(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2004-502417
(P2004-502417A)
(43)公表日　平成16年1月29日(2004.1.29)

(51)Int.Cl.[7]	F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N 15/00	ZNAA	2G045
A01K 67/027	A01K 67/027		4B024
A61P 9/10	A61P 9/10	101	4B063
A61P 15/00	A61P 15/00		4B064
A61P 15/06	A61P 15/06		4B065

審査請求 有　予備審査請求 有　（全 215 頁）　最終頁に続く

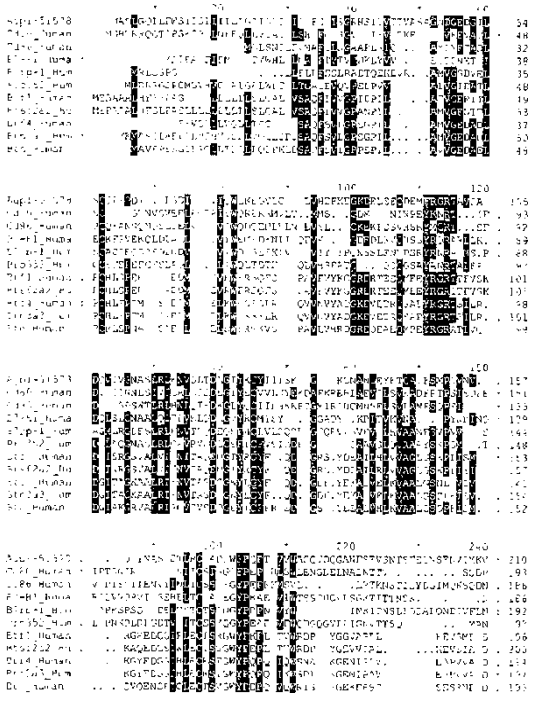
(21)出願番号　特願2002-507875(P2002-507875)
(86)(22)出願日　平成13年6月29日(2001.6.29)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月27日(2002.12.27)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/021297
(87)国際公開番号　WO2002/002624
(87)国際公開日　平成14年1月10日(2002.1.10)
(31)優先権主張番号　60/215,645
(32)優先日　平成12年6月30日(2000.6.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　391022430
アムジェン　インコーポレーテッド
ＡＭＧＥＮ　ＩＮＣ.
アメリカ合衆国　カリフォルニア州　９１３２０－１７９９，サウザント　オークス，ワン　アムジェン　センター　ドライブ
(74)代理人　100062007
弁理士　川口　義雄
(74)代理人　100105131
弁理士　井上　満
(74)代理人　100113332
弁理士　一入　章夫
(74)代理人　100114188
弁理士　小野　誠

最終頁に続く

(54)【発明の名称】Ｂ７様分子およびその使用

(57)【要約】
本発明は、Ｂ７様（Ｂ７－Ｌ）ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子を提供する。本発明はまた、Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞、および方法を提供する。本発明はさらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための薬学的組成物を提供する。本発明はさらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドに関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための方法を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
単離された核酸分子であって、以下：
（ａ）配列番号１に示されるヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
（ｃ）（ｂ）または（ｃ）のいずれかの相補体に、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および
（ｄ）（ｂ）または（ｃ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項２】
単離された核酸分子であって、以下：
（ａ）配列番号２に示されるポリペプチドに少なくとも約７０％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｂ）配列番号１または（ａ）のヌクレオチド配列、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
（ｃ）少なくとも約２５アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号１、（ａ）または（ｂ）のヌクレオチド配列領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号２に示されるコードされたポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、領域；
（ｄ）少なくとも約１６ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号１、または（ａ）～（ｃ）いずれかのヌクレオチド配列の領域；
（ｅ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）～（ｄ）のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに
（ｆ）（ａ）～（ｄ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。
【請求項３】
単離された核酸分子であって、以下；
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｄ）Ｃ末端短縮および／またはＮ末端短縮を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端短縮、およびＮ末端短縮からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｆ）少なくとも約１６ヌクレオチドのフラグメントを含む、（ａ）～（ｅ）のいずれかのヌクレオチド配列；
（ｇ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）～（ｆ）のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに
（ｈ）（ａ）～（ｅ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子。

【請求項４】
請求項１、請求項２または請求項３のいずれかに記載の核酸分子を含む、ベクター。
【請求項５】
請求項４に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項６】
真核生物細胞である、請求項５に記載の宿主細胞。
【請求項７】
原核生物細胞である、請求項５に記載の宿主細胞。
【請求項８】
Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生するためのプロセスであって、該ポリペプチドを発現するために適切な条件下で請求項５に記載の宿主細胞を培養する工程、および必要に応じて、該培養物から該ポリペプチドを単離する工程を包含する、プロセス。
【請求項９】
請求項８に記載のプロセスによって産生される、ポリペプチド。
【請求項１０】
請求項８に記載のプロセスであって、ここで、前記核酸分子が、Ｂ７－ＬポリペプチドをコードするＤＮＡに作動可能に連結された、ネイティブなＢ７－Ｌポリペプチドに対するプロモーターＤＮＡ以外のプロモーターＤＮＡを含む、プロセス。
【請求項１１】
請求項２に記載の単離された核酸分子であって、ここで、同一性パーセントは、ＧＡＰ、ＢＬＡＳＴＮ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＸ、ＢｅｓｔＦｉｔ、およびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離された核酸分子。
【請求項１２】
化合物がＢ７－Ｌポリペプチド活性またはＢ７－Ｌポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項５、請求項６、または請求項７のいずれかに記載の細胞を該化合物に曝露する工程、および該細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチド活性またはＢ７－Ｌポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。
【請求項１３】
配列番号２に示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項１４】
単離されたポリペプチドであって、以下：
（ａ）配列番号３に記載されており、必要に応じてアミノ末端メチオニンをさらに含む、アミノ酸配列；
（ｂ）配列番号２のオルソログに対するアミノ酸配列；
（ｃ）配列番号２のアミノ酸配列に少なくとも約７０％同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）少なくとも約２５アミノ酸残基を含む配列番号２に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに　（ｅ）配列番号２に示されるアミノ酸配列、または（ａ）～（ｃ）のいずれかのアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。
【請求項１５】
単離されたポリペプチドであって、以下：
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であっ

て、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）Ｃ末端短縮および／またはＮ末端短縮を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端短縮、およびＮ末端短縮からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、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、単離されたポリペプチド。
【請求項１６】
請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載の核酸分子によってコードされる単離されたポリペプチドであって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。
【請求項１７】
請求項１４に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、同一性パーセントは、ＧＡＰ、ＢＬＡＳＴＰ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＸ、ＢｅｓｔＦｉｔ、およびＳｍｉｔｈ－Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムからなる群より選択されるコンピュータープログラムを用いて決定される、単離されたポリペプチド。
【請求項１８】
請求項１３、請求項１４、または請求項１５のいずれかに記載のポリペプチドに特異的に結合する、選択的結合因子またはそのフラグメント。
【請求項１９】
配列番号２に示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドまたはそのフラグメントに特異的に結合する、請求項１８に記載の選択的結合因子またはそのフラグメント。
【請求項２０】
抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２１】
ヒト化抗体である、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２２】
ヒト抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２３】
ポリクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２４】
モノクローナル抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２５】
キメラ抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２６】
ＣＤＲ移植抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２７】
抗イディオタイプ抗体またはそのフラグメントである、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項２８】
可変領域フラグメントである、請求項１８記載の選択的結合因子。
【請求項２９】

ＦａｂフラグメントまたはＦａｂ’フラグメントである、請求項２８に記載の可変領域フラグメント。
【請求項３０】
配列番号２のアミノ酸配列を有するポリペプチドに特異性を有する少なくとも１つの相補性決定領域を含む、選択的結合因子またはそのフラグメント。
【請求項３１】
検出可能標識に結合される、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項３２】
Ｂ７－Ｌポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項１８に記載の選択的結合因子。
【請求項３３】
Ｂ７－Ｌポリペプチド関連の疾患、状態、または障害を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項１８に記載の選択的結合因子の有効量を患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項３４】
配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチドで動物を免疫することによって産生される、選択的結合因子。
【請求項３５】
請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載のポリペプチドを結合し得る選択的結合因子を産生する、ハイブリドーマ。
【請求項３６】
請求項１８に記載の抗Ｂ７－Ｌ抗体またはフラグメントを用いて、Ｂ７－Ｌポリペプチドの量を検出または定量する方法。
【請求項３７】
請求項１３、請求項１４、または請求項１５のいずれかに記載のポリペプチド、および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。
【請求項３８】
前記薬学的に受容可能な処方剤が、キャリア、アジュバント、溶解剤、安定剤、または抗酸化剤である、請求項３７に記載の組成物。
【請求項３９】
前記ポリペプチドが、配列番号３に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドの誘導体を含む、請求項３７に記載の組成物。
【請求項４０】
請求項１３、請求項１４、または請求項１５のいずれかに記載のポリペプチドの誘導体を含むポリペプチド。
【請求項４１】
水溶性ポリマーを用いて共有結合的に修飾された、請求項４０に記載のポリペプチド。
【請求項４２】
請求項４１に記載のポリペプチドであって、ここで、前記水溶性ポリマーが、ポリエチレングリコール、モノメトキシポリエチレングリコール、デキストラン、セルロース、ポリ－（Ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール、およびポリビニルアルコールからなる群より選択される、ポリペプチド。
【請求項４３】
請求項１、請求項２または請求項３のいずれかに記載の核酸分子および薬学的に受容可能な処方剤を含む、組成物。
【請求項４４】
前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項４３に記載の組成物。
【請求項４５】
請求項１、請求項２または請求項３のいずれかに記載の核酸分子を含む、ウイルスベクター。

【請求項４６】
異種アミノ酸配列に融合された、請求項１３、請求項１４、または請求項１５のいずれかに記載のポリペプチドを含む、融合ポリペプチド。
【請求項４７】
前記異種アミノ酸配列が、ＩｇＧ定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項４６に記載の融合ポリペプチド。
【請求項４８】
医学的状態を、処置、予防、または改善するための方法であって、請求項１３、請求項１４、もしくは請求項１５のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項１、請求項２、もしくは請求項３のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与する工程を包含する、方法。
【請求項４９】
被験体において病的状態または病的状態に対する感受性を診断する方法であって、以下：
（ａ）サンプル中の、請求項１３、請求項１４、もしくは請求項１５のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項１、請求項２、もしくは請求項３のいずれかに記載の核酸分子によってコードされるポリペプチドの、発現の存在または発現量を決定する工程；および
（ｂ）該ポリペプチドの発現の存在または発現量に基づいて、病的状態または病的状態に対する感受性を診断する工程、
を包含する、方法。
【請求項５０】
デバイスであって、以下：
（ａ）移植に適した膜；および
（ｂ）該膜内にカプセル化された細胞であって、該細胞は、請求項１３、請求項１４、もしくは請求項１５のいずれかに記載のタンパク質を分泌する、細胞；を備え、
該膜は、該タンパク質に対して透過性であり、そして該細胞に有害な物質に対して不透過性である、デバイス。
【請求項５１】
Ｂ７－Ｌポリペプチドに結合する化合物を同定する方法であって、以下：
（ａ）請求項１３、請求項１４、もしくは請求項１５のいずれかに記載のポリペプチドを、化合物と接触させる工程；および
（ｂ）該化合物に対する該Ｂ７－Ｌポリペプチドの結合の程度を決定する工程、
を包含する、方法。
【請求項５２】
前記化合物に結合した場合に、前記ポリペプチドの活性を決定する工程をさらに包含する、請求項５１に記載の方法。
【請求項５３】
動物においてポリペプチドのレベルを調節する方法であって、請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載の核酸分子を該動物に投与する工程を包含する、方法。
【請求項５４】
請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載の核酸分子を含む、トランスジェニック非ヒト哺乳動物。
【請求項５５】
化合物がＢ７－Ｌポリペプチド活性またはＢ７－Ｌポリペプチド産生を阻害するか否かを決定するためのプロセスであって、請求項５４に記載のトランスジェニック哺乳動物を該化合物に曝露する工程、および該哺乳動物におけるＢ７－Ｌポリペプチド活性またはＢ７－Ｌポリペプチド産生を測定する工程を包含する、プロセス。
【請求項５６】
固体支持体に結合した、請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載の核酸分子。

【請求項５７】
請求項１、請求項２、または請求項３のいずれかに記載の核酸分子を少なくとも１つ含む、核酸分子のアレイ。
【請求項５８】
単離されたポリペプチドであって、以下：位置４におけるメチオニン；位置１２におけるロイシンまたはメチオニン；位置１３におけるロイシンまたはバリン；位置１６におけるロイシンまたはバリン；位置１７におけるロイシンまたはバリン；位置１８におけるロイシン、バリン、またはメチオニン；位置２３におけるロイシンまたはバリン；位置２６におけるロイシン；位置２７におけるロイシンまたはバリン；位置３１におけるバリンまたはロイシン；位置３９におけるロイシンまたはイソロイシン；位置４６におけるアラニン；位置４８におけるバリン；位置５２におけるアラニン；位置５４におけるイソロイシン；位置６１におけるグルタミン酸；位置６４におけるバリン；位置６６におけるグルタミン酸；位置６７におけるロイシン、メチオニン、またはバリン；位置６９におけるバリンまたはロイシン；位置７３におけるアルギニン；位置７６におけるロイシン；位置７９におけるバリン；位置８０におけるメチオニン；位置８３におけるチロシン；位置８４におけるアルギニン；位置８５におけるアスパラギン酸；位置８７におけるアルギニン；位置８８におけるグルタミン酸；位置９２におけるアスパラギン酸；位置９７におけるチロシン；位置９８におけるリジン；位置１０３におけるロイシン、イソロイシン、またはメチオニン；位置１０８におけるイソロイシン、ロイシン、またはメチオニン；位置１１５におけるイソロイシン；位置１１７におけるイソロイシン；位置１２０におけるロイシンまたはイソロイシン；位置１２２におけるバリンまたはイソロイシン；位置１２３におけるセリン；位置１２４におけるグルタミン酸；位置１２７におけるセリン；位置１２８におけるフェニルアラニン；位置１２９におけるアルギニン；位置１３１におけるフェニルアラニン；位置１３２におけるバリン；位置１３７におけるアラニン；位置１４３におけるバリンまたはイソロイシン；位置１４８におけるアラニン；位置１４９におけるグリシン；位置１５５におけるイソロイシンまたはメチオニン；位置１５７におけるイソロイシンまたはメチオニン；位置１６６におけるイソロイシン；位置１７４におけるチロシン；位置１７９におけるイソロイシン、ロイシンまたはメチオニン；位置１８０におけるイソロイシン；位置１９４におけるロイシン；位置２１５におけるフェニルアラニン；位置２１８におけるセリン；位置２２２におけるセリン；位置２２６におけるイソロイシンまたはロイシン；位置２２７におけるバリンまたはロイシン；位置２３１におけるロイシンまたはバリン；位置２４０におけるイソロイシン；位置２４２におけるアスパラギン酸；位置２４５におけるメチオニンまたはロイシン；位置２４６におけるアルギニン；位置２５６におけるスレオニン；位置２６０におけるバリンまたはイソロイシン；位置２６２におけるロイシンまたはイソロイシン；位置２６８におけるロイシンまたはバリン；位置２７２におけるバリンまたはメチオニン；位置２７３におけるバリン；位置２７５におけるバリン、イソロイシン、またはメチオニン；位置２７８におけるフェニルアラニン；位置２７９におけるバリンまたはイソロイシン；位置２８１におけるイソロイシンまたはバリン；および位置２８２におけるアルギニン
からなる群から選択される少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含み、ここで該ポリペプチドが配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
本出願は、２０００年６月３０日出願の米国仮特許出願第６０／２１５，６４５号（その開示は、本明細書において参考として明白に援用されている）からの優先権の利益を主張する。
【０００２】
（発明の分野）
本発明は、Ｂ７様（Ｂ７－Ｌ）ポリペプチドおよびこれをコードする核酸分子に関する。

本発明はまた、Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生するための、選択的結合因子、ベクター、宿主細胞および方法に関する。本発明はさらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドと関連する疾患、障害、および状態の、診断、処置、改善、および／または予防のための薬学的組成物および方法に関する。

【０００３】

（発明の背景）

核酸分子の同定、クローニング、発現、および操作における技術進歩ならびにヒトゲノムの解読によって、新規治療薬の発見が大いに加速された。現在、高速核酸配列決定技術は、前例のない速度で配列情報を作製し得、そしてコンピュータ分析と結合されて、ゲノムの一部および全体への重複配列の組み立てならびにポリペプチドコード領域の同定を可能にする。既知アミノ酸配列のデータベース編集物に対する推定アミノ酸配列の比較は、以前に同定された配列および／または構造の目印に対する相同性の程度を決定することを可能にする。核酸分子のポリペプチドコード領域のクローニングおよび発現は、構造分析および機能分析のためのポリペプチド産物を提供する。核酸分子およびコードされるポリペプチドの操作は、治療剤として使用される生成物に対して有利な特性を与え得る。

【０００４】

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

【０００５】

（発明の要旨）

本発明は、新規なＢ７－Ｌの核酸分子およびコードされるポリペプチドに関する。

【０００６】

本発明は、以下：

（ａ）配列番号１に示されるヌクレオチド配列；

（ｂ）配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

（ｃ）（ｂ）または（ｃ）のいずれかの相補体に対して、中程度または高度にストリンジェントな条件下でハイブリダイズするヌクレオチド配列；および

（ｄ）（ｂ）または（ｃ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【０００７】

本発明はまた、以下：

（ａ）配列番号２に示されるポリペプチドに少なくとも約７０％同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

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

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

（ｅ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）～（ｄ）のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに

（ｆ）（ａ）～（ｄ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、

からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。

【０００８】
本発明はさらに、以下；
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｄ）Ｃ末端短縮および／またはＮ末端短縮を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端短縮、およびＮ末端短縮からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２に示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
（ｆ）少なくとも約１６ヌクレオチドのフラグメントを含む（ａ）～（ｅ）のいずれかのヌクレオチド配列；
（ｇ）中程度または高度にストリンジェントな条件下で、（ａ）～（ｆ）のいずれかの相補体にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列；ならびに
（ｈ）（ａ）～（ｅ）のいずれかに相補的なヌクレオチド配列、
からなる群より選択されるヌクレオチド配列を含む、単離された核酸分子を提供する。
【０００９】
本発明は、配列番号２に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する。
【００１０】
本発明はまた、以下：
（ａ）配列番号３に示されるアミノ酸配列であって、必要に応じてさらにアミノ末端メチオニンを含む、アミノ酸配列；
（ｂ）配列番号２のオルソログに対するアミノ酸配列；
（ｃ）配列番号２のアミノ酸配列に少なくとも約７０％同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）少なくとも約２５アミノ酸残基を含む配列番号２に示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有するか、または抗原性である、フラグメント；ならびに
（ｅ）配列番号２または（ａ）～（ｃ）のいずれかに示されるアミノ酸配列の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体のアミノ酸配列、
からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチドを提供する。
【００１１】
本発明は、さらに、以下：
（ａ）少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｂ）少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｃ）少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であっ

て、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；
（ｄ）Ｃ末端短縮および／またはＮ末端短縮を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；ならびに
（ｅ）アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、Ｃ末端短縮、およびＮ末端短縮からなる群より選択される少なくとも１つの改変を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する、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、単離されたポリペプチドを提供する。

【００１２】
本発明はさらに、以下：４位のメチオニン；１２位のロイシンまたはメチオニン；１３位のロイシンまたはバリン；１６位のロイシンまたはバリン；１７位のロイシンまたはバリン；１８位のロイシン、バリン、またはメチオニン；２３位のロイシンまたはバリン；２６位のロイシン；２７位のロイシンまたはバリン；３１位のバリンまたはロイシン；３９位のロイシンまたはイソロイシン；４６位のアラニン；４８位のバリン；５２位のアラニン；５４位のイソロイシン；６１位のグルタミン酸；６４位のバリン；６６位のグルタミン酸；６７位のロイシン、メチオニン、またはバリン；６９位のバリンまたはロイシン；７３位のアルギニン；７６位のロイシン；７９位のバリン；８０位のメチオニン；８３位のチロシン；８４位のアルギニン；８５位のアスパラギン酸；８７位のアルギニン；８８位のグルタミン酸；９２位のアスパラギン酸；９７位のチロシン；９８位のリジン；１０３位のロイシン、イソロイシン、またはメチオニン；１０８位のイソロイシン、ロイシン、またはメチオニン；１１５位のイソロイシン；１１７位のイソロイシン；１２０位のロイシンまたはイソロイシン；１２２位のバリンまたはイソロイシン；１２３位のセリン；１２４位のグルタミン酸；１２７位のセリン；１２８位のフェニルアラニン；１２９位のアルギニン；１３１位のフェニルアラニン；１３２位のバリン；１３７位のアラニン；１４３位のバリンまたはイソロイシン；１４８位のアラニン；１４９位のグリシン；１５５位のイソロイシンまたはメチオニン；１５７位のイソロイシンまたはメチオニン；１６６位のイソロイシン；１７４位のチロシン；１７９位のイソロイシン、ロイシン、またはメチオニン；１８０位のイソロイシン；１９４位のロイシン；２１５位のフェニルアラニン；２１８位のセリン；２２２位のセリン；２２６位のイソロイシンまたはロイシン；２２７位のバリンまたはロイシン；２３１位のロイシンまたはバリン；２４０位のイソロイシン；２４２位のアスパラギン酸；２４５位のメチオニンまたはロイシン；２４６位のアルギニン；２５６位のトレオニン；２６０位のバリンまたはイソロイシン；２６２位のロイシンまたはイソロイシン；２６８位のロイシンまたはバリン；２７２位のバリンまたはメチオニン；２７３位のバリン；２７５位のバリン、イソロイシン、またはメチオニン；２７８位のフェニルアラニン；２７９位のバリンまたはイソロイシン；２８１位のイソロイシンまたはバリン；および２８２位のアルギニン；からなる群より選択される少なくとも１つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号２に示されるアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを提供する（ここでこのポリペプチドは、配列番号２に示されるポリペプチドの活性を有する）。

【００１３】
Ｂ７－Ｌアミノ酸配列を含む融合ポリペプチドもまた、提供される。

【００１４】
本発明はまた、本明細書中に示されるような単離された核酸分子を含む発現ベクター、本明細書中に示されるような組換え核酸分子を含む組換え宿主細胞、およびＢ７－Ｌポリペプチドを産生する方法を提供し、この方法は、この宿主細胞を培養する工程、必要に応じてそのように産生されたポリペプチドを単離する工程を包含する。

【００１５】
Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸分子を含むトランスジェニック非ヒト動物もまた

、本発明に含まれる。Ｂ７－Ｌ核酸分子は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現およびＢ７－Ｌポリペプチドのレベルの増加（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、Ｂ７－Ｌ核酸分子は、内因性Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を妨害する様式で動物に導入される（すなわち、Ｂ７－Ｌポリペプチド遺伝子ノックアウトを保有するトランスジェニック動物を作製する）。トランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、より好ましくはげっ歯類（例えば、ラットまたはマウス）である。

【００１６】

本発明のＢ７－Ｌポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【００１７】

本発明のＢ７－Ｌポリペプチドに特異的に結合し得る選択的結合因子（例えば、抗体およびペプチド）が、さらに提供される。このような抗体およびペプチドは、アゴニスト性であってもアンタゴニスト性であってもよい。

【００１８】

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

【００１９】

本発明のＢ７－ＬポリペプチドおよびＢ７－Ｌ核酸分子は、疾患および障害（本明細書中に列挙されるものを含む）を処置、予防、改善、および／または検出するために使用され得る。

【００２０】

本発明はまた、Ｂ７－Ｌポリペプチドに結合する試験分子を同定するために、試験分子をアッセイする方法を提供する。この方法は、Ｂ７－Ｌポリペプチドを試験分子と接触させて、この試験分子のこのポリペプチドに対する結合の程度を決定する工程を包含する。この方法はさらに、このような試験分子が、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストであるか否かを決定する工程をさらに包含する。本発明はさらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現またはＢ７－Ｌポリペプチドの活性に対する分子の影響を試験する方法を提供する。

【００２１】

Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を調節する方法およびＢ７－Ｌポリペプチドのレベルを調節する（すなわち、増加または減少させる）方法もまた、本発明によって包含される。１つの方法は、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸分子を動物に投与する工程を包含する。別の方法において、Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を調節または調整するエレメントを含む核酸分子が、投与され得る。これらの方法の例としては、本明細書中にさらに記載されるように、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【００２２】

本発明の別の局面において、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、そのレセプター（「Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプター」）を同定するために使用され得る。種々の形態の「発現クローニング」は、タンパク質リガンドに対するレセプターをクローン化するために広範囲に使用されている。例えば、ＳｉｍｏｎｓｅｎおよびＬｏｄｉｓｈ、１９９４、Ｔｒｅｎｄｓ Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｓｃｉ．１５：４３７－４１ならびにＴａｒｔａｇｌｉａら、１９９５、Ｃｅｌｌ ８３：１２６３－７１を参照のこと。Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターの単離は、Ｂ７－Ｌポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよびアンタゴニストの同定または開発に有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプター、抗Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプター－選択的結合因子（例えば、抗体またはその誘導体）、低分子、およびアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、これらのうちのいずれもが、１つ以上の疾患または障害（本明細書中に

開示されるものを含む）の処置に使用され得る。
【００２３】
（発明の詳細な説明）
本明細書中で使用される節の表題は、体系的な目的のみのためであり、そして、そこに記載される内容を限定するようには解釈されるべきではない。本出願において列挙される全ての参考文献は、明確に本明細書中に参考として援用される
（定義）
用語「Ｂ７－Ｌ遺伝子」または「Ｂ７－Ｌ核酸分子」あるいは「Ｂ７－Ｌポリヌクレオチド」とは、配列番号１に示されるようなヌクレオチド配列、配列番号２に示されるようなポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義されるような核酸分子を含むか、あるいはこれらからなる核酸分子をいう。
【００２４】
用語「Ｂ７－Ｌポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物体または生物体の集団の染色体の所定の遺伝子座を占める遺伝子の、天然に存在する可能ないくつかの代替的形態のうちの１つをいう。
【００２５】
用語「Ｂ７－Ｌポリペプチドスプライス改変体」とは、配列番号２に示されるようなＢ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列のＲＮＡ転写物中のイントロン配列の選択的プロセシングによって生成される、核酸分子（通常はＲＮＡ）をいう。
【００２６】
用語「単離された核酸分子」とは、（１）総核酸が供給源細胞から単離される場合に、天然で一緒に見出されるタンパク質、脂質、炭水化物、または他の物質のうち少なくとも約５０パーセントから分離された本発明の核酸分子、（２）「単離された核酸分子」が天然で連結しているポリヌクレオチドの全てまたは一部に連結していない本発明の核酸分子、（３）天然では連結しないポリヌクレオチドに作動可能に連結した本発明の核酸分子、あるいは（４）より大きなポリヌクレオチド配列の一部として、天然には存在しない本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、その天然の環境において見出される任意の他の夾雑核酸分子または他の夾雑物（これらは、ポリペプチド産生における使用、または治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。
【００２７】
用語「核酸配列」または「核酸分子」は、ＤＮＡ配列またはＲＮＡ配列をいう。この用語は、ＤＮＡおよびＲＮＡの公知の塩基アナログのいずれかから形成される分子を含み、例えば、以下であるがこれらに限定されない：４－アセチルシトシン、８－ヒドロキシ－Ｎ６－メチルアデノシン、アジリジニル－シトシン、プソイドイソシトシン（ｐｓｅｕｄｏｉｓｏｃｙｔｏｓｉｎｅ）、５－（カルボキシヒドロキシルメチル）ウラシル、５－フルオロウラシル、５－ブロモウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチル－２－チオウラシル、５－カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、イノシン、Ｎ６－イソ－ペンテニルアデニン、１－メチルアデニン、１－メチルプソイドウラシル、１－メチルグアニン、１－メチルイノシン、２，２－ジメチル－グアニン、２－メチルアデニン、２－メチルグアニン、３－メチルシトシン、５－メチルシトシン、Ｎ６－メチルアデニン、７－メチルグアニン、５－メチルアミノメチルウラシル、５－メトキシアミノ－メチル－２－チオウラシル、β－Ｄ－マンノシルキューオシン（β－Ｄ－ｍａｎｎｏｓｙｌｑｕｅｏｓｉｎｅ）、５’－メトキシカルボニル－メチルウラシル、５－メトキシウラシル、２－メチルチオ－Ｎ６－イソペンテニルアデニン、ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、オキシブトキソシン（ｏｘｙｂｕｔｏｘｏｓｉｎｅ）、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、５－メチル－２－チオウラシル、２－チオウラシル、４－チオウラシル、５－メチルウラシル、Ｎ－ウラシル－５－オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル－５－オキシ酢酸、プソイドウラシル、キューオシン、２－チオシトシン、および２，６－ジアミノプリン。

【００２８】
用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を伝達するために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。　用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換使用に適切であり、そして挿入された異種核酸配列の発現を、指示および／または制御する核酸配列を含むベクターをいう。発現としては、転写、翻訳、およびＲＮＡスプライシング（イントロンが存在する場合）のようなプロセスが挙げられるがこれらに限定されない。
【００２９】
用語「作動可能に連結された」は、隣接配列の配置をいうために本明細書中で、使用され、ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を行うように構成または構築される。従って、コード配列に作動可能に連結した隣接配列は、このコード配列の複製、転写および／または翻訳に影響を及ぼし得る。例えば、コード配列は、プロモーターがコード配列の転写を指示し得る場合に、このプロモーターに作動可能に連結される。隣接配列は、これが正確に機能する限り、コード配列と隣接する必要はない。従って、例えば、介在する非翻訳性であるが転写される配列が、プロモーター配列とコード配列との間に存在し得、そしてこのプロモーター配列は、なおこのコード配列に「作動可能に連結」されているとみなされ得る。
【００３０】
用語「宿主細胞」は、核酸配列で形質転換されたか、または形質転換され得、次いで目的の選択された遺伝子を発現し得る細胞をいうために使用される。この用語は、選択された遺伝子が存在する限り、子孫が形態学または遺伝子構造において本来の親と同一であろうとなかろうと、親細胞の子孫を含む。
【００３１】
用語「Ｂ７－Ｌポリペプチド」とは、配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチド、および関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント、Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ、Ｂ７－Ｌポリペプチド改変体、およびＢ７－Ｌポリペプチド誘導体が挙げられ、これは、配列番号２に示されるポリペプチドの少なくとも１つの活性を有する。Ｂ７－Ｌポリペプチドは、本明細書中で定義されるような成熟ポリペプチドであり得、そしてこれらが調製される方法に依存して、アミノ末端メチオニン残基を有しても有さなくてもよい。
【００３２】
用語「Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント」とは、配列番号２に示されるようなポリペプチドの、アミノ末端（リーダー配列を有するかもしくは有さない）での短縮および／またはカルボキシル末端での短縮を含むポリペプチドをいう。用語「Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント」はまた、Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ、Ｂ７－Ｌポリペプチド誘導体、もしくはＢ７－Ｌポリペプチド改変体の、アミノ末端での短縮および／もしくはカルボキシル末端での短縮をいうか、またはＢ７－Ｌポリペプチド対立遺伝子改変体もしくはＢ７－Ｌポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端での短縮および／またはカルボキシル末端での短縮をいう。Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメントは、選択的ＲＮＡスプライシング、またはインビボプロテアーゼ活性から生じ得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドの膜結合形態もまた、本発明によって意図される。好ましい実施形態において、短縮および／または欠失は、約１０アミノ酸、または約２０アミノ酸、または約５０アミノ酸、または約７５アミノ酸、または約１００アミノ酸、または１００より多いアミノ酸を含む。このように生成されるポリペプチドフラグメントは、約２５個連続したアミノ酸、または約５０アミノ酸、または約７５アミノ酸、または約１００アミノ酸、または約１５０アミノ酸または約２００アミノ酸を含む。このようなＢ７－Ｌポリペプチドフラグメントは、必要に応じて、アミノ末端メチオニン残基を含み得る。このようなフラグメントは、例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドに対する抗体を作製するために使用され得ることが理解される。
【００３３】

用語「Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ」とは、配列番号２に示されるようなＢ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列に対応する、別の種由来のポリペプチドをいう。例えば、マウスおよびヒトのＢ７－Ｌポリペプチドは、互いにオルソログであるとみなされる。

【００３４】

用語「Ｂ７－Ｌポリペプチド改変体」とは、配列番号２（リーダー配列を有するかまたは有さない）に示されるＢ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列と比較して、１つ以上のアミノ酸配列の置換、欠失（例えば、内部欠失および／もしくはＢ７－Ｌポリペプチドフラグメント）、ならびに／または付加（例えば、内部付加および／もしくはＢ７－Ｌ融合ポリペプチド）を有するアミノ酸配列を含むＢ７－Ｌポリペプチドをいう。改変体は、天然に存在（例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチド対立遺伝子改変体、Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ、およびＢ７－Ｌポリペプチドスプライス改変体）し得るか、あるいは、人工的に構築され得る。このようなＢ７－Ｌポリペプチド改変体は、配列番号１に示されるようなＤＮＡ配列からそれに応じて変化するＤＮＡ配列を有する、対応する核酸分子から調製され得る。好ましい実施形態において、この改変体は、１～３、または１～５、または１～１０、または１～１５、または１～２０、または１～２５、または１～５０、または１～７５、または１～１００、または１００より多くのアミノ酸の置換、挿入、付加、および／あるいは欠失を有し、ここで、この置換は、保存的、または非保存的、あるいはそのいずれかの組み合わせであり得る。

【００３５】

用語「Ｂ７－Ｌポリペプチド誘導体」は、配列番号２に示されるようなポリペプチド、本明細書中で定義されるような、Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント、Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ、またはＢ７－Ｌポリペプチド改変体をいい、これらは、化学的に改変されている。用語「Ｂ７－Ｌポリペプチド誘導体」はまた、本明細書中で定義されるような、Ｂ７－Ｌポリペプチド対立遺伝子改変体またはＢ７－Ｌポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドをいい、これらは、化学的に改変されている。

【００３６】

用語「成熟Ｂ７－Ｌポリペプチド」は、リーダー配列を欠失したＢ７－Ｌポリペプチドをいう。成熟Ｂ７－Ｌポリペプチドはまた、他の改変（例えば、アミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）および／またはカルボキシ末端のタンパク質分解性プロセシング、より大きな前駆体からのより小さなポリペプチドの切断、Ｎ結合型および／またはＯ結合型グリコシル化など）を含み得る。例示的な成熟Ｂ７－Ｌポリペプチドは、配列番号３のアミノ酸配列によって示される。

【００３７】

用語「Ｂ７－Ｌ融合ポリペプチド」は、配列番号２に示されるようなポリペプチド、本明細書中で定義されるような、Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント、Ｂ７－Ｌポリペプチドオルソログ、Ｂ７－Ｌポリペプチド改変体、またはＢ７－Ｌ誘導体のアミノ末端またはカルボキシ末端での、１つ以上のアミノ酸の融合（例えば、異種ペプチドまたはポリペプチド）をいう。用語「Ｂ７－Ｌ融合ポリペプチド」はまた、本明細書中で定義されるような、Ｂ７－Ｌポリペプチド対立遺伝子改変体またはＢ７－Ｌポリペプチドスプライス改変体によってコードされるポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシ末端での、１つ以上のアミノ酸の融合をいう。

【００３８】

用語「生物学的に活性なＢ７－Ｌポリペプチド」は、配列番号２のアミノ酸配列を含むＢ７－Ｌポリペプチドの少なくとも１つの活性特徴を有するＢ７－Ｌポリペプチドをいう。さらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、免疫原として活性であり得る；すなわち、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、抗体が惹起され得る少なくとも１つのエピトープを含む。

【００３９】

用語「単離されたポリペプチド」とは、（１）細胞供給源から単離される場合に、天然で一緒に見出されるポリヌクレオチド、脂質、炭水化物、または他の物質の少なくとも約５０％から分離されている本発明のポリペプチド、（２）「単離されたポリペプチド」が天

然で連結するポリペプチドの全てまたは一部に（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）連結しない、本発明のポリペプチド、（３）天然には連結しないポリペプチドに（共有結合的または非共有結合的相互作用によって）作動可能に連結される、本発明のポリペプチド、あるいは（４）天然には存在しない本発明のポリペプチドをいう。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その天然の環境において見出される任意の他の夾雑ポリペプチドまたは他の夾雑物（これは、その治療的使用、診断的使用、予防的使用、または研究的使用を妨げる）を実質的に含まない。

【００４０】

用語「同一性」とは、当該分野で公知のように、配列の比較によって決定される、２つ以上のポリペプチド分子または２つ以上の核酸分子の配列間の関係をいう。当該分野において、「同一性」はまた、場合に応じて、２つ以上のヌクレオチド配列または２つ以上のアミノ酸配列間の一致によって決定されるように、核酸分子またはポリペプチド間の配列関連性の程度を意味する。「同一性」は、２つ以上の配列のうちのより小さなものと、特定の数理的モデルまたはコンピュータプログラム（すなわち、「アルゴリズム」）によって位置づけられたギャップアラインメント（存在する場合）との間の、同一の一致のパーセントを評価する。

【００４１】

用語「類似性」は、「同一性」とは同類の概念であるが、対照的に「類似性」は、同一の一致および保存的置換の一致の両方を含む関係の測定をいう。２つのポリペプチド配列が、例えば１０／２０個同一のアミノ酸を有し、そして残りが全て非保存的置換である場合、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、どちらも５０％である。同じ例において、保存的置換が存在する位置がさらに５つ存在する場合、同一性パーセントは５０％のままであるが、類似性パーセントは７５％（１５／２０）である。従って、保存的置換が存在する場合、２つのポリペプチド間の類似性の程度は、これらの２つのポリペプチド間のパーセント同一性よりも高い。

【００４２】

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

【００４３】

用語「有効量」および「治療有効量」は、本明細書中に示されるようなＢ７－Ｌポリペプチドの１つ以上の生物学的活性の観察可能なレベルを支持するために使用されるＢ７－Ｌポリペプチドまたはは７－Ｌ核酸分子の量をいう。

【００４４】

用語「薬学的に受容可能なキャリア」または「生理学的に受容可能なキャリア」は、本明細書中で使用される場合、薬学的組成物としてのＢ７－Ｌポリペプチド、Ｂ７－Ｌ核酸分子、またはＢ７－Ｌ選択的結合因子の送達の達成または増強に適切な１つ以上の処方材料をいう。

【００４５】

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

【００４６】

用語「選択的結合因子」とは、Ｂ７－Ｌポリペプチドに特異性を有する分子をいう。本明細書中で使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、選択的結合因子が、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドに結合し、かつヒト非Ｂ７－Ｌポリペプチドに結合しない能力をいう。しかし、選択的結合因子がまた、配列番号２に示されるようなポリペプチドのオルソログ（すなわち、その種間のバージョン（例えば、マウスＢ７－Ｌポリペプチドおよび

ラットＢ７－Ｌポリペプチド））に結合し得ることが、理解される。
【００４７】
用語「形質導入」とは、通常はファージによる１つの細菌から別の細菌への遺伝子の伝達をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞配列の獲得および伝達をいう。
【００４８】
用語「トランスフェクション」は、細胞による外来ＤＮＡまたは外因性ＤＮＡの取り込みをいうために使用され、そして細胞は、外因性ＤＮＡが細胞膜内に導入された場合には「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術は、当該分野で周知であり、そして本明細書中に開示される。例えば、Ｇｒａｈａｍら，１９７３ Ｖｉｒｏｌｏｇｙ ５２：４５６；Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ，Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ，１９８９）；Ｄａｖｉｓら，Ｂａｓｉｃ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ｅｌｓｅｖｉｅｒ，１９８６）；およびＣｈｕら，１９８１、Ｇｅｎｅ １３：１９７を参照のこと。このような技術を使用して、１つ以上の外因性ＤＮＡ部分を適切な宿主細胞に導入し得る。
【００４９】
本明細書中で使用される場合、用語「形質転換」とは、細胞の遺伝的特徴における変化をいい、そして細胞は、新しいＤＮＡを含有するように改変された場合に形質転換されている。例えば、細胞は、それがそのネイティブな状態から遺伝的に改変される場合に形質転換される。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、形質転換ＤＮＡは、物理的に細胞の染色体に組み込むことにより細胞のＤＮＡと組換わり得るか、複製されることなしにエピソームエレメントとして一過的に保持され得るか、またはプラスミドとして独立的に複製し得る。ＤＮＡが細胞分裂と共に複製される場合に、細胞は、安定に形質転換されたとみなされる。
【００５０】
（核酸分子および／またはポリペプチドの関連性）
関連した核酸分子が、配列番号１の核酸分子の対立遺伝子改変体またはスプライス改変体を含むこと、および上記のヌクレオチド配列のいずれかに相補的である配列を含むことが理解される。関連した核酸分子はまた、配列番号２に示されるポリペプチドと比較して１以上のアミノ酸残基の置換、改変、付加および／または欠失を含むかまたは本質的にこれからなるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む。このような関連したＢ７－Ｌポリペプチドは、例えば、１以上のＮ－連結もしくはＯ－連結グリコシル化部位の付加および／もしくは欠失、または１以上のシステイン残基の付加および／もしくは欠失を含み得る。
【００５１】
関連した核酸分子はまた、配列番号２のＢ７－Ｌポリペプチドの少なくとも約２５個連続したアミノ酸、または約５０個のアミノ酸、または約７５個のアミノ酸、または約１００個のアミノ酸、または約１５０個のアミノ酸、または約２００個のアミノ酸、または２００個より多くのアミノ酸残基のポリペプチドをコードする、Ｂ７－Ｌ核酸分子のフラグメントを包含する。
【００５２】
さらに、関連したＢ７－Ｌ核酸分子はまた、本明細書中で定義したとおりの中程度または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号１のいずれかのＢ７－Ｌ核酸分子またはポリペプチドをコードする分子の十分に相補的な配列とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子を包含し、このポリペプチドは、配列番号２、または本明細書中に定義したとおりの核酸フラグメント、または本明細書中に定義したとおりのポリペプチドをコードする核酸フラグメントのいずれかに示されるアミノ酸配列を含む。ハイブリダイゼーションプローブは、本明細書中に提供されるＢ７－Ｌ配列を用いてｃＤＮＡライブラリー、ゲノムＤＮＡライブラリーまたは合成ＤＮＡライブラリーを関連した配列についてスクリー

ニングするために調製され得る。Ｂ７－ＬポリペプチドのＤＮＡ配列および／またはアミノ酸配列のうちの、既知配列に対して顕著な同一性を示す領域は、本明細書中に記載されるとおりの配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域を用いて、スクリーニングのためのプローブを設計し得る。

【００５３】

用語「高度にストリンジェントな条件」とは、配列が非常に相補的であるＤＮＡ鎖のハイブリダイゼーションを許容し、かつ顕著に不一致のＤＮＡのハイブリダイゼーションを排除するように設計された条件をいう。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーは、温度、イオン強度および変性剤（例えば、ホルムアミド）の濃度によって主に決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄についての「高度にストリンジェントな条件」の例は、６５～６８℃での０．０１５Ｍ塩化ナトリウム、０．００１５Ｍクエン酸ナトリウムまたは４２℃での０．０１５Ｍ塩化ナトリウム、０．００１５Ｍクエン酸ナトリウムおよび５０％ホルムアミドである。Ｓａｍｂｒｏｏｋ，Ｆｒｉｔｓｃｈおよびｍａｎｉａｔｉｓ，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（第２版，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ，１９８９）；Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｓａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ 第４章（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ）を参照のこと。

【００５４】

よりストリンジェントな条件（例えば、より高い温度、より低いイオン強度、より高いホルムアミドまたは他の変性剤）もまた用いられ得るが、ハイブリダイゼーションの速度が影響される。他の薬剤は、非特異的および／またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的のために、ハイブリダイゼーションおよび洗浄の緩衝液中に含まれ得る。例は、０．１％ウシ血清アルブミン、０．１％ポリビニルピロリドン、０．１％ピロリン酸ナトリウム、０．１％ドデシル硫酸ナトリウム、ＮａＤｏｄＳＯ$_4$、（ＳＤＳ）、ｆｉｃｏｌｌ、デンハルト溶液、超音波処理サケ精子ＤＮＡ（または別の非相補的ＤＮＡ）および硫酸デキストランであるが、他の適切な薬剤もまた用いられ得る。これらの添加剤の濃度および種類は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は通常、ｐＨ６．８～７．４で実施される；しかし、代表的なイオン強度の条件では、ハイブリダイゼーションの速度は、ｐＨからほぼ独立する。Ａｎｄｅｒｓｏｎら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄ Ｈｙｂｒｉｄｉｓａｔｉｏｎ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ第４章（ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ Ｌｉｍｉｔｅｄ）を参照のこと。

【００５５】

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

T_m（℃）＝８１．５＋１６．６（ｌｏｇ［Ｎａ＋］）＋０．４１（Ｇ＋Ｃ％）－６００／Ｎ－０．７２（ホルムアミド％）

ここで、Ｎは、形成される二重鎖の長さであり、［Ｎａ＋］は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、Ｇ＋Ｃ％は、ハイブリッド中での（グアニン＋シトシン）塩基の百分率である。不完全に一致したハイブリッドについては、融解温度は、１％の不一致毎に約１℃下げられる。

【００５６】

用語「中程度にストリンジェントな条件」とは、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりも高い程度の塩基対不一致を有するＤＮＡ二重鎖が形成され得る条件をいう。代表的な「中程度にストリンジェントな条件」の例は、５０～６５℃での０．０１５Ｍ塩化ナトリウム、０．００１５Ｍクエン酸ナトリウムまたは３７～５０℃での０．０１５

Ｍ塩化ナトリウム、０．００１５Ｍクエン酸ナトリウムおよび２０％ホルムアミドである。例示として、０．０１５Ｍナトリウムイオン中での５０℃という「中程度にストリンジェントな条件」によって、約２１％の不一致が可能になる。

【００５７】

「高度にストリンジェントな条件」と「中程度にストリンジェントな条件」との間に絶対的な区別が存在しないことが当業者によって認識される。例えば、０．０１５Ｍナトリウムイオン（ホルムアミドなし）では、完全に一致した長さのＤＮＡの融解温度は、約７１℃である。６５℃で（同じイオン強度で）の洗浄を用いると、約６％の不一致が可能になる。より関連性の遠い配列を捕獲するために、当業者は、単純に、温度を低くし得るかまたはイオン強度を高くし得る。

【００５８】

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

Ｔｍ＝Ａ－Ｔ塩基対あたり２℃　＋　Ｇ－Ｃ塩基対あたり４℃

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

【００５９】

オリゴヌクレオチドについての高度ストリンジェンシー洗浄条件は通常、６×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ中でのそのオリゴヌクレオチドのＴｍよりも０℃～５℃低い温度においてである。

【００６０】

別の実施形態において、関連する核酸分子は、配列番号１に示されるようなヌクレオチド配列と少なくとも約７０パーセント同一であるヌクレオチド配列を含むかもしくはこれからなるか、または配列番号２に記載されるようなポリペプチドと少なくとも約７０パーセント同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかもしくはこれから本質的になる。好ましい実施形態において、このヌクレオチド配列は、配列番号１に示されるヌクレオチド配列と、約７５パーセント、または約８０パーセント、または約８５パーセント、または約９０パーセント、または約９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセントもしくは９９パーセント同一であるか、あるいは、このヌクレオチド配列は、配列番号２に記載されるようなポリペプチド配列と、約７５パーセント、または約８０パーセント、または約８５パーセント、または約９０パーセント、または約９５パーセント、９６パーセント、９７パーセント、９８パーセントもしくは９９パーセント同一であるポリペプチドをコードする。関連する核酸分子は、配列番号２に記載されるポリペプチドの少なくとも１つの活性を有するポリペプチドをコードする。

【００６１】

核酸配列における差異は、配列番号２のアミノ酸配列に対するアミノ酸配列の保存的改変および／または非保存的改変を生じ得る。

【００６２】

配列番号２のアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコードヌクレオチドに対する対応する改変）は、Ｂ７－Ｌポリペプチドに類似した機能的特徴および化学的特徴を有するポリペプチドを生成する。対照的に、Ｂ７－Ｌポリペプチドの機能的特徴および／または化学的特徴における実質的な改変は、配列番号２のアミノ酸配列において置換を選択することによって達成され得、これらの置換は、（ａ）置換領域における分子骨格の構造（例えば、シートコンフォメーションまたはらせんコンフォメーション）、（ｂ）標的部位における分子の電荷または疎水性、あるいは（ｃ）側鎖の大きさを、維持することに対するその影響において有意に異なる。

【００６３】

例えば、「保存的アミノ酸置換」は、その位置におけるアミノ酸残基の極性または電荷にほとんど影響がないかまたは全く影響がないような、ネイティブなアミノ酸残基の非ネイ

ティブな残基による置換を含み得る。さらに、ポリペプチド中の任意のネイティブな残基はまた、「アラニンスキャニング変異誘発」に関して以前に記載されたように、アラニンで置換され得る。

【００６４】

保存的アミノ酸置換はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含み、これらの残基は、生物系における合成によるよりむしろ化学的ペプチド合成によって代表的に組み込まれる。これらは、ペプチド模倣物、およびアミノ酸部分の他の逆転形態または反転形態を含む。

【００６５】

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいて以下のクラスに分けられ得る：

１）疎水性：ノルロイシン、Ｍｅｔ、Ａｌａ、Ｖａｌ、Ｌｅｕ、Ｉｌｅ；

２）中性親水性：Ｃｙｓ、Ｓｅｒ、Ｔｈｒ；

３）酸性：Ａｓｐ、Ｇｌｕ；

４）塩基性：Ａｓｎ、Ｇｌｎ、Ｈｉｓ、Ｌｙｓ、Ａｒｇ；

５）鎖の方向に影響を与える残基：Ｇｌｙ、Ｐｒｏ；および

６）芳香族：Ｔｒｐ、Ｔｙｒ、Ｐｈｅ。

【００６６】

例えば、非保存的置換は、これらのクラスのうちの１つのメンバーを、別のクラス由来のメンバーへと交換することを含み得る。このような置換された残基は、非ヒトＢ７－Ｌポリペプチドと相同性であるヒトＢ７－Ｌポリペプチドの領域、またはこの分子の非相同性領域に、導入され得る。

【００６７】

このような変更を作製する場合、アミノ酸のハイドロパシー指標（疎水性親水性指標）が、考慮され得る。各アミノ酸は、その疎水性特徴および荷電特徴に基づいてハイドロパシー指標が割り当てられている。これらのハイドロパシー指標は、イソロイシン（＋４．５）；バリン（＋４．２）；ロイシン（＋３．８）；フェニルアラニン（＋２．８）；システイン／シスチン（＋２．５）；メチオニン（＋１．９）；アラニン（＋１．８）；グリシン（－０．４）；スレオニン（－０．７）；セリン（－０．８）；トリプトファン（－０．９）；チロシン（－１．３）；プロリン（－１．６）；ヒスチジン（－３．２）；グルタミン酸（－３．５）；グルタミン（－３．５）；アスパラギン酸（－３．５）；アスパラギン（－３．５）；リジン（－３．９）およびアルギニン（－４．５）である。

【００６８】

タンパク質に対して相互作用的な生物学的機能を付与することにおけるハイドロパシーアミノ酸指標の重要性は、当該分野において一般的に理解されている（Ｋｙｔｅら、１９８２，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１５７：１０５－３１）。特定のアミノ酸が類似のハイドロパシー指標またはハイドロパシースコアを有する他のアミノ酸で置換され得、そして依然として類似の生物学的活性を維持し得ることが、公知である。ハイドロパシー指標に基づいて変化を起こす際に、ハイドロパシー指標が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。

【００６９】

類似のアミノ酸の置換が親水性に基づいて効果的になされ得る（特に、これによって作製された生物学的機能的に等価なタンパク質またはペプチドが、この場合においてと同様に、免疫学的実施形態における使用に関して考慮される場合）こともまた、当該分野において理解されている。その隣接するアミノ酸の親水性によって支配される、タンパク質の最も大きな局所的平均親水性は、その免疫原性および抗原性に、すなわち、そのタンパク質の生物学的特性に、相関する。

【００７０】

以下の親水性の値が、これらのアミノ酸残基に割り当てられている：アルギニン（＋３．０）；リジン（＋３．０）；アスパラギン酸（＋３．０±１）；グルタミン酸（＋３．０±１）；セリン（＋０．３）；アスパラギン（＋０．２）；グルタミン（＋０．２）；グ

リシン（０）；スレオニン（－０．４）；プロリン（－０．５±１）；アラニン（－０．５）；ヒスチジン（－０．５）；システイン（－１．０）；メチオニン（－１．３）；バリン（－１．５）；ロイシン（－１．８）；イソロイシン（－１．８）；チロシン（－２．３）；フェニルアラニン（－２．５）；およびトリプトファン（－３．４）。類似の親水性の値に基づいて変化を行う際に、親水性値が±２以内であるアミノ酸の置換が好ましく、±１以内であるものが特に好ましく、そして±０．５以内であるものが、なおより特に好ましい。一次アミノ酸配列から、エピトープを、親水性に基づいて同定もし得る。これらの領域はまた、「エピトープコア領域」とも呼ばれる。

【００７１】

所望のアミノ酸置換（保存的であれ非保存的であれ）は、当業者によって、そのような置換が所望される時点で決定され得る。例えば、アミノ酸置換を使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドの重要な残基を同定し得るし、または本明細書中に記載されるＢ７－Ｌポリペプチドの親和性を増加もしくは減少させ得る。例示的なアミノ酸置換は、表Ｉに記載される。

【００７２】

（表１）

（アミノ酸置換）

【００７３】

【表１】

もとの残基	例示的置換	好ましい置換
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4ジアミノ酪酸, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

当業者は、配列番号２に記載のポリペプチドの適切な改変体を、周知の技術を使用して、決定し得る。生物学的活性を破壊することなく変化され得る分子の適切な領域を同定するために、当業者は、活性のために重要であるとは考えられない領域を標的化し得る。例えば、同じ種由来かまたは他の種由来の、類似の活性を有する類似のポリペプチドが既知である場合には、当業者は、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を、このような類似のポリペプチドと比較し得る。このような比較を用いて、類似のポリペプチド間で保存される分子の残基および部分を同定し得る。このような類似のポリペプチドに対して保存されて

いない、Ｂ７－Ｌ分子の領域における変化が、Ｂ７－Ｌポリペプチドの生物学的活性および／または構造に不利に影響を与える可能性はさほどないことが、理解される。当業者はまた、比較的保存された領域においてさえ、活性を維持しながら、天然に存在する残基を化学的に類似するアミノ酸に置換し得ることを知っている（保存的アミノ酸残基置換）。従って、生物学的活性または構造のために重要であり得る領域でさえ、生物学的活性を破壊することなく、またはポリペプチド構造に不利に影響を与えることなく、保存的アミノ酸置換に供され得る。

【００７４】

さらに、当業者は、活性または構造のために重要である、類似のポリペプチドにおける残基を同定する、構造－機能研究を再調査し得る。このような比較を考慮して、類似のポリペプチドにおける活性または構造のために重要なアミノ酸残基に対応するＢ７－Ｌポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を推測し得る。当業者は、Ｂ７－Ｌポリペプチドのこのような推測された重要なアミノ酸残基に代わる化学的に類似するアミノ酸への置換を、選択し得る。

【００７５】

当業者はまた、類似のポリペプチドにおける三次元構造、およびその構造に関連するアミノ酸配列を分析し得る。このような情報を考慮して、当業者は、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸残基のアライメントを、その三次元構造に関して推測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面上に存在すると推測されるアミノ酸残基に対する急激な変化を起こさないように、選択し得る。なぜなら、このような残基は、他の分子との重要な相互作用に関与し得るからである。さらに、当業者は、単一のアミノ酸置換を各アミノ酸残基に含む、試験改変体を生成し得る。これらの改変体は、当業者に公知の活性アッセイを使用して、スクリーニングされ得る。このような改変体は、適切な改変体に関する情報を集めるために使用され得る。例えば、特定のアミノ酸残基に対する変化が、破壊された活性、望ましくなく減少した活性、または適切でない活性を生じたことを発見した場合には、このような変化を有する改変体は、回避される。換言すれば、このような慣用的な実験から集めた情報に基づいて、当業者は、さらなる置換が、単独でかまたは他の変異と組み合わせてかのいずれかで回避されるべきであるアミノ酸を、容易に決定し得る。

【００７６】

多数の科学刊行物が、二次構造の推定に充てられてきた。Ｍｏｕｌｔ，１９９６，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．７：４２２－２７；Ｃｈｏｕら、１９７４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １３：２２２－４５；Ｃｈｏｕら、１９７４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １１３：２１１－２２；Ｃｈｏｕら、１９７８，Ａｄｖ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．Ｒｅｌａｔ．Ａｒｅａｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４７：４５－４８；Ｃｈｏｕら、１９７８，Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．４７：２５１－２７６；およびＣｈｏｕら、１９７９，Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｊ．２６：３６７－８４を参照のこと。さらに、コンピュータープログラムが、二次構造の推測を補助するために現在利用可能である。二次構造を推測する１つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、３０％よりも大きい配列同一性、または４０％よりも大きい配列類似性を有する、２つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似した構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース（ＰＤＢ）の近年の成長により、二次構造の推測可能性（ポリペプチド構造またはタンパク質構造内の潜在的な折り畳みの数を含む）の促進がもたらされた。Ｈｏｌｍら、１９９９、Ｎｕｃｌｅｉｃ．Ａｃｉｄｓ．Ｒｅｓ．２７：２４４－４７を参照のこと。所定のポリペプチドもしくはタンパク質において限定された数の折り畳みが存在すること、および一旦臨界数の構造が決定されると、構造推測が劇的により正確になること、が示唆されている（Ｂｒｅｎｎｅｒら、１９９７、Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７ ３６９－７６）。

【００７７】

二次構造を推定するさらなる方法は、「スレッディング（ｔｈｒｅａｄｉｎｇ）」（Ｊｏｎｅｓ，１９９７，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．７：３７７－８７；

Ｓｉｐｐｌら、１９９６，Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ４：１５－１９）、「プロフィール分析」（Ｂｏｗｉｅら、１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ，２５３：１６４－７０；Ｇｒｉｂｓｋｏｖら、１９９０，Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：１４６－５９；Ｇｒｉｂｓｋｏｖら、１９８７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８４：４３５５－５８）、および「進化学的連鎖（ｅｖｏｌｕｔｉｏｎａｒｙ ｌｉｎｋａｇｅ）」（Ｈｏｌｍら、前出、およびＢｒｅｎｎｅｒら、前出を参照のこと）を包含する。

【００７８】

好ましいＢ７－Ｌポリペプチド改変体としては、グリコシル化部位の数および／または型が配列番号２に記載のアミノ酸配列と比較して変更している、グリコシル化改変体が挙げられる。１つの実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチド改変体は、配列番号２に記載のアミノ酸配列より多いかまたはより少ない数のＮ結合グリコシル化部位を含む。Ｎ結合グリコシル化部位は、配列Ａｓｎ－Ｘ－ＳｅｒまたはＡｓｎ－Ｘ－Ｔｈｒによって特徴付けられ、ここで、Ｘと印されるアミノ酸残基は、プロリン以外の任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、Ｎ結合型糖鎖の付加のための潜在的な新たな部位を提供する。あるいは、この配列を排除する置換は、存在するＮ結合型糖鎖を除去する。１つ以上のＮ結合グリコシル化部位（代表的には、天然に存在するグリコシル化部位）が排除され、そして１つ以上の新たなＮ結合部位が作製される、Ｎ結合型糖鎖の再配列もまた、提供される。さらなる好ましいＢ７－Ｌ改変体としては、１つ以上のシステイン残基が、配列番号２に記載のアミノ酸配列と比較して欠失しているか、または別のアミノ酸（例えば、セリン）で置換されている、システイン改変体が挙げられる。システイン改変体は、Ｂ７－Ｌポリペプチドが、例えば不溶性の封入体の単離の後に、生物学的に活性な立体構造へとリフォールディングされなければならない場合に、有用である。システイン改変体は、一般に、ネイティブタンパク質より少ないシステイン残基を有し、そして代表的には偶数のシステイン残基を有し、対合していないシステインから生じる相互作用を最小にする。

【００７９】

他の実施形態において、関連する核酸分子は、少なくとも１つのアミノ酸挿入を有する、配列番号２に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてこのポリペプチドが配列番号２に記載のポリペプチドの活性を有するか、あるいはこの関連する核酸分子は、少なくとも１つのアミノ酸欠失を有する、配列番号２に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、ここでこのポリペプチドが配列番号２に記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、配列番号２に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、このポリペプチドがカルボキシル末端および／またはアミノ末端の短縮を有し、そしてさらにこのポリペプチドが、配列番号２に記載のポリペプチドの活性を有する。関連する核酸分子はまた、アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、カルボキシル末端短縮、およびアミノ末端短縮からなる群より選択される少なくとも１つの改変を含む、配列番号２に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含むかまたはこの配列からなり、そしてポリペプチドが配列番号２に記載のポリペプチドの活性を有する。

【００８０】

さらに、配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチドまたは他のＢ７－Ｌポリペプチドは、同種ポリペプチドに融合されてホモダイマーを形成し得るか、あるいは異種ポリペプチドに融合されてヘテロダイマーを形成し得る。異種のペプチドおよびポリペプチドとしては、以下が挙げられるが、それらに限定されない：Ｂ７－Ｌ融合ポリペプチドの検出および／または単離を可能にするエピトープ；膜貫通レセプタータンパク質またはその部分（例えば、細胞外ドメインまたは膜貫通ドメインおよび細胞内ドメイン）；膜貫通レセプタータンパク質に結合する、リガンドまたはその部分；触媒的に活性である、酵素またはその部分；オリゴマー化を促進するポリペプチドまたはペプチド（例えば、ロイシンジッパードメイン）；安定性を増加させるポリペプチドまたはペプチド（例えば、免疫グロブ

リン定常領域）；ならびに配列番号２に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のＢ７－Ｌポリペプチドとは異なる治療活性を有する、ポリペプチド。

【００８１】

融合は、配列番号２に記載のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のＢ７－Ｌポリペプチドの、アミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、なされ得る。融合は、リンカーもアダプター分子も用いずに直接であっても、リンカーもしくはアダプター分子を介してであってもよい。リンカーまたはアダプター分子は、１つ以上のアミノ酸残基であり得、代表的に、約２０～約５０アミノ酸残基であり得る。リンカーまたはアダプター分子はまた、融合した部分の分離を可能にするために、ＤＮＡ制限エンドヌクレアーゼまたはプロテアーゼに対する切断部位を有して設計され得る。一旦構築されると、融合ポリペプチドは、本明細書中に記載の方法に従って誘導体化され得ることが、理解される。

【００８２】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号２のアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他のＢ７－Ｌポリペプチドは、ヒトＩｇＧのＦｃ領域の１つ以上のドメインに融合される。抗体は、以下の２つの機能的に独立した部分を含む；抗原と結合する「Ｆａｂ」として公知の可変ドメイン、ならびに補体活性化および食作用細胞による攻撃のようなエフェクター機能に関与する、「Ｆｃ」として公知の定常ドメイン。Ｆｃは、長い血清半減期を有し、一方でＦａｂは、短寿命である。Ｃａｐｏｎら、１９８９，Ｎａｔｕｒｅ ３３７：５２５－３１。治療タンパク質と一緒に構築される場合には、Ｆｃドメインは、より長い半減期を提供し得るか、またはＦｃレセプター結合、プロテインＡ結合、補体結合のような機能、および恐らく、胎盤移入のような機能さえも、組み込み得る（同書）。表ＩＩは、当該分野において公知の特定のＦｃ融合物の使用を要約する。

（表２）

（治療タンパク質とのＦｃ融合物）

【００８３】

【表２】

Ｆｃの形態	融合パートナー	治療関連	参考文献
ＩｇＧ１	ＣＤ３０－ＬのＮ末端	ホジキン病；未分化リンパ腫；Ｔ細胞白血病	米国特許第５，４８０，９８１号
マウスＦｃγ２ａ	ＩＬ－１０	抗炎症；移植拒絶	Ｚｈｅｎｇら、１９９５、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５４：５５９０～６００
ＩｇＧ１	ＴＮＦレセプター	敗血症性ショック	Ｆｉｓｈｅｒら、１９９６、Ｎ．Ｅｎｇｌ．Ｊ．Ｍｅｄ．３３４：１６９７～１７０２；Ｖａｎ Ｚｅｅら、１９９６、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５６：２２２１～３０
ＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、またはＩｇＥ（最初のドメインを除く）	ＴＮＦレセプター	炎症、自己免疫疾患	米国特許第５，８０８，０２９号
ＩｇＧ１	ＣＤ４レセプター	ＡＩＤＳ	Ｃａｐｏｎら、１９８９、Ｎａｔｕｒｅ ３３７：５２５～３１
ＩｇＧ１、ＩｇＧ３	ＩＬ－２のＮ末端	抗癌、抗ウイルス	Ｈａｒｖｉｌｌら、１９９５、Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈ，１：９５～１０５
ＩｇＧ１	ＯＰＧのＣ末端	変形性関節症；骨密度	ＷＯ ９７／２３６１４
ＩｇＧ１	レプチンのＮ末端	抗肥満	ＰＣＴ／ＵＳ ９７／２３１８３（１９９７年１２月１１日出願）
ヒトＩｇＣγ１	ＣＴＬＡ－４	自己免疫疾患	Ｌｉｎｓｅｙ、１９９１、Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：５６１～６９

一例において、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域が、当業者に公知の方法を使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。別の例において、ヒトＩｇＧのヒンジ領域、ＣＨ２領域、およびＣＨ３領域は、Ｂ７－Ｌポリペプチドフラグメント（例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドの推定細胞外部分）のアミノ末端またはカルボキシル末端のいずれかにおいて、融合され得る。

【００８４】

得られるＢ７－Ｌ融合ポリペプチドは、プロテインＡアフィニティーカラムの使用によって、精製され得る。Ｆｃ領域に融合したペプチドおよびタンパク質は、融合していない対応物より実質的に長いインビボでの半減期を示すことが見出された。また、Ｆｃ領域への融合は、融合ポリペプチドの二量体化／多量体化を可能にする。このＦｃ領域は、天然に存在するＦｃ領域であってもよいし、または治療品質、循環時間、もしくは減少した凝集のような、特定の品質を改善するよう変更されてもよい。

【００８５】

関連する核酸分子およびポリペプチドの同一性および類似性は、公知の方法によって容易に計算され得る。このような方法としては、Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａ．Ｍ．Ｌｅｓｋ編、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ １９８８）；Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ：Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ ａｎｄ Ｇｅｎｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ（Ｄ．Ｗ．Ｓｍｉｔｈ編、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９９３）；Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｏｆ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄ

ａｔａ（Ｐａｒｔ １，Ａ．Ｍ．ＧｒｉｆｆｉｎおよびＨ．Ｇ．Ｇｒｉｆｆｉｎ編、Ｈｕｍａｎａ Ｐｒｅｓｓ １９９４）；Ｇ．ｖｏｎ Ｈｅｉｎｌｅ，Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ １９８７）；Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ａｎａｌｙｓｉｓ Ｐｒｉｍｅｒ（Ｍ．Ｇｒｉｂｓｋｏｖおよびｊ．Ｄｅｖｅｒｅｕｘ編、Ｍ．Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ １９９１）；ならびにＣａｒｉｌｌｏら、１９８８，ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．，４８：１０７３に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。

【００８６】

同一性および／または類似性を決定するための好ましい方法は、試験される配列間での最大の適合を生じるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公に利用可能なコンピュータープログラムにおいて記載されている。２つの配列間の同一性および類似性を決定するための好ましいコンピュータープログラム方法としては、ＧＣＧプログラムパッケージ（ＧＡＰ（Ｄｅｖｅｒｅｕｘら、１９８４，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．１２：３８７；Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）、ＢＬＡＳＴＰ、ＢＬＡＳＴＮ、およびＦＡＳＴＡ（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－１０）を含む）が挙げられるが、これらに限定されない。ＢＬＡＳＴＸプログラムは、Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）および他の供給源（Ａｌｔｓｃｈｕｌら、ＢＬＡＳＴ Ｍａｎｕａｌ（ＮＣＢ ＮＬＭ ＮＩＨ，Ｂｅｔｈｅｓｄａ，ＭＤ）；Ａｌｔｓｃｈｕｌら、１９９０、前出）から公に利用可能である。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムもまた、同一性を決定するために使用され得る。

【００８７】

２つのアミノ酸配列を整列させるための特定のアライメントスキームは、これら２つの配列の短い領域のみの適合を生じ得、そしてこの小さな整列領域は、その２つの全長配列間に有意な関連がない場合でさえも、非常に高い配列同一性を有し得る。従って、好ましい実施形態において、選択されたアライメント方法（ＧＡＰプログラム）は、本願ポリペプチドのうちの少なくとも５０個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【００８８】

例えば、コンピューターアルゴリズムＧＡＰ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）を使用して、配列同一性の百分率が決定されるべき２つのポリペプチドが、それらのそれぞれのアミノ酸の最適な適合（このアルゴリズムによって決定される「適合したスパン」）のために、整列される。ギャップオープニングペナルティー（ｇａｐ ｏｐｅｎｉｎｇ ｐｅｎａｌｔｙ）（これは、平均対角の３倍として計算される：「平均対角」とは、使用される比較行列（ｃｏｍｐａｒｉｓｏｎ ｍａｔｒｉｘ）の対角の平均である；「対角」とは、特定の比較行列によって各完全なアミノ酸適合に対して割り当てられたスコアまたは数である）およびギャップエクステンションペナルティー（ｇａｐ ｅｘｔｅｎｓｉｏｎ ｐｅｎａｌｔｙ）（これは通常、キャップオープニングペナルティーの０．１倍である）、ならびにＰＡＭ ２５０またはＢＬＯＳＵＭ ６２のような比較行列が、このアルゴリズムと組み合わせて使用される。標準的な比較行列もまた、このアルゴリズムによって使用される（Ｄａｙｈｏｆｆら、５ Ａｔｌａｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ ａｎｄ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ（補遺３ １９７８）（ＰＡＭ２５０比較行列）；Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ ＵＳＡ ８９：１０９１５－１９（ＢＬＯＳＵＭ ６２比較行列）を参照のこと）。

【００８９】

ポリペプチド配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる：

アルゴリズム：ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ，１９７０，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．４８：４４３－５３；

比較行列：ＢＬＯＳＵＭ ６２（Ｈｅｎｉｋｏｆｆら、前出）；

ギャップペナルティー：１２
ギャップ長さペナルティー（Ｇａｐ　Ｌｅｎｇｔｈ　Ｐｅｎａｌｔｙ）：４
類似性の閾値（Ｔｈｒｅｓｈｏｌｄ　ｏｆ　Ｓｉｍｉｌａｒｉｔｙ）：０
このＧＡＰプログラムは、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、ＧＡＰアルゴリズムを用いるポリペプチド比較（末端ギャップに対してはペナルティーがないこととともに）のためのデフォルトパラメータである。
【００９０】
核酸分子配列比較のための好ましいパラメータとしては、以下が挙げられる：
アルゴリズム：ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ，前出；
比較行列：適合＝＋１０，非適合＝０
ギャップペナルティー：５０
ギャップ長さペナルティー：３
このＧＡＰプログラムはまた、上記パラメータを用いて有用である。上記パラメータは、核酸分子比較のためのデフォルトパラメータである。
【００９１】
Ｐｒｏｇｒａｍ　Ｍａｎｕａｌ，Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ，Ｖｅｒｓｉｏｎ　９，Ｓｅｐｔｅｍｂｅｒ，１９９７に記載されるものを含む、他の例示的なアルゴリズム、ギャップオープニングペナルティー、ギャップエクステンションペナルティー、比較行列、および類似性の閾値が使用され得る。なされるべき特定の選択は、当業者に明らかであり、そしてなされるべき特定の比較（例えば、ＤＮＡ対ＤＮＡ、タンパク質対タンパク質、タンパク質対ＤＮＡ）；ならびにさらに、その比較が所定の配列対の間（この場合には、ＧＡＰまたはＢｅｓｔＦｉｔが一般的に好ましい）であるか、１つの配列と大きな配列データベースとの間（この場合には、ＦＡＳＴＡまたはＢＬＡＳＴＡが好ましい）であるかに、依存する。
【００９２】
（核酸分子）
Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子は、種々の様式（化学合成、ｃＤＮＡもしくはゲノムのライブラリーのスクリーニング、発現ライブラリースクリーニング、および／またはｃＤＮＡのＰＣＲ増幅が挙げられるが、これらに限定されない）で容易に得られ得る。
【００９３】
本明細書中において使用される組換えＤＮＡ法は、一般に、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，１９８９）および／またはＣｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ（Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ　Ｉｎｃ．ａｎｄ　Ｗｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ　１９９４）に記載されている方法である。本発明は、本明細書中に記載されているような核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。
【００９４】
Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子が１つの種から同定された場合には、この遺伝子の全てまたは一部を、オルソログ（ｏｒｔｈｏｌｏｇ）または同じ種由来の関連遺伝子を同定するためのプローブとして使用し得る。このプローブまたはプライマーを使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドを発現すると考えられる種々の組織供給源由来のｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングし得る。さらに、配列番号１に記載されるような配列を有する核酸分子の部分または全てを使用して、ゲノムライブラリーをスクリーニングし、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定および単離し得る。代表的に、中程度または高度のストリンジェンシーの条件が、スクリーニングのために使用されて、このスクリーニングから得られる偽陽性の数を最少にする。
【００９５】

Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子はまた、発現されたタンパク質の特性に基づく陽性クローンの検出を使用する発現クローニングによって、同定され得る。代表的に、核酸ライブラリーは、抗体または他の結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）を、宿主細胞表面において発現および提示されたクローニングされたタンパク質に結合させることによって、スクリーニングされる。抗体または結合パートナーは、所望のクローンを発現する細胞を同定するために、検出可能な標識で改変される。

【００９６】

以下に記載される説明に従い実施される組換え発現技術に従って、これらのポリヌクレオチドを産生し得、そしてコードされたポリペプチドを発現させ得る。例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸配列を適切なベクターに挿入することによって、当業者は、多量の所望されるヌクレオチド配列を容易に生成し得る。次いで、これらの配列を使用して、検出プローブまたは増幅プライマーを生成し得る。あるいは、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを、発現ベクターに挿入し得る。発現ベクターを適切な宿主に導入することによって、コードされたＢ７－Ｌポリペプチドが、多量に生成され得る。

【００９７】

適切な核酸配列を得るための別の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）である。この方法において、ｃＤＮＡは、酵素逆転写酵素を使用して、ポリ（Ａ）＋ＲＮＡまたは全ＲＮＡから調製される。次いで、２つのプライマー（代表的には、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードするｃＤＮＡの２つの別個の領域に対して相補的である）が、ＴａｑポリメラーゼのようなポリメラーゼとともにこのｃＤＮＡに添加され、そしてこのポリメラーゼが、これら２つのプライマー間のｃＤＮＡ領域を増幅する。

【００９８】

Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を調製する別の手段は、Ｅｎｇｅｌｓら、１９８９，Ａｎｇｅｗ．Ｃｈｅｍ．Ｉｎｔｌ．第２８版：７１６－３４によって記載されるような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのホスホトリエステル、ホスホルアミダイト、およびＨ－ホスホネート方法が挙げられる。このような化学合成のために好ましい方法は、標準的なホスホルアミダイト化学を使用する、ポリマーにより支持される合成である。代表的に、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードするＤＮＡは、数百ヌクレオチド長である。約１００ヌクレオチドより長い核酸は、これらの方法を使用して、いくつかのフラグメントとして合成され得る。次いで、これらのフラグメントが一緒に連結されて、Ｂ７－Ｌ遺伝子の全長ヌクレオチド配列を形成し得る。通常、このポリペプチドのアミノ末端をコードするＤＮＡフラグメントは、ＡＴＧ（これは、メチオニン残基をコードする）を有する。このメチオニンは、宿主細胞において産生されるポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計されているか否かに依存して、Ｂ７－Ｌポリペプチドの成熟形態で存在してもそうでなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【００９９】

特定の実施形態において、核酸改変体は、所定の宿主細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチドの最適な発現のために変更されたコドンを含む。特定のコドン変更は、発現のために選択されるＢ７－Ｌポリペプチドおよび宿主細胞に依存する。このような「コドン最適化」は、種々の方法によって（例えば、所定の宿主細胞において高度に発現される遺伝子において使用されるのに好ましいコドンを選択することによって）実施され得る。高度に発現された細菌遺伝子のコドン優先度（ｃｏｄｏｎ　ｐｒｅｆｅｒｅｎｃｅ）についての「Ｅｃｏ＿ｈｉｇｈ．Ｃｏｄ」のようなコドン頻度表を組み込むコンピューターアルゴリズムが使用され得、そしてＵｎｉｖｅｒｓｉｔｙ　ｏｆ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅ　Ｖｅｒｓｉｏｎ　９．０（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ　Ｃｏｍｐｕｔｅｒ　Ｇｒｏｕｐ，Ｍａｄｉｓｏｎ，ＷＩ）によって提供される。他の有用なコドン頻度表としては、「Ｃｅｌｅｇａｎｓ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、「Ｃｅｌｅｇａｎｓ＿ｌｏｗ．ｃｏｄ」、「Ｄｒｏｓｏｐｈｉｌａ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、「Ｈｕｍａｎ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ」、「Ｍａｉｚｅ＿ｈ

ｉｇｈ．ｃｏｄ」、および「Ｙｅａｓｔ＿ｈｉｇｈ．ｃｏｄ．」が挙げられる。

【０１００】

いくつかの場合において、Ｂ７－Ｌポリペプチド改変体をコードする核酸分子を調製することが所望され得る。改変体をコードする核酸分子は、プライマーが所望の点変異を有する部位特異的変異誘発、ＰＣＲ増幅、または他の適切な方法を使用して生成され得る（変異誘発技術の説明に関しては、Ｓａｍｂｒｏｏｋら、前出、およびＡｕｓｕｂｅｌら、前出を参照のこと）。Ｅｎｇｅｌｓら、前出によって記載される方法を使用する化学合成もまた、このような改変体を調製するために使用され得る。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

【０１０１】

（ベクターおよび宿主細胞）

Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子を、標準的な連結技術を使用して適切な発現ベクターに挿入する。ベクターは、代表的に、使用される特定の宿主細胞において機能的であるように選択される（すなわち、ベクターは、遺伝子の増幅および／または遺伝子の発現が生じ得るように、宿主細胞機構と適合性である）。Ｂ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列をコードする核酸分子は、原核生物宿主細胞、酵母宿主細胞、昆虫（バキュロウイルス系）宿主細胞および／または真核生物宿主細胞において増幅／発現され得る。宿主細胞の選択は、Ｂ７－Ｌポリペプチドが翻訳後修飾（例えば、グリコシル化および／またはリン酸化）されるか否かに一部依存する。その場合、酵母宿主細胞、昆虫宿主細胞、または哺乳動物宿主細胞が好ましい。発現ベクターの総説については、Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．，第１８５巻（Ｄ．Ｖ．Ｇｏｅｄｄｅｌ編，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ　１９９０）を参照のこと。

【０１０２】

代表的に、任意の宿主細胞に使用される発現ベクターは、プラスミド維持のための配列ならびに外来性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」という）は、特定の実施形態において、代表的に、以下のヌクレオチド配列の１つ以上を含む：プロモーター、１つ以上のエンハンサー配列、複製起点、転写終結配列、ドナーおよびアクセプタースプライス部位を含む完全なイントロン配列、ポリペプチド分泌のためのリーダー配列をコードする配列、リボソーム結合部位、ポリアデニル化配列、発現されるポリペプチドをコードする核酸を挿入するためのポリリンカー領域、ならびに選択可能マーカーエレメント。これらの配列のそれぞれが、以下に議論される。

【０１０３】

必要に応じて、ベクターは、「タグ」コード配列（すなわち、Ｂ７－Ｌポリペプチドコード配列の５’末端または３’末端に配置されるオリゴヌクレオチド分子）を含み得；このオリゴヌクレオチド配列は、ポリＨｉｓ（例えば、ヘキサＨｉｓ）、または別の「タグ」（例えば、ＦＬＡＧ、ＨＡ（赤血球凝集素インフルエンザウイルス）またはｍｙｃ（これに対して、市販の抗体が存在する）をコードする。このタグは、代表的には、ポリペプチドの発現の際にポリペプチドに融合され、宿主細胞からの、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアフィニティー精製のための手段として役立ち得る。アフィニティー精製は、例えば、アフィニティーマトリクスとして、タグに対する抗体を使用するカラムクロマトグラフィーによって達成され得る。必要に応じて、タグは、引き続いて、切断のために特定のペプチダーゼを使用するような、種々の手段によって、精製されたＢ７－Ｌポリペプチドから除去され得る。

【０１０４】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または株由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または株以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、１つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、Ｂ７－Ｌポリペプチド発現を調節するために通常機能するネイティブな配列であり得る。従って、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または

真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、または任意の植物であり得るが、但し、隣接配列は、この宿主細胞の機構において機能的であり、そしてこの宿主細胞の機構によって活性化され得る。

【０１０５】

本発明のベクターに有用な隣接配列は、当該分野において周知である任意のいくつかの方法によって得られ得る。代表的には、Ｂ７－Ｌ遺伝子の隣接配列以外の、本発明で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、隣接配列は、核酸合成またはクローニングのために本明細書中で記載される方法を使用して合成され得る。

【０１０６】

隣接配列の全てまたは一部のみが既知である場合、これは、ＰＣＲを使用して、ならびに／あるいは適切なオリゴヌクレオチドおよび／または同種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知ではない場合、隣接配列を含むＤＮＡのフラグメントは、例えば、コード配列または別の遺伝子さえも含み得る大きなＤＮＡ片から単離され得る。単離は、適切なＤＮＡフラグメントを生成するための制限エンドヌクレアーゼ消化、続くアガロースゲル精製を使用する単離、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）カラムクロマトグラフィー（Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ、ＣＡ）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

【０１０７】

複製起点は、代表的に、市販の原核生物発現ベクターの一部であり、この起点は、宿主細胞におけるベクターの増幅を補助する。特定のコピー数までのベクターの増幅は、いくつかの場合において、Ｂ７－Ｌポリペプチドの最適な発現のために重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、複製起点は、既知の配列に基づいて化学的に合成され得、そしてベクターに連結され得る。例えば、プラスミドｐＢＲ３２２（Ｎｅｗ　Ｅｎｇｌａｎｄ　Ｂｉｏｌａｂｓ，Ｂｅｖｅｒｌｙ，ＭＡ）からの複製起点は、大部分のグラム陰性細菌に適切であり、そして種々の起源（例えば、ＳＶ４０、ポリオーマ、アデノウイルス、水疱性口内炎ウイルス（ＶＳＶ）、またはＨＰＶもしくはＢＰＶのようなパピローマウイルス）は、哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターには必要ない（例えば、ＳＶ４０起源は、それが初期プロモーターを含むという理由のみによって、しばしば使用されている）。

【０１０８】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の３’末端に配置され、そして転写を終結させるのに役立つ。通常、原核生物細胞における転写終結配列は、Ｇ－Ｃリッチフラグメントと、それに続くポリＴ配列である。この配列はライブラリーから容易にクローン化されるか、またはさらにベクターの一部として市販されているが、これはまた、本明細書中に記載された核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

【０１０９】

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

【０１１０】

他の選択遺伝子は、発現される遺伝子を増幅するために使用され得る。増幅は、増殖に重要なタンパク質の産生のために大いに要求されている遺伝子が、組換え細胞の継続世代の染色体内でタンデムに反復されているプロセスである。哺乳動物細胞に対する適切な選択マーカーの例としては、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）およびチミジンキナーゼが挙げられる。哺乳動物細胞の形質転換体は、選択圧下に置かれ、ここで、形質転換体のみが固有に、ベクターに存在する選択遺伝子によって生存するように適応される。培地中の選択因子の濃度を連続的に変化させ、それによって選択遺伝子とＢ７－ＬポリペプチドをコードするＤＮＡとの両方の増幅を導く条件下で、形質転換された細胞を培養することによって、選択圧を加える。結果として、増加した量のＢ７－Ｌポリペプチドが、増幅されたＤＮＡから合成される。

【０１１１】

リボソーム結合部位は、通常、ｍＲＮＡの翻訳開始に必要であり、そしてＳｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列（原核性物）またはＫｏｚａｋ配列（真核生物）によって特徴付けられる。このエレメントは、代表的に、発現されるＢ７－Ｌポリペプチドのプロモーターに対して３’側およびコード配列に対して５’側に配置される。Ｓｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列は、可変であるが、代表的には、ポリプリン（すなわち、高いＡ－Ｇ含有量を有する）である。多くのＳｈｉｎｅ－Ｄａｌｇａｒｎｏ配列は、同定されており、これらのそれぞれが、本明細書中に記載の方法を使用して、容易に合成され得、原核生物ベクターにおいて使用され得る。

【０１１２】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞の外にＢ７－Ｌポリペプチドを指向させるために使用され得る。代表的には、シグナル配列をコードするヌクレオチド配列は、Ｂ７－Ｌ核酸分子のコード領域に位置するか、または直接Ｂ７－Ｌポリペプチドコード領域の５’側に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、選択された宿主細胞において機能的である任意のシグナル配列が、Ｂ７－Ｌ核酸分子と組み合わせて使用され得る。従って、シグナル配列は、Ｂ７－Ｌ核酸分子に対して同種（天然に存在する）または異種であり得る。さらに、シグナル配列は、本明細書中に記載される方法を使用して化学的に合成され得る。大半の場合、シグナルペプチドの存在による宿主細胞からのＢ７－Ｌポリペプチドの分泌は、分泌されたＢ７－Ｌポリペプチドからのシグナルペプチドの除去を生じる。シグナル配列は、ベクターの成分であり得るか、またはベクターに挿入されたＢ７－Ｌ核酸分子の一部であり得る。

【０１１３】

Ｂ７－Ｌポリペプチドコード領域に結合されたネイティブなＢ７－Ｌポリペプチドシグナル配列をコードするヌクレオチド配列、または、Ｂ７－Ｌポリペプチドコード領域に結合された異種シグナル配列をコードするヌクレオチド配列のいずれかの使用は本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、プロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものであるべきである。ネイティブなＢ７－Ｌポリペプチドシグナル配列を認識せず、そしてプロセスもしない原核生物宿主細胞について、シグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、または熱安定エンテロトキシンＩＩリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、ネイティブなＢ７－Ｌポリペプチドシグナル配列は、酵母インベルターゼ、α因子、または酸ホスファターゼリーダーによって置換され得る。哺乳動物細胞発現において、ネイティブなシグナル配列で十分であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

【０１１４】

真核生物宿主細胞発現系においてグリコシル化が所望されるような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のプレ配列（ｐｒｅｓｅｑｕｅｎｃｅ）が操作され得る。例えば、特定のシグナルペプチドのペプチダーゼ切断部位を変更し得るかまたはプロ配列（ｐｒｏ－ｓｅｑｕｅｎｃｅ）を加え得、これはまた、グリコシル化に影響し得る。最終タンパク質産物は、（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）

１位に、発現に付随する１つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全には除去されない可能性がある。例えば、最終のタンパク質産物は、アミノ末端に結合される、ペプチダーゼ切断部位において見出される１つまたは２つのアミノ酸残基を有し得る。あるいは、いくつかの酵素切断部位の使用は、酵素が成熟ポリペプチド内のこのような領域で切断する場合に所望のＢ７－Ｌポリペプチドのわずかに短縮された（ｔｒｕｎｃａｔｅ）形態を生じ得る。

【０１１５】

多くの場合において、核酸分子の転写は、ベクター内の１つ以上のイントロンの存在によって増加する；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合に特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合にＢ７－Ｌ遺伝子内に天然に存在するものであり得る。イントロンが遺伝子内に天然に存在しない場合（大部分のｃＤＮＡについて）、イントロンは、別の供給源から得られ得る。隣接配列およびＢ７－Ｌ遺伝子に対してイントロンの位置は、イントロンが有効に転写されなければならないので、一般的に重要である。従って、Ｂ７－Ｌ　ｃＤＮＡ分子が転写される場合、イントロンの好ましい位置は、転写開始部位に対して３’側であり、かつポリ－Ａ転写終止配列に対して５’側である。好ましくは、イントロン（単数または複数）は、コード配列を妨害しないように、ｃＤＮＡの１方の側または他方の側（すなわち、５’側または３’側）に配置される。任意の供給源（ウイルス、原核生物および真核生物（植物または動物）を含む）由来の任意のイントロンを使用して本発明を実行し得るが、但し、このイントロンは、挿入される宿主細胞に適合性である。合成イントロンもまたここに含まれる。必要に応じて、１つより多くのイントロンがベクター内で使用され得る。

【０１１６】

本発明の発現ベクターおよびクローニングベクターは、代表的には、宿主生物によって認識され、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする分子に作動可能に連結されたプロモーターを含む。プロモーターは、構造遺伝子の転写を制御する、構造遺伝子（一般的に、約１００～１０００ｂｐ）の開始コドンに対して上流（すなわち、５’側）に配置される非転写配列である。プロモーターは、従来、２つのクラス（誘導プロモーターおよび構成プロモーター）のうち１つに分類される。誘導プロモーターは、培養条件におけるいくつかの変化（例えば、栄養の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応じてそれらの制御下で、ＤＮＡからの増加したレベルの転写を開始する。他方、構成プロモーターは、連続的な遺伝子産物の産生を開始する；すなわち、遺伝子発現は、ほとんど制御されないかまたは全く制御されない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のＤＮＡからプロモーターを制限酵素消化によって除去し、そして所望のプロモーター配列をベクターに挿入することによって、Ｂ７－ＬポリペプチドをコードするｃＤＮＡに作動可能に連結される。ネイティブなＢ７－Ｌプロモーター配列は、Ｂ７－Ｌ核酸分子の増幅および／または発現に指向させるために使用され得る。しかし、ネイティブなプロモーターと比較して高度に転写および発現されたタンパク質のより高い収量が可能である場合、および使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

【０１１７】

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

【０１１８】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターはまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、酵母プロモーターと共に有利に使用される。哺乳動物宿主細胞との使用に適

切なプロモーターは周知であり、限定しないが、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Ａｄｅｎｏｖｉｒｕｓ２）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、Ｂ型肝炎ウイルスおよび最も好ましくはシミアンウイルス４０（ＳＶ４０）のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーターが挙げられる。他の適切な哺乳動物プロモーターとしては、異種哺乳動物プロモーター（例えば、熱ショックプロモーターおよびアクチンプロモーター）が挙げられる。

【０１１９】

Ｂ７－Ｌ遺伝子発現を制御する際に重要であり得るさらなるプロモーターとしては、限定しないが、以下が挙げられる：ＳＶ４０初期プロモータ領域（Ｂｅｒｎｏｉｓｔ ａｎｄ Ｃｈａｍｂｏｎ，１９８１，Ｎａｔｕｒｅ ２９０：３０４－１０）；ＣＭＶプロモーター；ラウス肉腫ウイルスの３’側の長い末端反復に含まれるプロモーター（Ｙａｍａｍｏｔｏら，１９８０，Ｃｅｌｌ ２２ ：７８７－９７）；ヘルペスチミジンキナーゼプロモーター（Ｗａｇｎｅｒら，１９８１，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．７８：１４４４－４５）；メタロチオネイン遺伝子の調節配列（Ｂｒｉｎｓｔｅｒら，１９８２，Ｎａｔｕｒｅ ２９６：３９－４２）；β－ラクタマーゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Ｖｉｌｌａ－Ｋａｍａｒｏｆｆら，１９７８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，７５：３７２７－３１）；またはｔａｃプロモーター（ＤｅＢｏｅｒら，１９８３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．，８０：２１－２５）。組織特異性を示し、そしてトランスジェニック動物において利用されている、以下の動物転写制御領域もまた重要である：膵臓腺房細胞において活性なエラスターゼＩ遺伝子制御領域（Ｓｗｉｆｔら，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６３９－４６；Ｏｒｎｉｔｚら，１９８６，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５０：３９９－４０９（１９８６）；ＭａｃＤｏｎａｌｄ，１９８７，Ｈｅｐａｔｏｌｏｇｙ ７：４２５－５１５）；膵臓β細胞において活性なインシュリン遺伝子制御領域（Ｈａｎａｈａｎ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：１１５－２２）；リンパ系細胞において活性な免疫グロブリン遺伝子制御領域（Ｇｒｏｓｓｃｈｅｄｌら，１９８４，Ｃｅｌｌ ３８：６４７－５８；Ａｄａｍｅｓら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１８：５３３－３８；Ａｌｅｘａｎｄｅｒら，１９８７，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，７：１４３６－４４）；精巣、乳房、リンパ系細胞、および肥満細胞において活性なマウス乳房腫瘍ウイルス制御領域（Ｌｅｄｅｒら，１９８６，Ｃｅｌｌ ４５：４８５－９５）；肝臓において活性なアルブミン遺伝子制御領域（Ｐｉｎｋｅｒｔら，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：２６８－７６）；肝臓において活性なα－フェトプロテイン遺伝子制御領域（Ｋｒｕｍｌａｕｆら，１９８５，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．，５：１６３９－４８；Ｈａｍｍｅｒら，１９８７，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３５：５３－５８）；肝臓において活性なα１－抗トリプシン遺伝子制御領域（Ｋｅｌｓｅｙら，１９８７，Ｇｅｎｅｓ ａｎｄ Ｄｅｖｅｌ．１：１６１－７１）；骨髄性細胞において活性なβ－グロビン遺伝子制御領域（Ｍｏｇｒａｍら，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１５：３３８－４０；Ｋｏｌｌｉａｓら，１９８６，Ｃｅｌｌ ４６：８９－９４）；脳の稀突起神経膠細胞において活性なミエリン塩基性タンパク質遺伝子制御領域（Ｒｅａｄｈｅａｄら，１９８７，Ｃｅｌｌ ４８：７０３－１２）；骨格筋において活性なミオシン軽鎖－２遺伝子制御領域（Ｓａｎｉ，１９８５，Ｎａｔｕｒｅ ３１４：２８３－８６）；ならびに視床下部において活性なゴナドトロピン放出ホルモン遺伝子制御領域（Ｍａｓｏｎら，１９８６，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：１３７２－７８）。

【０１２０】

エンハンサー配列は、より高等な真核生物によって本発明のＢ７－ＬポリペプチドをコードするＤＮＡの転写を増加するように、ベクターに挿入され得る。エンハンサーは、転写を増加させるようにプロモーターに作用する、通常約１０～３００ｂｐの長さのＤＮＡのシス作用エレメントである。エンハンサーは、相対的な方向および位置に依存しない。これらは、転写ユニットに対して５’側および３’側に見出される。哺乳動物遺伝子から入手可能ないくつかのエンハンサー配列が公知である（例えば、グロビン、エラスターゼ、

アルブミン、α－フェトプロテインおよびインシュリン）。しかし、代表的には、ウイルス由来のエンハンサーが、使用される。ＳＶ４０エンハンサー、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、ポリオーマエンハンサー、およびアデノウイルスエンハンサーは、真核生物プロモーターの活性化についての代表的な増強エレメントである。エンハンサーは、Ｂ７－Ｌ核酸分子に対して５’位または３’位でベクターにスプライシングされ得るが、代表的には、プロモーターから５’位側に配置される。

【０１２１】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような開始ベクターから構築され得る。このようなベクターは、全ての所望な隣接配列を含んでも良いし、含まなくても良い。本明細書中に記載される隣接配列の１つ以上がまだベクター内にない場合、これらは、個々に得られ得、ベクターに連結され得る。隣接配列のそれぞれを得るために使用される方法は、当業者に周知である。

【０１２２】

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

【０１２３】

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

【０１２４】

ベクターが構築され、そしてＢ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸分子がベクターの適切な部位に挿入された後に、完全なベクターが増幅発現および／またはポリペプチド発現に適切な宿主細胞に挿入され得る。選択された宿主細胞への、Ｂ７－Ｌポリペプチドに対する発現ベクターの形質転換は、トランスフェクション、感染、塩化カルシウム、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、リポフェクション、ＤＥＡＥ－デキストラン法、または他の公知の技術のような方法を含む周知の方法によって達成され得る。選択される方法は、一部、使用される宿主細胞の種類と相関関係にある。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、例えば、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に記載される。

【０１２５】

宿主細胞は、原核生物宿主細胞（例えば、Ｅ．ｃｏｌｉ）または真核生物宿主細胞（例えば、酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞）であり得る。宿主細胞は、適切な条件下で培養される場合、Ｂ７－Ｌポリペプチドを合成し、このポリペプチドは、続いて、培養培地から（宿主細胞がそのポリペプチドを培地に分泌する場合）収集され得るか、直接そのポリペプチドを産生する宿主細胞から収集される（そのポリペプチドが分泌されない場合）。適切な宿主細胞の選択は、所望の発現レベル、活性に望ましいかまたは必要なポリ

ペプチド修飾（例えば、グリコシル化またはリン酸化）、および生物学的に活性な分子に折り畳まれる容易さなどの種々の因子に依存する。

【０１２６】

多くの適切な宿主細胞が当該分野において公知であり、多くが、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ），Ｍａｎａｓｓａｓ，ＶＡから入手可能である。例としては、限定しないが、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）、ＣＨＯ ＤＨＦＲ（－）細胞（Ｕｒｌａｕｂら，１９８０，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９７：４２１６－２０）、ヒト胚性腎臓（ＨＥＫ）２９３または２９３Ｔ細胞、あるいは３Ｔ３細胞のような哺乳動物細胞が挙げられる。適切な哺乳動物宿主細胞の選択および形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物生成、および精製のための方法が当該分野において公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルＣＯＳ－１およびＣＯＳ－７細胞株、およびＣＶ－１細胞株である。さらなる例示的な哺乳動物宿主細胞としては、霊長動物細胞株およびゲッ歯類動物細胞株（形質転換細胞株を含む）が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養物から誘導される細胞系統、ならびに初代外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子を遺伝子型的に欠損し得るか、または優先的に作用する選択遺伝子を含み得る。他の適切な哺乳動物細胞株としては、限定しないが、マウス神経芽細胞腫Ｎ２Ａ細胞、ＨｅＬａ、マウスＬ－９２９細胞、Ｓｗｉｓｓから誘導された３Ｔ３株、Ｂａｌｂ－ｃまたはＮＩＨマウス、ＢＨＫまたはＨａｋハムスター細胞株が挙げられる。これらの細胞株のそれぞれは、タンパク質発現の当業者に公知であり入手可能である。

【０１２７】

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

【０１２８】

当業者に公知の酵母細胞の多くの株はまた、本発明のポリペプチドの発現のため宿主細胞として入手可能である。好ましい酵母細胞としては、例えば、Ｓａｃｃｈａｒｏｍｙｃｅｓ ｃｅｒｉｖｉｓａｅおよびＰｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓが挙げられる。

【０１２９】

さらに、望ましい場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Ｋｉｔｔｓら，１９９３，Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，１４：８１０－１７；Ｌｕｃｋｌｏｗ，１９９３，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．４：５６４－７２；およびＬｕｃｋｌｏｗら，１９９３，Ｊ．Ｖｉｒｏｌ．，６７：４５６６－７９に記載される。好ましい昆虫細胞は、Ｓｆ－９およびＨｉ５（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）である。

【０１３０】

グリコシル化Ｂ７－Ｌポリペプチドを発現するためにトランスジェニック動物もまた使用し得る。例えば、トランスジェニック乳産生動物（例えば、雌ウシまたはヤギ）を使用し、本発明のグルコシル化ポリペプチドを動物の乳に得ることができる。Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生するために植物もまた使用し得るが、しかし、一般的に、植物において生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞において産生されるものとは異なり、ヒト治療用途に適切ではないグリコシル化産物を生じ得る。

【０１３１】

（ポリペプチド産生）

Ｂ７－Ｌポリペプチド発現ベクターを含む宿主細胞は、当業者に周知の標準的な培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、細胞の増殖および生存に必要な全ての栄養分を含む。Ｅ．ｃｏｌｉ細胞を培養するための適切な培地としては、例えば、Ｌｕｒｉａ Ｂｒｏｔｈ（ＬＢ）および／またはＴｅｒｒｉｆｉｃ Ｂｒｏｔｈ（ＴＢ）が挙げられる。

真核生物細胞を培養するための適切な培地としては、Ｒｏｓｗｅｌｌ Ｐａｒｋ Ｍｅｍｏｒｉａｌ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｍｅｄｉｕｍ １６４０（ＲＰＭＩ １６４０）、Ｍｉｎｉｍａｌ Ｅｓｓｅｎｔｉａｌ Ｍｅｄｉｕｍ（ＭＥＭ）および／またはＤｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ Ｍｏｄｉｆｉｅｄ Ｅａｇｌｅ Ｍｅｄｉｕｍ（ＤＭＥＭ）が挙げられ、これらの全ては、培養される特定の細胞株に必要な血清および／または増殖因子を補充され得る。昆虫細胞についての適切な培地は、必要に応じて、イーストレート（ｙｅａｓｔｏｌａｔｅ）、ラクトアルブミン加水分解産物、および／または胎仔ウシ血清を補充したグレース培地である。

【０１３２】

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

【０１３３】

宿主細胞によって産生されるＢ７－Ｌポリペプチドの量は、当該分野において公知の標準的な方法を使用して評価され得る。このような方法としては、限定しないが、ウェスタンブロット分析、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動、非変性ゲル電気泳動、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）分離、免疫沈降、および／またはＤＮＡ結合ゲルシフトアッセイのような活性アッセイが挙げられる。

【０１３４】

Ｂ７－Ｌポリペプチドが宿主細胞から分泌されるように設計された場合、ポリペプチドの大部分は、細胞培養培地中で見出され得る。しかし、Ｂ７－Ｌポリペプチドが宿主細胞から分泌されない場合、細胞質および／または核（真核宿主細胞について）に存在するか、あるいは、細胞質ゾル（グラム陰性細菌宿主細胞について）に存在する。

【０１３５】

宿主細胞細胞質および／または核（真核生物宿主細胞について）に位置するかまたは細胞質ゾル（細菌宿主細胞について）に位置するＢ７－Ｌポリペプチドについて、細胞内物質（グラム陰性細菌についての封入体を含む）は、当業者に公知の任意の標準的な技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、均質化、および／または超音波処理、続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の含有物を放出するように溶解され得る。

【０１３６】

Ｂ７－Ｌポリペプチドが細胞質ゾル内に封入体を形成した場合、この封入体は、しばしば、内部および／または外部細胞膜に結合し得、従って、主に、遠心分離後にペレット材料において見出される。次いで、ペレット材料は、ｐＨ極限値で処理され得るか、あるいはジチオトレイトールのような還元剤の存在下アルカリ性のｐＨで、またはトリスカルボキシエチルホスフィンの存在下酸性のｐＨで、界面活性剤、グアニジン、グアニジン誘導体、尿素、または尿素誘導体のようなカオトロピック剤で処理されて、封入体を放出し、分断し、そして溶解し得る。次いで、溶解されたＢ７－Ｌポリペプチドは、ゲル電気泳動、免疫沈降などを使用して分析され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドを単離することが望ましい場合、単離は、本明細書中およびＭａｒｓｔｏｎら，１９９０，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．，１８２：２６４－７５に記載される方法のような標準的な方法を使用して達成され得る。

【０１３７】

いくつかの場合、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、単離の際、生物学的に活性でなくても良い。「再折り畳みする」、つまり、ポリペプチドをその三次構造に変換し、ジスルフィド連結を生成するための種々の方法を使用して、生物学的活性を回複し得る。このような方法は、溶解されたポリペプチドをあるｐＨ（通常７より上）および特定の濃度のカオトロピック剤（ｃｈａｏｔｒｏｐｅ）の存在下に曝露する工程を包含する。カオトロピック剤の選

択は、封入体溶解に使用される選択肢に非常に類似するが、通常、カオトロピック剤は低い濃度で使用され、溶解に使用されるカオトロピック剤と必ずしも同一ではない。多くの場合、再折り畳み／酸化溶液はまた、還元剤、または特定の比の還元剤およびその酸化形態を含んで、タンパク質のシステイン架橋の形成を生じるジスルフィドシャフリングを可能にする特定の酸化還元電位を生じる。通常使用される酸化還元対のいくつかとしては、システイン／シスタミン、グルタチオン（ＧＳＨ）／ジチオビスＧＳＨ、塩化銅（ＩＩ）、ジチオトレイトール（ＤＴＴ）／ジチアンＤＴＴ、および２，２－メルカプトエタノール（ｂＭＥ）／ジチオ－ｂ（ＭＥ）が挙げられる。多くの場合において、共溶媒が使用され得るか、または再折り畳みの効率を増加するのに必要であり得、この目的のために使用されるより一般的な試薬としては、グリセロール、種々の分子量のポリエチレングリコール、アルギニンなどが挙げられる。

【０１３８】

封入体がＢ７－Ｌポリペプチドの発現において有意な程度まで形成されない場合、ポリペプチドは、主に、細胞ホモジネートの遠心分離後に上清中に見出される。ポリペプチドは、さらに、本明細書中に記載されるような方法を使用して上清から単離され得る。

【０１３９】

溶液からのＢ７－Ｌポリペプチドの精製は、種々の技術を使用して達成され得る。ポリペプチドが、ヘキサヒスチジン（Ｂ７－Ｌポリペプチド／ｈｅｘａＨｉｓ）のようなタグまたは他の小さなペプチド（例えば、ＦＬＡＧ（Ｅａｓｔｍａｎ Ｋｏｄａｋ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｈａｖｅｎ，ＣＴ）またはｍｙｃ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ））をそのカルボキシ末端またはアミノ末端のいずれかにおいて含むように合成された場合、カラムマトリクスがタグについて高い親和性を有するアフィニティーカラムに溶液を通すことによって一工程で精製され得る。

【０１４０】

例えば、ポリヒスチジンは、ニッケルに対して大きな親和性および特異性で結合する。従って、ニッケルのアフィニティーカラム（例えば、Ｑｉａｇｅｎ（登録商標）ニッケルカラム）は、Ｂ７－Ｌポリペプチド／ポリＨｉｓの精製のために使用され得る。例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ § １０．１１．８（Ａｕｓｕｂｅｌら編，Ｇｒｅｅｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｉｎｃ．ａｎｄ Ｗｉｌｅｙ ａｎｄ Ｓｏｎｓ １９９３）を参照のこと。

【０１４１】

さらに、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、Ｂ７－Ｌポリペプチドを特異的に認識し得、そして結合し得るモノクローナル抗体の使用によって精製され得る。

【０１４２】

精製のための他の適切な手段はとしては、限定しないが、アフィニティークロマトグラフィー、免疫親和性クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、モレキュラーシーブクロマトグラフィー、ＨＰＬＣ、電気泳動（ネイティブゲル電気泳動を含む）、続くゲル溶出、および分取用等電集束法（「Ｉｓｏｐｒｉｍｅ」ｍａｃｈｉｎｅ／ｔｅｃｈｎｉｑｕｅ，Ｈｏｅｆｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ，ＣＡ）が挙げられる。いくつかの場合において、２つ以上の精製技術が、増加した純度を達成するために組み合わせられ得る。

【０１４３】

Ｂ７－Ｌポリペプチドはまた、Ｍｅｒｒｉｆｉｅｌｄら，１９６３，Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．８５：２１４９；Ｈｏｕｇｈｔｅｎら，１９８５，Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：５１３２；およびＳｔｅｗａｒｔ ａｎｄ Ｙｏｕｎｇ，Ｓｏｌｉｄ Ｐｈａｓｅ Ｐｅｐｔｉｄｅ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ．１９８４）に記載されるような当該分野で公知の技術を使用する、化学合成法（例えば、固相ペプチド合成）によって調製され得る。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを有するかまたは有さないで合成され得る。化学的に合成されたＢ７－Ｌポリペプチドは、これらの参考文献に記載される方法を使用して酸化され得

て、ジスルフィド架橋を形成し得る。化学的に合成されたＢ７－Ｌポリペプチドは、組換え的に産生されるかまたは天然の供給源から精製される対応するＢ７－Ｌポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると期待され、従って、組換えまたは天然のＢ７－Ｌポリペプチドと相互交換可能に使用され得る。

【０１４４】

Ｂ７－Ｌポリペプチドを得る別の手段は、Ｂ７－Ｌポリペプチドが天然に見出される供給源の組織および／または流体のような生物学的サンプルからの精製による。このような精製は、本明細書中に記載されるようなタンパク質精製のための方法を使用して行われ得る。精製の間、Ｂ７－Ｌポリペプチドの存在が、例えば、組換え的に産生されたＢ７－Ｌポリペプチドまたはそのペプチドフラグメントに対して調製される抗体を使用してモニターされ得る。

【０１４５】

核酸およびポリペプチドを産生するための多くのさらなる方法は、当該分野において公知であり、この方法は、Ｂ７－Ｌポリペプチドに対して特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、Ｒｏｂｅｒｔｓら，１９９７，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９４：１２２９７－３０３を参照のこと。これは、ｍＲＮＡとそのコードされるペプチドとの間の融合タンパク質の産生を記載する。Ｒｏｂｅｒｔｓ，１９９９，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｃｈｅｍ．Ｂｉｏｌ　３：２６８－７３もまた参照のこと。さらに、米国特許第５，８２４，４６９号は、特定の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドを得るための方法を記載する。この手順は、異種プールのオリゴヌクレオチドを生成する工程を包含し、それぞれが、５’無作為化配列、中心予備選択配列、および３’無作為化配列を有する。得られる異種プールは、所望の生物学的活性を示さない細胞の集団に導入される。次いで、細胞の亜集団を、所定の生物学的機能を示すものについてスクリーニングする。その亜集団から、所望の生物学的機能を実行し得るオリゴヌクレオチドが単離される。

【０１４６】

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

【０１４７】

ペプチドまたはポリペプチドの産生するための別の方法は、Ａｔｈｅｒｓｙｓ，Ｉｎｃ．によって出願されたＰＣＴ／ＵＳ９８／２００９４（ＷＯ９９／１５６５０）に記載される。（「Ｒａｎｄｏｍ　Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ　ｏｆ　Ｇｅｎｅ　Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｇｅｎｅ　Ｄｉｓｃｏｖｅｒｙ」（ＲＡＧＥ－ＧＤ）として知られている、このプロセスは、インサイチュ組換え方法によって、内因性遺伝子の発現または遺伝子の過剰発現の活性化を含む。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同性組換えまたは異常な組換えによって、遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞中に、調節配列を組み込むことによって、活性化または増加される。この標的ＤＮＡは、まず、放射線に供せられ、そして遺伝子プロモーターに挿入される。このプロモーターは、遺伝子の前方にブレイクを配置し、遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドまたはポリペプチドの発現を生じる。

【０１４８】

これらの方法はまた、包括的なＢ７－Ｌポリペプチド発現ライブラリーを作製するために使用され得、このライブラリーは、続いて、種々のアッセイ（例えば、生化学的アッセイ、細胞アッセイおよび生物全体のアッセイ（例えば、植物、マウスなど））において、ハイスループット表現型スクリーニングのために使用され得ることが理解される。

【０１４９】
（合成）
本明細書中に記載される核酸およびポリペプチド分子は、組換えおよび他の手段によって産生され得ることは、当業者によって理解される。
【０１５０】
（選択的結合アッセイ）
用語「選択的結合因子」は、１以上のＢ７－Ｌポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。適切な選択的結合因子としては、抗体およびその誘導体、ポリペプチド、ならびに低分子が挙げられるが、これらに限定されない。適切な選択的結合因子は、当該分野で公知の方法を使用して調製され得る。本発明の例示的なＢ７－Ｌポリペプチド選択的結合因子は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの特定の部分を結合し得、これにより、このポリペプチドのＢ７－Ｌポリペプチドレセプターへの結合を阻害する。
【０１５１】
Ｂ７－Ｌポリペプチドと結合する抗体および抗体フラグメントのような選択的結合因子は、本発明の範囲内である。この抗体は、単一特異的なポリクローナルを含むポリクローナル；モノクローナル（ＭＡｂ）；組換え；キメラ；ヒト化（例えば、相補性決定領域（ＣＤＲ）移植化）；ヒト；単鎖；および／または二特異的；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、Ｂ７－Ｌポリペプチド上のエピトープに結合する抗体のこれらの一部を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素学的切断によって産生されたＦａｂおよびＦ（ａｂ’）フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えＤＮＡ技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む、組換えプラスミドの発現）によって産生されたフラグメントが挙げられる。
【０１５２】
Ｂ７－Ｌポリペプチドに特異的なポリクローナル抗体は、一般に、Ｂ７－Ｌポリペプチドおよびアジュバンドの複数回の皮下注射または腹腔内注射によって動物（例えば、ウサギまたはマウス）において産生される。Ｂ７－Ｌポリペプチドをキャリアタンパク質に結合させることは、有用であり得、このタンパク質は、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリン、またはダイズトリプシンインヒビターのように、免疫化される種において免疫原性である。また、ミョウバンのような凝集剤は、免疫応答を増強させるために使用される。免疫化後、この動物は採血され、そして血清を、抗Ｂ７－Ｌポリペプチド抗体力価についてアッセイする。
【０１５３】
Ｂ７－Ｌポリペプチドに特異的なモノクローナル抗体は、培地中の連続的細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を使用して産生される。モノクローナル抗体を調製するために適切な方法の例は、Ｋｏｈｌｅｒら、１９７５、Ｎａｔｕｒｅ ２５６：４９５－９７のハイブリドーマ法、およびヒトＢ細胞ハイブリドーマ法（Ｋｏｚｂｏｒ、１９８４、Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３３：３００１；Ｂｒｏｄｅｕｒら、Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｙ Ｐｒｏｄｕｃｔｉｏｎ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ５１－６３（Ｍａｒｃｅｌ Ｄｅｋｋｅｒ，Ｉｎｃ．，１９８７））が挙げられる。Ｂ７－Ｌポリペプチドと反応性の、モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞株がまた、本発明によって提供される。
【０１５４】
本発明のモノクローナル抗体は、治療剤として使用するために、改変され得る。１実施形態は、「キメラ」抗体であり、重鎖（Ｈ）および／または軽鎖（Ｌ）の一部が、特定の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスの属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である一方で、この鎖（単数または複数）の残りは、別の種から誘導されるか、または特定の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一であるか、または相同性である。抗体のフラグメントが所望の生物学的活性を示す限り、これらの抗体のフラグメントも含まれる。米国特許第４，８１

６，５６７号；Ｍｏｒｒｉｓｏｎら、１９８５、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８１：６８５１－５５を参照のこと。

【０１５５】

別の実施形態において、本発明のモノクローナル抗体は、「ヒト化」抗体である。非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当該分野で周知である。米国特許第５，５８５，０８９号および５，６９３，７６２号を参照のこと。一般に、ヒト化した抗体は、非ヒトである供給源から導入された１以上のアミノ酸残基有する。ヒト化は、例えば、当該分野で記載される方法（Ｊｏｎｅｓら、１９８６、Ｎａｔｕｒｅ ３２１：５２２－２５；Ｒｉｅｃｈｍａｎｎら、１９９８、Ｎａｔｕｒｅ ３３２：３２３－２７；Ｖｅｒｈｏｅｙｅｎら、１９８８、Ｓｃｉｅｎｃｅ２３９：１５３４－３６）を使用して、げっ歯動物相補性決定領域の少なくとも一部をヒトの抗体の対応する領域と置換することによって、実施され得る。

【０１５６】

Ｂ７－Ｌポリペプチドと結合するヒト抗体がまた、本発明によって包含される。内因性の免疫グロブリンの産物の非存在下で、ヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用して、このような抗体は、Ｂ７－Ｌポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも６個の連続アミノ酸を有する）を用いて免疫化することによって産生され、必要に応じて、キャリアに結合される。例えば、Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，１９９３，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ Ｓｃｉ．９０：２５５１－５５；Ｊａｋｏｂｏｖｉｔｓら，１９９３，Ｎａｔｕｒｅ ３６２：２５５－５８；Ｂｒｕｇｇｅｒｍａｎｎら，１９９３，Ｙｅａｒ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏ．７：３３を参照のこと。１つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードする内因性遺伝子座を無能にし、そしてヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座をそのゲノムに挿入することによって産生される。次いで、部分的に改変された動物（すなわち、この動物は、完全相補性より少ない低い改変を有する）は、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得るために交雑される。免疫原が投与される場合、これらのトランスジェニック動物が、ヒト（例えば、マウスではない）アミノ酸配列（これらの抗原に対して免疫特異性である可変領域を含む）を有する抗体を産生する。例えば、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９６／０５９２８およびＰＣＴ／ＵＳ９３／０６９２６を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第５，５４５，８０７、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９１／２４５およびＰＣＴ／ＧＢ８９／０１２０７、ならびに欧州特許第５４６０７３Ｂ１および５４６０７３Ａ１に記載される。ヒト抗体はまた、宿主細胞中の組換えＤＮＡの発現または本明細書中に記載されるようなハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【０１５７】

代替の実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリから産生され得る（Ｈｏｏｇｅｎｂｏｏｍら，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２７：３８１；Ｍａｒｋｓら，１９９１，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２２２：５８１）。これらにより、糸状バクテリオファージの表面上の抗体レパートリーのディスプレイを介した模倣免疫選択、および選択した抗原への結合によるファージの続く選択を処理する。１つのこのような技術は、ＰＣＴ出願番号ＰＣＴ／ＵＳ９８／１７３６４に記載されており、これには、このようなアプローチを使用して、ＭＰＬ－レポーターおよびｍｓｋ－レポーターについて、高い親和性および機能的なアゴニスト抗体の単離が記載される。

【０１５８】

キメラ、ＣＤＲ移植化抗体、およびヒト化抗体は、代表的に組換え方法によって産生される。抗体をコードする核酸は、宿主細胞中に導入され、そして本明細書中に記載される物質および手順を使用して発現される。好ましい実施形態において、この抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、ＣＨＯ細胞）中で産生される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、本明細書中に記載されるように、宿主細胞中での組換えＤＮＡの発現またはハイブリドーマ細胞中での発現によって産生され得る。

【０１５９】
本発明の抗Ｂ７－Ｌ抗体は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの検出および定量のために、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的および間接的サンドイッチアッセイ、および免疫沈降アッセイ）において使用され得る（Ｓｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７））。この抗体は、使用されるアッセイ方法に対して、適切である親和性でＢ７－Ｌポリペプチドと結合する。
【０１６０】
診断適用のために、特定の実施形態において、抗Ｂ７－Ｌ抗体は、検出可能な部分で標識され得る。この検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで、検出可能なシグナルを産生し得る任意の部分であり得る。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{125}Ｉ、^{99}Ｔｃ、^{111}Ｉｎ、または^{67}Ｇａ）；蛍光化合物または化学発光化合物（フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリン）、または酵素（アルカリホスファターゼ、β－ガラクトシダーゼ、もしくはホースラディシュペルオキシダーゼ）であり得る（Ｂａｙｅｒら，１９９０，Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚ．１８４：１３８－６３）。
【０１６１】
競合結合アッセイは、標識した標準（例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチド、またはその免疫学的に反応性な部分）の、限定された量の抗Ｂ７－Ｌ抗体との結合に関して試験サンプル検体（Ｂ７－Ｌペプチド）と競合する能力に依存する。試験サンプル中のＢ７－Ｌポリペプチドの量は、抗体と結合する標準の量と反比例する。結合する標準の量を決定するのを容易にするために、この抗体は、代表的には競合前または後に不溶化され、この抗体と結合する標準および検体は、結合しないままの標準および検体から好都合に分離され得る。
【０１６２】
サンドイッチアッセイは、２種の抗体の使用を代表的に包含し、各々の抗体は、検出および／または定量されるべきタンパク質の異なる免疫部分またはエピトープに結合し得る。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル検体は、固体支持体上に免疫化される第１抗体によって代表的に結合され、その後、第２抗体が、この検体に結合し、不溶の３部の複合体を形成する。例えば、米国特許第４，３７６，１１０を参照のこと。二次抗体自体は、検出可能な部分で標識されるか（直接的なサンドイッチアッセイ）、または検出可能な部分で標識される抗免疫グロブリン抗体を使用して測定され得る（間接的サンドイッチアッセイ）。例えば、サンドイッチアッセイの１つの型は、酵素結合イムノソルベント検定法（ＥＬＩＳＡ）（この場合、検出可能な部分は、酵素である）である。
【０１６３】
抗Ｂ７－Ｌ抗体を含む、選択的結合因子はまた、インビボ画像化のために有用である。検出可能な部分で標識した抗体は、動物に、好ましくは、血流中に投与され得、宿主中の標識した抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、核磁気共鳴、放射線学、または当該分野で公知の他の検出手段のいずれかによって、動物中で検出可能である任意の部分で標識され得る。
【０１６４】
抗体を含む、本発明の選択的結合因子は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、アゴニストまたはアンタゴニストであり、これらは、少なくとも１つのＢ７－Ｌポリペプチドの生物学的活性を、それぞれ増強または減少させるかのいずれかである。１実施形態で、本発明のアンタゴニスト抗体は、Ｂ７－Ｌポリペプチドに特異的に結合し得、そしてインビボまたはインビトロでＢ７－Ｌポリペプチドの機能活性を阻害または排除し得る抗体またはその結合フラグメントである。好ましい実施形態において、選択的結合因子（例えば、アンタゴニスト抗体）は、少なくとも約５０％、および好ましくは、少なくとも約８０％、Ｂ７－Ｌポリペプチドの機能活性を阻害する。別の実施形態において、選択的結合因子は、Ｂ７－Ｌポリペプチド結合パートナー（リガンドまたはレセプター）と相互作用し得る抗Ｂ７－Ｌポリペプチドであり、これにより、インビトロまたはイン

ビボにおいてＢ７－Ｌポリペプチド活性を阻害または排除する、抗Ｂ７－Ｌポリペプチド抗体であり得る。アゴニストおよびアンタゴニスト抗Ｂ７－Ｌポリペプチド抗体を含む、選択的結合因子は、当該分野で周知であるスクリーニングアッセイによって同定される。

【０１６５】

本発明はまた、Ｂ７－Ｌ選択的結合因子（例えば、抗体）を含むキットおよび生物学的サンプル中でＢ７－Ｌポリペプチドレベルを検出するために有用である他の薬剤に関する。このような薬剤は、血清を遮断する検出可能な標識、ポジティブおよびネガティブコントロールサンプル、ならびに検出薬剤を含み得る。

【０１６６】

（マイクロアレイ）

ＤＮＡマイクロアレイ技術は、本発明に従って利用され得ることが理解される。ＤＮＡマイクロアレイは、固体支持体（例えば、ガラス）上に配置された核酸の小型高密度アレイである。このアレイ内の各細胞またはエレメントは、相補的核酸配列（例えば、ｍＲＮＡ）とハイブリダイゼーションするための標識として作用する、単一の核酸種の複数のコピーを含む。ＤＮＡマイクロアレイ技術を使用する発現プロファイリングにおいて、ｍＲＮＡは、最初に細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、酵素で蛍光標識されたｃＤＮＡに変換される。この材料は、マイクロアレイにハイブリダイズされ、そして未結合のｃＤＮＡは、洗浄により除去される。次いで、このアレイ上に示された個々の遺伝子の発現は、各々核酸分子を標的するために特異的に結合される、標識されたｃＤＮＡの量を定量することによって視覚化される。この方法において、数千の遺伝子の発現が、生物学的材料の単一サンプルから、ハイスループットの並行様式で定量され得る。

【０１６７】

このハイスループット発現プロファイリングは、本発明のＢ７－Ｌ分子に関連して広範の適用を有し、これには、以下が挙げられるが、これに限定されない：治療のための標的としてのＢ７－Ｌ疾患関連遺伝子の同定および確認；関連するＢ７－Ｌ分子およびそのインヒビターの分子毒性；臨床試験のための代替標識の集団および産生の階層化；およびハイスループットスクリーニングにおいて、選択化合物の同定を援助することによって、関連するＢ７－Ｌポリペプチド低分子薬物発見を増強すること。

【０１６８】

（化学的誘導体）

Ｂ７－Ｌポリペプチドの化学的に改変された誘導体は、本明細書中の記載を考慮して、当業者によって調製され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチド誘導体は、このポリペプチドに天然で結合した分子の型または位置のいずれかで、異なる様式で改変される。誘導体は、１以上の天然で結合した化学基の欠失によって形成される分子を含み得る。配列番号２または他のＢ７－Ｌポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドは、１以上のポリマーの共有結合によって改変され得る。例えば、選択されたポリマーは、代表的に水溶性であり、その結果、結合するタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的な環境）下で沈殿しない。ポリマーの混合物が、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、目的産物の調製の治療学的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

【０１６９】

このポリマーの各々は、任意の分子量であり得、そして分枝または非分枝であり得る。このポリマーの各々は、代表的に、約２ｋＤａと約１００ｋＤａとの間の平均分子量を有する（この用語「約（およそ）」は、水溶性ポリマーの調製の際に、上記の分子量より多い、いくらか少ない分子量を有することを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは、約５ｋＤａと約５０ｋＤａの間、より好ましくは、約１２ｋＤａと約４０ｋＤａとの間、そして最も好ましくは、約２０ｋＤａと約３５Ｄａとの間である。

【０１７０】

適切な水溶性ポリマーまたはその混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Ｎ－連結またはＯ－連結炭水化物、糖、リン酸、ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）（これは、モノ－（C_1－C_{10}）ポリエチレングリコール、アルコキシ－ポリエチ

レングリコール、またはアリールオキシ－ポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導するために使用されたＰＥＧの形態を含む）、モノメトキシ－ポリエチレングリコール、デキストラン（例えば、約６ｋＤの低分子量デキストラン）、セルロース、または他の炭水化物ベースのポリマー、ポリ（Ｎ－ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、およびポリビニルアルコール。共有結合したＢ７－Ｌポリペプチドマルチマーを調製するために使用され得る、二官能性架橋分子もまた、本発明に含まれる。

【０１７１】

一般に、化学的誘導は、活性化したポリマー分子とタンパク質を反応させるために使用される任意の適切な条件下で、実施され得る。ポリペプチドの化学的誘導体を調製するための方法は、概して以下の工程を包含する：（ａ）配列番号２または他のＢ７－Ｌポリペプチドのいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドが、１以上のポリマー分子に結合する条件下で、活性化したポリマー分子（例えば、ポリマー分子の反応性エステル誘導体またはアルデヒド誘導体）とポリペプチドを反応させる工程、ならびに（ｂ）反応生成物を得る工程。最適の反応条件は、既知のパラメータおよび所望の結果に基づいて決定される。例えば、ポリマー分子のタンパク質に対する比が大きくなるほど、結合したポリマー分子の割合も大きくなる。１実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチド誘導体は、アミノ末端の単一ポリマー分子部分を有し得る。例えば、米国特許第５，２３４，７８４号を参照のこと。

【０１７２】

ポリペプチドのペギル化（ｐｅｇｙｌａｔｉｏｎ）は、当該分野で公知の任意のペギル化反応を使用して特異的に実施され得る。このような反応は、例えば、以下の参考文献に記載されている：Ｆｒａｎｃｉｓら，１９９２，Ｆｏｃｕｓ ｏｎ Ｇｒｏｗｔｈ Ｆａｃｔｏｒｓ ３：４－１０；欧州特許第０１５４３１６号および０４０１３８４号；ならびに米国特許第４，１７９，３３７号。例えば、ペギル化は、本明細書中に記載されるように、反応性ポリエチレングリコール分子（または、類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施され得る。アシル化反応のために、選択されたポリマーは、単一の反応性エステル基を有する。還元的アルキル化について、選択されたポリマーは、単一の反応性アルデヒド基を有する。反応性アルデヒドは、例えば、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド（これは、水に安定である）、またはモノＣ$_{1}$－Ｃ$_{10}$アルコキシもしくはそのアリールオキシ誘導体である（米国特許第５，２５２，７１４号を参照のこと）。

【０１７３】

別の実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、ビオチンに化学的に連結され得る。次いで、このビオチン／Ｂ７－Ｌポリペプチド分子は、アビジンに結合され得、その結果、４価のアビジン／ビオチン／Ｂ７－Ｌポリペプチド分子が得られる。Ｂ７－Ｌポリペプチドはまた、ジニトロフェノール（ＤＮＰ）またはトリニトロフェノール（ＴＮＰ）に共有結合され得、そして得られた結合体は、抗ＤＮＰまたは抗ＴＮＰ－ＩｇＭと共に沈殿し、１０価の十量体の結合体を形成する。

【０１７４】

一般に、本発明のＢ７－Ｌポリペプチド誘導体の投与によって、緩和または調節され得る条件は、Ｂ７－Ｌポリペプチドについて本明細書中に記載されたものを含む。しかし、本明細書中に開示されるＢ７－Ｌポリペプチド誘導体は、非誘導体化分子と比較した場合、さらなる活性、増強または減少した生物学的活性、または他の特性（例えば、増加または減少した半減期）を有し得る。

【０１７５】

（遺伝子操作した非ヒト動物）

マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物が、さらに本発明の範囲内に含まれ、ここで、ネイティブＢ７－Ｌポリペプチ

ドをコードする遺伝子は破壊（すなわち「ノックアウト」）され、Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現レベルは、有意に減少するか、または完全に破壊される。このような動物は、米国特許第５，５５７，０３２号に記載されるような技術および方法を使用して調製され得る。

【０１７６】

本発明は、マウス、ラット、または他のげっ歯類；ウサギ、ヤギ、ヒツジ、または他の家畜のような非ヒト動物をさらに含み、この動物のＢ７－Ｌ遺伝子のネイティブの形態または異種Ｂ７－Ｌ遺伝子のいずれかが、この動物によって過剰発現され、これによって、「トランスジェニック」動物を作製する。このようなトランスジェニック動物は、米国特許第５，４８９，７４３号およびＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／２８１２２号に記載されるような周知の方法を使用して調製され得る。

【０１７７】

本発明は、非ヒト動物をさらに含み、ここで、本発明の１以上のＢ７－Ｌポリペプチドのプロモーターは、（例えば、相同的な組換え方法を使用することによって）活性化されるか、または不活化され、１以上のネイティブＢ７－Ｌポリペプチドの発現のレベルを改変する。

【０１７８】

これらの非ヒト動物は、薬物候補物スクリーニングのために使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物での薬物候補物の影響が測定され得る。例えば、薬物候補物は、Ｂ７－Ｌ遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、産生されるＢ７－Ｌポリペプチドの量は、動物を薬物候補物に曝露した後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補物の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患状態または病理学的状態を生じるか、または関連する。このような場合において、薬物候補物の遺伝子の発現を減少させる能力または病理学的状態を防止または阻害する能力を試験し得る。別の例において、ポリペプチドのフラグメントのような、特定の代謝産物の産生は、疾患状態または病理学的状態を生じ得るか、または関連し得る。このような場合において、このような、薬物候補物の代謝産物の産生を減少させる能力または病理学的状態を防止または阻害するその能力を試験し得る。

【０１７９】

（Ｂ７－Ｌポリペプチド活性の他の修飾因子についてのアッセイ）

いくつかの状態において、Ｂ７－Ｌポリペプチドの活性の修飾因子である分子（すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト）を同定することが所望され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドを調節する天然または合成分子は、本明細書中に記載されるような、１以上のスクリーニングアッセイを使用して同定され得る。このような分子は、エキソビボ様式またはインビボ様式のいずれかで、注射、または経口送達、移植デバイスなどによって投与され得る。

【０１８０】

「試験分子」とは、Ｂ７－Ｌポリペプチドの活性を調節する（すなわち、増加または減少させる）能力について評価される分子を言う。最も一般的に、試験分子は、Ｂ７－Ｌポリペプチドと直接的に相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、Ｂ７－Ｌ遺伝子発現に影響を与えることによって、またはＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）に結合することによって、Ｂ７－Ｌポリペプチド活性を間接的に調節し得ることが企図される。１実施形態において、試験分子は、少なくとも約10^{-6}Ｍ、好ましくは、約10^{-8}Ｍ、より好ましくは、約10^{-9}Ｍ、そしてさらにより好ましくは約10^{-10}Ｍの親和性定数（ａｆｆｉｎｉｔｙ　ｃｏｎｓｔａｎｔ）でＢ７－Ｌポリペプチドと結合する。

【０１８１】

Ｂ７－Ｌポリペプチドと相互作用する化合物を同定するための方法は、本発明によって包含される。特定の実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、試験分子とＢ７－Ｌポリペプチドとの相互作用が可能な条件下で、試験分子と共にインキュベートされ、そして相

互作用の程度が測定される。試験分子は、実質的に精製された形態または粗製の混合物でスクリーニングされ得る。

【０１８２】

特定の実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、Ｂ７－Ｌポリペプチドと相互作用してその活性を調節するタンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質、または低分子量の分子であり得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を調節する分子として、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸と相補的であるか、またはＢ７－Ｌポリペプチドの発現を指向または制御する核酸配列に対して相補的である核酸、および発現のアンチセンスレギュレーターとして作用する核酸が挙げられる。

【０１８３】

一旦、試験化合物が、Ｂ７－Ｌポリペプチドと相互作用すると同定されると、この分子は、Ｂ７－Ｌポリペプチド活性を増加または減少させる能力についてさらに評価され得る。試験分子とＢ７－Ｌポリペプチドとの相互作用の測定は、いくつかの形態（細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイ、および免疫アッセイが挙げられる）で実施され得る。一般的に、試験分子は、特定の期間、Ｂ７－Ｌポリペプチドと共にインキュベートされ、そしてＢ７－Ｌポリペプチド活性が、生物学的活性を測定するために１以上のアッセイによって決定される。

【０１８４】

試験分子とＢ７－Ｌポリペプチドとの相互作用はまた、免疫アッセイにおいてポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体を使用して直接的にアッセイされ得る。あるいは、本明細書中に記載されるようなエピトープタグを含むＢ７－Ｌポリペプチドの改変形態は、溶液および免疫アッセイにおいて使用され得る。

【０１８５】

Ｂ７－Ｌポリペプチドが、結合パートナー（例えば、レセプターまたはリガンド）との相互作用を介して、生物学的活性を示す場合、種々のインビトロアッセイが、対応する結合パートナー（例えば、選択的結合因子、レセプター、またはリガンド）へのＢ７－Ｌポリペプチドの結合を測定するために使用され得る。これらのアッセイは、その結合パートナーに対するＢ７－Ｌポリペプチドの結合の速度および／または程度を増加または減少させるそれらの能力について、試験分子をスクリーニングするために使用され得る。１つのアッセイにおいて、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、マイクロタイタープレートのウェル中で固定される。次いで、放射標識したＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化Ｂ７－Ｌポリペプチド結合パートナー）および試験化合物は、このウェルに、一度に一つずつか（いずれかの順序で）または同時にかのいずれかで添加され得る。インキュベーション後、このウェルを洗浄し、そしてシンチレーションカウンターを使用して、放射活性を計数し、結合パートナーがＢ７－Ｌポリペプチドに結合する範囲を決定する。代表的に、この分子は、濃度範囲にわたって試験され、そして試験アッセイのエレメントの１つ以上を欠く一連のコントロールウェルが、結果の評価の正確性のために使用され得る。この方法の代替は、タンパク質の「位置」を逆にすることを（すなわち、マイクロタイタープレートウェルに対してＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーを固定し、試験分子および放射標識したＢ７－Ｌポリペプチドをインキュベートし、そしてＢ７－Ｌポリペプチド結合の程度を決定する）を包含する。例えば、Ｃｕｒｒｅｎｔ　Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ　ｉｎ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｂｉｏｌｏｇｙ、第１８章（Ａｕｓｕｂｅｌら編、Ｇｒｅｅｎ　Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ　Ｉｎｃ．およびＷｉｌｅｙ　ａｎｄ　Ｓｏｎｓ１９９５）を参照のこと。

【０１８６】

放射性標識に対する代替として、Ｂ７－Ｌポリペプチドまたはその結合パートナーは、ビオチンと結合体化され得、次いで、ビオチン化タンパク質の存在が、酵素（例えば、西洋わさびペルオキシダーゼ（ＨＲＰ）またはアルカリホスファターゼ（ＡＰ））（これらは、比色定量的に検出され得る）に結合したストレプトアビジンを使用して検出され得るか、またはストレプトアビジンの蛍光タグ化によって検出され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチド

またはＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナー（これらは、ビオチンに結合されている）に対する抗体はまた、ＡＰまたはＨＲＰに連結した酵素連結ストレプトアビジンとの複合体のインキュベーションに続いて、検出の目的のために使用され得る。

【０１８７】

Ｂ７－Ｌポリペプチドまたはポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズ、または他の型のこのような不活性な固体相基材への付着によって固定され得る。基材－タンパク質複合体は、相補タンパク質および試験化合物を含む溶液内に配置され得る。インキュベーション後、これらのビーズは、遠心分離によって沈澱され得、そしてＢ７－Ｌポリペプチドとその結合パートナーとの間の結合の量が、本明細書中に記載の方法を使用して評価され得る。あるいは、基材－タンパク質複合体は、カラムを通過する、試験分子および相補タンパク質を用いてカラム内に固定化され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドとその結合パートナーとの間の複合体の形成が、次いで、本明細書中に記載の技術（例えば、放射性標識または抗体結合）のいずれかを使用して評価され得る。

【０１８８】

Ｂ７－Ｌポリペプチド結合タンパク質とＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させる試験分子を同定するために有用な別のインビトロアッセイは、表面プラズモン共鳴検出システム（例えば、ＢＩＡｃｏｒｅアッセイシステム（Ｐｈａｒｍａｃｉａ，Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ，ＮＪ））である。ＢＩＡｃｏｒｅシステムは、製造業者によって指定されるように利用される。このアッセイは、本質的に、Ｂ７－ＬポリペプチドまたはＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーのいずれかの、ディテクターに位置するデキストランコーティングされたセンサーチップへの共有結合に関する。次いで、試験化合物および他の相補性タンパク質が、同時にかまたは連続的にかのいずれかで、センサーチップを含むチャンバーに注入され得る。結合する相補性タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコーティングされた側に物理的に結合する分子の質量の変化に基づいて評価され得、この分子の質量の変化は、ディテクターシステムによって測定される。

【０１８９】

いくつかの場合において、Ｂ７－ＬポリペプチドとＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少させるそれらの能力について、２つ以上の試験化合物を一緒に評価することが所望され得る。これらの場合、本明細書中に記載のアッセイは、第一の試験化合物と同時にか、またはそれに続いてのいずれかで、このようなさらなる試験化合物を添加することによって容易に改変され得る。このアッセイにおける残りの工程は、本明細書中に記載される通りである。

【０１９０】

インビトロアッセイ（例えば、本明細書中に記載されるアッセイ）は、Ｂ７－ＬポリペプチドとＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成に対する効果について、多数の化合物をスクリーニングするために、有利に使用され得る。これらのアッセイは、ファージディスプレイ、合成ペプチド、および化学合成ライブラリーにおいて生成された化合物をスクリーニングするために、自動化され得る。

【０１９１】

Ｂ７－ＬポリペプチドとＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーとの間の複合体の形成を増加または減少する化合物はまた、Ｂ７－ＬポリペプチドまたはＢ７－Ｌポリペプチド結合パートナーのいずれかを発現する細胞および細胞株を使用して、細胞培養物においてスクリーニングされ得る。細胞および細胞株は、任意の哺乳動物から獲得され得るが、好ましくは、ヒト、または他の霊長類、イヌまたはげっ歯類の供給源由来である。Ｂ７－Ｌポリペプチドの、Ｂ７－Ｌポリペプチド結合パートナーを発現する細胞のその表面への結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度が、例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチド結合パートナーに対するビオチン化抗体を使用するフローサイトメトリーによって決定され得る。細胞培養アッセイは、本明細書中に記載されるタンパク質結合アッセイにおいて、陽性とスコア付けされる化合物をさらに評価するために有利に使用され得る

。

【０１９２】

細胞培養物はまた、薬物候補の効果をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、Ｂ７－Ｌ遺伝子の発現を減少または増加させ得る。特定の実施形態において、生成されるＢ７－Ｌポリペプチドまたはポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物の薬物候補への曝露の後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物への薬物候補の実際の効果が検出され得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の効果を有し得る。このような場合、遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、または細胞培養物に対する特定の効果を予防または阻害するその能力が試験され得る。他の例において、特定の代謝産物（例えば、ポリペプチドのフラグメント）の生成が、疾患または病的状態を生じ得るか、またはそれらと関連し得る。このような場合、細胞培養物におけるこのような代謝産物の生成を減少する薬物候補の能力が試験され得る。

【０１９３】

（内部移行タンパク質）

ｔａｔタンパク質配列（ＨＩＶ由来）が、タンパク質を細胞内に内部移行させるために使用され得る。例えば、Ｆａｌｗｅｌｌら、１９９４、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．９１：６６４－６８を参照のこと。例えば、ＨＩＶ ｔａｔタンパク質の１１アミノ酸の配列（Ｙ－Ｇ－Ｒ－Ｋ－Ｋ－Ｒ－Ｒ－Ｑ－Ｒ－Ｒ－Ｒ；配列番号２０）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはＴＡＴ ＰＤＴと称される）は、細胞の細胞質膜および核膜を通じた送達を媒介することが記載されている。Ｓｃｈｗａｒｚｅら，１９９９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５：１５６９－７２；およびＮａｇａｈａｒａら，１９９８，Ｎａｔ．Ｍｅｄ．４：１４４９－５２を参照のこと。これらの手順において、腹腔内投与後に組織に浸透するＦＩＴＣ構築物（ＦＩＴＣ標識されたＧ－Ｇ－Ｇ－Ｇ－Ｙ－Ｇ－Ｒ－Ｋ－Ｋ－Ｒ－Ｒ－Ｑ－Ｒ－Ｒ－Ｒ；配列番号２１）が調製され、そしてこのような構築物の細胞への結合が、蛍光活性化細胞分離（ＦＡＣＳ）分析によって検出される。ｔａｔ－β－ｇａｌ融合タンパク質で処置された細胞は、β－ｇａｌ活性を示す。注入後、このような構築物の発現が、多くの組織（肝臓、腎臓、肺、心臓および脳組織を含む）において検出され得る。このような構築物は、細胞に侵入するためにある程度のアンフォールディングを受け、そのため、細胞への移入後にリフォールディングを必要とし得ると考えられる。

【０１９４】

従って、ｔａｔタンパク質配列は、所望のポリペプチドを細胞に内部移入させるために使用され得ることが理解される。例えば、ｔａｔタンパク質配列を使用して、Ｂ７－Ｌアンタゴニスト（例えば、抗Ｂ７－Ｌ選択的結合因子、低分子、可溶性レセプター、またはアンチセンスオリゴヌクレオチド）は、Ｂ７－Ｌ分子の活性を阻害するために、細胞内に投与され得る。本明細書中で使用される場合、用語「Ｂ７－Ｌ分子」は、本明細書中に規定されるような、Ｂ７－Ｌ核酸分子およびＢ７－Ｌポリペプチドの両方をいう。所望の場合、Ｂ７－Ｌタンパク質自体もまた、これらの手順を使用して、細胞に内部投与され得る。Ｓｔｒａｕｓ，１９９９，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８５：１４６６－６７もまた参照のこと。

【０１９５】

（Ｂ７－Ｌポリペプチドを使用する細胞供給源の同定）

本発明の特定の実施形態に従って、Ｂ７－Ｌポリペプチドと関連する特定の細胞型の供給源を決定することを可能することが有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病的状態の起源を決定することが有用であり得る。特定に実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸は、プローブとして使用され、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載の細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗Ｂ７－Ｌポリペプチド抗体を使用して、細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチドの存在について試験し得、それによって、このような細胞が、本明細書中に記載される型の細胞であるか否かを決定し得る。

【０１９６】
（Ｂ７－Ｌポリペプチド組成物および投与）
治療組成物は、本発明の範囲内である。このようなＢ７－Ｌポリペプチドの薬学的組成物は、投与の様式に適するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に、治療有効量のＢ７－Ｌポリペプチドまたはは７－Ｌ核酸分子を含み得る。薬学的組成物は、投与の様式に適するように選択された薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物中に、治療有効量の１つ以上のＢ７－Ｌポリペプチド選択的結合因子を含み得る。
【０１９７】
受容可能な処方物の材料は、好ましくは、使用される投薬量および濃度で、レシピエントに対して非毒性である。
【０１９８】
薬学的組成物は、例えば、組成物のｐＨ、浸透性、粘度、清澄性、色、等張性、臭い、無菌性、安定性、分解または放出の速度、吸着、または浸透を改変、維持または保存するための処方物材料を含み得る。適切な処方物材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム）、緩衝液（例えば、ホウ酸、重炭酸塩、Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、クエン酸、リン酸、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート化剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ））、複合体化剤（例えば、カフェイン、ポリビニルピロリドン、β－シクロデキストリン、またはヒドロキシプロピル－β－シクロデキストリン）、充填剤、単糖類、二糖類、および他の炭水化物（例えば、グルコース、マンノースまたはデキストリン）、タンパク質（例えば、血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン）、着色剤、香味剤および希釈剤、乳化剤、親水性ポリマー（例えば、ポリビニルピロリドン）、低分子量ポリペプチド、塩形成対イオン（例えば、ナトリウム）、防腐剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサール、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン（ｃｈｌｏｒｈｅｘｉｄｉｎｅ）、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルオニック（ｐｌｕｒｏｎｉｃ）；ＰＥＧ；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、ポリソルベート２０またはポリソルベート８０）；トリトン；トロメタミン（ｔｒｏｍｅｔｈａｍｉｎｅ）；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（ｔｙｌｏｘａｐａｌ））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、またはマンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的アジュバント。Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ（第１８版，Ａ．Ｒ．Ｇｅｎｎａｒｏ編，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ １９９０を参照のこと。
【０１９９】
最適な薬学的組成物は、当業者によって、例えば、意図される投与経路、送達形式、および所望の投薬量に依存して決定される。例えば、Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，前出を参照のこと。このような組成物は、Ｂ７－Ｌ分子の、物理的な状態、安定性、インビボ放出の速度、およびインビボクリアランスの速度に影響し得る。
【０２００】
薬学的組成物中の主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性であっても非水性であってもよい。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理学的な生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、おそらく非経口投与のための組成物において一般的な他の物質が補充される。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合され

た生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約ｐＨ７．０～８．５のＴｒｉｓ緩衝液または約ｐＨ４．０～５．５の酢酸塩緩衝液を含み、これらはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の１つの実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチド組成物は、所望の程度の純度を有する選択された組成物を、任意の処方薬剤（Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ’ｓ　Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ　Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，前出）と混合することによって、凍結乾燥ケークまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、Ｂ７－Ｌポリペプチド産物は、スクロースのような適切な賦形剤を使用して凍結乾燥物として処方され得る。

【０２０１】

このＢ７－Ｌポリペプチドの薬学的組成物は、非経口送達のために選択され得る。あるいは、これらの組成物は、吸入または消化管を介する送達（例えば、経口送達）のために選択され得る。このような薬学的に受容可能な組成物の調製は、当該分野の技術内にある。

【０２０２】

処方成分は、投与の部位において受容可能な濃度で存在する。例えば、緩衝液は、生理学的ｐＨまたはそれよりわずかに低いｐＨ（代表的に、約５～約８のｐＨ範囲内）でこの組成物を維持するために使用される。

【０２０３】

非経口投与が意図される場合、本発明における使用のための治療組成物は、薬学的に受容可能なビヒクルに所望のＢ７－Ｌ分子を含む発熱物質を含まない非経口的に受容可能な水溶液の形態であり得る。非経口注入のために特に適切なビヒクルは、滅菌蒸留水であり、この中で、Ｂ７－Ｌ分子が、滅菌性の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、生成物の制御されたまたは持続された放出を提供する薬剤（例えば、注入可能なミクロスフィア、生体侵食性（ｂｉｏ－ｅｒｏｄｉｂｌｅ）粒子、ポリマー化合物（ポリ乳酸またはポリグリコール酸）、ビーズまたはリポソーム）と所望の分子との処方物を含み得、次いで、これは蓄積注射を介して送達され得る。ヒアルロン酸もまた使用され得、そしてこれは、循環中に保持される持続時間を促進する効果を有し得る。所望の分子の導入のための他の適切な手段は、移植可能な薬物送達デバイスを含む。

【０２０４】

１つの実施形態において、薬学的組成物は、吸入のために処方され得る。例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、吸入のための乾燥粉末として処方され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドまたは核酸分子の吸入溶液はまた、エアロゾル送達のための噴霧剤と共に処方され得る。なお別の実施形態において、溶液は噴霧され得る。肺投与がさらに、ＰＣＴ公開番号ＷＯ９４／２００６９（化学的に改変されたタンパク質の肺送達が記載されている）に記載されている。

【０２０５】

特定の処方物が、経口投与され得ることがまた意図される。本発明の１つの実施形態において、この様式で投与されるＢ７－Ｌポリペプチドが、固体投薬形態（例えば、錠剤またはカプセル）の調合において慣用的に使用されるキャリアを伴うか、または伴わず処方され得る。例えば、カプセルは、バイオアベイラビリティーが最大化され、そして全身前分解（ｐｒｅ－ｓｙｓｔｅｍｉｃ　ｄｅｇｒａｄａｔｉｏｎ）が最小化される場合、胃腸管内でのある場所で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、Ｂ７－Ｌポリペプチドの吸収を促進するために含まれ得る。希釈剤、香味剤、低融点ワックス、植物油、潤滑剤、懸濁剤、錠剤崩壊剤、および結合剤もまた、使用され得る。

【０２０６】

別の薬学的組成物は、錠剤の製造に適切な非毒性賦形剤との混合物中に、有効量のＢ７－Ｌポリペプチドを含み得る。錠剤を滅菌水または別の適切なビヒクルに溶解することによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤は以下を含むが、これらに限定されない：不活性な希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウムまたは重炭酸ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム）；または結合剤（例えば、デンプン、ゼラチンまたはアラビアゴム）；あるいは潤滑剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム

、ステアリン酸またはタルク）。
【０２０７】
さらなるＢ７－Ｌポリペプチドの薬学的組成物は、当業者に明らかであり、持続送達または制御送達処方物中にＢ７－Ｌポリペプチドを含む処方物を含む。種々の他の持続送達または制御送達手段（例えば、リポソームキャリア、生体侵食性微粒子あるいは多孔性ビーズおよび蓄積注射）を処方するための技術はまた、当業者に公知である。例えば、ＰＣＴ／ＵＳ９３／００８２９（これは、薬学的組成物の送達のための多孔性ポリマー性微粒子の制御放出を記載する）を参照のこと。
【０２０８】
徐放性調製物のさらなる例としては、成形品の形態（例えば、フィルム、またはマイクロカプセル）の半透過性ポリマーマトリックスを含む。徐放性マトリックスとしては、ポリエステル、ヒドロゲル、ポリラクチド（米国特許第３，７７３，９１９号および欧州特許第０５８４８１号）、Ｌ－グルタミン酸とγエチル－Ｌ－グルタメートとのコポリマー（Ｓｉｄｍａｎら，１９８３，Ｂｉｏｐｏｌｙｍｅｒｓ ２２：５４７－５６）、ポリ（２－ヒドロキシエチル－メタクリレート）（Ｌａｎｇｅｒら，１９８１，Ｊ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｍａｔｅｒ．Ｒｅｓ．１５：１６７－２７７およびＬａｎｇｅｒ，１９８２，Ｃｈｅｍ．Ｔｅｃｈ．１２：９８－１０５）、エチレンビニルアセテート（Ｌａｎｇｅｒら，前出）またはポリ－Ｄ（－）－３－ヒドロキシ酪酸（欧州特許第１３３９８８号）が挙げられ得る。徐放性組成物はまた、リポソームを含み得、これは、当該分野で公知のいくつかの方法のいずれかによって調製され得る。例えば、Ｅｐｐｓｔｅｉｎら，１９８５，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８２：３６８８－９２；および欧州特許第０３６６７６号、同第０８８０４６号、および同第１４３９４９号を参照のこと。
【０２０９】
インビボ投与のために使用されるＢ７－Ｌ薬学的組成物は、代表的に無菌的でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を通じた濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用した滅菌は、凍結乾燥および再構成の前後のいずれかで実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口用組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器（例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル）内に配置される。
【０２１０】
一旦、薬学的組成物が処方されると、これは、滅菌バイアル中に、溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体として、または脱水粉末または凍結乾燥粉末として保存され得る。このような処方物は、ｒｅａｄｙ－ｔｏ－ｕｓｅ形態または投与前に再構成を必要とする形態（凍結乾燥形態）のいずれかで保存され得る。
【０２１１】
特定の実施形態において、本発明は、単一用量投与単位を作製するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。単一チャンバーおよび多チャンバーの予め充填されたシリンジ（例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ（ｌｙｏｓｙｒｉｎｇｅ））を含むキットもまた、本発明の範囲に含まれる。
【０２１２】
治療に使用されるＢ７－Ｌ薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って当業者は、処置に対する適切な投薬レベルが、送達される分子、Ｂ７－Ｌ分子が使用される指標、投与の経路、ならびに患者の大きさ（体重、体表面、または器官の大きさ）および状態（年齢および全体的な健康）に、部分的に依存して変化することを理解する。従って、臨床医は、最適な治療効果を得るために、投薬量を力価決定し（ｔｉｔｅｒ）、そして投与経路を改変し得る。代表的な投薬量は、上記の因子に依存して、約０．１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇ以上までの範囲またはそれ以上であり得る。他の実施形態において、投薬量は、０．１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇまでの範囲；また

は１μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇまでの範囲；または５μｇ／ｋｇ～約１００ｍｇ／ｋｇまでの範囲であり得る。

【０２１３】

投薬の頻度は、使用される処方物におけるＢ７－Ｌ分子の薬物動態学のパラメーターに依存する。代表的に、臨床医は、所望の効果を達成する投薬量に達するまで組成物を投与する。組成物は、従って、組成物は、単一用量として、経時的な２以上の用量（これは、同一量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを通じた連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして彼らによって慣用的に実施される課題の範囲内である。適切な投薬量は、適切な用量－応答データの使用を通じて確認され得る。

【０２１４】

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

【０２１５】

あるいは、またはさらに、組成物は、所望の分子を吸収またはカプセル化する膜、スポンジ、または他の適切な材料の移植を通じて局所的に投与され得る。移植デバイスが使用される場合、このデバイスは、任意の適切な組織または器官に移植され得、そして所望の分子の送達は、拡散、時限的放出ボーラスまたは連続的な投与を介し得る。

【０２１６】

いくつかの場合において、エキソビボ様式でＢ７－Ｌポリペプチドの薬学的組成物を使用することが所望され得る。このような例において、患者から採集された細胞、組織、または器官は、Ｂ７－Ｌポリペプチド薬学的組成物に曝露され、その後、これらの細胞、組織、または器官は、患者に移植して戻される。

【０２１７】

他の場合において、Ｂ７－Ｌポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して遺伝子操作された特定の細胞を移植することによって送達され、Ｂ７－Ｌポリペプチドが発現および分泌され得る。このような細胞は、動物またはヒト細胞であり得、そして自己性、非相同性、または異種性であり得る。必要に応じて、この細胞は不死化され得る。免疫学的応答の機会を減少させるために、細胞はカプセル化されて、周囲の組織の浸潤を回避され得る。カプセル化材料は、代表的に、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系または周囲の組織からの他の有害な因子による細胞の破壊を防止する、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲体または膜である。

【０２１８】

本明細書中で議論されるように、単離された細胞集団（例えば、幹細胞、リンパ球、赤血球、軟骨細胞、ニューロンなど）を１つ以上のＢ７－Ｌポリペプチドで処理することが、望ましくあり得る。このことは、細胞膜に対して透過性の形態である場合、単離された細胞をこのポリペプチドに直接曝露することによって達成され得る。

【０２１９】

本発明のさらなる実施形態は、治療ポリペプチドのインビトロ産生、および遺伝子治療または細胞治療による治療ポリペプチドの産生および送達の両方のための、細胞および方法（例えば、相同組換えおよび／または他の組換え産生方法）に関する。相同組換えおよび他の組換えの方法を使用して、通常は転写的にサイレントなＢ７－Ｌ遺伝子（すなわち、過少発現される遺伝子）を含む細胞を改変し得、これによって、治療有効量のＢ７－Ｌポリペプチドを発現する細胞を生成し得る。

【０２２０】

相同組換えは、本来は、転写的に活性な遺伝子における変異を誘導または修正するように

遺伝子を標的化するために開発された技術である。Ｋｕｃｈｅｒｌａｐａｔｉ，１９８９，Ｐｒｏｇ．ｉｎ Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄ Ｒｅｓ．＆ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３６：３０１。基本的な技術は、特定の変異を哺乳動物ゲノムの特定の領域に導入するため（Ｔｈｏｍａｓら、１９８６，Ｃｅｌｌ ４４：４１９－２８；ＴｈｏｍａｓおよびＣａｐｅｃｃｈｉ，１９８７，Ｃｅｌｌ ５１：５０３－１２；Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎら、１９８８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．Ｓ．Ａ．８５：８５８３－８７）、または欠損遺伝子における特定の変異を修正するため（Ｄｏｅｔｓｃｈｍａｎら、１９８７，Ｎａｔｕｒｅ ３３０：５７６－７８）の方法として、開発された。例示的な相同組換え技術は、米国特許第５，２７２，０７１号；欧州特許第９１９３０５１号および同第５０５５００号；ＰＣＴ／ＵＳ９０／０７６４２、ならびにＰＣＴ公開番号ＷＯ ９１／０９９５５）に記載されている。

【０２２１】

相同組換えを通して、ゲノムに挿入されるＤＮＡ配列は、それを標的化ＤＮＡに取り付けられることによって、目的の遺伝子の特定の領域に指向され得る。この標的化ＤＮＡは、ゲノムＤＮＡの領域に相補的（相同）であるヌクレオチド配列である。ゲノムの特定の領域に相補的な標的ＤＮＡの小片は、ＤＮＡ複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、ハイブリダイズするために細胞に挿入されたＤＮＡの一般的な特性であり、それによって、共有の相同領域を通して、内因性ＤＮＡの他の片と組み換わる。この相補鎖が、変異もしくは異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに取り付けられる場合には、これはまた、この組換えの結果として新たに合成された鎖に組み込まれる。プルーフリーディング機能の結果として、ＤＮＡの新たな配列がテンプレートとして機能することが可能である。それによって、移入されたＤＮＡは、ゲノムに組み込まれる。

【０２２２】

Ｂ７－Ｌポリペプチドと相互作用し得るかまたはその発現を制御し得るＤＮＡの領域（例えば、隣接配列）が、標的ＤＮＡのこれらの片に取り付けられる。例えば、プロモーター／エンハンサーエレメント、サプレッサー、または外因性転写調節エレメントが、意図される宿主細胞のゲノムに、所望のＢ７－ＬポリペプチドをコードするＤＮＡの転写に影響を与えるのに十分に近位および十分な方向で、挿入される。制御エレメントは、この宿主細胞ゲノムに存在するＤＮＡの一部を制御する。従って、所望のＢ７－Ｌポリペプチドの発現は、Ｂ７－Ｌ遺伝子自体をコードするＤＮＡのトランスフェクションによってではなく、Ｂ７－Ｌ遺伝子の転写のための認識可能なシグナルを有する内因性遺伝子配列を提供するＤＮＡ調節セグメントと結合した標的化ＤＮＡ（目的の内因性遺伝子と相同な領域を含む）の使用によって、達成され得る。

【０２２３】

例示的な方法において、細胞における所望の標的遺伝子（すなわち、所望の内因性細胞遺伝子）の発現は、少なくとも調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位を含むＤＮＡの導入によって、予め選択された部位における細胞ゲノムへの相同組換えを介して変更される。これらの構成成分は、新たな転写ユニットが実際に生成されるような様式で、染色体（ゲノム）ＤＮＡに導入される（ここで、ＤＮＡ構築物に存在する調節配列、エキソン、およびスプライスドナー部位は、内因性遺伝子に作動可能に連結されている）。染色体ＤＮＡへのこれらの構成成分の導入の結果として、所望の内因性遺伝子の発現が変化する。

【０２２４】

本明細書中で記載されるように、変化した遺伝子発現は、獲得されたとき、細胞中で通常はサイレントな（発現されていない）遺伝子の活性化（または発現の誘発）、ならびに獲得されたとき、細胞中で生理学的に有意なレベルでは発現されない遺伝子の発現の増加を包含する。この実施形態はさらに、獲得されたときに、細胞において生じている調節または誘導のパターンと異なるように調節または誘導のパターンを変化させること、および獲得されたとき、細胞中で発現されている遺伝子の発現を減少（排除を含む）させることを

包含する。

【０２２５】

細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのＢ７－Ｌポリペプチドの産生を増加するかまたはこれを引き起こすために相同定組換えが使用され得る１つの方法は、最初に、相同性組換えを使用して、部位特異的組換え系由来の組換え配列（例えば、Ｃｒｅ／ｌｏｘＰ、ＦＬＰ／ＦＲＴ）（Ｓａｕｅｒ，１９９４，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，５：５２１－２；Ｓａｕｅｒ，１９９３，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｚｙｍｏｌ．，２２５：８９０－９００）を、細胞の内因性ゲノムＢ７－Ｌポリペプチドコード領域の上流（すなわち、５’側）に配置することを包含する。ゲノムＢ７－Ｌポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された部位に相同な組換え部位を含むプラスミドは、適切なリコンビナーゼ酵素と共に、改変された細胞株に導入される。このリコンビナーゼによって、プラスミドは、このプラスミドの組換え部位を介して、この細胞株のゲノムＢ７－Ｌポリペプチドコード領域のすぐ上流に位置する組換え部位に組込まれ得る（ＢａｕｂｏｎｉｓおよびＳａｕｅｒ、１９９３，Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２１：２０２５－２９；Ｏ’Ｇｏｒｍａｎら、１９９１，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５１：１３５１－５５）。転写を増加させることが公知の任意の隣接配列（例えば、エンハンサー／プロモーター、イントロン、翻訳エンハンサー）は、このプラスミド中に適切に配置される場合、細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのデノボまたは増加したＢ７－Ｌポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写ユニットを生成するような様式で統合する。

【０２２６】

部位特異的組換え配列が細胞の内因性ゲノムＢ７－Ｌポリペプチドコード領域のすぐ上流に配置された細胞株を使用するさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の位置に第２の組換え部位を導入するために相同性組換えを使用することである。次いで、適切なリコンビナーゼ酵素が、二組換え部位の細胞株に導入され、細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのデノボまたは増加したＢ７－Ｌポリペプチド産生を生じる新たなまたは改変された転写ユニットを生成する組換え現象（欠失、転化、および転移）を生じる（Ｓａｕｅｒ，１９９４，Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．，５：５２１－２７；Ｓａｕｅｒ，１９９３，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｅｎｘｙｍｏｌ．，２２５：８９０－９００）。

【０２２７】

細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのＢ７－Ｌポリペプチドの発現を増加するため、または引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのデノボまたは増加したＢ７－Ｌポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（単数または複数）の発現を増加するかもしくは引き起こす工程（例えば、転写因子）、および／または遺伝子（単数または複数）の発現を減少する工程（例えば、転写リプレッサー）を包含する。この方法は、天然に存在しないポリペプチド（例えば、転写因子ドメインに融合した部位特異的ＤＮＡ結合ドメインを含むポリペプチド）の細胞への導入を包含し、それによって、細胞の内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子からのデノボまたは増加したＢ７－Ｌポリペプチドの産生が生じる。

【０２２８】

本発明はさらに、標的遺伝子の発現を変化させる方法において有用なＤＮＡ構築物に関する。特定の実施形態において、例示的なＤＮＡ構築物は、以下を含む：（ａ）１つ以上の標的化配列、（ｂ）調節配列、（ｃ）エキソン、および（ｄ）不対スプライスドナー部位。ＤＮＡ構築物中の標的化配列は、エレメント（ａ）～（ｄ）の細胞中の標的遺伝子への組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（ｂ）～（ｄ）は、内因性標的遺伝子の配列に作動可能に連結される。別の実施形態において、ＤＮＡ構築物は、以下を含む：（ａ）１つ以上の標的化配列、（ｂ）調節配列、（ｃ）エキソン、（ｄ）スプライスドナー部位、（ｅ）イントロン、および（ｆ）スプライスアクセプター部位。ここで、標的化配列は、エレメント（ａ）～（ｆ）の組込みを指向し、その結果、これらのエレメント（ｂ）～（ｆ）は、内因性遺伝子に作動可能に連結される。標的化配列は、相同性組換えが生じる細胞染色体ＤＮＡの予め選択された部位に対して相同である。この構築物において、

エキソンは、一般的に、調節配列の３’側であり、そしてスプライスドナー部位は、このエキソンの３’側である。

【０２２９】

特定の遺伝子の配列（例えば、本明細書中で記載されるＢ７－Ｌポリペプチドの核酸配列）が既知である場合、遺伝子の選択された領域に相補的なＤＮＡの片は、合成されるかまたはそうでなければ獲得される（例えば、目的の領域に結合しているネイティブのＤＮＡの特定の認識部位における適切な制限によって）。この片は、細胞に挿入された際に、標的化配列として作用し、そしてそのゲノム内の相同領域にハイブリダイズする。このハイブリダイゼーションが、ＤＮＡ複製の間に生じる場合、このＤＮＡの片、およびそれに結合した任意のさらなる配列は、Ｏｋａｚａｋｉフラグメントとして作用し、そしてＤＮＡの新たに合成された娘鎖に組み込まれる。従って、本発明は、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードするヌクレオチドを含み、このヌクレオチドは、標的化配列として使用され得る。

【０２３０】

Ｂ７－Ｌポリペプチド細胞治療（例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生する細胞の移植）もまた企図される。この実施形態は、生物学的に活性な形態のＢ７－Ｌポリペプチドを合成および分泌し得る細胞を移植する工程を包含する。このようなＢ７－Ｌポリペプチド産生細胞は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの天然のプロデューサーである細胞であり得るか、またはＢ７－Ｌポリペプチドを産生する能力が、所望のＢ７－Ｌポリペプチドをコードする遺伝子またはＢ７－Ｌポリペプチドの発現を増大する遺伝子で形質転換することによって増大された組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子の送達、ならびにその発現および分泌を促進するために適切なベクターによって達成され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドを投与された患者における潜在的な免疫学的反応（外来種のポリペプチドの投与により生じ得るような反応）を最小化するために、Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生する天然の細胞が、ヒト起源であり、そしてヒトＢ７－Ｌポリペプチドを産生することが好ましい。同様に、Ｂ７－Ｌポリペプチドを産生する組換え細胞が、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドをコードする遺伝子を含む発現ベクターで形質転換されることが好ましい。

【０２３１】

移植細胞は、周辺組織の浸潤を回避するようにカプセル化され得る。ヒトまたは非ヒト動物細胞は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの放出を可能にするが、患者の免疫系または周辺組織からの他の有害な因子による細胞の崩壊を防止する、生体適合性の半透性ポリマー封入体または膜において患者に移植され得る。あるいは、Ｂ７－Ｌポリペプチドをエキソビボで産生するように形質転換された患者自身の細胞が、このようにカプセル化することなく、患者に直接移植され得る。

【０２３２】

生存細胞をカプセル化するための技術は当該分野で公知であり、そしてカプセル化された細胞の調製およびそれらの患者への移植は、慣用的に達成され得る。例えば、Ｂａｅｔｇｅら（ＰＣＴ公開ＷＯ９５／０５４５２およびＰＣＴ／ＵＳ９４／０９２９９）は、生物学的に活性な分子の効果的な送達のために遺伝子操作された細胞を含む膜カプセルを記載する。このカプセルは、生体適合性であり、そして容易に取り戻し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植された際に、インビボで下方制御に供されないプロモーターに作動可能に連結された、生物学的に活性な分子をコードするＤＮＡ配列を含む組換えＤＮＡ分子でトランスフェクトされた細胞をカプセル化する。このデバイスは、生存細胞由来の分子のレシピエント内の特定の部位への送達を提供する。さらに、米国特許第４，８９２，５３８号；同第５，０１１，４７２号；および同第５，１０６，６２７号を参照のこと。生存細胞をカプセル化するためのシステムは、ＰＣＴ公開ＷＯ９１／１０４２５（Ａｅｂｉｓｃｈｅｒら）に記載される。ＰＣＴ公開を９１／１０４７０（Ａｅｂｉｓｃｈｅｒら）；Ｗｉｎｎら、１９９１，Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏｌ．１１３：３２２－２９；Ａｅｂｉｓｃｈｅｒら、１９９１，Ｅｘｐｅｒ．Ｎｅｕｒｏｌ．１１１：２６９－７５；およびＴｒｅｓｃｏら、１９９２，ＡＳＡＩＯ　３８：１７－２３もまた参照のこと。

【０２３３】

Ｂ７－Ｌポリペプチドのインビボおよびインビトロの遺伝子治療送達もまた想定される。遺伝子治療技術の一例は、構成的または誘発性プロモーターに作動可能に連結され得るＢ７－Ｌポリペプチドをコードするｂ７－Ｌ遺伝子（ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡおよび／または合成ＤＮＡのいずれか）を使用して、「遺伝子治療ＤＮＡ構築物」を形成することである。このプロモーターは、構築物が挿入される細胞または組織型において活性である場合、内因性Ｂ７－Ｌ遺伝子に対して同種性であっても異種性であってもよい。遺伝子治療ＤＮＡ構築物の他の成分は、必要に応じて、部位特異的組込みのために設計されたＤＮＡ分子（例えば、相同組換えのために有用な内因性配列）、組織特異的プロモーター、エンハンサーまたはサイレンサー、親細胞を越える選択的優位性を提供し得るＤＮＡ分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なＤＮＡ分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のための）、細胞特異的内部移行因子、ベクターからの発現を増大する転写因子、およびベクターの産生を可能にする因子を含む。

【０２３４】

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

【０２３５】

さらに他の実施形態において、調節エレメントが、標的細胞におけるＢ７－Ｌ遺伝子の制御された発現のために包含され得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して刺激される。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望される場合に発現され得る。１つの従来の制御手段は、低分子結合ドメインおよび生物学的プロセスを開始し得るドメインを含むキメラタンパク質（例えば、ＤＮＡ結合タンパク質または転写活性タンパク質）を二量化する低分子二量化剤またはラパログ（ｒａｐａｌｏｇ）の使用を包含する（ＰＣＴ公開ＷＯ９６／４１８６５、ＷＯ９７／３１８９８およびＷＯ９７／３１８９９を参照のこと）。タンパク質の二量化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。

【０２３６】

代替の調節技術は、目的の遺伝子から発現されたタンパク質を、凝集体またはクラスターとして細胞内に貯蔵する方法を使用する。目的の遺伝子は、小胞体における凝集タンパク質の保持を生じる、条件的凝集ドメインを含む融合タンパク質として発現される。貯蔵されたタンパク質は安定であり、そして細胞内で不活性である。しかし、このタンパク質は、条件的凝集ドメインを除去する薬物（例えば、低分子リガンド）を投与することによって放出され得、それにより、凝集体またはクラスターを特異的に破壊し、その結果、このタンパク質は細胞から分泌され得る。Ａｒｉｄｏｒら、２０００，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：８１６－１７およびＲｉｖｅｒａら、２０００，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２８７：８２６－３０を参照のこと。

【０２３７】

他の適切な制御手段または遺伝子スイッチとしては、本明細書中で記載されるシステムが挙げられるが、これらに限定されない。Ｍｉｆｅｐｒｉｓｔｏｎｅ（ＲＵ４８６）は、プロゲステロンアンタゴニストとして使用される。改変されたプロゲステロンレセプターリガンド結合ドメインのプロゲステロンアンタゴニストへの結合は、２つの転写因子のダイマーを形成することによって、転写を活性化し、次いで、核に至り、ＤＮＡに結合する。このリガンド結合ドメインは、天然のリガンドに結合するレセプターの能力を排除するように改変される。改変されたステロイドホルモンレセプター系はさらに、米国特許第５，３６４，７９１号、ならびにＰＣＴ公開ＷＯ９６／４０９１１およびＷＯ９７／１０３３７に記載される。

【０２３８】
さらに別の制御系は、エクジソンレセプター（細胞質レセプター）に結合し、そしてこれを活性化するエクジソン（ショウジョウバエステロイドホルモン）を使用する。次いで、このレセプターは核に転座し、特定のＤＮＡ応答エレメント（エクジソン応答性遺伝子由来のプロモーター）に結合する。エクジソンレセプターは、転写を開始するためのトランス活性化ドメイン、ＤＮＡ結合ドメイン、およびリガンド結合ドメインを含む。エクジソン系はさらに、米国特許第５，５１４，５７８、およびＰＣＴ公開ＷＯ９７／３８１１７、ＷＯ９６／３７６０９、およびＷＯ９３／０３１６２に記載される。
【０２３９】
別の制御手段は、陽性テトラサイクリン制御可能トランスアクチベーターを使用する。この系は、転写を活性化するポリペプチドに連結された変異ｔｅｔレプレッサータンパク質ＤＮＡ結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランスアクチベータータンパク質（すなわち、これは、テトラサイクリンの存在下でｔｅｔオペレーターに結合する）を生じた変異ｔｅｔ　Ｒ－４アミノ酸変化）を含む。このような系は、米国特許第５，４６４，７５８号、同第５，６５０，２９８号、および同第５，６５４，１６８号に記載される。
【０２４０】
さらなる発現制御系および核酸構築物は、Ｉｒｎｏｖｉｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ　Ｉｎｃ．に対する米国特許第５，７４１，６７９号および同第５，８３４，１８６号に記載される。
【０２４１】
インビボ遺伝子治療は、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする遺伝子を、Ｂ７－Ｌ核酸分子の局所注射によって、または他の適切なウイルスもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。Ｈｅｆｔｉ，１９９４，Ｎｅｕｒｏｂｉｏｌｏｇｙ　２５：１４１８－３５。例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸分子は、標的細胞への送達のためのアデノ随伴ウイルス（ＡＡＶ）ベクターに含まれ得る（例えば、Ｊｏｈｎｓｏｎ，ＰＣＴ公開ＷＯ９５／３４６７０；ＰＣＴ出願ＰＣＴ／ＵＳ９５／０７１７８を参照のこと）。組換えＡＡＶゲノムは、代表的に、機能的プロモーターに作動可能に連結したＢ７－ＬポリペプチドをコードするＤＮＡ配列およびポリアデニル化配列に隣接するＡＡＶ逆末端反復を含む。
【０２４２】
代替の適切なウイルスベクターとしては、レトロウイルス、アデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、レンチウイルス、肝炎ウイルス、パルボウイルス、パポバウイルス、ポックスウイルス、アルファウイルス、コロナウイルス、ラブドウイルス、パラミクソウイルス、およびパピローマウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。米国特許第５，６７２，３４４号は、組換え神経栄養性ＨＳＶ－１ベクターを含むインビボウイルス媒介遺伝子転移系を記載する。米国特許第５，３９９，３４６号は、治療タンパク質をコードするＤＮＡセグメントを挿入するためにインビトロで処置されたヒト細胞の送達によって、治療タンパク質を患者に提供するためのプロセスの例を提供する。遺伝子治療技術の実施のためのさらなる方法および材料は、米国特許第５，６３１，２３６号（アデノウイルスベクターに関する）、同第５，６７２，５１０号（レトロウイルスベクターに関する）、同第５，６３５，３９９号（サイトカインを発現するレトロウイルスベクターに関する）に記載される。
【０２４３】
非ウイルス送達法としては、リポソーム媒介移入、裸のＤＮＡ送達（直接注射）、レセプター媒介移入（リガンド－ＤＮＡ複合体）、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈降、および微粒子ボンバードメント（例えば、遺伝子銃）が挙げられるが、これらに限定されない。遺伝子治療の材料および方法はまた、誘導性プロモーター、組織特異的エンハンサー－プロモーター、部位特異的組込みのために設計されたＤＮＡ配列、親細胞を超える選択的優性を提供し得るＤＮＡ配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブな選択系および発現制御系（安全性の指標）、細胞特異的結合因子（細胞標的化

のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増大する転写因子ならびにベクターの製造方法を含み得る。遺伝子治療技術の実施のためのこのようなさらなる方法および材料は、米国特許第４，９７０，１５４号（エレクトロポレーション技術に関する）、同第５，６７９，５５９号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）、同第５，６７６，９５４号（リポソームキャリアに関する）、同第５，５９３，８７５号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、および同第４，９４５，０５０号（生物学的に活性な粒子が一定の速度で細胞に噴霧され、それによりこの粒子がこの細胞の表面に浸透し、そしてこの細胞の内側に組み込まれるプロセスを記載する）、およびＰＣＴ公開ＷＯ９６／４０９５８（核リガンドに関する）に記載される。

【０２４４】

Ｂ７－Ｌ遺伝子治療または細胞治療はさらに、同一または異なる細胞における１つ以上のさらなるポリペプチドの送達を含み得ることもまた企図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこの細胞は、単一の移植可能デバイス（例えば、上記のカプセル化膜）に含められ得るか、あるいはこの細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【０２４５】

遺伝子治療による細胞における内因性Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を増加する手段は、Ｂ７－Ｌポリペプチドプロモーターに１つ以上のエンハンサーエレメントを挿入することであり、ここでエンハンサーエレメントは、Ｂ７－Ｌ遺伝子の転写活性を増加させるように作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することを所望する組織に基づいて選択される－その組織においてプロモーター活性化を与えることが知られているエンハンサーエレメントが選択される。例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードする遺伝子がＴ細胞において「オンに変わる（ｔｕｒｎ　ｏｎ）」場合、ｌｃｋプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能的部分は、標準的なクローニング技術を使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドプロモーターを含むＤＮＡのフラグメントに挿入され得る（そして必要に応じて、ベクターならびに／または５’隣接配列および／もしくは３’隣接配列に挿入される）。「相同組換え構築物」として公知のこの構築物は、次いで、エキソビボまたはインビボのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【０２４６】

遺伝子治療はまた、内因性プロモーターのヌクレオチド配列を改変することによって、Ｂ７－Ｌポリペプチド発現を減少させるために使用され得る。このような改変は、典型的に、相同組換え方法によって達成される。例えば、不活性化のために選択されたＢ７－Ｌ遺伝子のプロモーターの全てまたは一部を含むＤＮＡ分子は、転写を調節するプロモーターの断片を除去および／または置換するように操作され得る。例えば、プロモーターの転写活性化因子のＴＡＴＡボックスおよび／または結合部位は、標準的な分子生物学的技術を使用して欠失され得；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、それによって、対応するＢ７－Ｌ遺伝子の転写を阻止し得る。プロモーターにおけるＴＡＴＡボックスまたは転写活性化因子結合部位の欠失は、Ｂ７－Ｌポリペプチドプロモーター（調節されるＢ７－Ｌ遺伝子と同じかまたは関連の種由来）のすべてまたは関連の部分を含むＤＮＡ構築物を生成することによって達成され得、ここで、１つ以上のＴＡＴＡボックスおよび／または転写活性化因子結合部位のヌクレオチドは、１つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、および／または挿入によって変異される。結果として、ＴＡＴＡボックスおよび／または活性化因子結合部位は、活性を減少するか、または完全に不活化される。この構築物（これはまた、典型的に、改変されたプロモーターセグメントに隣接したネイティブの（内因性）５’および３’ＤＮＡ配列に対応する少なくとも約５００塩基のＤＮＡを含む）は、直接または本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介してのいずれかで、適切な細胞に（エキソビボまたはインビボのいずれかで）導入され得る。典型的に、細胞のゲノムＤＮＡへのこの構築物の組込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター

構築物の５’および３’ＤＮＡ配列は、内因性染色体ＤＮＡへのハイブリダイゼーションによって、改変プロモーター領域を組み込むのを補助するように作用し得る。

【０２４７】

（治療的用途）

Ｂ７－Ｌ核酸分子、ポリペプチド、ならびにそれらのアゴニストおよびアンタゴニストは、多数の疾患、障害または状態（本明細書中で引用されるものを含む）を処置、診断、改善または予防するために使用され得る。

【０２４８】

Ｂ７－Ｌポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストは、Ｂ７－Ｌポリペプチド活性を調節し、Ｂ７－Ｌポリペプチドの成熟形態の少なくとも１つの活性を増加または減少する分子を含む。アゴニストまたはアンタゴニストは、Ｂ７－Ｌポリペプチドと相互作用し、それによりその活性を調節する補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、炭水化物、脂質または低分子量分子）であり得る。潜在的なポリペプチドアゴニストまたはアンタゴニストは、タンパク質の細胞外ドメインの一部または全てを含むＢ７－Ｌポリペプチドの可溶性形態または膜結合形態のいずれかと反応する抗体を含む。Ｂ７－Ｌポリペプチド発現を調節する分子は、典型的に、発現のアンチセンス制御因子としてはたらき得るＢ７－Ｌポリペプチドをコードする核酸を含む。

【０２４９】

Ｂ７ファミリーの関連するメンバーを発現するトランスジェニックマウスが、精嚢過形成を示すので（同時係属中の米国特許第０９／７２９，２６４（２０００年１１月２８日出願））、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストは、生殖障害および増殖障害の処置に有用であり得る。

【０２５０】

Ｂ７－Ｌポリペプチドの過剰発現は、精嚢過形成を引き起こすことによって癌細胞の増殖および維持に役割を果たし得る。従って、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、癌の診断または処置に有用であり得る。このような癌の例としては、精嚢癌、肺癌、脳癌、乳癌、造血系の癌、前立腺癌、卵巣がん、および精巣癌が挙げられるが、これらに限定されない。他の癌が、本発明の範囲内に含まれる。

【０２５１】

Ｂ７－Ｌポリペプチドの過剰発現は、精嚢過形成を引き起こすことによって細胞の不適切な増殖に役割を果たし得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドは、精嚢過形成を引き起こすことによって過剰発現に基づく細胞の不適切な増殖に役割を果たし得る。従って、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストは、異常な細胞増殖と関連する疾患の診断または処置に有用であり得る。このような疾患の例としては、動脈硬化症および脈管再狭窄が挙げられるが、これらに限定されない。細胞の不適切な増殖によって影響を受ける他の疾患が、本発明の範囲内に含まれる。

【０２５２】

Ｂ７－Ｌポリペプチドの過剰発現は、精嚢過形成を引き起こすことによって生殖系において役割を果たし得る。従って、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストおよびアンタゴニストは、生殖系と関連する疾患の診断または処置に有用であり得る。このような疾患の例としては、不妊、流産、早産（ｐｒｅ－ｔｅｒｍ　ｌａｂｏｒ　ａｎｄ　ｄｅｌｉｖｅｒｙ）および子宮内膜症が挙げられるが、これらに限定されない。生殖系の他の疾患が、本発明の範囲内に含まれる。

【０２５３】

好ましくは、本発明のＢ７－Ｌ核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、Ｔ細胞機能と関連する疾患を処置、診断、改善、または予防するために使用される（例えば、Ｔ細胞レセプターデコイとして機能する）。例えば、延長されたＴ細胞活性化または増強されたＴ細胞活性を引き起こすＢ７－Ｌポリペプチドの抗体、細胞外ドメインを含む可溶性タンパク質、または他の調節因子は、腫瘍に対する免疫応答を増加するために使用され得る。

【０２５４】
本発明のＢ７－Ｌ核酸分子、ポリペプチド、ならびにアゴニストおよびアンタゴニストは、自己免疫疾患、移植片生存、腫瘍細胞増殖を阻害するための免疫細胞活性化、Ｔ細胞依存性Ｂ細胞媒介疾患、および癌遺伝子免疫治療の処置において使用され得る。１つの実施形態において、Ｂ７－Ｌポリペプチド機能のアンタゴニストまたはインヒビターは、慢性免疫細胞機能不全を伴う疾患における症状を緩和するのに有益であり得る。全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、免疫血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、および乾癬のような自己免疫疾患は、Ｂ７－Ｌポリペプチドのアゴニストまたはインヒビターを用いて処置され得る。さらに、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎）、グレーヴス病、橋本甲状腺炎、および糖尿病のような慢性炎症性疾患もまた、Ｂ７－Ｌポリペプチドに対するインヒビターを用いて処置され得る。

【０２５５】
Ｂ７－Ｌポリペプチドのアンタゴニストは、骨髄および器官移植のための免疫抑制剤として使用され得、そして移植片生存を延長するために使用され得る。このようなアンタゴニストは、既存の処置を超える有意な利点を提供し得る。骨髄および組織移植治療は、宿主による外来細胞または外来組織のＴ細胞媒介拒絶と闘わなければならない。Ｔ細胞媒介拒絶を阻害するための現在の治療レジメンは、薬物（シクロスポリンまたはＦＫ５０６）を用いた処置を含む。薬物は有効であるが、患者は、重篤な副作用（肝毒性、腎毒性、および神経毒性を含む）を被る。シクロスポリン／ＦＫ５０６クラスの治療剤に対する標的は、カルシニューリン（遍在的に発現するホスファターゼ）である。Ｂ７－Ｌポリペプチドのインヒビターは、現在の免疫治療剤の使用で観察される重篤な副作用を欠き得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドのアンタゴニストは、自己免疫障害（例えば、慢性関節リウマチ、乾癬、多発性硬化症、糖尿病、および全身性エリテマトーデス）に対する免疫抑制剤として使用され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドのアンタゴニストはまた、トキシックショック症候群、炎症性腸疾患、輸血に起因する同種感作、Ｔ細胞依存性Ｂ細胞媒介疾患、および対宿主性移植片病の処置を緩和するために使用され得る。

【０２５６】
本発明のＢ７－Ｌ遺伝子を使用する遺伝子治療は、癌免疫治療において使用され得る。癌細胞に導入されたＢ７－Ｌ遺伝子は、その癌細胞を、動物に戻された場合に免疫系のＴ細胞によって認識され得る抗原提示細胞に形質転換し得る。Ｔ細胞による形質転換された腫瘍細胞の認識は、Ｂ７－Ｌ遺伝子を発現する腫瘍とＢ７－Ｌ遺伝子を発現しない腫瘍の根絶をもたらす。この免疫治療アプローチは、種々の白血病、肉腫、黒色腫、腺腫、胸部癌腫、前立腺腫瘍、肺癌腫、結腸癌腫、および他の癌に対して使用され得る。本発明は、種々の腫瘍に応答したＴ細胞活性化を増強するために、類似の様式でＢ７－Ｌ遺伝子を使用することを含む。

【０２５７】
多くのワクチンが、有効かつ特異的な抗体応答を誘発することで作用する。いくつかのワクチン（特に、Ａ型肝炎ウイルスおよびＳａｌｍｏｎｅｌｌａなどの腸管微生物に対するワクチン）は、短命の抗体応答を誘発する。ワクチンの有効性を増大するためにこの応答を増強および延長することが、望ましい。従って、可溶性Ｂ７－Ｌポリペプチドは、ワクチンアジュバントとして作用し得る。

【０２５８】
抗ウイルス応答もまた、Ｂ７－Ｌポリペプチド経路の活性化因子またはアゴニストによって増強され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチド／Ｆｃ融合タンパク質による細胞性免疫機能の増強もまた、ウイルス感染細胞を除去するのに有益であり得る。補完的な様式において、Ｂ７－Ｌポリペプチド／Ｆｃ融合タンパク質はまた、抗体媒介応答を増強し得、かつ体からウイルスを清澄するのを補助するように機能し得る体液性免疫機能に対して効果を有し得る。

【０２５９】
逆に、抗体酸性の阻害によって改善する多数の臨床状態が存在する。過敏症は、悪化また

は不適切な、通常は有益な免疫応答であり、そして炎症反応および組織傷害を導く。抗体媒介性の過敏症反応は、Ｂ７－Ｌポリペプチド活性のインヒビターによる拮抗作用を特に受け易くあり得る。アレルギー、枯草熱、喘息および急性水腫は、Ｉ型過敏症反応を引き起こし、そしてこれらの反応は、Ｂ７－Ｌポリペプチド活性に関するタンパク質、抗体、または低分子インヒビターによって抑制され得る。

【０２６０】

抗体媒介性過敏症反応を引き起こす疾患（全身性エリテマトーデス、関節炎（慢性関節リウマチ、反応性関節炎、および乾癬関節炎）、ネフロパシー（糸球体腎炎、膜性、膜性増殖性、病巣部分的（ｆｏｃａｌ　ｓｅｇｍｅｎｔａｌ）、病巣壊死性、半月体性、および増殖性細尿管症）、皮膚障害（天疱瘡、類天疱瘡および結節性紅斑）、内分泌障害（甲状腺炎、グレーヴス病、橋本病、インスリン依存性糖尿病）、種々の肺障害（特に、外因性肺胞炎（ｅｘｔｒｉｎｓｉｃ　ａｌｖｅｏｌｉｔｉｓ）、種々の脈管障害、腹腔疾患（ＩｇＡの異常な産生を伴う）、多くの貧血および血小板減少症、ギラン・バレー症候群、および重症筋無力症は、Ｂ７－Ｌポリペプチドアンタゴニストを用いて処置され得る。

【０２６１】

さらに、リンパ増殖性障害（例えば、多発性骨髄腫、Ｗａｌｄｅｎｓｔｒｏｍマクログロブリン血症、およびクリオグロブリン血症（ｃｒｉｏｇｌｏｂｕｌｉｎｅｍｉａｓ））は、Ｂ７－Ｌポリペプチドのタンパク質、抗体、または低分子インヒビターによって阻害され得る。

【０２６２】

最後に、対宿主性移植片病（「人工」の免疫障害）は、Ｂ７－Ｌポリペプチドアンタゴニストによる抗体産生のインヒビターから利益を受け得る。

【０２６３】

Ｂ７－Ｌポリペプチド機能のアゴニストまたはアンタゴニストは、処置される状態に適切である１つ以上のサイトカイン、増殖因子、抗生物質、抗炎症剤、および／または化学療法剤と組み合わせて（同時にかまたは連続的に）使用され得る。

【０２６４】

所望されないレベルのＢ７－Ｌポリペプチドによって引き起こされるかまたは所望されないレベルのＢ７－Ｌポリペプチドによって引き起こされるかまたは媒介される他の疾患または他の障害は、本発明の範囲内に含まれる。所望されないレベルとしては、Ｂ７－Ｌポリペプチドの過剰レベルおよびＢ７－Ｌポリペプチドの正常下レベルが挙げられる。

【０２６５】

（Ｂ７－Ｌ核酸およびＢ７－Ｌポリペプチドの使用）

本発明の核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）を使用して、Ｂ７－Ｌ遺伝子および関連遺伝子の染色体上の位置をマッピングし得る。マッピングは、当該分野で公知の技術（例えば、ＰＣＲ増幅およびインサイチュハイブリダイゼーション）により行われ得る。

【０２６６】

Ｂ７－Ｌ核酸分子（それ自体は生物学的に活性なポリペプチドをコードしない核酸分子を含む）は、哺乳動物組織または体液サンプル中のＢ７－Ｌ核酸分子の存在について、定性的または定量的のいずれかで試験するための、診断アッセイにおけるハイブリダイゼーションプローブとして有用であり得る。

【０２６７】

他の方法はまた、１つ以上のＢ７－Ｌポリペプチドの活性を阻害することが所望される場合に使用され得る。このような阻害は、発現制御配列（三重らせん形成）またはＢ７－Ｌ　ｍＲＮＡに相補的でありかつ発現制御配列（三重らせん形成）またはＢ７－Ｌ　ｍＲＮＡにハイブリダイズする核酸分子によりもたらされ得る。例えば、アンチセンスＤＮＡまたはＲＮＡ分子（これらは、Ｂ７－Ｌ遺伝子の少なくとも一部に相補的である配列を有する）は、細胞中に導入され得る。アンチセンスプローブは、本明細書中に開示されるＢ７－Ｌ遺伝子の配列を使用して、利用可能な技術により設計され得る。代表的には、このよ

うなアンチセンス分子の各々は、選択された各Ｂ７－Ｌ遺伝子の開始部位（５’末端）に相補的である。このアンチセンス分子が次いで、対応するＢ７－Ｌ　ｍＲＮＡにハイブリダイズする場合、このｍＲＮＡの翻訳は、防止されるかまたは低減される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物におけるＢ７－Ｌポリペプチドの減少または不在に関連する情報を提供する。

【０２６８】

あるいは、遺伝子治療を使用して、１つ以上のＢ７－Ｌポリペプチドのドミナントネガティブインヒビターを作製し得る。この状況において、各選択されたＢ７－Ｌポリペプチドの変異体ポリペプチドをコードするＤＮＡが、調製され得、そして本明細書中に記載されるウイルスまたは非ウイルスの方法のいずれかを使用して患者の細胞中に導入され得る。このような変異体の各々は、代表的にはその生物学的役割において内因性ポリペプチドと競合するように設計される。

【０２６９】

さらに、Ｂ７－Ｌポリペプチド（生物学的に活性でも活性でなくても）免疫原として使用され得、すなわち、これらのポリペプチドは、抗体が誘発され得る少なくとも１つのエピトープを含有する。Ｂ７－Ｌポリペプチドに結合する選択的結合因子（本明細書中に記載されるように）は、インビボおよびインビトロでの診断目的のために使用され得、これらの目的としては、体液サンプルまたは細胞サンプル中のＢ７－Ｌポリペプチドの存在を検出するための標識された形態での使用を含むが、これに限定されない。これらの抗体をまた使用して、本明細書中に列挙される疾患および障害を含む多数の疾患および障害を、予防、処置、または診断し得る。これらの抗体は、Ｂ７－Ｌポリペプチドの少なくとも１つの活性特徴を低減するかまたは遮断するように、Ｂ７－Ｌポリペプチドに結合し得るか、またはポリペプチドに結合してＢ７－Ｌポリペプチドの少なくとも１つの活性特徴を増加し得る（Ｂ７－Ｌポリペプチドの薬物動態を増加させることによるものを含む）。

【０２７０】

本発明のＢ７－Ｌポリペプチドは、発現クローニングストラテジーを使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターをクローン化するために使用され得る。放射性標識（１２５ヨウ素）されたＢ７－Ｌポリペプチドまたはアフィニティー／活性－タグ化Ｂ７－Ｌポリペプチド（例えば、Ｆｃ融合物またはアルカリホスファターゼ融合物）を、結合アッセイにおいて使用して、Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターを発現する細胞型または細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離されたＲＮＡは、ｃＤＮＡに変換され得、哺乳動物発現ベクターにクローン化され、そして哺乳動物細胞（例えば、ＣＯＳ細胞または２９３細胞）にトランスフェクトされて発現ライブラリーを生成する。放射性標識されるかまたはタグ化されたＢ７－Ｌポリペプチドは、次いで、アフィニティリガンドとして使用されて、このライブラリーから、その表面上にＢ７－Ｌポリペプチドレセプターを発現する細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、ＤＮＡが、これらの細胞から単離され得、そして哺乳動物細胞にトランスフェクトされて二次発現ライブラリー（ここで、Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターを発現する細胞の画分は、元のライブラリーよりも何倍も高い）を作製し得る。この富化プロセスは、Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターを含有する単一の組換えクローンが単離されるまで繰り返し反復され得る。Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプターの単離は、Ｂ７－Ｌポリペプチドシグナル伝達経路の新規アゴニストおよび新規アンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプター、抗Ｂ７－Ｌポリペプチドレセプター抗体、低分子またはアンチセンスオリゴヌクレオチドが挙げられ、そしてこれらは、本明細書中に記載される疾患または障害の１つ以上を、処置、予防、または診断するために使用され得る。

【０２７１】

本発明のマウスＢ７－Ｌ核酸およびヒトＢ７－Ｌ核酸もまた、対応する染色体Ｂ７－Ｌポリペプチド遺伝子を単離するための有用な手段である。例えば、マウスのＢ７－Ｌ配列を含む染色体ＤＮＡを使用してノックアウトマウスを構築し得、これによって、Ｂ７－Ｌポ

リペプチドのインビボでの役割の試験を可能にする。ヒトＢ７－ＬゲノムＤＮＡを使用して、遺伝性組織変性疾患を同定し得る。

【０２７２】

以下の実施例は、例示目的のみのためであることが意図され、本発明の範囲を限定するものとしていずれにも解釈されるべきではない。

【０２７３】

（実施例１：ヒトＢ７－Ｌポリペプチド遺伝子のクローニング）

概して、Ｓａｍｂｒｏｏｋら（前出）に記載されるような材料および方法を、ヒトＢ７－ＬポリペプチドおよびマウスＢ７－Ｌポリペプチドをコードする遺伝子をクローン化および分析するために使用した。

【０２７４】

Ｇｅｎｂａｎｋ－ＥＭＢＬデータベースの検索を、ＴＢＬＡＳＴＸプログラム（ｈｔｔｐ：／／ｂｌａｓｔ．ｗｕｓｔｌ．ｅｄｕ）および問い合わせ配列としてＢ７－Ｈ１を用いて実行した。ヒトゲノムＢＡＣクローンを、Ｂ７ファミリーのメンバーをコードする核酸配列を含むとして同定した（Ｇｅｎｂａｎｋ登録番号ＡＣ０８０３１２）。

【０２７５】

種々のｃＤＮＡライブラリー由来のプラスミドＤＮＡを、プライマー２４３４－２９（５’－Ｇ－Ｇ－Ｇ－Ａ－Ｇ－Ｇ－Ａ－Ｔ－Ｇ－Ｇ－Ａ－Ａ－Ｔ－Ｃ－Ｃ－Ｔ－Ｇ－Ａ－Ｇ－Ｃ－３’；配列番号２２）および２４３４－３４（５’－Ｃ－Ｔ－Ｇ－Ｇ－Ｔ－Ａ－Ｔ－Ｇ－Ｃ－Ｔ－Ｇ－Ａ－Ａ－Ｇ－Ｇ－Ｃ－Ｔ－Ｃ－Ｃ－３’；配列番号２３）を用いて実行するＰＣＲ増幅における鋳型として使用した。ＰＣＲプライマーを、上記で同定したＢＡＣクローン中の推定エキソン内の配列に対応するように設計した。ＰＣＲ増幅を標準的な技術を用いて実行した。

【０２７６】

予想した３１４ｂｐのＰＣＲフラグメントを、ヒト胎児膵臓、膀胱、腎臓、肝臓、卵巣、頭皮、胆嚢、子宮、Ｔリンパ球および気管から作製したｃＤＮＡライブラリーから獲得した。さらに、予想したフラグメントを、多数の腫瘍細胞株（前立腺腫瘍Ｔ１１７５、卵巣腫瘍Ｔ２３、肺腫瘍Ｔ２７、胸部腫瘍Ｔ１５４３、および胸部癌腫細胞株を含む）から得た。３１４ｂｐのフラグメントをまた、ヒト混合組織ｃＤＮＡライブラリーのいくつかのサブプールから得た（各々のサブプールは、約１５，０００個のクローンを含む）。全長ｃＤＮＡクローンについて最適化した注文して合成したライブラリー（ＬＴＩ－ＦＬ　ｃＤＮＡライブラリー（Ｌｉｆｅ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ　Ｉｎｃ．））を、さらなるクローニング実験のために使用した。

【０２７７】

ヒト混合組織ｃＤＮＡライブラリーのＰＣＲ増幅物において得られた３１４ｂｐのフラグメントを、単離し、そしてｐＣＲ２．１－ＴＯＰＯ（登録商標）ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）にクローン化した。選択したクローンのＤＮＡ配列を、決定して、このクローンの配列が、元々同定されたゲノム配列の配列と同一であったことを確認した。次いで、３１４ｂｐのフラグメントを、Ｅｃｏ　ＲＩ消化によってこのベクターから切り出し、そして^{32}Ｐ－ｄＣＴＰの取り込みによって標識した。標識したフラグメントを使用して、ＰＣＲ増幅実験の前にポジティブであると試験したＬＴＩ－ＦＬ　ｃＤＮＡライブラリーの１５，０００個のクローンのプール由来の１５０，０００個の細菌コロニーをスクリーニングした。コロニーを、ＬＢ／アンピシリンプレートからニトロセルロースフィルターに写し、６×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、１×デンハルト溶液および１００μｇ／ｍｌ　変性サケ精子ＤＮＡ中、６０℃で３時間プレハイブリダイズさせた。１×１０^{6}ｃｐｍ／ｍｌの^{32}Ｐ標識プローブの添加後、ハイブリダイゼーションを同じ条件下で一晩実行した。フィルターを、２×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳ中、室温で３０分間、２回洗浄し、次いで、０．１×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳ中、６５℃で３０分間、２回洗浄した。次いで、フィルターを、増感スクリーンを用いて－８０℃で一晩、Ｘ線フィルムに露光させた。

【０２７８】
単一のポジティブコロニーを、この様式で同定し、そして、このクローン由来のプラスミドＤＮＡを、標準方法によって調製した。このコロニーからのｃＤＮＡインサートは、２．６ｋｂ長であった。ＤＮＡ配列分析によって、このクローンが、Ｂ７－Ｌ遺伝子の推定コード領域を含むことを確認した。しかし、このｃＤＮＡクローンの配列は、ＡＬ０８０３１２ゲノム配列に非常に関連していたが、同一ではなかった。
【０２７９】
ヒトＢ７－Ｌポリペプチドの全長ｃＤＮＡの配列分析によって、この遺伝子が、２８２アミノ酸であって、かつそのアミノ末端に２４アミノ酸長の潜在的なシグナルペプチド（図１；下線によって示される推定シグナルペプチド）を保有するタンパク質をコードする８４６ｂｐのオープンリーディングフレームを含むことが示された。
【０２８０】
Ｂ７－Ｌ遺伝子の推定タンパク質産物は、Ｂ７ファミリーのタンパク質に関連する。これらのタンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーであり、そしてＴ細胞媒介免疫応答の調節因子として機能する。このファミリーのメンバーは、ほとんど保存されていないアミノ酸配列を保有し、従って、計算的な方法を用いて他の関連分子から識別することが困難である。しかし、Ｂ７ファミリーのタンパク質のメンバーは、さらに低いレベルの配列同一性を共有するが、このファミリーのメンバーは、いくつかの共有された構造的特徴を示す。これらの構造的特徴としては、特定のシステイン残基（これらは、免疫グロブリンドメイン内でジスルフィド結合を形成する）のアラインメント、分子の全体的なサイズ、ポリペプチド内の膜貫通ドメインの位置、ならびに免疫グロブリンＶ（可変）ドメインおよび免疫グロブリンＣ（定常）ドメインを含む小さい細胞質ドメインおよび細胞外領域が挙げられる。Ｂ７ファミリーのメンバーは、Ｉ型膜タンパク質である。
【０２８１】
Ｂ７ファミリーの既知のメンバーとしては、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、Ｂ７－ｒｐｌ、およびＢ７－Ｈ１が挙げられる。Ｂ７－１およびＢ７－２は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４と相互作用し、そしてＴ細胞同時刺激経路の媒介因子である。Ｂ７－ｒｐｌは、異なるレセプター（ＩＣＯＳ；誘導性同時刺激因子）に結合し、そしてまた、Ｔ細胞増殖の刺激因子でもある。Ｂ７－Ｈ１もまた、Ｔ細胞増殖の同時刺激因子であるが、ＣＤ２８にもＣＴＬＡ－４にもＩＣＯＳにも結合しない。Ｂ７ファミリーに配列相同性を示す他のタンパク質としては、ブチロフィリン（ｂｕｔｙｒｏｐｈｉｌｉｎ）およびＰＲＯ３５２が挙げられる。さらにより離れて関連するのは、ミエリン稀突起神経膠細胞タンパク質（ＭＯＧ）である。図２Ａ～２Ｃは、ヒトタンパク質Ｂ７－Ｌポリペプチド、ＣＤ８０（Ｂ７－１）、ＣＤ８６（Ｂ７－２）、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７ｒｐ－１、ＰＲＯ３５２、ブチロフィリン　ＢＴＦ１、ブチロフィリン　ＢＴＦ２、ブチロフィリン　ＢＴＦ４、ブチロフィリンＢＴＦ３、およびブチロフィリンのアミノ酸配列アラインメントを示す。
【０２８２】
Ｂ７－Ｌ核酸配列とゲノム配列データベース（Ｃｅｌｅｒａ，Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ，ＭＤ）との比較は、いくつかの良好な一致を生じ、Ｂ７－Ｌ遺伝子の仮のイントロン－エキソン構造の決定を可能にする。コンティグは、ゲノム配列データベース中で同定されたゲノム配列タグ（ＧＳＴ）からの各推定エキソン周辺で組み立てられた。現在、コンティグ間で重複は存在せず、従って、このアセンブリが真のゲノム配列を示すか否かは、未だ確認できない。図３Ａ～３Ｅは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列を示す。エキソン（下線）の位置およびこのエキソンの推定アミノ酸配列を示す。エキソン１の上流の境界は、未だ決定されていない。
【０２８３】
（実施例２：Ｂ７－Ｌ　ｍＲＮＡの発現）
Ｂ７－Ｌ　ｍＲＮＡの発現を、ノーザンブロット分析によって調べる。複数のヒト組織のノーザンブロット（Ｃｌｏｎｔｅｃｈ）を、ヒトＢ７－ＬポリペプチドのｃＤＮＡクロー

ンから単離した適切な制限フラグメントを用いてプローブ化する。プローブを、標準的な技術を用いて^{32}Ｐ－ｄＣＴＰで標識する。

【０２８４】

ノーザンブロットを、ハイブリダイゼーション溶液（５×ＳＳＣ、５０％　脱イオン化ホルムアミド、５×デンハルト溶液、０．５％　ＳＤＳ、および１００ｍｇ／ｍｌ　変性サケ精子ＤＮＡ）中、４２℃で２時間プレハイブリダイズさせ、次いで、５ｎｇ／ｍｌの標識プローブを含む新しいハイブリダイゼーション溶液中、４２℃で一晩ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション後、フィルターを、２×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳ中室温で１０分間２回洗浄し、次いで、０．１×ＳＳＣおよび０．１％　ＳＤＳ中６５℃で３０分間２回洗浄する。次いで、このブロットを、オートラジオグラフィーに感光させる。

【０２８５】

Ｂ７－Ｌ　ｍＲＮＡの発現は、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化する。正常な胚組織および成体マウス組織のパネルを、４％　パラホルムアルデヒド中で固定し、パラフィン中に包理し、そして５μｍに切片にする。切片化した組織を、０．２ＭＨＣｌ中で透過化処理し、プロテイナーゼＫで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸でアセチル化する。切片を、ハイブリダイゼーション溶液（３００ｍＭ　ＮａＣｌ、２０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．０、５ｍＭ　ＥＤＴＡ、１×デンハルト溶液、０．２％　ＳＤＳ、１０ｍＭ　ＤＴＴ、０．２５ｍｇ／ｍｌ　ｔＲＮＡ、２５μｇ／ｍｌ　ポリＡ、２５μｇ／ｍｌ　ポリＣおよび５０％ホルムアミド）中で１時間６０℃でプレハイブリダイズし、次いで、１０％デキストランおよび２×１０^{4}ｃｐｍ／μｌの^{33}Ｐ－標識アンチセンスリボプローブ（ヒトＢ７－Ｌ遺伝子に相補的）を含有する同じ溶液中で６０℃で一晩ハイブリダイズさせる。標準的技術を用いて、ヒトＢ７－Ｌ　ｃＤＮＡ配列を含有するクローンのインビトロ転写によって、このリボプローブを得る。

【０２８６】

ハイブリダイゼーション後、切片を、ハイブリダイゼーション溶液中でリンスし、ＲＮａｓｅＡで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで０．１×ＳＳＣ中で５５℃で３０分間洗浄する。次いで、切片をＮＴＢ－２エマルジョン（Ｋｏｄａｋ，Ｒｏｃｈｅｓｔｅｒ，ＮＹ）に浸し、４℃に３週間曝し、発色させ、そしてヘマトキシリンおよびエオシンで対比染色する。組織形態学およびハイブリダイゼーションシグナルを、脳（矢状切片１つおよび冠状切片２つ）、胃腸管（食道、胃、十二指腸、空腸、回腸、近位結腸、および遠位結腸）、下垂体、肝臓、肺、心臓、脾臓、胸腺、リンパ節、腎臓、副腎、膀胱、膵臓、唾液腺、雄性および雌性生殖器（雌性の卵巣、卵管、および子宮；ならびに雄性の精巣、精巣上体、前立腺、精嚢および輸精管）、ＢＡＴおよびＷＡＴ（皮下、腎臓周囲）、骨（大腿）、皮膚、乳房、および骨格筋についての暗視野照明法かつ標準照明法によって同時に分析する。

【０２８７】

（実施例３：Ｂ７－Ｌポリペプチドの産生）

（Ａ．細菌におけるＢ７－Ｌポリペプチドの発現）

ＰＣＲを用いて、Ｂ７－Ｌポリペプチドをコードするテンプレートの配列を増幅する。このＰＣＲには、この配列の５’および３’末端に対応するプライマーを用いる。増幅したＤＮＡ産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。ＰＣＲ産物をゲル精製し、そして標準的組み換えＤＮＡ方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。ｌｕｘプロモーターおよびカナマイシン耐性をコードする遺伝子を含むｐＡＭＧ２１（ＡＴＣＣ番号９８１１３）のような代表的なベクターを、挿入したＤＮＡの方向性クローニングのために、ＢａｍＨＩおよびＮｄｅＩを用いて消化する。連結した混合物を、エレクトロポレーションによってＥ．ｃｏｌｉ宿主株中に形質転換し、そして形質転換体をカナマイシン耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドＤＮＡを、単離し、そしてＤＮＡ配列決定に供してインサート（挿入物）の存在を確認する。

【０２８８】
形質転換した宿主細胞を、導入前に、３０μｇ／ｍＬカナマイシンを含有する２×ＹＴ培地中で３０℃でインキュベートする。最終濃度３０ｎｇ／ｍＬへのＮ－（３－オキソヘキサノイル）－ｄｌ－ホモセリンラクトンの添加、それに続く３０℃かまたは３７℃での６時間のインキュベーションによって、遺伝子発現を誘導する。Ｂ７－Ｌポリペプチドの発現を、培養物の遠心分離、細菌ペレットの再懸濁および溶解、ならびに、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル電気泳動による宿主細胞タンパク質の分析によって評価する。
【０２８９】
Ｂ７－Ｌポリペプチドを含有する封入体を、以下の通り精製する。細菌細胞を遠心分離によってペレット化し、そして水中に再懸濁する。この細胞懸濁液を超音波処理によって溶解し、そして１９５，０００×ｇでの５～１０分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、そしてペレットを洗浄してホモジナイザーに移す。このペレットを、均一に懸濁されるまで、５ｍＬのＰｅｒｃｏｌｌ溶液（７５％液体Ｐｅｒｃｏｌｌおよび０．１５Ｍ　ＮａＣｌ）中でホモジナイズし、次いで希釈して２１，６００×ｇで３０分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。
【０２９０】
Ｅ．ｃｏｌｉが産生したＢ７－Ｌポリペプチドに相当する、ＳＤＳポリアクリルアミドゲル上の単一のバンドを、ゲルから切り出し、そしてＮ末端アミノ酸配列を、本質的にＭａｔｓｕｄａｉｒａら、１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：１０～３５に記載のように決定する。
【０２９１】
（Ｂ．哺乳動物細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチドの発現）
ＰＣＲを用いて、Ｂ７－ＬポリペプチドをコードするテンプレートｄＮＡ配列を増幅する。このＰＣＲには、この配列の５’および３’末端に対応するプライマーを用いる。増幅したＤＮＡ産物を改変して、発現ベクター内への挿入を可能にするために制限酵素部位を含むようにし得る。ＰＣＲ産物をゲル精製し、そして標準的組み換えＤＮＡ方法論を用いて発現ベクター中に挿入する。エプスタイン－バーウイルス複製起点を含む代表的な発現ベクターであるｐＣＥＰ４（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ，Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）を、２９３－ＥＢＮＡ－１細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチドの発現のために用い得る。増幅およびゲル精製したＰＣＲ産物を、ｐＣＥＰ４ベクターに連結し、そしてリポフェクチンによって２９３－ＥＢＮＡ細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、１００μｇ／ｍＬのハイグロマイシン中で選択し、そして得られた薬物耐性培養物をコンフルエンスになるまで増殖する。次いで、この細胞を無血清培地中で７２時間培養する。馴化培地を取り出し、Ｂ７－Ｌポリペプチド発現をＳＤＳ－ＰＡＧＥによって分析する。
【０２９２】
Ｂ７－Ｌポリペプチド発現は、銀染色によって検出できる。あるいは、Ｂ７－Ｌポリペプチドを、ペプチドタグに対する抗体を用いてウエスタンブロット分析によって検出可能であり得る、エピトープタグ（例えば、ＩｇＧ定常ドメインまたはＦＬＡＧエピトープ）を有する融合タンパク質として生成する。
【０２９３】
Ｂ７－Ｌポリペプチドを、ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲルから切り出し得るか、またはＢ７－Ｌ融合タンパク質を、エピトープタグに対するアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、そして本明細書に記載のようなＮ末端アミノ酸配列分析に供する。
【０２９４】
（Ｃ．哺乳動物細胞におけるＢ７－Ｌポリペプチドの発現および精製）
リポフェクチンまたはリン酸カルシウムプロトコールのいずれかを用いて、２９３　ＥＢＮＡ細胞またはＣＨＯ細胞中に、Ｂ７－Ｌポリペプチド発現構築物を導入する。
【０２９５】
生成されるＢ７－Ｌポリペプチドに対する機能的研究を行うため、ハイグロマイシン選択

２９３　ＥＢＮＡクローニングのプールから大量の馴化培地を生成する。この細胞を５００ｃｍ　Ｎｕｎｃ　Ｔｒｉｐｌｅ　Ｆｌａｓｋｓ中で、８０％コンフルエンスになるまで培養し、その後、培地を回収する１週間前に無血清培地に切り換える。馴化培地を回収し、そして精製まで－２０℃に凍結する。

【０２９６】

馴化培地を下記のとおり、アフィニティークロマトグラフィーによって精製する。この培地を解凍し、次いで０．２μｍフィルターに通す。プロテインＧカラムをＰＢＳでｐＨ７．０に平衡化し、次いで濾過した培地をロードする。このカラムをA_{280}の吸収がベースラインに達するまでＰＢＳで洗浄する。０．１Ｍ　Ｇｌｙｃｉｎｅ－ＨＣｌを用いてｐＨ２．７でＢ７－Ｌポリペプチドを、カラムから溶出し、直ちに１Ｍ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌを用いてｐＨ８．５で中和する。Ｂ７－Ｌポリペプチドを含有する画分をプールし、ＰＢＳ中で透析し、そして－７０℃で貯蔵した。

【０２９７】

ヒトＢ７－Ｌポリペプチド－Ｆｃ融合ポリペプチドの第Ｘａ因子切断について、アフィニティークロマトグラフィー精製したタンパク質を、５０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１００ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　$CaCl_2$中でｐＨ８．０で透析する。制限プロテアーゼ第Ｘａ因子を、透析したタンパク質に１／１００（ｗ／ｗ）で添加し、そしてこのサンプルを室温で一晩消化する。

【０２９８】

（実施例４：抗Ｂ７－Ｌポリペプチド抗体の産生）

Ｂ７－Ｌポリペプチドに対する抗体を、生物学的合成または化学的合成によって生成した、精製タンパク質またはＢ７－Ｌペプチドを用いて免疫することによって獲得し得る。抗体を生成するための適切な手順は、ＨｕｄｓｏｎおよびＢａｙ、Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ（第二版、Ｂｌａｃｋｗｅｌｌ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ　Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ）に記載の手順を含む。

【０２９９】

抗体生成のための１つの手順において、動物（代表的には、マウスまたはウサギ）に、Ｂ７－Ｌ抗原（例えば、Ｂ７－Ｌポリペプチド）を注射し、そして、ハイブリドーマ産生のため、ＥＬＩＳＡによって決定した十分な血清力価レベルを有する動物を、選択する。免疫した動物の脾臓を回収し、そして単一細胞懸濁液として調製し、これから脾臓細胞を回収する。脾臓細胞をマウスミエローマ細胞（例えば、Ｓｐ２／０－Ａｇ１４細胞）に融合し、ＤＭＥＭ（２００Ｕ／ｍＬペニシリン、２００μｇ／ｍＬ硫酸ストレプトマイシン、および４ｍＭグルタミン含有）中でまずインキュベートし、次いで、ＨＡＴ選択培地（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン）中でインキュベートする。選択後、組織培養上清を各融合ウェルから取り出し、そしてＥＬＩＳＡによって、抗Ｂ７－Ｌ抗体産生について試験する。

【０３００】

抗Ｂ７－Ｌ抗体を得るため、別の手順をまた、使用し得る。この手順は例えば、ヒト抗体の生成のためのヒトＩｇ遺伝子座を保有するトランスジェニックマウスの免疫、および合成抗体ライブラリー（例えば、抗体可変ドメインの変異誘発によって生成されるライブラリーなど）のスクリーニングである。

【０３０１】

（実施例５：トランスジェニックマウスにおけるＢ７－Ｌポリペプチドの発現）

Ｂ７－Ｌポリペプチドの生物学的活性を評価するため、肝臓特異的ＡｐｏＥプロモーターの制御下で、Ｂ７－Ｌポリペプチド／Ｆｃ融合タンパク質をコードする構築物を調製する。この構築物の送達により、Ｂ７－Ｌポリペプチドの機能に関して情報を与える、病理的変化を生じることが期待される。同様に、βアクチンプロモーターの制御下で、全長Ｂ７－Ｌポリペプチドを含む構築物を調製する。この構築物の送達により、遍在性発現を生じることが期待される。

【０３０２】

これらの構築物を生成するために、ＰＣＲを用いて、Ｂ７－ＬポリペプチドをコードするテンプレートＤＮＡ配列を増幅する。このＰＣＲには、所望の配列の５’および３’末端に対応するプライマーを用いる。そしてこのプライマーは、発現ベクター内への増幅産物の挿入を可能にするために制限酵素部位を組み込む。増幅後、ＰＣＲ産物をゲル精製し、適切な制限酵素で消化し、そして標準的組み換えＤＮＡ技術を用いて発現ベクター中に連結する。例えば、増幅したＢ７－Ｌポリペプチド配列を、Ｇｒａｈａｍら、１９９７、Ｎａｔｕｒｅ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ，１７：２７２～７４およびＲａｙら，１９９１，Ｇｅｎｅｓ Ｄｅｖ．５：２２６５～７３に記載のように、ヒトβアクチンプロモーターの制御下で発現ベクター中にクローニングし得る。

【０３０３】

連結（ライゲーション）後、反応混合物を用いて、Ｅ．ｃｏｌｉ宿主株をエレクトロポレーションによって形質転換し、そして形質転換体を、薬物耐性について選択する。選択したコロニー由来のプラスミドＤＮＡを単離して、ＤＮＡ配列決定に供し、適切なインサートが存在することおよび変異が存在しないことを確認する。Ｂ７－Ｌポリペプチド発現ベクターを、２回のＣｓＣｌ密度勾配遠心分離を通じて精製し、適切な制限酵素で切断し、そして、Ｂ７－Ｌポリペプチド導入遺伝子を含有する直鎖化フラグメントを、ゲル電気泳動によって精製する。精製したフラグメントを、５ｍＭ Ｔｒｉｓ（ｐＨ７．４）および０．２ｍＭ ＥＤＴＡ中で、２ｍｇ／ｍＬの濃度で、再懸濁する。

【０３０４】

ＢＤＦ１×ＢＤＦ１交配マウス由来の単一細胞胚に、記載（ＰＣＴ公開番号ＷＯ９７／２３６１４）のように注射する。胚を、CO_2インキュベーター中で一晩培養し、そして１５～２０の２細胞胚を偽妊娠ＣＤ１雌性マウスの卵管に移す。マイクロインジェクションした胚の移植から得た子孫を、以下のように、ゲノムＤＮＡサンプル中に組み込まれた導入遺伝子のＰＣＲ増幅によってスクリーニングする。耳切片を２０ｍＬの耳緩衝液（２０ｍＭ Ｔｒｉｓ、ｐＨ８．０、１０ｍＭ ＥＤＴＡ、０．５％ ＳＤＳ、および５００ｍｇ／ｍＬ プロテイナーゼＫ）中で、５５℃で一晩消化する。次いで、このサンプルを２００ｍＬのＴＥで希釈し、そして２ｍＬの耳サンプルを、適切なプライマーを用いるＰＣＲ反応中で用いる。

【０３０５】

８週齢で、トランスジェニック創始動物およびコントロール動物を、剖検および病理分析のため、屠殺する。脾臓の一部を取り出し、そしてＴｏｔａｌ ＲＮＡ Ｅｘｔｒａｃｔｉｏｎ Ｋｉｔ（Ｑｉａｇｅｎ）を用いて、脾臓から、総細胞ＲＮＡを単離し、そして導入遺伝子発現を、ＲＴ－ＰＣＲによって決定する。脾臓から回収したＲＮＡを、以下のように、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ^{TM} Ｐｒｅａｍｐｌｉｆｉｃａｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）を用いてｃＤＮＡに変換する。適切なプライマー（発現ベクター配列中に位置し、そしてＢ７－Ｌポリペプチド導入遺伝子の３’側にある）を用いて、導入遺伝子転写物からｃＤＮＡ合成をプライムする。トランスジェニック創始動物およびコントロール由来の１０ｍｇの総脾臓ＲＮＡを、１ｍＭのプライマーとともに、１０分間７０℃でインキュベートし、そして氷上に置く。次いで、反応物に、１０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、ｐＨ８．３、５０ｍＭ ＫＣｌ、２．５ｍＭ $MgCl_2$、１０ｍＭの各ｄＮＴＰ、０．１ｍＭ ＤＴＴ、および２００ＵのＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔ ＩＩ逆転写酵素を補充する。４２℃で５０分間のインキュベーション後、７２℃で１５分間加熱することによって反応を停止し、２ＵのＲＮａｓｅ Ｈを用いて２０分間３７℃で消化する。次いで、サンプルをＢ７－Ｌポリペプチドに特異的なプライマーを用いるＰＣＲによって増幅する。

【０３０６】

（実施例６：トランスジェニックマウスにおけるＢ７－Ｌポリペプチドの生物学的活性）

安楽死の前に、トランスジェニック動物を計量し、イソフルラン（ｉｓｏｆｌｕｏｒａｎｅ）によって麻酔し、そして心臓穿刺によって採血する。サンプルを、血液学および血清化学分析に供する。Ｘ線撮影を、最終的な放血後に行う。肉眼での解剖の際に、主な内臓

器官を、重量分析に供する。

【０３０７】

肉眼での解剖後、組織（すなわち、肝臓、脾臓、膵臓、胃、胃腸管全体、腎臓、生殖器官、皮膚および乳腺、骨、脳、心臓、肺、胸腺、気管、食道、甲状腺、副腎、膀胱、リンパ節および骨格筋）を取出し、そして１０％緩衝化Ｚｎ－ホルマリン中で組織学的検査のために固定する。固定後、組織をパラフィンブロック中で処理し、そして３ｍｍの切片を得る。全ての切片を、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、次いで組織学的分析に供する。

【０３０８】

トランスジェニックマウスおよびコントロールマウスの両方の脾臓、リンパ節およびパイアー斑を、以下の通りにＢ細胞特異的抗体およびＴ細胞特異的抗体についての免疫組織学的分析に供する。ホルマリンで固定したパラフィン包埋切片を脱パラフィン処理し、そして脱イオン水中で水和する。切片を３％過酸化水素でクエンチし、Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｂｌｏｃｋ（Ｌｉｐｓｈａｗ，Ｐｉｔｔｓｂｕｒｇｈ，ＰＡ）でブロックし、そしてラットモノクローナル抗マウスＢ２２０およびＣＤ３（Ｈａｒｌａｎ，Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）中でインキュベートする。抗体結合を、色素原（ｃｈｒｏｍａｇｅｎ）としてＤＡＢ（ＢｉｏＴｅｋ，Ｓａｎｔａ　Ｂａｒｂａｒａ，ＣＡ）を用いて、ビオチン化ウサギ抗ラット免疫グロブリンおよびペルオキシダーゼ結合体化ストレプトアビジン（ＢｉｏＧｅｎｅｘ，Ｓａｎ　Ｒａｍｏｎ，ＣＡ）によって検出する。切片を、ヘマトキシリンで対比染色する。

【０３０９】

剖検後、トランスジェニック動物およびコントロールの同腹仔由来の脾臓および胸腺のＭＬＮおよび切片を取出す。シリンジの平らな末端を用いて１００ｍｍナイロン性細胞ストレーナー（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ，Ｆｒａｎｋｌｉｎ　Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）の底に対してこの組織を穏やかに粉砕することによって単細胞懸濁物を調製する。細胞を２回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約1×10^{6}細胞を、２０μＬ容量において０．５μｇ　ＣＤ１６／３２（ＦｃγＩＩＩ／ＩＩ）Ｆｃブロックで１０分間インキュベートする。次いで、サンプルを、ＦＩＴＣまたはＰＥに結合体化した、ＣＤ９０．２（Ｔｈｙ－１．２）、ＣＤ４５Ｒ（Ｂ２２０）、ＣＤ１１ｂ（Ｍａｃ－１）、Ｇｒ－１、ＣＤ４またはＣＤ８に対するモノクローナル抗体（ＰｈａｒＭｉｎｇｅｎ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）の０．５μｇ抗体を有する、１００μＬ容量のＰＢＳ（Ca^{+}およびMg^{+}を欠く）、０．１％ウシ血清アルブミンおよび０．０１％アジ化ナトリウム中で２～８℃で３０分間染色する。抗体結合後、細胞を洗浄し、次いでＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ　Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ）でのフローサイトメトリーによって分析する。

【０３１０】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、バリエーションおよび改変が当業者に思い浮かぶことが理解される。それゆえ、添付の特許請求の範囲が、本願発明の範囲内に入る全てのこのような均等なバリエーションを包含することが意図される。

【図面の簡単な説明】

【図１】

図１Ａ～Ｃは、ヒトＢ７－Ｌ遺伝子のヌクレオチド配列（配列番号１）、およびヒトＢ７－Ｌポリペプチドの推定アミノ酸配列（配列番号２）を例示する。推定シグナルペプチドを示す（下線部）。

【図２】

図２Ａ～Ｃは、以下のアミノ酸配列アラインメントを例示する：ヒトＢ７－Ｌポリペプチド（Ａｇｐ１－５１５７８；配列番号２）、ヒトＣＤ８０またはＢ７－１（Ｃｄ８０＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１０；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｐ３３６８１）、ヒトＣＤ８６またはＢ７－２（Ｃｄ８６＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１１；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ０４３４３）、ヒトＢ７－Ｈ１（Ｂ７－Ｈ１＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１２；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＦ１７７９３７）、ヒトＢ７ｒｐ－１（Ｂ７ｒｐ－１＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１３；Ｇ

ｅｎＢａｎｋ登録番号ＡＦ１９９０２８）、ヒトＰＲＯ３５２（Ｐｒｏ３５２＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１４；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｙ４１７０５）、ヒトブチロフィリンＢＴＦ１（Ｂｔｆ１＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１５；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ９０５４３）、ヒトブチロフィリンＢＴＦ２（Ｂｔｓｆ２ａ２＿Ｈｕ；配列番号１６；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ９０５５０）、ヒトブチロフィリンＢＴＦ４（Ｂｔｆ４＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１７；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ９０５４６）、ヒトブチロフィリンＢＴＦ３（Ｂｔｎ３ａ３＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１８；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ９０５４８）、およびブチロフィリン（Ｂｙｎ＿Ｈｕｍａｎ；配列番号１９；ＧｅｎＢａｎｋ登録番号Ｕ３９５７６）。

【図３Ａ】

図３Ａは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列（配列番号４）を例示する。エキソンの位置（下線）およびこのエキソンの推定アミノ酸配列（配列番号５～９）を示す。

【図３Ｂ】

図３Ｂは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列（配列番号４）を例示する。エキソンの位置（下線）およびこのエキソンの推定アミノ酸配列（配列番号５～９）を示す。

【図３Ｃ】

図３Ｃは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列（配列番号４）を例示する。エキソンの位置（下線）およびこのエキソンの推定アミノ酸配列（配列番号５～９）を示す。

【図３Ｄ】

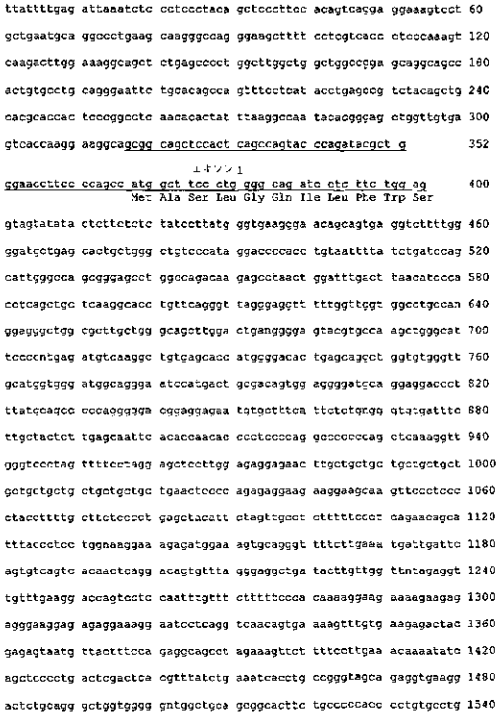
図３Ｄは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列（配列番号４）を例示する。エキソンの位置（下線）およびこのエキソンの推定アミノ酸配列（配列番号５～９）を示す。

【図３Ｅ】

図３Ｅは、ヒトＢ７－Ｌポリペプチドのゲノムヌクレオチド配列（配列番号４）を例示する。エキソンの位置（下線）およびこのエキソンの推定アミノ酸配列（配列番号５～９）を示す。

【図３Ａ】

FIG. 3A

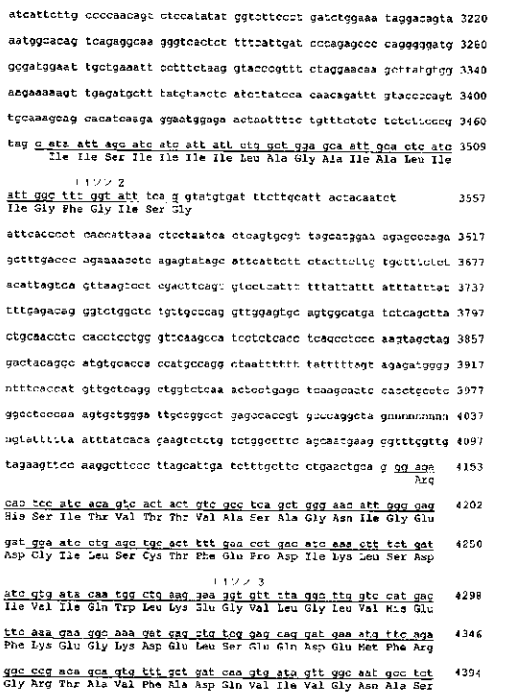


【図３Ｂ】

FIG. 3B

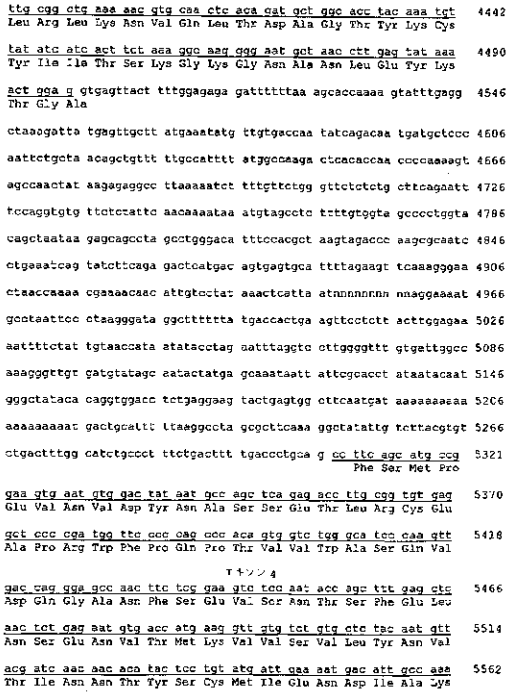
【図３Ｃ】

FIG. 3C



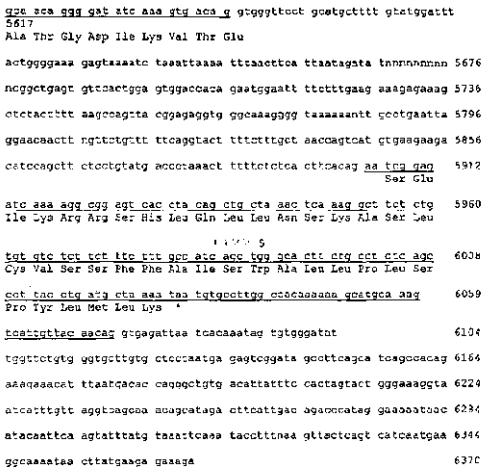
【図３Ｄ】

FIG. 3D



【図３Ｅ】

FIG. 3E


gga aca ggg gat atc aaa gtg aca g gtgggttcct gcatgctttt gtatggattt
5617
Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu
actggggaaa gagtaaaatc taaattaaaa tttaacttca ttaatagata tnnnnnnnnn 5676
ncggctgagt gttcactgga gtggaccaca gaatggaatt ttcttttgaag aaagagaaag 5736
ctctactttt aagccagtta cggagaggtg ggcaaaggggg taaaaaantt gcctgaatta 5796
ggaacaactt ngtttgttt ttcaggtact ttttctttgct aaccagtcat gtgaagaaga 5856
catccagctt ctcctgtatg accctaaact ttttctcttca cttcacag aa trg gag 5912
Ser Glu
atc aaa agg cgg agt cac cta cag ctg cta aac tca aag gct tct ctg 5960
Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu
tgt gtc tct tct ttc ttt gcc atc agc tgg gca ctt ctg cct ctc agc 6008
Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser
cct tac ctg atg ctt aaa taa tgtgccttgg ctcacaaaaa gcatgca aag 6059
Pro Tyr Leu Met Leu Lys *
tcattgttcc aacag gtgagattaa tcacaaatag tgtgggatnt 6104
tggttctgtg ggtgcttgtg ctcctaatga gagtcggata gccttcagca tcagccacag 6164
aaaqaaacat ttaatqacac cagggctgtg acatttatttc cactagtact gggaaaggta 6224
atcatttgtt aggtcagcaa acagcataga cttcattgac agacccatag gaacaatcac 6284
atacaattca agtatttatg taaatcaaa tacctttnaa gttactcagt catcaatgaa 6344
ggcaaaataa cttatgaaga gaaaga 6370

【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
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/02624 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/47

(21) International Application Number: PCT/US01/21297

(22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/215,645 30 June 2000 (30.06.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/215,645 (CON)
Filed on 30 June 2000 (30.06.2000)

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Mailstop 27-4-A, Thousand Oaks, CA 91320-1789 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **FOX, Michael** [US/US]; 35 West Kelley Road, Newbury Park, CA 91320 (US). **SULLIVAN, John, K.** [US/US]; 1085 Rotella Street, Newbury Park, CA 91320 (US). **FANG, Mei** [US/US]; 3648 Fielderest Court, Thosand Oaks, CA 91360 (US).

(74) Agent: **ZUHN, Donald, L.**; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(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, 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, 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, ZW). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *without international search report and to be republished upon receipt of that report*
— *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 02/02624 A2

(54) Title: B7 LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

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

B7-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/215,645, filed on June 30, 2000, the disclosure of which is explicitly incorporated by reference herein.

Field of the Invention

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

Background of the Invention

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

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

object of the invention to identify novel polypeptides, and nucleic acid molecules encoding the same, which have diagnostic or therapeutic benefit.

Summary of the Invention

The present invention relates to novel B7-L nucleic acid molecules and encoded polypeptides.

The invention provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1;

(b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;

(c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of either (b) or (c); and

(d) a nucleotide sequence complementary to either (b) or (c).

The invention also provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or (a);

(c) a region of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (d); and

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

The invention further provides for an isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

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

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

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

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

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

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

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)- (f); and

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

The present invention provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.

The invention also provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3, optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of SEQ ID NO: 2;

(c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2, or is antigenic; and

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 or any of (a) - (c).

The invention further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

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

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

(c) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(d) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2; and

(e) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

The invention still further provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one conservative amino acid substitution selected from the group consisting of: methionine at position 4; leucine or methionine at position 12; leucine or valine at position 13; leucine or valine at position 16; leucine or valine at position 17; leucine, valine, or methionine at position 18; leucine or valine at position 23; leucine at position 26; leucine or valine at position 27; valine or leucine at position 31; leucine or isoleucine at position 39; alanine at position 46; valine at position 48; alanine at position 52; isoleucine at

position 54; glutamic acid at position 61; valine at position 64; glutamic acid at position 66; leucine, methionine, or valine at position 67; valine or leucine at position 69; arginine at position 73; leucine at position 76; valine at position 79; methionine at position 80; tyrosine at position 83; arginine at position 84; aspartic acid at position 85; arginine at position 87; glutamic acid at position 88; aspartic acid at position 92; tyrosine at position 97; lysine at position 98; leucine, isoleucine, or methionine at position 103; isoleucine, leucine, or methionine at position 108; isoleucine at position 115; isoleucine at position 117; leucine or isoleucine at position 120; valine or isoleucine at position 122; serine at position 123; glutamic acid at position 124; serine at position 127; phenylalanine at position 128; arginine at position 129; phenylalanine at position 131; valine at position 132; alanine at position 137; valine or isoleucine at position 143; alanine at position 148; glycine at position 149; isoleucine or methionine at position 155; isoleucine or methionine at position 157; isoleucine at position 166; tyrosine at position 174; isoleucine, leucine, or methionine at position 179; isoleucine at position 180; leucine at position 194; phenylalanine at position 215; serine at position 218; serine at position 222; isoleucine or leucine at position 226; valine or leucine at position 227; leucine or valine at position 231; isoleucine at position 240; aspartic acid at position 242; methionine or leucine at position 245; arginine at position 246; threonine at position 256; valine or isoleucine at position 260; leucine or isoleucine at position 262; leucine or valine at position 268; valine or methionine at position 272; valine at position 273; valine, isoleucine, or methionine at position 275; phenylalanine at position 278; valine or isoleucine at position 279; isoleucine or valine at position 281; and arginine at position 282; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

Also provided are fusion polypeptides comprising B7-L amino acid sequences.

The present invention also provides for an expression vector comprising the isolated nucleic acid molecules as set forth herein, recombinant host cells comprising the recombinant nucleic acid molecules as set forth herein, and a method of producing a B7-L polypeptide comprising culturing the host cells and optionally isolating the polypeptide so produced.

A transgenic non-human animal comprising a nucleic acid molecule encoding a B7-L polypeptide is also encompassed by the invention. The B7-L nucleic acid

molecules are introduced into the animal in a manner that allows expression and increased levels of a B7-L polypeptide, which may include increased circulating levels. Alternatively, the B7-L nucleic acid molecules are introduced into the animal in a manner that prevents expression of endogenous B7-L polypeptide (*i.e.*, generates a transgenic animal possessing a B7-L polypeptide gene knockout). The transgenic non-human animal is preferably a mammal, and more preferably a rodent, such as a rat or a mouse.

Also provided are derivatives of the B7-L polypeptides of the present invention.

Additionally provided are selective binding agents such as antibodies and peptides capable of specifically binding the B7-L polypeptides of the invention. Such antibodies and peptides may be agonistic or antagonistic.

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

The B7-L polypeptides and nucleic acid molecules of the present invention may be used to treat, prevent, ameliorate, and/or detect diseases and disorders, including those recited herein.

The present invention also provides a method of assaying test molecules to identify a test molecule that binds to a B7-L polypeptide. The method comprises contacting a B7-L polypeptide with a test molecule to determine the extent of binding of the test molecule to the polypeptide. The method further comprises determining whether such test molecules are agonists or antagonists of a B7-L polypeptide. The present invention further provides a method of testing the impact of molecules on the expression of B7-L polypeptide or on the activity of B7-L polypeptide.

Methods of regulating expression and modulating (*i.e.*, increasing or decreasing) levels of a B7-L polypeptide are also encompassed by the invention. One method comprises administering to an animal a nucleic acid molecule encoding a B7-L polypeptide. In another method, a nucleic acid molecule comprising elements that regulate or modulate the expression of a B7-L polypeptide may be administered.

Examples of these methods include gene therapy, cell therapy, and anti-sense therapy as further described herein.

In another aspect of the present invention, the B7-L polypeptides may be used for identifying receptors thereof ("B7-L polypeptide receptors"). Various forms of "expression cloning" have been extensively used to clone receptors for protein ligands. *See, e.g.*, Simonsen and Lodish, 1994, *Trends Pharmacol. Sci.* 15:437-41 and Tartaglia *et al.*, 1995, *Cell* 83:1263-71. The isolation of a B7-L polypeptide receptor is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the B7-L polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble B7-L polypeptide receptors, anti-B7-L polypeptide receptor-selective binding agents (such as antibodies and derivatives thereof), small molecules, and antisense oligonucleotides, any of which can be used for treating one or more disease or disorder, including those disclosed herein.

Brief Description of the Figures

Figures 1A-1C illustrate the nucleotide sequence of the human B7-L gene (SEQ ID NO: 1) and the deduced amino acid sequence of human B7-L polypeptide (SEQ ID NO: 2). The predicted signal peptide is indicated (underline);

Figures 2A-2C illustrate an amino acid sequence alignment of human B7-L polypeptide (Agp1-51578; SEQ ID NO: 2), human CD80 or B7-1 (Cd80_Human; SEQ ID NO: 10; GenBank accession no. P33681), human CD86 or B7-2 (Cd86_Human; SEQ ID NO: 11; GenBank accession no. U04343), human B7-H1 (B7-H1_Human; SEQ ID NO: 12; GenBank accession no. AF177937), human B7rp-1 (B7rp-1_Human; SEQ ID NO: 13; GenBank accession no. AF199028), human PRO352 (Pro352_Human; SEQ ID NO: 14; GenBank accession no. Y41705), human butyrophilin BTF1 (Btf1_Human; SEQ ID NO: 15; GenBank accession no. U90543), human butyrophilin BTF2 (Btsf2a2_Hu; SEQ ID NO: 16; GenBank accession no. U90550), human butyrophilin BTF4 (Btf4_Human; SEQ ID NO: 17; GenBank accession no. U90546), human butyrophilin BTF3 (Btn3a3_Human; SEQ ID NO: 18; GenBank accession no. U90548), and butyrophilin (Byn_Human; SEQ ID NO: 19; GenBank accession no. U39576);

Figures 3A-3B illustrate the genomic nucleotide sequence for human B7-L polypeptide (SEQ ID NO: 4). The location of the exons (underline) and the deduced amino acid sequences of the exons (SEQ ID NOS: 5-9) are indicated.

Detailed Description of the Invention

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

Definitions

The terms "B7-L gene" or "B7-L nucleic acid molecule" or "B7-L polynucleotide" refer to a nucleic acid molecule comprising or consisting of a nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, and nucleic acid molecules as defined herein.

The term "B7-L polypeptide allelic variant" refers to one of several possible naturally occurring alternate forms of a gene occupying a given locus on a chromosome of an organism or a population of organisms.

The term "B7-L polypeptide splice variant" refers to a nucleic acid molecule, usually RNA, which is generated by alternative processing of intron sequences in an RNA transcript of B7-L polypeptide amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.

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

The term "nucleic acid sequence" or "nucleic acid molecule" refers to a DNA or RNA sequence. The term encompasses molecules formed from any of the known base analogs of DNA and RNA such as, but not limited to 4-acetylcytosine, 8-hydroxy-N6-methyladenosine, aziridinyl-cytosine, pseudoisocytosine, 5-(carboxyhydroxylmethyl) uracil, 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouracil, 5-carboxy-methylaminomethyluracil, dihydrouracil, inosine, N6-iso-pentenyladenine, 1-methyladenine, 1-methylpseudouracil, 1-methylguanine, 1-methylinosine, 2,2-dimethyl-guanine, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-methyladenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyamino-methyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5'-methoxycarbonyl-methyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, oxybutoxosine, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, N-uracil-5-oxyacetic acid methylester, uracil-5-oxyacetic acid, pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, and 2,6-diaminopurine.

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

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

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

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

The term "B7-L polypeptide" refers to a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 and related polypeptides. Related polypeptides include B7-L polypeptide fragments, B7-L polypeptide orthologs, B7-L polypeptide variants, and B7-L polypeptide derivatives, which possess at least one activity of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2. B7-L polypeptides may be mature polypeptides, as defined herein, and may or may not have an amino-terminal methionine residue, depending on the method by which they are prepared.

The term "B7-L polypeptide fragment" refers to a polypeptide that comprises a truncation at the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or a truncation at the carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2. The term "B7-L polypeptide fragment" also refers to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of B7-L polypeptide orthologs, B7-L polypeptide derivatives, or B7-L polypeptide variants, or to amino-terminal and/or carboxyl-terminal truncations of the polypeptides encoded by B7-L polypeptide allelic variants or B7-L polypeptide splice variants. B7-L polypeptide fragments may result from alternative RNA splicing or from *in vivo* protease activity. Membrane-bound forms of a B7-L polypeptide are also contemplated by the present invention. In preferred embodiments, truncations and/or deletions comprise about 10 amino acids, or about 20 amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or more than about 100 amino acids. The polypeptide fragments so produced will comprise about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids. Such B7-L polypeptide fragments may optionally comprise an amino-terminal methionine residue. It will be appreciated that such fragments can be used, for example, to generate antibodies to B7-L polypeptides.

The term "B7-L polypeptide ortholog" refers to a polypeptide from another species that corresponds to B7-L polypeptide amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2. For example, mouse and human B7-L polypeptides are considered orthologs of each other.

The term "B7-L polypeptide variants" refers to B7-L polypeptides comprising amino acid sequences having one or more amino acid sequence substitutions, deletions (such as internal deletions and/or B7-L polypeptide fragments), and/or additions (such as internal additions and/or B7-L fusion polypeptides) as compared to the B7-L polypeptide amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 (with or without a leader sequence). Variants may be naturally occurring (*e.g.*, B7-L polypeptide allelic variants, B7-L polypeptide orthologs, and B7-L polypeptide splice variants) or artificially constructed. Such B7-L polypeptide variants may be prepared from the corresponding nucleic acid molecules having a DNA sequence that varies accordingly from the DNA sequence as set forth in SEQ ID NO: 1. In preferred embodiments, the variants have from 1 to 3, or from 1 to 5, or from 1 to 10, or from 1 to 15, or from 1 to 20, or from 1 to 25, or from 1 to 50, or from 1 to 75, or from 1 to 100, or more than 100 amino acid substitutions, insertions, additions and/or deletions, wherein the substitutions may be conservative, or non-conservative, or any combination thereof.

The term "B7-L polypeptide derivatives" refers to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, B7-L polypeptide fragments, B7-L polypeptide orthologs, or B7-L polypeptide variants, as defined herein, that have been chemically modified. The term "B7-L polypeptide derivatives" also refers to the polypeptides encoded by B7-L polypeptide allelic variants or B7-L polypeptide splice variants, as defined herein, that have been chemically modified.

The term "mature B7-L polypeptide" refers to a B7-L polypeptide lacking a leader sequence. A mature B7-L polypeptide may also include other modifications such as proteolytic processing of the amino-terminus (with or without a leader sequence) and/or the carboxyl-terminus, cleavage of a smaller polypeptide from a larger precursor, N-linked and/or O-linked glycosylation, and the like. An exemplary mature B7-L polypeptide is depicted by the amino acid sequence of SEQ ID NO: 3.

The term "B7-L fusion polypeptide" refers to a fusion of one or more amino acids (such as a heterologous protein or peptide) at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, B7-L polypeptide fragments, B7-L polypeptide orthologs, B7-L polypeptide variants, or B7-L derivatives, as defined herein. The term "B7-L fusion polypeptide" also refers to a fusion of one or more amino acids at the amino- or carboxyl-terminus of the polypeptide encoded by B7-L polypeptide allelic variants or B7-L polypeptide splice variants, as defined herein.

The term "biologically active B7-L polypeptides" refers to B7-L polypeptides having at least one activity characteristic of the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2. In addition, a B7-L polypeptide may be active as an immunogen; that is, the B7-L polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised.

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

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

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

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

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

The terms "effective amount" and "therapeutically effective amount" each refer to the amount of a B7-L polypeptide or B7-L nucleic acid molecule used to support an observable level of one or more biological activities of the B7-L polypeptides as set forth herein.

The term "pharmaceutically acceptable carrier" or "physiologically acceptable carrier" as used herein refers to one or more formulation materials suitable for accomplishing or enhancing the delivery of the B7-L polypeptide, B7-L nucleic acid molecule, or B7-L selective binding agent as a pharmaceutical composition.

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

The term "selective binding agent" refers to a molecule or molecules having specificity for a B7-L polypeptide. As used herein, the terms, "specific" and "specificity" refer to the ability of the selective binding agents to bind to human B7-L polypeptides and not to bind to human non-B7-L polypeptides. It will be appreciated, however, that the selective binding agents may also bind orthologs of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, that is, interspecies versions thereof, such as mouse and rat B7-L polypeptides.

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

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

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

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

Relatedness of Nucleic Acid Molecules and/or Polypeptides

It is understood that related nucleic acid molecules include allelic or splice variants of the nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1, and include sequences which are complementary to any of the above nucleotide sequences. Related nucleic acid molecules also include a nucleotide sequence encoding a polypeptide comprising or consisting essentially of a substitution, modification, addition and/or deletion of one or more amino acid residues compared to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2. Such related B7-L polypeptides may comprise, for example, an addition and/or a deletion of one or more N-linked or O-linked glycosylation sites or an addition and/or a deletion of one or more cysteine residues.

Related nucleic acid molecules also include fragments of B7-L nucleic acid molecules which encode a polypeptide of at least about 25 contiguous amino acids, or about 50 amino acids, or about 75 amino acids, or about 100 amino acids, or about 150 amino acids, or about 200 amino acids, or more than 200 amino acid residues of the B7-L polypeptide of SEQ ID NO: 2.

In addition, related B7-L nucleic acid molecules also include those molecules which comprise nucleotide sequences which hybridize under moderately or highly stringent conditions as defined herein with the fully complementary sequence of the B7-L nucleic acid molecule of SEQ ID NO: 1, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 2, or of a nucleic acid fragment as defined herein, or of a nucleic acid

fragment encoding a polypeptide as defined herein. Hybridization probes may be prepared using the B7-L sequences provided herein to screen cDNA, genomic or synthetic DNA libraries for related sequences. Regions of the DNA and/or amino acid sequence of B7-L polypeptide that exhibit significant identity to known sequences are readily determined using sequence alignment algorithms as described herein and those regions may be used to design probes for screening.

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

More stringent conditions (such as higher temperature, lower ionic strength, higher formamide, or other denaturing agent) may also be used – however, the rate of hybridization will be affected. Other agents may be included in the hybridization and washing buffers for the purpose of reducing non-specific and/or background hybridization. Examples are 0.1% bovine serum albumin, 0.1% polyvinyl-pyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, $NaDodSO_4$, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength conditions, the rate of hybridization is nearly independent of pH. *See* Anderson *et al.*, *Nucleic Acid Hybridisation: A Practical Approach* Ch. 4 (IRL Press Limited).

Factors affecting the stability of DNA duplex include base composition, length, and degree of base pair mismatch. Hybridization conditions can be adjusted by one skilled in the art in order to accommodate these variables and allow DNAs of

different sequence relatedness to form hybrids. The melting temperature of a perfectly matched DNA duplex can be estimated by the following equation:

$T_m(°C) = 81.5 + 16.6(\log[Na+]) + 0.41(\%G+C) - 600/N - 0.72(\%formamide)$

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

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

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

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

Tm = 2°C per A-T base pair + 4°C per G-C base pair

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

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

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO: 1, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent,

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

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

Conservative modifications to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 (and the corresponding modifications to the encoding nucleotides) will produce a polypeptide having functional and chemical characteristics similar to those of B7-L polypeptides. In contrast, substantial modifications in the functional and/or chemical characteristics of B7-L polypeptides may be accomplished by selecting substitutions in the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2 that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the molecular backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain.

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

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

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

1) hydrophobic: norleucine, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

2) neutral hydrophilic: Cys, Ser, Thr;

3) acidic: Asp, Glu;

4) basic: Asn, Gln, His, Lys, Arg;

5) residues that influence chain orientation: Gly, Pro; and

6) aromatic: Trp, Tyr, Phe.

For example, non-conservative substitutions may involve the exchange of a member of one of these classes for a member from another class. Such substituted residues may be introduced into regions of the human B7-L polypeptide that are homologous with non-human B7-L polypeptides, or into the non-homologous regions of the molecule.

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

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

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

The following hydrophilicity values have been assigned to these amino acid residues: arginine (+3.0); lysine (+3.0); aspartate (+3.0 ± 1); glutamate (+3.0 ± 1); serine (+0.3); asparagine (+0.2); glutamine (+0.2); glycine (0); threonine (-0.4); proline (-0.5 ± 1); alanine (-0.5); histidine (-0.5); cysteine (-1.0); methionine (-1.3);

valine (-1.5); leucine (-1.8); isoleucine (-1.8); tyrosine (-2.3); phenylalanine (-2.5); and tryptophan (-3.4). In making changes based upon similar hydrophilicity values, the substitution of amino acids whose hydrophilicity values are within ±2 is preferred, those that are within ±1 are particularly preferred, and those within ±0.5 are even more particularly preferred. One may also identify epitopes from primary amino acid sequences on the basis of hydrophilicity. These regions are also referred to as "epitopic core regions."

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the B7-L polypeptide, or to increase or decrease the affinity of the B7-L polypeptides described herein. Exemplary amino acid substitutions are set forth in Table I.

Table I

Amino Acid Substitutions

Original Residues	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala	Val, Leu, Ile	Val
Arg	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser, Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro, Ala	Ala
His	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile	Leu, Val, Met, Ala, Phe, Norleucine	Leu
Leu	Norleucine, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys	Arg, 1,4 Diamino-butyric Acid, Gln, Asn	Arg
Met	Leu, Phe, Ile	Leu

Phe	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr, Ala, Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr, Phe	Tyr
Tyr	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val	Ile, Met, Leu, Phe, Ala, Norleucine	Leu

A skilled artisan will be able to determine suitable variants of the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 using well-known techniques. For identifying suitable areas of the molecule that may be changed without destroying biological activity, one skilled in the art may target areas not believed to be important for activity. For example, when similar polypeptides with similar activities from the same species or from other species are known, one skilled in the art may compare the amino acid sequence of a B7-L polypeptide to such similar polypeptides. With such a comparison, one can identify residues and portions of the molecules that are conserved among similar polypeptides. It will be appreciated that changes in areas of the B7-L molecule that are not conserved relative to such similar polypeptides would be less likely to adversely affect the biological activity and/or structure of a B7-L polypeptide. One skilled in the art would also know that, even in relatively conserved regions, one may substitute chemically similar amino acids for the naturally occurring residues while retaining activity (conservative amino acid residue substitutions). Therefore, even areas that may be important for biological activity or for structure may be subject to conservative amino acid substitutions without destroying the biological activity or without adversely affecting the polypeptide structure.

Additionally, one skilled in the art can review structure-function studies identifying residues in similar polypeptides that are important for activity or structure. In view of such a comparison, one can predict the importance of amino acid residues in a B7-L polypeptide that correspond to amino acid residues that are important for activity or structure in similar polypeptides. One skilled in the art may opt for

chemically similar amino acid substitutions for such predicted important amino acid residues of B7-L polypeptides.

One skilled in the art can also analyze the three-dimensional structure and amino acid sequence in relation to that structure in similar polypeptides. In view of such information, one skilled in the art may predict the alignment of amino acid residues of B7-L polypeptide with respect to its three dimensional structure. One skilled in the art may choose not to make radical changes to amino acid residues predicted to be on the surface of the protein, since such residues may be involved in important interactions with other molecules. Moreover, one skilled in the art may generate test variants containing a single amino acid substitution at each amino acid residue. The variants could be screened using activity assays known to those with skill in the art. Such variants could be used to gather information about suitable variants. For example, if one discovered that a change to a particular amino acid residue resulted in destroyed, undesirably reduced, or unsuitable activity, variants with such a change would be avoided. In other words, based on information gathered from such routine experiments, one skilled in the art can readily determine the amino acids where further substitutions should be avoided either alone or in combination with other mutations.

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. *See* Moult, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins that have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural topologies. The recent growth of the protein structural database (PDB) has provided enhanced predictability of secondary structure, including the potential number of folds within the structure of a polypeptide or protein. *See* Holm *et al.*, 1999, *Nucleic Acids Res.* 27:244-47. It has been suggested that there are a limited number of folds in a given polypeptide or protein and that once a critical number of structures have been resolved, structural prediction will become dramatically more accurate (Brenner *et al.*, 1997, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7:369-76).

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

Preferred B7-L polypeptide variants include glycosylation variants wherein the number and/or type of glycosylation sites have been altered compared to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2. In one embodiment, B7-L polypeptide variants comprise a greater or a lesser number of N-linked glycosylation sites than the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2. An N-linked glycosylation site is characterized by the sequence: Asn-X-Ser or Asn-X-Thr, wherein the amino acid residue designated as X may be any amino acid residue except proline. The substitution of amino acid residues to create this sequence provides a potential new site for the addition of an N-linked carbohydrate chain. Alternatively, substitutions that eliminate this sequence will remove an existing N-linked carbohydrate chain. Also provided is a rearrangement of N-linked carbohydrate chains wherein one or more N-linked glycosylation sites (typically those that are naturally occurring) are eliminated and one or more new N-linked sites are created. Additional preferred B7-L variants include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (e.g., serine) as compared to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2. Cysteine variants are useful when B7-L polypeptides must be refolded into a biologically active conformation such as after the isolation of insoluble inclusion bodies. Cysteine variants generally have fewer cysteine residues than the native protein, and typically have an even number to minimize interactions resulting from unpaired cysteines.

In other embodiments, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 wherein the polypeptide has a

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

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide, may be fused to a homologous polypeptide to form a homodimer or to a heterologous polypeptide to form a heterodimer. Heterologous peptides and polypeptides include, but are not limited to: an epitope to allow for the detection and/or isolation of a B7-L fusion polypeptide; a transmembrane receptor protein or a portion thereof, such as an extracellular domain or a transmembrane and intracellular domain; a ligand or a portion thereof which binds to a transmembrane receptor protein; an enzyme or portion thereof which is catalytically active; a polypeptide or peptide which promotes oligomerization, such as a leucine zipper domain; a polypeptide or peptide which increases stability, such as an immunoglobulin constant region; and a polypeptide which has a therapeutic activity different from the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide.

Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide. Fusions may be direct with no linker or adapter molecule or may be through a linker or adapter molecule. A linker or adapter molecule may be one or more amino acid residues, typically from about 20 to about 50 amino acid residues. A linker or adapter molecule may also be designed with a cleavage site for a DNA restriction endonuclease or for a protease to allow for the separation of the fused moieties. It will be appreciated that once constructed, the fusion polypeptides can be derivatized according to the methods described herein.

In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide, is fused to one or more domains of an Fc region of human IgG. Antibodies comprise two functionally independent parts, a variable domain known as "Fab," that binds an antigen, and a constant domain known as "Fc," that is involved in effector functions such as

complement activation and attack by phagocytic cells. An Fc has a long serum half-life, whereas an Fab is short-lived. Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337:525-31. When constructed together with a therapeutic protein, an Fc domain can provide longer half-life or incorporate such functions as Fc receptor binding, protein A binding, complement fixation, and perhaps even placental transfer. *Id.* Table II summarizes the use of certain Fc fusions known in the art.

Table II

Fc Fusion with Therapeutic Proteins

Form of Fc	Fusion partner	Therapeutic implications	Reference
IgG1	N-terminus of CD30-L	Hodgkin's disease; anaplastic lymphoma; T-cell leukemia	U.S. Patent No. 5,480,981
Murine Fcγ2a	IL-10	anti-inflammatory; transplant rejection	Zheng *et al.*, 1995, *J. Immunol.* 154:5590-600
IgG1	TNF receptor	septic shock	Fisher *et al.*, 1996, *N. Engl. J. Med.* 334:1697-1702; Van Zee *et al.*, 1996, *J. Immunol.* 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, or IgE (excluding the first domain)	TNF receptor	inflammation, autoimmune disorders	U.S. Patent No. 5,808,029
IgG1	CD4 receptor	AIDS	Capon *et al.*, 1989, *Nature* 337: 525-31
IgG1, IgG3	N-terminus of IL-2	anti-cancer, antiviral	Harvill *et al.*, 1995, *Immunotech.* 1:95-105
IgG1	C-terminus of OPG	osteoarthritis; bone density	WO 97/23614
IgG1	N-terminus of leptin	anti-obesity	PCT/US 97/23183, filed December 11, 1997
Human Ig Cγ1	CTLA-4	autoimmune disorders	Linsley, 1991, *J. Exp. Med.*, 174:561-69

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the B7-L polypeptides using methods known to the skilled artisan. In another example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of a B7-L polypeptide fragment (e.g., the predicted extracellular portion of B7-L polypeptide).

The resulting B7-L fusion polypeptide may be purified by use of a Protein A affinity column. Peptides and proteins fused to an Fc region have been found to exhibit a substantially greater half-life *in vivo* than the unfused counterpart. Also, a fusion to an Fc region allows for dimerization/multimerization of the fusion polypeptide. The Fc region may be a naturally occurring Fc region, or may be altered to improve certain qualities, such as therapeutic qualities, circulation time, or reduced aggregation.

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

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

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

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

Preferred parameters for polypeptide sequence comparison include the following:

Algorithm: Needleman and Wunsch, 1970, *J. Mol. Biol.* 48:443-53;
Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff *et al., supra*);
Gap Penalty: 12
Gap Length Penalty: 4
Threshold of Similarity: 0

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

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

Algorithm: Needleman and Wunsch, *supra*;
Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0
Gap Penalty: 50
Gap Length Penalty: 3

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

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

Nucleic Acid Molecules

The nucleic acid molecules encoding a polypeptide comprising the amino acid sequence of a B7-L polypeptide can readily be obtained in a variety of ways including, without limitation, chemical synthesis, cDNA or genomic library screening, expression library screening, and/or PCR amplification of cDNA.

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

Where a gene encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide has been identified from one species, all or a portion of that gene may be used as a probe to identify orthologs or related genes from the same species. The probes or primers may be used to screen cDNA libraries from various tissue sources believed to express the B7-L polypeptide. In addition, part or all of a nucleic acid molecule having the sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 may be used to screen a genomic library to identify and isolate a gene encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide. Typically, conditions of moderate or high stringency will be employed for screening to minimize the number of false positives obtained from the screening.

Nucleic acid molecules encoding the amino acid sequence of B7-L polypeptides may also be identified by expression cloning which employs the

detection of positive clones based upon a property of the expressed protein. Typically, nucleic acid libraries are screened by the binding an antibody or other binding partner (e.g., receptor or ligand) to cloned proteins that are expressed and displayed on a host cell surface. The antibody or binding partner is modified with a detectable label to identify those cells expressing the desired clone.

Recombinant expression techniques conducted in accordance with the descriptions set forth below may be followed to produce these polynucleotides and to express the encoded polypeptides. For example, by inserting a nucleic acid sequence that encodes the amino acid sequence of a B7-L polypeptide into an appropriate vector, one skilled in the art can readily produce large quantities of the desired nucleotide sequence. The sequences can then be used to generate detection probes or amplification primers. Alternatively, a polynucleotide encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide can be inserted into an expression vector. By introducing the expression vector into an appropriate host, the encoded B7-L polypeptide may be produced in large amounts.

Another method for obtaining a suitable nucleic acid sequence is the polymerase chain reaction (PCR). In this method, cDNA is prepared from poly(A)+RNA or total RNA using the enzyme reverse transcriptase. Two primers, typically complementary to two separate regions of cDNA encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide, are then added to the cDNA along with a polymerase such as *Taq* polymerase, and the polymerase amplifies the cDNA region between the two primers.

Another means of preparing a nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide is chemical synthesis using methods well known to the skilled artisan such as those described by Engels *et al.*, 1989, *Angew. Chem. Intl. Ed.* 28:716-34. These methods include, *inter alia*, the phosphotriester, phosphoramidite, and H-phosphonate methods for nucleic acid synthesis. A preferred method for such chemical synthesis is polymer-supported synthesis using standard phosphoramidite chemistry. Typically, the DNA encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide will be several hundred nucleotides in length. Nucleic acids larger than about 100 nucleotides can be synthesized as several fragments using these methods. The fragments can then be ligated together to form the full-length nucleotide sequence of a B7-L gene. Usually, the DNA fragment encoding the amino-terminus of the polypeptide will have an ATG, which encodes a methionine

residue. This methionine may or may not be present on the mature form of the B7-L polypeptide, depending on whether the polypeptide produced in the host cell is designed to be secreted from that cell. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

In certain embodiments, nucleic acid variants contain codons which have been altered for optimal expression of a B7-L polypeptide in a given host cell. Particular codon alterations will depend upon the B7-L polypeptide and host cell selected for expression. Such "codon optimization" can be carried out by a variety of methods, for example, by selecting codons which are preferred for use in highly expressed genes in a given host cell. Computer algorithms which incorporate codon frequency tables such as "Eco_high.Cod" for codon preference of highly expressed bacterial genes may be used and are provided by the University of Wisconsin Package Version 9.0 (Genetics Computer Group, Madison, WI). Other useful codon frequency tables include "Celegans_high.cod," "Celegans_low.cod," "Drosophila_high.cod," "Human_high.cod," "Maize_high.cod," and "Yeast_high.cod."

In some cases, it may be desirable to prepare nucleic acid molecules encoding B7-L polypeptide variants. Nucleic acid molecules encoding variants may be produced using site directed mutagenesis, PCR amplification, or other appropriate methods, where the primer(s) have the desired point mutations (*see* Sambrook *et al.*, *supra*, and Ausubel *et al.*, *supra*, for descriptions of mutagenesis techniques). Chemical synthesis using methods described by Engels *et al.*, *supra*, may also be used to prepare such variants. Other methods known to the skilled artisan may be used as well.

Vectors and Host Cells

A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide is inserted into an appropriate expression vector using standard ligation techniques. The vector is typically selected to be functional in the particular host cell employed (*i.e.*, the vector is compatible with the host cell machinery such that amplification of the gene and/or expression of the gene can occur). A nucleic acid molecule encoding the amino acid sequence of a B7-L polypeptide may be amplified/expressed in prokaryotic, yeast, insect (baculovirus systems) and/or eukaryotic host cells. Selection of the host cell will depend in part on whether a B7-L polypeptide is to be post-translationally modified (*e.g.*, glycosylated and/or

phosphorylated). If so, yeast, insect, or mammalian host cells are preferable. For a review of expression vectors, *see Meth. Enz.*, vol. 185 (D.V. Goeddel, ed., Academic Press 1990).

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

Optionally, the vector may contain a "tag"-encoding sequence, *i.e.*, an oligonucleotide molecule located at the 5' or 3' end of the B7-L polypeptide coding sequence; the oligonucleotide sequence encodes polyHis (such as hexaHis), or another "tag" such as FLAG, HA (hemaglutinin influenza virus), or *myc* for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the B7-L polypeptide from the host cell. Affinity purification can be accomplished, for example, by column chromatography using antibodies against the tag as an affinity matrix. Optionally, the tag can subsequently be removed from the purified B7-L polypeptide by various means such as using certain peptidases for cleavage.

Flanking sequences may be homologous (*i.e.*, from the same species and/or strain as the host cell), heterologous (*i.e.*, from a species other than the host cell species or strain), hybrid (*i.e.*, a combination of flanking sequences from more than one source), or synthetic, or the flanking sequences may be native sequences that normally function to regulate B7-L polypeptide expression. As such, the source of a flanking sequence may be any prokaryotic or eukaryotic organism, any vertebrate or invertebrate organism, or any plant, provided that the flanking sequence is functional in, and can be activated by, the host cell machinery.

Flanking sequences useful in the vectors of this invention may be obtained by any of several methods well known in the art. Typically, flanking sequences useful herein – other than the B7-L gene flanking sequences – will have been previously identified by mapping and/or by restriction endonuclease digestion and can thus be isolated from the proper tissue source using the appropriate restriction endonucleases. In some cases, the full nucleotide sequence of a flanking sequence may be known. Here, the flanking sequence may be synthesized using the methods described herein for nucleic acid synthesis or cloning.

Where all or only a portion of the flanking sequence is known, it may be obtained using PCR and/or by screening a genomic library with a suitable oligonucleotide and/or flanking sequence fragment from the same or another species. Where the flanking sequence is not known, a fragment of DNA containing a flanking sequence may be isolated from a larger piece of DNA that may contain, for example, a coding sequence or even another gene or genes. Isolation may be accomplished by restriction endonuclease digestion to produce the proper DNA fragment followed by isolation using agarose gel purification, Qiagen® column chromatography (Chatsworth, CA), or other methods known to the skilled artisan. The selection of suitable enzymes to accomplish this purpose will be readily apparent to one of ordinary skill in the art.

An origin of replication is typically a part of those prokaryotic expression vectors purchased commercially, and the origin aids in the amplification of the vector in a host cell. Amplification of the vector to a certain copy number can, in some cases, be important for the optimal expression of a B7-L polypeptide. If the vector of choice does not contain an origin of replication site, one may be chemically synthesized based on a known sequence, and ligated into the vector. For example, the origin of replication from the plasmid pBR322 (New England Biolabs, Beverly, MA) is suitable for most gram-negative bacteria and various origins (e.g., SV40, polyoma, adenovirus, vesicular stomatitus virus (VSV), or papillomaviruses such as HPV or BPV) are useful for cloning vectors in mammalian cells. Generally, the origin of replication component is not needed for mammalian expression vectors (for example, the SV40 origin is often used only because it contains the early promoter).

A transcription termination sequence is typically located 3' of the end of a polypeptide coding region and serves to terminate transcription. Usually, a transcription termination sequence in prokaryotic cells is a G-C rich fragment

followed by a poly-T sequence. While the sequence is easily cloned from a library or even purchased commercially as part of a vector, it can also be readily synthesized using methods for nucleic acid synthesis such as those described herein.

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

Other selection genes may be used to amplify the gene that will be expressed. Amplification is the process wherein genes that are in greater demand for the production of a protein critical for growth are reiterated in tandem within the chromosomes of successive generations of recombinant cells. Examples of suitable selectable markers for mammalian cells include dihydrofolate reductase (DHFR) and thymidine kinase. The mammalian cell transformants are placed under selection pressure wherein only the transformants are uniquely adapted to survive by virtue of the selection gene present in the vector. Selection pressure is imposed by culturing the transformed cells under conditions in which the concentration of selection agent in the medium is successively changed, thereby leading to the amplification of both the selection gene and the DNA that encodes a B7-L polypeptide. As a result, increased quantities of B7-L polypeptide are synthesized from the amplified DNA.

A ribosome binding site is usually necessary for translation initiation of mRNA and is characterized by a Shine-Dalgarno sequence (prokaryotes) or a Kozak sequence (eukaryotes). The element is typically located 3' to the promoter and 5' to the coding sequence of a B7-L polypeptide to be expressed. The Shine-Dalgarno sequence is varied but is typically a polypurine (*i.e.*, having a high A-G content). Many Shine-Dalgarno sequences have been identified, each of which can be readily synthesized using methods set forth herein and used in a prokaryotic vector.

A leader, or signal, sequence may be used to direct a B7-L polypeptide out of the host cell. Typically, a nucleotide sequence encoding the signal sequence is positioned in the coding region of a B7-L nucleic acid molecule, or directly at the 5'

end of a B7-L polypeptide coding region. Many signal sequences have been identified, and any of those that are functional in the selected host cell may be used in conjunction with a B7-L nucleic acid molecule. Therefore, a signal sequence may be homologous (naturally occurring) or heterologous to the B7-L nucleic acid molecule. Additionally, a signal sequence may be chemically synthesized using methods described herein. In most cases, the secretion of a B7-L polypeptide from the host cell via the presence of a signal peptide will result in the removal of the signal peptide from the secreted B7-L polypeptide. The signal sequence may be a component of the vector, or it may be a part of a B7-L nucleic acid molecule that is inserted into the vector.

Included within the scope of this invention is the use of either a nucleotide sequence encoding a native B7-L polypeptide signal sequence joined to a B7-L polypeptide coding region or a nucleotide sequence encoding a heterologous signal sequence joined to a B7-L polypeptide coding region. The heterologous signal sequence selected should be one that is recognized and processed, *i.e.*, cleaved by a signal peptidase, by the host cell. For prokaryotic host cells that do not recognize and process the native B7-L polypeptide signal sequence, the signal sequence is substituted by a prokaryotic signal sequence selected, for example, from the group of the alkaline phosphatase, penicillinase, or heat-stable enterotoxin II leaders. For yeast secretion, the native B7-L polypeptide signal sequence may be substituted by the yeast invertase, alpha factor, or acid phosphatase leaders. In mammalian cell expression the native signal sequence is satisfactory, although other mammalian signal sequences may be suitable.

In some cases, such as where glycosylation is desired in a eukaryotic host cell expression system, one may manipulate the various presequences to improve glycosylation or yield. For example, one may alter the peptidase cleavage site of a particular signal peptide, or add pro-sequences, which also may affect glycosylation. The final protein product may have, in the -1 position (relative to the first amino acid of the mature protein) one or more additional amino acids incident to expression, which may not have been totally removed. For example, the final protein product may have one or two amino acid residues found in the peptidase cleavage site, attached to the amino-terminus. Alternatively, use of some enzyme cleavage sites may result in a slightly truncated form of the desired B7-L polypeptide, if the enzyme cuts at such area within the mature polypeptide.

In many cases, transcription of a nucleic acid molecule is increased by the presence of one or more introns in the vector; this is particularly true where a polypeptide is produced in eukaryotic host cells, especially mammalian host cells. The introns used may be naturally occurring within the B7-L gene especially where the gene used is a full-length genomic sequence or a fragment thereof. Where the intron is not naturally occurring within the gene (as for most cDNAs), the intron may be obtained from another source. The position of the intron with respect to flanking sequences and the B7-L gene is generally important, as the intron must be transcribed to be effective. Thus, when a B7-L cDNA molecule is being transcribed, the preferred position for the intron is 3' to the transcription start site and 5' to the poly-A transcription termination sequence. Preferably, the intron or introns will be located on one side or the other (*i.e.*, 5' or 3') of the cDNA such that it does not interrupt the coding sequence. Any intron from any source, including viral, prokaryotic and eukaryotic (plant or animal) organisms, may be used to practice this invention, provided that it is compatible with the host cell into which it is inserted. Also included herein are synthetic introns. Optionally, more than one intron may be used in the vector.

The expression and cloning vectors of the present invention will typically contain a promoter that is recognized by the host organism and operably linked to the molecule encoding the B7-L polypeptide. Promoters are untranscribed sequences located upstream (*i.e.*, 5') to the start codon of a structural gene (generally within about 100 to 1000 bp) that control the transcription of the structural gene. Promoters are conventionally grouped into one of two classes: inducible promoters and constitutive promoters. Inducible promoters initiate increased levels of transcription from DNA under their control in response to some change in culture conditions, such as the presence or absence of a nutrient or a change in temperature. Constitutive promoters, on the other hand, initiate continual gene product production; that is, there is little or no control over gene expression. A large number of promoters, recognized by a variety of potential host cells, are well known. A suitable promoter is operably linked to the DNA encoding B7-L polypeptide by removing the promoter from the source DNA by restriction enzyme digestion and inserting the desired promoter sequence into the vector. The native B7-L promoter sequence may be used to direct amplification and/or expression of a B7-L nucleic acid molecule. A heterologous promoter is preferred, however, if it permits greater transcription and higher yields of

the expressed protein as compared to the native promoter, and if it is compatible with the host cell system that has been selected for use.

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

Suitable promoters for use with yeast hosts are also well known in the art. Yeast enhancers are advantageously used with yeast promoters. Suitable promoters for use with mammalian host cells are well known and include, but are not limited to, those obtained from the genomes of viruses such as polyoma virus, fowlpox virus, adenovirus (such as Adenovirus 2), bovine papilloma virus, avian sarcoma virus, cytomegalovirus, retroviruses, hepatitis-B virus and most preferably Simian Virus 40 (SV40). Other suitable mammalian promoters include heterologous mammalian promoters, for example, heat-shock promoters and the actin promoter.

Additional promoters which may be of interest in controlling B7-L gene expression include, but are not limited to: the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-10); the CMV promoter; the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, *et al.*, 1980, *Cell* 22:787-97); the herpes thymidine kinase promoter (Wagner *et al.*, 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78:1444-45); the regulatory sequences of the metallothionine gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the beta-lactamase promoter (Villa-Kamaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: the elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift *et al.*, 1984, *Cell* 38:639-46; Ornitz *et al.*, 1986, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50:399-409 (1986); MacDonald, 1987, *Hepatology* 7:425-515); the insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, *Nature* 315:115-22); the immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl *et al.*, 1984, *Cell* 38:647-58; Adames *et al.*, 1985, *Nature* 318:533-38; Alexander *et al.*, 1987, *Mol. Cell. Biol.*, 7:1436-44); the mouse mammary tumor

virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder *et al.*, 1986, *Cell* 45:485-95); the albumin gene control region which is active in liver (Pinkert *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:268-76); the alpha-feto-protein gene control region which is active in liver (Krumlauf *et al.*, 1985, *Mol. Cell. Biol.*, 5:1639-48; Hammer *et al.*, 1987, *Science* 235:53-58); the alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey *et al.*, 1987, *Genes and Devel.* 1:161-71); the beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogram *et al.*, 1985, *Nature* 315:338-40; Kollias *et al.*, 1986, *Cell* 46:89-94); the myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead *et al.*, 1987, *Cell* 48:703-12); the myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, *Nature* 314:283-86); and the gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason *et al.*, 1986, *Science* 234:1372-78).

An enhancer sequence may be inserted into the vector to increase the transcription of a DNA encoding a B7-L polypeptide of the present invention by higher eukaryotes. Enhancers are cis-acting elements of DNA, usually about 10-300 bp in length, that act on the promoter to increase transcription. Enhancers are relatively orientation and position independent. They have been found 5' and 3' to the transcription unit. Several enhancer sequences available from mammalian genes are known (*e.g.*, globin, elastase, albumin, alpha-feto-protein and insulin). Typically, however, an enhancer from a virus will be used. The SV40 enhancer, the cytomegalovirus early promoter enhancer, the polyoma enhancer, and adenovirus enhancers are exemplary enhancing elements for the activation of eukaryotic promoters. While an enhancer may be spliced into the vector at a position 5' or 3' to a B7-L nucleic acid molecule, it is typically located at a site 5' from the promoter.

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

Preferred vectors for practicing this invention are those that are compatible with bacterial, insect, and mammalian host cells. Such vectors include, *inter alia*, pCRII, pCR3, and pcDNA3.1 (Invitrogen, San Diego, CA), pBSU (Stratagene, La

Jolla, CA), pET15 (Novagen, Madison, WI), pGEX (Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ), pEGFP-N2 (Clontech, Palo Alto, CA), pETL (BlueBacII, Invitrogen), pDSR-alpha (PCT Pub. No. WO 90/14363) and pFastBacDual (Gibco-BRL, Grand Island, NY).

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

After the vector has been constructed and a nucleic acid molecule encoding a B7-L polypeptide has been inserted into the proper site of the vector, the completed vector may be inserted into a suitable host cell for amplification and/or polypeptide expression. The transformation of an expression vector for a B7-L polypeptide into a selected host cell may be accomplished by well known methods including methods such as transfection, infection, calcium chloride, electroporation, microinjection, lipofection, DEAE-dextran method, or other known techniques. The method selected will in part be a function of the type of host cell to be used. These methods and other suitable methods are well known to the skilled artisan, and are set forth, for example, in Sambrook *et al.*, *supra*.

Host cells may be prokaryotic host cells (such as *E. coli*) or eukaryotic host cells (such as a yeast, insect, or vertebrate cell). The host cell, when cultured under appropriate conditions, synthesizes a B7-L polypeptide that can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as glycosylation or phosphorylation) and ease of folding into a biologically active molecule.

A number of suitable host cells are known in the art and many are available from the American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA. Examples

include, but are not limited to, mammalian cells, such as Chinese hamster ovary cells (CHO), CHO DHFR(-) cells (Urlaub *et al.*, 1980, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97:4216-20), human embryonic kidney (HEK) 293 or 293T cells, or 3T3 cells. The selection of suitable mammalian host cells and methods for transformation, culture, amplification, screening, product production, and purification are known in the art. Other suitable mammalian cell lines, are the monkey COS-1 and COS-7 cell lines, and the CV-1 cell line. Further exemplary mammalian host cells include primate cell lines and rodent cell lines, including transformed cell lines. Normal diploid cells, cell strains derived from *in vitro* culture of primary tissue, as well as primary explants, are also suitable. Candidate cells may be genotypically deficient in the selection gene, or may contain a dominantly acting selection gene. Other suitable mammalian cell lines include but are not limited to, mouse neuroblastoma N2A cells, HeLa, mouse L-929 cells, 3T3 lines derived from Swiss, Balb-c or NIH mice, BHK or HaK hamster cell lines. Each of these cell lines is known by and available to those skilled in the art of protein expression.

Similarly useful as host cells suitable for the present invention are bacterial cells. For example, the various strains of *E. coli* (*e.g.*, HB101, DH5α, DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

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

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

One may also use transgenic animals to express glycosylated B7-L polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow or goat, for example) and obtain the present glycosylated polypeptide in the animal milk. One may also use plants to produce B7-L polypeptides, however, in general, the glycosylation occurring in plants is different from that produced in mammalian

cells, and may result in a glycosylated product which is not suitable for human therapeutic use.

Polypeptide Production

Host cells comprising a B7-L polypeptide expression vector may be cultured using standard media well known to the skilled artisan. The media will usually contain all nutrients necessary for the growth and survival of the cells. Suitable media for culturing *E. coli* cells include, for example, Luria Broth (LB) and/or Terrific Broth (TB). Suitable media for culturing eukaryotic cells include Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640), Minimal Essential Medium (MEM) and/or Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), all of which may be supplemented with serum and/or growth factors as necessary for the particular cell line being cultured. A suitable medium for insect cultures is Grace's medium supplemented with yeastolate, lactalbumin hydrolysate, and/or fetal calf serum as necessary.

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

The amount of a B7-L polypeptide produced by a host cell can be evaluated using standard methods known in the art. Such methods include, without limitation, Western blot analysis, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis, non-denaturing gel electrophoresis, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) separation, immunoprecipitation, and/or activity assays such as DNA binding gel shift assays.

If a B7-L polypeptide has been designed to be secreted from the host cells, the majority of polypeptide may be found in the cell culture medium. If however, the B7-L polypeptide is not secreted from the host cells, it will be present in the cytoplasm and/or the nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for gram-negative bacteria host cells).

For a B7-L polypeptide situated in the host cell cytoplasm and/or nucleus (for eukaryotic host cells) or in the cytosol (for bacterial host cells), the intracellular

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

If a B7-L polypeptide has formed inclusion bodies in the cytosol, the inclusion bodies can often bind to the inner and/or outer cellular membranes and thus will be found primarily in the pellet material after centrifugation. The pellet material can then be treated at pH extremes or with a chaotropic agent such as a detergent, guanidine, guanidine derivatives, urea, or urea derivatives in the presence of a reducing agent such as dithiothreitol at alkaline pH or tris carboxyethyl phosphine at acid pH to release, break apart, and solubilize the inclusion bodies. The solubilized B7-L polypeptide can then be analyzed using gel electrophoresis, immunoprecipitation, or the like. If it is desired to isolate the B7-L polypeptide, isolation may be accomplished using standard methods such as those described herein and in Marston *et al.*, 1990, *Meth. Enz.*, 182:264-75.

In some cases, a B7-L polypeptide may not be biologically active upon isolation. Various methods for "refolding" or converting the polypeptide to its tertiary structure and generating disulfide linkages can be used to restore biological activity. Such methods include exposing the solubilized polypeptide to a pH usually above 7 and in the presence of a particular concentration of a chaotrope. The selection of chaotrope is very similar to the choices used for inclusion body solubilization, but usually the chaotrope is used at a lower concentration and is not necessarily the same as chaotropes used for the solubilization. In most cases the refolding/oxidation solution will also contain a reducing agent or the reducing agent plus its oxidized form in a specific ratio to generate a particular redox potential allowing for disulfide shuffling to occur in the formation of the protein's cysteine bridges. Some of the commonly used redox couples include cysteine/cystamine, glutathione (GSH)/dithiobis GSH, cupric chloride, dithiothreitol(DTT)/dithiane DTT, and 2-2-mercaptoethanol(bME)/dithio-b(ME). In many instances, a cosolvent may be used or may be needed to increase the efficiency of the refolding, and the more common reagents used for this purpose include glycerol, polyethylene glycol of various molecular weights, arginine and the like.

If inclusion bodies are not formed to a significant degree upon expression of a B7-L polypeptide, then the polypeptide will be found primarily in the supernatant after centrifugation of the cell homogenate. The polypeptide may be further isolated from the supernatant using methods such as those described herein.

The purification of a B7-L polypeptide from solution can be accomplished using a variety of techniques. If the polypeptide has been synthesized such that it contains a tag such as Hexahistidine (B7-L polypeptide/hexaHis) or other small peptide such as FLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or *myc* (Invitrogen) at either its carboxyl- or amino-terminus, it may be purified in a one-step process by passing the solution through an affinity column where the column matrix has a high affinity for the tag.

For example, polyhistidine binds with great affinity and specificity to nickel. Thus, an affinity column of nickel (such as the Qiagen® nickel columns) can be used for purification of B7-L polypeptide/polyHis. *See, e.g., Current Protocols in Molecular Biology* § 10.11.8 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1993).

Additionally, B7-L polypeptides may be purified through the use of a monoclonal antibody that is capable of specifically recognizing and binding to a B7-L polypeptide.

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

B7-L polypeptides may also be prepared by chemical synthesis methods (such as solid phase peptide synthesis) using techniques known in the art such as those set forth by Merrifield *et al.*, 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149; Houghten *et al.*, 1985, *Proc Natl Acad. Sci. USA* 82:5132; and Stewart and Young, *Solid Phase Peptide Synthesis* (Pierce Chemical Co. 1984). Such polypeptides may be synthesized with or without a methionine on the amino-terminus. Chemically synthesized B7-L polypeptides may be oxidized using methods set forth in these references to form disulfide bridges. Chemically synthesized B7-L polypeptides are expected to have

comparable biological activity to the corresponding B7-L polypeptides produced recombinantly or purified from natural sources, and thus may be used interchangeably with a recombinant or natural B7-L polypeptide.

Another means of obtaining B7-L polypeptide is via purification from biological samples such as source tissues and/or fluids in which the B7-L polypeptide is naturally found. Such purification can be conducted using methods for protein purification as described herein. The presence of the B7-L polypeptide during purification may be monitored, for example, using an antibody prepared against recombinantly produced B7-L polypeptide or peptide fragments thereof.

A number of additional methods for producing nucleic acids and polypeptides are known in the art, and the methods can be used to produce polypeptides having specificity for B7-L polypeptide. *See, e.g.*, Roberts *et al.*, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94:12297-303, which describes the production of fusion proteins between an mRNA and its encoded peptide. *See also*, Roberts, 1999, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3:268-73. Additionally, U.S. Patent No. 5,824,469 describes methods for obtaining oligonucleotides capable of carrying out a specific biological function. The procedure involves generating a heterogeneous pool of oligonucleotides, each having a 5' randomized sequence, a central preselected sequence, and a 3' randomized sequence. The resulting heterogeneous pool is introduced into a population of cells that do not exhibit the desired biological function. Subpopulations of the cells are then screened for those that exhibit a predetermined biological function. From that subpopulation, oligonucleotides capable of carrying out the desired biological function are isolated.

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

Another method for producing peptides or polypeptides is described in PCT/US98/20094 (WO99/15650) filed by Athersys, Inc. Known as "Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery" (RAGE-GD), the process involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell that is

capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

It will be appreciated that these methods can also be used to create comprehensive B7-L polypeptide expression libraries, which can subsequently be used for high throughput phenotypic screening in a variety of assays, such as biochemical assays, cellular assays, and whole organism assays (*e.g.*, plant, mouse, etc.).

Synthesis

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

Selective Binding Agents

The term "selective binding agent" refers to a molecule that has specificity for one or more B7-L polypeptides. Suitable selective binding agents include, but are not limited to, antibodies and derivatives thereof, polypeptides, and small molecules. Suitable selective binding agents may be prepared using methods known in the art. An exemplary B7-L polypeptide selective binding agent of the present invention is capable of binding a certain portion of the B7-L polypeptide thereby inhibiting the binding of the polypeptide to a B7-L polypeptide receptor.

Selective binding agents such as antibodies and antibody fragments that bind B7-L polypeptides are within the scope of the present invention. The antibodies may be polyclonal including monospecific polyclonal; monoclonal (MAbs); recombinant; chimeric; humanized, such as complementarity-determining region (CDR)-grafted; human; single chain; and/or bispecific; as well as fragments; variants; or derivatives thereof. Antibody fragments include those portions of the antibody that bind to an epitope on the B7-L polypeptide. Examples of such fragments include Fab and F(ab') fragments generated by enzymatic cleavage of full-length antibodies. Other binding fragments include those generated by recombinant DNA techniques, such as the expression of recombinant plasmids containing nucleic acid sequences encoding

antibody variable regions.

Polyclonal antibodies directed toward a B7-L polypeptide generally are produced in animals (*e.g.*, rabbits or mice) by means of multiple subcutaneous or intraperitoneal injections of B7-L polypeptide and an adjuvant. It may be useful to conjugate a B7-L polypeptide to a carrier protein that is immunogenic in the species to be immunized, such as keyhole limpet hemocyanin, serum, albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor. Also, aggregating agents such as alum are used to enhance the immune response. After immunization, the animals are bled and the serum is assayed for anti-B7-L antibody titer.

Monoclonal antibodies directed toward B7-L polypeptides are produced using any method that provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture. Examples of suitable methods for preparing monoclonal antibodies include the hybridoma methods of Kohler *et al.*, 1975, *Nature* 256:495-97 and the human B-cell hybridoma method (Kozbor, 1984, *J. Immunol.* 133:3001; Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* 51-63 (Marcel Dekker, Inc., 1987). Also provided by the invention are hybridoma cell lines that produce monoclonal antibodies reactive with B7-L polypeptides.

Monoclonal antibodies of the invention may be modified for use as therapeutics. One embodiment is a "chimeric" antibody in which a portion of the heavy (H) and/or light (L) chain is identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is/are identical with or homologous to a corresponding sequence in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass. Also included are fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity. *See* U.S. Patent No. 4,816,567; Morrison *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81:6851-55.

In another embodiment, a monoclonal antibody of the invention is a "humanized" antibody. Methods for humanizing non-human antibodies are well known in the art. *See* U.S. Patent Nos. 5,585,089 and 5,693,762. Generally, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source that is non-human. Humanization can be performed, for example, using methods described in the art (Jones *et al.*, 1986, *Nature* 321:522-25; Riechmann *et al.*, 1998, *Nature* 332:323-27; Verhoeyen *et al.*, 1988, *Science* 239:1534-36), by

substituting at least a portion of a rodent complementarity-determining region for the corresponding regions of a human antibody.

Also encompassed by the invention are human antibodies that bind B7-L polypeptides. Using transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable of producing a repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production such antibodies are produced by immunization with a B7-L polypeptide antigen (*i.e.*, having at least 6 contiguous amino acids), optionally conjugated to a carrier. *See, e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggemann *et al.*, 1993, *Year in Immuno.* 7:33. In one method, such transgenic animals are produced by incapacitating the endogenous loci encoding the heavy and light immunoglobulin chains therein, and inserting loci encoding human heavy and light chain proteins into the genome thereof. Partially modified animals (*i.e.*, those having less than the full complement of modifications) are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions that are immunospecific for these antigens. *See* PCT App. Nos. PCT/US96/05928 and PCT/US93/06926. Additional methods are described in U.S. Patent No. 5,545,807, PCT App. Nos. PCT/US91/245 and PCT/GB89/01207, and in European Patent Nos. 546073B1 and 546073A1. Human antibodies can also be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

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

Chimeric, CDR grafted, and humanized antibodies are typically produced by recombinant methods. Nucleic acids encoding the antibodies are introduced into host cells and expressed using materials and procedures described herein. In a preferred embodiment, the antibodies are produced in mammalian host cells, such as CHO

cells. Monoclonal (*e.g.*, human) antibodies may be produced by the expression of recombinant DNA in host cells or by expression in hybridoma cells as described herein.

The anti-B7-L antibodies of the invention may be employed in any known assay method, such as competitive binding assays, direct and indirect sandwich assays, and immunoprecipitation assays (Sola, *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques* 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)) for the detection and quantitation of B7-L polypeptides. The antibodies will bind B7-L polypeptides with an affinity that is appropriate for the assay method being employed.

For diagnostic applications, in certain embodiments, anti-B7-L antibodies may be labeled with a detectable moiety. The detectable moiety can be any one that is capable of producing, either directly or indirectly, a detectable signal. For example, the detectable moiety may be a radioisotope, such as ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{125}I, ^{99}Tc, ^{111}In, or ^{67}Ga; a fluorescent or chemiluminescent compound, such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, or luciferin; or an enzyme, such as alkaline phosphatase, β-galactosidase, or horseradish peroxidase (Bayer, *et al.*, 1990, *Meth. Enz.* 184:138-63).

Competitive binding assays rely on the ability of a labeled standard (*e.g.*, a B7-L polypeptide, or an immunologically reactive portion thereof) to compete with the test sample analyte (an B7-L polypeptide) for binding with a limited amount of anti-B7-L antibody. The amount of a B7-L polypeptide in the test sample is inversely proportional to the amount of standard that becomes bound to the antibodies. To facilitate determining the amount of standard that becomes bound, the antibodies typically are insolubilized before or after the competition, so that the standard and analyte that are bound to the antibodies may conveniently be separated from the standard and analyte that remain unbound.

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

assays). For example, one type of sandwich assay is an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), in which case the detectable moiety is an enzyme.

The selective binding agents, including anti-B7-L antibodies, are also useful for *in vivo* imaging. An antibody labeled with a detectable moiety may be administered to an animal, preferably into the bloodstream, and the presence and location of the labeled antibody in the host assayed. The antibody may be labeled with any moiety that is detectable in an animal, whether by nuclear magnetic resonance, radiology, or other detection means known in the art.

Selective binding agents of the invention, including antibodies, may be used as therapeutics. These therapeutic agents are generally agonists or antagonists, in that they either enhance or reduce, respectively, at least one of the biological activities of a B7-L polypeptide. In one embodiment, antagonist antibodies of the invention are antibodies or binding fragments thereof which are capable of specifically binding to a B7-L polypeptide and which are capable of inhibiting or eliminating the functional activity of a B7-L polypeptide *in vivo* or *in vitro*. In preferred embodiments, the selective binding agent, *e.g.*, an antagonist antibody, will inhibit the functional activity of a B7-L polypeptide by at least about 50%, and preferably by at least about 80%. In another embodiment, the selective binding agent may be an anti-B7-L polypeptide antibody that is capable of interacting with a B7-L polypeptide binding partner (a ligand or receptor) thereby inhibiting or eliminating B7-L polypeptide activity *in vitro* or *in vivo*. Selective binding agents, including agonist and antagonist anti-B7-L polypeptide antibodies, are identified by screening assays that are well known in the art.

The invention also relates to a kit comprising B7-L selective binding agents (such as antibodies) and other reagents useful for detecting B7-L polypeptide levels in biological samples. Such reagents may include a detectable label, blocking serum, positive and negative control samples, and detection reagents.

Microarrays

It will be appreciated that DNA microarray technology can be utilized in accordance with the present invention. DNA microarrays are miniature, high-density arrays of nucleic acids positioned on a solid support, such as glass. Each cell or element within the array contains numerous copies of a single nucleic acid species that acts as a target for hybridization with a complementary nucleic acid sequence

(*e.g.*, mRNA). In expression profiling using DNA microarray technology, mRNA is first extracted from a cell or tissue sample and then converted enzymatically to fluorescently labeled cDNA. This material is hybridized to the microarray and unbound cDNA is removed by washing. The expression of discrete genes represented on the array is then visualized by quantitating the amount of labeled cDNA that is specifically bound to each target nucleic acid molecule. In this way, the expression of thousands of genes can be quantitated in a high throughput, parallel manner from a single sample of biological material.

This high throughput expression profiling has a broad range of applications with respect to the B7-L molecules of the invention, including, but not limited to: the identification and validation of B7-L disease-related genes as targets for therapeutics; molecular toxicology of related B7-L molecules and inhibitors thereof; stratification of populations and generation of surrogate markers for clinical trials; and enhancing related B7-L polypeptide small molecule drug discovery by aiding in the identification of selective compounds in high throughput screens.

Chemical Derivatives

Chemically modified derivatives of B7-L polypeptides may be prepared by one skilled in the art, given the disclosures described herein. B7-L polypeptide derivatives are modified in a manner that is different-- either in the type or location of the molecules naturally attached to the polypeptide. Derivatives may include molecules formed by the deletion of one or more naturally-attached chemical groups. The polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide, may be modified by the covalent attachment of one or more polymers. For example, the polymer selected is typically water-soluble so that the protein to which it is attached does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. Included within the scope of suitable polymers is a mixture of polymers. Preferably, for therapeutic use of the end-product preparation, the polymer will be pharmaceutically acceptable.

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

preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C_1-C_{10}), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, about 6 kD), cellulose, or other carbohydrate based polymers, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol), and polyvinyl alcohol. Also encompassed by the present invention are bifunctional crosslinking molecules that may be used to prepare covalently attached B7-L polypeptide multimers.

In general, chemical derivatization may be performed under any suitable condition used to react a protein with an activated polymer molecule. Methods for preparing chemical derivatives of polypeptides will generally comprise the steps of: (a) reacting the polypeptide with the activated polymer molecule (such as a reactive ester or aldehyde derivative of the polymer molecule) under conditions whereby the polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, or other B7-L polypeptide, becomes attached to one or more polymer molecules, and (b) obtaining the reaction products. The optimal reaction conditions will be determined based on known parameters and the desired result. For example, the larger the ratio of polymer molecules to protein, the greater the percentage of attached polymer molecule. In one embodiment, the B7-L polypeptide derivative may have a single polymer molecule moiety at the amino-terminus. *See, e.g.*, U.S. Patent No. 5,234,784.

The pegylation of a polypeptide may be specifically carried out using any of the pegylation reactions known in the art. Such reactions are described, for example, in the following references: Francis *et al.*, 1992, *Focus on Growth Factors* 3:4-10; European Patent Nos. 0154316 and 0401384; and U.S. Patent No. 4,179,337. For example, pegylation may be carried out via an acylation reaction or an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule (or an analogous reactive water-soluble polymer) as described herein. For the acylation reactions, a selected polymer should have a single reactive ester group. For reductive alkylation, a selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde

is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C_1-C_{10} alkoxy or aryloxy derivatives thereof (*see* U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, B7-L polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/B7-L polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin, resulting in tetravalent avidin/biotin/B7-L polypeptide molecules. B7-L polypeptides may also be covalently coupled to dinitrophenol (DNP) or trinitrophenol (TNP) and the resulting conjugates precipitated with anti-DNP or anti-TNP-IgM to form decameric conjugates with a valency of 10.

Generally, conditions that may be alleviated or modulated by the administration of the present B7-L polypeptide derivatives include those described herein for B7-L polypeptides. However, the B7-L polypeptide derivatives disclosed herein may have additional activities, enhanced or reduced biological activity, or other characteristics, such as increased or decreased half-life, as compared to the non-derivatized molecules.

Genetically Engineered Non-Human Animals

Additionally included within the scope of the present invention are non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which the genes encoding native B7-L polypeptide have been disrupted (i.e., "knocked out") such that the level of expression of B7-L polypeptide is significantly decreased or completely abolished. Such animals may be prepared using techniques and methods such as those described in U.S. Patent No. 5,557,032.

The present invention further includes non-human animals such as mice, rats, or other rodents; rabbits, goats, sheep, or other farm animals, in which either the native form of a B7-L gene for that animal or a heterologous B7-L gene is over-expressed by the animal, thereby creating a "transgenic" animal. Such transgenic animals may be prepared using well known methods such as those described in U.S. Patent No 5,489,743 and PCT Pub. No. WO 94/28122.

The present invention further includes non-human animals in which the promoter for one or more of the B7-L polypeptides of the present invention is either activated or inactivated (e.g., by using homologous recombination methods) to alter the level of expression of one or more of the native B7-L polypeptides.

These non-human animals may be used for drug candidate screening. In such screening, the impact of a drug candidate on the animal may be measured. For

example, drug candidates may decrease or increase the expression of the B7-L gene. In certain embodiments, the amount of B7-L polypeptide that is produced may be measured after the exposure of the animal to the drug candidate. Additionally, in certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the animal. For example, over-expression of a particular gene may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a pathological condition. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product or its ability to prevent or inhibit a pathological condition.

Assaying for Other Modulators of B7-L Polypeptide Activity

In some situations, it may be desirable to identify molecules that are modulators, *i.e.*, agonists or antagonists, of the activity of B7-L polypeptide. Natural or synthetic molecules that modulate B7-L polypeptide may be identified using one or more screening assays, such as those described herein. Such molecules may be administered either in an *ex vivo* manner or in an *in vivo* manner by injection, or by oral delivery, implantation device, or the like.

"Test molecule" refers to a molecule that is under evaluation for the ability to modulate (*i.e.*, increase or decrease) the activity of a B7-L polypeptide. Most commonly, a test molecule will interact directly with a B7-L polypeptide. However, it is also contemplated that a test molecule may also modulate B7-L polypeptide activity indirectly, such as by affecting B7-L gene expression, or by binding to a B7-L polypeptide binding partner (*e.g.*, receptor or ligand). In one embodiment, a test molecule will bind to a B7-L polypeptide with an affinity constant of at least about 10^{-6} M, preferably about 10^{-8} M, more preferably about 10^{-9} M, and even more preferably about 10^{-10} M.

Methods for identifying compounds that interact with B7-L polypeptides are encompassed by the present invention. In certain embodiments, a B7-L polypeptide is incubated with a test molecule under conditions that permit the interaction of the test molecule with a B7-L polypeptide, and the extent of the interaction is measured.

The test molecule can be screened in a substantially purified form or in a crude mixture.

In certain embodiments, a B7-L polypeptide agonist or antagonist may be a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule that interacts with B7-L polypeptide to regulate its activity. Molecules which regulate B7-L polypeptide expression include nucleic acids which are complementary to nucleic acids encoding a B7-L polypeptide, or are complementary to nucleic acids sequences which direct or control the expression of B7-L polypeptide, and which act as anti-sense regulators of expression.

Once a test molecule has been identified as interacting with a B7-L polypeptide, the molecule may be further evaluated for its ability to increase or decrease B7-L polypeptide activity. The measurement of the interaction of a test molecule with B7-L polypeptide may be carried out in several formats, including cell-based binding assays, membrane binding assays, solution-phase assays, and immunoassays. In general, a test molecule is incubated with a B7-L polypeptide for a specified period of time, and B7-L polypeptide activity is determined by one or more assays for measuring biological activity.

The interaction of test molecules with B7-L polypeptides may also be assayed directly using polyclonal or monoclonal antibodies in an immunoassay. Alternatively, modified forms of B7-L polypeptides containing epitope tags as described herein may be used in solution and immunoassays.

In the event that B7-L polypeptides display biological activity through an interaction with a binding partner (*e.g.*, a receptor or a ligand), a variety of *in vitro* assays may be used to measure the binding of a B7-L polypeptide to the corresponding binding partner (such as a selective binding agent, receptor, or ligand). These assays may be used to screen test molecules for their ability to increase or decrease the rate and/or the extent of binding of a B7-L polypeptide to its binding partner. In one assay, a B7-L polypeptide is immobilized in the wells of a microtiter plate. Radiolabeled B7-L polypeptide binding partner (for example, iodinated B7-L polypeptide binding partner) and a test molecule can then be added either one at a time (in either order) or simultaneously to the wells. After incubation, the wells can be washed and counted for radioactivity, using a scintillation counter, to determine the extent to which the binding partner bound to the B7-L polypeptide. Typically, a molecule will be tested over a range of concentrations, and a series of control wells

lacking one or more elements of the test assays can be used for accuracy in the evaluation of the results. An alternative to this method involves reversing the "positions" of the proteins, *i.e.*, immobilizing B7-L polypeptide binding partner to the microtiter plate wells, incubating with the test molecule and radiolabeled B7-L polypeptide, and determining the extent of B7-L polypeptide binding. *See, e.g.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, chap. 18 (Ausubel *et al.*, eds., Green Publishers Inc. and Wiley and Sons 1995).

As an alternative to radiolabeling, a B7-L polypeptide or its binding partner may be conjugated to biotin, and the presence of biotinylated protein can then be detected using streptavidin linked to an enzyme, such as horse radish peroxidase (HRP) or alkaline phosphatase (AP), which can be detected colorometrically, or by fluorescent tagging of streptavidin. An antibody directed to a B7-L polypeptide or to a B7-L polypeptide binding partner, and which is conjugated to biotin, may also be used for purposes of detection following incubation of the complex with enzyme-linked streptavidin linked to AP or HRP.

A B7-L polypeptide or a B7-L polypeptide binding partner can also be immobilized by attachment to agarose beads, acrylic beads, or other types of such inert solid phase substrates. The substrate-protein complex can be placed in a solution containing the complementary protein and the test compound. After incubation, the beads can be precipitated by centrifugation, and the amount of binding between a B7-L polypeptide and its binding partner can be assessed using the methods described herein. Alternatively, the substrate-protein complex can be immobilized in a column with the test molecule and complementary protein passing through the column. The formation of a complex between a B7-L polypeptide and its binding partner can then be assessed using any of the techniques described herein (*e.g.*, radiolabelling or antibody binding).

Another *in vitro* assay that is useful for identifying a test molecule that increases or decreases the formation of a complex between a B7-L polypeptide binding protein and a B7-L polypeptide binding partner is a surface plasmon resonance detector system such as the BIAcore assay system (Pharmacia, Piscataway, NJ). The BIAcore system is utilized as specified by the manufacturer. This assay essentially involves the covalent binding of either B7-L polypeptide or a B7-L polypeptide binding partner to a dextran-coated sensor chip that is located in a detector. The test compound and the other complementary protein can then be

injected, either simultaneously or sequentially, into the chamber containing the sensor chip. The amount of complementary protein that binds can be assessed based on the change in molecular mass that is physically associated with the dextran-coated side of the sensor chip, with the change in molecular mass being measured by the detector system.

In some cases, it may be desirable to evaluate two or more test compounds together for their ability to increase or decrease the formation of a complex between a B7-L polypeptide and a B7-L polypeptide binding partner. In these cases, the assays set forth herein can be readily modified by adding such additional test compound(s) either simultaneously with, or subsequent to, the first test compound. The remainder of the steps in the assay are as set forth herein.

In vitro assays such as those described herein may be used advantageously to screen large numbers of compounds for an effect on the formation of a complex between a B7-L polypeptide and B7-L polypeptide binding partner. The assays may be automated to screen compounds generated in phage display, synthetic peptide, and chemical synthesis libraries.

Compounds which increase or decrease the formation of a complex between a B7-L polypeptide and a B7-L polypeptide binding partner may also be screened in cell culture using cells and cell lines expressing either B7-L polypeptide or B7-L polypeptide binding partner. Cells and cell lines may be obtained from any mammal, but preferably will be from human or other primate, canine, or rodent sources. The binding of a B7-L polypeptide to cells expressing B7-L polypeptide binding partner at the surface is evaluated in the presence or absence of test molecules, and the extent of binding may be determined by, for example, flow cytometry using a biotinylated antibody to a B7-L polypeptide binding partner. Cell culture assays can be used advantageously to further evaluate compounds that score positive in protein binding assays described herein.

Cell cultures can also be used to screen the impact of a drug candidate. For example, drug candidates may decrease or increase the expression of the B7-L gene. In certain embodiments, the amount of B7-L polypeptide or a B7-L polypeptide fragment that is produced may be measured after exposure of the cell culture to the drug candidate. In certain embodiments, one may detect the actual impact of the drug candidate on the cell culture. For example, the over-expression of a particular gene may have a particular impact on the cell culture. In such cases, one may test a drug

candidate's ability to increase or decrease the expression of the gene or its ability to prevent or inhibit a particular impact on the cell culture. In other examples, the production of a particular metabolic product such as a fragment of a polypeptide, may result in, or be associated with, a disease or pathological condition. In such cases, one may test a drug candidate's ability to decrease the production of such a metabolic product in a cell culture.

Internalizing Proteins

The *tat* protein sequence (from HIV) can be used to internalize proteins into a cell. *See, e.g.*, Falwell *et al.*, 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:664-68. For example, an 11 amino acid sequence (Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 20) of the HIV *tat* protein (termed the "protein transduction domain," or TAT PDT) has been described as mediating delivery across the cytoplasmic membrane and the nuclear membrane of a cell. *See* Schwarze *et al.*, 1999, *Science* 285:1569-72; and Nagahara *et al.*, 1998, *Nat. Med.* 4:1449-52. In these procedures, FITC-constructs (FITC-labeled G-G-G-G-Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 21), which penetrate tissues following intraperitoneal administration, are prepared, and the binding of such constructs to cells is detected by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis. Cells treated with a *tat*-β-gal fusion protein will demonstrate β-gal activity. Following injection, expression of such a construct can be detected in a number of tissues, including liver, kidney, lung, heart, and brain tissue. It is believed that such constructs undergo some degree of unfolding in order to enter the cell, and as such, may require a refolding following entry into the cell.

It will thus be appreciated that the *tat* protein sequence may be used to internalize a desired polypeptide into a cell. For example, using the *tat* protein sequence, a B7-L antagonist (such as an anti-B7-L selective binding agent, small molecule, soluble receptor, or antisense oligonucleotide) can be administered intracellularly to inhibit the activity of a B7-L molecule. As used herein, the term "B7-L molecule" refers to both B7-L nucleic acid molecules and B7-L polypeptides as defined herein. Where desired, the B7-L protein itself may also be internally administered to a cell using these procedures. *See also*, Straus, 1999, *Science* 285:1466-67.

Cell Source Identification Using B7-L Polypeptide

In accordance with certain embodiments of the invention, it may be useful to be able to determine the source of a certain cell type associated with a B7-L polypeptide. For example, it may be useful to determine the origin of a disease or pathological condition as an aid in selecting an appropriate therapy. In certain embodiments, nucleic acids encoding a B7-L polypeptide can be used as a probe to identify cells described herein by screening the nucleic acids of the cells with such a probe. In other embodiments, one may use anti-B7-L polypeptide antibodies to test for the presence of B7-L polypeptide in cells, and thus, determine if such cells are of the types described herein.

B7-L Polypeptide Compositions and Administration

Therapeutic compositions are within the scope of the present invention. Such B7-L polypeptide pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of a B7-L polypeptide or a B7-L nucleic acid molecule in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration. Pharmaceutical compositions may comprise a therapeutically effective amount of one or more B7-L polypeptide selective binding agents in admixture with a pharmaceutically or physiologically acceptable formulation agent selected for suitability with the mode of administration.

Acceptable formulation materials preferably are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed.

The pharmaceutical composition may contain formulation materials for modifying, maintaining, or preserving, for example, the pH, osmolarity, viscosity, clarity, color, isotonicity, odor, sterility, stability, rate of dissolution or release, adsorption, or penetration of the composition. Suitable formulation materials include, but are not limited to, amino acids (such as glycine, glutamine, asparagine, arginine, or lysine), antimicrobials, antioxidants (such as ascorbic acid, sodium sulfite, or sodium hydrogen-sulfite), buffers (such as borate, bicarbonate, Tris-HCl, citrates, phosphates, or other organic acids), bulking agents (such as mannitol or glycine), chelating agents (such as ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)), complexing agents (such as caffeine, polyvinylpyrrolidone, beta-cyclodextrin, or hydroxypropyl-beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrins), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents,

hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as benzalkonium chloride, benzoic acid, salicylic acid, thimerosal, phenethyl alcohol, methylparaben, propylparaben, chlorhexidine, sorbic acid, or hydrogen peroxide), solvents (such as glycerin, propylene glycol, or polyethylene glycol), sugar alcohols (such as mannitol or sorbitol), suspending agents, surfactants or wetting agents (such as pluronics; PEG; sorbitan esters; polysorbates such as polysorbate 20 or polysorbate 80; triton; tromethamine; lecithin; cholesterol or tyloxapal), stability enhancing agents (such as sucrose or sorbitol), tonicity enhancing agents (such as alkali metal halides – preferably sodium or potassium chloride – or mannitol sorbitol), delivery vehicles, diluents, excipients and/or pharmaceutical adjuvants. *See Remington's Pharmaceutical Sciences* (18th Ed., A.R. Genmaro, ed., Mack Publishing Company 1990.

The optimal pharmaceutical composition will be determined by a skilled artisan depending upon, for example, the intended route of administration, delivery format, and desired dosage. *See, e.g., Remington's Pharmaceutical Sciences, supra.* Such compositions may influence the physical state, stability, rate of *in vivo* release, and rate of *in vivo* clearance of the B7-L molecule.

The primary vehicle or carrier in a pharmaceutical composition may be either aqueous or non-aqueous in nature. For example, a suitable vehicle or carrier for injection may be water, physiological saline solution, or artificial cerebrospinal fluid, possibly supplemented with other materials common in compositions for parenteral administration. Neutral buffered saline or saline mixed with serum albumin are further exemplary vehicles. Other exemplary pharmaceutical compositions comprise Tris buffer of about pH 7.0-8.5, or acetate buffer of about pH 4.0-5.5, which may further include sorbitol or a suitable substitute. In one embodiment of the present invention, B7-L polypeptide compositions may be prepared for storage by mixing the selected composition having the desired degree of purity with optional formulation agents (*Remington's Pharmaceutical Sciences, supra*) in the form of a lyophilized cake or an aqueous solution. Further, the B7-L polypeptide product may be formulated as a lyophilizate using appropriate excipients such as sucrose.

The B7-L polypeptide pharmaceutical compositions can be selected for parenteral delivery. Alternatively, the compositions may be selected for inhalation or for delivery through the digestive tract, such as orally. The preparation of such

pharmaceutically acceptable compositions is within the skill of the art.

The formulation components are present in concentrations that are acceptable to the site of administration. For example, buffers are used to maintain the composition at physiological pH or at a slightly lower pH, typically within a pH range of from about 5 to about 8.

When parenteral administration is contemplated, the therapeutic compositions for use in this invention may be in the form of a pyrogen-free, parenterally acceptable, aqueous solution comprising the desired B7-L molecule in a pharmaceutically acceptable vehicle. A particularly suitable vehicle for parenteral injection is sterile distilled water in which a B7-L molecule is formulated as a sterile, isotonic solution, properly preserved. Yet another preparation can involve the formulation of the desired molecule with an agent, such as injectable microspheres, bio-erodible particles, polymeric compounds (such as polylactic acid or polyglycolic acid), beads, or liposomes, that provides for the controlled or sustained release of the product which may then be delivered via a depot injection. Hyaluronic acid may also be used, and this may have the effect of promoting sustained duration in the circulation. Other suitable means for the introduction of the desired molecule include implantable drug delivery devices.

In one embodiment, a pharmaceutical composition may be formulated for inhalation. For example, B7-L polypeptide may be formulated as a dry powder for inhalation. B7-L polypeptide or nucleic acid molecule inhalation solutions may also be formulated with a propellant for aerosol delivery. In yet another embodiment, solutions may be nebulized. Pulmonary administration is further described in PCT Pub. No. WO 94/20069, which describes the pulmonary delivery of chemically modified proteins.

It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, B7-L polypeptides that are administered in this fashion can be formulated with or without those carriers customarily used in the compounding of solid dosage forms such as tablets and capsules. For example, a capsule may be designed to release the active portion of the formulation at the point in the gastrointestinal tract when bioavailability is maximized and pre-systemic degradation is minimized. Additional agents can be included to facilitate absorption of the B7-L polypeptide. Diluents, flavorings, low melting point waxes, vegetable

oils, lubricants, suspending agents, tablet disintegrating agents, and binders may also be employed.

Another pharmaceutical composition may involve an effective quantity of B7-L polypeptides in a mixture with non-toxic excipients that are suitable for the manufacture of tablets. By dissolving the tablets in sterile water, or another appropriate vehicle, solutions can be prepared in unit-dose form. Suitable excipients include, but are not limited to, inert diluents, such as calcium carbonate, sodium carbonate or bicarbonate, lactose, or calcium phosphate; or binding agents, such as starch, gelatin, or acacia; or lubricating agents such as magnesium stearate, stearic acid, or talc.

Additional B7-L polypeptide pharmaceutical compositions will be evident to those skilled in the art, including formulations involving B7-L polypeptides in sustained- or controlled-delivery formulations. Techniques for formulating a variety of other sustained- or controlled-delivery means, such as liposome carriers, bio-erodible microparticles or porous beads and depot injections, are also known to those skilled in the art. *See, e.g.*, PCT/US93/00829, which describes the controlled release of porous polymeric microparticles for the delivery of pharmaceutical compositions.

Additional examples of sustained-release preparations include semipermeable polymer matrices in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Sustained release matrices may include polyesters, hydrogels, polylactides (U.S. Patent No. 3,773,919 and European Patent No. 058481), copolymers of L-glutamic acid and gamma ethyl-L-glutamate (Sidman *et al.*, 1983, *Biopolymers* 22:547-56), poly(2-hydroxyethyl-methacrylate) (Langer *et al.*, 1981, *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277 and Langer, 1982, *Chem. Tech.* 12:98-105), ethylene vinyl acetate (Langer *et al.*, *supra*) or poly-D(-)-3-hydroxybutyric acid (European Patent No. 133988). Sustained-release compositions may also include liposomes, which can be prepared by any of several methods known in the art. *See, e.g.*, Eppstein *et al.*, 1985, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688-92; and European Patent Nos. 036676, 088046, and 143949.

The B7-L pharmaceutical composition to be used for *in vivo* administration typically must be sterile. This may be accomplished by filtration through sterile filtration membranes. Where the composition is lyophilized, sterilization using this method may be conducted either prior to, or following, lyophilization and reconstitution. The composition for parenteral administration may be stored in

lyophilized form or in a solution. In addition, parenteral compositions generally are placed into a container having a sterile access port, for example, an intravenous solution bag or vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle.

Once the pharmaceutical composition has been formulated, it may be stored in sterile vials as a solution, suspension, gel, emulsion, solid, or as a dehydrated or lyophilized powder. Such formulations may be stored either in a ready-to-use form or in a form (*e.g.*, lyophilized) requiring reconstitution prior to administration.

In a specific embodiment, the present invention is directed to kits for producing a single-dose administration unit. The kits may each contain both a first container having a dried protein and a second container having an aqueous formulation. Also included within the scope of this invention are kits containing single and multi-chambered pre-filled syringes (*e.g.*, liquid syringes and lyosyringes).

The effective amount of a B7-L pharmaceutical composition to be employed therapeutically will depend, for example, upon the therapeutic context and objectives. One skilled in the art will appreciate that the appropriate dosage levels for treatment will thus vary depending, in part, upon the molecule delivered, the indication for which the B7-L molecule is being used, the route of administration, and the size (body weight, body surface, or organ size) and condition (the age and general health) of the patient. Accordingly, the clinician may titer the dosage and modify the route of administration to obtain the optimal therapeutic effect. A typical dosage may range from about 0.1 μg/kg to up to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. In other embodiments, the dosage may range from 0.1 μg/kg up to about 100 mg/kg; or 1 μg/kg up to about 100 mg/kg; or 5 μg/kg up to about 100 mg/kg.

The frequency of dosing will depend upon the pharmacokinetic parameters of the B7-L molecule in the formulation being used. Typically, a clinician will administer the composition until a dosage is reached that achieves the desired effect. The composition may therefore be administered as a single dose, as two or more doses (which may or may not contain the same amount of the desired molecule) over time, or as a continuous infusion via an implantation device or catheter. Further refinement of the appropriate dosage is routinely made by those of ordinary skill in the art and is within the ambit of tasks routinely performed by them. Appropriate dosages may be ascertained through use of appropriate dose-response data.

The route of administration of the pharmaceutical composition is in accord with known methods, e.g., orally; through injection by intravenous, intraperitoneal, intracerebral (intraparenchymal), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial, intraportal, or intralesional routes; by sustained release systems; or by implantation devices. Where desired, the compositions may be administered by bolus injection or continuously by infusion, or by implantation device.

Alternatively or additionally, the composition may be administered locally via implantation of a membrane, sponge, or other appropriate material onto which the desired molecule has been absorbed or encapsulated. Where an implantation device is used, the device may be implanted into any suitable tissue or organ, and delivery of the desired molecule may be via diffusion, timed-release bolus, or continuous administration.

In some cases, it may be desirable to use B7-L polypeptide pharmaceutical compositions in an *ex vivo* manner. In such instances, cells, tissues, or organs that have been removed from the patient are exposed to B7-L polypeptide pharmaceutical compositions after which the cells, tissues, or organs are subsequently implanted back into the patient.

In other cases, a B7-L polypeptide can be delivered by implanting certain cells that have been genetically engineered, using methods such as those described herein, to express and secrete the B7-L polypeptide. Such cells may be animal or human cells, and may be autologous, heterologous, or xenogeneic. Optionally, the cells may be immortalized. In order to decrease the chance of an immunological response, the cells may be encapsulated to avoid infiltration of surrounding tissues. The encapsulation materials are typically biocompatible, semi-permeable polymeric enclosures or membranes that allow the release of the protein product(s) but prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissues.

As discussed herein, it may be desirable to treat isolated cell populations (such as stem cells, lymphocytes, red blood cells, chondrocytes, neurons, and the like) with one or more B7-L polypeptides. This can be accomplished by exposing the isolated cells to the polypeptide directly, where it is in a form that is permeable to the cell membrane.

Additional embodiments of the present invention relate to cells and methods (*e.g.*, homologous recombination and/or other recombinant production methods) for

both the *in vitro* production of therapeutic polypeptides and for the production and delivery of therapeutic polypeptides by gene therapy or cell therapy. Homologous and other recombination methods may be used to modify a cell that contains a normally transcriptionally-silent B7-L gene, or an under-expressed gene, and thereby produce a cell which expresses therapeutically efficacious amounts of B7-L polypeptides.

Homologous recombination is a technique originally developed for targeting genes to induce or correct mutations in transcriptionally active genes. Kucherlapati, 1989, *Prog. in Nucl. Acid Res. & Mol. Biol.* 36:301. The basic technique was developed as a method for introducing specific mutations into specific regions of the mammalian genome (Thomas *et al.*, 1986, *Cell* 44:419-28; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-12; Doetschman *et al.*, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:8583-87) or to correct specific mutations within defective genes (Doetschman *et al.*, 1987, *Nature* 330:576-78). Exemplary homologous recombination techniques are described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505300; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

Through homologous recombination, the DNA sequence to be inserted into the genome can be directed to a specific region of the gene of interest by attaching it to targeting DNA. The targeting DNA is a nucleotide sequence that is complementary (homologous) to a region of the genomic DNA. Small pieces of targeting DNA that are complementary to a specific region of the genome are put in contact with the parental strand during the DNA replication process. It is a general property of DNA that has been inserted into a cell to hybridize, and therefore, recombine with other pieces of endogenous DNA through shared homologous regions. If this complementary strand is attached to an oligonucleotide that contains a mutation or a different sequence or an additional nucleotide, it too is incorporated into the newly synthesized strand as a result of the recombination. As a result of the proofreading function, it is possible for the new sequence of DNA to serve as the template. Thus, the transferred DNA is incorporated into the genome.

Attached to these pieces of targeting DNA are regions of DNA that may interact with or control the expression of a B7-L polypeptide, *e.g.*, flanking sequences. For example, a promoter/enhancer element, a suppressor, or an exogenous transcription modulatory element is inserted in the genome of the intended host cell in proximity and orientation sufficient to influence the transcription of DNA encoding

the desired B7-L polypeptide. The control element controls a portion of the DNA present in the host cell genome. Thus, the expression of the desired B7-L polypeptide may be achieved not by transfection of DNA that encodes the B7-L gene itself, but rather by the use of targeting DNA (containing regions of homology with the endogenous gene of interest) coupled with DNA regulatory segments that provide the endogenous gene sequence with recognizable signals for transcription of a B7-L gene.

In an exemplary method, the expression of a desired targeted gene in a cell (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA that includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the regulatory sequence, the exon, and the splice donor site present in the DNA construct are operatively linked to the endogenous gene). As a result of the introduction of these components into the chromosomal DNA, the expression of the desired endogenous gene is altered.

Altered gene expression, as described herein, encompasses activating (or causing to be expressed) a gene which is normally silent (unexpressed) in the cell as obtained, as well as increasing the expression of a gene which is not expressed at physiologically significant levels in the cell as obtained. The embodiments further encompass changing the pattern of regulation or induction such that it is different from the pattern of regulation or induction that occurs in the cell as obtained, and reducing (including eliminating) the expression of a gene which is expressed in the cell as obtained.

One method by which homologous recombination can be used to increase, or cause, B7-L polypeptide production from a cell's endogenous B7-L gene involves first using homologous recombination to place a recombination sequence from a site-specific recombination system (*e.g.*, Cre/loxP, FLP/FRT) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) upstream of (*i.e.*, 5' to) the cell's endogenous genomic B7-L polypeptide coding region. A plasmid containing a recombination site homologous to the site that was placed just upstream of the genomic B7-L polypeptide coding region is introduced into the modified cell line along with the appropriate recombinase enzyme. This recombinase causes the plasmid to integrate, via the plasmid's recombination site, into the

recombination site located just upstream of the genomic B7-L polypeptide coding region in the cell line (Baubonis and Sauer, 1993, *Nucleic Acids Res.* 21:2025-29; O'Gorman *et al.*, 1991, *Science* 251:1351-55). Any flanking sequences known to increase transcription (*e.g.*, enhancer/promoter, intron, translational enhancer), if properly positioned in this plasmid, would integrate in such a manner as to create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased B7-L polypeptide production from the cell's endogenous B7-L gene.

A further method to use the cell line in which the site specific recombination sequence had been placed just upstream of the cell's endogenous genomic B7-L polypeptide coding region is to use homologous recombination to introduce a second recombination site elsewhere in the cell line's genome. The appropriate recombinase enzyme is then introduced into the two-recombination-site cell line, causing a recombination event (deletion, inversion, and translocation) (Sauer, 1994, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 5:521-27; Sauer, 1993, *Methods Enzymol.*, 225:890-900) that would create a new or modified transcriptional unit resulting in *de novo* or increased B7-L polypeptide production from the cell's endogenous B7-L gene.

An additional approach for increasing, or causing, the expression of B7-L polypeptide from a cell's endogenous B7-L gene involves increasing, or causing, the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcription factors) and/or decreasing the expression of a gene or genes (*e.g.*, transcriptional repressors) in a manner which results in *de novo* or increased B7-L polypeptide production from the cell's endogenous B7-L gene. This method includes the introduction of a non-naturally occurring polypeptide (*e.g.*, a polypeptide comprising a site specific DNA binding domain fused to a transcriptional factor domain) into the cell such that *de novo* or increased B7-L polypeptide production from the cell's endogenous B7-L gene results.

The present invention further relates to DNA constructs useful in the method of altering expression of a target gene. In certain embodiments, the exemplary DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, and (d) an unpaired splice-donor site. The targeting sequence in the DNA construct directs the integration of elements (a) - (d) into a target gene in a cell such that the elements (b) - (d) are operatively linked to sequences of the endogenous target gene. In another embodiment, the DNA constructs comprise: (a) one or more targeting sequences, (b) a regulatory sequence, (c) an exon, (d) a splice-donor site, (e) an intron, and (f) a splice-acceptor site, wherein the targeting sequence directs the

integration of elements (a) - (f) such that the elements of (b) - (f) are operatively linked to the endogenous gene. The targeting sequence is homologous to the preselected site in the cellular chromosomal DNA with which homologous recombination is to occur. In the construct, the exon is generally 3' of the regulatory sequence and the splice-donor site is 3' of the exon.

If the sequence of a particular gene is known, such as the nucleic acid sequence of B7-L polypeptide presented herein, a piece of DNA that is complementary to a selected region of the gene can be synthesized or otherwise obtained, such as by appropriate restriction of the native DNA at specific recognition sites bounding the region of interest. This piece serves as a targeting sequence upon insertion into the cell and will hybridize to its homologous region within the genome. If this hybridization occurs during DNA replication, this piece of DNA, and any additional sequence attached thereto, will act as an Okazaki fragment and will be incorporated into the newly synthesized daughter strand of DNA. The present invention, therefore, includes nucleotides encoding a B7-L polypeptide, which nucleotides may be used as targeting sequences.

B7-L polypeptide cell therapy, *e.g.*, the implantation of cells producing B7-L polypeptides, is also contemplated. This embodiment involves implanting cells capable of synthesizing and secreting a biologically active form of B7-L polypeptide. Such B7-L polypeptide-producing cells can be cells that are natural producers of B7-L polypeptides or may be recombinant cells whose ability to produce B7-L polypeptides has been augmented by transformation with a gene encoding the desired B7-L polypeptide or with a gene augmenting the expression of B7-L polypeptide. Such a modification may be accomplished by means of a vector suitable for delivering the gene as well as promoting its expression and secretion. In order to minimize a potential immunological reaction in patients being administered a B7-L polypeptide, as may occur with the administration of a polypeptide of a foreign species, it is preferred that the natural cells producing B7-L polypeptide be of human origin and produce human B7-L polypeptide. Likewise, it is preferred that the recombinant cells producing B7-L polypeptide be transformed with an expression vector containing a gene encoding a human B7-L polypeptide.

Implanted cells may be encapsulated to avoid the infiltration of surrounding tissue. Human or non-human animal cells may be implanted in patients in biocompatible, semipermeable polymeric enclosures or membranes that allow the

release of B7-L polypeptide, but that prevent the destruction of the cells by the patient's immune system or by other detrimental factors from the surrounding tissue. Alternatively, the patient's own cells, transformed to produce B7-L polypeptides *ex vivo*, may be implanted directly into the patient without such encapsulation.

Techniques for the encapsulation of living cells are known in the art, and the preparation of the encapsulated cells and their implantation in patients may be routinely accomplished. For example, Baetge *et al.* (PCT Pub. No. WO 95/05452 and PCT/US94/09299) describe membrane capsules containing genetically engineered cells for the effective delivery of biologically active molecules. The capsules are biocompatible and are easily retrievable. The capsules encapsulate cells transfected with recombinant DNA molecules comprising DNA sequences coding for biologically active molecules operatively linked to promoters that are not subject to down-regulation *in vivo* upon implantation into a mammalian host. The devices provide for the delivery of the molecules from living cells to specific sites within a recipient. In addition, *see* U.S. Patent Nos. 4,892,538; 5,011,472; and 5,106,627. A system for encapsulating living cells is described in PCT Pub. No. WO 91/10425 (Aebischer *et al.*). *See also*, PCT Pub. No. WO 91/10470 (Aebischer *et al.*); Winn *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 113:322-29; Aebischer *et al.*, 1991, *Exper. Neurol.* 111:269-75; and Tresco *et al.*, 1992, *ASAIO* 38:17-23.

In vivo and *in vitro* gene therapy delivery of B7-L polypeptides is also envisioned. One example of a gene therapy technique is to use the B7-L gene (either genomic DNA, cDNA, and/or synthetic DNA) encoding a B7-L polypeptide that may be operably linked to a constitutive or inducible promoter to form a "gene therapy DNA construct." The promoter may be homologous or heterologous to the endogenous B7-L gene, provided that it is active in the cell or tissue type into which the construct will be inserted. Other components of the gene therapy DNA construct may optionally include DNA molecules designed for site-specific integration (*e.g.*, endogenous sequences useful for homologous recombination), tissue-specific promoters, enhancers or silencers, DNA molecules capable of providing a selective advantage over the parent cell, DNA molecules useful as labels to identify transformed cells, negative selection systems, cell specific binding agents (as, for example, for cell targeting), cell-specific internalization factors, transcription factors enhancing expression from a vector, and factors enabling vector production.

A gene therapy DNA construct can then be introduced into cells (either *ex*

vivo or *in vivo*) using viral or non-viral vectors. One means for introducing the gene therapy DNA construct is by means of viral vectors as described herein. Certain vectors, such as retroviral vectors, will deliver the DNA construct to the chromosomal DNA of the cells, and the gene can integrate into the chromosomal DNA. Other vectors will function as episomes, and the gene therapy DNA construct will remain in the cytoplasm.

In yet other embodiments, regulatory elements can be included for the controlled expression of the B7-L gene in the target cell. Such elements are turned on in response to an appropriate effector. In this way, a therapeutic polypeptide can be expressed when desired. One conventional control means involves the use of small molecule dimerizers or rapalogs to dimerize chimeric proteins which contain a small molecule-binding domain and a domain capable of initiating a biological process, such as a DNA-binding protein or transcriptional activation protein (*see* PCT Pub. Nos. WO 96/41865, WO 97/31898, and WO 97/31899). The dimerization of the proteins can be used to initiate transcription of the transgene.

An alternative regulation technology uses a method of storing proteins expressed from the gene of interest inside the cell as an aggregate or cluster. The gene of interest is expressed as a fusion protein that includes a conditional aggregation domain that results in the retention of the aggregated protein in the endoplasmic reticulum. The stored proteins are stable and inactive inside the cell. The proteins can be released, however, by administering a drug (*e.g.*, small molecule ligand) that removes the conditional aggregation domain and thereby specifically breaks apart the aggregates or clusters so that the proteins may be secreted from the cell. *See* Aridor *et al.*, 2000, *Science* 287:816-17 and Rivera *et al.*, 2000, *Science* 287:826-30.

Other suitable control means or gene switches include, but are not limited to, the systems described herein. Mifepristone (RU486) is used as a progesterone antagonist. The binding of a modified progesterone receptor ligand-binding domain to the progesterone antagonist activates transcription by forming a dimer of two transcription factors that then pass into the nucleus to bind DNA. The ligand-binding domain is modified to eliminate the ability of the receptor to bind to the natural ligand. The modified steroid hormone receptor system is further described in U.S. Patent No. 5,364,791 and PCT Pub. Nos. WO 96/40911 and WO 97/10337.

Yet another control system uses ecdysone (a fruit fly steroid hormone), which binds to and activates an ecdysone receptor (cytoplasmic receptor). The receptor then translocates to the nucleus to bind a specific DNA response element (promoter from ecdysone-responsive gene). The ecdysone receptor includes a transactivation domain, DNA-binding domain, and ligand-binding domain to initiate transcription. The ecdysone system is further described in U.S. Patent No. 5,514,578 and PCT Pub. Nos. WO 97/38117, WO 96/37609, and WO 93/03162.

Another control means uses a positive tetracycline-controllable transactivator. This system involves a mutated tet repressor protein DNA-binding domain (mutated tet R-4 amino acid changes which resulted in a reverse tetracycline-regulated transactivator protein, *i.e.*, it binds to a tet operator in the presence of tetracycline) linked to a polypeptide which activates transcription. Such systems are described in U.S. Patent Nos. 5,464,758, 5,650,298, and 5,654,168.

Additional expression control systems and nucleic acid constructs are described in U.S. Patent Nos. 5,741,679 and 5,834,186, to Innovir Laboratories Inc.

In vivo gene therapy may be accomplished by introducing the gene encoding B7-L polypeptide into cells via local injection of a B7-L nucleic acid molecule or by other appropriate viral or non-viral delivery vectors. Hefti 1994, *Neurobiology* 25:1418-35. For example, a nucleic acid molecule encoding a B7-L polypeptide may be contained in an adeno-associated virus (AAV) vector for delivery to the targeted cells (*see, e.g.*, Johnson, PCT Pub. No. WO 95/34670; PCT App. No. PCT/US95/07178). The recombinant AAV genome typically contains AAV inverted terminal repeats flanking a DNA sequence encoding a B7-L polypeptide operably linked to functional promoter and polyadenylation sequences.

Alternative suitable viral vectors include, but are not limited to, retrovirus, adenovirus, herpes simplex virus, lentivirus, hepatitis virus, parvovirus, papovavirus, poxvirus, alphavirus, coronavirus, rhabdovirus, paramyxovirus, and papilloma virus vectors. U.S. Patent No. 5,672,344 describes an *in vivo* viral-mediated gene transfer system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells that have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236

(involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance expression by a vector as well as methods of vector manufacture. Such additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 4,970,154 (involving electroporation techniques), 5,679,559 (describing a lipoprotein-containing system for gene delivery), 5,676,954 (involving liposome carriers), 5,593,875 (describing methods for calcium phosphate transfection), and 4,945,050 (describing a process wherein biologically active particles are propelled at cells at a speed whereby the particles penetrate the surface of the cells and become incorporated into the interior of the cells), and PCT Pub. No. WO 96/40958 (involving nuclear ligands).

It is also contemplated that B7-L gene therapy or cell therapy can further include the delivery of one or more additional polypeptide(s) in the same or a different cell(s). Such cells may be separately introduced into the patient, or the cells may be contained in a single implantable device, such as the encapsulating membrane described above, or the cells may be separately modified by means of viral vectors.

A means to increase endogenous B7-L polypeptide expression in a cell via gene therapy is to insert one or more enhancer elements into the B7-L polypeptide promoter, where the enhancer elements can serve to increase transcriptional activity of the B7-L gene. The enhancer elements used will be selected based on the tissue in which one desires to activate the gene--enhancer elements known to confer promoter activation in that tissue will be selected. For example, if a gene encoding a B7-L polypeptide is to be "turned on" in T-cells, the *lck* promoter enhancer element may be used. Here, the functional portion of the transcriptional element to be added may be inserted into a fragment of DNA containing the B7-L polypeptide promoter (and

optionally, inserted into a vector and/or 5' and/or 3' flanking sequences) using standard cloning techniques. This construct, known as a "homologous recombination construct," can then be introduced into the desired cells either *ex vivo* or *in vivo*.

Gene therapy also can be used to decrease B7-L polypeptide expression by modifying the nucleotide sequence of the endogenous promoter. Such modification is typically accomplished via homologous recombination methods. For example, a DNA molecule containing all or a portion of the promoter of the B7-L gene selected for inactivation can be engineered to remove and/or replace pieces of the promoter that regulate transcription. For example, the TATA box and/or the binding site of a transcriptional activator of the promoter may be deleted using standard molecular biology techniques; such deletion can inhibit promoter activity thereby repressing the transcription of the corresponding B7-L gene. The deletion of the TATA box or the transcription activator binding site in the promoter may be accomplished by generating a DNA construct comprising all or the relevant portion of the B7-L polypeptide promoter (from the same or a related species as the B7-L gene to be regulated) in which one or more of the TATA box and/or transcriptional activator binding site nucleotides are mutated via substitution, deletion and/or insertion of one or more nucleotides. As a result, the TATA box and/or activator binding site has decreased activity or is rendered completely inactive. This construct, which also will typically contain at least about 500 bases of DNA that correspond to the native (endogenous) 5' and 3' DNA sequences adjacent to the promoter segment that has been modified, may be introduced into the appropriate cells (either *ex vivo* or *in vivo*) either directly or via a viral vector as described herein. Typically, the integration of the construct into the genomic DNA of the cells will be via homologous recombination, where the 5' and 3' DNA sequences in the promoter construct can serve to help integrate the modified promoter region via hybridization to the endogenous chromosomal DNA.

Therapeutic Uses

B7-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists thereof can be used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent a number of diseases, disorders, or conditions, including those recited herein.

B7-L polypeptide agonists and antagonists include those molecules which regulate B7-L polypeptide activity and either increase or decrease at least one activity

of the mature form of the B7-L polypeptide. Agonists or antagonists may be co-factors, such as a protein, peptide, carbohydrate, lipid, or small molecular weight molecule, which interact with B7-L polypeptide and thereby regulate its activity. Potential polypeptide agonists or antagonists include antibodies that react with either soluble or membrane-bound forms of B7-L polypeptides that comprise part or all of the extracellular domains of the said proteins. Molecules that regulate B7-L polypeptide expression typically include nucleic acids encoding B7-L polypeptide that can act as anti-sense regulators of expression.

Since transgenic mice expressing a related member of the B7 family showed seminal vesicle hyperplasia (co-pending U.S. Patent App. No. 09/729,264, filed November 28, 2000), B7-L polypeptide agonists and antagonists may be useful in the treatment of reproductive disorders and proliferative disorders.

The overexpression of B7-L polypeptide may play a role in the growth and maintenance of cancer cells by causing seminal vesicle hyperplasia. Accordingly, agonists or antagonists to B7-L polypeptide may be useful for the diagnosis or treatment of cancer. Examples of such cancers include, but are not limited to, seminal vesicle cancer, lung cancer, brain cancer, breast cancer, cancers of the hematopoietic system, prostate cancer, ovarian cancer, and testicular cancer. Other cancers are encompassed within the scope of the invention.

The overexpression of B7-L polypeptide may play a role in the inappropriate proliferation of cells by causing seminal vesicle hyperplasia. B7-L polypeptide may play a role in the inappropriate proliferation of cells based on overexpression causing seminal vesicle hyperplasia. Accordingly, agonists or antagonists to B7-L polypeptide may be useful for the diagnosis or treatment of diseases associated with abnormal cell proliferation. Examples of such diseases include, but are not limited to, arteriosclerosis and vascular restenosis. Other diseases influenced by the inappropriate proliferation of cells are encompassed within the scope of the invention.

The overexpression of B7-L polypeptide may play a role in the reproductive system by causing seminal vesicle hyperplasia. Accordingly, agonists or antagonists to B7-L polypeptide may be useful for the diagnosis or treatment of diseases associated with the reproductive system. Examples of such diseases include, but are not limited to, infertility, miscarriage, pre-term labor and delivery, and endometriosis. Other diseases of the reproductive system are encompassed within the scope of the invention.

Preferably, the B7-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention are used to treat, diagnose, ameliorate, or prevent diseases associated with T-cell function (*e.g.*, functioning as a T-cell receptor decoy). For example, antibodies, soluble proteins comprising extracellular domains, or other regulators of B7-L polypeptide that result in prolonged or enhanced T-cell activation can be used to increased the immune response to tumors.

The B7-L nucleic acid molecules, polypeptides, and agonists and antagonists of the present invention may be used in the treatment of autoimmune disease, graft survival, immune cell activation for inhibiting tumor cell growth, T-cell dependent B-cell mediated diseases, and cancer gene immunotherapy. In one embodiment, antagonists or inhibitors of B7-L polypeptide function may be beneficial to alleviate symptoms in diseases with chronic immune cell dysfunction. Autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosis, rheumatoid arthritis, immune thrombocytopenic purpura (ITP), and psoriasis, may be treated with antagonists or inhibitors of B7-L polypeptide. In addition, chronic inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (Crohn's disease and ulcerative colitis), Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, and diabetes mellitis, may also be treated with inhibitors to B7-L polypeptide.

Antagonists of B7-L polypeptide may be used as immunosuppressive agents for bone marrow and organ transplantation and may be used to prolong graft survival. Such antagonists may provide significant advantages over existing treatments. Bone marrow and organ transplantation therapy must contend with T-cell mediated rejection of the foreign cells or tissue by the host. Present therapeutic regimens for inhibiting T-cell mediated rejection involve treatment with the drugs cyclosporine or FK506. While drugs are effective, patients suffer from serious side effects, including hepatotoxicity, nephrotoxicity, and neurotoxicity. The target for the cyclosporin/FK506 class of therapeutics is calcineurin, a phosphatase with ubiquitous expression. Inhibitors of B7-L polypeptide may lack the severe side effects observed with the use of the present immunotherapeutic agents. Antagonists of B7-L polypeptide may be used as immunosuppressive agents for autoimmune disorders, such as rheumatoid arthritis, psoriasis, multiple sclerosis, diabetes, and systemic lupus erythematosus. Antagonists of the B7-L polypeptide may also be used to alleviate toxic shock syndrome, inflammatory bowel disease, allosensitization due to blood

transfusions, T-cell dependent B-cell mediated diseases, and the treatment of graft versus host disease.

Gene therapy using B7-L genes of the invention may be used in cancer immunotherapy. B7-L genes introduced into cancer cells can transform them into antigen presenting cells that can be recognized by the T-cells of the immune system when introduced back into an animal. Recognition of the transfected tumor cells by the T-cells results in the eradication of tumors expressing and tumors not expressing the B7-L gene. This immunotherapy approach may be used for various leukemias, sarcomas, melanomas, adenocarcinomas, breast carcinomas, prostate tumors, lung carcinomas, colon carcinomas, and other tumors. This invention encompasses using the B7-L gene in a similar manner to enhance T-cell activation in response to variety of tumors.

Many vaccines act by eliciting an effective and specific antibody response. Some vaccines, especially those against intestinal microorganisms (*e.g.*, Hepatitis A virus and *Salmonella*), elicit a short-lived antibody response. It is desirable to potentiate and prolong this response in order to increase the effectiveness of the vaccine. Therefore, soluble B7-L polypeptides may serve as vaccine adjuvants.

Anti-viral responses may also be enhanced by activators or agonists of the B7-L polypeptide pathway. The enhancement of cellular immune functions by B7-L polypeptide/Fc fusion proteins may also be beneficial in eliminating virus-infected cells. In a complementary fashion, B7-L polypeptide/Fc fusion proteins may also have effects on humoral immune functions that may enhance antibody mediated responses and that may function to help clear free virus from the body.

Conversely, there are a number of clinical conditions that would be ameliorated by the inhibition of antibody production. Hypersensitivity is a normally beneficial immune response that is exaggerated or inappropriate, and leads to inflammatory reactions and tissue damage. Hypersensitivity reactions that are antibody-mediated may be particularly susceptible to antagonism by inhibitors of B7-L polypeptide activity. Allergies, hay fever, asthma, and acute edema cause type I hypersensitivity reactions, and these reactions may be suppressed by protein, antibody, or small molecule inhibitors of B7-L polypeptide activity.

Diseases that cause antibody-mediated hypersensitivity reactions, including systemic lupus erythematosis, arthritis (rheumatoid arthritis, reactive arthritis, and psoriatic arthritis), nephropathies (glomerulo-nephritis, membranous,

mesangiocapillary, focal segmental, focal necrotizing, crescentic, and proliferative tubulopathies), skin disorders (pemphigus, pemphigoid, and erythema nodosum), endocrinopathies (thyroiditis, Grave's, Hashimoto's, insulin-dependent diabetes mellitus), various pneumopathies (especially extrinsic alveolitis), various vasculopathies, coeliac disease, with aberrant production of IgA, many anemias and thrombocytopenias, Guillain-Barre Syndrome, and myasthenia gravis, may be treated with B7-L polypeptide antagonists.

In addition, lymphoproliferative disorders, such as multiple myeloma, Waldenstrom's macroglobulinemia, and crioglobulinemias, may be inhibited by protein, antibody, or small molecule antagonists of B7-L polypeptide.

Finally, graft versus host disease, an "artificial" immune disorder, may benefit from the inhibition of antibody production by B7-L polypeptide antagonists.

Agonists or antagonists of B7-L polypeptide function may be used (simultaneously or sequentially) in combination with one or more cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the condition being treated.

Other diseases or disorders caused by or mediated by undesirable levels of B7-L polypeptides are encompassed within the scope of the invention. Undesirable levels include excessive levels of B7-L polypeptides and sub-normal levels of B7-L polypeptides.

Uses of B7-L Nucleic Acids and Polypeptides

Nucleic acid molecules of the invention (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides) may be used to map the locations of the B7-L gene and related genes on chromosomes. Mapping may be done by techniques known in the art, such as PCR amplification and *in situ* hybridization.

B7-L nucleic acid molecules (including those that do not themselves encode biologically active polypeptides), may be useful as hybridization probes in diagnostic assays to test, either qualitatively or quantitatively, for the presence of a B7-L nucleic acid molecule in mammalian tissue or bodily fluid samples.

Other methods may also be employed where it is desirable to inhibit the activity of one or more B7-L polypeptides. Such inhibition may be effected by nucleic acid molecules that are complementary to and hybridize to expression control sequences (triple helix formation) or to B7-L mRNA. For example, antisense DNA

or RNA molecules, which have a sequence that is complementary to at least a portion of a B7-L gene can be introduced into the cell. Anti-sense probes may be designed by available techniques using the sequence of the B7-L gene disclosed herein. Typically, each such antisense molecule will be complementary to the start site (5' end) of each selected B7-L gene. When the antisense molecule then hybridizes to the corresponding B7-L mRNA, translation of this mRNA is prevented or reduced. Anti-sense inhibitors provide information relating to the decrease or absence of a B7-L polypeptide in a cell or organism.

Alternatively, gene therapy may be employed to create a dominant-negative inhibitor of one or more B7-L polypeptides. In this situation, the DNA encoding a mutant polypeptide of each selected B7-L polypeptide can be prepared and introduced into the cells of a patient using either viral or non-viral methods as described herein. Each such mutant is typically designed to compete with endogenous polypeptide in its biological role.

In addition, a B7-L polypeptide, whether biologically active or not, may be used as an immunogen, that is, the polypeptide contains at least one epitope to which antibodies may be raised. Selective binding agents that bind to a B7-L polypeptide (as described herein) may be used for *in vivo* and *in vitro* diagnostic purposes, including, but not limited to, use in labeled form to detect the presence of B7-L polypeptide in a body fluid or cell sample. The antibodies may also be used to prevent, treat, or diagnose a number of diseases and disorders, including those recited herein. The antibodies may bind to a B7-L polypeptide so as to diminish or block at least one activity characteristic of a B7-L polypeptide, or may bind to a polypeptide to increase at least one activity characteristic of a B7-L polypeptide (including by increasing the pharmacokinetics of the B7-L polypeptide).

The B7-L polypeptides of the present invention can be used to clone B7-L polypeptide receptors, using an expression cloning strategy. Radiolabeled (125-Iodine) B7-L polypeptide or affinity/activity-tagged B7-L polypeptide (such as an Fc fusion or an alkaline phosphatase fusion) can be used in binding assays to identify a cell type or cell line or tissue that expresses B7-L polypeptide receptors. RNA isolated from such cells or tissues can be converted to cDNA, cloned into a mammalian expression vector, and transfected into mammalian cells (such as COS or 293 cells) to create an expression library. A radiolabeled or tagged B7-L polypeptide can then be used as an affinity ligand to identify and isolate from this library the

subset of cells that express the B7-L polypeptide receptors on their surface. DNA can then be isolated from these cells and transfected into mammalian cells to create a secondary expression library in which the fraction of cells expressing B7-L polypeptide receptors is many-fold higher than in the original library. This enrichment process can be repeated iteratively until a single recombinant clone containing a B7-L polypeptide receptor is isolated. Isolation of the B7-L polypeptide receptors is useful for identifying or developing novel agonists and antagonists of the B7-L polypeptide signaling pathway. Such agonists and antagonists include soluble B7-L polypeptide receptors, anti-B7-L polypeptide receptor antibodies, small molecules, or antisense oligonucleotides, and they may be used for treating, preventing, or diagnosing one or more of the diseases or disorders described herein.

The murine and human B7-L nucleic acids of the present invention are also useful tools for isolating the corresponding chromosomal B7-L polypeptide genes. For example, mouse chromosomal DNA containing B7-L sequences can be used to construct knockout mice, thereby permitting an examination of the *in vivo* role for B7-L polypeptide. The human B7-L genomic DNA can be used to identify heritable tissue-degenerating diseases.

The following examples are intended for illustration purposes only, and should not be construed as limiting the scope of the invention in any way.

Example 1: Cloning of the Human B7-L Polypeptide Genes

Generally, materials and methods as described in Sambrook *et al. supra* were used to clone and analyze the genes encoding human and murine B7-L polypeptides.

A search of the Genbank-EMBL database was performed using the TBLASTX program (http://blast.wustl.edu) and B7-H1 as the query sequence. A human genomic BAC clone was identified (Genbank accession no. AC080312) as containing a nucleic acid sequence encoding a member of the B7 family.

Plasmid DNA from various cDNA libraries was used as a template in PCR amplifications performed with the primers 2434-29 (5'-G-G-G-A-G-G-A-T-G-G-A-A-T-C-C-T-G-A-G-C-3'; SEQ ID NO: 22) and 2434-34 (5'-C-T-G-G-T-A-T-G-C-T-G-A-A-G-G-C-T-C-C-3'; SEQ ID NO: 23). The PCR primers were designed to correspond to sequences within a putative exon in the BAC clone identified above. PCR amplifications were performed using standard techniques.

The expected 314 bp PCR fragment was obtained from cDNA libraries

generated from human fetal pancreas, bladder, kidney, liver, ovary, scalp, gall bladder, uterus, T-lymphocytes, and trachea. In addition, the expected fragment was obtained from a number of tumor cell lines, including prostate tumor T1175, ovary tumor T23, lung tumor T27, breast tumor T1543, and a breast carcinoma cell line. The 314 bp fragment was also obatined from several sub-pools of human mixed-tissue cDNA libraries (each sub-pool containing approximately 15,000 clones). A custom synthesized library optimized for full-length cDNA clones – the LTI-FL cDNA library (Life Technologies Inc.)– was used for further cloning experiments.

The 314 bp fragment obtained in PCR amplifications of human mixed-tissue cDNA libraries was isolated and cloned into the pCR2.1-TOPO® vector (Invitrogen, Carlsbad, CA). The DNA sequence of a selected clone was determined to confirm that the sequence of the clone was identical to that of the originally identified genomic sequence. The 314 bp fragment was then excised from the vector by Eco RI digestion and labeled by incorporation of ^{32}P-dCTP. The labeled fragment was used to screen 150,000 bacterial colonies derived from a 15,000-clone pool of the LTI-FL cDNA library that tested positive in prior PCR amplification experiments. Colonies were transferred from LB/ampicillin plates to nitrocellulose filters, pre-hybridized in 6X SSC, 0.5% SDS, 1X Denhardt's solution and 100 µg/ml denatured salmon sperm DNA for 3 hours at 60°C. Following the addition of 1 x 10^6 cpm/ml of the ^{32}P-labeled probe, hybridization was performed overnight under the same conditions. Filters were washed twice for 30 minutes at room temperature in 2X SSC and 0.1% SDS and then twice for 30 minutes at 65°C in 0.1X SSC and 0.1% SDS. Filters were then exposed to X-ray film overnight at -80°C with intensifying screens.

A single positive colony was identified in this manner and plasmid DNA from this clone was prepared by standard methods. The cDNA insert from this colony was 2.6 kb in length. DNA sequence analysis confirmed that the clone contained the putative coding region of the B7-L gene. However, although the sequence of the cDNA clone was closely related to the AL080312 genomic sequence, it was not identical.

Sequence analysis of the full-length cDNA for human B7-L polypeptide indicated that the gene comprises a 846 bp open reading frame encoding a protein of 282 amino acids and possessing a potential signal peptide of 24 amino acids in length at its amino-terminus (Figure 1; predicted signal peptide indicated by underline).

The predicted protein product of the B7-L gene is related to the B7 family of proteins. These proteins are members of the immunoglobulin superfamily and function as regulators of the T-cell mediated immune response. The members of this family possess amino acid sequences that are poorly conserved, and thus difficult to distinguish from other related molecules using computational methods. However, while the members of the B7 family of proteins share a lower level of sequence identity, the members of this family exhibit several shared structural features. These structural features include the alignment of certain cysteine residues (which form disulfide bonds within the immunoglobulin domains), the overall size of the molecule, the location of the transmembrane domain within the polypeptide, and a small cytoplasmic domain and an extracellular region that contain immunoglobulin V (variable) and C (constant) domains. The members of the B7 family are Type I membrane proteins.

The known members of the B7 family include CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7-rp1, and B7-H1. B7-1 and B7-2 interact with CD28 and CTLA-4 and are mediators of the T cell costimulatory pathway. B7-rp1 binds to a distinct receptor (ICOS; inducible co-stimulator) and is also a stimulator of T-cell proliferation. B7-H1 also co-stimulates T cell proliferation, but does not bind CD28, CTLA-4, or ICOS. Other proteins exhibiting sequence homology to the B7 family include the butyrophilins and PRO352. Still more distantly related are the myelin oligodendrocyte proteins (MOGs). Figures 2A-2C illustrate an amino acid sequence alignment of the human proteins B7-L polypeptide, CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), B7-H1, B7rp-1, PRO352, butyrophilin BTF1, butyrophilin BTF2, butyrophilin BTF4, butyrophilin BTF3, and butyrophilin.

A comparison of the B7-L nucleic sequence with a genomic sequence database (Celera, Rockville, MD) yielded several good matches, allowing the determination of a tentative intron-exon structure for the B7-L gene. A contig was built around each putative exon from genomic sequence tags (GSTs) identified in the genomic sequence database. Currently, there is no overlap between the contigs, so whether this assembly represents the true genomic sequence cannot yet be confirmed. Figures 3A-3E illustrate the genomic nucleotide sequence for human B7-L polypeptide. The location of the exons (underline) and deduced amino acid sequence of the exons are indicated. The upstream boundary of exon 1 is yet to be determined.

Example 2: B7-L mRNA Expression

The expression of B7-L mRNA is examined by Northern blot analysis. Multiple human tissue northern blots (Clontech) are probed with a suitable restriction fragment isolated from a human B7-L polypeptide cDNA clone. The probe is labeled with ^{32}P-dCTP using standard techniques.

Northern blots are prehybridized for 2 hours at 42°C in hybridization solution (5X SSC, 50% deionized formamide, 5X Denhardt's solution, 0.5% SDS, and 100 mg/ml denatured salmon sperm DNA) and then hybridized at 42°C overnight in fresh hybridization solution containing 5 ng/ml of the labeled probe. Following hybridization, the filters are washed twice for 10 minutes at room temperature in 2X SSC and 0.1% SDS, and then twice for 30 minutes at 65°C in 0.1X SSC and 0.1% SDS. The blots are then exposed to autoradiography.

The expression of B7-L mRNA is localized by *in situ* hybridization. A panel of normal embryonic and adult mouse tissues is fixed in 4% paraformaldehyde, embedded in paraffin, and sectioned at 5 µm. Sectioned tissues are permeabilized in 0.2 M HCl, digested with Proteinase K, and acetylated with triethanolamine and acetic anhydride. Sections are prehybridized for 1 hour at 60°C in hybridization solution (300 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM EDTA, 1X Denhardt's solution, 0.2% SDS, 10 mM DTT, 0.25 mg/ml tRNA, 25 µg/ml polyA, 25 µg/ml polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2 x 10^4 cpm/µl of a ^{33}P-labeled antisense riboprobe complementary to the human B7-L gene. The riboprobe is obtained by *in vitro* transcription of a clone containing human B7-L cDNA sequences using standard techniques.

Following hybridization, sections are rinsed in hybridization solution, treated with RNaseA to digest unhybridized probe, and then washed in 0.1X SSC at 55°C for 30 minutes. Sections are then immersed in NTB-2 emulsion (Kodak, Rochester, NY), exposed for 3 weeks at 4°C, developed, and counterstained with hematoxylin and eosin. Tissue morphology and hybridization signal are simultaneously analyzed by darkfield and standard illumination for brain (one sagittal and two coronal sections), gastrointestinal tract (esophagus, stomach, duodenum, jejunum, ileum, proximal colon, and distal colon), pituitary, liver, lung, heart, spleen, thymus, lymph nodes, kidney, adrenal, bladder, pancreas, salivary gland, male and female reproductive

organs (ovary, oviduct, and uterus in the female; and testis, epididymus, prostate, seminal vesicle, and vas deferens in the male), BAT and WAT (subcutaneous, perirenal), bone (femur), skin, breast, and skeletal muscle.

Example 3: Production of B7-L Polypeptides

A. Expression of B7-L Polypeptides in Bacteria

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7-L polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary vector, such as pAMG21 (ATCC no. 98113) containing the lux promoter and a gene encoding kanamycin resistance is digested with Bam HI and Nde I for directional cloning of inserted DNA. The ligated mixture is transformed into an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for kanamycin resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of the insert.

Transformed host cells are incubated in 2xYT medium containing 30 μg/mL kanamycin at 30°C prior to induction. Gene expression is induced by the addition of N-(3-oxohexanoyl)-dl-homoserine lactone to a final concentration of 30 ng/mL followed by incubation at either 30°C or 37°C for six hours. The expression of B7-L polypeptide is evaluated by centrifugation of the culture, resuspension and lysis of the bacterial pellets, and analysis of host cell proteins by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

Inclusion bodies containing B7-L polypeptide are purified as follows. Bacterial cells are pelleted by centrifugation and resuspended in water. The cell suspension is lysed by sonication and pelleted by centrifugation at 195,000 xg for 5 to 10 minutes. The supernatant is discarded, and the pellet is washed and transferred to a homogenizer. The pellet is homogenized in 5 mL of a Percoll solution (75% liquid Percoll and 0.15 M NaCl) until uniformly suspended and then diluted and centrifuged at 21,600 xg for 30 minutes. Gradient fractions containing the inclusion bodies are recovered and pooled. The isolated inclusion bodies are analyzed by SDS-PAGE.

A single band on an SDS polyacrylamide gel corresponding to *E. coli*-produced B7-L polypeptide is excised from the gel, and the N-terminal amino acid

sequence is determined essentially as described by Matsudaira *et al.*, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:10-35.

B. Expression of B7-L Polypeptide in Mammalian Cells

PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7-L polypeptide using primers corresponding to the 5' and 3' ends of the sequence. The amplified DNA products may be modified to contain restriction enzyme sites to allow for insertion into expression vectors. PCR products are gel purified and inserted into expression vectors using standard recombinant DNA methodology. An exemplary expression vector, pCEP4 (Invitrogen, Carlsbad, CA), that contains an Epstein-Barr virus origin of replication, may be used for the expression of B7-L polypeptides in 293-EBNA-1 cells. Amplified and gel purified PCR products are ligated into pCEP4 vector and introduced into 293-EBNA cells by lipofection. The transfected cells are selected in 100 μg/mL hygromycin and the resulting drug-resistant cultures are grown to confluence. The cells are then cultured in serum-free media for 72 hours. The conditioned media is removed and B7-L polypeptide expression is analyzed by SDS-PAGE.

B7-L polypeptide expression may be detected by silver staining. Alternatively, B7-L polypeptide is produced as a fusion protein with an epitope tag, such as an IgG constant domain or a FLAG epitope, which may be detected by Western blot analysis using antibodies to the peptide tag.

B7-L polypeptides may be excised from an SDS-polyacrylamide gel, or B7-L fusion proteins are purified by affinity chromatography to the epitope tag, and subjected to N-terminal amino acid sequence analysis as described herein.

C. Expression and Purification of B7-L Polypeptide in Mammalian Cells

B7-L polypeptide expression constructs are introduced into 293 EBNA or CHO cells using either a lipofection or calcium phosphate protocol.

To conduct functional studies on the B7-L polypeptides that are produced, large quantities of conditioned media are generated from a pool of hygromycin selected 293 EBNA clones. The cells are cultured in 500 cm Nunc Triple Flasks to 80% confluence before switching to serum free media a week prior to harvesting the media. Conditioned media is harvested and frozen at -20°C until purification.

Conditioned media is purified by affinity chromatography as described below. The media is thawed and then passed through a 0.2 μm filter. A Protein G column is equilibrated with PBS at pH 7.0, and then loaded with the filtered media. The column is washed with PBS until the absorbance at A_{280} reaches a baseline. B7-L polypeptide is eluted from the column with 0.1 M Glycine-HCl at pH 2.7 and immediately neutralized with 1 M Tris-HCl at pH 8.5. Fractions containing B7-L polypeptide are pooled, dialyzed in PBS, and stored at -70°C.

For Factor Xa cleavage of the human B7-L polypeptide-Fc fusion polypeptide, affinity chromatography-purified protein is dialyzed in 50 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$ at pH 8.0. The restriction protease Factor Xa is added to the dialyzed protein at 1/100 (w/w) and the sample digested overnight at room temperature.

Example 4: Production of Anti-B7-L Polypeptide Antibodies

Antibodies to B7-L polypeptides may be obtained by immunization with purified protein or with B7-L peptides produced by biological or chemical synthesis. Suitable procedures for generating antibodies include those described in Hudson and Bay, *Practical Immunology* (2nd ed., Blackwell Scientific Publications).

In one procedure for the production of antibodies, animals (typically mice or rabbits) are injected with a B7-L antigen (such as a B7-L polypeptide), and those with sufficient serum titer levels as determined by ELISA are selected for hybridoma production. Spleens of immunized animals are collected and prepared as single cell suspensions from which splenocytes are recovered. The splenocytes are fused to mouse myeloma cells (such as Sp2/0-Ag14 cells), are first incubated in DMEM with 200 U/mL penicillin, 200 μg/mL streptomycin sulfate, and 4 mM glutamine, and are then incubated in HAT selection medium (hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). After selection, the tissue culture supernatants are taken from each fusion well and tested for anti-B7-L antibody production by ELISA.

Alternative procedures for obtaining anti-B7-L antibodies may also be employed, such as the immunization of transgenic mice harboring human Ig loci for production of human antibodies, and the screening of synthetic antibody libraries, such as those generated by mutagenesis of an antibody variable domain.

Example 5: Expression of B7-L Polypeptide in Transgenic Mice

To assess the biological activity of B7-L polypeptide, a construct encoding a B7-L polypeptide/Fc fusion protein under the control of a liver specific ApoE promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to cause pathological changes that are informative as to the function of B7-L polypeptide. Similarly, a construct containing the full-length B7-L polypeptide under the control of the beta actin promoter is prepared. The delivery of this construct is expected to result in ubiquitous expression.

To generate these constructs, PCR is used to amplify template DNA sequences encoding a B7-L polypeptide using primers that correspond to the 5' and 3' ends of the desired sequence and which incorporate restriction enzyme sites to permit insertion of the amplified product into an expression vector. Following amplification, PCR products are gel purified, digested with the appropriate restriction enzymes, and ligated into an expression vector using standard recombinant DNA techniques. For example, amplified B7-L polypeptide sequences can be cloned into an expression vector under the control of the human β-actin promoter as described by Graham *et al.*, 1997, *Nature Genetics*, 17:272-74 and Ray *et al.*, 1991, *Genes Dev.* 5:2265-73.

Following ligation, reaction mixtures are used to transform an *E. coli* host strain by electroporation and transformants are selected for drug resistance. Plasmid DNA from selected colonies is isolated and subjected to DNA sequencing to confirm the presence of an appropriate insert and absence of mutation. The B7-L polypeptide expression vector is purified through two rounds of CsCl density gradient centrifugation, cleaved with a suitable restriction enzyme, and the linearized fragment containing the B7-L polypeptide transgene is purified by gel electrophoresis. The purified fragment is resuspended in 5 mM Tris, pH 7.4, and 0.2 mM EDTA at a concentration of 2 mg/mL.

Single-cell embryos from BDF1 x BDF1 bred mice are injected as described (PCT Pub. No. WO 97/23614). Embryos are cultured overnight in a CO_2 incubator and 15-20 two-cell embryos are transferred to the oviducts of a pseudopregnant CD1 female mice. Offspring obtained from the implantation of microinjected embryos are screened by PCR amplification of the integrated transgene in genomic DNA samples as follows. Ear pieces are digested in 20 mL ear buffer (20 mM Tris, pH 8.0, 10 mM EDTA, 0.5% SDS, and 500 mg/mL proteinase K) at 55°C overnight. The sample is then diluted with 200 mL of TE, and 2 mL of the ear sample is used in a PCR reaction using appropriate primers.

At 8 weeks of age, transgenic founder animals and control animals are sacrificed for necropsy and pathological analysis. Portions of spleen are removed and total cellular RNA isolated from the spleens using the Total RNA Extraction Kit (Qiagen) and transgene expression determined by RT-PCR. RNA recovered from spleens is converted to cDNA using the SuperScript™ Preamplification System (Gibco-BRL) as follows. A suitable primer, located in the expression vector sequence and 3' to the B7-L polypeptide transgene, is used to prime cDNA synthesis from the transgene transcripts. Ten mg of total spleen RNA from transgenic founders and controls is incubated with 1 mM of primer for 10 minutes at 70°C and placed on ice. The reaction is then supplemented with 10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 2.5 mM $MgCl_2$, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at 37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for B7-L polypeptide.

Example 6: Biological Activity of B7-L Polypeptide in Transgenic Mice

Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isofluorane and blood drawn by cardiac puncture. The samples are subjected to hematology and serum chemistry analysis. Radiography is performed after terminal exsanguination. Upon gross dissection, major visceral organs are subject to weight analysis.

Following gross dissection, tissues (*i.e.*, liver, spleen, pancreas, stomach, the entire gastrointestinal tract, kidney, reproductive organs, skin and mammary glands, bone, brain, heart, lung, thymus, trachea, esophagus, thyroid, adrenals, urinary bladder, lymph nodes and skeletal muscle) are removed and fixed in 10% buffered Zn-Formalin for histological examination. After fixation, the tissues are processed into paraffin blocks, and 3 mm sections are obtained. All sections are stained with hematoxylin and eosin, and are then subjected to histological analysis.

The spleen, lymph node, and Peyer's patches of both the transgenic and the control mice are subjected to immunohistology analysis with B cell and T cell specific antibodies as follows. The formalin fixed paraffin embedded sections are deparaffinized and hydrated in deionized water. The sections are quenched with 3% hydrogen peroxide, blocked with Protein Block (Lipshaw, Pittsburgh, PA), and

incubated in rat monoclonal anti-mouse B220 and CD3 (Harlan, Indianapolis, IN). Antibody binding is detected by biotinylated rabbit anti-rat immunoglobulins and peroxidase conjugated streptavidin (BioGenex, San Ramon, CA) with DAB as a chromagen (BioTek, Santa Barbara, CA). Sections are counterstained with hematoxylin.

After necropsy, MLN and sections of spleen and thymus from transgenic animals and control littermates are removed. Single cell suspensions are prepared by gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed twice, counted, and approximately 1 x 10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 µg CD16/32(FcγIII/II) Fc block in a 20 µL volume. Samples are then stained for 30 minutes at 2-8°C in a 100 µL volume of PBS (lacking Ca^{+} and Mg^{+}), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5µg antibody of FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PharMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow cytometry on a FACScan (Becton Dickinson).

While the present invention has been described in terms of the preferred embodiments, it is understood that variations and modifications will occur to those skilled in the art. Therefore, it is intended that the appended claims cover all such equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1;

(b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2;

(c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of either (b) or (c); and

(d) a nucleotide sequence complementary to either (b) or (c).

2. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

(a) a nucleotide sequence encoding a polypeptide which is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in SEQ ID NO: 1 or (a);

(c) a region of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2, or is antigenic;

(d) a region of the nucleotide sequence of SEQ ID NO: 1 or any of (a)-(c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

(e) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a)-(d); and

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

3. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:

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

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

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

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

(e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

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

(g) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of any of (a) - (f); and

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

4. A vector comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

5. A host cell comprising the vector of Claim 4.

6. The host cell of Claim 5 that is a eukaryotic cell.

7. The host cell of Claim 5 that is a prokaryotic cell.

8. A process of producing a B7-L polypeptide comprising culturing the host cell of Claim 5 under suitable conditions to express the polypeptide, and optionally isolating the polypeptide from the culture.

9. A polypeptide produced by the process of Claim 8.

10. The process of Claim 8, wherein the nucleic acid molecule comprises promoter DNA other than the promoter DNA for the native B7-L polypeptide operatively linked to the DNA encoding the B7-L polypeptide.

11. The isolated nucleic acid molecule according to Claim 2, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTN, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

12. A process for determining whether a compound inhibits B7-L polypeptide activity or B7-L polypeptide production comprising exposing a cell according to any of Claims 5, 6, or 7 to the compound and measuring B7-L polypeptide activity or B7-L polypeptide production in said cell.

13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2.

14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3, optionally further comprising an amino-terminal methionine;

(b) an amino acid sequence for an ortholog of SEQ ID NO: 2;

(c) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(d) a fragment of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2, or is antigenic; and

(e) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 or any of (a) -(c).

15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

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

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

(c) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2;

(d) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2; and

(e) the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

17. The isolated polypeptide according to Claim 14, wherein the percent identity is determined using a computer program selected from the group consisting of GAP, BLASTP, FASTA, BLASTA, BLASTX, BestFit, and the Smith-Waterman algorithm.

18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 2, or a fragment thereof.

20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.

21. The selective binding agent of Claim 18 that is a humanized antibody.

22. The selective binding agent of Claim 18 that is a human antibody or fragment thereof.

23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.

24. The selective binding agent Claim 18 that is a monoclonal antibody or fragment thereof.

25. The selective binding agent of Claim 18 that is a chimeric antibody or fragment thereof.

26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.

27. The selective binding agent of Claim 18 that is an antiidiotypic antibody or fragment thereof.

28. The selective binding agent of Claim 18 that is a variable region fragment.

29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.

30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

31. The selective binding agent of Claim 18 that is bound to a detectable label.

32. The selective binding agent of Claim 18 that antagonizes B7-L polypeptide biological activity.

33. A method for treating, preventing, or ameliorating a B7-L polypeptide-related disease, condition, or disorder comprising administering to a patient an effective amount of a selective binding agent according to Claim 18.

34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of SEQ ID NO: 2.

35. A hybridoma that produces a selective binding agent capable of binding a polypeptide according to any of Claims 1, 2, or 3.

36. A method of detecting or quantitating the amount of B7-L polypeptide using the anti-B7-L antibody or fragment of Claim 18.

37. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

38. The composition of Claim 37, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.

39. The composition of Claim 37 wherein the polypeptide comprises the amino acid sequence as set forth in SEQ ID NO: 3.

40. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.

41. The polypeptide of Claim 40 that is covalently modified with a water-soluble polymer.

42. The polypeptide of Claim 41, wherein the water-soluble polymer is selected from the group consisting of polyethylene glycol, monomethoxy-polyethylene glycol, dextran, cellulose, poly-(N-vinyl pyrrolidone) polyethylene glycol, propylene glycol homopolymers, polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymers, polyoxyethylated polyols, and polyvinyl alcohol.

43. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.

44. The composition of Claim 43, wherein said nucleic acid molecule is contained in a viral vector.

45. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

46. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.

47. The fusion polypeptide of Claim 46, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

48. A method for treating, preventing, or ameliorating a medical condition comprising administering to a patient the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid of any of Claims 1, 2, or 3.

49. A method of diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition in a subject comprising:

(a) determining the presence or amount of expression of the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, or the polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 in a sample; and

(b) diagnosing a pathological condition or a susceptibility to a pathological condition based on the presence or amount of expression of the polypeptide.

50. A device, comprising:

(a) a membrane suitable for implantation; and

(b) cells encapsulated within said membrane, wherein said cells secrete a protein of any of Claims 13, 14, or 15; and

said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

51. A method of identifying a compound which binds to a B7-L polypeptide comprising:

(a) contacting the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 with a compound; and

(b) determining the extent of binding of the B7-L polypeptide to the compound.

52. The method of Claim 51, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.

53. A method of modulating levels of a polypeptide in an animal comprising administering to the animal the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

54. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

55. A process for determining whether a compound inhibits B7-L polypeptide activity or B7-L polypeptide production comprising exposing a transgenic mammal according to Claim 54 to the compound, and measuring B7-L polypeptide activity or B7-L polypeptide production in said mammal.

56. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.

57. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

58. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in *SEQ ID NO*: 2 with at least one conservative amino acid substitution selected from the group consisting of: methionine at position 4; leucine or methionine at position 12; leucine or valine at position 13; leucine or valine at position 16; leucine or valine at position 17; leucine, valine, or methionine at position 18; leucine or valine at position 23; leucine at position 26; leucine or valine at position 27; valine or leucine at position 31; leucine or isoleucine at position 39; alanine at position 46; valine at position 48; alanine at position 52; isoleucine at position 54; glutamic acid at position 61; valine at position 64; glutamic acid at position 66; leucine, methionine, or valine at position 67; valine or leucine at position 69; arginine at position 73; leucine at position 76; valine at position 79; methionine at position 80; tyrosine at position 83; arginine at position 84; aspartic acid at position 85; arginine at position 87; glutamic acid at position 88; aspartic acid at position 92; tyrosine at position 97; lysine at position 98; leucine, isoleucine, or methionine at position 103; isoleucine, leucine, or methionine at position 108; isoleucine at position 115; isoleucine at position 117; leucine or isoleucine at position 120; valine or isoleucine at position 122; serine at position 123; glutamic acid at position 124; serine at position 127; phenylalanine at position 128; arginine at position 129; phenylalanine at position 131; valine at position 132; alanine at position 137; valine or isoleucine at position 143; alanine at position 148; glycine at position 149; isoleucine or methionine at position 155; isoleucine or methionine at position 157; isoleucine at position 166; tyrosine at position 174; isoleucine, leucine, or methionine at position 179; isoleucine at position 180; leucine at position 194; phenylalanine at position 215; serine at position 218; serine at position 222; isoleucine or leucine at position 226; valine or leucine at position 227; leucine or valine at position 231; isoleucine at position 240; aspartic acid at position 242; methionine or leucine at position 245; arginine at position 246; threonine at position 256; valine or isoleucine at position 260; leucine or isoleucine at position 262; leucine or valine at position 268; valine or methionine at position 272; valine at position 273; valine, isoleucine, or methionine at position 275; phenylalanine at position 278; valine or isoleucine at position 279; isoleucine or

valine at position 281; and arginine at position 282; wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in SEQ ID NO: 2.

FIG. 1A

```
gcggcagctc cactcaggca gtacccagat acgctgggaa cattccccag cc atg gct 50
                                                        Met Ala
                                                          1

tac ctg ggg cag atc ctc ttc tgg agc ata att agc atc atc att att  106
Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile Ile Ile
          5                  10                  15

ctg gct gga gcn att gca ctc atc att ggc ttt ggt att tca ggg aga  154
Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg
      20                  25                  30

cac tcc arc aca gtc act act gtc gcc tca gct ggg asc att ggg gag  202
His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu
 35                  40                  45                  50

gat gga atc ctg agc tgt acc ttt gaa cct gac atc aaa ctt tct gat  250
Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp
                 55                  60                  65

atc gtg ata caa tgg ctg aag gaa ggt gtt tta ggc ttg gtc cat gag  298
Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu
             70                  75                  80

ttc aaa gaa ggc aaa gat gag ctg tcg gag cag gat gaa atg ttc aga  346
Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg
         85                  90                  95

ggc cgg acn gca gtg ttt gct gat caa gtg ata gtt ggc aat gcc tct  394
Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser
     100                 105                 110

ttg cgg ctg aaa aac gtg caa ctc acn gat gct ggc acc tac aaa tgt  442
Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys
115                 120                 125                 130

tat atc atc act tct aaa ggc aag ggg aat gct aac ctt gag tat aaa  490
Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys
                135                 140                 145

act gga gcc ttc agc atg ccg gaa gtg aat gtg gac tat aat gcc agc  538
Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser
            150                 155                 160

tca gag acc ttg cgg tgt gag gct ccc cga tgg ttc ccc cag ccc aca  586
Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr
        165                 170                 175

gtg gtc tgg gca tcc caa gtt gac cag gga gcc aac ttc tcg gaa gtc  634
Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val
    180                 185                 190
```

FIG. 1B

```
tcc aat acc agc ttt gag ctg aac tct gag aat gtg acc atg aag gtt   682
Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val
195                 200                 205                 210

gtg tct gtg ctc tac aat gtt acg atc aac aac aca tac tcc tgt atg   730
Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met
                215                 220                 225

att gaa aat gac att gcc aaa gca aca ggg gat atc aaa gtg aca gaa   778
Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu
            230                 235                 240

tcg gag atc aaa agg cgg agt cac cta cag ctg cta aac tca aag gct   826
Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala
        245                 250                 255

tct ctg tgt gtc tct cct ttc ttt gcc atc agc tgg gca ctt ctg cct   874
Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro
    260                 265                 270

ctc agc cct tac ctg atg cta aaa taa tgtgcctgg ccacaaaaaa          921
Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275                 280

gcatgcaaag tcattgttac aacagggatc tacagaacta tttcaccacc agatatgacc 981

tagttttata tttctgggag gaaatgaatt catatctaga agtctggact gagcaaacaa 1041

gagcaagaaa caaaaagaag ccaaaagcag aaggatccaa tatgaacaag atagaatctat 1101

chtcaaagac atattagaag ttgggaaaat aattcatgtg aactagacaa gtgtgttaag 1161

agtgataagt aaaatgcacg tggagacaag tgcatcccca gatctcaggg accteccect 1221

gcctgtcacc tgcggagtga gaggccagga tagtgcatgt tctttgtctc tgaattttta 1281

gttctatgtg ctgtaatgtt gctctgagga agcccctgga aagtctatcc caacatatcc 1341

acatcttata ttccacaaat taaggtgtag tatgtacact aagacgctgc taattgactg 1401

ccacttcgca actcagggcc ggctgcattt tagtaatggg tcaaatgatt cacttttat 1461

gatgcttcca aaggtgcctt ggcttctctt cccaactgac aaatgccaaa gttgagaaaa 1521

atgatcataa tttagcata aacagagcag tcggcgacac cgattttata aataaactga 1581

gcacctttct tttaaacaaa caaatgcggg tttatttctc agctgatgtt catccgtgaa 1641

tggtccaggg aaggaccttt cacattgact atatggcatt atgtcatcac aagctctgag 1701

gtttctcctt tccatcctgc gtggacagct aagaactcag ttttcaatag catctagagc 1761

agtggactc agatgggtg atttcgccc ccatctcngg gggaatgtct gaagacaatt 1821
```

FIG. 1C

```
ttggttacct caatgaggga gtggaggagg atacagtgct actaccaact agtggataaa 1881
ggccagggat gctgccaaac ctcctaccat gtacaggacg tctccccatt acaactaccc 1941
aatccgaagt gtcaactgtg tcaggactaa gaaaccctgg ttttgagtag aaaagggcct 2001
ggaaagaggg yagccaacaa atctgtctgc ttcctcacat tagtcattgg caaatgagya 2061
ttctgtctct ttggctgctg cctcagcaca gagagccaga actctatcgg gcaccaggat 2121
aacatctctc agtgaacaga gttgaaaagg cctatgggaa atgcctgatg ggattatctt 2181
cagcttgttg agcttctaag tttctttccc ttcattctac cctgcaagcc aagttctgta 2241
agagaaatgc ctgagttcta gctcaggttt tcttactctg aatttagatc tccagaccct 2301
tcctggccac aattcaaatt aaggcaacaa acatatacct tccatgaagc acacacagac 2361
ttttgaaagc aaggacaatg actgcttgaa ttgaggcctt gaggaatgaa gcttlgaagg 2421
aaaagaatac tttgtttccs gcccccttcc cacactcttc atgtgttaac cactgccttc 2481
ctggaccttg gagccacggt gactgtatta catgttgtta tagaaaactg attttaragt 2541
tctgatcgtt caagagaatg attaaataaa catttcctaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2601
aa                                                                2603
```

FIG. 2A

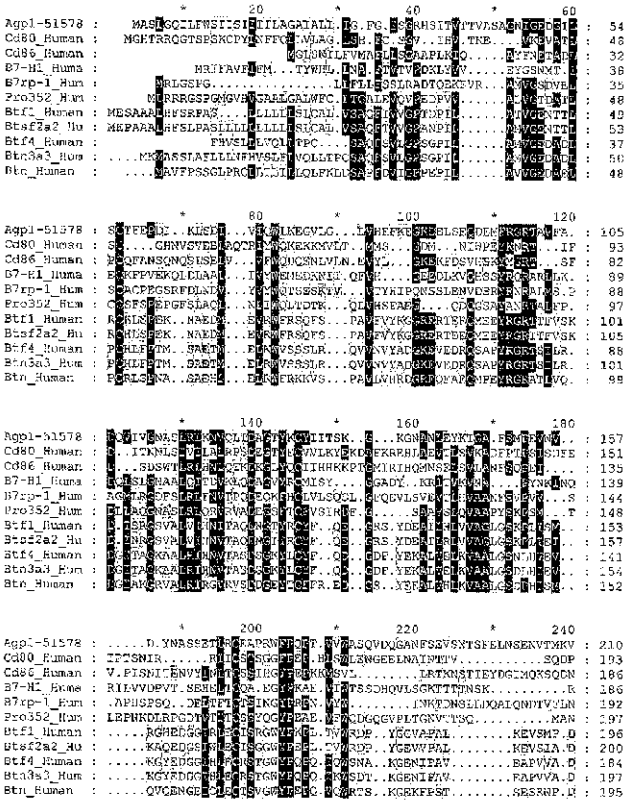


FIG. 2B

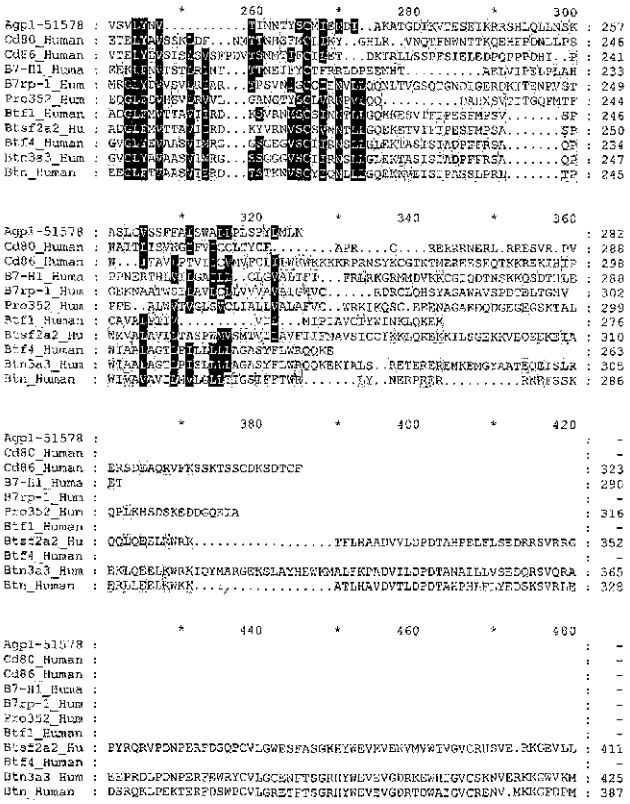


FIG. 2C

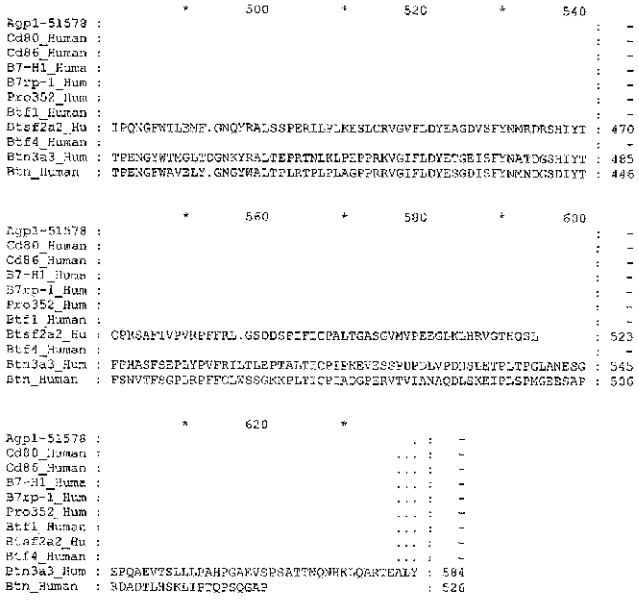

Agp1-51578
Cd80_Human
Cd86_Human
B7-H1_Huma
B7xp-1_Hum
Pro352_Hum
Btf1_Human
Btsf2a2_Hu
Btf4_Human
Btn3a3_Hum
Btn_Human

FIG. 3A

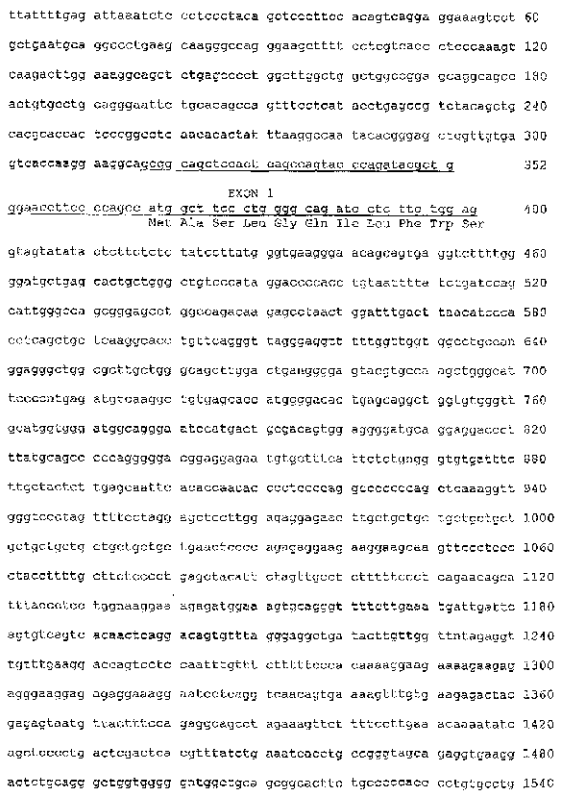


FIG. 3B

gctacagcac tgtgctccag gaggaagcagt gggtggcagg ggcttcccta tgaacccttc 1600

tgccctgaga ggatgtccct aaggaagcacc tatgtcagag gagctagcat tttgtgagtg 1660

actccttccc tgccctgcac taggtgtctt agagcagcgt gtccaccact gccttgtgaa 1720

gactcgttat cacctcagag aagttaaggc caggtgactg tgaaactgtg catgagggga 1780

tattgctctg aaatcccaag ctcrrcrccc ctgccaccct tgcnncctgc actgccagtc 1840

ccagttctcc atgccccccn ttcctccagc cttgatccca aggacatgaa acactcctcc 1900

tgcaccaagt ggctccnctg ttcagaggtc agatgggatg tgtgggctct ctcgtaatgc 1960

tttgcatcca gcctgactgg ttttgctgga ggattagcag gaggtgggtg ttcaaaattc 2020

gtatccccta ccctttagaa acccactgga atcaacagag actcctcttg tlggctcctg 2080

catgccttgt tagctattca tgctctgcag tttcagaagc agcgactgtc catnagggtg 2140

gcagatcctt tgtgcaaggg acctccaggn agagggccaa tgagcagctt cagtgggtag 2200

caggatcatg aaagctcatc tcagggatgc aggtggagcc tgcctgggct aactcttgac 2260

cctaatnacc ctcttcctct gtcataatgg ccttaattca taaaaatacc tctcctggag 2320

gtcatcatga cagtggtgat gtgggaacgc tcatgmnnnn nnbnnnaccca aatgtccatc 2380

aatgataggc tggatnaaga aaatgtggca cgtatacacc atagaatact atgcagccat 2440

aaaaaagaat gagttcatgt cctttgcagg aacatggatg aagctggaaa ccatcattct 2500

cagcaaacta acacaggnac agaaancccn acaccacatg ttctcactca taaatgggag 2560

ttgaacaatg agaacacatg gatacaggaa gggtaacatc acacactggg gcctgtcagg 2620

gtggctgggg gcaaggggag ggagggcatt aggncaaata atgcatgcag gtcttannac 2680

ctagatgacg ggttgatagg tgcagcnaac cacccatgaca catgtgtncc tctgtnacga 2740

acctgcaagt tctgcacatg tatcccagaa cttaaagtaa aataaantaa aaaataattg 2800

gtgaggntta tatcnaaaca cagtggttgt atttagatga tgggatttaa ggtgatttat 2860

ttgtctcatt tttgcttgtt tatatttttt aaacttctg tagtaaatat gtttttgttt 2920

ttgtttnttt aatnaaagaa aacagactcc cactgatgac ttacggagtg cagtagatga 2980

ggtgtgagtg ggtacaaagt gaagaagatg tgaccattgt ccttaatgga gtttaaagtc 3040

tatggaagga gataagacag ggagacaaat gacacaagag agtggacagt gatgctcagg 3100

gaaggctggg aacaggacca gtccttctca agtggcacct ggcattaaag aaatgtttta 3160

FIG. 3C

```
atcattcttg ccccaacagt ctccatatat ggtcttcccc gatctggaaa taggacagta 3220

aatggcaccg tcagaggcaa gggtcacttt tttcattgat cccagagccc cagggggatg 3280

gggatggaat tgctgaaatt cctttctaag gtacccgttt ctaggaacaa gcttatgtgg 3340

aagaaaaagt tgagatgctt tatgtaactc atcttatcca caacagattt gtacccaagt 3400

tgcaaagcag cacatcaaga ggaatggaga actaattttc tgttctctcc tctcttcccg 3460

tag c ata att agc atc atc att att gtg got gga gca att gca ctc atc 3509
     Ile Ile Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile

          EXON 2
att ggc ttt ggt att tca g gtaagtgat ttcttgcatt actacaatct          3557
Ile Gly Phe Gly Ile Ser G.y

attcaccact cacaattaaa ctcctaatca ctcagtgcgt tagcatggaa agagcccaga 3617

gctttgaccc agaaaacctc agagtatagc attcattctt ctccttcttg tgctttctct 3677

acattagtca gttaagtcct cgacttcagt gtcctcattt tttattattt atttattttat 3737

tttgagacag ggtctggctc tgttgcccag gttggagtgc agtggcatga tctcagctta 3797

ctgcaacctc cacctcctgg gttcaagcga tcttctcacc tcagcctccc aagtagctag 3857

gactacaggc atgtgccacc acacgccagg ctaatttttt tatttttagt agagatgggg 3917

tttcaccat gttgctcagg ctggtctcaa actcctgagc tcaagcaatc cacctgcctc 3977

ggcctcccaa agtgctggga ttgccggcct gagccaccgt gcccaggcta gnnnnnnnnn 4037

ngtattttta atttatcaca gaagtctctg tcttgcttcc agcactgaag gttttgtttg 4097

tagaagttcc aaggcttccc ttagcattga tcttgcttcc ctgaactgca g gg aga    4153
                                                          Arg

cac tcc atc aca gtc act acc gtc gcc tca gct ggg aac att ggg gag    4202
His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu

gat gga atc ctg agc tgc act ttt gaa cct gac atc aaa ctt tct gat    4250
Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp

                    EXON 3
atc gtg ata caa tgg ctg aag gaa ggt gtt tta ggc ttg gtc cat gag    4298
Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu

ttc aaa gaa ggc aaa gat gag ctg tcg gag cag gat gaa atg ttc aga    4346
Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg

ggc cgg aca gca gtg ttt gct gat caa gtg ata ctt ggc aat gcc tct    4394
Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser
```

FIG. 3D

```
ttg cgg ctg aaa aac gtg caa ctc aca gat gnt ggc acc tac aaa tgt  4442
Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys

tat atc atc act tct aaa ggc aag ggg aat gct aac ctt gag tat aaa  4490
Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys

act gga g gtgagttact tttgagaaga gatttttttaa agcaccaaaa gtatttgagg  4546
Thr Gly Ala

ctaaagatta tgagttgctt atgaaatatg ttgtgaccaa tatcagacca tgatgctccc 4606

aattctgcta acagctgttt ttgccatttt atggccaaga ctcacaccaa cccaaaaagt 4666

agccaaclat aagagaggcc ttaaaaatct tttgtttctgg gttctctctg cttcagaatt 4726

tccaggtgtg ttctctattc aacaaaatac atgtagcctc ttttgtggta gcacctggta 4786

cagctaatca gagcagccta gcctgggacc tttccacgct aagtagaccc aagcgcaatc 4846

ctgaaatcag tatcttcaga gactcatgac agtgaggtgca tttagaaagt tcaaagggaa 4906

ctaaccaaaa cgaaaaccac attgtcctat aaactcatta atnnannnnn nnaggaaaat 4966

gcctaattcc ctaagggata ggcttttta tgaccactga agttcctctt actiggagaa 5026

aattttctat tgtaaccata atatacctag aatttaggtc cttgggtttt gtgattggcc 5086

aaaggtttgt gatgtatagc aatactatga gcaaataatt attcgcacct ataatacaal 5146

gggctataca cagctggacc tatgaggaag tacngagtgg cttcaatgat aaaaaaaaan 5206

aaaaaaaaat gacfgcattt ttaaggccla gagcttcaaa ggctatattg tcttacgtgt 5266

ctgactttgg catctgccct ttctgacttt tgaccctgca g cc ttc agc atg ccg  5321
                                                Phe Ser Met Pro

gaa gtg aat gtg gac tat aat gtc agc tca gag acc ttg cgg tgt gag  5370
Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu

gct ccc aga tgg ttc ccc cag ccc aca gtg gtc tgg gca tcc caa gtt  5418
Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val

                    EXON 4
gac cag gga gcc aac ttc tcg gaa gtc tcc gat acc agc ttt gag ctg  5466
Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu

aac tct gag aat gtg acc atg aag gtt gtg tct gtg ctc tac aat gtt  5514
Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val

acg atc aac aac acg tac tcc tgt atg att gaa aat gac att gcc aaa  5562
Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys
```

FIG. 3E

```
gca acg ggg gat atc aaa gtg acg g gtgggttcct gcatgctttt gtatggattt
5617
Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu

actggggaaa gagtaaaatc taaattaaaa tttaanttca ttaatagata nnnnnnnnnn 5676

nagggtgagt gttcnntgga gtggaccacc gaatggaatt ttcttttgaag aaagagaaag 5736

ctctactttt aagccagtta cggayaggtg ggcaaagggg taaaaaantt gcctgaatka 5796

ggaacacctt ngttctgttt ttcaggtact tttattgct aaccagtcat gtgaagaaga 5856

catccagctt ctccngtatg accctaaact ttttctctca cttcacag aa tcg gag   5912
                                                    Ser Glu

atc aaa agg cgg agt cac cta cag ctg cta aac tca aag gct tct ctg   5960
Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu

                    EXON 5
tgt gtc tct tcg ttc ttt gcc atc agc tgg gca ctt ctg cct ctc agc   6008
Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser

cct tac ctg atg cta aaa taa tgtgccttgc ccacaaaaaa gcatgca aag     6059
Pro Tyr Leu Met Leu Lys  *

tca:tgttac aacag gtgagattaa tcacaaatag tgtgggatat                6104

tggttctgtg ggtgcttgtg ctcctaatga gagtcggata gccttcagca tcagccnnag 6164

aaagaaacat ttaatgacac cagggctgtg acattattc cactagtact gggaaagtta 6224

atcattgtt aggtcagcaa acagcatgga cttcattgac agacccatag gaaaaatnac 6284

atacaattca ggtatttatg taaattcaaa tacctttnaa gttactcagt catcnatgaa 6344

ggcaaaataa cttatgaaga gaaaga                                     6370
```

SEQUENCE LISTING

<110> Fox, Michael
Sullivan, John K.
Fang, Mei

<120> B7-Like Molecules and Uses Thereof

<130> 00-513-B

<140>
<141>

<150> 60/215,645
<151> 2000-06-30

<160> 23

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1
<211> 2603
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> CDS
<222> (58)..(901)

<400> 1
gcggcagctc cactcagcca gtaccacagat acgctgggaa ccttccccay cc atg gct 56
Met Ala
1

tcc ctg ggg cag atc ctc ttc tgg agc ata att agc atc ata att att 104
Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile Ile Ile
5 10 15

ctg gct gga gca att gca gtc atc att ggc ttt ggt att tca ggg aga 152
Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg
20 25 30

cac tcc atc aca gtc act act gtc gcc tca gct ggg aac atg ggg gag 200
His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu
35 40 45 50

gat gga atc ctg agc tgc act ttt gaa cct gac atc aaa ctt tct gat 248
Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp
55 60 65

atc gtg ata caa tgg ctg aag gaa ggt gtt tta ggc ttg gtc cat gag 296
Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu
70 75 80

ttc aaa gaa ggc aaa gat gag ctg tcg gag cag gat gaa atg ttc aga 344
Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg
85 90 95

ggc cgg aca gca gtg ttt gct gat caa gtg ata gtt ggc aat gcc tct 392
Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser
100 105 110

```
ttg cgg ctg aaa aac gtg caa ctc aca gat gct ggc acc tac aaa tgt   432
Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys
115                 120                 125                 130

tat atc atc act tct aaa ggc aag ggg aat gct aac ctt gag tat aaa   480
Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys
                135                 140                 145

act gga gcc ttc agc atg ccg gaa gtg aat gtg gac tat aat gcc agc   528
Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser
            150                 155                 160

tca gag acc ttg cgg tgt gag gct ccc cga tgg ttc ccc cag ccc aca   576
Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr
        165                 170                 175

gtg gtc tgg gca tcc caa gtt gac cag gga gcc aac ttc tcg gaa gtc   624
Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val
    180                 185                 190

tcc aac acc agc ttt gag ctg aac tct gag aat gtg acc atg aag gtt   672
Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val
195                 200                 205                 210

gtg tct gtg ctc tac aat gtt acg atc aac aac aca tac tcc tgt atg   720
Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met
                215                 220                 225

att gaa aat gac att gcc aaa gca acg ggg gat atc aaa gtg acg gaa   768
Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu
            230                 235                 240

tcg gag atc aaa agg cgg agt cac cta cag ctg cta aac tca aag gct   816
Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala
        245                 250                 255

tct ctg tgt gtc tct tct ttc ttt gcc atc agc tgg gca ctt ctg cct   864
Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro
    260                 265                 270

ctc agc cct tac ctg atg cta aaa taa tgtgccttgg ccacaaaaaa          921
Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
275                 280

gcatgcaaag tcattgttac aacagggatc tacagaacta tttcaccacc agattatgacc 981

tagttttata tttctgggag gaaattgaatt catatctaga agtctggact gagcaaacaa 1041

gagcaagaaa caaaaagaag ccaaangcag aagyctccaa tatgaacaag ataaatctat 1101

gttcaaagac atattagaag ttgggaaaat agttcatgtg aactagacaa gtgtgttaag 1161

agtgataagt aaaatgcacg tggagacaag tgcatcccca gatctcaggg acctcccctt 1221

gcctgccacc tggggagtga gaggacagga tagtgcatgt tctttgtctc tgaatttttta 1281

gttatatgtg ntgtaatgtt gctctgagga agcccctgga aagtctatcc cancatatcc 1341

acatcttata ttccacaaat taagctgtag tatgtacccc aagacgctgc taattgactg 1401
```

ccactttgca actcaggggc ggctgcattt tagtaatggg tcaaatgatt cactttttat 1461

gatgcttcca anggtgcctt ggcttctctt cccaactgac aaatgccaaa gttgagaaaa 1521

atgatcatca ttttagcata aacagagcag tcggcgacac cgcttttata aataaactga 1581

gcaccttctt tttaaacaaa caaatgcggg tttatttctc agatgatgtt catcnghgaa 1641

tggtccaggg aaggaccttt caccttgact atatggcatt atgtcatcac aagctctgag 1701

gcttctcctt tccatcctgc gtggacagct aagacctcag ttttcaatag catctagagc 1761

agtgggactc agntggggtg atttagcccc ccatctccgg gggaatgtct gaggancatt 1821

ttggttacct caatgaggga gtggaggagg atacagtgct actaccanct agtggataaa 1881

ggccnggggt gctgctcaac ctcctaccat gtccaggang tctcccnctt acaactaccc 1941

aatccgnagt gtccnactgg tcaggactaa gcaaccctgg ttttgagtag aaaagggcct 2001

ggaaagaggg gagccnacaa atctgtctgc ttcctcnnat tagtcnttgg caaataagca 2061

ttctgtctct ttggctgntg cctcagcacn gngagccaga actctatcgg gcaccaggnt 2121

aancatctcc agtgnacagn gttgnccnqg cctatgggaa atgcctgatg ggattatctt 2181

cagcttgttg agcttctaag tttcttttcc ttcattctac cctgcnagcc aagttctgta 2241

agagaaatgc ctgagttcta gctcaggttt tcttactctg aatttagatc tccagaccct 2301

ncctqqccac nattcaaatt aaggcnacaa acatatacct tccatgnagc nnncncagac 2361

ttttgnaagc nnggncnatg nctgcttgaa ttgaygcctt gaggnatgaa gctttganqg 2421

annnganatac tttgtttcca gccnccctcc cacactcttc atgtgttaac cnctgccttc 2481

ctggncattg gagccncggt gnctgtattn catgttgtta tagannnntg attttnragt 2541

tctgatcgtt cnagagaatg attaaatata catttcctaa aaaannnnna aaaannnnnn 2601

aa 2603

<210> 2
<211> 282
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2
Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser Ile Ile Ser Ile Ile
1 5 10 15

Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser
20 25 30

Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile
35 40 45

Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu
50 55 60

```
Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val
 65                  70                  75                  80

His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met
                85                  90                  95

Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn
            100                 105                 110

Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr
        115                 120                 125

Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu
    130                 135                 140

Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn
145                 150                 155                 160

Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln
                165                 170                 175

Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser
            180                 185                 190

Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met
        195                 200                 205

Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser
    210                 215                 220

Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val
225                 230                 235                 240

Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser
                245                 250                 255

Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu
            260                 265                 270

Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
        275                 280
```

<210> 3
<211> 298
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 3
Leu Ile Ile Gly Phe Gly Ile Ser Gly Arg His Ser Ile Thr Val Thr
  1               5                  10                  15

Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys
            20                  25                  30

Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser Asp Ile Val Ile Gln Trp Leu
        35                  40                  45

Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp
    50                  55                  60
```

```
Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe
 65                  70                  75                  80

Ala Asp Gln Val Ile Val Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val
                85                  90                  95

Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys
            100                 105                 110

Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr Lys Thr Gly Ala Phe Ser Met
        115                 120                 125

Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr Leu Arg Cys
    130                 135                 140

Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp Ala Ser Gln
145                 150                 155                 160

Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr Ser Phe Glu
                165                 170                 175

Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val Leu Tyr Asn
            180                 185                 190

Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn Asp Ile Ala
        195                 200                 205

Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu Ser Glu Ile Lys Arg Arg
    210                 215                 220

Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala Ser Leu Cys Val Ser Ser
225                 230                 235                 240

Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro Leu Ser Pro Tyr Leu Met
                245                 250                 255

Leu Lys


<210> 4
<211> 6370
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> misc_feature
<222> (640)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (675)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (766)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
```

<221> misc_feature
<222> (668)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (1134)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (1233)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (1502)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (3918)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (5794)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (5807)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> misc_feature
<222> (6322)
<223> "n" can represent A, G, C, or T

<220>
<221> unsure
<222> (2356)..(2365)

<220>
<221> unsure
<222> (4029)..(4038)

<220>
<221> unsure
<222> (4949)..(4958)

<220>
<221> unsure
<222> (5668)..(5677)

<220>
<221> exon
<222> (317)..(400)

<220>
<221> exon

<222> (3455)..(3527)

<220>
<221> exon
<222> (4149)..(4496)

<220>
<221> exon
<222> (5308)..(5586)

<220>
<221> exon
<222> (5807)..(6074)

<400> 4
ttattttgag attaaatctc cctcctaca gttcxttcc acagtcagga ggaaagtcct 60

gctgaatgca ggccctgaag caagggccag ggaagtttt cctcgtcacc ctcccaaagt 120

caagacttgg aaaggcaact ctgagccccc ggcttggctg gctggccgga gcaggcagcc 180

actgtgcctg cagggaattc tgcacagcca gttcctcat acctgagcag tctacagctg 240

cacgcacccac tcccggcctc aacacactat ttaaggccaa tacacgggag atggttgtgc 300

gtcaccaagg aaggca gcg gca gct cca ctc agc cag tac cca gat acg ctg 352

gga acc ttc ccc agc cat ggc ttc cct ggg gca gat cct ctt ctg gag 400

gtagtatata ctcttctctc tatccttatg ggtgaaggga acagcaqtga ggtcttttgg 460

ggatgctgag cactgctggg ctgtcccata ggacccaacc tgtaatttta tctgatccag 520

cattgggcca gcgggagcct ggccagacaa gaqcctaact ggatttgact tascatccca 580

cctcagctgc tcaaggcacc tgttnaggga tagggaggtt tttggttggt ggcctgccan 640

ggagggctgg cqcttgctgg gcagcttgga ctgangggga gtacgtgcca agctgggcat 700

tcccantgag aktgtccaggc tstgagcacc atgggggcac tgagcaggct ggtgtgggtt 760

gcatggtggg atggcaggga atccctgact qcgaragtgg agggggatgca ggaggaccct 820

ttatgcaggc cccaggggga cgggaggaaa tgtgctttca ttcrctgngg gtgtgatttc 880

ctgctactct tgagcaattc acaccaacac ccctcccoag gccccccaay ctcaaaggtt 940

gggtccctag ttttcctagg agctccttgg agagyagaac ttgctgctgc tgctgctgct 1000

gctgctgctg ctgctgctgc tgaactcccc agagaggnag aaggsagcaa gtlcccticc 1060

ctacctittg ctttctcccc gagctacatt ctcqttgcct cttttccct cagnacagca 1120

tttaccctcc tggnaaggaa agagatggaa agtgcagggt tttcttgaaa tgattgattc 1180

agtgtcagtc acaactcagg acagtgtttc gggnggctga tacttgttgg tintagaggn 1240

tgtttgaagg arcagtcctc cagtttgttt cttttccca caaaaggaag aaaagaagag 1300

aggaaaggag agaggaaagg aatcctcagg tcnacaghga aaagtttgtg aagagactac 1360

gagagtaatg ttactttcca gaggcagcct agaaagttct tttccttgaa acaaaatacc 1420
agctcccctg actgactca cgtttatctg aaatcacctg ccgggtagca gaggtgaagg 1480
actctgcagg gctggtgggg gntggctgca gcggcacttc tgccccacc catgtgcctg 1540
gctacagcac tgtgctccag gagaagcagt gggtggcagg ggcttcccta tagacccttc 1600
tgccctgaga ggatgtcctt aagaagcccc tatgtcagag gagctagcat tttgtgagtg 1660
actcctttcc tgccctgcac taggtgtctt agagcagcgt gtccaccact gccttgtgaa 1720
gactcgttat cacctcagag aagttaaggc cagqtgactg tgaaactgtg catyagggga 1780
tottgctctg aaatcccaag ctcrctcccc ctgccaccct tgcccctgct cctgccagtc 1840
ccagtttctc atgccccca ttcctccagc cttgatccca aggcatgaa acactcatcc 1900
tgcaacaagt ggctccattg ttcagaggtc agatgggatg tgtgggcact ctcgtaatgc 1960
tttgcatcca gtctgactgg ttttgctgga ggattagcag gaggtgggtg ttcaaaattc 2020
gtatccccta cccttcagaa acccactgga atcaacagag actcctcttg ttggctcctg 2080
catgccttgt taqctattca tgctctgcag tttcagaagc agcgactgtc cataagggtg 2140
gnagatcctt tgtgcaaggg accttccagga agagggccaa tgagcagctt cagtgtggag 2200
caggatcatg aaagctcatc tcagggatgc agctggagcc tgcctgggct aactcttgac 2260
cctaataacc ctcttccttt gtcataatgg ccttaattca taaaaatacc tctcctggag 2320
gtgatcatga cagtggtgat gtgggaacgc tcatgnnnnn nnnnnacccc aatgtccatc 2380
aatgatagge tggataaaga aantgtggca cgtatanacc atagantact atgcagccat 2440
aaaaaagaat gagttcatgt ccttycagg aacatggatg aagctggaaa ccatcattct 2500
cagcaaacta acacaggaac agaaaacccaa acaccacatg ttctcactca taaatgggag 2560
ttgaacaatg agaacacatg gatcacggaa gggaacatc acacactggg gcctgtcagg 2620
gggcctgggg gcaaggggag ggagggcstt aggacaaata atgcatgcag gtcttaaaac 2680
ctagatgacg ggttgntagg tgcagcaaac caccatgaca catgtgtacc tatgtaacga 2740
acctgcacgt tctgcacatg tatcccagaa cttaaagtaa aatacaatan aaaatcattg 2800
gtgaggatta tatcaaaaca cagtggttgt anttagatga tgggattaca ggtgattttat 2860
ttgtctcatt tttgcttgtt tatatttrct aaacttctg tagtaaatat gttttttgtt 2920
ttgtttttt aatacaagaa aacagactac cactgatgac ttccggagtg cagtagatga 2980
ggtgtgagtg ggtacaaagt gaagaagatg tgaacattgt ccttaatgga gtttaaagtc 3040
tatggaagga gataagacag ggagacaaat gacacagag agtggacagt gatgctcagg 3100
gaaggctggg aacaggacca gtccttctca agtggcacct ggcattaaag aaatgttttn 3160
atcattcttg ccccaacagt ctccatatat ggtcttcctt gatctggaaa taggacagta 3220

aatggcacag tcaggggcaa gggtcactct tttcattgat cccagagccc cagggggatg 3280
gggatggaat tgctgaaatt cctttctaag gtaccogttt ctaggaacaa gcttatgtgg 3340
aagaaaaagt tgagatgctt tatgtaactc atcttattca caccagattt gtaccccagt 3400
tgcaaagcag cacatcaaga ggaatggaga actaattttc tgtttctctc tctcttcccg 3460
tagc ata att agc atc atc att att ctg got gga gca att gca ctc atc 3509
att ggc ttt ggt att tca ggtatgtgat ttcttgcatt actacaatct 3557
gttcaccoct cagcattaaa ctcctaatca ctcagtgcgt tagcatggaa agaggcaaga 3617
gctttgaccc agaaaacctc agagtatagc attcattctt ctacttcttg tgcttttctt 3677
acattagtca gttaagtcct cgacttcagt gtcctcattt tttattattt atttatttat 3737
tttgaagcag ggtctgggtc tgttgccaag gttggagtgc agtggcatga tctcagctta 3797
ctgcaacctc cacctcctgg gttcaagcga tctctcacc tcagcctcct aagtagctag 3857
gactacaggc atgtgccacc acatgcccagg ctaatttttt tatttttagt agagatgggg 3917
tttcaccat gttgctcagg ctggtctcaa actcctgagc tcaagcaatc cacctgcctc 3977
ggcctcccaa agtgctggga ttgccggcct gagccaccgt gcccaggcta gnnnnnnnnn 4037
ngtatttta atttatcaca gaagtctctg tctggctttc agcaatgaag ggtttggttg 4097
tagaagtcc aaggcttccc ttagcattga tctttgcttc ctgaactgca g gga gac 4154
act cca tca cag tca cta ctg tcg cct cag ctg ggc aca ttg ggg agg 4202
atg gaa tcc tga got gca ctt ttg aac ctg aca tca aac ttt ctg ata 4250
tcg tga tac aat ggc tga agg aag gtg ttt tag gct tgg tcc atg agt 4298
tca aag aag gca aag atg agc tgt cgg agn agg atg aaa tgt tca gag 4346
gcc gga cag cag tgt ttg ctg atc acg tga tag ctg gca atg cct ctt 4394
tgc ggc tga aaa acg tgc aac tca cag atg ctg gca cct aca aat gtt 4442
ata tca tca ctt cta aag gca agg gga atg cta acc ttg agt sta aan 4490
ctg gag gtgagttact tttggagaga gatttttaa agcaccaaaa gtatttgagg 4546
ctaaagatta tgagttgctt atgaaatatg ttgtgaccaa tatcagacaa tgatgctccc 4606
aattctgcta acagctgttt ttgccatttt atggccaaga ctcacaccaa ccccaaaagt 4666
agccaactat aagagaggcc ttaaaaatct tttgttctgg gttctctctg cttcagaatt 4726
tccaggtgtg ttctctattc aacaaaataa atgtagcctc ttttgtggta gccctggta 4786
cagctaataa gagcagccta gcctgggaca tttccaagct aagtagaccc agcgcaatcc 4846
ctgaaatcag tatcttcaga gactcatgac agtgagtgca tttnagaagt tcaaccggaa 4906

ctaaccaaaa cgaaaacaac attgtcctat aaactcatta atnnannnnn cnaggaaaat 4966

gccaaattcc ctaagggata ggctttttta tgaccactga agttcctctt acttggagaa 5026

aattttctat tgtaaccata otatacctag aatttaggtc cbttggggttt gtcattggcc 5086

aaaggggtcgt gatgtatagc aatachatga gcaaataatt athgcacct ataatacaat 5146

gggctataca caggtggacc totgaggaag tactgagtgg cttcaatgat aaaaaaaaaa 5206

aaaaaaaaat gactgcattt ttaaggccta gagcttcaaa ggctatattg tctbacgtgt 5266

atgacttttg cntctgccct ttctgacttt tgaccctgca g cct tca gca tgc cgg 5322

aag tga atg tgg act ata atg cca gct cag aga cct tgc ggt gtg agg 5370

ctc ccc gat ggt tcc ccc agc ccn cag tgg tct ggg cat ccc aag ttg 5418

acc agg gag cca act tct cgg nag tct cca ata cca gct ttg agc tga 5466

act ctg aga atg tga cca tga agg ttg tgt ctg tgc tct aca atg tta 5514

cga tca acn nca cat ach cct gta tga ttg aaa atg aca ttg cna aag 5562

caa cag ggg ata tca aag tga cag gtgggttcct gcatgctttt gtatggattt 5616

actqgggaaa gagtanzatc tnaattnaaaa tttcnacttca ttantagata tnnnnnnnnn 5676

ncggcttgagt gttcactgga gtggaccaca gaatggaatt ttctttgaag aaagagaaag 5736

ctctactttt aagcnagtta cggagaggtg ggcaaggggg tanaaaantt gcctgaatta 5796

ggaacaactt ngttctgttt ttcaggtact tttcttgct aacnagtcat gtgaagaaga 5856

catccagctt ctcctgtatg accctaaach tittctctca cttcacagaa tcg grg 5912

atc aaa agg cgg agt cac cta cag ctg cta acc tca aag gct tct ctg 5960

tgt gtc tct tct ttc ttt gcc atc agc tgg gca ctt ctg cct ctc agc 6008

cct tac ctg atg cta aaa taa tgt gcc ttg gnc aca aaa aag cat gca 6056

aag tca ttg tta caa cag gtgagatnaa tcacaaatag tgtggcatat 6104

tggttctgtg ggtgcttgtg ctcctaatga gagtcggata gccttcagca tcagccacag 6164

aaagaaacat ttaatgacac cagggctgtg acattatttc cactagtact gggaaaggta 6224

atcatttgtt aggtcagcaa acagcnatago cttcattgac agacccatag gnannntaac 6284

atanaattca zgtatttatg tanattcaaa tacctttnaa gttantcngt cctcaatgaa 6344

ggcaaaataa cttatgaaga gaaaga 6370

<210> 5
<211> 11
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

Met Ala Ser Leu Gly Gln Ile Leu Phe Trp Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 22
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Ile Ile Ser Ile Ile Ile Ile Leu Ala Gly Ala Ile Ala Leu Ile Ile
1 5 10 15

Gly Phe Gly Ile Ser Gly
20

<210> 7
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Arg His Ser Ile Thr Val Thr Thr Val Ala Ser Ala Gly Asn Ile Gly
1 5 10 15

Glu Asp Gly Ile Leu Ser Cys Thr Phe Glu Pro Asp Ile Lys Leu Ser
20 25 30

Asp Ile Val Ile Glu Trp Leu Lys Glu Gly Val Leu Gly Leu Val His
35 40 45

Glu Phe Lys Glu Gly Lys Asp Glu Leu Ser Glu Gln Asp Glu Met Phe
50 55 60

Arg Gly Arg Thr Ala Val Phe Ala Asp Glu Val Ile Val Gly Asn Ala
65 70 75 80

Ser Leu Arg Leu Lys Asn Val Gln Leu Thr Asp Ala Gly Thr Tyr Lys
85 90 95

Cys Tyr Ile Ile Thr Ser Lys Gly Lys Gly Asn Ala Asn Leu Glu Tyr
100 105 110

Lys Thr Gly Ala
115

<210> 8
<211> 98
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Phe Ser Met Pro Glu Val Asn Val Asp Tyr Asn Ala Ser Ser Glu Thr
1 5 10 15

Leu Arg Cys Glu Ala Pro Arg Trp Phe Pro Gln Pro Thr Val Val Trp
20 25 30

Ala Ser Gln Val Asp Gln Gly Ala Asn Phe Ser Glu Val Ser Asn Thr

35 40 45

Ser Phe Glu Leu Asn Ser Glu Asn Val Thr Met Lys Val Val Ser Val
50 55 60

Leu Tyr Asn Val Thr Ile Asn Asn Thr Tyr Ser Cys Met Ile Glu Asn
65 70 75 80

Asp Ile Ala Lys Ala Thr Gly Asp Ile Lys Val Thr Glu
85 90

<210> 9
<211> 40
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9
Ser Glu Ile Lys Arg Arg Ser His Leu Gln Leu Leu Asn Ser Lys Ala
1 5 10 15

Ser Leu Cys Val Ser Ser Phe Phe Ala Ile Ser Trp Ala Leu Leu Pro
20 25 30

Leu Ser Pro Tyr Leu Met Leu Lys
35 40

<210> 10
<211> 288
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
1 5 10 15

Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
20 25 30

Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
35 40 45

Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
50 55 60

Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
65 70 75 80

Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
85 90 95

Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
100 105 110

Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
115 120 125

Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
130 135 140

```
Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
145                 150                 155                 160

Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu
                165                 170                 175

Glu Asn Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp
            180                 185                 190

Pro Glu Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met
        195                 200                 205

Thr Thr Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg
    210                 215                 220

Val Asn Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro
225                 230                 235                 240

Asp Asn Leu Leu Pro Ser Trp Ala Ile Thr Leu Ile Ser Val Asn Gly
                245                 250                 255

Ile Phe Val Ile Cys Cys Leu Thr Tyr Cys Phe Ala Pro Arg Cys Arg
            260                 265                 270

Glu Arg Arg Arg Asn Glu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Val Arg Pro Val
        275                 280                 285
```

<210> 11
<211> 323
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 11
Met Gly Leu Ser Asn Ile Leu Phe Val Met Ala Phe Leu Leu Ser Gly
  1               5                  10                  15

Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu
            20                  25                  30

Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Gln Ser Leu Ser Glu Leu Val
        35                  40                  45

Val Phe Trp Gln Asp Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu
    50                  55                  60

Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr
65                  70                  75                  80

Ser Phe Asp Ser Asp Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile
                85                  90                  95

Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Lys Pro Thr
            100                 105                 110

Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala
        115                 120                 125
```

```
Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn
    130                 135                 140

Val Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Lys Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr
                165                 170                 175

Asp Gly Ile Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp
            180                 185                 190

Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met
        195                 200                 205

Thr Ile Phe Cys Ile Leu Glu Thr Asp Lys Thr Arg Leu Leu Ser Ser
    210                 215                 220

Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Ile
225                 230                 235                 240

Pro Trp Ile Thr Ala Val Leu Pro Thr Val Ile Ile Cys Val Met Val
                245                 250                 255

Phe Cys Leu Ile Leu Trp Lys Trp Ile Lys Lys Lys Arg Pro Arg Asn
            260                 265                 270

Ser Tyr Lys Cys Gly Thr Asn Thr Met Glu Arg Glu Glu Ser Glu Gln
        275                 280                 285

Thr Lys Lys Arg Glu Lys Ile His Ile Pro Glu Arg Ser Asp Glu Ala
    290                 295                 300

Gln Arg Val Phe Lys Ser Ser Lys Thr Ser Ser Cys Asp Lys Ser Asp
305                 310                 315                 320

Thr Cys Phe
```

<210> 12
<211> 250
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
```
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
  1               5                  10                  15

Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Asp Lys Leu Tyr Val Val Glu Tyr
            20                  25                  30

Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
        35                  40                  45

Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
    50                  55                  60

Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65                  70                  75                  80
```

Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110

Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125

Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140

Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190

Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205

Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220

Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240

Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255

Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270

Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285

Glu Thr
290

<210> 13
<211> 302
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
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 Val
        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

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 Gly His Val
    290                 295                 300


<210> 14
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> UNSURE
<222> (233)
<223> "Xaa" can be any naturally occurring amino acid

<400> 14
Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala
 1               5                  10                  15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln
```

```
            20                  25                  30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu
        35                  40                  45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn
    50                  55                  60

Leu Ile Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala
65                  70                  75                  80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe
                85                  90                  95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val
            100                 105                 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser Ile Arg Asp
        115                 120                 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gln Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys
    130                 135                 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr
145                 150                 155                 160

Val Thr Ile Thr Cys Ser Ser Tyr Glu Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val
                165                 170                 175

Phe Trp Gln Asp Gly Gln Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr
            180                 185                 190

Ser Gln Met Ala Asn Glu Gln Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu
        195                 200                 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn
    210                 215                 220

Pro Val Leu Gln Gln Asp Ala His Gly Ser Val Thr Ile Thr Gly Gln
225                 230                 235                 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser
                245                 250                 255

Val Cys Leu Ile Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg
            260                 265                 270

Lys Ile Lys Gln Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gln
        275                 280                 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gln Pro Leu Lys His
    290                 295                 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gln Glu Ile Ala
305                 310                 315


<210> 15
<211> 276
<212> PRT
<213> Homo sapiens
```

<400> 15
Met Glu Ser Ala Ala Ala Leu His Phe Ser Arg Pro Ala Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ser Leu Cys Ala Leu Val Ser Ala Gln Phe Ile Val
20 25 30

Val Gly Pro Thr Asp Pro Ile Leu Ala Thr Val Gly Glu Asn Thr Thr
35 40 45

Leu Arg Cys His Leu Ser Pro Glu Lys Asn Ala Glu Asp Met Glu Val
50 55 60

Arg Trp Phe Arg Ser Gln Phe Ser Pro Ala Val Phe Val Tyr Lys Gly
65 70 75 80

Gly Arg Glu Arg Thr Glu Glu Gln Met Glu Glu Tyr Arg Gly Arg Thr
85 90 95

Thr Phe Val Ser Lys Asp Ile Ser Arg Gly Ser Val Ala Leu Val Ile
100 105 110

His Asn Ile Thr Ala Gln Glu Asn Gly Thr Tyr Arg Cys Tyr Phe Gln
115 120 125

Glu Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Ala Ile Leu His Leu Val Val Ala Gly
130 135 140

Leu Gly Ser Lys Pro Leu Ile Ser Met Arg Gly His Glu Asp Gly Gly
145 150 155 160

Ile Arg Leu Glu Cys Ile Ser Arg Gly Trp Tyr Pro Lys Pro Leu Thr
165 170 175

Val Trp Arg Asp Pro Tyr Gly Gly Val Ala Pro Ala Leu Lys Glu Val
180 185 190

Ser Met Pro Asp Ala Asp Gly Leu Phe Met Val Thr Thr Ala Val Ile
195 200 205

Ile Arg Asp Lys Ser Val Arg Asn Met Ser Cys Ser Ile Asn Asn Thr
210 215 220

Leu Leu Gly Gln Lys Lys Glu Ser Val Ile Phe Ile Pro Glu Ser Phe
225 230 235 240

Met Pro Ser Val Ser Pro Cys Ala Val Ala Leu Pro Ile Ile Val Val
245 250 255

Ile Leu Met Ile Pro Ile Ala Val Cys Ile Tyr Trp Ile Asn Lys Leu
260 265 270

Gln Lys Glu Lys
275

<210> 16
<211> 523
<212> PRT
<213> Homo Sapiens

<400> 16
Met Glu Pro Ala Ala Ala Leu His Phe Ser Leu Pro Ala Ser Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Ser Leu Cys Ala Leu Val Ser Ala
20 25 30

Gln Phe Thr Val Val Gly Pro Ala Asn Pro Ile Leu Ala Met Val Gly
35 40 45

Glu Asn Thr Thr Leu Arg Cys His Leu Ser Pro Glu Lys Asn Ala Glu
50 55 60

Asp Met Glu Val Arg Trp Phe Arg Ser Gln Phe Ser Pro Ala Val Phe
65 70 75 80

Val Tyr Lys Gly Gly Arg Glu Arg Thr Glu Glu Gln Met Glu Glu Tyr
85 90 95

Arg Gly Arg Ile Thr Phe Val Ser Lys Asp Ile Asn Arg Gly Ser Val
100 105 110

Ala Leu Val Ile His Asn Val Thr Ala Gln Glu Asn Gly Ile Tyr Arg
115 120 125

Cys Tyr Phe Gln Glu Gly Arg Ser Tyr Asp Glu Ala Ile Leu Arg Leu
130 135 140

Val Val Ala Gly Leu Gly Ser Lys Pro Leu Ile Glu Ile Lys Ala Gln
145 150 155 160

Glu Asp Gly Ser Ile Trp Leu Glu Cys Ile Ser Gly Gly Trp Tyr Pro
165 170 175

Glu Pro Leu Thr Val Trp Arg Asp Pro Tyr Gly Glu Val Val Pro Ala
180 185 190

Leu Lys Glu Val Ser Ile Ala Asp Ala Asp Gly Leu Phe Met Val Thr
195 200 205

Thr Ala Val Ile Ile Arg Asp Lys Tyr Val Arg Asn Val Ser Cys Ser
210 215 220

Val Asn Asn Thr Leu Leu Gly Gln Glu Lys Glu Thr Val Ile Phe Ile
225 230 235 240

Pro Glu Ser Phe Met Pro Ser Ala Ser Pro Trp Met Val Ala Leu Ala
245 250 255

Val Ile Leu Thr Ala Ser Pro Trp Met Val Ser Met Thr Val Ile Leu
260 265 270

Ala Val Phe Ile Ile Phe Met Ala Val Ser Ile Cys Cys Ile Lys Lys
275 280 285

Leu Gln Arg Glu Lys Lys Ile Leu Ser Gly Glu Lys Lys Val Glu Gln
290 295 300

Glu Glu Lys Glu Ile Ala Gln Gln Leu Gln Glu Glu Leu Arg Trp Arg
305 310 315 320

```
Arg Thr Phe Leu His Ala Ala Asp Val Val Leu Asp Pro Asp Thr Ala
                325                 330                 335

His Pro Glu Leu Phe Leu Ser Glu Asp Arg Arg Ser Val Arg Arg Gly
            340                 345                 350

Pro Tyr Arg Gln Arg Val Pro Asp Asn Pro Glu Arg Phe Asp Ser Gln
        355                 360                 365

Pro Cys Val Leu Gly Trp Glu Ser Phe Ala Ser Gly Lys His Tyr Trp
    370                 375                 380

Glu Val Glu Val Glu Asp Val Met Val Trp Thr Val Gly Val Cys Arg
385                 390                 395                 400

His Ser Val Glu Arg Lys Gly Glu Val Leu Leu Ile Pro Gln Asn Gly
                405                 410                 415

Phe Trp Thr Leu Glu Met Phe Gly Asn Gln Tyr Arg Ala Leu Ser Ser
            420                 425                 430

Pro Glu Arg Ile Leu Pro Leu Lys Glu Ser Leu Cys Arg Val Gly Val
        435                 440                 445

Phe Leu Asp Tyr Glu Ala Gly Asp Val Ser Phe Tyr Asn Met Arg Asp
    450                 455                 460

Arg Ser His Ile Tyr Thr Cys Pro Arg Ser Ala Phe Thr Val Pro Val
465                 470                 475                 480

Arg Pro Phe Phe Arg Leu Gly Ser Asp Asp Ser Pro Ile Phe Ile Cys
                485                 490                 495

Pro Ala Leu Thr Gly Ala Ser Gly Val Met Val Pro Glu Glu Gly Leu
            500                 505                 510

Lys Leu His Arg Val Gly Thr His Gln Ser Leu
        515                 520
```

<210> 17
<211> 263
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

```
Phe His Val Ser Leu Leu Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala
  1               5                  10                  15

Gln Phe Ser Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly
             20                  25                  30

Glu Asp Ala Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu
         35                  40                  45

Thr Met Glu Leu Lys Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn
     50                  55                  60

Val Tyr Ala Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr
 65                  70                  75                  80
```

```
Arg Gly Arg Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala
                85                  90                  95

Ala Leu Arg Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu
            100                 105                 110

Cys Tyr Phe Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu
        115                 120                 125

Lys Val Ala Ala Leu Gly Ser Asn Leu His Val Glu Val Lys Gly Tyr
    130                 135                 140

Glu Asp Gly Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro
145                 150                 155                 160

Gln Pro Gln Ile Gln Trp Ser Asn Ala Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala
                165                 170                 175

Val Glu Ala Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Glu Val Ala
            180                 185                 190

Ala Ser Val Ile Met Arg Gly Gly Ser Gly Glu Gly Val Ser Cys Ile
        195                 200                 205

His Arg Asn Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile
    210                 215                 220

Ala Asp Pro Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala
225                 230                 235                 240

Gly Thr Leu Pro Ile Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe
                245                 250                 255

Leu Trp Arg Gln Gln Lys Glu
            260
```

<210> 18
<211> 564
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 18
Met Lys Met Ala Ser Ser Leu Ala Phe Leu Leu Leu Asn Phe His Val
  1               5                  10                  15

Ser Leu Phe Leu Val Gln Leu Leu Thr Pro Cys Ser Ala Gln Phe Ser
            20                  25                  30

Val Leu Gly Pro Ser Gly Pro Ile Leu Ala Met Val Gly Glu Asp Ala
        35                  40                  45

Asp Leu Pro Cys His Leu Phe Pro Thr Met Ser Ala Glu Thr Met Glu
    50                  55                  60

Leu Arg Trp Val Ser Ser Ser Leu Arg Gln Val Val Asn Val Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Gly Lys Glu Val Glu Asp Arg Gln Ser Ala Pro Tyr Arg Gly Arg
                85                  90                  95
```

Thr Ser Ile Leu Arg Asp Gly Ile Thr Ala Gly Lys Ala Ala Leu Arg
100 105 110

Ile His Asn Val Thr Ala Ser Asp Ser Gly Lys Tyr Leu Cys Tyr Phe
115 120 125

Gln Asp Gly Asp Phe Tyr Glu Lys Ala Leu Val Glu Leu Lys Val Ala
130 135 140

Ala Leu Gly Ser Asp Leu His Ile Glu Val Lys Gly Tyr Glu Asp Gly
145 150 155 160

Gly Ile His Leu Glu Cys Arg Ser Thr Gly Trp Tyr Pro Gln Pro Gln
165 170 175

Ile Lys Trp Ser Asp Thr Lys Gly Glu Asn Ile Pro Ala Val Glu Ala
180 185 190

Pro Val Val Ala Asp Gly Val Gly Leu Tyr Ala Val Ala Ala Ser Val
195 200 205

Ile Met Arg Gly Ser Ser Gly Gly Gly Val Ser Cys Ile Ile Arg Asn
210 215 220

Ser Leu Leu Gly Leu Glu Lys Thr Ala Ser Ile Ser Ile Ala Asp Pro
225 230 235 240

Phe Phe Arg Ser Ala Gln Pro Trp Ile Ala Ala Leu Ala Gly Thr Leu
245 250 255

Pro Ile Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ala Gly Ala Ser Tyr Phe Leu Trp Arg
260 265 270

Gln Gln Lys Glu Lys Ile Ala Leu Ser Arg Glu Thr Glu Arg Glu Arg
275 280 285

Glu Met Lys Glu Met Gly Tyr Ala Ala Thr Glu Gln Glu Ile Ser Leu
290 295 300

Arg Glu Lys Leu Gln Glu Glu Leu Lys Trp Arg Lys Ile Gln Tyr Met
305 310 315 320

Ala Arg Gly Glu Lys Ser Leu Ala Tyr His Glu Trp Lys Met Ala Leu
325 330 335

Phe Lys Pro Ala Asp Val Ile Leu Asp Pro Asp Thr Ala Asn Ala Ile
340 345 350

Leu Leu Val Ser Glu Asp Gln Arg Ser Val Gln Arg Ala Glu Glu Pro
355 360 365

Arg Asp Leu Pro Asp Asn Pro Glu Arg Phe Glu Trp Arg Tyr Cys Val
370 375 380

Leu Gly Cys Glu Asn Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu
385 390 395 400

Val Gly Asp Arg Lys Glu Trp His Ile Gly Val Cys Ser Lys Asn Val
405 410 415

```
Glu Arg Lys Lys Gly Trp Val Lys Met Thr Pro Glu Asn Gly Tyr Trp
            420                 425                 430

Thr Met Gly Leu Thr Asp Gly Asn Lys Tyr Arg Ala Leu Thr Glu Pro
        435                 440                 445

Arg Thr Asn Leu Lys Leu Pro Glu Pro Pro Arg Lys Val Gly Ile Phe
    450                 455                 460

Leu Asp Tyr Glu Thr Gly Glu Ile Ser Phe Tyr Asn Ala Thr Asp Gly
465                 470                 475                 480

Ser His Ile Tyr Thr Phe Pro His Ala Ser Phe Ser Glu Pro Leu Tyr
                485                 490                 495

Pro Val Phe Arg Ile Leu Thr Leu Glu Pro Thr Ala Leu Thr Ile Cys
            500                 505                 510

Pro Ile Pro Lys Glu Val Glu Ser Ser Pro Asp Pro Asp Leu Val Pro
        515                 520                 525

Asp His Ser Leu Glu Thr Pro Leu Thr Pro Gly Leu Ala Asn Glu Ser
    530                 535                 540

Gly Glu Pro Gln Ala Glu Val Thr Ser Leu Leu Leu Pro Ala His Pro
545                 550                 555                 560

Gly Ala Glu Val Ser Pro Ser Ala Thr Thr Asn Gln Asn His Lys Leu
                565                 570                 575

Gln Ala Arg Thr Glu Ala Leu Tyr
            580
```

<210> 19
<211> 526
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```
<400> 19
Met Ala Val Phe Pro Ser Ser Gly Leu Pro Arg Cys Leu Leu Thr Leu
  1               5                  10                  15

Ile Leu Leu Gln Leu Pro Lys Leu Asp Ser Ala Pro Phe Asp Val Ile
            20                  25                  30

Gly Pro Pro Glu Pro Ile Leu Ala Val Val Gly Glu Asp Ala Glu Leu
        35                  40                  45

Pro Cys Arg Leu Ser Pro Asn Ala Ser Ala Glu His Leu Glu Leu Arg
    50                  55                  60

Trp Phe Arg Lys Lys Val Ser Pro Ala Val Leu Val His Arg Asp Gly
65                  70                  75                  80

Arg Glu Gln Glu Ala Glu Gln Met Pro Glu Tyr Arg Gly Arg Ala Thr
                85                  90                  95

Leu Val Gln Asp Gly Ile Ala Lys Gly Arg Val Ala Leu Arg Ile Arg
            100                 105                 110
```

Gly Val Arg Val Ser Asp Asp Gly Glu Tyr Thr Cys Phe Phe Arg Glu
115 120 125

Asp Gly Ser Tyr Glu Glu Ala Leu Val His Leu Lys Val Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Ser Asp Pro His Ile Ser Met Gln Val Gln Glu Asn Gly Glu Ile
145 150 155 160

Cys Leu Glu Cys Thr Ser Val Gly Trp Tyr Pro Glu Pro Gln Val Gln
165 170 175

Trp Arg Thr Ser Lys Gly Glu Lys Phe Pro Ser Thr Ser Glu Ser Arg
180 185 190

Asn Pro Asp Glu Glu Gly Leu Phe Thr Val Ala Ala Ser Val Ile Ile
195 200 205

Arg Asp Thr Ser Thr Lys Asn Val Ser Cys Tyr Ile Gln Asn Leu Leu
210 215 220

Leu Gly Gln Glu Lys Lys Val Glu Ile Ser Ile Pro Ala Ser Ser Leu
225 230 235 240

Pro Arg Leu Thr Pro Trp Ile Val Ala Val Ala Val Ile Leu Met Val
245 250 255

Leu Gly Leu Leu Thr Ile Gly Ser Ile Phe Phe Thr Trp Arg Leu Tyr
260 265 270

Asn Gln Arg Pro Arg Glu Arg Arg Asn Glu Phe Ser Ser Lys Glu Arg
275 280 285

Leu Leu Glu Glu Leu Lys Trp Lys Lys Ala Thr Leu His Ala Val Asp
290 295 300

Val Thr Leu Asp Pro Asp Thr Ala His Pro His Leu Phe Leu Tyr Glu
305 310 315 320

Asp Ser Lys Ser Val Arg Leu Glu Asp Ser Arg Gln Lys Leu Pro Glu
325 330 335

Lys Thr Glu Arg Phe Asp Ser Trp Pro Cys Val Leu Gly Arg Glu Thr
340 345 350

Phe Thr Ser Gly Arg His Tyr Trp Glu Val Glu Val Gly Asp Arg Thr
355 360 365

Asp Trp Ala Ile Gly Val Cys Arg Glu Asn Val Met Lys Lys Gly Phe
370 375 380

Asp Pro Met Thr Pro Glu Asn Gly Phe Trp Ala Val Glu Leu Tyr Gly
385 390 395 400

Asn Gly Tyr Trp Ala Leu Thr Pro Leu Arg Thr Pro Leu Pro Leu Ala
405 410 415

Gly Pro Pro Arg Arg Val Gly Ile Phe Leu Asp Tyr Glu Ser Gly Asp
420 425 430

Ile Ser Phe Tyr Asn Met Asn Asp Gly Ser Asp Ile Tyr Thr Phe Ser

435 440 445

Asn Val Thr Phe Ser Gly Pro Leu Arg Pro Phe Pro Cys Leu Trp Ser
450 455 460

Ser Gly Lys Lys Pro Leu Thr Ile Cys Pro Ile Ala Asp Gly Pro Glu
465 470 475 480

Arg Val Thr Val Ile Ala Asn Ala Gln Asp Leu Ser Lys Glu Ile Pro
485 490 495

Leu Ser Pro Met Gly Glu Glu Ser Ala Pro Arg Asp Ala Asp Thr Leu
500 505 510

His Ser Lys Leu Ile Pro Thr Glu Pro Ser Gln Gly Ala Pro
515 520 525

<210> 20
<211> 11
<212> PRT
<213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 20
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Internalizing domain derived from HIV tat protein

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
1 5 10 15

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Oligonucleotide 2434-29

<400> 22
gggaggatgg aatcctgagc 20

<210> 23
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:
Oligonucleotide 2434-34

<400> 23
ctggtatgct gaaggctcc 19

【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
10 January 2002 (10.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/002624 A3

(51) International Patent Classification⁷: C12N 15/12, C07K 14/705, A61K 31/7088, G01N 33/50, C12Q 1/68, A01K 67/027, A61K 49/00, 38/17

(21) International Application Number: PCT/US01/21297

(22) International Filing Date: 29 June 2001 (29.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/215,615 30 June 2000 (30.06.2000) US

(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier application:
US 60/215,615 (CON)
Filed on 30 June 2000 (30.06.2000)

(71) Applicant (*for all designated States except US*): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Mailstop 27-4-A, Thousand Oaks, CA 91320-1789 (US).

(72) Inventors; and

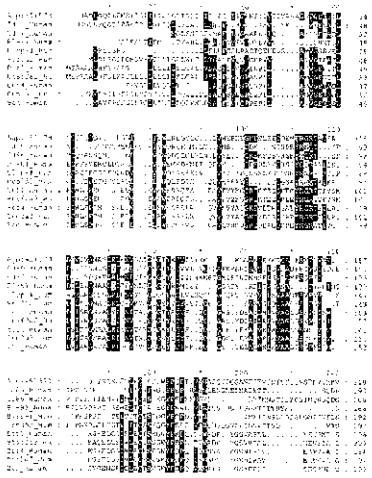
(75) Inventors/Applicants (*for US only*): FOX, Gary, M. [US/US]; 35 West Kelley Road, Newbury Park, CA 91320 (US). SULLIVAN, John, K. [US/US]; 1085 Rotella Street, Newbury Park, CA 91320 (US). FANG, Mei [US/US]; 3648 Fieldcrest Court, Thousand Oaks, CA 91360 (US).

(74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, 300 South Wacker Drive, Chicago, IL 60606 (US).

(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, 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,

[Continued on next page]

(54) Title: B7-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF



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

WO 02/002624 A3

WO 02/002624 A3

MZ, NO, NZ, 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, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
with international search report

before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
4 July 2002

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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/21297

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 A61K31/7088 G01N33/50 C12Q1/68
A01K67/027 A61K49/00 A61K38/17

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07K C12N A61K G01N C12Q A01K

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)
EPO-Internal, WPI Data, PAJ, SEQUENCE SEARCH

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99 63088 A (BAKER KEVIN ;CHEN JIAN (US); GENENTECH INC (US); YUAN JEAN (US); G) 9 December 1999 (1999-12-09) figures 207,208; example 92 ---	1-58
X	WO 00 36107 A (CORIXA CORP) 22 June 2000 (2000-06-22) seq 391 and 393 ---	1-58
X	WO 00 12758 A (RECIPON HERVE ;DIADEXUS LLC (US); SALCEDA SUSANA (US); SUN YONGMIN) 9 March 2000 (2000-03-09) seq id 1 ---	1-58

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] 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.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
15 April 2002

Date of mailing of the international search report
02. 05. 2002

Name and mailing address of the ISA
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax. (+31-70) 340-3016

Authorized officer
Lejeune, R

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/21297

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
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 ---	
P,X	WO 00 73454 A (GENENTECH INC) 7 December 2000 (2000-12-07) figures 207,208 ---	1-58
P,X	WO 00 76531 A (HUMAN GENOME SCIENCES INC ;ROSEN CRAIG A (US); RUBEN STEVEN M (US)) 21 December 2000 (2000-12-21) sdeq id 57 ---	1-58
P,X	WO 01 16318 A (EATON DAN L ;GENENTECH INC (US); FILVAROFF ELLEN (US); GODDARD AUD) 8 March 2001 (2001-03-08) figures 59,60 ---	1-58
P,X	WO 01 40269 A (CORIXA CORP ;DAY CRAIG H (US); JIANG YUQIU (US); DILLON DAVIN C (U) 7 June 2001 (2001-06-07) seq 207 and 208; example 3 ---	1-58
E	WO 01 68848 A (BAKER KEVIN P ;CHEN JIAN (US); DESNOYERS LUC (US); GENENTECH INC ()) 20 September 2001 (2001-09-20) seq 217 and 218 ---	1-58
E	WO 01 94641 A (IDEC PHARMA CORP) 13 December 2001 (2001-12-13) seq 7 and 8 -----	1-58

1

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 01/21297

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. [X] Claims Nos.:
Because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 33, 48, 53 are, as far as in vivo methods are concerned, 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, as far as these were searchable (see further remark)

2. [X] Claims Nos.: 18, 19, 30-33 (all partially)
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.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

International Application No. PCT/US 01/21297

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 18, 19, 30-33 (all partially)

Claims 18,19,30-33 refer to an binding agent of the B7-L polypeptide without giving a true technical characterization. Moreover, no such compounds are defined in the application. In consequence, the scope of said claims is ambiguous and vague, and their subject matter is not sufficiently disclosed and supported.
No search can be carried out for such speculative claims whose wording is, in fact a mere recitation of the results to be achieved.
A partial search has been carried out as far as the selective binding AGENT is an antibody to the B7-L polypeptide.

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

...formation on patent family members

Inter... nal Application No
PCT/US 01/21297

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9963088	A	09-12-1999	AU	4328699	A	20-12-1999
			CA	2328895	A1	09-12-1999
			WO	9963088	A2	09-12-1999
			AU	2212299	A	26-07-1999
			WO	9935170	A2	15-07-1999
WO 0036107	A	22-06-2000	AU	2197800	A	03-07-2000
			BR	9916207	A	04-12-2001
			CN	1333830	T	30-01-2002
			EP	1141290	A2	10-10-2001
			NO	20013002	A	15-08-2001
			WO	0036107	A2	22-06-2000
WO 0012758	A	09-03-2000	EP	1109937	A1	27-06-2001
			WO	0012758	A1	09-03-2000
WO 0073454	A	07-12-2000	AU	1748200	A	19-06-2000
			AU	1932000	A	03-07-2000
			AU	2192800	A	12-07-2000
			AU	2215300	A	28-12-2000
			AU	2495200	A	28-09-2000
			AU	2600800	A	28-09-2000
			AU	2879400	A	31-07-2001
			AU	3246100	A	28-12-2000
			AU	3381600	A	28-09-2000
			AU	3514400	A	28-09-2000
			AU	3774300	A	18-12-2000
			AU	4328699	A	20-12-1999
			AU	5441200	A	18-12-2000
			AU	5460100	A	18-12-2000
			AU	5591100	A	18-12-2000
			EP	1173563	A1	23-01-2002
			EP	1159419	A1	05-12-2001
			EP	1185648	A2	13-03-2002
			EP	1135485	A2	26-09-2001
			EP	1141285	A2	10-10-2001
			EP	1141289	A2	10-10-2001
			WO	0053753	A2	14-09-2000
			WO	0053755	A2	14-09-2000
			WO	0153486	A1	26-07-2001
			WO	0075327	A1	14-12-2000
			WO	0053757	A2	14-09-2000
			WO	0053758	A2	14-09-2000
			WO	0073454	A1	07-12-2000
			WO	0073445	A2	07-12-2000
			WO	0073348	A2	07-12-2000
			WO	0073452	A2	07-12-2000
			WO	0032221	A2	08-06-2000
			WO	0036102	A2	22-06-2000
			WO	0037640	A2	29-06-2000
			WO	0075316	A1	14-12-2000
			AU	2883600	A	28-09-2000
			AU	2883700	A	09-01-2001
			WO	0053756	A2	14-09-2000
			WO	0078961	A1	28-12-2000
			AU	2883900	A	30-01-2001
			WO	0104311	A1	18-01-2001
			AU	1749800	A	04-10-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Inter...nal Application No
PCT/US 01/21297

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0073454	A		AU	1749900 A	12-07-2000
			AU	2390700 A	05-02-2001
			AU	2399300 A	28-09-2000
			AU	3107000 A	19-06-2000
			AU	4011300 A	05-02-2001
			EP	1141284 A2	10-10-2001
			EP	1135491 A2	26-09-2001
			WO	0105972 A1	25-01-2001
WO 0076531	A	21-12-2000	AU	5177100 A	02-01-2001
			EP	1185284 A1	13-03-2002
			WO	0076531 A1	21-12-2000
WO 0116318	A	08-03-2001	AU	1748200 A	19-06-2000
			AU	2192800 A	12-07-2000
			AU	2600800 A	28-09-2000
			AU	2879400 A	31-07-2001
			AU	2883700 A	09-01-2001
			AU	3107700 A	28-09-2000
			AU	3381600 A	28-09-2000
			AU	3514400 A	28-09-2000
			AU	5152700 A	02-01-2001
			AU	5441200 A	18-12-2000
			AU	5460100 A	18-12-2000
			AU	5590899 A	21-03-2000
			AU	5591100 A	18-12-2000
			AU	7079300 A	26-03-2001
			AU	7573000 A	26-03-2001
			EP	1173563 A1	23-01-2002
			EP	1159419 A1	05-12-2001
			EP	1185648 A2	13-03-2002
			EP	1144629 A2	17-10-2001
			EP	1135485 A2	26-09-2001
			EP	1159422 A1	05-12-2001
			EP	1141289 A2	10-10-2001
			WO	0053753 A2	14-09-2000
			WO	0153486 A1	26-07-2001
			WO	0078961 A1	28-12-2000
			WO	0053757 A2	14-09-2000
			WO	0053758 A2	14-09-2000
			WO	0073445 A2	07-12-2000
			WO	0077037 A2	21-12-2000
			WO	0073348 A2	07-12-2000
			WO	0073452 A2	07-12-2000
			WO	0116318 A2	08-03-2001
			WO	0116319 A2	08-03-2001
			WO	0032221 A2	08-06-2000
			WO	0053750 A1	14-09-2000
			WO	0037640 A2	29-06-2000
			AU	1747100 A	17-04-2001
			AU	1749800 A	04-10-2000
			AU	1749900 A	12-07-2000
			AU	2215300 A	28-12-2000
			AU	2390700 A	05-02-2001
			AU	2883900 A	30-01-2001
			AU	3774300 A	18-12-2000
			AU	3878400 A	10-04-2001
			AU	5922999 A	03-04-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Inter...onal Application No
PCT/US 01/21297

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 0116318	A		AU	6391000	A	19-02-2001
			EP	1114152	A2	11-07-2001
			EP	1141284	A2	10-10-2001
			WO	0104311	A1	18-01-2001
			WO	0116210	A1	15-03-2001
WO 0140269	A	07-06-2001	AU	1807401	A	12-06-2001
			WO	0140269	A2	07-06-2001
			US	2001034052	A1	25-10-2001
WO 0168848	A	20-09-2001	AU	2055401	A	12-06-2001
			AU	3864800	A	09-10-2000
			AU	5152700	A	02-01-2001
			AU	5459900	A	18-12-2000
			AU	6802801	A	24-09-2001
			AU	7079300	A	26-03-2001
			AU	7573000	A	26-03-2001
			EP	1169442	A2	09-01-2002
			WO	0077037	A2	21-12-2000
			WO	0073452	A2	07-12-2000
			WO	0116318	A2	08-03-2001
			WO	0116319	A2	08-03-2001
			WO	0140466	A2	07-06-2001
			WO	0168848	A2	20-09-2001
			AU	1916701	A	16-07-2001
			AU	2590901	A	03-07-2001
			AU	3514400	A	28-09-2000
			AU	3774300	A	18-12-2000
			AU	6391000	A	19-02-2001
			EP	1185648	A2	13-03-2002
			WO	0073454	A1	07-12-2000
			WO	0073445	A2	07-12-2000
			WO	0073348	A2	07-12-2000
			WO	0109327	A2	08-02-2001
			WO	0149715	A2	12-07-2001
			WO	0146420	A2	28-06-2001
			US	2002010137	A1	24-01-2002
			AU	3434601	A	12-06-2001
			AU	5516801	A	17-09-2001
			WO	0140465	A2	07-06-2001
			WO	0166740	A2	13-09-2001
			AU	3075701	A	20-08-2001
			AU	4011300	A	05-02-2001
			AU	6901800	A	12-06-2001
			WO	0140464	A1	07-06-2001
			WO	0159100	A2	16-08-2001
			AU	5528201	A	23-10-2001
			WO	0177628	A1	18-10-2001
			AU	5441200	A	18-12-2000
			AU	5591100	A	18-12-2000
			AU	6501901	A	11-12-2001
			WO	0192331	A2	06-12-2001
			AU	5460100	A	18-12-2000
			WO	0193983	A1	13-12-2001
			WO	0200690	A2	03-01-2002
			WO	0208288	A2	31-01-2002
			WO	0208284	A2	31-01-2002
			WO	0216611	A2	28-02-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

...formation on patent family members

Inter...nal Application No
PCT/US 01/21297

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0168848	A	WO	0216429 A2	28-02-2002
		WO	0216581 A2	28-02-2002
WO 0194641	A	13-12-2001	WO 0194641 A2	13-12-2001

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 35/00		４Ｃ０８４
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１０５	４Ｈ０４５
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 16/18	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｎ 7/00		
Ｃ１２Ｎ 7/00	Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ	
Ｃ１２Ｐ 21/02	Ｃ１２Ｑ 1/02		
Ｃ１２Ｑ 1/02	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/15	Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｚ	
Ｇ０１Ｎ 33/50	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 37/00	１０２	
Ｇ０１Ｎ 37/00	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ａ	
// Ａ６１Ｋ 45/00	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
Ｃ１２Ｐ 21/08	Ａ６１Ｋ 45/00		
	Ｃ１２Ｐ 21/08		

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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,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,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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100103920
弁理士 大崎 勝真
(72)発明者 フォックス, ギャリー エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３２０, ニューバリー パーク, ウエスト ケリー ロード ３５
(72)発明者 サリバン, ジョン ケイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３２０, ニューバリー パーク, ロテラ ストリート １０８５
(72)発明者 ファン, メイ
アメリカ合衆国 カリフォルニア ９１３６０, サウザンド オークス, フィールドクレスト コート ３６４８

Ｆターム(参考) 2G045 AA25 AA29 AA40 BB03 BB20 CB01 CB17 CB21 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB02 JA01
4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA09 CA11 CA12 DA02 DA03 DA06 HA11 HA17
4B063 QA13 QA18 QA19 QQ08 QQ42 QQ53 QQ79 QR32 QR36 QR48 QR55 QR62 QR77 QS16 QS25 QS33 QS34
4B064 AG01 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CE12 DA01 DA13
4B065 AA26X AA91X AA93X AA93Y AB01 CA24 CA44 CA46
4C084 AA16 ZA45 ZA81 ZB21 ZB26 ZC42

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA57 CA40 DA75 DA76
EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	B7样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2004502417A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002507875	申请日	2001-06-29
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	フォックスギャリーエム サリバンジョンケイ ファンメイ		
发明人	フォックス, ギャリー エム. サリバン, ジョン ケイ. ファン, メイ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61K45/00 A61P9/10 A61P15/00 A61P15/06 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N7/00 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53 G01N37/00		
CPC分类号	A01K2217/05 A61K38/00 A61P15/00 A61P15/06 C07K14/70532 C07K2319/00 C12N2799/021		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61P9/10.101 A61P15/00 A61P15/06 A61P35/00 A61P43/00.105 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N7/00 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/50.Z G01N33/53.M G01N37/00.102 C12N5/00.A C12N5/00.B A61K45/00 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA29 2G045/AA40 2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/CB17 2G045/CB21 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/DA77 2G045/FB02 2G045/JA01 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/DA06 4B024/HA11 4B024/HA17 4B063/QA13 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR36 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR77 4B063/QS16 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B064/AG01 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA91X 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA16 4C084/ZA45 4C084/ZA81 4C084/ZB21 4C084/ZB26 4C084/ZC42 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/BA57 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	井上充 小野 诚 Masarushin大崎		
优先权	60/215645 2000-06-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了B7样（B7-L）多肽和编码该多肽的核酸分子。 本发明还提供选择性结合剂，载体，宿主细胞和产生B7-L多肽的方法。 本发明进一步提供了用于诊断，治疗，改善和/或预防与B7-L多肽有关的疾病，病症和病状的药物组合物和方法。