

(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2004-501625

(P2004-501625A)

(43) 公表日 平成16年1月22日(2004.1.22)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
A O 1 K 67/027	A O 1 K 67/027	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 P 1/04	4 B O 6 3
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 3/10	4 B O 6 4
A 6 1 P 3/10	A 6 1 P 5/14	4 B O 6 5
審査請求 有 予備審査請求 有 (全 210 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-505832 (P2002-505832)	(71) 出願人	391022430
(86) (22) 出願日	平成13年6月28日 (2001.6.28)		アムジェン インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月27日 (2002.12.27)		AMGEN INC.
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/020719		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 91
(87) 国際公開番号	W02002/000710		320-1799, サウザント オークス
(87) 国際公開日	平成14年1月3日 (2002.1.3)		, ワン アムジェン センター ドライブ
(31) 優先権主張番号	60/214, 512	(74) 代理人	100078282
(32) 優先日	平成12年6月28日 (2000.6.28)		弁理士 山本 秀策
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409
(31) 優先権主張番号	09/729, 264		弁理士 安村 高明
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000.11.28)	(74) 代理人	100113413
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B 7 様分子およびその使用

(57) 【要約】

本発明は、B 7 様 (B 7-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、B 7-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、B 7-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および方法を提供する。B 7-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。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 B 7-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、および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。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 または配列番号 13 のいずれかに示されるヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；

(c) (a) または (b) のいずれかの相補体に、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) (a) 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。

10

【請求項 2】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約 70% 同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 または配列番号 13 のいずれかに示されるヌクレオチド配列、あるいは (a) の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 または配列番号 13 のいずれかのヌクレオチド配列、(a)、あるいは (b) の領域であって、ここで、該ポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれか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、あるいは抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 または配列番号 13 のいずれかのヌクレオチド配列、あるいは (a) ~ (c) いずれかの領域；

(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。

20

30

【請求項 3】

単離された核酸分子であって、以下：

(a) 少なくとも 1 つの保存的アミノ酸置換を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペ

40

50

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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、該コードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

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

(g) 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、前記 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。

10

20

30

40

50

【請求項 13】

単離されたポリペプチドであって、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含む、単離されたポリペプチド。

【請求項 14】

単離されたポリペプチドであって、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、該フラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性である、フラグメント；ならびに

(d) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列、(a) または (c) 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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、該ポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、単離されたポリペプチド。

【請求項 17】

請求項 14 に記載の単離されたポリペプチドであって、ここで、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。 10

【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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、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。 20

【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。 30

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

【請求項 27】

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

【請求項 28】

可変領域フラグメントである、請求項 18 に記載の選択的結合因子。 40

【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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれか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】

B 7－L ポリペプチドの生物学的活性を拮抗する、請求項 1 8 に記載の選択的結合因子。

【請求項 3 3】

B 7－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 1 8 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 3 4】

配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 1 0、配列番号 1 2 または配列番号 1 4 のいずれか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 3 5】

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

【請求項 3 6】

請求項 1 8 に記載の抗 B 7－L 抗体またはフラグメントを用いて、B 7－L ポリペプチドの量を検出または定量する方法。

【請求項 3 7】

請求項 1 3、請求項 1 4、または請求項 1 5 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 3 8】

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 3 7 に記載の組成物。

【請求項 3 9】

請求項 1 3、請求項 1 4、または請求項 1 5 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 4 0】

水溶性ポリマーを用いて共有結合的に改変された、請求項 3 9 に記載のポリペプチド。

【請求項 4 1】

請求項 4 0 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、ポリマー（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 4 2】

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 4 3】

前記核酸分子が、ウイルスベクター中に含まれる、請求項 4 2 に記載の組成物。

【請求項 4 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、ウイルスベクター。

【請求項 4 5】

異種アミノ酸配列に融合された、請求項 1 3、請求項 1 4、または請求項 1 5 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 4 6】

前記異種アミノ酸配列が、Ig G 定常ドメインまたはそのフラグメントである、請求項 4 5 に記載の融合ポリペプチド。

【請求項 4 7】

医学的状态を処置、予防、または改善するための方法であって、請求項 1 3、請求項 1 4、もしくは請求項 1 5 のいずれかに記載のポリペプチド、または請求項 1、請求項 2、もしくは請求項 3 のいずれかに記載の核酸によってコードされるポリペプチドを患者に投与

10

20

30

40

50

する工程を包含する、方法。

【請求項 48】

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。

10

【請求項 49】

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、または請求項 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 50】

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。

20

【請求項 51】

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 50 に記載の方法。

【請求項 52】

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 53】

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。

30

【請求項 54】

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 53 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 55】

固体支持体に結合される請求項 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。

40

【請求項 56】

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

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は、2000 年 6 月 28 日に出願された米国暫定特許番号第 60/214,512 号および 2000 年 11 月 28 日に出願された、米国特許第 09/729,264 号から優先権の利益を主張する（これらのそれぞれの開示は、本明細書中に参考として明白に援用される）

（発明の分野）

50

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。

【0002】

（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は、新規治療薬の発見を大いに加速した。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、治療剤として使用するための生成物に対して有利な特性を与え得る。

【0003】

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。

【0004】

（発明の要旨）

本発明は、新規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。

【0005】

本発明は、以下：

- （a）配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13のいずれかに示されるヌクレオチド配列；
 - （b）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列；
 - （c）（a）または（b）のいずれかの相補体に、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）（a）または（b）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。

【0006】

本発明はまた、以下：

- （a）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドに少なくとも約70%同一であるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；
- （b）配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13のいずれかに示されるヌクレオチド配列、または（a）の、対立遺伝子改変体またはスプライス改変体をコードするヌクレオチド配列；
- （c）少なくとも約25アミノ酸残基のポリペプチドフラグメントをコードする、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13のいずれかのヌクレオチド配列、（a）、または（b）の領域であって、ここで、こ

のポリペプチドフラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性である、ヌクレオチド配列の領域；

(d) 少なくとも約 16 ヌクレオチドのフラグメントを含む、配列番号 1、配列番号 3、配列番号 5、配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 または配列番号 13 のいずれかのヌクレオチド配列あるいは (a) ~ (c) のいずれかの領域；

(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。

10

【0007】

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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

20

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

30

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

(e) アミノ酸置換、アミノ酸挿入、アミノ酸欠失、C 末端短縮、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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列であって、ここで、このコードされたポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、ヌクレオチド配列；

40

(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。

50

【0008】

本発明は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるような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。

【0009】

本発明はまた、以下：

(a) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかのオルソログに対するアミノ酸配列；

(b) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかのアミノ酸配列に少なくとも約 70% 同一であるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも約 25 アミノ酸残基を含む配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列のフラグメントであって、ここで、このフラグメントは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有するか、あるいは抗原性である、フラグメント；ならびに

(d) 配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列、(a) または (b) のいずれかの、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。

【0010】

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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(b) 少なくとも 1 つのアミノ酸挿入を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(c) 少なくとも 1 つのアミノ酸欠失を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；

(d) C 末端短縮および／または N 末端短縮を有する配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列；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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるアミノ酸配列であって、ここで、このポリペプチドは、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに示されるポリペプチドの活性を有する、アミノ酸配列、

10

20

30

40

50

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】

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。

【0012】

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、および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。

【0013】

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ポリペプチドの増加したレベル（これは、増加した循環レベルを含み得る）を可能にする様式で、動物中に導入される。あるいは、B7-L核酸分子は、内因性B7-Lポリペプチドの発現を阻害する（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）様式で動物に導入される。このトランスジェニック非ヒト動物は、好ましくは哺乳動物であり、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。

【0014】

本発明のB7-Lポリペプチドの誘導体もまた、提供される。

【0015】

本発明のB7-Lポリペプチドを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、アゴニストであってもアンタゴニストであってもよい。

【0016】

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と、1つ以上の薬学的に受容可能な処方剤とを含む、薬学的組成物もまた、本発明によって包含される。この薬学的組成物は、治療有効量の本発明のヌクレオチドまたはポリペプチドを提供するために使用される。本発明はまた、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。

【0017】

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。

【0018】

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、このポリペプチドへのこの試験分子の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。

【0019】

B7-Lポリペプチドの発現を調整する方法および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整または調節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な、遺伝子治療、細胞治療、およびアンチセンス治療が挙げられる。

【0020】

本発明の別の局面において、この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」が、タンパク質リガンドについてのレセプターをクローニングするために広く使用されている。例えば、SimonsenおよびLodish, 1994, Trends Pharmacol. Sci. 15: 437-41および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ポリペプチドのシグナル伝達経路の新規のアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。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選択的結合因子(例えば、抗体およびその誘導体)、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かが、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)を処置するために使用され得る。 10

【0021】

(発明の詳細な説明)

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

【0022】

(定義)

用語「B7-L遺伝子」または「B7-L核酸分子」または「B7-Lポリヌクレオチド」とは、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13のいずれかに示されるヌクレオチド配列、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12のいずれかに示されるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、および本明細書中で定義される核酸分子を含むかまたはこれらからなる、核酸分子をいう。 20

【0023】

用語「B7-Lポリペプチド対立遺伝子改変体」とは、生物または生物の集団の染色体上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形態のうちの1つをいう。

【0024】

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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるB7-Lポリペプチドアミノ酸配列のRNA転写物中のイントロン配列の選択的プロセッシングによって生成される、核酸分子(通常はRNA)をいう。 30

【0025】

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、ともに天然で見出されるタンパク質、脂質、糖質、または他の物質のうち少なくとも約50パーセントから分離された、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されている、本発明の核酸分子、または(4)より大きなポリヌクレオチド配列の一部として天然には存在しない、本発明の核酸分子をいう。好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、いかなる他の夾雑核酸分子、または天然の環境において見出される他の夾雑物(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、もしくは研究的使用を妨げる)も実質的には含まない。 40

【0026】

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うちのいずれかから形成される分子を含み、この塩基アナログは、例えば、以下であるがこれらに限定されない: 4-アセチルシトシン、8-ヒドロキシ-N6-メチルアデノシン、アジリジニル-シトシン、プソイドイソシトシン、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 50

、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-mannosyl queosine)、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、オキシプトキソシン、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 (queosine)、2-チオシトシン、および2, 6-ジアミノプリン。

10

【0027】

用語「ベクター」は、宿主細胞にコード情報を移すために使用される任意の分子（例えば、核酸、プラスミド、またはウイルス）をいうために使用される。

【0028】

用語「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適切であり、かつ挿入された異種核酸配列の発現を、指向および／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。

20

【0029】

用語「作動可能に連結された（されている）」は、隣接配列の配置方法をいうために本明細書中に使用される。ここで、このように記載される隣接配列は、その通常の機能を実行するように構成されるかまたは組み立てられる。従って、コード配列に作動可能に連結された隣接配列は、そのコード配列の複製、転写および／または翻訳をもたらすことができ得る。例えば、プロモーターがコード配列の転写を指向し得る場合、このコード配列は、このプロモーターに作動可能に連結されている。隣接配列は、それが正確に機能する限り、コード配列と連続している必要はない。従って、例えば、翻訳されないが転写される介在配列が、プロモーター配列とこのコード配列との間に存在し得、そして、このプロモーター配列はなお、このコード配列に「作動可能に連結されている」とみなされ得る。

30

【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、細胞をいうために用いられる。この用語は、この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的構成においてもとの親と同一であってもなくても、この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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドおよび関連ポリペプチドをいう。関連ポリペプチドとしては、以下が挙げられる：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であって、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するもの。B7-Lポリペプチドは、本明細書中に定義されるように、成熟ポリペプチドであり得、そしてそ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。

40

【0032】

用語「B7-Lポリペプチドフラグメント」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示される

50

ポリペプチドのアミノ末端（リーダー配列を有するかまたは有さない）の短縮および／またはカルボキシル末端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」とはまた、B7-Lポリペプチドオルソログ、B7-Lポリペプチド誘導体、またはB7-Lポリペプチド改変体のアミノ末端および／またはカルボキシル末端の短縮物をいうか、あるいは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および／またはカルボキシル末端の短縮物をいう。B7-Lポリペプチドフラグメントは、選択的RNAスプライシングから生じ得るか、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アミノ酸より多いアミノ酸を含む。このように産生されたポリペプチドフラグメントは、約25個連続するアミノ酸、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生成するために用いら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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるB7-Lポリペプチド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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるB7-Lポリペプチドアミノ酸配列（リーダー配列を有するか、または有さない）に比べて、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、天然に存在し得る（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スプライス改変体）か、または人工的に構築され得る。このようなB7-Lポリペプチド改変体は、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13のいずれかに示されるDNA配列からしかるべく変動する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個、または1～5個、または1～10個、または1～15個、または1～20個、または1～25個、または1～50個、または1～75個、または1～100個、または100個よりも多いアミノ酸の置換、挿入、付加および／もしくは欠失を有し、ここでその置換は、保存的であっても、または非保存的であってもよいし、あるいはその組み合わせであってもよい。

【0035】

用語「B7-Lポリペプチド誘導体」とは、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチド、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う。用語「B7-Lポリペプチド誘導体」とはまた、化学的に改変された、本明細書中に定義されるような、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う。

【0036】

用語「成熟B7-Lポリペプチド」とは、リーダー配列を欠くB7-Lポリペプチドをいう。成熟B7-Lポリペプチドはまた、アミノ末端（リーダー配列を有するか、または有

さない) および/またはカルボキシル末端のタンパク質分解性プロセッシング、より大きい前駆体からのより小さいポリペプチドの切断、N結合型グリコシル化および/またはO結合型グリコシル化などのような、他の改変を含み得る。

【0037】

用語「B7-L融合ポリペプチド」とは、本明細書中に定義されるような、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチド、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ル末端での1つ以上のアミノ酸(例えば、異種タンパク質または異種ペプチド)の融合体をいう。用語「B7-L融合ポリペプチド」とはまた、本明細書中に定義されるような、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ル末端での、1つ以上のアミノ酸の融合体をいう。

10

【0038】

用語「生物学的に活性なB7-Lポリペプチド」とは、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチドの少なくとも1つの活性の特徴を有する、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、この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。

20

【0039】

用語「単離されたポリペプチド」とは、以下のような本発明のポリペプチドをいう:(1)供給源細胞から単離された場合に、共に天然に見出されるポリヌクレオチド、脂質、糖質、または他の材料の、少なくとも約50%から分離されたポリペプチド、(2)その「単離されたポリペプチド」が天然において結合されているポリペプチドの全体または一部分に(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)結合されていないポリペプチド、(3)天然において結合されないポリペプチドに(共有結合性の相互作用または非共有結合性の相互作用によって)作動可能に連結されているポリペプチド、あるいは(4)天然に存在しないポリペプチド。好ましくは、この単離されたポリペプチドは、その治療用途、診断用途、予防用途または研究用途を妨害する、その天然の環境において見出されるいかなる他の夾雑ポリペプチドまたは他の夾雑物をも実質的に含まない。

30

【0040】

用語「同一性(identity)」は、当該分野で公知のように、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、これらの配列を比較することによって決定される、関係をいう。当該分野では、「同一性」はまた、核酸分子またはポリペプチドの配列関連性の程度(場合によっては、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のストリングの間の一致により決定されるような)を意味する。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム(すなわち、アルゴリズム)によって扱われるギャップアライメント(もし存在するならば)を有する、2つ以上の配列のうちの短い方の間の同一適合のパーセントを測定する。

40

【0041】

用語「類似性(similarity)」は、関連する概念であるが、「同一性」とは対照的に、「類似性」とは、同一適合および保存的置換適合の両方を含む関連性の尺度をいう。2つのポリペプチド配列が、例えば、10/20の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ならば、同一性パーセントおよび類似性パーセントは、両方とも50%である。同じ例で、保存的置換が存在するさらに5つの位置が存在するならば、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つのポリペプチドの間の類似性パーセントは、これらの2つのポリペプチドの間の同一性パーセントよりも高い。

【0042】

50

用語「天然に存在する」または「ネイティブ」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材料に関して使用される場合、天然に見出されかつ人工的に操作されていない材料をいう。同様に、「天然に存在しない」または「非ネイティブ」は、本明細書中において使用される場合、天然には見出されないか、または人工的に構造改変されたかもしくは合成された、材料をいう。

【0043】

用語「有効量」および「治療的に有効な量」とは、各々、本明細書中に示される 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 B7-L 核酸分子の量をいう。

【0044】

本明細書中に使用される場合、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」とは、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を、達成するかまたは増強するのに適切な、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）により結合され得る分子または分子の一部であって、そしてさらに、その抗原のエピトープに結合し得る抗体を産生するために動物において用いられ得る、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 ポリペプチドに対して特異性を有する分子をいう。本明細書中にて使用される場合、用語「特異的」および「特異性」とは、ヒト B7-L ポリペプチドに結合するがヒト非 B7-L ポリペプチドに結合しない、選択的結合因子の能力をいう。しかし、その選択的結合因子が、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、または配列番号 14 のいずれか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））もまた結合し得ることが、理解される。

【0047】

用語「形質導入」は、1 つの細菌から別の細胞への（通常、ファージによる）遺伝子の移入をいうために使用される。「形質導入」はまた、レトロウイルスによる真核生物細胞の配列の捕捉および移入をいう。

【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る。そして、細胞は、その外因性 DNA が細胞膜の内側に導入されている場合、「トランスフェクト」されている。多数のトランスフェクション技術が、当該分野で周知であり、そして、本明細書中に開示される。例えば、Graham ら、1973, *Virology* 52:456; Sambrook ら、*Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratories, 1989); Davis ら、*Basic Methods in Molecular Biology* (Elsevier, 1986)；および Chu ら、1981, *Gene* 13:197 を参照のこと。このような技術は、1 つ以上の外因性 DNA 部分を適切な宿主細胞に導入するために使用され得る。

【0049】

用語「形質転換」は、本明細書中に使用される場合、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 を含むように改変されている場合、形質転換されている。例えば、細胞は、そのネイティブな状態から遺伝的に改変された場合、形質転換されている。トランスフェクションまたは形質導入に続いて、その形質転換 DNA は、細胞の染色体へ物理的に組み込むことによってその細胞の DNA と組み換わり得るか、複製されないエピソームエレメントとして一過性に維持され得るか、またはプラスミドとして独立し

10

20

30

40

50

て複製し得る。細胞は、そのDNAが細胞の分裂と共に複製される場合、安定に形質転換されているとみなされる。

【0050】

(核酸分子および／またはポリペプチドの関連性)

関連する核酸分子が、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13のいずれか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み、そして上記のヌクレオチド配列のいずれかと相補的である配列を含むことが、理解される。関連する核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドと比較して、1つ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これらから本質的になる、ポリペプチドをコードする、ヌクレオチド配列を含む。このような関連するB7-Lポリペプチドは、例えば、1つ以上のN結合型グリコシル化部位もしくはO結合型グリコシル化部位の付加および／または欠失、あるいは1つ以上のシステイン残基の付加および／または欠失を含み得る。

10

【0051】

関連する核酸分子はまた、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかの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、または約200個より多い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含む。

20

【0052】

さらに、関連するB7-L核酸分子としてはまた、本明細書中に定義されるような中程度にストリンジェントな条件または高度にストリンジェントな条件下で、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、もしくは配列番号13のいずれかのB7-L核酸分子の完全な相補配列、または配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、もしくは配列番号14のいずれかに示されるようなアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする分子の完全な相補配列、または本明細書中に定義されるような核酸フラグメントの完全な相補配列、または本明細書中に定義されるようなポリペプチドをコードする核酸フラグメントの完全な相補配列、とハイブリダイズするヌクレオチド配列を含む分子が挙げられる。ハイブリダイゼーションプロブは、関連する配列に関して、cDNAライブラリー、ゲノムDNAライブラリー、または合成DNAライブラリーをスクリーニングするために、本明細書中に提供されるB7-L配列を用いて調製され得る。既知の配列と有意な同一性を示す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領域は、本明細書中に記載されるような配列アラインメントアルゴリズムを用いて容易に決定され、そしてこれらの領域は、スクリーニングのためのプロブを設計するために使用され得る。

30

【0053】

用語「高度にストリンジェントな条件」は、配列が高度に相補的であるDNA鎖のハイブリダイゼーションを可能にし、そして有意にミスマッチしているDNAのハイブリダイゼーションを除外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、主に、温度、イオン強度、およびホルムアミドのような変性剤の濃度によって、決定される。ハイブリダイゼーションおよび洗浄に関する「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であるか、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 & Maniatis, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989); Andersonら, Nucleic Acid Hybridization: A Practical approach, 第4

40

50

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、使用し得る。しかし、ハイブリダイゼーションの速度は、影響される。他の薬剤が、非特異的なハイブリダイゼーションおよび/またはバックグラウンドのハイブリダイゼーションを減少させる目的で、ハイブリダイゼーション緩衝液および洗浄緩衝液に含まれ得る。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))、フィコール、デンハルト溶液、超音波処理されたサケ精子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、使用され得る。これらの添加物の濃度および型は、ハイブリダイゼーション条件のストリンジェンシーに実質的に影響を与えることなく変更され得る。ハイブリダイゼーション実験は、通常、pH 6.8~7.4 で実施されるが; 代表的なイオン強度条件において、ハイブリダイゼーションの速度は、ほとんど pH とは無関係である。Anderson ら、Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach、第4章 (IRL Press Limited) を参照のこと。

10

【0055】

DNA 二重鎖の安定性に影響を与える因子としては、塩基の組成、長さ、および塩基対不一致の程度が挙げられる。ハイブリダイゼーション条件は、これらの変数を適応させ、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ように、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、以下の式によって概算され得る:

20

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

ここで、N は、形成される二重鎖の長さであり、 $[\text{Na}^+]$ は、ハイブリダイゼーション溶液または洗浄溶液中のナトリウムイオンのモル濃度であり、%G+C は、ハイブリッド中の (グアニン+シトシン) 塩基のパーセンテージである。不完全に一致したハイブリッドに関して、融解温度は、各1% 不一致に対して約1℃ ずつ減少する。

【0056】

用語「中程度にストリンジェントな条件」は、「高度にストリンジェントな条件」下で生じ得るよりもより大きい程度の塩基対不一致を有するDNA二重鎖が、形成し得る条件をいう。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であるか、または37~50℃ 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20%ホルムアミドである。例として、0.015M ナトリウムイオン中、50℃ の「中程度にストリンジェントな条件」は、約21%の不一致を許容する。

30

【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」との間に完全な区別は存在しないことが、当業者によって理解される。例えば、0.015M ナトリウムイオン (ホルムアミドなし) において、完全に一致した長いDNAの融解温度は、約71℃ である。65℃ (同じイオン強度) で洗浄する場合、これは、約6%の不一致を許容する。より遠く関連する配列を捕獲するために、当業者は、単に温度を低下させ得るし、またはイオン強度を上昇させ得る。

40

【0058】

約20ntまでのオリゴヌクレオチドプローブについて、1M NaCl* における融解温度の適切な概算値は、以下によって提供される:

$$T_m = 1 \text{ つの A-T 塩基対につき } 2^{\circ}\text{C} + 1 \text{ つの G-C 塩基対につき } 4^{\circ}\text{C}$$

* 6×クエン酸ナトリウム塩 (SSC) におけるナトリウムイオン濃度は、1M である。

Suggs ら、Developmental Biology Using Purif 50

ied 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対して高いストリンジェンシーの洗浄条件は、通常、 $6\times\text{SSC}$ 、 $0.1\%\text{SDS}$ において、このオリゴヌクレオチドの T_m の $0\sim 5^\circ\text{C}$ 下の温度である。

【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、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13のいずれか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またはこれからなるか、あるいは配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示される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また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、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11、または配列番号13のいずれか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パーセントまたは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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示される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パーセントまたは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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかに示されるポリペプチドの少なくとも1つの活性を有するポリペプチドをコードする。

10

20

【0061】

核酸配列における差異は、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれか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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれかのアミノ酸配列に対する保存的改変（およびコード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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のいずれか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。

30

【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。

40

【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】

50

天然に存在する残基は、共通の側鎖の特性に基づいてクラスに分けられ得る：

- 1) 疎水性：N o r l o y s i n、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e；
- 2) 中性親水性：C y s、S e r、T h r；
- 3) 酸性：A s p、G l u；
- 4) 塩基性：A s n、G l n、H i s、L y s、A r g；
- 5) 鎖の方向に影響を与える残基：G l y、P r o；および
- 6) 芳香族：T r p、T y r、P h e。

【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領域に、導入され得る。

10

【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。

20

【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 (K y t e ら、1982, J. M o l. B i o l. 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。

30

【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、関連する。

【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。

40

50

【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、B 7-L ポリペプチドの重要な残基を同定し得るか、または本明細書中に記載される B 7-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】

本来の残基	例示的な置換	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

10

20

30

40

当業者は、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに記載されるような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、B 7-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、B 7-L 分子の領域における変化が、B 7-L ポリペプチドの生物学的活性および／または構造にさほど不利に影響を与えるようではないことが、理解される。当業者は、比較的保存された領域においてさえ、化学的に類似のアミノ酸を、活性を維持ながら天然に存在する残基と置換し得ることもまた理解する（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。このような比較の観点において、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 B 7-L ポリペプチドにおける、アミノ酸残基の重要性を予測し得る。当業者は、B 7-L ポリペプチドのこのような予測された重要なアミノ酸残基に対する化学的に類似のアミノ酸置換を、選択し得る。

50

【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に関して、三次元構造およびアミノ酸配列を分析し得る。このような情報の観点において、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予測し得る。当業者は、そのタンパク質の表面に存在すると予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活性の破壊を生じるか、活性を所望でなく減少するか、または不適切な活性を生ずる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る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。

10

【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、二次構造の推定を補助するために、現在利用可能である。二次構造を推定する1つの方法は、相同性モデリングに基づく。例えば、30%より大きな配列同一性または40%より大きな類似性を有する2つのポリペプチドまたはタンパク質は、しばしば、類似の構造トポロジーを有する。タンパク質構造データベース(PDB)の近年の成長は、二次構造(ポリペプチドまたはタンパク質の構造内の可能な数の折り畳みを含む)の増強された予測不可能性を提供してきた。Holmら、1999, Nucleic Acids Res. 27: 244-47を参照のこと。所定のポリペプチドまたはタンパク質において制限された数の折り畳みが存在すること、および一旦、重要な数の構造が解析されると、構造推定は劇的により正確となることが、示唆されてきた(Brennerら、1997, Curr. Opin. Struct. Biol. 7: 369-76)。

20

30

【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」(Holmら、前出、およびBrennerら、前出を参照のこと)を包含する。

40

【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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のアミノ酸配列と比較して変化している、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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれか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連結グリコシル化部位を含む。N連結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

50

任意のアミノ酸残基であり得る。この配列を作製するためのアミノ酸残基の置換は、N連結炭水化物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連結炭水化物鎖を除去する。1つ以上のN連結グリコシル化部位（代表的に、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連結部位が作製される、N連結炭水化物鎖の再配列もまた、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、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれか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、生物学的に活性なコンフォメーションに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、同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。

10

【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し、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のような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るか、あるいは少なくとも1つのアミノ酸欠失を有し、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のような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る。関連する核酸分子はまた、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、そしてさらにここで、このポリペプチドが、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のような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つの改変を有し、そしてここで、ポリペプチドが配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のポリペプチドの活性を有する、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかに記載のような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る。

20

30

【0080】

さらに、配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12または配列番号14のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の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、配列番号4、配列番号6、配列

40

50

番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかに記載のような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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれか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、代表的には、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、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て、融合した部分の分離を可能にし得る。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。

10

【0082】

本発明のさらなる実施形態において、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12 または配列番号 14 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、あるいは他の 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する。抗体は、以下の 2 つの機能的に独立した部分を含む：抗原を結合する「Fab」として公知の可変ドメイン、ならびに相補的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、相補体固定のような機能、および、おそらく胎盤移入のような機能でさえも、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。

20

【0083】

【表 2】

表 I I
治療タンパク質とのFc融合物

Fcの形態	融合パターン	治療関連	参考文献
IgG1	CD30-L のN末端	ホジキン病；未分化リンパ種；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, <i>J. Immunol.</i> 154:5590-600
IgG1	TNFレセプター	敗血症性ショック	Fisherら、1996, <i>N. Engl. J. Med.</i> 334:1697-1702; Van Zeeら、1996, <i>J. Immunol.</i> 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、 自己免疫障害	米国特許第5,808,029号
IgG1	CD4レセプター	AIDS	Caponら、1989, <i>Nature</i> 337: 525-31
IgG1, IgG3	IL-2のN末端	抗癌、抗ウイルス	Harvillら、1995, <i>Immunotech.</i> 1:95-105
IgG1	OPGのC末端	変形性関節症； 骨密度	WO 97/23614
IgG1	レプチンのN末端	抗肥満症	PCT/US 97/23183, 1997年12月11日出願
ヒト IgGγ1	CTLA-4	自己免疫障害	Linsley, 1991, <i>J. Exp. Med.</i> , 174:561-69

10

20

30

一例において、ヒトIgGのヒンジ領域、CH2領域、およびCH3領域は、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化／多量体化を可能にする。Fc領域は、天然に存在するFc領域であり得るか、または治療の質、循環時間、もしくは減少した凝集のような特定の質を改善するよう変更され得る。

【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 Data (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

40

50

); 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与えるように、設計される。同一性および類似性を決定するための方法は、公共に利用可能なコンピュータ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) から公共に利用可能である。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、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、選択された整列方法 (GAP プログラム) は、特許請求されるポリペプチドの少なくとも50個連続するアミノ酸にわたる整列を生じる。

【0088】

例えば、コンピュータアルゴリズム GAP (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI) を使用して、配列同一性パーセントが決定されるべき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 (アルゴリズムによって決定されるような「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、ギ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共に使用される。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) (PAM 250 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は、以下を含む:

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

Comparison matrix: BLOSUM 62 (Henikoff ら、前出);

Gap Penalty: 12

Gap Length Penalty: 4

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、GA 50

P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は、以下を含む：

Algorithm: Needleman and Wunsch, 前出；

Comparison matrix: matches = +10, mismatch = 0

Gap Penalty: 50

Gap Length Penalty: 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。

10

【0091】

Program Manual, Wisconsin Package, 第9版、9月、1997に記載されるものを含む、他の例示的なalgorithm、gap opening penalty、gap extension penalty、comparison matrix、およびthreshold of similarity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、その比較が所定の対の配列間（この場合には、GAPまたはBest Fitが一般的に好ましい）であるか、1つの配列と大きなデータベースの配列との間（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。

20

【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）において容易に得られ得る。

【0093】

本明細書中において使用される組換えDNA方法は、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. およびWiley and Sons 1994)に記載されるものである。本発明は、本明細書中に記載される核酸分子、およびこのような分子を得るための方法を提供する。

30

【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、同じ種由来のオーソログまたは関連する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をスクリーニングし得る。さらに、配列番号1、配列番号3、配列番号5、配列番号7、配列番号9、配列番号11または配列番号13のいずれか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、中程度または高い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小にする。

40

【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もまた、発現されたタンパク質の特性に基づいて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ンタンパク

50

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って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し得る。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、多量の所望の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。

10

【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、poly(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に付加され、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の領域を増幅する。

【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. Ed. 28:716-34によって記載されるもののような、当業者に周知の方法を使用する、化学合成である。これらの方法としては、とりわけ、核酸合成のためのリン酸トリエステル方法、ホスホラミダイト方法、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、標準的なホスホラ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を有し、これは、メチオニン残基をコードする。このメチオニンは、宿主細胞において産生されたポリペプチドがその細胞から分泌されるよう設計され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しなくてもよい。当業者に公知の他の方法が、同様に使用され得る。

20

30

【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ける使用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性のための「Eco_high_cod」のようなコドン度数表を組み込むコンピュータ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。他の有用なコドン度数表としては、「Celegans_high_cod」、「Celegans_low_cod」、「Drosophila_high_cod」、「Human_high_cod」、「Maize_high_cod」、および「Yeast_high_cod」が挙げられる。

40

【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であり得る。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

50

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（変異誘発技術の記載に関しては、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／またはホスホリル化）されるか否かに一部依存する。そうである場合、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。

10

【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ならびに外因性ヌクレオチド配列のクローニングおよび発現のための配列を含む。このような配列（集合的に、「隣接配列」と呼ばれる）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、ポリアダニル化配列、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。

20

【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；オリゴヌクレオチド配列は、polyHis（例えば、hexaHis）、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））または市販の抗体が存在するmyc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して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、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る。

30

【0104】

隣接配列は、同種（すなわち、宿主細胞と同じ種および／または系統由来）であり得るか、異種（すなわち、宿主細胞種または系統以外の種由来）であり得るか、ハイブリッド（すなわち、1つより多くの供給源由来の隣接配列の組み合わせ）であり得るか、または合成であり得るか、あるいは隣接配列は、B7-Lポリペプチド発現を調節するために正常に機能するネイティブな配列であり得る。このように、隣接配列の供給源は、任意の原核生物または真核生物、任意の脊椎生物または無脊椎生物、あるいは任意の植物であり得、但し、隣接配列は、宿主細胞の機構において機能的であり、そして宿主細胞の機構によって活性化され得る。

40

【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

50

法によって得られ得る。代表的には、B 7-L 遺伝子隣接配列以外の、本明細書中で有用な隣接配列は、マッピングおよび／または制限エンドヌクレアーゼ消化によって以前に同定されており、従って、適切な制限エンドヌクレアーゼを使用して、適切な組織供給源から単離され得る。いくつかの場合において、隣接配列の全長ヌクレオチド配列は公知であり得る。ここで、この隣接配列は、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公知である場合、PCRを使用して、そして／あるいは適切なオリゴヌクレオチドおよび／または同じ種もしくは別の種由来の隣接配列フラグメントを用いてゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られ得る。隣接配列が公知でない場合、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DNAの大きな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（Chatworth、CA）、または当業者に公知の他の方法によって達成され得る。この目的を達成するための適切な酵素の選択は、当業者に容易に明らかである。

10

【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、そして、この起点は、宿主細胞においてベクターの増幅に役立つ。特定のコピー数に対するベクターの増幅は、いくつかの場合において、B 7-L ポリペプチドの最適な発現に重要であり得る。選択されたベクターが複製起点部位を含まない場合、公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、そして種々の起点（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、哺乳動物細胞においてベクターのクローニングのために有用である。一般的に、複製起点の成分は、哺乳動物発現ベクターを必要としない（例えば、SV40 起点は、ただそれが初期プロモーターを含むので、しばしば、使用される）。

20

【0108】

転写終結配列は、代表的にポリペプチドコード領域の末端の3'側に配置され、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、続いてポリ-T配列である。この配列は、ライブラリーから容易にクローニングされるか、またはベクターの一部として市販で購入さえされる一方で、これはまた、本明細書中に記載のような核酸合成のための方法を使用して容易に合成され得る。

30

【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）細胞の自己栄養欠損を補うか；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。

40

【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、増殖に必要なタンパク質の産生のために、より大きく要求される遺伝子が、組換え細胞の連続的な生成の染色体内でタンデムに反復されるプロセスである。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、ベクターに存在する選択遺伝子の効力によって生存するように独特に適合される。

50

選択圧は、培地中の選択因子の濃度が連続的に変化し、それによって選択遺伝子と B 7-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課される。結果として、増加した量の B 7-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 B 7-L ポリペプチドのプロモーターの 3' 側およびコード配列の 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、これらの各々が、本明細書中に記載の方法を使用して容易に合成され得、そして原核生物ベクターにおいて使用され得る。

10

【0112】

リーダー配列、またはシグナル配列は、宿主細胞から B 7-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、B 7-L 核酸分子のコード領域に位置するか、または直接 B 7-L ポリペプチドコード領域の 5' 末端に位置する。多くのシグナル配列が同定されており、そして、選択された宿主細胞において機能性である任意のシグナル配列が、B 7-L 核酸分子と共に使用され得る。従って、シグナル配列は、B 7-L 核酸分子に対して同種（天然）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。大部分において、シグナルペプチドの存在によって宿主細胞からの B 7-L ポリペプチドの分泌は、分泌された B 7-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 B 7-L 核酸分子の一部であり得る。

20

【0113】

B 7-L ポリペプチドコード領域に結合されたネイティブな B 7-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 B 7-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が本発明の範囲内に含まれる。選択された異種シグナル配列は、宿主細胞によって認識され、そしてプロセスされる（すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される）ものでなければならない。ネイティブな B 7-L ポリペプチドシグナル配列を認識せず、プロセス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。酵母分泌について、ネイティブな B 7-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が満足であるが、他の哺乳動物シグナル配列が適切であり得る。

30

【0114】

グリコシル化が真核生物宿主細胞発現系において望ましいような、いくつかの場合において、グリコシル化または収量を改善するために種々のシグナルペプチド（presence）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、1 位に（成熟タンパク質の最初のアミノ酸に対して）、発現に付随して 1 つ以上のさらなるアミノ酸を有し得、これは、完全に除去されないかもしれない。例えば、最終タンパク質産物は、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される場合、所望の B 7-L ポリペプチドのわずかに短縮した形態を生じ得る。

40

【0115】

50

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される；これは、ポリペプチドが真核生物宿主細胞（特に、哺乳動物宿主細胞）において産生される場合、特に当てはまる。使用されるイントロンは、特に使用される遺伝子が全長ゲノム配列またはそのフラグメントである場合、B7-L遺伝子内に天然に存在し得る。イントロンが（大部分のcDNAについて）遺伝子内に天然に存在しない場合、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遺伝子に関するイントロンの位置は、イントロンが効果的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、転写開始部位の3'側で、そしてpoly-A転写終止配列の5'側である。好ましくは、イントロンは、コード配列を妨害しないように、cDNAの1つの側面または他の側面（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。

10

【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100bp～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、通常、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1つにグループ化される。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、栄養分の存在または非存在、あるいは温度の変化）に応答してそれらの制御下で、DNAからの転写の増加したレベルを開始する。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、遺伝子発現に対して遺伝子をほとんど制御しないかまたは制御しない。多数のプロモーター（種々の潜在的な宿主細胞によって認識される）が周知である。適切なプロモーターは、供給源のDNAからプロモーターを制限酵素消化によって取り出し、そして所望のプロモーター配列をベクター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DNA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／または発現を指向す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、より大きい転写および発現タンパク質のより高い産生が可能であり、そして使用のために選択された宿主細胞系と適合性である場合、異種プロモーターが好ましい。

20

30

【0117】

原核性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、その結果、当業者は、任意の有用な制限部位を供給するのに必要とされるようなリンカーまたはアダプターを使用して、所望のDNA配列にそれらの配列を連結し得る。

40

【0118】

酵母宿主との使用に適切なプロモーターもまた、当該分野において周知である。酵母エンハンサーは、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、そしてこれらとしては、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス（例えば、Adenovirus 2）、ウシパピローマウイルス、鳥類肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、そして最も好ましくは、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がこれらに限定されない。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。

50

【0119】

B7-L 遺伝子発現を制御する際の目的のプロモーターであり得るさらなるプロモーターとしては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：SV40 初期プロモーター領域（Bernois および Chambon、1981、Nature 290：304-10）；CMV プロモーター；ラウス肉腫ウイルスの 3' 末端反復において得られるプロモーター（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）；メタロチオニン遺伝子の調節配列（Brinster ら、1982、Nature 296：39-42）；βラクターゼプロモーターのような原核生物発現ベクター（Villa-Komaroff 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）。以下の動物転写制御領域もまた目的の領域であり、これらは、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：膵臓腺房細胞において活性であるエラスターゼ 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細胞中で活性化されるインスリン遺伝子制御領域（Hanahan、1985、Nature 315：115-122）；リンパ系細胞中で活性化される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）；精巣細胞、胸部細胞、リンパ系細胞および肥満細胞において活性化されるマウス乳腺癌ウイルス制御領域（Leder ら、1986、Cell 45：485-95）；肝臓において活性化されるアルブミン遺伝子制御領域（Pinkert ら、1987、Genes and Devel. 1：268-76）；肝臓において活性化される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）；肝臓において活性化されるα1アンチトリプシン遺伝子制御領域（Kelsey ら、1987、Genes and Devel. 1：161-171）；骨髄性細胞において活性化される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）；脳中の稀突起膠細胞において活性化される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化されるミオシン軽鎖-2 遺伝子制御領域（Sani、1985、Nature 314：283-86）；および視床下部において活性化される性腺刺激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、高等真核生物により本発明の B7-L ポリペプチドをコードする DNA の転写を増加するためにベクターへ挿入され得る。エンハンサーは、DNA のシス作用性エレメントであり、通常約 10~300 bp 長であり、これは、プロモーターに対して作用し、その転写を増加させる。エンハンサーは、比較的配向性でありそして位置依存性である。エンハンサーは、転写ユニットに対して 5' および 3' を見出されている。哺乳動物遺伝子から利用可能ないくつかのエンハンサー配列（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スリン）が公知である。しかし、典型的に、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例示的なエンハンサーエレメントである。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

ーに接合され得るが、エンハンサーは、典型的には、プロモーターから5'部位に配置される。

【0121】

本発明の発現ベクターは、市販のベクターのような出発ベクターから構成され得る。このようなベクターは、全ての所望の隣接配列を含んでも含まなくてもよい。本明細書中に記載される所望の隣接配列のうちの1以上がベクター中にまだ存在しない場合、これらは、個々に入手され、そしてベクターへ連結され得る。それぞれの隣接配列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するベクターである。このようなベクターとしては、特に、pCRII、pCR3およびpcDNA3.1 (Invitrogen、San Diego、CA)、pBSII (Stratagene、La Jolla、CA)、pET15 (Novagen、Madison、WI)、pGEX (Pharmacia Biotech、Piscataway、NJ)、pEGFP-N2 (Clontech、Palo Alto、CA)、pETL (BlueBacII、Invitrogen)、pDSR- α (PCT公開番号WO90/14363) および 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、コスミドベクター、プラスミドベクターまたは改変ベクターが挙げられるがこれらに限定されない。しかし、このベクター系が選択された宿主細胞と適合し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、以下が挙げられるがこれらに限定されない：例えば、Bluescript (登録商標) プラスミド誘導体 (高コピー数ColE1ベースのファージミド；Stratagene Cloning Systems、La Jolla CA) のようなプラスミド；クローニングTaq増幅されるPCR産物について設計されたPCRクローニングプラスミド (例えば、TOPOTM TA Cloning (登録商標) Kit 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、酵母ベクターおよびウイルスベクター (例えば、バキュロウイルス発現系 (pBacPAKプラスミド誘導体；Clontech))。

【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、完成されたベクターは、増幅および/またはポリペプチド発現のために適切な宿主細胞へ挿入され得る。選択された宿主細胞へのB7-Lポリペプチドについての発現ベクターの形質転換は、周知の方法 (例えば、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) により達成され得る。選択された方法は、部分的に、使用される宿主細胞の型に依存する。これらの方法および他の適切な方法は、当業者に周知であり、そして例えば、Sambrookら (前出) に記載される。

【0125】

宿主細胞は、原核細胞宿主細胞 (例えば、E. coli) または真核細胞宿主細胞 (酵母細胞、昆虫細胞、または脊椎動物細胞) であり得る。適切な条件下で培養された場合、宿主細胞は、B7-Lポリペプチドを合成し、このポリペプチドは引き続き培養培地から収集され得るか (宿主細胞がB7-Lポリペプチドを培地へ分泌する場合)、またはB7-Lポリペプチドを産生する宿主細胞から直接収集される (分泌されない場合)。適切な宿主細胞の選択が、ウイルス因子 (例えば、所望の発現レベル、活性にとって所望であるかまたは必要であるポリペプチド改変 (例えば、グリコシル化またはリン酸化) および生物学的に活性な分子への折り畳みの簡便性) に依存する。

【0126】

適切な宿主細胞の多くは、当該分野で公知であり、そして、多くは、American Type Culture Collection (ATCC)、Manassas、VAから入手可能である。例としては、哺乳動物細胞（例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO)、CHO DHFR (-) 細胞 (Urlaubら、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97: 4216-20)、ヒト胎児腎臓 (HEK) 293細胞もしくは293T細胞、または3T3細胞)が挙げられるが、これらに限定されない。適切な哺乳動物宿主細胞の選択ならびに形質転換、培養、増幅、スクリーニング、産物産生および精製のための方法は、当該分野で公知である。他の適切な哺乳動物細胞株は、サルCOS-1およびCOS-7細胞株ならびにCV-1細胞株である。さらなる例示的な哺乳宿主細胞としては、形質転換された細胞株を含む、霊長類細胞株およびげっ歯類細胞株が挙げられる。正常な二倍体細胞、初代組織のインビトロ培養に由来する細胞株、ならびに一次外植片もまた適切である。候補細胞は、選択遺伝子において遺伝子型的に欠損していてもよいし、または優性に作用する選択遺伝子を含んでいてもよい。他の適切な哺乳動物細胞株としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：Swiss、Balb-cもしくはNIHマウスに由来するマウス神経芽細胞種N2A細胞、HeLa細胞、マウスL-929細胞、3T3株またはHaKハムスター細胞株、BH Kハムスター細胞株またはHaKハムスター細胞株。各々これらの細胞株は、公知であり、そしてタンパク質発現の分野の当業者にとって利用可能である。

【0127】

本発明に適切な宿主細胞として同様に有用であるのは、細菌細胞である。例えば、E. coliの種々の株（例えば、HB101、DH5α、DH10、およびMC1061）が、バイオテクノロジー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.などの種々の株もまた、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もまた、本発明のポリペプチドの発現のための宿主細胞として利用可能である。好ましい酵母株としては、例えば、Saccharomyces cerevisiaeおよびPichia pastorisが挙げられる。

【0129】

さらに、所望される場合、昆虫細胞系が、本発明の方法において利用され得る。このような系は、例えば、Kittsら(1993、Biotechniques、14: 810-17)；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の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汁産生動物（例えば、ウシまたはヤギ）を使用し得、そしてその動物の乳汁中の本発明のグリコシル化ポリペプチドを入手し得る。B7-Lポリペプチドを産生するための植物もまた使用し得るが、一般的に、植物中で生じるグリコシル化は、哺乳動物細胞にて産生されるものと異なり、そしてヒト治療用途に適切でないグリコシル化生成物を生じ得る。

【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が、当業者に周知の標準的培地を使用して培養され得る。この培地は、通常、その細胞の増殖および生存に必要な栄養素すべてを含む。E. coli細胞を培養するのに適切な培地は、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のに適切な培地としては、Roswell Park Memorial Institute medium 1640 (RPMI 1640)、Minimal

al Essential Medium (MEM)、および／または Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) が挙げられ、これらすべては、培養される特定の細胞株のために必要な血清および／または増殖因子として補充され得る。昆虫培養に適切な培地は、必要な場合には酵母融解物 (yeastolate)、ラクトアルブミン加水分解物および／またはウシ胎仔血清を補充した、Grace 培地である。

【0132】

代表的には、トランスフェクトされた細胞または形質転換細胞の選択的増殖に有用な抗生物質または他の化合物が、この培地に補充物として添加される。使用される化合物は、宿主細胞を形質転換したプラスミド上に存在する選択マーカーエレメントにより決定される。例えば、その選択マーカーエレメントがカナマイシン耐性である場合、培養培地に添加される化合物は、カナマイシンである。選択的増殖のための他の化合物としては、アンピシリン、テトラサイクリンおよびネオマイシンが挙げられる。

10

【0133】

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

【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、細胞培養培地にて見出され得る。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、B7-L ポリペプチドは細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (グラム陰性細菌宿主細胞) に存在する。

20

【0135】

宿主細胞の細胞質および／または核 (真核生物宿主細胞について) あるいは細胞質ゾル (細菌宿主細胞) に存在する B7-L ポリペプチドに関して、細胞内物質 (グラム陰性細菌について封入体を含む) が、当業者に公知の任意の標準的技術を使用して宿主細胞から抽出され得る。例えば、宿主細胞は、フレンチプレス、ホモジナイゼーション、および／または超音波処理、それに続く遠心分離によって、ペリプラズム／細胞質の中身を放出するように溶解され得る。

30

【0136】

B7-L ポリペプチドが細胞質ゾルにおいて封入体を形成した場合、その封入体は、しばしば、内側細胞膜および／または外側細胞膜に結合し得、従って、遠心分離後に、主にペレット物質中に見出される。次いで、このペレット物質は、極端な pH 状態で処理され得るか、またはカオトロピック剤 (例えば、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) を還元剤 (例えば、ジチオスレイトール (アルカリ性 pH) もしくはトリスカルボキシエチルホスフィン (酸性 pH)) の存在下で用いて処理され得て、封入体を遊離、破壊および可溶化し得る。可溶化された B7-L ポリペプチドは、次いで、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所望される場合、単離は、本明細書中に記載される方法および Marston ら (1990、Meth. Enz. 182: 264-75) に記載される方法のような、標準的方法を使用して達成され得る。

40

【0137】

いくつかの場合において、B7-L ポリペプチドは、単離の際に生物学的に活性でないかもしれない。そのポリペプチドを「リフォールディング」またはその 3 次構造に変換してジスルフィド結合を産生するための種々の方法が、生物学的活性を回復するために使用され得る。このような方法は、可溶化されたポリペプチドを通常は 7 を超える pH に、特定の濃度のカオトロップの存在下で曝すことを包含する。カオトロップの選択は、封入体可溶化のために使用される選択に非常に類似するが、通常このカオトロップは、より低い濃

50

度で使用されそして可溶化に使用されるカオトロープと必ずしも同じではない。ほとんどの場合、リフォールディング／酸化溶液はまた、還元剤を含むかまたは還元剤およびその酸化形態を特定の比で含んで、特定の酸化還元ポテンシャルを生じ、それによりそのタンパク質のシステイン架橋の形成を生じるようなジスルフィドシャッフリングを可能にする。一般的に使用される酸化還元カップル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、ジチオスレイトール (DTT)／ジチアンDTT、および2-2-メルカプトエタノール (bME)／ジチオー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リフォールディングの効率を高めるために必要であり得、そしてこの目的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。

10

【0138】

封入体が、B7-Lポリペプチドの発現の際に有意な程度まで形成されない場合は、そのポリペプチドは、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。そのポリペプチドは、本明細書中に記載されるような方法を使用して、上清からさらに単離され得る。

【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。そのポリペプチドがそのカルボキシル末端もしくはアミノ末端のいずれかに、ヘキサヒスチジンのようなタグを含む (B7-Lポリペプチド／ヘキサHis) かまたはFLAG (Eastman Kodak Co., New Haven, CT) もしくはmyc (Invitrogen) のような他の小さいペプチドを含むように合成されている場合、そのポリペプチドは、アフィニティークラム (カラムマトリックスはそのタグに高い親和性を有する) にその溶液を通すことによって、1工程で精製され得る。

20

【0140】

例えば、ポリヒスチジンはニッケルに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クラム (例えば、Qiagen (登録商標) ニッケルカラム) が、B7-Lポリペプチド／ポリHisの精製に使用され得る。例えば、Current Protocols in Molecular Biology, 10.11.8節 (Ausubelら編、Green Publishers Inc. およびWiley & Sons, 1993を参照のこと。

30

【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を介して、精製され得る。

【0142】

精製に適切な他の手順としては、限定はしないが、アフィニティークロマトグラフィー、イムノアフィニティー、クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、分子ふるいクロマトグラフィー、HPLC、電気泳動 (ネイティブゲル電気泳動を含む) と続くゲル溶出、ならびに調製的等電点電気泳動 (「IsoPrime」マシン／技術、Hoefer Scientific, San Francisco, CA) が挙げられる。いくつかの場合、2つ以上の精製技術が、純度の増加を達成するために組み合わせられ得る。

40

【0143】

B7-Lポリペプチドもまた、当該分野で公知の技術を使用して化学合成法 (例えば、固相ペプチド合成) により調製され得、その公知技術は、たとえば、Merrifieldら、1963、J. Am. Chem. Soc. 85:2149; Houghtenら、1985、Proc Natl Acad. Sci. USA 82:5132; ならびにStewartおよびYoung、Solid Phase Peptide Synthesis (Pierce Chemical Co. 1984) に示される技術である。このようなポリペプチドは、アミノ末端にメチオニンを含んで合成され得るし、または含まずに合成され得る。化学合成されたB7-Lポリペプチドは、これらの参考文献に示さ

50

れる方法を使用して、ジスルフィド架橋を形成するように酸化され得る。化学合成された B7-L ポリペプチドは、組換え産生されるかもしくは天然の供給源から精製された対応する B7-L ポリペプチドに匹敵する生物学的活性を有すると予測され、従って、組換え B7-L ポリペプチドもしくは天然の B7-L ポリペプチドと互換可能に使用され得る。

【0144】

B7-L ポリペプチドを得るための別の手段は、その B7-L ポリペプチドが天然で見出される生物学的サンプル（例えば、供給源組織および／または流体）からの精製を介する。このような精製は、上記のようなタンパク質精製のための方法を使用して実行され得る。精製の間の B7-L ポリペプチドの存在は、例えば、組換え産生された B7-L ポリペプチドもしくはそのペプチドフラグメントに対して調製された抗体を使用して、モニター

10

【0145】

核酸およびポリペプチドを産生するためのさらなる多数の方法が、当該分野で公知であり、そしてその方法は、B7-L ポリペプチドに対する特異性を有するポリペプチドを産生するために使用され得る。例えば、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。また、Roberts、1999、Curr. Opin. Chem. Biol. 3:268-73も参照のこと。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方法を記載する。この手順は、各々が5'ランダム配列、所定の中心配列、および3'ランダム配列を有する、オリゴヌクレオチドの不均質プールを産生することを包含する。生じた不均質プールは、所望の生物学的機能を示さない細胞集団に導入される。次いで、この細胞の部分集団が、所定の生物学的機能を示す部分集団についてスクリーニングされる。この部分集団から、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。

20

【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、ペプチドもしく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、確率的 (stochastic) 遺伝子もしくはそのフラグメントを産生すること、次いでこれらの遺伝子を、その確率的遺伝子によりコードされる1つ以上のタンパク質を産生する宿主細胞に導入することによって、なされる。次いで、この宿主細胞は、所望の活性を有するペプチドもしくはポリペプチドを産生するクローンを同定するためにスクリーニングされる。

30

【0147】

ペプチドもしくはポリペプチドを産生するための別の方法は、「Random Activation of Gene Expression for Gene Discovery」(RAGE-GD)として公知である、Athersys, Inc.により出願されたPCT/US98/20094 (WO99/15650)に記載され、このプロセスは、インサイチュ組換え方法による内因性遺伝子発現の活性化もしくは遺伝子の過剰発現を包含する。例えば、内因性遺伝子の発現は、非相同組換えもしくは非正統的 (illegitimate) 組換えによってその遺伝子の発現を活性化し得る標的細胞に調節配列を組み込むことによって、活性化もしくは増加される。標的DNAは、まず、放射線に供され、そして遺伝子プロモーターが挿入される。このプロモーターは、最終的には遺伝子の前の途切れ目に位置し、その遺伝子の転写を開始する。これは、所望のペプチドもしくはポリペプチドの発現を生じる。

40

【0148】

これらの方法がまた、包括的B7-Lポリペプチド発現ライブラリーを生じるために使用され得、このライブラリーが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、および生物全体アッセイ（例えば、植物、マウスなど））における高スループット表現型スクリーニングに使用され得ることが、理解される。

50

【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が、組換え手段および他の手段によって産生され得ることが、当業者によって理解される。

【0150】

(選択的結合因子)

用語「選択的結合因子」は、1つ以上の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、それによって、B7-Lポリペプチドレセプターへのこのポリペプチドの結合を阻害する。 10

【0151】

B7-Lポリペプチドを結合する選択的結合因子（例えば、抗体および抗体フラグメント）は、本発明の範囲内にある。抗体は、ポリクローナル（単一特異的なポリクローナルを含む）抗体；モノクローナル抗体（MAb）；組換え抗体；キメラ抗体；ヒト化抗体（例えば、相補性決定領域（CDR）グラフト化抗体）；ヒト抗体；単鎖抗体；および／または二特異性抗体；ならびにそれらのフラグメント；改変体；または誘導体であり得る。抗体フラグメントは、B7-Lポリペプチドのエピトープに結合する抗体の部分を含む。このようなフラグメントの例としては、全長抗体の酵素的切断によって生成される、Fab 20
フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントが挙げられる。他の結合フラグメントとしては、組換えDNA技術（例えば、抗体可変領域をコードする核酸配列を含む組換えプラスミドの発現）によって生成されるフラグメントが挙げられる。

【0152】

B7-Lポリペプチドに対する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ト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体化することが有用であり得、このキャリアタンパク質は、免疫される種において免疫原性である（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清、アルブミン、ウシサイログロブリンまたはダイズトリプシンインヒビター）。また、凝集因子（例えば、ミョウ 30
バン）も、免疫応答を増強するために使用される。免疫後、動物を採血し、そして血清を、抗B7-L抗体力価についてアッセイする。

【0153】

B7-Lポリペプチドに対するモノクローナル抗体は、培養物中の継代細胞株による抗体分子の産生を提供する、任意の方法を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の適切な方法の例としては、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頁（Marcel Dekker, Inc.、19 40
87）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もまた、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、治療剤としての使用のために改変され得る。1つの実施形態は、「キメラ」抗体であり、ここで、重鎖（H）および／または軽鎖（L）の一部が、特定の種に由来す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における対応する配列と、同一であるかまたは相同であり、鎖の残りの部分は、別の種に由来するかまたは別の抗体のクラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と、同一であるかまたは相同である。このような抗体のフラグメントもまた、それらが、所望の生物学的活性を示す限り、含まれる。米国特許第4,816,567号；Mori 50

son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号および同第5,693,762号を参照のこと。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト供給源由来のそのヒト化抗体に1以上のアミノ酸残基が導入されている。ヒト化は、例えば、齧歯目の相補性決定領域の少なくとも一部を、ヒト抗体の対応する領域で置換することによる、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；Verhoevenら、1988、Science 239:1534-36）によって、行われ得る。 10

【0156】

B7-Lポリペプチドを結合するヒト抗体もまた、本発明に含まれる。このような抗体は、必要に応じてキャリアに結合体化されたB7-Lポリペプチド抗原（すなわち、少なくとも6個連続するアミノ酸を有する）で免疫することによって産生される内因性免疫グロブリン産生の非存在下でヒト抗体のレパートリーを産生し得る、トランスジェニック動物（例えば、マウス）を使用する。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 Immunol. 7:33を参照のこと。1つの方法において、このようなトランスジェニック動物は、免疫グロブリンの重鎖および軽鎖をその中でコードする内因性遺伝子座を不活化し、ヒト重鎖および軽鎖タンパク質をコードする遺伝子座を、そのゲノム内に導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（完全ではない補体の改変を有する）を交雑育種して、所望の免疫系の改変の全てを有する動物を得る。免疫原を投与した場合、これらのトランスジェニック動物は、これらの抗原に免疫特異的な可変領域を含む、（例えば、マウスよりもむしろ）ヒトのアミノ酸配列を有する抗体を産生する。PCT出願番号PCT/US96/05928およびPCT/US93/06926を参照のこと。さらなる方法は、米国特許第5,545,807号、PCT出願番号PCT/US91/245、およびPCT/GB89/01207、ならびに欧州特許第546073B1号および同第546073A1号に記載される。ヒト抗体はまた、本明細書中に記載されるような、宿主細胞における組換えDNAの発現またはハイブリドーマ細胞における発現によって産生され得る。 20 30

【0157】

代替的な実施形態において、ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーにおいて生成され得る（Hoogenboomら、1991、J. Mol. Biol. 227:381；Marksら、1991、J. Mol. Biol. 222:581）。これらのプロセスは、糸状バクテリオファージの表面上での抗体レパートリーのディスプレイ、引き続いて、選択された抗原に対するそれらの結合によるファージの選択によって免疫選択を模倣する。1つのこのような技術は、PCT出願番号PCT/US98/17364（これは、このようなアプローチを用いたMPL-レセプターおよびmsk-レセプターに対する高親和性でかつ機能的アゴニスト抗体の単離を記載する）に記載される。 40

【0158】

キメラ抗体、CDRグラフト化抗体、およびヒト化抗体は、代表的には、組換え方法により生成される。これらの抗体をコードする核酸は、宿主細胞に導入され、そして本明細書中に記載される材料および方法を用いて発現される。好ましい実施形態において、抗体は、哺乳動物宿主細胞（例えば、CHO細胞）において発現される。モノクローナル（例えば、ヒト）抗体は、宿主細胞における組換えDNAの発現によるか、または本明細書中に記載のハイブリドーマ細胞における発現により生成され得る。

【0159】

本発明の抗 B 7-L 抗体は、B 7-L ポリペプチドの検出および定量について、任意の公知のアッセイ方法（例えば、競合結合アッセイ、直接的サンドイッチアッセイおよび間接的サンドイッチアッセイ、ならびに免疫沈降アッセイ（Sola、Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques、147-158（CRC Press, Inc.、1987））において用いられ得る。抗体は、使用されるアッセイ方法に適切な親和性で B 7-L ポリペプチドを結合する。

【0160】

診断適用に関しては、特定の実施形態において、抗 B 7-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生じ得る任意の部分である。例えば、検出可能な部分は、放射性同位体（例えば、³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、¹²⁵I、⁹⁹Tc、¹¹¹In、または⁶⁷Ga）；蛍光化合物もしくは化学発光化合物（例えば、フルオロセインイソチオシアネート、ローダミンもしくはルシフェリン）；または酵素（例えば、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ）（Bayerら、1990、Meth. Enz. 184:138-163）であり得る。

【0161】

競合結合アッセイは、限定された量の抗 B 7-L 抗体との結合について試験サンプル分析物（B 7-L ポリペプチド）と競合する標識された標準物質（例えば、B 7-L ポリペプチドまたはその免疫学的に反応性の部分）の能力に依存する。試験サンプル中の B 7-L ポリペプチドの量は、この抗体に結合する標準物質の量に逆比例する。結合する標準物質の量の測定を容易にするために、この抗体は、代表的には、競合の前または後に不溶化され、その結果、この抗体に結合する標準物質および分析物は、結合しないままの標準物質および分析物から簡単に分離され得る。

【0162】

サンドイッチアッセイは、代表的には、2つの抗体（各々、検出され、そして／または定量されるタンパク質の異なる免疫原性部分（すなわち、エピトープ）に結合し得る）の使用を含む。サンドイッチアッセイにおいて、この試験サンプル分析物は、代表的には、固体支持体に固定化された第1の抗体に結合され、その後第2の抗体がこの分析物に結合し、このようにして不溶性の3部分で構成される複合体を形成する。例えば、米国特許第4,376,110号を参照のこと。第2の抗体は、それ自体検出可能な部分で標識され得るか（直接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た抗免疫グロブリン抗体を用いて測定され得る（間接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アッセイ（ELISA）であり、この場合、この検出可能な部分は酵素である。

【0163】

選択的結合因子（抗 B 7-L 抗体を含む）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された抗体は、動物に（好ましくは、血流に）投与され得、そして宿主における標識化抗体の存在および位置がアッセイされる。この抗体は、動物において（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で）検出可能な任意の部分で標識され得る。

【0164】

本発明の選択的結合因子（抗体を含む）は、治療剤として使用され得る。これらの治療剤は、一般に、それらが B 7-L ポリペプチドの生物学的活性の少なくとも1つを増強または減少するかのいずれかであるという点で、それぞれ、アゴニストまたはアンタゴニストである。1つの実施形態において、本発明のアンタゴニスト抗体は、B 7-L ポリペプチドに特異的に結合し得、そして B 7-L ポリペプチドの機能的活性をインビボまたはインビトロで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、B 7-L ポリペプチドの機能的活性を少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約80%阻害する。別の実施形態において、この選択的結合因子は、B 7-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、それによりインビトロまたはインビボで B 7-L ポリペプチド活性を阻害または排除し得る抗 B 7-L ペプチド抗体であり得る。選択的結合因子（アゴニスト抗 B 7-L ポリペプチド抗体およびアンタゴニスト抗 B 7-L ポリペプチド抗体を含む）は、当該分野で周知のスクリーニングアッセイにより同定される。

【0165】

本発明はまた、B 7-L 選択的結合因子（例えば、抗体）および生物学的サンプルにおいて B 7-L ポリペプチドレベルを検出するに有用な他の試薬を含むキットに関する。このような試薬としては、以下が挙げられ得る：検出可能な標識、ブロッキング血清、陽性コントロールサンプルおよび陰性コントロールサンプル、ならびに検出試薬。

【0166】

10

（マイクロアレイ）

DNA マイクロアレイ技術が、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、核酸の微小の高密度アレイである。このアレイ内の各セルまたはエレメントは、単一核酸種の多くのコピーを有し、この核酸種は、相補的な核酸配列（例えば、mRNA）に対するハイブリダイゼーションのための標的として作用する。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、最初に、mRNA が、細胞または組織サンプルから抽出され、次いで、蛍光標識された cDNA に酵素的に変換される。この材料を、マイクロアレイにハイブリダイズさせ、そして未結合 cDNA を洗浄により除去する。次いで、アレイ上に提示される別々の遺伝子の発現を、各標的核酸分子に特異的に結合された標識 cDNA の量を定量することによって可視化する。このようにして、数千の遺伝子の発現を、生物学的材料の単一のサンプルから、高スループットの並行様式で定量し得る。

20

【0167】

この高スループット発現プロファイリングは、本発明の B 7-L 分子に関する広範な適用を有する。これらの適用としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：治療用標的としての B 7-L 疾患関連遺伝子の同定および確証；関連する B 7-L 分子およびそのインヒビターの分子毒性研究；集団の層別化および臨床試験用の代理マーカーの作製；ならびに高スループットスクリーニングにおける選択的な化合物の同定を補助することによる B 7-L ポリペプチド関連低分子薬物発見の増大。

【0168】

30

（化学的誘導体）

B 7-L ポリペプチドの化学的改変誘導体は、本明細書に記載される開示を与えられると、当業者によって調製され得る。B 7-L ポリペプチド誘導体は、ポリペプチドに天然に結合する分子の型または場所のいずれかが異なる様式で改変される。誘導体は、1 つ以上の天然に結合する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、配列番号 4、配列番号 6、配列番号 8、配列番号 10、配列番号 12、または配列番号 14 のいずれかのアミノ酸配列を含むポリペプチド、または他の B 7-L ポリペプチドは、1 つ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、典型的には、水溶性であり、その結果、結合されるタンパク質は、水性環境（例えば、生理学的環境）において沈殿しない。ポリマーの混合物は、適切なポリマーの範囲内に含まれる。好ましくは、最終生成物の調製物の治療的使用のために、このポリマーは、薬学的に受容可能である。

40

【0169】

ポリマーは、各々、任意の分子量のポリマーであり得、そして分枝しても分枝しなくてもよい。ポリマーは、各々、代表的に、約 2 kDa ～ 約 100 kDa の間の平均分子量を有する（用語「約」とは、水溶性ポリマーの調製物において、ある分子は、示された分子量よりも大きく、ある分子は、示された分子量より小さいことを示す）。各ポリマーの平均分子量は、好ましくは約 5 kDa ～ 約 50 kDa の間、より好ましくは、約 12 kDa ～ 約 40 kDa の間、そして最も好ましくは、約 20 kDa ～ 約 35 kDa の間である。

【0170】

50

適切な水溶性ポリマーまたはそれらの混合物としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：N結合型炭水化物またはO結合型炭水化物、糖類、ホスフェート、炭水化物、糖類、ホスフェート、ポリエチレングリコール（PEG）（モノー（ $C_1 \sim C_{10}$ ）アルコキシまたはアリールオキシポリエチレングリコールを含む、タンパク質を誘導体化するために使用されている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、低分子量（例えば、約6 kD）のデキストラン）、セルロース、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。共有結合的に結合した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。

10

【0171】

一般に、化学誘導体化は、タンパク質を活性化ポリマー分子と反応させるために使用される任意の適切な条件下で行われ得る。ポリペプチドの化学誘導体を調製するための方法は、一般に、以下の工程を包含する：（a）配列番号2、配列番号4、配列番号6、配列番号8、配列番号10、配列番号12、または配列番号14のアミノ酸配列を含むポリペプチドあるいは他のB7-Lポリペプチドが、1つ以上のポリマー分子に結合されるような条件下で、ポリペプチドを、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またはアルデヒド誘導体）と反応させる工程、および（b）反応生成物を得る工程。最適な反応条件は、公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、ポリマー分子対タンパク質の比が大きいほど、結合されるポリマー分子の割合は大きくなる。1つの実施形態において、B7-Lポリペプチド誘導体は、そのアミノ末端で単一の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。

20

【0172】

ポリペプチドのペグ化（pegylation）は、当該分野で公知の任意のペグ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号および同第0401384号；ならびに米国特許第4,179,337号。例えば、ペグ化は、本明細書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。アシル化反応に関して、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べきである。還元的アルキル化に関して、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べきである。反応性アルデヒドは、例えば、水安定性のポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドであるか、またはそれらのモノ $C_1 \sim C_{10}$ アルコキシ誘導体またはモノ $C_1 \sim C_{10}$ 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）。

30

【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結合し得る。次いで、ビオチン／B7-Lポリペプチド分子は、アビジンに結合し得、その結果、四価のアビジン／ビオチン／B7-Lポリペプチド分子を生じる。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）と共有結合し得、その結果、抗DNP-IgMまたは抗TNP-IgMと沈降される結合体が生じて、10の価数を有する十量化結合体を形成する。

40

【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状態としては、B7-Lポリペプチドについて本明細書中に記載される状態が挙げられる。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て、さらなる活性、増強または減少された生物学的活性、または他の特徴（例えば、増加または減少された半減期）を有し得る。

50

【0175】

(遺伝子操作した非ヒト動物)

ネイティブ B7-L ポリペプチドをコードする遺伝子が破壊 (すなわち、「ノックアウト」) されて、その結果、この B7-L ポリペプチドの発現レベルが、有意に減少されているかまたは完全に消失されている、非ヒト動物 (例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物) も、本発明の範囲内にさらに含まれる。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】

本発明はさらに、その動物についてネイティブな形態の B7-L 遺伝子または異種 B7-L 遺伝子のいずれかが、その動物によって過剰発現されている (それによって「トランスジェニック」動物が作製される) 非ヒト動物 (例えば、マウス、ラットまたは他の齧歯目、ウサギ、ヤギまたはヒツジ、あるいは他の家畜動物) を包含する。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 WO 94/28122 に記載のような、周知の方法を使用して調製され得る。 10

【0177】

本発明はさらに、本発明の 1 以上の B7-L ポリペプチドに対するプロモーターが、活性化または不活性化されて (例えば、相同組換え法を使用することによって) 1 以上のネイティブ B7-L ポリペプチドの発現レベルが変更されている非ヒト動物を包含する。

【0178】

これらの非ヒト動物は、薬物候補スクリーニングに使用され得る。このようなスクリーニングにおいて、動物に対する薬物候補の影響が測定され得る。例えば、薬物候補は、B7-L 遺伝子の発現を減少または増加し得る。特定の実施形態において、産生される B7-L ポリペプチドの量は、薬物候補への動物の曝露後に測定され得る。さらに、特定の実施形態において、動物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、遺伝子の発現を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。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) の産生が、疾患または病理学的状態を生じ得るか、またはそれらに関連し得る。このような場合において、このような代謝産物の産生を減少する薬物候補の能力または病理学的状態を防止または阻止する能力を試験し得る。 20 30

【0179】

(B7-L ポリペプチド活性の他のモジュレーターについてのアッセイ)

いくつかの状況において、B7-L ポリペプチドの活性のモジュレーター (すなわち、アゴニストまたはアンタゴニスト) である分子を同定することが所望され得る。B7-L ポリペプチドを調節する天然または合成の分子は、1 つ以上のスクリーニングアッセイ (例えば、本明細書において記載されるようなもの) を用いて同定され得る。そのような分子は、エキソビボ様式もしくは注射によってインビボ様式で、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 (すなわち、増加または減少) させる能力について評価される状態にある分子をいう。最も一般的には、試験分子は、B7-L ポリペプチドと直接相互作用する。しかし、試験分子はまた、例えば、B7-L 遺伝子発現に影響を与えることにより、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り、B7-L ポリペプチド活性を間接的に調節し得ることも意図される。1 つの実施形態において、試験分子は、少なくとも約 10^{-6} M、好ましくは約 10^{-8} M、より好ましくは約 10^{-9} M、そしてさらにより好ましくは約 10^{-10} M の親和性定数で B7-L ポリペプチドに結合する。 40

【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、本発明に包含され 50

る。特定の実施形態において、B 7-L ポリペプチドは、試験分子と、その試験分子の B 7-L ポリペプチドとの相互作用を可能にする条件下で、インキュベートされ、そしてその相互作用の程度が測定される。この試験分子は、実質的に精製された形態で、または粗混合物中でスクリーニングされ得る。

【0182】

特定の実施形態において、B 7-L ポリペプチドのアゴニストまたはアンタゴニストは、B 7-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分子であり得る。B 7-L ポリペプチド発現を調節する分子としては、B 7-L ポリペプチドをコードする核酸に相補的であるか、または B 7-L ポリペプチドの発現を指向もしくは制御する核酸配列に相補的であり、かつ発現のアンチセンスモジュレーターとして作用する核酸が挙げられる。

10

【0183】

一旦、試験分子が、B 7-L ポリペプチドと相互作用すると同定されると、この分子はさらに、B 7-L ポリペプチドの活性を増大または減少させるその能力について評価され得る。B 7-L ポリペプチドと試験分子との相互作用の測定は、いくつかの形式で行われ得、これには、細胞ベースの結合アッセイ、膜結合アッセイ、溶液相アッセイおよび免疫アッセイが含まれる。一般的に、試験分子は、特定の時間にわたって、B 7-L ポリペプチドとインキュベートされ、そして B 7-L ポリペプチド活性は、生物学的活性を測定するための 1 つ以上のアッセイにより決定される。

【0184】

試験分子の B 7-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エピトープタグを含有する B 7-L ポリペプチドの改変形態は、溶液中および免疫アッセイにおいて使用され得る。

20

【0185】

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 B 7-L ポリペプチドが生物学的活性を示す事象において、種々のインビトロアッセイは、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 B 7-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、B 7-L ポリペプチドのその結合パートナーへの結合の速度および／または程度を増加または減少するこ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、B 7-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に固定される。次いで、放射標識された B 7-L ポリペプチド結合パートナー（例えば、ヨウ素化された B 7-L ポリペプチド結合パートナー）、および試験分子は、ウェルに（いずれかの順番で）一つずつか、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、ウェルを洗浄し、そして、B 7-L ポリペプチドに結合した結合パートナーの程度を決定するために、放射能についてシンチレーションカウンターを使用して計数し得る。典型的には、分子は、ある濃度範囲にわたって試験され、そして、試験アッセイの 1 つ以上の要素を欠く一連のコントロールウェルは、これらの結果の評価における正確さのために使用され得る。本方法の代替は、タンパク質の「位置」を反転する工程（すなわち、マイクロタイタープレートのウェルに B 7-L ポリペプチド結合パートナーを固定する工程）、試験分子および放射標識された B 7-L ポリペプチドをインキュベートする工程、ならびに B 7-L ポリペプチド結合の程度を決定する工程を包含する。例えば、Current Protocols in Molecular Biology、第 18 章（Ausubel ら編、Green Publishers Inc. および Wiley and Sons 1995）を参照のこと。

30

40

【0186】

放射標識の代替として、B 7-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は、比色的に（colorometrically）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酵素（

50

例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）またはアルカリホスファターゼ（AP）に連結されたストレプトアビジンを使用して検出され得る。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に対する抗体、およびビオチンに結合体化された抗体もまた、そしてAPまたはHRPと連結され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後の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B7-Lポリペプチド結合パートナーはまた、アガロースビーズ、アクリルビーズまたは他の型のこのような不活性な固相基質への接着によって固定され得る。基質タンパク質複合体は、相補的タンパク質および試験化合物を含む溶液中に配置され得る。インキュベーション後、ビーズは、遠心分離によって沈殿され得、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は、本明細書中に記載される方法を使用して評価され得る。あるいは、基質タンパク質複合体は、カラムに固定され得、そして試験分子および相補的タンパク質は、このカラムを通過する。次いで、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は、本明細書中に記載の技術のいずれか（例えば、放射標識、抗体結合）を使用して評価され得る。

10

【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、例えば、BIACoreアッセイシステム（Pharmacia, Piscataway, NJ）のような表面プラズモン共鳴検出器システムである。BIACoreシステムを、製造業者に特定されるように利用する。このアッセイは、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、検出器中に位置するデキストランコートされたセンサーチップへの共有結合を本質的に含む。次いで、試験化合物および他の相補的タンパク質は、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中に注入され得る。結合する相補的タンパク質の量は、センサーチップのデキストランコートされた側に物理的に結合する分子量における変化に基づいて評価され得、そして分子量における変化は、検出器システムによって測定される。

20

【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。これらの場合において、本明細書中に示されるアッセイは、このようなさらなる試験化合物の添加（第一の試験化合物と同時に、または第一の試験化合物に引き続いてかのいずれか）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、本明細書中に示される。

30

【0190】

本明細書中に記載されるもののようなインビトロアッセイは、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形成に対する影響について、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ライブラリー、合成ペプチドライブラリー、および化学合成ライブラリーにおいて作製される化合物をスクリーニングするために自動化され得る。

40

【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させる化合物はまた、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する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取得され得るが、好ましくは、ヒトもしくは他の霊長類、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への表面での結合は、試験分子の存在または非存在下で評価され、そして結合の程度は、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

50

イにおいてポジティブにスコアリング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、薬物候補の影響をスクリーニングするために使用され得る。例えば、薬物候補は、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、B7-Lポリペプチドまたは生成されるB7-Lポリペプチドフラグメントの量は、細胞培養物を薬物候補に暴露した後に測定され得る。特定の実施形態において、細胞培養物に対する薬物候補の実際の影響を検出し得る。例えば、特定の遺伝子の過剰発現は、細胞培養物に対する特定の影響を有し得る。このような場合において、この遺伝子の発現を増加または減少させる薬物候補の能力、あるいは細胞培養物に対する特定の影響を予防または阻害する薬物候補の能力を試験し得る。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）の産生は、疾患または病理学的状態を生じ得るか、あるいは疾患または病理学的状態に関し得る。このような場合において、細胞培養物中のこのような代謝産物の生成を減少させる薬物候補の能力を試験し得る。

10

【0193】

（タンパク質の内部移行）

tatタンパク質配列（HIV由来）は、細胞にタンパク質を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アミノ酸配列（Y-G-R-K-K-R-R-Q-R-R-R；配列番号16）（「タンパク質形質導入ドメイン」、またはTAT PDTと呼ばれる）は、細胞の細胞質膜および核膜を横切る送達を媒介するとして記載されている。Schwarzeら、1999、Science 285:1569-72；およびNagaharaら、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を貫通する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17）が調製され、そしてこれらの構築物の細胞への結合は、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析によって検出される。tat-β-gal融合タンパク質で処理された細胞は、β-gal活性を示す。注入に続いて、このような構築物は、多くの組織（肝臓組織、腎臓組織、肺組織、心臓組織、および脳組織を含む）において検出され得る。このような構築物の発現は、細胞への侵入のためにある程度のアンフォールディングを受け；そしてそれ自体、細胞への侵入後に再折り畳みを必要とし得ると考えられる。

20

30

【0194】

従って、tatタンパク質配列が所望のポリペプチドを細胞内へ内部移行するために使用され得ることは明白である。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、細胞内へ投与されてB7-L分子の活性を阻害し得る。本明細書中で使用される場合、用語「B7-L分子」は、本明細書中で定義されるような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タンパク質自体はまた、これらの手順を使用して細胞内部に投与され得る。Straus、1999、Science 285:1466-67もまた参照のこと。

40

【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ポリペプチドに関連する特定の細胞型の供給源を決定し得ることは有用であり得る。例えば、適切な治療を選択する際の補助として疾患または病理学的状態の起源を決定することは、有用であり得る。特定の実施形態において、B7-Lポリペプチドをコードする核酸をプローブとして使用して、このようなプローブを用いて細胞の核酸をスクリーニングすることによって、本明細書中に記載される細胞を同定し得る。他の実施形態において、抗B7-Lポリペプチド抗体を使用して、細胞中のB7-Lポリペプチドの存在について試験し得、従って、このような細胞が、本明細

50

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)

治療的組成物は、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、B7-LポリペプチドまたはB7-L核酸分子の治療有効量を、投与形態の適切さのために選択される薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物で含み得る。薬学的組成物は、1つ以上のB7-Lポリペプチド選択的結合因子の治療有効量を、投与形態の適切さのために選択される薬学的または生理学的に受容可能な処方剤との混合物で含み得る。

【0197】

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

【0198】

この薬学的組成物は、例えば、組成物のpH、浸透圧、粘度、透明度、色、等張性、において、無菌性、安定性、溶解もしくは放出の速度、吸着または浸透を改変、維持または保存するための処方材料を含み得る。適切な処方材料としては、以下が挙げられるが、これらに限定されない：アミノ酸（例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、またはリジン）、抗菌剤、抗酸化剤（例えば、アスコルビン酸、亜硫酸ナトリウム、または亜硫酸水素ナトリウム（sodium hydrogen-sulfite））、緩衝剤（例えば、ホウ酸塩、炭酸水素塩、Tris-HCl、クエン酸塩、リン酸塩、または他の有機酸）、バルキング剤（例えば、マンニトールまたはグリシン）、キレート剤（例えば、エチレンジアミン四酢酸（EDTA））、錯化剤（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）、保存剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、安息香酸、サリチル酸、チメロサル、フェネチルアルコール、メチルパラベン、プロピルパラベン、クロルヘキシジン、ソルビン酸、または過酸化水素）、溶媒（例えば、グリセリン、プロピレングリコール、またはポリエチレングリコール）、糖アルコール（例えば、マンニトールまたはソルビトール）、懸濁剤、界面活性剤または湿潤剤（例えば、プルロニック（pluronic）；PEG；ソルビタンエステル；ポリソルベート（例えば、polysorbate 20またはpolysorbate 80）；トリトン；トロメタミン；レシチン；コレステロールまたはチロキサポール（tyloxapal））、安定性増強剤（例えば、スクロースまたはソルビトール）、張度増強剤（例えば、ハロゲン化アルカリ金属（好ましくは塩化ナトリウムまたは塩化カリウム）、またはマンニトール、ソルビトール）、送達ビヒクル、希釈剤、賦形剤および／または薬学的なアジュバント。Remington's Pharmaceutical Sciences（第18版、A. R. Gennaro、編、Mack Publishing Company 1990）を参照のこと。

【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】

薬学的組成物における主要なビヒクルまたはキャリアは、本来水性または非水性のいずれかであり得る。例えば、注入のための適切なビヒクルまたはキャリアは、水、生理食塩水溶液、または人工脳脊髄液であり得、おそらく非経口投与のための組成物において一般的

10

20

30

40

50

な他の材料で補充され得る。中性の緩衝化生理食塩水または血清アルブミンと混合された生理食塩水は、さらなる例示的なビヒクルである。他の例示的な薬学的組成物は、約 pH 7.0 ~ 8.5 の Tris 緩衝液または約 pH 4.0 ~ 5.5 の酢酸塩緩衝液を含み、これはさらに、ソルビトールまたは適切な置換物を含み得る。本発明の 1 つの実施形態において、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、最適な処方剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences、前出) と混合することによって、凍結乾燥ケーキまたは水溶液の形態で、保存のために調製され得る。さらに、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】

10

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、経口的) 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、当該分野の技術内である。

【0202】

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

【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的組成物は、薬学的に受容可能なビヒクル中に所望の 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、ここで、B7-L 分子が、滅菌の等張溶液として処方され、適切に保存される。なお別の調製物は、所望の分子と、薬剤 (例えば、注入可能なミクロスフィア、生体侵食 (bio-erodible) 粒子、ポリマー化合物 (例えば、ポリ乳酸またはポリグリコール酸)、ビーズまたはリポソーム) との処方物を含み、これは、次いで蓄積注射を介して送達され得る産物の制御放出または持続放出を提供する。ヒアルロン酸もまた、使用され得、そしてこれは、循環において、維持された持続時間を助長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としては、移植可能な薬物送達デバイスが挙げられる。

20

【0204】

30

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、PCT 公開番号 WO 94/20069 にさらに記載され、これは化学的に改変されたタンパク質の肺送達を記載する。

【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 ポリペプチドは、固体投薬形態 (例えば、錠剤およびカプセル) の調合において慣用的に使用されるキャリアを用いてか、または用いずに処方され得る。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、そして全身前分解が最小化される場合、胃腸管内の点で処方物の活性部分を放出するように設計され得る。さらなる薬剤が、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、および結合因子もまた、使用され得る。

40

【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させることによって、溶液が、単位用量形態で調製され得る。適切な賦形剤としては以下が挙げられるが、これらに限定されない：不活性な希釈剤 (例えば、炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム

50

または炭酸水素ナトリウム、ラクトース、あるいはリン酸カルシウム) ; または結合因子 (例えば、デンプン、ゼラチンまたはアカシア) ; 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、持続送達処方物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が挙げられる。種々の他の持続送達手段または制御送達手段 (例えば、リポソームキャリア、生体侵食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もまた、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。

10

【0208】

徐放性調製物のさらなる例としては、成形された物品の形態 (例えば、フィルム、またはマイクロカプセル) の半透過性ポリマーマトリックスが挙げられる。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 0 584 81 号)、L-グルタミン酸と γ エチルー L-グルタメートとのコポリマー (Sidman ら, 1983, Biopolymers 22: 547-56)、ポリ (2-ヒドロキシエチルーメタクリレート) (Langer ら, 1981, J. Biomed. Mater. Res. 15: 167-277 および Langer, 1982, Chem. Tech. 12: 98-105)、エチレンビニルアセテート (Langer ら, 前出) またはポリ-D (-)-3-ヒドロキシ酪酸 (欧州特許第 1 339 88 号) が挙げられる。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 0 366 76 号、同第 0 880 46 号、および同第 1 439 49 号を参照のこと。

20

【0209】

インビボ投与のために使用される B7-L の薬学的組成物は、代表的に滅菌でなければならない。このことは、滅菌濾過膜を介する濾過によって達成され得る。組成物が凍結乾燥される場合、この方法を使用する滅菌は、凍結乾燥および再構成の前、またはその後のいずれかに実施され得る。非経口投与のための組成物は、凍結乾燥された形態または溶液中で保存され得る。さらに、非経口組成物は、一般に、滅菌アクセスポートを有する容器 (例えば、静脈内溶液バッグまたは皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有するバイアル) 内に配置される。

30

【0210】

一旦、薬学的組成物が処方されると、それは、滅菌バイアル中に溶液、懸濁液、ゲル、エマルジョン、固体、または脱水粉末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、すぐに使用できる形態または投与の前に再構成を必要とする形態 (凍結乾燥された形態) 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生成するためのキットに関する。このキットは、各々、乾燥タンパク質を有する第一の容器および水性処方物を有する第二の容器の両方を含み得る。また、本発明の範囲内には、単一および多チャンバーの予め充填されたシリンジ (例えば、液体シリンジおよび分散シリンジ (lysyringe)) を含むキットが含まれる。

40

【0212】

治療的に使用される B7-L の薬学的組成物の有効量は、例えば、治療の内容および目的に依存する。従って、当業者は、処置のための適切な投薬レベルが、送達される分子、B7-L 分子が使用されている適応、投与の経路、および患者のサイズ (体重、体表面、または器官の大きさ) および状態 (年齢および一般的な健康) 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

50

し (t i t e r)、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 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ 以上までの範囲であり得る。他の実施形態において、投薬量は、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ まで；または $5 \mu\text{g}/\text{kg}$ ~ 約 $100 \text{mg}/\text{kg}$ までの範囲であり得る。

【0213】

投薬の頻度は、使用される処方物中での B7-L 分子の薬物動態学的パラメータに依存する。典型的に、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。従って、組成物は、ある時間にわたって単一用量として、2 以上の用量（これは、同量の所望の分子を含んでも、含まなくてもよい）として、あるいは移植デバイスまたはカテーテルを介する連続的な注入として、投与され得る。適切な投薬量のさらなる改良は、当業者によって慣用的になされ、そして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介して確認され得る。

10

【0214】

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

【0215】

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

20

【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、患者から取り出された細胞、組織、または器官は、B7-L ポリペプチドの薬学的組成物に曝露され、その後これらの細胞、組織、または器官が引き続いて患者に移植して戻される。

30

【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、B7-L ポリペプチドを発現および分泌するように遺伝的に操作された特定の細胞を移植することによって送達され得る。このような細胞は、動物細胞またはヒト細胞であり得、そして自己、異種、または外因性の細胞であり得る。必要に応じて、これらの細胞は、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、これらの細胞は、周囲の組織の浸潤を回避するために、カプセル化され得る。カプセル化材料は、典型的に、生体適合性の半浸透性ポリマー性包囲物または膜であり、これらは、タンパク質産物の放出を可能にするが、患者の免疫系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。

40

【0218】

本明細書中において議論されるように、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には、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、治療的ポリペプチドのインビトロ産生ならびに遺伝子治療または細胞治療による治療的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

50

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、もともとは、遺伝子を標的化して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。基本的な技術が、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Capecci, 1987, Cell 51:503-12; Doetschmanら、1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 85:8583-87)、または欠損遺伝子内の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。 10

【0221】

相同組換えによって、ゲノムに挿入されるべきDNA配列は、それを標的化DNAに付着させることによって、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対して相補的な標的化DNAの小さな断片は、DNA複製プロセスの間に、親鎖と接触される。これは、細胞に挿入されてハイブリダイズしたDNAの一般的な特性であり、そして従って、共有される相同領域を介して、内因性DNAの他の断片と組み換わる。この相補鎖が、変異または異なる配列またはさらなるヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドに付着される場合には、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。校正機能の結果として、DNAの新たな配列がテンプレートとして働くことが可能である。従って、移入されたDNAは、ゲノムに組み込まれる。 20

【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、標的化DNAのこれらの断片に付着する。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の近位に、このDNAの転写に影響を与えるに十分な配向で、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の部分を制御する。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、むしろ、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の領域を含む)の使用によって、達成され得る。 30

【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、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、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、変更される。これらの構成成分は、新たな転写単位の生成を実際に生じるような様式で、染色体(ゲノム)DNAに導入される(ここで、この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する)。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。 40

【0224】

本明細書中で記載されるように、変化された遺伝子発現は、得られたままの細胞において通常はサイレントな(発現されていない)遺伝子を活性化させること(または発現させること)、ならびに得られたままの細胞において生理学的に有意なレベルでは発現されない 50

遺伝子の発現を増加させることを包含する。この実施形態はさらに、調節または誘導のパターンを変化させる工程を包含し、その結果、これは、得られたままの細胞において生じる調節または誘導のパターンとは異なり、そして得られたままの細胞において発現される遺伝子の発現を減少（排除を含む）させる。

【0225】

細胞の内在性 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: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）を、細胞の内在性ゲノム B7-L ポリペプチドコード領域の上流（すなわち、5'）に配置する工程を包含する。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対して相同な組換え部位を含むプラスミドは、適切なり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、プラスミドを、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み込み得る（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知られている任意の隣接配列（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、細胞の内在性 B7-L 遺伝子からの新たなまたは増加した 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単位を作製するような様式で組み込む。

【0226】

部位特異的組換え配列が細胞の内在性ゲノム 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ためのさらなる方法は、細胞株のゲノムの他の場所に第 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。適切なりコンビナーゼ酵素は、次いで、二組換え部位細胞株に導入され、組換え事象（欠失、転化、および転移）を生じ（Sauer, 1994, Curr. Opin. Biotechnol., 5: 521-27; Sauer, 1993, Methods Enzymol., 225: 890-900）、これは、細胞の内在性 B7-L 遺伝子からの新規なまたは増加した B7-L ポリペプチド産生を生じる、新しいかまたは改変された転写単位を作製する。

【0227】

細胞の内在性 B7-L 遺伝子からの B7-L ポリペプチドの発現を増加するかまたは引き起こすためのさらなるアプローチは、細胞の内在性 B7-L 遺伝子からの新たなまたは増加した B7-L ポリペプチドの産生を生じる様式で、遺伝子（例えば、転写因子）の発現を増加するかまたは引き起こし、そして／または遺伝子（例えば、転写リプレッサー）の発現を減少させる工程を包含する。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）を、細胞の内在性 B7-L 遺伝子からの新たなまたは増加した B7-L ポリペプチドの産生が起こるように、細胞に導入する工程を包含する。

【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み込みを指向し、その結果、これらのエレメント（b）～（d）は、内在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、この DNA 構築物は、以下を含む：（a）1 つ以上の標的化配列、（b）調節配列、（c）エキソン、（d）スプライスドナー部位、（e）イントロン、および（f）スプライスアクセプター部位。ここで、この標的化配列は、エレメント（a）～（f）の組み込みを指向し、その結果、これらのエレ

10

20

30

40

50

ント (b) ~ (f) は、内在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、制御配列の 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対して相補的な DNA の部分は、合成され得るか、またはそうでなければ、例えば、目的の領域に結合している特定の認識部位におけるネイティブの DNA の適切な制限によって得られ得る。この部分は、細胞に挿入される際に、標的化配列として働き、そしてそのゲノム内の相同性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 の部分、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。

10

【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）もまた意図される。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強する遺伝子で形質転換することによって増強された、組換え細胞であり得る。このような改変は、遺伝子を送達し、かつ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ている患者における、異種のポリペプチドの投与によって生じ得るような、強力な免疫学的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、ヒト起源でありかつヒト 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。

20

【0231】

移植された細胞は、周辺組織の浸透を回避するようにカプセル化され得る。ヒト細胞または非ヒト動物細胞は、生体適合性の半透性ポリマー封入物または膜（これらは、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）で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、このようなカプセル化なしで、患者に直接移植され得る。

30

【0232】

生きた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 WO 95/05452 および PCT/US 94/09299）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、そして容易に取り出し可能である。このカプセルは、哺乳動物宿主に移植される際に、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、生きた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。生きた細胞をカプセル化するための系は、PCT 公開 WO 91/10425 (Aebischer ら) に記載される。PCT 公開 WO 91/10470 (Aebischer ら)；Winn ら、1991, Exper. Neurol. 113:322-29；

40

50

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、構成的または誘導性プロモーターに作動可能に連結されて「遺伝子治療DNA構築物」を形成し得る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）を使用することである。このプロモーターは、内在性B7-L遺伝子に対して同種または異種であり得るが、ただし、これは、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。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るDNA分子（例えば、相同組換えのために有用な内在性配列）、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、親細胞を超える選択的利点を提供し得るDNA分子、形質転換された細胞を同定するための標識として有用なDNA分子、ネガティブ選択系、細胞特異的結合因子（例えば、細胞標的化のための）、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み得る。 10

【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のいずれかで）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つの方法は、本明細書中に記載されるようなウイルスベクターによる。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、細胞質に残る。 20

【0235】

なお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含まれ得る。このようなエレメントは、適切なエフェクターに応答して変化する。このようにして、治療的ポリペプチドは、所望の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化タンパク質）を二量体化する低分子二量体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）。タンパク質の二量体化は、導入遺伝子の転写を開始するために使用され得る。 30

【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の内側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、そして細胞の内側で不活性である。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分解し、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。 40

【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系が挙げられるが、これらに限定されない。ミフェプリストン（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つの転写因子の二量体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 50

、ならびにPCT公開WO 96/40911およびWO 97/10337に記載される。

【0238】

なお別の制御系は、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移し、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号ならびにPCT公開WO 97/38117、WO 96/37609、およびWO 93/03162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活性化因子を使用する。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リプレッサータンパク質DNA結合ドメイン（逆テトラサイクリン調節トランス活性化因子タンパク質を生じる、変異tetR-4アミノ酸の変化、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、Innovir Laboratories Inc.への米国特許第5,741,679号および同第5,834,186号に記載されている。

【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核酸分子の局所的注射を介してかまたは他の適切なウイルス送達ベクターもしくは非ウイルス送達ベクターによって、細胞に導入することにより達成され得る。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、標的化された細胞への送達のために、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターに含まれ得る（例えば、Johnson, PCT公開番号WO 95/34670；およびPCT出願番号PCT/US 95/07178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およびポリアデニル化配列に作動可能に連結されたB7-LポリペプチドをコードするDNA配列に隣接する、AAV逆方向末端反復を含む。

【0242】

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

【0243】

非ウイルス送達方法としては、リポソーム媒介移入、裸のDNA送達（直接注入）、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としてはまた、誘導性プロモーター、組織特

10

20

30

40

50

異的エンハンサープロモーター、部位特異的組み込みのために設計されたDNA配列、親細胞より優れた選択的利点を提供し得るDNA配列、形質転換された細胞を同定するための標識、ネガティブ選択系および発現制御系（安全性の尺度）、細胞特異的結合因子（細胞標的化のため）、細胞特異的インターナリゼーション因子、およびベクターによる発現を増強するための転写因子、ならびにベクター作製の方法が挙げられ得る。遺伝子治療技術の実施のための、このようなさらなる方法および材料は、米国特許第4,970,154号（エレクトロポレーション技術を含む）、米国特許第5,679,559号（遺伝子送達のためのリポタンパク質含有系を記載する）、米国特許第5,676,954号（リポソームキャリアを含む）、米国特許第5,593,875号（リン酸カルシウムトランスフェクションのための方法を記載する）、米国特許第4,945,050号（生物学的に活性な粒子が、細胞において、この粒子がこの細胞の表面を貫通しそしてこの細胞の内側に取り込まれる速度で推進されるプロセス、を記載する）、およびPCT公開番号WO96/40958（核リガンドを含む）に記載されている。

【0244】

B7-L遺伝子治療または細胞治療が、同じまたは異なる細胞における1つ以上のさらなるポリペプチドの送達をさらに含み得ることがまた意図される。このような細胞は、患者に別々に導入され得るか、またはこれらの細胞は、単一の移植可能なデバイス（例えば、上記のカプセル化膜）内に含まれ得るか、または細胞は、ウイルスベクターによって別々に改変され得る。

【0245】

遺伝子治療を介して細胞における内因性B7-Lポリペプチド発現を増加させるための手段は、1つ以上のエンハンサーエレメントをB7-Lポリペプチドプロモーターに挿入することであり、ここで、このエンハンサーエレメントは、B7-L遺伝子の転写活性を増加させるよう作用し得る。使用されるエンハンサーエレメントは、遺伝子を活性化することが所望される組織に基づいて選択される；この組織においてプロモーター活性化を与えることが公知であるエンハンサーエレメントが、選択される。例えば、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「オンにされる」場合には、Ickプロモーターエンハンサーエレメントが使用され得る。ここで、付加される転写エレメントの機能性部分は、標準的なクローニング技術を使用して、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、ベクターおよび／または5'および／または3'隣接配列に挿入され得る）。次いで、この構築物（「相同組換え構築物」として公知）が、エキソビボでかまたはインビボでのいずれかで、所望の細胞に導入され得る。

【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、代表的に、相同組換え法を介して達成される。例えば、不活化について選択された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片を除去および／または置換するように、操作され得る。例えば、プロモーターの転写アクチベーターのTATAボックスおよび／または結合部位が、標準的な分子生物学の技術を使用して、欠失され得る；このような欠失は、プロモーター活性を阻害し得、これによって、対応するB7-L遺伝子の転写を抑制する。プロモーターにおけるTATAボックスまたは転写アクチベーター結合部位の欠失は、（調節されるB7-L遺伝子と同じ種かまたは関連する種由来の）B7-Lポリペプチドプロモーターの全てまたは関連する部分を含むDNA構築物を生成することによって達成され得、ここで、1つ以上のTATAボックスおよび／または転写アクチベーター結合部位のヌクレオチドが、1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失および／または挿入を介して変異される。その結果、TATAボックスおよび／またはアクチベーター結合部位は、活性が減少されているか、または完全に不活性にされている。この構築物はまた、代表的に、その改変されたプロモーターセグメントに隣接するネイティブな（内因性の）5'および3'DNA配列に対応する、少なくとも

約500塩基のDNAを含む。この構築物は、直接的にかまたは本明細書中に記載されるようなウイルスベクターを介して、適切な細胞に（エキソビボでかまたはインビボでかのいずれかで）導入され得る。代表的に、細胞のゲノムDNAへのこの構築物の組み込みは、相同組換えを介し、ここで、このプロモーター構築物における5'および3'DNA配列は、ハイブリダイゼーションを介するその内因性染色体DNAへの改変されたプロモーター領域の組み込みを補助するよう作用し得る。

【0247】

（治療的使用）

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、本明細書中に引用される疾患、障害または状態を含む、多くの疾患、障害または状態を処置、診断、改善または予防するために使用され得る。 10

【0248】

B7-Lポリペプチドアゴニストおよびアンタゴニストとしては、B7-Lポリペプチド活性を調節し、そして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、アゴニスト分子およびアンタゴニスト分子が挙げられる。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、それによってそのB7-Lの活性を調節する、補因子（例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、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としては、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が挙げられ、これらの形態は、B7-Lタンパク質の細胞外ドメインの全てまたは一部を含む。B7-Lポリペプチド発現を調節する分子としては、代表的に、発現のアンチセンス調節因子として作用し得る、B7-Lポリペプチドをコードする核酸が挙げられる。 20

【0249】

本発明のB7-Lポリペプチド（B7-L₁；配列番号14）を発現するトランスジェニックマウスは、精嚢同形成を示した。従って、本発明のB7-L核酸、ポリペプチド、ならびにそ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性障害の処置において有用であり得る。

【0250】

例えば、延長または増大したT細胞の活性化を生じる抗体、細胞外ドメインを含む可溶性タンパク質、およびB7-Lポリペプチド発現の他のレギュレーターは、腫瘍に対する免疫応答を増大するために有用であり得る。B7-Lポリペプチドは、B7-Lポリペプチドを過剰発現するトランスジェニックマウスにおける精嚢の過形成の観察に基づいて、癌細胞の増殖および維持における役割を果たし得る。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ついて有用であり得る。このような癌の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：精嚢癌、肺癌、脳癌、乳癌、造血系の癌、前立腺癌、卵巣癌、および精巣癌。他の癌は、本発明の範囲内に含まれる。 30

【0251】

本発明のB7-Lポリペプチド遺伝子を使用する遺伝子治療は、癌の免疫療法処置において有用であり得る。癌細胞に導入される場合、B7-Lポリペプチド遺伝子は、動物に導入して戻される場合に免疫系のT細胞によって認識され得る抗原提示細胞へと、これらの細胞を形質転換し得る。この形質転換された腫瘍細胞の、T細胞による認識は、B7-L発現腫瘍細胞およびB7-Lポリペプチドを発現しない腫瘍細胞の両方の根絶を生じ得る。この免疫療法アプローチは、種々の白血病、肉腫、黒色腫、腺癌、乳癌、前立腺腫瘍、肺癌、結腸癌、または他の腫瘍の処置に有用であり得る。本発明は、種々の腫瘍への応答においてT細胞活性化を増大する様式と同様の様式で、B7-Lポリペプチド遺伝子を使用することを含む。 40

【0252】

B7-Lポリペプチド経路はまた、多くの他の臨床設定（同種移植、対宿主性移植片病、T細胞依存性B細胞媒介疾患、および自己免疫疾患を含む）における細胞傷害性Tーリン 50

パ球（CTL）応答を調節するために操作され得る。

【0253】

対宿主性移植片病—「人工的な」免疫障害—は、例えば、B7-Lポリペプチドアンタゴニストを使用する抗体産生の阻害から恩恵を受ける。本発明のB7-L分子はまた、慢性免疫細胞機能障害に関連する疾患に関連する症状を緩和するため、または自己免疫疾患（例えば、全身性エリテマトーデス、慢性間接リウマチ、多発性硬化症、糖尿病、免疫性血小板減少性紫斑病（ITP）、および乾癬）を処置するために使用され得る。さらに、慢性炎症性疾患（例えば、炎症性腸疾患（クローン病および潰瘍性大腸炎）、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、および真性糖尿病もまた、本発明のB7-L分子を使用して処置され得る。B7-Lポリペプチドのアンタゴニストはまた、輸血に起因するトキシックショック症候群またはアロ感作を緩和するために有用であり得る。 10

【0254】

本発明のB7-L分子は、骨髄移植および器官移植についての免疫抑制剤として、または移植編の生存を延長するために有用であり得る。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。骨髄移植および器官移植の治療は、宿主による外来の細胞または組織のT細胞媒介拒絶について対処しなければならない。T細胞媒介拒絶を阻害するための本治療レジメンは、薬物（シクロスポリンまたはFK506）での処置を含む。このような薬物は効果的であるが、患者は、重篤な副作用（肝毒性、腎毒性、神経毒性を含む）を受け得る。シクロスポリン／FK506クラスの治療の標的は、カルシニユリン、偏在性発現を有するホスファターゼである。B7-Lポリペプチドまたはタンパク質のインヒビターは、本免疫療法剤が使用される場合に、観察される重篤な副作用が少なくあり得る。 20

【0255】

B7-Lポリペプチドは、B7-Lポリペプチドを過剰発現するトランスジェニックマウスにおける精囊の過形成の観察に基づいて、細胞の不適切な増殖における役割を果たし得る。従って、本発明のB7-L分子は、異常な細胞増殖に関連する疾患の診断または処置について有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：動脈硬化および脈管再狭窄。細胞の不適切な増殖によって影響される他の疾患は、本発明の範囲内に含まれる。

【0256】

B7-Lポリペプチドは、B7-Lポリペプチドを過剰発現するトランスジェニックマウスにおける精囊の過形成の観察に基づいて、生殖系における役割を果たし得る。従って、本発明のB7-L分子は、生殖障害の診断または処置について有用であり得る。このような疾患の例としては、以下が挙げられるがこれらに限定されない：不妊症、流産、早期分娩および早期産、ならびに子宮内膜症。他の生殖系疾患は、本発明の範囲内に含まれる。 30

【0257】

効果的かつ特異的な抗体応答を誘発することによって、多くのワクチンが作用する。いくつかのワクチン（特に、腸の微生物（例えば、A型肝炎ウイルスおよびSalmonella）に対するワクチン）は、短期的な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貢献し得る。 40

【0258】

抗ウイルス応答はまた、B7-Lポリペプチド経路のアクチベーターまたはアゴニストによって増大され得る。B7-LポリペプチドまたはB7-Lポリペプチド／Fc融合物による細胞の免疫機能の増大はまた、ウイルスに感染した細胞を除去する際に有利であり得る。相補的様式において、B7-LポリペプチドまたはB7-Lポリペプチド／Fc融合物はまた、抗体媒介応答を増大することによって、体液性免疫機能に対する影響を有し得、そしてこれは身体からの遊離ウイルスの清浄化を助けるように機能する。

【0259】

さらに、抗体産生の阻害によって改善される多くの臨床条件がある。過敏症は、拡大した 50

かまたは不適切な、通常は有利な免疫応答であり、そしてこれは炎症性反応および組織損傷を導く。抗体媒介される過敏性反応は、B 7-L ポリペプチド活性のインヒビターによるアンタゴニスト作用に対して特に感受性であり得る。アレルギー、枯草熱、ぜん息、および急性浮腫は、過敏性型反応を引き起こし、そしてこれらの反応は、B 7-L ポリペプチド活性のタンパク質インヒビター、抗体インヒビター、または低分子インヒビターによって抑制され得る。

【0260】

抗体媒介過敏性反応を引き起こす疾患（全身性エリテマトーデス、関節炎（例えば、慢性間接リウマチ、反応性関節炎、および乾癬性関節炎）、腎症（例えば、糸球体腎炎、膜様（membranous）、膜性増殖性（mesangiocapillary）、巣状分節状（focal segmental）、巣状壊死性（focal necrotizing）、半月形、および増殖性管状疾患（tubulopathies））、皮膚障害（例えば、天疱瘡および類天疱瘡、結節性紅斑）、内分泌障害（例えば、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、および真性糖尿病）、種々の肺疾患（pneumopathies）（特に、外因性肺炎）、種々の血管症、IgAの異常な産生を伴う腔（coeliac）疾患、多くの貧血および血小板減少、ギラン-バレー症候群、ならびに重症筋無力症が挙げられる）は、B 7-L ポリペプチドアンタゴニストを用いて処置され得る。

10

【0261】

さらに、リンパ増殖障害（例えば、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、およびクリオグロブリン血症）は、B 7-L ポリペプチド活性のタンパク質アンタゴニスト、抗体アンタゴニスト、または低分子アンタゴニストによって阻害され得る。

20

【0262】

B 7-L 核酸、ポリペプチド、アゴニストおよびアンタゴニストは、処置される徴候に適切である場合、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使用され得る。

【0263】

B 7-L ポリペプチドまたは B 7-L ポリペプチドレセプターの望ましくないレベルによって引き起こされるかまたはこれらによって媒介される他の疾患または障害は、本発明の範囲内に含まれる。望ましくないレベルは、B 7-L ポリペプチドの過剰なレベルおよび B 7-L ポリペプチドの正常以下のレベルを含む。

30

【0264】

（B 7-L 核酸および B 7-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、B 7-L 遺伝子および関連する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。

【0265】

B 7-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 B 7-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。

40

【0266】

他の方法はまた、1つ以上の B 7-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 B 7-L mRNA に相補的でありかつこれら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 分子または RNA 分子（これらは、B 7-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）が、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 B 7-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 B 7-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

50

、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、妨げられるかまたは減少される。アンチセンスインヒビターは、細胞または生物体における B7-L ポリペプチドの減少または非存在に関連する情報を提供する。

【0267】

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方法または非ウイルス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、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。

10

【0268】

さらに、B7-L ポリペプチドは、生物学的に活性であっても活性でなくても、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、抗体が惹起され得る、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な）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。これらの抗体もまた、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、処置または診断するために使用され得る。これらの抗体は、B7-L ポリペプチドの少なくとも1つの活性特徴を減少またはブロックするように 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）。

20

【0269】

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ニングするために使用され得る。放射性標識（¹²⁵ヨウ素）した B7-L ポリペプチドまたはアフィニティ／活性ータグ化 B7-L ポリペプチド（例えば、Fc 融合体またはアルカリホスファターゼ融合体）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、細胞株または組織を同定し得る。このような細胞または組織から単離された RNA を、cDNA に変換し、哺乳動物発現ベクターにクローニングし、そして哺乳動物細胞（例えば、COS または 293 細胞）にトランスフェクトして発現ライブラリーを作製し得る。次いで、放射性標識化またはタグ化 B7-L ポリペプチドを、アフィニティリガンドとして使用して、B7-L ポリペプチドレセプターを表面に発現する、このライブラリー中の細胞のサブセットを同定および単離し得る。次いで、DNA を、これらの細胞から単離しそして哺乳動物細胞にトランスフェクトして、二次発現ライブラリー（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む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なアゴニストおよびアンタゴニストを同定または開発するために有用である。このようなアゴニストおよびアンタゴニストとしては、可溶性の 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、これらは、本明細書中に記載される1つ以上の疾患または障害を、処置、予防、または診断するために使用され得る。

30

40

【0270】

本発明のマウスおよびヒトの B7-L 核酸はまた、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ツールである。例えば、B7-L 配列を含むマウス染色体 DNA は、ノックアウトマウスを構築するために使用され得、これによって B7-L ポリペプチドについてのインビボでの役割の試験が可能になる。ヒト B7-L ゲノム DNA は、遺伝的組織変性疾患を同定するために使用され得る。

50

【0271】

以下の実施例は、例示目的のみが意図され、そしていかようにも本発明の範囲を限定するようには解釈されるべきではない。

【0272】

(実施例1：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試験する。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する。このプローブを、標準的な技術を使用して³²P-dCTPで標識する。

【0273】

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×デンハート溶液、0.5% SDS、および100mg/mlの変性サケ精子DNA) 中、42℃で2時間プレハイブリダイズし、次いで5ng/mlの標識されたプローブを含む新鮮な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する。ハイブリダイゼーション後、濾過物を、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曝露する。

10

【0274】

B7-L mRNAの発現を、インサイチュハイブリダイゼーションによって局在化する。正常の胚および成体マウスの組織パネルを、4%パラホルムアルデヒド中に固定し、パラフィン中に包埋し、そして5μmで切り出す。切り出した組織を、0.2MのHCl中に透過させ、プロテイナーゼKで消化し、そしてトリエタノールアミンおよび無水酢酸を用いてアセチル化する。切片を、ハイブリダイゼーション溶液 (300mM NaCl、20mM Tris-HCl、pH 8.0、5mM EDTA、1×デンハート溶液、0.2% SDS、10mM DTT、0.25mg/ml tRNA、25μg/ml ポリA、25μg/ml ポリCおよび50%ホルムアルデヒド) 中、60℃で1時間プレハイブリダイズし、次いで、10%デキストランおよびヒトB7-L遺伝子に相補的な 2×10^4 cpm/μlの³²P-標識されたアンチセンスリボプローブを含む同じ溶液中、60℃で一晩ハイブリダイズする。このリボプローブを、標準的な技術を使用して、ヒトB7-L cDNA配列を含むクロンのインビトロ転写によって得る。

20

30

【0275】

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、RNase Aで処理してハイブリダイズしていないプローブを消化し、次いで0.1×SSC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 (矢状断面1つおよび冠状断面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、精囊および輸精管)、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かつ標準のイルミネーションによって同時に分析する。

40

【0276】

(実施例2：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、そして標準的な組み換え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

50

遺伝子を含む pAMG21 (ATCC 番号 98113) のような代表的ベクターを、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。

【0277】

形質転換した宿主細胞を、導入前に、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ カナマイシンを含有する $2 \times \text{YT}$ 培地中で 30°C でインキュベートする。最終濃度 $30 \text{ ng}/\text{mL}$ への N- (3-オキソヘキサノイル) -D-ホモセリンラク톤の添加、それに続く 30°C かまたは 37°C 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。

10

【0278】

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 $195,000 \times g$ での 5~10 分間の遠心分離によってペレット化する。この上清を廃棄し、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、 5 mL の Percoll 溶液 (75% 液体 Percoll および 0.15 M NaCl) 中にホモジナイズし、次いで希釈して $21,600 \times g$ で 30 分間遠心分離する。封入体を含む勾配画分を回収してプールする。単離した封入体を SDS-PAGE によって分析する。

20

【0279】

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 Matsuda ら、1987, J. Biol. Chem. 262:10~35 に記載のように決定する。

【0280】

(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例示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、そしてリポフェクションによって 293-EBNA 細胞中に導入する。トランスフェクトした細胞を、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 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させる。次いで、この細胞を無血清培地中で 72 時間培養する。馴化培地を取り出し、B7-L ポリペプチド発現を SDS-PAGE によって分析する。

30

40

【0281】

B7-L ポリペプチド発現は、銀染色によって検出され得る。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。

【0282】

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。

50

【0283】

(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)

リポフェクショ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。

【0284】

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クローンのプールから大量の馴化培地を生成する。この細胞を500 cm 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。

10

【0285】

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0.2 μm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した。このカラムをA₂₈₀の吸収がベースラインに達するまでPBSで洗浄する。0.1M グリシン-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。

【0286】

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 CaCl₂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。

20

【0287】

(実施例3：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。

30

【0288】

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、200 μg/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。

40

【0289】

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。

【0290】

(実施例4：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

50

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する情報を与える病理的变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。

【0291】

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。そしてこの配列は、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。

10

【0292】

連結後、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、薬物耐性で選択する。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、適切なインサートの存在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む直線フラグメントを、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 (pH 7.4) および0.2mM EDTA中で、2mg/mLの濃度で、再懸濁する。

20

【0293】

BDF1×BDF1交配マウス由来の単一細胞胚を、記載(PCT公開番号WO97/23614)のように注射する。胚を、CO₂インキュベーター中で一晚培養し、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着床から得た子孫を、以下のように、ゲノムDNAサンプル中に取り込まれた導入遺伝子のPCR増幅でスクリーニングする。耳切片を20mLの耳緩衝液(20mM Tris, pH 8.0, 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。

30

【0294】

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、SuperScriptTM Preamplification System (Gibco-BRL)を用いてcDNAに変換する。適切なプライマー(発現ベクター中のB7-Lポリペプチド導入遺伝子の3'側に位置する)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、pH 8.3、50mM KCl、2.5mM MgCl₂、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。

40

50

【0295】

(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、イソフルオロラン (i s o f l u o r a n e) 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。

【0296】

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。 10

【0297】

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細胞特異的抗体を用いた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、タンパク質 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 20) 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 (BioGene x, 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。

【0298】

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M L N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 30
 2回洗浄し、計数し、次いで各組織由来の約 1×10^6 細胞を、20 μ L容量において0.5 μ g CD16/32 (Fc γ II/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に対するモノクローナル抗体 (Thy-1.2)、CD45Rに対するモノクローナル抗体 (B220)、CD11bに対するモノクローナル抗体 (Mac-1)、Gr-1に対するモノクローナル抗体、CD4に対するモノクローナル抗体またはCD8に対するモノクローナル抗体 (PharMingen, San Diego, CA) の0.5 μ g抗体を用いて、100 μ L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 40
 トメトリーによって分析する。

【0299】

本発明を好ましい実施形態に関して記載してきたが、改変および修飾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改変物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~1Bは、ヒトB7-Lポリペプチド (B7-L__h1; 配列番号2) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号1) を示す。

【図2】図2A~2Bは、ヒトB7-Lポリペプチド (B7-L__h2; 配列番号4) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す。 50

【図 3】図 3 A～3 Bは、ヒト B 7-L ポリペプチド (B 7-L __h 3 ; 配列番号 6) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 5) を示す。

【図 4】図 4 A～4 Bは、ヒト B 7-L ポリペプチド (B 7-L __h 4 ; 配列番号 8) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 7) を示す。

【図 5】図 5 A～5 Bは、マウス B 7-L ポリペプチド (B 7-L __m 1 ; 配列番号 1 0) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 9) を示す。

【図 6】図 6 A～6 Bは、マウス B 7-L ポリペプチド (B 7-L __m 2 ; 配列番号 1 2) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1 1) を示す。

【図 7】図 7 A～7 Bは、マウス B 7-L ポリペプチド (B 7-L __m 3 ; 配列番号 1 4) をコードするヌクレオチド配列 (配列番号 1 3) を示す。

10

【図 8】図 8 は、マウス B 7-L ポリペプチド (上側の配列 ; 配列番号 1 0) およびラット B 7-1 (下側の配列 ; 配列番号 1 5) のアミノ酸配列のアライアメントを示す。

【図 9】図 9 は、ヒト B 7-L ポリペプチド (上側の配列 ; 配列番号 2) およびマウス B 7-L (下側の配列 ; 配列番号 1 0) のアミノ酸配列のアライアメントを示す。

【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
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/00710 A2

- (51) International Patent Classification: C07K 14/47 CA 91350 (US). CHUTE, Hilary, T. [US/AU]; 26005-F Alizia Canyon Drive, Calabasas, CA 91350 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/20719
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/214,512 28 June 2000 (28.06.2000) US
09/729,264 28 November 2000 (28.11.2000) US
- (63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part (CIP) to earlier applications:
US 09/729,264 (CON)
Filed on 28 November 2000 (28.11.2000)
US 60/214,512 (CON)
Filed on 28 June 2000 (28.06.2000)
- (71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN, INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, CA 91320 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): WELCHER, Andrew, A. [US/US]; 1175 Church Street, Ventura, CA 93001 (US). SARMIENTO, Ulla, M. [CA/US]; 11340 Broadview Drive, Moorpark, CA 93021 (US). SCHULTZ, Henry, J. [US/US]; 21827 Parvin Drive, Santa Clarita,
- (74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert & Berghoff, Suite 3200, 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 02/00710 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

B7-LIKE MOLECULES AND USES THEREOF

This application claims the benefit of priority from U.S. Provisional Patent Application No. 60/214,512, filed on June 28, 2000, and U.S. Patent Application No. 09/729,264, filed on November 28, 2000, the disclosure of each 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

5 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:

- 10 (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13;
- (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 15 (c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of either (a) or (b); and
- (d) a nucleotide sequence complementary to either (a) or (b).

20 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, or (a);
- 30 (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, (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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or is antigenic;

- (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, 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).

10 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one conservative amino acid substitution,
- 15 wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid insertion, wherein the
- 20 encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
- 25 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 30 (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID

WO 02/00710

PCT/US01/20719

NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;

- (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (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).

15 The present invention provides for an isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

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

- (a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 25 (b) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 30 (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID

WO 02/00710

PCT/US01/20719

NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or is antigenic; and

- (d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, (a), or (b).

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

- 10 (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 15 (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 20 (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 25 (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14; and
- 30 (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-terminal truncation,

WO 02/00710

PCT/US01/20719

and N-terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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
15 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
20 "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
25 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.

30 Brief Description of the Figures

Figures 1A-1B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 1) encoding a human B7-L polypeptide (B7-L_h1; SEQ ID NO: 2);

WO 02/00710

PCT/US01/20719

- Figures 2A-2B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 3) encoding a human B7-L polypeptide (B7-L_h2; SEQ ID NO: 4);
- Figures 3A-3B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 5) encoding a human B7-L polypeptide (B7-L_h3; SEQ ID NO: 6);
- Figures 4A-4B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 7) encoding a human B7-L polypeptide (B7-L_h4; SEQ ID NO: 8);
- Figures 5A-5B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 9) encoding a murine B7-L polypeptide (B7-L_m1; SEQ ID NO: 10);
- Figures 6A-6B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 11) encoding a murine B7-L polypeptide (B7-L_m2; SEQ ID NO: 12);
- Figures 7A-7B illustrate a nucleotide sequence (SEQ ID NO: 13) encoding a murine B7-L polypeptide (B7-L_m3; SEQ ID NO: 14);
- Figure 8 illustrates an amino acid sequence alignment of murine B7-L polypeptide (upper sequence; SEQ ID NO: 10) and rat B7-1 (lower sequence; SEQ ID NO: 15);
- Figure 9 illustrates an amino acid sequence alignment of human B7-L polypeptide (upper sequence; SEQ ID NO: 2) and murine B7-L polypeptide (lower sequence; SEQ ID NO: 10).

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 any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID

WO 02/00710

PCT/US01/20719

NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, and nucleic acid molecules as defined herein.

5 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

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-(carboxyhydroxymethyl) 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-

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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, 5 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 10 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 15 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 20 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 25 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 30 acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 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 any of SEQ ID NO: 2,

WO 02/00710

PCT/US01/20719

SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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.

5 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. The term "B7-L polypeptide fragment" also refers to amino-
10 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.
15 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
20 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
25 species that corresponds to B7-L polypeptide amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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
30 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID

WO 02/00710

PCT/US01/20719

NO: 14 (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 any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13. 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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.

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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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.

5 The term "isolated polypeptide" refers to a polypeptide of the present invention that (1) has been separated from at least about 50 percent of polynucleotides, lipids, carbohydrates, or other materials with which it is naturally found when isolated from the source cell, (2) is not linked (by covalent or noncovalent interaction) to all or a portion of a polypeptide to which the "isolated
10 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
15 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
20 polypeptides, as the case may be, as determined by the match between strings of two or more nucleotide or two or more amino acid sequences. "Identity" measures the percent of identical matches between the smaller of two or more sequences with gap alignments (if any) addressed by a particular mathematical model or computer program (*i.e.*, "algorithms").

25 The term "similarity" is a related concept, but in contrast to "identity," "similarity" refers to a measure of relatedness which includes both identical matches and conservative substitution matches. If two polypeptide sequences have, for example, 10/20 identical amino acids, and the remainder are all non-conservative substitutions, then the percent identity and similarity would both be 50%. If in the
30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

B7-L nucleic acid molecule of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, or of a molecule encoding a polypeptide, which polypeptide comprises the amino acid sequence as shown in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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% polyvinylpyrrolidone, 0.1% sodium pyrophosphate, 0.1% sodium dodecylsulfate, NaDodSO₄, (SDS), ficoll, Denhardt's solution, sonicated salmon sperm DNA (or another non-complementary DNA), and dextran sulfate, although other suitable agents can also be used. The concentration and types of these additives can be changed without substantially affecting the stringency of the hybridization conditions. Hybridization experiments are usually carried out at pH 6.8-7.4; however, at typical ionic strength

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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:

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

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

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

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

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

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

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

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

In another embodiment, related nucleic acid molecules comprise or consist of a nucleotide sequence that is at least about 70 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, or comprise or consist essentially of a nucleotide sequence encoding a polypeptide that is at least about 70 percent identical to the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. In preferred embodiments, the nucleotide sequences are about 75 percent, or about 80 percent, or about 85 percent, or about 90 percent, or about 95, 96, 97, 98, or 99 percent identical to the nucleotide sequence as shown in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. Related nucleic acid molecules encode polypeptides possessing at least one activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

Differences in the nucleic acid sequence may result in conservative and/or non-conservative modifications of the amino acid sequence relative to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

Conservative modifications to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 (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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
 5 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
 10 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;
- 15 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.

20 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.

25 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 (-
 30 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.*

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Mol. Biol. 157:105-31). It is known that certain amino acids may be substituted for other amino acids having a similar hydropathic index or score and still retain a similar biological activity. In making changes based upon the hydropathic index, the substitution of amino acids whose hydropathic indices are within ± 2 is preferred, those which are within ± 1 are particularly preferred, and those within ± 0.5 are even more particularly preferred.

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

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

Desired amino acid substitutions (whether conservative or non-conservative) can be determined by those skilled in the art at the time such substitutions are desired. For example, amino acid substitutions can be used to identify important residues of the 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
-------------------	-------------------------	-------------------------

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 using wellknown techniques.

- 5 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

A number of scientific publications have been devoted to the prediction of secondary structure. See Moulton, 1996, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:422-27; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 13:222-45; Chou *et al.*, 1974, *Biochemistry* 113:211-22; Chou *et al.*, 1978, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 47:45-48; Chou *et al.*, 1978, *Ann. Rev. Biochem.* 47:251-276; and Chou *et al.*, 1979, *Biophys. J.* 26:367-84. Moreover, computer programs are currently available to assist with predicting secondary structure. One method of predicting secondary structure is based upon homology modeling. For example, two polypeptides or proteins which have a sequence identity of greater than 30%, or similarity greater than 40%, often have similar structural 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

5 include cysteine variants, wherein one or more cysteine residues are deleted or substituted with another amino acid (*e.g.*, serine) as compared to the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. Cysteine variants are useful when B7-L polypeptides must be refolded into a biologically active

10 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or

15 SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid insertion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or

20 SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid deletion and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence

25 encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 wherein the polypeptide has a carboxyl- and/or amino-terminal truncation and further wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or

30 SEQ ID NO: 14. Related nucleic acid molecules also comprise or consist of a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, carboxyl-

WO 02/00710

PCT/US01/20719

terminal truncations, and amino-terminal truncations and wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

In addition, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of
 5 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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
 10 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
 15 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or other B7-L polypeptide.

20 Fusions can be made either at the amino-terminus or at the carboxyl-terminus of the polypeptide comprising the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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
 25 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.

30 In a further embodiment of the invention, the polypeptide comprising the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

"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

10

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

In one example, a human IgG hinge, CH2, and CH3 region may be fused at either the amino-terminus or carboxyl-terminus of the 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

15

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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.

10 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
15 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.

20 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
25 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,
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 B7L 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 (hemagglutinin influenza virus), or myc for which commercially available antibodies exist. This tag is typically fused to the polypeptide upon expression of the polypeptide, and can serve as a means for affinity purification of the 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 which normally function to regulate B7-L polypeptide expression. As such, the source of a

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 stomatitis 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).

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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,
10 *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
15 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
20 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
25 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
30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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,

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
 5 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
 10 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,
 15 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 metallothionein gene (Brinster *et al.*, 1982, *Nature* 296:39-42); prokaryotic expression vectors such as the
 20 beta-lactamase promoter (Villa-Komaroff *et al.*, 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 75:3727-31); or the tac promoter (DeBoer *et al.*, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 80:21-25). Also of interest are the following animal transcriptional control regions,
 30 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*

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
 5 (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);
 10 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
 15 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
 20 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
 25 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
 30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

Additional suitable vectors include, but are not limited to, cosmids, plasmids, or modified viruses, but it will be appreciated that the vector system must be compatible with the selected host cell. Such vectors include, but are not limited to plasmids such as Bluescript[®] plasmid derivatives (a high copy number ColE1-based phagemid; Stratagene Cloning Systems, La Jolla CA), PCR cloning plasmids designed for cloning Taq-amplified PCR products (e.g., TOPO[™] TA Cloning[®] Kit 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 which can subsequently be collected from the culture medium (if the host cell secretes it into the medium) or directly from the host cell producing it (if it is not secreted). The selection of an appropriate host cell will depend upon various factors, such as desired expression levels, polypeptide modifications that are desirable or necessary for activity (such as

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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, DH5 α , DH10, and MC1061) are well-known as host cells in the field of biotechnology. Various strains of *B. subtilis*, *Pseudomonas spp.*, other *Bacillus spp.*, *Streptomyces spp.*, and the like may also be employed in this method.

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

Additionally, where desired, insect cell systems may be utilized in the methods of the present invention. Such systems are described, for example, in Kitts *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 Sf9 and Hi5 (Invitrogen).

One may also use transgenic animals to express glycosylated B7L polypeptides. For example, one may use a transgenic milk-producing animal (a cow

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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
20 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,
25 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

involves the activation of endogenous gene expression or over-expression of a gene by *in situ* recombination methods. For example, expression of an endogenous gene is activated or increased by integrating a regulatory sequence into the target cell which is capable of activating expression of the gene by non-homologous or illegitimate recombination. The target DNA is first subjected to radiation, and a genetic promoter inserted. The promoter eventually locates a break at the front of a gene, initiating transcription of the gene. This results in expression of the desired peptide or polypeptide.

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.).

15 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.

20 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')

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

5 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
10 carrier. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90:2551-55; Jakobovits *et al.*, 1993, *Nature* 362:255-58; Bruggermann *et al.*, 1993, *Year in 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
15 the genome thereof. Partially modified animals, that is those having less than the full complement of modifications, are then cross-bred to obtain an animal having all of the desired immune system modifications. When administered an immunogen, these transgenic animals produce antibodies with human (rather than, *e.g.*, murine) amino acid sequences, including variable regions which are immunospecific for these
20 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.

25 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

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 which remain unbound.

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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
15 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
20 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
25 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.

30

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

between about 2 kDa to about 100 kDa (the term "about" indicating that in preparations of a water-soluble polymer, some molecules will weigh more, some less, than the stated molecular weight). The average molecular weight of each polymer is preferably between about 5 kDa and about 50 kDa, more preferably between about 12 kDa and about 40 kDa and most preferably between about 20 kDa and about 35 kDa.

Suitable water-soluble polymers or mixtures thereof include, but are not limited to, N-linked or O-linked carbohydrates, sugars, phosphates, polyethylene glycol (PEG) (including the forms of PEG that have been used to derivatize proteins, including mono-(C₁-C₁₀), alkoxy-, or aryloxy-polyethylene glycol), monomethoxy-polyethylene glycol, dextran (such as low molecular weight dextran of, for example, 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 which 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 selected polymer should have a single reactive aldehyde group. A reactive aldehyde is, for example, polyethylene glycol propionaldehyde, which is water stable, or mono C₁-C₁₀ alkoxy or aryloxy derivatives thereof (see U.S. Patent No. 5,252,714).

In another embodiment, B7-L polypeptides may be chemically coupled to biotin. The biotin/B7-L polypeptide molecules are then allowed to bind to avidin,
10 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
15 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.

20

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
25 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
30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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
15 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.

20 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
25 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,
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 colorimetrically, 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 which increases or decreases the formation of a complex between a B7-L polypeptide

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

15 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-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 16) 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-Q-R-R-R; SEQ ID NO: 17), 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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-
 5 beta-cyclodextrin), fillers, monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates (such as glucose, mannose, or dextrans), proteins (such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins), coloring, flavoring and diluting agents, emulsifying agents, hydrophilic polymers (such as polyvinylpyrrolidone), low molecular weight polypeptides, salt-forming counterions (such as sodium), preservatives (such as
 10 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
 15 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. Gennaro, ed., Mack Publishing Company
 20 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,
 25 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
 30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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.

10 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.

25 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.

30 It is also contemplated that certain formulations may be administered orally. In one embodiment of the present invention, B7-L polypeptides that are administered

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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,

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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.

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

20 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
25 (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 $\mu\text{g/kg}$ 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 $\mu\text{g/kg}$ up to
30 about 100 mg/kg ; or 1 $\mu\text{g/kg}$ up to about 100 mg/kg ; or 5 $\mu\text{g/kg}$ 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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,
15 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
20 described in U.S. Patent No. 5,272,071; European Patent Nos. 9193051 and 505500; PCT/US90/07642, and PCT Pub No. WO 91/09955).

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
25 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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
15 (*i.e.*, a desired endogenous cellular gene) is altered via homologous recombination into the cellular genome at a preselected site, by the introduction of DNA which includes at least a regulatory sequence, an exon, and a splice donor site. These components are introduced into the chromosomal (genomic) DNA in such a manner that this, in effect, results in the production of a new transcription unit (in which the
20 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
25 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
30 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-

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

5 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

10 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

15 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

20 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

25 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

30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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.

10 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
15 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
20 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,
25 *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 which
30 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.*,

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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.
15 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.

20 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 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

system involving a recombinant neurotrophic HSV-1 vector. U.S. Patent No. 5,399,346 provides examples of a process for providing a patient with a therapeutic protein by the delivery of human cells which have been treated *in vitro* to insert a DNA segment encoding a therapeutic protein. Additional methods and materials for the practice of gene therapy techniques are described in U.S. Patent Nos. 5,631,236 (involving adenoviral vectors), 5,672,510 (involving retroviral vectors), 5,635,399 (involving retroviral vectors expressing cytokines).

Nonviral delivery methods include, but are not limited to, liposome-mediated transfer, naked DNA delivery (direct injection), receptor-mediated transfer (ligand-DNA complex), electroporation, calcium phosphate precipitation, and microparticle bombardment (*e.g.*, gene gun). Gene therapy materials and methods may also include inducible promoters, tissue-specific enhancer-promoters, DNA sequences designed for site-specific integration, DNA sequences capable of providing a selective advantage over the parent cell, labels to identify transformed cells, negative selection systems and expression control systems (safety measures), cell-specific binding agents (for cell targeting), cell-specific internalization factors, and transcription factors to enhance 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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.

Transgenic mice expressing B7-L polypeptides (B7-L_m3; SEQ ID NO: 14)
15 of the present invention exhibited seminal vesicle hyperplasia. Accordingly, the B7-L nucleic acids, polypeptides, and agonists and antagonists thereof of the present invention may be useful in the treatment of reproductive disorders and proliferative disorders.

For example, antibodies, soluble proteins comprising extracellular domains,
20 and other regulators of B7-L polypeptide expression that result in prolonged or enhanced T-cell activation may be useful for increasing the immune response to tumors. B7-L polypeptides may play a role in the growth and maintenance of cancer cells based on the observation of seminal vesicle hyperplasia in transgenic mice overexpressing B7-L polypeptide. Accordingly, agonists or antagonists of B7-L
25 polypeptides 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.

30 Gene therapy using the B7-L polypeptide genes of the invention may be useful in the immunotherapeutic treatment of cancer. When introduced into cancer cells, B7-L polypeptide genes may transform these cells 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 these T-cells may result in the

WO 02/00710

PCT/US01/20719

eradication of both B7-L expressing tumor cells and tumor cells that do not express B7-L polypeptide. This immunotherapeutic approach may be useful for treating various leukemias, sarcomas, melanomas, adenocarcinomas, breast carcinomas, prostate tumors, lung carcinomas, colon carcinomas, or other tumors. The present invention encompasses using the B7-L polypeptide gene in a similar manner to enhance T-cell activation in response to variety of tumors.

The B7-L polypeptide pathway can also be manipulated to regulate cytotoxic T-lymphocyte (CTL) response in a number of other clinical settings, including allograft transplantation, graft versus host disease, T-cell dependent B-cell mediated diseases, and autoimmune diseases.

Graft versus host disease – an “artificial” immune disorder – may benefit from the inhibition of antibody production using, for example, B7-L polypeptide antagonists. The B7-L molecules of the present invention may also be used to alleviate the symptoms associated with diseases involving chronic immune cell dysfunction or to treat autoimmune diseases such as systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, diabetes, immune thrombocytopenic purpura (ITP), and psoriasis. In addition, chronic inflammatory diseases, such as inflammatory bowel disease (Crohn’s disease and ulcerative colitis), Grave’s disease, Hashimoto’s thyroiditis, and diabetes mellitus may also be treated using the B7-L molecules of the present invention. Antagonists of the B7-L polypeptides also may be useful for the alleviation of toxic shock syndrome or allosensitization due to blood transfusions.

The B7-L molecules of the present invention may be useful as immunosuppressive agents for bone marrow and organ transplantation or 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 such drugs are effective, patients can suffer 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 polypeptides or proteins may lack the severe side effects observed when the present immunotherapeutic agents are used.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

B7-L polypeptides may play a role in the inappropriate proliferation of cells based on the observation of seminal vesicle hyperplasia in transgenic mice overexpressing B7-L polypeptide. Accordingly, the B7-L molecules of the present invention may be useful for the diagnosis or treatment of diseases involving abnormal

5 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.

B7-L polypeptides may play a role in the reproductive system based on the observation of seminal vesicle hyperplasia in transgenic mice overexpressing B7-L

10 polypeptide. Accordingly, the B7-L molecules of the present invention may be useful for the diagnosis or treatment of reproductive disorders. Examples of such diseases include, but are not limited to, infertility, miscarriage, preterm labor and delivery, and endometriosis. Other diseases of the reproductive system are encompassed within the scope of the invention.

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.

15

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 polypeptides or B7-L polypeptide/Fc fusions may also be beneficial in eliminating virus-infected cells. In a complementary fashion, B7-L polypeptides or B7-L polypeptide/Fc fusions may also have an effect on humoral immune functions by

20 enhancing antibody mediated responses and that function to help clear free-virus from the body.

In addition, 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

30 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 using protein, antibody, or small molecule inhibitors of B7-L polypeptide activity.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Diseases that cause antibody-mediated hypersensitivity reactions, including systemic lupus erythematosus, arthritis (*e.g.*, rheumatoid arthritis, reactive arthritis, and psoriatic arthritis), nephropathies (*e.g.*, glomerulo-nephritis, membranous, mesangiocapillary, focal segmental, focal necrotizing, crescentic, and proliferative tubulopathies), skin disorders (*e.g.*, pemphigus and pemphigoid, erythema nodosum), endocrinopathies (*e.g.*, Grave's disease, Hashimoto's thyroiditis, and 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 cryoglobulinemias may be inhibited by protein, antibody, or small molecule antagonists of B7-L polypeptide activity.

B7-L nucleic acids, polypeptides, agonists and antagonists may be used in combination with cytokines, growth factors, antibiotics, anti-inflammatories, and/or chemotherapeutic agents as is appropriate for the indication being treated.

Other diseases or disorders caused by or mediated by undesirable levels of B7-L polypeptides or B7-L polypeptide receptors 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 (¹²⁵Iodine) 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 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
10 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
15 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.

20

Example 1: 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
25 with ³²P-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
30 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 μ m. 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 μ g/ml polyA, 25 μ g/ml polyC and 50% formamide) and then hybridized overnight at 60°C in the same solution containing 10% dextran and 2×10^4 cpm/ μ l of a ^{32} 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 2: 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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
10 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
15 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.

20 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.

25 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
30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.

5 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.

10 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

15 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 -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.

30 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 CaCl₂ 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Example 3: 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
 5 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
 10 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
 15 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.

20

Example 4: 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
 25 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
 30 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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 CQ₂ 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 MgCl₂, 10 mM of each dNTP, 0.1 mM DTT, and 200 U of SuperScript II reverse transcriptase. Following incubation for 50 minutes at 42°C, the reaction is stopped by heating for 15 minutes at 72°C and digested with 2U of RNase H for 20 minutes at

WO 02/00710

PCT/US01/20719

37°C. Samples are then amplified by PCR using primers specific for B7-L polypeptide.

Example 5: Biological Activity of B7-L Polypeptide in Transgenic Mice

5 Prior to euthanasia, transgenic animals are weighed, anesthetized by isoflurane 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.

10 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
15 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
20 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
25 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
30 gently grinding the tissues with the flat end of a syringe against the bottom of a 100 mm nylon cell strainer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Cells are washed twice, counted, and approximately 1×10^6 cells from each tissue are then incubated for 10 minutes with 0.5 µg CD16/32(FcγII/III) 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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Mg²⁺), 0.1% bovine serum albumin, and 0.01% sodium azide with 0.5 µg antibody of FITC or PE-conjugated monoclonal antibodies against CD90.2 (Thy-1.2), CD45R (B220), CD11b (Mac-1), Gr-1, CD4, or CD8 (PbarMingen, San Diego, CA). Following antibody binding, the cells are washed and then analyzed by flow
5 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
10 equivalent variations that come within the scope of the invention as claimed.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence selected from the group consisting of:
 - 5 (a) the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13;
 - (b) a nucleotide sequence encoding the polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
 - 10 (c) a nucleotide sequence which hybridizes under moderately or highly stringent conditions to the complement of either (a) or (b); and
 - (d) a nucleotide sequence complementary to either (a) or (c).
- 15 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
 - (b) a nucleotide sequence encoding an allelic variant or splice variant of the nucleotide sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, or (a);
 - 20 (c) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, (a), or (b) encoding a polypeptide fragment of at least about 25 amino acid residues, wherein the polypeptide fragment has an activity of the encoded polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or is antigenic;
 - 30 (d) a region of the nucleotide sequence of any of SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, or SEQ ID NO: 13, or any of (a) - (c) comprising a fragment of at least about 16 nucleotides;

WO 02/00710

PCT/US01/20719

- (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).
- 5 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one conservative amino acid substitution,
- 10 wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (b) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid insertion, wherein the
- 15 encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (c) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of
- 20 SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid deletion, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 25 (d) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 30 (e) a nucleotide sequence encoding a polypeptide as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one modification selected from the group consisting of amino acid substitutions, amino acid insertions, amino acid deletions, C-

WO 02/00710

PCT/US01/20719

terminal truncation, and N-terminal truncation, wherein the encoded polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;

(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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.
- 5
13. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.
- 10
14. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:
- (a) an amino acid sequence for an ortholog of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 15
- (b) an amino acid sequence which is at least about 70 percent identical to the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- 20
- (c) a fragment of the amino acid sequence set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 comprising at least about 25 amino acid residues, wherein the fragment has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or is antigenic; and
- 25
- (d) an amino acid sequence for an allelic variant or splice variant of the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, (a), or
- 30
- (c).
15. An isolated polypeptide comprising the amino acid sequence selected from the group consisting of:

WO 02/00710

PCT/US01/20719

- (a) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one conservative amino acid substitution, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (b) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid insertion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (c) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 with at least one amino acid deletion, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14;
- (d) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 which has a C- and/or N- terminal truncation, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14; and
- (e) the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14 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 any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.
16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3, wherein the polypeptide has an activity of the polypeptide set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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.
- 5 18. A selective binding agent or fragment thereof that specifically binds the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15.
19. The selective binding agent or fragment thereof of Claim 18 that specifically binds the polypeptide comprising the amino acid sequence as set forth in any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14, or a fragment thereof.
- 10 20. The selective binding agent of Claim 18 that is an antibody or fragment thereof.
- 15 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.
- 20 23. The selective binding agent of Claim 18 that is a polyclonal antibody or fragment thereof.
- 25 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.
- 30 26. The selective binding agent of Claim 18 that is a CDR-grafted antibody or fragment thereof.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

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
5 fragment.
29. The variable region fragment of Claim 28 that is a Fab or a Fab' fragment.
- 10 30. A selective binding agent or fragment thereof comprising at least one complementarity determining region with specificity for a polypeptide having the amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.
- 15 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.
20
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.
- 25 34. A selective binding agent produced by immunizing an animal with a polypeptide comprising an amino acid sequence of any of SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, or SEQ ID NO: 14.
- 30 35. A hybridoma that produces a selective binding agent that is 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

37. A composition comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15, and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
- 5 38. The composition of Claim 37, wherein the pharmaceutically acceptable formulation agent is a carrier, adjuvant, solubilizer, stabilizer, or anti-oxidant.
39. A polypeptide comprising a derivative of the polypeptide of any of
10 Claims 13, 14, or 15.
40. The polypeptide of Claim 39 that is covalently modified with a water-soluble polymer.
- 15 41. The polypeptide of Claim 40, 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.
- 20 42. A composition comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 and a pharmaceutically acceptable formulation agent.
43. The composition of Claim 42, wherein said nucleic acid molecule is
25 contained in a viral vector.
44. A viral vector comprising a nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.
- 30 45. A fusion polypeptide comprising the polypeptide of any of Claims 13, 14, or 15 fused to a heterologous amino acid sequence.
46. The fusion polypeptide of Claim 45, wherein the heterologous amino acid sequence is an IgG constant domain or fragment thereof.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

47. 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.

5

48. 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.

15 49. 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

20 said membrane is permeable to said protein and impermeable to materials detrimental to said cells.

50. A method of identifying a compound that binds to a B7-L polypeptide comprising:

25 (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.

30 51. The method of Claim 50, further comprising determining the activity of the polypeptide when bound to the compound.

52. 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.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

53. A transgenic non-human mammal comprising the nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

5 54. 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.

10 55. A nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3 attached to a solid support.

56. An array of nucleic acid molecules comprising at least one nucleic acid molecule of any of Claims 1, 2, or 3.

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 1A

```

ctgtctgccc atctgaataa caagag atg ggg ctt gtg att ttc ctc cac ggt 53
                               Met Gly Leu Val Ile Phe Leu His Gly
                               1           5

tct ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc cag aat gca aca gtc 101
Ser Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Thr Val
10           15           20           25

ctg aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg 149
Leu Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp
30           35           40

aag ctc atc atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg 197
Pro Met Glu Pro Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg
45           50           55

ccc atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac 245
Pro Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr
60           65           70

gac cag ggc ggg aac ttc acc tcg gag atg atc atc cac aat gtg gag 293
Asp Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu
75           80           85

ccc agt gat tgc ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt cgc ctg 341
Pro Ser Asp Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu
90           95           100           105

cat gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att 389
His Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile
110           115           120

ccc agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa gtt act 437
Pro Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr
125           130           135

tgt cta ccc tca cac tgg acc cgg ctc ccg gat att tcc tgg gag ctc 485
Cys Leu Pro Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu
140           145           150

ggg ctc ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag ccc agc 533
Gly Leu Leu Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser
155           160           165

gac ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc oca cag agc aat 581
Asp Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn
170           175           180           185

ggg act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag 629
Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys
190           195           200

tct gca act gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga 677
Ser Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly
205           210           215

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 1B

```

ggt ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt tta ggt 725
Gly Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly
220 225 230

ttt tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc 773
Phe Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr
235 240 245

atg ctt ctg acg cag acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc 821
Met Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys
250 255 260 265

cgc cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc 869
Arg Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys
270 275 280

tgt aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa tct gaa 917
Cys Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu
285 290 295

aaa gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat gaa aac 965
Lys Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn
300 305 310

tcc ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gac acc gct tct ctc 1013
Ser Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu
315 320 325

cct ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac agt agc 1061
Pro Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser
330 335 340 345

tgt ggc cct cct cac cag cgg gct gat caa cgt cca ccc agg cca gca 1109
Cys Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala
350 355 360

agt cat cca cag gct tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag gtc agt 1157
Ser His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser
365 370 375

aat aca act gta gta tag 1175
Asn Thr Thr Val Val
380

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 2A

```

agtgatc atg gtg gca gga gcc atg gaa aat aga gac cca ccc ggt tct 49
      Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Pro Gly Ser
      1           5           10

ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc caa aat gca aga gtc ctg 97
Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu
15           20           25           30

aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg aag 145
Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys
35           40           45

ctc atc atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg ccc 193
Leu Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro
50           55           60

atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac gac 241
Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp
65           70           75

cag ggc ggg aac ttc acc tcg gag atg atc atc cac aat gtg gag ccc 289
Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro
80           85           90

agt gat tcg ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt cgc ctg cat 337
Ser Asp Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His
95           100           105

gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att ccc 385
Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro
115           120           125

agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa gtt act tgt 433
Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys
130           135           140

cta ccc tca cac tgg acc tgg ctc ccg gat att tcc tgg gag ctc ggt 481
Leu Pro Ser His Trp Thr Trp Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly
145           150           155

ctc ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag ccc agc gac 529
Leu Leu Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp
160           165           170

ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag agc aat ggg 577
Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly
175           180           185           190

act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag tct 625
Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser
195           200           205

gca act gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga ggt 673
Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly
210           215           220

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 2B

```

ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt tta ggt ttt 721
Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe
225 230 235

tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc atg 769
Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met
240 245 250

ctt ctg acg ccg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc cgc 817
Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg
255 260 265 270

cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc tgt 865
Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys
275 280 285

aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa tct gaa aaa 913
Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu Lys
290 295 300

gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat gaa aac tcc 961
Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn Ser
305 310 315

ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gac acc gct tct ctc cct 1009
Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu Pro
320 325 330

ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac agt agc tgt 1057
Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser Cys
335 340 345 350

ggc cct cct cac cag cgg gct gat caa cgt cca ccc agg cca gca agt 1105
Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala Ser
355 360 365

cat cca cag gct tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag gtc agt aat 1153
His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser Asn
370 375 380

aca act gta gta tag 1168
Thr Thr Val Val
385

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 3A

```

aggtgtgagt ccagccaaca gtgtggatca gtttcttagg ctgccataac aaagcaccat 60
aacctggttg cttagaaca atg gaa agg cat ttg ctc acg gtt cca gaa gct 112
                               Met Glu Arg His Leu Leu Thr Val Pro Glu Ala
                               1       5       10
gta ggt tct ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc cag aat gca 160
Val Gly Ser Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala
      15       20       25
aca gtc ctg aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag 208
Thr Val Leu Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln
      30       35       40
ggc tgg aag ctc atc atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc 256
Gly Trp Lys Leu Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser
      45       50       55
gtc agg ccc atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag 304
Val Arg Pro Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln
      60       65       70       75
agg tac gac cag ggc ggg aac ttc acc tcg gag atg atc atc cac aat 352
Arg Tyr Asp Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn
      80       85       90
gtg gag ccc agt gat tcg ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt 400
Val Glu Pro Ser Asp Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser
      95      100      105
cgc ctg cat gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg 448
Arg Leu His Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu
      110     115     120
ttc att ccc agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa 496
Phe Ile Pro Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu
      125     130     135
gtt act tgt cta ccc tca cac tgg acc cgg ctc ccg gat att tcc tgg 544
Val Thr Cys Leu Pro Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp
      140     145     150     155
gag ctc ggt ctc ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag 592
Glu Leu Gly Leu Leu Val Ser His Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu
      160     165     170
ccc agc gac ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag 640
Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln
      175     180     185
agc aat ggg act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc 688
Ser Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala
      190     195     200
cgc aag tct gca act gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac 736
Arg Lys Ser Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp
      205     210     215

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 3B

```

act gga ggt ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt 784
Thr Gly Gly Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser
220                225                230                235

tta ggt ttt tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ott gga cta gca 832
Leu Gly Phe Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala
                240                245                250

ggc acc atg ctt ctg acg ccg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc 880
Gly Thr Met Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys
                255                260                265

tgc tgc cgc cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt 928
Cys Cys Arg Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys
                270                275                280

ttc tgc tgt aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa 976
Phe Cys Cys Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys
                285                290                295

tct gaa aaa gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat 1024
Ser Glu Lys Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn
300                305                310                315

gaa aac tcc ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gaa acc gct 1072
Glu Asn Ser Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Glu Thr Ala
                320                325                330

tct ctc cct ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac 1120
Ser Leu Pro Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn
                335                340                345

agt agc tgt ggc cct cct cac cag cgg gct gat caa cgt cca ccc agg 1168
Ser Ser Cys Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg
                350                355                360

cca gca agt cat cca cag got tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag 1216
Pro Ala Ser His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys
                365                370                375

gtc agt aat aca act gta gta tag 1240
Val Ser Asn Thr Thr Val Val
380                385

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 4A

```

atg gtg gca gga gcc atg gaa aat aga gac cca ccc ggt tct ggg tct 48
Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Pro Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc caa aat gca aga gtc ctg aag ggc 96
Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gly
20 25 30

tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg aag ctc atc 144
Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile
35 40 45

atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg ccc atg gag 192
Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu
50 55 60

ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac gac cag ggc 240
Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly
65 70 75 80

ggg aac ctc acc tcg gag atg atc atc cac aat gtg gag ccc agt gat 288
Gly Asn Leu Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp
85 90 95

tcg ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt cgc ctg cat gga tct 336
Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His Gly Ser
100 105 110

gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att ccc agt gtt 384
Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val
115 120 125

aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa gtt act tgt cta ccc 432
Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro
130 135 140

tca cac tgg acc cgg ctc ccg gat att tcc tgg gag ctc ggt ctc ctg 480
Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu
145 150 155 160

gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag ccc agc gac ctt caa 528
Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln
165 170 175

agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag agc aat ggg act ttg 576
Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu
180 185 190

act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag tct gca act 624
Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr
195 200 205

gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga ggt ggt att 672
Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile
210 215 220

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 4B

```

aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt tta ggt ttt tca ttg 720
Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu
225                230                235                240

cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc atg ctt ctg 768
Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu
245                250                255

acg ccg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc cgc cgt cgt 816
Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg Arg Arg
260                265                270

tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc tgt aga aga 864
Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg
275                280                285

aaa aga gga aat ctg aaa aag aga aga caa aca aag aaa ctg aga cag 912
Lys Arg Gly Asn Leu Lys Lys Arg Arg Gln Thr Lys Lys Leu Arg Gln
290                295                300

aaa gtg gaa atg aaa act ccg gct aca att cag atg aac aaa aga cca 960
Lys Val Glu Met Lys Thr Pro Ala Thr Ile Gln Met Asn Lys Arg Pro
305                310                315

cag aca ccg ctt ctc tcc ctc cca aat cct gtg aat cca gtg atc ctg 1008
Gln Thr Pro Leu Leu Ser Leu Pro Asn Pro Val Asn Pro Val Ile Leu
325                330                335

aac aaa gaa aca gta gct gtg gcc ctc ctc acc agc ggg ctg atc aac 1056
Asn Lys Glu Thr Val Ala Val Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Ile Asn
340                345                350

gtc cac cca ggc cag caa gtc atc cac agg ctt ctt tta atc tgg cca 1104
Val His Pro Gly Gln Gln Val Ile His Arg Leu Leu Leu Ile Trp Pro
355                360                365

gtc ctg aga agg tca gta ata caa ctg tagtataa 1139
Val Leu Arg Arg Ser Val Ile Gln Leu
370                375

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 5A

```

gtgaacgaga tacagagatt tacctgcctg aggtaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
                                     Met Glu
                                     1
ggc agc tgg aga gat gtc ctg gct gtg ctg gtc atc ctg gct cag ctg 106
Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala Gln Leu
      5          10          15
aca gct tcc gga tcc agt tat cag atc ata gaa ggt cct cag aat gta 154
Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln Asn Val
      20          25          30
aca gtc cta aag gac tca gag gct cac ttc aac tgc acc gtg act cac 202
Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val Thr His
      35          40          45          50
ggc tgg aag ctt ctc atg tgg act ctt aac caa atg gtg gtg ctg agt 250
Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val Leu Ser
      55          60          65
ctc acc acc caa gga ccc atc atc acc aac aac cgc ttc acc tat gcc 298
Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr Tyr Ala
      70          75          80
agt tac aac agc act gac agc ttc atc tgc gag ttg atc atc cat gat 346
Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile His Asp
      85          90          95
gtg cag ccc agt gac tgc gga tcc gtg caa tgc agc ctg cag aac agc 394
Val Gln Pro Ser Asp Ser Glu Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln Asn Ser
      100          105          110
cat ggg ttt gga tct gcc ttc ctc tca gtg caa gtc atg ggg acc ctg 442
His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Val Met Gly Thr Leu
      115          120          125
aac att cct agc aac aac ctt ata gtc act gag ggt gaa ccc tgt aat 490
Asn Ile Pro Ser Asn Asn Leu Ile Val Thr Glu Gly Glu Pro Cys Asn
      135          140          145
gtg act tgc tat gcc gtg ggc tgg acc tca ctc ccg gat att tcc tgg 538
Val Thr Cys Tyr Ala Val Gly Trp Thr Ser Leu Pro Asp Ile Ser Trp
      150          155          160
gag ctt gag gtt ccc gta agc cat tgc agt tac aat tcc ttt ctg gag 586
Glu Leu Glu Val Pro Val Ser His Ser Ser Tyr Asn Ser Phe Leu Glu
      165          170          175
ccg ggc aac ttt atg agg gtc ttg agt gtc ctg gac ctc aca cca ctg 634
Pro Gly Asn Phe Met Arg Val Leu Ser Val Leu Asp Leu Thr Pro Leu
      180          185          190
ggc aac ggg acc ttg act tgt gtg gca gag ctg aag gac ttg cag gcc 682
Gly Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Glu Leu Lys Asp Leu Gln Ala
      195          200          205          210

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 5B

```

agc aag tcc tta act gtc aac ctg act gtg gtt cag cct cca cct gac 730
Ser Lys Ser Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Val Gln Pro Pro Pro Asp
      215                220                225

agt att gga gag gaa ggc cca gca ctg ccg acc tgg gcc atc atc ctg 778
Ser Ile Gly Glu Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile Ile Leu
      230                235                240

ctg gca gtg gcc ttt tcc ttg ctc ttg atc ctg atc att gtt ttg att 826
Leu Ala Val Ala Phe Ser Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val Leu Ile
      245                250                255

ata ata ttc tgt tgc tgt tgt gcc tcc agg aga gaa aag gaa gaa tct 874
Ile Ile Phe Cys Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu Glu Ser
      260                265                270

act tat caa aat gaa ata agg aaa tct gca aac atg agg aca aac aaa 922
Thr Tyr Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys
      275                280                285                290

gca gat ccg gag aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac 970
Ala Asp Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr
      295                300                305

agt tcg gat gag gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa 1018
Ser Ser Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys
      310                315                320

tct gct gaa gtc agc ctt cca gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat 1066
Ser Ala Glu Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr
      325                330                335

cag gaa ctc aat aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt 1114
Gln Glu Leu Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val
      340                345                350

tcc ttt gac atc gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg 1162
Ser Phe Asp Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
      355                360                365                370

taataaagac ttctcatgac tgtacttggt gca 1195

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 6A

```

gtgaacgaga tacagagatt tacotgcctg aggtaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
                                     Met Glu
                                     1
ggc agc tgg aga gat gtc ctg gct gtg ctg gtc atc ctg gct cag ctg 106
Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala Gln Leu
5      10      15
aca gct tcc gga tcc agt tat cag atc ata gaa ggt cct cag aat gta 154
Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln Asn Val
20      25      30
aca gtc cta aag gac tca gag gct cac ttc aac tgc acc gtg act cac 202
Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val Thr His
35      40      45      50
ggc tgg aag ctt ctg atg tgg act ctt aac caa atg gtg gtg ctg agt 250
Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val Leu Ser
55      60      65
ctc acc acc caa gga ccc atc atc acc aac aac cgc ttc acc tat gcc 298
Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr Tyr Ala
70      75      80
agt tac aac agc act gac agc ttc atc tcg gag ttg atc atc cat gat 346
Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile His Asp
85      90      95
gtg cag ccc agt gac tcg gga tcc gtg caa tgc agc ctg cag aac agc 394
Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln Asn Ser
100     105     110
cat ggg ttt gga tct gcc ttc ctg tca gtg caa gac agt att gga gag 442
His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Asp Ser Ile Gly Glu
115     120     125     130
gaa ggc cca gca ctg ccg acc tgg gcc atc atc ctg ctg gca gtg gcc 490
Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile Ile Leu Leu Ala Val Ala
135     140     145
ttt tcc ttg ctg ttg atc ctg atc att gtt ttg att ata ata ttc tgt 538
Phe Ser Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val Leu Ile Ile Phe Cys
150     155     160
tgc tgt tgt gcc tcc agg aga gaa aag gaa gaa tct act tat caa aat 586
Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu Glu Ser Thr Tyr Gln Asn
165     170     175
gaa ata agg aaa tct gca aac atg agg aca aac aaa gca gat ccg gag 634
Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala Asp Pro Glu
180     185     190
aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac agt tcg gat gag 682
Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser Asp Glu
195     200     205     210

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 6B

```
gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa tct gct gaa gtc 730
Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Ala Glu Val
      215                220                225

agc ctt coa gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat cag gaa ctc aat 778
Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Glu Leu Asn
      230                235                240

aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt tcc ttt gac atc 826
Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser Phe Asp Ile
      245                250                255

gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg taataaagac 872
Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
      260                265                270

ttctcatgac tgtacttggt gca 895
```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 7A

```

gtgaacgaga tacagagatt tacotgcctg aggtaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
                                     Met Glu
                                     1
ggc agc tgg aga gat gtc ctg gct gtg ctg gtc atc ctg gct cag ctg 106
Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala Gln Leu
      5              10              15
aca gct tcc gga tcc agt tat cag atc ata gaa ggt cct cag aat gta 154
Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln Asn Val
      20              25              30
aca gtc cta aag gac tca gag gct cac ttc aac tgc acc gtg act cac 202
Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val Thr His
      35              40              45              50
ggc tgg aag ctt ctc atg tgg act ctt aac caa atg gtg gtg ctg agt 250
Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val Leu Ser
      55              60              65
ctc acc acc caa gga ccc atc atc acc aac aac cgc ttc acc tat gcc 298
Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr Tyr Ala
      70              75              80
agt tac aac agc act gac agc ttc atc tcg gag ttg atc atc cat gat 346
Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile His Asp
      85              90              95
gtg cag ccc agt gac tcg gga tcc gtg caa tgc agc ctg cag aac agc 394
Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln Asn Ser
      100              105              110
cat ggg ttt gga tct gcc ttc ctc tca gtg caa gaa tct act tat caa 442
His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Glu Ser Thr Tyr Gln
      115              120              125              130
aat gaa ata agg aaa tct gca aac atg agg aca aac aaa gca gat ccg 490
Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala Asp Pro
      135              140              145
gag aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac agt tcg gat 538
Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser Asp
      150              155              160
gag gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa tct gct gaa 586
Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Ala Glu
      165              170              175
gtc agc ctt cca gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat cag gaa ctc 634
Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Glu Leu
      180              185              190
aat aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt tcc ttt gac 682
Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser Phe Asp
      195              200              205              210

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 7B

```
atc gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg taataaagac 731
Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
                215                220
ttctcatgac tgtacttggt gca 754
```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 8

```

1 .....MEGSRDVLAVLVILAQLTASGSSYQIEGFQ 32
   :      || .|| | |: .|| | :
1 MAYSCQPLQESPLLGPRLRFIHLFVL.LLVGLLQI.SSGIVGQVKSVR 48
   :      : | | . : | . .||| . : | |
33 NVTVLKDSEAHFNCTVTHGWKLLMMTLNQMVVLSLTQGPPII...TNNRF 79
   .| : | | . : | . .||| . : | |
49 EKALL.SCDYKF.CSEEQSIHRIYWQKDKMVLVSVISGVPEVWPKYKNRT 96
   | | . : ||: || | . | | | | . | :
80 TVASYNSTDSEFISELIIHDVQPSDSGSVQCSLQNSHGFGSAFL...SVQ 125
   | | . : ||: || | . | | | | . | :
97 VVDIANNYSFSLGLIL.....SDRGTYTCVVQRYEG.GSYVVKHLITVE 140
   . . | . | | | | : ||: | | | : || | |
126 VMGTLNIPSNLIVTEGEPC...NVTCTYAVGWTSPLDISWELEVPVSHS 171
   . . | . | | | | : ||: | | | : || | |
141 LSVRADFPTPN.ITEYGNPSADIKRITCFASGGFPKPRLSW.LENGRELN 188
   | : : | : | | : | | . : | | | |
172 SYNSFL..EP.GNFMRLSVLDLTPLGNGTLTCVAELKDLQASKSLTVNL 218
   | : : | : | | : | | . : | | | |
189 GINTTISQDPESSELYTISQDQFNATYDHFIDCFIEYGDARVSO...NF 234
   | | | | | | | | | | | | | | | |
219 TVVQPPDSIGESGPALPTW.....AIIILAVAFSLLLILLIIVLIIF 261
   | | | | | | | | | | | | | | | |
235 TWVKPPDPDPDEKQTVFPFAGPDVAKAIIIFIAITVIAVIAAIIIF 284
   | | | | | | | | | | | | | | | |
262 CCCASRR.EKEESTYQNEIRKSANMRTNKADPETKLKSGKENYGYSSDE 310
   | | | | | | | | | | | | | | |
285 CITVKFRRCPRRRNEASRETNKLYIGPVEAAAEQTV..... 321

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

FIG. 9

```

1 .....MGLVIFLHSGSGSGNEVIEGPGQATVLKGSQARFNCTVSO 39
: . : | | | : : | | | | | | | | | | | | | | | |
1 MEGSWRDVLAVLVILAQLTASGSSVQIIEGPGQNVTVLKDSEAHFNCTVTH 50
40 GWKLIMWALSDMVVLSVRPMEPIITNDRFTSQRYDQGGNPTSEMIHNV 89
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
51 GWKLLMWTLNQMVVLSLTQGPITNNRPTYASYNSTDSEFISELIIHDVQ 100
90 PSDSGNIRCSLQNSRLHGSAYLTVQVMGELFIPSVNLVVAENEPCEVTCL 139
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
101 PSDSGSVQCQLQNSHGFGSAFLSVQVMGTLNIPSNLIVTEGEPNVTCTY 150
140 PSHWTELPDISWELGLLVSHSSYIFVPEPSDLQSAVSLALTFQSNGLT 189
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
151 AVGWTSPLDISWELEVPSVSHSSYNFLEPGNFMRLSVLDLTLPLGNGLT 200
190 CVATWKSLLKARKSATVNLTVIRCPQDTGGGINIPGVLSLPSLGFSLPTW 239
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
201 CVAELKDLQASKSLTVNLTVVQPPD.....SIGEEGPALPTW 238
240 GKVGLGLAGTMLLTFTCTLIRCCCCRRCCGCNCCCRCCFCCRRKRGRF 289
: | . | : | | | | | | | | | | | | | | | |
239 AIIILLAVAFSLLLLIIIVLIIIFCCC.....CASR.....REKEEST 275
290 IQFQ.KKSHKEKINK...ETETESGNENSGYNSDBQKTTDTASLPPKSCE 335
| : : | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
276 YQNEIRKSANMRINKADPETKLKSGKENYGYSSDEAKAAQTASLPPKSAE 325
336 SSDPEQRNSSCGPPHQRADQRP RPASHPOASEPNLASPEKVSNTTVV* 383
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
326 VSLPEKRSSL..PYQELNKHQGPATHPRVSFDIASPKVRNVTLV* 371

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

SEQUENCE LISTING

<110> Welcher, Andrew
Sarmiento, Ulla
Schultz, Henry
Chute, Hilary

<120> E7-Like Molecules and Uses Thereof

<130> 01-668-A

<140>

<141>

<150> 60/214,512

<151> 2000-06-28

<150> 09/729,264

<151> 2000-11-28

<160> 17

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 1175

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (27)..(1172)

<400> 1

```

ctgtctgccc atctgaataa caagag atg ggg ctt gtg att ttc ctc cac ggt 53
                Met Gly Leu Val Ile Phe Leu His Gly
                1           5

tct ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc cag aat gca aca gtc 101
Ser Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Thr Val
10           15           20           25

ctg aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg 149
Leu Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp
30           35           40

aag ctc atc atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg 197
Lys Leu Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg
45           50           55

ccc atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac 245
Pro Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr
60           65           70

gac cag ggc ggg aac ttc acc tcg gag atg atc atc cac aat gtg gag 293
Asp Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu
75           80           85

ccc agt gat tcg ggg aac atc aga tgc ayc ctc cag aac agt cgc ctg 341
Pro Ser Asp Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu
90           95           100           105

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

cat gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att 389
His Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile
110 115 120

ccc agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cot tgt gaa gtt act 437
Pro Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr
125 130 135

tgt cta ccc tca cac tgg acc cgg ctc cgg gat att tcc tgg gag ctc 485
Cys Leu Pro Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu
140 145 150

ggc ctc ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag ccc agc 533
Gly Leu Leu Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser
155 160 165

gac ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag agc aat 581
Asp Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn
170 175 180 185

ggg act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag 629
Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys
190 195 200

tct gca act gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga 677
Ser Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly
205 210 215

ggg ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta cgg agt tta ggt 725
Gly Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly
220 225 230

ttt tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc 773
Phe Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr
235 240 245

atg ctt ctg acg cgg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc 821
Met Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys
250 255 260 265

cgc cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc 869
Arg Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys
270 275 280

tgt aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa tct gaa 917
Cys Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu
285 290 295

aaa gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat gaa aac 965
Lys Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn
300 305 310

tcc ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gac acc gct tct ctc 1013
Ser Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu
315 320 325

cct ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac agt agc 1061
Pro Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser
330 335 340 345

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

tgt ggc cct cct cac cag cgg gct gat caa cgt cca ccc agg cca gca 1109
 Cys Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala
 350 355 360

agt cat cca cag gct tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag gtc agt 1157
 Ser His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser
 365 370 375

aat aca act gta gta tag 1175
 Asn Thr Thr Val Val
 380

<210> 2
 <211> 382
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Gly Leu Val Ile Phe Leu His Gly Ser Gly Ser Gly Asn Glu Val
 1 5 10 15

Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Thr Val Leu Lys Gly Ser Gln Ala Arg
 20 25 30

Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile Met Trp Ala Leu
 35 40 45

Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu Pro Ile Ile Thr
 50 55 60

Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly Gly Asn Phe Thr
 65 70 75 80

Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp Ser Gly Asn Ile
 85 90 95

Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His Gly Ser Ala Tyr Leu Thr
 100 105 110

Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val Asn Leu Val Val
 115 120 125

Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro Ser His Trp Thr
 130 135 140

Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu Val Ser His Ser
 145 150 155 160

Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ala Val Ser
 165 170 175

Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala
 180 185 190

Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr Val Asn Leu Thr
 195 200 205

Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile Asn Ile Pro Gly
 210 215 220

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu Pro Thr Trp Gly
 225 230 235 240
 Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu Thr Pro Thr Cys
 245 250 255
 Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg Arg Arg Cys Cys Gly Cys
 260 265 270
 Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg Lys Arg Gly Phe
 275 280 285
 Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu Lys Glu Lys Thr Asn Lys Glu
 290 295 300
 Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn Ser Gly Tyr Asn Ser Asp Glu
 305 310 315 320
 Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Cys Glu Ser
 325 330 335
 Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser Cys Gly Pro Pro His Gln Arg
 340 345 350
 Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala Ser His Pro Gln Ala Ser Phe
 355 360 365
 Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser Asn Thr Thr Val Val
 370 375 380

<210> 3
 <211> 1168
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (8)..(1165)

<400> 3
 agtggatc atg gtg gca gga gcc atg gaa aat aga gac cca ccc ggt tct 49
 Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Pro Gly Ser
 1 5 10
 ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc caa aat gca aga gtc ctg 97
 Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu
 15 20 25 30
 aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg aag 145
 Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys
 35 40 45
 ctc atc atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg ccc 193
 Leu Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro
 50 55 60
 atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac gac 241
 Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp
 65 70 75

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

cag ggc ggg aac ttc acc tog gag atg atc atc cac aat gtg gag ccc 289
Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro
80 85 90

agt gat tog ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt cgc ctg cat 337
Ser Asp Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His
95 100 105 110

gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att ccc 385
Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro
115 120 125

agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa gtt act tgt 433
Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys
130 135 140

cta ccc tca cac tgg acc tgg ctc cgg gat att tcc tgg gag ctc ggt 481
Leu Pro Ser His Trp Thr Trp Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly
145 150 155

ctc ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt cgg gag ccc agc gac 529
Leu Leu Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp
160 165 170

ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc caa cag agc aat ggg 577
Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly
175 180 185

act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag tct 625
Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser
195 200 205

gca act gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga ggt 673
Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly
210 215 220

ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta cgg agt tta ggt ttt 721
Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe
225 230 235

tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc atg 769
Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met
240 245 250

ctt ctg acg cgg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc cgc 817
Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg
255 260 265 270

cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc tgt 865
Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys
275 280 285

aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa tct gaa aaa 913
Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu Lys
290 295 300

gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat gaa aac tcc 961
Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn Ser
305 310 315

ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gac acc gct tct ctc cct 1009

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu Pro
 320 325 330

ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac agt agc tgt 1057
 Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser Cys
 335 340 345 350

ggc cct cct cac cag ogg gct gat caa cgt cca ccc agg cca gca agt 1105
 Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala Ser
 355 360 365

cat cca cag gct tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag gtc agt aat 1153
 His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser Asn
 370 375 380

aca act gta gta tag 1168
 Thr Thr Val Val
 385

<210> 4
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4
 Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Pro Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15

Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gly
 20 25 30

Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile
 35 40 45

Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu
 50 55 60

Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly
 65 70 75 80

Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp
 85 90 95

Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His Gly Ser
 100 105 110

Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val
 115 120 125

Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro
 130 135 140

Ser His Trp Thr Trp Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu
 145 150 155

Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln
 165 170 175

Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu
 180 185 190

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile
 210 215 220
 Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu
 225 230 235 240
 Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu
 245 250 255
 Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Arg Arg Arg
 260 265 270
 Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg
 275 280 285
 Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu Lys Glu Lys
 290 295 300
 Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn Ser Gly Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Asp Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys
 325 330 335
 Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser Cys Gly Pro
 340 345 350
 Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala Ser His Pro
 355 360 365
 Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser Asn Thr Thr
 370 375 380
 Val Val
 385

 <210> 5
 <211> 1240
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> CDS
 <222> (80)..(1237)

 <400> 5
 aggtgtgagt ccagccaaca gtgtggatca gtttcttagg ctgcataac aaagcaccat 60

 aacctgggtg cttagaaca atg gaa agg cat ttg ctc acg gtt cca gaa gct 112
 Met Glu Arg His Leu Leu Thr Val Pro Glu Ala
 1 5 10

 gta ggt tct ggg tct ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc cag aat gca 160
 Val Gly Ser Gly Ser Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala
 15 20 25

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

aca gtc ctg aag ggc tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag 208
Thr Val Leu Lys Gly Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln
      30              35              40

ggc tgg aag ctg atc atg tgg gct ctg agt gac atg gtg gtg cta agc 256
Gly Trp Lys Leu Ile Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser
      45              50              55

gtc agg ccc atg atg gag ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag 304
Val Arg Pro Met Glu Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln
      60              65              70              75

agg tac gac cag ggc ggg aac ttc acc tgc gag atg atc atc cgc aat 352
Arg Tyr Asp Gln Gly Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn
      80              85              90

gtg gag ccc agt gat tgc ggg aac atc aga tgc agc ctg cag aac agt 400
Val Glu Pro Ser Asp Ser Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser
      95              100             105

cgc ctg cat gga tct gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg 448
Arg Leu His Gly Ser Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu
      110             115             120

ttc att ccc agt gtt aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa 496
Phe Ile Pro Ser Val Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu
      125             130             135

gtt act tgt cta ccc tca cac tgg acc cgg ctg ccg gat att tcc tgg 544
Val Thr Cys Leu Pro Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp
      140             145             150             155

gag ctg ggt ctg ctg gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag 592
Glu Leu Gly Leu Leu Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu
      160             165             170

ccc agc gac ctt caa agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag 640
Pro Ser Asp Leu Gln Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln
      175             180             185

agc aat ggg act ttg act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc 688
Ser Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala
      190             195             200

cgc aag tct gca act gta aat ctg act gtg att cgg tgt ccc caa gac 736
Arg Lys Ser Ala Thr Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp
      205             210             215

act gga ggt ggt att aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt 784
Thr Gly Gly Gly Ile Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser
      220             225             230             235

tta ggt ttt tca ttg cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca 832
Leu Gly Phe Ser Leu Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala
      240             245             250

ggc acc atg ctt ctg acg cgg acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc 880
Gly Thr Met Leu Leu Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys
      255             260             265

tgc tgc cgc cgt cgt tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt 928

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Cys Cys Arg Arg Arg Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys
 270 275 280
 ttc tgc tgt aga aga aaa aga gga ttt cgt att caa ttt caa aag aaa 976
 Phe Cys Cys Arg Arg Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys
 285 290 295
 tct gaa aaa gag aag aca aac aaa gaa act gag aca gaa agt gga aat 1024
 Ser Glu Lys Glu Lys Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn
 300 305 310 315
 gaa aac tcc ggc tac aat tca gat gaa caa aag acc aca gaa acc gct 1072
 Glu Asn Ser Gly Tyr Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Glu Thr Ala
 320 325 330
 tct ctc cct ccc aaa tcc tgt gaa tcc agt gat cct gaa caa aga aac 1120
 Ser Leu Pro Pro Lys Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn
 335 340 345
 agt agc tgt ggc cct cct cac cag cgg gct gat caa cgt cca ccc agg 1168
 Ser Ser Cys Gly Pro Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg
 350 355 360
 cca gca agt cat cca cag gct tct ttt aat ctg gcc agt cct gag aag 1216
 Pro Ala Ser His Pro Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys
 365 370 375
 gtc agt aat aca act gta gta tag 1240
 Val Ser Asn Thr Thr Val Val
 380 385

<210> 6
 <211> 386
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6
 Met Glu Arg His Leu Leu Thr Val Pro Glu Ala Val Gly Ser Gly Ser
 1 5 10 15
 Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Thr Val Leu Lys Gly
 20 25 30
 Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile
 35 40 45
 Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu
 50 55 60
 Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly
 65 70 75 80
 Gly Asn Phe Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp
 85 90 95
 Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His Gly Ser
 100 105 110
 Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val
 115 120 125

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro
 130 135 140
 Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu
 145 150 155 160
 Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu
 180 185 190
 Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile
 210 215 220
 Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu
 225 230 235 240
 Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu
 245 250 255
 Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg Arg Arg
 260 265 270
 Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg
 275 280 285
 Lys Arg Gly Phe Arg Ile Gln Phe Gln Lys Lys Ser Glu Lys Glu Lys
 290 295 300
 Thr Asn Lys Glu Thr Glu Thr Glu Ser Gly Asn Glu Asn Ser Gly Tyr
 305 310 315 320
 Asn Ser Asp Glu Gln Lys Thr Thr Glu Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys
 325 330 335
 Ser Cys Glu Ser Ser Asp Pro Glu Gln Arg Asn Ser Ser Cys Gly Pro
 340 345 350
 Pro His Gln Arg Ala Asp Gln Arg Pro Pro Arg Pro Ala Ser His Pro
 355 360 365
 Gln Ala Ser Phe Asn Leu Ala Ser Pro Glu Lys Val Ser Asn Thr Thr
 370 375 380
 Val Val
 385

<210> 7
 <211> 1139
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(1131)

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

<400> 7
atg gtg gca gga gcc atg gaa aat aga gac cca ccc ggt tct ggg tct 49
Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Gly Ser Gly Ser
1 5 10 15

ggt aat gaa gtc ata gaa ggc ccc caa aat gca aga gtc ctg aag ggc 96
Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gly
20 25 30

tcc cag gct cgc ttc aac tgc acc gtc tcc cag ggc tgg aag ctc atc 144
Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile
35 40 45

atg tgg gct ctc agt gac atg gtg gtg cta agc gtc agg ccc atg gag 192
Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu
50 55 60

ccc atc atc acc aat gac cgc ttc acc tct cag agg tac gac cag ggc 240
Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly
65 70 75 80

ggg aac ctc acc tgc gag atg atc atc cac aat gtg gag ccc agt gat 288
Gly Asn Leu Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp
85 90 95

tcg ggg aac atc aga tgc agc ctc cag aac agt cgc ctg cat gga tct 336
Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Asn Ser Arg Leu His Gly Ser
100 105 110

gct tac ctt acc gtc caa gtt atg gga gag ctg ttc att ccc agt gtt 384
Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val
115 120 125

aat ctt gta gtc gct gag aat gaa cct tgt gaa gtt act tgt cta ccc 432
Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro
130 135 140

tca cac tgg acc cgg ctc ccg gat att tcc tgg gag ctc ggt ctc ctg 480
Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu
145 150 155 160

gtc agc cat tca agc tat tat ttt gtt ccg gag ccc agc gac ctt caa 528
Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln
165 170 175

agt gca gtg agc atc ctg gct ctg acc cca cag agc aat ggg act ttg 576
Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu
180 185 190

act tgc gtg gct acc tgg aag agc ctg aag gcc cgc aag tct gca act 624
Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr
195 200 205

gta aat ctc act gtg att cgg tgt ccc caa gac act gga ggt ggt att 672
Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile
210 215 220

aat att cca ggt gta tta tca agt tta ccg agt tta ggt ttt tca ttg 720
Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu
225 230 235 240

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

cct act tgg ggc aaa gtt gga ctt gga cta gca ggc acc atg ctt ctg 768
Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu
      245      250      255

acg cag acg tgt act ctt aca ata cgc tgc tgc tgc tgc cgc cgt cgt 816
Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Cys Arg Arg Arg
      260      265      270

tgt tgt ggc tgc aac tgc tgc tgc cgt tgt tgt ttc tgc tgt aga aga 864
Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg
      275      280      285

aaa aga gga aat ctg aaa aag aga aga caa aca aag aaa ctg aga cag 912
Lys Arg Gly Asn Leu Lys Lys Arg Arg Gln Thr Lys Lys Leu Arg Gln
      290      295      300

aaa gtg gaa atg aag act cgc gct aca att cag atg aac aaa aga cca 960
Lys Val Glu Met Lys Thr Pro Ala Thr Ile Gln Met Asn Lys Arg Pro
      305      310      315

cag aca cgc ctt ctc tcc ctc cca aat cct gtg aat cca gtg atc ctg 1008
Gln Thr Pro Leu Leu Ser Leu Pro Asn Pro Val Asn Pro Val Ile Leu
      325      330      335

aac aaa gaa aca gta gct gtg gcc ctc ctc acc agc ggg ctg atc aac 1056
Asn Lys Glu Thr Val Ala Val Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Ile Asn
      340      345      350

gtc cac cca ggc cag caa gtc atc cac agg ctt ctt tta atc tgg cca 1104
Val His Pro Gly Gln Gln Val Ile His Arg Leu Leu Leu Ile Trp Pro
      355      360      365

gtc ctg aga agg tca gta ata caa ctg tagtataa 1139
Val Leu Arg Arg Ser Val Ile Gln Leu
      370      375

<210> 8
<211> 377
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 8
Met Val Ala Gly Ala Met Glu Asn Arg Asp Pro Pro Gly Ser Gly Ser
  1      5      10      15

Gly Asn Glu Val Ile Glu Gly Pro Gln Asn Ala Arg Val Leu Lys Gly
      20      25      30

Ser Gln Ala Arg Phe Asn Cys Thr Val Ser Gln Gly Trp Lys Leu Ile
      35      40      45

Met Trp Ala Leu Ser Asp Met Val Val Leu Ser Val Arg Pro Met Glu
      50      55      60

Pro Ile Ile Thr Asn Asp Arg Phe Thr Ser Gln Arg Tyr Asp Gln Gly
      65      70      75      80

Gly Asn Leu Thr Ser Glu Met Ile Ile His Asn Val Glu Pro Ser Asp
      85      90      95

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Ser Gly Asn Ile Arg Cys Ser Leu Gln Asn Ser Arg Leu His Gly Ser
 100 105 110
 Ala Tyr Leu Thr Val Gln Val Met Gly Glu Leu Phe Ile Pro Ser Val
 115 120 125
 Asn Leu Val Val Ala Glu Asn Glu Pro Cys Glu Val Thr Cys Leu Pro
 130 135 140
 Ser His Trp Thr Arg Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu Gly Leu Leu
 145 150 155 160
 Val Ser His Ser Ser Tyr Tyr Phe Val Pro Glu Pro Ser Asp Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ala Val Ser Ile Leu Ala Leu Thr Pro Gln Ser Asn Gly Thr Leu
 180 185 190
 Thr Cys Val Ala Thr Trp Lys Ser Leu Lys Ala Arg Lys Ser Ala Thr
 195 200 205
 Val Asn Leu Thr Val Ile Arg Cys Pro Gln Asp Thr Gly Gly Gly Ile
 210 215 220
 Asn Ile Pro Gly Val Leu Ser Ser Leu Pro Ser Leu Gly Phe Ser Leu
 225 230 235 240
 Pro Thr Trp Gly Lys Val Gly Leu Gly Leu Ala Gly Thr Met Leu Leu
 245 250 255
 Thr Pro Thr Cys Thr Leu Thr Ile Arg Cys Cys Cys Arg Arg Arg
 260 265 270
 Cys Cys Gly Cys Asn Cys Cys Cys Arg Cys Cys Phe Cys Cys Arg Arg
 275 280 285
 Lys Arg Gly Asn Leu Lys Lys Arg Arg Gln Thr Lys Lys Leu Arg Gln
 290 295 300
 Lys Val Glu Met Lys Thr Pro Ala Thr Ile Gln Met Asn Lys Arg Pro
 305 310 315 320
 Gln Thr Pro Leu Leu Ser Leu Pro Asn Pro Val Asn Pro Val Ile Leu
 325 330 335
 Asn Lys Glu Thr Val Ala Val Ala Leu Leu Thr Ser Gly Leu Ile Asn
 340 345 350
 Val His Pro Gly Gln Gln Val Ile His Arg Leu Leu Leu Ile Trp Pro
 355 360 365
 Val Leu Arg Arg Ser Val Ile Gln Leu
 370 375

<210> 9
 <211> 1195
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

WO 02/00710

PCT/US01/20719

<220>

<221> CDS

<222> (53)..(1162)

<400> 9

```

gtgaacgaga tacagagatt tacctgcotg aggttaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
Met Glu
1

ggc agc tgg aga gat gtc ctg gct gtg ctg gtc atc ctg gct cag ctg 106
Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala Gln Leu
5 10 15

aca gct tcc gga tcc agt tat cag atc ata gaa ggt cct cag aat gta 154
Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln Asn Val
20 25 30

aca gtc cta aag gac tca gag gct cac ttc aac tgc acc gtg act cac 202
Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val Thr His
35 40 45 50

ggc tgg aag ctt ctc atg tgg act ctt aac caa atg gtg gtg ctg agt 250
Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val Leu Ser
55 60 65

ctc acc acc caa gga ccc atc atc acc aac aac cgc ttc acc tat gcc 298
Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr Tyr Ala
70 75 80

agt tac aac agc act gac agc ttc atc tcg gag ttg atc atc cat gat 346
Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile His Asp
85 90 95

gtg cag ccc agt gac tcg gga tcc gtg caa tgc agc ctg cag aac agc 394
Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln Asn Ser
100 105 110

cat ggg ttt gga tot gcc ttc ctc tca gtg caa gtc atg ggg acc ctg 442
His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Val Met Gly Thr Leu
115 120 125 130

aac att cct agc aac aac ctt ata gtc act gag ggt gaa ccc tgt aat 490
Asn Ile Pro Ser Asn Asn Leu Ile Val Thr Glu Gly Glu Pro Cys Asn
135 140 145

gtg act tgc tat gcc gtg ggc tgg acc tca ctc cag gat att tcc tgg 538
Val Thr Cys Tyr Ala Val Gly Trp Thr Ser Leu Pro Asp Ile Ser Trp
150 155 160

gag ctt gag gtt ccc gta agc cat tcg agt tac aat tcc ttt ctg gag 586
Glu Leu Glu Val Pro Val Ser His Ser Ser Tyr Asn Ser Phe Leu Glu
165 170 175

ccg ggc aac ttt atg agg gtc ttg agt gtc ctg gac ctc aca cca ctg 634
Pro Gly Asn Phe Met Arg Val Leu Ser Val Leu Asp Leu Thr Pro Leu
180 185 190

ggc aac ggg acc ttg act tgt gtg gca gag ctg aag gac ttg cag gcc 682
Gly Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Glu Leu Lys Asp Leu Gln Ala
195 200 205 210

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

agc aag tcc tta act gtc aac ctg act gtg gtt cag cct cca' cct' gac 730
Ser Lys Ser Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Val Gln Pro Pro Pro Asp
215 220 225

agt att gga gag gaa ggc cca gca ctg cgg acc tgg gcc atc atc ctg 778
Ser Ile Gly Glu Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile Ile Leu
230 235 240

ctg gca gtg gcc ttt tcc ttg ctc ttg atc ctg atc att gtt ttg att 826
Leu Ala Val Ala Phe Ser Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val Leu Ile
245 250 255

ata ata ttc tgt tgc tgt gtc tcc agg aga gaa aag gaa gaa tot 874
Ile Ile Phe Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu Glu Ser
260 265 270

act tat caa aat gaa ata agg aaa tct gca aac atg agg aca aac aaa 922
Thr Tyr Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys
275 280 285 290

gca gat cgg gag aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac 970
Ala Asp Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr
295 300 305

agt tgg gat gag gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa 1018
Ser Ser Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys
310 315 320

tct gct gaa gtc agc ctt cca gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat 1066
Ser Ala Glu Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr
325 330 335

cag gaa ctc aat aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt 1114
Gln Glu Leu Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val
340 345 350

tcc ttt gac atc gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg 1162
Ser Phe Asp Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
355 360 365 370

taataaagac ttctcatgac tgtacttggt gca 1195

<210> 10
<211> 370
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 10
Met Glu Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala
1 5 10 15

Gln Leu Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln
20 25 30

Asn Val Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val
35 40 45

Thr His Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val
50 55 60

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Leu Ser Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ala Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile
 85 90 95
 His Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln
 100 105 110
 Asn Ser His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Val Met Gly
 115 120 125
 Thr Leu Asn Ile Pro Ser Asn Asn Leu Ile Val Thr Glu Gly Glu Pro
 130 135 140
 Cys Asn Val Thr Cys Tyr Ala Val Gly Trp Thr Ser Leu Pro Asp Ile
 145 150 155 160
 Ser Trp Glu Leu Glu Val Pro Val Ser His Ser Ser Tyr Asn Ser Phe
 165 170 175
 Leu Glu Pro Gly Asn Phe Met Arg Val Leu Ser Val Leu Asp Leu Thr
 180 185 190
 Pro Leu Gly Asn Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Glu Leu Lys Asp Leu
 195 200 205
 Gln Ala Ser Lys Ser Leu Thr Val Asn Leu Thr Val Val Gln Pro Pro
 210 215 220
 Pro Asp Ser Ile Gly Glu Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile
 225 230 235 240
 Ile Leu Leu Ala Val Ala Phe Ser Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val
 245 250 255
 Leu Ile Ile Ile Phe Cys Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu
 260 265 270
 Glu Ser Thr Tyr Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr
 275 280 285
 Asn Lys Ala Asp Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr
 290 295 300
 Gly Tyr Ser Ser Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro
 305 310 315 320
 Pro Lys Ser Ala Glu Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu
 325 330 335
 Pro Tyr Gln Glu Leu Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro
 340 345 350
 Arg Val Ser Phe Asp Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr
 355 360 365
 Leu Val
 370

PCT/US01/20719

<400> 11
gtgaacgaga tacagagatt tacctgcctg aggtaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
Met Glu
1

ggc	agc	tgg	aga	tgc	ctg	gct	gtg	ctg	gtc	atc	ctg	gct	cag	ctg	106	
Gly	Ser	Trp	Arg	Asp	Val	Leu	Ala	Val	Leu	Val	Ile	Ala	Gln	Leu		
		5					10				15					
aca	gct	tcc	gga	tcc	agt	tat	cag	atc	ata	gaa	ggt	cct	cag	aat	gta	154
Thr	Ala	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Gln	Ile	Ile	Glu	Gly	Pro	Gln	Asn	Val	
	20					25					30					
aca	gtc	cta	aag	gac	tca	gag	gct	cac	ttc	aac	tgc	act	gtg	act	cac	202
Thr	Val	Leu	Lys	Asp	40	Gly	Ala	His	Phe	Asn	Cys	Thr	Val	Thr	His	
	35						45								50	
ggc	tgg	aga	ctt	ctc	tgt	tgg	act	ctt	aac	caa	atg	gtg	gtg	ctg	agt	250
Gly	Trp	Lys	Leu	Met	Thr	Trp	Thr	Leu	Asn	Gln	Met	Val	Val	Leu	Ser	
			55					60							65	
ctc	acc	acc	caa	gga	ccc	atc	atc	acc	aac	aac	cgc	ttc	acc	tat	gcc	298
Leu	Thr	Thr	Gln	Gly	Pro	Ile	Ile	Thr	Asn	Asn	Asn	Arg	Phe	Thr	Tyr	Ala
			70					75						80		
agt	tac	aac	agc	act	gac	agc	ttc	atc	tgc	gag	ttg	atc	atc	cat	gat	346
Ser	Tyr	Asn	Ser	Thr	Asp	Ser	Phe	Ile	Ser	Glu	Leu	Ile	Ile	His	Asp	
		85					90					95				
gtg	cag	ccc	agt	gac	tog	gga	tcc	tgc	caa	tgc	agc	ctg	cag	aac	agc	394
Val	Gln	Pro	Ser	Asp	Ser	Gly	Ser	Val	Gln	Cys	Ser	Leu	Gln	Asn	Ser	
	100					105					110					
cat	ggg	ttt	gga	tct	gct	ttc	ctc	tca	gtg	caa	gac	agt	att	gga	gag	442
His	Gly	Phe	Gly	Ser	Ala	Phe	Leu	Ser	Val	Gln	Asp	Ser	Ile	Gly	Glu	
	115				120				125					130		
gaa	ggc	cca	gca	ctg	ccg	acc	tgg	gcc	atc	atc	ctg	ctg	gca	gtg	gcc	490
Glu	Gly	Pro	Ala	Leu	Pro	Thr	Trp	Ala	Ile	Ile	Leu	Leu	Ala	Val	Ala	
			135					140						145		
ttt	tcc	tgt	ctc	ttg	atc	ctg	atc	att	gtt	ttt	att	ata	ata	ttc	tgt	538
Thr	Ser	Leu	Leu	Leu	Ile	Ile	Ile	Val	Val	Leu	Ile	Ile	Ile	Phe	Cys	
		150					155							160		
tgc	tgt	tgt	gcc	tcc	agg	aga	gaa	agg	gaa	gaa	tct	act	tat	caa	aat	586
Cys	Cys	Cys	Ala	Ser	Arg	Arg	Glu	Lys	Glu	Glu	Ser	Thr	Tyr	Gln	Asn	
		165					170					175				
gaa	ata	agg	aaa	tct	gca	aac	atg	agg	aca	aaa	gca	gat	ccg	gag		634
Glu	Ile	Arg	Lys	Ser	Ala	Asn	Met	Arg	Thr	Asn	Lys	Ala	Asp	Pro	Glu	
	180					185					190					

WO 02/00710

PCT/US01/20719

aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac agt tog gat gag 682
 Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser Asp Glu
 195 200 205 210

gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa tct gct gaa gtc 730
 Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Ala Glu Val
 215 220 225

agc ctt cca gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat cag gaa ctc aat 778
 Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Glu Leu Asn
 230 235 240

aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt tcc ttt gac atc 826
 Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser Phe Asp Ile
 245 250 255

gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg taataaagac 872
 Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
 260 265 270

ttctcatgac tgtacttggt gca 895

<210> 12
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 12
 Met Glu Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala
 1 5 10 15

Gln Leu Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln
 20 25 30

Asn Val Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val
 35 40 45

Thr His Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val
 50 55 60

Leu Ser Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr
 65 70 75 80

Tyr Ala Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile
 85 90 95

His Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln
 100 105 110

Asn Ser His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Asp Ser Ile
 115 120 125

Gly Glu Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile Ile Leu Leu Ala
 130 135 140

Val Ala Phe Ser Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile
 145 150 155 160

Phe Cys Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu Glu Ser Thr Tyr

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

165          170          175
Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala Asp
180          185          190
Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser
195          200          205
Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Ala
210          215          220
Glu Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Glu
225          230          235          240
Leu Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser Phe
245          250          255
Asp Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
260          265          270

<210> 13
<211> 754
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (53)..(721)

<400> 13
gtgaacgaga tacagagatt tacctgcctg aggtaaggaa gatcatgctg ag atg gag 58
Met Glu
1

ggc agc tgg aga gat gtc ctg gct gtg ctg gtc atc ctg gct cag ctg 106
Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala Gln Leu
5          10          15

aca gct tcc gga tcc agt tat cag atc ata gaa ggt cct cag aat gta 154
Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln Asn Val
20          25          30

aca gtc cta aag gac tca gag gct cac ttc aac tgc acc gtg act cac 202
Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val Thr His
35          40          45          50

ggc tgg aag ctt ctc atg tgg act ctt aac caa atg gtg gtg ctg agt 250
Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val Leu Ser
55          60          65

ctc acc acc caa gga ccc atc atc acc aac cgc ttc acc tat gcc 298
Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr Tyr Ala
70          75          80

agt tac aac agc act gac agc ttc atc tcg gag ttg atc atc cat gat 346
Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile His Asp
85          90          95

gtg cag ccc agt gac tcg gga tcc gtg caa tgc agc ctg cag aac agc 394
Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln Asn Ser

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

100          105          110
cat ggg ttt gga tct gcc ttc ctc tca gtg caa gaa tct act tat caa 442
His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Glu Ser Thr Tyr Gln
115          120          125          130
aat gaa ata agg aaa tct gca aac atg agg aca aac aaa gca gat cgg 490
Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala Asp Pro
135          140          145
gag aca aag tta aaa agt gga aag gaa aac tac ggg tac agt tog gat 538
Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser Asp
150          155          160
gag gca aag gct gca cag act gca tct ctc cct cct aaa tct gct gaa 586
Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser Ala Glu
165          170          175
gtc agc ctt cca gaa aaa cgc agc agt agc ctt cct tat cag gaa ctc 634
Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Gln Glu Leu
180          185          190
aat aaa cat cag ccc ggt cca gca act cat cca cgg gtt tcc ttt gac 682
Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser Phe Asp
195          200          205          210
atc gcc agt cct cag aag gtc aga aat gtg act tta gtg taataaagac 731
Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
215          220
ttctcatgac tgaacttggt gca 754

<210> 14
<211> 223
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 14
Met Glu Gly Ser Trp Arg Asp Val Leu Ala Val Leu Val Ile Leu Ala
1          5          10          15
Gln Leu Thr Ala Ser Gly Ser Ser Tyr Gln Ile Ile Glu Gly Pro Gln
20          25          30
Asn Val Thr Val Leu Lys Asp Ser Glu Ala His Phe Asn Cys Thr Val
35          40          45
Thr His Gly Trp Lys Leu Leu Met Trp Thr Leu Asn Gln Met Val Val
50          55          60
Leu Ser Leu Thr Thr Gln Gly Pro Ile Ile Thr Asn Asn Arg Phe Thr
65          70          75          80
Tyr Ala Ser Tyr Asn Ser Thr Asp Ser Phe Ile Ser Glu Leu Ile Ile
85          90          95
His Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln
100          105          110
Asn Ser His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Glu Ser Thr

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

115 120 125
Tyr Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala
130 135 140
Asp Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser
145 150 155 160
Ser Asp Glu Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ala Ser Leu Pro Pro Lys Ser
165 170 175
Ala Glu Val Ser Leu Pro Glu Lys Arg Ser Ser Ser Leu Pro Tyr Gln
180 185 190
Glu Leu Asn Lys His Gln Pro Gly Pro Ala Thr His Pro Arg Val Ser
195 200 205
Phe Asp Ile Ala Ser Pro Gln Lys Val Arg Asn Val Thr Leu Val
210 215 220

<210> 15
<211> 631
<212> PRT
<213> Rattus rattus

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

WO 02/00710

PCT/US01/20719

```

180          185          190
His Asp Val Gln Pro Ser Asp Ser Gly Ser Val Gln Cys Ser Leu Gln
195          200          205
Asn Ser His Gly Phe Gly Ser Ala Phe Leu Ser Val Gln Val Tyr Asp
210          215          220
Ile Ala Asn Asn Tyr Ser Phe Ser Leu Leu Gly Leu Ile Leu Ser Asp
225          230          235          240
Arg Gly Thr Tyr Thr Cys Val Val Gln Arg Tyr Glu Gly Gly Ser Tyr
245          250          255
Val Val Lys His Leu Thr Thr Val Glu Val Met Gly Thr Leu Asn Ile
260          265          270
Pro Ser Asn Asn Leu Ile Val Thr Glu Gly Glu Pro Cys Asn Val Thr
275          280          285
Cys Tyr Ala Val Gly Trp Thr Ser Leu Pro Asp Ile Ser Trp Glu Leu
290          295          300
Glu Val Pro Val Ser His Ser Leu Ser Val Arg Ala Asp Phe Pro Thr
305          310          315          320
Pro Asn Ile Thr Glu Tyr Gly Asn Pro Ser Ala Asp Ile Lys Arg Ile
325          330          335
Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Leu Ser Trp Leu
340          345          350
Glu Asn Gly Arg Glu Leu Asn Ser Tyr Asn Ser Phe Leu Glu Pro Gly
355          360          365
Asn Phe Met Arg Val Leu Ser Val Leu Asp Leu Thr Pro Leu Gly Asn
370          375          380
Gly Thr Leu Thr Cys Val Ala Glu Leu Lys Asp Leu Gln Ala Ser Lys
385          390          395          400
Ser Leu Thr Val Asn Leu Gly Ile Asn Thr Thr Ile Ser Gln Asp Pro
405          410          415
Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp Phe Asn Ala Thr
420          425          430
Tyr Asp His Phe Ile Asp Cys Phe Ile Glu Tyr Gly Asp Ala His Val
435          440          445
Ser Gln Asn Phe Thr Val Val Gln Pro Pro Asp Ser Ile Gly Glu
450          455          460
Glu Gly Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ala Ile Ile Leu Leu Ala Val Ala
465          470          475          480
Phe Ser Leu Leu Leu Ile Leu Ile Ile Val Leu Ile Ile Ile Phe Thr
485          490          495
Trp Val Lys Pro Pro Glu Asp Pro Pro Asp Glu Lys Gln Thr Val Pro
500          505          510

```

WO 02/00710

PCT/US01/20719

Phe Ala Trp Ala Gly Pro Asp Ala Val Lys Ala Ile Ile Ile Phe Phe
 515 520 525
 Ile Ala Ile Thr Val Ile Ala Val Ile Ala Ala Ile Ala Ile Ile Ile
 530 535 540
 Phe Cys Cys Cys Cys Ala Ser Arg Arg Glu Lys Glu Glu Ser Thr Tyr
 545 550 555 560
 Gln Asn Glu Ile Arg Lys Ser Ala Asn Met Arg Thr Asn Lys Ala Asp
 565 570 575
 Pro Glu Thr Lys Leu Lys Ser Gly Lys Glu Asn Tyr Gly Tyr Ser Ser
 580 585 590
 Asp Glu Cys Ile Thr Val Lys Phe Arg Arg Cys Phe Arg Arg Arg Asn
 595 600 605
 Glu Ala Ser Arg Glu Thr Asn Lys Asn Leu Tyr Ile Gly Pro Val Glu
 610 615 620
 Ala Ala Ala Glu Gln Thr Val
 625 630

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Human immunodeficiency virus type 1

<400> 16
 Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 17
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: internalizing
 domain derived from HIV tat protein

<400> 17
 Gly Gly Gly Gly Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10 15

【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
3 January 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/000710 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
C07K 14/705, 16/28, A61K 38/17, G01N 33/53, C12N
15/86, A01K 67/027Henry, J. [US/US]; 21827 Parvin Drive, Santa Clarita,
CA 91350 (US). CHUTE, Hilary, T. [US/US]; 26005-F
Alizia Canyon Drive, Calabasas, CA 91350 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20719

(74) Agent: ZUHN, Donald, L.; McDonnell Boehnen Hulbert
& Berghoff, Suite 3200, 300 South Wacker Drive, Chicago,
IL 60606 (US).

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/214,512 28 June 2000 (28.06.2000) US
09/729,264 28 November 2000 (28.11.2000) 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, 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, SL, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(63) Related by continuation (CON) or continuation-in-part
(CIP) to earlier applications:
US 09/729,264 (CON)
Filed on 28 November 2000 (28.11.2000)
US 60/214,512 (CON)
Filed on 28 June 2000 (28.06.2000)(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, NI, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): AMGEN,
INC. [US/US]; One Amgen Center Drive, Thousand Oaks,
CA 91320 (US).Published:
with international search report(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): WELCHER, An-
drew, A. [US/US]; 1175 Church Street, Ventura, CA
93001 (US). SARMIENTO, Ulla, M. [CA/US]; 11340
Broadview Drive, Moorpark, CA 93021 (US). SCHULTZ,For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/000710 A3

(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.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20719
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/705 C07K16/28 A61K38/17 G01N33/53 C12N15/86 A01K67/027		
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 C12N C07K A61K		
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) BIOSIS, MEDLINE, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim no.
X	DATABASE EMBL 8 May 2000 (2000-05-08) HATTORI M ET AL.: "Homo sapiens chromosome 21 segment HS21C080" Database accession no. AL163280 XP002201581 nt 268445-268842 are 93% identical to nt 42-434 in SEQ 1	1-3
A	WO 00 08057 A (BAUM PETER ROBERT; IMMUNEX CORPORATION) 17 February 2000 (2000-02-17) the whole document	1-55
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
7 June 2002		26/06/2002
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5518 Patentium 2 NL - 2260 HW Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 551 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Cupido, M

Form: PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/20719
C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE SWISS-PROT 1 October 2000 (2000-10-01) "IGSF5 protein (fragment)" Database accession no. Q9NSI5 XP002201582 Q9NSI5 is 99.6% identical to aa 10-324 in SEQ 2 -----	13-17

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/20719**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

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

Remark on Protest

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

International Application No. PCT/US 01/20719

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box 1.2

Claims 18 and 19 a binding agent or fragment thereof that specifically binds the B7-like molecules of the application, without giving a true technical characterisation of such a binding agent. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating antibodies specific for these B7-like molecules.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 01/20719

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0008057	A	17-02-2000	AU 5550499 A
			EP 1108042 A2
			WO 0008057 A2
			28-02-2000
			20-06-2001
			17-02-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 5/14	A 6 1 P 7/04	4 C 0 8 4
A 6 1 P 7/04	A 6 1 P 7/06	4 H 0 4 5
A 6 1 P 7/06	A 6 1 P 7/08	
A 6 1 P 7/08	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 9/00	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 9/10	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 11/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 17/00	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 25/28	
A 6 1 P 25/28	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/00	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 37/08	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 39/00	A 6 1 P 39/00	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 43/00	1 0 5
C 0 7 K 14/47	A 6 1 P 43/00	1 1 1
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 16/18	
C 1 2 N 1/15	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 15/02	C 1 2 P 21/02	C
C 1 2 P 21/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/58	G 0 1 N 33/58	Z
G 0 1 N 37/00	G 0 1 N 37/00	1 0 2
// C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	C
	C 1 2 N 15/00	F
	C 1 2 N 5/00	A
	A 6 1 K 37/02	
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,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

(72)発明者 ウェルチャー, アンドリュー エイ.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 0 1, ベンチュラ, チャーチ ストリート 1 1 7

5

- (72)発明者 サーミエント, ウラ エム.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 3 0 2 1, ムーアパーク, ブロードビュー ドライブ
1 1 3 4 0
- (72)発明者 シュルツ, ヘンリー ジェイ.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 5 0, サンタ クラリタ, パルビン ドライブ 2
1 8 2 7
- (72)発明者 チュテ, ヒラリー ティー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 1 3 5 0, カラバサス, アリジア キャニオン ドライ
ブ 2 6 0 0 5-エフ

F ターム(参考) 2G045 AA29 AA34 AA35 BB10 BB14 BB20 BB24 BB29 BB46 BB51
CB01 DA13 DA36 FB02 FB03 FB05 FB08 FB09
4B024 AA01 AA11 BA44 BA80 CA04 CA09 DA02 DA05 DA11 DA12
EA02 EA03 EA04 FA02 GA01 GA11 HA01 HA03 HA12
4B063 QA01 QA08 QA18 QQ05 QQ13 QQ42 QQ52 QR08 QR33 QR42
QR55 QR62 QR74 QR80 QR82 QS05 QS25 QS34 QS36 QX02
4B064 AG01 AG27 CA01 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 CA18 DC50 NA14 ZA151
ZA451 ZA531 ZA591 ZA681 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB021 ZB051
ZB071 ZB081 ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZB271 ZC061 ZC351 ZC371
ZC411 ZC412
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA00 DA76 EA20
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	B7样分子及其用途		
公开(公告)号	JP2004501625A	公开(公告)日	2004-01-22
申请号	JP2002505832	申请日	2001-06-28
[标]申请(专利权)人(译)	安姆根有限公司		
申请(专利权)人(译)	安进公司		
[标]发明人	ウェルチャーアンドリユーエイ サーミエントウラエム シュルツヘンリージェイ チュテヒラリーティー		
发明人	ウェルチャー, アンドリユー エイ. サーミエント, ウラ エム. シュルツ, ヘンリー ジェイ. チュテ, ヒラリー ティー.		
IPC分类号	A01K67/027 A61K38/00 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/08 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P37 /00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/58 G01N37/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 C07K14 /70532		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61P1/04 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P7/08 A61P9 /00 A61P9/10 A61P11/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P21/04 A61P25/28 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/06 A61P37/08 A61P39/00 A61P43/00.105 A61P43/00. 111 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/58.Z G01N37/00.102 C12N15/00.C C12N15/00.F C12N5/00.A A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA29 2G045/AA34 2G045/AA35 2G045/BB10 2G045/BB14 2G045/BB20 2G045/BB24 2G045 /BB29 2G045/BB46 2G045/BB51 2G045/CB01 2G045/DA13 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 2G045/FB08 2G045/FB09 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA80 4B024 /CA04 4B024/CA09 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA02 4B024/EA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA12 4B063 /QA01 4B063/QA08 4B063/QA18 4B063/QQ05 4B063/QQ13 4B063/QQ42 4B063/QQ52 4B063/QR08 4B063/QR33 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR74 4B063/QR80 4B063/QR82 4B063 /QS05 4B063/QS25 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065 /AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084 /BA23 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA151 4C084/ZA451 4C084/ZA531 4C084 /ZA591 4C084/ZA681 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB021 4C084 /ZB051 4C084/ZB071 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084 /ZB271 4C084/ZC061 4C084/ZC351 4C084/ZC371 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045 /AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA00 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下		

优先权

60/214512 2000-06-28 US

09/729264 2000-11-28 US

外部链接

Espacenet

摘要(译)

新的B7样多肽和编码它们的核酸分子。本发明还提供了载体，宿主细胞，选择性结合剂和产生B7样多肽的方法。还提供了用于治疗，诊断，改善或预防B7样多肽疾病的方法。

本来の残基	例示的な置換	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, ノルロイジン	Leu
Leu	ノルロイジン, 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, ノルロイジン	Leu