変体のアミノ末端短縮物および／もしくはカルボキシル末端短縮物、またはB7RP-2ポリペプチド対立遺伝子改変体もしくはB7RP-2ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端短縮物および／もしくはカルボキシル末端短縮物をいう。B7RP-2ポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングまたはインビボでのプロテアーゼ活性からもたらされ得る。膜結合形態のB7RP-2ポリペプチドもまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態では、短縮および／または欠失は、約10アミノ酸、または約20アミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約100より多くのアミノ酸を含む。このようにして生成されるポリペプチドフラグメントは、約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約150より多くのアミノ酸を含む。このようなB7RP-2ポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、B7RP-2ポリペプチドに対する抗体を生成するために使用され得ることが理解される。

30

40

【0035】

用語「B7RP-2ポリペプチドオルソログ」とは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるB7RP-2ポリペプチドアミノ酸配列に対応する、別の種

50

由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトの B 7 R P - 2 ポリペプチドは、互いのオルソログであるとみなされる。

【0036】

用語「B 7 R P - 2 ポリペプチド改変体」は、配列番号 2、配列番号 4 もしくは配列番号 6（リーダー配列を有するかまたは有さない）のいずれかに示される B 7 R P - 2 ポリペプチドアミノ酸配列と比較して、1つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／または B 7 R P - 2 ポリペプチドフラグメント）、および／または付加（例えば、内部付加および／または B 7 R P - 2 融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含む B 7 R P - 2 ポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在する（例えば、B 7 R P - 2 ポリペプチド対立遺伝子改変体、B 7 R P - 2 ポリペプチドオルソログ、および B 7 R P - 2 ポリペプチドスプライス改変体）か、または、人工的に構築され得る。このような B 7 R P - 2 ポリペプチド改変体は、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 のいずれかに示される D N A 配列から変化する D N A 配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、これらの改変体は、1～3、または 1～5、または 1～10、または 1～15、または 1～20、または 1～25、または 1～50、または 1～75、または 1～100、または 100 より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加および／または欠失を有し、ここで、これらの置換は、保存的、または非保存的、あるいはその任意の組み合わせであり得る。

10

【0037】

用語「B 7 R P - 2 ポリペプチド誘導体」は、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号 2、配列番号 4 もしくは配列番号 6 のいずれかに記載されるポリペプチド、B 7 R P - 2 ポリペプチドフラグメント、B 7 R P - 2 ポリペプチドオルソログ、または B 7 R P - 2 ポリペプチド改変体をいう。用語「B 7 R P - 2 ポリペプチド誘導体」はまた、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、B 7 R P - 2 ポリペプチド対立遺伝子改変体または B 7 R P - 2 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいう。

20

【0038】

用語「成熟 B 7 R P - 2 ポリペプチド」は、リーダー配列を欠失した B 7 R P - 2 ポリペプチドをいう。成熟 B 7 R P - 2 ポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、N 結合型および／または O 結合型グリコシル化など）を含み得る。

30

【0039】

用語「B 7 R P - 2 融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号 2、配列番号 4 もしくは配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチド、B 7 R P - 2 ポリペプチドフラグメント、B 7 R P - 2 ポリペプチドオルソログ、B 7 R P - 2 ポリペプチド改変体、または B 7 R P - 2 ポリペプチド誘導体の、アミノ末端またはカルボキシル末端での 1つ以上のアミノ酸（例えば、異種タンパク質または異種ペプチド）の融合体をいう。用語「B 7 R P - 2 融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、B 7 R P - 2 ポリペプチド対立遺伝子改変体または B 7 R P - 2 ポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

40

【0040】

用語「生物学的に活性な B 7 R P - 2 ポリペプチド」とは、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドに特徴的な少なくとも 1つの活性を有する B 7 R P - 2 ポリペプチドをいう。さらに、B 7 R P - 2 ポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、B 7 R P - 2 ポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも 1つのエピトープを含む。

【0041】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（1）供給源細胞から単離される場合に、天然で

50

一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の物質の少なくとも約50%から分離された本発明のポリペプチド、(2)「単離されたポリペプチド」が天然で連結しているポリペプチドの全てまたは一部に(共有結合的相互作用によっても非共有結合的相互作用によっても)連結していない、本発明のポリペプチド、(3)天然では連結していないポリペプチドに(共有結合的相互作用または非共有結合的相互作用によっても)作動可能に連結している、本発明のポリペプチド、または(4)天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、あらゆる他の混入ポリペプチドも、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げるその天然の環境において見出される他の混入物も、実質的に含まない。

【0042】

10

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の、配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、一列の2つ以上のヌクレオチド配列間または2つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定したときの、核酸分子間またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、2つ以上の配列のうち小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム(すなわち、「アルゴリズム」)によってアドレス指定されるギャップアラインメント(存在する場合)との間の同一一致のパーセントを評価する。

【0043】

用語「類似性」は、関連した概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」は、同一一致および保存的置換の一致の両方を含む関連性尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば10/20個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、パーセント同一性および類似性は、どちらも50%である。同じ例において、保存的置換であるさらに5つの位置が存在する場合、パーセント同一性は50%のままであるが、パーセント類似性は75%(15/20)である。したがって、保存的置換が存在する場合、2つのポリペプチド間のパーセント類似性は、これら2つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

20

【0044】

用語「天然に存在する」または「ネイティブの」は、核酸分子、ポリペプチド、宿主細胞などのような生物学的物質と関連して使用される場合、天然において見出され、そして人によって操作されていない物質をいう。同様に、「天然に存在しない」または「ネイティブではない」は、本明細書中で使用される場合、天然で見出されないか、またはヒトによって構造的に改変もしくは合成された物質をいう。

30

【0045】

用語「有効量」および「治療有効量」は、各々、本明細書中に示されるB7RP-2ポリペプチドの1つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるB7RP-2ポリペプチドまたはB7RP-2核酸分子の量をいう。

【0046】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのB7RP-2ポリペプチド、B7RP-2核酸分子、またはB7RP-2選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な1つ以上の処方材料をいう。

40

【0047】

用語「抗原」とは、選択的結合因子(例えば、抗体)により結合され得、そしてさらに動物において使用されて、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生し得る、分子または分子の一部をいう。抗原は、1つ以上のエピトープを有し得る。

【0048】

用語「選択的結合因子」とは、B7RP-2ポリペプチドについての特異性を有する分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトB7RP-2ポリペプチドに結合し、かつヒト非B7RP-2ポリペプチ

50

ドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに記載されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間バージョン（例えば、マウスB7RP-2ポリペプチドおよびラットB7RP-2ポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。

【0049】

用語「形質導入」とは、通常はファージによる、1つの細菌から別の細菌への遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および移入をいう。

【0050】

用語「トランスフェクション」は、細胞による外因性DNAまたは異種DNAの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性DNAが細胞膜内に導入された場合に「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Grahamら、1973、Virology 52:456; Sambrookら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davisら、Basic Methods in Molecular Biology (Elsevier, 1986); およびChura、1981、Gene 13:197を参照のこと。このような技術を使用して、1つ以上の外因性DNA部分を適切な宿主細胞に導入し得る。

10

【0051】

本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞が新しいDNAを含有するように改変された場合、その細胞は形質転換されている。例えば、細胞がそのネイティブな状態から遺伝子改変された場合、その細胞は形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、形質転換DNAは、細胞の染色体に物理的に組み込まれることにより細胞のDNAと組換わり得るか、複製されることなしにエピソードエレメントとして一過的に維持され得るか、またはプラスミドとして独立して複製し得る。DNAが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。

20

【0052】

（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）

30

関連した核酸分子が、配列番号1、配列番号3、または配列番号5の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかにおけるポリペプチドと比較して1以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連したB7RP-2ポリペプチドは、例えば、1以上のN結合型および／もしくはO結合型グリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または1以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。

【0053】

40

関連した核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかのB7RP-2ポリペプチドのうちの少なくとも約25個連続したアミノ酸、または約50アミノ酸、または約75アミノ酸、または約100アミノ酸、または約150アミノ酸、または約150よりも多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、B7RP-2核酸分子のフラグメントを包含する。

【0054】

さらに、関連したB7RP-2核酸分子としてはまた、本明細書中で定義したような中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、もしくは配列番号5のいずれかのB7RP-2核酸分子の十分に相補的な配列、またはポリペプチド（このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるアミ

50

ノ酸配列を含む)をコードする分子の十分に相補的な配列、または本明細書中に定義したような核酸フラグメントの十分に相補的な配列、または本明細書中に定義したようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプローブは、cDNA、ゲノムDNAライブラリーまたは合成DNAライブラリーを、関連した配列についてスクリーニングするために、本明細書中に提供されるB7RP-2配列を用いて調製され得る。B7RP-2ポリペプチドのDNA配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

10

【0055】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ著しく不一致なDNAのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、65～68℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムまたは42℃での0.015M塩化ナトリウム、0.0015Mクエン酸ナトリウムおよび50%ホルムアミドである。Sambrook, FritschおよびManiatis、Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、1989)；Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach、第4章 (IRL Press Limited)を参照のこと。

20

【0056】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度は影響を受ける。他の薬剤は、非特異的ハイブリダイゼーションおよび／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液中に含まれ得る。例は、0.1%ウシ血清アルブミン、0.1%ポリビニルピロリドン、0.1%ピロリン酸ナトリウム、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム、NaDodSO₄ (SDS)、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子DNA（または別の非相補的DNA）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、pH6.8～7.4で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、pHにほとんど依存しない。Andersonら、Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach、第4章 (IRL Press Limited)を参照のこと。

30

【0057】

DNA二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基組成、長さおよび塩基対の不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変動要因を適応させ、そして異なる配列関連性のDNAがハイブリッドを形成するのを可能にするために当業者によって調整され得る。完全に一致したDNA二重鎖の融解温度は、以下の方程式によって推定され得る：

40

$$T_m (^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6 (\log [\text{Na}^+]) + 0.41 (\% \text{G} + \text{C}) - 600 / \text{N} - 0.72 (\% \text{ホルムアミド})$$

ここで、Nは、形成される二重鎖の長さであり、[Na⁺]は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+Cは、ハイブリッド中の（グアニン+シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについ

50

ては、融解温度は、不一致 1 % 毎に約 1 °C 下げられる。

【0058】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で形成され得るよりも程度が高い塩基対不一致を有する DNA 二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、50～65 °C での 0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウムまたは 37～50 °C での 0.015 M 塩化ナトリウム、0.0015 M クエン酸ナトリウムおよび 20 % ホルムアミドである。例として、0.015 M ナトリウムイオン中で 50 °C の、「中程度にストリンジェントな」条件は、約 21 % の不一致を可能にする。

【0059】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって理解される。例えば、0.015 M ナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長い DNA の融解温度は、約 71 °C である。65 °C で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、このことは、約 6 % の不一致を可能にする。より遠く関連した配列を捕捉するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【0060】

約 20 nt までのオリゴヌクレオチドプローブについての 1 M NaCl * 中での融解温度の良好な推定は、以下によって与えられる：

$$T_m = A - T \text{ 塩基対あたり } 2^\circ\text{C} + G - C \text{ 塩基対あたり } 4^\circ\text{C}$$

* 6 × 塩クエン酸ナトリウム（SSC）中のナトリウムイオン濃度は、1 M である。Suggs ら, Developmental Biology Using Purified Genes, 683 (Brown および Fox 編, 1981) を参照のこと。

【0061】

オリゴヌクレオチドについての高いストリンジェンシーの洗浄条件は、通常、6 × SSC、0.1 % SDS 中で、そのオリゴヌクレオチドの T_m よりも 0 °C ～ 5 °C 低い温度においてである。

【0062】

別の実施形態において、関連した核酸分子は、配列番号 1、配列番号 3、もしくは配列番号 5 に示されるようなヌクレオチド配列に対して少なくとも約 70 パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号 2、配列番号 4、もしくは配列番号 6 のいずれかに示されるようなポリペプチドに対して少なくとも約 70 パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくは本質的にこれからなる。好ましい実施形態において、ヌクレオチド配列は、配列番号 1、配列番号 3、または配列番号 5 のいずれかに示されるようなヌクレオチド配列に対して約 75 パーセント、または約 80 パーセント、または約 85 パーセント、または約 90 パーセント、または約 95、96、97、98、もしくは 99 パーセント同一であるか、あるいはヌクレオチド配列は、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるようなポリペプチド配列に対して約 75 パーセント、または約 80 パーセント、または約 85 パーセント、または約 90 パーセント、または約 95、96、97、98、もしくは 99 パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連した核酸分子は、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも 1 つの活性を保有するポリペプチドをコードする。

【0063】

核酸配列における差異は、配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列と比較して、アミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変を生じ得る。

【0064】

配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードするヌクレオチドに対する対応する改変）は、B7RP-2 ポリペプチド

10

20

30

40

50

の機能的特徴および化学的特徴と類似の機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、B7RP-2ポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、以下を維持することに対するその影響が顕著に異なる、配列番号2、配列番号4、または配列番号6のいずれかのアミノ酸配列における置換を選択することによって達成され得る：(a)例えば、シートもしくはヘリックスコンホメーションのような、置換領域における分子骨格の構造、(b)標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c)側鎖のかさ。

【0065】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置でのアミノ酸残基の極性にも電荷にもほとんどまたは全く影響がないような、非ネイティブな残基によるネイティブなアミノ酸残基の置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」について以前に記載されたように、アラニンによって置換され得る。

10

【0066】

保存的アミノ酸置換はまた、生物学的系における合成によるよりむしろ、化学的なペプチド合成によって代表的に組み込まれる、天然には存在しないアミノ酸残基を含む。これらとしては、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態が挙げられる。

【0067】

天然に存在する残基は、共通の側鎖特性に基づいて、複数のクラスに分割され得る：

20

- 1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- 2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr；
- 3) 酸性：Asp、Glu；
- 4) 塩基性：Asn、Gln、His、Lys、Arg；
- 5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro；および
- 6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0068】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーの、別のクラス由来のメンバーとの交換を含み得る。このような置換された残基は、非ヒトB7RP-2ポリペプチドと相同なヒトB7RP-2ポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同領域に導入され得る。

30

【0069】

このような変更を行う際に、アミノ酸のハイドロパシー指数(hydrophobic index)が考慮され得る。各アミノ酸には、その疎水性および電荷特性に基づいて、ハイドロパシー指数が割り当てられている。ハイドロパシー指数は、以下である：イソロイシン(+4.5)；バリン(+4.2)；ロイシン(+3.8)；フェニルアラニン(+2.8)；システイン／シスチン(+2.5)；メチオニン(+1.9)；アラニン(+1.8)；グリシン(-0.4)；スレオニン(-0.7)；セリン(-0.8)；トリプトファン(-0.9)；チロシン(-1.3)；プロリン(-1.6)；ヒスチジン(-3.2)；グルタミン酸(-3.5)；グルタミン(-3.5)；アスパラギン酸(-3.5)；アスパラギン(-3.5)；リジン(-3.9)；およびアルギニン(-4.5)。

40

【0070】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与する際の、ハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当該分野において理解されている(Kyteら、1982、J. Mol. Biol.、157：105-131)。特定のアミノ酸が、類似のハイドロパシー指数またはスコアを有する他のアミノ酸の代わりに使用され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指数に基づいて変更を行う際に、ハイドロパシー指数が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして±0.5以内であるアミノ酸の置換が、なおより

50

特に好ましい。

【0071】

類似のアミノ酸の置換が、親水性に基づいて効果的になされ得る（特に、これによって作製された生物学的に機能的に等価なタンパク質またはペプチドは、本発明の場合と同様に、免疫学的実施形態における使用が意図される）こともまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配されるような、タンパク質の最大の局所平均親水性は、その免疫原性および抗原性、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に相関する。

【0072】

以下の親水性値が、以下のアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（+3.0）；リジン（+3.0）；アスパラギン酸（+3.0±1）；グルタミン酸（+3.0±1）；セリン（+0.3）；アスパラギン（+0.2）；グルタミン（+0.2）；グリシン（0）；スレオニン（-0.4）；プロリン（-0.5±1）；アラニン（-0.5）；ヒスチジン（-0.5）；システイン（-1.0）；メチオニン（-1.3）；バリン（-1.5）；ロイシン（-1.8）；イソロイシン（-1.8）；チロシン（-2.3）；フェニルアラニン（-2.5）；およびトリプトファン（-3.4）。類似の親水性値に基づいて変更を行う際に、親水性値が±2以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±1以内であるアミノ酸の置換が特に好ましく、そして±0.5以内であるアミノ酸の置換が、なおより特に好ましい。エピトープをまた、一次アミノ酸配列から、親水性に基づいて同定し得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」と呼ばれる。

【0073】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、このような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、B7RP-2ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載されるB7RP-2ポリペプチドの親和性を増大もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換を、表Iに示す。

【0074】

【表1-1】

表 1

アミノ酸置換

元々の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

【 0 0 7 5 】

【 表 1 - 2 】

Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

10

20

30

当業者は、周知の技術を使用して、配列番号 2、配列番号 4 または配列番号 6 のいずれかに示されるようなポリペプチドの適切な改変体を決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性について重要であると考えられていない領域を標的化し得る。例えば、同一の種または他の種由来の類似の活性を有する類似のポリペプチドが公知である場合、当業者は、B 7 R P-2 ポリペプチドのアミノ酸配列をこのような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較において、類似のポリペプチドの中で保存されている分子の残基および部分が、同定され得る。このような類似のポリペプチドと比較して保存されていない B 7 R P-2 分子の領域での変化が、B 7 R P-2 ポリペプチドの生物学的活性および／または構造を不利に影響しないようであることは、明らかである。当業者はまた、比較的保存されている領域でさえ、天然に存在する残基が、化学的に類似するアミノ酸に置換され得、その一方で活性が保持される（保存的アミノ酸残基置換）を認識する。よって、生物学的活性または構造に重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することがない、またはポリペプチド構造を不利に影響することがない、保存的アミノ酸置換の対象であり得る。

40

【 0 0 7 6 】

さらに、当業者は、活性または構造に重要である類似のポリペプチド中の残基を同定する構造-機能研究を、検討し得る。このような比較の点で、当業者は、類似のポリペプチド中の活性または構造に重要であるアミノ酸残基に対応する、B 7 R P-2 ポリペプチド中のアミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、このように予測された B 7 R P-2 ポ

50

リペプチドの重要なアミノ酸残基に化学的に類似のアミノ酸の置換を選択し得る。

【0077】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける3次元構造と比較して3次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の点で、当業者は、その3次元構造に関してB7RP-2ポリペプチドのアミノ酸残基の整列を予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上にあることが予想されるアミノ酸残基に根本的な変化が起こらないように選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関連し得るからである。さらに、当業者は、各アミノ酸残基で単一のアミノ酸置換を含む試験改変体を生成し得る。改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用してスクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体についての情報を得るために使用され得る。例えば、特定の10
アミノ酸残基への変化が、破壊された活性、所望されない減少した活性、または不適切な活性を生じたことが見出された場合、このような変化を有する改変体は、避けられる。換言すれば、このような慣用的実験から得られた情報に基いて、当業者は、アミノ酸を容易に決定し得、ここで、さらなる置換が単独でかまたは他の変異と組合わせてのいずれかで避けられるべきである。

【0078】

多くの科学的刊行物が、2次構造の予測を記している。Moult, 1996, Curr. Opin. Biotechnol. 7: 422-27; Chouら、1974、Biochemistry 13: 222-45; Chouら、1974、Biochemistry 113: 211-22; Chouら、1978、Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 47: 45-48; Chouら、1978、Ann. Rev. Biochem. 47: 251-276; およびChouら、1979、Biophys. J. 26: 367-84を参照のこと。さらに、コンピュータープログラムが、2次構造の予測を補助するために現在利用可能である。2次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリングに基く。例えば、30%より大きな配列同一性、または40%より大きな配列類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造的トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の最近の成長は、増強された2次構造の予測(ポリペプチドまたはタンパク質の構造内の可能性のある数のフォールディングを含む)を提供する。Holmら、1999、Nucleic Acids Res. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質内に制限された数のフォールディングが存在すること、および、一旦臨界的な数の構造が解かれると、構造的予測は劇的により正確になることが、示唆されている(Brennerら、1997、Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)。
。

【0079】

二次構造を予測するさらなる方法としては、「スレッディング」(Jones, 1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 377-87; Sipplら、1996、Structure 4: 15-19)、「プロファイル分析」(Bowieら、1991、Science, 253: 164-70; Gribskovら、1990、Methods Enzymol. 183: 146-59; Gribskovら、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 84: 4355-58)および「エボリューションリー連鎖(linkage)」(Holmら、上述、およびBrennerら、上述を参照のこと)が挙げられる。40

【0080】

好ましいB7RP-2ポリペプチド改変体としては、グリコシル化改変体が挙げられ、ここで、グリコシル化部位の数および／または型は、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列と比較して変更されている。1つの実施形態において、B7RP-2ポリペプチド改変体は、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列よりも多いかまたは少ないN-連結グリコシル化部位の数を有する。N-連結グリコシル化部位は、以下の配列によって特徴付けられる：Asn 50

—X—SerまたはAsn—X—Thr（ここで、Xで示されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る）。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N—連結炭化水素鎖の付加のために潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を除去する置換は、現存のN—連結炭化水素鎖を取り除く。また、N—連結炭化水素鎖の再構成が提供され、ここで、1つ以上のN—連結グリコシル化部位（典型的には天然に存在する部位）が除去され、そして1つ以上の新たなN—連結部位が作製される。さらなる好ましいB7RP-2改変体としては、システイン改変体が挙げられ、ここで、1つ以上のシステイン残基が、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるアミノ酸配列と比較して、欠失されるかまたは他のアミノ酸（例えば、セリン）で置換される。システイン改変体は、B7RP-2ポリペプチドが生物学的に活性なコンフォメーションに再フォールディングされなければならない場合（例えば、不溶性封入体の単離後）に有用である。システイン改変体は、一般に天然のタンパク質より少ないシステイン残基を有し、典型的には、不對システインから生じる相互作用を最小化する偶数個有する。

10

【0081】

他の実施形態において、関連の核酸分子は、少なくとも1つのアミノ酸挿入を有する配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチド（ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する）をコードするヌクレオチド配列、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有する配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチド（ここで、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する）をコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる。関連の核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチド（ここで、このポリペプチドは、カルボキシ末端短縮および／またはアミノ末端短縮を有し、さらにこのポリペプチドは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する）をコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる。関連の核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチド（ここで、このポリペプチドは、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシ末端短縮およびアミノ末端短縮からなる群より選択される改変の少なくとも1つを有し、このポリペプチドは、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する）をコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこれらからなる。

20

30

【0082】

さらに、配列番号2、配列番号4または配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のB7RP-2ポリペプチドは、相同なポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成され得るか、または異種のポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成され得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：B7RP-2融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその一部（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合するリガンドまたはその一部；触媒的に活性な酵素またはその一部；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブリン定常領域）；ならびに配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のB7RP-2ポリペプチドとは異なる治療活性を有するポリペプチド。

40

【0083】

融合は、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のB7RP-2ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかでなされ得る。融合は、リンカーもしくはアダプター分子を含まずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプタ

50

一分子は、1つ以上のアミノ酸残基（代表的には、約20～約50個のアミノ酸残基）であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、DNA制限エンドヌクレアーゼ、または融合部分の分離を可能にするプロテアーゼの切断部位を有して設計され得る。融合ポリヌクレオチドは、一旦構築されると、本明細書中に記載される方法に従って誘導体化され得る、ということが明らかである。

【0084】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号2、配列番号4もしくは配列番号6のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のB7RP-2ポリペプチドは、ヒトIgGのFc領域の1つ以上のドメインに融合される。抗体は、2つの機能的に独立した部分（抗原を結合する「Fab」として知られる可変ドメイン、ならびにエフェクター機能（例えば、補体活性化および食細胞による攻撃）に關与する「Fc」として知られる定常ドメイン）を含む。Fcが長い血清半減期を有する一方、Fabは寿命が短い。Caponら、1989、Nature 337:525-31。治療剤タンパク質と一緒に構築された場合、Fcドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはFcレセプター結合、プロテインA結合、補体結合、およびおそらくまさに胎盤移入のような機能を組み込み得る（前述）。表IIは、当該分野において公知の特定のFc融合物の使用を要約する。

10

【0085】

【表2-1】

表 II

治療タンパク質とのFc融合

20

Fcの形態	融合パートナー	治療との関連	参考文献
IgG1	CD30-LのN末端	ホジキン病; 未分化リンパ腫; T細胞白血病	U.S. Patent No. 5,480,981
マウス Fcγ2a	IL-10	抗炎症; 移植拒絶	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30

30

【0086】

【表2-2】

IgG, IgA, IgM, または IgE (第1ドメインを除く)	TNF レセプター	炎症 自己免疫障害	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 レセプター	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2 の N 末端	抗癌、抗ウイルス	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPG の C 末端	変形性関節症; 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンの N 末端	抗肥満	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
ヒト Ig C γ 1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

10

1 例において、ヒト I g G ヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域は、当業者に公知の方法を使用して、B 7 R P-2 ポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端のいずれかで融合され得る。別の例において、ヒト I g G ヒンジ領域、C H 2 領域および C H 3 領域は、B 7 R P-2 ポリペプチドフラグメント（例えば、B 7 R P-2 ポリペプチドの推

20

【0087】

生じた B 7 R P-2 融合ポリペプチドは、プロテイン A アフィニティカラムの使用によって精製され得る。F c 領域に融合されたペプチドおよびタンパク質は、融合されていない対象物よりも実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、F c 領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化／多量体化を可能にする。F c 領域は、天然に存在する F c 領域であり得るか、または、特定の品質（例えば、治療的な品質）、循環時間、または減少した凝縮を改善するために変更され得る。

【0088】

関連の核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に算出される。このような方法としては、以下に記載される方法が挙げられるがこれらに限定されない：Computational Molecular Biology (A. M. Lesk 編, Oxford University Press 1988) ; Biocomputing: Informatics and Genome Projects (D. W. Smith 編, Academic Press 1993) ; Computer Analysis of Sequence Data (Part 1, A. M. Griffin および H. G. Griffin 編, Humana Press 1994) ; G. von Heijne, Sequence Analysis in Molecular Biology (Academic Press 1987) ; Sequence Analysis Primer (M. Gribskov および J. D

30

40

【0089】

同一性および／または類似性を決定する好ましい方法は、試験された配列間で最大一致を与えるように設計される。同一性および類似性を決定する方法は、公的に利用可能なコンピュータプログラムに記載される。2つの配列間での同一性および類似性を決定する好ましいコンピュータプログラム法としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：GAPを含むGCGプログラムパッケージ (Devereux ら, 1984, Nucleic Acids Res. 12:387 ; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)

50

、BLASTP、BLASTNおよびFASTA (Altschulら, 1990, J. Mol. Biol. 215:403-10)。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他の供給源 (Altschulら, BLAST Manual (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschulら, 1990, 上述) から公的に利用可能である。周知のSmith Watermanアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【0090】

2つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアラインメントスキームは、この2つの配列の短い領域のみの一致を生じ得、そしてこの整列した小さな領域は、たとえ2つの全長配列間で有意な関係が存在しなくても非常に高い配列同一性を有し得る。よって、好ましい実施形態において、選択された整列法 (GAPプログラム) は、本発明のポリペプチドの少なくとも50個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0091】

例えば、コンピュータープログラムGAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性パーセントが決定されるべき2つのポリペプチドは、これらのそれぞれのアミノ酸の最適な一致 (アルゴリズムによって決定されるような「一致したスパン」) のために整列される。ギャップ開放ペナルティー (3×平均対角線 (diagonal) として算出される; 「平均対角線」は、比較マトリクスが使用される対角線の平均である; 「対角線」は、特定の比較マトリクスによる各完全アミノ酸一致に割り当てられるスコアまたは数である) およびギャップ伸長ペナルティー (これは、通常、0.1×ギャップ開放ペナルティーである)、ならびに比較マトリクス (例えば、PAM250またはBLOSUM62) が、アルゴリズムと組合わせて使用される。標準的比較マトリクスがまた、アルゴリズムによって使用される (Dayhoffら, 5 Atlas of Protein Sequence and Structure (Supp. 3 1978) (PAM250比較マトリクス); Henikoffら, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915-19 (BLOSUM 62比較マトリクス) を参照のこと)。

【0092】

ポリペプチド配列比較についての好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:
アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-53;
比較マトリクス: BLOSUM 62 (Henikoffら, 上述)
ギャップペナルティー: 12
ギャップ長ペナルティー: 4
類似性の閾値: 0
GAPプログラムは、上記のパラメータで有用である。上述のパラメータは、(エンドギャップに対するペナルティーなしとともに) GAPアルゴリズムを使用するポリペプチド比較のためのデフォルトパラメータである。

【0093】

核酸分子配列比較のために好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる:
アルゴリズム: NeedlemanおよびWunsch, 上述
比較マトリクス: 一致=±10、不一致=0
ギャップペナルティー: 50
ギャップ長ペナルティー: 3
GAPプログラムはまた、上記のパラメータで有用である。上述のパラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。

【0094】

他の例示的アルゴリズム (ギャップ開放ペナルティー、ギャップ伸長ペナルティー、比較

マトリクス、および類似性の閾値) (Program Manual, Wisconsin Package, バージョン9, 1997年9月に示されるアルゴリズムを含む) が、使用され得る。なされるべき特定の選択は当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較(例えば、DNA-DNA、タンパク質-タンパク質、タンパク質-DNA)に依存し、さらに、この比較が、配列の所定の対の間(この場合、GAPまたはBest Fitが一般に好ましい)またはある配列と大きな配列データベースとの間(この場合、FASTAまたはBLASTAが好ましい)のいずれかに依存する。

【0095】

(核酸分子)

B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、化学合成、cDNAライブラリースクリーニングもしくはゲノムライブラリースクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および/またはcDNAのPCR増幅が挙げられるがこれらに限定されない種々の様式で容易に取得され得る。 10

【0096】

本明細書中で使用される組換えDNA法は、一般に以下に示される方法である: Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) および/または Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編, Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994)。本発明は、本明細書中に記載されるような核酸分子およびこのような分子を得るための方法を提供する。 20

【0097】

B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子がある種から同定された場合、この遺伝子の全てまたは一部をプローブとして使用して、同一種由来のオルソログまたは関連遺伝子を同定し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、B7RP-2ポリペプチドを発現すると考えられている種々の組織供給源からcDNAライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号1、配列番号3または配列番号5のいずれかに示される配列を有する核酸分子の一部または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングしてB7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。典型的には、中程度のストリンジェンシー条件または高ストリンジェンシー条件が、スクリーニングから得られる偽陽性の数を最小化するためのスクリーニングのために使用される。 30

【0098】

B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現したタンパク質の特性に基づくポジティブクローンの検出を使用する発現クローニングによって同定され得る。典型的には、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー(例えば、レセプターまたはリガンド)を結合することによってスクリーニングされて、宿主細胞に発現されてその表面上に提示されるタンパク質をクローニングする。抗体および結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。 40

【0099】

以下に示される記載に従って行われる組換え発現技術を、これらのポリヌクレオチドを産生するために、そしてコードされるポリペプチドを発現するために続け得る。例えば、B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望のヌクレオチド配列を容易に産生し得る。次いで、この配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを作製し得る。あるいは、B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、発現ベクターに挿入され得る。適切な宿主に発現ベクターを導入することによって、コードされたB7RP-2ポリペプチドは、多量に産生され得る。

【0100】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）である。この方法において、cDNAは、酵素（逆転写酵素）を使用してポリ（A）+RNAまたは総RNAより調製され得る。次いで、2つのプライマー（典型的には、B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするcDNAの2つの別々の領域に相補的な）が、TaqポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにcDNAに添加され、そしてこのポリメラーゼは、2つのプライマー間のcDNA領域を増幅する。

【0101】

B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Engelsら、1989、Angew. Chem. Intl. Ed. 28:716-34に記載される手段のような、当業者に周知の方法を使用する化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル法、ホスホルアミダイド法およびH-ホスホネート法が挙げられる。このような化学合成に好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイド化学を使用するポリマー支持された合成である。典型的には、B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードするDNAは、数百ヌクレオチド長である。約100ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用していくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、このフラグメントを一緒に連結して、B7RP-2遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、ポリペプチドのアミノ末端をコードするDNAフラグメントはATGを有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞中で産生されたB7RP-2ポリペプチドがこの細胞から分泌されるように設計されているか否かに依存して、このポリペプチドの成熟形態上に存在してもしなくてもよい。当業者に既知の他の方法もまた使用され得る。

【0102】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞において最適なB7RP-2ポリペプチド発現のために改変されているコドンを含む。特定のコドン変更は、B7RP-2ポリペプチドおよび発現のために選択された宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞中で高度に発現される遺伝子における使用のために好ましいコドンを選択することによって）行われ得る。高度に発現される細菌性遺伝子のコドン嗜好（preference）のための「Eco_high.cod」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてUniversity of Wisconsin Package Version 9.0（Genetics Computer Group, Madison, WI）によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、以下が挙げられる：「Celegans-high.cod」、「Celegans-low.cod」、「Drosophila-high.cod」、「Human-high.cod」、「Maize-high.cod」および「Yeast-high.cod」。

【0103】

いくつかの場合において、B7RP-2ポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが好ましくあり得る。改変体をコードする核酸分子は、部位特異的変異誘発、PCR増幅、または他の適切な方法を使用して産生され得、ここで、プライマーは、所望の点変異を有する（変異誘発技術の記載については、Sambrookら、上述、およびAusubelら、上述、を参照のこと）。Engelら（上述）によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に既知の他の方法もまた、使用され得る。

【0104】

（ベクターおよび宿主細胞）

B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、標準的連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入される。ベクターは、典型的には、使用される特定の宿主細胞中で機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、宿主細胞機構に適合可能であり、その結果、遺伝子増幅および／または遺伝子発現が生じ得る）。B7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞

胞、昆虫宿主細胞（バキュロウイルス系）および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、B7RP-2ポリペプチドが翻訳後修飾で改変されるべきか否かに一部依存する（例えば、グリコシル化および／またはリン酸化）。そうならば、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、*Met h. En z.*, vol. 185 (D. V. Go ed d e l 編, A c a d e m i c P r e s s 1990)を参照のこと。

【0105】

典型的には、宿主細胞のいずれかにおいて使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列、ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。特定の実施形態において、このような配列（「隣接配列」と総称される）は、典型的には1つ以上の以下のヌクレオチド配列を含む：プロモーター、1つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終止配列、ドナースプライシング部位およびアクセプタースプライシング部位を含む完全イントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるべきポリペプチドをコードする核酸の挿入のためのポリリンカー領域、ならびに選択マーカーエレメント。これらの配列の各々は、以下に論じられる。

10

【0106】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、B7RP-2ポリペプチドコード配列の5'末端または3'末端に位置するオリゴヌクレオチド分子）を含み得；そのオリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、または別の「タグ」（例えば、FLAG、HA（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはmyc（これらに対しては、市販の抗体が存在する））をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にそのポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、B7RP-2ポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとしてタグに対する抗体を使用する、カラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、そのタグは、続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような種々の手段によって、精製されたB7RP-2ポリペプチドから除去される。

20

【0107】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種由来および／または同じ系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種以外または宿主細胞系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、B7RP-2ポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、その隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

30

【0108】

本発明のベクター中において有用な隣接配列は、当該分野において周知であるいくつかの方法のいずれかによって得られ得る。代表的には、B7RP-2遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は、公知であり得る。ここで、その隣接配列は、核酸合成またはクローニングのための本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

40

【0109】

その隣接配列の全てもしくは一部のみが既知である場合、PCRを使用して、そして／または適切なオリゴヌクレオチドおよび／もしくは同じ種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって、その隣接配列は得られ得る。その隣接配列が既知でない場合、隣接配列を含むDNAフラグメントが

50

、例えば、コード配列または別の遺伝子を含み得る、より大きなDNA片から単離され得る。単離は、適切なDNAフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、その後のアガロースゲル精製を使用する単離、Qiagen（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Chatworth、CA）、または当業者に公知の他の方法によって、達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【0110】

複製起点は、代表的には、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、その起点は、宿主細胞においてそのベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数へのベクターの増幅は、いくつかの場合において、B7RP-2ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、既知の配列に基づいて複製起点が化学合成され得、そしてそのベクター中に連結され得る。例えば、プラスミドpBR322（New England Biolabs, Beverly, MA）由来の複製起点は、大部分のグラム陰性細菌にとって適切であり、そして種々の起点（例えば、SV40の起点、ポリオーマの起点、アデノウイルスの起点、水疱性口内炎ウイルス（VSV）の起点、またはパピローマウイルス（例えば、HPVもしくはBPV）の起点）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクター中には必要とされない（例えば、SV40起点は、初期プロモーターを含むという理由だけで、しばしば、使用される）。

10

【0111】

転写終結配列は、代表的には、ポリペプチドコード領域の末端の3'側に位置し、そしてその転写終結配列は、転写を終結させる働きをする。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、G-Cリッチフラグメント、続いてポリT配列である。この配列は、ライブラリーから容易にクローン化されるか、またはベクターの一部として市販さえされているが、この配列はまた、本明細書中に記載される方法のような核酸合成方法を使用して、容易に合成され得る。

20

【0112】

選択マーカー遺伝子エレメントは、選択培養培地において増殖される宿主細胞の生存および増殖に必要なタンパク質をコードする。代表的な選択マーカー遺伝子は、（a）原核生物宿主細胞に対して、抗生物質または他の毒素（例えば、アンピシリン、テトラサイクリン、またはカナマイシン）に対する耐性を与えるタンパク質をコードするか、（b）細胞の栄養要求性欠損を補うタンパク質をコードするか、あるいは（c）複合培地から入手可能ではない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。好ましい選択マーカーは、カナマイシン耐性遺伝子、アンピシリン耐性遺伝子、およびテトラサイクリン耐性遺伝子である。ネオマイシン耐性遺伝子もまた、原核生物宿主細胞および真核生物宿主細胞における選択のために使用され得る。

30

【0113】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に必要なタンパク質の産生のために大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続する世代の染色体においてタンデムに反復されるプロセスである。哺乳動物細胞にとって適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞形質転換体は、選択圧下に置かれ、その選択圧下で、その形質転換体のみが、そのベクター中に存在する選択遺伝子によって生存するように独自に適合される。選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子とB7RP-2ポリペプチドをコードするDNAとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって課される。結果として、増加した量のB7RP-2ポリペプチドが、増幅されたDNAから合成される。

40

【0114】

リボソーム結合部位は、通常、mRNAの翻訳開始に必要であり、そしてShine-Dalgarno配列（原核生物）またはKozak配列（真核生物）によって特徴付けら

50

れる。このエレメントは、代表的には、発現されるべきB7RP-2ポリペプチドのプロモーターの3'側でありかつコード配列の5'側に位置する。そのShine-Dalgarno配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いA-G含量）である。多くのShine-Dalgarno配列は、同定されており、それぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクター中で使用され得る。

【0115】

リーダー配列またはシグナル配列は、宿主細胞から外へとB7RP-2ポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、B7RP-2核酸分子のコード領域に位置するか、または直接B7RP-2ポリペプチドコード領域の5'末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能性であるシグナル配列のいずれもが、B7RP-2核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、B7RP-2核酸分子に対して同種であっても（天然に存在しても）または異種であってもよい。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学合成され得る。多くの場合、シグナルペプチドの存在を介する宿主細胞からのB7RP-2ポリペプチドの分泌は、分泌されたB7RP-2ポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。そのシグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはそのシグナル配列は、ベクター中に挿入されたB7RP-2核酸分子の一部であり得る。

10

【0116】

B7RP-2ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブB7RP-2ポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、またはB7RP-2ポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用が、本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセッシングされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなB7RP-2ポリペプチドシグナル配列を認識せずプロセッシングしない原核生物宿主細胞のために、そのシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、そのネイティブなB7RP-2ポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、 α 因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、このネイティブシグナル配列が十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

20

30

【0117】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいようないくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列を加え得、このことはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）-1位に、発現に付随して1つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、この1つ以上のさらなるアミノ酸は、完全に除去されていないかもしれない。例えば、その最終タンパク質産物は、アミノ末端に結合された、ペプチダーゼ切断部位において見出される1つまたは2つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、その酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合、所望のB7RP-2ポリペプチドの少し短縮した形態を生じ得る。

40

【0118】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の1つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に、使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合に、B7RP-2遺伝子内に天然で存在し得る。そのイントロンが遺伝子内に天然で存在しない（大部分のcDNAについての）場合、そのイントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびB7RP

50

ー2遺伝子に対するイントロンの位置は、そのイントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、B7RP-2 cDNA分子が転写される場合、そのイントロンの好ましい位置は、転写開始部位の3'側でありかつポリA転写終結配列の5'側である。好ましくは、そのイントロンは、コード配列を中断しないように、そのcDNAの一方の側または他方の側（すなわち、5'側または3'側）に位置する。任意の供給源（ウイルス生物、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンが本発明を実行するために使用され得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞と適合性である。合成イントロンもまた、本明細書中に含まれる。必要に応じて、1つより多くのイントロンが、ベクター内で使用され得る。

【0119】

10

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、そしてB7RP-2ポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結された、プロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する、その構造遺伝子の開始コドンに対して上流（すなわち、5'側）に（一般的に、約100～1000bp内に）位置する非転写配列である。プロモーターは、従来、2つのクラス（誘導プロモーターおよび構成的プロモーター）のうちの1つにグループ分けされる。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくらかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答して、その誘導プロモーターの制御下にあるDNAからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成的プロモーターは、継続的な遺伝子産物産生を開始する；すなわち、遺伝子発現に対する制御がほとんど存在しないかまたは全く存在しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が、周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクター中に挿入することによって、B7RP-2ポリペプチドをコードするDNAに作動可能に連結される。ネイティブなB7RP-2プロモーター配列は、B7RP-2核酸分子の増幅および／または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して多量の発現タンパク質の転写および収量が可能である場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

20

【0120】

原核生物宿主との使用に適切なプロモーターとしては、 β -ラクタマーゼ系およびラクトースプロモーター系；アルカリホスファターゼ；トリプトファン（trp）プロモーター系；およびハイブリッドプロモーター（例えば、tacプロモーター）が挙げられる。他の公知の細菌プロモーターもまた、適切である。このプロモーター配列は、公開されており、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらのプロモーター配列を連結し得る。

30

【0121】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーが、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ウイルス（例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス40（SV40））のゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

40

【0122】

B7RP-2遺伝子発現を制御する際に興味深くあり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：SV40初期プロモーター領域（Bernois et al. および Chambon, 1981, Nature 290:304-10）；CMVプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの3'長末端反復に含まれるプロモーター（Yamamoto

50

t oら、1980, *Cell* 22:787-97) ; ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター (Wagnerら、1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78:1444-1445) ; メタロチオネイン遺伝子の調節配列 (Brinsterら、1982, *Nature* 296:39-42) ; β -ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター (Villal-Kamaroffら、1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75:3727-3731) ; またはtacプロモーター (DeBoerら、1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80:21-25) 。組織特異性を示しかつトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた興味深い：膵臓腺房細胞において活性な、エラスターゼI 遺伝子制御領域 (Swiftら、1984, *Cell* 38:639-646 ; Ornitzら、*Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986) ; MacDonald、1987, *Hepatology* 7:425-515) ; 膵臓 β 細胞において活性な、インシュリン遺伝子制御領域 (Hanahan、1985, *Nature* 315:115-22) ; リンパ球において活性な、免疫グロブリン遺伝子制御領域 (Grosschedlら、1984, *Cell* 38:647-658 ; Adamesら、1985, *Nature* 318:533-538 ; Alexanderら、1987, *Mol. Cell. Biol.* 7:1436-1444) ; 精巣細胞、乳房細胞、リンパ球細胞、および肥満細胞において活性な、マウス乳腺癌ウイルス制御領域 (Lederら、1986, *Cell* 45:485-495) ; 肝臓において活性な、アルブミン遺伝子制御領域 (Pinkertら、1987, *Genes and Devel.* 1:268-276) ; 肝臓において活性な、 α -フェトプロテイン遺伝子制御領域 (Krumlaufら、1985, *Mol. Cell. Biol.* 5:1639-1648 ; Hammerら、1987, *Science* 235:53-58) ; 肝臓において活性な、 α 1-抗トリプシン遺伝子制御領域 (Kelseyら、1987, *Genes and Devel.* 1:161-171) ; 骨髄性細胞において活性な、 β -グロビン遺伝子制御領域 (Mogramら、1985, *Nature* 315:338-340 ; Kolliasら、1986, *Cell* 46:89-94) ; 脳の稀突起神経膠細胞において活性な、ミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域 (Readheadら、1987, *Cell* 48:703-712) ; 骨格筋において活性な、ミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域 (Sani、1985, *Nature* 314:283-286) ; ならびに視床下部において活性な、性腺刺激ホルモン放出ホルモン遺伝子制御領域 (Masonら、1986, *Science* 234:1372-1378) 。

【0123】

エンハンサー配列は、高等真核生物による本発明のB7RP-2 ポリペプチドをコードするDNAの転写を増加するように、ベクター中に挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるようにプロモーターに作用する、通常約10~300bpの長さのDNAのシス作用性エレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に依存しない。これらは、転写単位に対して5'側および3'側に見出されている。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が、公知である (例えば、グロビンエンハンサー配列、エラスターゼエンハンサー配列、アルブミンエンハンサー配列、 α -フェトプロテインエンハンサー配列およびインシュリンエンハンサー配列) 。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。SV40エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化のための例示的な増強エレメントである。エンハンサーは、B7RP-2 核酸分子に対して5'側または3'側の位置でベクター中にスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから5'側の部位に位置する。

【0124】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構築され得る。そのようなベクターは、望ましい隣接配列すべてを含んでも良いし、含まなくても良い。本明

細書中に記載される望ましい隣接配列のうちの1つ以上が未だベクター中に存在しない場合、それらの隣接配列は、個々に得られ得、そのベクター中に連結され得る。その隣接配列の各々を得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【0125】

本発明を実行するために好ましいベクターは、細菌宿主細胞と適合性のベクター、昆虫宿主細胞と適合性のベクターおよび哺乳動物宿主細胞と適合性のベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3、およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR-α (PCT公開番号WO 90/14363) ならびにpFastBacDual (Gibco-BRL、Grand Island、NY) が挙げられる。

【0126】

さらなる適切なベクターとしては、限定しないが、コスミド、プラスミド、または改変ウイルスが挙げられるが、これらのベクター系は、選択された宿主細胞と適合性でなければならないことが理解される。このようなベクターとしては、限定しないが、プラスミド (例えば、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド、Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA)、Taq増幅PCR産物をクローニングするために設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit、PCR2.1 (登録商標) プラスミド誘導体、Invitrogen、Carlsbad、CA))、ならびに哺乳動物ベクター、酵母ベクターまたはウイルスベクター (例えば、バキュロウイルス発現系 (pBacPAKプラスミド誘導体、Clontech、Palo Alto、CA)) が挙げられる。

【0127】

ベクターが構築され、そしてB7RP-2ポリペプチドをコードする核酸分子がそのベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが、増幅および/またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞中に挿入され得る。B7RP-2ポリペプチドについての発現ベクターを、選択された宿主細胞へ形質転換することは、以下を含む周知の方法によって達成され得る：例えば、トランスフェクション法、感染法、塩化カルシウム法、エレクトロポレーション法、マイクロインジェクション法、リポフェクション法、またはDEAEーデキストラン法あるいは他の公知の技術。選択された方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型の相関的要素である。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そしてこれらは、例えば、Sambrookら (前出) に示されている。

【0128】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞 (例えば、E. coli) であっても、真核生物宿主細胞 (例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であってもよい。その宿主細胞は、適切な条件下で培養された場合、B7RP-2ポリペプチドを合成し、このB7RP-2ポリペプチドは、その後、(その宿主細胞がこのB7RP-2ポリペプチドを培地に分泌する場合に) 培養培地から収集され得るか、または(このB7RP-2ポリペプチドが分泌されない場合には) このB7RP-2ポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集され得る。適切な宿主細胞の選択は、種々の要因 (例えば、所望の発現レベル、活性に望ましいかもしくは必要とされるポリペプチド修飾 (例えば、グリコシル化またはリン酸化)、および生物学的に活性な分子へのフォールディングの容易さ) に依存する。

【0129】

多くの適切な宿主細胞が、当該分野において公知であり、多くが、American Type Culture Collection (ATCC)、Manassas, VA から入手可能である。例としては、哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巢

細胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaubら、1980, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97: 4216-4220)、ヒト胚性腎臓 (HEK) 293細胞または293T細胞、あるいは3T3細胞が挙げられるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞の選択、ならびに形質転換のための方法、培養のための方法、増幅のための方法、スクリーニングのための方法、産物生成のための方法、および精製のための方法が、当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1細胞株およびCOS-7細胞株、ならびにCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株および齧歯類動物細胞株 (形質転換細胞株を含む) が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物由来の細胞株、ならびに初代外植片もまた、適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠き得るか、または優性作用性選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない: マウス神経芽細胞腫N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、Swissマウス、Balb-cマウスまたはNIHマウスから誘導された3T3株、BHKハムスター細胞株またはHaKハムスター細胞株。これらの細胞株の各々は、タンパク質発現の分野の当業者によって知られており、そして入手可能である。

【0130】

同様に、細菌細胞が、本発明に適切な宿主細胞として有用である。例えば、E. coliの種々の菌株 (例えば、HB101、DH5α、DH10、およびMC1061) は、生物工学の分野において宿主細胞として周知である。B. subtilis、Pseudomonas spp.、他のBacillus spp.、Streptomyces spp.などの種々の菌株もまた、本方法において使用され得る。

【0131】

当業者に公知の酵母細胞の多くの菌株もまた、本発明のポリペプチドの発現のため宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0132】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら、1993、Biotechniques, 14: 810-817; Lucklow、1993、Curr. Opin. Biotechnol. 4: 564-572; およびLucklowら、1993、J. Virol., 67: 4566-4579に記載される。好ましい昆虫細胞は、Sf-9およびHi5 (Invitrogen) である。

【0133】

グリコシル化B7RP-2ポリペプチドを発現するために、トランスジェニック動物もまた使用され得る。例えば、トランスジェニック乳汁産生動物 (例えば、ウシまたはヤギ) が使用され得、本発明のグリコシル化ポリペプチドが動物の乳汁中にて得られ得る。B7RP-2ポリペプチドを産生するために、植物もまた使用され得る。しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において生じるグリコシル化とは異なり、ヒト治療用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【0134】

(ポリペプチド産生)

B7RP-2ポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。その培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。E. coli細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Luria Broth (LB) および/またはTerrific Broth (TB) が挙げられる。真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal Essential Medium (MEM) および/またはDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げ

られ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞培養物についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解産物、および／またはウシ胎仔血清を補充した、グレース培地である。

【0135】

代表的に、トランスフェクトされた細胞または形質転換された細胞の選択的な増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、培地に補充物質として加えられる。使用される化合物は、宿主細胞が形質転換されるプラスミドに存在する選択マーカーエレメントによって、検出可能である。例えば、選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリン、およびネオマイシンが挙げられる。 10

【0136】

宿主細胞によって産生される B7RP-2 ポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分離、免疫沈降、および／または活性アッセイ (例えば、DNA 結合ゲルシフトアッセイ) が挙げられる。

【0137】

B7RP-2 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計される場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中に見出され得る。しかし、B7RP-2 ポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および／または核 (真核宿主細胞について) に、あるいは、細胞質ゾル (グラム細菌宿主細胞について) に存在する。 20

【0138】

宿主細胞の細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) に位置するかあるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞について) に位置する B7RP-2 ポリペプチドについて、細胞内物質 (グラム陰性細菌について封入体を含む) が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理、ならびにそれらの後の遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

【0139】

B7RP-2 ポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内側および／または外側の細胞膜に結合され得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、pH 極限值で処理され得るか、あるいはジチオスレイトールのような還元剤の存在下でアルカリ性の pH にて、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下で酸性の pH にて、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理されて、封入体が放出され得、封入体が分断され得、そして封入体が溶解され得る。次いで、可溶化 B7RP-2 ポリペプチドが、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。B7RP-2 ポリペプチドを単離することが所望される場合、単離は、本明細書中および Marston ら、1990, Meth. Enz., 182: 264-275 に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。 30 40

【0140】

いくつかの場合、B7RP-2 ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でなくても良い。ポリペプチドをその三次構造に「再折り畳み」または変換し、そしてジスルフィド結合を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回復し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドを、通常は、7 より上の pH および特定の濃度のカオトロプ (chaotrope) の存在に曝露する工程を包含する。カオトロプの選択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロプはより低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロプと必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、 50

特定の酸化還元電位を生じ、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン（GSH）／ジチオビスGSH、塩化第二銅、ジチオトレイトール（DTT）／ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール（bME）／ジチオ-b（ME）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が、再折り畳みの効率を増加するのに使用され得るかまたは必要とされ得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【0141】

封入体がB7RP-2ポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後の上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

10

【0142】

溶液からのB7RP-2ポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（B7RP-2ポリペプチド／ヘキサHis）のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、FLAG（Eastman Kodak Co., New Haven, CT）またはmyc（Invitrogen, Carlsbad, CA））をそのカルボキシル末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグに対して高い親和性を有するアフィニティークラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

20

【0143】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性を有して結合する。従って、ニッケルのアフィニティークラム（例えば、Qiagen（登録商標）ニッケルカラム）は、B7RP-2ポリペプチド／ポリHisの精製のために使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology § 10.11.8（Ausubelら編，Green Publishers Inc. およびWiley and Sons（1993））を参照のこと。

【0144】

さらに、B7RP-2ポリペプチドは、B7RP-2ポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

30

【0145】

精製のための他の適切な手段としては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー（molecular sieve chromatography）、HPLC、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）、その後のゲル溶出、および分取用等電点電気泳動（「Isoprime」machine／technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA）が挙げられる。いくつかの場合において、2つ以上の精製技術を、増加した純度を達成するために組み合わせ得る。

【0146】

B7RP-2ポリペプチドはまた、Merrifieldら，1963，J. Am. Chem. Soc. 85:2149；Houghtenら，1985，Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132；ならびに、StewartおよびYoung，Solid Phase Peptide Synthesis（Pierce Chemical Co. 1984）に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さずに合成され得る。化学合成されたB7RP-2ポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化されて、ジスルフィド結合を形成し得る。化学的に合成されたB7RP-2ポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製された対応するB7RP-2ポリペ

40

50

プチドに匹敵する生物学的活性を有することが期待され、従って、組換えまたは天然の B 7 R P-2 ポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【0147】

B 7 R P-2 ポリペプチドを得る別の手段は、B 7 R P-2 ポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、B 7 R P-2 ポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生された B 7 R P-2 ポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用してモニターされ得る。

【0148】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、B 7 R P-2 ポリペプチドに対する特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Robert s ら, 1997, Proc. Nat l. Acad. Sci. U. S. A. 94: 12297-303 を参照のこと。これは、mRNA とそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Robert s, 1999, Curr. Opin. Chem. Biol. 3: 268-73 もまた参照のこと。さらに、米国特許第 5, 824, 469 号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、オリゴヌクレオチドの異種性プールを生成する工程を包含し、各々、5' ランダム化配列、中央部の予備選択配列、および 3' ランダム化配列を有する。得られる異種性プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、予め決定された生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を発揮し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【0149】

米国特許第 5, 763, 192 号；同第 5, 814, 476 号；同第 5, 723, 323 号；および同第 5, 817, 483 号は、ペプチドまたはポリペプチドを産生するためのプロセスを記載する。これは、確率論的な遺伝子またはそのフラグメントを産生し、次いで、その確率論的な遺伝子によってコードされる 1 以上のタンパク質を産生する宿主細胞にこれらの遺伝子を導入することによって達成される。次いで、この宿主は、所望の活性を有するペプチドまたはポリペプチドを産生する、これらのクローンを同定するためにスクリーニングされる。

【0150】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Athersys, Inc. によって出願された PCT/US 98/20094 (WO 99/15650 に記載される。「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD) として知られるように、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えまたは非正統的 (illegitimate) 組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的 DNA は、まず、照射に供せられ、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方に最終的に開始点 (break) を配置し、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を引き起こす。

【0151】

これらの方法はまた、包括的な B 7 R P-2 ポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、これは、続いて、種々のアッセイ (例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ (例えば、植物、マウスなど)) において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【0152】

(合成)

10

20

30

40

50

本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子が、組換え手段および他の手段によって生成され得ることが、当業者により理解される。

【0153】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」とは、1つ以上のB7RP-2ポリペプチドに対する特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を用いて調製され得る。本発明の例示的なB7RP-2ポリペプチド選択的結合因子は、B7RP-2ポリペプチドの特定の部分に結合し得、これによってB7RP-2ポリペプチドレセプターへのこのポリペプチドの結合を阻害する。

10

【0154】

選択的結合因子（例えば、B7RP-2ポリペプチドに結合する抗体および抗体フラグメント）は、本発明の範囲内にある。抗体は、一特異性ポリクローナル抗体を含むポリクローナル抗体、モノクローナル(MAbs)抗体；組換え抗体；キメラ抗体；ヒト化抗体（例えば、相補性決定領域(CDR)移植片化抗体）；ヒト抗体；単鎖抗体；および／または二重特異性抗体；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントとしては、B7RP-2ポリペプチド上のエピトープに結合する抗体の一部が挙げられる。このようなフラグメントの例としては、全長の抗体の酵素的切断によって生じるFabおよびF(ab')フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現）によって生じるものが挙げられる。

20

【0155】

B7RP-2ポリペプチドに対するポリクローナル抗体は、一般的に、動物（例えば、ウサギまたはマウス）において、B7RP-2ポリペプチドおよびアジュバントの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって産生される。B7RP-2ポリペプチドが、免疫させるためにその種において免疫原性であるキャリアタンパク質（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビター）と結合するのに有用であり得る。また、凝集剤（例えば、ミョウバン）は、免疫応答を増強するために用いられる。免疫後、これらの動物は、飼育され、そしてこの血清を抗B7RP-2抗体力価についてアッセイする。

30

【0156】

B7RP-2ポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する任意の方法を用いて産生される。モノクローナル抗体を調製するための適切な方法の例としては、Kohlerら、1975, Nature, 256: 495-497のハイブリドーマ法、およびヒトB細胞ハイブリドーマ法(Kozbor, 1984, J. Immunol., 133: 3001)；Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987)が挙げられる。B7RP-2ポリペプチドと反応するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株もまた、本発明によって提供される。

40

【0157】

本発明のモノクローナル抗体は、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、特定の種由来の抗体あるいは特定の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体において、重(H)鎖および／または軽(L)鎖の一部が対応する配列と同一であるか、または相同であるが、その鎖の残部は、別の種由来の抗体または別の抗体のクラスまたはサブクラスに属する抗体において、対応する配列と同一であるかまたは相同である、「キメラ」抗体である。このような抗体のフラグメントもまた、これらのフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、含まれる。米国特許第4,816,567号；Morrisonら、1985, Proc. Natl. Acad. Sci., 81: 6851-6855を参照のこと。

50

【0158】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第5,585,089号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒトである供給源由来の抗体に導入された1つ以上のアミノ酸残基を有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載された方法（Jonesら, 1986, Nature 321: 522-525; Riechmannら, 1998, Nature, 332: 323-327; Verhoevenら, 1988, Science 239: 1534-1536）を用いて、ヒト抗体の対応する領域についてのげっ歯類相補性決定領域の少なくとも一部分を置換することによって実施され得る。

10

【0159】

B7RP-2ポリペプチドに結合するヒト抗体もまた、本発明に包含される。内因性免疫グロブリン産生の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）を用いて、このような抗体は、必要に応じてキャリアと結合体化される、B7RP-2ポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも6連続アミノ酸を有する）での免疫によって産生される。例えば、Jakobovitsら, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., 90: 2551-55; Jakobovitsら, 1993, Nature 362: 255-58; Bruggemannら, 1993, Year in Immunol., 7: 33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、この動物における重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能力化し、そしてそのゲノム中に、ヒト重鎖および軽鎖のタンパク質をコードする遺伝子座を挿入することによって生成される。次いで、部分的に改変された動物（すなわち、改変の完全未満の補完を有する）を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与された場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む、ヒト（例えば、マウスではなく）アミノ酸配列を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT出願番号PCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245およびPCT出願番号PCT/GB89/01207、ならびに欧州特許546073B1および同546073A1に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現によってか、またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

20

30

【0160】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーから産生され得る（Hoogenboomら, 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; Marksら, 1991, J. Mol. Biol. 222: 581）。これらは、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーの提示を介した模倣免疫選択、およびその後の目的の抗原に対するそれらの結合によってファージの選択をプロセスする。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364に記載されており、これは、このようなアプローチを用いた、MPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性かつ機能的アゴニスト抗体の単離を記載している。

40

【0161】

キメラ抗体、CDR移植抗体、およびヒト化抗体は、組換え方法によって代表的に産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書に記載される材料および手順を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物の宿主細胞（例えば、CHO細胞）において産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書において記載されるように、宿主細胞における組換えDNAの発現によってかまたはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。

【0162】

本発明の抗B7RP-2抗体は、B7RP-2ポリペプチドの検出および定量的ための任

50

意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接のおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)））において用いられ得る。これらの抗体は、用いられるアッセイ方法に適切な親和性を有するB7RP-2ポリペプチドに結合する。

【0163】

診断適用について、特定の実施形態において、抗B7RP-2抗体は、検出可能な部分で標識され得る。検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを産生し得るもののいずれかであり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、または ^{67}Ga ）；蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、もしくは西洋ワサビペルオキシダーゼ（Bayerら、1990, Meth. Enz., 184: 138-63））であり得る。 10

【0164】

競合的結合アッセイは、限られた量の抗B7RP-2抗体と結合するために、試験サンプルの分析物（B7RP-2ポリペプチド）と競合する標識された標準物（例えば、B7RP-2ポリペプチド、またはその免疫学的反応性部分）の能力に依存する。試験サンプル中のB7RP-2ポリペプチドの量は、抗体に結合する標準的な量に反比例する。結合する標準物の量を決定するのを容易にするため、これらの抗体は、代表的に、競合の前後に不溶化され、その結果、これらの抗体に結合された標準物および分析物は、未結合の標準物および分析物から、都合よく分離され得る。 20

【0165】

サンドイッチアッセイは、代表的に、検出および／または定量されるタンパク質の2つの抗体（各々、異なる免疫原性部分、またはエピトープに結合し得る）の使用を含む。サンドイッチアッセイにおいて、試験サンプルの分析物は、代表的に、固体支持体上に固定化された第1抗体に結合し、その後、第2の抗体がこの分析物に結合し、したがって、不溶性の三部複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体に検出可能な部分を標識してもよいし（直接的サンドイッチアッセイ）、検出可能な部分で標識された抗免疫グロブリン抗体を用いて測定してもよい（間接的サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの1つの型は、固相酵素免疫アッセイ（ELISA）であり、この場合、検出可能な部分は、酵素である。 30

【0166】

選択的結合因子（抗B7RP-2抗体を含む）はまた、インビボでのイメージングに有用である。検出可能な部分で標識された抗体は、動物に、好ましくは、血流中に投与され得、そして宿主における標識抗体の存在および位置が、アッセイされる。抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物において検出可能な任意の部分で標識され得る。

【0167】

本発明の選択的結合因子（抗体を含む）は、治療剤として用いられ得る。これらの治療剤は、一般に、これらのいずれかが、B7RP-2ポリペプチドの少なくとも1つの生物学的活性を、それぞれ、増強するかまたは減少させるという点で、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、B7RP-2ポリペプチドに特異的に結合し得、そして、インビボまたはインビトロにおいてB7RP-2ポリペプチドの機能的活性を阻害または排除し得る、抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約50%、そして好ましくは、少なくとも約80%、B7RP-2ポリペプチドの機能的活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、B7RP-2結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得、これによって、インビボまたはインビトロにおいてB7RP-2ポリペプチド活性を阻害または排除する抗B 40 50

7 R P-2 ポリペプチド抗体であり得る。選択的結合因子（アゴニストおよびアンタゴニスト抗 B 7 R P-2 ポリペプチド抗体を含む）は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイによって同定される。

【0168】

本発明はまた、B 7 R P-2 選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいて B 7 R P-2 ポリペプチドのレベルを検出するのに有用な他の試薬を備えるキットに関する。このような試薬は、検出可能な標識、ブロッキング血清、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出試薬を含み得る。

【0169】

（マイクロアレイ）

DNA マイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。DNA マイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置される核酸の小型の高密度アレイである。アレイ内の各セルまたはエレメントは、相補的核酸配列（例えば、mRNA）についてのハイブリダイゼーションのための標的として働く単一核酸種の多数のコピーを有する。DNA マイクロアレイ技術を用いた発現プロファイリングにおいて、mRNA はまず、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識された cDNA に酵素的に変換される。この物質は、このマイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合の cDNA が洗浄によって除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各標的核酸分子に特異的に結合する標識された cDNA の量を定量化することによって可視化される。このように、幾千もの遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットかつ並列様式で定量化され得る。

【0170】

このハイスループット発現プロファイリングは、以下を含むが、これらに限定されない本発明の B 7 R P-2 分子に関して、広い範囲の適用を有する；治療剤のための標的としての B 7 R P-2 疾患関連遺伝子の同定および確証；関連した B 7 R P-2 分子およびそのインヒビターの分子毒物学；治験のための代理マーカーの集団および世代の階層化；ならびに、ハイスループットスクリーニングにおける選択的化合物の同定に役立つことによって向上する関連した B 7 R P-2 ポリペプチド低分子薬物開発。

【0171】

（化学的誘導体）

B 7 R P-2 ポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中に記載された開示を考慮して、当業者によって調製され得る。B 7 R P-2 ポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然に結合した分子の型または位置のいずれかにおいて異なる様式で改変される。誘導体は、1 以上の天然で結合した化学的な基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号 2、配列番号 4、もしくは配列番号 6 または他の B 7 R P-2 ポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、1 以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、それが結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終産物の調製物の治療的用途のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【0172】

各々のポリマーは、任意の分子量であり、そして分枝または非分枝であり得る。各々のポリマーは、代表的に、約 2 kDa ～ 約 100 kDa の間の平均分子量を有する（用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、いくつかの分子が示された分子量より多く、いくぶんかは少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約 5 kDa と 約 50 kDa の間、より好ましくは、約 12 kDa と 約 40 kDa との間、そして最も好ましくは、約 20 kDa と 約 35 kDa との間である。

【0173】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N-結合型またはO-結合型炭水化物、糖、ホスフェート、ポリエチレングリコ

10

20

30

40

50

ール (PEG) (これは、モノー ($C_1 \sim C_{10}$)、アルコキシ、またはアリーロキシポリエチレングリコールを含むタンパク質を誘導体化するために使用された PEG の形態を含む)、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン (例えば、約 6 kD の低分子量デキストラン)、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ (N-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、およびポリビニルアルコール。共有結合した B7RP-2 ポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に包括される。

【0174】

一般に、化学的誘導体化は、タンパク質と活性化ポリマー分子とを反応させるために用いられる任意の適切な条件下で実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製する方法は、一般に、(a) 配列番号 2、配列番号 4、または配列番号 6 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の B7RP-2 ポリペプチドが、1 つ以上のポリマー分子との結合を生じる条件下で、ポリペプチドと活性化ポリマー分子 (例えば、反応性エステルまたはポリマー分子のアルデヒド誘導体) とを反応させる工程、および (b) 反応産物を得る工程、を包含する。最適反応条件は、公知のパラメーターおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子：タンパク質の比がより大きくなればなるほど、ポリマー分子との結合の割合がより多くなる。1 つの実施形態において、B7RP-2 ポリペプチド誘導体は、アミノ末端に単一のポリマー分子の部分を有し得る。例えば、米国特許第 5, 234, 784 号を参照のこと。

【0175】

ポリペプチドのペグ化は、特に、当該分野で公知のペグ化反応のいずれかを使用することによって、特に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載される：Francis ら, 1992, Focus on Growth Factors, 3: 4-10; 欧州特許第 0154316 号および欧州特許第 0401384 号; ならびに米国特許第 4, 179, 337 号。例えば、ペグ化は、本明細書において記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子 (または、アナログ反応水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応について、選択されたポリマーは、単一反応性エステル基を有するべきである。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一反応性アルデヒド基を有するべきである。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド (これは、水溶性である) であるか、またはモノ $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシもしくはそのアリーロキシ誘導体である (米国特許第 5, 252, 714 号を参照のこと)。

【0176】

別の実施形態において、B7RP-2 ポリペプチドは、ビオチンと化学的に結合され得る。次いで、ビオチン/B7RP-2 ポリペプチド分子は、アビジンへの結合が可能となり、四価のアビジン/ビオチン/B7RP-2 ポリペプチド分子を生じる。B7RP-2 ポリペプチドはまた、ジニトロフェノール (DNP) またはトリニトロフェノール (TNP) に共有結合し得、そして得られた結合体は、抗 DNP または抗 TNP-IgM とともに沈澱して 10 の結合価の十量体の結合体を形成し得る。

【0177】

一般に、本発明の B7RP-2 ポリペプチド誘導体の投与によって緩和され得るかまたは調節され得る状態は、B7RP-2 ポリペプチドについて本明細書において記載される状態を含む。しかし、本明細書において開示される B7RP-2 ポリペプチド誘導体は、誘導体化されていない分子と比較した場合、さらなる活性、増強した生物学的活性もしくは減少した生物学的活性、または他の特性 (例えば、増加した半減期もしくは減少した半減期) を有し得る。

【0178】

(遺伝的に操作された非ヒト動物)

10

20

30

40

50

非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜）は、本発明の範囲内にさらに含まれ、ここで、ネイティブ B 7 R P - 2 ポリペプチドをコードする遺伝子は、破壊されており（すなわち「ノックアウト」）、その結果、B 7 R P - 2 ポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するかまたは完全に消失する。このような動物は、米国特許第 5, 557, 032 号に記載されるような技術および方法を用いて調製され得る。

【0179】

本発明はさらに、非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜）を含み、ここで、この動物についての B 7 R P - 2 遺伝子のネイティブな形態または異種 B 7 R P - 2 遺伝子のいずれかは、この動物によって過剰に発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第 5, 489, 743 号および PCT 出願番号 WO 94/28122 に記載されるような、周知の方法を用いて調製され得る。

【0180】

本発明はさらに、非哺乳動物を含み、ここで、本発明の 1 つ以上の B 7 R P - 2 ポリペプチドについてのプロモーターは、1 つ以上のネイティブ B 7 R P - 2 ポリペプチドの発現のレベルを変更するために、（例えば、相同組換え方法を用いることによって）活性化させるかまたは不活性化させるかのいずれかである。

【0181】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が、測定され得る。例えば、薬物候補は、B 7 R P - 2 遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生される B 7 R P - 2 ポリペプチドの量は、動物をその薬物候補に暴露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少させる薬物候補の能力、または病理学的状態を予防もしくは阻害する薬物候補の能力を試験し得る。他の例としては、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の産生が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力、または病理学的状態を予防もしくは阻害する薬物候補の能力を試験し得る。

【0182】

（B 7 R P - 2 ポリペプチド活性の他の調節因子についてのアッセイ）

いくつかの状況において、B 7 R P - 2 ポリペプチドの活性の調節因子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）である分子を同定することが所望され得る。B 7 R P - 2 ポリペプチドを調節する天然分子または合成分子は、本明細書中に記載されるもののような 1 つ以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、注入によるエキソビボ様式またはインビボ様式でか、あるいは経口送達、移植デバイスなどのいずれかで投与され得る。

【0183】

「試験分子」は、B 7 R P - 2 ポリペプチドの活性を調節（すなわち、増加または減少）する能力についての評価の下にある分子をいう。最も一般的には、試験分子は、B 7 R P - 2 ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた B 7 R P - 2 ポリペプチド活性を、例えば、B 7 R P - 2 遺伝子発現に影響を与えることによってか、または B 7 R P - 2 ポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、間接的に調節し得ることも意図される。1 つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} M の親和性定数で B 7 R P - 2 ポリペプチドに結合する。

【0184】

10

20

30

40

50

B7RP-2ポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、B7RP-2ポリペプチドは、試験分子とB7RP-2ポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物中でスクリーニングされ得る。

【0185】

特定の実施形態において、B7RP-2ポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得、これは、B7RP-2ポリペプチドと相互作用して、その活性を調節する。B7RP-2ポリペプチドの発現を調節する分子は、B7RP-2ポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはB7RP-2ポリペプチドの発現を指向もしくは制御する核酸配列に対して相補的である核酸分子、および発現のアンチセンス調節因子として作用する核酸分子を含む。

10

【0186】

一旦、1つの試験分子がB7RP-2ポリペプチドと相互作用するとして同定されると、この分子は、B7RP-2ポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とB7RP-2ポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの様式で実施され得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる。一般に、試験分子は、特定の期間、B7RP-2ポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてB7RP-2ポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために1以上のアッセイによって決定される。

20

【0187】

試験分子とB7RP-2ポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいて、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むB7RP-2ポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイ中で使用され得る。

【0188】

B7RP-2ポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合において、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのB7RP-2ポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、結合パートナーに対するB7RP-2ポリペプチドの結合の速度および／または程度を増加または減少させるその能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。1つのアッセイにおいて、B7RP-2ポリペプチドは、マイクロタイタープレートウェル中で固定される。次いで、放射標識したB7RP-2ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化したB7RP-2ポリペプチド結合パートナー）および試験分子は、このウェルに、1つずつ（いずれかの順序で）または同時にのいずれかで添加され得る。インキュベーション後に、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーション計数器を使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがB7RP-2ポリペプチドに結合する程度を決定する。代表的に、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイの1以上のエレメントを欠く一連のコントロールウェルは、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代わりは、タンパク質の「位置」を逆にする工程を逆にする工程（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してB7RP-2ポリペプチド結合パートナーを固定し、試験分子および放射標識したB7RP-2ポリペプチドと共にインキュベートし、そしてB7RP-2ポリペプチド結合の程度を決定する工程）を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第18章（Ausubelら、編、Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995）を参照のこと。

30

40

【0189】

放射性標識に対する代替として、B7RP-2ポリペプチドまたはその結合パートナーは

50

、ビオチンと結合体化され得、そしてビオチン化されたタンパク質の存在が、次いで、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（H R P）またはアルカリホスファターゼ（A P））（これらは、比色測定的に検出される）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。B 7 R P-2 ポリペプチドまたはB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーに対する抗体（これは、ビオチンに結合されている）もまた使用されそして、A PまたはH R Pに連結した酵素連結ストレプトアビジンとのこの複合体のインキュベーションの後に検出され得る。

【0190】

B 7 R P-2 ポリペプチドまたはB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固相基材への付着によって固定され得る。基材-タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてB 7 R P-2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材-タンパク質複合体は、カラム内に固定され得、試験分子および相補タンパク質はカラムを通される。B 7 R P-2 ポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

10

【0191】

B 7 R P-2 ポリペプチド結合タンパク質とB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出器システム（例えば、B I A c o r e アッセイシステム（P h a r m a c i a , P i s c a t a w a y , N J））である。B I A c o r e システムは、製造業者に指示されるように利用され得る。このアッセイは、本質的に、B 7 R P-2 ポリペプチドまたはB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーのいずれかの、デキストランコーティングセンサーチップ（これは、検出器中に配置される）への共有結合を含む。次いで、この試験化合物および他の相補タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを備えるチャンバーに注入され得る。結合する相補タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコート側に物理的に結合する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、検出器システムによって測定

20

30

【0192】

いくつかの場合において、2つ以上の試験化合物と一緒に、B 7 R P-2 ポリペプチドとB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について評価することが所望され得る。これらの場合において、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時に、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける工程の残りは、本明細書中に記載されるとおりである。

【0193】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるもの）は、B 7 R P-2 ポリペプチドとB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

40

【0194】

B 7 R P-2 ポリペプチドとB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる化合物はまた、B 7 R P-2 ポリペプチドまたはB 7 R P-2 ポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から得られ得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来であ

50

る。B7RP-2ポリペプチドの、B7RP-2ポリペプチド結合パートナーを発現する細胞への、その表面での結合は、試験分子の存在下または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、B7RP-2ポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性であるとスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る。

【0195】

細胞培養物はまた、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、B7RP-2遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるB7RP-2ポリペプチドまたはB7RP-2ポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合に、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病理的状态を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【0196】

（内部移行タンパク質）

tatタンパク質配列（HIV由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために、使用され得る。例えば、Falwellら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:664-68を参照のこと。例えば、HIV tatタンパク質の11アミノ酸の配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号14）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTを称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、Nat. Med. 4:1449-1452（1998）を参照のこと。これらの手順において、FITC構築物（FITC標識されたG-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号15）（これは、腹腔内投与後に組織を透過する）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光活性セルソーティング（FACS）分析によって検出される。tat-β-gal融合タンパク質で処置された細胞は、β-gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む）において検出され得る。これらの構築物は、細胞に入るためにある程度の変性を受け、そしてそれ自体、細胞内への移入に続いて、再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

【0197】

従って、tatタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、tatタンパク質配列を使用して、B7RP-2アンタゴニスト（例えば、抗B7RP-2選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、B7RP-2分子の活性を阻害するために、細胞内投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「B7RP-2分子」は、本明細書中に規定されるような、B7RP-2核酸分子およびB7RP-2ポリペプチドの両方をいう。所望ならば、B7RP-2タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Straus、1999、Science 285:1466-1467をまた参照のこと。

【0198】

（B7RP-2ポリペプチドを使用する細胞供給源同定）

本発明の特定の実施形態に従って、B7RP-2ポリペプチドに結合する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する目的として疾

10

20

30

40

50

患または病理学的状態の期限を決定することは、有用であり得る。特定の実施形態において、B7RP-2ポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用されて、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載される細胞を同定し得る。他の実施形態において、細胞におけるB7RP-2ポリペプチドの存在について試験するために、抗B7RP-2ポリペプチド抗体を使用し得、従って、このような細胞が本明細書中に記載される型の細胞であるかどうかを決定し得る。

【0199】

(B7RP-2ポリペプチド組成物および投与)

治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなB7RP-2ポリペプチド薬学的組成物は、治療有効量のB7RP-2ポリペプチドまたはB7RP-2核酸分子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。薬学的組成物は、治療有効量の1以上のB7RP-2ポリペプチド選択的結合因子を、投与の様式と適合するように選択された薬学的にまたは生理学的に受容可能な処方薬剤との混合物中に、含み得る。

10

【0200】

受容可能な処方物材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。

【0201】

薬学的組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、清澄性、色、等張性、におい、無菌性、安定性、解離もしくは放出の速度、吸着、または透過を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルク剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、 β -シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル β -シクロデキストリン）、充填剤、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、芳香剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン（B7RP-2 or hexidine）、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、ポリソルベート20またはポリソルベート80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（tyloxapal））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、またはマンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版, A. R. Gennaro編, Mack Publishing Company 1990を参照のこと。

20

30

40

【0202】

最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出を参照のこと。このような組成物は、B7R

50

P-2分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。

【0203】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、自然状態では、水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、非経口投与のための組成物において一般的な他の材料で補充され得る。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約pH 7.0~8.5のTris緩衝液または約pH 4.0~5.5の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の1つの実施形態において、B7RP-2ポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤(Remington's Pharmaceutical Sciences, 前出)と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、B7RP-2ポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

10

【0204】

このB7RP-2ポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達(例えば、経口)のために、選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術の範囲内にある。

20

【0205】

処方成分が、投与の部位に受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的pHまたはわずかにより低いpH(典型的に、約5~約8のpH範囲内)にこの組成物を維持するために使用される。

【0206】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のB7RP-2分子を含む、発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、ここで、B7RP-2分子は、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、薬剤(例えば、注入可能なミクロスフェア、生物腐食性(bio-erodible)粒子、ポリマー化合物(例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズまたはリポソーム)との処方物を含み得、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御放出または持続放出を提供する。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環における持続時間を増進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

30

【0207】

1つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、B7RP-2ポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。CB7RP-2ポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は、噴霧され得る。肺投与が、PCT公開番号WO 94/20069にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

40

【0208】

特定の処方物が、経口投与され得ることもまた意図される。本発明の1つの実施形態において、このよう様式で投与されるB7RP-2ポリペプチドが、固体投薬形態(例えば、錠剤およびカプセル)の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティが最大化され、そして前全身的分解(presystemic degradation)が最小化される場合に、胃腸管内の時点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、B7RP-2ポリペプチドの吸収を容易にするために含まれ得る。希釈剤、芳香剤、

50

低融点ワックス、植物油、滑沢剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた使用され得る。

【0209】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のB7RP-2ポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア）；あるいは滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸またはタルク）。

10

【0210】

さらなるB7RP-2ポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続送達処方物または制御送達処方物中にB7RP-2ポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続送達手段または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生物腐食性微粒子あるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、PCT/US93/00829（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。

【0211】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリクスを含む。徐放性マトリクスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号および欧州特許第058481号）、L-グルタミン酸と γ -エチルーL-グルタメートとのコポリマー（Sidmanら, 1983, Biopolymers 22:547-56）、ポリ（2-ヒドロキシエチルーメタクリレート）（Langerら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15:167-277およびLanger, 1982, Chem. Tech. 12:98-105）、エチレンビニルアセテート（Langerら, 前出）またはポリ-D（-）-3-ヒドロキシ酪酸（欧州特許第133988号）が挙げられ得る。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Eppsteinら, 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688-92；および欧州特許第036676号、同第088046号、および同第143949号を参照のこと。

20

30

【0212】

インビボ投与のために使用されるB7RP-2の薬学的組成物は、代表的に無菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が、凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構築の前または後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。

【0213】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水粉末もしくは凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態（例えば、凍結乾燥された形態）のいずれかで保存され得る。

40

【0214】

特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（lysyringe））を含むキットが含まれる。

50

【0215】

治療的に使用されるB7RP-2の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、従って、送達される分子、B7RP-2分子が使用されている指標、投与の経路、および患者のサイズ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および全身の健康状態）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（titer）、投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ～約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。 10

【0216】

投薬の頻度は、使用される処方物中でのB7RP-2分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。典型的に、臨床家は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。組成物は、従って、組成物は、経時的な単一用量として、2以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そしてそれらによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量-応答データの使用を介して確認され得る。

【0217】

薬学的組成物の投与の経路は、以下のような公知の方法と一致する：経口的に；静脈内、腹腔内、脳内（実質内の）、脳室内、筋肉内、眼内、動脈内、門脈内、または病巣内の経路による注入を介する方法；徐放性系による方法；または移植デバイスによる方法。所望される場合、これらの組成物は、ボーラス注射によって投与され得るか、または注入によって連続的に投与され得るか、または移植デバイスによって投与され得る。 20

【0218】

あるいは、またはさらに、組成物は、その上に所望の分子が吸収されるかまたはカプセル化された膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を介して局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。 30

【0219】

いくつかの場合において、エキソビボ様式において、B7RP-2ポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から取り出された細胞、組織または器官は、B7RP-2ポリペプチドの薬学的組成物に曝露され、その後これらの細胞、組織または器官は続いて患者に移植し戻される。

【0220】

他の場合において、B7RP-2ポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、B7RP-2ポリペプチドを発現および分泌するように遺伝子操作された特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種（heterologous）、または異種間（xenogeneic）であり得る。必要に応じて、細胞は、不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少するために、細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半透性ポリマーの包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系によるかまたは周囲の組織由来の他の有害な因子による細胞の破壊を防止する。 40

【0221】

本明細書中に開示されるように、1つ以上のB7RP-2ポリペプチドで単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、神経など）を処置することが所望され得る。これは、単離された細胞を、（細胞膜を透過し得る形態で存在する）ポリペプ 50

チドに直接曝露することによって達成され得る。

【0222】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生と、遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達との両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写的にサイレントなB7RP-2遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のB7RP-2ポリペプチドを発現する細胞を産生し得る。

【0223】

相同組換えは、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または矯正するように遺伝子を標的化するために元々開発された技術である（Kucherlapati、1989、Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.、36:301）。この基本的技術は、特定の変異を、哺乳動物ゲノムの特定の領域へ導入するための方法として（Thomasら、1986、Cell、44:419-428；ThomasおよびCapecechi、1987、Cell、51:503-512；Doetschmanら、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8583-8587）、または欠損遺伝子内の特定の変異を矯正するための方法として（Doetschmanら、1987、Nature、330:576-578）開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第5,272,071号、EP 913051、欧州公開番号第505500号；PCT/US90/07642、国際公開番号 WO 91/09955に記載される。

【0224】

相同組換えを介して、ゲノム中に挿入されるべきDNA配列は、標的化DNAにこのDNA配列を結合することによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化DNAは、ゲノムDNA領域に相補的である（相同である）ヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的である標的化DNAの小片は、DNA複製プロセスの間に親鎖と接触下に置かれる。共有される相同領域を介して内因性DNAの他の小片とハイブリダイズし、そして従って、組み換わることは、細胞内に挿入されたDNAの一般的な特性である。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに結合された場合、これもまた、新たに合成された鎖に組換えの結果として組み込まれる。ブルーフリーディング機能の結果として、この新たなDNA配列が、テンプレートとして作用することが可能である。このように、この移入されたDNAは、ゲノム内に組み込まれる。

【0225】

B7RP-2ポリペプチドと相互作用し得るかまたはB7RP-2ポリペプチドの発現を制御し得るDNA領域（例えば、隣接配列）が、標的化DNAのこれらの小片に結合される。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサーまたは外因性転写調節エレメントが、所望のB7RP-2ポリペプチドをコードするDNAの転写に影響を与えるに十分に近位でかつ十分な方向で、その意図される宿主細胞のゲノムに挿入される。制御エレメントは、宿主細胞ゲノム中に存在するDNAの一部を制御する。従って、所望のB7RP-2ポリペプチドの発現は、B7RP-2遺伝子自体をコードするDNAのトランスフェクションによってではなく、むしろDNA調節セグメントと結合された標的化DNA（その目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって達成され得、この調節セグメントは、B7RP-2遺伝子の転写について認識可能なシグナルを、その内因性遺伝子配列に提供する。

【0226】

例示的な方法において、細胞内の所望の標的化された遺伝子（すなわち、所望の内因性の細胞遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位を含むDNAの導入による、予め選択された部位でのその細胞ゲノムへの相同組換えを介して変更される。これらの成分は、実際には、これらの成分が、新たな転写単位の産生を生じ

る（ここで、そのDNA構築物中に存在する調節配列、エキソンおよびスプライスドナー部位が、内因性遺伝子に作動的に連結される）このような様式で染色体（ゲノム）DNA中に導入される。染色体DNAへのこれらの成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変更される。

【0227】

本明細書中に記載されるように、変更された遺伝子発現は、得られたときの細胞において通常サイレントな（発現されない）遺伝子を活性化すること（または発現されるのを引き起こすこと）、ならびに得られたときの細胞において生理学的に重要なレベルで発現されない遺伝子の発現を増大させることを包含する。この実施形態はさらに、得られたときの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なるように調節または誘導のパターンを変更すること、ならびに得られたときの細胞において発現される遺伝子の発現を減少させること（除去することを含む）を包含する。

10

【0228】

相同組換えを用いて、細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのB7RP-2ポリペプチド産生を増大させ得るかまたは生じさせ得る1つの方法は、第1に、相同組換えを用いて部位特異的組換え系（例えば、Cre/loxP、FLP/FRT）（Sauer、1994, Curr. Opin. Biotechnology, 5:521-527; Sauer、1993, Methods Enzymol., 225:890-900）由来の組換え配列を、細胞の内因性ゲノムB7RP-2ポリペプチドコード領域の上流に（すなわち、5'側に）配置することを含む。ゲノムB7RP-2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、この改変された細胞株に、適当なリコンビナーゼ酵素により導入される。このリコンビナーゼ酵素は、このプラスミドを、プラスミドの組換え部位を介して、その細胞株におけるゲノムB7RP-2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組み込ませる（Baubonis および Sauer、1993, Nucleic Acids Res., 21:2025-2029; O'Gormanら, Science, 1991, 251:1351-1355）。転写を増大させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー/プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド内に適切に配置された場合に、新たな転写単位または改変された転写単位を作製するような様式で組み込み、この細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのデノボB7RP-2ポリペプチド産生または増大したB7RP-2ポリペプチド産生を生じる。

20

30

【0229】

部位特異的な組換え配列がその細胞の内因性ゲノムB7RP-2ポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するためのさらなる方法は、相同組換えを使用して、第2の組換え部位を、この細胞株のゲノムの他の箇所に導入することである。次いで、適当なリコンビナーゼ酵素が、この2つの組換え部位の細胞株に導入されて、これが、組換え事象（欠失、逆位および転座）を引き起こす（Sauer、1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5:521-27; Sauer、1993, Methods Enzymol., 225:890-900）。この組換え事象は、新たな転写単位または改変された転写単位を作製し、この転写単位が、この細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのデノボB7RP-2ポリペプチド産生または増加したB7RP-2ポリペプチド産生を生じる。

40

【0230】

細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのB7RP-2ポリペプチドの発現を増加させるかまたは引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのデノボB7RP-2ポリペプチド産生または増加したB7RP-2ポリペプチド産生を生じる様式で、ある遺伝子（例えば、転写因子）の発現を増加させるかもしくは引き起こすこと、および/またはある遺伝子（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させることを包含する。この方法は、細胞の内因性B7RP-2遺伝子からのデノボB7RP-2ポリペプチド産生または増加したB7RP-2ポリペプチド産生が生じるように、天然には

50

存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的DNA結合ドメインを含むポリペプチド）をその細胞に導入することを包含する。

【0231】

本発明は、さらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なDNA構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なDNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列；（b）調節配列；（c）エキソン；および（d）不対（unpaired）スプライスドナー部位。このDNA構築物における標的化配列は、細胞中の標的遺伝子へのエレメント（a）～（d）の取り込みを、エレメント（b）～（d）がその内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結されるように、指向する。別の実施形態においては、DNA構築物は、以下を含む：（a）1つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位；ここで、この標的化配列は、エレメント（a）～（f）の取り込みを、（b）～（f）のエレメントが内因性遺伝子に作動可能に連結されるように、指向する。この標的化配列は、相同組換えが生じる細胞染色体DNAにおける所定の部位に相同である。この構築物において、エキソンは、一般に、調節配列の3'側であり、そしてスプライスドナー部位は、エキソンの3'側である。

10

【0232】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中に提示されるB7RP-2ポリペプチドの核酸配列）が既知である場合には、この遺伝子の選択された領域に相補的なDNA小片は、合成され得るか、またはさもないければ、例えば、その目的の領域に結合する特異的な認識部位でのネイティブDNAの適切な制限処理によって得られ得る。この小片は、細胞への導入時に標的化配列として作用し、そしてゲノム内のその相同領域とハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションがDNA複製の間にかかる場合、このDNA小片およびこのDNA小片に結合した任意のさらなる配列は、岡崎フラグメントとして作用し、そして新たに合成されたDNAの娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、B7RP-2ポリペプチドをコードするヌクレオチドを包含し、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

20

【0233】

B7RP-2ポリペプチド細胞治療（例えば、B7RP-2ポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた意図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のB7RP-2ポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植することを包含する。このようなB7RP-2ポリペプチド産生細胞は、B7RP-2ポリペプチドの天然の産生体である細胞であり得るか、または所望のB7RP-2ポリペプチドをコードする遺伝子もしくはB7RP-2ポリペプチドの発現を増強する遺伝子で形質転換することによってそのB7RP-2ポリペプチドを産生する能力が増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、その遺伝子を送達するため、ならびにその発現および分泌を促進するために適したベクターによって、達成され得る。B7RP-2ポリペプチドを投与される患者において、外来種のポリペプチドの投与によって生じ得るような潜在的な免疫学的反応を最小化するためには、B7RP-2ポリペプチドを産生する天然の細胞がヒト起源であり、かつヒトB7RP-2ポリペプチドを産生することが、好ましい。同様に、B7RP-2ポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトB7RP-2ポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

30

40

【0234】

移植される細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物の細胞は、B7RP-2ポリペプチドの放出を可能にするが患者の免疫系によるかまたは周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半透過性のポリマー包皮または膜内で、患者に移植され得る。あるいは、B7RP-2ポリペプチドを産生するようエキソビボで形質転換された患者自身の細胞が、このようなカプセル化なしに、患者に直接移植され得る。

【0235】

50

生存細胞をカプセル化するための技術は、当該分野において公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびこれらの患者への移植は、慣例的に達成され得る。例えば、Baetgeら（PCT公開番号WO95/05452およびPCT/US94/09299）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のための、遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。これらのカプセルは生体適合性であり、そして容易に回収可能である。これらのカプセルは、プロモーターに作動可能に連結された生物学的に活性な分子をコードするDNA配列を含む組換えDNA分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化し、これらの細胞は、哺乳動物宿主への移植の際に、インビボでのダウンレギュレーションに供されない。このデバイスは、生存細胞からレシピエント内の特異的な部位への分子の送達を提供する。さらに、米国特許第4,892,538号、同第5,011,472号、および同第5,106,627号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するための系は、PCT公開番号WO91/10425（Aebischerら）に記載されている。PCT公開番号WO91/10470（Aebischerら）；Winnら、1991、Exper. Neurol. 113:322-329；Aebischerら、1991、Exper. Neurol. 111:269-275；およびTrescoら、1992、ASAIO 38:17-23もまた参照のこと。

【0236】

B7RP-2ポリペプチドのインビボおよびインビトロ遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の1つの例は、構成的プロモーターまたは誘導性プロモーターに作動可能に連結され得るB7RP-2ポリペプチドをコードするB7RP-2遺伝子（ゲノムDNA、cDNA、および/または合成DNAのいずれか）を使用して、「遺伝子治療DNA構築物」を形成することである。このプロモーターは、内因性B7RP-2遺伝子に対して同種であっても異種であってもよいが、但し、この構築物が挿入される細胞または組織型において、このプロモーターは、活性である。遺伝子治療DNA構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組み込みのために設計されたDNA分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性配列）、組織特異的なプロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、ベクターによる発現を増強するための転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含み得る。

【0237】

次いで、遺伝子治療DNA構築物は、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターを使用して、細胞に（エキソビボまたはインビボでのいずれかで）導入され得る。遺伝子治療DNA構築物を導入するための1つの手段は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる手段である。特定のベクター（例えば、レトロウイルスベクター）は、DNA構築物を細胞の染色体DNAに送達し、そしてこの遺伝子は、染色体DNAに組み込まれ得る。他のベクターは、エピソームとして機能し、そして遺伝子治療DNA構築物は、細胞質内に残る。

【0238】

なお別の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるB7RP-2遺伝子の制御された発現のために含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに対する応答の際に、オンにされる。この様式で、治療ポリペプチドは、所望のときに発現され得る。1つの従来の制御手段は、小分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、DNA結合タンパク質または転写活性化タンパク質）を二量体化するために使用される、小分子二量体化剤またはラパログ（rapalog）（PCT国際公開番号WO96/41865、WO97/31898およびWO97/31899を参照のこと）の使用を包含する。このタンパク質の二量体化を使用して、導入遺伝子の転写を開始し得る。このタンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【0239】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、その細胞の内側で凝集体またはクラスターとして貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、融合タンパク質として発現され、この融合タンパク質は、条件的凝集ドメインを含み、このドメインは、小胞体内での凝集したタンパク質の保持を生じる。貯蔵されたタンパク質は、細胞内で安定でありそして不活性である。しかし、これらのタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去し、これによってこの凝集体またはクラスターを特異的に破壊する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって、放出され得、その結果、これらのタンパク質は、その細胞から分泌され得る。A r i d o r ら、2000, S c i e n c e 287:816-817およびR i v e r a ら、2000, S c i e n c e 287:826-830を参照のこと。

10

【0240】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中に記載される系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン（R U 4 8 6）が、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。プロゲステロンアンタゴニストに対する、改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインの結合は、2つの転写因子の二量体の形成し、次いで、これらの転写因子が、核を通してDNAに結合することによって、転写を活性化する。このリガンド結合ドメインは、そのレセプターがその天然のリガンドに結合する能力を排除するよう改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系は、米国特許第5,364,791号；ならびにPCT公開番号W O 9 6 / 4 0 9 1 1 およびW O 9 7 / 1 0 3 3 7 に、さらに記載されている。

20

【0241】

なお別の制御系は、エクジソン（ショウジョウバエのステロイドホルモン）を使用し、これは、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこのレセプターを活性化する。次いで、このレセプターは、核に転移して、特定のDNA応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）を結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するための、トランス活性化ドメイン／DNA結合ドメイン／リガンド結合ドメインを含む。エクジソン系は、米国特許第5,514,578号、ならびにPCT公開番号W O 9 7 / 3 8 1 1 7、W O 9 6 / 3 7 6 0 9、およびW O 9 3 / 0 3 1 6 2 にさらに記載されている。

【0242】

別の制御手段は、ポジティブなテトラサイクリン制御可能トランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化させるポリペプチドに連結された、変異t e t リプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下で、t e t オペレーターに結合する）を生じる変異t e t R-4アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第5,464,758号、同第5,650,298号、および同第5,654,168号に記載されている。

30

【0243】

さらなる発現制御系および核酸構築物は、I n n o v i r L a b o r a t o r i e s I n c. に対する米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号に記載されている。

40

【0244】

インビボ遺伝子治療は、B7RP-2ポリペプチドをコードする遺伝子を、B7RP-2核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。H e f t i、1994, N e u r o b i o l o g y, 25:1418-1435。例えば、B7RP-2ポリペプチドをコードする核酸分子は、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス（AAV）ベクターに含まれ得る（例えば、J o h n s o n, 国際公開番号W O 9 5 / 3 4 6 7 0；および国際出願番号PCT/US95/07178）。組換えAAVゲノムは、代表的に、機能的プロモーターおよびポリアデニル化配列に作動可能に連結され

50

た B 7 R P - 2 ポリペプチドをコードする D N A 配列に隣接する、A A V 逆方向末端反復を含む。

【0245】

代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、単純ヘルペスウイルスベクター、レンチウイルスベクター、肝炎ウイルスベクター、パルボウイルスベクター、パポバウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アルファウイルスベクター、コロナウイルスベクター、ラブドウイルスベクター、パラミクソウイルスベクター、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるが、これらに限定されない。米国特許第 5, 672, 344 号は、組換え神経栄養性 H S V - 1 ベクターを含む、インビボウイルス媒介遺伝子移入系を記載する。米国特許第 5, 399, 346 号は、治療タンパク質をコードする D N A セグメントを挿入するようインビトロで処理されたヒト細胞の送達による、患者に治療タンパク質を提供するためのプロセスの例を、提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第 5, 631, 236 号（アデノウイルスベクターを含む）；米国特許第 5, 672, 510 号（レトロウイルスベクターを含む）；および米国特許第 5, 635, 399 号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターを含む）に記載されている。

10

【0246】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸の D N A 送達（直接注入）、レセプター媒介移入（リガンド-D N A 複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法としてはまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサープロモーター、部位特異的組み込みのために設計された D N A 配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得る D N A 配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第 4, 970, 154 号（エレクトロポレーション技術を含む）；米国特許第 5, 679, 559 号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）；米国特許第 5, 676, 954 号（リポソームキャリアを含む）；米国特許第 5, 593, 875 号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）；および米国特許第 4, 945, 050 号（生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する）、ならびに W O 96 / 40958（核リガンドを含む）に記載されている。

20

30

【0247】

B 7 R P - 2 遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における 1 つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

40

【0248】

遺伝子治療を介して細胞における内因性 B 7 R P - 2 ポリペプチド発現を増加させるための手段は、1 つ以上のエンハンサーエレメントを B 7 R P - 2 ポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、B 7 R P - 2 遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、B 7 R P - 2 ポリペプチドをコードする遺伝子が T 細胞において「オンにされる」場合には、l c k プロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、B 7 R P - 2 ポリペ

50

チドプロモーターを含むDNAのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターおよび／または5'および／または3'隣接配列などに挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【0249】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、B7RP-2ポリペプチド発現を減少させるために、使用され得る。このような改変は、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択されたB7RP-2遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むDNA分子は、転写を調節するプロモーター片を除去および／または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのTATAボックスおよび／または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応するB7RP-2遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節されるB7RP-2遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）B7RP-2ポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび／または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入を介して変異される。結果として、TATAボックスおよび／またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内因性の）5'および3'DNA配列に対応する、少なくとも約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に（エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで）導入され得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3'DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0250】

（治療的使用）

本発明のB7RP-2核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、多くの疾患、障害または状態（本明細書中に列挙されるものを含む）を、処置、診断、寛解または予防するために使用され得る。

【0251】

B7RP-2ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストとしては、B7RP-2ポリペプチドの活性を調節するか、または少なくとも1つのB7RP-2ポリペプチドの成熟形態の生物学的活性を、増強または減少させるかのいずれかである、分子が挙げられる。アゴニストまたはアンタゴニストは、B7RP-2ポリペプチドと相互作用してその活性を調節するタンパク質、ポリペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量分子のような補因子であり得る。潜在的タンパク質アンタゴニストまたはアンタゴニストは、このタンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むB7RP-2の可溶化形態または膜に結合した形態のいずれかと反応する抗体を含む。B7RP-2ポリペプチド発現を調節する分子は、代表的に、発現のアンチセンス調節因子として作用し得るB7RP-2ポリヌクレオチドをコードする核酸を含む。

【0252】

骨組織は、コラーゲンマトリクスおよび非コラーゲンタンパク質、鈣物（主にカルシウムおよびリン）、ならびに細胞からなる。骨に見出される3つの型の細胞（骨細胞、骨芽細胞、および破骨細胞）は、骨が断続的に形成されかつ吸収されることによる劇的なプロセスに関する。骨芽細胞は、骨組織の形成を誘導する一方、破骨細胞は、吸収に関する。骨マトリックスおよび鈣物の吸収、または分解は、骨形成に比べて速くかつ効率的なプロセスであり、そして多量の鈣物を骨から放出する。破骨細胞は、骨格組織の正常な再モデル

化の調節、およびホルモンによって誘導される吸収に関する。例えば、吸収は、細胞外液におけるカルシウムイオンの濃度の減少に応じた副甲状腺ホルモンの分泌によって刺激される。対照的に、吸収の阻害は、カルシトニンの主要な機能である。さらに、ビタミンDの代謝物は、副甲状腺ホルモンおよびカルシトニンに対する骨の応答性を変更する。

【0253】

骨格の成熟に伴って、骨格における骨量は、骨形成および骨吸収のバランス（またはアンバランス）を反映する。ピーク骨量は、40歳になる前の骨格成熟後に生じる。40歳と50歳との間に、この均衡はシフトし、そして骨吸収は、優位になる。年齢とともに進行する骨量の誘因可能な減少は、男性よりも女性において早く開始し、そしていくつかの女性において（主に、CaucasianおよびAsianの家系）、閉経後に顕著に加速される。 10

【0254】

骨減少症は、骨量の平均レベル以下への任意の減少に一般に関する状態である。このような状態は、骨合成の割合における減少、または骨崩壊の割合における増加、あるいはこれらの両方より生じ得る。最も一般的な形態の骨減少症は、主に骨粗しょう症である。これは、閉経後の骨粗しょう症および老衰性骨粗しょう症の場合にもいう。この形態の骨粗しょう症は、年齢に伴う一連の骨の一般的な消失であり、そして通常は骨形成の正常な割合を有する骨吸収における増加の結果である。米国における全ての白人女性の約25～30%は、徴候的骨粗しょう症を発達する。直接の関係は、骨粗しょう症と、45歳以上の女性における尻、大腿部、頸部、および転子間骨折（inter-trochanteric fracture）の発生率との間に存在する。老齢の男性は、50歳と70歳との間の年齢で徴候的骨粗しょう症を発達するが、この疾患は主に女性に影響する。 20

【0255】

閉経後および老年性の骨粗鬆症の原因は、未知である。この状態に寄与し得るいくつかの因子が同定されている。これらは、加齢に伴うホルモンレベルの変化、ならびにカルシウムおよび他のミネラルの腸管吸収低下に起因する不適切なカルシウム消耗が挙げられる。処置としては、普通、進行の遅滞を目的とする、ホルモン治療または食事補給が挙げられる。しかし、今日まで、骨損失に対する有効な処置は存在しない。

【0256】

本発明のB7RP-2核酸分子、B7RP-2ポリペプチド、ならびにB7RP-2アゴニストおよびB7RP-2アンタゴニストを使用して、骨疾患および骨障害（例えば、正味の骨量減少（例えば、骨減少または骨溶解）によって特徴付けられる疾患または障害）を処置、診断、緩和または予防し得る。例えば、B7RP-2ポリペプチドを使用して、骨の再吸収速度を抑制し得る。この様式では、個体をB7RP-2ポリペプチドを用いて処置して、再吸収速度が正常よりも高い場合の骨の再吸収速度を低下させ得、または正常レベル未満の骨形成を代償するために骨再吸収を正常レベル未満に低減させ得る。 30

【0257】

本発明のB7RP-2核酸分子、B7RP-2ポリペプチド、ならびにB7RP-2アゴニストおよびB7RP-2アンタゴニストを用いて処置可能である状態としては、以下が挙げられる：骨粗鬆症（例えば、原発性骨粗鬆症、内分泌性骨粗鬆症（甲状腺機能亢進、副甲状腺機能亢進（hyperparathyroidism）、クッシング症候群および末端肥大症）、遺伝性形態および先天性形態の骨粗鬆症（骨形成不全、ホモシスチン尿症、メンケズ症候群およびライリー・デイ症候群）ならびに四肢の不動化に起因する骨粗鬆症）；成人および若年における骨のパジエット病（変形性骨炎）；骨の損失をもたらす、骨髄炎または骨の感染性損傷；固形腫瘍（胸部、肺および腎臓）および血液の悪性疾患（多発性骨髄腫、リンパ腫および白血病）から生じる高カルシウム血症、特発性高カルシウム血症ならびに甲状腺機能亢進および腎臓機能障害に関連した高カルシウム血症；ステロイド投与によって誘発され、そして小腸および大腸の障害ならびに慢性の肝臓疾患および腎臓疾患と関連する、手術後の骨減少症；ゴシェ病、鎌状赤血球貧血、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、歯周疾患、骨溶解性転移および他の状態に関連した外傷性 40 50

損傷または非外傷性壊死に関連した、骨壊死（すなわち、骨細胞死）。他の骨疾患および骨障害が、本発明の範囲内に含まれる。

【0258】

本発明の B7RP-2 核酸分子、B7RP-2 ポリペプチド、ならびに B7RP-2 アゴニストおよび B7RP-2 アンタゴニストを使用して、T細胞機能（例えば、T細胞レセプターのおとり（デコイ）としての機能）と関連する疾患を、処置、診断、緩和または予防し得る。例えば、抗体、細胞外ドメインを含有する可溶性タンパク質、またはT細胞活性化の長期化または増強を生じる B7RP-2 ポリペプチドの他の制御因子を使用して、腫瘍に対する免疫応答を増加し得る。

【0259】

本発明の B7RP-2 核酸分子、B7RP-2 ポリペプチド、ならびに B7RP-2 アゴニストおよび B7RP-2 アンタゴニストを、自己免疫疾患、移植片の生存、腫瘍細胞増殖を阻害するための免疫細胞活性化、T細胞依存的な B細胞媒介性疾患、および癌遺伝子免疫治療の処置において使用し得る。1つの実施形態において、B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体は、慢性の免疫細胞機能不全を伴う疾患の症状を緩和するのに有益であり得る。自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、変形性関節症、免疫性血小板減少性紫斑病（IPT）、および乾癬）を、B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体を用いて処置し得る。さらに、慢性炎症疾患（例えば、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸）、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、および真性糖尿病）を、また、B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体を用いて処置し得る。

【0260】

B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体を、骨髄移植および器官移植のための免疫抑制剤として使用し得、そして移植片の生存を長期化するために使用し得る。このような、B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体は、既存の処置以上に重要な有意性を提供し得る。骨髄移植治療および器官移植治療は、宿主により、外来性の細胞および組織の T細胞媒介性拒絶に対処しなければならない。T細胞媒介性拒絶を阻害するための現在の治療レジメンは、薬物シクロスポリンまたは FK506 を用いる処置を包含する。薬物が有効であっても、患者は、肝毒性、腎毒性および神経毒性を含む、重篤な副作用に苦しむ。治療剤のシクロスポリン/FK506 のクラスの標的は、遍在性発現を有するホスファターゼである、カルシニューリンである。B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体は、現在の免疫治療剤の使用で観察される重篤な副作用を、欠き得る。B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体を、自己免疫障害（例えば、慢性関節リウマチ、変形性関節症、多発性硬化症、糖尿病および全身性エリテマトーデス）に対する免疫抑制剤として使用し得る。また、B7RP-2 ポリペプチド機能のアゴニストもしくはアンタゴニスト、可溶性 B7RP-2 ポリペプチド、または B7RP-2 ポリペプチド誘導体を使用して、トキシックショック症候群、炎症性腸疾患、輸血に起因する同種感作、T細胞依存的な B細胞媒介性疾患、および宿主の疾患に対する移植片の処置を緩和し得る。

【0261】

本発明の B7RP-2 遺伝子を使用する遺伝子治療を、癌免疫治療において使用し得る。癌細胞中に導入された B7RP-2 遺伝子は、これら癌細胞を抗原提示細胞へと形質転換し得、そしてこれら細胞は動物中に戻された場合に免疫系の T細胞によって認識され得る

10

20

30

40

50

。トランスフェクトされた腫瘍細胞のT細胞による認識は、B7RP-2遺伝子を発現する腫瘍および発現しない腫瘍の根絶を生じる。この免疫治療アプローチは、種々の白血病、肉腫、黒色腫、腺癌、乳癌、前立腺腫瘍、肺癌、結腸癌、または他の腫瘍に対して使用される。本発明は、同様の様式でB7RP-2遺伝子を使用して種々の腫瘍に应答してT細胞活性化を増強させる工程を包含する。

【0262】

例えば、多くのワクチンは、有効かつ特異的な抗体応答を誘発することによって作用する。いくつかのワクチン、特に腸内微生物（例えば、A型肝炎ウイルスおよびSalmonella）に対するワクチンは、短期間の抗体応答を誘発する。この応答を増強しそして持続させて、ワクチンの有効性を増加させることが望ましい。従って、可溶性B7RP-2ポリペプチドは、ワクチンのアジュバントとして役立ち得る。 10

【0263】

対照的に、B7RP-2はネガティブな免疫制御機能を有し得るので、抗体、低分子、ペプチボディ（peptibody）またはB7RP-2機能の他のアンタゴニストを用いたB7RP-2活性の阻害は、免疫増強および抗腫瘍活性を生じ得る。

【0264】

また、抗腫瘍応答を、B7RP-2ポリペプチド経路のアクチベーターまたはアゴニストによって増強し得る。B7RP-2ポリペプチドアンタゴニストによる細胞免疫機能の増強はまた、ウイルス感染細胞の除去において有益であり得る。補完的な様式で、B7RP-2ポリペプチドアンタゴニストはまた、抗体媒介性応答を増強し得、そして生体から遊離ウイルスを取り除く（clear）のを援助するように機能し得る、ホルモン性免疫機能に対する効果を有し得る。 20

【0265】

対照的に、抗体産生を阻害することによって緩和される、多くの臨床状態が存在する。過敏症は、過剰または不適切である通常は有益な免疫応答であり、そして炎症反応および組織損傷を導く。抗体媒介性である過敏症反応は、B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニスト、可溶性B7RP-2ポリペプチド、またはB7RP-2ポリペプチド誘導体による拮抗作用に特に敏感であり得る。アレルギー、枯草熱、喘息および急性浮腫は、I型過敏性反応を引き起こし、そしてこれらの反応は、B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニスト、可溶性B7RP-2ポリペプチド、またはB7RP-2ポリペプチド誘導体により抑制され得る。 30

【0266】

抗体媒介性の過敏症反応を引き起こす疾患としては以下が挙げられ、これらを、B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニスト、可溶性B7RP-2ポリペプチド、またはB7RP-2ポリペプチド誘導体を用いて処置し得る：全身性エリテマトーデス、関節炎（慢性関節リウマチ、反応性関節炎（reactive arthritis）および変形性関節症）、腎症（糸球体腎炎、膜性糸球体腎炎、膜性増殖性糸球体腎炎、巣状分節状糸球体硬化症、巣状壊死性（focal necrotizing）腎炎、半月形腎炎および増殖性細管障害（proliferative tubulopathy）腎炎）、皮膚障害（天疱瘡、天疱瘡様および結節性紅斑）、内分泌障害（甲状腺炎、グレーブズ病、橋本病、インスリン依存性真性糖尿病）、種々の肺性障害（pneumopathy）（特に外因性肺炎）、種々の血管症、セリアック病、IgAの異常産生、多くの貧血および血小板減少症、ギャンーバレー症候群、および重症筋無力症。 40

【0267】

さらに、リンパ球増殖性障害（例えば、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症およびクリオグロブリン血症）を、B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニスト、可溶性B7RP-2ポリペプチド、またはB7RP-2ポリペプチド誘導体により阻害し得る。最終的に、「人工の免疫障害」である宿主疾患に対する移植片は、B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニスト、可溶性B7RP-2ポリペプチド、またはB7RP-2ポリペプチド誘導体による抗体産生阻害から利益を受け得る。 50

【0268】

B7RP-2ポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切である場合、1つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤および／または化学療法剤と（同時にかまたは連続的に）併用して使用され得る。

【0269】

望まれないレベルのB7RP-2ポリペプチドによるか、またはこれに媒介される他の疾患は、本発明の範囲内に包含される。望まれないレベルは、過剰なレベルのB7RP-2ポリペプチド、および正常以下（sub-normal）のレベルのB7RP-2ポリペプチドを含む。

【0270】

（B7RP-2核酸およびポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、染色体上のB7RP-2遺伝子および関連遺伝子の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、PCR増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）によってなされ得る。

【0271】

B7RP-2核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織サンプルまたは体液サンプル中のB7RP-2核酸分子の存在について、定性的または定量的のどちらかで試験するための診断アッセイにおける、ハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【0272】

また、1つ以上のB7RP-2ポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に他の方法を使用し得る。このような阻害は、発現制御配列（3重鎖を形成する）かまたはB7RP-2 mRNAに相補的でありそしてそれにハイブリダイズする核酸分子によって、もたらされ得る。例えば、B7RP-2遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する、アンチセンスDNA分子またはアンチセンスRNA分子は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるB7RP-2遺伝子の配列を使用する利用可能な技術によって設計され得る。代表的に、このようなアンチセンス分子の各々は、選択されたB7RP-2遺伝子の各々の開始部位（5'末端）に相補的である。次いで、アンチセンス分子が対応するB7RP-2 mRNAとハイブリダイズする場合、このmRNAの翻訳を防止するかまたは低下させる。アンチセンスインヒビターは、細胞内または生物内でのB7RP-2ポリペプチドの減少か、またはB7RP-2ポリペプチドの不在に関する情報を提供する。

【0273】

あるいは、遺伝子治療は、1つ以上のB7RP-2ポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを生成するために使用され得る。この状況では、各々の選択されたB7RP-2ポリペプチドの変異ポリペプチドをコードするDNAを調製し、そして本明細書中に記載される、ウイルス方法または非ウイルス方法のどちらかを使用して、患者の細胞中に導入し得る。このような変異体の各々は、代表的に、内因性ポリペプチドの生物学的役割において、内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【0274】

さらに、B7RP-2ポリペプチドは、生物学的に活性であっても活性ではなくても、免疫原として使用され得る。すなわち、このポリペプチドは、少なくとも1つのエピトープを含有し、このエピトープに対して抗体が惹起され得る。（本明細書に記載のように）B7RP-2ポリペプチドに結合する、選択的な結合性因子は、インビボおよびインビトロの診断目的のために使用され得る。この使用としては、体液または細胞サンプル中のB7RP-2ポリペプチドの存在を検出するための、標識形態での使用が挙げられるが、これに限定されない。また、抗体を使用して、本明細書中に記載される疾患および障害を含む、多くの疾患および障害を、予防、処置または診断し得る。抗体は、B7RP-2ポリペプチドに結合して、B7RP-2ポリペプチドの少なくとも1つの活性特性を低下させ

10

20

30

40

50

得るかもしくはブロックし得るか、またはポリペプチドに結合して、B7RP-2ポリペプチドの少なくとも1つの活性特性を増大させ得る（B7RP-2ポリペプチドの薬物動態を増大させることによることを含む）。

【0275】

本発明のB7RP-2ポリペプチドを使用して、B7RP-2ポリペプチドレセプターを、発現クローニングストラテジーを使用してクローニングし得る。放射性標識された（¹²⁵ヨウ素）B7RP-2ポリペプチドまたは親和性／活性タグ化されたB7RP-2ポリペプチド（例えば、Fc融合物またはアルカリホスファターゼ融合物）を結合アッセイにおいて使用して、B7RP-2ポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたRNAをcDNAに転換し、哺乳動物の発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COS細胞または293細胞）中にトランスフェクトして発現ライブラリーを作製する。次いで、放射性標識されたB7RP-2ポリペプチドまたはタグ化B7RP-2ポリペプチドを親和性リガンドとして使用して、細胞表面上にB7RP-2ポリペプチドレセプターを発現する細胞サブセットを、このライブラリーから同定および単離し得る。次いで、DNAをこれら細胞から単離し、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトして二次発現ライブラリーを作製する。このライブラリー中では、B7RP-2ポリペプチドレセプターを発現する細胞の割合は、元のライブラリーにおける割合におけるより何倍も高い。この富化プロセスを、B7RP-2ポリペプチドレセプターを含有する単一の組換えクローンを単離するまで反復し得る。B7RP-2ポリペプチドレセプターの単離は、B7RP-2ポリペプチドシグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するのに有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性B7RP-2ポリペプチドレセプター、抗B7RP-2ポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらを、本明細書中に記載される1つ以上の疾患または障害を、処置、予防または診断するために使用し得る。

【0276】

本発明のマウスB7RP-2核酸およびヒトB7RP-2核酸はまた、対応する染色体B7RP-2ポリペプチド遺伝子を単離するのに有用なツールである。例えば、B7RP-2配列を含有するマウス染色体DNAを使用して、ノックアウトマウスを構築し得、これによってB7RP-2ポリペプチドのインビボの役割の試験が可能となる。ヒトB7RP-2ゲノムDNAを使用して、遺伝性組織変性疾患を同定し得る。

【0277】

以下の実施例は、例示の目的のためのみに意図されるものであり、そしていかなる様式でも本発明の範囲を制限するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0278】

（実施例1：ヒトB7RP-2ポリペプチド遺伝子のクローニング）

一般的に、Sambrookら（前出）に記載される材料および方法を使用して、ヒトB7RP-2ポリペプチドをコードする遺伝子をクローニングおよび分析した。

【0279】

照会配列としてラットB7RP-2オルソログ（配列番号5）を使用して、独自のデータベースの検索を実施した。ヒトB7RP-2ポリペプチドの一部をコードする核酸配列を含むものとして、342bpクローンを同定した。この配列を、関連コンティグの試験によって792bp（配列番号16）に拡大した。

【0280】

インサイチュハイブリダイゼーションによって頭蓋冠において検出された高レベルのB7RP-2発現に起因して、ヒト頭蓋冠骨cDNAライブラリーならびにアンプリマー（amp primer）2245-71（5'-C-A-A-C-G-A-G-C-A-G-G-G-C-T-T-G-T-T-T-G-3'；配列番号17）および2245-72（5'-G-G-T-C-T-G-T-G-T-A-T-C-G-C-A-T-C-C-T

－T－T－G－G－3'；配列番号18)を使用して実施した増幅反応において、ヒトB7RP-2ポリペプチドをコードするcDNA配列を単離した。予想されるサイズのPCR産物を単離し、そしてTopo IIベクター中にサブクローニングした。得られたライゲーション反応物を使用してコンピテント細菌を形質転換し、次いでこの様式で得られたクローンを配列決定により分析した。

【0281】

5' RACE反応および3' RACE反応の両方を実施して、ヒトB7RP-2ポリペプチドの全長cDNA配列を生成した。cDNA配列の3'末端に対応するcDNA配列を単離するために、pSPORT1ベクター中のヒト胎児頭蓋冠cDNAライブラリー、ならびにプライマー2245-72およびプライマー1071-80(5'-T-G-C-A-G-G-T-A-C-C-G-G-T-C-C-G-G-A-A-T-3'；配列番号19)を使用して、3' RACEを実施した。3' RACE増幅産物の一部ならびにプライマー2279-24(5'-T-G-T-C-A-G-A-G-C-A-G-G-A-T-G-C-A-T-C-T-G-T-3'；配列番号20)および1071-80を使用して、ネステッドPCRを実施した。800bpのPCR産物を単離し、そしてTopo IIベクター中にサブクローニングした。得られたライゲーション反応物を使用して、コンピテント細菌を形質転換し、次いでこの様式で得られたクローンを配列決定によって分析した。

10

【0282】

cDNA配列の5'末端に対応するcDNA配列を単離するために、上記のヒト胎児頭蓋冠cDNAライブラリー、ならびにプライマー2279-22(5'-T-G-C-A-T-T-G-C-C-T-T-G-T-G-C-C-A-G-C-A-G-G-T-3'；配列番号21)および1071-80を使用して、5' RACEを実施した。5' RACE増幅産物の一部ならびにプライマー2279-21(5'-C-T-G-T-C-A-G-C-T-G-C-C-A-G-A-T-G-A-G-G-T-T-G-3'；配列番号22)および1071-80を使用して、ネステッドPCRを実施した。400bpのPCR産物を単離し、そしてTopo IIベクター中にサブクローニングした。得られたライゲーション反応物を使用して、コンピテント細菌を形質転換し、次いでこの様式で得られたクローンを配列決定によって分析した。

20

【0283】

B7RP-2ポリペプチドをコードする全長cDNA配列を単離するために、上記のヒト胎児頭蓋冠cDNAライブラリー、ならびにプライマー2318-34(5'-G-C-G-T-C-C-C-T-G-A-G-T-C-C-C-A-G-A-G-3'；配列番号23)および2318-35(5'-G-T-G-T-A-T-C-G-C-A-T-C-C-T-T-T-G-G-A-G-A-A-G-3'；配列番号24)を使用して、増幅反応を実施した。約1.6kbのPCR産物を単離し、そしてTopo IIベクター中にサブクローニングした。得られたライゲーション反応物を使用して、コンピテント細菌を形質転換し、次いでこの様式で得られたクローンを配列決定によって分析した。配列分析は、ヒトB7RP-2遺伝子が、316アミノ酸のタンパク質をコードする948bpのオープンリーディングフレームを含有することを示した(図1A～1B)。

30

40

【0284】

マウスB7RP-2ポリペプチドをコードするcDNA配列およびラットB7RP-2ポリペプチドをコードするcDNA配列の単離は、マウスB7RP-2遺伝子(図2A～2B)およびラットB7RP-2遺伝子(図3A～3C)の両方がまた、948bpのオープンリーディングフレームを含み、各々316アミノ酸のタンパク質をコードすることを示す。ヒトB7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号2)、マウスB7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号4)およびラットB7RP-2ポリペプチドのアミノ酸配列(配列番号6)を、ClustalWアルゴリズムを使用して整列させた(Thompsonら, 1994, Nucleic Acids Res. 22:4673-80)。ヒトB7RP-2オルソログ、マウスB7RP-2オルソログおよびラットB

50

7 R P-2 オルソログの C l u s t a l W アラインメント (図 4 A ~ 4 B) は、ヒト B 7 R P-2 ポリペプチドが多く、位置で非保存的アミノ酸置換に寛容であること (配列番号 3 2 を参照のこと)、そしてさらに保存的アミノ酸置換がヒト B 7 R P-2 アミノ酸配列中のいくつかの他の位置 (例えば、2 0 位、2 9 位、1 0 1 位、1 2 0 位、1 8 4 位、2 6 0 位、2 6 1 位、2 9 1 位、および 3 0 6 位) で、なされ得ることを示唆する。C o n s e r v e d D o m a i n D a t a b a s e (主に、S m a r t データベースおよび P f a m データベースに由来する、機能ドメインおよび構造ドメインの集合) に対する、ヒト B 7 R P-2 オルソログ、マウス B 7 R P-2 オルソログおよびラット B 7 R P-2 オルソログの B L A S T 分析は、これら 3 つのタンパク質がまた、少なくとも 2 つの保存されたタンパク質ドメイン、すなわち免疫グロブリン V 型ドメインおよび免疫グロブリン C 型ドメインまたは C-2 型ドメインを共有することを示した (図 5)。

10

【0285】

配列分析はまた、B 7 R P-2 ポリペプチドが B 7 ファミリーのタンパク質と相同性を共有することを示した。図 6 A ~ 6 B は、ヒトブチロフィリンサブファミリー 1 メンバー A 1 (h u _ B T N 1 A 1 ; 配列番号 7)、ウシブチロフィリン前駆体 (b o _ B T N ; 配列番号 8)、マウスブチロフィリン (m u _ B T N ; 配列番号 9)、ヒトブチロフィリンサブファミリー 2 メンバー A 1 (h u _ B T N 2 A 1 ; 配列番号 1 0)、ヒトブチロフィリン様タンパク質 (h u _ B T 3 . 2 ; 配列番号 1 1)、ヒトブチロフィリンサブファミリー 3 メンバー A 2 (h u _ B T N 3 A 2 ; 配列番号 1 2)、G r u s a m e r i c a n a B - G - 様タンパク質 (g r _ B G 2 ; 配列番号 1 3)、およびヒト B 7 R P-2 ポリペプチド (h u _ B 7 R P-2 ; 配列番号 2) のアミノ酸配列アラインメントを示す。

20

【0286】

B 7 R P-2 遺伝子の推定タンパク質産物は B 7 ファミリータンパク質に関係する。これらのタンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、そして T 細胞媒介性免疫応答の制御因子として機能する。B 7 ファミリータンパク質のメンバーは、小さな細胞質ドメイン、ならびに免疫グロブリン V (可変) ドメインおよび免疫グロブリン C (定常) ドメインを含む、細胞外領域を有する 1 型膜タンパク質である。B 7 ファミリーの公知のメンバーとしては、C D 8 0 (B 7-1)、C D 8 6 (B 7-2)、B 7 R P-1、および B 7-H 1 が挙げられる。B 7-1 および B 7-2 は、C D 2 8 および C T L A-4 と相互作用し、そして、T 細胞同時刺激 (c o s t i m u l a t o r y) 経路のメディエーターである。B 7 R P-1 は、別のレセプター (I C O S ; 誘導可能な同時刺激因子) に結合し、そしてまた、T 細胞増殖の刺激因子である。B 7-H 1 もまた T 細胞増殖を同時刺激するが、C D 2 8 にも C T L A-4 にも I C O S にも結合しない。このファミリーのタンパク質配列は、ほとんど保存されておらず、そして結果的に、特に全長コード領域配列の一部を比較する場合、計算的な方法を使用して、他の関連分子と区別することが困難である。B 7 ファミリーと配列相同性を提示する他のタンパク質としては、ブチロフィリンおよび P R O 3 5 2 が挙げられる。ミエリンオリゴデンドロサイトタンパク質 (M O G) はさらに遠い関係にある。

30

【0287】

B a k e r ら (P C T 公開第 W O 9 9 / 4 6 2 8 1 号) は、P R O 3 5 2 と呼ばれる 3 1 6 アミノ酸のポリペプチド (配列番号 2 6) をコードする、1 9 9 8 b p の核酸配列 (配列番号 2 5) を開示する。C h a p o v a l ら (2 0 0 1, N a t . I m m u n . 2 : 2 6 9 - 2 7 4) は、B 7-H 3 と称される、3 1 6 アミノ酸のポリペプチド (配列番号 2 8) をコードする、9 5 1 b p の核酸配列 (配列番号 2 7) を開示する。C h a p o v a l らにより開示される核酸配列は、B 7 R P-2 ポリペプチドをコードする核酸配列と同一である。

40

【0288】

(実施例 2 : B 7 R P-2 m R N A の発現)

骨形成中の B 7 R P-2 m R N A 発現の動態を、デキサメタゾン、ビタミン C および β

50

ーグリセロホスフェート処理後の骨芽細胞において試験した。骨芽細胞をラットの骨髄から単離し、そして10% ウシ胎仔血清、3 ng/ml β -FGF、50 μ M β -メルカプトエタノールおよび抗生物質を含む、 α -最小栄養培地 (Minimal Essential Medium) 中で培養した。細胞がコンフルエントに達した場合にデキサメタゾン (10 nM) およびビタミンC (50 μ g/ml) を培地に添加し、次いで14日まで1日おきに培地を更新した。8日目に、 β -グリセロホスフェート (50 μ g/ml) もまた添加した。2日目、3日目、4日目、6日目、8日目、10日目、12日目および14日目に、全RNAを調製し、そしてプローブとして全長ラットB7RP-2 cDNA配列を使用するノーザンブロット分析により分析した。各々のレーンに、28S rRNAおよび18S rRNAにより評価した、等量のRNA (1レーン当たり20 μ g) を充填した。デキサメタゾン、ビタミンCおよび β -グリセロホスフェート添加後のB7RP-2 mRNAの発現の増加 (図7) は、B7RP-2ポリペプチドが骨芽細胞の増殖または分化に関与し得ることを示す。 10

【0289】

B7RP-2 mRNAの発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって位置付けた。正常のマウス胚 (E18.5) を4%パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包埋し、そして5 μ mで切片作製した。ハイブリダイゼーションの前に、切片を0.2M HClを用いて透過性にし、プロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸を用いてアセチル化した。切片を、マウスB7RP-2タンパク質コード配列の5'配列および3'配列に対応する³²P標識したリボプローブを用いて、55℃で一晩ハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーション後、切片をRNase Aで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで、0.1×SSCの高ストリンジェンシーまで漸減する塩濃度を有する、一連の緩衝液で55℃にて洗浄する。次いで、切片をNTB2エマルジョン中 (Kodak, Rochester, NY) に浸漬して、4℃で2~3週間曝露させて、発色させ、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色した。切片を組織形態およびハイブリダイゼーションシグナルの同時評価を可能とする、暗視野・透過型光照明で検査した。E18.5マウス胚の発達中の骨において、B7RP-2 mRNA発現を検出した (図8)。 20

【0290】

(実施例3: B7RP-2ポリペプチドの産生) 30

(A. 細菌におけるB7RP-2ポリペプチドの発現)

PCRを、B7RP-2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを使用して、その配列を増幅する。この増幅したDNA産物を、発現ベクター中への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むように改変し得る。PCR産物をゲル精製し、そして標準的な組換えDNA方法論を使用して、発現ベクター中に挿入する。luxプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含む、例示的なベクター (例えば、pAMG21 (ATCC番号98113)) を、挿入されるDNAの指向性クローニングのためにBamHIおよびNdeIで消化する。E. coli宿主株にエレクトロポレーションによって、連結された混合物を形質転換し、そして形質転換体を、カナマイシン耐性について選択する。選択されたコロニーからのプラスミドDNAを単離し、そして挿入物の存在を確認するためにDNA配列決定に供する。 40

【0291】

形質転換した宿主細胞を、誘導前に、30 μ g/mLのカナマイシンを含む2×YT培地中で30℃でインキュベートする。遺伝子発現を、N-(3-オキソヘキサノイル)-D-リボホモセリンラクトン (最終濃度30 ng/mL) で添加することによって誘導し、続いて30℃または37℃のいずれかで6時間インキュベートする。B7RP-2ポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌性ペレットの再懸濁および溶解、ならびにSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。

【0292】

B7RP-2ポリペプチドを含む封入体を、以下のように精製する。細菌細胞を遠心分離 50

によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁物を超音波処理によって溶解し、そして $195,000\times g$ での5～10分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を捨て、そしてこのペレットを洗浄し、そしてホモジナイザーに移す。このペレットを、5mLのPercol l溶液（75%液体Percol lおよび0.15M NaCl）に、一様に懸濁されるまでホモジナイズし、次いで、希釈し、そして $21,600\times g$ で30分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収し、そしてプールする。この単離された封入体を、SDS-PAGEによって分析する。

【0293】

E.col i 産生B7RP-2ポリペプチドに対応するSDS-ポリアクリルアミドゲル上の単一バンドを、ゲルから切り出し、そしてN末端アミノ酸配列を、Matsuda i r aら、1987, J. Biol. Chem. 262:10-35によって本質的に記載されるように決定する。 10

【0294】

(B. 哺乳動物細胞におけるB7RP-2ポリペプチドの発現)
PCRを、B7RP-2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列の5'末端および3'末端に対応するプライマーを使用して、その配列を増幅する。この増幅したDNA産物を、発現ベクターへの挿入を可能にするために制限酵素部位を含むように改変し得る。このPCR産物をゲル精製し、そして標準的な組換えDNA方法論を使用して、発現ベクターに挿入する。エプスタイン・バーウイルス複製起点を含む例示的な発現ベクター (pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA)) を、293-EBNA 20
-1細胞中でのB7RP-2ポリペプチドの発現のために使用し得る。増幅およびゲル精製されたPCR産物を、pCEP4ベクターに連結し、そしてリポフェクションによって293-EBNA細胞に導入する。トランスフェクトした細胞を、 $100\mu g/mL$ のハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物を、コンフルエントまで増殖させる。次いで、この細胞を無血清培地中で72時間培養する。馴化培地を除去し、そしてB7RP-2ポリペプチド発現を、SDS-PAGEによって分析する。

【0295】

B7RP-2ポリペプチド発現を、銀染色によって検出し得る。あるいは、B7RP-2ポリペプチドを、エピトープタグ（例えば、IgG定常ドメインまたはFLAGエピトープ）との融合タンパク質として産生し、このエピトープタグを、このペプチドタグに対する抗体を使用するウェスタンブロット分析によって検出し得る。 30

【0296】

B7RP-2ポリペプチドを、SDS-ポリアクリルアミドゲルから切り出すか、またはB7RP-2融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し得、そして本明細書中に記載されるようなN末端アミノ酸配列分析に供する。

【0297】

(C. 哺乳動物細胞におけるB7RP-2ポリペプチドの発現および精製)
B7RP-2ポリペプチド発現構築物を、リポフェクションまたはリン酸カルシウムプロトコルのいずれかを使用して、293-EBNA細胞またはCHO細胞に導入する。 40

【0298】

産生されるB7RP-2ポリペプチドに対する機能的研究を実施するために、多量の馴化培地を、ハイグロマイシン選択293-EBNAクローンのプールから生成する。この細胞を、500cm Nunc Triple Flask中で80%コンフルエントまで培養した後に、1週間無血清培地へと交換し、その後この培地を回収する。馴化培地を回収し、精製まで $-20^{\circ}C$ で凍結する。

【0299】

馴化培地を、以下に記載されるように、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで、 $0.2\mu m$ のフィルターを通す。プロテインGカラムを、PBS (pH7.0) で平衡化し、次いで、濾過した培地をロードする。このカラム 50

を、 A_{280} の吸光度がベースラインに達するまで PBS で洗浄する。B7RP-2 ポリペプチドを、0.1 M グリシン-HCl (pH 2.7) でカラムから溶出し、そして 1 M Tris-HCl (pH 8.5) で直ちに中和する。B7RP-2 ポリペプチドを含む画分をプールし、PBS 中で透析し、そして -70°C で保存する。

【0300】

ヒト B7RP-2 ポリペプチド-Fc 融合ポリペプチドの第 Xa 因子切断のために、アフィニティークロマトグラフィー精製タンパク質を、50 mM Tris-HCl、100 mM NaCl、2 mM CaCl_2 (pH 8.0) 中で透析する。制限プロテアーゼ第 Xa 因子を、この透析したタンパク質に 1/100 (w/w) で添加し、このサンプルを、室温で一晩消化する。

10

【0301】

(実施例 4: B7RP-2 ポリペプチドのインビトロ特徴付け)

骨石灰化の間、B7RP-2 mRNA 発現の阻害活性を、頭蓋冠細胞においてデキサメタゾン、ビタミン C、および β -グリセロホスフェートで処置した後、試験した。頭蓋冠細胞を、新生児マウス (CD1 株) から単離し、そして 10% ウシ胎仔血清、50 μM β -メルカプトエタノール、および抗生物質を含む α -必須最小 (minimal essential) 培地中で培養した。デキサメタゾン (10 nM) およびビタミン C (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を、細胞がコンフルエントに達したときに培地に添加し、次いでこの培地を、14 日目まで一日おきに入れ換えた。12 日目に、 β -グリセロホスフェート (10 mM) もまた添加した。14 日目に、骨石灰化の程度を、von Kossa 染色によって決定した。可溶性 B7RP-2 ポリペプチドが、用量依存性様式で、小結節形成および石灰化をインビトロで阻害することが見出され (図 9)、このことは、B7RP-2 ポリペプチドが、骨形成の調節に関与し得ることを示す。

20

【0302】

ヒト IgG1 の Fc 部分にインフレイムで融合された B7RP-2 の 2 つの細胞外 Ig ドメインを含む組換えタンパク質 (B7RP-2-Fc) を合成した。C57BL/6 マウス由来のリンパ節細胞を、磁気ビーズ (Dynal, Oslo, Norway) を使用して、 B220^+ 細胞を枯渇化させた。精製したリンパ節 T 細胞を、U 底 96 ウェルプレート中で、プレート結合抗 CD3 (0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) および 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のプレート結合ヒト IgG1 (アイソタイプコントロール)、B7RP-2-Fc、または B7-2-Fc (ポジティブコントロール) を使用して活性化した。T 細胞増殖を、72 時間のインキュベーションの期間の最後の 8 時間、 ^3H -チミジンで細胞をパルスすることによってアッセイした。B7RP-2-Fc は、コントロールに比べて 5 倍まで T 細胞増殖を阻害した (図 10A)。培養上清における、インターロイキン-2 (IL-2) 産生 (図 10B) およびインターフェロン- γ (IFN- γ) 産生 (図 10C) を、ELISA を使用して測定した。IL-2 産生および IFN- γ 産生を、おそらく T 細胞増殖の減少に起因して、同様に減少した (図 10B および図 10C)。これらの結果は、B7RP-2 がインビトロでの TCR 媒介性 T 細胞増殖を阻害することを示す。

30

【0303】

(実施例 5: B7RP-2 のインビボでの特徴付け)

40

(A. B7RP-2 (-/-) マウスの産生)

B7RP-2 のインビボでの役割を、B7RP-2 欠損マウスを作製することによって試験した。マウス B7RP-2 ゲノムクローンを、プローブとして全長ラット B7RP-2 cDNA を使用して、129/J ファージライブラリーから単離した。ターゲティングベクターを、B7RP-2 の第 2 の Ig ドメインをコードするエキソンをネオマイシン耐性カセットと置換するように設計した (図 11)。B7RP-2 の第 2 の Ig ドメインをコードするエキソンを含む、約 3.2 kb ゲノム配列 (図 11 において黒長方形) を、PGK プロモーター駆動性ネオマイシン耐性遺伝子 (Neo) によって置換した。ジフテリトキシニン A (DT-A) をネガティブ選択のために使用した。ターゲティングベクターを、直接的なマイクロインジェクションによって、E14 胚性幹細胞 (ES 細胞) (12

50

9/O1a)に導入し、そしてES細胞クローンを、相同組換えを受けたクローンを同定するためにPCRによってスクリーニングした。

【0304】

選択されたESクローンを、サザンブロット分析によって検証した。サザンブロッティングについて、B7R P-2 (+/+)マウス、B7R P-2 (+/-)マウスおよびB7R P-2 (-/-)マウス由来のBg l I I消化ゲノムDNAを、図11に示される5'隣接プローブにハイブリダイズさせた。C57BL/6未分化胚芽細胞を、B7R P-2 (+/-)ES細胞と共に注入し、そして偽妊娠雌性マウスに移植した。得られたキメラマウスを、C57BL/6マウスと交配し、異型接合F1子孫を得、このF1子孫を交配し、B7R P-2 (-/-)マウスを生成した。2つの独立したESクローンに由来するB7R P-2 (-/-)マウスは、同じ表現型を示した。 10

【0305】

B7R P-2 遺伝子の破壊を、F2子孫からのゲノムDNAのサザン分析によって確認した(図12)。抗B7R P-2抗体を、このマウスがB7R P-2タンパク質を産生しなかったことを検証するために使用した。ウサギポリクローナル抗体を、ラットB7R P-2-Fcタンパク質に対して惹起させた。抗血清を、プロテインAカラムを通して精製し、そして抗Fc抗体を、Fcアフィニティーカラムを使用して回収した。B7R P-2 (-/-)マウスからのマウス胎性線維芽細胞(MEF)のフローサイトメトリー分析は、B7R P-2タンパク質の非存在を確認した(図13)。MEFを、抗B7R P-2ウサギIgGおよびFITC結合体化ヤギ抗ウサギIgGで染色した。 20

【0306】

B7R P-2 (-/-)マウスを、予想されるメンデル比で得、そして正常なサイズ、成熟、および受胎能であることが見出された。骨髄、胸腺、リンパ節、脾臓、および末梢血におけるT細胞集団、B細胞集団、およびNK細胞集団は、B7R P-2 (-/-)マウスにおいて正常であった。C57BL/6×129/O1aのF2動物およびF3動物を、次の分析のために使用した。

【0307】

(B. B7R P-2 (-/-)マウスにおけるT細胞応答)

B7R P-2 (-/-)マウスを、B7R P-2タンパク質の非存在が高められたT細胞媒介性過敏症に寄与するかどうかを決定するために使用した。Th1細胞またはTh2細胞のいずれかによって駆動される気道炎症モデル、およびリンパ球脈絡髄膜炎ウイルス(LCMV)感染に対する細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答を反映するフットパッドスウェリング(foot pad-swelling)モデルを、T細胞応答を試験するために使用した。サイトカイン(Th1偏向性またはTh2偏向性)微小環境を、GM-CSFおよびIL-12(Th1)、またはGM-CSF単独(Th2)の一過性アデノウイルス媒介性鼻腔内発現によって、B7R P-2 (+/+)マウスおよびB7R P-2 (-/-)マウスの気道内で確立した。適切なサイトカインcDNAを保有する複製欠損アデノウイルスの鼻腔内発現を、1日目(-)に開始した。(+/+)マウスおよび(-/-)マウスを、連続した10日間(0~9日目)において、オボアルブミン(OVA)エアロゾル(0.9%生理食塩水中の1%重量/体積)に、20分間曝露し、気道炎症を引き起こさせた。11日目に、このマウスを屠殺し、そして気管支肺胞洗浄(BAL)流体中の免疫細胞集団を、差示的に染色し、そして計数した。残存肺組織を、ヘマトキシリンおよびエオシン(H&E)染色によって、組織学的試験のためにプロセスした。いくつかの場合において、肺細胞を、コラーゲナーゼ処理によって遊離し、そしてフローサイトメトリーによって分析した。エキソピボ脾臓細胞を、400μg/mlのOVAの非存在下または存在下で5日間培養し、その後、ELISA(R&Dシステム)によってサイトカインの産生を測定した。 40

【0308】

Th1条件下でのOVA感作の後、B7R P-2 (-/-)マウスは、B7R P-2 (+/+)に比べて2.5倍より浸潤された免疫細胞を気道内に有した(図14;全体)。リ 50

ンパ球（図14；リンパ球）、マクロファージ、および好中球の部分集団を、同程度まで増加させた。肺切片の組織学的試験は、B7RP-2の非存在下で増加した重篤度の浸潤を確認した（図15；Th1）。B7RP-2（-/-）マウスの肺浸潤物中の、CD4⁺T細胞集団およびCD8⁺T細胞集団の両方における活性化細胞（CD69⁺細胞）の割合を、コントロールと比較した（CD4⁺T細胞の間では、それぞれ59.5%および47.2%；CD8⁺T細胞の間では、それぞれ76.7%および65.9%；図16）。

【0309】

Th1条件下で感作されたB7RP-2（-/-）マウスから回収された脾臓細胞は、インビトロでOVAで再刺激される場合、B7RP-2（+/+）脾臓細胞と比較して、約60%を超えるIFN- γ を産生した。しかし、Th2条件下で、類似した数の肺浸潤免疫細胞を、B7RP-2（+/+）マウスおよびB7RP-2（-/-）マウスからのBAL流体および肺切片において見出した（図14および図15；Th2）。好酸球増加症（Th2-駆動性気道炎症の特徴）はまた、類似しており（図15；Th2；下パネル）、そしてOVA-刺激B7RP-2（+/+）脾臓細胞およびB7RP-2（-/-）脾臓細胞は、類似するレベルのIL-4、IL-5、およびIL-13を一定して産生した。従って、Th1駆動性気道炎症において、B7RP-2（-/-）マウスは、コントロールマウスより重篤な疾患を発症し、そしてT細胞活性化の増加を示すが、Th2駆動性気道炎症においてはそうではない。

【0310】

CTL媒介性過敏症反応におけるB7RP-2の役割を、B7RP-2（+/+）マウスおよびB7RP-2（-/-）マウスのフットパッドにLCMVを注射することによって試験した。フットパッドスエリングの程度および動力学は、遺伝子型間で、区別し得る（図17）。これらのデータは、B7RP-2がTh1媒介性応答をダウンレギュレーションすることに関与するが、Th2媒介性過敏症反応またはCTL媒介性過敏症には関与しないことを示す。

【0311】

（実施例6：実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）におけるB7RP-2の役割）
B7RP-2の役割はまた、実験的自己免疫脳脊髄炎（EAE）（別のTh1駆動性疾患モデル）において調査される。EAEの誘導およびEAEの臨床的スコアリングを、以下のように実施した。EAEを、ミエリン稀突起神経膠細胞糖タンパク質（MOG）のペプチド抗原提示アミノ酸35～55（M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K（配列番号29））でマウスを免疫することによって誘導した。B7RP-2（+/+）同腹仔およびB7RP-2（-/-）同腹仔（8～12週間）に、CFA（Sigma）中で乳化した300 μ gのMOG35-55ペプチドおよび500 μ gのMycobacterium tuberculosisを、0日目および7日目に皮下（s.c.）注射した。マウスに、500ngの百日咳毒素（List Biological, Campbell, CA）を、0日目および2日目に腹腔内（i.p.）注射した。EAE臨床スコアを、（中間レベルについて0.5の段階で）以下のように毎日測定した：0（臨床的徴候なし）；1（尾の緊張の消失）；2（不安定な歩行）；3（後肢麻痺）；4（後肢および前肢の麻痺）；5（死亡）。

【0312】

疾患発症の平均日数（臨床的スコアが1より大きい場合、1日目）は、B7RP-2（+/+）マウス（18.4日；n=14）よりB7RP-2（-/-）マウス（16.1日；n=16）においてより速く（図18A）、傾向は、同腹仔を比較した場合に明らかであった（図18B）。より速い発症に関わらず、B7RP-2（-/-）マウスは、疾患の末期までに、B7RP-2（+/+）マウスと同じ臨床的スコアを有した（図18A）。疾患発生率（+/+）において14/16および（-/-）において16/18）または死亡率（+/+）において1/14対（-/-）において3/16）はまた、等価であった。B7RP-2の非存在下でのEAEの初期の発症は、B7RP-2がTh1駆

動性免疫応答を負に調節するという仮定に対する支持を提供する。

【0313】

(実施例7: B7RP-2 (-/-) マウスにおける細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 応答)

(A. リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) 特異的 CTL 応答)

リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス (LCMV) またはインフルエンザウイルスに対する、抗ウイルス細胞傷害性Tリンパ球 (CTL) 応答に対する B7RP-2 の効果をまた、インビボで試験した。最初の CTL 応答について、B7RP-2 (-/-) マウスおよび B7RP-2 (+/+) マウスに、2000 pfu の LCMV (Armstrong 株) を静脈 (i. v.) 注射した。感染後8日目に、脾臓細胞を回収し、そしてエキソビボ CTL 活性を、LCMV 糖タンパク質ペプチド p33 (K-A-V-Y-N-F-A-T-M; 配列番号30) でパルスした ⁵¹Cr 標識 EL4 細胞を使用する標準的な ⁵¹Cr 放出アッセイによって測定した。LCMV での感染8日後の B7RP-2 (-/-) マウス由来の脾臓細胞は、B7RP-2 (+/+) マウス由来の脾臓細胞と同じレベルのエキソビボ CTL 活性を示した (図19; 初期)。

【0314】

B7RP-2 (-/-) マウスおよび B7RP-2 (+/+) マウスにおける CTL 記憶応答を、フットパッドスエリングアッセイを使用して試験した。フットパッドスエリングについて、3000 pfu LCMV (Armstrong 株) を、B7RP-2 (-/-) マウスおよび B7RP-2 (+/+) マウスの後フットパッドに注射し、このフットパッドの厚さを、カリパーで測定した。記憶 CTL 活性を測定するために、フットパッドスエリング実験のために使用されたマウスを、30日目に屠殺し、その脾臓細胞を回収した。この回収された脾臓細胞を、1 μM の p33 ペプチドおよびラット脾臓細胞 ConA 培養上清の存在下で、細胞を5日間培養することによって、インビトロで再刺激した。細胞傷害性を、上記のように測定した。B7RP-2 (-/-) マウスから回収した脾臓細胞において検出される CTL 活性のレベルは、B7RP-2 (+/+) マウスから回収された脾臓細胞と同程度であった (図19; 記憶)。これらの実験は、LCMV に対する正常初期 CTL 応答および記憶 CTL 応答を、B7RP-2 の非存在下で上昇させ得ることを示す。

【0315】

(B. インフルエンザウイルス核蛋白質 (NP) 特異的 CTL 応答)

LCMV 感染に関連する強い抗原刺激が共刺激シグナルに対する必要性をマスクするという可能性を排除するために、インフルエンザウイルスに対する CTL 応答を試験した。B7RP-2 (-/-) マウスおよび B7RP-2 (+/+) マウスを、200 ヘマグルチニン単位 (HAU) のインフルエンザ A/HKx31 (H3N1) で腹腔内 (i. p.) 感染させた。インフルエンザウイルス核蛋白質 (NP) 特異的 CTL の拡大を、抗 CD8 mAb (ebioscience, San Diego, CA) および四量体 H-2Db/NP366-374 (A-S-N-E-N-M-E-T-M; 配列番号31) (NIH AIDS MHC Tetramer Core Facility, Atlanta, GA) の感染の7日後および21日後に染色した脾臓細胞のフローサイトメトリー分析によって、モニタリングした。一次インフルエンザウイルス感染および二次インフルエンザウイルス感染の間、NP366-374/H-2Db-特異的 CTL の拡大は、B7RP-2 (+/+) マウスおよび B7RP-2 (-/-) マウスで区別可能であった (図20)。記憶 CTL 応答について、B7RP-2 (+/+) マウスおよび B7RP-2 (-/-) マウス (4匹マウス/群) を、HKx31 で感染させ、そして4週間後に、血清学的に異なるインフルエンザウイルス A/PR/8/34 (H1N1) (これは、HKx31 と同じ NP 遺伝子を共有する) で再感染させた。再感染の7日後に脾臓細胞を回収し、四量体染色によって分析した。CD8⁺ T 細胞間で、IFN-γ 産生細胞の数およびインビトロで最刺激される脾臓細胞の細胞傷害性に差異はなかった。

【0316】

(実施例8：抗B7RP-2ポリペプチド抗体の産生)

B7RP-2ポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成によって産生されたタンパク質または化学合成によって生成されたB7RP-2ペプチドでの免疫によって得ることができる。抗体生成に対する適切な手順は、HudsonおよびBay, Practical Immunology (第2版、Blackwell Scientific Publications)に記載される手順を含む。

【0317】

抗体の産生のための1つの手順において、動物(代表的には、マウスまたはウサギ)にB7RP-2抗原(例えば、B7RP-2ポリペプチド)を注射し、そしてELISAによって決定されるような十分な血清力価レベルを有する抗体をハイブリドーマ産生について選択する。免疫された動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁物として調製し、そこから脾臓細胞を回収した。この脾臓細胞を、マウス骨髄腫細胞(例えば、Sp2/O-Ag14細胞)に融合し、そしてまず200U/mLペニシリン、200μg/mL硫酸ストレプトマイシン、および4mMグルタミンを含有するDMEM中でインキュベートし、次いで、HAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジン)中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を、各融合ウェルからとり、そしてELISAによって抗B7RP-2抗体産生について試験する。

【0318】

抗B7RP-2抗体を得るための代替的な手順(例えば、ヒト抗体の産生のためのヒトIg遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー(例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって産生される合成抗体ライブラリー)のスクリーニング)もまた使用し得る。

【0319】

(実施例9：トランスジェニックマウスにおけるB7RP-2ポリペプチドの発現)

B7RP-2ポリペプチドの生物学的活性を評価するために、肝臓特異的ApoEプロモーターの制御下で、B7RP-2ポリペプチド/Fc融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達は、B7RP-2ポリペプチドの機能に関する情報を与える、病理学的変化を引き起こすことが予想される。同様に、βアクチンプロモーターの制御下で、全長B7RP-2ポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達は、遍在的な発現を生じることが予想される。

【0320】

これらの構築物を生成するために、PCRを、所望の配列の5'末端および3'末端に対応し、増幅産物の発現ベクターへの挿入を可能にする制限酵素部位を組込むプライマーを使用して、B7RP-2ポリペプチドをコードするテンプレートDNA配列を増幅するために使用する。増幅の後に、標準的な組換えDNA技術を使用して、PCR産物をゲル精製し、適切な制限酵素部位で消化し、そして発現ベクターに組込む。例えば、増幅したB7RP-2ポリペプチド配列を、Grahamら、1997, Nature Genetics, 17:272-74、およびRayら、1991, Genes Dev. 5:2265-73によって記載されるように、ヒトβ-アクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

【0321】

連結後、反応混合物を、E. coli宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換するために使用し、形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択されたコロニーからのプラスミドDNAを単離し、そして適切な挿入物の存在および変異の非存在を確認するためにDNA配列決定に供する。B7RP-2ポリペプチド発現ベクターを、2回のCsCl密度勾配遠心分離によって精製し、適切な制限酵素で切断し、そしてB7RP-2ポリペプチド導入遺伝子を含む線状化されたフラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。この精製したフラグメントを、5mM Tris (pH 7.4)、および0.2mM EDTA中に、2mg/mLの濃度で再懸濁する。

【0322】

10

20

30

40

50

B D F 1 × B D F 1 交配マウス由来の単細胞胚を、(P C T 公開番号 W O 9 7 / 2 3 6 1 4 号)に記載されるように注入する。胚を C O₂ インキュベーター中で一晚培養し、そして 1 5 ~ 2 0 の二細胞胚を、偽妊娠 C D 1 雌性マウスの卵管に移す。微量注入された胚の移植から得られる子孫を、以下のようにゲノム D N A サンプル中に組込まれた導入遺伝子の P C R 増幅によってスクリーニングする。耳の断片を、2 0 m L の耳緩衝液 (2 0 m M T r i s (p H 8 . 0)、1 0 m M E D T A、0 . 5 % S D S、および 5 0 0 m g / m L プロテイナーゼ K) 中、5 5 °C で一晚消化する。次いで、このサンプルを 2 0 0 m L の T E で希釈し、そして 2 m L の耳サンプルを、適切なプライマーを有する P C R 反応物中で使用する。

【0323】

8 週齢において、トランスジェニックファウンダー動物およびコントロール動物を、剖検および病理学的分析のために屠殺する。脾臓の一部を回収し、そして全細胞 R N A を、T o t a l R N A E x t r a c t i o n K i t (Q i a g e n) を使用して脾臓から単離し、そして導入遺伝子発現を、R T - P C R によって決定する。脾臓から回収した R N A を、以下のように S u p e r S c r i p t^{T M} P r e a m p l i f i c a t i o n S y s t e m (G i b c o - B R L) を使用して c D N A に変換する。適切なプライマー (発現ベクター配列内の B 7 R P - 2 ポリペプチド導入遺伝子の 3' に位置する) を、導入遺伝子転写物から c D N A 合成を開始するために使用する。トランスジェニックファウンダーおよびコントロール由来の 1 0 m g の全脾臓 R N A を、1 m M のプライマーと 7 0 °C で 1 0 分間インキュベートし、そして氷上に配置する。次いで、反応物を、1 0 m M T r i s - H C l (p H 8 . 3)、5 0 m M K C l、2 . 5 m M M g C l₂、1 0 m M の各 d N T P、0 . 1 m M D T T、および 2 0 0 U の S u p e r S c r i p t I I 逆転写酵素を補充する。4 2 °C で 5 0 分のインキュベーションの後、反応を、7 2 °C で 1 5 分間加熱することによって停止し、そして 2 U の R N a s e H で 3 7 °C にて 2 0 分間消化する。次いで、サンプルを、B 7 R P - 2 ポリペプチドに特異的なプライマーを使用する P C R によって増幅する。

【0324】

(実施例 10: トランスジェニックマウスにおける B 7 R P - 2 ポリペプチドの生物学的活性)

安楽死の前に、トランスジェニック動物を秤量し、イソフルオランによって麻酔し、そして血液を心臓穿刺によって取り出す。このサンプルを、血液学分析および血清化学分析に供する。X 線撮影法を、終末全採血の後、実施する。全切開の後、主要な内臓器官を、重量分析に供する。

【0325】

全切開の後、組織 (すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節ならびに骨格筋) を回収し、そして組織学的試験のために 1 0 % 緩衝化 Z n - ホルマリン中で固定化する。固定後、組織を、パラフィンブロック中で処理し、そして 3 m m の切片を得る。全ての切片をヘマトキシリンおよびエオシン (e x o s i n) で染色し、次いで、組織学的分析に供する。

【0326】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下のように、B 細胞特異的抗体および T 細胞特異的抗体を用いて組織学的分析に供する。ホルマリン固定パラフィン包埋切片を、脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。この切片を 3 % 過酸化水素でクエンチし、P r o t e i n B l o c k (L i p s h a w, P i t t s b u r g h, P A) でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウス B 2 2 0 およびラットモノクローナル抗マウス C D 3 (H a r l a n, I n d i a n a p o l i s, I N) 中でインキュベートする。抗体結合を、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよび色原体として D A B (B i o T e k, S a n t a B a r b a r a, C A) を有するペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン (B i o G

10

20

30

40

50

enex, San Ramon, CA) によって検出する。切片をヘマトキシリンで対比染色する。

【0327】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロール同腹仔由来のMLNならびに脾臓および胸腺の切片を除去する。単一細胞懸濁物を、シリンジの平らな末端を用いて100mmナイロン細胞ストレーナー(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)の底に対して組織をおだやかにすりつぶすことによって調製する。細胞を2回洗浄し、計数し、次いで各組織からの約 1×10^6 細胞を、20 μ L容量中で0.5 μ gのCD16/32(FcyRII/II)Fcブロックと共に10分間インキュベートする。次いで、サンプルを、CD90.2(Thy-1.2)、CD45R(B220)、CD11b(Mac-1)、Gr-1、CD4、またはCD8に対するFITCまたはPEを結合体化したモノクローナル抗体(PharMingen, San Diego, CA)0.5 μ gを有するPBS(Ca^{+} および Mg^{+} を含まない)、0.1%のウシ血清アルブミン、および0.01%アジ化ナトリウム(100 μ L容積)中にて2~8℃で30分間染色する。抗体結合の後、この細胞を洗浄し、次いでFACSscan(Becton Dickinson)でフローサイトメトリーによって分析する。

【0328】

本発明は、好ましい実施形態に関して記載されているものの、バリエーションおよび改変は当業者が想起することが理解される。従って、添付される特許請求の範囲は、主張されるように本発明の範囲内に入る全てのこのような等価なバリエーションを含むことが意図される。

【図面の簡単な説明】

【0329】

【図1】図1A~図1Bは、ヒトB7RP-2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号1)およびヒトB7RP-2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号2)を図示する。

【図2】図2A~図2Bは、マウスB7RP-2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号3)およびマウスB7RP-2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号4)を図示する。

【図3】図3A~3Cは、ラットB7RP-2遺伝子のヌクレオチド配列(配列番号5)およびラットB7RP-2ポリペプチドの推定アミノ酸配列(配列番号6)を図示する。

【図4】4A~4Bは、ClustalWアルゴリズムを使用して調製された、ヒトB7RP-2ポリペプチド(huB7RP-2; 配列番号2)、マウスB7RP-2ポリペプチド(muB7RP-2; 配列番号4)、およびラットB7RP-2ポリペプチド(raB7RP-2; 配列番号6)のアミノ酸配列アラインメントを図示する。この配列は、MacVector 7.1.1アプリケーション(Accelrys, Cambridge, UK; <http://www.accelrys.com>)をデフォルト設定で使用して、整列された。保存された残基が、四角で囲まれている。

【図5】図5は、Conserved Domain Databaseに対するアミノ酸のBLAST分析後に示された、ヒトB7RP-2ポリペプチド(配列番号2)、マウスB7RP-2ポリペプチド(配列番号4)、およびラットB7RP-2ポリペプチド(配列番号6)によって保有されるいくつかの保存されたドメインの位置を図示する。

【図6】図6A~6Bは、ヒトブチロフィリン、サブファミリー1、メンバーA1(hu__BTN1A1; 配列番号7; GenBank登録番号NP_001723)、ウシブチロフィリン前駆体(bo__BTN; 配列番号8; GenBank登録番号P18892)、マウスブチロフィリン(mu__BTN; 配列番号9; GenBank登録番号NP_038511)、ヒトブチロフィリン、サブファミリー2、メンバーA1(hu__BTN2A1; 配列番号10; 登録番号NP_008980)、ヒトブチロフィリン様タンパク質(hu__BT3.2; 配列番号11; GenBank登録番号ACC02652)、ヒトブチロフィリン、サブファミリー3、メンバーA2(hu__BTN3A2; 配列番号12; GenBank登録番号NP_008978)、Grus americana B

ーG様タンパク質 (g r _ B G 2 ; 配列番号 1 3 ; G e n B a n k 登録番号 A F 0 3 3 1 0 7) 、 およびヒト B 7 R P - 2 ポリペプチド (h u _ B 7 R P - 2 ; 配列番号 2) のアミノ酸配列アラインメントを図示する。

【図 7】図 7 は、デキサメタゾン、ビタミン C、および β -グリセロホスフェートでの処置後、骨芽細胞のノーザンブロット分析によって検出される B 7 R P - 2 m R N A の発現を図示する。

【図 8】図 8 は、インサイチュハイブリダイゼーションによって検出される、E 1 8 . 5 マウス胚中の B 7 R P - 2 m R N A の発現を図示する。

【図 9】図 9 は、B 7 R P - 2 ポリペプチドによる骨鉱化作用の阻害を図示する。細胞を、ポリペプチドなし (プレート A)、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の I g G 1 アイソタイプコントロール (プレート B)、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性 B 7 R P - 2 ポリペプチド (プレート C) または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の可溶性 B 7 R P - 2 ポリペプチド (プレート D) のいずれかで処理した。

【図 10】図 10 A ~ 10 C は、T 細胞増殖、インターロイキン - 2 産生、およびインターフェロン - γ 産生に対する B 7 R P - 2 の影響を図示する。

【図 11】図 11 は、B 7 R P - 2 - / - マウスを作製するための、についての野生型マウス B 7 R P - 2 座、標的化ベクター、および変異 B 7 R P - 2 対立遺伝子を図示する (B, B g l I I ; H, H i n d I I I ; X, X b a I)。

【図 12】図 12 は、B 7 R P - 2 遺伝子の破壊を確認する F 2 子孫由来のゲノム DNA のサザン分析を示す。

【図 13】図 13 は、示された遺伝子型の M E F 細胞中の B 7 R P - 2 タンパク質発現のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 14】図 14 は、サイトカイン誘導性気道炎症を有する、B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス由来の気管支肺胞洗浄 (B A L) 液中の総細胞数およびリンパ球数を示す。

【図 15】図 15 は、サイトカイン誘導性気道炎症を有する B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス由来の肺切片のヘマトキシリンおよびエキソシン染色を示す。

【図 16】図 16 は、サイトカイン誘導性気道炎症を有する B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス (各グループにつき 4 匹のマウス) からプールされた肺浸潤物に基づく肺浸潤 T 細胞のフローサイトメトリー分析を示す。

【図 17】図 17 は、B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウスの L C M V 誘導性足蹠腫脹を示す。

【図 18】図 18 A ~ 18 B は、あるグループ (図 16 A) 中の全てのマウスの平均臨床スコア、および同腹仔 (図 16 B) 間で比較した E A E 発症の時間; 同一の同腹仔由来の個々のマウスを示す同一の列における C i C i r c l e によって決定される B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス中の実験的自己免疫脳脊髄炎 (E A E) の疾患原因を示し、表された結果は、4 つの独立した実験の要約である。

【図 19】図 19 は、注射後 8 日で収集された、B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス由来の脾細胞における、L C M V に対する C T L 応答、および注射後 30 日で収集されそしてインビトロで 5 日間再刺激された、B 7 R P - 2 - / - マウスおよび B 7 R P - 2 + / + マウス由来の脾細胞における、L C M V に対するメモリー C T L 応答を図示する。

【図 20】図 20 は、B 7 R P - 2 - / - マウスおよび + / + マウスから収集された脾細胞におけるインフルエンザウイルスに対する C T L 応答および C T L メモリー応答を図示する。

10

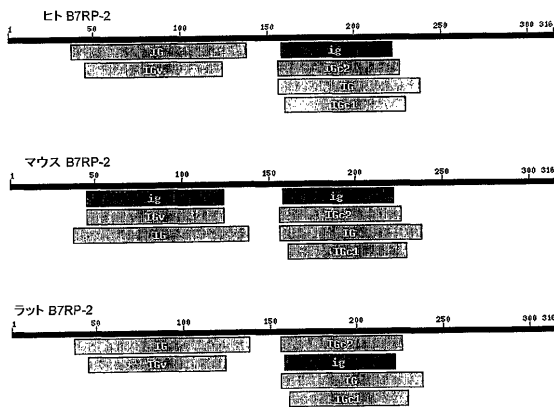
20

30

40

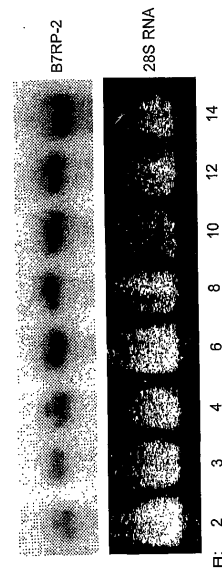
【図 5】

FIG. 5



【図 7】

FIG. 7



【図 10】

FIG. 10C

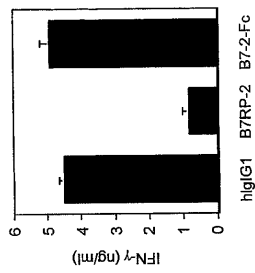


FIG. 10B

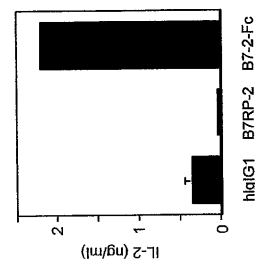
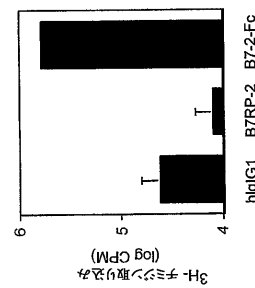
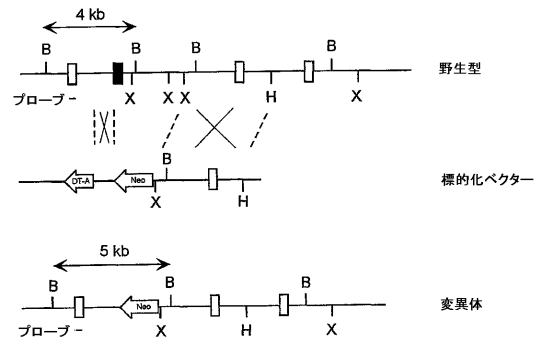


FIG. 10A



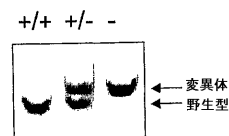
【図 11】

FIG. 11

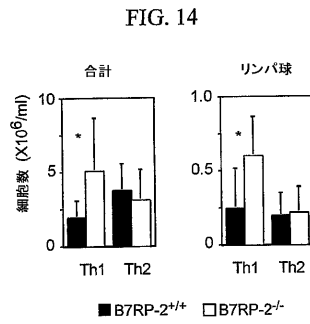


【図 12】

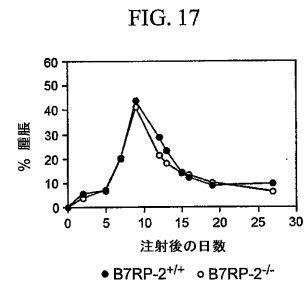
FIG. 12



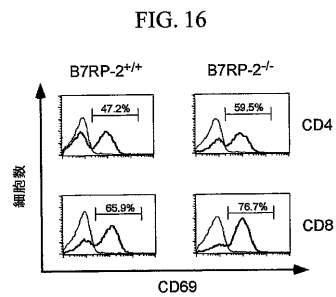
【図 1 4】



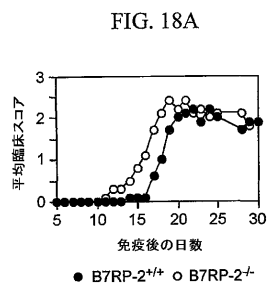
【図 1 7】



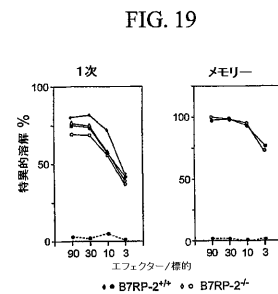
【図 1 6】



【図 1 8】



【図 1 9】



【図 2 0】

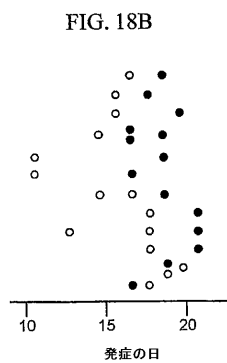
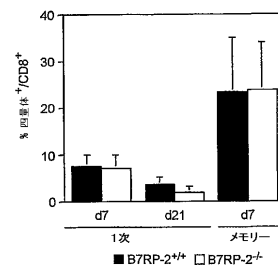


FIG. 20



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097046 A2

- (51) International Patent Classification²: C12N
- (21) International Application Number: PCT/US02/16740
- (22) International Filing Date: 28 May 2002 (28.05.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/293,629 25 May 2001 (25.05.2001) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/293,629 (CON)
Filed on 25 May 2001 (25.05.2001)
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320-1799 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): YOSHINAGA, Steven, Kiyoshi [US/US]; 1806 Calle Salto, Thousand Oaks, CA 91360 (US); SUH, Woong-Kyung [KR/CA]; 55 Charles Street West, Apt. 504, Toronto, Ontario M5S 2W9 (CA); MAK, Tak, Wah [CA/CA]; 25 Elgin Avenue, Toronto, Ontario M5R 1G5 (CA).
- (74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LI, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/097046 A2

(54) Title: B7 RELATED PROTEIN-2 MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides B7 related Protein-2 (B7RP-2) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing B7RP-2 polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with B7RP-2 polypeptides.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

B7 RELATED PROTEIN-2 MOLECULES AND USES THEREOF

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/293,629, filed on May 25, 2001, the disclosure of which is explicitly incorporated by reference herein.

Field of the Invention

The present invention relates to B7 Related Protein-2 (B7RP-2) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also relates to selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing B7RP-2 polypeptides. The invention further relates to pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with B7RP-2 polypeptides.

Background of the Invention

Technical advances in the identification, cloning, expression, and manipulation of nucleic acid molecules and the deciphering of the human genome have greatly accelerated the discovery of novel therapeutics. Rapid nucleic acid sequencing techniques can now generate sequence information at unprecedented rates and, coupled with computational analyses, allow the assembly of overlapping sequences into partial and entire genomes and the identification of polypeptide-encoding regions. A comparison of a predicted amino acid sequence against a database compilation of known amino acid sequences allows one to determine the extent of homology to previously identified sequences and/or structural landmarks. The cloning and expression of a polypeptide-encoding region of a nucleic acid molecule provides a polypeptide product for structural and functional analyses. The manipulation of nucleic acid molecules and encoded polypeptides may confer advantageous properties on a product for use as a therapeutic.

In spite of the significant technical advances in genome research over the past decade, the potential for the development of novel therapeutics based on the human genome is still largely unrealized. Many genes encoding potentially beneficial polypeptide therapeutics or those encoding polypeptides, which may act as "targets" for therapeutic molecules, have still not been identified. Accordingly, it is an object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Summary of the Invention

The present invention relates to novel B7RP-2 nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

5 The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

- (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5;
- (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 10 (c) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of either (a) or (b), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- (d) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of
- 15 any of (a) - (c).

The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

- (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 20 (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a);
- 25 (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or the nucleotide sequence of (a) or (b), encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic;
- 30 (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d),

WO 02/097046

PCT/US02/16740

wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or

(f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).

5

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

10

(b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

15

(c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

20

(d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, amino acid insertion, amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

25

30

(f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f),

WO 02/097046

PCT/US02/16740

wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or

(h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (g).

5

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

10 The invention also provides for an isolated polypeptide comprising:

(a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(b) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6,

15 wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

(c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID

20 NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic; or

(d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or the amino acid sequence of either (a) or (b).

25 The invention further provides for an isolated polypeptide comprising:

(a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

30 (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;

WO 02/097046

PCT/US02/16740

- (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 5 (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, amino acid insertion, amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

- 15 The invention still further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one conservative amino acid substitution that is a valine at position 20; valine at position 29; valine at position 101; tyrosine at position 120; leucine at position 184; valine at position 260; valine or isoleucine at position 261; aspartic acid at position 291; or glutamic acid at position 306; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

- Also provided are fusion polypeptides comprising B7RP-2 amino acid sequences.
- 25 The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a B7RP-2 polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

- 30 A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a B7RP-2 polypeptide is also encompassed by the invention. The B7RP-2 nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a B7RP-2 polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the B7RP-2 nucleic acid molecules are introduced into the

WO 02/097046

PCT/US02/16740

animal in a manner that prevents expression of endogenous B7RP-2 polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing a B7RP-2 polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

5 Also provided are derivatives of the B7RP-2 polypeptides of the present invention.

Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the B7RP-2 polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

10 Pharmaceutical compositions comprising the nucleotides, polypeptides, or selective binding agents of the invention and one or more pharmaceutically acceptable formulation agents are also encompassed by the invention. The pharmaceutical compositions are used to provide therapeutically effective amounts of the nucleotides or polypeptides of the present invention. The invention is also directed to methods of

15 using the polypeptides, nucleic acid molecules, and selective binding agents.

The B7RP-2 polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to
20 identify a test molecule that binds to a B7RP-2 polypeptide. The method comprises contacting a B7RP-2 polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a B7RP-2 polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of
25 molecules on the expression of B7RP-2 polypeptide or on the activity of B7RP-2 polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of a B7RP-2 polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a
30 B7RP-2 polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a B7RP-2 polypeptide may be administered. Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

In another aspect of the present invention, the B7RP-2 polypeptides may be used for identifying receptors thereof ("B7RP-2 polypeptide receptors"). Various forms of "expression cloning" have been extensively used to clone receptors for protein ligands. See, e.g., Simonsen and Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:437-41 and Tartaglia *et al.*, 1995, *Cell* 83:1263-71. The isolation of a B7RP-2 polypeptide receptor is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the B7RP-2 polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble B7RP-2 polypeptide receptors, anti-B7RP-2 polypeptide receptor-selective binding agents (such as antibodies and derivatives thereof), small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those disclosed herein.

Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate the nucleotide sequence of the human B7RP-2 gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of human B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 2);

Figures 2A-2B illustrate the nucleotide sequence of the murine B7RP-2 gene (SEQ ID NO: 3) and the deduced amino acid sequence of the murine B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 4);

Figures 3A-3C illustrate the nucleotide sequence of the rat B7RP-2 gene (SEQ ID NO: 5) and the deduced amino acid sequence of rat B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 6);

Figures 4A-4B illustrate the amino acid sequence alignment of human B7RP-2 polypeptide (huB7RP-2; SEQ ID NO: 2), murine B7RP-2 polypeptide (muB7RP-2; SEQ ID NO: 4), and rat B7RP-2 polypeptide (raB7RP-2; SEQ ID NO: 6), which was prepared using the ClustalW algorithm. The sequences were aligned using the application MacVector 7.1.1 (Accelrys, Cambridge, UK; <http://www.accelrys.com>) at the default settings. Conserved residues are boxed;

Figure 5 illustrates the locations of several conserved domains possessed by human B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 2), murine B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 4),

WO 02/097046

PCT/US02/16740

and rat B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 6), as indicated following a BLAST analysis of the amino acid sequences against the Conserved Domain Database;

Figures 6A-6B illustrate the amino acid sequence alignment of human butyrophilin, subfamily 1, member A1 (hu_BT1A1; SEQ ID NO: 7; GenBank Accession No. NP_001723), bovine butyrophilin precursor (bo_BT1; SEQ ID NO: 8; GenBank Accession No. P18892), murine butyrophilin (mu_BT1; SEQ ID NO: 9; GenBank Accession No. NP_038511), human butyrophilin, subfamily 2, member A1 (hu_BT2A1; SEQ ID NO: 10; Accession No. NP_008980), human butyrophilin-like protein (hu_BT3.2; SEQ ID NO: 11; GenBank Accession No. ACC02652), human butyrophilin, subfamily 3, member A2 (hu_BT3A2; SEQ ID NO: 12; GenBank Accession No. NP_008978), *Grus americana* B-G-like protein (gr_BG2; SEQ ID NO: 13; GenBank Accession No. AF033107), and human B7RP-2 polypeptide (hu_B7RP-2; SEQ ID NO: 2);

Figure 7 illustrates the expression of B7RP-2 mRNA as detected by Northern blot analysis of osteoblast cells following treatment with dexamethasone, vitamin C, and α -glycerophosphate;

Figure 8 illustrates the expression of B7RP-2 mRNA in an E18.5 mouse embryo as detected by *in situ* hybridization;

Figure 9 illustrates the inhibition of bone mineralization by B7RP-2 polypeptide. Cells were either treated with no polypeptide (plate A), 10 μ g/ml of an IgG1 isotype control (plate B), 1 μ g/ml of soluble B7RP-2 polypeptide (plate C) or 10 μ g/ml (plate D) of soluble B7RP-2 polypeptide;

Figures 10A-10C illustrate the effect of B7RP-2 on T-cell proliferation, interleukin-2 production, and interferon- γ production;

Figure 11 illustrates the wild type murine B7RP-2 locus, targeting vector, and mutated B7RP-2 allele for generating B7RP-2 $-/-$ mice. (B, Bgl II; H, Hind III; X, Xba I);

Figure 12 depicts a Southern analysis of genomic DNA from F2 progeny verifying the

WO 02/097046

PCT/US02/16740

disruption of the B7RP-2 gene;

Figure 13 depicts a flow cytometric analysis of B7RP-2 protein expression in MEF cells of the indicated genotypes;

5

Figure 14 shows total and lymphocyte cell counts in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid from the B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice having cytokine-induced airway inflammation;

10 Figure 15 depicts hematoxylin and eosin staining of lung sections from the B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice having cytokine-induced airway inflammation;

Figure 16 depicts flow cytometric analysis of lung-infiltrating T-cells based on lung infiltrates pooled from B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice having cytokine-induced airway inflammation (four mice in each group);

15

Figure 17 depicts LCMV-induced footpad swelling of B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice;

Figures 18A-18B depict the disease course for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice as determined by the average clinical score of all mice in a group (Figure 16A), and the time of EAE onset compared among littermates (Figure 16B); Ci Circles in the same row represent individual mice from the same litter; results shown are a summary of four independent experiments;

20

Figure 19 illustrates the CTL response to LCMV in splenocytes from B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice harvested 8 days post-infection, and a memory CTL response to LCMV in splenocytes from B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice harvested 30 days post-infection and restimulated for 5 days *in vitro*;

25

Figure 20 illustrates the CTL response and CTL memory response to influenza virus in splenocytes harvested from B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice.

30

Detailed Description of the Invention

WO 02/097046

PCT/US02/16740

The section headings used herein are for organizational purposes only and are not to be construed as limiting the subject matter described. All references cited in this application are expressly incorporated by reference herein.

5 Definitions

The terms "B7RP-2 gene" or "B7RP-2 nucleic acid molecule" or "B7RP-2 polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, and nucleic acid molecules as defined
10 herein.

The term "B7RP-2 polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

15 The term "B7RP-2 polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of B7RP-2 polypeptide amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

The term "isolated nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule of the invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of proteins, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when total nucleic acid is isolated from the source cells, (2) is not linked to all or a portion of a polynucleotide to which the "isolated nucleic acid molecule" is linked in nature, (3) is operably linked to a polynucleotide which it is not linked to in nature, or (4) does not
20 occur in nature as part of a larger polynucleotide sequence. Preferably, the isolated nucleic acid molecule of the present invention is substantially free from any other contaminating nucleic acid molecule(s) or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its use in polypeptide production or its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

30 The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-

WO 02/097046

PCT/US02/16740

carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopenenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

The term "vector" is used to refer to any molecule (e.g., nucleic acid, plasmid, or virus) used to transfer coding information to a host cell.

The term "expression vector" refers to a vector that is suitable for transformation of a host cell and contains nucleic acid sequences that direct and/or control the expression of inserted heterologous nucleic acid sequences. Expression includes, but is not limited to, processes such as transcription, translation, and RNA splicing, if introns are present.

The term "operably linked" is used herein to refer to an arrangement of flanking sequences wherein the flanking sequences so described are configured or assembled so as to perform their usual function. Thus, a flanking sequence operably linked to a coding sequence may be capable of effecting the replication, transcription and/or translation of the coding sequence. For example, a coding sequence is operably linked to a promoter when the promoter is capable of directing transcription of that coding sequence. A flanking sequence need not be contiguous with the coding sequence, so long as it functions correctly. Thus, for example, intervening untranslated yet transcribed sequences can be present between a promoter sequence and the coding sequence and the promoter sequence can still be considered "operably linked" to the coding sequence.

The term "host cell" is used to refer to a cell which has been transformed, or is capable of being transformed with a nucleic acid sequence and then of expressing a selected gene of interest. The term includes the progeny of the parent cell, whether or not the progeny is identical in morphology or in genetic make-up to the original parent, so long as the selected gene is present.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

The term "B7RP-2 polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 and related polypeptides. Related polypeptides include B7RP-2 polypeptide fragments, B7RP-2 polypeptide orthologs, B7RP-2 polypeptide variants, and B7RP-2 polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. B7RP-2 polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

10 The term "B7RP-2 polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. The term "B7RP-2 polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of B7RP-2 polypeptide orthologs, B7RP-2 polypeptide derivatives, or B7RP-2
15 polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by B7RP-2 polypeptide allelic variants or B7RP-2 polypeptide splice variants. B7RP-2 polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a B7RP-2 polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred
20 embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or more than about
25 150 amino acids. Such B7RP-2 polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to B7RP-2 polypeptides.

The term "B7RP-2 polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to B7RP-2 polypeptide amino acid sequence as set forth in
30 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. For example, mouse and human B7RP-2 polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "B7RP-2 polypeptide variants" refers to B7RP-2 polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or B7RP-2 polypeptide

WO 02/097046

PCT/US02/16740

fragments), and/or additions (such as internal additions and/or B7RP-2 fusion polypeptides) as compared to the B7RP-2 polypeptide amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (*e.g.*, B7RP-2 polypeptide allelic variants, B7RP-2 polypeptide orthologs, and B7RP-2 polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such B7RP-2 polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "B7RP-2 polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, B7RP-2 polypeptide fragments, B7RP-2 polypeptide orthologs, or B7RP-2 polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "B7RP-2 polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by B7RP-2 polypeptide allelic variants or B7RP-2 polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature B7RP-2 polypeptide" refers to a B7RP-2 polypeptide lacking a leader sequence. A mature B7RP-2 polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like.

The term "B7RP-2 fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, B7RP-2 polypeptide fragments, B7RP-2 polypeptide orthologs, B7RP-2 polypeptide variants, or B7RP-2 derivatives, as defined herein. The term "B7RP-2 fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by B7RP-2 polypeptide allelic variants or B7RP-2 polypeptide splice variants, as defined herein.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

The term "biologically active B7RP-2 polypeptides" refers to B7RP-2 polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In addition, a B7RP-2 polypeptide may be active as an immunogen; that is, the B7RP-2 polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

5 The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated polypeptide" is linked in nature, (3) is operably linked (by covalent or noncovalent interaction) to a polypeptide with which it is not linked in nature, or (4) does not occur in nature. Preferably, the isolated polypeptide is substantially free from any other contaminating polypeptides or other contaminants that are found in its natural environment that would interfere with its therapeutic, diagnostic, prophylactic or research use.

10 The term "identity," as known in the art, refers to a relationship between the sequences of two or more polypeptide molecules or two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between nucleic acid molecules or polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

25 The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness which includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the same example, there are five more positions where there are conservative substitutions, then the percent identity remains 50%, but the percent similarity would be 75% (15/20). Therefore, in cases where there are conservative substitutions, the

WO 02/097046

PCT/US02/16740

percent similarity between two polypeptides will be higher than the percent identity between those two polypeptides.

5 The term "naturally occurring" or "native" when used in connection with biological materials such as nucleic acid molecules, polypeptides, host cells, and the like, refers to materials which are found in nature and are not manipulated by man. Similarly, "non-naturally occurring" or "non-native" as used herein refers to a material that is not found in nature or that has been structurally modified or synthesized by man.

10 The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a B7RP-2 polypeptide or B7RP-2 nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the B7RP-2 polypeptides as set forth herein.

15 The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the B7RP-2 polypeptide, B7RP-2 nucleic acid molecule, or B7RP-2 selective binding agent as a pharmaceutical composition.

20 The term "antigen" refers to a molecule or a portion of a molecule capable of being bound by a selective binding agent, such as an antibody, and additionally capable of being used in an animal to produce antibodies capable of binding to an epitope of that antigen. An antigen may have one or more epitopes.

25 The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a B7RP-2 polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human B7RP-2 polypeptides and not to bind to human non-B7RP-2 polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat B7RP-2 polypeptides.

30 The term "transduction" is used to refer to the transfer of genes from one bacterium to another, usually by a phage. "Transduction" also refers to the acquisition and transfer of eukaryotic cellular sequences by retroviruses.

The term "transfection" is used to refer to the uptake of foreign or exogenous DNA by a cell, and a cell has been "transfected" when the exogenous DNA has been introduced inside the cell membrane. A number of transfection techniques are well known in the art and are disclosed herein. See, e.g., Graham *et al.*, 1973, *Virology*

WO 02/097046

PCT/US02/16740

52:456; Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986); and Chu *et al.*, 1981, *Gene* 13:197. Such techniques can be used to introduce one or more exogenous DNA moieties into suitable host cells.

5 The term "transformation" as used herein refers to a change in a cell's genetic characteristics, and a cell has been transformed when it has been modified to contain a new DNA. For example, a cell is transformed where it is genetically modified from its native state. Following transfection or transduction, the transforming DNA may recombine with that of the cell by physically integrating into a chromosome of the
10 cell, may be maintained transiently as an episomal element without being replicated, or may replicate independently as a plasmid. A cell is considered to have been stably transformed when the DNA is replicated with the division of the cell.

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

15 It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a
20 substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Such related B7RP-2 polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

25 Related nucleic acid molecules also include fragments of B7RP-2 nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or more than about 150 amino acid residues of the B7RP-2 polypeptide of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

30 In addition, related B7RP-2 nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the B7RP-2 nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide

WO 02/097046

PCT/US02/16740

comprises the amino acid sequence as shown in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the B7RP-2 sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of B7RP-2 polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

The term "highly stringent conditions" refers to those conditions that are designed to permit hybridization of DNA strands whose sequences are highly complementary, and to exclude hybridization of significantly mismatched DNAs. Hybridization stringency is principally determined by temperature, ionic strength, and the concentration of denaturing agents such as formamide. Examples of "highly stringent conditions" for hybridization and washing are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 65-68°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 50% formamide at 42°C. See Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. See Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted

WO 02/097046

PCT/US02/16740

by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$$T_m(^{\circ}\text{C}) = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\% \text{G+C}) - 600/N - 0.72(\% \text{formamide})$$

- 5 where N is the length of the duplex formed, $[\text{Na}^+]$ is the molar concentration of the sodium ion in the hybridization or washing solution, %G+C is the percentage of (guanine+cytosine) bases in the hybrid. For imperfectly matched hybrids, the melting temperature is reduced by approximately 1°C for each 1% mismatch.

- The term "moderately stringent conditions" refers to conditions under which a DNA duplex with a greater degree of base pair mismatching than could occur under "highly stringent conditions" is able to form. Examples of typical "moderately stringent conditions" are 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate at 50-65°C or 0.015 M sodium chloride, 0.0015 M sodium citrate, and 20% formamide at 37-50°C. By way of example, "moderately stringent conditions" of 50°C in 0.015 M sodium ion will allow about a 21% mismatch.

- It will be appreciated by those skilled in the art that there is no absolute distinction between "highly stringent conditions" and "moderately stringent conditions." For example, at 0.015 M sodium ion (no formamide), the melting temperature of perfectly matched long DNA is about 71°C. With a wash at 65°C (at the same ionic strength), this would allow for approximately a 6% mismatch. To capture more distantly related sequences, one skilled in the art can simply lower the temperature or raise the ionic strength.

A good estimate of the melting temperature in 1M NaCl* for oligonucleotide probes up to about 20nt is given by:

- 25 $T_m = 2^{\circ}\text{C}$ per A-T base pair + 4°C per G-C base pair

*The sodium ion concentration in 6X salt sodium citrate (SSC) is 1M. See Suggs *et al.*, *Developmental Biology Using Purified Genes* 683 (Brown and Fox, eds., 1981).

High stringency washing conditions for oligonucleotides are usually at a temperature of 0-5°C below the T_m of the oligonucleotide in 6X SSC, 0.1% SDS.

- 30 In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID

WO 02/097046

PCT/US02/16740

NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or the nucleotide
 5 sequences encode a polypeptide that is about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the polypeptide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ
 10 ID NO: 6.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

Conservative modifications to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of B7RP-2 polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of B7RP-2 polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid
 15 sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.
 20

For example, a "conservative amino acid substitution" may involve a substitution of a native amino acid residue with a nonnative residue such that there is little or no effect on the polarity or charge of the amino acid residue at that position. Furthermore, any native residue in the polypeptide may also be substituted with alanine, as has been previously described for "alanine scanning mutagenesis."
 25

Conservative amino acid substitutions also encompass non-naturally occurring amino acid residues that are typically incorporated by chemical peptide synthesis rather than by synthesis in biological systems. These include peptidomimetics, and other reversed or inverted forms of amino acid moieties.
 30

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Naturally occurring residues may be divided into classes based on common side chain properties:

- 1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- 2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;
- 5 3) acidic: Asp, Glu;
- 4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;
- 5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and
- 6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human B7RP-2 polypeptide that are homologous with non-human B7RP-2 polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

In making such changes, the hydropathic index of amino acids may be considered. Each amino acid has been assigned a hydropathic index on the basis of its hydrophobicity and charge characteristics. The hydropathic indices are: isoleucine (+4.5); valine (+4.2); leucine (+3.8); phenylalanine (+2.8); cysteine/cystine (+2.5); methionine (+1.9); alanine (+1.8); glycine (-0.4); threonine (-0.7); serine (-0.8); tryptophan (-0.9); tyrosine (-1.3); proline (-1.6); histidine (-3.2); glutamate (-3.5); glutamine (-3.5); aspartate (-3.5); asparagine (-3.5); lysine (-3.9); and arginine (-4.5).

The importance of the hydropathic amino acid index in conferring interactive biological function on a protein is generally understood in the art (Kyte *et al.*, 1982, *J. Mol. Biol.* 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

It is also understood in the art that the substitution of like amino acids can be made effectively on the basis of hydrophilicity, particularly where the biologically functionally equivalent protein or peptide thereby created is intended for use in immunological embodiments, as in the present case. The greatest local average hydrophilicity of a protein, as governed by the hydrophilicity of its adjacent amino

WO 02/097046

PCT/US02/16740

acids, correlates with its immunogenicity and antigenicity, *i.e.*, with a biological property of the protein.

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 $\pm$ 1); glutamate (+3.0 $\pm$ 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 $\pm$ 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3); valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the B7RP-2 polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the B7RP-2 polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

20

Table I

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyrlic Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the B7RP-2 molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a B7RP-2 polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to

WO 02/097046

PCT/US02/16740

conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure.

5 In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a B7RP-2 polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of B7RP-2 polypeptides.

10 One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of B7RP-2 polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues
15 predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable
20 variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination
25 with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover,
30 computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural

WO 02/097046

PCT/US02/16740

topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. See Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

Additional methods of predicting secondary structure include "threading" (Jones, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:377-87; Sippl *et al.*, 1996, *Structure* 4:15-19), "profile analysis" (Bowie *et al.*, 1991, *Science*, 253:164-70; Gribskov *et al.*, 1990, *Methods Enzymol.* 183:146-59; Gribskov *et al.*, 1987, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 84:4355-58), and "evolutionary linkage" (See Holm *et al.*, *supra*, and Brenner *et al.*, *supra*).

Preferred B7RP-2 polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. In one embodiment, B7RP-2 polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred B7RP-2 variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (*e.g.*, serine) as compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Cysteine variants are useful when B7RP-2 polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the

WO 02/097046

PCT/US02/16740

native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-terminal truncations, and amino-terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a B7RP-2 fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino

WO 02/097046

PCT/US02/16740

acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

25

Table II

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng <i>et al.</i> , 1995, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher <i>et al.</i> , 1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zee <i>et al.</i> , 1996, <i>J. Immunol.</i> 156:2221-30

WO 02/097046

PCT/US02/16740

IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon <i>et al.</i> , 1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill <i>et al.</i> , 1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig C γ 1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the B7RP-2 polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a B7RP-2 polypeptide fragment (*e.g.*, the predicted extracellular portion of B7RP-2 polypeptide).

The resulting B7RP-2 fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

Identity and similarity of related nucleic acid molecules and polypeptides are readily calculated by known methods. Such methods include, but are not limited to those described in *Computational Molecular Biology* (A.M. Lesk, ed., Oxford University Press 1988); *Biocomputing: Informatics and Genome Projects* (D.W. Smith, ed., Academic Press 1993); *Computer Analysis of Sequence Data* (Part 1, A.M. Griffin and H.G. Griffin, eds., Humana Press 1994); G. von Heijne, *Sequence Analysis in Molecular Biology* (Academic Press 1987); *Sequence Analysis Primer* (M. Gribskov and J. Devereux, eds., M. Stockton Press 1991); and Carillo *et al.*, 1988, *SIAM J. Applied Math.*, 48:1073.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Preferred methods to determine identity and/or similarity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity and similarity are described in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity and similarity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux *et al.*, 1984, *Nucleic Acids Res.* 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), BLASTP, BLASTN, and FASTA (Altschul *et al.*, 1990, *J. Mol. Biol.* 215:403-10). The BLASTX program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (Altschul *et al.*, *BLAST Manual* (NCB NLM NIH, Bethesda, MD); Altschul *et al.*, 1990, *supra*). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Certain alignment schemes for aligning two amino acid sequences may result in the matching of only a short region of the two sequences, and this small aligned region may have very high sequence identity even though there is no significant relationship between the two full-length sequences. Accordingly, in a preferred embodiment, the selected alignment method (GAP program) will result in an alignment that spans at least 50 contiguous amino acids of the claimed polypeptide.

For example, using the computer algorithm GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI), two polypeptides for which the percent sequence identity is to be determined are aligned for optimal matching of their respective amino acids (the "matched span," as determined by the algorithm). A gap opening penalty (which is calculated as 3X the average diagonal; the "average diagonal" is the average of the diagonal of the comparison matrix being used; the "diagonal" is the score or number assigned to each perfect amino acid match by the particular comparison matrix) and a gap extension penalty (which is usually 0.1X the gap opening penalty), as well as a comparison matrix such as PAM 250 or BLOSUM 62 are used in conjunction with the algorithm. A standard comparison matrix is also used by the algorithm (*see* Dayhoff *et al.*, 5 *Atlas of Protein Sequence and Structure* (Supp. 3 1978)(PAM250 comparison matrix); Henikoff *et al.*, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 89:10915-19 (BLOSUM 62 comparison matrix)).

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al.*, *supra*);

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

Threshold of Similarity: 0

5

The GAP program is useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (along with no penalty for end gaps) using the GAP algorithm.

Preferred parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following:

10

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

15

Gap Length Penalty: 3

The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, and thresholds of similarity may be used, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September, 1997. The particular choices to be made will be apparent to those of skill in the art and will depend on the specific comparison to be made, such as DNA-to-DNA, protein-to-protein, protein-to-DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

20

25

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

30

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Recombinant DNA methods used herein are generally those set forth in Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) and/or *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1994). The invention provides for
5 nucleic acid molecules as described herein and methods for obtaining such molecules.

Where a gene encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express
10 the B7RP-2 polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives
15 obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of B7RP-2 polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other
20 binding partner (*e.g.*, receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to
25 express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid
30 sequence of a B7RP-2 polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded B7RP-2 polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from

WO 02/097046

PCT/US02/16740

poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of a B7RP-2 gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the B7RP-2 polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a B7RP-2 polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the B7RP-2 polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

WO 02/097046

PCT/US02/16740

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding B7RP-2 polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, 5 *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

10 Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that 15 amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7RP-2 polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a B7RP-2 polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or 20 phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, *see Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

Typically, expression vectors used in any of the host cells will contain sequences for plasmid maintenance and for cloning and expression of exogenous 25 nucleotide sequences. Such sequences, collectively referred to as "flanking sequences" in certain embodiments will typically include one or more of the following nucleotide sequences: a promoter, one or more enhancer sequences, an origin of replication, a transcriptional termination sequence, a complete intron sequence containing a donor and acceptor splice site, a sequence encoding a leader 30 sequence for polypeptide secretion, a ribosome binding site, a polyadenylation sequence, a polylinker region for inserting the nucleic acid encoding the polypeptide to be expressed, and a selectable marker element. Each of these sequences is discussed below.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the B7RP-2 polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemagglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the B7RP-2 polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified B7RP-2 polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences which normally function to regulate B7RP-2 polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the B7RP-2 gene flanking sequences – will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by

WO 02/097046

PCT/US02/16740

isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

5 An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a B7RP-2 polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically
10 synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (*e.g.*, SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitis virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of
15 replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment
20 followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

A selectable marker gene element encodes a protein necessary for the survival and growth of a host cell grown in a selective culture medium. Typical selection
25 marker genes encode proteins that (a) confer resistance to antibiotics or other toxins, *e.g.*, ampicillin, tetracycline, or kanamycin for prokaryotic host cells; (b) complement auxotrophic deficiencies of the cell; or (c) supply critical nutrients not available from complex media. Preferred selectable markers are the kanamycin resistance gene, the ampicillin resistance gene, and the tetracycline resistance gene. A neomycin
30 resistance gene may also be used for selection in prokaryotic and eukaryotic host cells.

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the

WO 02/097046

PCT/US02/16740

chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes a B7RP-2 polypeptide. As a result, increased quantities of B7RP-2 polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

10 A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of a B7RP-2 polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

15 A leader, or signal, sequence may be used to direct a B7RP-2 polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a B7RP-2 nucleic acid molecule, or directly at the 5' end of a B7RP-2 polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with a B7RP-2 nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the B7RP-2 nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a B7RP-2 polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted B7RP-2 polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of a B7RP-2 nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

20 Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native B7RP-2 polypeptide signal sequence joined to a B7RP-2 polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a B7RP-2 polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a

WO 02/097046

PCT/US02/16740

signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native B7RP-2 polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native B7RP-2 polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

10 In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, 15 which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired B7RP-2 polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

20 In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the B7RP-2 gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the 25 intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the B7RP-2 gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a B7RP-2 cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 30 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the B7RP-2 polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding B7RP-2 polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native B7RP-2 promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a B7RP-2 nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

Promoters suitable for use with prokaryotic hosts include the beta-lactamase and lactose promoter systems; alkaline phosphatase; a tryptophan (*trp*) promoter system; and hybrid promoters such as the *tac* promoter. Other known bacterial promoters are also suitable. Their sequences have been published, thereby enabling one skilled in the art to ligate them to the desired DNA sequence, using linkers or adapters as needed to supply any useful restriction sites.

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40

WO 02/097046

PCT/US02/16740

(SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling B7RP-2 gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Komaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

WO 02/097046

PCT/US02/16740

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a B7RP-2 polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a B7RP-2 nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

Expression vectors of the invention may be constructed from a starting vector such as a commercially available vector. Such vectors may or may not contain all of the desired flanking sequences. Where one or more of the flanking sequences described herein are not already present in the vector, they may be individually obtained and ligated into the vector. Methods used for obtaining each of the flanking sequences are well known to one skilled in the art.

Preferred vectors for practicing this invention are those which are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSII (Stratagene, La Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid, Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (*e.g.*, TOPO[™] TA Cloning[®] Kit, PCR2.1[®] plasmid derivatives, Invitrogen, Carlsbad, CA), and mammalian, yeast or

WO 02/097046

PCT/US02/16740

virus vectors such as a baculovirus expression system (pBacPAK plasmid derivatives, Clontech, Palo Alto, CA).

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a B7RP-2 polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed
5 vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for a B7RP-2 polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The
10 method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under
15 appropriate conditions, synthesizes a B7RP-2 polypeptide which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as
20 glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells
25 (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines,
30 and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines

WO 02/097046

PCT/US02/16740

include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

5 Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (e.g., HB101, DH5 α , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

10 Many strains of yeast cells known to those skilled in the art are also available as host cells for the expression of the polypeptides of the present invention. Preferred yeast cells include, for example, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts
15 *et al.*, 1993, *Biotechniques*, 14:810-17; Lucklow, 1993, *Curr. Opin. Biotechnol.* 4:564-72; and Lucklow *et al.*, 1993, *J. Virol.*, 67:4566-79. Preferred insect cells are Sf-9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated B7RP-2 polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow
20 or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce B7RP-2 polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

25

Polypeptide Production

Host cells comprising a B7RP-2 polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells.

30 Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular

WO 02/097046

PCT/US02/16740

cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

Typically, an antibiotic or other compound useful for selective growth of transfected or transformed cells is added as a supplement to the media. The compound to be used will be dictated by the selectable marker element present on the plasmid with which the host cell was transformed. For example, where the selectable marker element is kanamycin resistance, the compound added to the culture medium will be kanamycin. Other compounds for selective growth include ampicillin, tetracycline, and neomycin.

The amount of a B7RP-2 polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a B7RP-2 polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the B7RP-2 polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For a B7RP-2 polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular material (including inclusion bodies for gram-negative bacteria) can be extracted from the host cell using any standard technique known to the skilled artisan. For example, the host cells can be lysed to release the contents of the periplasm/cytoplasm by French press, homogenization, and/or sonication followed by centrifugation.

If a B7RP-2 polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized B7RP-2 polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis,

WO 02/097046

PCT/US02/16740

immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the B7RP-2 polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

5 In some cases, a B7RP-2 polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body
10 solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine
15 bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiothreitol (DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.
20

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a B7RP-2 polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

25 The purification of a B7RP-2 polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (B7RP-2 polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or myc (Invitrogen, Carlsbad, CA) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-
30 step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of B7RP-2 polypeptide/polyHis. See, e.g., *Current Protocols in*

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Molecular Biology § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, B7RP-2 polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a B7RP-2 polypeptide.

5 Other suitable procedures for purification include, without limitation, affinity chromatography, immunoaffinity chromatography, ion exchange chromatography, molecular sieve chromatography, HPLC, electrophoresis (including native gel electrophoresis) followed by gel elution, and preparative isoelectric focusing ("Isoptime" machine/technique, Hoefer Scientific, San Francisco, CA). In some cases, two or more purification techniques may be combined to achieve increased purity.

B7RP-2 polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 15 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized B7RP-2 polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized B7RP-2 polypeptides are expected to have comparable biological activity to the corresponding B7RP-2 polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural B7RP-2 polypeptide.

Another means of obtaining B7RP-2 polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the B7RP-2 polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the B7RP-2 polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced B7RP-2 polypeptide or peptide fragments thereof.

30 A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for B7RP-2 polypeptide. See, e.g., Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. See also, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.*

WO 02/097046

PCT/US02/16740

3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence.

5 The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

U.S. Patent Nos. 5,763,192; 5,814,476; 5,723,323; and 5,817,483 describe processes for producing peptides or polypeptides. This is done by producing stochastic genes or fragments thereof, and then introducing these genes into host cells which produce one or more proteins encoded by the stochastic genes. The host cells are then screened to identify those clones producing peptides or polypeptides having the desired activity.

15 Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

25 It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive B7RP-2 polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, etc.).

Synthesis

WO 02/097046

PCT/US02/16740

It will be appreciated by those skilled in the art that the nucleic acid and polypeptide molecules described herein may be produced by recombinant and other means.

5 Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more B7RP-2 polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art.

10 An exemplary B7RP-2 polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the B7RP-2 polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a B7RP-2 polypeptide receptor.

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind B7RP-2 polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies
15 may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as complementarity-determining region (CDR)-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the B7RP-2 polypeptide. Examples of such fragments include
20 Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward a B7RP-2 polypeptide generally are
25 produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of B7RP-2 polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a B7RP-2 polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as
30 alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-B7RP-2 antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward B7RP-2 polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing

WO 02/097046

PCT/US02/16740

monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are

5 hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with B7RP-2 polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding

10 sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. See U.S.

15 Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. See U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a

20 source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeven *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind B7RP-2 polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin

25 production such antibodies are produced by immunization with a B7RP-2 polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in Immunol.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin

30 chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these antigens. See PCT App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

In an alternative embodiment, human antibodies can also be produced from phage-display libraries (Hoogenboom *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 227:381; Marks *et al.*, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581). These processes mimic immune selection through the display of antibody repertoires on the surface of filamentous bacteriophage, and subsequent selection of phage by their binding to an antigen of choice. One such technique is described in PCT App. No. PCT/US98/17364, which describes the isolation of high affinity and functional agonistic antibodies for MPL- and msk-receptors using such an approach.

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO cells. Monoclonal (*e.g.*, human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-B7RP-2 antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of B7RP-2 polypeptides. The antibodies will bind B7RP-2 polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-B7RP-2 antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example,

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^{99}Tc , ^{111}In , or ^{67}Ga ; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β -galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-5 63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (*e.g.*, a B7RP-2 polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an B7RP-2 polypeptide) for binding with a limited amount of anti-B7RP-2 antibody. The amount of a B7RP-2 polypeptide in the test sample is
10 inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte which remain unbound.

Sandwich assays typically involve the use of two antibodies, each capable of binding to a different immunogenic portion, or epitope, of the protein to be detected and/or quantitated. In a sandwich assay, the test sample analyte is typically bound by a first antibody which is immobilized on a solid support, and thereafter a second antibody binds to the analyte, thus forming an insoluble three-part complex. *See, e.g.*,
20 U.S. Patent No. 4,376,110. The second antibody may itself be labeled with a detectable moiety (direct sandwich assays) or may be measured using an anti-immunoglobulin antibody that is labeled with a detectable moiety (indirect sandwich assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-B7RP-2 antibodies, are also
25 useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic
30 resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a B7RP-2 polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are

WO 02/097046

PCT/US02/16740

antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a B7RP-2 polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a B7RP-2 polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a B7RP-2 polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-B7RP-2 polypeptide antibody that is capable of interacting with a B7RP-2 polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating B7RP-2 polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-B7RP-2 polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising B7RP-2 selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting B7RP-2 polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence (*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the B7RP-2 molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of B7RP-2 disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related B7RP-2 molecules and inhibitors

WO 02/097046

PCT/US02/16740

thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and enhancing related B7RP-2 polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

5 Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of B7RP-2 polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. B7RP-2 polypeptide derivatives are modified in a manner that is different – either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include
 10 molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate
 15 in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

The polymers each may be of any molecular weight and may be branched or unbranched. The polymers each typically have an average molecular weight of
 20 between about 2 kDa to about 100 kDa (the term “about” indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example,
 25 about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional

WO 02/097046

PCT/US02/16740

crosslinking molecules which may be used to prepare covalently attached B7RP-2 polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of:

5 (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or other B7RP-2 polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal

10 reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the B7RP-2 polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-

15 terminus. See, e.g., U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For

20 example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for

25 example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, B7RP-2 polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/B7RP-2 polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/B7RP-2 polypeptide molecules. B7RP-2

30 polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present B7RP-2 polypeptide derivatives include those described

WO 02/097046

PCT/US02/16740

herein for B7RP-2 polypeptides. However, the B7RP-2 polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

5

Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which the genes encoding native B7RP-2 polypeptide have been disrupted (i.e., "knocked out") such that the level of expression of B7RP-2 polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a B7RP-2 gene for that animal or a heterologous B7RP-2 gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Pub. No. WO 94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the B7RP-2 polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (e.g., by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native B7RP-2 polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the B7RP-2 gene. In certain embodiments, the amount of B7RP-2 polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a

WO 02/097046

PCT/US02/16740

drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

Assaying for Other Modulators of B7RP-2 Polypeptide Activity

5 In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of B7RP-2 polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate B7RP-2 polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection,
10 or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a B7RP-2 polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a B7RP-2 polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate B7RP-2
15 polypeptide activity indirectly, such as by affecting B7RP-2 gene expression, or by binding to a B7RP-2 polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a B7RP-2 polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

20 Methods for identifying compounds that interact with B7RP-2 polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a B7RP-2 polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a B7RP-2 polypeptide, and the extent of the interaction is measured. The test molecule can be screened in a substantially purified
25 form or in a crude mixture.

In certain embodiments, a B7RP-2 polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with B7RP-2 polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate B7RP-2 polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to
30 nucleic acids encoding a B7RP-2 polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of B7RP-2 polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with a B7RP-2 polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or

WO 02/097046

PCT/US02/16740

decrease B7RP-2 polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with B7RP-2 polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a B7RP-2 polypeptide
5 for a specified period of time, and B7RP-2 polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with B7RP-2 polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of B7RP-2 polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.
10

In the event that B7RP-2 polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (*e.g.*, a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a B7RP-2 polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand).
15 These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a B7RP-2 polypeptide to its binding partner. In one assay, a B7RP-2 polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled B7RP-2 polypeptide binding partner (for example, iodinated B7RP-2 polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added
20 either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the B7RP-2 polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy
25 in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing B7RP-2 polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled B7RP-2 polypeptide, and determining the extent of B7RP-2 polypeptide binding. *See, e.g., Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green
30 Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a B7RP-2 polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorometrically, or by

WO 02/097046

PCT/US02/16740

fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a B7RP-2 polypeptide or to a B7RP-2 polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

5 A B7RP-2 polypeptide or a B7RP-2 polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a
10 B7RP-2 polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing through the column. The formation of a complex between a B7RP-2 polypeptide and its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (*e.g.*,
15 radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule which increases or decreases the formation of a complex between a B7RP-2 polypeptide binding protein and a B7RP-2 polypeptide binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway,
20 NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either B7RP-2 polypeptide or a B7RP-2 polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor
25 chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds
30 together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a B7RP-2 polypeptide and a B7RP-2 polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a B7RP-2 polypeptide and B7RP-2 polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a B7RP-2 polypeptide and a B7RP-2 polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either B7RP-2 polypeptide or B7RP-2 polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a B7RP-2 polypeptide to cells expressing B7RP-2 polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a B7RP-2 polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the B7RP-2 gene. In certain embodiments, the amount of B7RP-2 polypeptide or a B7RP-2 polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. See, e.g., Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 14) of

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the HIV tat protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. See Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 15), which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells treated with a tat-β-gal fusion protein will demonstrate β-gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

It will thus be appreciated that the tat protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the tat protein sequence, a B7RP-2 antagonist (such as an anti-B7RP-2 selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a B7RP-2 molecule. As used herein, the term "B7RP-2 molecule" refers to both B7RP-2 nucleic acid molecules and B7RP-2 polypeptides as defined herein. Where desired, the B7RP-2 protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. See also, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

Cell Source Identification Using B7RP-2 Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a B7RP-2 polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain embodiments, nucleic acids encoding a B7RP-2 polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-B7RP-2 polypeptide antibodies to test for the presence of B7RP-2 polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

B7RP-2 Polypeptide Compositions and Administration

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such B7RP-2 polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of a B7RP-2 polypeptide or a B7RP-2 nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more B7RP-2 polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, B7RP-2orhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides -- preferably sodium or potassium chloride -- or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. See

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Remington's Pharmaceutical Sciences (18th Ed., A.R. Gennaro, ed., Mack Publishing Company 1990).

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery
5 format, and desired dosage. See, e.g., *Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*. Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the B7RP-2 molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for
10 injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may
15 further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, B7RP-2 polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the B7RP-2 polypeptide product
20 may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The B7RP-2 polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such
pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

25 The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions
30 for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired B7RP-2 molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a B7RP-2 molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, B7RP-2 polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. B7RP-2 polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, B7RP-2 polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the B7RP-2 polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of B7RP-2 polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional B7RP-2 polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving B7RP-2 polypeptides in

WO 02/097046

PCT/US02/16740

sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bi-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. *See, e.g.*, PCT/US93/00829, which describes the controlled release

5 of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56),
 10 poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be
 15 prepared by any of several methods known in the art. *See, e.g.*, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The B7RP-2 pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile
 20 filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous
 25 solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or
 in a form (*e.g.*, lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

30 In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (*e.g.*, liquid syringes and lysyringes).

WO 02/097046

PCT/US02/16740

The effective amount of a B7RP-2 pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the B7RP-2 molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titrate the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 µg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 µg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 µg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the B7RP-2 molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, *e.g.*, orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

In some cases, it may be desirable to use B7RP-2 polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to B7RP-2 polypeptide pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently
5 implanted back into the patient.

In other cases, a B7RP-2 polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the B7RP-2 polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the
10 cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental
15 factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more B7RP-2 polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the
20 cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (e.g., homologous recombination and/or other recombinant production methods) for both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous
25 and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent B7RP-2 gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of B7RP-2 polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting
30 genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-

WO 02/097046

PCT/US02/16740

87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

5 Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the
10 parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly
15 synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a B7RP-2 polypeptide, *e.g.*, flanking
20 sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding the desired B7RP-2 polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired B7RP-2
25 polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the B7RP-2 gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a B7RP-2 gene.

30 In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner

WO 02/097046

PCT/US02/16740

that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, B7RP-2 polypeptide production from a cell's endogenous B7RP-2 gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic B7RP-2 polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic B7RP-2 polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the recombination site located just upstream of the genomic B7RP-2 polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased B7RP-2 polypeptide production from the cell's endogenous B7RP-2 gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic B7RP-2 polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase

WO 02/097046

PCT/US02/16740

enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased B7RP-2 polypeptide production from the cell's endogenous B7RP-2 gene.

5 An additional approach for increasing, or causing, the expression of B7RP-2 polypeptide from a cell's endogenous B7RP-2 gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased B7RP-2 polypeptide production from the cell's endogenous B7RP-2 gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased B7RP-2 polypeptide production from the cell's endogenous B7RP-2 gene results.

10 The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

25 If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of B7RP-2 polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon

WO 02/097046

PCT/US02/16740

insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a B7RP-2 polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

B7RP-2 polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing B7RP-2 polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of B7RP-2 polypeptide. Such B7RP-2 polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of B7RP-2 polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce B7RP-2 polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired B7RP-2 polypeptide or with a gene augmenting the expression of B7RP-2 polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a B7RP-2 polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing B7RP-2 polypeptide be of human origin and produce human B7RP-2 polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing B7RP-2 polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human B7RP-2 polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of B7RP-2 polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce B7RP-2 polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (PCT Pub. No. WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are

WO 02/097046

PCT/US02/16740

biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, *see* U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). *See also*, PCT Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of B7RP-2 polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the B7RP-2 gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a B7RP-2 polypeptide which may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous B7RP-2 gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (*e.g.*, endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex vivo* or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the B7RP-2 gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can

WO 02/097046

PCT/US02/16740

be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (*see* PCT Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

10 An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. *See* Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

20 Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and PCT Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

25 Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone) which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and PCT Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

30 Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated

WO 02/097046

PCT/US02/16740

transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding B7RP-2 polypeptide into cells via local injection of a B7RP-2 nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a B7RP-2 polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, PCT Pub. No. WO 95/34670; PCT App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a B7RP-2 polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance

WO 02/097046

PCT/US02/16740

expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and PCT Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

10 It is also contemplated that B7RP-2 gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

15 A means to increase endogenous B7RP-2 polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the B7RP-2 polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the B7RP-2 gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene – enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a B7RP-2 polypeptide is to be “turned on” in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the B7RP-2 polypeptide promoter (and optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a
25 “homologous recombination construct,” can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease B7RP-2 polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a
30 DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the B7RP-2 gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard

WO 02/097046

PCT/US02/16740

molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding B7RP-2 gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the B7RP-2 polypeptide promoter (from the same or a related species as the B7RP-2 gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Therapeutic Uses

B7RP-2 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

B7RP-2 polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate B7RP-2 polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity of the mature form of the B7RP-2 polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with B7RP-2 polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of B7RP-2 polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate B7RP-2 polypeptide expression typically include nucleic acids encoding B7RP-2 polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

Bone tissue consists of a matrix of collagenous and noncollagenous proteins, minerals (largely calcium and phosphorous), and cells. Three types of cells are

WO 02/097046

PCT/US02/16740

involved in the dynamic process by which bone is continually formed and resorbed: osteocytes, osteoblasts, and osteoclasts. Osteoblasts promote formation of bone tissue whereas osteoclasts are associated with resorption. Resorption, or the dissolution of bone matrix and mineral, is a fast and efficient process compared to bone formation and can release large amounts of mineral from bone. Osteoclasts are involved in the regulation of the normal remodeling of skeletal tissue and in resorption induced by hormones. For instance, resorption is stimulated by the secretion of parathyroid hormone in response to decreasing concentrations of calcium ion in extracellular fluids. In contrast, inhibition of resorption is the principal function of calcitonin. In addition, metabolites of vitamin D alter the responsiveness of bone to parathyroid hormone and calcitonin.

Following skeletal maturity, the amount of bone in the skeleton reflects the balance (or imbalance) of bone formation and bone resorption. Peak bone mass occurs after skeletal maturity prior to the fourth decade. Between the fourth and fifth decades, the equilibrium shifts and bone resorption dominates. The inevitable decrease in bone mass with advancing years starts earlier in females than males and is distinctly accelerated after menopause in some females (principally those of Caucasian and Asian descent).

Osteopenia is a condition relating generally to any decrease in bone mass to below normal levels. Such a condition may arise from a decrease in the rate of bone synthesis or an increase in the rate of bone destruction or both. The most common form of osteopenia is primary osteoporosis, also referred to as postmenopausal and senile osteoporosis. This form of osteoporosis is a consequence of the universal loss of bone with age and is usually a result of increase in bone resorption with a normal rate of bone formation. About 25 to 30 percent of all white females in the United States develop symptomatic osteoporosis. A direct relationship exists between osteoporosis and the incidence of hip, femoral, neck, and inter-trochanteric fracture in women 45 years and older. Elderly males develop symptomatic osteoporosis between the ages of 50 and 70, but the disease primarily affects females.

The cause of postmenopausal and senile osteoporosis is unknown. Several factors have been identified which may contribute to the condition. They include alteration in hormone levels accompanying aging, and inadequate calcium consumption attributed to decreased intestinal absorption of calcium and other minerals. Treatments have usually included hormone therapy or dietary supplements

WO 02/097046

PCT/US02/16740

in an attempt to retard the process. To date, however, an effective treatment for bone loss does not exist.

The B7RP-2 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention may be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent diseases and disorders of the bones, such as diseases or disorders characterized by a net bone loss (such as osteopenia or osteolysis). For example, B7RP-2 polypeptides may be used to suppress the rate of bone resorption. In this manner, an individual may be treated with B7RP-2 polypeptides in order to reduce the rate of bone resorption where the resorption rate is above normal or to reduce bone resorption to below normal levels in order to compensate for below normal levels of bone formation.

Conditions which may be treatable with the B7RP-2 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention include the following: osteoporosis, such as primary osteoporosis, endocrine osteoporosis (hyperthyroidism, hyperparathyroidism, Cushing's syndrome, and acromegaly), hereditary and congenital forms of osteoporosis (osteogenesis imperfecta, homocystinuria, Menkes' syndrome, and Riley-Day syndrome), and osteoporosis due to immobilization of extremities; Paget's disease of bone (osteitis deformans) in adults and juveniles; osteomyelitis, or an infectious lesion in bone, leading to bone loss; hypercalcemia resulting from solid tumors (breast, lung, and kidney) and hematologic malignancies (multiple myeloma, lymphoma, and leukemia), idiopathic hypercalcemia, and hypercalcemia associated with hyperthyroidism and renal function disorders; osteopenia following surgery, induced by steroid administration, and associated with disorders of the small and large intestine and with chronic hepatic and renal diseases; osteonecrosis, or bone cell death, associated with traumatic injury or nontraumatic necrosis associated with Gaucher's disease, sickle cell anemia, systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, periodontal disease, osteolytic metastasis, and other conditions. Other bone diseases and disorders are encompassed within the scope of the invention.

The B7RP-2 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention may be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent diseases associated with T-cell function (*e.g.*, functioning as a T-cell receptor decoy). For example, antibodies, soluble proteins comprising extracellular domains,

WO 02/097046

PCT/US02/16740

or other regulators of B7RP-2 polypeptide that result in prolonged or enhanced T-cell activation can be used to increase the immune response to tumors.

The B7RP-2 nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention may be used in the treatment of autoimmune disease, graft survival, immune cell activation for inhibiting tumor cell growth, T-cell dependent B-cell mediated diseases, and cancer gene immunotherapy. In one embodiment, agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may be beneficial to alleviate symptoms in diseases with chronic immune cell dysfunction. Autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, osteoarthritis, immune thrombocytopenic purpura (ITP), and psoriasis, may be treated with agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives. In addition, chronic inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis), Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, and diabetes mellitus, may also be treated with agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives.

Agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may be used as immunosuppressive agents for bone marrow and organ transplantation and may be used to prolong graft survival. Such agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may provide significant advantages over existing treatments. Bone marrow and organ transplantation therapy must contend with T-cell mediated rejection of the foreign cells or tissue by the host. Present therapeutic regimens for inhibiting T-cell mediated rejection involve treatment with the drugs cyclosporine or FK506. While drugs are effective, patients suffer from serious side effects, including hepatotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity. The target for the cyclosporin/FK506 class of therapeutics is calcineurin, a phosphatase with ubiquitous expression. Agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may lack the severe side effects observed with the use of the present immunotherapeutic agents. Agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may be used as immunosuppressive agents for autoimmune disorders, such as rheumatoid arthritis,

WO 02/097046

PCT/US02/16740

osteoarthritis psoriasis, multiple sclerosis, diabetes, and systemic lupus erythematosus. Agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives may also be used to alleviate toxic shock syndrome, inflammatory bowel disease, allosensitization due to blood transfusions, T-cell dependent B-cell mediated diseases, and the treatment of graft versus host disease.

Gene therapy using B7RP-2 genes of the invention may be used in cancer immunotherapy. B7RP-2 genes introduced into cancer cells can transform them into antigen presenting cells that can be recognized by the T-cells of the immune system when introduced back into an animal. Recognition of the transfected tumor cells by the T-cells results in the eradication of tumors expressing and tumors not expressing the B7RP-2 gene. This immunotherapy approach may be used for various leukemias, sarcomas, melanomas, adenocarcinomas, breast carcinomas, prostate tumors, lung carcinomas, colon carcinomas, and other tumors. This invention encompasses using the B7RP-2 gene in a similar manner to enhance T-cell activation in response to variety of tumors.

For instance, many vaccines act by eliciting an effective and specific antibody response. Some vaccines, especially those against intestinal microorganisms (*e.g.*, Hepatitis A virus and *Salmonella*), elicit a short-lived antibody response. It is desirable to potentiate and prolong this response in order to increase the effectiveness of the vaccine. Therefore, soluble B7RP-2 polypeptides may serve as vaccine adjuvants.

Conversely, since B7RP-2 may have negative immune regulatory functions, inhibition of B7RP-2 activity using antibodies, small molecules, peptibodies, or other antagonists of B7RP-2 function may result in immune enhancement and anti-tumor activity.

Anti-viral responses may also be enhanced by activators or agonists of the B7RP-2 polypeptide pathway. The enhancement of cellular immune functions by B7RP-2 polypeptide antagonists may also be beneficial in eliminating virus-infected cells. In a complementary fashion, B7RP-2 polypeptide antagonists may also have effects on humoral immune functions that may enhance antibody mediated responses and that may function to help clear free virus from the body.

Conversely, there are a number of clinical conditions that would be ameliorated by the inhibition of antibody production. Hypersensitivity is a normally

WO 02/097046

PCT/US02/16740

beneficial immune response that is exaggerated or inappropriate, and leads to inflammatory reactions and tissue damage. Hypersensitivity reactions that are antibody-mediated may be particularly susceptible to antagonism by agonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives. Allergies, hay fever, asthma, and acute edema cause type I hypersensitivity reactions, and these reactions may be suppressed by agonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives.

Diseases that cause antibody-mediated hypersensitivity reactions, including systemic lupus erythematosus, arthritis (rheumatoid arthritis, reactive arthritis, and psoriatic arthritis), nephropathies (glomerulo-nephritis, membranous, mesangiocapillary, focal segmental, focal necrotizing, crescentic, and proliferative tubulopathies), skin disorders (pemphigus, pemphigoid, and erythema nodosum), endocrinopathies (thyroiditis, Grave's, Hashimoto's, insulin-dependent diabetes mellitus), various pneumopathies (especially extrinsic alveolitis), various vasculopathies, coeliac disease, with aberrant production of IgA, many anemias and thrombocytopenias, Guillain-Barre Syndrome, and myasthenia gravis, may be treated with agonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives.

In addition, lymphoproliferative disorders, such as multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and crioglobulinemias, may be inhibited by agonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives. Finally, graft versus host disease, an "artificial" immune disorder, may benefit from the inhibition of antibody production by agonists of B7RP-2 polypeptide function, soluble B7RP-2 polypeptides, or B7RP-2 polypeptide derivatives.

Agonists or antagonists of B7RP-2 polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases caused by or mediated by undesirable levels of B7RP-2 polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of B7RP-2 polypeptides and sub-normal levels of B7RP-2 polypeptides.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Uses of B7RP-2 Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the B7RP-2 gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

B7RP-2 nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a B7RP-2 nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more B7RP-2 polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to B7RP-2 mRNA. For example, antisense DNA or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a B7RP-2 gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the B7RP-2 gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected B7RP-2 gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding B7RP-2 mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a B7RP-2 polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more B7RP-2 polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected B7RP-2 polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, a B7RP-2 polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a B7RP-2 polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of B7RP-2 polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to

WO 02/097046

PCT/US02/16740

prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to a B7RP-2 polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a B7RP-2 polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of a B7RP-2 polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the B7RP-2 polypeptide).

5 The B7RP-2 polypeptides of the present invention can be used to clone B7RP-2 polypeptide receptors, using an expression cloning strategy. Radiolabeled (¹²⁵Iodine) B7RP-2 polypeptide or affinity/activity-tagged B7RP-2 polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or cell line or tissue that expresses B7RP-2 polypeptide receptors. RNA isolated from such cells or tissues can be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (such as COS or 293 cells) to create an expression library. A radiolabeled or tagged B7RP-2 polypeptide can then be used as an affinity ligand to identify and isolate from this library the subset of cells that express the B7RP-2 polypeptide receptors on their surface. DNA can then be isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing B7RP-2 polypeptide receptors is many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing a B7RP-2 polypeptide receptor is isolated. Isolation of the B7RP-2 polypeptide receptors is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the B7RP-2 polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble B7RP-2 polypeptide receptors, anti-B7RP-2 polypeptide receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more of the diseases or disorders described herein.

The murine and human B7RP-2 nucleic acids of the present invention are also useful tools for isolating the corresponding chromosomal B7RP-2 polypeptide genes. For example, mouse chromosomal DNA containing B7RP-2 sequences can be used to construct knockout mice, thereby permitting an examination of the *in vivo* role for B7RP-2 polypeptide. The human B7RP-2 genomic DNA can be used to identify heritable tissue-degenerating diseases.

30 The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Example 1: Cloning of the Human B7RP-2 Polypeptide Gene

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze the gene encoding human B7RP-2 polypeptide.

5 A search of a proprietary database was performed using the rat B7RP-2 ortholog (SEQ ID NO: 5) as the query sequence. A 342 bp clone was identifying as containing nucleic acid sequences encoding a portion of human B7RP-2 polypeptide. This sequence was expanded to 792 bp (SEQ ID NO: 16) by examination of related contigs.

10 Due to the high level of B7RP-2 expression detected in bone calveria by *in situ* hybridization, cDNA sequences encoding human B7RP-2 polypeptide were isolated in amplification reactions performed using a human bone calveria cDNA library and the amplimers 2245-71 (5'-C-A-A-C-G-A-G-C-A-G-G-G-C-T-T-G-T-T-T-G-3'; SEQ ID NO: 17) and 2245-72 (5'-G-G-T-C-T-G-T-G-T-A-T-C-G-C-A-T-C-
15 C-T-T-T-G-G-3'; SEQ ID NO: 18). A PCR product of the expected size was isolated and subcloned into the Topo II vector. The resulting ligation reactions were used to transform competent bacteria and the clones obtained in this manner were then analyzed by sequencing.

Both 5'RACE and 3'RACE reactions were performed in order to generate the
20 full-length cDNA sequence for human B7RP-2 polypeptide. To isolate cDNA sequences corresponding to the 3' end of the cDNA sequence, 3'RACE was performed using a human fetal calveria cDNA library in the pSPORT1 vector and the primers 2245-72 and 1071-80 (5'-T-G-C-A-G-G-T-A-C-C-G-G-T-C-C-G-G-A-A-T-3'; SEQ ID NO: 19). Nested PCR was performed using a portion of the 3'RACE
25 amplification product and the primers 2279-24 (5'-T-G-T-C-A-G-A-G-C-A-G-G-A-T-G-C-A-T-C-T-G-T-3'; SEQ ID NO: 20) and 1071-80. A PCR product of 800 bp was isolated and subcloned into the Topo II vector. The resulting ligation reactions were used to transform competent bacteria and the clones obtained in this manner were then analyzed by sequencing.

30 To isolate cDNA sequences corresponding to the 5' end of the cDNA sequence, 5'RACE was performed using the human fetal calveria cDNA library described above and the primers 2279-22 (5'-T-G-C-A-T-T-G-C-C-T-T-G-T-G-C-C-A-G-C-A-G-G-T-3'; SEQ ID NO: 21) and 1071-80. Nested PCR was performed using a portion of the 5'RACE amplification product and the primers 2279-21 (5'-C-

WO 02/097046

PCT/US02/16740

T-G-T-C-A-G-C-T-G-C-C-A-G-A-T-G-A-G-T-T-G-3'; SEQ ID NO: 22) and 1071-80. A PCR product of 400 bp was isolated and subcloned into the Topo II vector. The resulting ligation reactions were used to transform competent bacteria and the clones obtained in this manner were then analyzed by sequencing.

5 To isolate the full-length cDNA sequence encoding B7RP-2 polypeptide, amplification reactions were performed using the human fetal calvera cDNA library described above and the primers 2318-34 (5'-G-C-G-T-C-C-C-T-G-A-G-T-C-C-C-A-G-A-G-3'; SEQ ID NO: 23) and 2318-35 (5'-G-T-G-T-A-T-C-G-C-A-T-C-C-T-T-T-G-G-A-G-A-A-G-3'; SEQ ID NO: 24). A PCR product of approximately 1.6 kb was
10 isolated and subcloned into the Topo II vector. The resulting ligation reactions were used to transform competent bacteria and the clones obtained in this manner were then analyzed by sequencing. Sequence analysis indicated that the human B7RP-2 gene comprises a 948 bp open reading frame encoding a protein of 316 amino acids (Figures 1A-1B).

15 Isolation of the cDNA sequences encoding murine and rat B7RP-2 polypeptide, indicate that both the murine B7RP-2 gene (Figures 2A-2B) and the rat B7RP-2 gene (Figures 3A-3C) also comprise open reading frames of 948 bp, each encoding a protein of 316 amino acids. The amino acid sequences for human B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 2), murine B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 4), and rat
20 B7RP-2 polypeptide (SEQ ID NO: 6) were aligned using the ClustalW algorithm (Thompson *et al.*, 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:4673-80). The ClustalW alignment of the human, murine, and rat B7RP-2 orthologs (Figures 4A-4B) suggests that human B7RP-2 polypeptide will tolerate nonconservative amino acid substitutions at a number of positions (*see* SEQ ID NO: 32), and further, that conservative amino acid
25 substitutions may be made at several other positions in the human B7RP-2 amino acid sequence (*e.g.*, at positions 20, 29, 101, 120, 184, 260, 261, 291, and 306). A BLAST analysis of the human, murine, and rat B7RP-2 orthologs against the Conserved Domain Database (a collection of functional and structural domains derived primarily from the Smart and Pfam databases) indicated that the three proteins also share at
30 least two conserved protein domains, namely an immunoglobulin V-type domain and an immunoglobulin C-type or C-2 type domain (Figure 5).

Sequence analysis also revealed that B7RP-2 polypeptide shares homology with the B7 family of proteins. Figures 6A-6B illustrate the amino acid sequence alignment of human butyrophilin, subfamily 1, member A1 (hu_BTN1A1; SEQ ID

WO 02/097046

PCT/US02/16740

NO: 7), bovine butyrophilin precursor (bo_BTIN; SEQ ID NO: 8), murine butyrophilin (mu_BTIN; SEQ ID NO: 9), human butyrophilin, subfamily 2, member A1 (hu_BTIN2A1; SEQ ID NO: 10), human butyrophilin-like protein (hu_BT3.2; SEQ ID NO: 11), human butyrophilin, subfamily 3, member A2 (hu_BTIN3A2; SEQ ID NO: 12), *Grus americana* B-G-like protein (gr_BG2; SEQ ID NO: 13), and human B7RP-2 polypeptide (hu_B7RP-2; SEQ ID NO: 2).

The predicted protein product of the B7RP-2 gene is related to the B7 family of proteins. These proteins are members of the immunoglobulin superfamily and function as regulators of the T-cell mediated immune response. Members of the B7 family of proteins are Type-1 membrane proteins with a small cytoplasmic domain and extracellular regions that contain immunoglobulin V (variable) and C (constant) domains. The known members of the B7 family include CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7RP-1, and B7-H1. B7-1 and B7-2 interact with CD28 and CTLA-4 and are mediators of the T-cell costimulatory pathway. B7RP-1 binds to a distinct receptor (ICOS; inducible co-stimulator) and is also a stimulator of T-cell proliferation. B7-H1 also co-stimulates T-cell proliferation, but does not bind CD28, CTLA-4, or ICOS. The protein sequences of this family are poorly conserved and consequently, are difficult to distinguish from other related molecules using computational methods, especially when only a portion of the full-length coding region sequence is compared. Other proteins exhibiting sequence homology to the B7 family include the butyrophilins and PRO352. Still more distantly related are the myelin oligodendrocyte proteins (MOGs).

Baker *et al.* (PCT Publication No. WO 99/46281) disclose a nucleic acid sequence of 1998 bp (SEQ ID NO: 25) encoding a polypeptide of 316 amino acids (SEQ ID NO: 26) that they designate as PRO352. Chapoval *et al.*, 2001, *Nat. Immun.* 2:269-274, disclose a nucleic acid sequence of 951 bp (SEQ ID NO: 27) encoding a polypeptide of 316 amino acids (SEQ ID NO: 28) which they designate B7-H3. The nucleic acid sequence disclosed by Chapoval *et al.* is identical to the nucleic acid sequence that encodes B7RP-2 polypeptide.

30

Example 2: B7RP-2 mRNA Expression

The kinetics of B7RP-2 mRNA expression during bone formation was examined in osteoblast cells following treatment with dexamethasone, vitamin C, and α -glycerolphosphate. Osteoblasts were isolated from rat bone marrow and cultured in

WO 02/097046

PCT/US02/16740

5 α -Minimal Essential Media containing 10% fetal calf serum, 3 ng/ml β -FGF, 50 $\square$ M β -mercaptoethanol, and antibiotics. Dexamethasone (10 nM) and vitamin C (50 $\square$ g/ml) were added to the media when the cells reached confluency, and the media was then renewed every other day until day 14. At day 8, β -glycerophosphate (50 $\square$ g/ml) was also added. Total RNA was prepared at days 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 14 and analysed by Northern blot analysis using the full-length rat B7RP-2 cDNA sequence as a probe. Each lane was loaded with an equal amount of RNA (20 $\square$ g/lane) as assessed by 28S and 18S rRNA. The increase in the expression of B7RP-2 mRNA following the addition of dexamethasone, vitamin C, and β -glycerophosphate (Figure 7) indicates that B7RP-2 polypeptide might be involved in osteoblast growth or differentiation.

15 The expression of B7RP-2 mRNA was localized by *in situ* hybridization. Normal mouse embryos (E18.5) were fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 μ m. Prior to hybridization, sections were permeabilized with 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections were hybridized overnight at 55°C with a ^{32} P-labeled riboprobe corresponding to 5' and 3' sequences of the mouse B7RP-2 protein coding sequence. Following hybridization, sections were treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed with a series of buffers containing decreasing salt concentrations to a high stringency of 0.1X SSC at 55°C. Sections were then immersed in NTB2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 2-3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Sections were examined with darkfield and transmitted light illumination to allow simultaneous evaluation of tissue morphology and hybridization signal. B7RP-2 mRNA expression was detected
 20 in the developing bones of an E18.5 mouse embryo (Figure 8).

Example 3: Production of B7RP-2 Polypeptides

A. Expression of B7RP-2 Polypeptides in Bacteria

30 PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7RP-2 polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary

WO 02/097046

PCT/US02/16740

vector, such as pAMG21 (ATCC no. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with Bam HI and Nde I for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance.

- 5 Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 µg/mL kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-DL-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/mL followed by incubation at either 30°C or 37°C for six hours. The expression of B7RP-2 polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing B7RP-2 polypeptide are purified as follows. Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000 xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 mL of a Percoll solution (75% liquid Percoll and 0.15 M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged at 21,600 xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli*-produced B7RP-2 polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid sequence is determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35.

B. Expression of B7RP-2 Polypeptide in Mammalian Cells

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7RP-2 polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of B7RP-2 polypeptides in

WO 02/097046

PCT/US02/16740

293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are selected in 100 µg/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and B7RP-2 polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

B7RP-2 polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, B7RP-2 polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

B7RP-2 polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or B7RP-2 fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

C. Expression and Purification of B7RP-2 Polypeptide in Mammalian Cells

B7RP-2 polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

To conduct functional studies on the B7RP-2 polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at -20°C until purification.

Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2 µm filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at A₂₈₀ reaches a baseline. B7RP-2 polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing B7RP-2 polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human B7RP-2 polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂ at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is added to

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 4: *In Vitro* Characterization of B7RP-2 Polypeptides

5 The inhibitory activity of B7RP-2 mRNA expression during bone mineralization was examined in calvarial cells following treatment with dexamethasone, vitamin C, and β -glycerophosphate. Calvarial cells were isolated from neonatal mice (CD1 strain) and cultured in α -Minimal Essential Media containing 10% fetal calf serum, 50 μ M β -mercaptoethanol, and antibiotics.
 10 Dexamethasone (10 nM) and vitamin C (50 μ g/ml) were added to the media when the cells reached confluency, and the media was then renewed every other day until day 14. At day 12, β -glycerophosphate (10 mM) was also added. At day 14, the degree of bone mineralization was determined by von Kossa staining. Soluble B7RP-2 polypeptide was found to inhibit nodule formation and mineralization in a dose
 15 dependent manner *in vitro* (Figure 9), indicating that B7RP-2 polypeptide might be involved in the regulation of bone formation.

Recombinant protein comprising the two extracellular Ig domains of B7RP-2 fused in-frame to the Fc portion of human IgG1 (B7RP-2-Fc) was synthesized. Lymph node cells from C57BL/6 mice were depleted of B220⁺ cells using magnetic
 20 beads (Dyna, Oslo, Norway). Purified lymph node T-cells were activated using plate-bound anti-CD3 (0.1 μ g/ml) plus 10 μ g/ml of plate-bound human IgG1 (isotype control), B7RP-2-Fc, or B7-2-Fc (positive control) in U-bottom 96-well plates. T-cell proliferation was assayed by pulsing the cells with ³H-thymidine during the last 8 hours of a 72-hour incubation period. The B7RP-2-Fc inhibited T-cell proliferation
 25 up to 5-fold compared to controls (Figure 10A). Interleukin-2 (IL-2) (Figure 10B) and interferon- γ (IFN- γ) (Figure 10C) production in the culture supernatants was measured using ELISA. IL-2 and IFN- γ production were similarly reduced, most likely because of the decrease in T-cell proliferation (Figures 10B and 10C). These results indicate that B7RP-2 inhibits TCR-mediated T-cell proliferation *in vitro*.

30

Example 5: *In vivo* Characterization of B7RP-2

A. Generation of B7RP-2^{-/-} Mice

The *in vivo* role of B7RP-2 was examined by generating B7RP-2 deficient mice. A murine B7RP-2 genomic clone was isolated from a 129/J phage library using

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the full-length rat B7RP-2 cDNA as a probe. A targeting vector was designed to replace the exon encoding the second Ig domain of B7RP-2 with a neomycin resistance cassette (Figure 11). A ~3.2 kb genomic sequence encompassing the exon encoding the second Ig domain of B7RP-2 (filled rectangle in Figure 11) was replaced by the PGK promoter-driven neomycin resistance gene (Neo). The diphtheria toxin A gene (DT-A) was used for negative selection. The targeting vector was introduced into E14 embryonic stem (ES) cells (129/Ola) by direct microinjection, and ES cell clones were screened by PCR to identify clones that had undergone homologous recombination.

Selected ES clones were verified by Southern blot analysis. For Southern blotting, Bgl II-digested genomic DNA from B7RP-2 $+/+$, $+/-$ and $-/-$ mice was hybridized to the 5' flanking probe shown in Figure 11. C57BL/6 blastocysts were injected with B7RP-2 $+/-$ ES cells and implanted in pseudopregnant female mice. The resulting chimeric mice were bred with C57BL/6 mice to obtain heterozygous F1 progeny, which were interbred to generate B7RP-2 $-/-$ mice. B7RP-2 $-/-$ mice derived from two independent ES clones showed the same phenotypes.

Disruption of the B7RP-2 gene was confirmed by Southern analysis of genomic DNA from F2 progeny (Figure 12). Anti-B7RP-2 antibodies were used to verify that the mice were not producing B7RP-2 protein. Rabbit polyclonal antibody was raised against rat B7RP-2-Fc protein. The antiserum was purified through a protein A column and anti-Fc antibodies were removed using an Fc affinity column. The flow cytometric analysis of mouse embryonic fibroblasts (MEF) from the B7RP-2 $-/-$ mice confirmed the absence of B7RP-2 protein (Figure 13). MEF were stained with anti-B7RP-2 rabbit IgG and FITC-conjugated goat anti-rabbit IgG.

B7RP-2 $-/-$ mice were obtained at the expected Mendelian ratio, and were found to be of normal size, maturation, and fertility. T-, B-, and NK-cell populations in the bone marrow, thymus, lymph node, spleen, and peripheral blood were normal in B7RP-2 $-/-$ mice. C57BL/6 x 129/Ola F2 and F3 animals were used for subsequent analysis.

30

B. T-Cell Response In B7RP-2 $-/-$ Mice

The B7RP-2 $-/-$ mice were used to determine if the absence of B7RP-2 protein contributes to heightened T-cell-mediated hypersensitivity. Airway inflammation models driven by either Th1 or Th2 cells, and a footpad-swelling model that reflects

WO 02/097046

PCT/US02/16740

cytotoxic T lymphocyte (CTL) response to lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) infection, were used to examine T-cell response. Cytokine (Th1- or Th2-polarizing) microenvironments were established in the airways of B7RP-2 *+/+* and B7RP-2 *-/-* mice by transient, adenovirus-mediated intranasal expression of GM-CSF plus IL-12 (Th1) or GM-CSF alone (Th2). Intranasal expression of replication-deficient adenovirus carrying the appropriate cytokine cDNA was initiated on day (-)1. The *+/+* and *-/-* mice were exposed to ovalbumin (OVA) aerosol (1% wt/vol in 0.9% saline) for 20 minutes on 10 consecutive days (days 0-9) to cause airway inflammation. On day 11, the mice were killed and immune cell populations in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluids were differentially stained and counted. The remaining lung tissue was processed for histologic examination by hematoxylin and eosin (H&E) staining. In some cases, lung cells were released by collagenase treatment and analyzed by flow cytometry. *Ex vivo* splenocytes were cultured in the absence or presence of 400 µg/ml OVA for 5 days prior to determination of cytokine production by ELISA (R&D Systems).

After OVA sensitization under Th1 conditions, B7RP-2 *-/-* mice had 2.5-fold more infiltrating immune cells in the airway compared to B7RP-2 *+/+* (Figure 14; Total). Lymphocyte (Figure 14; Lymphocytes), macrophage, and neutrophil subsets were increased to a similar degree. Histological examination of lung sections confirmed infiltration of increased severity in the absence of B7RP-2 (Figure 15; Th1). The portion of activated (CD69⁺) cells in both CD4⁺ and CD8⁺ T-cell populations in lung infiltrates of B7RP-2 *-/-* mice compared to controls (59.5% and 47.2%, respectively, among CD4⁺ T-cells; 76.7% and 65.9% among CD8⁺ T-cells; Figure 16).

Splenocytes harvested from B7RP-2 *-/-* mice sensitized under Th1 conditions produced about 60% more IFN-γ when restimulated *in vitro* with OVA compared to B7RP-2 *+/+* splenocytes. Under Th2 conditions, however, similar numbers of lung-infiltrating immune cells were found in BAL fluids and lung sections from B7RP-2 *+/+* and B7RP-2 *-/-* mice (Figures 14 and 15; Th2). Eosinophilia, a hallmark of Th2-driven airway inflammation, was also comparable (Figure 15; Th2; bottom panel), and OVA-stimulated B7RP-2 *+/+* and *-/-* splenocytes consistently produced similar levels of IL-4, IL-5, and IL-13. Thus, in situations of Th1- but not Th2-driven airway inflammation, B7RP-2 *-/-* mice develop more severe disease than control mice and

WO 02/097046

PCT/US02/16740

display augmented T-cell activation.

The role of B7RP-2 in a CTL-mediated hypersensitivity reaction was examined by injecting LCMV into the footpads of B7RP-2 +/+ and -/- mice. The extent and kinetics of footpad swelling were indistinguishable between genotypes (Figure 17). These data indicate that B7RP-2 is involved in downregulating Th1-mediated responses, but not in Th2- or CTL-mediated hypersensitivity reactions.

Example 6: Role of B7RP-2 in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE)

The role of B7RP-2 was also investigated in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), another Th1-driven disease model. Induction and clinical scoring of EAE was performed as follows. EAE was induced by immunizing mice with the peptide antigen representing amino acids 35-55 of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) M-E-V-G-W-Y-R-S-P-F-S-R-V-V-H-L-Y-R-N-G-K (SEQ ID NO: 29). B7RP-2 +/+ and -/- littermates (8-12 weeks) were injected subcutaneously (s.c.) on day 0 and day 7 with 300 µg MOG 35-55 peptide emulsified in CFA (Sigma) plus 500 µg *Mycobacterium tuberculosis*. The mice were injected intraperitoneally (i.p.) with 500 ng pertussis toxin (List Biological, Campbell, CA) on day 0 and day 2. EAE clinical scores were determined daily as follows (with a gradation of 0.5 for intermediate levels): 0, no clinical signs; 1, loss of tail tone; 2, wobbly gait; 3, hind limb paralysis; 4, hind and fore limb paralysis; 5, death.

The average day of disease onset (the first day when the clinical score was higher than 1) was earlier in B7RP-2 -/- mice (day 16.1; n = 16) than in B7RP-2 +/+ mice (day 18.4; n = 14) (Figure 18A), a trend clarified when littermates were compared (Figure 18B). Despite the earlier onset, B7RP-2 -/- mice had the same clinical scores as B7RP-2 +/+ mice by the late stages of the disease (Figure 18A). The rates of disease incidence (14/16 in +/+ and 16/18 in -/-) or mortality (1/14 in +/+ vs. 3/16 in -/-) were also equivalent. The earlier onset of EAE in the absence of B7RP-2 provides support for the hypothesis that B7RP-2 negatively regulates Th1-driven immune responses.

Example 7: Cytotoxic T lymphocytes (CTL) Response in B7RP-2 -/- Mice

A. Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV)-Specific CTL Response

The effect of B7RP-2 on the anti-viral cytotoxic T lymphocytes (CTL) responses to lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) or influenza virus was also

WO 02/097046

PCT/US02/16740

examined *in vivo*. For primary CTL responses, B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice were injected intravenously (i.v.) with 2000 pfu LCMV (Armstrong strain). At day 8 post-infection, splenocytes were harvested and *ex vivo* CTL activity was measured by a standard ^{51}Cr release assay using ^{51}Cr -labeled EL4 cells pulsed with LCMV glycoprotein peptide p33 (K-A-V-Y-N-F-A-T-M; SEQ ID NO: 30). The splenocytes from B7RP-2 $-/-$ mice on day 8 post-infection with LCMV showed the same level of *ex vivo* CTL activity as those from B7RP-2 $+/+$ mice (Figure 19; Primary).

The CTL memory response in B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice was examined using the footpad swelling assays. For footpad swelling, 3000 pfu LCMV (Armstrong strain) was injected into the hind footpad of B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice and the footpad thickness was measured with calipers. To measure memory CTL activity, the mice that were used for the footpad swelling experiments were killed at day 30 and the splenocytes were harvested. The harvested splenocytes were restimulated *in vitro* by culturing the cells for 5 days in the presence of 1 μM p33 peptide and rat splenocyte ConA culture supernatant. Cytotoxicity was measured as above. The levels of CTL activity detected in the splenocytes harvested from the B7RP-2 $-/-$ mice were comparable to those harvested from the B7RP $+/+$ mice (Figure 19; Memory). These experiments indicate that normal primary and memory CTL responses against LCMV can be mounted in the absence of B7RP-2.

B. Influenza Virus Nucleoprotein (NP)-Specific CTL Response

To rule out the possibility that the strong antigenic stimulation associated with LCMV infection masked a need for costimulatory signals, CTL responses to influenza virus were examined. B7RP-2 $-/-$ and $+/+$ mice were infected intraperitoneally (i.p.) with 200 hemagglutinin units (HAU) of influenza A HKx31(H3N1). Expansion of influenza nucleoprotein (NP)-specific CTL was monitored by flow cytometric analysis of splenocytes stained on day 7 and day 21 post-infection with anti-CD8 mAb (ebioscience, San Diego, CA) and the tetramer H-2D^b/NP366-374 (A-S-N-E-N-M-E-T-M; SEQ ID NO: 31) (NIAID MHC Tetramer Core Facility, Atlanta, GA). The expansion of NP366-374/H-2Db-specific CTLs during primary and secondary influenza virus infections was indistinguishable in B7RP-2 $+/+$ and $-/-$ mice (Figure 20). For memory CTL responses, B7RP-2 $+/+$ and $-/-$ mice (four mice/group) were infected with HKx31 and re-infected 4 weeks later with the serologically distinct influenza virus A/PR/8/34 (H1N1), which shares the same NP gene with HKx31.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Splenocytes were harvested and analyzed by tetramer staining 7 days after re-infection. There were no differences in the number of IFN- γ producing cells among CD8⁺ T-cells and the cytotoxicity of splenocytes restimulated *in vitro*.

5 Example 8: Production of Anti-B7RP-2 Polypeptide Antibodies

Antibodies to B7RP-2 polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with B7RP-2 peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

10 In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with a B7RP-2 antigen (such as a B7RP-2 polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to
15 mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 200 U/mL penicillin, 200 μ g/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-B7RP-2 antibody production by ELISA.

20 Alternative procedures for obtaining anti-B7RP-2 antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

25 Example 9: Expression of B7RP-2 Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of B7RP-2 polypeptide, a construct encoding a B7RP-2 polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of B7RP-2 polypeptide. Similarly, a
30 construct containing the full-length B7RP-2 polypeptide under the control of the beta actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7RP-2 polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, 5 PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified B7RP-2 polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β -actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

10 Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The B7RP-2 polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient 15 centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the B7RP-2 polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described 20 (PCT Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO₂ incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM 25 EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 mL of TE, and 2 mL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and 30 total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScript™ Preamplification System (Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the B7RP-2 polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice. The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for B7RP-2 polypeptide.

10 Example 10: Biological Activity of B7RP-2 Polypeptide in Transgenic Mice

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isofluorane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B-cell and T-cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by

WO 02/097046

PCT/US02/16740

gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100
mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed
twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated
for 10 minutes with 0.5 μg CD16/32(Fc γ III/II) Fc block in a 20 μL volume. Samples
5 are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 μL volume of PBS (lacking Ca^{+} and
 Mg^{+}), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 μg antibody of
FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R
(B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA).
Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow
10 cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

While the present invention has been described in terms of the preferred
embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those
skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such
15 equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising
 - (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5;
 - (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (c) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of either (a) or (b), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
 - (d) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (c).
2. An isolated nucleic acid molecule comprising:
 - (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
 - (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of (a);
 - (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5, or the nucleotide sequence of (a) or (b), encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic;
 - (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, or SEQ ID NO: 5 or the nucleotide sequence of any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
 - (e) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (d), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or

WO 02/097046

PCT/US02/16740

- (f) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (e).
3. An isolated nucleic acid molecule comprising:
- 5 (a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
10 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
15 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
20 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
25 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, amino acid insertion, amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (f) a nucleotide sequence of any of (a) - (e) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;
- (g) a nucleotide sequence that hybridizes under at least moderately
30 stringent conditions to the complement of the nucleotide sequence of any of (a) - (f), wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- (h) a nucleotide sequence complementary to the nucleotide sequence of any of (a) - (g).

WO 02/097046

PCT/US02/16740

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
5. A host cell comprising the vector of Claim 4.
6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.
7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.
8. A process of producing a B7RP-2 polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.
9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.
10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native B7RP-2 polypeptide operatively linked to the DNA encoding the B7RP-2 polypeptide.
11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program that is GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, or the Smith-Waterman algorithm.
12. A process for determining whether a compound inhibits B7RP-2 polypeptide activity or B7RP-2 polypeptide production comprising exposing a cell according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring B7RP-2 polypeptide activity or B7RP-2 polypeptide production in the cell.
13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
14. An isolated polypeptide comprising:

WO 02/097046

PCT/US02/16740

- (a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (b) an amino acid sequence that is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or is antigenic; or
- (d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or the amino acid sequence of either (a) or (b).
- 15 15. An isolated polypeptide comprising:
- (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 20 (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6;
- 25 (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 that has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6; or
- 30 (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6 with at least one modification that is an amino acid substitution, amino acid insertion, amino acid deletion, C-terminal truncation, or N-

WO 02/097046

PCT/US02/16740

terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.

17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program that is GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, or the Smith-Waterman algorithm.

18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6, or a fragment thereof.

20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.

21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.

22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.

23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.
- 5 27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.
28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.
- 10 29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.
30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
- 15 31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.
- 20 32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes B7RP-2 polypeptide biological activity.
33. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.
- 25 34. The method of Claim 33, wherein the medical disease, condition, or disorder is osteoporosis, Paget's disease, osteomyelitis, hypercalcemia, osteopenia, or osteonecrosis.
- 30 35. The method of Claim 33, wherein the medical disease, condition, or disorder is an autoimmune disease.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

36. The method of claim 35, wherein the autoimmune disease is systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, osteoarthritis, immune thrombocytopenic purpura (ITP), or psoriasis.
- 5 37. The method of Claim 33, wherein the medical disease, condition, or disorder is a chronic inflammatory disease.
38. The method of claim 37, wherein the chronic inflammatory disease is an inflammatory bowel disease, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, or diabetes mellitus.
- 10 39. The method of Claim 33, wherein the medical disease, condition, or disorder is cancer.
- 15 40. The method of Claim 33, wherein the medical disease, condition, or disorder is an infectious disease.
41. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, or SEQ ID NO: 6.
- 20 42. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to any of Claims 1, 2, or 3.
- 25 43. A method of detecting or quantitating the amount of B7RP-2 polypeptide using the selective binding agent or fragment of Claim 18.
44. A kit for detecting or quantitating the amount of GPCR polypeptide in a biological sample, comprising the selective binding agent of Claim 18.
- 30 45. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

46. The composition of Claim 45, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.
- 5 47. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.
48. The polypeptide of Claim 47 that is covalently modified with a water-soluble polymer.
- 10 49. The polypeptide of Claim 48, wherein the water-soluble polymer is polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols, or polyvinyl alcohol.
- 15 50. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
- 20 51. The composition of Claim 50, wherein the nucleic acid molecule is contained in a viral vector.
52. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
- 25 53. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.
54. The fusion polypeptide of Claim 53, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.
- 30 55. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of

WO 02/097046

PCT/US02/16740

the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

56. The method of Claim 55, wherein the medical disease, condition, or disorder is osteoporosis, Paget's disease, osteomyelitis, hypercalcemia, osteopenia, or osteonecrosis.

57. The method of Claim 55, wherein the medical disease, condition, or disorder is an autoimmune disease.

58. The method of claim 57, wherein the autoimmune disease is systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, osteoarthritis, immune thrombocytopenic purpura (ITP), or psoriasis.

59. The method of Claim 55, wherein the medical disease, condition, or disorder is a chronic inflammatory disease.

60. The method of claim 59, wherein the chronic inflammatory disease is inflammatory bowel disease, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, or diabetes mellitus.

61. The method of Claim 55, wherein the medical disease, condition, or disorder is cancer.

62. The method of Claim 55, wherein the medical disease, condition, or disorder is an infectious disease.

63. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

WO 02/097046

PCT/US02/16740

- (b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.
- 5 64. A device, comprising:
- (a) a membrane suitable for implantation; and
- (b) cells encapsulated within the membrane, wherein the cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and
- wherein the membrane is permeable to the protein and impermeable to
- 10 materials detrimental to the cells.
65. A method of identifying a compound that binds to a B7RP-2 polypeptide comprising:
- (a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a
- 15 compound; and
- (b) determining the extent of binding of the B7RP-2 polypeptide to the compound.
66. The method of Claim 65, further comprising determining the activity
- 20 of the polypeptide when bound to the compound.
67. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
- 25 68. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
69. A process for determining whether a compound inhibits B7RP-2
- 30 polypeptide activity or B7RP-2 polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 68 to the compound, and measuring B7RP-2 polypeptide activity or B7RP-2 polypeptide production in the transgenic mammal.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

x

70. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.
71. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
72. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one conservative amino acid substitution that is a valine at position 20; valine at position 29; valine at position 101; tyrosine at position 120; leucine at position 184; valine at position 260; valine or isoleucine at position 261; aspartic acid at position 291; or glutamic acid at position 306; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.
73. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 32.

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 1A

```

ccgggtcgac ccacgcgtcc ggccggggcg actgagccag gctgggocgc gtcctcgast 60
cccagagtcg gcgcggcgcg gcaggggcag ccttccacca cggggagccc agctgtcagc 120
cgcctcacag gaag atg ctg cgt ogg ogg ggc agc cct ggc atg ggt gtg 170
          Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val
          1          5          10

cat gtg ggt gca gcc ctg gga gca ctg tgg ttc tgc ctc aca gga gcc 218
His Val Gly Ala Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala
          15          20          25

ctg gag gtc cag gtc cct gaa gac cca gtg gtg gca ctg gtg ggc acc 266
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
          30          35          40

gat gcc acc ctg tgc tgc tcc ttc tcc cct gag cct ggc ttc agc ctg 314
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
          45          50          55

gca cag ctc aac ctc atc tgg cag ctg aca gat acc aaa cag ctg gtg 362
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
          65          70          75

cac agc ttt gct gag ggc cag gac cag ggc agc gcc tat gcc aac cgc 410
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
          80          85          90

acg gcc ctc ttc ccg gac ctg ctg gca caa ggc aat gca tcc ctg agg 458
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
          95          100          105

ctg cag cgc gtg cgt gtg gcg gac gag ggc agc ttc acc tgc ttc gtg 506
Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
          110          115          120

agc atc cgg gat ttc ggc agc gct gcc gtc agc ctg cag gtg gcc gct 554
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
          125          130          135          140

ccc tac tcg aag ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac ctg cgg 602
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
          145          150          155

cca ggg gac acg gtg acc atc acg tgc tcc agc tac cgg ggc tac cct 650
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro
          160          165          170

gag gct gag gtg ttc tgg cag gat ggg cag ggt gtg ccc ctg act ggc 698
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
          175          180          185

aac gtg acc aog tog cag atg gcc aac gag cag ggc ttg ttt gat gtg 746
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
          190          195          200

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 1B

```

cac agc gtc ctg cgg gtg gtg ctg ggt gcg aat ggc acc tac agc tgc 794
His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
205                210                215                220

ctg gtg cgc aac ccc gtg ctg cag cag gat gcg cac ggc tct gtc acc 842
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
225                230                235

atc aca ggg cag cct atg aca ttc ccc cca gag gcc ctg tgg gtg acc 890
Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr
240                245                250

gtg ggg ctg tct gtc tgt ctc att gca ctg ctg gtg gcc ctg gct ttc 938
Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe
255                260                265

gtg tgc tgg aga aag atc aaa cag agc tgt gag gag gag aat gca gga 986
Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly
270                275                280

gct gag gac cag gat ggg gag gga gaa ggc tcc aag aca gcc ctg cag 1034
Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln
285                290                295

cct ctg aaa cac tct gac agc aaa gaa gat gat gga caa gaa ata gcc 1082
Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                310                315

tgaccatgag gaccagggag ctgctacccc tccctacagc tccctacccc tggctgcaat 1142

ggggctgcac tgtgagcctt gcccccaaca gatgcatcct gctctgacag gtgggctcct 1202

tctccaaagg atgogataca cagaccactg tgcagcctta tttctccaat ggacatgatt 1262

cccaagtcac cctgctgcct tttttcttat agacacaatg aacagaccac ccacaacctt 1322

agttctctaa gtcacat 1337

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 2A

```

tggtacagag ctccgatcca ctagtaacgg ccgccagtg getggaatte gcccttgctg 60
tctcacagga ag atg ctt cga gga tgg ggt ggc ccc agt gtg ggt gtg tgt 111
      Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Cys
      1           5           10

gtg cgc aca gca ctg ggg gtg ctg tgc ctc tgc ctc aca gga gct gtg 159
Val Arg Thr Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val
      15           20           25

gaa gtc cag gtc tct gaa gac ccc gtg gtg gcc ctg gtg gac acg gat 207
Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp
      30           35           40           45

gcc acc cta cgc tgc tcc ttt tcc cca gag cct ggc ttc agt ctg gca 255
Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala
      50           55           60

cag ctc aac ctc atc tgg cag ctg aca gac acc aaa cag ctg gtg cac 303
Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His
      65           70           75

aga ttc acg gag ggc cgg gac caa ggc agt gcc tac tcc aac cgc aca 351
Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr
      80           85           90

gcg ctc ttc cct gac ctg ttg gtg caa ggc aat gcg tcc ttg agg ctg 399
Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu
      95           100           105

cag cgc gtc cga gta acc gac gag ggc agc tac acc tgc ttt gtg agc 447
Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser
      110           115           120           125

atc cag gac ttt gac agc gct gct gtt agc ctg cag gtg gcc gcc ccc 495
Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro
      130           135           140

tac tcg aag ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac cta cgt cca 543
Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro
      145           150           155

ggg aac atg gtg acc atc acg tgc tct agc tac cag ggc tat ccg gag 591
Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu
      160           165           170

gcc gag gtg ttc tgg aag gat gga cag gga gtg ccc ttg act ggc aat 639
Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn
      175           180           185

gtg acc aca tcc cag atg gcc aac gag cgg ggc ttg ttc gat gtt cac 687
Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His
      190           195           200           205

agc gtg ctg agg gtg gtg ctg ggt gct aac ggc acc tac agc tgc ctg 735
Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu
      210           215           220

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 2B

```

gta cgc aac ccg gtg ttg cag caa gat gct cac ggc tca gtc acc atc 783
Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile
225 230 235

aca ggg cag ccc ctg aca ttc ccc cct gag gct ctg tgg gta acc gtg 831
Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val
240 245 250

ggg ctc tct gtc tgt ctt gtg gta cta ctg gtg gcc ctg gct ttc gtg 879
Gly Leu Ser Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val
255 260 265

tgc tgg aga aag atc aag cag agc tgc gag gag gag aat gca ggt gcc 927
Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala
270 275 280 285

gag gac cag gat gga gat gga gaa gga tcc aag aca gct cta cgg cct 975
Glu Asp Gln Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro
290 295 300

ctg aaa ccc tct gaa aac aaa gaa gat gac gga caa gaa att gct 1020
Leu Lys Pro Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

tgattgggag ctgctgcaag ggcgaattct gcagatatcc atcactctgg cggccgctcg 1080
agoatgcctc tagag 1095

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 3A

```

cctcgccggt gctctaccga cggtaggggc gattgtgtgt cgtcccgag 60
tccccggagt cggcgcggcg cggcaggagc agccatccgc caccgagagt ccagctgtca 120
gctgtctcac aggaag atg ctt cga gga tgg ggt ggc ccc agt gtg ggt gtg 172
      Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val
      1           5           10

tct atg ggc acg gca ctg gga gtg ttg tgc etc tgc ctt aca gga gct 220
Ser Met Gly Thr Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala
      15           20           25

gtg gag gtc caa gtc tct gaa gac cct gtg gtg gcc cta gtg gat acg 268
Val Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr
      30           35           40

gat gcc acc cta cgc tgc tcc ttc tcc cca gag cct ggc ttc agc ctg 316
Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
      45           50           55           60

aga cag ctg aac ctg atc tgg cag ctg aca gac acc aaa cag ctg gtg 364
Arg Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
      65           70           75

cac agc ttc act gag ggc cgg gac caa ggc agt gcc tat gcc aac cgc 412
His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
      80           85           90

acg gcg ctg ttc cct gac ttg ttg gtg cag ggc aat gca tcc ctg agg 460
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
      95           100           105

ctg cag cgt gtc cga gta acc gac gag ggc agc tac acc tgc ttt gtg 508
Leu Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val
      110           115           120

agc atc cag gac ttt gac agc gct got gtt agc ctg cag gtg gcc gcc 556
Ser Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
      125           130           135           140

ccc tac tca aag ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac ctg cgt 604
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
      145           150           155

cca ggg gac atg gtg acc atc acg tgc tcc ago tac cag ggc tat ccc 652
Pro Gly Asp Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro
      160           165           170

gag gct gag gtg ttc tgg aag gac gga cag gga ttg ccc ttg act ggc 700
Glu Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Leu Pro Leu Thr Gly
      175           180           185

aat gtg acc aca tcc cag atg gcc aac gag cgg ggc ctg ttc gat gtt 748
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val
      190           195           200

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 3B

```

cac agt gtc ctg agg gtc gtc ctg ggt gct aat ggc acc tac agc tgc 796
His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
205                210                215                220

ctg gtc cgc aac cgc gtc ttg cag caa gat gct cat ggc tgc gtc acc 844
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
225                230                235

atc aca ggg cag ccc atg aca ttc ccc cct gag gct cta tgg gtc act 892
Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr
240                245                250

gtg ggg ctc tct gtc tgt ctt gtc ata ctg ctg gtc gcc ctg gcc ttc 940
Val Gly Ile Ser Val Cys Leu Val Ile Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe
255                260                265

gtg tgc tgg aga aag atc aag cag agc tgt gaa gag gag aat gca ggt 988
Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly
270                275                280

gct gag gac cag gat ggg gat gga gaa gga tcc aag aca gct ctt cgg 1036
Ala Glu Asp Gln Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg
285                290                295

cct ctg aaa cac tct gaa aac aaa gaa gat gac gga caa gaa ata gct 1084
Pro Leu Lys His Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                310                315

tgactggaag ctgctgccct tccctggtgg gggggccac cctctggctg tattgagcct 1144
caatgtgagc cctgccccca atgaatgggt ttgtttccac agatctaccc attctttaga 1204
ggactgtggtt tacaggctac ccacagcctt attttcccaa tggacttaat tcccatcato 1264
ctgaagcctc cttttctcag tgacacgata caccgaaccat cctgcggcct tattttctac 1324
ggactcgaca caaagagttc tccacctcag tgtccctcca ggtcatccg gtggccttgt 1384
gatactacac ggacotttct tctgccttac tttaatagat atacacaaac catcccatg 1444
tccttgtgcc tccaaagcca tgcagagact gtattactgc tactattctc caaggcacat 1504
gctattcaga tgaacccctg cettattcct ctgaagacag atgottagtt acctcttggg 1564
tcctttctcc atggccctga catatcttag tcccccata acgatgggat cccatctctc 1624
agcaagtctc caacctgact cctgcctc atctggccct ggetttggtt ttctccctcc 1684
ctaagtgaga tggggcacac tccccatcca cacacatggg tcaacagctgt gcgtgctgga 1744
tcgcgtacat acttgccctg catggtctcc tctggctgcc ctgggctgtg cctttctctg 1804
ctcaggaag caggtgctgg tggcctgggt tctcagggcc cctcaggagg tcagccttca 1864
acctgtgct tcccggttg gaaatctttg ttacttttcc tttcttagta aattaacatc 1924

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 3C

```
tgttgaacaa ccacagcgtc caacaggact ttcacagacc ctgccagcta gattaaataa 1984
tgatcacagaa gtttattaat tattttaaaag cttagggtttt ttgccggga ggtatcccaa 2044
atactctatc cagactaatc ctggcactat gtcccaccac atggcgaaggc ctacctctgc 2104
tccactctga atcatccacc tctgtgtccg cagacaaatc tcccatgatt cagttcttct 2164
ccacagctcc ctatctctgc cgggaagtac gaactttgac ttcttgacca actattggcc 2224
gtcaactctt tgtaaaggt gatcagatat aattttgct taggcacgtg aggaagaaac 2284
atatttataa aatacgagac cagagatggg ccatggaaat aacaccagat tctgacagcc 2344
tttagccctc tgcctgtaca aattaacaat tgaatatata gagacacacc ttcacacagt 2404
gcaccccaac aacaggggtg agcattgtgc tgggtactag ggtcctgctg aaatcagaga 2464
ccttaactcc agctggggaa tggccttgc cctgctgtg cccacagctt ccaacactgt 2524
ccctgaccoc agggtagggg tggaaaactg gagaaggcac agcccttacc ataccttga 2584
gaactgggta tttttcagag tctatatgtg tgcactggaa ggcaggtggc cacagccatg 2644
cagacctggg tagggtcaga agcctatgcc acgctgggac ctccccaaca gctgaagtct 2704
gaggacaaga agggccttct tactgtgggt ctattctgga gctggggtat atacctgct 2764
tgtctctgac agccctggct ttggcagaa ctt 2797
```

FIG. 4A

hufB 7BP-2 ¹⁸ M L R G W G G F S F G M G V G H V G A A L G A L W F C L I T G A I E ²⁰
mufB 7BP-2 M L R E R G G F S F G V G V C Y R T A L G V L C L C L I T G A V E
rsB 7BP-2 M L R G W G G F S F S V G V S M G T A L G V L C L C L I T G A V E
M L R G W G G F S F S V G V V G T A L G V L C L C L I T G A V E

hufB 7BP-2 ⁴⁰ V Q V P E D F V V A L V C T D A T I L C G S F S F E P G F S L ⁵⁰
mufB 7BP-2 V Q V S E D F V V A L V D T D A T L R C S F S F E P G F S L
rsB 7BP-2 V Q V S E D F V V A L V D T D A T L R C S F S F E P G F S L
V Q V S E D F V V A L V D T D A T L R C S F S F E P G F S L

hufB 7BP-2 ⁷⁰ A Q L N L I W Q L I D T I K Q L V H S F A E G Q D Q G S A Y A ⁸⁰
mufB 7BP-2 A Q L N L I W Q L I D T I K Q L V H S F T E G R D Q G S A Y S
rsB 7BP-2 R Q L N L I W Q L I D T I K Q L V H S F T E G R D Q G S A Y A
A Q L N L I W Q L I D T I K Q L V H S F T E G R D Q G S A Y A

hufB 7BP-2 ¹⁰⁰ N R T A L F P D L L V Q G N A S L R L Q R V R V A D E G S F ¹¹⁰
mufB 7BP-2 N R T A L F P D L L V Q G N A S L R L Q R V R V T D E G S Y
rsB 7BP-2 N R T A L F P D L L V Q G N A S L R L Q R V R V T D E G S Y
N R T A L F P D L L V Q G N A S L R L Q R V R V T D E G S Y

hufB 7BP-2 ¹³⁰ T C F V S I R D F G S A A V S L Q V A A P Y S K P S M I L E ¹⁴⁰
mufB 7BP-2 T C F V S I Q D F D S A A V S L Q V A A P Y S K P S M I L E
rsB 7BP-2 T C F V S I Q D F D S A A V S L Q V A A P Y S K P S M I L E
T C F V S I Q D F D S A A V S L Q V A A P Y S K P S M I L E

hufB 7BP-2 ¹⁶⁰ F N K D L R P G D M V T I T C S S Y E G Y P E A E V F W K Q D ¹⁷⁰
mufB 7BP-2 F N K D L R P G N M V T I T C S S Y G Y P E A E V F W K D
rsB 7BP-2 F N K D L R P G D M V T I T C S S Y G Y P E A E V F W K D
F N K D L R P G D M V T I T C S S Y G Y P E A E V F W K D

WO 02/097046

PCT/US02/16740

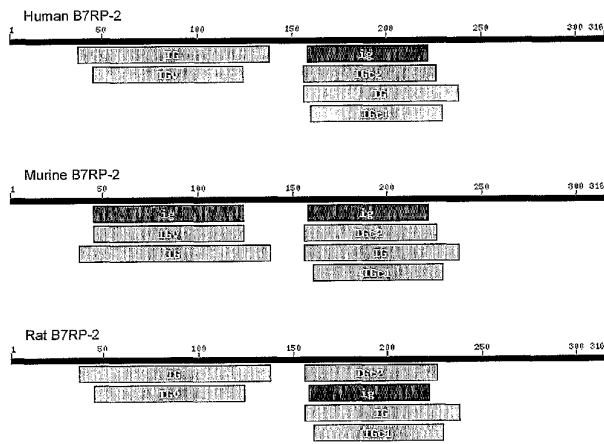
FIG. 4B

	188	200	210
<i>huB7RP-2</i>	G Q G V P L T G N V T T S Q M A N E	Q G L F D V H S V L R V	
<i>muB7RP-2</i>	G Q G V P L T G N V T T S Q M A N E	R G L F D V H S V L R V	
<i>raB7RP-2</i>	G Q G L P L T G N V T T S Q M A N E	R G L F D V H S V L R V	
	220	230	240
<i>huB7RP-2</i>	V L G A N G T Y S C L V R N P V L Q Q D A H G S V T I T G Q		
<i>muB7RP-2</i>	V L G A N G T Y S C L V R N P V L Q Q D A H G S V T I T G Q		
<i>raB7RP-2</i>	V L G A N G T Y S C L V R N P V L Q Q D A H G S V T I T G Q		
	250	260	270
<i>huB7RP-2</i>	F M T F P F E A L W V T V G L S V C L I A L L V A L A F V C		
<i>muB7RP-2</i>	F L T F P F E A L W V T V G L S V C L V V L L V A L A F V C		
<i>raB7RP-2</i>	F M T F P F E A L W V T V G L S V C L V I L L V A L A F V C		
	280	290	300
<i>huB7RP-2</i>	W R K I K Q S C E E E N A G A E D Q D G D G E G S K T A L R		
<i>muB7RP-2</i>	W R K I K Q S C E E E N A G A E D Q D G D G E G S K T A L R		
<i>raB7RP-2</i>	W R K I K Q S C E E E N A G A E D Q D G D G E G S K T A L R		
	310	320	330
<i>huB7RP-2</i>	P L K H S E N K E D D G Q E I A		
<i>muB7RP-2</i>	P L K P S E N K E D D G Q E I A		
<i>raB7RP-2</i>	P L K H S E N K E D D G Q E I A		

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 5



WO 02/09746

PCT/US02/16740

FIG. 6A

```

1                               50
hu_BT1A1  --MAVFPSSG LPRCLLTLL LQLPKLDS.A PFDVIGPPEP ILAVVGSDAE
bo_BT1    --MAVFPNSC LAGCLLTLL LQLPKLDS.A PFDVIGPQEP ILAVVGSDAE
mu_BT1    --MAVFTNSC LLVCLLTLL LQLPTLDSAA PFDVTAQCEP VLAVVGSDAE
hu_BT2A1  -MESAAALHF SRPASLLLL LSLCALVS.A QFIVVGPTDP ILATVGENTT
hu_BT3.2  MKMASSLAF LNFHVSLLL VQLLTPCS.A QFSVLGPSGP ILAVVGSDAD
hu_BT3A2  MKMASSLAF LNFHVSLLL VQLLTPCS.A QFSVLGPSGP ILAVVGSDAD
gr_B2     --MQMWLPAS PRGLLSYLV LHLRLGS.A NFSVVGPGHP LRVTVGQDVM
Hu_B7RP-2 --MLRRRGSP GMQVHVGAAL GALWFCLTGA .LEVQVPEDP VVALVGTDAT

51                               100
hu_BT1A1  LPCRISP.N. . ASAEHLRLRW FRKKVSPAVL VHRDGRFQEA EQMPEYRGRA
bo_BT1    LPCRISP.N. . VSAKMELRW FREKVSPAVL VSRGQEQEG EEMAEYRGV
mu_BT1    LTCGRISP.N. . ASSEIMELRW FRQTRSTAVL LYRDCQEQEG QQMTYRGRA
hu_BT2A1  LRCHLSP.N. . KNAEDMEVW FRQFSPAVL VYKGRERTS EQMEYRGRT
hu_BT3.2  LRCHLFTT. . MSAETMELKW VSSSLRQVW VYADGKEVED RQSAFYRGRT
hu_BT3A2  LRCHLFTT. . MSAETMELKW VSSSLRQVW VYADGKEVED RQSAFYRGRT
gr_B2     LPCRISP.N. . MARSLEIRW LRHQSSEIVH RYRNGEDLYG DQMEYVGRRT
Hu_B7RP-2 LCCSPSPPEP PSLAQLNLW QLTDTKQLVH SPABGQD... .QGSAYANRT

101                               150
hu_BT1A1  TLVQDGIAG RVALRIRGRV VSDDGRYTCF FREDGSYEEA LVHLKVAALG
bo_BT1    SLVEDHIAEG SVAVRIQEVK ASDDGRYRCF FRQDENYEEA LVHLKVAALG
mu_BT1    TLATAGLLDG RATLLIRDRV VSDQGRYCL FKQNDDEEEA AVVLKVAALG
hu_BT2A1  TTFVSKDISRG SVALVIHNT AQENGTYRCV PQGRSRYDEA TLHLVVALG
hu_BT3.2  SILRDGITAG KAALRIHNV ASDSGKYLQY PQDGDIFYEKA LVBLKVAALG
hu_BT3A2  SILRDGITAG KAALRIHNV ASDSGKYLQY PQDGDIFYEKA LVBLKVAALG
gr_B2     ELVRDGLSRG RLDLRISGLR PSDDGQYVCT VRDGSYGEA TVDLVSATG
Hu_B7RP-2 ALFPDLAQG NASLRLQVRV VADBGSTCF VSIRD.FGSA AVSLQVAAPY

151                               200
hu_BT1A1  SDPHISMOVO EN....GEIC LECTSVGWYP EPOVQWRISK GEKPPS.TSE
bo_BT1    SDPHISMVVO ES....GEIQ LECTSVGWYP EPOVQWRTHR GEKPPS.MSE
mu_BT1    SDPQISMVVO EN....GENE LECTSVGWYP EPOVQWRTHN REMLPS.TSE
hu_BT2A1  SKPLISMVGH ED....GGIR LECTSVGWYP KPFTVWRDPY QGVAPA.LKE
hu_BT3.2  SNLHVEVKGY ED....GGIH LECTSVGWYP QPQIQWNAK GENIPA.VEA
hu_BT3A2  SNLHVEVKGY ED....GGIH LECTSVGWYP QPQIQWNAK GENIPA.VEA
gr_B2     SGPQLSLEAV ED....GGIR VVCRSAGWYP RPEVLWKDPG QQHLP.SVSQ
Hu_B7RP-2 SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDQ GVPFTGNVTI

201                               250
hu_BT1A1  SRNPDEBGLF TVAASVIIRD TSTKNV.SCY IQNLLGQEK KVEISIPASS
bo_BT1    SRNPDEBGLF TVRASVIIRD SSMKNV.SCC IRNLLGQEK EYVVSIPASF
mu_BT1    SKKHNEBGLF TVAVSMIIRD SSIKNM.SCC IQNLLGQEK EYVVSIPASF
hu_BT2A1  VSMPPADGLF MVITAVIIRD KSVRNM.SCS INNTLLGQEK EYVIFIPBSF
hu_BT3.2  FVVADGVGLY EVAASVIMRG GSGEGV.SCI IRNSLLGLEK TESISIADPF
hu_BT3A2  FVVADGVGLY EVAASVIMRG GSGEGV.SCI IRNSLLGLEK TESISIADPF
gr_B2     RYSFDERGLF DTEVDIIVTD GNRDGMSCV VRNSHLNQBQ ETSLEISAPF
Hu_B7RP-2 SQMANEQGLF DVH.SVLRVV LGANGTYSCL VRNPVLQODA HGSVTTITQPF

251                               300
hu_BT1A1  LPRLTPWIVA VAVILMVGL LTIQSIFFTW RLYNERP...
bo_BT1    FPRLTPWIVA VAVILMVGL LTIQSIFFTW RLYKERS...
mu_BT1    VPRLTPWIVA VAILLALGF LTIQSIFFTW KLYKERS...
hu_BT2A1  MPSVSPCAVA LPILVILMI PIACIYWIN KLQKEKILS GEKEFBRETR
hu_BT3.2  FRSAQPIAA LAGTLPILL LLAGASYFLW RQKEITALS SEISBQEMK
hu_BT3A2  FRSAQPIAA LAGTLPILL LLAGASYFLW RQKEITALS SEISBQEMK
gr_B2     FHNARPMVVG VQ.VLLVLSG VLLGLGAYLW R.RKVLQSRRE LE-----
Hu_B7RP-2 MTPPPEALNV TVGLSVCLIA LVALAPVCW RKIKQSCRE NAGABDQDGE

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 6B

```

301                                350
hu_BT1A1  .RRRRNEFSS KERLLBELKW KKATLHAVDV TLDPDTAHPH
bo_BTN   .RQRRNEFSS KERLLBELKW KKATLHAVDV TLDPDTAHPH
mu_BTN   .SLRKKFSGS KERLLBELRC KKTVLHAVDV TLDPDTAHPH
hu_BT2A1  EIALKELEKE RVQKEELQV KEKLQELRW RRTFLHAVDV VLDPDTAHPD
hu_BT3.2  EMGYAATERE ISLRSLQEE LKRRKIQYLT RGESSSDTN KSALMLKWKK
hu_BT3A2  EMGYAATERE ISLRSLQEE LKRRKSST~ ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 GEGSKTALQP LKHSUSKEDD QGETA*~ ~~~~~~

351                                400
hu_BT1A1  LFLYEDSKSV RLEDSR...Q KLPEKTERFD SWPCVLGRET FTSGRHYWEV
bo_BTN    LFLYEDSKSV RLEDSR...Q KLPEKTERFD SWPCVMGREA FTSGRHYWEV
mu_BTN    LFLYEDSKSV RLEDSR...Q ILPRPERFD SWPCVLGRET FTSGRHYWEV
hu_BT2A1  LFLYEDSKSV RLEDSR...Q ILPRPERFD SWPCVLGRET FTSGRHYWEV
hu_BT3.2  ALLKPGEEML QNRHLVKK~ ~~~~~~
hu_BT3A2  ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 ~~~~~~

401                                450
hu_BT1A1  EVGDRTDWAT GVCRENVMKK GFDPMTFENG FWAVELYGNG YWALTPLRTP
bo_BTN    EVGDRTDWAT GVCRENVMKK GFDPMTFENG FWAVELYGNG YWALTPLRTP
mu_BTN    EVGDRTDWAT GVCRENVVKK GFDPMTFENG FWAVELYGNG YWALTPLRTP
hu_BT2A1  EVENVIEWTV GVCRDSVERK GEVLLIPQNG FWTLMMHKQO YRAVSSPDRI
hu_BT3.2  ~~~~~~
hu_BT3A2  ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 ~~~~~~

451                                500
hu_BT1A1  LPLAGPPRRV GFLDYESGD ISFYNMNDGS DIYTFSNVTF SGPLRPFFFCL
bo_BTN    LPLAGPPRRV GVFLDYESGD IFYFNMNDGS HIYTFSKASF SGPLRPFFFCL
mu_BTN    LPLAGPPRRV GVFLDYDAGD ISFYNMNDGS LIYTFPSISF SGPLRPFFFCL
hu_BT2A1  LPLKESLCRV GVFLDYEAGD VSFYNMNDGS HIYTCPRSAF SVFVRPFFFCL
hu_BT3.2  ~~~~~~
hu_BT3A2  ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 ~~~~~~

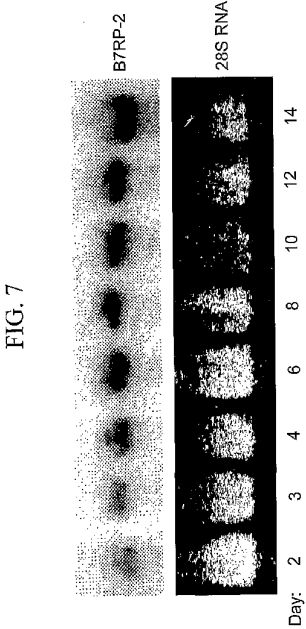
501                                550
hu_BT1A1  WSSGKKPLTI CPIADGPERV TVIANAQDLG KEIFLSPMGE ESAPRDADTL
bo_BTN    WSCGKKPLTI CPVIDGLEGV MUVADAKDIS KEIFLSPMGE DSASGDITL
mu_BTN    WSCGKKPLTI CSTANGPEKV TVIANVQD..DIPLSPLGE GCTSGDKDTL
hu_BT2A1  .GCEDSPIFI CPALTGANGV TVPEEGLTLH RVGTHQSL~ ~~~~~~
hu_BT3.2  ~~~~~~
hu_BT3A2  ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 ~~~~~~

551                                564
hu_BT1A1  HSKLIPTQPS QGAP
bo_BTN    HSKLIPLQPS QGVP
mu_BTN    HSKLIFFSPS QAAP
hu_BT2A1  ~~~~~~
hu_BT3.2  ~~~~~~
hu_BT3A2  ~~~~~~
gr_BG2    ~~~~~~
Hu_B7RP-2 ~~~~~~

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740



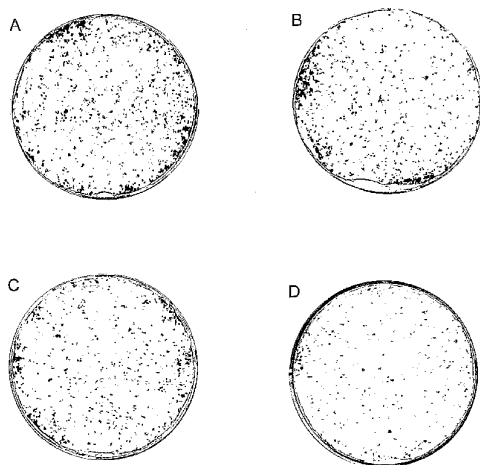
WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 8

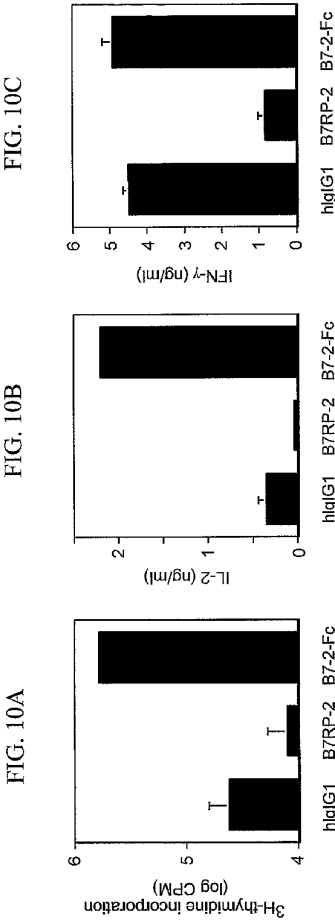


FIG. 9



WO 02/097046

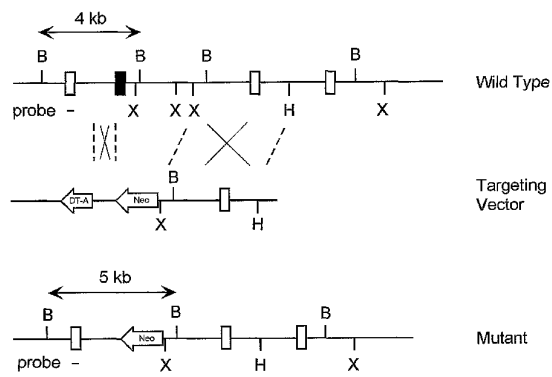
PCT/US02/16740



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 11



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 12

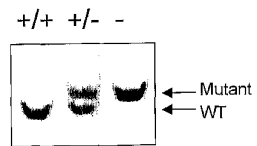
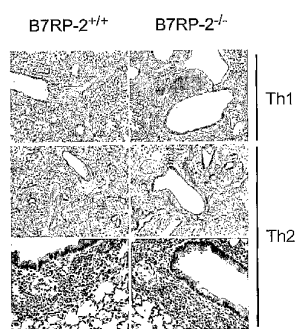


FIG. 15



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 13

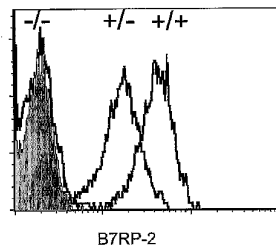
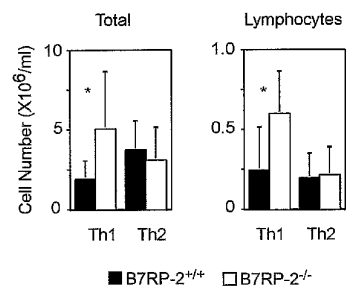


FIG. 14



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 16

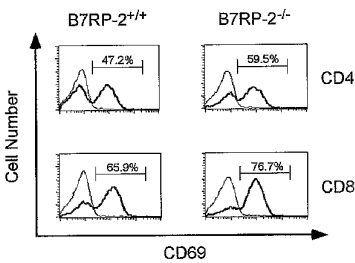
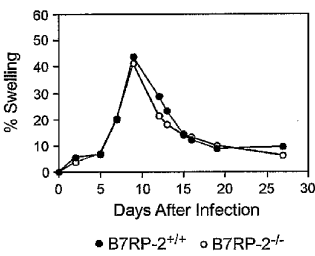


FIG. 17



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 18A

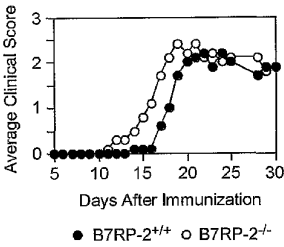
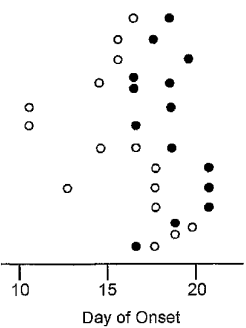


FIG. 18B



WO 02/097046

PCT/US02/16740

FIG. 19

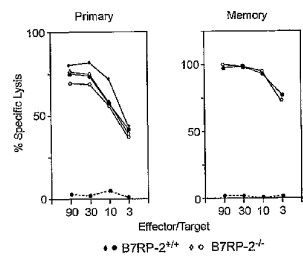
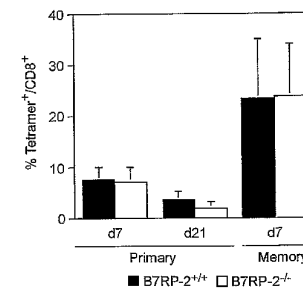


FIG. 20



WO 02/097046

PCT/US02/16740

SEQUENCE LISTING

<110> Yoshinaga, Steve Kiyoshi
Suh, Woong-Kyung
Mak, Tak W.

<120> B7 Related Protein-2 Molecules and Uses Thereof

<130> 01-384-B

<140>
<141>

<150> 60/283,629
<151> 2001-05-25

<160> 32

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 1337
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (135)..(1082)

<400> 1
ccgggtcgac ccacgcgtcc ggcgccggcg actgagccag gctgggcgcg gtccctgagt 60
ccacagagtcg gcgcggcgcg gcaggggcag ccttcaccca cggggagccc agctgtcagc 120
cgccctacacg gaag atg ctg cgt cgg cgg ggc agc cot ggc atg ggt gtg 170
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val
1 5 10
cat gtg ggt gca gcc ctg gga gca ctg tgg ttc tgc ctc aca gga gcc 218
His Val Gly Ala Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala
15 20 25
ctg cag gtc cag gtc cct gaa gac cca gtg gtg gca ctg gtg ggc acc 266
Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr
30 35 40
gat gcc acc ctg tgc tgc tcc ttc tcc cot gag cot ggc ttc agc ctg 314
Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu
45 50 55 60
gca cag ctc aac ctc atc tgg cag ctg aca gat acc aaa cag ctg gtg 362
Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val
65 70 75
cac agc ttt gct cag ggc cag gac cag ggc agc gcc tat gcc aac cgc 410
His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg
80 85 90
aag gcc ctc ttc ccg gac ctg ctg gca caa ggc aat gca tcc ctg agg 458
Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg
95 100 105

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

ctg cag cgc gtg cgt gtg gcg gac gag gcc agc ttc acc tgc ttc gtg 506
Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val
110 115 120

agc atc cgg gat ttc gcc agc gct gcc gtc agc ctg cag gtg gcc gct 554
Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala
125 130 135 140

ccc tac tcg aag ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac ctg cgg 602
Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg
145 150 155

cca ggg gac acg gtg acc atc acg tgc tcc agc tac cgg gcc tac cct 650
Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro
160 165 170

gag gct gag gtg ttc tgg cag gat ggg cag ggt gtg ccc ctg act gcc 698
Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly
175 180 185

aac gtg acc acg tcg cag atg gcc aac gag cag gcc ttg ttt gat gtg 746
Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val
190 195 200

cac agc gtc ctg cgg gtg gtg ctg ggt gcg aat gcc acc tac agc tgc 794
His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys
205 210 215 220

ctg gtg cgc aac ccc gtg ctg cag cag gat gcg cac gcc tct gtc acc 842
Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
225 230 235

atc aca ggg cag cct atg aca ttc ccc cca gag gcc ctg tgg gtg acc 890
Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr
240 245 250

gtg ggg ctg tct gtc tgt ctc att gca ctg ctg gtg gcc ctg gct ttc 938
Val Gly Leu Ser Val Cys Ile Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe
255 260 265

gtg tgc tgg aga aag atc aaa cag agc tgt gag gag gag aat gca gga 986
Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly
270 275 280

gct gag gac cag gat ggg gag gga gaa gcc tcc aag aca gcc ctg cag 1034
Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln
285 290 295 300

cct ctg aaa cac tct gac agc aaa gaa gat gat gga caa gaa ata gcc 1082
Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

tgacaaatgag gaccagggag ctgctacccc tccctacagc tccctacccc tggctgcaat 1142
ggggctgcaac tgtgagccct gccccaaca gatgcaccc gtctgacag gtgggctcct 1202
tctccaaagg atgcgataca cagacccactg tgcagcotta tttctccaat ggacatgatt 1262
cccaagtcac cctgctgctt ttttttttat agacacaatg aacagaccac ccacaacctt 1322

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

agttctctaa gtcat

1337

<210> 2

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

      275              280              285
Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290              295              300
Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305              310              315

<210> 3
<211> 1095
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (73)..(1020)

<400> 3
tggtaccgag ctccggtacca ctagtaacgg ccgccagtggt gctgggaattc gcccttgctg 60
tctcacagga ag atg ctt cga gga tgg ggt ggc ccc agt gtg ggt gtg tgt 111
      Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Cys
      1              5              10

gtg cgc aca gca ctg ggg gtg ctg tgc ctc tgc ctc aca gga gct gtg 159
Val Arg Thr Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val
      15              20              25

gaa gtc cag gtc tct gaa gac ccc gtg gtg gcc ctg gtg gac acg gat 207
Glu Val Gln Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp
      30              35              40

gcc acc cta cgc tgc tcc ttt tcc cca gag cct ggc ttc agt ctg gca 255
Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala
      50              55              60

cag ctc aac ctc atc tgg cag ctg aca gac acc aaa cag ctg gtg cac 303
Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His
      65              70              75

agc ttc acg gag ggc cgg gac caa ggc agt gcc tac tcc aac cgc aca 351
Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr
      80              85              90

gcg ctc ttc cct gac ctg ttg gtg caa ggc aat gcg tcc ttg agg ctg 399
Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu
      95              100              105

cag cgc gtc cga gta acc gac gag ggc agc tac acc tgc ttt gtg agc 447
Gln Arg Val Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser
      110              115              120              125

atc cag gac ttt gac agc gct gct gtt agc ctg cag gtg gcc gcc ccc 495
Ile Gln Asp Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro
      130              135              140

tac tcg aag ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac cta cgt cca 543
Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro
      145              150              155

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

ggg aac atg gtg acc atc acg tgc tot agc tac cag ggc tat ccg gag 591
Gly Asn Met Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu
160 165 170

gcc gag gtg ttc tgg aag gat gga cag gga gtg ccc ttg act gcc aat 639
Ala Glu Val Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn
175 180 185

gtg acc aca tcc cag atg gcc aac gag cgg ggc ttg ttc gat gtt cac 687
Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His
190 195 200 205

agc gtg ctg agg gtg gtg ctg ggt gct aac ggc acc tac agc tgc ctg 735
Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu
210 215 220

gta cgc aac ccg gtg ttg cag caa gat gct cac ggc tca gtc acc atc 783
Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile
225 230 235

aca ggg cag ccc ctg aca ttc ccc cct gag gct ctg tgg gta acc gtg 831
Thr Gly Gln Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val
240 245 250

ggg ctg tot gtc tgt ctt gtg gta cta ctg gtg gcc ctg gct ttc gtg 879
Gly Leu Ser Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val
255 260 265

tgc tgg aga aag atc aag cag agc tgc gag gag gag aat gca ggt gcc 927
Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala
270 275 280 285

gag gac cag gat gga gat gga gaa gga tcc aag aca gct cta cgg cct 975
Glu Asp Gln Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro
290 295 300

ctg aaa ccc tct gaa aac aaa gaa gat gac gga caa gaa att gct 1020
Leu Lys Pro Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305 310 315

tgattgggag ctgctgcaag ggcgaattct gcagatatcc atcacactgg oggcccgtcg 1080

agcatgcctc tagag 1095

<210> 4
<211> 316
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4
Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Cys Val Arg Thr
1 5 10 15

Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val Glu Val Gln
20 25 30

Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

      50              55              60
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
 65              70              75              80
Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ser Asn Arg Thr Ala Leu Phe
      85              90              95
Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
      100              105              110
Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp
      115              120              125
Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
      130              135              140
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asn Met
      145              150              155              160
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
      165              170              175
Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
      180              185              190
Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
      195              200              205
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
      210              215              220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
      225              230              235              240
Pro Leu Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
      245              250              255
Val Cys Leu Val Val Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
      260              265              270
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
      275              280              285
Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro Leu Lys Pro
      290              295              300
Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
      305              310              315

```

<210> 5
 <211> 2797
 <212> DNA
 <213> Rattus norvegicus

<220>
 <221> CDS
 <222> (137)..(1084)

<400> 5

PCT/US02/16740

7

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr
      225                230                235
atc aca ggg cag ccc atg aca ttc ccc cct gag gct cta tgg gtg act 892
ile thr gly gln pro met thr phe pro pro glu ala leu trp val thr
      240                245                250
gtg ggg ctc tct gtc tgt ctt gtg ata ctg ctg gtg gcc ctg gcc ttc 940
val gly leu ser val cys leu val ile leu leu val ala leu ala phe
      255                260                265
gtg tgc tgg aga aag atc aag cag agc tgt gaa gag gag aat gca ggt 988
val cys trp arg lys ile lys gln ser cys glu glu glu asn ala gly
      270                275                280
gct gag gac cag gat ggg gat gga gaa gga tcc aag aca gct ctt cgg 1036
ala glu asp gln asp gly asp gly glu gly ser lys thr ala leu arg
      285                290                295
cct ctg aaa cac tct gaa aac aaa gaa gat gac gga caa gaa ata gct 1084
pro leu lys his ser glu asn lys glu asp asp gly gln glu ile ala
      305                310                315

tgactggaag ctgctgccct tccctggtgg gggggccccc cctctggctg tattgagcct 1144
caatgtgagc cctgccccca atgaatgggt ttgtttccac agatctaccc attctttaga 1204
ggacgtggtt tacaggctac ccacagcctt attttcccaa tggacttaat tcccatcacc 1264
ctgaagcctc ctttctccag tgacacgata cacgaacctt cctgcggcct tatttcttac 1324
ggactcgaca caaagagttc tccacctcag tgtccctcca gagtcctccg gtggccttgt 1384
gatactacac ggaaccttct tctgacctac tttaatagat atacacaaac catccccatg 1444
tcctgtgccc tccaaagcca tgcagagact gtattactgc tactattctc caaggcacat 1504
gctattcaga tgaacccctg ccttattctt ctgaagacag atgcttagtt aactcttggt 1564
tctttctccc atggccctga catatcttag tcccccctcc aagatgggat cccatctctc 1624
agcaagtctt caacctgact cctgcctcct atctggcctt ggctttggtt ttctccctcc 1684
ctaagtgaqa tggggcacac tcccctccca cacacatggg tcacagctgt gcgtgctgga 1744
tcgctacat acttgcttg catggtctcc tctggctgcc ctgggctgtg cctttctctg 1804
cctcaggaaq caggtgctgg tcggcctggt tctcagggcc cctcaggagag tcagccttca 1864
acctgtgctt tccctgttg gaaatctttg ttacttttcc tttcttagta aattaacatc 1924
tgttgaacaa ccacagcgtc caacaggact ttccagagac ctgcagata gattaaataa 1984
tgatacagaa gtttattaat ttttttaaag cttaggtttt ttgcccggga ggtatcccaa 2044
atactctatc ccgactaatc ctggcactat gtcccaccac atggccagga ctacctctgc 2104
tccactctga atcatccacc tctgtgtccg ccgacaaatc tcccatgatt cagttctctt 2164
cccagcgtcc ctatctctgc ccggaagtac gacctttgac ttctgacca actattggcc 2224

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

gtcaactctt tgtaaagggt gatcagatat aattttgcoo taggcacgtg aggaagaaac 2284
 atatttataa aatacgagac cagagatggg ccatgggaat aacaccagat totgacagcc 2344
 tttagccctc tgcgtgtaca aattaacaat tgaatatata gagacacacc ttacacacgt 2404
 gcaccccaac aacaggggtg agcattgtgc tgggtactag ggtcctgtgt aaatcagaga 2464
 cottaactcc agctggggaa tggccttgct cctgctgtg cccacagcct ccaacactgt 2524
 cctgacccc agggtagggg tggaaacctg gagaaggcac agcccttac cataccttga 2584
 gaactgggta tttttcagag totatatgtg tgcactggaa ggcaggtggc cacagccatg 2644
 cagacctggg tagggtcaga agcctatgcc acgctgggac ctctcaaca gctgaagtct 2704
 gaggacaaga agggccttct tactgtgtgt ctattctgga gctgggggtat atacctggct 2764
 tgtctctgac agccctggct ttggcagaa ctt 2797

<210> 6
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Rattus norvegicus

<400> 6
 Met Leu Arg Gly Trp Gly Gly Pro Ser Val Gly Val Ser Met Gly Thr
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Val Leu Cys Leu Cys Leu Thr Gly Ala Val Glu Val Gln
 20 25 30
 Val Ser Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Asp Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45
 Arg Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Arg Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly Arg Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Val Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Thr Asp Glu Gly Ser Tyr Thr Cys Phe Val Ser Ile Gln Asp
 115 120 125
 Phe Asp Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Met
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Lys Asp Gly Gln Gly Leu Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

180          185          190
Ser Gln Met Ala Asn Glu Arg Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
195          200          205
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210          215          220
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225          230          235          240
Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245          250          255
Val Cys Leu Val Ile Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260          265          270
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275          280          285
Asp Gly Asp Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Arg Pro Leu Lys His
290          295          300
Ser Glu Asn Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305          310          315

```

<210> 7
 <211> 526
 <212> PPT
 <213> Homo sapiens

```

<400> 7
Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Gly Leu Pro Arg Cys Leu Leu Thr Leu
1          5          10          15
Ile Leu Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile
20          25          30
Gly Pro Pro Glu Pro Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Glu Leu
35          40          45
Pro Cys Arg Leu Ser Pro Asn Ala Ser Ala Glu His Leu Glu Leu Arg
50          55          60
Trp Phe Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala Val Leu Val His Arg Asp Gly
65          70          75          80
Arg Glu Gln Glu Ala Glu Gln Met Pro Glu Tyr Arg Gly Arg Ala Thr
85          90          95
Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg Val Ala Leu Arg Ile Arg
100          105          110
Gly Val Arg Val Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Thr Cys Phe Phe Arg Glu
115          120          125
Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu
130          135          140
Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Gln Val Gln Glu Asn Gly Glu Ile

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

145          150          155          160
Cys Leu Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln
      165          170          175

Trp Arg Thr Ser Lys Gly Glu Lys Phe Pro Ser Thr Ser Glu Ser Arg
      180          185          190

Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile
      195          200          205

Arg Asp Thr Ser Thr Lys Asn Val Ser Cys Tyr Ile Gln Asn Leu Leu
      210          215          220

Leu Gly Gln Glu Lys Lys Val Glu Ile Ser Ile Pro Ala Ser Ser Leu
      225          230          235

Pro Arg Leu Thr Pro Trp Ile Val Ala Val Ala Val Ile Leu Met Val
      245          250          255

Leu Gly Leu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg Leu Tyr
      260          265          270

Asn Glu Arg Pro Arg Glu Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Arg
      275          280          285

Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Lys Ala Thr Leu His Ala Val Asp
      290          295          300

Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu
      305          310          315

Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu
      325          330          335

Lys Thr Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu Thr
      340          345          350

Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr
      355          360          365

Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Met Lys Lys Gly Phe
      370          375          380

Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr Gly
      385          390          395

Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Ala
      405          410          415

Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp
      420          425          430

Ile Ser Phe Tyr Asn Met Asn Asp Gly Ser Asp Ile Tyr Thr Phe Ser
      435          440          445

Asn Val Thr Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp Ser
      450          455          460

Ser Gly Lys Lys Pro Leu Thr Ile Cys Pro Ile Ala Asp Gly Pro Glu
      465          470          475          480

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

Arg Val Thr Val Ile Ala Asn Ala Gln Asp Leu Ser Lys Glu Ile Pro
      485              490              495
Leu Ser Pro Met Gly Glu Glu Ser Ala Pro Arg Asp Ala Asp Thr Leu
      500              505              510
His Ser Lys Leu Ile Pro Thr Gln Pro Ser Gln Gly Ala Pro
      515              520              525

<210> 8
<211> 526
<212> PRT
<213> Bos taurus

<400> 8
Met Ala Val Phe Pro Asn Ser Cys Leu Ala Gly Cys Leu Leu Ile Phe
  1              5              10              15
Ile Leu Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile
      20              25              30
Gly Pro Gln Glu Pro Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Glu Leu
      35              40              45
Pro Cys Arg Leu Ser Pro Asn Val Ser Ala Lys Gly Met Glu Leu Arg
      50              55              60
Trp Phe Arg Glu Lys Val Ser Pro Ala Val Phe Val Ser Arg Glu Gly
      65              70              75              80
Gln Glu Gln Glu Gly Glu Glu Met Ala Glu Tyr Arg Gly Arg Val Ser
      85              90              95
Leu Val Glu Asp His Ile Ala Glu Gly Ser Val Ala Val Arg Ile Gln
      100             105             110
Glu Val Lys Ala Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Arg Cys Phe Phe Arg Gln
      115             120             125
Asp Glu Asn Tyr Glu Glu Ala Ile Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu
      130             135             140
Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Lys Val Gln Glu Ser Gly Glu Ile
      145             150             155             160
Gln Leu Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln
      165             170             175
Trp Arg Thr His Arg Gly Glu Glu Phe Pro Ser Met Ser Glu Ser Arg
      180             185             190
Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Arg Ala Ser Val Ile Ile
      195             200             205
Arg Asp Ser Ser Met Lys Asn Val Ser Cys Cys Ile Arg Asn Leu Leu
      210             215             220
Leu Gly Gln Glu Lys Glu Val Glu Val Ser Ile Pro Ala Ser Phe Phe
      225             230             235             240

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

Pro Arg Leu Thr Pro Trp Met Val Ala Val Ile Leu Val Val
      245          250          255
Leu Gly Leu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg Leu Tyr
      260          265          270
Lys Glu Arg Ser Arg Gln Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Lys
      275          280          285
Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Arg Ala Thr Leu His Ala Val Asp
      290          295          300
Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu
      305          310          315
Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu
      325          330          335
Lys Pro Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Met Gly Arg Glu Ala
      340          345          350
Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr
      355          360          365
Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Met Lys Lys Gly Phe
      370          375          380
Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr Gly
      385          390          395
Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Ala
      405          410          415
Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp
      420          425          430
Ile Phe Phe Tyr Asn Met Thr Asp Gly Ser His Ile Tyr Thr Phe Ser
      435          440          445
Lys Ala Ser Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp Ser
      450          455          460
Cys Gly Lys Lys Pro Leu Thr Ile Cys Pro Val Thr Asp Gly Leu Glu
      465          470          475
Gly Val Met Val Val Ala Asp Ala Lys Asp Ile Ser Lys Glu Ile Pro
      485          490          495
Leu Ser Pro Met Gly Glu Asp Ser Ala Ser Gly Asp Ile Glu Thr Leu
      500          505          510
His Ser Lys Leu Ile Pro Leu Gln Pro Ser Gln Gly Val Pro
      515          520          525

```

<210> 9
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

<400> 9
Met Ala Val Pro Thr Asn Ser Cys Leu Leu Val Cys Leu Leu Thr Leu
 1           5           10           15

Thr Val Leu Gln Leu Pro Thr Leu Asp Ser Ala Ala Pro Phe Asp Val
 20           25           30

Thr Ala Pro Gln Glu Pro Val Leu Ala Leu Val Gly Ser Asp Ala Glu
 35           40           45

Leu Thr Cys Gly Phe Ser Pro Asn Ala Ser Ser Glu Tyr Met Glu Leu
 50           55           60

Leu Trp Phe Arg Gln Thr Arg Ser Thr Ala Val Leu Leu Tyr Arg Asp
 65           70           75           80

Gly Gln Glu Gln Glu Gly Gln Gln Met Thr Glu Tyr Arg Gly Arg Ala
 85           90           95

Thr Leu Ala Thr Ala Gly Leu Leu Asp Gly Arg Ala Thr Leu Leu Ile
100           105           110

Arg Asp Val Arg Val Ser Asp Gln Gly Glu Tyr Arg Cys Leu Phe Lys
115           120           125

Asp Asn Asp Asp Phe Glu Glu Ala Ala Val Tyr Leu Lys Val Ala Ala
130           135           140

Val Gly Ser Asp Pro Gln Ile Ser Met Thr Val Gln Glu Asn Gly Glu
145           150           155           160

Met Glu Leu Glu Cys Thr Ser Ser Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val
165           170           175

Gln Trp Arg Thr Gly Asn Arg Glu Met Leu Pro Ser Thr Ser Glu Ser
180           185           190

Lys Lys His Asn Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Val Ser Met Met
195           200           205

Ile Arg Asp Ser Ser Ile Lys Asn Met Ser Cys Cys Ile Gln Asn Ile
210           215           220

Leu Leu Gly Gln Gly Lys Glu Val Glu Ile Ser Leu Pro Ala Pro Phe
225           230           235           240

Val Pro Arg Leu Thr Pro Trp Ile Val Ala Val Ala Ile Ile Leu Leu
245           250           255

Ala Leu Gly Phe Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Lys Leu
260           265           270

Tyr Lys Glu Arg Ser Ser Leu Arg Lys Lys Glu Phe Gly Ser Lys Glu
275           280           285

Arg Leu Leu Glu Glu Leu Arg Cys Lys Lys Thr Val Leu His Glu Val
290           295           300

Asp Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr
305           310           315           320

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Glu Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Ile Leu Pro
 325 330 335
 Asp Arg Pro Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu
 340 345 350
 Thr Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg
 355 360 365
 Thr Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Val Lys Lys Gly
 370 375 380
 Phe Asp Pro Met Thr Pro Asp Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr
 385 390 395 400
 Gly Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Ser Leu Arg Leu
 405 410 415
 Ala Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Asp Ala Gly
 420 425 430
 Asp Ile Ser Phe Tyr Asn Met Ser Asn Gly Ser Leu Ile Tyr Thr Phe
 435 440 445
 Pro Ser Ile Ser Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Phe Cys Leu Trp
 450 455 460
 Ser Cys Gly Lys Lys Pro Leu Thr Ile Cys Ser Thr Ala Asn Gly Pro
 465 470 475 480
 Glu Lys Val Thr Val Ile Ala Asn Val Gln Asp Asp Ile Pro Leu Ser
 485 490 495
 Pro Leu Gly Glu Gly Cys Thr Ser Gly Asp Lys Asp Thr Leu His Ser
 500 505 510
 Lys Leu Ile Pro Phe Ser Pro Ser Gln Ala Ala Pro
 515 520

 <210> 10
 <211> 527
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

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

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Gly Arg Glu Arg Thr Glu Glu Gln Met Glu Glu Tyr Arg Gly Arg Thr
 85 90 95
 Thr Phe Val Ser Lys Asp Ile Ser Arg Gly Ser Val Ala Leu Val Ile
 100 105 110
 His Asn Ile Thr Ala Gln Glu Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Phe Gln
 115 120 125
 Glu Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Ala Ile Leu His Leu Val Val Ala Gly
 130 135 140
 Leu Gly Ser Lys Pro Leu Ile Ser Met Arg Gly His Glu Asp Gly Gly
 145 150 155 160
 Ile Arg Leu Glu Cys Ile Ser Arg Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Leu Thr
 165 170 175
 Val Trp Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Val Ala Pro Ala Leu Lys Glu Val
 180 185 190
 Ser Met Pro Asp Ala Asp Gly Leu Phe Met Val Thr Thr Ala Val Ile
 195 200 205
 Ile Arg Asp Lys Ser Val Arg Asn Met Ser Cys Ser Ile Asn Asn Thr
 210 215 220
 Leu Leu Gly Gln Lys Lys Glu Ser Val Ile Phe Ile Pro Glu Ser Phe
 225 230 235 240
 Met Pro Ser Val Ser Pro Cys Ala Val Ala Leu Pro Ile Ile Val Val
 245 250 255
 Ile Leu Met Ile Pro Ile Ala Val Cys Ile Tyr Trp Ile Asn Lys Leu
 260 265 270
 Gln Lys Glu Lys Lys Ile Leu Ser Gly Glu Lys Glu Phe Glu Arg Glu
 275 280 285
 Thr Arg Glu Ile Ala Leu Lys Glu Leu Glu Lys Glu Arg Val Gln Lys
 290 295 300
 Glu Glu Glu Leu Gln Val Lys Glu Lys Leu Gln Glu Glu Leu Arg Trp
 305 310 315 320
 Arg Arg Thr Phe Leu His Ala Val Asp Val Val Leu Asp Pro Asp Thr
 325 330 335
 Ala His Pro Asp Leu Phe Leu Ser Glu Asp Arg Arg Ser Val Arg Arg
 340 345 350
 Cys Pro Phe Arg His Leu Gly Glu Ser Val Pro Asp Asn Pro Glu Arg
 355 360 365
 Phe Asp Ser Gln Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu Ser Phe Ala Ser Gly
 370 375 380
 Lys His Tyr Trp Glu Val Glu Val Glu Asn Val Ile Glu Trp Thr Val
 385 390 395 400
 Gly Val Cys Arg Asp Ser Val Glu Arg Lys Gly Glu Val Leu Leu Ile

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

      405              410              415
Pro  Gln Asn Gly Phe Trp Thr Leu Glu Met His Lys Gly Gln Tyr Arg
      420              425              430
Ala Val Ser Ser Pro Asp Arg Ile Leu Pro Leu Lys Glu Ser Leu Cys
      435              440              445
Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Asp Val Ser Phe Tyr
      450              455              460
Asn Met Arg Asp Arg Ser His Ile Tyr Thr Cys Pro Arg Ser Ala Phe
      465              470              475              480
Ser Val Pro Val Arg Pro Phe Phe Arg Leu Gly Cys Glu Asp Ser Pro
      485              490              495
Ile Phe Ile Cys Pro Ala Leu Thr Gly Ala Asn Gly Val Thr Val Pro
      500              505              510
Glu Glu Gly Leu Thr Leu His Arg Val Gly Thr His Gln Ser Leu
      515              520              525

<210> 11
<211> 359
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Met Lys Met Ala Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val
  1              5              10              15
Ser Leu Leu Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser
      20              25              30
Val Leu Gly Pro Ser Gly Fro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala
      35              40              45
Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu
      50              55              60
Leu Lys Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala
      65              70              75              80
Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg
      85              90              95
Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg
      100             105             110
Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe
      115             120             125
Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala
      130             135             140
Ala Leu Gly Ser Asn Leu His Val Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly
      145             150             155             160
Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

165          170          175
Ile Gln Trp Ser Asn Ala Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala
180          185          190
Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Glu Val Ala Ala Ser Val
195          200          205
Ile Met Arg Gly Gly Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn
210          215          220
Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
225          230          235          240
Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
245          250          255
Pro Ile Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe Leu Trp Arg
260          265          270
Gln Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ser Ser Glu Ile Glu Ser Glu Gln
275          280          285
Glu Met Lys Glu Met Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Arg Glu Ile Ser Leu
290          295          300
Arg Glu Ser Leu Gln Glu Glu Leu Lys Arg Lys Lys Ile Gln Tyr Leu
305          310          315          320
Thr Arg Gly Glu Glu Ser Ser Ser Asp Thr Asn Lys Ser Ala Leu Met
325          330          335
Leu Lys Trp Lys Lys Ala Leu Leu Lys Pro Gly Glu Glu Met Leu Gln
340          345          350
Met Arg Leu His Leu Val Lys
355

<210> 12
<211> 319
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Met Lys Met Ala Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val
1          5          10          15
Ser Leu Leu Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser
20          25          30
Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala
35          40          45
Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu
50          55          60
Leu Lys Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala
65          70          75          80
Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

      85              90              95
Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg
    100              105              110
Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe
    115              120              125
Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala
    130              135              140
Ala Leu Gly Ser Asn Leu His Val Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly
    145              150              155              160
Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln
    165              170              175
Ile Gln Trp Ser Asn Ala Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala
    180              185              190
Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Glu Val Ala Ala Ser Val
    195              200              205
Ile Met Arg Gly Gly Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn
    210              215              220
Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
    225              230              235              240
Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
    245              250              255
Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe Leu Trp Arg
    260              265              270
Gln Gln Lys Glu Ile Thr Ala Leu Ser Ser Glu Ile Glu Ser Glu Gln
    275              280              285
Glu Met Lys Glu Met Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Arg Glu Ile Ser Leu
    290              295              300
Arg Glu Ser Leu Gln Glu Glu Leu Lys Arg Lys Lys Ser Ser Thr
    305              310              315

<210> 13
<211> 280
<212> PRT
<213> Grus americana

<400> 13
Met Gln Met Trp Leu Pro Ala Ser Pro Arg Gly Leu Leu Ser Tyr Leu
  1          5          10          15
Val Thr Leu His Val Leu Arg Leu Gly Ser Ala Asn Phe Ser Val Val
  20          25          30
Gly Pro Gly His Pro Leu Arg Val Thr Val Gly Gln Asp Val Met Leu
  35          40          45
Pro Cys His Leu Ser Pro Ser Met Glu Ala Arg Ser Leu Asp Ile Arg

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

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

```

<210> 14
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 14
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

WO 02/097046

PCT/US02/16740

<223> Description of Artificial Sequence: internalizing
domain derived from HIV tat protein

<400> 15

Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 16

<211> 792

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> unsure

<222> (125)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (128)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (137)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (692)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (716)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (762)

<223> "n" is a, g, c, or t

<220>

<221> unsure

<222> (787)

<223> "n" is a, g, c, or t

<400> 16

tctggcagga tgggcagggt gtgccatga ctggcaactg gaccacgtcg cagatggcca 60
acgagcagggt cttgtttgat gtgcacagcg tctgcgggt ggtgctgggt gcgaatggca 120
ctacngcntg cctgttncgc aacccogtgc tgcagcagga tgcgcacggc tctgtcacca 180
tcacagggca gcctatgaca ttcccccagc aggcctgtgt gtgacgtgg ggctgtctgt 240
ctgtctcatt gcaotgtgtg tggocotggo ttctgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag 300
ctgtcagdag gagaatgcag gagctgagga ccaggtatgg gagggagaag gctccaagac 360

WO 02/097046

PCT/US02/16740

agccctgcag cctctgaac actctgacag caaagaagat gntggacaag aaatagcctg 420
accatgagga ccaggagct gotacccctc cctacagctc ctaccccttg gctgcaatgg 480
ggctgcactg tgagccctgc ccccaacaga tgcctcctgc tctgacaggt gggctccttc 540
tccaaaggat gcgatacaca gccactgtg cagccttatt tctccaatgg acatgattcc 600
caagtcaccc tgcctccttt tttcttatag acacaatgaa cagaccaccc acaaccctga 660
gttctgtaaa gtcctccttg cctgctggcc tntattttca cagttacata catttnttta 720
gggggacaca gttacattga accacattta accacotttt tnttttcag ttgttgcgtg 780
gggaccnntt gg 792

<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2245-71

<400> 17
caacgagcag ggcttgtttg 20

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2245-72

<400> 18
ggctcgtgta tgcctcctt tgg 23

<210> 19
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 1071-80

<400> 19
tgcagggtacc ggctcgggaat 20

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

WO 02/097046

PCT/US02/16740

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2279-24

<400> 20
tgtcagagca ggtgcatct gt 22

<210> 21
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2279-22

<400> 21
tgcattgctt tgtgccagca ggt 23

<210> 22
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2279-21

<400> 22
ctgtcagctg ccagatgagg ttg 23

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:
oligonucleotide; PCR primer 2318-34

<400> 23
gcgtccctga gtcccagag 19

<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial
Sequence:oligonucleotide; PCR primer 2318-35

<400> 24
gtgtatcgca tcctttgag aag 23

<210> 25

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

<211> 1998
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (152)..(1099)

<220>
<221> UNSURE
<222> (233)
<223> "Xaa" is Ser or Ala

<400> 25
cggggccgccc cggggcccca ttggggcgg gctctgctgc ggcgcgact gagccaggct 60
ggggcgcgtc cctgagtcac agagtcggcg cggcgcgga gggcgagcct tccaccacgg 120
ggagccacgc tgtcagccgc ctccacggaa g atg ctg cgt cgg cgg ggc agc 172
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser
1 5

cct ggc atg ggt gtg cat gtg ggt gca gcc ctg gga gca ctg tgg ttc 220
Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe
10 15 20

tgc ctg aca gga gcc ctg gag gtc cag gtc cct gaa gac oca gtg gtg 268
Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln Val Pro Glu Asp Pro Val Val
25 30 35

gca ctg gtg ggc acc gat gcc acc ctg tgc tgc tcc ttc tcc cct gag 316
Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu
40 45 50

cct ggc ttc agc ctg gca cag ctg aac ctg atc tgg cag ctg aca gat 364
Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp
60 65 70

acc aaa cag ctg gtg cac agc ttt gct gag ggc cag gac cag ggc agc 412
Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser
75 80 85

gcc tat gcc aac cgc acg gcc ctg ttc ccg gac ctg ctg gca cag ggc 460
Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly
90 95 100

aac gca tcc ctg agg ctg cag cgc gtg cgt gtg gcg gac gag ggc agc 508
Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser
105 110 115

ttc acc tgc ttc gtg agc atc cgg gat ttc ggc agc gct gcc gtc agc 556
Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser
120 125 130 135

ctg cag gtg gcc gct ccc tac tcg aag ccc agc atg acc ctg gag ccc 604
Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro
140 145 150

aac aag gac ctg cgg cca ggg gac acg gtg acc atc acg tgc tcc agc 652
Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser
155 160 165

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

tac cag gcc tac cct gag gct gag gtg ttc tgg cag gat ggg cag ggt 700
Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly
170 175 180

gtg ccc ctg act ggc aac gtg acc acg tcg cag atg gcc aac gag cag 748
Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln
185 190 195

ggc ttg ttt gat gtg cac agc gtc ctg cgg gtg gtg ctg ggt gcg aat 796
Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala Asn
200 205 210 215

ggc acc tac agc tgc ctg gtg cgc aac ccc gtg ctg cag cag gat gcg 844
Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala
220 225 230

cac rgc tot gtc acc atc aca ggg cag cct atg aca ttc ccc cca gag 892
His Xaa Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu
235 240 245

gcc ctg tgg gtg acc gtg ggg ctg tct gtc tgt ctc att gca ctg ctg 940
Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu
250 255 260

gtg gcc ctg got ttc gtg tgc tgg aga aag atc aaa cag agc tgt gag 988
Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu
265 270 275

gag gag aat gca gga gct gag gac cag gat ggg gag gga gaa gcc tcc 1036
Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser
280 285 290 295

aag aca gcc ctg cag cct ctg aaa cac tct gac agc aaa gaa gat gat 1084
Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp
300 305 310

gga caa gaa ata gcc tgacctgag gaccaggagg ctgctacccc tccctacagc 1139
Gly Gln Glu Ile Ala
315

tccctacccc tggctgcaat ggggctgcac tgtgagccct gcccacaaca gatgcatcct 1199

gctctgacag gtgggctcct tctccaaagg atgcgataca cagaccactg tgcagcctta 1259

ttctccaat ggacatgatt cccaaagtcct cctgtgcct tttttcttat agacacaatg 1319

aacagaccac ccacaacott agttctctaa gtcacctgc ctgctgcctt atttcacagt 1379

acatacatit cttagggaca cagtacactg accacatcac caccctcttc ttccagtgtc 1439

gcgtggacca tctggctgcc tttttctcc aaaagatgca atattoagac tgactgaccc 1499

cctgccttat ttcaccaag acacgatgca tagtcacccc gcccttggtt ctccaatggc 1559

ogtgatacac tagtgatcat gttcagccct gottccact gcatagaatc tttttcttc 1619

agacagggac agtgaggcct caacatctcc tggagtctag aagctgttcc ctttccctc 1679

cttctccct gcccacagt aagacaggc agggccagga atgctttggg gacaccgag 1739

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

ggactgcccc ccaccccccac catgggtgcta ttctggggct ggggcagtcct ttctctggct 1799
 tgcctctggc cagctcctgg cctctggtag agtgagactt cagacgttct gatgccttc 1859
 ggatgtcatc tctcctggcc ccagggaatgg aagatgtgag gacttctaatt ttaaatgtgg 1919
 gactcggagg gattttgtaa actgggggta tattttggg aaaataaatg tctttgtaaa 1979
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1998

<210> 26
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> UNSURE
 <222> (233)
 <223> "Xaa" is Ser or Ala

<400> 26
 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15
 Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30
 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45
 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Gln Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210                215                220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Xaa Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225                230                235                240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245                250                255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260                265                270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275                280                285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290                295                300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                310                315

<210> 27
<211> 951
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(948)

<400> 27
atg ctg cgt cgg cgg ggc agc cct ggc atg ggt gtg cat gtg ggt gca 48
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
1      5      10      15

ggc ctg gga gca ctg tgg ttc tgc ctc aca gga gcc ctg gag gtc cag 96
Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20      25      30

gtc cct gaa gac cca gtg gtg gca ctg gtg ggc acc gat gcc acc ctg 144
Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
35      40      45

tgc tgc tcc ttc tcc cct gag cct ggc ttc agc ctg gca cag ctc aac 192
Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
50      55      60

ctc atc tgg cag ctg aca gat acc aaa cag ctg gtg cac agc ttt gct 240
Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65      70      75      80

gag ggc cag gac cag ggc agc gcc tat gcc aac cgc acg gcc ctc ttc 288
Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
85      90      95

ccg gac ctg ctg gca cag ggc aac gca tcc ctg agy ctg cag cgc gtg 336
Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
100     105     110

cgt gtg gcg gac gag ggc agc ttc acc tgc ttc gtg agc atc cgg gat 384

```

WO 02/097046

PCT/US02/16740

```

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
115                      120                      125

ttc gcc agc gct gcc gtc agc ctg cag gtg gcc gct ccc tac tcg aag 432
Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
130                      135                      140

ccc agc atg acc ctg gag ccc aac aag gac ctg cgg cca ggg gac acg 480
Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145                      150                      155                      160

gtg acc atc acg tgc tcc agc tac cgg ggc tac cct gag gct gag gtg 528
Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
165                      170                      175

ttc tgg cag gat ggg cag ggt gtg ccc ctg act ggc aac gtg acc acg 576
Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
180                      185                      190

tgc cag atg gcc aac gag cag ggc ttg ttt gat gtg cag agc gtc ctg 624
Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
195                      200                      205

cgg gtg gtg ctg ggt gcg aat ggc acc tac agc tgc ctg gtg cgc aac 672
Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
210                      215                      220

ccc gtg ctg cag cag gat gcg cac ggc tct gtc acc atc aca ggg cag 720
Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225                      230                      235                      240

cot atg aca ttc ccc cca gag gcc ctg tgg gtg acc gtg ggg ctg tct 768
Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
245                      250                      255

gtc tgt ctc att gca ctg ctg gtg gcc ctg gct ttc gtg tgc tgg aca 816
Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
260                      265                      270

aag atc aaa cag agc tgt gag gag gag aat gca gga gct gag gac cag 864
Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
275                      280                      285

gat ggg gag gga gaa ggc tcc aag aca gcc ctg cag cct ctg aaa cac 912
Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
290                      295                      300

tct gac agc aaa gaa gat gat gga caa gaa ata gcc tga 951
Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                      310                      315

```

<210> 28
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 28
 Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1 5 10 15

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
 20 25 30
 Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
 35 40 45
 Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
 65 70 75 80
 Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
 115 120 125
 Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220
 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
 245 250 255
 Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
 260 265 270
 Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
 275 280 285
 Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
 290 295 300
 Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 305 310 315

<210> 29
 <211> 21
 <212> PRT

WO 02/097046

PCT/US02/16740

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide antigen

<400> 29

Met Glu Val Gly Trp Tyr Arg Ser Pro Phe Ser Arg Val Val His Lys
1 5 10 15Tyr Arg Asn Gly Lys
20

<210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: LCMV glycoprotein peptide p33

<400> 30

Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Met
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: tetramer H-2Db/NP366-374

<400> 31

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

<210> 32

<211> 316

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: artificial B7RP-2 amino acid sequence

<400> 32

Met Leu Arg Xaa Xaa Gly Xaa Pro Xaa Xaa Gly Val Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15Ala Leu Gly Ala Leu Xaa Xaa Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
20 25 30Val Xaa Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Xaa Thr Asp Ala Thr Leu
35 40 45

WO 02/097046

PCT/US02/16740

Xaa Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
 50 55 60
 Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Xaa
 65 70 75
 Glu Gly Xaa Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Xaa Asn Arg Thr Ala Leu Phe
 85 90 95
 Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
 100 105 110
 Arg Val Xaa Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Xaa Asp
 115 120 125
 Phe Xaa Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
 130 135 140
 Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Xaa Xaa
 145 150 155 160
 Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Xaa Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
 165 170 175
 Phe Trp Xaa Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
 180 185 190
 Ser Gln Met Ala Asn Glu Xaa Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
 195 200 205
 Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
 210 215 220
 Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
 225 230 235 240
 Pro Xaa Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
 245 250 255
 Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
 260 265 270
 Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
 275 280 285
 Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Xaa Pro Leu Lys Xaa
 290 295 300
 Ser Asp Xaa Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
 305 310 315

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 December 2002 (05.12.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/097046 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
16/28, A61K 38/17, 39/395, 48/00, C12N 15/12, 5/10,
C12Q 1/68, G01N 33/53(74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert
& Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606
(US).

(21) International Application Number: PCT/US02/16740

(81) Designated States (national): AT, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) International Filing Date: 28 May 2002 (28.05.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/293,629 25 May 2001 (25.05.2001) US

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier application:
US 60/293,629 (CON)
Filed on 25 May 2001 (25.05.2001)

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN,
INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks,
CA 91320-1799 (US).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): YOSHINAGA,
Steven, Kiyoshi [US/US]; 1806 Calle Salto, Thousand
Oaks, CA 91350 (US); SUH, Woong-Kyung [KR/CA];
55 Charles Street West, Apt. 504, Toronto, Ontario M5S
2W9 (CA); MAIK, Tak, Wah [CA/CA]; 25 Hgin Avenue,
Toronto, Ontario M5R 1G5 (CA).(88) Date of publication of the international search report:
27 February 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/097046 A3

(54) Title: B7 RELATED PROTEIN-2 MOLECULES AND USES THEREOF

(57) Abstract: The present invention provides B7 related Protein-2 (B7RP-2) polypeptides and nucleic acid molecules encoding the same. The invention also provides selective binding agents, vectors, host cells, and methods for producing B7RP-2 polypeptides. The invention further provides pharmaceutical compositions and methods for the diagnosis, treatment, amelioration, and/or prevention of diseases, disorders, and conditions associated with B7RP-2 polypeptides.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/16740																					
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(T) : C07K 14/705, 16/28; A61K 38/17, 39/395, 48/00; C12N 15/12, 5/10; C12Q 1/68; G01N 33/53 US CL : 536/23.1; 435/320.1; 69.1, 325, 252.1, 455, 810, 7.1; 530/350, 387.3; 424/130.1, 134.1, 185.1, 192.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC																							
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 536/23.1; 435/320.1, 69.1, 325, 252.1, 455, 810, 7.1; 530/350, 387.3; 424/130.1, 134.1, 185.1, 192.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet																							
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category *</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 01/18021 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 15 March 2001 (15.03.2001), see pages 1-6, 12-13, 26, 193-233, Figures 1-10 and sequence listing, especially SEQ ID NO:4 which is 99.1% identical over its full length to instant SEQ ID NO:2.</td> <td>1-73</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CHAPOVAL et al. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-g production. Nature Immunol. March 2001, Vol. 2, No. 3, pages 269-274, see entire document.</td> <td>1-73</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>Database GenBank, Accession Number AF302102. CHAPOVAL et al., (Bethesda, MD, USA), National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH, 03 March 2001, encodes instant SEQ ID NO:2 and 99.8% identical to instant SEQ ID NO:1 from nucleotide 135 to 1085.</td> <td>1-3 and 11</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Database GenBank, Accession No. AAK15438, (Bethesda, MD, USA) CHAPOVAL et al., National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH 03 March 2001, identical to instant SEQ ID NO:2.</td> <td>4-10 and 12-73</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td></td> <td>9, 13-14, 16-17, 73</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td></td> <td>1-8, 10-12, 15, 18-72</td> </tr> </tbody> </table>			Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 01/18021 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 15 March 2001 (15.03.2001), see pages 1-6, 12-13, 26, 193-233, Figures 1-10 and sequence listing, especially SEQ ID NO:4 which is 99.1% identical over its full length to instant SEQ ID NO:2.	1-73	X	CHAPOVAL et al. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-g production. Nature Immunol. March 2001, Vol. 2, No. 3, pages 269-274, see entire document.	1-73	X	Database GenBank, Accession Number AF302102. CHAPOVAL et al., (Bethesda, MD, USA), National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH, 03 March 2001, encodes instant SEQ ID NO:2 and 99.8% identical to instant SEQ ID NO:1 from nucleotide 135 to 1085.	1-3 and 11	Y	Database GenBank, Accession No. AAK15438, (Bethesda, MD, USA) CHAPOVAL et al., National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH 03 March 2001, identical to instant SEQ ID NO:2.	4-10 and 12-73	X		9, 13-14, 16-17, 73	Y		1-8, 10-12, 15, 18-72
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.																					
X	WO 01/18021 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.) 15 March 2001 (15.03.2001), see pages 1-6, 12-13, 26, 193-233, Figures 1-10 and sequence listing, especially SEQ ID NO:4 which is 99.1% identical over its full length to instant SEQ ID NO:2.	1-73																					
X	CHAPOVAL et al. B7-H3: A costimulatory molecule for T cell activation and IFN-g production. Nature Immunol. March 2001, Vol. 2, No. 3, pages 269-274, see entire document.	1-73																					
X	Database GenBank, Accession Number AF302102. CHAPOVAL et al., (Bethesda, MD, USA), National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH, 03 March 2001, encodes instant SEQ ID NO:2 and 99.8% identical to instant SEQ ID NO:1 from nucleotide 135 to 1085.	1-3 and 11																					
Y	Database GenBank, Accession No. AAK15438, (Bethesda, MD, USA) CHAPOVAL et al., National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, NIH 03 March 2001, identical to instant SEQ ID NO:2.	4-10 and 12-73																					
X		9, 13-14, 16-17, 73																					
Y		1-8, 10-12, 15, 18-72																					
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.																							
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family																							
Date of the actual completion of the international search 29 August 2002 (29.08.2002)		Date of mailing of the international search report 16 DEC 2002																					
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)505-3230		Authorized officer <i>R. Victoria Lawrence</i> for Jessica H. Roark Telephone No. (703) 308-0196																					

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/16740

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, MEDLINE, GenBank

search terms: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, B7-RP-2, B7-H3, Inventor's names

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 3/10	4 B 0 6 5
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 7/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/00	A 6 1 P 17/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 19/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 19/10	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 31/00	
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/42	C 0 7 K 16/42	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00 A	
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02 C	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/68 A	
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/15 Z	
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/50 Z	
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53 D	
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53 M	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 5/00 A	
	C 1 2 N 5/00 B	
	C 1 2 N 15/00 F	
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100124855

弁理士 坪倉 道明

(72)発明者 ヨシナガ, ステイーブン キヨシ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 6 0, サウザンド オークス, ケール サルト 1 8 9 6

(72)発明者 スー, ウーナーキューン

カナダ国 オンタリオ エム5エス 2ダブリュー9, トロント, アpartmentメント 5 0 4,

チャールズ ストリート ウェスト 55

(72)発明者 マーク, タック ワウ

カナダ国 オンタリオ エム5アール 1ジー5, トロント, エルギン アベニュー 25

Fターム(参考) 2G045 AA35 AA40 BA11 BB50 DA13 DA36 FB02 FB03

4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA05 CA06 CA07 CA09 CA12
DA02 DA06 EA02 EA04 FA02 FA10 GA03 GA11 HA03 HA08
HA12 HA14

4B029 AA07 AA21 AA23 BB20 CC02 FA12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ42 QQ53 QQ79 QR08 QR32 QR55
QR62 QR82 QS12 QS25 QS34 QX01 QX07

4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13

4B065 AA26X AA90X AA92X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 BA24
BD06 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA01 BA08 BA22 BA23 BA44 CA53

NA14 ZA011 ZA012 ZA511 ZA512 ZA681 ZA682 ZA891 ZA892 ZA961
ZA962 ZA971 ZA972 ZB071 ZB072 ZB111 ZB112 ZB151 ZB152 ZB261
ZB262 ZB311 ZB312 ZC351 ZC352

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 DA86 EA20

EA22 EA28 EA29 EA50 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	B7相关蛋白-2分子及其用途		
公开(公告)号	JP2004536591A	公开(公告)日	2004-12-09
申请号	JP2003500215	申请日	2002-05-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ヨシナガスティーブンキヨシ スーウーンキュン マークタックワウ		
发明人	ヨシナガ, スティーブン キヨシ スー, ウーン-キュン マーク, タック ワウ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/42 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/14 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/70532		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K45/00 A61K48/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P7/00 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/10 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/00 A61P35/00 A61P37/02 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/42 C07K16/46 C07K19/00 C12M1/00.A C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.A C12N5/00.B C12N15/00.F A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA35 2G045/AA40 2G045/BA11 2G045/BB50 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/FA10 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA03 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/AA23 4B029/BB20 4B029/CC02 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BA24 4B065/BD06 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/BA44 4C084/CA53 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA511 4C084/ZA512 4C084/ZA681 4C084/ZA682 4C084/ZA891 4C084/ZA892 4C084/ZA961 4C084/ZA962 4C084/ZA971 4C084/ZA972 4C084/ZB071 4C084/ZB072 4C084/ZB111 4C084/ZB112 4C084/ZB151 4C084/ZB152 4C084/ZB261 4C084/ZB262 4C084/ZB311 4C084/ZB312 4C084/ZC351 4C084/ZC352 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA28 4H045/EA29 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/293629 2001-05-25 US		

外部链接

Espacenet

摘要(译)

本发明提供了B7相关蛋白2 (B7RP-2) 多肽和编码该多肽的核酸分子。本发明还提供选择性结合剂，载体，宿主细胞和产生B7RP-2多肽的方法。 本发明进一步提供了用于诊断，治疗，改善和/或预防与B7RP-2多肽有关的疾病，病症和病状的药物组合物和方法。

元々の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg