

(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2004-527228

(P2004-527228A)

(43) 公表日 平成16年9月9日(2004.9.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 N 15/09</b>	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
<b>A 6 1 K 31/7088</b>	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
<b>A 6 1 K 31/711</b>	A 6 1 K 31/711	4 B O 6 3
<b>A 6 1 K 39/395</b>	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 4
<b>A 6 1 K 45/00</b>	A 6 1 K 39/395 U	4 B O 6 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 161 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2002-555242 (P2002-555242)	(71) 出願人	591063187 バイエル アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国 レーフエルクーゼン (番地なし) D-51368 Leverkusen, Germany
(86) (22) 出願日	平成14年1月4日 (2002.1.4)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月4日 (2003.7.4)	(74) 代理人	100103230 弁理士 高山 裕貢
(86) 国際出願番号	PCT/EP2002/000028	(74) 代理人	100087114 弁理士 齋藤 みの里
(87) 国際公開番号	W02002/053733	(72) 発明者	ジェフリー・エンシナス 奈良県奈良市あやめ池北3-17-15
(87) 国際公開日	平成14年7月11日 (2002.7.11)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	60/259, 632		
(32) 優先日	平成13年1月4日 (2001.1.4)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 ヒト B7-H2 タンパク質の調節

## (57) 【要約】

ヒト B7-H2 を調節する試薬およびヒト B7-H2 遺伝子産物に結合する試薬は、例えば気道アレルギー、食物アレルギー、喘息、およびアトピー性皮膚炎などのアレルギー疾患を含む機能障害または疾患の予防、改善または矯正、ならびに結核、ライ、リステリア症、およびサルモネラ症などの細胞内細菌感染症ならびに多発性硬化症、慢性関節炎、および I 型糖尿病などの自己免疫疾患の処置、ならびに蠕虫および細胞外微生物感染症の処置に役立つ。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

a) 配列番号3に示すアミノ酸配列と少なくとも約90%一致するアミノ酸配列、配列番号4に示すアミノ酸配列と少なくとも約90%一致するアミノ酸配列、配列番号3に示すアミノ酸配列、および配列番号4に示すアミノ酸配列、からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むB7-H2 Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
b) 配列番号1または配列番号2の配列を含むポリヌクレオチド、  
c) (a) および (b) に記載のポリヌクレオチドにストリンジェントな条件でハイブリダイズし、かつB7-H2 Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、  
d) 遺伝暗号の縮重のために、(a) ~ (c) に記載のポリヌクレオチド配列からは逸脱し、かつB7-H2 Vポリペプチドをコードしている配列を持つポリヌクレオチド、および  
e) (a) ~ (d) に記載のポリヌクレオチド配列の断片、誘導体または対立遺伝子変異体に相当し、かつB7-H2 Vポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド、からなる群より選択される単離されたポリヌクレオチド。

10

## 【請求項2】

請求項1に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

## 【請求項3】

請求項2に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

20

## 【請求項4】

請求項1に記載のポリヌクレオチドによってコードされる実質的に精製されたB7-H2 Vポリペプチド。

## 【請求項5】

a) 請求項3に記載の宿主細胞をB7-H2 Vポリペプチドの発現に適した条件で培養する工程、および  
b) 宿主細胞培養物からB7-H2 Vポリペプチドを回収する工程、を含む、B7-H2 Vポリペプチドの製造方法。  
方法。

30

## 【請求項6】

a) 生物学的試料の核酸物質に、請求項1に記載のポリヌクレオチドをハイブリダイズさせ、それによりハイブリダイゼーション複合体を形成させる工程、および  
b) 前記ハイブリダイゼーション複合体を検出する工程、を含み、前記複合体の存在が、前記生物学的試料におけるB7-H2をコードするポリヌクレオチドの存在と相関する、生物学的試料中のB7-H2 Vポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを検出する方法。

## 【請求項7】

ハイブリダイゼーションの前に、生物学的試料中の核酸物質を増幅させる、請求項6に記載の方法。

## 【請求項8】

請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のB7-H2 Vポリペプチドを検出する方法であって、生物学的試料を、B7-H2 Vポリペプチドのポリヌクレオチドと特異的に相互作用する試薬と接触させる工程を含む方法。

40

## 【請求項9】

請求項6 ~ 8のいずれか一項に記載の方法を実施するための診断キット。

## 【請求項10】

被験化合物を、請求項1に記載のポリヌクレオチドによってコードされるB7-H2 Vポリペプチドと接触させる工程、およびB7-H2 Vポリペプチドへの被験化合物の結合を検出する工程、を含み、前記ポリペプチドに結合する被験化合物を、B7-H2 Vの活性を低下させる可能性

50

のある治療物質であると同定する、B7-H2 Vの活性を低下させる物質に関するスクリーニングの方法。

【請求項11】

被験化合物を、請求項1に記載のポリヌクレオチドによってコードされるB7-H2 Vポリペプチドと接触させる工程、および前記ポリペプチドのB7-H2 V活性を検出する工程、を含み、B7-H2 V活性を増加させる被験化合物を、B7-H2 Vの活性を増加させる可能性のある治療物質であると同定し、前記ポリペプチドのB7-H2 V活性を低下させる被験化合物を、B7-H2 Vの活性を低下させる可能性のある治療物質であると同定する、B7-H2 Vの活性を調節する物質に関するスクリーニングの方法。

10

【請求項12】

被験化合物を、請求項1に記載のB7-H2 Vポリヌクレオチドと接触させる工程、および前記ポリヌクレオチドへの被験化合物の結合を検出する工程、を含み、前記ポリヌクレオチドに結合する被験化合物を、B7-H2 Vの活性を低下させる可能性のある治療物質であると同定する、B7-H2 Vの活性を低下させる物質に関するスクリーニングの方法。

【請求項13】

細胞を、請求項1に記載のポリヌクレオチドまたは請求項4に記載のポリペプチドに特異的に結合する試薬と接触させ、それによりB7-H2 Vの活性を低下させる工程を含む、B7-H2 Vの活性を低下させる方法。

20

【請求項14】

請求項10～12のいずれかに記載の方法によって同定される、B7-H2 Vポリペプチドまたはポリヌクレオチドの活性を調整する試薬。

【請求項15】

請求項14に記載の試薬と製薬的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項16】

疾患に際してB7-H2 Vの活性を調整するための医薬の製造における請求項14に記載の試薬の使用。

【請求項17】

疾患が感染性疾患、喘息、アレルギー性疾患、または炎症性疾患である請求項16に記載の使用。

30

【請求項18】

被験化合物を、配列番号3もしくは4に示すアミノ酸配列と少なくとも約90%一致するアミノ酸配列または請求項3もしくは4に示す配列を含むポリペプチドと接触させる工程、および前記ポリペプチドへの被験化合物の結合を検出する工程、を含み、前記ポリペプチドに結合する被験化合物を、B7-H2 Vタンパク質の活性を調節する可能性のある物質であると同定する、B7-H2 Vタンパク質の活性を調節することができる物質に関するスクリーニングの方法。

【請求項19】

接触させる工程が細胞内で行なわれる、請求項18に記載の方法。

40

【請求項20】

細胞がインビトロである、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

接触させる工程が無細胞系で行なわれる、請求項18に記載の方法。

【請求項22】

ポリペプチドが検出可能な標識を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項23】

被験化合物が検出可能な標識を含む、請求項18に記載の方法。

【請求項24】

50

被験化合物がポリペプチドに結合している標識リガンドを置換する、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 25】

ポリペプチドが固体支持体に結合している、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 26】

被験化合物が固体支持体に結合している、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 27】

被験化合物を、配列番号3もしくは4に示すアミノ酸配列と少なくとも約90%一致するアミノ酸配列または配列番号3もしくは4に示す配列を含むポリペプチドと接触させる工程、および

10

前記ポリペプチドの活性を検出する工程、

を含み、前記ポリペプチドの活性を増加させる被験化合物を、ヒトB7-H2 Vタンパク質の活性を増加させる可能性のある物質であると同定し、前記ポリペプチドの活性を低下させる被験化合物を、ヒトB7-H2 Vタンパク質の活性を低下させる可能性のある物質であると同定する、B7-H2 Vタンパク質の活性を調整する物質に関するスクリーニングの方法。

【請求項 28】

接触させる工程が細胞内で行なわれる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

細胞がインビトロである、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 30】

接触させる工程が無細胞系で行なわれる、請求項 27 に記載の方法。

20

【請求項 31】

被験化合物を、配列番号1または2に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触させる工程、および

前記産物への被験化合物の結合を検出する工程、

を含み、前記産物に結合する被験化合物を、ヒトB7-H2 Vタンパク質の活性を調節する可能性のある物質であると同定する、B7-H2 Vタンパク質の活性を調節する物質に関するスクリーニングの方法。

【請求項 32】

前記産物がポリペプチドである、請求項 31 に記載の方法。

30

【請求項 33】

前記産物がRNAである、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

細胞を、配列番号1または2に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物に特異的に結合する試薬と接触させ、それによりヒトB7-H2 Vタンパク質の活性を低下させる工程を含む、ヒトB7-H2 Vタンパク質の活性を低下させる方法。

【請求項 35】

前記産物がポリペプチドである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

該試薬が抗体である、請求項 35 に記載の方法。

40

【請求項 37】

該産物がRNAである、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

該試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

該試薬がリボザイムである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 40】

細胞がインビトロである、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 41】

細胞がインビボである、請求項 34 に記載の方法。

50

## 【請求項 4 2】

配列番号3または4に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドに特異的に結合する試薬と製薬的に許容される担体とを含む医薬組成物。

## 【請求項 4 3】

前記試薬が抗体である、請求項 4 2 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4 4】

配列番号1または2に示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドの産物に特異的に結合する試薬と製薬的に許容される担体とを含む医薬組成物。

## 【請求項 4 5】

前記試薬がリボザイムである、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 4 6】

前記試薬がアンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4 7】

前記試薬が抗体である、請求項 4 4 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 4 8】

感染性疾患、喘息、アレルギー疾患または炎症性疾患から選択されるB7-H2 V機能障害関連疾患を処置する方法であって、それを必要とする患者に、ヒトB7-H2 Vタンパク質の機能を調節する試薬の治療的有効量を投与し、それにより、前記B7-H2 V機能障害関連疾患の症状を改善させる工程を含む方法。

## 【請求項 4 9】

前記試薬が請求項 1 8 に記載の方法によって同定される、請求項 4 8 に記載の方法。

20

## 【請求項 5 0】

前記試薬が請求項 2 7 に記載の方法によって同定される、請求項 4 8 に記載の方法。

## 【請求項 5 1】

前記試薬が請求項 3 1 に記載の方法によって同定される、請求項 4 8 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明はヒトB7-H2のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列ならびにそれらの調節に関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

抗原提示細胞上に発現するB7ファミリーリガンドは、Tリンパ球上に発現するいくつかの受容体のカウンターリガンドである。B7ファミリーリガンドとそれらの受容体との共刺激相互作用は、T細胞の成長、分化および死に決定的な役割を果たしている。休止T細胞上に構成的に発現するT細胞共刺激因子CD28に、その天然リガンドB7-1およびB7-2が結合すると、CD4<sup>+</sup>T細胞の抗原特異的増殖が増加し、サイトカインの産生が亢進し、CD8+エフェクターT細胞の成熟が誘導され (Chambers CA, Allison JP. (1997) 「T細胞応答における共刺激 (Co-stimulation in T cell responses)」 *Curr Opin Immunol.*, 9, 396-404; Lenschow DJ, Bluestone JAら (1996) 「CD28/B7 T細胞共刺激系 (CD28/B7 system of T cell costimulation)」 *Annu Rev Immunol.* 14, 233-258; Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE (1993) 「腫瘍免疫のためのT細胞の共刺激 (Costimulation of T cells for tumor immunity)」 *Immunol Today.* 14, 483-486)、T細胞の生存率が向上する (Boise LH, Noel PJ, Thompson CB. 「CD28とアポトーシス (CD28 and apoptosis)」 (1995) *Curr Opin Immunol.*, 7, 620-625)。CTLA4と呼ばれるもう一つのリガンドはCD28と相同であるが、休止T細胞上には発現せず、T細胞活性化後に現れる (Brunet, J.F.ら., (1987) *Nature* 328, 267-270)。活性化T細胞におけるB7-1およびB7-2の相同CTLA-4受容体を介したシグナリングは、T細胞増殖、IL-2産生および細胞周期進行を阻害する負のシグナルを運搬すると考えられている (Krummel MF, Allison JP. (1996) 「CTLA-4結合は休止T細胞活性化時のIL-2蓄積および細胞周期進行を阻害する (CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and

40

50

cell cycle progression upon activation of resting T cells) 」 J Exp Med., 183, 2 533-2540 ; Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. (1996) 「CTLA-4リガンド結合はCD28 依存的T細胞活性化を遮断する (CTLA-4 ligation blocks CD28-dependent T cell activation) 」 J Exp Med. 183, 2541-2550) 。

【 0 0 0 3 】

したがって、B7:CD28/CTLA4経路を操作することにより、ヒトの免疫応答を刺激または抑制できるようになる可能性は大きい。

【 0 0 0 4 】

B7-CD28ファミリーの他の新しいメンバーも、細胞性および体液性免疫応答の調節に關与 10  
しうることが、最近の研究によって示されている。新しいメンバーの一つは、B7-H1 ( B7  
相同体1) およびB7-H2 ( B7相同体2) と名付けられたB7様遺伝子である。B7-H2は、B7-1お  
よびB7-2受容体CD28およびCTLA-4 ( CD152) の相同体である誘導性共刺激因子 ( ICOS) を  
結合する。

【 0 0 0 5 】

B7-H2遺伝子の転写物は、ヒト ( Homo sapiens) 成体男性脳に由来するcDNAクローンとし  
て、かずさDNA研究所によって初めて記載された ( 参考文献1) 。しかし最近になって、B7  
-H2と共刺激分子B7-1 ( CD80) およびB7-2 ( CD86) との相同性から、B7-H2は、B7-1および  
B7-2受容体CD28およびCTLA-4 ( CD152) の相同体であるICOSのリガンドであることがわか  
った。

【 0 0 0 6 】

ICOSは、T細胞受容体刺激後にCD4+およびCD8<sup>+</sup>T細胞での発現がアップレギュレート ( 上方  
調節) される共刺激受容体である ( 参考文献8 ~ 10) 。ICOSの刺激は、IL-10サイトカイン  
産生を誘導すると共に、IL-10ほどではないが、IL-4、IL-5、IFN-<sub>γ</sub>、TNF-<sub>α</sub>、およびGM-  
CSFの産生も増加させ、また活性化Th2ヘルパー細胞の機能を増進すると考えられている ( 参  
考文献9、10) 。ICOS遺伝子は主に一次リンパ組織および二次リンパ組織に発現すると  
報告されている ( 参考文献3) 。

【 0 0 0 7 】

当技術分野では、治療選択肢となりうる、調節可能なB7-H2タンパク質の新規変異体を同  
定することが必要とされている。

【 0 0 0 8 】

( 発明の概要 )

本発明の目的は、B7-H2スプライシング変異体 ( B7-H2 V) の新規ポリペプチドをコードす  
る新規ポリヌクレオチド、または生物学的に活性なその誘導体を提供することである。本  
発明のポリヌクレオチドは、配列番号1に記載の配列、配列番号1に記載の配列にストリン  
ジエントな条件でハイブリダイズするポリヌクレオチド配列、配列番号2に記載の配列、  
および配列番号2に記載の配列にストリンジエントな条件でハイブリダイズするポリヌク  
レオチド配列からなる群より選択されるポリヌクレオチド配列を持つ。

【 0 0 0 9 】

本発明のポリペプチドは、配列番号3に記載のアミノ酸配列、1~数個のアミノ酸残基の置  
換、欠失、付加または転位が配列番号3中で起こっているアミノ酸配列、配列番号4に記  
載の配列、1~数個のアミノ酸残基の置換、欠失、付加または転位が配列番号4中で起こっ  
ているアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 0 】

また、ヒトB7-H2を調節する方法および試薬を提供することも、本発明の目的である。本  
発明のこの目的および他の目的は、以下に説明する態様の一つまたは複数によって達成さ  
れる。

【 0 0 1 1 】

本発明の一態様は、ヒトB7-H2の活性を調節することができる物質に関するスクリーニン  
グの方法である。被験化合物を、配列番号3または4に示すアミノ酸配列と少なくとも約90  
%一致するアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる。前記ポリペプチドへの被験化 50

化合物の結合を検出する。その結果、前記ポリペプチドに結合する被験化合物を、ヒトB7-H2の活性を調節する可能性のある治療物質であると同定する。

【0012】

本発明のもう一つの態様は、ヒトB7-H2の活性を調節する物質に関するスクリーニングの方法である。被験化合物を、配列番号3または4に示すアミノ酸配列と少なくとも約90%一致するアミノ酸配列を含むポリペプチドと接触させる。前記ポリペプチドのB7-H2様活性を検出する。その結果、B7-H2様活性を低下させる被験化合物を、ヒトB7-H2の活性を低下させる可能性のある治療物質であると同定する。またその結果、B7-H2様活性を増加させる被験化合物を、ヒトB7-H2の活性を増加させる可能性のある治療物質であると同定する。

10

【0013】

本発明のさらにもう一つの態様は、ヒトB7-H2の活性を調節する物質に関するスクリーニングの方法である。被験化合物を、配列番号1または2に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%一致するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物と接触させる。前記産物への被験化合物の結合を検出する。その結果、前記産物に結合する被験化合物を、ヒトB7-H2の活性を調節する可能性のある治療物質であると同定する。

【0014】

本発明のさらにもう一つの態様は、ヒトB7-H2の活性を低下させる方法である。細胞を、配列番号1または2に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%一致するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物に特異的に結合する試薬と接触させる。その結果、ヒトB7-H2の活性が低下する。

20

【0015】

本発明のもう一つの態様は、配列番号1または2に示すヌクレオチド配列と少なくとも90%一致するヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドによってコードされる産物に特異的に結合する試薬と、製薬的に許容される担体とを含む医薬組成物である。

【0016】

本発明のもう一つの態様は、配列番号3または4に示すアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする発現コンストラクトと、製薬的に許容される担体とを含む医薬組成物である。

【0017】

本発明のさらにもう一つの態様は、本質的に配列番号1または2に示すヌクレオチド配列からなる単離精製されたポリヌクレオチドである。

30

【0018】

本発明のさらにもう一つの態様は、本質的に配列番号3または4に示すアミノ酸配列からなる単離精製されたポリペプチドである。

【0019】

本発明のさらにもう一つの態様は、本質的に配列番号3または4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドに特異的に結合する抗体の調製物である。

【0020】

本発明のさらにもう一つの態様は、本質的に配列番号3または4に示すアミノ酸配列からなるポリペプチドの製造方法である。前記ポリペプチドをコードする発現コンストラクトを含む宿主細胞を、前記ポリペプチドが発現される条件で培養する。前記ポリペプチドを単離する。

40

【0021】

したがって本発明は、例えば受容体複合体形成の促進剤または阻害剤などとして作用する被験化合物を同定するために使用することができるヒトB7-H2を提供する。ヒトB7-H2およびその断片は、このタンパク質を遮断してその活性を効果的に低下させることができる特異的抗体を産生させる際にも有用である。

【0022】

(詳細な説明)

転写物1または転写物2によってコードされる新規ヒトB7-H2タンパク質(それぞれ配列番

50

号3および配列番号4)は、本発明によって発見されたタンパク質である。

【0023】

転写物1の配列は912bp長のコード領域を持ち、この遺伝子に関して報告されたKIAA0653 mRNA配列 (GenBankアクセッション番号AB014553) の1027番目の塩基から1662番目の塩基までの636bpが欠失している。

【0024】

転写物2の配列は1419bp長のコード領域を持ち、KIAA0653配列の1452番目の塩基から1580番目の塩基までの129bpが欠失している。

【0025】

また、転写物1または2と元のKIAA0653との間には、欠失領域以外にも、ヌクレオチド配列の相違がいくつか認められる。 10

【0026】

転写物1クローン (B7-H2 V1) を翻訳すると304残基長のアミノ酸配列が得られる。転写物2クローンを翻訳すると473残基長のアミノ酸配列が得られる。

【0027】

本発明者らは、B7-H2発現が胸腺および脾臓などのリンパ組織で強いことを見いだしただけでなく、肺および胃腸組織にも高レベルな発現を認めた。このことから、ICOSは粘膜組織における局所免疫応答に参与する可能性が示唆される。

【0028】

ICOSの発現が限定的であるのに対して、B7-H2は試験した全ての組織で広く発現し、肝臓、腎臓、心臓、および脳に最も強く発現することがわかった。対応するICOS受容体と比較して発現範囲が広いことは、調節免疫応答にB7-H2が全身で果たしている役割と辻褄があっている。B7-H2はほとんどの組織に発現することで、ICOSを発現させる活性化T細胞を刺激して、免疫応答をTh2表現型側に引き戻すサイトカインを産生させることにより、Th1表現型への免疫応答の過剰な偏向を広く防止する。それと同時に、B7-H2自体は、B7-H2を発現させる細胞にシグナルを返すことによって、活性化T細胞が近くにあることをその細胞に示す。 20

【0029】

B7-H2のこれら2つの新しい変異体は、公表されたB7-H2配列とは、主に細胞質ドメインが異なっている。28残基の細胞質テールを持つB7-H2 V1は、短い33残基および26残基の細胞質テールを持つGL-50およびB7-H2のアミノ酸配列に最もよく似ている。これに対してB7-H2 V2は、KIAA0653の細胞質テールにより近い長さの197残基の細胞質テールを持つが、KIAA0653中でタンデムに反復している43アミノ酸配列が欠けている。細胞質テールの相違は、B7-H2分子を発現させる細胞内部へのシグナル伝達に大きな影響を持つ可能性がある。例えば、長いテールはTh2促進性サイトカイン類の産生を誘導し (参考文献11)、その結果として、T細胞におけるICOS誘発性の効果を増幅しうるが、短いテールはそれ自体ではそのようなシグナリング機能を持たず、その代わりに、二次シグナリング分子または他の分子と相互作用しうる。 30

【0030】

B7-H2の様々な形態間でのシグナリングの相違は、病原体に対する免疫応答および発病に、重大な影響を持つと予想することができる。身体が自らを様々な病原体から防御するには、様々なタイプの免疫応答が必要である。一部の病原体、例えば細胞内細菌などの場合は、感染を抑制するのに主としてTh1タイプの応答が必要であり、一方、他の病原体、例えば細胞外環境に存在する蠕虫または微生物などの場合は、Th2タイプの応答が必要である。免疫応答が不適切に偏向すると感染に対する防御が不十分になる可能性があり、一方、応答が無規制に過剰偏向すると有害な続発症が起こりうる。細胞内細菌感染の場合は、対抗調節性サイトカインIL-10が感染後迅速に分泌されて、Th1応答を抑制する (参考文献12)。そのような応答は、B7-H2を発現させる細胞内にシグナルを伝達するのも、T細胞上のICOSを刺激するのも、B7-H2に頼っているのだろう。同様に、Th2応答が適切な場合には、B7-H2を介したシグナリングおよびICOSの刺激による応答の増幅が、病原体に対する十 40 50

分な防御にとって必要だろう。一方、自己免疫疾患およびアレルギー疾患では、免疫応答の無規制な活性化が組織破壊、苦痛、そして時には生命にかかわる合併症を引き起こす。Th1免疫応答に続いて起こるB7-H2発現のアップレギュレーションおよびTh2免疫応答に続いて起こるB7-H2発現のダウンレギュレーションは、正常な免疫応答後の自己免疫およびアレルギーを避けるために身体が利用することのできる方法であると考えられる。B7-H2の様々なスプライシング変異体の発現も、様々な細胞が状況に合わせて異なる応答をすることを可能にしていると考えられる。したがって、発現させるB7-H2変異体の種類および発現レベルに関する細胞の決定は、適切な免疫応答の発達と制御にとって、極めて重要だろう。

#### 【0031】

B7-H2 V1およびB7-H2 V2の機能の遮断ならびにそのための阻害剤は、Th2応答のダウンレギュレーションおよびTh1応答への再偏向が有益であるだろうアレルギー疾患、例えば気道アレルギー、食物アレルギー、喘息、およびアトピー性皮膚炎などの処置、ならびに細胞内細菌感染症、例えば結核、ライ、リステリア症、およびサルモネラ症などの処置に有用である。B7-H2 V1およびB7-H2 V2の機能の増進ならびにそのための分子は、Th2応答への再偏向が有益な自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節炎、およびI型糖尿病などの処置、ならびに蠕虫および細胞外微生物感染症の処置に有用である。

10

#### 【0032】

##### ポリペプチド

本発明のヒトB7-H2ポリペプチドは、配列番号3に示すアミノ酸配列または以下に定義する生物学的に活性なその変異体から選択される少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300または304個の連続するアミノ酸を含む。あるいは、本発明のヒトB7-H2ポリペプチドは、配列番号4に示すアミノ酸配列または以下に定義する生物学的に活性なその変異体から選択される少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、または473個の連続するアミノ酸を含む。したがって、本発明のヒトB7-H2ポリペプチドは、ヒトB7-H2の一部、完全長のヒトB7-H2、またはヒトB7-H2の全部または一部を含む融合タンパク質であることができる。

20

#### 【0033】

##### B7-H2 Vの生物学的に活性な変異体

例えばICOS結合活性などを保持している生物学的に活性なヒトB7-H2 Vポリペプチド変異体もヒトB7-H2 Vポリペプチドである。好ましくは、天然または非天然のヒトB7-H2ポリペプチド変異体は、配列番号3もしくは配列番号4に示すアミノ酸配列またはその断片と少なくとも約31、35、40、45、50、55、60、65、または70、好ましくは約75、80、85、90、96、96、または98%一致するアミノ酸配列を持つ。推定上のヒトB7-H2ポリペプチド変異体と配列番号3または4のアミノ酸配列との一致率は通常の方法によって決定される。例えば、Altschulら、Bull. Math. Bio. 48:603 (1986)、ならびにHenikoffおよびHenikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992)を参照されたい。簡単に述べると、ギャップ開始ペナルティ10、ギャップ伸長ペナルティ1、ならびにHenikoffおよびHenikoff (同文献)の「BLOSUM62」スコア行列を使って、アラインメントスコアが最適になるように、2つのアミノ酸配列を整列させる。2つのアミノ酸配列を整列させるために利用することができる確立されたアルゴリズムが数多く存在することは、当業者には理解されるだろう。PearsonおよびLipmanの「FASTA」類似度検索アルゴリズムは、本明細書に開示するアミノ酸配列と推定上の変異体のアミノ酸配列との一致レベルを調べるのに適したタンパク質アラインメント法である。FASTAアルゴリズムは、PearsonおよびLipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988)、およびPearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)に記載されている。簡単に述べると、FASTAではまず、保存的なアミノ酸置換、アミノ酸挿入またはアミノ酸欠失を考慮せずに、問い合わせ配列(例えば配列番号2)と被験配列とが共有している一致残基の密度(k<sub>tup</sub>変数が1の場合)または一致残基ペアの密度(k<sub>tup</sub>=2の場合)が最も高い領域を同定することによって、配列類似度を特徴づける。次に、アミノ酸置

30

40

50

換行列を使って全てのアミノ酸対の類似度を比較することにより、一致密度が最も高い10領域のスコアを再計算し、最も高いスコアに寄与する残基だけが含まれるように各領域の末端を「切り整える(trim)」。(配列の長さおよびktup値に基づいて所定の式によって計算される)「カットオフ(cutoff)」値よりも大きいスコアを持つ領域が数個ある場合は、切り整えた初期領域を調べて、それらの領域を結合してギャップ付の近似アラインメントを形成させることができるかどうかを決定する。最後に、アミノ酸の挿入および欠失を考慮するNeedleman-Wunsch-Sellersアルゴリズムの変法(NeedlemanおよびWunsch, J. Mol. Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974))を使って、2つのアミノ酸配列の最もスコアの高い領域を整列させる。FASTA解析の好ましいパラメータは、ktup=1、ギャップ開始ペナルティ=10、ギャップ伸長ペナルティ=1、および置換マトリックス=BLOSUM62である。これらのパラメータは、Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990)の付録(Appendix)2で説明されているように、スコア行列ファイル(「SMATRIX」)を変更することによって、FASTAプログラムに導入することができる。FASTAは、上述の比を使って核酸分子の配列一致度を決定するためにも使用することができる。ヌクレオチド配列を比較する場合、ktup値は1~6、好ましくは3~6、最も好ましくは3の値を取ることができ、他のパラメータはデフォルトどおりに設定する。

10

20

30

40

50

#### 【0034】

一致率の変動は、例えばアミノ酸の置換、挿入または欠失などの理由で起こりうる。アミノ酸置換は1対1のアミノ酸の置き換えであると定義される。置換されたアミノ酸が類似する構造的および/または化学的性質を持つ場合、その置換は保存的である。保存的置換の例は、イソロイシンまたはバリンによるロイシンの置換、グルタミン酸によるアスパラギン酸の置換、またはセリンによるスレオニンの置換である。

#### 【0035】

アミノ酸の挿入または欠失は、アミノ酸配列に加えられる変化またはアミノ酸配列内での変化である。これらは典型的には約1~5アミノ酸の範囲で起こる。ヒトB7-H2ポリペプチドの生物学的または免疫学的活性を消失させずに、どのアミノ酸残基を置換し、挿入し、または欠失させることができるかを決定する際の指針は、当技術分野では周知のコンピュータプログラム、例えばDNASTARソフトウェアなどを使って見出すことができる。あるアミノ酸変化が生物学的に活性なヒトB7-H2ポリペプチドをもたらすかどうかは、例えばCarpenterら, PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A. 95, 13630-34 (1998)などに記載されているようにShh結合活性を測定することによって、容易に決定することができる。

#### 【0036】

##### 融合タンパク質

融合タンパク質は、ヒトB7-H2ポリペプチドアミノ酸配列に対する抗体を産生させるのに役立つ、また様々な測定系にも役立つ。例えば、融合タンパク質は、ヒトB7-H2ポリペプチドの一部と相互作用するタンパク質の同定に使用することができる。この目的には、タンパク質アフィニティークロマトグラフィーまたはタンパク質-タンパク質相互作用に関するライブラリーに基づく測定法、例えば酵母ツーハイブリッドシステムまたはフェージディスプレイシステムを使用することができる。そのような方法は当技術分野では周知であり、薬物スクリーンとして使用することもできる。

#### 【0037】

ヒトB7-H2ポリペプチド融合タンパク質は、ペプチド結合を使って一つに融合された二つのポリペプチドセグメントを含んでいる。第一ポリペプチドセグメントは、配列番号3または上述したような生物学的に活性な変異体の少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300または304個の連続アミノ酸を含む。あるいは、第一ポリペプチドセグメントは、配列番号4または上述したような生物学的に活性な変異体の少なくとも6、10、15、20、25、50、75、100、125、150、175、200、225、250、275、300、325、350、375、400、425、450、または473個の連続アミノ酸を含む。第一ポリペプチドセグメントは完全長ヒトB7-H2 V2を含むこともできる。

#### 【0038】

第二ポリペプチドセグメントは完全長タンパク質またはタンパク質断片であることができる。融合タンパク質の構築によく使用されるタンパク質には、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -グルクロニダーゼ、緑色蛍光タンパク質 (GFP)、自己蛍光タンパク質 (青色蛍光タンパク質 (BFP) を含む)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、ルシフェラーゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP)、およびクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT) などがある。さらに、融合タンパク質構築物には、ヒスチジン (His) タグ、FLAGタグ、インフルエンザヘマグルチニン (HA) タグ、Mycタグ、VSV-Gタグ、およびチオレドキシニン (Trx) タグなどのエピトープタグが使用される。他の融合構築物は、マルチース結合タンパク質 (MBP)、S-タグ、Lex a DNA結合ドメイン (DBD) 融合物、GAL4 DNA結合ドメイン融合物、および単純ヘルペスウイルス (HSV) BP16タンパク質融合物を含むことができる。また、ヒトB7-H2ポリペプチドを異種部分から切り離して精製することができるように、ヒトB7-H2ポリペプチドコード配列と異種タンパク質配列との間に切断部位を含む融合タンパク質を設計することもできる。

10

20

30

40

50

#### 【0039】

融合タンパク質は当技術分野では知られているように化学的に合成することができる。融合タンパク質は、好ましくは、二つのポリペプチドセグメントを共有結合的に連結することによって、または分子生物学分野の標準的手法によって製造される。例えば、当技術分野では知られているように、配列番号1または2の相補鎖から選択されるコード配列を、第二ポリペプチドセグメントをコードしているヌクレオチドと共に、適切な読み枠で含むDNAコンストラクトを作製し、そのDNAコンストラクトを宿主細胞内で発現させることなどにより、組換えDNA法を使って、融合タンパク質を製造することができる。数多くの融合タンパク質構築用キットを、例えばPromega Corporation (ウィスコンシン州マディソン)、Stratagene (カリフォルニア州ラホーヤ)、CLONTECH (カリフォルニア州マウンテンビュー)、Santa Cruz Biotechnology (カリフォルニア州サンタクルーズ)、MBL International Corporation (MIC; マサチューセッツ州ウオータータウン)、およびQuantum Biotechnologies (カナダ・モントリオール; 1-888-DNA-KITS) などの企業から入手することができる。

#### 【0040】

##### 種相同体の同定

当技術分野では知られているように、ヒトB7-H2ポリヌクレオチド (後述) を使って他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングするのに適したプローブまたはプライマーを作製し、ヒトB7-H2ポリペプチドの相同体をコードしているcDNAを同定し、そのcDNAを発現させることにより、ヒトB7-H2ポリペプチドの種相同体を得ることができる。

#### 【0041】

##### ポリヌクレオチド

ヒトB7-H2ポリヌクレオチドは一本鎖または二本鎖であることができ、ヒトB7-H2ポリペプチドのコード配列またはその相補鎖を含む。ヒトB7-H2のコード配列を配列番号1または2に示す。

#### 【0042】

ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする縮重ヌクレオチド配列、ならびに配列番号1もしくは2に示すヌクレオチド配列またはそれらの相補鎖と少なくとも約50、55、60、65、70、好ましくは約75、90、96、または98%一致する相同なヌクレオチド配列も、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドである。二つのポリヌクレオチドの配列間の配列一致率は、例えばFASTAアルゴリズムを利用するALIGNなどのコンピュータプログラムを使用し、ギャップ開始ペナルティが-12およびギャップ伸長ペナルティが-2のアフィンギャップ検索を使って決定される。生物学的に活性なヒトB7-H2ポリペプチドをコードするヒトB7-H2ポリヌクレオチドの相補DNA (cDNA) 分子、種相同体、および変異体も、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドである。配列番号1もしくは2またはそれらの相補鎖の8、10、12、15、20、または25個の連続ヌクレオチドを含む断片も、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドである。そのようなポリヌクレオ

チドは、例えばアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはハイブリダイゼーションプローブなどとして使用することができる。

#### 【0043】

##### ポリヌクレオチド変異体および相同体の同定

上記のヒトB7-H2ポリヌクレオチドの変異体および相同体も、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドである。通例、相同なヒトB7-H2ポリヌクレオチド配列は、当技術分野では知られているように、ストリンジентな条件下で候補ポリヌクレオチドを既知のヒトB7-H2ポリヌクレオチドにハイブリダイズさせることによって、同定することができる。例えば、 $2\times$  SSC (0.3M NaCl, 0.03Mクエン酸ナトリウム, pH7.0) / 0.1% SDS、室温で各30分間を2回、次に $2\times$  SSC / 0.1% SDS、50 で30分間を1回、次に $2\times$  SSC、室温で各10分間を2回という洗浄条件を使って、最大約25~30%の塩基対ミスマッチを含む相同配列を同定することができる。より好ましくは、相同な核酸鎖は15~25%の塩基対ミスマッチを含み、さらに好ましくは5~15%の塩基対ミスマッチを含む。

10

#### 【0044】

本明細書に開示するヒトB7-H2ポリヌクレオチドの種相同体も、適切なプローブまたはプライマーを作製し、他の種、例えばマウス、サル、または酵母由来のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、同定することができる。ヒトB7-H2ポリヌクレオチドのヒト変異体は、例えばヒトcDNA発現ライブラリーをスクリーニングすることによって、同定することができる。二本鎖DNAの $T_m$ は、相同性が1%低下する毎に1~1.5 低下することが、よく知られている (Bonnerら, *J. Mol. Biol.* 81, 123(1973))。したがって、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドの変異体または他の種のヒトB7-H2ポリヌクレオチドは、推定上の相同ヒトB7-H2ポリヌクレオチドを、配列番号1または2のヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドまたはその相補鎖とハイブリダイズさせて、被験ハイブリッドを形成させることによって、同定することができる。被験ハイブリッドの融解温度を、完全に相補的なヌクレオチド配列を持つポリヌクレオチドを含むハイブリッドの融解温度と比較して、被験ハイブリッド中の塩基対ミスマッチの数またはパーセンテージを算出する。

20

#### 【0045】

ストリンジентなハイブリダイゼーション条件および/または洗浄条件でヒトB7-H2ポリヌクレオチドまたはその相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列も、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドである。ストリンジентな洗浄条件は当技術分野では周知であって、よく理解されており、例えばSambrookら「MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL」第2版(1989)の9.50~9.51頁などに記載されている。

30

#### 【0046】

通例、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件には、検討中のハイブリッドの計算 $T_m$ 値より約12~20 低い温度と塩濃度の組み合わせを選択すべきである。配列番号1または2に示すヌクレオチド配列を持つヒトB7-H2ポリヌクレオチドまたはその相補鎖と、それらのヌクレオチド配列の1つと少なくとも約50、好ましくは約75、90、96、または98%一致するポリヌクレオチド配列とのハイブリッドの $T_m$ は、例えばBoltonおよびMcCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390(1962)の等式:

$$T_m = 81.5 - 16.6(\log_{10} [Na^+]) + 0.41(\%G+C) - 0.63(\%ホルムアミド) - 600/l$$

40

[式中、 $l$  = 塩基対数で表したハイブリッドの長さ]

などを使って、計算することができる。ストリンジентな洗浄条件としては、例えば、65 で $4\times$  SSC、または42 で50%ホルムアミド/ $4\times$  SSC、または65 で $0.5\times$  SSC / 0.1% SDSなどが挙げられる。高度にストリンジентな洗浄条件としては、例えば65 で $0.2\times$  SSCなどが挙げられる。

#### 【0047】

##### ポリヌクレオチドの調製

他の細胞成分、例えば膜成分、タンパク質、および脂質などを含まないヒトB7-H2ポリヌクレオチドを単離することができる。ポリヌクレオチドは、細胞に産生させて標準的な核酸精製技術によって単離するか、またはポリメラーゼ連鎖反応(PCR)などの増幅技術を

50

使って、もしくは自動合成装置を使って、合成することができる。ポリヌクレオチドを単離する方法は当技術分野では常用され、よく知られている。単離されたヒトB7-H2ポリヌクレオチドを取得するには、そのようなポリヌクレオチド取得技術をどれでも使用することができる。例えば、制限酵素およびプローブを使って、ヒトB7-H2様ヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド断片を単離することができる。単離したポリヌクレオチドは、他の分子を含まないかまたは少なくとも70、80もしくは90%含まない調製物の形をとる。

【0048】

ヒトB7-H2 cDNA分子は、ヒトB7-H2 mRNAをテンプレートにして、標準的な分子生物学技術を使って製造することができる。製造されたヒトB7-H2 cDNA分子は、Sambrookら(1989)などの手引書に記載されている当技術分野公知の分子生物学技術を使って複製することができる。PCRなどの増幅技術を使用することにより、ヒトゲノムDNAまたはcDNAをテンプレートとして、本発明のポリヌクレオチドのさらなるコピーを得ることができる。

10

【0049】

あるいは、合成化学技術を使ってヒトB7-H2ポリヌクレオチドを合成することもできる。遺伝暗号は縮重しているので、例えば配列番号1もしくは2に示すアミノ酸配列を持つB7-H2ポリペプチドまたはその生物学的に活性な変異体をコードする別のヌクレオチド配列を合成することができる。

【0050】

#### ポリヌクレオチドの伸長

PCRに基づく様々な方法を使って、本明細書に開示する核酸配列を伸長することにより、プロモーターおよび調節要素などの上流配列を検出することができる。例えば制限部位PCRでは、ユニバーサルプライマーを使って、既知の遺伝子座に隣接する未知の配列を取得する(Sarkar, PCR Methods Applic.2, 318-322, 1993)。まず、リンカー配列に対するプライマーと、既知領域に特異的なプライマーとの存在下で、ゲノムDNAを増幅する。次に、増幅された配列を、同じリンカープライマーと、最初の特異的プライマーの内部に位置する別の特異的プライマーとを使って、二回目のPCRにかける。各回のPCR産物を適当なRNAポリメラーゼで転写し、逆転写酵素を使って配列決定する。

20

【0051】

逆PCRを使用し、既知領域に基づく分岐プライマー(divergent primer)を使って、配列を増幅または伸長することもできる(Trigliaら, Nucleic Acids Res.16, 8186, 1988)。プライマーは、OLIGO 4.06プライマー解析ソフトウェア(National Biosciences Inc., ミネソタ州プリマス)などの市販ソフトウェアを使って、22~30ヌクレオチドの長さを持ち、GC含量が50%以上であり、約68~72の温度で標的配列にアニールするように設計することができる。この方法では、いくつかの制限酵素を使って、遺伝子の既知領域中に適当な断片を作製する。次に、その断片を分子内ライゲーションによって環化し、PCRテンプレートとして使用する。

30

【0052】

使用することができるもう一つの方法は、ヒトおよび酵母人工染色体DNA中の既知配列に隣接するDNA断片をPCR増幅する捕捉(capture)PCRである(Lagerstromら, PCR Methods Applic.1, 111-119, 1991)。この方法では、設計された二本鎖配列を、複数の制限酵素消化およびライゲーションを使用して、当該DNA分子の未知断片中に入れてから、PCRを実施することもできる。

40

【0053】

未知の配列を取得するために使用することができるもう一つの方法は、Parkerら, Nucleic Acids Res.19, 3055-3060, 1991の方法である。さらに、PCR、入れ子プライマー、およびPROMOTERFINDERライブラリー(CLONTECH, カリフォルニア州パロアルト)を使って、ゲノムDNAウォーキングを行なうこともできる(CLONTECH, カリフォルニア州パロアルト)。この方法ではライブラリーをスクリーニングする必要がなく、イントロン/エクソン接合部の発見に有用である。

【0054】

50

完全長cDNAに関してスクリーニングする場合には、より大きなcDNAを含むようにサイズ選択したライブラリーを使用することが望ましい。ランダムプライムド (randomly primed) ライブラリーは、遺伝子の5'領域を含む配列がより多く含まれることになる点で好ましい。オリゴd(T)ライブラリーでは完全長cDNAが得られない場合、ランダムプライムドライブラリーの使用は特に好ましいだろう。ゲノムライブラリーは配列を5'非転写調節領域中まで伸長させるのに役立つ。

#### 【0055】

市販されているキャピラリー電気泳動システムを使って、PCR産物または配列決定反応産物のサイズを分析し、またはそのヌクレオチド配列を確認することができる。例えば、キャピラリー配列決定法には、電気泳動分離用の流動性ポリマー、レーザーで励起される4種類 10  
の蛍光色素 (各ヌクレオチドにつき1種類)、および電荷結合素子カメラによる放射波長の検出を利用することができる。出力/光強度は適当なソフトウェア (例えばGENOTYP  
ERおよびSequence NAVIGATOR、Perkin Elmer) を使って電気信号に変換することができ、試料のローディングからコンピュータ分析および電子的データ表示に至る全プロセスを、コンピュータで管理することができる。キャピラリー電気泳動は、ある試料中に限られた量だけ存在する可能性のあるDNAの小片を配列決定するのに特に好ましい。

#### 【0056】

##### ポリペプチドの取得

ヒトB7-H2ポリペプチドは、例えばヒト細胞からの精製によって、またはヒトB7-H2ポリヌクレオチドの発現によって、または直接的な化学合成によって得ることができる。 20

#### 【0057】

##### タンパク質精製

ヒトB7-H2ポリペプチドは、例えばヒトB7-H2発現コンストラクトがトランスフェクトされている宿主細胞など、この分子を発現させる任意の細胞から精製することができる。精製ヒトB7-H2ポリペプチドは、細胞中でヒトB7-H2ポリペプチドに通常付随している他の化合物、例えばある種のタンパク質、糖質または脂質などから、当技術分野で周知の方法を使って分離される。そのような方法には、例えばサイズ排除クロマトグラフィー、硫酸アンモニウム分画、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、および分取用ゲル電気泳動などがあるが、これらに限るわけではない。精製ヒトB7-H2ポリペプチドの調製物は少なくとも80%純粋であり、好ましくは90%、95%、または99%純粋 30  
である。調製物の純度は、例えばSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動など、当技術分野で知られている任意の手段によって評価することができる。

#### 【0058】

##### ポリヌクレオチドの発現

ヒトB7-H2ポリヌクレオチドを発現させるために、挿入されたコード配列の転写と発現に必要な要素を含む発現ベクター中に、前記ポリヌクレオチドを挿入することができる。当業者には周知の方法を使って、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列と適当な転写および翻訳制御要素とを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法にはインビトロ組換えDNA技術、合成技術、およびインビボ遺伝子組換えが含まれる。そのような技術は、例えばSambrookら (1989) およびAusubelら「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR 40  
BIOLOGY」(John Wiley & Sons, ニューヨーク州ニューヨーク, 1989)などに記載されている。

#### 【0059】

様々な発現ベクター/宿主系を利用して、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列を組み込み、それを発現させることができる。これらには、微生物、例えば組換えバクテリオファージ、プラスミド、またはコスミドDNA発現ベクターで形質転換された細菌、酵母発現ベクターで形質転換された酵母、ウイルス発現ベクター (例えばバキュロウイルス) に感染させた昆虫細胞系、ウイルス発現ベクター (例えばカリフラワーモザイクウイルス (CaMV)、タバコモザイクウイルス (TMV)) もしくは細菌発現ベクター (例えばTiまたはpBR32 2プラスミド) で形質転換された植物細胞系、または動物細胞系などが含まれるが、これ 50

らに限るわけではない。

【0060】

制御要素または調節配列は、宿主細胞タンパク質と相互作用して転写および翻訳を実行するベクターの非翻訳領域（エンハンサー、プロモーター、5'および3'非翻訳領域）である。そのような要素は様々な強さおよび特異性を持ちうる。利用するベクター系および宿主に応じて、構成的プロモーターおよび誘導性プロモーターを包む数多くの好適な転写および翻訳要素を使用することができる。例えば、細菌系でクローニングを行う場合は、誘導的プロモーター、例えばBLUESCRIPTファージミド（Stratagene, カリフォルニア州ラホーヤ）またはpSPORT1プラスミド（Life Technologies）などのハイブリッドlacZプロモーターを使用することができる。バキュロウイルスのポリヘドリンプロモーターは昆虫細胞に使用することができる。植物細胞のゲノムに由来するプロモーターもしくはエンハンサー（例えば熱ショック、RUBISCO、および貯蔵タンパク質遺伝子）、または植物ウイルスに由来するプロモーターもしくはエンハンサー（例えばウイルスプロモーターまたはリーダー配列）を、ベクター中にクローニングすることができる。哺乳動物細胞系では、哺乳動物遺伝子由来のプロモーターまたは哺乳動物ウイルス由来のプロモーターが好ましい。ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を複数コピー含む細胞系を作出する必要がある場合は、SV40またはEBVに基づくベクターを適当な選択マーカーと共に使用することができる。

【0061】

細菌および酵母発現系

細菌系では、意図しているヒトB7-H2ポリペプチドの用途に応じて、いくつかの発現ベクターを選択することができる。例えば、抗体を誘導するために、大量のヒトB7-H2ポリペプチドが必要な場合は、容易に精製することができる融合タンパク質を高レベルに発現させるベクターを使用することができる。そのようなベクターには、例えばBLUESCRIPT（Stratagene）などの多機能大腸菌クローニングおよび発現ベクターがあるが、これに限るわけではない。BLUESCRIPTベクターでは、ハイブリッドタンパク質が産生されるように、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列を、 $\gamma$ -ガラクトシダーゼのアミノ末端Metとそれに続く7残基をコードする配列と共に、インフレームで、ベクター中に連結することができる。pINベクター（Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989）またはpGEXベクター（Promega, ウィスコンシン州マディソン）も、外来ポリペプチドをグルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）との融合タンパク質として発現させるために使用することができる。一般に、そのような融合タンパク質は可溶性であり、グルタチオン-アガロースビーズに吸着させた後、遊離グルタチオンの存在下で溶離させることにより、溶解した細胞から容易に精製することができる。そのような系で製造されるタンパク質には、ヘパリン、トロンピン、または第Xa因子プロテアーゼ切断部位を組み込んで、目的とするクローン化ポリペプチドをGST部分から思い通りに切り離すことができるように設計することができる。

【0062】

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* では、 $\alpha$ 因子、アルコールオキシダーゼ、およびPGHなどの構成的または誘導性プロモーターを含有するいくつかのベクターを使用することができる。総説として、Ausubelら（1989）およびGrantら、*Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987を参照されたい。

【0063】

植物および昆虫発現系

植物発現ベクターを使用する場合は、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列の発現を、いくつかあるプロモーターのどれで駆動することもできる。例えば、CaMVの35Sおよび19Sプロモーターなどのウイルスプロモーターを、単独で、またはTMV由来のオメガリーダー配列と組み合わせて使用することができる（Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987）。あるいは、RUBISCOの小サブユニットまたは熱ショックプロモーターなどの植物プロモーターを使用することもできる（Coruzziら, *EMBO J.* 3, 1671-1680, 1984; Broglieら, *Scien*

10

20

30

40

50

ce224, 838-843, 1984; Winterら, Results Probl. Cell Differ.17, 85-105, 1991)。これらのコンストラクトは、直接DNA形質転換によって、または病原体を介したトランスフェクションによって、植物細胞中に導入することができる。そのような技術は、いくつかの一般に入手可能な総説（例えば「McGraw Hill Yearbook of Science and Technology」（McGraw Hill, ニューヨーク州ニューヨーク, p.191-196, 1992）のHobbsまたはMurrayの総説）に記載されている。

#### 【0064】

昆虫系を使ってヒトB7-H2ポリペプチドを発現させることもできる。例えば、そのような系の一つでは、Autographa californica核多角体病ウイルス（AcNPV）をベクターとして使用して、Spodoptera frugiperda細胞またはTrichoplusia幼虫中で、外来遺伝子を発現させる。ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列は、ウイルスの非必須領域中、例えばポリヘドリン遺伝子中にクローニングして、ポリヘドリンプロモーターの制御下に置くことができる。ヒトB7-H2ポリペプチドがうまく挿入されると、ポリヘドリン遺伝子は不活性になり、コートタンパク質を欠く組換えウイルスが産生されるようになる。次に、この組換えウイルスを使って、S. frugiperda細胞またはTrichoplusia幼虫を感染させ、その中でヒトB7-H2ポリペプチドを発現させることができる（Engelhardら, Proc. Natl. Acad. Sci.91, 3224-3227, 1994）。

10

#### 【0065】

##### 哺乳動物発現系

ウイルスに基づくいくつかの発現系を使って、哺乳動物宿主細胞でヒトB7-H2ポリペプチドを発現させることができる。例えば、発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合は、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードしている配列を、後期プロモーターおよびトリパータイトリーダー配列を含むアデノウイルス転写/翻訳複合体中にライゲートすることができる。ウイルスゲノムの非必須E1またはE3領域への挿入を使って、感染宿主細胞中でヒトB7-H2ポリペプチドを発現させる能力を持つ生ウイルスを得ることができる（LoganおよびShenk, Proc. Natl. Acad. Sci.81, 3655-3659, 1984）。所望により、ラウス肉腫ウイルス（RSV）エンハンサーなどの転写エンハンサーを使って、哺乳動物宿主細胞における発現量を増加させることもできる。

20

#### 【0066】

プラスミドに組み込んで発現させることが可能なDNA断片よりも大きいDNA断片を送達するために、ヒト人工染色体（HAC）を使用することもできる。6M~10MのHACを構築し、通常の方法（例えばリポソーム、ポリカチオン性アミノポリマー、またはベシクル）によって細胞に送達する。

30

#### 【0067】

ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列の翻訳効率が向上するように、特異的開始シグナルを使用することもできる。そのようなシグナルにはATG開始コドンおよび隣接配列が含まれる。ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列、その開始コドン、および上流配列を、適当な発現ベクターに挿入する場合には、さらなる転写または翻訳制御シグナルは必要ないだろう。しかし、コード配列またはその断片だけを挿入する場合には、外来の翻訳制御シグナル（ATG開始コドンを包む）を用意すべきである。開始コドンは、インサート全体が確実に翻訳されるように、正しい読み枠になければならない。外来の翻訳要素および開始コドンは、天然、合成両方の様々な起源を持つことができる。発現の効率は、使用する細胞系に適したエンハンサーを組み込むことによって、向上させることができる（Scharfら, Results Probl. Cell Differ.20, 125-162, 1994）。

40

#### 【0068】

##### 宿主細胞

宿主細胞株は、挿入された配列の発現を調節する能力または発現されたヒトB7-H2ポリペプチドを望ましい形にプロセッシングする能力を持つという理由で、選択することができる。ポリペプチドのそのような修飾には、例えばアセチル化、カルボキシル化、グリコシル化、リン酸化、脂質化、およびアシル化などが含まれるが、これらに限るわけではない。

50

「ブレプロ」型のポリペプチドを切断する翻訳後プロセッシングを使って、正しい挿入、折り畳み、および/または機能を促進することもできる。翻訳後活性のための特殊な細胞機構および特徴的な機序を持つ様々な宿主細胞（例えばCHO、HeLa、MDCK、HEK293、およびW138）は、American Type Culture Collection (ATCC; バージニア州20110-2209マナッサス、ユニバーシティ・ブルバード10801) から入手することができ、外来タンパク質の正しい修飾およびプロセッシングを確保するために、これらの宿主細胞を選択することができる。

#### 【0069】

組換えタンパク質の長期高収量生産には、安定な発現が好ましい。例えば、ウイルス複製起点および/または内在性発現要素を含むことができる発現ベクターならびに同じベクター上または別のベクター上にある選択マーカー遺伝子を使って、ヒトB7-H2ポリペプチドを安定に発現させる細胞系を形質転換することができる。ベクターの導入に続いて、細胞を強化培地で1~2日間生育させた後、培地を選択培地に交換することができる。選択マーカーの目的は、選択に対する耐性を付与することであり、その存在は、導入されたヒトB7-H2配列をうまく発現する細胞の生育および回収を可能にする。安定に形質転換された細胞の耐性クローンは、その細胞タイプに適した組織培養技術を使って、増殖させることができる。例えば、R. I. Freshney編「ANIMAL CELL CULTURE」(1986)を参照されたい。

#### 【0070】

形質転換された細胞系を回収するには、多くの選択系を使用することができる。例えば、tk細胞またはaprt細胞でそれぞれ使用することができる単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ遺伝子 (Wiglerら, Cell11, 223-32, 1977) およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子 (Lowyら, Cell22, 817-23, 1980) などがあるが、これらに限るわけではない。また、代謝拮抗物質、抗生物質、または除草剤耐性を選択の根拠として使用することもできる。例えば、dhfrはメトトレキセートに対する耐性を付与し (Wiglerら, Proc. Natl. Acad. Sci.77, 3567-70, 1980)、nptはアミノグリコシド、ネオマイシンおよびG-418に対する耐性を付与し (Colbere-Garapinら, J. Mol. Biol.150, 1-14, 1981)、alsおよびpatはそれぞれクロルスルフロンおよびホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する耐性を付与する (Murray, 1992, 前掲)。選択可能な遺伝子は他にも記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにし、hisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用できるようにする (HartmanおよびMulligan, Proc. Natl. Acad. Sci.85, 8047-51, 1988)。アントシアニンなどの可視マーカー、-グルクロニダーゼとその基質GUS、およびルシフェラーゼとその基質ルシフェリンは、形質転換体を同定するために、また特定のベクター系に起因すると考えられる一過性または安定なタンパク質発現の量を定量するために、使用することができる (Rhodesら, Methods Mol. Biol.55, 121-131, 1995)。

#### 【0071】

##### 発現の検出

マーカー遺伝子発現の存在はヒトB7-H2ポリヌクレオチドも存在することを示唆するが、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドの存在と発現は確認する必要があるかもしれない。例えば、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列がマーカー遺伝子配列の内部に挿入される場合、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列を含む形質転換された細胞は、マーカー遺伝子機能の不在によって同定することができる。あるいは、単一のプロモーターの制御下に、マーカー遺伝子と、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列とを、タンデムに置くこともできる。誘導または選択に反応して起こるマーカー遺伝子の発現は、通常は、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドの発現を示す。

#### 【0072】

あるいは、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドを含む宿主細胞およびヒトB7-H2ポリペプチドを発現させる宿主細胞は、当業者に知られている様々な方法によって同定することができる。これらの方法には、例えば、核酸またはタンパク質を検出および/または定量するための膜、溶液、またはチップに基づく技術を含むDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーショ

10

20

30

40

50

ンおよびタンパク質バイオアッセイまたはイムノアッセイ技術などがあるが、これらに限るわけではない。例えば、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列の存在は、プローブまたは断片またはヒトB7-H2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの断片を用いるDNA-DNAまたはDNA-RNAハイブリダイゼーションまたは増幅によって、検出することができる。核酸増幅に基づく測定法では、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドを含有する形質転換体を検出するために、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列から選択されるオリゴヌクレオチドを使用する。

#### 【0073】

当技術分野では、ヒトB7-H2ポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使ってヒトB7-H2ポリペプチドの発現を検出し測定するための様々なプロトコルが知られている。酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、および蛍光活性化セルソーティング(FACS)などが、その例である。ヒトB7-H2ポリペプチド上の二つの干渉しないエピトープに反応するモノクローナル抗体を用いる二部位モノクローナルイムノアッセイ、または競合結合測定法を使用することができる。これらの測定法および他の測定法は、Hamptomら「SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL」(APS Press, ミネソタ州セントポール, 1990)およびMaddoxら, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983に記載されている。

#### 【0074】

多種多様な標識およびコンジュゲーション技術が当業者には知られており、様々な核酸およびアミノ酸測定法に、それらを使用することができる。ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関する配列を検出するための標識ハイブリダイゼーションプローブまたはPCRプローブを製造する手段には、標識ヌクレオチドを使ったオリゴラベリング法、ニックトランスレーション法、末端標識法、またはPCR増幅法などがある。あるいは、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列を、mRNAプローブを製造するためのベクターにクローニングすることもできる。そのようなベクターは当技術分野では知られていて、市販されており、それらを使って、標識ヌクレオチドおよび適当なRNAポリメラーゼ、例えばT7、T3、またはSP6などを添加することにより、インビトロでRNAプローブを合成することができる。これらの方法は、様々な市販のキットを使って行なうことができる(Amersham Pharmacia Biotech、Promega、およびUS Biochemical)。検出を容易にするために使用することができる適切なリポーター分子または標識には、放射性核種、酵素、および蛍光性物質、化学発光性物質、または発色性物質、ならびに基質、補因子、阻害剤、磁性粒子などがある。

#### 【0075】

##### ポリペプチドの発現および精製

ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞は、タンパク質を発現させて細胞培養から回収するのに適した条件で、培養することができる。形質転換細胞により産生されたポリペプチドは、その配列および/または使用したベクターに依存して、分泌される場合も、細胞内に貯留される場合もある。当業者には理解されるだろうが、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターは、原核または真核細胞膜を通した可溶性ヒトB7-H2ポリペプチドの分泌を指示するシグナル配列、または膜結合型ヒトB7-H2ポリペプチドの膜挿入を指示するシグナル配列を含むように設計することができる。

#### 【0076】

上述のように、他の構築物を使って、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列を、可溶性タンパク質の精製を容易にするポリペプチドドメインをコードしているヌクレオチド配列とつなぎ合わせることができる。そのような精製促進ドメインには、例えば金属キレートペプチド、例えば固定化金属上での精製を可能にするヒスチジン-トリプトファンモジュール、固定化免疫グロブリン上での精製を可能にするプロテインAドメイン、およびFLAG伸長/Aフィニティー精製システム(Immunex Corp., ワシントン州シアトル)に利用されるドメインなどがあるが、これらに限るわけではない。精製ドメインとヒトB7-H2ポリ

10

20

30

40

50

ペプチドとの間に切断可能なリンカー配列、例えば第Xa因子またはエンテロキナーゼに特異的なリンカー配列 (Invitrogen, カリフォルニア州サンディエゴ) などを導入することによって、精製を容易にすることもできる。そのような発現ベクターの一つは、ヒトB7-H2ポリペプチドと、チオレドキシシンまたはエンテロキナーゼ切断部位の前に配置された6個のヒスチジン残基とを含む融合タンパク質を、発現させる。これらのヒスチジン残基はIMAC (Porathら, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992に記載の固定化金属イオンアフィニティークロマトグラフィー) による精製を容易にし、一方、エンテロキナーゼ切断部位は融合タンパク質からヒトB7-H2ポリペプチドを精製する手段となる。融合タンパク質を含むベクターはKrollら, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993に開示されている。

【0077】

#### 化学合成

ヒトB7-H2ポリペプチドをコードする配列は、その全体または一部を、当技術分野で周知の化学的方法を使って、合成することができる (Caruthersら, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Hornら, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232, 1980)。あるいは、ヒトB7-H2ポリペプチド自体を、化学的方法を使ってそのアミノ酸配列を合成することによって、例えば固相法による直接的ペプチド合成などによって、製造することもできる (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154, 1963; Robergeら, *Science* 269, 202-204, 1995)。タンパク質合成は手作業によって行なうか、または自動化して行なうことができる。自動合成は、例えばApplied Biosystems 431Aペプチド合成装置 (Perkin Elmer) を使って達成することができる。所望により、ヒトB7-H2ポリペプチドの断片を別々に合成し、それらを化学的方法で一体化することによって、完全長の分子を製造することもできる。

【0078】

新たに合成されたペプチドは、分取用高速液体クロマトグラフィー (例えばCreighton「PROTEINS: STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES」WH Freeman and Co., ニューヨーク州ニューヨーク, 1983) によって、実質的に精製することができる。合成ヒトB7-H2ポリペプチドの組成はアミノ酸分析またはアミノ酸配列決定によって確認することができる (例えばエドマン分解法; 前掲のCreightonを参照されたい)。さらに、直接合成中にヒトB7-H2ポリペプチドのアミノ酸配列の任意の部分を改変し、そして/または化学的方法を使って他のタンパク質に由来する配列と一体化することにより、変異体ポリペプチドまたは融合タンパク質を製造することができる。

【0079】

#### 改変ポリペプチドの製造

当業者には理解されるだろうが、天然には存在しないコドンを持つヒトB7-H2ポリペプチドコードヌクレオチド配列を作製すると有利になる場合がある。例えば、特定の原核または真核宿主が好むコドンを選択して、タンパク質発現の速度を増大させたり、望ましい性質、例えば天然に存在する配列から生じる転写物よりも長い半減期などを持つRNA転写物を製造したりすることができる。

【0080】

当技術分野で広く知られている方法を使って、本明細書に開示するヌクレオチド配列を操作することにより、例えばヒトB7-H2ポリペプチドまたはmRNA産物のクローニング、プロセッシング、および/または発現に変更を加える改変 (ただしこれらに限るわけではない) などの様々な理由で、ヒトB7-H2ポリペプチドコード配列を改変することができる。ランダムな断片化ならびに遺伝子断片および合成オリゴヌクレオチドのPCR再アセンブリによるDNAシャフリングを使って、ヌクレオチド配列を操作することができる。例えば、位置指定突然変異誘発法を使って、新たな制限部位を挿入したり、グリコシル化パターンを変化させたり、コドン選択性を変えたり、スプライシング変異体を製造したり、突然変異を導入したりすることができる。

【0081】

#### 抗体

10

20

30

40

50

当分野で知られているどのタイプの抗体でも、ヒトB7-H2ポリペプチドのエピトープと特異的に結合するように作製することができる。本明細書で使用する「抗体」という用語は、ヒトB7-H2ポリペプチドのエピトープを結合する能力を持つ完全な免疫グロブリン分子、ならびにその断片、例えばFab、F(ab')<sub>2</sub>、およびFvなどを包含する。通例、エピトープを形成するには少なくとも6、8、10、または12個の連続するアミノ酸が必要である。しかし、非連続アミノ酸が関わるエピトープには、より多くのアミノ酸、例えば少なくとも15、25、または50個のアミノ酸が必要になる場合もある。

#### 【0082】

ヒトB7-H2ポリペプチドのエピトープに特異的に結合する抗体は、治療に使用することができるだけでなく、例えばウェスタンブロット、ELISA、ラジオイムノアッセイ、免疫組織化学測定、免疫沈降などの免疫化学的測定、または当技術分野で知られる他の免疫化学的測定にも使用することができる。様々なイムノアッセイを使って、所望の特異性を持つ抗体を同定することができる。当技術分野では、競合結合測定法または免疫放射線測定法に関して、数多くのプロトコルがよく知られている。そのようなイムノアッセイでは、通例、免疫原とその免疫原に特異的に結合する抗体の間に起こる複合体形成を測定する。

10

#### 【0083】

通例、ヒトB7-H2ポリペプチドに特異的に結合する抗体を免疫化学的測定に使用すると、他のタンパク質がもたらす検出シグナルよりも少なくとも5、10、または20倍高い検出シグナルが得られる。好ましくは、ヒトB7-H2様ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、免疫化学的測定で他のタンパク質を検出せず、ヒトB7-H2ポリペプチドを溶液から免疫沈降させることができる。

20

#### 【0084】

ヒトB7-H2ポリペプチドを使ってマウス、ラット、ウサギ、モルモット、サル、またはヒトなどの哺乳動物を免疫し、ポリクローナル抗体を産生させることができる。所望により、ヒトB7-H2ポリペプチドは、例えばウシ血清アルブミン、チログロブリン、およびスカシガイヘモシアニンなどの担体タンパク質とコンジュゲートさせることができる。宿主の種に応じて様々なアジュバントを使用することにより、免疫学的応答を増大させることができる。そのようなアジュバントには、例えばフロイントアジュバント、無機ゲル（例えば水酸化アルミニウム）、および界面活性物質（例えばリゾレシチン、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノール）などがあるが、これらに限るわけではない。ヒトに使用されるアジュバントの中では、BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*) および *Corynebacterium parvum* が特に有用である。

30

#### 【0085】

ヒトB7-H2ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体は、培養連続継代性細胞株による抗体分子の産生に対応できる任意の技術を使って製造することができる。これらの技術には、ハイブリドーマ技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびEBV-ハイブリドーマ技術などがあるが、これらに限るわけではない (Kohlerら, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozborら, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Coteら, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Coleら, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984)。

40

#### 【0086】

また、「キメラ抗体」を製造するために開発された技術、すなわちマウス抗体遺伝子をヒト抗体遺伝子と接合して適当な抗原特異性と生物学的活性とを持つ分子を得る技術も使用することができる (Morrisonら, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neubergerら, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takedaら, *Nature* 314, 452-454, 1985)。モノクローナル抗体および他の抗体を「ヒト化」して、これを治療に使用した場合に患者がその抗体に対して免疫応答を起こすのを防ぐこともできる。そのような抗体は、ヒト抗体と配列が十分に似ていて、そのまま治療に使用することができるかもしれないし、いくつかの重要残基を改変する必要があるかもしれない。齧歯類の抗体とヒト配列との配列の相違は、個々の残基の位置指定突然変異誘発または相補性決定領域全体の移植により、ヒト配列中の残

50

基とは異なる残基を置き換えることによって、最小限に抑えることができる。別法として、ヒト化抗体はGB2188638Bに記載されているように、組換え法を使って製造することもできる。ヒトB7-H2ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、U.S.5,565,332に開示されているように、部分的にまたは完全にヒト化された抗原結合部位を含むことができる。

【0087】

あるいは、当技術分野で知られている方法を使って、一本鎖抗体を製造するために記載された技術を応用することにより、ヒトB7-H2ポリペプチドに特異的に結合する一本鎖抗体を製造することができる。関連する特異性を持つが異なるイディオタイプ組成を有する抗体を、ランダムコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリーからの鎖シャフリングによって作製することができる (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991)。

10

【0088】

一本鎖抗体は、ハイブリドーマcDNAをテンプレートとして使用するPCRなどのDNA増幅法を使って構築することもできる (Thirionら, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11)。一本鎖抗体は単一特異性または二重特異性であることができ、二価または四価であることができる。四価二重特異性一本鎖抗体の構築は、例えばColomaおよびMorrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63などに教示されている。二価二重特異性一本鎖抗体の構築は、MallenderおよびVoss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206に教示されている。

【0089】

後述するように、手作業によるヌクレオチド合成法または自動ヌクレオチド合成法を使って一本鎖抗体をコードするヌクレオチド配列を構築し、標準的な組換えDNA法を使って発現コンストラクトにクローニングし、それを細胞中に導入することにより、コード配列を発現させることができる。別法として、例えば繊維状ファージ技術などを使って、一本鎖抗体を直接製造することもできる (Verhaarら, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nichollsら, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91)。

20

【0090】

ヒトB7-H2ポリペプチドに特異的に結合する抗体は、リンパ球集団におけるインビボ産生を誘導することによって、または文献に記載されている極めて特異的な結合試薬のパネルもしくは免疫グロブリンライブラリーをスクリーニングすることによって得ることもできる (Orlandiら, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winterら, *Nature* 349, 293-299, 1991)。

30

【0091】

他のタイプの抗体を構築して、本発明の方法で治療に使用することもできる。例えば、W093/03151に開示されているようにキメラ抗体を構築することができる。例えばW094/13804に記載の「ダイアボディ (diabody)」など、免疫グロブリンから誘導される多価かつ多重特異性の結合タンパク質も製造することができる。

【0092】

本発明の抗体は、当技術分野で周知の方法によって精製することができる。例えば、抗体は、ヒトB7-H2ポリペプチドが結合しているカラムを通過させることによって、アフィニティー精製することができる。次に、結合した抗体を、高塩濃度の緩衝液を使って、カラムから溶出することができる。

40

【0093】

アンチセンスオリゴヌクレオチド

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、特定のDNAまたはRNA配列に対して相補的なヌクレオチド配列である。いったん細胞中に導入されると、この相補的なヌクレオチドは、その細胞が産生する天然配列と結合して複合体を形成し、転写または翻訳のいずれかを遮断する。好ましくは、アンチセンスオリゴヌクレオチドは少なくとも11ヌクレオチド長であるが、少なくとも12、15、20、25、30、35、40、45、または50以上のヌクレオチド長であってもよい。さらに長い配列も使用することができる。アンチセンスオリゴヌクレオチド分子をDNAコンストラクトに入れて上述のように細胞中に導入することにより、その細胞におけるヒトB7-H2遺伝子産物のレベルを低下させることができる。

50

## 【0094】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、または両者の組み合わせであることができる。オリゴヌクレオチドは、あるヌクレオチドの5'末端を、アルキルホスホネート、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、アルキルホスホノチオエート、アルキルホスホネート、ホスホロアミデート、リン酸エステル、カルバメート、アセトアミデート、カルボキシメチルエステル、カーボネート、およびリン酸トリエステルなどの非ホスホジエステルヌクレオチド間結合で、別のヌクレオチドの3'末端と、共有結合させることにより、手作業で、または自動合成装置によって、合成することができる。Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmannら, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990を参照されたい。

10

## 【0095】

ヒトB7-H2遺伝子の制御領域、5'領域、または調節領域に対して二重鎖を形成するアンチセンスオリゴヌクレオチドを設計することにより、ヒトB7-H2遺伝子発現に変更を加えることができる。転写開始部位に由来するオリゴヌクレオチド、例えば開始部位から-10番目の位置と+10番目の位置の間に由来するオリゴヌクレオチドは好ましい。同様に、「三重らせん」塩基対形成法を使って、阻害を達成することもできる。三重らせん塩基対形成は、ポリメラーゼ、転写因子、またはシャペロンが結合できる程度に開くという二重らせんの能力を阻害するので有用である。三重鎖DNAを使った治療の進歩は、文献に記載されている（例えばHuberおよびCarr「MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES」（Futura Publishing Co., ニューヨーク州マウントキスコ, 1994）のGeeらの項）。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、転写物がリボソームに結合するのを防ぐことによってmRNAの翻訳を遮断するように設計することもできる。

20

## 【0096】

正確な相補性が存在しなくても、アンチセンスオリゴヌクレオチドとヒトB7-H2ポリヌクレオチドの相補配列との間には、複合体の形成が起こりうる。例えば、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドに対して正確に相補的な連続するヌクレオチドからなる2、3、4、もしくは5個以上の区間（ストレッチ）を含み、各区間が、隣接するヒトB7-H2ヌクレオチドとは相補的ではない連続するヌクレオチドからなる区間（ストレッチ）によって隔てられているアンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトB7-H2 mRNAに対して十分なターゲティング特異性を持ちうる。好ましくは、相補的な連続ヌクレオチドの各区間（ストレッチ）は、少なくとも4、5、6、7または8ヌクレオチド以上の長さを持つ。非相補的な介在配列は、好ましくは1、2、3、または4ヌクレオチド長である。当業者は、アンチセンス-センス対の融点計算値を使って、特定のアンチセンスオリゴヌクレオチドと特定のヒトB7-H2ポリヌクレオチド配列との間に許容されるであろうミスマッチの程度を、容易に決定することができる。

30

## 【0097】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドにハイブリダイズするというその能力に影響を及ぼすことなく、修飾することができる。これらの修飾はアンチセンス分子の内部、または一端もしくは両端に施すことができる。例えば、ヌクレオシド間のリン酸結合は、コレステリル部分またはアミノ基と末端リボースとの間に様々な数の炭素残基を持つジアミン部分を付加することによって、修飾することができる。修飾された塩基および/または糖、例えばリボースではなくアラビノース、または3'ヒドロキシ基もしくは5'リン酸基が置換されている3',5'-置換オリゴヌクレオチドも、修飾アンチセンスオリゴヌクレオチド中に使用することができる。これらの修飾オリゴヌクレオチドは、当技術分野で周知の方法によって製造することができる。例えば、Agrawalら, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmannら, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmannら, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987などを参照されたい。

40

## 【0098】

## リボザイム

リボザイムは触媒活性を持つRNA分子である。例えば、Cech, *Science* 236, 1532-1539, 1987

50

7、Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568, 1990、Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609, 1992、CoutureおよびStinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996などを参照されたい。当技術分野では知られているように、リボザイムは、RNA配列を切断することによって遺伝子機能を阻害するために使用することができる（例えばHaseloffらの米国特許第5,641,673号）。リボザイムの作用機序には、相補的標的RNAに対するリボザイム分子の配列特異的ハイブリダイゼーションと、それに続く核酸鎖内部の切断（endonucleolytic cleavage）とが含まれる。リボザイムの例として、特異的ヌクレオチド配列の核酸鎖内部切断を特異的かつ効果的に触媒することができるように設計されたハンマーヘッドモチーフリボザイム分子が挙げられる。

【0099】

ヒトB7-H2ポリヌクレオチドのコード配列を使って、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドから転写されるmRNAに特異的に結合するリボザイムを作製することができる。当技術分野では、他のトランスRNA分子を極めて配列特異的に切断することができるリボザイムを設計し、構築する方法が開発され、記載されている（Haseloffら, *Nature* 334, 585-591, 1988）。例えば、リボザイムの切断活性は、独立した「ハイブリダイゼーション」領域をリボザイムに組み込むことによって、特定のRNAに差し向けることができる。このハイブリダイゼーション領域は標的RNAに相補的な配列を含むので、その標的と特異的にハイブリダイズする（例えばGerlachらのEP321,201を参照されたい）。

【0100】

ヒトB7-H2 RNA標的内の特異的リボザイム切断部位は、GUA、GUUおよびGUCという配列を含むリボザイム切断部位について、その標的分子を精査することによって同定することができる。同定されたら、その切断部位を含む標的RNAの領域に対応する15~20個のリボヌクレオチドからなる短いRNA配列を、その標的を動作不能にするかもしれない二次構造上の特徴について評価することができる。また、候補ヒトB7-H2 RNA標的の適性は、相補的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを起こしやすいかどうかをリボヌクレアーゼ保護測定法で検証することによって、評価することもできる。さらに長い相補配列を使用して、標的に対するハイブリダイゼーション配列の親和性を増加させることができる。リボザイムのハイブリダイゼーション領域と切断領域とは、相補領域を介して標的RNAにハイブリダイズした時に、リボザイムの触媒領域が標的を切断できるような一体的関係にあることができる。

【0101】

リボザイムはDNAコンストラクトの一部として細胞中に導入することができる。マイクロインジェクション、リボソームを用いたトランスフェクション、エレクトロポレーション、またはリン酸カルシウム沈殿法などの機械的方法を使って、ヒトB7-H2発現を減少させることが望まれる細胞中にリボザイム含有DNAコンストラクトを導入することができる。あるいは、細胞がDNAコンストラクトを安定的に保持することが望ましい場合は、そのコンストラクトをプラスミドに入れて、当技術分野で知られているように、独立した要素として維持するか、または細胞のゲノムに組み込むことができる。リボザイムをコードするDNAコンストラクトは、細胞におけるリボザイムの転写を制御するために、プロモーター要素、エンハンサーまたはUAS要素、および転写終結シグナルなどの転写調節要素を含むことができる。

【0102】

Haseloffらの米国特許第5,641,673号に教示されているように、リボザイムは、標的遺伝子の発現を誘導する因子に应答してリボザイムの発現が起こるように設計することができる。また、リボザイムを操作して、細胞内でリボザイムと標的遺伝子の両者が誘導された場合にのみmRNAの破壊が起こるように、さらなる調節を加えることもできる。

【0103】

差次的発現遺伝子

本明細書には、ヒトB7-H2と相互作用する産物を与える遺伝子の同定方法を記載する。そのような遺伝子は、例えば自己免疫疾患、アレルギー疾患、細菌感染症、およびI型糖尿

10

20

30

40

50

病など（ただしこれらに限るわけではない）の障害に際して差次的に発現する遺伝子に相当するかもしれない。さらにそのような遺伝子は、そのような疾患の進行または処置に係る操作に応答して、差次的に調節される遺伝子に相当するかもしれない。また、そのような遺伝子の発現は時期的調整を受け、組織発生または生物発生の様々な段階で増減するかもしれない。差次的に発現する遺伝子は、対照条件下と実験条件下との対比で、その発現が調整されるかもしれない。また、ヒトB7-H2遺伝子または遺伝子産物そのものを、差次的発現について調べてもよい。

#### 【0104】

正常状態と疾患状態とで発現が相違する程度は、ディファレンシャルディスプレイ法などの標準的キャラクタリゼーション技術によって可視化するのに十分な大きさでさえあればよい。発現の相違を視覚化する手段になりうる標準的キャラクタリゼーション技術には、他にも、例えば定量的RT（逆転写酵素）PCR、およびノーザン解析などがあるが、これらに限るわけではない。

#### 【0105】

##### 差次的発現遺伝子の同定

差次的発現遺伝子を同定するには、全RNAか、好ましくはmRNAを、対象組織から単離する。例えば、実験被験体の組織と、対照被験体の対応する組織とから、RNA試料を得る。そのようなRNA試料の精製には、mRNAの単離を妨げるような選択をしない任意のRNA単離技術を利用することができる。例えばAusubelら編「CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY」（John Wiley & Sons, Inc., ニューヨーク, 1987-1993）を参照されたい。当業者に周知の技術、例えばChomczynskiの米国特許第4,843,155号の一段階RNA単離法などを使って、多数の組織試料を容易に処理することができる。

#### 【0106】

収集したRNA試料のうち、差次的発現遺伝子が産生するRNAに相当する転写物は、当業者に周知の方法によって同定される。そのような方法には、例えばディファレンシャルスクリーニング（Tedderら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988）、サブトラクティブハイブリダイゼーション（Hedrickら, *Nature* 308, 149-53; Leeら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984）、そして好ましくはディファレンシャルディスプレイ（LiangおよびPardee, *Science* 257, 967-71, 1992; 米国特許第5,262,311号）などがある。

#### 【0107】

差次的発現情報そのものからは、ヒトB7-H2が関与する障害を処置するための関連する方法が示唆されるかもしれない。例えば、処置には、差次的発現遺伝子および/またはヒトB7-H2をコードする遺伝子の発現の調整が含まれるかもしれない。差次的発現情報により、差次的に発現する遺伝子もしくは遺伝子産物またはヒトB7-H2遺伝子もしくは遺伝子産物の発現または活性がアップレギュレートされるかダウンレギュレートされるかが示されるかもしれない。

#### 【0108】

##### スクリーニング方法

本発明は、ヒトB7-H2ポリペプチドまたはヒトB7-H2ポリヌクレオチドに結合するかまたはその活性を調整する被験化合物に関してスクリーニングするための測定法を提供する。被験化合物は、好ましくは、ヒトB7-H2ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する。より好ましくは、被験化合物は、その被験化合物が存在しない場合と比較して、ヒトB7-H2活性を少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%減少または増加させる。

#### 【0109】

##### 被験化合物

被験化合物は当技術分野で既に知られている薬理学的物質であってもよいし、薬理活性を持っていることが前もって分かっている化合物であってもよい。これらの化合物は天然に存在するものであってもよいし、実験室で設計されたものであってもよい。これらは微生物、動物、または植物から単離されたものであってもよいし、組換え生産されたものま

10

20

30

40

50

たは当技術分野で知られている化学的方法により合成されたものであってもよい。所望により、被験化合物は、例えば生物学的ライブラリー、空間アドレス可能 (spatially addressable) パラレル固相または液相ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「一ビーズ化合物」ライブラリー法、およびアフィニティークロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法など (ただしこれらに限定されるわけではない) といった、当技術分野で知られている数多くのコンビナトリアルライブラリー法のいずれかを使って取得することができる。生物学的ライブラリーによるアプローチはポリペプチドライブラリーに限定されるが、他の4つのアプローチはポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または小分子化合物ライブラリーに適用できる。Lam, Anticancer Drug Des. 12, 145, 1997を参照されたい。

10

## 【0110】

分子ライブラリーを合成する方法は当技術分野ではよく知られている (例えば、DeWittら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erbら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermannら, J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Choら, Science 261, 1303, 1993; Carellら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carellら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallopら, J. Med. Chem. 37, 1233, 1994などを参照されたい)。化合物ライブラリーは溶液中 (例えばHoughten, BioTechniques 13, 412-421, 1992)、またはビーズ (Lam, Nature 354, 82-84, 1991)、チップ (Fodor, Nature 364, 555-556, 1993)、細菌もしくは孢子 (Ladner, 米国特許第5,223,409号)、プラスミド (Cullら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 1865-1869, 1992)、またはファージ (ScottおよびSmith, Science 249, 386-390, 1990; Devlin, Science 249, 404-406, 1990; Cwirlaら, Proc. Natl. Acad. Sci. 97, 6378-6382, 1990; Felici, J. Mol. Biol. 222, 301-310, 1991; およびLadner, 米国特許第5,223,409号) 上に提示することができる。

20

## 【0111】

ハイスループットスクリーニング

被験化合物は、ハイスループットスクリーニングを使って、ヒトB7-H2ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドに結合する能力、またはヒトB7-H2活性もしくはヒトB7-H2遺伝子発現に影響を及ぼす能力に関してスクリーニングすることができる。ハイスループットスクリーニングを使用することにより、多くの化合物を別々に並行して試験することができ、その結果、多数の被験化合物を迅速にスクリーニングすることができる。最も広範に確立されている技術では96穴マイクロタイタープレートを利用する。マイクロタイタープレートのウェルには、通例、50~500 $\mu$ lの測定液量が必要である。プレートの他にも、96穴フォーマットに適した多くの機器、材料、ピペット、ロボット、プレート洗浄機、およびプレート読み取り機が市販されている。

30

## 【0112】

別法として、「自由フォーマット測定法」、すなわち試料間に物理的障壁を持たない測定法も使用することができる。例えば、コンビナトリアルペプチドライブラリー用の簡単な均一測定系で色素細胞 (メラノサイト) を用いる測定法が、Jayawickremeら, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 19, 1614-18 (1994) に記載されている。ペトリ皿中のアガロースの下にこれらの細胞を置き、次に、コンビナトリアル化合物を保持しているビーズを、アガロースの表面に載せる。コンビナトリアル化合物の一部をビーズから放出させる。化合物がゲルマトリックス中へと局所的に拡散するにつれて活性化合物は細胞の変色を引き起こすので、活性化合物を暗色色素領域として可視化することができる。

40

## 【0113】

自由フォーマット測定法のもう一つの例は、ペンシルバニア州フィラデルフィアにおける生体分子スクリーニング学会 (The Society for Biomolecular Screening) 第1回年次総会 (1995年11月7~10日) でChelskyが報告した「コンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための戦略: 新しいアプローチと伝統的なアプローチ (Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches)」に記載されている。Chelskyは、炭酸脱水酵素に関する簡単な均一酵素測定系をアガロースゲルの内部

50

に入れて、ゲル中の酵素がゲル全体の変色を引き起こすようにした。その後、光リンカーを介してコンビナトリアル化合物を保持しているビーズをゲルの内部に入れ、その化合物の一部をUV光によって放出させた。酵素を阻害する化合物は、変色が少ない局所的阻害ゾーンとして観察された。

【0114】

さらにもう一つの例が、Salmonら、Molecular Diversity2, 57-63 (1996)に記載されている。この例では、寒天中で生育する癌細胞に対して細胞毒性を有する化合物に関して、コンビナトリアルライブラリーのスクリーニングが行なわれた。

【0115】

もう一つのハイスループットスクリーニング法が、Beutelらの米国特許第5,976,813号に記載されている。この方法では、被験試料を多孔性マトリックスに入れる。次に、マトリックス、例えばゲル、プラスチックシート、フィルター、または操作が容易な他の形態の固体支持体の内部、上部、または底部に、1つまたはそれ以上の測定成分を置く。試料を多孔性マトリックスに投入すると、それらは十分にゆっくりと拡散するので、被験試料が混ざることなく、測定を行なうことができる。

10

【0116】

結合測定法

結合測定法の場合、被験化合物は、好ましくは、ヒトB7-H2ポリペプチドの活性部位などに結合してこれを占有し、その結果、正常な生物活性を妨げるような小分子である。そのような小分子の例には、小さいペプチドまたはペプチド様分子があるが、これらに限るわけではない。

20

【0117】

結合測定法では、被験化合物またはヒトB7-H2ポリペプチドのどちらかが、例えば蛍光標識、放射性同位体標識、化学発光標識、または酵素標識（例えばセイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ）などの検出可能な標識を含むことができる。この場合、ヒトB7-H2ポリペプチドに結合している被験化合物の検出は、例えば放射線の直接計数、シンチレーション計数、または適当な基質の検出可能な産物への変換を決定することなどによって達成することができる。

【0118】

別法として、どちらの反応物も標識せずに、ヒトB7-H2ポリペプチドに対する被験化合物の結合を測定することもできる。例えば、マイクロフィジオメーターを使って、被験化合物とヒトB7-H2ポリペプチドとの結合を検出することができる。マイクロフィジオメーター（例えばCytosensor（商標））は、光アドレス可能電位差センサー（light-addressable potentiometric sensor; LAPS）を用いて、細胞がその環境を酸性化する速度を測定する分析機器である。この酸性化速度の変化は、被験化合物とヒトB7-H2ポリペプチドとの相互作用の指標として使用することができる（McConnellら、Science257, 1906-1912, 1992）。

30

【0119】

被験化合物がヒトB7-H2ポリペプチドに結合する能力の決定は、実時間生体分子間相互作用解析（Bimolecular Interaction Analysis; BIA）などの技術を使って達成することもできる（SjolanderおよびUrbaniczky、Anal. Chem.63, 2338-2345, 1991、ならびにSzaboら、Curr. Opin. Struct. Biol.5, 699-705, 1995）。BIAはどの反応物も標識しないで、生体特異的相互作用を実時間で研究するための技術である（例えばBIAcore（商標））。光学現象である表面プラズモン共鳴（SPR）の変化は、生物学的分子間の実時間反応の指標として使用することができる。

40

【0120】

本発明のさらにもう一つの態様として、ツーハイブリッド測定法またはスリーハイブリッド測定法（例えば米国特許第5,283,317号、Zervosら、Cell72, 223-232, 1993、Maduraら、J. Biol. Chem.268, 12046-12054, 1993、Bartelら、BioTechniques14, 920-924, 1993、Iwabuchiら、Oncogene8, 1693-1696, 1993、およびBrent、W094/10300などを参照されたい

50

)で、ヒトB7-H2ポリペプチドを「ベイト (bait) タンパク質」として使用することにより、ヒトB7-H2ポリペプチドに結合するかまたはヒトB7-H2ポリペプチドと相互作用してその活性を調整する他のタンパク質を同定することもできる。

#### 【0121】

ツーハイブリッド系は、ほとんどの転写因子が、分離可能なDNA結合ドメインと活性化ドメインとからなるモジュール性を持つことに基づいている。簡単に述べると、この測定法では二種類のDNAコンストラクトを利用する。例えば、一方のコンストラクトでは、ヒトB7-H2ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを、既知の転写因子 (例えばGAL-4) のDNA結合ドメインをコードするポリヌクレオチドに融合させることができる。他方のコンストラクトでは、未同定のタンパク質 (「プレイ (prey)」または「試料」) をコードするDNA配列を、既知の転写因子の活性化ドメインをコードするポリヌクレオチドに融合させることができる。もし「ベイト」および「プレイ」タンパク質がインビボで相互作用してタンパク質依存的な複合体を形成できるならば、前記転写因子のDNA結合ドメインと活性化ドメインとはきわめて接近することになる。この接近により、転写因子に応答する転写調節部位に機能的に結合しているレポーター遺伝子 (例えばLacZ) の転写が可能になる。レポーター遺伝子の発現を検出することができる。そして、機能的な転写因子を含む細胞コロニーを単離することができ、それを使って、ヒトB7-H2ポリペプチドと相互作用するタンパク質をコードするDNA配列を得ることができる。

10

#### 【0122】

反応物の一方または両方の結合型を非結合型から容易に分離することができるように、また、測定法の自動化に対応するために、ヒトB7-H2ポリペプチド (もしくはポリヌクレオチド) または被験化合物のどちらかを、固定化することが望ましいかもしれない。したがって、ヒトB7-H2ポリペプチド (もしくはポリヌクレオチド) または被験化合物のどちらかを、固体支持体に結合させることができる。好適な固体支持体には、例えばガラスまたはプラスチックスライド、組織培養プレート、マイクロタイターウェル、管、シリコンチップ、またはビーズ (ラテックス、ポリスチレン、またはガラスビーズを含むが、これらに限るわけではない) などの粒子があるが、これらに限るわけではない。例えば、共有結合および非共有結合、受動吸収、あるいはポリペプチド (もしくはポリヌクレオチド) または被験化合物と固体支持体とにそれぞれを取付けた結合部分の対などを利用して、当技術分野で知られる任意の方法で、ヒトB7-H2ポリペプチド (もしくはポリヌクレオチド) または被験化合物を、固体支持体に取り付けることができる。被験化合物は、好ましくは、個々の被験化合物の位置を追跡することができるように、整列して固体支持体に結合させる。ヒトB7-H2ポリペプチド (またはポリヌクレオチド) への被験化合物の結合は、反応物を入れる適した任意の容器で行なうことができる。そのような容器の例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠沈管などがある。

20

30

#### 【0123】

一態様として、ヒトB7-H2ポリペプチドは、ヒトB7-H2ポリペプチドを固体支持体に結合できるようにするドメインを含む融合タンパク質である。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ融合タンパク質を、グルタチオンセファロースビーズ (Sigma Chemical, ミズーリ州セントルイス) またはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレートに吸着させた後、これを被験化合物または被験化合物および非吸着ヒトB7-H2ポリペプチドと混合し、次に、その混合物を複合体形成に資する条件 (例えば塩およびpHに関して生理的条件) 下でインキュベートする。インキュベーション後に、ビーズまたはマイクロタイタープレートのウェルを洗浄して、未結合成分を除去する。反応物の結合は上記のように直接的または間接的に測定することができる。別法として、結合を測定する前に、複合体を固体支持体から解離させることもできる。

40

#### 【0124】

本発明のスクリーニング測定法では、固体支持体にタンパク質またはポリヌクレオチドを固定化するために、他の技術を使用することもできる。例えば、ヒトB7-H2ポリペプチド (もしくはポリヌクレオチド) または被験化合物のいずれかを、ビオチンとストレプトア

50

ビジンのコンジュゲーションを利用して固定化することができる。当技術分野で周知の技術（例えばビオチン化キット、Pierce Chemicals, イリノイ州ロックフォード）を使って、ビオチン-NHS（N-ヒドロキシスクシンイミド）からビオチン化されたヒトB7-H2ポリペプチド（もしくはポリヌクレオチド）または被験化合物を調製し、ストレプトアビジン被覆96穴プレート（Pierce Chemical）のウェルに固定化することができる。別法として、ヒトB7-H2ポリペプチド、ポリヌクレオチド、または被験化合物に特異的に結合するが、所望する結合部位、例えばヒトB7-H2ポリペプチドの活性部位には干渉しない抗体を、プレートのウェルに誘導体化することもできる。結合されていない標的またはタンパク質を、抗体コンジュゲーションによって、ウェル中に捕捉することができる。

#### 【0125】

そのような複合体を検出する方法には、GST固定化複合体に関して上述した方法の他に、ヒトB7-H2ポリペプチドまたは被験化合物に特異結合する抗体を用いる複合体の免疫検出、ヒトB7-H2ポリペプチドの活性を検出することに依拠する酵素結合測定法、および非還元条件下でのSDSゲル電気泳動などがある。

#### 【0126】

ヒトB7-H2ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する被験化合物に関するスクリーニングは、無傷の細胞中で実施することもできる。細胞に基づく測定法には、ヒトB7-H2ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む任意の細胞を使用することができる。ヒトB7-H2ポリヌクレオチドは細胞中に天然に存在する場合もあるし、上述した技術を使って導入することもできる。ヒトB7-H2ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに対する被験化合物の結合は、上記のように決定する。

#### 【0127】

##### 遺伝子発現

もう一つの態様では、ヒトB7-H2遺伝子の発現を増大または減少させる被験化合物を同定する。ヒトB7-H2ポリヌクレオチドを被験化合物と接触させ、ヒトB7-H2ポリヌクレオチドのRNA産物またはポリペプチド産物の発現量を決定する。被験化合物が存在する場合の適当なmRNAまたはポリペプチドの発現レベルを、被験化合物が存在しない場合のmRNAまたはポリペプチドの発現レベルと比較する。被験化合物は、この比較に基づいて、発現調整物質であると同定することができる。例えば、被験化合物の不在時よりも被験化合物の存在時の方が、mRNAまたはポリペプチドの発現量が大きい場合、その被験化合物は、前記mRNAまたはポリペプチド発現の刺激物質または増強物質であると同定される。また、被験化合物の不在時よりも被験化合物の存在時の方が、mRNAまたはポリペプチドの発現量が小さい場合、その被験化合物は、該mRNAまたはポリペプチド発現の阻害物質であると同定される。

#### 【0128】

細胞におけるヒトB7-H2 mRNAまたはポリペプチドの発現レベルは、本技術分野で周知のmRNAまたはポリペプチド検出方法によって決定することができる。定性的方法または定量的方法を使用することができる。ヒトB7-H2ポリヌクレオチドのポリペプチド産物の存在は、例えば、ラジオイムノアッセイなどの免疫化学的方法、ウエスタンブロット法、および免疫組織化学を含む、当技術分野で知られている様々な技術を使って、決定することができる。また、ヒトB7-H2ポリペプチドへの標識アミノ酸の取り込みを検出することによって、ポリペプチド合成をインビボで、細胞培養物で、またはインビトロ翻訳系で決定することもできる。

#### 【0129】

そのようなスクリーニングは無細胞測定系か無傷の細胞で行なうことができる。細胞に基づく検定系にはヒトB7-H2ポリヌクレオチドを発現させる任意の細胞を使用することができる。ヒトB7-H2ポリヌクレオチドは細胞内に天然に存在する場合もあるし、上述したような技術を使って導入することもできる。初代培養またはCHOもしくはヒト胚性腎293細胞などの樹立細胞系を使用することができる。

#### 【0130】

10

20

30

40

50

## 医薬組成物

本発明は、治療効果を得るために患者に投与することができる医薬組成物も提供する。本発明の医薬組成物は、例えばヒトB7-H2ポリペプチド、ヒトB7-H2ポリヌクレオチド、リボザイムまたはアンチセンスオリゴヌクレオチド、ヒトB7-H2ポリペプチドと特異的に結合する抗体、またはヒトB7-H2ポリペプチド活性のミメティック（模倣体）、活性化剤、または阻害剤などを含むことができる。本組成物は、単独で、または少なくとも1つの他の物質、例えば安定化化合物などと組み合わせて投与することができ、任意の滅菌生体適合性医薬担体、例えば食塩水、緩衝食塩水、デキストロース、および水など（ただしこれらに限るわけではない）に入れて投与することができる。本組成物は、単独で、または他の物質、薬物またはホルモンと組み合わせて、患者に投与することができる。

10

### 【0131】

これらの医薬組成物は、活性成分の他に、薬学的に使用できる調製物への活性化合物の加工を容易にする賦形剤および補助剤を含む、適切な製薬的に許容される担体を含むことができる。本発明の医薬組成物は、例えば経口、静脈内、筋肉内、動脈内、髄内、クモ膜下、心室内、経皮、皮下、腹腔内、鼻腔内、非経口、局所、舌下、または直腸手段など（ただしこれらに限るわけではない）を含む多くの経路によって投与することができる。経口投与用の医薬組成物は、当技術分野で周知の製薬的に許容される担体を使って、経口投与に適した用量に製剤化することができる。そのような担体により、医薬組成物は、患者が内服するための錠剤、丸剤、糖衣剤、カプセル剤、液剤、ゲル剤、シロップ剤、スラリー剤、懸濁剤などとして製剤化することができる。

20

### 【0132】

経口用の医薬調製物は、活性化合物を、固体賦形剤と混合し、得られた混合物を所望により粉碎し、その顆粒混合物を、所望ならば適当な補助剤を加えた後に錠剤または糖衣錠核が得られるように加工することによって得ることができる。好適な賦形剤は、糖質またはタンパク質増量剤、例えば乳糖、ショ糖、マンニトール、またはソルビトールなどの糖類、トウモロコシ、コムギ、コメ、パレイショ、または他の植物由来のデンプン、セルロース、例えばメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、またはカルボキシメチルセルロースナトリウム、アラビアゴムおよびトラガカントゴムなどのゴム、ならびにゼラチンおよびコラーゲンなどのタンパク質である。所望により、崩壊剤または可溶化剤、例えば架橋ポリビニルピロリドン、寒天、アルギン酸、またはその塩、例えばアルギン酸ナトリウムなどを添加することができる。

30

### 【0133】

糖衣錠核は、濃縮糖溶液などの適当な被覆材と共に使用することができ、これはさらに、アラビアゴム、タルク、ポリビニルピロリドン、カーボポールゲル、ポリエチレングリコール、および/または二酸化チタン、ラッカー溶液、および適当な有機溶媒または溶媒混合物を含むこともできる。製品を識別するために、または活性化合物の量、すなわち用量を特徴づけるために、染料または色素を錠剤または糖衣錠被覆材に添加することができる。

### 【0134】

経口的に使用することができる医薬調合物としては、例えば、ゼラチン製の滑りばめ式カプセル剤、ならびにゼラチンとグリセロールまたはソルビトールなどの被覆材とでできた軟封入カプセル剤が挙げられる。滑りばめ式カプセル剤は、乳糖もしくはデンプンなどの増量剤または結合剤、タルクもしくはステアリン酸マグネシウムなどの潤滑剤、および所望により安定剤と混合された活性成分を含むことができる。軟カプセル剤では、安定剤を含むまたは安定剤を含まない適当な液体、例えば脂肪油、液体、または液体ポリエチレングリコールに、活性化合物を溶解または懸濁することができる。

40

### 【0135】

非経口投与に適した医薬製剤は、水溶液、好ましくは、ハंकウス溶液、リンゲル溶液、または生理緩衝食塩水などの生理適合性緩衝液中に製剤化することができる。水性注射用懸濁剤は、懸濁液の粘度を増加させる物質、例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム

50

、ソルビトール、またはデキストランなどを含有することができる。また、活性化合物の懸濁剤を、適当な油性注射用懸濁剤として製剤化することもできる。好適な親油性溶媒または媒質としては、ゴマ油などの脂肪油、またはオレイン酸エチルもしくはトリグリセリドなどの合成脂肪酸エステル、またはリポソームが挙げられる。非脂質ポリカチオンアミノポリマーも送達に使用することができる。所望により懸濁剤は、化合物の溶解性を増加させて高濃度溶液を製造できるようにする適当な安定剤または物質を含むこともできる。局所または鼻腔投与には、透過させようとする障壁に適した浸透剤を、製剤中に使用する。そのような浸透剤は当技術分野では一般に知られている。

#### 【0136】

本発明の医薬組成物は当技術分野で知られている方法で、例えば通常の混合、溶解、造粒、糖衣剤製造、すりつぶし、乳化、カプセル化、封入、または凍結乾燥工程などによって、製造することができる。本医薬組成物は塩として提供することができ、例えば塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸、コハク酸など（ただしこれらに限らない）の多くの酸を使って形成させることができる。塩は、水性溶媒または他のプロトン性溶媒への可溶性が、対応する遊離塩基型よりも高い傾向がある。また、4.5~5.5のpH範囲で1~50mMヒスチジン、0.1%~2%ショ糖、および2~7%マンニトールの一部または全てを含有することができ、使用前に緩衝液と混合される凍結乾燥粉末を、好ましい調製物として挙げることもできる。

#### 【0137】

製剤技術および投与技術に関するさらなる詳細は「REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE S」(Maack Publishing Co., ペンシルバニア州イーストン)の最新版に見出すことができる。医薬組成物を製造した後、それらを適当な容器に入れて、適応症の表示をする。そのような表示には投与量、投与頻度、および投与方法などが含まれるだろう。

#### 【0138】

##### 適応症および治療法

自己免疫疾患、アレルギー疾患、細菌感染症、およびI型糖尿病を処置するために、ヒトB7-H2タンパク質を調節することができる。

#### 【0139】

身体が自らを様々な病原体から防御するには、様々なタイプの免疫応答が必要である。一部の病原体、例えば細胞内細菌などの場合は、感染を抑制するのに主としてTh1タイプの応答が必要であり、一方、他の病原体、例えば細胞外環境に存在する蠕虫または微生物などの場合は、Th2タイプの応答が必要である。免疫応答が不適切に偏向すると感染に対する防御が不十分になる可能性があり、一方、応答が無規制に過剰偏向すると有害な続発症が起こりうる。細胞内細菌感染の場合は、対抗調節性サイトカインIL-10が感染後迅速に分泌されて、Th1応答を抑制する(参考文献12)。そのような応答は、B7-H2を発現させる細胞内にシグナルを伝達するのも、T細胞上のICOSを刺激するのも、B7-H2に頼っているのだろう。同様に、Th2応答が適切な場合には、B7-H2を介したシグナリングおよびICOSの刺激による応答の増幅が、病原体に対する十分な防御にとって必要だろう。一方、自己免疫疾患およびアレルギー疾患では、免疫応答の無規制な活性化が組織破壊、苦痛、そして時には生命にかかわる合併症を引き起こす。Th1免疫応答に続いて起こるB7-H2発現のアップレギュレーションおよびTh2免疫応答に続いて起こるB7-H2発現のダウンレギュレーションは、正常な免疫応答後の自己免疫およびアレルギーを避けるために身体が利用することのできる方法であると考えられる。B7-H2の様々なスプライシング変異体の発現も、様々な細胞が状況に合わせて異なる応答をすることを可能にしていると考えられる。したがって、発現させるB7-H2変異体の種類および発現レベルに関する細胞の決定は、適切な免疫応答の発達と制御にとって、極めて重要だろう。

#### 【0140】

B7-H2 V1およびB7-H2 V2の機能を遮断するための阻害剤の開発は、Th2応答のダウンレギュレーションおよびTh1応答への再偏向が有益であるだろうアレルギー疾患、例えば気道アレルギー、食物アレルギー、喘息、およびアトピー性皮膚炎などの処置、ならびに細胞

内細菌感染症、例えば結核、ライ、リステリア症、およびサルモネラ症などの処置に有用であると予想される。B7-H2 V1およびB7-H2 V2の機能を増進するための分子の開発は、Th2応答への再偏向が有益な自己免疫疾患、例えば多発性硬化症、慢性関節炎、および1型糖尿病などの処置、ならびに蠕虫および細胞外微生物感染症の処置に有用である。

#### 【0141】

さらに本発明は上述したスクリーニング測定法によって同定される新規物質の使用に関する。したがって、本明細書に記載するようにして同定される被験化合物を適当な動物モデルで使用することは、本発明の範囲に含まれる。例えば、本明細書に記載するようにして同定される物質（例えば調整物質、アンチセンス核酸分子、特異抗体、リボザイム、またはヒトB7-H2ポリペプチド結合分子）を動物モデルで使用して、そのような物質による処置の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載するようにして同定される物質を動物モデルで使用して、そのような物質の作用機序を決定することもできる。さらに本発明は、上記スクリーニング測定法によって同定される新規物質の、本明細書に記載する処置への使用に関する。

10

#### 【0142】

ヒトB7-H2活性に影響を及ぼす試薬を、インビトロまたはインビボでヒト細胞に投与し、ヒトB7-H2活性を低下させることができる。この試薬は、好ましくは、ヒトB7-H2遺伝子の発現産物に結合する。発現産物がタンパク質である場合、この試薬は、好ましくは、抗体である。ヒト細胞をエクスピボ（*ex vivo*）で処置するために、身体から取り出した幹細胞の調製物に、抗体を添加することができる。次に、当技術分野で知られているように、クローン増殖を行なってまたはクローン増殖を行わずに、それらの細胞を同じ人体または別の人体に戻すことができる。

20

#### 【0143】

一態様として、本試薬はリポソームを使って送達される。好ましくは、リポソームは、それを投与された動物中で少なくとも約30分間、より好ましくは少なくとも約1時間、さらに好ましくは少なくとも約24時間安定である。リポソームは、試薬（とりわけポリヌクレオチド）を動物（例えばヒト）の特定部位にターゲティングすることができる脂質組成物を含んでいる。好ましくは、リポソームのこの脂質組成物は、動物の特定の臓器、例えば肺、肝臓、脾臓、心臓、脳、リンパ節、および皮膚にターゲティングすることができる。

30

#### 【0144】

本発明に役立つリポソームは、標的細胞の形質膜と融合してその内容物を細胞内に送達することができる脂質組成物を含んでいる。リポソームのトランスフェクション効率、好ましくは、約 $10^6$ 細胞に送達される16ナノモルのリポソームにつき約 $0.5\mu\text{g}$ のDNA、より好ましくは約 $10^6$ 細胞に送達される16ナノモルのリポソームにつき約 $1.0\mu\text{g}$ のDNA、さらに好ましくは約 $10^6$ 細胞に送達される16ナノモルのリポソームにつき約 $2.0\mu\text{g}$ のDNAである。好ましくは、リポソームの直径は、好ましくは、約100~500nm、より好ましくは約150~450nm、さらに好ましくは約200~400nmである

#### 【0145】

本発明での使用に適したリポソームとしては、例えば当業者に知られている遺伝子送達法で一般的に使用されるリポソームが挙げられる。より好ましいリポソームとして、ポリカチオン脂質組成物を有するリポソームおよび/またはポリエチレングリコールとコンジュゲートしたコレステロール骨格を持つリポソームが挙げられる。所望により、リポソームは、そのリポソームを特定の細胞タイプへとターゲティングすることができる化合物、例えばリポソームの外表面に露出した細胞特異的リガンドを含む。

40

#### 【0146】

リポソームと、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムなどの試薬との複合体形成は、当技術分野で広く使用されている方法を使って達成することができる（例えば米国特許第5,705,151号を参照されたい）。好ましくは、約 $0.1\mu\text{g}$ ~約 $10\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを約8nmolのリポソームと、より好ましくは、約 $0.5\mu\text{g}$ ~約 $5\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを約8nmolのリポソームと、さらに好ましくは約 $1.0\mu\text{g}$ のポリヌクレオチドを約8nmolのリ

50

ポソームと混合する。

【0147】

もう一つの態様として、受容体媒介標的送達法 (receptor-mediated targeted delivery) を使って、インビボの特定の組織に抗体を送達することができる。受容体媒介DNA送達技術は、例えばFindeisら, *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993)、Chiouら「GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER」(J.A.Wolff編) (1994)、WuおよびWu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988)、Wuら, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994)、Zenkeら, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990)、Wuら, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991)などに教示されている。

【0148】

治療有効量の決定

治療有効量の決定は当業者の能力で十分に可能である。治療有効量とは、治療有効量の不在下で見られるヒトB7-H2活性と比較して、ヒトB7-H2活性を増加または減少させる活性成分量を表す。

【0149】

どの化合物についても、まずは細胞培養測定法または動物モデル(通常はマウス、ウサギ、イヌ、またはブタ)で、治療有効量を見積もることができる。動物モデルは、適当な濃度範囲および投与経路の決定にも使用することができる。次に、そのような情報を使って、ヒトへの投与に有用な量および経路を決定することができる。

【0150】

治療効力および毒性、例えばED<sub>50</sub>(集団の50%で治療的に有効な用量)およびLD<sub>50</sub>(集団の50%にとって致死的な用量)は、標準的な薬学的方法によって、細胞培養または実験動物で決定することができる。治療効果に対する毒性の用量比を治療係数といい、LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>比で表すことができる。

【0151】

大きな治療係数を示す医薬組成物が好ましい。細胞培養測定法および動物試験から得られるデータを利用して、ヒトに使用する場合の用量範囲を策定する。そのような組成物に含まれる用量は、好ましくは、ED<sub>50</sub>を含み、毒性がほとんどがないか全くない、循環濃度範囲内にある。用量は、使用する剤形、患者の感受性、および投与経路に依存して、この範囲内で変動する。

【0152】

正確な用量は、治療を必要とする対象に関係する因子を考慮して、医師によって決定されることになる。用量および投与には、活性成分のレベルが十分になるように、または所望する効果が維持されるように調節される。考慮することができる因子は、疾病状態の重症度、対象の全体的健康状態、対象の年齢、体重、および性別、食餌、投与の回数および頻度、併用薬、反応感受性、および治療に対する耐性/反応などが含まれる。持効性医薬組成物は、その製剤の半減期およびクリアランス率に応じて、3~4日毎、毎週、または2週間に1回投与することができる。

【0153】

標準的な用量は、投与経路に依存して、0.1~100,000マイクログラムの範囲、総用量は1gまでの値をとりうる。特定の用量および送達方法に関する指針は文献に記載されており、当技術分野の医師はこれを広く利用することができる。ヌクレオチド用には、タンパク質用またはそれらの阻害剤用とは異なる製剤が使用されるだろう。また、ポリヌクレオチドまたはポリペプチドの送達は、特定の細胞、状態、場所などに特異的に行なわれるだろう。

【0154】

試薬が一本鎖抗体である場合は、その抗体をコードするポリヌクレオチドを構築し、例えばトランスフェリン-ポリカチオンによるDNA導入、裸の核酸またはカプセルに封入した核酸のトランスフェクション、リポソームを使った細胞融合、DNA被覆ラテックスビーズの細胞内輸送、プロトプラスト融合、ウイルス感染、エレクトロポレーション、「遺伝子銃

10

20

30

40

50

」、およびDEAEトランスフェクションまたはリン酸カルシウムトランスフェクションなど（ただしこれらに限るわけではない）の確立された技術を使って、エクスピボまたはインスピボで、細胞に導入することができる。

【0155】

抗体の有効インスピボ用量は、患者の体重に対して、約5 $\mu$ g～約50 $\mu$ g/kg、約50 $\mu$ g～約5mg/kg、約100 $\mu$ g～約500 $\mu$ g/kg、および約200～約250 $\mu$ g/kgの範囲である。一本鎖抗体をコードするポリヌクレオチドを投与する場合、有効インスピボ用量は、DNA約100ng～約200ng、500ng～約50mg、約1 $\mu$ g～約2mg、約5 $\mu$ g～約500 $\mu$ g、および約20 $\mu$ g～約100 $\mu$ gの範囲である。

【0156】

発現産物がmRNAである場合、試薬は、好ましくはアンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムである。アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはリボザイムを発現させるポリヌクレオチドは、上記のように様々な方法によって、細胞中に導入することができる。

10

【0157】

好ましくは、試薬は、ヒトB7-H2遺伝子の発現またはヒトB7-H2ポリペプチドの活性を、その試薬が存在しない場合と比較して、少なくとも約10、好ましくは約50、より好ましくは約75、90、または100%低下させる。ヒトB7-H2遺伝子の発現レベルまたはヒトB7-H2ポリペプチドの活性を低下させるために選択した機序の有効性は、当技術分野で周知の方法、例えばヒトB7-H2特異的mRNAへのヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション、定量的RT-PCR、ヒトB7-H2ポリペプチドの免疫学的検出、またはヒトB7-H2活性の測定などを使って評価することができる。

20

【0158】

上記のどの態様においても、本発明の医薬組成物はいずれも、他の適当な治療薬と組み合わせて投与することができる。当業者は、通常の薬学的原則に従って、併用療法での使用に適した薬剤を選択することができる。治療薬の併用は、相乗的に作用して、上述した様々な疾患の処置または予防をもたらさう。このアプローチを使用すれば、各薬剤の投与量を下げても治療効果を得ることができ、よって有害な副作用の可能性を低減することができる。

【0159】

上記の治療方法はいずれも、例えばイヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ウサギ、サル、そして最も好ましくはヒトなどの哺乳動物を含めて、そのような治療を必要とする任意の対象に適用することができる。

30

【0160】

診断方法

ヒトB7-H2は、この酵素をコードする核酸配列中の突然変異の存在に関係する疾病および異常、またはそれらの疾病および異常に対する易罹患性を検出するための診断測定法にも使用することができる。例えば、ある疾病に罹患している個体と正常な個体とにおけるヒトB7-H2をコードするcDNA配列またはゲノム配列の間の相違を決定することができる。もし、ある突然変異が、罹患した個体の一部または全部に観察されるのに、正常な個体には観察されないならば、その突然変異はその疾病の原因であると思われる。

40

【0161】

基準遺伝子と突然変異を持つ遺伝子との間の配列の相違は、直接DNA配列決定法によって明らかにすることができる。また、クローニングしたDNAセグメントを、特定のDNAセグメントを検出するためのプローブとして使用することもできる。この方法の感受性は、PCRと組み合わせると、著しく増大する。例えば、二本鎖PCR産物またはPCRの変法によって調製される一本鎖テンプレート分子と共に、配列決定用プライマーを使用することができる。配列決定は、放射標識ヌクレオチドを用いる通常の方法によって、または蛍光タグを用いる自動配列決定法によって行なわれる。

【0162】

DNA配列の相違に基づく遺伝子検査は、変性剤を含むまたは含まないゲルにおけるDNA断片

50

の電気泳動移動度の変化を検出することによって実施することができる。小さい配列の欠失および挿入は、例えば高分解能ゲル電気泳動によって、視覚化することができる。異なる配列を持つDNA断片は、変性ホルムアミド勾配ゲル上で識別することができる。変性ホルムアミド勾配ゲルでは、異なるDNA断片の移動度が、それぞれの融解温度または部分融解温度に従って、ゲルの異なる位置で遅延される（例えばMyersら, *Science*230, 1242, 1985などを参照されたい）。特定の位置における配列の変化は、RNアーゼ保護法およびS1保護法などのヌクレアーゼ保護法または化学的切断法によって明らかにすることができる（例えばCottonら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*85, 4397-4401, 1985）。したがって、特定のDNA配列を、ハイブリダイゼーション、RNアーゼ保護法、化学的切断、直接DNA配列決定などの方法によって、または制限酵素およびゲノムDNAのサザンブロッティングによって、検出することができる。ゲル電気泳動およびDNA配列決定のような直接的方法の他に、インサイチュー（in situ）分析によって突然変異を検出することもできる。

10

#### 【0163】

様々な組織におけるヒトB7-H2レベルの変化を検出することもできる。宿主から得られる血液または組織生検などの身体試料中の受容体ポリペプチドのレベルを検出するために使用される測定法は、当業者にはよく知られており、例えばラジオイムノアッセイ、競合結合測定法、ウェスタンブロット解析、およびELISA測定法などがある。

#### 【0164】

本明細書に引用する全ての特許および特許出願は、引用をもって特に本明細書の一部を構成するものとする。上記の内容は本発明を一般的に記載するものである。より完全な理解は、以下の具体的実施例を参照することによって得られるが、以下の実施例は例示を目的として記載されるに過ぎず、本発明の範囲を限定しようとするものではない。

20

#### 【0165】

##### 実施例 1

ヒトB7-H2 V1およびV2 mRNA配列の決定

CD80 (GenBankアクセッション番号NP\_005182)、CD86 (GenBankアクセッション番号NP\_008820) およびB7H1 (GenBankアクセッション番号NP\_054862) のヒトアミノ酸配列、ならびにB7hのマウスmRNA配列 (GenBankアクセッション番号NP\_056605) を使用し、その相同配列を求めて、コンピュータプログラムBLAST2.0 (米国国立バイオテクノロジー情報センター) のTBLASTNコンポーネントによって日本DNAデータバンク (DDBJ) を検索した。1つのヒトDNA配列 (KIAA0653タンパク質のホモ・サピエンスmRNAという注釈が付いているGenBankアクセッション番号AB014553) は、概念上翻訳した場合に、マウスB7アミノ酸配列と231残基の領域にわたって50%を超えるアミノ酸配列一致率を持ち、231残基にわたって64%を超えるアミノ酸相同性を持つことがわかった。

30

#### 【0166】

次に、さらに詳しく解析するために、KIAA0653遺伝子の予想オープンリーディングフレームをクローニングした。コンピュータプログラムPrimer 3.0 (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer 3. コードは[http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)から入手可能) を使って、オープンリーディングフレームに隣接するプライマーを設計した。プライマーK653-L2 (配列番号5) およびK653-R6 (配列番号6) を使用し、ヒト末梢血白血球cDNAを反応のテンプレートとするポリメラーゼ連鎖反応によって、オープンリーディングフレームを増幅した。テンプレートcDNAは、ヒト末梢血白血球由来のポリA RNAをcDNA合成の出発物質として、SMART RACE cDNA増幅キット (Clontech, 米国カリフォルニア州パロアルト) を使用し、製造者のプロトコルに従って、予め合成しておいた。うまく増幅された断片をpCRII-TOPOベクター (Invitrogen, 米国カリフォルニア州カールスバッド) にクローニングし、ABI Prism 377 DNAシーケンサー (PE Biosystems) で、製造者の標準配列決定プロトコルに従い、各ベクター上のインサートに隣接するSP6およびT7プロモーター領域に相補的なプライマーを使って配列決定した。配列決定後に、選択した5つのクローン (クローン14、16、17、19および21) のDNA配列を、コンピュータプログラムSequencher (Gene Codes Corporation, 米国ミシガン州アナーバー) を使

40

50

って、公表されているKIAA0653の配列と比較した。

【0167】

(得られたcDNAの特徴)

1. 転写物1の配列(クローン14から得たもの)は912bp長のコード領域を持つ。

【0168】

2. この遺伝子に関して報告された元のKIAA0653 mRNA配列(GenBankアクセッション番号AB014553)と比較すると、転写物1は、KIAA0653配列の1027番目の塩基から1662番目の塩基までの636bpが欠失している。また、KIAA0653の510番目のGヌクレオチドは、転写物1ではA(482番目)に変化している。

【0169】

3. この遺伝子に関して報告されたGL50 mRNA配列(GenBankアクセッション番号AF199028)と比較すると、転写物1の3'末端(998番目の塩基以降)は、GL50配列の3'末端(921番目の塩基以降)に対して有意な相同性を示さない。また、GL50の405番目のGヌクレオチドは、転写物1ではA(482番目)に変化している。

【0170】

4. この遺伝子に関して報告されたB7-H2 mRNA配列(GenBankアクセッション番号AF289028)と比較すると、転写物1の3'末端(998番目の塩基以降)は、B7-H2配列の3'末端(1022番目の塩基以降)に対して有意な相同性を示さない。また、B7-H2の506番目のGヌクレオチドは、転写物1ではA(482番目)に変化している。

【0171】

5. 転写物2の配列(クローン16、17、19、および21から得たもの)は1419bp長のコード領域を持つ。

【0172】

6. この遺伝子に関して報告された元のKIAA0653 mRNA配列と比較すると、転写物2は、KIAA0653配列の1452番目の塩基から1580番目の塩基までの129bpが欠失している。また、転写物2の配列と元のKIAA0653配列との間には、上記欠失領域の外にも、ヌクレオチド配列の相違がいくつか認められた：

KIAA0653の510番目のヌクレオチドがGからA(転写物2の482番目)に変化している；

KIAA0653の1115番目のヌクレオチドがGからA(転写物2の1087番目)に変化している；

KIAA0653の1185番目のヌクレオチドがCからT(転写物2の1157番目)に変化している；

KIAA0653の1323番目のヌクレオチドがGからA(転写物2の1295番目)に変化している；

KIAA0653の1593番目のヌクレオチドがTからC(転写物2の1436番目)に変化している。

【0173】

7. この遺伝子に関して報告されたGL50 mRNA配列(GenBankアクセッション番号AF199028)と比較すると、転写物2の3'末端(998番目の塩基以降)は、GL50配列の3'末端(921番目の塩基以降)に対して有意な相同性を示さない。また、GL50の405番目のGヌクレオチドは、転写物2ではA(482番目)に変化している。

【0174】

8. この遺伝子に関して報告されたB7-H2 mRNA配列(GenBankアクセッション番号AF289028)と比較すると、転写物2の3'末端(998番目の塩基以降)は、B7-H2配列の3'末端(1022番目の塩基以降)に対して有意な相同性を示さない。また、B7-H2の506番目のGヌクレオチドは、転写物2ではA(482番目)に変化している。

【0175】

(得られたcDNAがコードしているアミノ酸配列の特徴)

1. 転写物1クローンを翻訳すると(B7-H2 V1)304残基長のアミノ酸配列が得られた。

【0176】

2. 転写物1配列の翻訳物は、KIAA0653の最初の42残基が欠失している点、およびバリン(KIAA0653の170番目の残基)がイソロイシン(B7-H2 V1の128番目の残基)で置換されている点で、KIAA0653の概念的翻訳物(GenBankアクセッション番号BAA31628)とは異なっている。KIAA0653転写物の1027~1662番目の塩基に対応するKIAA0653の342~553番目の残基

10

20

30

40

50

も欠失している。

【0177】

3. 転写物1配列の翻訳物は、バリン (GL50の128番目の残基) がイソロイシン (B7-H2 V1の128番目の残基) で置換されている点で、GL50の概念的翻訳物 (GenBankアクセッション番号AAF34739) とは異なっているが、それ以外は、最初の299残基は一致している。両配列の299番目の残基以降のカルボキシ末端は有意な相同性を示さない。

【0178】

4. 転写物1配列の翻訳物は、バリン (GL50の128番目の残基) がイソロイシン (B7-H2 V1の128番目の残基) で置換されている点で、B7-H2の概念的翻訳物 (GenBankアクセッション番号AAG01176) とは異なっているが、それ以外は、最初の299残基は一致している。両配列の299番目の残基以降のカルボキシ末端は有意な相同性を示さない。

10

【0179】

5. 転写物2クローンを翻訳すると473残基長のアミノ酸配列が得られた。

【0180】

6. 転写物2配列の翻訳物はKIAA0653の概念的翻訳物とは以下の残基が異なっている：  
KIAA0653の170番目のバリン残基がイソロイシン (B7-H2 V2の128番目の残基) に変化している；

KIAA0653の395番目のアルギニン残基がトリプトファン (B7-H2 V2の353番目の残基) に変化している；

KIAA0653の441番目のアスパラギン酸残基がアスパラギン (B7-H2 V2の399番目の残基) に変化している；

20

KIAA0653の531番目のトリプトファン残基がアルギニン (B7-H2 V2の446番目の残基) に変化している。

KIAA0653転写物の1452～1580番目の塩基に対応するKIAA0653の484～526番目の残基は欠失している。

【0181】

7. 転写物2配列の翻訳物は、バリン (GL50の128番目の残基) がイソロイシン (B7-H2 V2の128番目の残基) で置換されている点で、GL50の概念的翻訳物 (GenBankアクセッション番号AAF34739) とは異なっているが、それ以外は、最初の299残基は一致している。両配列の299番目の残基以降のカルボキシ末端は有意な相同性を示さない。

30

【0182】

8. 転写物2配列の翻訳物は、バリン (GL50の128番目の残基) がイソロイシン (B7-H2 V2の128番目の残基) で置換されている点で、B7-H2の概念的翻訳物 (GenBankアクセッション番号AAG01176) とは異なっているが、それ以外は、最初の299残基は一致している。両配列の299番目の残基以降のカルボキシ末端は有意な相同性を示さない。

【0183】

## 実施例2

### ヒトB7-H2の組織分布

発現プロファイリングは定量ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 解析に基づく。これは速度論的解析とも呼ばれ、Higuchiら (1992) およびHiguchiら (1993) に初めて記載された。PCRの対数期にあっては、任意の与えられたサイクルで、産物の量はテンプレートの初期コピー数に比例するというのが、その原理である。染色体からメッセンジャーRNA (mRNA) として転写される特定遺伝子の発現レベルは、この技術を利用して、そのmRNAのDNAコピー (cDNA) をまず作製し、次にそのcDNAに対して定量PCRを行なうことによって測定される。これは、定量的逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (定量的RT-PCR) と呼ばれる方法である。

40

【0184】

B7-H2転写物1または2 mRNAの組織分布を調べるために、様々なヒト組織に由来するRNAの定量的RT-PCR解析を行なった。様々な組織に由来する25 μgの全RNA (ヒト全RNAパネルI～V (Human Total RNA Panel I-V), Clontech Laboratories (米国カリフォルニア州パロ

50

アルト))をテンプレートとして使用し、SUPERSCRIPT(商標)RT-PCR用第一鎖合成システム(First-Strand Synthesis System for RT-PCR)(Life Technologies, 米国メリーランド州ロックビル)を使って、第一鎖cDNAを合成した。第一鎖cDNA合成は、オリゴ(dT)を使ってmRNAの3'ポリAテールにハイブリダイズさせ、合成反応を開始させることにより、製造者のプロトコルに従って行なった。次に、10ngの第一鎖cDNAをポリメラーゼ連鎖反応にテンプレートとして使用した。ポリメラーゼ連鎖反応は、DNA結合性蛍光色素SYBR Green Iの存在下に、LightCycler(Roche Molecular Biochemicals, 米国インディアナ州インディアナポリス)で行なった。SYBR Green Iは、ポリメラーゼ連鎖反応で二本鎖DNAがうまく合成された場合だけに生成するDNA二重らせんの副溝に結合する(Morrisonら, 1998)。二本鎖DNAに結合すると、SYBR Green Iは、LightCycler装置で定量的に測定することができる光を放出する。ポリメラーゼ連鎖反応は、オリゴヌクレオチドプライマーK653-L5(配列番号7)およびK653-R8(配列番号8)を使って行ない、放出光の強さは、各反応サイクル後、反応系が87に到達した時に測定した。放出光の強さは、同時に反応させた既知濃度の標品との比較によって、テンプレートcDNA 1ナノグラムあたりの遺伝子転写物のコピー数に変換した。

10

#### 【0185】

様々な組織タイプにおける1細胞当たりのmRNA転写レベルの違いを補正するために、同様に計算した5種類のハウスキーピング遺伝子、すなわちグリセルアルデヒド-3-リン酸(G3PDH)、ヒポキサンチンデアミンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HPRT)、 $\beta$ -アクチン、ボルホピリノゲンデアミナーゼ(PBGD)、および2-ミクログロブリンの様々な組織における発現レベルを使って、標準化操作を行なった。ハウスキーピング遺伝子の発現レベルは全ての組織で比較的一定であると考えられるので(Adamsら, 1993、Adamsら, 1995、Liewら, 1994)、cDNA合成ステップで使用した全RNA 1 $\mu$ gあたりの相対的細胞数を概算するための判断基準として使用することができる。使用するハウスキーピング遺伝子のセットがわずかに異なることと、発現レベルの測定にLightCyclerシステムを使用したことを除いて、標準化操作は基本的に「RNA Master Blot User Manual, Appendix C」(1997, Clontech Laboratories, 米国カリフォルニア州パロアルト)に記載されているものと同じとした。簡単に述べると、LightCyclerと一定量(25 $\mu$ g)の出発RNAとを使って、全ての試料における上記5種類のハウスキーピング遺伝子の発現レベルを、1遺伝子につき3つの独立した反応で測定した。同時に反応させた既知濃度の標品と比較することによって得られる各遺伝子に関するコピー数の計算値を記録し、全ての組織試料におけるその遺伝子のコピー数の和のパーセンテージに変換した。次に、各組織試料について、各遺伝子に関する前記パーセンテージ値の和を計算し、各組織に関するパーセンテージ値の和を、基準として恣意的に選択した一組織のパーセンテージ値の和で割ることによって、標準化係数を計算した。組織試料中の特定の遺伝子の発現に関して実験的に得られる値を標準化するために、得られた値に、試験した組織に関する標準化係数を掛けた。結果を図3に記載する。図3では、実験的に得た第一鎖cDNA 10ngあたりのmRNAのコピー数が左側に、そして標準化された値が右側に示されている。cDNA合成に使用したRNAを、その供給者およびカタログ番号と共に、表1に示す。

20

30

#### 【0186】

#### 【表1】

40

## 全身スクリーン組織

組織	供給者	パネル名およびカタログ番号
1. 脳	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. 心臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. 腎臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. 肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. 肺	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. 気管	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. 骨髄	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
8. 結腸	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
9. 小腸	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
10. 脾臓	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
11. 胃	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
12. 胸腺	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
13. 乳腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
14. 骨格筋	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
15. 前立腺	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
16. 精巣	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
17. 子宮	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
18. 小脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
19. 胎児脳	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
20. 胎児肝臓	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
21. 脊髄	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
22. 胎盤	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
23. 副腎	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
24. 膵臓	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
25. 唾液腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
26. 甲状腺	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1

10

20

30

## 【0187】

図3に示すように、B7-H2は、試験した限りにおいて、全ての組織タイプで広く発現しており、最も高い発現は肝臓、腎臓、脳、心臓、胎盤、脊髄、乳腺、および肺に見られた。

## 【0188】

## 実施例3

## ヒトB7-H2の発現

チャニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中で大量の組換えヒトB7-H2様ポリペプチドを産生させるために、発現ベクター-pcDNA3.1ベクター(Invitrogen, カリフォルニア州カールスバッド)を使用する。ヒトB7-H2をコードするDNA配列は配列番号1または2から導く。ベクター-pcDNA3.1への挿入に先立って、DNA配列がB7-H2およびIg融合遺伝子を含むように、B7-H2の細胞外ドメインのcDNAをヒトIgG1のCH2-CH3部分にインフレームで融合することにより、周知の方法でDNA配列に改変を加える。さらに、制限エンドヌクレアーゼの認識配列を両端に付加し、対応する制限酵素でpcDNA3.1のマルチクローニング部位を消化した後、改変したDNA配列をpcDNA3.1中にライゲートする。得られたpHB7-H2 Igベクターを使って、B7-H2陰性細胞株であるCHO細胞をトランスフェクトする。

40

## 【0189】

5リットルの振とうフラスコ中、通常の条件下に、細胞を培養し、分泌された組換え生産タンパク質(B7-H2 Ig)を精製し、次の実施例で使用する。

## 【0190】

## 実施例4

50

### B7-H2の共刺激によるT細胞増殖

T細胞を健常献血者のヒトPBMCから精製し、至適用量未満の抗CD3 mAbの存在下に、実施例3で得たB7-H2 Igで刺激する。3日間の培養後に、<sup>3</sup>H-TdRの取込みによって、T細胞増殖を決定する。B7-H2 Igは、固定化抗CD3 mAbの存在下で、対照Igと比較して、T細胞増殖を増進する。

【0191】

#### 実施例5

##### B7-H2共刺激によるサイトカイン分泌

B7-H2Igおよび至適用量の抗CD3 mAbの刺激によるT細胞培養上清中のサイトカイン（例えばIL-2、IL-4、およびIL-10）のレベルをサンドイッチELISAによって決定する。至適用量の抗CD3 mAbの存在下でB7-H2Igによって共刺激されたT細胞は、IL-4およびIL-10のレベルを増加させる。

【0192】

#### 実施例6

##### ヒトICOSの発現

チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞中で大量の組換えヒトICOSポリペプチドを産生させるために、発現ベクター-pcDNA3.1ベクター（Invitrogen, カリフォルニア州カールスバッド）を使用する。ヒトICOSをコードするDNA配列はGenBankアクセッション番号AB0231353の配列から導く。

【0193】

ベクター-pcDNA3.1への挿入に先立って、DNA配列がICOSおよびIg融合遺伝子を含むように、ICOSの細胞外ドメインのcDNAをヒトIgG1のCH2-CH3部分にインフレームで融合することにより、周知の方法でDNA配列に改変を加える。さらに、制限エンドヌクレアーゼの認識配列を両端に付加し、対応する制限酵素でpcDNA3.1のマルチクローニング部位を消化した後、改変したDNA配列をpcDNA3.1中にライゲートする。得られたphICOS Igベクターを使って、CHO細胞をトランスフェクトする。

【0194】

5リットルの振とうフラスコ中、通常の条件下に、細胞を培養し、分泌された組換え生産タンパク質（ICOS Ig）を精製し、次の実施例で使用する。

【0195】

#### 実施例7

##### ICOSの共刺激によるB細胞増殖

B細胞中で組換えヒトB7-H2 V1およびB7-H2 V2ポリペプチドを産生させるために、発現ベクター-pcDNA3.1ベクター（Invitrogen, カリフォルニア州カールスバッド）を使用する。ヒトB7-H2 V1およびB7-H2 V2 DNA配列は、それぞれ配列番号1または2から導く。

【0196】

ベクター-pcDNA3.1への挿入に先立って、各DNA配列がその5'末端に開始コドンを、そしてその3'末端に停止コドンを含むように、周知の方法により、DNA配列に改変を加える。さらに、制限エンドヌクレアーゼの認識配列を両端に付加し、対応する制限酵素でpcDNA3.1のマルチクローニング部位を消化した後、改変したDNA配列をpcDNA3.1中にライゲートする。得られたphB7-H2 V1ベクターまたはphB7-H2 V2ベクターを使って、健常献血者のヒトPBMCから精製したB細胞をトランスフェクトする。

【0197】

5リットルの振とうフラスコ中、通常の条件下に、細胞を培養し、組換え生産タンパク質（B7-H2 V1またはB7-H2 V2）を含むトランスフェクタントを得る。次に、そのようにして得たB細胞を、至適用量未満の抗CD3 mAbの存在下に、実施例6で得たICOS Igで刺激する。3日間の培養後に、<sup>3</sup>H-TdRの取込みによって、B細胞増殖を決定する。ICOS Igは、固定化抗CD3 mAbの存在下で、対照Igと比較して、B細胞増殖を増進する。

【0198】

#### 実施例8

10

20

30

40

50

### ICOS共刺激によるサイトカイン分泌

ICOS Igおよび至適用量の抗CD3 mAbの刺激によるトランスフェクタントB細胞培養上清中のサイトカイン(例えばIL-2、IL-4、およびIL-10)のレベルをサンドイッチELISAによって決定する。至適用量の抗CD3 mAbの存在下でICOSIgによって共刺激されたB細胞は、一部のサイトカインのレベルを変化させる。

【0199】

#### 実施例9

ヒトB7-H2ポリペプチドに結合する被験化合物の同定

グルタチオン-S-トランスフェラーゼタンパク質を含む精製ヒトB7-H2タンパク質を、96穴マイクロタイタープレートのグルタチオン誘導体化ウェルに吸収吸着させたものを、生理緩衝溶液中、pH7.0で、小分子ライブラリーの被験化合物と接触させる。ヒトB7-H2ポリペプチドは配列番号2に示すアミノ酸配列を含む。被験化合物は蛍光タグを含む。試料を5分間~1時間インキュベートする。対照試料を被験化合物の不在下でインキュベートする。

【0200】

被験化合物を含む緩衝溶液をウェルから洗い流す。ヒトB7-H2ポリペプチドに対する被験化合物の結合を、ウェルの内容物の蛍光測定によって検出する。被験化合物をインキュベートしていないウェルの蛍光と比較して、ウェル中の蛍光を少なくとも15%増加させる被験化合物を、ヒトB7-H2ポリペプチドに結合する化合物であると同定する。

【0201】

#### 実施例10

ヒトB7-H2遺伝子発現を調整する被験化合物の同定

ヒトB7-H2発現コンストラクトをトランスフェクトしたヒト細胞の培養物に被験化合物を投与し、37℃で10~45分間インキュベートする。トランスフェクトされていない同じタイプの細胞の培養物を、被験化合物なしで同じ時間インキュベートして、陰性対照とする。

【0202】

それら2つの培養物から、Chirgwinら, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979に記載されているように、RNAを単離する。20~30µgの全RNAを使ってノーザンプロットを調製し、<sup>32</sup>P標識したヒトB7-H2特異的プローブと、Express-hyb (CLONTECH) 中、65℃でハイブリダイズさせる。このプローブは、配列番号1または2の相補鎖から選択される少なくとも11個の連続するヌクレオチドを含む。被験化合物が存在しない場合に得られるシグナルと比較して、ヒトB7-H2特異的シグナルを減少させる被験化合物を、ヒトB7-H2遺伝子発現の阻害剤であると同定する。

【0203】

#### 参考文献

1. Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. および Ohara, O. 「未同定ヒト遺伝子のコード配列の予測10. インビトロで大きいタンパク質をコードする脳由来の100個の新規cDNAクローンの全配列 (Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro)」 *DNA Res.* 5(3), 169-176 (1998).
2. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, Leonard JP, Hunter SE, Zollner R, Thomas JL, Miyashiro JS, Jacobs KA, Collins M. 「最先端: ICOS受容体に機能的に結合する新規B7様タンパク質GL50の同定 (Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor)」 *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1653-7.
3. Mages HW, Hutloff A, Heuck C, Buchner K, Himmelbauer H, Oliveri F, Kroczeck RA. 「ネズミICOSの分子クローニングおよび特徴づけならびにB7hがICOSリガンドであることの確認 (Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand)」 *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1040-7.
4. Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, Sonnenberg M,

10

20

30

40

50

Boone T, Brankow D, Dai T, Delaney J, Han H, Hui A, Kohno T, Manoukian R, Whoriskey JS, Coccia MA. 「新しいヒトB7関連タンパク質の特徴づけ：B7RP-1は共刺激タンパク質 ICOSに対するリガンドである (Characterization of a new human B7-related protein : B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS)」 *Int Immunol.* 2000 Oct;12(10):1439-47.

5. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P, Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi, G. 「B7RP-1およびICOSによるT細胞共刺激 (T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS)」 *Nature.* 1999 Dec 16;402(6763):827-32. 10

【 0 2 0 4 】

6. Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, Sonnenberg M, Boone T, Brankow D, Dai T, Delaney J, Han H, Hui A, Kohno T, Manoukian R, Whoriskey JS, Coccia MA. 「新規ヒトB7関連タンパク質の特徴づけ：B7RP-1は共刺激タンパク質 ICOSに対するリガンドである (Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS)」 *Int Immunol.* 2000 Oct;12(10):1439-47.

7. Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, Chen L. 「ICOSを結合するB7様分子B7-H2によるT細胞の共刺激 (Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS)」 *Blood.* 2000 Oct 15;96(8):2808-13. 20

8. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. 「ICOSは構造的および機能的にCD28に関連する誘導性T細胞共刺激因子である (ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28)」 *Nature.* 1999 Jan 21;397(6716):263-6.

9. McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. 「マウス誘導性共刺激分子 (ICOS) 発現はCD28共刺激によって増進されCD4(+) T細胞の分化を調節する (Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4(+) T cells)」 *J Immunol.* 2000 Nov 1;165(9):5035-40. 30

10. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. 「効果的なT細胞依存性免疫応答にはCD28関連分子ICOSが必要である (The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses)」 *Immunity.* 2000 Jul;13(1):95-105.

【 0 2 0 5 】

11. David P. Harris, Laura Haynes, Peter C. Sayles, Debra K. Duso, Sheri M. Eaton, Nancy M. Lepak, Lawrence L. Johnson, Susan L. Swain, Frances E. Lund. 「エフェクターB細胞およびT細胞による偏向したサイトカイン産生の相互調節 (Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells)」 *Nature Immunology.* 2000 Dec;1(6):475-482. 40

12. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. 「インターロイキン12および腫瘍壊死因子 はリステリア症を持つ重症複合型免疫不全マウスにおけるナチュラルキラー細胞によるインターフェロン 産生の共刺激因子であり、インターロイキン10は生理的アンタゴニストである (Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist)」 *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993 Apr 15;90(8):3725-9.

13. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S.およびGriffith, R. (1992) 「特定DNA配列の同時増幅および検出 (Simultaneous amplification and detection of specific DNA 50

sequences)」BioTechnology 10:413-417.

14. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G.およびWatson, R. (1993)「速度論的PCR解析: DNA増幅反応の実時間モニタリング (Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions)」BioTechnology 11:1026-1030.

15. T. B. Morrison, J.J. WeisおよびC.T. Wittwer. (1998)「増幅中の連続的SYBR Green Iモニタリングによる低コピー数転写物の定量 (Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification)」Biotechniques 24: 954-962.

【0206】

16. Adams, M.D., Kerlavage, A.R., Fields, C.およびVenter, C. (1993)「3400個の新規発現配列タグによりヒト脳内の転写物の多様性が確認される (3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain)」Nature Genet. 4: 256-265. 10

17. Adams, M.D.ら (1995)「8300万ヌクレオチドのcDNA配列に基づくヒト遺伝子の多様性および発現パターンの一次評価 (Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence)」Nature 377 supp:3-174.

18. Liew, C.C., Hwang, D.M., Fung, Y.W., Laurenson, C., Cukerman, E., Tsui, S.およびLee, C.Y. (1994)「発現配列タグによって同定される心血管系の遺伝子のカタログ (A catalog of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags)」Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10145-10649. 20

【図面の簡単な説明】

【0207】

【図1】本発明のヒトB7-H2選択的スプライシング変異体ヌクレオチド配列 (配列番号1または配列番号2) とB7-H2の他の変異体とのアラインメントを示す図である。

【図2】本発明のヒトB7-H2選択的スプライシング変異体アミノ酸配列 (配列番号3または4) とB7-H2の他の変異体とのアラインメントを示す図である。

【図3】B7-H2転写物1または2 mRNAの発現プロファイリングを示す図である。

【 1 - 1 】

Fig. 1 B7-H2選択的サブライシニング変異体ヌクレオチド配列のアライメント

Table with 3 columns: Accession ID (e.g., AB014553, AF199028), Nucleotide sequence, and Position (50, 46, 22, 100, 96, 72, 72, 150, 45, 146, 122, 122, 200, 95, 176, 172).

【 1 - 2 】

Fig. 1 (続き)

Table with 3 columns: Accession ID (e.g., AB014553, AF199028), Nucleotide sequence, and Position (250, 145, 246, 222, 222, 300, 195, 296, 272, 272, 350, 245, 346, 322, 322, 400, 295, 396, 372, 372, 450, 445, 446, 422, 422).

【 1 - 3 】

Fig. 1 (続き)

Table with 3 columns: Accession ID (e.g., AB014553, AF199028), Nucleotide sequence, and Position (500, 395, 496, 472, 472, 550, 445, 546, 522, 522, 600, 495, 595, 572, 572, 650, 646, 622, 622, 700, 595, 696, 672, 672).

【 1 - 4 】

Fig. 1 (続き)

Table with 3 columns: Accession ID (e.g., AB014553, AF199028), Nucleotide sequence, and Position (750, 645, 746, 722, 722, 800, 695, 796, 772, 772, 850, 745, 846, 822, 822, 900, 795, 896, 872, 872, 950, 845, 946, 922, 922).

【 1 - 5 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAAAC	AGCTATGCAG	GTCCCTGGGC	1000
AF199028	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAAAC	AGCTATGCAG	GTCCCTGGGC	895
AF289028	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAAAC	AGCTATGCAG	GTCCCTGGGC	972
B7H2_V1	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAAAC	AGCTATGCAG	GTCCCTGGGC	998
B7H2_V2	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAAAC	AGCTATGCAG	GTCCCTGGGC	972
AB014553	TGTGATCCG	GAGACAGAGC	TCACTGTGTA	GTTTGGCGTG	GGAAAGCAGA	1050
AF199028	TGTGATCCG	GAGACAGAGC	TCACTGTGTA	GTTTGGCGTG	GGAAAGCAGA	945
AF289028	TGTGATCCG	GAGACAGAGC	TCACTGTGTA	GTTTGGCGTG	GGAAAGCAGA	1022
B7H2_V1	TGTGATCCG	GAGACAGAGC	TCACTGTGTA	GTTTGGCGTG	GGAAAGCAGA	998
B7H2_V2	TGTGATCCG	GAGACAGAGC	TCACTGTGTA	GTTTGGCGTG	GGAAAGCAGA	1022
AB014553	GGTTCCTGGG	GGCCACGAGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TFTCAGAGTT	1100
AF199028	GGTTCCTGGG	GGCCACGAGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TFTCAGAGTT	995
AF289028	GGTTCCTGGG	GGCCACGAGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TFTCAGAGTT	1022
B7H2_V1	GGTTCCTGGG	GGCCACGAGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TFTCAGAGTT	998
B7H2_V2	GGTTCCTGGG	GGCCACGAGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TFTCAGAGTT	1072
AB014553	TCAAAAAACT	TTCGAAAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTTGAA	AACTGTTGTT	1150
AF199028	TCAAAAAACT	TTCGAAAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTTGAA	AACTGTTGTT	1009
AF289028	TCAAAAAACT	TTCGAAAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTTGAA	AACTGTTGTT	1022
B7H2_V1	TCAAAAAACT	TTCGAAAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTTGAA	AACTGTTGTT	998
B7H2_V2	TCAAAAAACT	TTCGAAAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTTGAA	AACTGTTGTT	1122
AB014553	CCTGGAGAGC	CAGCGAAGCC	CTCCATGGTG	CGCACGGCAT	TTCCTGCAGC	1200
AF199028	CCTGGAGAGC	CAGCGAAGCC	CTCCATGGTG	CGCACGGCAT	TTCCTGCAGC	1009
AF289028	CCTGGAGAGC	CAGCGAAGCC	CTCCATGGTG	CGCACGGCAT	TTCCTGCAGC	1022
B7H2_V1	CCTGGAGAGC	CAGCGAAGCC	CTCCATGGTG	CGCACGGCAT	TTCCTGCAGC	998
B7H2_V2	CCTGGAGAGC	CAGCGAAGCC	CTCCATGGTG	CGCACGGCAT	TTCCTGCAGC	1172

【 1 - 6 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	CTCCCTTTGG	CATGGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACITTTGT	CACACTGGGA	1250
AF199028	CTCCCTTTGG	CATGGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACITTTGT	CACACTGGGA	1009
AF289028	CTCCCTTTGG	CATGGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACITTTGT	CACACTGGGA	1022
B7H2_V1	CTCCCTTTGG	CATGGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACITTTGT	CACACTGGGA	998
B7H2_V2	CTCCCTTTGG	CATGGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACITTTGT	CACACTGGGA	1222
AB014553	TGGGATTTTC	CCAACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1300
AF199028	TGGGATTTTC	CCAACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1009
AF289028	TGGGATTTTC	CCAACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1022
B7H2_V1	TGGGATTTTC	CCAACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	998
B7H2_V2	TGGGATTTTC	CCAACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1272
AB014553	GGGCTCCCCA	GTGCCAGCC	CCGACGAGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1350
AF199028	GGGCTCCCCA	GTGCCAGCC	CCGACGAGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1009
AF289028	GGGCTCCCCA	GTGCCAGCC	CCGACGAGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1022
B7H2_V1	GGGCTCCCCA	GTGCCAGCC	CCGACGAGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	998
B7H2_V2	GGGCTCCCCA	GTGCCAGCC	CCGACGAGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1322
AB014553	ACGGGGCCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCGGG	AFTGGGTCCA	GGCACCGGG	1400
AF199028	ACGGGGCCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCGGG	AFTGGGTCCA	GGCACCGGG	1009
AF289028	ACGGGGCCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCGGG	AFTGGGTCCA	GGCACCGGG	1022
B7H2_V1	ACGGGGCCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCGGG	AFTGGGTCCA	GGCACCGGG	998
B7H2_V2	ACGGGGCCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCGGG	AFTGGGTCCA	GGCACCGGG	1372
AB014553	CCCAGCCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	CGGCCAGCC	1450
AF199028	CCCAGCCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	CGGCCAGCC	1009
AF289028	CCCAGCCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	CGGCCAGCC	1022
B7H2_V1	CCCAGCCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	CGGCCAGCC	998
B7H2_V2	CCCAGCCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	CGGCCAGCC	1422

【 1 - 7 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	CCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GTCACAGGCA	CGGGGCCCCA	GCCCCCATGG	1500
AF199028	CCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GTCACAGGCA	CGGGGCCCCA	GCCCCCATGG	1009
AF289028	CCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GTCACAGGCA	CGGGGCCCCA	GCCCCCATGG	1022
B7H2_V1	CCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GTCACAGGCA	CGGGGCCCCA	GCCCCCATGG	998
B7H2_V2	CCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GTCACAGGCA	CGGGGCCCCA	GCCCCCATGG	1436
AB014553	GFTGTCCGGA	GTCAGGTCAG	GCACCGGCGC	CCAGCCCCCG	TGGGGTGTCC	1550
AF199028	GFTGTCCGGA	GTCAGGTCAG	GCACCGGCGC	CCAGCCCCCG	TGGGGTGTCC	1009
AF289028	GFTGTCCGGA	GTCAGGTCAG	GCACCGGCGC	CCAGCCCCCG	TGGGGTGTCC	1022
B7H2_V1	GFTGTCCGGA	GTCAGGTCAG	GCACCGGCGC	CCAGCCCCCG	TGGGGTGTCC	998
B7H2_V2	GFTGTCCGGA	GTCAGGTCAG	GCACCGGCGC	CCAGCCCCCG	TGGGGTGTCC	1436
AB014553	AGCGGGGCTC	CAGGCACCGG	CGCCACGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	1600
AF199028	AGCGGGGCTC	CAGGCACCGG	CGCCACGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	1009
AF289028	AGCGGGGCTC	CAGGCACCGG	CGCCACGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	1022
B7H2_V1	AGCGGGGCTC	CAGGCACCGG	CGCCACGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	998
B7H2_V2	AGCGGGGCTC	CAGGCACCGG	CGCCACGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	1443
AB014553	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGGC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1650
AF199028	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGGC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1009
AF289028	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGGC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1022
B7H2_V1	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGGC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	998
B7H2_V2	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGGC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1493
AB014553	TTTGCCCCCTC	AGTTCACGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1700
AF199028	TTTGCCCCCTC	AGTTCACGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1009
AF289028	TTTGCCCCCTC	AGTTCACGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1022
B7H2_V1	TTTGCCCCCTC	AGTTCACGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1036
B7H2_V2	TTTGCCCCCTC	AGTTCACGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1543

【 1 - 8 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	GGGAAAATG	TCCACACAG	GTCACCCAC	TGGCAGGTGC	CTCTGGGTGC	1750
AF199028	GGGAAAATG	TCCACACAG	GTCACCCAC	TGGCAGGTGC	CTCTGGGTGC	1009
AF289028	GGGAAAATG	TCCACACAG	GTCACCCAC	TGGCAGGTGC	CTCTGGGTGC	1022
B7H2_V1	GGGAAAATG	TCCACACAG	GTCACCCAC	TGGCAGGTGC	CTCTGGGTGC	1064
B7H2_V2	GGGAAAATG	TCCACACAG	GTCACCCAC	TGGCAGGTGC	CTCTGGGTGC	1571
AB014553	AAGGGCGCT	GGGCTTCGCA	GGCAGGCCAG	CCGGCTCCC	CGCCATGGGC	1800
AF199028	AAGGGCGCT	GGGCTTCGCA	GGCAGGCCAG	CCGGCTCCC	CGCCATGGGC	1009
AF289028	AAGGGCGCT	GGGCTTCGCA	GGCAGGCCAG	CCGGCTCCC	CGCCATGGGC	1022
B7H2_V1	AAGGGCGCT	GGGCTTCGCA	GGCAGGCCAG	CCGGCTCCC	CGCCATGGGC	1064
B7H2_V2	AAGGGCGCT	GGGCTTCGCA	GGCAGGCCAG	CCGGCTCCC	CGCCATGGGC	1571
AB014553	CAGGATCCC	TCCGAGCCCT	GTTTCCCGCC	CAGGAGAAGG	GGTTCGCCCG	1850
AF199028	CAGGATCCC	TCCGAGCCCT	GTTTCCCGCC	CAGGAGAAGG	GGTTCGCCCG	1009
AF289028	CAGGATCCC	TCCGAGCCCT	GTTTCCCGCC	CAGGAGAAGG	GGTTCGCCCG	1022
B7H2_V1	CAGGATCCC	TCCGAGCCCT	GTTTCCCGCC	CAGGAGAAGG	GGTTCGCCCG	1064
B7H2_V2	CAGGATCCC	TCCGAGCCCT	GTTTCCCGCC	CAGGAGAAGG	GGTTCGCCCG	1571
AB014553	GGACAGTGG	CTCAGGGTGT	GGCAGCCAC	CACGCTGTGG	TGTCACTGT	1900
AF199028	GGACAGTGG	CTCAGGGTGT	GGCAGCCAC	CACGCTGTGG	TGTCACTGT	1009
AF289028	GGACAGTGG	CTCAGGGTGT	GGCAGCCAC	CACGCTGTGG	TGTCACTGT	1022
B7H2_V1	GGACAGTGG	CTCAGGGTGT	GGCAGCCAC	CACGCTGTGG	TGTCACTGT	1064
B7H2_V2	GGACAGTGG	CTCAGGGTGT	GGCAGCCAC	CACGCTGTGG	TGTCACTGT	1571
AB014553	GGACCCAGGC	GAGCTGATGG	CCGACCCGAG	AAAGGCATT	CCAAGGCCAG	1950
AF199028	GGACCCAGGC	GAGCTGATGG	CCGACCCGAG	AAAGGCATT	CCAAGGCCAG	1009
AF289028	GGACCCAGGC	GAGCTGATGG	CCGACCCGAG	AAAGGCATT	CCAAGGCCAG	1022
B7H2_V1	GGACCCAGGC	GAGCTGATGG	CCGACCCGAG	AAAGGCATT	CCAAGGCCAG	1064
B7H2_V2	GGACCCAGGC	GAGCTGATGG	CCGACCCGAG	AAAGGCATT	CCAAGGCCAG	1571

【 1 - 9 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	GTCGGCCCAT	CCAGATGATG	CAGGAACACA	GCTTGCTAAA	AAACAGGGCG	2000
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GCCTGTTCC	GTCGGAGCA	GTCGAAGTTC	CTGGAACAGG	CGCTGTTTTC	2050
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CGAAGCTTTA	AACCTGTGT	TTCACCAAG	CTGAGTCTTC	AGAAAACCGG	2100
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CGTCTGCCCTG	CAGAAGGAA	AGGGGTGCTT	CATGTTCCCTC	TCTCTCCTTC	2150
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ATCTCCCTTC	CAAGGCCACG	TTTGACCGA	GCTCACCGCC	CAGAGCTGG	2200
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 10 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	ACAGGCTTC	CCTGAGACGC	CACCGTGAGA	GGCCAGGTGG	CAGCTTGAGC	2250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1108
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ATGGACTCC	AGACTGCAGG	GGACACTTG	GGCAGCCCC	CAGAAGGACC	2300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1158
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACTGTGGAT	CCCAGGGAGA	ACCTGTGGC	GTTGGCTGTG	ATCCTGGAAAT	2350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1208
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GAGGCCCTTT	CAAAAGGCTC	ATCCACCCA	AAGGAAAATG	TCCCAGATG	2400
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1258
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	AGTGGCTCC	CCGCTGTAC	TGCCAGTAC	CCACAGAAAG	GGACTGGTCA	2450
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1308
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 11 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	TGGGCTGTCT	CTACCCGGAG	CGTGGGGAT	TCAGCACCCAG	GCTCTTCCCA	2500
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1358
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GTACCCACA	CCCAGTGG	GTCTTCCCGT	GGGATGCGGG	ATCCTGAGAC	2550
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1408
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CGAAGGTGT	TTGGTTAAA	AGAAGACTG	GGCTCCCGT	CTTCCAGGAC	2600
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1458
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GGCTCTGTG	CTGCTGGGT	CAGCGAGGC	TGTTTGCAGG	GGACACGGTC	2650
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1508
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACAGGAGTC	TTCTGCCCTG	AACGTTCCA	ACCTGCCTCC	CGCCCGGAAG	2700
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1556
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 12 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	CCACAGACC	CACATGATG	TGTGCCACA	AGTAPAGTTA	GCCGTCCACA	2750
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CCGAGGACC	CCCGAAGTC	CCCAGTGGC	TTCAGTGTCC	TCTGCCACAT	2800
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TCCCTGGAG	GAACAATGC	CCTCGGCTGT	TCCGGTAAA	AGTTGAGCCA	2850
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CCFTTGAAG	ACGACGGGT	GGAGTTTGC	AGAAAAGG	CTGTGCCAGG	2900
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GGCTGTGTTG	GCTTACAGGG	CTGCCGGGC	TCTTGGCTCT	GCAGCGAGAA	2950
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 3 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	AGACACAGCC	CAGCAGGGCT	GGAGACGCC	ATGTCCAGCA	GGCGCAGGCC	3000
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TGGCAACACG	GTCCCCAGAG	TCCTGAGCAG	CAGTTAGGTG	CATGGAGAGG	3050
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GTAATCACCTG	GTGGCCACAG	TCCCCCTTCT	CACCTCAGCA	ATGATCCCCA	3100
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	AAAGTGAGAG	TGGTCCCCC	GGCCCCACC	ACCTCAGCA	GCCCCACCCC	3150
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACTCAACCTT	GAGGTCCCC	AGGFTCTCGA	TGAAGACCTC	CGACCCCGAC	3200
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 5 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	TCITTACTTCC	CAGAAATCCC	TGACATTCCC	AGGFTCAGCC	AGGACCTGTT	3500
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACAGCCCTGG	TCACITGGAA	CTGACAGCTG	TGTGAGGCTT	GCACTTCTCA	3550
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GACCCAGACT	TAGAACAAA	GGAGAGTGA	GGACTCAAGG	CTACAAATGAG	3600
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GTCCAGTAC	TGTGTACAG	AAATGGTTT	TCTCAAAA	AGTCCCTAC	3650
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CTGGCCCTTT	AGGTGANTGT	GGATCCACT	CCCGTTTTTA	ACATGAAAGC	3700
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 4 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	GCCAGGCTCC	TCCGAGCCCA	ACAGTCCCAA	GGGGCAGGTG	TTGAGGGGTA	3250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CAGCCCTGGG	CCCTGACCAG	CCCCGGCACC	TGCCATGCTG	GTTCCCGGAA	3300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TGAATCAGCT	GCTGACTGTC	TCCAGAAGGG	CTGGAAGGA	TGCTGCCAGG	3350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TGACCCGAGG	TGCACCTGCC	CCAGGGAGAT	GGAGTAGACA	GCCTGGCCTG	3400
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GCCTCGGA	CACATTGTCT	GCCCCGGGAC	TATGGGAAA	TGCCCTCCT	3450
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 6 】

Fig. 1 ( 続き )

AB014553	ATTAGAGAT	GTCTGGTGT	TATAAAGAA	CAGTTGTCAI	CACCGGGCAT	3750
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TGATTGGCAG	GGACAAGGAG	CTGCTTGGGT	GTGAAAAGTT	GGGGCTTGG	3800
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	AAAGTGGCT	GTGGTGCCCA	TTTGCACTGA	CTGTAAAGTG	ACTCCAGGAC	3850
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GGACCTGGG	GGGCACCCAG	AGGTCTAAG	CCCCAGGACT	GAGGGTGGTG	3900
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CATCACCACT	CGGGTGTCCC	GGGAGTGGC	CTGGGCCCGG	GGACCTCACA	3950
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 7 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	GGCAGGACGG	CGACACTAAT	GCAGGAGAG	GGAGTCTGGC	CCCAGCTTTT	4000
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CTTATCAGAG	GGGATTTTCC	TTCACCAGG	GATGGGACG	AAAGAGCAG	4050
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GGGCCCAGA	AGCTTCTGTC	CCTCATGCCT	GAGGGCACGG	GGGACACTTG	4100
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GAGGCTGCTG	TCACCACATG	CGTCCCAAG	CCATGCTCTC	TGCGGGTCAG	4150
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	TGCTGAGTC	TGCGCTCCCT	GCTGGTCCCT	GAAGCCCCCT	CAGAAAGCCCT	4200
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 1 - 1 8 】

Fig. 1 (続き)

AB014553	GCCTGTCAAG	TGCGCAATTTG	TGAGACCTAC	CCTGTAACGC	CTGCCCTCT	4250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CAGCCCAACA	TCAGCTTCCT	CTTTCTCCCT	TGCTGTAGAC	AGGCTGGATT	4300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CCAGTGTGG	GACAGCATC	TCCAGAAAC	TGACTTAAGA	GAGTAAGATG	4350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CAAAATCGT	-----	-----	-----	-----	4358
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

【 2 - 1 】

Fig. 2

B7-H2選択的スプライシング変異体アミノ酸配列のアラインメント

BAA31628	AVRADLRPE	VAPLRGLPRP	KFSAPRGLRA	PRSPRPVESA	RTMRIGSPEGL	50
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	8
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	8
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	8
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	8
BAA31628	LFLLFSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQISE	100
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	58
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	58
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	58
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	58
BAA31628	SKTVVTYHIP	QNSSENVD	RYRREALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	150
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	108
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	108
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	108
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	108
BAA31628	QKPHCLVLSQ	SLGFQEVLSV	EVTLHVAANE	SFVVSAPHS	PSODELATTC	200
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	158
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	158
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	158
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	158

【 2 - 2 】

Fig. 2 (続き)

BAA31628	TSINGYPRN	VYWINKTDS	LDDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VSVLRIART	250
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	208
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	208
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	208
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	208
BAA31628	PSVNIACCIE	NVLLQNLTV	GSQTGNIDIGE	RDKITENPVS	TGKNAATWS	300
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	258
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	258
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	258
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	258
BAA31628	ILAVLCLLVV	VAVAIQWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	TGFAVYGSSR	350
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	308
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	308
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	299
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	308
BAA31628	FWAQGRIGC	QLSFRVSKNF	QKAKVPCLEQ	LLFLETQRP	RWCARHFLQP	400
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	309
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	302
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	299
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	358
BAA31628	PLGMGWHPGV	HFVTLRWDFP	NMHSRETS	RPPRSVPSP	DQGVQGSRH	450
AAF34739	-----	-----	-----	-----	-----	309
AAG01176	-----	-----	-----	-----	-----	302
B7H2_V1aa	-----	-----	-----	-----	-----	298
B7H2_V2aa	-----	-----	-----	-----	-----	408

【 2 - 3 】

Fig. 2 ( 続き )

BAA31628	RRPAPMGCPB	WVQAPAPSPR	GVSRRAGPTG	AQPPWGVQGG	SRHRRPAPMG	500
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
ARG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	RRPAPMGCPB	WVQAPAPSPR	GVSRRAGPTG	AQP.....	.....	299
B7H2_V2aa	.....	.....	.....	.....	.....	441
BAA31628	CPEWVQAPAP	SPRGVSRAGP	GTGAQPLMGV	WSSGSHRQLL	SVAATPAALV	550
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
ARG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	299
B7H2_V2aa	.....	.....	.....	.....	.....	465
BAA31628	CPSVFCAT	.....	.....	.....	.....	558
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
ARG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	304
B7H2_V2aa	.....	.....	.....	.....	.....	473

【 3 】

Fig. 3

試料名	細胞名	読取回数	読取回数
試料1	脳-1	1826	1826
試料2	心臓-1	347.5	1743
試料3	腎臓	1853	3083
試料4	肝臓-1	391.9	3274
試料5	肺	934.6	837
試料6	気管	38.42	531
試料7	骨髄-1	337	17
試料8	膵臓	364.4	286
試料9	小腸	822.7	398
試料10	脾臓-1	416.6	568
試料11	胃	264.5	236
試料12	膵臓-1	157.7	1384
試料13	乳腺	427.1	443
試料14	前立腺-1	216.2	154
試料15	骨髄-1	811.4	282
試料16	精巣	367	469
試料17	子宮	697.6	775
試料18	小腸	210.2	150
試料19	胎児膵	107.5	71
試料20	胎児肝臓-1	1132	1392
試料21	精巣	1036	1467
試料22	陰茎-1	1111	135
試料23	副腎	30.07	293
試料24	膵臓-1	285.2	534
試料25	唾液腺	174	409
試料26	甲状腺		

【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  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/053733 A2

(51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/47, G01N 33/68

(21) International Application Number: PCT/EP02/00028

(22) International Filing Date: 4 January 2002 (04.01.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/259,632 4 January 2001 (04.01.2001) US

(71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ENCINAS, Jeffrey [US/JP]; 3-17-15 Ayanokicho-Kitu, Nara, Nara 631-0032 (JP); TANABE, Eri [JP/JP]; 1-8-7 Gakkocho, Nara, Nara 631-0036 (JP); WATANABE, Shinichi [JP/JP]; 6-3-1-504 Jinguu, Nara, Nara 631-0804 (JP).

(74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(81) Designated States (national): AF, 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, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KI, 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, SI, TR), OAPI patent (BF, BJ, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations: AE, AG, AL, AM, AN, 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, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, 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, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, SN, TD, TG)

— as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(ii)) for all designations

Published:

without international search report and to be republished upon receipt of that report

— entirely in electronic form (except for this front page) and available upon request from the International Bureau with sequence listing part of description published separately in electronic form and available upon request from the International Bureau

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 02/053733 A2

(54) Title: REGULATION OF HUMAN B7-H2 PROTEIN

(57) Abstract: Reagents which regulate human B7-H2 and reagents which bind to human B7-H2 gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, allergic diseases, such as respiratory allergies, food allergies, asthma, and atopic dermatitis, as well as in the treatment of intracellular bacterial infections, such as tuberculosis, leprosy, listeriosis, and salmonellosis; and autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and type I diabetes, as well as in the treatment of helminth and extracellular microbial infections.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 1 -

**REGULATION OF HUMAN B7-H2 PROTEIN****TECHNICAL FIELD OF THE INVENTION**

5 The invention relates to nucleotide and amino acid sequences of human B7-H2 and to the regulation of the same.

**BACKGROUND OF THE INVENTION**

10 B7 family ligands, expressed on antigen presenting cells, are the counter-ligands for several receptors expressed on T lymphocytes. Costimulatory interactions between the B7 family ligands and their receptors play critical roles in the growth, differentiation, and death of T cells. Engagement of the T-cell costimulator CD28, constitutively expressed on resting T cells, by its natural ligands B7-1 and B7-2  
15 increases antigen-specific proliferation of CD4<sup>+</sup> T cells, enhances production of cytokines, induces maturation of CD8<sup>+</sup> effector T cells (Chambers CA, Allison JP. (1997) Co-stimulation in T cell responses. *Curr Opin Immunol.*, 9, 396-404; Lenschow DJ et al (1996) Bluestone JA. C28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 14, 233-258; Chen L, Linsley PS, Hellstrom KE (1993)  
20 Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today.* 14, 483-486), and promotes T-cell survival (Boise LH, Noel PJ, Thompson CB. CD28 and apoptosis. (1995) *Curr Opin Immunol.*, 7, 620-625). Another ligand, termed CTLA4 is homologous to CD28 but is not expressed on resting T cells and appears following T cell activation (Brunet, J. F., et al., (1987) *Nature* 328, 267-270). Signaling through  
25 homologous CTLA-4 receptor of B7-1 and B7-2 on activated T cells is thought to deliver a negative signal that inhibits T-cell proliferation, IL-2 production, and cell cycle progression (Krummel MF, Allison JP. (1996) CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med.*, 183, 2533-2540; Walunas TL, Bakker CY, Bluestone JA. (1996) CTLA-4  
30 ligation blocks CD28-dependent T cell activation. *J Exp Med.* 183, 2541-2550).

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 2 -

Therefore, manipulation of the B7:CD28/CTLA4 pathway offers great potential to stimulate or suppress immune responses in humans.

5 Recent studies indicate other new members of the B7-CD28 family may also participate in the regulation of cellular and humoral immune responses. One of the new members is B7-like gene designated B7-H1 (B7 homolog 1) and B7-H2 (B7 homolog 2). B7-H2 binds an inducible costimulator (ICOS), a homolog of the B7-1 and B7-2 receptors CD28 and CTLA-4 (CD152).

10 The transcript of the B7-H2 gene was originally described by the Kazusa DNA institute as a cDNA clone derived from Homo sapiens adult male brain (ref 1). Recently, however, owing to the homology between B7-H2 and the costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86), it was found that B7-H2 is a ligand for ICOS, a homolog of the B7-1 and B7-2 receptors CD28 and CTLA-4 (CD152) (refs. 15 2-7).

ICOS is a costimulatory receptor whose expression is upregulated on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells after T cell receptor stimulation (refs. 8-10). Stimulation of ICOS is thought to induce the production of IL-10 cytokine production, and to a lesser extent 20 to increase production of IL-4, IL-5, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , and GM-CSF, as well as to promote the function of activated Th2 helper cells (refs. 9, 10). The ICOS gene has been reported to be expressed predominantly in primary and secondary lymphoid tissues (ref. 3)

25 There is a need in the art to identify novel variants of B7-H2 proteins which can be regulated and provide therapeutic options.

#### SUMMARY OF THE INVENTION

30 It is an object of the invention to provide novel polynucleotides encoding novel polypeptides of B7-H2 splice variants (B7-H2 V), or biologically active derivatives

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 3 -

thereof. The polynucleotides of the present invention have the polynucleotide sequence selected from the group consisting of the sequence as depicted in SEQ ID NO:1, the polynucleotide sequence which hybridizes to the sequence as depicted in SEQ ID NO:1 under the stringent condition, the sequence as depicted in SEQ ID NO:2, and the polynucleotide sequence which hybridizes to the sequence as depicted in SEQ ID NO:2 under the stringent condition.

The polypeptide of the present invention comprises the amino acid sequence selected from the group consisting of the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO:3, amino acid sequences wherein a substitution, deletion, addition or transposition of one to several amino acid residue(s) is made in SEQ ID NO:3, the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO:4, amino acid sequences wherein a substitution, deletion, addition, or transposition of one to several amino acid residue (s) is made in SEQ ID NO:4.

It is also an object of the present invention to provide reagents and methods of regulating a human B7-H2. This and other objects of the invention are provided by one or more of the embodiments described below.

One embodiment of the invention is a method of screening for agents which can regulate the activity of a human B7-H2. A test compound is contacted with a polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least about 90% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3 or 4. Binding of the test compound to the polypeptide is detected. A test compound which binds to the polypeptide is thereby identified as a potential therapeutic agent for regulating activity of the human B7-H2.

Another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate an activity of a human B7-H2. A test compound is contacted with a polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least about 90% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4. A B7-H2 like activity of the

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 4 -

polypeptide is detected. A test compound that decreases the B7-H2 like activity is thereby identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of the human B7-H2. A test compound which increases the B7-H2 like activity of the polypeptide is thereby identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of the human B7-H2.

Yet another embodiment of the invention is a method of screening for agents which regulate an activity of a human B7-H2. A test compound is contacted with a product encoded by a polynucleotide which comprises a nucleotide sequence which is at least 90% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2. Binding of the test compound to the product is detected. A test compound which binds to the product is thereby identified as a potential therapeutic agent for regulating the activity of the human B7-H2.

Even another embodiment of the invention is a method of reducing activity of a human B7-H2. A cell is contacted with a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is at least 90% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2. The activity of the human B7-H2 is thereby reduced.

Another embodiment of the invention is a pharmaceutical composition comprising a reagent which specifically binds to a product encoded by a polynucleotide comprising a nucleotide sequence which is at least 90% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2 and a pharmaceutically acceptable carrier.

Another embodiment of the invention is a pharmaceutical composition comprising an expression construct encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4 and a pharmaceutically acceptable carrier.

Yet another embodiment of the invention is an isolated and purified polynucleotide consisting essentially of the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 5 -

Still another embodiment of the invention is an isolated and purified polypeptide consisting essentially of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4.

5 Even another embodiment of the invention is a preparation of antibodies which specifically binds to a polypeptide consisting essentially of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4.

A further embodiment of the invention is a method of preparing a polypeptide consisting essentially of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4. A  
10 host cell comprising an expression construct encoding the polypeptide is cultured under conditions whereby the polypeptide is expressed. The polypeptide is isolated.

The invention thus provides a human B7-H2 which can be used to identify test  
15 compounds which may act, for example, as enhancers or inhibitors of formation of the receptor complex. Human B7-H2 and fragments thereof also are useful in raising specific antibodies which can block the protein and effectively reduce its activity.

#### **BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS**

20 FIG. 1. shows the alignment of human B7-H2 alternative splice variants, nucleotide sequences (SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:2) of the present invention with other variants of B7-H2.

FIG. 2. shows the alignment of human B7-H2 alternative splice variants, amino acid sequence (SEQ ID NO:3 or SEQ ID NO:4) of the present  
25 invention against other variants of B7-H2.

FIG. 3. shows the expression profiling of B7-H2 transcript 1 or 2 mRNA.

#### **DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION**

30 A novel human B7-H2 protein encoded by the transcript 1 (SEQ ID NO:3) (B7-H2 V1) or by the transcript 2 (SEQ ID NO:4) is a discovery of the present invention.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 6 -

The sequence of transcript 1 has a coding region 912 bp in length and has a deletion of 636bp from bases 1027 to 1662 of the KIAA0653 mRNA sequence (GenBank accession number AB014553) reported for this gene.

5

The sequence of transcript 2 has a coding region 1419 bp in length and has a deletion of 129 bp from bases 1452 to 1580 of the KIAA0653 sequence.

In addition, several nucleotide sequence differences outside of the deleted region are noted between transcript 1 or 2 and the original KIAA0653 sequence.

10

The translation of the transcript 1 clone (B7-H2 V1) gives an amino acid sequence 304 residues in length. The translation of the transcript 2 clones gives an amino acid sequence 473 residues in length.

15

The present inventors found B7-H2 expression to be high in lymphoid tissues such as the thymus and spleen, but also noted high levels of expression in the lung and gastrointestinal tissues, suggesting that ICOS may play a role in local immune responses in mucosal tissues.

20

In contrast to the limited expression of ICOS, B7-H2 was found to be expressed widely in all tissues tested, with highest expression in the liver, kidney, heart, and brain. Its wide expression compared with its ICOS receptor counterpart is consistent with a role for B7-H2 in the regulation immune responses throughout the body. By being expressed in most tissues, B7-H2 generally prevent excessive deviation of immune response toward the Th1 phenotype by stimulating activated, ICOS-expressing T cells to produce cytokines that force the response back toward a more Th2 phenotype. At the same time, B7-H2 itself can transduce a signal back into the cell on which it is expressed in order to indicate to the cell that an activated T cell is close by.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 7 -

The two new variants of B7-H2 differ from the published B7-H2 sequences primarily in their cytoplasmic domains. B7-H2 V1, with its 28-residue cytoplasmic tail, resembles most the amino acid sequences of GL-50 and B7-H2 with their short 33- and 26-residue cytoplasmic tails. B7-H2 V2, on the other hand, has a cytoplasmic tail of 197 residues, more similar in length to the cytoplasmic tail of KIAA0653, but lacks a 43 amino acid sequence that is repeated in tandem in KIAA0653. The differences in the cytoplasmic tails have potentially significant effects on signal transduction into the cell on which the B7-H2 molecules are expressed. The longer tail may, for example, signal into its cell to induce the production of Th2 promoting cytokines (ref. 11), and thereby amplify the ICOS-induced effects in the T cell, while the shorter tail has no such signaling function in itself but instead may interact with secondary signaling molecules or other molecules.

The differences in signaling between the various forms of B7-H2 can be expected to have important effects in immune responses to pathogens and in disease pathogenesis. In order for the body to defend itself against different pathogens, different types of immune responses are necessary. For some pathogens, such as intracellular bacteria, a predominantly Th1 type of response is required to control infection, while for others, such as helminthes or microbes present in the extracellular milieu, a Th2 type of response is required. Inappropriate polarization of immune responses can result in inadequate protection against infection, while unregulated overpolarization of responses can have harmful sequelae. In the case of intracellular bacterial infections, the counterregulatory cytokine IL-10 is secreted rapidly after infection to control Th1 responses (ref. 12). Such a response may rely on B7-H2 both to transmit signals into the cell on which it is expressed and to stimulate ICOS on T cells. Similarly, when a Th2 response is appropriate, the amplification of the response by signaling through B7-H2 and stimulation of ICOS may be necessary for adequate defense against a pathogen. On the other hand, in autoimmune diseases and allergic diseases, uncontrolled activation of the immune response causes tissue destruction, suffering, and sometimes life-threatening complications. Upregulated expression of B7-H2 following Th1 immune responses and downregulated expression of B7-H2

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 8 -

following Th2 immune responses is a possible method that the body can use to avoid autoimmunity and allergy after normal immune responses. The expression of different splice variants of B7-H2 may also allow different cells to respond differently according to the situation. Therefore a cell's decision on which B7-H2 variant to express and at what level may be crucial to the development and control of an appropriate immune response.

The blockage of the functions of the B7-H2 V1 and B7-H2 V2 and inhibitors for it are useful in the treatment of allergic diseases, such as respiratory allergies, food allergies, asthma, and atopic dermatitis, as well as in the treatment of intracellular bacterial infections, such as tuberculosis, leprosy, listeriosis, and salmonellosis, where a downregulation of the Th2 response and a repolarization towards a Th1 response would be beneficial. The enhancement of the functions of B7-H2 V1 and B7-H2 V2 and molecules therefor are useful in the treatment of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and type I diabetes, as well as in the treatment of helminth and extracellular microbial infections, where a repolarization towards a Th2 response is beneficial.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 9 -

Polypeptides

Human B7-H2 polypeptides according to the invention comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 or 304 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 or a biologically active variant thereof, as defined below. Alternatively, the human B7-H2 polypeptides of the present invention comprise at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, or 473 contiguous amino acids selected from the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4 or biologically active variant thereof, as defined below. A human B7-H2 polypeptide of the invention therefore can be a portion of a human B7-H2, a full-length human B7-H2, or a fusion protein comprising all or a portion of a human B7-H2.

15 Biologically Active Variants of B7-H2 V

Human B7-H2 V polypeptide variants which are biologically active, e.g., retain a ICOS binding activity, also are human B7-H2 V polypeptides. Preferably, naturally or non-naturally occurring human B7-H2 polypeptide variants have amino acid sequences which are at least about 31, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, or 70, preferably about 75, 80, 85, 90, 96, 96, or 98% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3, or SEQ ID NO:4 or a fragment thereof. Percent identity between a putative human B7-H2 polypeptide variant and an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 or 4 is determined by conventional methods. See, for example, Altschul et al., Bull. Math. Bio. 48:603 (1986), and Henikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1992). Briefly, two amino acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using a gap opening penalty of 10, a gap extension penalty of 1, and the "BLOSUM62" scoring matrix of Henikoff and Henikoff (ibid.). Those skilled in the art appreciate that there are many established algorithms available to align two amino acid sequences. The "FASTA" similarity search algorithm of Pearson and Lipman is a suitable protein alignment method for examining the level of identity

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 10 -

shared by an amino acid sequence disclosed herein and the amino acid sequence of a putative variant. The FASTA algorithm is described by Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444(1988), and by Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). Briefly, FASTA first characterizes sequence similarity by identifying regions shared by the query sequence (e.g. SEQ ID NO: 2) and a test sequence that have either the highest density of identities (if the ktup variable is 1) or pairs of identities (if ktup=2), without considering conservative amino acid substitutions, insertions, or deletions. The ten regions with the highest density of identities are then rescored by comparing the similarity of all paired amino acids using an amino acid substitution matrix, and the ends of the regions are "trimmed" to include only those residues that contribute to the highest score. If there are several regions with scores greater than the "cutoff" value (calculated by a predetermined formula based upon the length of the sequence and the ktup value), then the trimmed initial regions are examined to determine whether the regions can be joined to form approximate alignment with gaps. Finally, the highest scoring regions of the two amino acid sequences are aligned using a modification of the Needleman-Wunsch-Sellers algorithm (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444 (1970); Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26:787 (1974)), which allows for amino acid insertions and deletions. Preferred parameters for FASTA analysis are: ktup=1, gapopeningpenalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62. These parameters can be introduced into a FASTA program by modifying the scoring matrix file ("SMATRIX"), as explained in Appendix 2 of Pearson, Meth. Enzymol. 183:63 (1990). FASTA can also be used to determine the sequence identity of nucleic acid molecules using a ratio as disclosed above. For nucleotide sequence comparisons, the ktup value can range between one to six, preferably from three to six, most preferably three, with other parameters set as default.

Variations in percent identity can be due, for example, to amino acid substitutions, insertions, or deletions. Amino acid substitutions are defined as one for one amino acid replacements. They are conservative in nature when the substituted amino acid has similar structural and/or chemical properties. Examples of conservative replace-

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 11 -

ments are substitution of a leucine with an isoleucine or valine, an aspartate with a glutamate, or a threonine with a serine.

Amino acid insertions or deletions are changes to or within an amino acid sequence. They typically fall in the range of about 1 to 5 amino acids. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity of a human B7-H2 polypeptide can be found using computer programs well known in the art, such as DNASTAR software. Whether an amino acid change results in a biologically active human B7-H2 polypeptide can readily be determined by assaying for Shh-binding activity, as described for example, in Carpenter, *et al.*, *PROC. NATL. ACAD. SCI. U.S.A.* 95, 13630-34 (1998).

#### Fusion Proteins

Fusion proteins are useful for generating antibodies against human B7-H2 polypeptide amino acid sequences and for use in various assay systems. For example, fusion proteins can be used to identify proteins that interact with portions of a human B7-H2 polypeptide. Protein affinity chromatography or library-based assays for protein-protein interactions, such as the yeast two-hybrid or phage display systems, can be used for this purpose. Such methods are well known in the art and also can be used as drug screens.

A human B7-H2 polypeptide fusion protein comprises two polypeptide segments fused together by means of a peptide bond. The first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300 or 304 contiguous amino acids of SEQ ID NO:3 or of a biologically active variant, such as those described above. Alternatively, the first polypeptide segment comprises at least 6, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, or 473 contiguous amino acids of SEQ ID NO:4 or of a

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 12 -

biologically active variant, such as those described above. The first polypeptide segment also can comprise full-length human B7-H2 V2.

The second polypeptide segment can be a full-length protein or a protein fragment.

5 Proteins commonly used in fusion protein construction include  $\beta$ -galactosidase,  $\beta$ -glucuronidase, green fluorescent protein (GFP), autofluorescent proteins, including blue fluorescent protein (BFP), glutathione-S-transferase (GST), luciferase, horseradish peroxidase (HRP), and chloramphenicol acetyltransferase (CAT). Additionally, epitope tags are used in fusion protein constructions, including

10 histidine (His) tags, FLAG tags, influenza hemagglutinin (HA) tags, Myc tags, VSV-G tags, and thioredoxin (Trx) tags. Other fusion constructions can include maltose binding protein (MBP), S-tag, Lex a DNA binding domain (DBD) fusions, GAL4 DNA binding domain fusions, and herpes simplex virus (HSV) BP16 protein fusions. A fusion protein also can be engineered to contain a cleavage site located between

15 the human B7-H2 polypeptide-encoding sequence and the heterologous protein sequence, so that the human B7-H2 polypeptide can be cleaved and purified away from the heterologous moiety.

A fusion protein can be synthesized chemically, as is known in the art. Preferably, a

20 fusion protein is produced by covalently linking two polypeptide segments or by standard procedures in the art of molecular biology. Recombinant DNA methods can be used to prepare fusion proteins, for example, by making a DNA construct which comprises coding sequences selected from the complement of SEQ ID NO:1 or 2 in proper reading frame with nucleotides encoding the second polypeptide

25 segment and expressing the DNA construct in a host cell, as is known in the art. Many kits for constructing fusion proteins are available from companies such as Promega Corporation (Madison, WI), Stratagene (La Jolla, CA), CLONTECH (Mountain View, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), MBL International Corporation (MIC; Watertown, MA), and Quantum Biotechnologies

30 (Montreal, Canada; 1-888-DNA-KITS).

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 13 -

Identification of Species Homologues

Species homologues of human B7-H2 polypeptide can be obtained using human B7-H2 polypeptide polynucleotides (described below) to make suitable probes or primers for screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast, identifying cDNAs which encode homologues of human B7-H2 polypeptide, and expressing the cDNAs as is known in the art.

Polynucleotides

A human B7-H2 polynucleotide can be single- or double-stranded and comprises a coding sequence or the complement of a coding sequence for a human B7-H2 polypeptide. A coding sequence for human B7-H2 is shown in SEQ ID NO:1 or 2.

Degenerate nucleotide sequences encoding human B7-H2 polypeptides, as well as homologous nucleotide sequences which are at least about 50, 55, 60, 65, 70, preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2 or their complement also are human B7-H2 polynucleotides. Percent sequence identity between the sequences of two polynucleotides is determined using computer programs such as ALIGN which employ the FASTA algorithm, using an affine gap search with a gap open penalty of -12 and a gap extension penalty of -2. Complementary DNA (cDNA) molecules, species homologues, and variants of human B7-H2 polynucleotides that encode biologically active human B7-H2 polypeptides also are human B7-H2 polynucleotides. Fragments comprising 8, 10, 12, 15, 20, or 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or 2 or their complement also are human B7-H2 polynucleotides. Such polynucleotides can be used, for example, as antisense oligonucleotides or as hybridization probes.

Identification of Polynucleotide Variants and Homologues

- 5 Variants and homologues of the human B7-H2 polynucleotides described above also are human B7-H2 polynucleotides. Typically, homologous human B7-H2 polynucleotide sequences can be identified by hybridization of candidate polynucleotides to known human B7-H2 polynucleotides under stringent conditions, as is known in the art. For example, using the following wash conditions--2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS, room temperature twice, 30 minutes each; then 2X SSC, 0.1% SDS, 50 °C once, 30 minutes; then 2X SSC, room temperature twice, 10 minutes each--homologous sequences can be identified which contain at most about 25-30% basepair mismatches. More preferably, homologous nucleic acid strands contain 15-25% basepair mismatches, even more preferably 5-15% basepair mismatches.
- 15 Species homologues of the human B7-H2 polynucleotides disclosed herein also can be identified by making suitable probes or primers and screening cDNA expression libraries from other species, such as mice, monkeys, or yeast. Human variants of human B7-H2 polynucleotides can be identified, for example, by screening human cDNA expression libraries. It is well known that the  $T_m$  of a double-stranded DNA decreases by 1-1.5 °C with every 1% decrease in homology (Bonner *et al.*, *J. Mol. Biol.* 81, 123 (1973). Variants of human B7-H2 polynucleotides or human B7-H2 polynucleotides of other species can therefore be identified by hybridizing a putative homologous human B7-H2 polynucleotide with a polynucleotide having a nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or 2, or the complement thereof to form a test hybrid.
- 20 The melting temperature of the test hybrid is compared with the melting temperature of a hybrid comprising polynucleotides having perfectly complementary nucleotide sequences, and the number or percent of basepair mismatches within the test hybrid is calculated.
- 25 Nucleotide sequences which hybridize to human B7-H2 polynucleotides or their complements following stringent hybridization and/or wash conditions also are
- 30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 15 -

human B7-H2 polynucleotides. Stringent wash conditions are well known and understood in the art and are disclosed, for example, in Sambrook *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 2d ed., 1989, at pages 9.50-9.51.

5 Typically, for stringent hybridization conditions a combination of temperature and salt concentration should be chosen that is approximately 12-20 °C below the calculated  $T_m$  of the hybrid under study. The  $T_m$  of a hybrid between a human B7-H2 polynucleotide having a nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2, or the complement thereof and a polynucleotide sequence which is at least about 50,  
10 preferably about 75, 90, 96, or 98% identical to one of those nucleotide sequences can be calculated, for example, using the equation of Bolton and McCarthy, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 48, 1390 (1962):

$$T_m = 81.5 \text{ }^\circ\text{C} - 16.6(\log_{10}[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 0.63(\%\text{formamide}) - 600/l,$$
  
15 where  $l$  = the length of the hybrid in basepairs.

Stringent wash conditions include, for example, 4X SSC at 65 °C, or 50% formamide, 4X SSC at 42 °C, or 0.5X SSC, 0.1% SDS at 65 °C. Highly stringent wash conditions include, for example, 0.2X SSC at 65 °C.

20

#### Preparation of Polynucleotides

A human B7-H2 polynucleotide can be isolated free of other cellular components such as membrane components, proteins, and lipids. Polynucleotides can be made by  
25 a cell and isolated using standard nucleic acid purification techniques, or synthesized using an amplification technique, such as the polymerase chain reaction (PCR), or by using an automatic synthesizer. Methods for isolating polynucleotides are routine and are known in the art. Any such technique for obtaining a polynucleotide can be used to obtain isolated human B7-H2 polynucleotides. For example, restriction  
30 enzymes and probes can be used to isolate polynucleotide fragments which

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 16 -

comprises B7-H2 like nucleotide sequences. Isolated polynucleotides are in preparations which are free or at least 70, 80, or 90% free of other molecules.

5 Human B7-H2 cDNA molecules can be made with standard molecular biology techniques, using human B7-H2 mRNA as a template. Human B7-H2 cDNA molecules can thereafter be replicated using molecular biology techniques known in the art and disclosed in manuals such as Sambrook *et al.* (1989). An amplification technique, such as PCR, can be used to obtain additional copies of polynucleotides of the invention, using either human genomic DNA or cDNA as a template.

10 Alternatively, synthetic chemistry techniques can be used to synthesize human B7-H2 polynucleotides. The degeneracy of the genetic code allows alternate nucleotide sequences to be synthesized which will encode a human B7-H2 polypeptide having, for example, an amino acid sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2 or a biologically active variant thereof.

#### Extending Polynucleotides

20 Various PCR-based methods can be used to extend the nucleic acid sequences disclosed herein to detect upstream sequences such as promoters and regulatory elements. For example, restriction-site PCR uses universal primers to retrieve unknown sequence adjacent to a known locus (Sarkar, *PCR Methods Applic.* 2, 318-322, 1993). Genomic DNA is first amplified in the presence of a primer to a linker sequence and a primer specific to the known region. The amplified sequences are then subjected to a second round of PCR with the same linker primer and another specific primer internal to the first one. Products of each round of PCR are transcribed with an appropriate RNA polymerase and sequenced using reverse transcriptase.

30 Inverse PCR also can be used to amplify or extend sequences using divergent primers based on a known region (Triglia *et al.*, *Nucleic Acids Res.* 16, 8186, 1988). Primers

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 17 -

can be designed using commercially available software, such as OLIGO 4.06 Primer Analysis software (National Biosciences Inc., Plymouth, Minn.), to be 22-30 nucleotides in length, to have a GC content of 50% or more, and to anneal to the target sequence at temperatures about 68-72 °C. The method uses several restriction enzymes to generate a suitable fragment in the known region of a gene. The fragment is then circularized by intramolecular ligation and used as a PCR template.

Another method which can be used is capture PCR, which involves PCR amplification of DNA fragments adjacent to a known sequence in human and yeast artificial chromosome DNA (Lagerstrom *et al.*, *PCR Methods Applic. 1*, 111-119, 1991). In this method, multiple restriction enzyme digestions and ligations also can be used to place an engineered double-stranded sequence into an unknown fragment of the DNA molecule before performing PCR.

Another method which can be used to retrieve unknown sequences is that of Parker *et al.*, *Nucleic Acids Res. 19*, 3055-3060, 1991). Additionally, PCR, nested primers, and PROMOTERFINDER libraries (CLONTECH, Palo Alto, Calif.) can be used to walk genomic DNA (CLONTECH, Palo Alto, Calif.). This process avoids the need to screen libraries and is useful in finding intron/exon junctions.

When screening for full-length cDNAs, it is preferable to use libraries that have been size-selected to include larger cDNAs. Randomly-primed libraries are preferable, in that they will contain more sequences which contain the 5' regions of genes. Use of a randomly primed library may be especially preferable for situations in which an oligo d(T) library does not yield a full-length cDNA. Genomic libraries can be useful for extension of sequence into 5' non-transcribed regulatory regions.

Commercially available capillary electrophoresis systems can be used to analyze the size or confirm the nucleotide sequence of PCR or sequencing products. For example, capillary sequencing can employ flowable polymers for electrophoretic separation, four different fluorescent dyes (one for each nucleotide) which are laser

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 18 -

activated, and detection of the emitted wavelengths by a charge coupled device camera. Output/light intensity can be converted to electrical signal using appropriate software (e.g. GENOTYPER and Sequence NAVIGATOR, Perkin Elmer), and the entire process from loading of samples to computer analysis and electronic data display can be computer controlled. Capillary electrophoresis is especially preferable for the sequencing of small pieces of DNA that might be present in limited amounts in a particular sample.

#### Obtaining Polypeptides

10

Human B7-H2 polypeptides can be obtained, for example, by purification from human cells, by expression of human B7-H2 polynucleotides, or by direct chemical synthesis.

#### Protein Purification

15

Human B7-H2 polypeptides can be purified from any cell which expresses the molecule, including host cells which have been transfected with human B7-H2 expression constructs. A purified human B7-H2 polypeptide is separated from other compounds which normally associate with the human B7-H2 polypeptide in the cell, such as certain proteins, carbohydrates, or lipids, using methods well-known in the art. Such methods include, but are not limited to, size exclusion chromatography, ammonium sulfate fractionation, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and preparative gel electrophoresis. A preparation of purified human B7-H2 polypeptides is at least 80% pure; preferably, the preparations are 90%, 95%, or 99% pure. Purity of the preparations can be assessed by any means known in the art, such as SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Expression of Polynucleotides

To express a human B7-H2 polynucleotide, the polynucleotide can be inserted into an expression vector that contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted coding sequence. Methods that are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing sequences encoding human B7-H2 polypeptides and appropriate transcriptional and translational control elements. These methods include *in vitro* recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and *in vivo* genetic recombination. Such techniques are described, for example, in Sambrook *et al.* (1989) and in Ausubel *et al.*, CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, New York, N.Y., 1989.

A variety of expression vector/host systems can be utilized to contain and express sequences encoding a human B7-H2 polypeptide. These include, but are not limited to, microorganisms, such as bacteria transformed with recombinant bacteriophage, plasmid, or cosmid DNA expression vectors; yeast transformed with yeast expression vectors, insect cell systems infected with virus expression vectors (*e.g.*, baculovirus), plant cell systems transformed with virus expression vectors (*e.g.*, cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or with bacterial expression vectors (*e.g.*, Ti or pBR322 plasmids), or animal cell systems.

The control elements or regulatory sequences are those non-translated regions of the vector -- enhancers, promoters, 5' and 3' untranslated regions -- which interact with host cellular proteins to carry out transcription and translation. Such elements can vary in their strength and specificity. Depending on the vector system and host utilized, any number of suitable transcription and translation elements, including constitutive and inducible promoters, can be used. For example, when cloning in bacterial systems, inducible promoters such as the hybrid lacZ promoter of the BLUESCRIPT phagemid (Stratagene, LaJolla, Calif.) or pSPORT1 plasmid (Life Technologies) and the like can be used. The baculovirus polyhedrin promoter can be used in insect cells. Promoters or enhancers derived from the genomes of plant

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 20 -

cells (e.g., heat shock, RUBISCO, and storage protein genes) or from plant viruses (e.g., viral promoters or leader sequences) can be cloned into the vector. In mammalian cell systems, promoters from mammalian genes or from mammalian viruses are preferable. If it is necessary to generate a cell line that contains multiple copies of a nucleotide sequence encoding a human B7-H2 polypeptide, vectors based on SV40 or EBV can be used with an appropriate selectable marker.

Bacterial and Yeast Expression Systems

In bacterial systems, a number of expression vectors can be selected depending upon the use intended for the human B7-H2 polypeptide. For example, when a large quantity of a human B7-H2 polypeptide is needed for the induction of antibodies, vectors which direct high level expression of fusion proteins that are readily purified can be used. Such vectors include, but are not limited to, multifunctional *E. coli* cloning and expression vectors such as BLUESCRIPT (Stratagene). In a BLUESCRIPT vector, a sequence encoding the human B7-H2 polypeptide can be ligated into the vector in frame with sequences for the amino-terminal Met and the subsequent 7 residues of  $\beta$ -galactosidase so that a hybrid protein is produced. pIN vectors (Van Heeke & Schuster, *J. Biol. Chem.* 264, 5503-5509, 1989) or pGEX vectors (Promega, Madison, Wis.) also can be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption to glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. Proteins made in such systems can be designed to include heparin, thrombin, or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned polypeptide of interest can be released from the GST moiety at will.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a number of vectors containing constitutive or inducible promoters such as alpha factor, alcohol oxidase, and PGH can be used. For reviews, see Ausubel *et al.* (1989) and Grant *et al.*, *Methods Enzymol.* 153, 516-544, 1987.

Plant and Insect Expression Systems

If plant expression vectors are used, the expression of sequences encoding human B7-H2 polypeptides can be driven by any of a number of promoters. For example, 5 viral promoters such as the 35S and 19S promoters of CaMV can be used alone or in combination with the omega leader sequence from TMV (Takamatsu, *EMBO J.* 6, 307-311, 1987). Alternatively, plant promoters such as the small subunit of RUBISCO or heat shock promoters can be used (Coruzzi *et al.*, *EMBO J.* 3, 10 1671-1680, 1984; Broglie *et al.*, *Science* 224, 838-843, 1984; Winter *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 17, 85-105, 1991). These constructs can be introduced into plant cells by direct DNA transformation or by pathogen-mediated transfection. Such techniques are described in a number of generally available reviews (*e.g.*, Hobbs or 15 Murray, in MCGRAW HILL YEARBOOK OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, McGraw Hill, New York, N.Y., pp. 191-196, 1992).

An insect system also can be used to express a human B7-H2 polypeptide. For example, in one such system *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes in *Spodoptera frugiperda* cells 20 or in *Trichoplusia* larvae. Sequences encoding human B7-H2 polypeptides can be cloned into a non-essential region of the virus, such as the polyhedrin gene, and placed under control of the polyhedrin promoter. Successful insertion of human B7-H2 polypeptides will render the polyhedrin gene inactive and produce recombinant virus lacking coat protein. The recombinant viruses can then be used to infect *S. frugiperda* cells or *Trichoplusia* larvae in which human B7-H2 polypeptides can be 25 expressed (Engelhard *et al.*, *Proc. Nat. Acad. Sci.* 91, 3224-3227, 1994).

Mammalian Expression Systems

30 A number of viral-based expression systems can be used to express human B7-H2 polypeptides in mammalian host cells. For example, if an adenovirus is used as an

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 22 -

- expression vector, sequences encoding human B7-H2 polypeptides can be ligated into an adenovirus transcription/translation complex comprising the late promoter and tripartite leader sequence. Insertion in a non-essential E1 or E3 region of the viral genome can be used to obtain a viable virus which is capable of expressing a human B7-H2 polypeptide in infected host cells (Logan & Shenk, *Proc. Natl. Acad. Sci. 81*, 3655-3659, 1984). If desired, transcription enhancers, such as the Rous sarcoma virus (RSV) enhancer, can be used to increase expression in mammalian host cells.
- 10 Human artificial chromosomes (HACs) also can be used to deliver larger fragments of DNA than can be contained and expressed in a plasmid. HACs of 6M to 10M are constructed and delivered to cells via conventional delivery methods (*e.g.*, liposomes, polycationic amino polymers, or vesicles).
- 15 Specific initiation signals also can be used to achieve more efficient translation of sequences encoding human B7-H2 polypeptides. Such signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. In cases where sequences encoding a human B7-H2 polypeptide, its initiation codon, and upstream sequences are inserted into the appropriate expression vector, no additional transcriptional or translational control signals may be needed. However, in cases where only coding sequence, or a fragment thereof, is inserted, exogenous translational control signals (including the ATG initiation codon) should be provided. The initiation codon should be in the correct reading frame to ensure translation of the entire insert. Exogenous translational elements and initiation codons can be of various origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression can be enhanced by the inclusion of enhancers which are appropriate for the particular cell system which is used (see Scharf *et al.*, *Results Probl. Cell Differ.* 20, 125-162, 1994).
- 20
- 25

Host Cells

5 A host cell strain can be chosen for its ability to modulate the expression of the inserted sequences or to process the expressed human B7-H2 polypeptide in the desired fashion. Such modifications of the polypeptide include, but are not limited to, acetylation, carboxylation, glycosylation, phosphorylation, lipidation, and acylation. Post-translational processing which cleaves a "prepro" form of the polypeptide also can be used to facilitate correct insertion, folding and/or function. Different host cells which have specific cellular machinery and characteristic mechanisms for post-translational activities (e.g., CHO, HeLa, MDCK, HEK293, and 10 WI38), are available from the American Type Culture Collection (ATCC; 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) and can be chosen to ensure the correct modification and processing of the foreign protein.

15 Stable expression is preferred for long-term, high-yield production of recombinant proteins. For example, cell lines which stably express human B7-H2 polypeptides can be transformed using expression vectors which can contain viral origins of replication and/or endogenous expression elements and a selectable marker gene on the same or on a separate vector. Following the introduction of the vector, cells can 20 be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium before they are switched to a selective medium. The purpose of the selectable marker is to confer resistance to selection, and its presence allows growth and recovery of cells which successfully express the introduced human B7-H2 sequences. Resistant clones of stably transformed cells can be proliferated using tissue culture techniques appropriate to the cell 25 type. See, for example, ANIMAL CELL CULTURE, R.L. Freshney, ed., 1986.

Any number of selection systems can be used to recover transformed cell lines. These include, but are not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler *et al.*, *Cell* 11, 223-32, 1977) and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy *et al.*, *Cell* 22, 817-23, 1980) genes which can be employed in *tk* or *aprt* cells, 30 respectively. Also, antimetabolite, antibiotic, or herbicide resistance can be used as

the basis for selection. For example, *dhfr* confers resistance to methotrexate (Wigler *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77, 3567-70, 1980), *npt* confers resistance to the aminoglycosides, neomycin and G-418 (Colbere-Garapin *et al.*, *J. Mol. Biol.* 150, 1-14, 1981), and *als* and *pat* confer resistance to chlorsulfuron and phosphinotricin acetyltransferase, respectively (Murray, 1992, *supra*). Additional selectable genes have been described. For example, *trpB* allows cells to utilize indole in place of tryptophan, or *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (Hartman & Mulligan, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85, 8047-51, 1988). Visible markers such as anthocyanins,  $\beta$ -glucuronidase and its substrate GUS, and luciferase and its substrate luciferin, can be used to identify transformants and to quantify the amount of transient or stable protein expression attributable to a specific vector system (Rhodes *et al.*, *Methods Mol. Biol.* 55, 121-131, 1995).

#### Detecting Expression

Although the presence of marker gene expression suggests that the human B7-H2 polynucleotide is also present, its presence and expression may need to be confirmed. For example, if a sequence encoding a human B7-H2 polypeptide is inserted within a marker gene sequence, transformed cells containing sequences which encode a human B7-H2 polypeptide can be identified by the absence of marker gene function. Alternatively, a marker gene can be placed in tandem with a sequence encoding a human B7-H2 polypeptide under the control of a single promoter. Expression of the marker gene in response to induction or selection usually indicates expression of the human B7-H2 polynucleotide.

Alternatively, host cells which contain a human B7-H2 polynucleotide and which express a human B7-H2 polypeptide can be identified by a variety of procedures known to those of skill in the art. These procedures include, but are not limited to, DNA-DNA or DNA-RNA hybridizations and protein bioassay or immunoassay techniques which include membrane, solution, or chip-based technologies for the detection and/or quantification of nucleic acid or protein. For example, the presence

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 25 -

of a polynucleotide sequence encoding a human B7-H2 polypeptide can be detected by DNA-DNA or DNA-RNA hybridization or amplification using probes or fragments of polynucleotides encoding a human B7-H2 polypeptide. Nucleic acid amplification-based assays involve the use of oligonucleotides selected from sequences encoding a human B7-H2 polypeptide to detect transformants which contain a human B7-H2 polynucleotide.

A variety of protocols for detecting and measuring the expression of a human B7-H2 polypeptide, using either polyclonal or monoclonal antibodies specific for the polypeptide, are known in the art. Examples include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), radioimmunoassay (RIA), and fluorescence activated cell sorting (FACS). A two-site, monoclonal-based immunoassay using monoclonal antibodies reactive to two non-interfering epitopes on a human B7-H2 polypeptide can be used, or a competitive binding assay can be employed. These and other assays are described in Hampton *et al.*, SEROLOGICAL METHODS: A LABORATORY MANUAL, APS Press, St. Paul, Minn., 1990) and Maddox *et al.*, *J. Exp. Med.* 158, 1211-1216, 1983).

A wide variety of labels and conjugation techniques are known by those skilled in the art and can be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding human B7-H2 polypeptides include oligolabeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, sequences encoding a human B7-H2 polypeptide can be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and can be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of labeled nucleotides and an appropriate RNA polymerase such as T7, T3, or SP6. These procedures can be conducted using a variety of commercially available kits (Amersham Pharmacia Biotech, Promega, and US Biochemical). Suitable reporter molecules or labels which can be used for ease of detection include radionuclides, enzymes, and fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

*Expression and Purification of Polypeptides*

5 Host cells transformed with nucleotide sequences encoding a human B7-H2 polypeptide can be cultured under conditions suitable for the expression and recovery of the protein from cell culture. The polypeptide produced by a transformed cell can be secreted or contained intracellularly depending on the sequence and/or the vector used. As will be understood by those of skill in the art, expression vectors containing polynucleotides which encode human B7-H2 polypeptides can be designed to contain  
10 signal sequences which direct secretion of soluble human B7-H2 polypeptides through a prokaryotic or eukaryotic cell membrane or which direct the membrane insertion of membrane-bound human B7-H2 polypeptide.

As discussed above, other constructions can be used to join a sequence encoding a  
15 human B7-H2 polypeptide to a nucleotide sequence encoding a polypeptide domain which will facilitate purification of soluble proteins. Such purification facilitating domains include, but are not limited to, metal chelating peptides such as histidine-tryptophan modules that allow purification on immobilized metals, protein A domains that allow purification on immobilized immunoglobulin, and the domain  
20 utilized in the FLAGS extension/affinity purification system (Immunex Corp., Seattle, Wash.). Inclusion of cleavable linker sequences such as those specific for Factor Xa or enterokinase (Invitrogen, San Diego, CA) between the purification domain and the human B7-H2 polypeptide also can be used to facilitate purification. One such expression vector provides for expression of a fusion protein containing a  
25 human B7-H2 polypeptide and 6 histidine residues preceding a thioredoxin or an enterokinase cleavage site. The histidine residues facilitate purification by IMAC (immobilized metal ion affinity chromatography, as described in Porath *et al.*, *Prot. Exp. Purif.* 3, 263-281, 1992), while the enterokinase cleavage site provides a means for purifying the human B7-H2 polypeptide from the fusion protein. Vectors which  
30 contain fusion proteins are disclosed in Kroll *et al.*, *DNA Cell Biol.* 12, 441-453, 1993.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 27 -

Chemical Synthesis

Sequences encoding a human B7-H2 polypeptide can be synthesized, in whole or in  
5 part, using chemical methods well known in the art (see Caruthers *et al.*, *Nucl. Acids  
Res. Symp. Ser.* 215-223, 1980; Horn *et al.*, *Nucl. Acids Res. Symp. Ser.* 225-232,  
1980). Alternatively, a human B7-H2 polypeptide itself can be produced using  
chemical methods to synthesize its amino acid sequence, such as by direct peptide  
10 synthesis using solid-phase techniques (Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85, 2149-2154,  
1963; Roberge *et al.*, *Science* 269, 202-204, 1995). Protein synthesis can be  
performed using manual techniques or by automation. Automated synthesis can be  
achieved, for example, using Applied Biosystems 431A Peptide Synthesizer (Perkin  
Elmer). Optionally, fragments of human B7-H2 polypeptides can be separately  
15 synthesized and combined using chemical methods to produce a full-length  
molecule.

The newly synthesized peptide can be substantially purified by preparative high per-  
formance liquid chromatography (*e.g.*, Creighton, *PROTEINS: STRUCTURES AND  
20 MOLECULAR PRINCIPLES*, WH Freeman and Co., New York, N.Y., 1983). The  
composition of a synthetic human B7-H2 polypeptide can be confirmed by amino  
acid analysis or sequencing (*e.g.*, the Edman degradation procedure; see Creighton,  
*supra*). Additionally, any portion of the amino acid sequence of the human B7-H2  
polypeptide can be altered during direct synthesis and/or combined using chemical  
25 methods with sequences from other proteins to produce a variant polypeptide or a  
fusion protein.

Production of Altered Polypeptides

As will be understood by those of skill in the art, it may be advantageous to produce  
30 human B7-H2 polypeptide-encoding nucleotide sequences possessing non-naturally  
occurring codons. For example, codons preferred by a particular prokaryotic or

eukaryotic host can be selected to increase the rate of protein expression or to produce an RNA transcript having desirable properties, such as a half-life which is longer than that of a transcript generated from the naturally occurring sequence.

5 The nucleotide sequences disclosed herein can be engineered using methods generally known in the art to alter human B7-H2 polypeptide-encoding sequences for a variety of reasons, including but not limited to, alterations which modify the cloning, processing, and/or expression of the polypeptide or mRNA product. DNA shuffling by random fragmentation and PCR reassembly of gene fragments and  
10 synthetic oligonucleotides can be used to engineer the nucleotide sequences. For example, site-directed mutagenesis can be used to insert new restriction sites, alter glycosylation patterns, change codon preference, produce splice variants, introduce mutations, and so forth.

15 Antibodies

Any type of antibody known in the art can be generated to bind specifically to an epitope of a human B7-H2 polypeptide. "Antibody" as used herein includes intact immunoglobulin molecules, as well as fragments thereof, such as Fab, F(ab')<sub>2</sub>, and  
20 Fv, which are capable of binding an epitope of a human B7-H2 polypeptide. Typically, at least 6, 8, 10, or 12 contiguous amino acids are required to form an epitope. However, epitopes which involve non-contiguous amino acids may require more, e.g., at least 15, 25, or 50 amino acids.

25 An antibody which specifically binds to an epitope of a human B7-H2 polypeptide can be used therapeutically, as well as in immunochemical assays, such as Western blots, ELISAs, radioimmunoassays, immunohistochemical assays, immunoprecipitations, or other immunochemical assays known in the art. Various immunoassays can be used to identify antibodies having the desired specificity. Numerous  
30 protocols for competitive binding or immunoradiometric assays are well known in the art. Such immunoassays typically involve the measurement of complex

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 29 -

formation between an immunogen and an antibody which specifically binds to the immunogen.

5 Typically, an antibody which specifically binds to a human B7-H2 polypeptide provides a detection signal at least 5-, 10-, or 20-fold higher than a detection signal provided with other proteins when used in an immunochemical assay. Preferably, antibodies which specifically bind to human B7-H2 like polypeptides do not detect other proteins in immunochemical assays and can immunoprecipitate a human B7-H2 polypeptide from solution.

10

Human B7-H2 polypeptides can be used to immunize a mammal, such as a mouse, rat, rabbit, guinea pig, monkey, or human, to produce polyclonal antibodies. If desired, a human B7-H2 polypeptide can be conjugated to a carrier protein, such as bovine serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. Depending on the host species, various adjuvants can be used to increase the immunological response. Such adjuvants include, but are not limited to, Freund's adjuvant, mineral gels (e.g., aluminum hydroxide), and surface active substances (e.g. lysolecithin, pluronic polyols, polyanions, peptides, oil emulsions, keyhole limpet hemocyanin, and dinitrophenol). Among adjuvants used in humans, BCG (*bacilli Calmette-Guerin*) and *Corynebacterium parvum* are especially useful.

20

Monoclonal antibodies which specifically bind to a human B7-H2 polypeptide can be prepared using any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. These techniques include, but are not limited to, the hybridoma technique, the human B-cell hybridoma technique, and the BBV-hybridoma technique (Kohler *et al.*, *Nature* 256, 495-497, 1985; Kozbor *et al.*, *J. Immunol. Methods* 81, 31-42, 1985; Cote *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80, 2026-2030, 1983; Cole *et al.*, *Mol. Cell Biol.* 62, 109-120, 1984).

25

30 In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies," the splicing of mouse antibody genes to human antibody genes to obtain a molecule with

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 30 -

appropriate antigen specificity and biological activity, can be used (Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 6851-6855, 1984; Neuberger *et al.*, *Nature* 312, 604-608, 1984; Takeda *et al.*, *Nature* 314, 452-454, 1985). Monoclonal and other antibodies also can be "humanized" to prevent a patient from mounting an immune response  
5 against the antibody when it is used therapeutically. Such antibodies may be sufficiently similar in sequence to human antibodies to be used directly in therapy or may require alteration of a few key residues. Sequence differences between rodent antibodies and human sequences can be minimized by replacing residues which differ from those in the human sequences by site directed mutagenesis of individual  
10 residues or by grating of entire complementarity determining regions. Alternatively, humanized antibodies can be produced using recombinant methods, as described in GB2188638B. Antibodies which specifically bind to a human B7-H2 polypeptide can contain antigen binding sites which are either partially or fully humanized, as disclosed in U.S. 5,565,332.

15 Alternatively, techniques described for the production of single chain antibodies can be adapted using methods known in the art to produce single chain antibodies which specifically bind to human B7-H2 polypeptides. Antibodies with related specificity, but of distinct idiotypic composition, can be generated by chain shuffling from  
20 random combinatorial immunoglobulin libraries (Burton, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88, 11120-23, 1991).

Single-chain antibodies also can be constructed using a DNA amplification method, such as PCR, using hybridoma cDNA as a template (Thirion *et al.*, 1996, *Eur. J. Cancer Prev.* 5, 507-11). Single-chain antibodies can be mono- or bispecific, and  
25 can be bivalent or tetravalent. Construction of tetravalent, bispecific single-chain antibodies is taught, for example, in Coloma & Morrison, 1997, *Nat. Biotechnol.* 15, 159-63. Construction of bivalent, bispecific single-chain antibodies is taught in Mallender & Voss, 1994, *J. Biol. Chem.* 269, 199-206.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 31 -

A nucleotide sequence encoding a single-chain antibody can be constructed using manual or automated nucleotide synthesis, cloned into an expression construct using standard recombinant DNA methods, and introduced into a cell to express the coding sequence, as described below. Alternatively, single-chain antibodies can be produced directly using, for example, filamentous phage technology (Verhaar *et al.*, 1995, *Int. J. Cancer* 61, 497-501; Nicholls *et al.*, 1993, *J. Immunol. Meth.* 165, 81-91).

Antibodies which specifically bind to human B7-H2 polypeptides also can be produced by inducing *in vivo* production in the lymphocyte population or by screening immunoglobulin libraries or panels of highly specific binding reagents as disclosed in the literature (Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86, 3833-3837, 1989; Winter *et al.*, *Nature* 349, 293-299, 1991).

Other types of antibodies can be constructed and used therapeutically in methods of the invention. For example, chimeric antibodies can be constructed as disclosed in WO 93/03151. Binding proteins which are derived from immunoglobulins and which are multivalent and multispecific, such as the "diabodies" described in WO 94/13804, also can be prepared.

Antibodies according to the invention can be purified by methods well known in the art. For example, antibodies can be affinity purified by passage over a column to which a human B7-H2 polypeptide is bound. The bound antibodies can then be eluted from the column using a buffer with a high salt concentration.

#### Antisense Oligonucleotides

Antisense oligonucleotides are nucleotide sequences which are complementary to a specific DNA or RNA sequence. Once introduced into a cell, the complementary nucleotides combine with natural sequences produced by the cell to form complexes and block either transcription or translation. Preferably, an antisense oligonucleotide

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 32 -

is at least 11 nucleotides in length, but can be at least 12, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, or 50 or more nucleotides long. Longer sequences also can be used. Antisense oligonucleotide molecules can be provided in a DNA construct and introduced into a cell as described above to decrease the level of human B7-H2 gene products in the cell.

Antisense oligonucleotides can be deoxyribonucleotides, ribonucleotides, or a combination of both. Oligonucleotides can be synthesized manually or by an automated synthesizer, by covalently linking the 5' end of one nucleotide with the 3' end of another nucleotide with non-phosphodiester internucleotide linkages such as alkylphosphonates, phosphorothioates, phosphorodithioates, alkylphosphonothioates, alkylphosphonates, phosphoramidates, phosphate esters, carbamates, acetamidate, carboxymethyl esters, carbonates, and phosphate triesters. See Brown, *Meth. Mol. Biol.* 20, 1-8, 1994; Sonveaux, *Meth. Mol. Biol.* 26, 1-72, 1994; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-583, 1990.

Modifications of human B7-H2 gene expression can be obtained by designing antisense oligonucleotides which will form duplexes to the control, 5', or regulatory regions of the human B7-H2 gene. Oligonucleotides derived from the transcription initiation site, *e.g.*, between positions -10 and +10 from the start site, are preferred. Similarly, inhibition can be achieved using "triple helix" base-pairing methodology. Triple helix pairing is useful because it causes inhibition of the ability of the double helix to open sufficiently for the binding of polymerases, transcription factors, or chaperons. Therapeutic advances using triplex DNA have been described in the literature (*e.g.*, Gee *et al.*, in Huber & Carr, MOLECULAR AND IMMUNOLOGIC APPROACHES, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, N.Y., 1994). An antisense oligonucleotide also can be designed to block translation of mRNA by preventing the transcript from binding to ribosomes.

Precise complementarity is not required for successful complex formation between an antisense oligonucleotide and the complementary sequence of a human B7-H2

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 33 -

polynucleotide. Antisense oligonucleotides which comprise, for example, 2, 3, 4, or 5 or more stretches of contiguous nucleotides which are precisely complementary to a human B7-H2 polynucleotide, each separated by a stretch of contiguous nucleotides which are not complementary to adjacent human B7-H2 nucleotides, can provide sufficient targeting specificity for human B7-H2 mRNA. Preferably, each stretch of complementary contiguous nucleotides is at least 4, 5, 6, 7, or 8 or more nucleotides in length. Non-complementary intervening sequences are preferably 1, 2, 3, or 4 nucleotides in length. One skilled in the art can easily use the calculated melting point of an antisense-sense pair to determine the degree of mismatching which will be tolerated between a particular antisense oligonucleotide and a particular human B7-H2 polynucleotide sequence.

Antisense oligonucleotides can be modified without affecting their ability to hybridize to a human B7-H2 polynucleotide. These modifications can be internal or at one or both ends of the antisense molecule. For example, internucleoside phosphate linkages can be modified by adding cholesteryl or diamine moieties with varying numbers of carbon residues between the amino groups and terminal ribose. Modified bases and/or sugars, such as arabinose instead of ribose, or a 3', 5'-substituted oligonucleotide in which the 3' hydroxyl group or the 5' phosphate group are substituted, also can be employed in a modified antisense oligonucleotide. These modified oligonucleotides can be prepared by methods well known in the art. See, e.g., Agrawal *et al.*, *Trends Biotechnol.* 10, 152-158, 1992; Uhlmann *et al.*, *Chem. Rev.* 90, 543-584, 1990; Uhlmann *et al.*, *Tetrahedron. Lett.* 215, 3539-3542, 1987.

#### Ribozymes

Ribozymes are RNA molecules with catalytic activity. See, e.g., Cech, *Science* 236, 1532-1539; 1987; Cech, *Ann. Rev. Biochem.* 59, 543-568; 1990; Cech, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2, 605-609; 1992; Couture & Stinchcomb, *Trends Genet.* 12, 510-515, 1996. Ribozymes can be used to inhibit gene function by cleaving an RNA sequence,

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 34 -

as is known in the art (e.g., Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673). The mechanism of ribozyme action involves sequence-specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by endonucleolytic cleavage. Examples include engineered hammerhead motif ribozyme molecules that can specifically and efficiently catalyze endonucleolytic cleavage of specific nucleotide sequences.

The coding sequence of a human B7-H2 polynucleotide can be used to generate ribozymes which will specifically bind to mRNA transcribed from the human B7-H2 polynucleotide. Methods of designing and constructing ribozymes which can cleave other RNA molecules in trans in a highly sequence specific manner have been developed and described in the art (see Haseloff *et al. Nature 334*, 585-591, 1988). For example, the cleavage activity of ribozymes can be targeted to specific RNAs by engineering a discrete "hybridization" region into the ribozyme. The hybridization region contains a sequence complementary to the target RNA and thus specifically hybridizes with the target (see, for example, Gerlach *et al.*, EP 321,201).

Specific ribozyme cleavage sites within a human B7-H2 RNA target can be identified by scanning the target molecule for ribozyme cleavage sites which include the following sequences: GUA, GUU, and GUC. Once identified, short RNA sequences of between 15 and 20 ribonucleotides corresponding to the region of the target RNA containing the cleavage site can be evaluated for secondary structural features which may render the target inoperable. Suitability of candidate human B7-H2 RNA targets also can be evaluated by testing accessibility to hybridization with complementary oligonucleotides using ribonuclease protection assays. Longer complementary sequences can be used to increase the affinity of the hybridization sequence for the target. The hybridizing and cleavage regions of the ribozyme can be integrally related such that upon hybridizing to the target RNA through the complementary regions, the catalytic region of the ribozyme can cleave the target.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 35 -

Ribozymes can be introduced into cells as part of a DNA construct. Mechanical methods, such as microinjection, liposome-mediated transfection, electroporation, or calcium phosphate precipitation, can be used to introduce a ribozyme-containing DNA construct into cells in which it is desired to decrease human B7-H2 expression.

5 Alternatively, if it is desired that the cells stably retain the DNA construct, the construct can be supplied on a plasmid and maintained as a separate element or integrated into the genome of the cells, as is known in the art. A ribozyme-encoding DNA construct can include transcriptional regulatory elements, such as a promoter element, an enhancer or UAS element, and a transcriptional terminator signal, for

10 controlling transcription of ribozymes in the cells.

As taught in Haseloff *et al.*, U.S. Patent 5,641,673, ribozymes can be engineered so that ribozyme expression will occur in response to factors which induce expression of a target gene. Ribozymes also can be engineered to provide an additional level of

15 regulation, so that destruction of mRNA occurs only when both a ribozyme and a target gene are induced in the cells.

#### Differentially Expressed Genes

20 Described herein are methods for the identification of genes whose products interact with human B7-H2. Such genes may represent genes which are differentially expressed in disorders including, but not limited to, autoimmune diseases, allergic diseases, bacterial infections, and type I diabetes. Further, such genes may represent genes which are differentially regulated in response to manipulations relevant to the

25 progression or treatment of such diseases. Additionally, such genes may have a temporally modulated expression, increased or decreased at different stages of tissue or organism development. A differentially expressed gene may also have its expression modulated under control versus experimental conditions. In addition, the human B7-H2 gene or gene product may itself be tested for differential expression.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 36 -

The degree to which expression differs in a normal versus a diseased state need only be large enough to be visualized via standard characterization techniques such as differential display techniques. Other such standard characterization techniques by which expression differences may be visualized include but are not limited to, quantitative RT (reverse transcriptase), PCR, and Northern analysis.

*Identification of Differentially Expressed Genes*

To identify differentially expressed genes total RNA or, preferably, mRNA is isolated from tissues of interest. For example, RNA samples are obtained from tissues of experimental subjects and from corresponding tissues of control subjects. Any RNA isolation technique which does not select against the isolation of mRNA may be utilized for the purification of such RNA samples. See, for example, Ausubel *et al.*, ed., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, Inc. New York, 1987-1993. Large numbers of tissue samples may readily be processed using techniques well known to those of skill in the art, such as, for example, the single-step RNA isolation process of Chomczynski, U.S. Patent 4,843,155.

Transcripts within the collected RNA samples which represent RNA produced by differentially expressed genes are identified by methods well known to those of skill in the art. They include, for example, differential screening (Tedder *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 208-12, 1988), subtractive hybridization (Hedrick *et al.*, *Nature* 308, 149-53; Lee *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2825, 1984), and, preferably, differential display (Liang & Pardee, *Science* 257, 967-71, 1992; U.S. Patent 5,262,311).

The differential expression information may itself suggest relevant methods for the treatment of disorders involving the human B7-H2. For example, treatment may include a modulation of expression of the differentially expressed genes and/or the gene encoding the human B7-H2. The differential expression information may indicate whether the expression or activity of the differentially expressed gene or

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 37 -

gene product or the human B7-H2 gene or gene product are up-regulated or down-regulated.

Screening Methods

5

The invention provides assays for screening test compounds which bind to or modulate the activity of a human B7-H2 polypeptide or a human B7-H2 polynucleotide. A test compound preferably binds to a human B7-H2 polypeptide or polynucleotide. More preferably, a test compound decreases or increases human B7-H2 activity by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the test compound.

10

Test Compounds

15

Test compounds can be pharmacologic agents already known in the art or can be compounds previously unknown to have any pharmacological activity. The compounds can be naturally occurring or designed in the laboratory. They can be isolated from microorganisms, animals, or plants, and can be produced recombinantly, or synthesized by chemical methods known in the art. If desired, test compounds can be obtained using any of the numerous combinatorial library methods known in the art, including but not limited to, biological libraries, spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries, synthetic library methods requiring deconvolution, the "one-bead one-compound" library method, and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of compounds. See Lam, *Anticancer Drug Des.* 12, 145, 1997.

20

25

Methods for the synthesis of molecular libraries are well known in the art (see, for example, DeWitt *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 6909, 1993; Erb *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, 11422, 1994; Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 2678,

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 38 -

1994; Cho *et al.*, *Science* 261, 1303, 1993; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2059, 1994; Carell *et al.*, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33, 2061; Gallop *et al.*, *J. Med. Chem.* 37, 1233, 1994). Libraries of compounds can be presented in solution (see, e.g., Houghten, *BioTechniques* 13, 412-421, 1992), or on beads (Lam, *Nature* 354, 82-84, 1991), chips (Fodor, *Nature* 364, 555-556, 1993), bacteria or spores (Ladner, U.S. Patent 5,223,409), plasmids (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 1865-1869, 1992), or phage (Scott & Smith, *Science* 249, 386-390, 1990; Devlin, *Science* 249, 404-406, 1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6378-6382, 1990; Felici, *J. Mol. Biol.* 222, 301-310, 1991; and Ladner, U.S. Patent 5,223,409).

10

#### High Throughput Screening

Test compounds can be screened for the ability to bind to human B7-H2 polypeptides or polynucleotides or to affect human B7-H2 activity or human B7-H2 gene expression using high throughput screening. Using high throughput screening, many discrete compounds can be tested in parallel so that large numbers of test compounds can be quickly screened. The most widely established techniques utilize 96-well microtiter plates. The wells of the microtiter plates typically require assay volumes that range from 50 to 500  $\mu$ l. In addition to the plates, many instruments, materials, pipettors, robotics, plate washers, and plate readers are commercially available to fit the 96-well format.

15

20

Alternatively, "free format assays," or assays that have no physical barrier between samples, can be used. For example, an assay using pigment cells (melanocytes) in a simple homogeneous assay for combinatorial peptide libraries is described by Jayawickreme *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 19, 1614-18 (1994). The cells are placed under agarose in petri dishes, then beads that carry combinatorial compounds are placed on the surface of the agarose. The combinatorial compounds are partially released the compounds from the beads. Active compounds can be visualized as dark pigment areas because, as the compounds diffuse locally into the gel matrix, the active compounds cause the cells to change colors.

25

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 39 -

Another example of a free format assay is described by Chelsky, "Strategies for Screening Combinatorial Libraries: Novel and Traditional Approaches," reported at the First Annual Conference of The Society for Biomolecular Screening in Philadelphia, Pa. (Nov. 7-10, 1995). Chelsky placed a simple homogenous enzyme assay for carbonic anhydrase inside an agarose gel such that the enzyme in the gel would cause a color change throughout the gel. Thereafter, beads carrying combinatorial compounds via a photolinker were placed inside the gel and the compounds were partially released by UV-light. Compounds that inhibited the enzyme were observed as local zones of inhibition having less color change.

Yet another example is described by Salmon *et al.*, *Molecular Diversity* 2, 57-63 (1996). In this example, combinatorial libraries were screened for compounds that had cytotoxic effects on cancer cells growing in agar.

Another high throughput screening method is described in Beutel *et al.*, U.S. Patent 5,976,813. In this method, test samples are placed in a porous matrix. One or more assay components are then placed within, on top of, or at the bottom of a matrix such as a gel, a plastic sheet, a filter, or other form of easily manipulated solid support. When samples are introduced to the porous matrix they diffuse sufficiently slowly, such that the assays can be performed without the test samples running together.

#### Binding Assays

For binding assays, the test compound is preferably a small molecule which binds to and occupies, for example, the active site of the human B7-H2 polypeptide, such that normal biological activity is prevented. Examples of such small molecules include, but are not limited to, small peptides or peptide-like molecules.

In binding assays, either the test compound or the human B7-H2 polypeptide can comprise a detectable label, such as a fluorescent, radioisotopic, chemiluminescent,

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 40 -

5 or enzymatic label, such as horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, or luciferase. Detection of a test compound which is bound to the human B7-H2 polypeptide can then be accomplished, for example, by direct counting of radio-emission, by scintillation counting, or by determining conversion of an appropriate substrate to a detectable product.

10 Alternatively, binding of a test compound to a human B7-H2 polypeptide can be determined without labeling either of the interactants. For example, a microphysiometer can be used to detect binding of a test compound with a human B7-H2 polypeptide. A microphysiometer (e.g., Cytosensor™) is an analytical instrument that measures the rate at which a cell acidifies its environment using a light-addressable potentiometric sensor (LAPS). Changes in this acidification rate can be used as an indicator of the interaction between a test compound and a human B7-H2 polypeptide (McConnell *et al.*, *Science* 257, 1906-1912, 1992).

15 Determining the ability of a test compound to bind to a human B7-H2 polypeptide also can be accomplished using a technology such as real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA) (Sjolander & Urbaniczky, *Anal. Chem.* 63, 2338-2345, 1991, and Szabo *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5, 699-705, 1995). BIA is a technology for studying biospecific interactions in real time, without labeling any of the interactants (e.g., BIAcore™). Changes in the optical phenomenon surface plasmon resonance (SPR) can be used as an indication of real-time reactions between biological molecules.

25 In yet another aspect of the invention, a human B7-H2 polypeptide can be used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three-hybrid assay (see, e.g., U.S. Patent 5,283,317; Zervos *et al.*, *Cell* 72, 223-232, 1993; Madura *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268, 12046-12054, 1993; Bartel *et al.*, *BioTechniques* 14, 920-924, 1993; Iwabuchi *et al.*, *Oncogene* 8, 1693-1696, 1993; and Brent W094/10300), to identify other proteins which bind to or interact with the human B7-H2 polypeptide and modulate its activity.

30

The two-hybrid system is based on the modular nature of most transcription factors, which consist of separable DNA-binding and activation domains. Briefly, the assay utilizes two different DNA constructs. For example, in one construct, polynucleotide  
5 encoding a human B7-H2 polypeptide can be fused to a polynucleotide encoding the DNA binding domain of a known transcription factor (e.g., GAL-4). In the other construct a DNA sequence that encodes an unidentified protein ("prey" or "sample") can be fused to a polynucleotide that codes for the activation domain of the known transcription factor. If the "bait" and the "prey" proteins are able to interact *in vivo*  
10 to form an protein-dependent complex, the DNA-binding and activation domains of the transcription factor are brought into close proximity. This proximity allows transcription of a reporter gene (e.g., LacZ), which is operably linked to a transcriptional regulatory site responsive to the transcription factor. Expression of the reporter gene can be detected, and cell colonies containing the functional  
15 transcription factor can be isolated and used to obtain the DNA sequence encoding the protein which interacts with the human B7-H2 polypeptide.

It may be desirable to immobilize either the human B7-H2 polypeptide (or polynucleotide) or the test compound to facilitate separation of bound from unbound  
20 forms of one or both of the interactants, as well as to accommodate automation of the assay. Thus, either the human B7-H2 polypeptide (or polynucleotide) or the test compound can be bound to a solid support. Suitable solid supports include, but are not limited to, glass or plastic slides, tissue culture plates, microtiter wells, tubes, silicon chips, or particles such as beads (including, but not limited to, latex, polystyrene, or glass beads). Any method known in the art can be used to attach the  
25 enzyme polypeptide (or polynucleotide) or test compound to a solid support, including use of covalent and non-covalent linkages, passive absorption, or pairs of binding moieties attached respectively to the polypeptide (or polynucleotide) or test compound and the solid support. Test compounds are preferably bound to the solid support in an array, so that the location of individual test compounds can be tracked.  
30 Binding of a test compound to a human B7-H2 polypeptide (or polynucleotide) can

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 42 -

be accomplished in any vessel suitable for containing the reactants. Examples of such vessels include microtiter plates, test tubes, and microcentrifuge tubes.

5 In one embodiment, the human B7-H2 polypeptide is a fusion protein comprising a domain that allows the human B7-H2 polypeptide to be bound to a solid support. For example, glutathione-S-transferase fusion proteins can be adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) or glutathione derivatized microtiter plates, which are then combined with the test compound or the test compound and the non-adsorbed human B7-H2 polypeptide; the mixture is then  
10 incubated under conditions conducive to complex formation (*e.g.*, at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the beads or microtiter plate wells are washed to remove any unbound components. Binding of the interactants can be determined either directly or indirectly, as described above. Alternatively, the complexes can be dissociated from the solid support before binding is determined.

15 Other techniques for immobilizing proteins or polynucleotides on a solid support also can be used in the screening assays of the invention. For example, either a human B7-H2 polypeptide (or polynucleotide) or a test compound can be immobilized utilizing conjugation of biotin and streptavidin. Biotinylated human B7-H2 polypeptides (or polynucleotides) or test compounds can be prepared from  
20 biotin-NHS(N-hydroxysuccinimide) using techniques well known in the art (*e.g.*, biotinylation kit, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) and immobilized in the wells of streptavidin-coated 96 well plates (Pierce Chemical). Alternatively, antibodies which specifically bind to a human B7-H2 polypeptide, polynucleotide, or a test compound,  
25 but which do not interfere with a desired binding site, such as the active site of the human B7-H2 polypeptide, can be derivatized to the wells of the plate. Unbound target or protein can be trapped in the wells by antibody conjugation.

30 Methods for detecting such complexes, in addition to those described above for the GST-immobilized complexes, include immunodetection of complexes using antibodies which specifically bind to the human B7-H2 polypeptide or test compound,

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 43 -

enzyme-linked assays which rely on detecting an activity of the human B7-H2 polypeptide, and SDS gel electrophoresis under non-reducing conditions.

5 Screening for test compounds which bind to a human B7-H2 polypeptide or polynucleotide also can be carried out in an intact cell. Any cell which comprises a human B7-H2 polypeptide or polynucleotide can be used in a cell-based assay system. A human B7-H2 polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Binding of the test compound to a human B7-H2 polypeptide or polynucleotide is determined as described above.

10

#### Gene Expression

In another embodiment, test compounds which increase or decrease human B7-H2 gene expression are identified. A human B7-H2 polynucleotide is contacted with a test compound, and the expression of an RNA or polypeptide product of the human B7-H2 polynucleotide is determined. The level of expression of appropriate mRNA or polypeptide in the presence of the test compound is compared to the level of expression of mRNA or polypeptide in the absence of the test compound. The test compound can then be identified as a modulator of expression based on this comparison. For example, when expression of mRNA or polypeptide is greater in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as a stimulator or enhancer of the mRNA or polypeptide expression. Alternatively, when expression of the mRNA or polypeptide is less in the presence of the test compound than in its absence, the test compound is identified as an inhibitor of the mRNA or polypeptide expression.

15

20

25

The level of human B7-H2 mRNA or polypeptide expression in the cells can be determined by methods well known in the art for detecting mRNA or polypeptide. Either qualitative or quantitative methods can be used. The presence of polypeptide products of a human B7-H2 polynucleotide can be determined, for example, using a

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 44 -

variety of techniques known in the art, including immunochemical methods such as radioimmunoassay, Western blotting, and immunohistochemistry. Alternatively, polypeptide synthesis can be determined *in vivo*, in a cell culture, or in an *in vitro* translation system by detecting incorporation of labeled amino acids into a human B7-H2 polypeptide.

Such screening can be carried out either in a cell-free assay system or in an intact cell. Any cell which expresses a human B7-H2 polynucleotide can be used in a cell-based assay system. The human B7-H2 polynucleotide can be naturally occurring in the cell or can be introduced using techniques such as those described above. Either a primary culture or an established cell line, such as CHO or human embryonic kidney 293 cells, can be used.

#### Pharmaceutical Compositions

The invention also provides pharmaceutical compositions that can be administered to a patient to achieve a therapeutic effect. Pharmaceutical compositions of the invention can comprise, for example, a human B7-H2 polypeptide, human B7-H2 polynucleotide, ribozymes or antisense oligonucleotides, antibodies which specifically bind to a human B7-H2 polypeptide, or mimetics, activators, or inhibitors of a human B7-H2 polypeptide activity. The compositions can be administered alone or in combination with at least one other agent, such as stabilizing compound, which can be administered in any sterile, biocompatible pharmaceutical carrier, including, but not limited to, saline, buffered saline, dextrose, and water. The compositions can be administered to a patient alone, or in combination with other agents, drugs or hormones.

In addition to the active ingredients, these pharmaceutical compositions can contain suitable pharmaceutically-acceptable carriers comprising excipients and auxiliaries that facilitate processing of the active compounds into preparations which can be used pharmaceutically. Pharmaceutical compositions of the invention can be ad-

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 45 -

5 ministered by any number of routes including, but not limited to, oral, intravenous, intramuscular, intra-arterial, intramedullary, intrathecal, intraventricular, transdermal, subcutaneous, intraperitoneal, intranasal, parenteral, topical, sublingual, or rectal means. Pharmaceutical compositions for oral administration can be formulated using pharmaceutically acceptable carriers well known in the art in dosages suitable for oral administration. Such carriers enable the pharmaceutical compositions to be formulated as tablets, pills, dragees, capsules, liquids, gels, syrups, slurries, suspensions, and the like, for ingestion by the patient.

10 Pharmaceutical preparations for oral use can be obtained through combination of active compounds with solid excipient, optionally grinding a resulting mixture, and processing the mixture of granules, after adding suitable auxiliaries, if desired, to obtain tablets or dragee cores. Suitable excipients are carbohydrate or protein fillers, such as sugars, including lactose, sucrose, mannitol, or sorbitol; starch from corn, 15 wheat, rice, potato, or other plants; cellulose, such as methyl cellulose, hydroxypropylmethyl-cellulose, or sodium carboxymethylcellulose; gums including arabic and tragacanth; and proteins such as gelatin and collagen. If desired, disintegrating or solubilizing agents can be added, such as the cross-linked polyvinyl pyrrolidone, agar, alginic acid, or a salt thereof, such as sodium alginate.

20 Dragee cores can be used in conjunction with suitable coatings, such as concentrated sugar solutions, which also can contain gum arabic, talc, polyvinylpyrrolidone, carbopol gel, polyethylene glycol, and/or titanium dioxide, lacquer solutions, and suitable organic solvents or solvent mixtures. Dyestuffs or pigments can be added to 25 the tablets or dragee coatings for product identification or to characterize the quantity of active compound, *i.e.*, dosage.

30 Pharmaceutical preparations that can be used orally include push-fit capsules made of gelatin, as well as soft, sealed capsules made of gelatin and a coating, such as glycerol or sorbitol. Push-fit capsules can contain active ingredients mixed with a filler or binders, such as lactose or starches, lubricants, such as talc or magnesium

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 46 -

stearate, and, optionally, stabilizers. In soft capsules, the active compounds can be dissolved or suspended in suitable liquids, such as fatty oils, liquid, or liquid polyethylene glycol with or without stabilizers.

- 5 Pharmaceutical formulations suitable for parenteral administration can be formulated in aqueous solutions, preferably in physiologically compatible buffers such as Hanks' solution, Ringer's solution, or physiologically buffered saline. Aqueous injection suspensions can contain substances that increase the viscosity of the suspension, such as sodium carboxymethyl cellulose, sorbitol, or dextran. Additionally, suspensions
- 10 of the active compounds can be prepared as appropriate oily injection suspensions. Suitable lipophilic solvents or vehicles include fatty oils such as sesame oil, or synthetic fatty acid esters, such as ethyl oleate or triglycerides, or liposomes. Non-lipid polycationic amino polymers also can be used for delivery. Optionally, the suspension also can contain suitable stabilizers or agents that increase the solubility
- 15 of the compounds to allow for the preparation of highly concentrated solutions. For topical or nasal administration, penetrants appropriate to the particular barrier to be permeated are used in the formulation. Such penetrants are generally known in the art.
- 20 The pharmaceutical compositions of the present invention can be manufactured in a manner that is known in the art, *e.g.*, by means of conventional mixing, dissolving, granulating, dragee-making, levigating, emulsifying, encapsulating, entrapping, or lyophilizing processes. The pharmaceutical composition can be provided as a salt and can be formed with many acids, including but not limited to, hydrochloric,
- 25 sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic, succinic, etc. Salts tend to be more soluble in aqueous or other protonic solvents than are the corresponding free base forms. In other cases, the preferred preparation can be a lyophilized powder which can contain any or all of the following: 1-50 mM histidine, 0.1%-2% sucrose, and 2-7% mannitol, at a pH range of 4.5 to 5.5, that is combined with buffer prior to use.
- 30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 47 -

Further details on techniques for formulation and administration can be found in the latest edition of REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Maack Publishing Co., Easton, Pa.). After pharmaceutical compositions have been prepared, they can be placed in an appropriate container and labeled for treatment of an indicated condition. Such labeling would include amount, frequency, and method of administration.

Therapeutic Indications and Methods

Human B7-H2 protein may be regulated to treat autoimmune diseases, allergic diseases, bacterial infections, and type I diabetes.

In order for the body to defend itself against different pathogens, different types of immune responses are necessary. For some pathogens, such as intracellular bacteria, a predominantly Th1 type of response is required to control infection, while for others, such as helminths or microbes present in the extracellular milieu, a Th2 type of response is required. Inappropriate polarization of immune responses can result in inadequate protection against infection, while unregulated overpolarization of responses can have harmful sequelae. In the case of intracellular bacterial infections, the counterregulatory cytokine IL-10 is secreted rapidly after infection to control Th1 responses (ref. 12). Such a response rely on B7-H2 both to transmit signals into the cell on which it is expressed and to stimulate ICOS on T cells. Similarly, when a Th2 response is appropriate, the amplification of the response by signaling through B7-H2 and stimulation of ICOS is necessary for adequate defense against a pathogen. On the other hand, in autoimmune diseases and allergic diseases, uncontrolled activation of the immune response causes tissue destruction, suffering, and sometimes life-threatening complications. Upregulated expression of B7-H2 following Th1 immune responses and downregulated expression of B7-H2 following Th2 immune responses is a possible method that the body can use to avoid autoimmunity and allergy after normal immune responses. The expression of different splice variants of B7-H2 also allows different cells to respond differently according to the situation. Therefore a

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 48 -

cell's decision on which B7-H2 variant to express and at what level may be crucial to the development and control of an appropriate immune response.

5 The development of inhibitors to block the functions of the B7-H2 V1 and B7-H2 V2 would be expected to be useful in the treatment of allergic diseases, such as respiratory allergies, food allergies, asthma, and atopic dermatitis, as well as in the treatment of intracellular bacterial infections, such as tuberculosis, leprosy, listeriosis, and salmonellosis, where a downregulation of the Th2 response and a repolarization towards a Th1 response would be beneficial. The development of  
10 molecules to enhance the functions of B7-H2 V1 and B7-H2 V2 is useful in the treatment of autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and type I diabetes, as well as in the treatment of helminth and extracellular microbial infections, where a repolarization towards a Th2 response would be beneficial.

15

This invention further pertains to the use of novel agents identified by the screening assays described above. Accordingly, it is within the scope of this invention to use a test compound identified as described herein in an appropriate animal model. For example, an agent identified as described herein (*e.g.*, a modulating agent, an antisense  
20 nucleic acid molecule, a specific antibody, ribozyme, or a human B7-H2 polypeptide binding molecule) can be used in an animal model to determine the efficacy, toxicity, or side effects of treatment with such an agent. Alternatively, an agent identified as described herein can be used in an animal model to determine the mechanism of action of such an agent. Furthermore, this invention pertains to uses of novel agents  
25 identified by the above-described screening assays for treatments as described herein.

A reagent which affects human B7-H2 activity can be administered to a human cell, either *in vitro* or *in vivo*, to reduce human B7-H2 activity. The reagent preferably binds to an expression product of a human B7-H2 gene. If the expression product is  
30 a protein, the reagent is preferably an antibody. For treatment of human cells *ex vivo*, an antibody can be added to a preparation of stem cells that have been removed from

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 49 -

the body. The cells can then be replaced in the same or another human body, with or without clonal propagation, as is known in the art.

5 In one embodiment, the reagent is delivered using a liposome. Preferably, the liposome is stable in the animal into which it has been administered for at least about 30 minutes, more preferably for at least about 1 hour, and even more preferably for at least about 24 hours. A liposome comprises a lipid composition that is capable of targeting a reagent, particularly a polynucleotide, to a particular site in an animal, such as a human. Preferably, the lipid composition of the liposome is capable of  
10 targeting to a specific organ of an animal, such as the lung, liver, spleen, heart brain, lymph nodes, and skin.

A liposome useful in the present invention comprises a lipid composition that is capable of fusing with the plasma membrane of the targeted cell to deliver its  
15 contents to the cell. Preferably, the transfection efficiency of a liposome is about 0.5  $\mu\text{g}$  of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about  $10^6$  cells, more preferably about 1.0  $\mu\text{g}$  of DNA per 16 nmole of liposome delivered to about  $10^6$  cells, and even more preferably about 2.0  $\mu\text{g}$  of DNA per 16 nmol of liposome delivered to about  $10^6$  cells. Preferably, a liposome is between about 100 and  
20 500 nm, more preferably between about 150 and 450 nm, and even more preferably between about 200 and 400 nm in diameter.

Suitable liposomes for use in the present invention include those liposomes  
25 standardly used in, for example, gene delivery methods known to those of skill in the art. More preferred liposomes include liposomes having a polycationic lipid composition and/or liposomes having a cholesterol backbone conjugated to polyethylene glycol. Optionally, a liposome comprises a compound capable of targeting the liposome to a particular cell type, such as a cell-specific ligand exposed on the outer surface of the liposome.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 50 -

Complexing a liposome with a reagent such as an antisense oligonucleotide or ribozyme can be achieved using methods that are standard in the art (see, for example, U.S. Patent 5,705,151). Preferably, from about 0.1  $\mu\text{g}$  to about 10  $\mu\text{g}$  of polynucleotide is combined with about 8 nmol of liposomes, more preferably from about 0.5  $\mu\text{g}$  to about 5  $\mu\text{g}$  of polynucleotides are combined with about 8 nmol liposomes, and even more preferably about 1.0  $\mu\text{g}$  of polynucleotides is combined with about 8 nmol liposomes.

In another embodiment, antibodies can be delivered to specific tissues *in vivo* using receptor-mediated targeted delivery. Receptor-mediated DNA delivery techniques are taught in, for example, Findeis *et al.* *Trends in Biotechnol.* 11, 202-05 (1993); Chiou *et al.*, GENE THERAPEUTICS: METHODS AND APPLICATIONS OF DIRECT GENE TRANSFER (J.A. Wolff, ed.) (1994); Wu & Wu, *J. Biol. Chem.* 263, 621-24 (1988); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269, 542-46 (1994); Zenke *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 3655-59 (1990); Wu *et al.*, *J. Biol. Chem.* 266, 338-42 (1991).

#### Determination of a Therapeutically Effective Dose

The determination of a therapeutically effective dose is well within the capability of those skilled in the art. A therapeutically effective dose refers to that amount of active ingredient that increases or decreases human B7-H2 activity relative to the human B7-H2 activity which occurs in the absence of the therapeutically effective dose.

For any compound, the therapeutically effective dose can be estimated initially either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rabbits, dogs, or pigs. The animal model also can be used to determine the appropriate concentration range and route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 51 -

Therapeutic efficacy and toxicity, *e.g.*, ED<sub>50</sub> (the dose therapeutically effective in 50% of the population) and LD<sub>50</sub> (the dose lethal to 50% of the population), can be determined by standard pharmaceutical procedures in cell cultures or experimental animals. The dose ratio of toxic to therapeutic effects is the therapeutic index, and it can be expressed as the ratio, LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>.

Pharmaceutical compositions that exhibit large therapeutic indices are preferred. The data obtained from cell culture assays and animal studies is used in formulating a range of dosage for human use. The dosage contained in such compositions is preferably within a range of circulating concentrations that include the ED<sub>50</sub> with little or no toxicity. The dosage varies within this range depending upon the dosage form employed, sensitivity of the patient, and the route of administration.

The exact dosage will be determined by the practitioner, in light of factors related to the subject that requires treatment. Dosage and administration are adjusted to provide sufficient levels of the active ingredient or to maintain the desired effect. Factors that can be taken into account include the severity of the disease state, general health of the subject, age, weight, and gender of the subject, diet, time and frequency of administration, drug combination(s), reaction sensitivities, and tolerance/response to therapy. Long-acting pharmaceutical compositions can be administered every 3 to 4 days, every week, or once every two weeks depending on the half-life and clearance rate of the particular formulation.

Normal dosage amounts can vary from 0.1 to 100,000 micrograms, up to a total dose of about 1 g, depending upon the route of administration. Guidance as to particular dosages and methods of delivery is provided in the literature and generally available to practitioners in the art. Those skilled in the art will employ different formulations for nucleotides than for proteins or their inhibitors. Similarly, delivery of polynucleotides or polypeptides will be specific to particular cells, conditions, locations, etc.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 52 -

If the reagent is a single-chain antibody, polynucleotides encoding the antibody can be constructed and introduced into a cell either *ex vivo* or *in vivo* using well-established techniques including, but not limited to, transferrin-polycation-mediated DNA transfer, transfection with naked or encapsulated nucleic acids, liposome-mediated cellular fusion, intracellular transportation of DNA-coated latex beads, 5 protoplast fusion, viral infection, electroporation, "gene gun," and DEAE- or calcium phosphate-mediated transfection.

Effective *in vivo* dosages of an antibody are in the range of about 5 µg to about 10 50 µg/kg, about 50 µg to about 5 mg/kg, about 100 µg to about 500 µg/kg of patient body weight, and about 200 to about 250 µg/kg of patient body weight. For administration of polynucleotides encoding single-chain antibodies, effective *in vivo* dosages are in the range of about 100 ng to about 200 ng, 500 ng to about 50 mg, about 1 µg to about 2 mg, about 5 µg to about 500 µg, and about 20 µg to about 100 15 µg of DNA.

If the expression product is mRNA, the reagent is preferably an antisense oligonucleotide or a ribozyme. Polynucleotides that express antisense oligonucleotides or ribozymes can be introduced into cells by a variety of methods, as described above.

20 Preferably, a reagent reduces expression of a human B7-H2 gene or the activity of a human B7-H2 polypeptide by at least about 10, preferably about 50, more preferably about 75, 90, or 100% relative to the absence of the reagent. The effectiveness of the mechanism chosen to decrease the level of expression of a human B7-H2 gene or the 25 activity of a human B7-H2 polypeptide can be assessed using methods well known in the art, such as hybridization of nucleotide probes to human B7-H2-specific mRNA, quantitative RT-PCR, immunologic detection of a human B7-H2 polypeptide, or measurement of human B7-H2 activity.

30 In any of the embodiments described above, any of the pharmaceutical compositions of the invention can be administered in combination with other appropriate thera-

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 53 -

peutic agents. Selection of the appropriate agents for use in combination therapy can be made by one of ordinary skill in the art, according to conventional pharmaceutical principles. The combination of therapeutic agents can act synergistically to effect the treatment or prevention of the various disorders described above. Using this approach, one may be able to achieve therapeutic efficacy with lower dosages of each agent, thus reducing the potential for adverse side effects.

Any of the therapeutic methods described above can be applied to any subject in need of such therapy, including, for example, mammals such as dogs, cats, cows, horses, rabbits, monkeys, and most preferably, humans.

#### Diagnostic Methods

Human B7-H2 also can be used in diagnostic assays for detecting diseases and abnormalities or susceptibility to diseases and abnormalities related to the presence of mutations in the nucleic acid sequences that encode the enzyme. For example, differences can be determined between the cDNA or genomic sequence encoding human B7-H2 in individuals afflicted with a disease and in normal individuals. If a mutation is observed in some or all of the afflicted individuals but not in normal individuals, then the mutation is likely to be the causative agent of the disease.

Sequence differences between a reference gene and a gene having mutations can be revealed by the direct DNA sequencing method. In addition, cloned DNA segments can be employed as probes to detect specific DNA segments. The sensitivity of this method is greatly enhanced when combined with PCR. For example, a sequencing primer can be used with a double-stranded PCR product or a single-stranded template molecule generated by a modified PCR. The sequence determination is performed by conventional procedures using radiolabeled nucleotides or by automatic sequencing procedures using fluorescent tags.

30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 54 -

Genetic testing based on DNA sequence differences can be carried out by detection of alteration in electrophoretic mobility of DNA fragments in gels with or without denaturing agents. Small sequence deletions and insertions can be visualized, for example, by high resolution gel electrophoresis. DNA fragments of different sequences can be distinguished on denaturing formamide gradient gels in which the mobilities of different DNA fragments are retarded in the gel at different positions according to their specific melting or partial melting temperatures (*see, e.g., Myers et al., Science 230, 1242, 1985*). Sequence changes at specific locations can also be revealed by nuclease protection assays, such as RNase and S 1 protection or the chemical cleavage method (*e.g., Cotton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 4397-4401, 1985*). Thus, the detection of a specific DNA sequence can be performed by methods such as hybridization, RNase protection, chemical cleavage, direct DNA sequencing or the use of restriction enzymes and Southern blotting of genomic DNA. In addition to direct methods such as gel-electrophoresis and DNA sequencing, mutations can also be detected by *in situ* analysis.

Altered levels of a human B7-H2 also can be detected in various tissues. Assays used to detect levels of the receptor polypeptides in a body sample, such as blood or a tissue biopsy, derived from a host are well known to those of skill in the art and include radioimmunoassays, competitive binding assays, Western blot analysis, and ELISA assays.

All patents and patent applications cited in this disclosure are expressly incorporated herein by reference. The above disclosure generally describes the present invention. A more complete understanding can be obtained by reference to the following specific examples which are provided for purposes of illustration only and are not intended to limit the scope of the invention.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 55 -

**EXAMPLE 1***Determination of the human B7-H2 V1 and V2 mRNA sequence*

5 The human amino acid sequences for CD80 (GenBank accession number NP\_005182), CD86 (GenBank accession number NP\_008820), and B7H1 (GenBank accession number NP\_054862), and the mouse mRNA sequence for B7h (GenBank accession number NP\_056605) were used to search the DNA DataBank of Japan (DDBJ) for homologous sequences using the TBLASTN component of the computer program BLAST 2.0 (National Center for Biotechnology Information). One human  
10 DNA sequence (GenBank accession number AB014553, annotated as the homo sapiens mRNA for KIAA0653 protein) was found that when conceptually translated had over 50% amino acid sequence identity with the mouse B7h amino acid sequence over a region of 231 residues and over 64% amino acid homology over a region of 231 residues.

15

The predicted open reading frame of the KIAA0653 gene was then cloned for further analysis. Primers flanking the open reading frame were designed using the computer program Primer 3.0 (Steve Rozen, Helen J. Skaletsky (1998) Primer3. Code available at [http://www-genome.wi.mit.edu/genome\\_software/other/primer3.html](http://www-genome.wi.mit.edu/genome_software/other/primer3.html)). Primers  
20 K653-L2 (SEQ ID NO:5) and K653-R6 (SEQ ID NO:6) were used to amplify the open reading by polymerase chain reaction using human peripheral blood leukocyte cDNA as the template in the reaction. The template cDNA was previously synthesized with the SMART RACE cDNA amplification kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) according to the manufacturer's protocol using human peripheral blood  
25 leukocyte-derived poly-A RNA as the starting material for cDNA synthesis. Successfully amplified fragments were cloned into the pCRII-TOPO vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and were sequenced on a ABI Prism 377 DNA sequencer (PE Biosystems) according to the manufacturer's standard sequencing protocol using primers complementary to the SP6 and T7 promoter regions flanking  
30 the insert on each vector. After sequencing, the DNA sequences of five selected clones (clones 14, 16, 17, 19, and 21) were compared with the published sequence

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 56 -

for KIAA0653 using the computer program Sequencher (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, MI, USA).

(Properties of the obtained cDNA)

- 5
1. The sequence of transcript 1 (from clone 14) has a coding region 912 bp in length.
  - 10 2. Compared with the original KIAA0653 mRNA sequence (GenBank accession number AB014553) reported for this gene, transcript 1 has a deletion of 636 bp from bases 1027 to 1662 of the KIAA0653 sequence. In addition, the G nucleotide at position 510 of KIAA0653 is changed to an A (position 482) in transcript 1.
  - 15 3. Compared with the GL50 mRNA sequence (GenBank accession number AF199028) reported for this gene, transcript 1 shows no significant homology in its 3' end (after base 998) with the 3' end (after base 921) of the of the GL50 sequence. In addition, the G nucleotide at position 405 of GL50 is changed to an A (position 482) in transcript 1.
  - 20 4. Compared with the B7-H2 mRNA sequence (GenBank accession number AF289028) reported for this gene, transcript 1 shows no significant homology in its 3' end (after base 998) with the 3' end (after base 1022) of the of the B7-H2 sequence. In addition, the G nucleotide at position 506 of B7-H2 is changed to an A (position 482) in transcript 1.
  - 25 5. The sequence of transcript 2 (from clones 16, 17, 19, and 21) has a coding region 1419 bp in length.
  6. Compared with the original KIAA0653 mRNA sequence reported for this gene, transcript 2 has a deletion of 129 bp from bases 1452 to 1580 of the KIAA0653 sequence. In addition, several nucleotide sequence differences outside of the deleted region are noted between transcript 2 and the original KIAA0653 sequence:  
30 KIAA0653 nucleotide 510 changed from G to A (transcript 2 position 482)  
KIAA0653 nucleotide 1115 changed from G to A (transcript 2 position 1087)

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 57 -

- KIAA0653 nucleotide 1185 changed from C to T (transcript 2 position 1157)  
KIAA0653 nucleotide 1323 changed from G to A (transcript 2 position 1295)  
KIAA0653 nucleotide 1593 changed from T to C (transcript 2 position 1436)
7. Compared with the GL50 mRNA sequence (GenBank accession number  
5 AFI99028) reported for this gene, transcript 2 shows no significant homology  
in its 3' end (after base 998) with the 3' end (after base 921) of the of the  
GL50 sequence. In addition, the G nucleotide at position 405 of GL50 is  
changed to an A (position 482) in transcript 2.
8. Compared with the B7-H2 mRNA sequence (GenBank accession number  
10 AF289028) reported for this gene, transcript 2 shows no significant homology  
in its 3' end (after base 998) with the 3' end (after base 1022) of the of the  
B7-H2 sequence. In addition, the G nucleotide at position 506 of B7-H2 is  
changed to an A (position 482) in transcript 2.
- 15 (Properties of the amino acid sequences encoded by the obtained cDNA)
1. The translation of the transcript 1 clone (B7-H2 V1) gave an amino acid  
sequence 304 residues in length.
2. The translation of the transcript 1 sequence differs from the conceptual  
20 translation of KIAA0653 (GenBank accession number BAA31628) by  
lacking the first 42 residues of KIAA0653 and having a substitution of valine  
(KIAA0653 residue 170) to isoleucine (B7-H2 V1 residue 128). KIAA0653  
residues 342 through 553, corresponding to bases 1027-1662 of the  
KIAA0653 transcript, are also lacking.
- 25 3. The translation of the transcript 1 sequence differs from the conceptual  
translation of GL50 (GenBank accession number AAF34739) by having a  
substitution of valine (GL50 residue 128) to isoleucine (B7-H2 V1 residue  
128), but is otherwise identical in the first 299 residues. The carboxy  
terminals after residue 299 of both sequences show no significant homology.
- 30 4. The translation of the transcript 1 sequence differs from the conceptual  
translation of B7-H2 (GenBank accession number AAG01176) by having a

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 58 -

- substitution of valine (GL50 residue 128) to isoleucine (B7-H2 V1 residue 128), but is otherwise identical in the first 299 residues. The carboxy terminals after residue 299 of both sequences show no significant homology.
5. The translation of the transcript 2 clones gives an amino acid sequence 473 residues in length.
6. The translation of the transcript 2 sequence differs from the conceptual translation of KIAA0653 at the following residues:  
KIAA0653 residue 170 valine changed to isoleucine (B7-H2 V2 residue 128)  
KIAA0653 residue 395 arginine changed to tryptophan (B7-H2 V2 residue 353)  
KIAA0653 residue 441 aspartate changed to asparagine (B7-H2 V2 residue 399)  
KIAA0653 residue 531 tryptophan changed to arginine (B7-H2 V2 residue 446)  
KIAA0653 residues 484 through 526, corresponding to bases 1452-1580 of the KIAA0653 transcript, are deleted.
7. The translation of the transcript 2 sequence differs from the conceptual translation of GL50 (GenBank accession number AAF34739) by having a substitution of valine (GL50 residue 128) to isoleucine (B7-H2 V2 residue 128), but is otherwise identical in the first 299 residues. The carboxy terminals after residue 299 of both sequences show no significant homology.
8. The translation of the transcript 2 sequence differs from the conceptual translation of B7-H2 (GenBank accession number AAG01176) by having a substitution of valine (GL50 residue 128) to isoleucine (B7-H2 V2 residue 128), but is otherwise identical in the first 299 residues. The carboxy terminals after residue 299 of both sequences show no significant homology.

**EXAMPLE 2***Tissue distribution of human B7-H2*

5 Expression profiling is based on a quantitative polymerase chain reaction (PCR) analysis, also called kinetic analysis, first described in Higuchi et al., 1992 and Higuchi et al., 1993. The principle is that at any given cycle within the exponential phase of PCR, the amount of product is proportional to the initial number of template copies. Using this technique, the expression levels of particular genes, which are transcribed from the chromosomes as messenger RNA (mRNA), are measured by first making a DNA copy (cDNA) of the mRNA, and then performing quantitative PCR on the cDNA, a method called quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (quantitative RT-PCR).

15 Quantitative RT-PCR analysis of RNA from different human tissues was performed to investigate the tissue distribution of B7-H2 transcript 1 or 2 mRNA. 25 .mu.g of total RNA from various tissues (Human Total RNA Panel I-V, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA) was used as a template to synthesize first-strand cDNA using the SUPERSRIPT™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, Rockville, MD, USA). First-strand cDNA synthesis was carried out according to the manufacturer's protocol using oligo (dT) to hybridize to the 3' poly A tails of mRNA and prime the synthesis reaction. 10 ng of the first-strand cDNA was then used as template in a polymerase chain reaction. The polymerase chain reaction was performed in a LightCycler (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA), in the presence of the DNA-binding fluorescent dye SYBR Green I which binds to the minor groove of the DNA double helix, produced only when double-stranded DNA is successfully synthesized in the reaction (Morrison et al., 1998). Upon binding to double-stranded DNA, SYBR Green I emits light that can be quantitatively measured by the LightCycler machine. The polymerase chain reaction was carried out using oligonucleotide primers K653-L5 (SEQ ID NO:7) and K653-R8 (SEQ ID NO:8) and measurements of the intensity of emitted light were taken following each cycle of the reaction when the reaction had reached a

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 60 -

temperature of 87 degrees C. Intensities of emitted light were converted into copy numbers of the gene transcript per nanogram of template cDNA by comparison with simultaneously reacted standards of known concentration.

5 To correct for differences in mRNA transcription levels per cell in the various tissue types, a normalization procedure was performed using similarly calculated expression levels in the various tissues of five different housekeeping genes: glycerinaldehyde-3-phosphatase (G3PDH), hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HPRT), beta-actin, porphobilinogen deaminase (PBGD), and beta-2-  
10 microglobulin. The level of housekeeping gene expression is considered to be relatively constant for all tissues (Adams et al., 1993, Adams et al., 1995, Liew et al., 1994) and therefore can be used as a gauge to approximate relative numbers of cells per .mu.g of total RNA used in the cDNA synthesis step. Except for the use of a slightly different set of housekeeping genes and the use of the LightCycler system to  
15 measure expression levels, the normalization procedure was essentially the same as that described in the RNA Master Blot User Manual, Appendix C (1997, Clontech Laboratories, Palo Alto, CA, USA). In brief, expression levels of the five housekeeping genes in all tissue samples were measured in three independent reactions per gene using the LightCycler and a constant amount (25 .mu.g) of starting  
20 RNA. The calculated copy numbers for each gene, derived from comparison with simultaneously reacted standards of known concentrations, were recorded and converted into a percentage of the sum of the copy numbers of the gene in all tissue samples. Then for each tissue sample, the sum of the percentage values for each gene was calculated, and a normalization factor was calculated by dividing the sum  
25 percentage value for each tissue by the sum percentage value of one of the tissues arbitrarily selected as a standard. To normalize an experimentally obtained value for the expression of a particular gene in a tissue sample, the obtained value was multiplied by the normalization factor for the tissue tested. Results are given in FIG.3, showing the experimentally obtained copy numbers of mRNA per 10 ng of  
30 first-strand cDNA on the left and the normalized values on the right. RNAs used for

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 61 -

the cDNA synthesis, along with their supplier and catalog numbers are shown in table 1.

**Table 1****Table 1. Whole-body-screen tissues**

<b>Tissue</b>	<b>Supplier</b>	<b>Panel name and catalog number</b>
1. brain	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
2. heart	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
3. kidney	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
4. liver	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
5. lung	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
6. trachea	Clontech	Human Total RNA Panel I, K4000-1
7. bone marrow	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
8. colon	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
9. small intestine	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
10. spleen	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
11. stomach	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
12. thymus	Clontech	Human Total RNA Panel II, K4001-1
13. mammary gland	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
14. skeletal muscle	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
15. prostate	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
16. testis	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
17. uterus	Clontech	Human Total RNA Panel III, K4002-1
18. cerebellum	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
19. fetal brain	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
20. fetal liver	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
21. spinal cord	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
22. placenta	Clontech	Human Total RNA Panel IV, K4003-1
23. adrenal gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
24. pancreas	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
25. salivary gland	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1
26. thyroid	Clontech	Human Total RNA Panel V, K4004-1

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 63 -

As shown in Fig. 3, B7-H2 are broadly expressed in all tissue types so far tested, with highest expression seen in liver, kidney, brain, heart, placenta, spinal cord, mammary gland, and lung.

5 **EXAMPLE3**

*Expression of human B7-H2*

The expression vector pcDNA 3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used to produce large quantities of recombinant human B7-H2 like polypeptides in Chinese hamster ovary (CHO) cells. The human B7-H2-encoding DNA sequence is derived from SEQ ID NO:1 or 2. Before insertion into vector pcDNA 3.1, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains B7-H2 and Ig fusion gene by fusing the cDNA of the extracellular domain of B7-H2 in frame to the CH2-CH3 portion of human IgG1. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pcDNA 3.1 with the corresponding restriction enzymes the modified DNA sequence is ligated into pcDNA3.1. The resulting phB7-H2 Ig vector is used to transfect the CHO cell, a B7-H2 negative cell line.

20 The cells are cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the secreted recombinantly produced protein (B7-H2 Ig) is purified and used in the next example.

**EXAMPLE4**

25 *T cell proliferation with the costimulation of B7-H2*

T cells are purified from human PBMC of healthy donors and then stimulated with B7-H2 Ig obtained in Example 3 in the presence of suboptimal doses of an anti-CD3 mAb. T-cell proliferation is determined by incorporation of <sup>3</sup>H-TdR after 3-day culture. B7-H2 Ig enhances T-cell proliferation compared to the control Ig in the presence of immobilized anti-CD3 mAb.

**EXAMPLE 5***Cytokine secretion by B7-H2 costimulation*

- 5 The level of Cytokine e.g., IL-2, IL-4, and IL-10 in the T-cell culture supernatants by the stimulation of B7-H2Ig and an optimal dose of an anti-CD3 mAb are determined by sandwich ELISA. T-cells costimulated by B7-H2Ig in the presence of an optimal dose of anti-CD3 mAb increase levels of IL-4 and IL-10.

**EXAMPLE 6***Expression of human ICOS*

- The expression vector pcDNA 3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used to produce large quantities of recombinant human ICOS polypeptides in Chinese hamster ovary (CHO) cells. The human ICOS-encoding DNA sequence is derived from the sequence of GenBank accession number AB0231353.

- Before insertion into vector pcDNA 3.1, the DNA sequence is modified by well known methods in such a way that it contains ICOS and Ig fusion gene by fusing the cDNA of the extracellular domain of ICOS in frame to the CH2-CH3 portion of human IgG1. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pcDNA 3.1 with the corresponding restriction enzymes the modified DNA sequence is ligated into pcDNA3.1. The resulting pICOS Ig vector is used to transfect the CHO cell.

- 25 The cells are cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the secreted recombinantly produced protein (ICOS Ig) is purified and used in the next example.

**EXAMPLE 7***B cell proliferation with the costimulation of ICOS*

5 The expression vector pcDNA 3.1 vector (Invitrogen, Carlsbad, CA) is used to produce recombinant human B7-H2 V1 and B7-H2 V2 polypeptides in B-cells. The human B7-H2 V1 and B7-H2 V2 DNA sequence is derived from the sequence of SEQ ID NO:1 and SEQ ID NO:2, respectively.

10 Before insertion into vector pcDNA 3.1, each of the DNA sequences is modified by well known methods in such a way that it contains at its 5'-end an initiation codon and at its 3'-end a termination codon. Moreover, at both termini recognition sequences for restriction endonucleases are added and after digestion of the multiple cloning site of pcDNA 3.1 with the corresponding restriction enzymes the modified  
15 DNA sequence is ligated into pcDNA3.1. The resulting phB7-H2 V1 vector or phB7-H2 V2 is used to transfect the B cell purified from human PBMC of healthy donors.

The cells are cultivated under usual conditions in 5 liter shake flasks and the  
20 transfectants with recombinantly produced protein (B7-H2 V1 or B7-H2 V2) are obtained. B cells so obtained are then stimulated with ICOS Ig obtained in Example 6 in the presence of suboptimal doses of an anti-CD3 mAb. B-cell proliferation is determined by incorporation of <sup>3</sup>H-TdR after 3-day culture. ICOS Ig enhances B-cell proliferation compared to the control Ig in the presence of immobilized anti-CD3  
25 mAb.

**EXAMPLE 8***Cytokine secretion by ICOS costimulation*

30 The level of Cytokine e.g., IL-2, IL-4, and IL-10 in the transfectant B-cell culture supernatants by the stimulation of ICOS Ig and an optimal dose of an anti-CD3 mAb

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 66 -

are determined by sandwich ELISA. B-cells costimulated by ICOSIg in the presence of an optimal dose of an anti-CD3 mAb change levels of some cytokines.

**EXAMPLE 9**5 *Identification of test compounds that bind to human B7-H2 polypeptides*

Purified human B7-H2 polypeptides comprising a glutathione-S-transferase protein and absorbed onto glutathione-derivatized wells of 96-well microtiter plates are contacted with test compounds from a small molecule library at pH 7.0 in a  
10 physiological buffer solution. Human B7-H2 polypeptides comprise the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:2. The test compounds comprise a fluorescent tag. The samples are incubated for 5 minutes to one hour. Control samples are incubated in the absence of a test compound.

15 The buffer solution containing the test compounds is washed from the wells. Binding of a test compound to a human B7-H2 polypeptide is detected by fluorescence measurements of the contents of the wells. A test compound that increases the fluorescence in a well by at least 15% relative to fluorescence of a well in which a test compound is not incubated is identified as a compound which binds to  
20 a human B7-H2 polypeptide.

**EXAMPLE 10***Identification of a test compound which modulates human B7-H2 gene expression*

25 A test compound is administered to a culture of human cells transfected with a human B7-H2 expression construct and incubated at 37 °C for 10 to 45 minutes. A culture of the same type of cells that have not been transfected is incubated for the same time without the test compound to provide a negative control.

30 RNA is isolated from the two cultures as described in Chirgwin *et al.*, *Biochem. 18*, 5294-99, 1979). Northern blots are prepared using 20 to 30 µg total RNA and

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 67 -

hybridized with a <sup>32</sup>P-labeled human B7-H2-specific probe at 65 °C in Express-hyb (CLONTECH). The probe comprises at least 11 contiguous nucleotides selected from the complement of SEQ ID NO:1 or 2. A test compound that decreases the human B7-H2-specific signal relative to the signal obtained in the absence of the test compound is identified as an inhibitor of human B7-H2 gene expression.

#### REFERENCES

1. Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Miyajima, N., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N. and Ohara, O. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 5 (3), 169-176 (1998).
2. Ling V, Wu PW, Finnerty HF, Bean KM, Spaulding V, Fouser LA, Leonard JP, Hunter SE, Zollner R, Thomas JL, Miyashiro JS, Jacobs KA, Collins M. Cutting edge: identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor. *J Immunol.* 2000 Feb 15;164(4):1653-7.
3. Mages HW, Hutloff A, Heuck C, Buchner K, Himmelbauer H, Oliveri F, Kroczek RA. Molecular cloning and characterization of murine ICOS and identification of B7h as ICOS ligand. *Eur J Immunol.* 2000 Apr;30(4):1040-7.
4. Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, Sonnenberg M, Boone T, Brankow D, Dai T, Delaney J, Han H, Hui A, Kohno T, Manoukian R, Whoriskey JS, Coccia MA. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int Immunol.* 2000 Oct;12(10):1439-47.
5. Yoshinaga SK, Whoriskey JS, Khare SD, Sarmiento U, Guo J, Horan T, Shih G, Zhang M, Coccia MA, Kohno T, Tafuri-Bladt A, Brankow D, Campbell P,

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 68 -

- Chang D, Chiu L, Dai T, Duncan G, Elliott GS, Hui A, McCabe SM, Scully S, Shahinian A, Shaklee CL, Van G, Mak TW, Senaldi G. T-cell co-stimulation through B7RP-1 and ICOS. *Nature*. 1999 Dec 16;402(6763):827-32.
- 5
6. Yoshinaga SK, Zhang M, Pistillo J, Horan T, Khare SD, Miner K, Sonnenberg M, Boone T, Brankow D, Dai T, Delaney J, Han H, Hui A, Kohno T, Manoukian R, Whoriskey JS, Coccia MA. Characterization of a new human B7-related protein: B7RP-1 is the ligand to the co-stimulatory protein ICOS. *Int Immunol*. 2000 Oct;12(10):1439-47.
- 10
7. Wang S, Zhu G, Chapoval AI, Dong H, Tamada K, Ni J, Chen L. Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS. *Blood*. 2000 Oct 15;96(8):2808-13.
- 15
8. Hutloff A, Dittrich AM, Beier KC, Eljaschewitsch B, Kraft R, Anagnostopoulos I, Kroczek RA. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*. 1999 Jan 21;397(6716):263-6.
- 20
9. McAdam AJ, Chang TT, Lumelsky AE, Greenfield EA, Boussiotis VA, Duke-Cohan JS, Chernova T, Malenkovich N, Jabs C, Kuchroo VK, Ling V, Collins M, Sharpe AH, Freeman GJ. Mouse inducible costimulatory molecule (ICOS) expression is enhanced by CD28 costimulation and regulates differentiation of CD4(+) T cells. *J Immunol*. 2000 Nov 1;165(9):5035-40.
- 25
10. Coyle AJ, Lehar S, Lloyd C, Tian J, Delaney T, Manning S, Nguyen T, Burwell T, Schneider H, Gonzalo JA, Gosselin M, Owen LR, Rudd CE, Gutierrez-Ramos JC. The CD28-related molecule ICOS is required for effective T cell-dependent immune responses. *Immunity*. 2000 Jul;13(1):95-105.
- 30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 69 -

11. David P. Harris, Laura Haynes, Peter C. Sayles, Debra K. Duso, Sheri M. Eaton, Nancy M. Lepak, Lawrence L. Johnson, Susan L. Swain, Frances E. Lund. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nature Immunology*. 2000 Dec;1(6): 475-482.  
5
12. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Apr 15;90(8):3725-9.  
10
13. Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *BioTechnology* 10:413-417.
14. Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. and Watson, R. (1993) Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *BioTechnology* 11:1026-1030.  
15
15. T.B. Morrison, J.J. Weis & C.T. Wittwer (1998) Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24:954-962.  
20
16. Adams, M. D., Kerlavage, A. R., Fields, C. & Venter, C. (1993) 3,400 new expressed sequence tags identify diversity of transcripts in human brain. *Nature Genet*. 4:256-265.
17. Adams, M. D., et al. (1995) Initial assessment of human gene diversity and expression patterns based upon 83 million nucleotides of cDNA sequence. *Nature* 377 supp:3-174.  
25
18. Liew, C. C., Hwang, D. M., Fung, Y. W., Laursen, C., Cukerman, E., Tsui, S. & Lee, C. Y. (1994) A catalog of genes in the cardiovascular system as identified by expressed sequence tags. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10145-10649.  
30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 70 -

CLAIMS

1. An isolated polynucleotide being selected from the group consisting of:
  - a) a polynucleotide encoding a B7-H2 V polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:
    - 5 amino acid sequences which are at least about 90% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3;
    - amino acid sequences which are at least about 90% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:4;
    - 10 the amino acid sequence shown in SEQ ID NO:3 and the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4.
  - b) a polynucleotide comprising the sequence of SEQ ID NO: 1 or SEQ ID NO:2;
  - c) a polynucleotide which hybridizes under stringent conditions to a polynucleotide specified in (a) and (b) and encodes a B7-H2 V polypeptide;
  - 15 d) a polynucleotide the sequence of which deviates from the polynucleotide sequences specified in (a) to (c) due to the degeneration of the genetic code and encodes a B7-H2 V polypeptide; and
  - 20 e) a polynucleotide which represents a fragment, derivative or allelic variation of a polynucleotide sequence specified in (a) to (d) and encodes a B7-H2 V polypeptide.
2. An expression vector containing any polynucleotide of claim 1.
- 25 3. A host cell containing the expression vector of claim 2.
4. A substantially purified B7-H2 V polypeptide encoded by a polynucleotide of claim 1.
- 30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 71 -

5. A method for producing a B7-H2 V polypeptide, wherein the method comprises the steps of:
- 5 a) culturing the host cell of claim 3 under conditions suitable for the expression of the B7-H2 V polypeptide; and
- b) recovering the B7-H2 V polypeptide from the host cell culture.
6. A method for the detection of polynucleotides encoding a B7-H2 V polypeptide in a biological sample comprising the steps of:
- 10 a) hybridizing a polynucleotide of claim 1 to nucleic acid material of a biological sample, thereby forming a hybridization complex; and
- b) detecting said hybridization complex; wherein the presence of said
- 15 complex correlates with the presence of a polynucleotide encoding the B7-H2 in said biological sample.
7. The method of claim 6, wherein before hybridization, the nucleic acid material of the biological sample is amplified.
- 20 8. A method for the detection of a polynucleotide of claim 1 or a B7-H2 V polypeptide of claim 4 comprising the steps of contacting a biological sample with a reagent which specifically interacts with the polynucleotide of the B7-H2 V polypeptide.
- 25 9. A diagnostic kit for conducting the method of any one of claim 6 to 8.
10. A method of screening for agents which decrease the activity of B7-H2 V, comprising the steps of:

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 72 -

- 5 contacting a test compound with any B7-H2 V polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1;  
and detecting binding of the test compound to the B7-H2 V polypeptide, wherein a test compound which binds to the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of B7-H2 V.
11. A method of screening for agents which regulate the activity of B7-H2 V, comprising the steps of:  
10 contacting a test compound with any B7-H2 V polypeptide encoded by any polynucleotide of claim 1; and  
detecting B7-H2 V activity of the polypeptide, wherein a test compound which increases the B7-H2 V activity is identified as a potential therapeutic agent for increasing the activity of B7-H2 V, and wherein a test compound which decreases the B7-H2 V activity of the polypeptide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of B7-H2 V.
- 15 12. A method of screening for agents which decrease the activity of B7-H2 V, comprising the steps of:  
20 contacting a test compound with any B7-H2 V polynucleotide of claim 1; and  
detecting binding of the test compound to the polynucleotide, wherein a test compound which binds to the polynucleotide is identified as a potential therapeutic agent for decreasing the activity of B7-H2 V.
- 25 13. A method of reducing the activity of B7-H2 V, comprising the steps of:  
contacting a cell with a reagent which specifically binds to any polynucleotide of claim 1 ; or  
any polypeptide of claim 4, whereby the activity of B7-H2 V is reduced.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 73 -

14. A reagent that modulates the activity of B7-H2 V polypeptide or a polynucleotide wherein said reagent is identified by the method of any of the claim 10 to 12.
- 5 15. A pharmaceutical composition, comprising the reagent of claim 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.
16. Use of the reagent of claim 14 in the preparation of a medicament for modulating the activity of B7-H2 V in a disease.
- 10 17. Use of claim 16 wherein the disease is an infectious disease, asthma or an allergic or inflammatory disease.
- 15 18. A method of screening for agents which can regulate the activity of B7-H2 V protein, comprising the steps of:  
contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid sequence which is at least about 90% identical to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 3 or 4; or the sequence shown in SEQ ID NO: 3 or 4; and detecting binding of the test compound to the polypeptide, wherein a test  
20 compound which binds to the polypeptide is identified as a potential agent for regulating activity of the B7-H2 V protein.
19. A method of claim 18 wherein the step of contacting is in a cell.
- 25 20. The method of claim 18 wherein the cell is *in vitro*.
21. The method of claim 18 wherein the step of contacting is in a cell-free system.
- 30 22. The method of claim 18 wherein the polypeptide comprises a detectable label.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 74 -

23. The method of claim 18 wherein the test compound comprises a detectable label.
24. The method of claim 18 wherein the test compound displaces a labeled  
5 ligand which is bound to the polypeptide.
25. The method of claim 18 wherein the polypeptide is bound to a solid support.
26. The method of claim 18 wherein the test compound is bound to a solid support.  
10
27. A method of screening for agents which regulate the activity of B7-H2 V protein, comprising the steps of:  
contacting a test compound with a polypeptide comprising an amino acid  
sequence which is at least about 90% identical to the amino acid sequence  
15 shown in SEQ ID NO: 3 or 4; or the sequence shown in SEQ ID NO: 3 or 4;  
and  
detecting an activity of the polypeptide, wherein a test compound which  
increases the activity of the polypeptide is identified as a potential agent for  
increasing the activity of the human B7-H2 V protein, and wherein a test  
20 compound which decreases the activity of the polypeptide is identified as a  
potential agent for decreasing the activity of the human B7-H2 V protein.
28. The method of claim 27 wherein the step of contacting is in a cell.
- 25 29. The method of claim 27 wherein the cell is *in vitro*.
30. The method of claim 27 wherein the step of contacting is in a cell-free system.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 75 -

31. A method of screening for agents which regulate B7-H2 V protein,  
comprising the steps of:  
contacting a test compound with a product encoded by a polynucleotide  
which comprises the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2; and  
5 detecting binding of the test compound to the product, wherein a test  
compound which binds to the product is identified as a potential agent for  
regulating the activity of human B7-H2 V protein.
32. The method of claim 31 wherein the product is a polypeptide.
- 10 33. The method of claim 31 wherein the product is RNA.
34. A method of reducing activity of a human B7-H2 V protein, comprising the  
step of:  
15 contacting a cell with a reagent which specifically binds to a product encoded  
by a polynucleotide comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID  
NO:1 or 2, whereby the activity of a human B7-H2 V protein is reduced.
35. The method of claim 34 wherein the product is a polypeptide.
- 20 36. The method of claim 35 wherein the reagent is an antibody.
37. The method of claim 35 wherein the product is RNA.
- 25 38. The method of claim 34 wherein the reagent is an antisense oligonucleotide.
39. The method of claim 34 wherein the reagent is a ribozyme.
40. The method of claim 34 wherein the cell is *in vitro*.
- 30

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 76 -

41. The method of claim 34 wherein the cell is *in vivo*.
42. A pharmaceutical composition, comprising:  
a reagent which specifically binds to a polypeptide comprising the amino acid  
5 sequence shown in SEQ ID NO:3 or 4 ; and  
a pharmaceutically acceptable carrier.
43. The pharmaceutical composition of claim 42 wherein the reagent is an  
10 antibody.
44. A pharmaceutical composition, comprising:  
a reagent which specifically binds to a product of a polynucleotide  
comprising the nucleotide sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2; and  
a pharmaceutically acceptable carrier.  
15
45. The pharmaceutical composition of claim 44 wherein the reagent is a  
ribozyme.
46. The pharmaceutical composition of claim 44 wherein the reagent is an  
20 antisense oligonucleotide.
47. The pharmaceutical composition of claim 44 wherein the reagent is an  
antibody.
- 25 48. A method of treating B7-H2 V dysfunction related disease, wherein the  
disease is selected from an infectious disease, asthma, or an allergic or  
inflammatory disease comprising the step of:  
administering to a patient in need thereof a therapeutically effective dose of a  
30 reagent that regulates the function of human B7-H2 V protein, whereby  
symptoms of the B7-H2 V dysfunction related disease are ameliorated.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 77 -

49. The method of claim 48 wherein the reagent is identified by the method of claim 18.
50. The method of claim 48 wherein the reagent is identified by the method of claim 27.
51. The method of claim 48 wherein the reagent is identified by the method of claim 31.

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 1/22 -

Fig. 1

Alignment of B7-H2 alternative splice variants, nucleotide sequences  
 AB014553 = KIAA0653  
 AF199028 = GL50  
 AF289028 = B7-H2

AB014553	GCGCAGTTAG	AGCCGATCTC	CGCGGCCCG	AGTTTGTCTC	TCTCCGAGGT	50
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	0
AF289028	--G-AG-TAG	AGCCGATCTC	CGCGGCCCG	AGTTTGTCTC	TCTCCGAGGT	46
B7H2_V1	-----	-----	-----CG	AGTTTGTCTC	TCTCCGAGGT	22
B7H2_V2	-----	-----	-----CG	AGTTTGTCTC	TCTCCGAGGT	22
AB014553	CTCCCGCGGC	CCAAGTTCTC	CGCGCCCGCA	GGTCTCCGCG	CCCCGAGGTC	100
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	0
AF289028	CTCCCGCGGC	CCAAGTTCTC	CGCGCCCGCA	GGTCTCCGCG	CCCCGAGGTC	96
B7H2_V1	CTCCCGCGGC	CCAAGTTCTC	CGCGCCCGCA	GGTCTCCGCG	CCCCGAGGTC	72
B7H2_V2	CTCCCGCGGC	CCAAGTTCTC	CGCGCCCGCA	GGTCTCCGCG	CCCCGAGGTC	72
AB014553	TCCGCGGCC	GAGTCTCCG	CCCGCACCAT	CGGGCTGGGC	AGTCCCTGGAC	150
AF199028	-----GGCC	GAGTCTCCG	CCCGCACCAT	CGGGCTGGGC	AGTCCCTGGAC	145
AF289028	TCCGCGGCC	GAGTCTCCG	CCCGCACCAT	CGGGCTGGGC	AGTCCCTGGAC	145
B7H2_V1	TCCGCGGCC	GAGTCTCCG	CCCGCACCAT	CGGGCTGGGC	AGTCCCTGGAC	122
B7H2_V2	TCCGCGGCC	GAGTCTCCG	CCCGCACCAT	CGGGCTGGGC	AGTCCCTGGAC	122
AB014553	TGCTCTTCT	GCTCTTCAGC	AGCCTTCGAG	CTGATACTCA	GGAGAAGGAA	200
AF199028	TGCTCTTCT	GCTCTTCAGC	AGCCTTCGAG	CTGATACTCA	GGAGAAGGAA	95
AF289028	TGCTCTTCT	GCTCTTCAGC	AGCCTTCGAG	CTGATACTCA	GGAGAAGGAA	196
B7H2_V1	TGCTCTTCT	GCTCTTCAGC	AGCCTTCGAG	CTGATACTCA	GGAGAAGGAA	172
B7H2_V2	TGCTCTTCT	GCTCTTCAGC	AGCCTTCGAG	CTGATACTCA	GGAGAAGGAA	172

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

-2/22-

Fig. 1 (continued)

AB014553	FTCAGAGCGA	TGGTAGGCAG	CGACGTGGAG	CTCAGCTGGC	CTTGCCCTGA	250
AF199028	FTCAGAGCGA	TGGTAGGCAG	CGACGTGGAG	CTCAGCTGGC	CTTGCCCTGA	145
AF289028	FTCAGAGCGA	TGGTAGGCAG	CGACGTGGAG	CTCAGCTGGC	CTTGCCCTGA	246
B7H2_V1	FTCAGAGCGA	TGGTAGGCAG	CGACGTGGAG	CTCAGCTGGC	CTTGCCCTGA	222
B7H2_V2	FTCAGAGCGA	TGGTAGGCAG	CGACGTGGAG	CTCAGCTGGC	CTTGCCCTGA	222
AB014553	AGGAAGCCGT	TTTGATTTAA	ATGATGTTTA	CGTATATTTG	CAAAACAGTG	300
AF199028	AGGAAGCCGT	TTTGATTTAA	ATGATGTTTA	CGTATATTTG	CAAAACAGTG	195
AF289028	AGGAAGCCGT	TTTGATTTAA	ATGATGTTTA	CGTATATTTG	CAAAACAGTG	295
B7H2_V1	AGGAAGCCGT	TTTGATTTAA	ATGATGTTTA	CGTATATTTG	CAAAACAGTG	272
B7H2_V2	AGGAAGCCGT	TTTGATTTAA	ATGATGTTTA	CGTATATTTG	CAAAACAGTG	272
AB014553	AGTCGAAAAC	CGTGTGACC	TACCACATCC	CACAGAACAG	CTCCTTGGAA	350
AF199028	AGTCGAAAAC	CGTGTGACC	TACCACATCC	CACAGAACAG	CTCCTTGGAA	245
AF289028	AGTCGAAAAC	CGTGTGACC	TACCACATCC	CACAGAACAG	CTCCTTGGAA	346
B7H2_V1	AGTCGAAAAC	CGTGTGACC	TACCACATCC	CACAGAACAG	CTCCTTGGAA	322
B7H2_V2	AGTCGAAAAC	CGTGTGACC	TACCACATCC	CACAGAACAG	CTCCTTGGAA	322
AB014553	AACGTGGACA	GCCGCTACCG	GAAACCGAGCC	CTGATGTTCAC	CGGCCGGCAT	400
AF199028	AACGTGGACA	GCCGCTACCG	GAAACCGAGCC	CTGATGTTCAC	CGGCCGGCAT	295
AF289028	AACGTGGACA	GCCGCTACCG	GAAACCGAGCC	CTGATGTTCAC	CGGCCGGCAT	395
B7H2_V1	AACGTGGACA	GCCGCTACCG	GAAACCGAGCC	CTGATGTTCAC	CGGCCGGCAT	372
B7H2_V2	AACGTGGACA	GCCGCTACCG	GAAACCGAGCC	CTGATGTTCAC	CGGCCGGCAT	372
AB014553	GCTGCGGGGC	GACTTCTCCC	TGCGCTTGT	CAACGTCACC	CCCCAGGAGC	450
AF199028	GCTGCGGGGC	GACTTCTCCC	TGCGCTTGT	CAACGTCACC	CCCCAGGAGC	345
AF289028	GCTGCGGGGC	GACTTCTCCC	TGCGCTTGT	CAACGTCACC	CCCCAGGAGC	446
B7H2_V1	GCTGCGGGGC	GACTTCTCCC	TGCGCTTGT	CAACGTCACC	CCCCAGGAGC	422
B7H2_V2	GCTGCGGGGC	GACTTCTCCC	TGCGCTTGT	CAACGTCACC	CCCCAGGAGC	422

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 3/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	ACGAGAAGTT	TCACATGCCCTG	GTGTTGAGCC	AATCCCTGGG	ATTCCAGGAG	500	
AF199028	ACGAGAAGTT	TCACATGCCCTG	GTGTTGAGCC	AATCCCTGGG	ATTCCAGGAG	395	
AF289028	ACGAGAAGTT	TCACATGCCCTG	GTGTTGAGCC	AATCCCTGGG	ATTCCAGGAG	496	
B7H2_V1	ACGAGAAGTT	TCACATGCCCTG	GTGTTGAGCC	AATCCCTGGG	ATTCCAGGAG	472	
B7H2_V2	ACGAGAAGTT	TCACATGCCCTG	GTGTTGAGCC	AATCCCTGGG	ATTCCAGGAG	472	
AB014553	GTTTTGAGCG	TTGAGGTTAC	ACTGCATGTC	GCAGCAAACT	TCAGCGTGCC	550	
AF199028	GTTTTGAGCG	TTGAGGTTAC	ACTGCATGTC	GCAGCAAACT	TCAGCGTGCC	445	
AF289028	GTTTTGAGCG	TTGAGGTTAC	ACTGCATGTC	GCAGCAAACT	TCAGCGTGCC	546	
B7H2_V1	GTTTTGAGCA	TTGAGGTTAC	ACTGCATGTC	GCAGCAAACT	TCAGCGTGCC	522	
B7H2_V2	GTTTTGAGCA	TTGAGGTTAC	ACTGCATGTC	GCAGCAAACT	TCAGCGTGCC	522	
AB014553	CGTCGTCAGC	GCCCCCACA	GCCCCCACA	GCCCTCCCA	GGATGAGCTC	ACCTTCACGT	600
AF199028	CGTCGTCAGC	GCCCCCACA	GCCCCCACA	GCCCTCCCA	GGATGAGCTC	ACCTTCACGT	495
AF289028	CGTCGTCAGC	GCCCCCACA	GCCCCCACA	GCCCTCCCA	GGATGAGCTC	ACCTTCACGT	596
B7H2_V1	CGTCGTCAGC	GCCCCCACA	GCCCCCACA	GCCCTCCCA	GGATGAGCTC	ACCTTCACGT	572
B7H2_V2	CGTCGTCAGC	GCCCCCACA	GCCCCCACA	GCCCTCCCA	GGATGAGCTC	ACCTTCACGT	572
AB014553	GTACATCCAT	AAACGGCTAC	CCCAGGCCCA	CCGTTGACTG	GATCAATAAG	650	
AF199028	GTACATCCAT	AAACGGCTAC	CCCAGGCCCA	CCGTTGACTG	GATCAATAAG	545	
AF289028	GTACATCCAT	AAACGGCTAC	CCCAGGCCCA	CCGTTGACTG	GATCAATAAG	645	
B7H2_V1	GTACATCCAT	AAACGGCTAC	CCCAGGCCCA	CCGTTGACTG	GATCAATAAG	622	
B7H2_V2	GTACATCCAT	AAACGGCTAC	CCCAGGCCCA	CCGTTGACTG	GATCAATAAG	622	
AB014553	ACGGACAACA	GCCTGCTGGA	CCAGGCTCTG	CAGAATGACA	CCGTTCTTCT	700	
AF199028	ACGGACAACA	GCCTGCTGGA	CCAGGCTCTG	CAGAATGACA	CCGTTCTTCT	595	
AF289028	ACGGACAACA	GCCTGCTGGA	CCAGGCTCTG	CAGAATGACA	CCGTTCTTCT	696	
B7H2_V1	ACGGACAACA	GCCTGCTGGA	CCAGGCTCTG	CAGAATGACA	CCGTTCTTCT	672	
B7H2_V2	ACGGACAACA	GCCTGCTGGA	CCAGGCTCTG	CAGAATGACA	CCGTTCTTCT	672	

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 4/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	GAACATGCGG	GGCTTGTATG	ACGTGGTCA	CGTGTGAGG	ATCGCACGGA	750
AF199028	GAACATGCGG	GGCTTGTATG	ACGTGGTCA	CGTGTGAGG	ATCGCACGGA	645
AF289028	GAACATGCGG	GGCTTGTATG	ACGTGGTCA	CGTGTGAGG	ATCGCACGGA	745
B7H2_V1	GAACATGCGG	GGCTTGTATG	ACGTGGTCA	CGTGTGAGG	ATCGCACGGA	722
B7H2_V2	GAACATGCGG	GGCTTGTATG	ACGTGGTCA	CGTGTGAGG	ATCGCACGGA	722
AB014553	CCCCAGCGT	GAACATGCG	TCCTGCATAG	AGAACGTGCT	TCTGCAGCG	800
AF199028	CCCCAGCGT	GAACATGCG	TCCTGCATAG	AGAACGTGCT	TCTGCAGCG	695
AF289028	CCCCAGCGT	GAACATGCG	TCCTGCATAG	AGAACGTGCT	TCTGCAGCG	796
B7H2_V1	CCCCAGCGT	GAACATGCG	TCCTGCATAG	AGAACGTGCT	TCTGCAGCG	772
B7H2_V2	CCCCAGCGT	GAACATGCG	TCCTGCATAG	AGAACGTGCT	TCTGCAGCG	772
AB014553	AACCTGACTG	TCGGCAGCCA	GACAGGAAAT	GACATCGGAG	AGAGAGACAA	850
AF199028	AACCTGACTG	TCGGCAGCCA	GACAGGAAAT	GACATCGGAG	AGAGAGACAA	745
AF289028	AACCTGACTG	TCGGCAGCCA	GACAGGAAAT	GACATCGGAG	AGAGAGACAA	846
B7H2_V1	AACCTGACTG	TCGGCAGCCA	GACAGGAAAT	GACATCGGAG	AGAGAGACAA	822
B7H2_V2	AACCTGACTG	TCGGCAGCCA	GACAGGAAAT	GACATCGGAG	AGAGAGACAA	822
AB014553	GATCACAGAG	AATCCAGTCA	GTACCGGCGA	GAARAACCGG	GCCACGTGGA	900
AF199028	GATCACAGAG	AATCCAGTCA	GTACCGGCGA	GAARAACCGG	GCCACGTGGA	795
AF289028	GATCACAGAG	AATCCAGTCA	GTACCGGCGA	GAARAACCGG	GCCACGTGGA	895
B7H2_V1	GATCACAGAG	AATCCAGTCA	GTACCGGCGA	GAARAACCGG	GCCACGTGGA	872
B7H2_V2	GATCACAGAG	AATCCAGTCA	GTACCGGCGA	GAARAACCGG	GCCACGTGGA	872
AB014553	GCATCCTGGC	TGTCCTGTGC	CTGCTTGTGG	TCGTGGCGGT	GGCCATAGGC	950
AF199028	GCATCCTGGC	TGTCCTGTGC	CTGCTTGTGG	TCGTGGCGGT	GGCCATAGGC	845
AF289028	GCATCCTGGC	TGTCCTGTGC	CTGCTTGTGG	TCGTGGCGGT	GGCCATAGGC	946
B7H2_V1	GCATCCTGGC	TGTCCTGTGC	CTGCTTGTGG	TCGTGGCGGT	GGCCATAGGC	922
B7H2_V2	GCATCCTGGC	TGTCCTGTGC	CTGCTTGTGG	TCGTGGCGGT	GGCCATAGGC	922

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 5/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAACAC	AGCTATGCAG	GTGCCTGGGC	1000
AF199028	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAACAC	AGCTATGCAG	GTGCCTGGGC	895
AF289028	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAACAC	AGCTATGCAG	GTGCCTGGGC	996
B7H2_V1	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAACAC	AGCTATGCAG	GTGCCTGGGC	972
B7H2_V2	TGGGTGTGCA	GGGACCGATG	CCTCCAACAC	AGCTATGCAG	GTGCCTGGGC	972
AB014553	TGTGACTCCG	GAGACAGAGC	TCACCTGGTGA	GTTTGCCTGTG	GGAAGCAGCA	1050
AF199028	TGTGACTCCG	GAGACAGAGC	TCACCTGGTGA	GTTTGCCTGTG	GGAAGCAGCA	945
AF289028	TGTGACTCCG	GAGACAGAGC	TCACCTGGTGA	GTTTGCCTGTG	GGAAGCAGCA	1022
B7H2_V1	TGTGACTCCG	GAGACAGAGC	TCACCTGGTGA	GTTTGCCTGTG	GGAAGCAGCA	998
B7H2_V2	TGTGACTCCG	GAGACAGAGC	TCACCTGGTGA	GTTTGCCTGTG	GGAAGCAGCA	1022
AB014553	GGTTCCTGGG	GGCCAGGGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TTCAGAGTT	1100
AF199028	TCTCGTACT	GACTGTGTC	TCTATGCAAC	TTCCAATAAA	ACCTTTGAT	995
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	GGTTCCTGGG	GGCCAGGGG	AGGCTTGGCT	GCCAGCTGTC	TTCAGAGTT	1072
AB014553	TCAAAAAACT	TTCAGAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTGAAC	AACTTTGTT	1150
AF199028	TTGAAAAAAA	AAAA	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	TCAAAAAACT	TTCAGAGGC	AAAAGTCCCT	TGCCTTGAAC	AACTTTGTT	1122
AB014553	CCTGGAGACG	CAGCGAAGCC	CTCGATGGTG	CGCACGGGAT	TTCCTGCAGC	1200
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	CCTGGAGACG	CAGCGAAGCC	CTCGATGGTG	CGCATGGGAT	TTCCTGCAGC	1172

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 6/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	CTCCCTTGG	CATGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACCTTGT	CACACTGGCA	1250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	CTCCCTTGG	CATGGATGG	CATCCTGGTG	TGCACCTTGT	CACACTGGCA	1222
AB014553	TGGGATTTTC	CCACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	TGGGATTTTC	CCACATGCA	CAGAAGCAGA	GAGACGAGTG	CTAGACCCCC	1272
AB014553	GCGCTCCCA	GTGCCAGCC	CCGACCAGGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	GCGCTCCCA	GTGCCAGCC	CCAACCAGGG	TGTCCAGGGC	GGGTCCAGGC	1322
AB014553	ACCGGGCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCCGG	AGTGGGTCCA	GGCACCCGGG	1400
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	ACCGGGCCC	AGCCCCCATG	GGGTGTCCGG	AGTGGGTCCA	GGCACCCGGG	1372
AB014553	CCCAGCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	GCGCCACAGCC	1450
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	CCCAGCCCC	GTGGGGTGTG	CAGGGCGGGT	CCAGGCACCG	GCGCCACAGCC	1422

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 7/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	CCCCGTGGGGT	GTCCAGGGCG	GGTCCAGGCA	CCGGGCCCCA	CCCCCATGG	1500
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	C-----	-----	-----	-----	-----	1436
AB014553	GGTGTCCGGA	GTGGGTCCAG	GCACCGGGC	CCAGCCCCCG	TGGGTFGTCC	1550
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1436
AB014553	AGGGGGGFTC	CAGGCACCCG	CGCCAGCCC	CTGTGGGGTG	TCTGGAGCGG	1600
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	-----	-----	-----	CTGTGGGGTG	TCCGGAGCGG	1443
AB014553	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGSC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1650
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	998
B7H2_V2	GTCCGGGCAC	CGCCAGCTTC	TCTCTGTGSC	AGCCACTCCT	GCAGCTCTCG	1493
AB014553	TTTGCCCTC	AGTTCAGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1700
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1022
B7H2_V1	-----	TTCCAGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1036
B7H2_V2	TTTGCCCTC	AGTTCAGGA	GCAACATAGA	TGTGGATTCC	TGTCCAAATTT	1543





WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 10/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	ACAGGGCTTC	CCTGAGACGC	CACCGTGAGA	GGCCAGGTGG	CAGCTTGAGC	2250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	ACAGGGCTTC	CATGAGACGC	CACCGTGAGA	GGCCAGGTGG	CAGCTTGAGC	1108
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ATGGACTCCC	AGACTGCAGG	GGAGCACTTG	GGGCAGCCCC	CAGAAGGACC	2300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	ATGGACTCCC	AGACTGCAGG	GGAGCACTTG	GGGCAGCCCC	CAGAAGGACC	1158
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACTGCTGGAT	CCCAGGAGA	ACCTGCTGGC	GTTGGCTGTG	ATCCTGGGAT	2350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	ACTGCTGGAT	CCCAGGAGA	ACCTGCTGGC	GTTGGCTGTG	ATCCTGGGAT	1208
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GAGGCCCTTT	CAAAAGCGTC	ATCCACACCA	AAGGCAATG	TCCCCAAGTG	2400
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	GAGGCCCTTT	CAAAAGCGTC	ATCCACACCA	AAGGCAATG	TCCCCAAGTG	1258
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	AGTGGCTCC	CCGCTGTCC	TGCCAGTCC	CCACAGGAG	GGACTGGTGA	2450
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	AGTGGCTCC	CCGCTGTCC	TGCCAGTCC	CCACAGGAG	GGACTGGTGA	1308
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 11/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	TGGGCTGTCT	CTACCCGGAG	CGTGGGGAT	TCAGCACCAG	GCTCTTCCCA	2500
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	TGGGCTGTCT	CTACCCGGAG	CGTGGGGAT	TCAGCACCAG	GCTCTTCCCA	1358
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GTACCCGAGA	CCCCTGTGG	GTCTTCCCGT	GGGATGCGGG	ATCCTGAGAC	2550
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	GTACCCGAGA	CCCCTGTGG	GTCTTCCCGT	GGGATGCGGG	ATCCTGAGAC	1408
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CGAAGGTGT	TTGGTTTAAA	AAGAAGACTG	GGCCTCCGCT	CTTCCAGGAC	2600
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	CGAAGGTGT	TTGGTTTAAA	AAGAAGACTG	GGCCTCCGCT	CTTCCAGGAC	1458
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	GGCCTCTGTG	CTGCTGGGGT	CACGGAGGC	TGTTTGCAGG	GGACACGGTC	2650
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	GGCCTCTGTG	CTGCTGGGGT	CACGGAGGC	TGTTTGCAGG	GGACACGGTC	1508
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	ACAGGAGCTC	TTCTGCCCTG	AACGCTCCCA	ACCTGCCTCC	CGCCCGGAAG	2700
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	ACAGGAGCTC	TTCTGCCCTG	AACGCTCCCA	ACCTG-CT-C	CGCCCGGAAG	1556
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1054
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571













WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 18/22 -

Fig. 1 (continued)

AB014553	GCCTGTCACG	TCGGCATTGG	TGAGACCTAC	CCTGTAACGC	CTGCCCTCT	4250
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CAGCCCAACA	TCAGCTTCCT	CTTTCCTCCCT	TCCTGTAGAC	AGGCTGGATT	4300
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CCAGTGTGG	GACAGCCATC	TCCAGAAACC	TGACTTAAGA	GAGTAAGATG	4350
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571
AB014553	CAAAATCGT	-----	-----	-----	-----	4358
AF199028	-----	-----	-----	-----	-----	1009
AF289028	-----	-----	-----	-----	-----	1572
B7H2_V1	-----	-----	-----	-----	-----	1064
B7H2_V2	-----	-----	-----	-----	-----	1571

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 19/22 -

Fig. 2

Alignment of B7-H2 alternative splice variants, amino acid sequences

BAA31628 = KIAA0653  
AAF34739 = GLL50  
AAG01176 = B7-H2

BAA31628	AVRADLPRPE	VAPLRGLPRP	KFSAPRGLRA	PRSPRPEVSA	RTMRLGSPGL	50
AAF34739	.....	.....	.....	.....	..MRLGSPGL	8
AAG01176	.....	.....	.....	.....	..MRLGSPGL	8
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	..MRLGSPGL	8
B7H2_V2aa	.....	.....	.....	.....	..MRLGSPGL	8
BAA31628	LFLFSSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQTSE	100
AAF34739	LFLFSSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQTSE	58
AAG01176	LFLFSSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQTSE	58
B7H2_V1aa	LFLFSSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQTSE	58
B7H2_V2aa	LFLFSSSLRA	DTQKEVRAM	VGSDVELSCA	CPEGSRFDLN	DVYVWQTSE	58
BAA31628	SKTVVYTHIP	QNSLLENVDS	RYRNRALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	150
AAF34739	SKTVVYTHIP	QNSLLENVDS	RYRNRALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	108
AAG01176	SKTVVYTHIP	QNSLLENVDS	RYRNRALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	108
B7H2_V1aa	SKTVVYTHIP	QNSLLENVDS	RYRNRALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	108
B7H2_V2aa	SKTVVYTHIP	QNSLLENVDS	RYRNRALMSP	AGMLRGDFSL	RLFNVTPODE	108
BAA31628	QKFKCLVLSQ	SLGFQEVLSV	EVTLLHVAANF	SVPVVSAPHS	PSQDELTFTC	200
AAF34739	QKFKCLVLSQ	SLGFQEVLSV	EVTLLHVAANF	SVPVVSAPHS	PSQDELTFTC	158
AAG01176	QKFKCLVLSQ	SLGFQEVLSV	EVTLLHVAANF	SVPVVSAPHS	PSQDELTFTC	158
B7H2_V1aa	QKFKCLVLSQ	SLGFQEVLSI	EVTLLHVAANF	SVPVVSAPHS	PSQDELTFTC	158
B7H2_V2aa	QKFKCLVLSQ	SLGFQEVLSI	EVTLLHVAANF	SVPVVSAPHS	PSQDELTFTC	158

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 20/22 -

Fig. 2 (continued)

BAA31628	TSINGYPRPN	VWINKTDNS	LLDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VVSVLRIART	250
AAF34739	TSINGYPRPN	VWINKTDNS	LLDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VVSVLRIART	208
AAG01176	TSINGYPRPN	VWINKTDNS	LLDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VVSVLRIART	208
B7H2_V1aa	TSINGYPRPN	VWINKTDNS	LLDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VVSVLRIART	208
B7H2_V2aa	TSINGYPRPN	VWINKTDNS	LLDQALQNDT	VFLNMRGLYD	VVSVLRIART	208
BAA31628	PSVNI GCCIE	NVLLQONLTV	GSQTGN DICE	RDKITENPVS	TGERKNAATWS	300
AAF34739	PSVNI GCCIE	NVLLQONLTV	GSQTGN DICE	RDKITENPVS	TGERKNAATWS	258
AAG01176	PSVNI GCCIE	NVLLQONLTV	GSQTGN DICE	RDKITENPVS	TGERKNAATWS	258
B7H2_V1aa	PSVNI GCCIE	NVLLQONLTV	GSQTGN DICE	RDKITENPVS	TGERKNAATWS	258
B7H2_V2aa	PSVNI GCCIE	NVLLQONLTV	GSQTGN DICE	RDKITENPVS	TGERKNAATWS	258
BAA31628	ILAVLCLLVV	VAVAI GWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	TGEFAVGSRR	350
AAF34739	ILAVLCLLVV	VAVAI GWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	TESWNLLILL	308
AAG01176	ILAVLCLLVV	VAVAI GWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	TGHV.....	302
B7H2_V1aa	ILAVLCLLVV	VAVAI GWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	T.....	299
B7H2_V2aa	ILAVLCLLVV	VAVAI GWVCR	DRCLQHSYAG	AWAVSPETEL	TGEFAVGSRR	308
BAA31628	FWGAGRLGC	QLSFRVSKNF	QKAKVPCLEQ	LLFLETQRSP	RWCARHFLQP	400
AAF34739	S.....	.....	.....	.....	.....	309
AAG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	299
B7H2_V2aa	FWGAGRLGC	QLSFRVSKNF	QKAKVPCLEQ	LLFLETQRSP	RWCARHFLQP	358
BAA31628	PLGMGWHPGV	HFVTLRWDFF	NMHSRRETSR	RPPRSFVFPSP	DQGVQGGSRH	450
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
AAG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	299
B7H2_V2aa	PLGMGWHPGV	HFVTLRWDFF	NMHSRRETSR	RPPRSFVFPSP	NQGVQGGSRH	408

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 21/22 -

Fig. 2 (continued)

BAA31628	REPAPMGCCPE	WYQAPAPSPR	GYSRAGPGTG	AQPPWGVQGG	SRHRRPAPMG	500
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
AAG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	299
B7H2_V2aa	REPAPMGCCPE	WYQAPAPSPR	GYSRAGPGTG	AQP.....	.....	441
BAA31628	CPEWVQAPAP	SPRGVSRAGP	GTGAQPLMGV	WSSGSHRQLL	SVAATPAALV	550
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
AAG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	.....	.....	.....	.....	.....	299
B7H2_V2aa	.....	.....	.....	.....	.....	465
BAA31628	CPSVPGAT	.....	.....	.....	.....	558
AAF34739	.....	.....	.....	.....	.....	309
AAG01176	.....	.....	.....	.....	.....	302
B7H2_V1aa	..VPGAT	.....	.....	.....	.....	304
B7H2_V2aa	CPSVPGAT	.....	.....	.....	.....	473

Fig. 3

Sample	Cell Name	Abs. #	Norm. #
Sample 1	Bleph-1	1826	1826
Sample 2	Heart-1	347.5	1743
Sample 3	Kidney	1892	3083
Sample 4	Liver-1	261.9	3274
Sample 5	Lung	934.8	837
Sample 6	Trachea	268.5	531
Sample 7	Bone Marrow-1	38.42	17
Sample 8	Colon	331	299
Sample 9	Small intestine	364.4	569
Sample 10	Spleen-1	822.7	388
Sample 11	Stomach	416.8	589
Sample 12	Thymus-1	264.5	289
Sample 13	Mammary gland	757.7	1294
Sample 14	Prostate-1	427.1	443
Sample 15	Skeletal muscle-1	216.2	154
Sample 16	Testis	811.4	282
Sample 17	Uterus	387	488
Sample 18	Cerebellum	887.6	775
Sample 19	Fetal Brain	210.2	150
Sample 20	Fetal Liver-1	107.5	71
Sample 21	Spinal cord	1132	1392
Sample 22	Placenta-1	1028	1457
Sample 23	Adipose gland	111.1	135
Sample 24	Pancreas-1	30.07	293
Sample 25	Salivary gland	295.2	534
Sample 26	Thyroid	174	409

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 1 -

SEQUENCE LISTING

<110> Bayer AG

<120> REGULATION OF HUMAN B7-H2 PROTEIN

<130> RCK-10 Foreign countries

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1064

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 1
cgaggttgct cctctccgag gtctcccgcg gcccaagttc tcgcgcccc gaggtctccg 60
cgccccgagg tctcccgggc ccgaggtctc ccccccaacc atggggctgg gcagtcctgg 120
actgctcttc ctgctcttca gcagccttgg agctgatact caggagaagg aagtcagagc 180
gatggtaggg agcgaagtgg agctcagctg cgtttgcoot gaaggaagcc gttttgattt 240
aaatgatggt taagtatatt ggcacaaccg tgagtcgaaa accgtggtga cctaccocat 300
ccccacagaac agctccttgg aaaaacttgg cagcagctac cggaaaccgag ccttgatgto 360
accgccccggc atgctgctgg ggcacttctc cctgcgcttg ttcaacctca cccccagga 420
cgagcagaag tttaactgcc tgggtttgag ccaatccctg ggattccagg aggttttgag 480
cattgaggtt acactgcatg tggcagcaaa cttaagctg ccctctgtoa gcgcccccca 540
cagccccctcc caggatgagc tcaacttcaac gtgtacatcc ataaaggctc accccaggcc 600
caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg gaccaggctc tgcagaaatga 660
cacctcttctc ttgaacatgc ggggcttcta tgactgtgto agcgtgctga ggatgacagc 720
gcccccaagc gtgaacaattg gctgctgcat agagaactg cttctgcaag agaactgac 780
tgctggcagc cagacagaaa atgactctgg agagagagac aagatccagc agaactcagc 840
cagtaaccggc gagaacacag cggcaactgg gagcctctcg gctgctctgt gctgctctgt 900
ggtgctggcg gtggcaatag gctgggtgtg cagggaaccg tgctcccaac acagctatgc 960
aggtgctggc gctgtgagtc cgggcaaga gctcactgtt ccaggagcaa catagatgtg 1020
gattcctgto caatttggga aaaatgtoca cacacggtoa ccca 1064

```

<210> 2

<211> 1571

<212> DNA

<213> Homo sapiens

```

<400> 2
cgaggttgct cctctccgag gtctcccgcg gcccaagttc tcgcgcccc gaggtctccg 60
cgccccgagg tctcccgggc ccgaggtctc ccccccaacc atggggctgg gcagtcctgg 120
actgctcttc ctgctcttca gcagccttgg agctgatact caggagaagg aagtcagagc 180
gatggtaggg agcgaagtgg agctcagctg cgtttgcoot gaaggaagcc gttttgattt 240
aaatgatggt taagtatatt ggcacaaccg tgagtcgaaa accgtggtga cctaccocat 300
ccccacagaac agctccttgg aaaaacttgg cagcagctac cggaaaccgag ccttgatgto 360
accgccccggc atgctgctgg ggcacttctc cctgcgcttg ttcaacctca cccccagga 420
cgagcagaag tttaactgcc tgggtttgag ccaatccctg ggattccagg aggttttgag 480
cattgaggtt acactgcatg tggcagcaaa cttaagctg ccctctgtoa gcgcccccca 540
cagccccctcc caggatgagc tcaacttcaac gtgtacatcc ataaaggctc accccaggcc 600
caacgtgtac tggatcaata agacggacaa cagcctgctg gaccaggctc tgcagaaatga 660
cacctcttctc ttgaacatgc ggggcttcta tgactgtgto agcgtgctga ggatgacagc 720

```

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 2 -

```

gacccccagc gtgaacattg getgetgcac agagaaactg cttctgcagc agaacctgac 780
tgtggcagc  cagacaggaa  atgacatcgg agagagagac aagatcacag agaatccagt 840
cagtaaccgc gagaaaaacg cggccacgtg gagcatcctg gctgtcctgt gcctgcttgt 900
ggctgtggcg gtggccatag cgtgggtgtg cagggaaccg tgcctccaac acagctatgc 960
aggtgcctgg gctgtgagtc cggagacaga gctcactggt gagtttgcog tgggaagcag 1020
caggttatgg ggggcccagg ggaggcttgg ctgccagctg tctttcagag tttcaaaaaa 1080
ctttcaaaag gcaaaaagtc cttgccttga acaactgttg ttctgggaga cgcagogaag 1140
ccctgatgg  tgcgatggc  attccttcca gctcccctt  ggcattggat  ggcacatcctg 1200
tgtgcacttt gtcacactgc gatgggattt tcccaacatg cacagaagca gagagacgag 1260
tgctagaccc ccgctctccc cagtggccag ccccaaccag ggtgtccagg ggggtcccag 1320
gcaccggcgc ccagccccca tgggggtgac ggagtggttc caggcacccg cggcccagccc 1380
ccgtgggggt tccagggcgg gtccaggcac cgggcaccag cccctgtggg gtgtccaggc 1440
cgggtcccgg caccgcccag tctctctctg gccagccact cctgcagctc tcttttccc 1500
ctcagttcca ggagcaacat agatgtggat tctgttccaa tttgggaaaa atgtccacac 1560
accgtacccc a

```

```

<210> 3
<211> 304
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 3
Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu
1 5 10 15
Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp
20 25 30
Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn
35 40 45
Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr
50 55 60
Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr
65 70 75 80
Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe
85 90 95
Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His
100 105 110
Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Ile
115 120 125
Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser
130 135 140
Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser
145 150 155 160
Ile Asn Gly Tyr Pro Arg Pro Asn Val Tyr Trp Ile Asn Lys Thr Asp
165 170 175
Asn Ser Leu Leu Asp Gln Ala Leu Gln Asn Asp Thr Val Phe Leu Asn
180 185 190

```

WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 3 -

Met Arg Gly Leu Tyr Asp Val Val Ser Val Leu Arg Ile Ala Arg Thr  
 195 200 205  
 Pro Ser Val Asn Ile Gly Cys Cys Ile Glu Asn Val Leu Leu Gln Gln  
 210 215 220  
 Asn Leu Thr Val Gly Ser Gln Thr Gly Asn Asp Ile Gly Glu Arg Asp  
 225 230 235 240  
 Lys Ile Thr Glu Asn Pro Val Ser Thr Gly Glu Lys Asn Ala Ala Thr  
 245 250 255  
 Trp Ser Ile Leu Ala Val Leu Cys Leu Leu Val Val Val Ala Val Ala  
 260 265 270  
 Ile Gly Trp Val Cys Arg Asp Arg Cys Leu Gln His Ser Tyr Ala Gly  
 275 280 285  
 Ala Trp Ala Val Ser Pro Glu Thr Glu Leu Thr Val Pro Gly Ala Thr  
 290 295 300

<210> 4  
 <211> 473  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 4  
 Met Arg Leu Gly Ser Pro Gly Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Ser Leu  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Asp Thr Gln Glu Lys Glu Val Arg Ala Met Val Gly Ser Asp  
 20 25 30  
 Val Glu Leu Ser Cys Ala Cys Pro Glu Gly Ser Arg Phe Asp Leu Asn  
 35 40 45  
 Asp Val Tyr Val Tyr Trp Gln Thr Ser Glu Ser Lys Thr Val Val Thr  
 50 55 60  
 Tyr His Ile Pro Gln Asn Ser Ser Leu Glu Asn Val Asp Ser Arg Tyr  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Arg Ala Leu Met Ser Pro Ala Gly Met Leu Arg Gly Asp Phe  
 85 90 95  
 Ser Leu Arg Leu Phe Asn Val Thr Pro Gln Asp Glu Gln Lys Phe His  
 100 105 110  
 Cys Leu Val Leu Ser Gln Ser Leu Gly Phe Gln Glu Val Leu Ser Ile  
 115 120 125  
 Glu Val Thr Leu His Val Ala Ala Asn Phe Ser Val Pro Val Val Ser  
 130 135 140  
 Ala Pro His Ser Pro Ser Gln Asp Glu Leu Thr Phe Thr Cys Thr Ser



WO 02/053733

PCT/EP02/00028

- 5 -

Val Cys Pro Ser Val Pro Gly Ala Thr  
465 470

<210> 5  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Primer:K653-L2

<400> 5  
cgaggttgot cctctccgag gtct 24

<210> 6  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Primer:K653-R6

<400> 6  
tgggtgaocg tgtgtggaca tttt 24

<210> 7  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Primer:K653-L5

<400> 7  
aggttacact gcatgtggca gcaa 24

<210> 8  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (1)..(24)  
<223> Primer:K653-R8

<400> 8  
ogtttttoto gccggtactg actg 24

## 【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  
11 July 2002 (11.07.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/053733 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, 15/63, 15/62, 15/11, 5/10, C07K 14/47, G01N 33/68, C07K 16/28, C12Q 1/68, C07K 14/705, A61K 38/17, G01N 33/50, 33/53
- (21) International Application Number: PCT/EP02/00028
- (22) International Filing Date: 4 January 2002 (04.01.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/259,632 4 January 2001 (04.01.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT (DE/DL); 51368 Leverkusen (DE).
- (72) Inventors; and  
(75) Inventors/Applicants (for US only): ENCINAS, Jeffrey [US/JP]; 3-17-15 Ayanokike-cho, Nara, Nara 631-0032 (JP), TANABE, Eri [JP/JP]; 1-8-7 Gakuenkita, Nara, Nara 631-0036 (JP), WATANABE, Shinichi [JP/JP]; 6-3-1-504 Jingu, Nara, Nara 631-0804 (JP).
- (74) Common Representative: BAYER AKTIENGESELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).
- (81) Designated States (national): 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, FR, GB, GD, GE, GM, GR, GU, HK, HN, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KH, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, NI, NL, NO, NZ, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, 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, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declarations under Rule 4.17:**  
as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(i)) for the following designations AF, 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, GM, GR, GU, HK, HN, 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, NI, NL, NO, NZ, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, ARIPO patent (GH, 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, CI, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii)) for all designations
- Published:**  
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 20 March 2003
- 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 02/053733 A3

(54) Title: REGULATION OF HUMAN B7-H2 PROTEIN

(57) Abstract: Reagents which regulate human B7-H2 and reagents which bind to human B7-H2 gene products can play a role in preventing, ameliorating, or correcting dysfunctions or diseases including, but not limited to, allergic diseases, such as respiratory allergies, food allergies, asthma, and atopic dermatitis, as well as in the treatment of intracellular bacterial infections, such as tuberculosis, leprosy, listeriosis, and salmonellosis; and autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, and type 1 diabetes, as well as in the treatment of helminth and extracellular microbial infections.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/00028
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
IPC 7	C12N15/12 C12N15/63 C07K14/47 G01N33/68 A61K38/17 G01N33/50	C12N15/62 C12N15/11 C12N5/10 C07K16/28 C07K14/705 G01N33/53
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C07K		
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 practical, search terms used) SEQUENCE SEARCH, EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, EMBL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 46240 A (AMGEN INC ;YOSHINAGA STEVEN KIYOSHI (US)) 10 August 2000 (2000-08-10) Human B7RP1 sequences share 99,6% (299 amino acids overlap) respectively 99,9% (998 nucleotide overlap) identity with claimed sequences. page 3, line 25 -page 9, line 22; figures 1-3; examples 1-4,14,15	1-51
P,X	WO 01 64704 A (CHEN LIEPING ;MAYO FOUNDATION (US)) 7 September 2001 (2001-09-07) page 1, line 15 - line 26; figures 1,2; examples 1-5 page 9, line 20 -page 25, line 30 -/-	1-51
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 December 2002		Date of mailing of the international search report 20/12/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5918 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mossier, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 02/00028
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE EMBL 'Online! Homo sapiens mRNA for KIAA0653 protein, 15 July 1998 (1998-07-15) OHARA ET AL: "Direct submission" retrieved from EBI Database accession no. ab014553 XP002222725 cited in the application abstract</p>	1-5
X	<p>WANG S ET AL: "Costimulation of T cells by B7-H2, a B7-like molecule that binds ICOS" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPAGNY, ORLANDO, FL, US, vol. 96, no. 8, 15 October 2000 (2000-10-15), pages 2808-2813, XP002156742 ISSN: 0006-4971</p>	1-8
Y	<p>the whole document -&amp; DATABASE EMBL 'Online! Homo s. transmembran protein B7-H2 ICOS ligand, 21 August 2000 (2000-08-21) retrieved from EBI Database accession no. af289028 XP002222726 abstract</p>	9-51
X	<p>LING V ET AL: "Identification of GL50, a novel B7-like protein that functionally binds to ICOS receptor" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 164, no. 4, 15 February 2000 (2000-02-15), pages 1653-1657, XP002156735 ISSN: 0022-1767</p>	1-8
Y	<p>the whole document</p>	9-51
X	<p>-&amp; DATABASE EMBL 'Online! Homo sapiens B7-like protein, 20 July 2000 (2000-07-20) retrieved from EBI Database accession no. af199028 XP002222727 abstract</p>	
	---	
	-/--	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.  
 PCT/EP 02/00028

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SWALLOW M M ET AL: "B7H, A NOVEL COSTIMULATORY HOMOLOG OF B7.1 AND B7.2 IS INDUCED BY TNFALPHA" INFECTION AND IMMUNITY, AMERICAN SOCIETY OF MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 11, October 1999 (1999-10), pages 423-432, XP000971265 ISSN: 0019-9567 page 423, column 2, paragraph 3 -page 425, column 1, paragraph 1; figure 3 -----	1-51
Y	DONG H ET AL: "B7-H1, A THIRD MEMBER OF THE B7 FAMILY, CO-STIMULATES T-CELL PROLIFERATION AND INTERLEUKIN-10 SECRETION" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 5, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 1635-1639, XP000971288 ISSN: 1078-8956 abstract page 1365, column 2, paragraph 2; figure 1 -----	1-51
A	HENRY J ET AL: "Structure and evolution of the extended B7 family" IMMUNOLOGY TODAY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 20, no. 6, June 1999 (1999-06), pages 285-288, XP004169718 ISSN: 0167-5699 the whole document -----	1-51

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/EP 02/00028**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Although claims 13, 34-39, 41, and 48-51 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:  
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 00028

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Present claims 8, 9, 13-17, 34, 40-42, 44 and 48-51 relate to reagents defined by reference to a desirable characteristic or property, namely that said reagents modulate the activity of B7-H2 V polypeptide or polynucleotide, respectively that said reagents specifically bind and/or interact with the polynucleotide B7-H2 V or with a product encoded by a polynucleotide comprising the sequence shown in SEQ ID NO:1 or 2.

The claims cover all reagents having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such reagents. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the reagent by reference to a result to be achieved and in addition also by reference to a process for its preparation ("product-by-process" claims). Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear, supported and disclosed, namely those parts relating to reagents like antibodies, ribozymes and antisense oligonucleotides.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT  
Information on patent family members

International Application No  
PCT/EP 02/00028

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0046240 A	10-08-2000	AU 2859200 A	25-08-2000
		CN 1346370 T	24-04-2002
		EP 1149114 A2	31-10-2001
		HU 0105337 A2	29-04-2002
		WO 0046240 A2	10-08-2000
WO 0164704 A	07-09-2001	AU 4539601 A	12-09-2001
		WO 0164704 A1	07-09-2001

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 45/00	4 C 0 8 4
A 6 1 P 11/06	A 6 1 K 48/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 31/00	A 6 1 P 11/06	4 C 0 8 6
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/02	
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 37/08	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 14/47	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	C 1 2 Q 1/68	Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/53	M
	G 0 1 N 33/566	
	C 1 2 N 5/00	A

(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, PH, PL, P T, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 タナベ エリ

奈良県奈良市学園北1-8-7

(72) 発明者 渡辺 信一

奈良県奈良市神功6-3-1-504

Fターム(参考) 2G045 AA40 BB03 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03  
 FB07  
 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07 CA12 DA02 EA04 GA11 HA01  
 HA03 HA14  
 4B063 QA01 QA05 QA18 QQ08 QQ42 QQ52 QR08 QR32 QR48 QR55  
 QR80 QS16 QS24 QS25 QS32 QS36 QS38 QX01 QX07  
 4B064 AG01 CA10 CA19 CC24 DA01 DA13  
 4B065 AA94X AA94Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
 4C084 AA13 AA17 NA14 ZA59 ZB02 ZB07 ZB08 ZB09 ZB11 ZB13  
 ZB32 ZC41  
 4C085 AA13 AA14 BB11 BB17 CC02 CC07 CC08 CC21 CC31 DD62  
 EE01  
 4C086 AA01 AA02 AA03 EA16 NA14 ZA59 ZB02 ZB07 ZB08 ZB09  
 ZB11 ZB13 ZB32 ZC41  
 4H045 AA10 AA20 AA30 BA10 BA41 BA60 CA40 EA22 EA50 FA74

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004527228A5</a>	公开(公告)日	2005-12-22
申请号	JP2002555242	申请日	2002-01-04
[标]申请(专利权)人(译)	拜尔公司		
申请(专利权)人(译)	拜耳股份公司		
[标]发明人	ジェフリー・エンシナス タナベ エリ 渡辺 信一		
发明人	ジェフリー・エンシナス タナベ エリ 渡辺 信一		
IPC分类号	G01N33/50 A61K31/7088 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/00 A61K48/00 A61P11/06 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C07K14/705 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/ /21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/53 G01N33/566		
CPC分类号	A61K38/00 A61K39/00 A61P11/06 C07K14/70532 G01N2333/70532 G01N2500/04		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K31/7088 A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.U A61K45/00 A61K48/00 A61P11/06 A61P31/00 A61P37/02 A61P37/08 C07K14/47 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02. C C12Q1/02 C12Q1/68.A C12Q1/68.Z G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N33/566 C12N5 /00.A		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045 /DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB07 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024 /HA14 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR80 4B063/QS16 4B063/QS24 4B063/QS25 4B063 /QS32 4B063/QS36 4B063/QS38 4B063/QX01 4B063/QX07 4B064/AG01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA94X 4B065/AA94Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065 /BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA59 4C084/ZB02 4C084/ZB07 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB13 4C084/ZB32 4C084 /ZC41 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/BB17 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD62 4C085/EE01 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086 /EA16 4C086/NA14 4C086/ZA59 4C086/ZB02 4C086/ZB07 4C086/ZB08 4C086/ZB09 4C086/ZB11 4C086/ZB13 4C086/ZB32 4C086/ZC41 4H045/AA10 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045 /BA41 4H045/BA60 4H045/CA40 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	田中，三夫		
优先权	60/259632 2001-01-04 US		
其他公开文献	JP2004527228A		

#### 摘要(译)

调节人B7-H2的试剂和与人B7-H2基因产物结合的试剂可在预防，改善或纠正功能障碍或疾病中起作用，这些功能障碍或疾病包括但不限于过敏性疾病，例如呼吸道过敏，食物过敏，哮喘和特应性皮炎，以及用于治疗细胞内细菌感染，例如结核，麻风，李斯特菌病和沙门氏菌病；以及自身免疫性疾病，例如多发性硬化症，类风湿性关节炎和I型糖尿病，以及用于治疗蠕虫和细胞外微生物感染的疾病。

