(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2004-500863
(P2004-500863A)
(43)公表日　平成16年1月15日(2004.1.15)

(51)Int.Cl.[7]	F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A01K 67/027	A01K	67/027		4B063
A61K 35/12	A61K	35/12		4B064
A61K 35/64	A61K	35/64		4B065
A61K 35/74	A61K	35/74	A	4C084

審査請求 未請求　予備審査請求 有　（全 282 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2002-501961(P2002-501961)
(86)(22)出願日　平成13年6月6日(2001.6.6)
(85)翻訳文提出日　平成14年12月6日(2002.12.6)
(86)国際出願番号　PCT/US2001/018257
(87)国際公開番号　WO2001/094413
(87)国際公開日　平成13年12月13日(2001.12.13)
(31)優先権主張番号　60/209,811
(32)優先日　平成12年6月6日(2000.6.6)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　60/272,107
(32)優先日　平成13年2月28日(2001.2.28)
(33)優先権主張国　米国(US)
(81)指定国　EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),AU,CA,IL,JP,MX

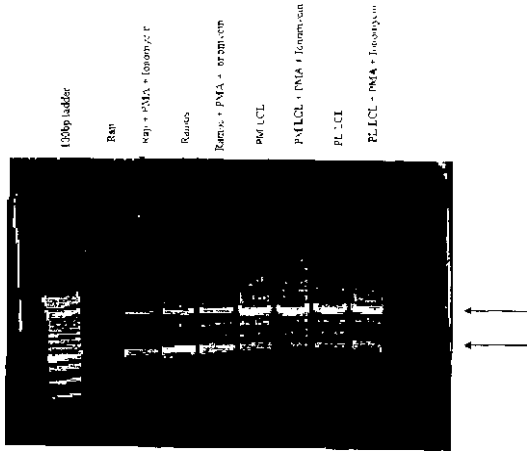
(71)出願人　391015708
ブリストル－マイヤーズ　スクイブ　カンパニー
ＢＲＩＳＴＯＬ－ＭＹＥＲＳ　ＳＱＵＩＢＢ　ＣＯＭＰＡＮＹ
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１０１５４　ニューヨーク　パーク　アベニュー　３４５
(74)代理人　100062144
弁理士　青山　葆
(74)代理人　100086405
弁理士　河宮　治
(74)代理人　100068526
弁理士　田村　恭生

（特許庁注：以下のものは登録商標）

最終頁に続く

(54)【発明の名称】免疫調節に有用なＢ７関連核酸およびポリペプチド

(57)【要約】
本発明は、免疫または炎症応答細胞、例えばＴ細胞、の活性化を調節するＢ７関連因子をコードする核酸を提供する。さらに、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３を含む、Ｂ７関連ポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターおよび融合構築物を提供する。本発明はさらに、単離されたＢ７関連ポリペプチド、Ｂ７関連ポリペプチドを含む単離された融合タンパク質、Ｂ７関連ポリペプチドと特異的には反応する抗体またはその断片を提供する。さらに、本発明は、Ｂ７関連核酸、ポリペプチドまたはペプチドを用いる分析を提供する。本発明はさらに、ヒトまたは動物の患者の免疫調節に有用な、Ｂ７関連核酸、ポリペプチド、融合タンパク質または抗体の組成物を提供する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
配列番号２、７、１１、１３および１５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
【請求項２】
ａ）配列番号２の少なくとも２０個の隣接したアミノ酸を含むポリペプチド；ｂ）配列番号７の少なくとも２１０個の隣接したアミノ酸を含むポリペプチド；ｃ）配列番号１１の少なくとも９０個の隣接したアミノ酸を含むポリペプチド；ｄ）配列番号１３の少なくとも１７０個の隣接したアミノ酸を含むポリペプチド；およびｅ）配列番号１５の少なくとも１００個の隣接したアミノ酸を含むポリペプチドからなる群から選択されるポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
【請求項３】
配列番号２と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列；ｂ）配列番号７と少なくとも９０％同一であるアミノ酸配列；ｃ）配列番号１１と少なくとも９９％同一であるアミノ酸配列；ｄ）配列番号１３と少なくとも９９．５％同一であるアミノ酸配列；ｅ）配列番号１５と少なくとも９８％同一であるアミノ酸配列からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離された核酸分子。
【請求項４】
配列番号１、３、６、１０、１２および１４からなる群から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５】
以下、
ａ）配列番号１または配列番号３の少なくとも６０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｂ）配列番号６の少なくとも６３０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｃ）配列番号１０の少なくとも２７０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｄ）配列番号１２の少なくとも４１０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；および
ｅ）配列番号１４の少なくとも３００個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列からなる群から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６】
以下、
ａ）配列番号１または配列番号３の少なくとも２５個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｂ）配列番号６の少なくとも３０５個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｃ）配列番号１０の少なくとも２５５個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；
ｄ）配列番号１２の少なくとも３１０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列；および
ｅ）配列番号１４の少なくとも２４０個の隣接したヌクレオチドを含むヌクレオチド配列からなる群から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７】
請求項１～５のいずれかに記載の核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む単離された核酸分子。
【請求項８】
請求項６に記載の核酸分子の配列に対して相補的な配列を含む単離された核酸分子。
【請求項９】
以下、
ａ）配列番号２、７、１１、１３、および１５からなる群から選択されるアミノ酸配列の

細胞外ドメインをコードするヌクレオチド配列；および
ｂ）免疫グロブリンＧのＦｃドメインをコードするヌクレオチド配列
を含む単離された核酸分子。
【請求項１０】
請求項１～６のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１１】
請求項７～８のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１２】
請求項９に記載の核酸分子を含むベクター。
【請求項１３】
請求項１０に記載のベクターを含む宿主細胞あって、細菌、酵母、昆虫、哺乳類および植物細胞からなる群から選択される宿主細胞。
【請求項１４】
請求項１１に記載のベクターを含む宿主細胞あって、細菌、酵母、昆虫、哺乳類および植物細胞からなる群から選択される宿主細胞。
【請求項１５】
請求項１２に記載のベクターを含む宿主細胞あって、細菌、酵母、昆虫、哺乳類および植物細胞からなる群から選択される宿主細胞。
【請求項１６】
請求項１～５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。
【請求項１７】
請求項９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。
【請求項１８】
請求項１６に記載のポリペプチドに結合する単離された抗体。
【請求項１９】
モノクローナルである、請求項１８に記載の抗体。
【請求項２０】
請求項１９に記載の抗体を産生するハイブリドーマ細胞。
【請求項２１】
請求項８に記載の核酸分子、および生理学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。
【請求項２２】
請求項１３に記載の宿主細胞、および生理学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。
【請求項２３】
請求項１５に記載のポリペプチド、および生理学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。
【請求項２４】
請求項１６に記載のポリペプチドおよび生理学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。
【請求項２５】
請求項１９に記載の抗体、および生理学的に許容し得る担体、賦形剤または希釈剤を含有する医薬組成物。
【請求項２６】
配列番号２、７、１１、１３および１５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＢ７関連ポリペプチドに結合するリガンドを同定する方法であって、
ａ）Ｂ７関連ポリペプチドが結合した固体支持体を調製すること；
ｂ）該支持体を生物学的サンプルから得られたポリペプチドと接触させ、Ｂ７関連ポリペプチドに１またはそれ以上のサンプルポリペプチドが会合可能な条件下でインキュベーシ

ョンすること；および
ｃ）Ｂ７関連ポリペプチドが１またはそれ以上のサンプルポリペプチドと会合しているかどうかについて測定して、Ｂ７関連ポリペプチドに結合するリガンドを同定する
ことを含む方法。
【請求項２７】
配列番号２、７、１１、１３および１５からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＢ７関連ポリペプチドに結合する試験薬剤を同定する方法であって、
ａ）Ｂ７関連ポリペプチドが結合した固体支持体を調製すること；
ｂ）該支持体を試験薬剤と接触させ、Ｂ７関連ポリペプチドに１またはそれ以上の試験薬剤が会合可能な条件下でインキュベーションすること；および
ｃ）Ｂ７関連ポリペプチドが１またはそれ以上の試験薬剤と会合しているかどうかについて測定して、Ｂ７関連ポリペプチドに結合する試験薬剤を同定する
ことを含む方法。
【請求項２８】
患者におけるＴ細胞活性を増大または減少させる方法であって、その患者に請求項２１～２５のいずれかに記載の医薬組成物を、免疫細胞活性を増大または減少させるのに有効な量で投与することを含む方法。
【請求項２９】
患者がウイルス感染であると診断される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３０】
ウイルス感染が、ヒト免疫不全ウイルス、ヒトパピローマウイルス、単純ヘルペスウイルス、ヒト脳炎ウイルス、ヒトライノウイルス 、およびヒトインフルエンザウイルス感染からなる群から選択される、請求項２９に記載の方法。
【請求項３１】
患者が癌であると診断される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３２】
患者が、組織拒絶、骨髄拒絶、移植臓器拒絶および移植片対宿主疾患からなる群から選択される状態であると診断される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３３】
患者が、炎症に関連する状態であると診断される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３４】
前記状態が、乾癬、慢性閉塞性肺疾患、喘息およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項３３に記載の方法。
【請求項３５】
患者が、自己免疫疾患であると診断される、請求項２８に記載の方法。
【請求項３６】
自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、紅斑性狼瘡、橋本病甲状腺炎、原発性ｍｉｘ水腫、グレーブス病 、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、インスリン依存性糖尿病、Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅ症候群、重症筋無力症、天疱瘡、クローン病、交換性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性筋炎および混合性結合組織病からなる群から選択される、請求項３５に記載の方法。
【請求項３７】
免疫細胞活性の増大に関連する状態を診断する方法であって、
ａ）請求項６～８のいずれかに記載の単離された核酸と生物学的サンプルとを、その核酸がその生物学的サンプルの核酸とハイブリダイズすることが可能な、ストリンジェンシーの高い条件下で接触させて複合体を形成させること；
ｂ）（ａ）のハイブリダイゼーション複合体を測定すること；および
ｃ）（ａ）のハイブリダイゼーション複合体の量を標準的な生物学的サンプルにおけるハイブリダイゼーション複合体の量と比較することを含み、

標準の量に対する増大がその状態の診断結果を示す、方法。
【請求項３８】
前記状態が、組織拒絶、骨髄拒絶、移植臓器拒絶、および移植片対宿主疾患からなる群から選択される、請求項３７に記載の方法。
【請求項３９】
前記状態が炎症に関連する、請求項３７に記載の方法。
【請求項４０】
前記状態が、乾癬、慢性閉塞性肺疾患、喘息、およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項３７に記載の方法。
【請求項４１】
前記状態が自己免疫疾患である、請求項３７に記載の方法。
【請求項４２】
前記自己免疫疾患が、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、紅斑性狼瘡、橋本病甲状腺炎、原発性ｍｉｘ水腫、グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、インスリン依存性糖尿病、Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅ症候群、重症筋無力症、天疱瘡、クローン病 、交換性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性筋炎および混合性結合組織病からなる群から選択される請求項４１に記載の方法。
【請求項４３】
免疫細胞活性の増大に関連する状態を診断する方法であって、
ａ）請求項１９に記載の単離された抗体と生物学的サンプルとを、その抗体がその生物学的サンプルのアミノ酸配列と結合することが可能な条件下で接触させることにより複合体を形成させること；
ｂ）（ａ）の複合体を検出すること；および
ｃ）（ａ）の複合体の量を標準的な生物学的サンプルにおける複合体の量と比較することを含み、
標準の量に対する増大がその状態の診断結果を示す、方法。
【請求項４４】
前記状態が、組織拒絶、骨髄拒絶、移植臓器拒絶および移植片対宿主疾患からなる群から選択される、請求項４３に記載の方法。
【請求項４５】
前記状態が炎症に関連している請求項４３に記載の方法。
【請求項４６】
前記状態が、乾癬、慢性閉塞性肺疾患、喘息、およびアテローム性動脈硬化症からなる群から選択される、請求項４５に記載の方法。
【請求項４７】
前記状態が自己免疫疾患である、請求項４３に記載の方法。
【請求項４８】
前記疾患が、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、紅斑性狼瘡、橋本病甲状腺炎、原発性ｍｉｘ水腫、グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、インスリン依存性糖尿病、Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅ症候群、重症筋無力症、天疱瘡、クローン病 、交換性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性筋炎および混合性結合組織病からなる群から選択される、請求項４７に記載の方法。
【請求項４９】
ａ）請求項６または８に記載の単離された核酸分子；およびｂ）単離された核酸分子とＢ７関連核酸分子との結合を検出するための少なくとも１つの成分を含む、Ｂ７関連核酸分子を検出するためのキット。
【請求項５０】
ａ）請求項１９の単離された抗体およびｂ）単離された抗体とＢ７関連ポリペプチド配列

との結合を検出するための少なくとも１つの成分を含む、Ｂ７関連ポリペプチドを検出するためのキット。
【請求項５１】
請求項１～６のいずれかに記載の核酸分子を含むトランジェニックマウス。
【請求項５２】
請求項１～６のいずれかに記載の核酸分子を含む細胞系。
【発明の詳細な説明】
【０００１】
関連出願
本願は、本明細書の一部を構成する、米国特許出願６０／２０９，８１１（出願日２０００年６月６日）および米国特許出願第６０／２７２，１０７（出願日２０００年２月２８日）の優先権を主張するものである。
【０００２】
発明の分野
本発明は、Ｔ細胞等の免疫および炎症反応に重要な細胞を調節する、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３を含むＢ７関連ポリペプチドをコードする単離された核酸に関する。さらに、Ｂ７関連ポリペプチドをコードする核酸を含む発現ベクターおよび融合構築物に関する。本発明はさらに、単離されたＢ７関連ポリペプチド、Ｂ７関連ポリペプチドを含む単離された融合タンパク質、およびＢ７関連ポリペプチドと特異的に反応する抗体またはその一部に関する。さらに、本発明は、Ｂ７関連ポリペプチドまたは融合タンパク質を利用して、Ｂ７関連ポリペプチドの対応するカウンターレセプターを単離および同定する方法に関する。さらに、Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、同族抗体（ｃｏｇｎａｔｅ 抗ｂｏｄｉｅｓ）またはその一部もしくは誘導体の組成物を投与することによる患者における免疫調節の方法に関する。本発明はさらに、本明細書に開示されたＢ７関連ポリペプチド発現カセットを含む遺伝子操作されたベクターの組成物を投与することによる動物またはヒトの患者の免疫を調節する方法に関する。
【０００３】
発明の背景
Ｔ細胞の活性化、増殖および分化を伴う、Ｔ細胞に対する一次応答は外来抗原に対する免疫応答の開始には必須である。抗原提示細胞（ＡＰＣ）によるＴ細胞の活性化には、少なくとも２つの独立したシグナルが必要である（Ｋ．Ｅ．Ｈｅｌｌｓｔｒｏｍ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｃａｎｃｅｒ Ｃｈｅｍｏｔｈｅｒ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．３８：Ｓ４０－１；Ｎ．Ｋ．Ｄａｍｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１９８５－９２；Ｊ．Ｍ．Ｇｒｅｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２４：２６５－７２；Ｅ．Ｃ．Ｇｕｉｎａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｂｌｏｏｄ ８４：３２６１－８２；Ｊ．Ｗ．Ｈｏｄｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５５：３５９８－６０３）。第１のシグナルによってＴ細胞が細胞サイクルに入り、主要組織適合複合体（ＭＨＣ）によって提示された外来抗原により媒介される。副刺激と呼ばれる第２のシグナルは、サイトカイン産生とＴ細胞増殖をもたらすが、抗原特異的でもＭＨＣ制限的でもない（Ｒ．Ｈ．Ｓｃｈｗａｒｔｚ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８：１３４９－１３５６）。
【０００４】
副刺激は、ＡＰＣによって発現した１またはそれ以上の別個な細胞表面分子の細胞によって媒介されると考えられている（Ｍ．Ｋ．Ｊｅｎｋｉｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４０：３３２４－３３３０；Ｐ．Ｓ．Ｌｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７２１－７３０；Ｃ．Ｄ．Ｇｉｍｍｉ、ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：６５７５６５７９；Ｊ．Ｗ．Ｙｏｕｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．９０：２２９－２３７；Ｌ．Ｋｏｕｌｏｖａ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７５９－７６２；Ｈ．Ｒｅｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．

（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：２７１－２７５；Ｇ．Ａ．ｖａｎ－Ｓｅｖｅｎｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．ｌｍｍｕｎｏｌ．１４４：４５７９－４５８６；Ｊ．Ｍ．ＬａＳａｌｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４７：７７４－８０；Ｍ．Ｉ．Ｄｕｓｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６９：５０３；Ｒ．Ｊ．Ａｒｍｉｔａｇｅ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ ３５７：８０－８２；Ｙ．Ｌｉｕ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７５：４３７－４４５）。ＡＰＣ細胞表面タンパク質であるＢ７がそのような副刺激分子の１つであることを示唆する無視できない証拠がある（Ｐ．Ｓ．Ｌｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７２１－７３０；Ｃ．Ｄ．Ｇｉｍｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ｌＪＳＡ８８：６５７５－６５７９；Ｌ．Ｋｏｕｌｏｖａ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３：７５９－７６２；Ｈ．Ｒｅｉｓｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９，２７１－２７５；Ｐ．Ｓ．Ｌｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８７：５０３１－５０３５；Ｇ．Ｊ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７４：６２５－６３１）。

【０００５】

Ｂ７は、ＣＤ２８およびＣＴＬＡ－４と呼ばれる、Ｔ細胞上に発現した２つのカウンターレセプター（リガンド）に結合することが示されている。ＣＤ２８に結合したＢ７は、Ｔ細胞の増殖を誘導し、Ｔ細胞を完全に活性化させるＩＬ－２を分泌させる（Ｐ．Ｓ．Ｌｉｎｓｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１７３，７２１－７３０；Ｃ．Ｄ．Ｇｉｍｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８８：６５７５－６５７９；Ｃ．Ｂ．Ｔｈｏｍｐｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８６：１３３３－１３３７；Ｃ．Ｈ．Ｊｕｎｅ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ １１：２１１－６；Ｆ．Ａ．Ｈａｒｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ ３５６：６０７－６０９）。反対に、ＣＴＬＡ－４に結合したＢ７はＴ細胞を下方調節する。Ｂ７：ＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４副刺激経路の重要性は、ｉｎ ｖｉｔｒｏおよびいくつかのｉｎ ｖｉｖｏモデル系で実証されている。この経路の遮断は、ネズミおよびヒトの系において、抗原特異的耐性の進展をもたらす（Ｆ．Ａ．Ｈａｒｄｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ ３５６：６０７６０９；Ｄ．Ｊ．Ｌｅｎｓｃｈｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５７：７８９－７９２；Ｌ．Ａ．Ｔｕｒｋａ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８９：１１１０２－１１１０５；Ｃ．Ｄ．Ｇｉｍｍｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：６５８６－６５９０）。反対に、Ｂ７ネガティブのネズミ腫瘍細胞におけるＢ７の異所性の発現は、腫瘍拒絶および長期間継続する腫瘍による攻撃に対する保護を伴う、Ｔ細胞介在の特異的な免疫を誘導する（Ｌ．Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ ７１：１０９３－１１０２；Ｓ．Ｅ．Ｔｏｗｎｓ末端 ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：３６８－３７０；Ｓ．Ｂａｓｋａｒ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：５６８７－５６９０）。したがって、Ｂ７：ＣＤ２８／ＣＴＬＡ－４経路の操作は、ヒトにおける免疫応答を刺激または抑制ことに対し非常に有望である。

【０００６】

以前に特徴付けられたＢ７分子（以下Ｂ７－１と称する）に加えて、Ｂ７－１－様分子が同定されている（例えば、Ｍ．Ａｚｕｍａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６６：７６－７９；Ｃ．Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５２：４９２９－３６；Ｒ．Ｈ．Ｒｅｅｖｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｍａｍｍ Ｇｅｎｏｍｅ ８：５８１５８２；Ｋ．Ｉｓｈｉｋａｗａ ｅｔ ａｌ（１９９８）ＤＮＡ Ｒｅｓ．５：１６９－１７６；Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．の米国特許第５，９４２，６

０７号（１９９９年８月２４日発行）を参照）。特に、ＰＤ－Ｌ１およびＰＤ－Ｌ２は、Ｔ細胞活性化のインヒビターであると同定されており（Ｇ．Ｊ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１０２７－１０３４；Ｙ．Ｌａｔｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．，（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：２６１－２６８）、Ｂ７－Ｈ１、Ｂ７－Ｈ３およびＢ７－ＤＣはＴ細胞増殖の副刺激分子として記載されている（Ｈ．Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ ５：１３６５－１３６９；Ａ．Ｉ．Ｃｈａｐｏｖａｌ（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：２６９－２７４；Ｔｓｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９３（７）：８３９－４５）。

【０００７】

したがって、Ｔ細胞活性化を調節するＢ７－１に関連する因子のファミリーは増えている（Ｊ．Ｈｅｎｒｙ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｔｏｄａｙ ２０：２８５－２８８参照）。したがって、Ｂ７関連因子の同定、単離およびキャラクタリゼーションは、動物、特にヒトにおける、正常なおよび病的な状態の両方におけるＴ細胞の活性化と機能をさらに理解するための重要な目標である。したがって、本発明は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３と呼ばれる３つのＢ７関連因子の発見およびキャラクタリゼーションを開示する。さらに、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３因子を利用する様々な分析および処置を記載する。

【０００８】

発明の要約

本発明の目的は、Ｔ細胞活性化を含む、炎症および免疫反応を調節するＢ７関連ポリペプチドをコードする単離された核酸を提供する。本発明の範囲に属するＢ７関連ポリペプチドとしては、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドに結合可能なＡＰＣの表面上のカウンターレセプターが含まれる。具体的には、Ｂ７関連ポリペプチドとしては、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３ポリペプチド、およびその可溶性断片または誘導体が挙げられる。より具体的には、Ｂ７関連核酸は以下のものである：

ｉ）ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の少なくとも断片を含む核酸分子；

ｉｉ）ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドに対して中程度の～実質的に相同な配列を共有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子；

ｉｉｉ）適当な条件（例えば、中～高いストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件）下で、ＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）またはＢＳＬ３（配列番号１４）ヌクレオチド配列またはその断片とハイブリダイズすることが可能な核酸分子；

ｉｖ）遺伝コードの縮重または組換えもしくは化学的修飾のために、ＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）のヌクレオチド配列とは異なる核酸分子；または

ｖ）配列番号１、３、６、１０、１２または１４に記載の核酸と少なくとも実質的な相同性を共有する核酸分子。

【０００９】

さらに、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３因子を発現するＡＰＣの存在について生物学的サンプルを分析するのに有用な核酸プローブは、本発明に包含される。

【００１０】

本発明の別の目的は、Ｂ７関連ポリペプチドをコードする核酸を含むベクター（例えば、発現ベクター）および融合構築物を提供することである。発現ベクターは、様々な宿主、特に哺乳類および昆虫細胞のカルチャー等の真核細胞、および大腸菌等の原核細胞において、対応するポリペプチドまたはペプチドの合成を指揮する。本発明の範囲に属する発現ベクターは、本明細書に記載されたＢ７関連ポリペプチドの少なくとも１つをコードする

核酸配列を含む。１つの態様として、本発現ベクターは、Ｆｃ領域ヒト免疫グロブリンＧ１（ＩｇＧ１）をコードするＤＮＡ配列に融合した、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号 １５）の細胞外ドメインをコードするＤＮＡ配列を含む。そのような発現ベクターは、宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトして、それにより本明細書に記載された核酸分子をコードする融合タンパク質またはペプチドを含むポリペプチドまたはペプチドを製造するために使用することができる。

【００１１】

本発明の更なる目的は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリペプチドまたはその一部もしくは誘導体を含む単離されたＢ７関連ポリペプチドを提供することである。好ましいＢ７関連ポリペプチドは、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドまたはその一部のアミノ酸配列を含む。そのようなポリペプチドは、少なくともＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリペプチドの成熟形態の部分、および好ましくはこれらポリペプチドの可溶性形態を含む。さらに、本発明は、ポリペプチド、配列番号２、７、１１、１３または１５に記載されたアミノ酸配列と中～実質的な相同性を共有し、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチドの天然に存在するアイソフォームまたは修飾された組換えポリペプチドであるポリペプチドを包含する。

【００１２】

本発明の更なる目的は、本明細書に記載されたＢ７関連ポリペプチドまたはその一部もしくは誘導体を含む単離された融合タンパク質を提供することである。１つの態様では、融合タンパク質は、溶解性、精製、結合親和性および／またはＢ７関連ポリペプチドの結合価を変化させる別のポリペプチドと融合したＢ７関連ポリペプチドの細胞外ドメイン部分を含む。好ましくは、、ａ ＤＮＡ ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｅｎｃｏｄｉｎｇ ａｎ細胞外ドメイン ｐｏｒｔｉｏｎ ｏｆ ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドの細胞外ドメイン部分をコードするＤＮＡ分子は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ領域をコードするＤＮＡと連結してＢＳＬ１－Ｉｇ、ＢＳＬ２－Ｉｇ、またはＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質をコードするＤＮＡ融合産物を形成することができる。本発明の更なる目的は、本明細書に記載の単離されたＢ７関連ポリペプチド、融合タンパク質または同族抗体を利用して、Ｂ７関連ポリペプチドの対応するカウンターレセプターを単離および同定する方法を提供することである。１つの態様では、単離されたＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチド、またはその一部を、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞から得られたタンパク質抽出物とインキュベーションして、ＢＳＬ／レセプター複合体を形成した後、抗ＢＳＬ抗体とインキュベーションしてそのＢＳＬ／レセプター複合体を単離することができる。あるいは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドを含む融合タンパク質をＴ細胞等の免疫または炎症応答細胞から得られたタンパク抽出物とインキュベーションした後、その融合タンパク質と特異的に反応する抗体とインキュベーションすることができる。Ｂ７関連ポリペプチドと結合するレセプターは、有意の免疫調節活性を有すると期待される。

【００１３】

本発明の別の目的は、核酸、ポリペプチド、抗体またはその機能的断片を含む、本発明のＢ７関連因子を利用する、診断方法およびキットを提供することである。そのような因子を、例えば、診断方法およびＢ７関連因子の発現レベルを測定するためのおよび様々なＢ７に関連する疾患をスクリーンするためのキットに使用することができる。さらに、本明細書に記載のＢ７関連核酸を、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３に影響を及ぼす染色体異常を同定するため、およびアレル変異体または個人もしくは集団におけるＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の突然変異を同定するために使用することができる。

【００１４】

本発明のさらに別の目的は、本明細書に記載の、Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質またはその一部もしくは誘導体と特異的に反応するモノクローナルおよびポリクローナル

抗体を含む単離された抗体を提供することである。好ましくは、モノクローナル抗体を、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチド、またはその一部もしくは誘導体と特異的に反応するように調製する。

【００１５】

本発明の別の目的は、本明細書に記載の、Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、またはその一部もしくは誘導体の組成物を投与することによる、ヒトまたは動物の患者における免疫調節の方法を提供することである。そのような組成物は、免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性を上方調節または下方調節すると期待される。例えば、組成物中のＢ７関連ポリペプチドは、ＣＤ２８と相互作用することによって免疫細胞活性を上方調節し得る。あるいは、組成物中のＢ７関連ポリペプチドは、ＣＴＬＡ－４ト相互作用することによって免疫細胞活性を下方調節し得る。１つの態様では、ＢＳＬ１－Ｉｇ、ＢＳＬ２－Ｉｇ、およびＢＳＬ３－Ｉｇ、融合タンパク質の組成物を、例えば、注射により、患者に投与して全身的な免疫抑制または免疫刺激をもたらす。そのような組成物は、単独でまたは１またはそれ以上の免疫調節分子と組み合わせて投与することができる。

【００１６】

本発明の別の目的は、本明細書に記載の、Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、またはその一部もしくは誘導体と特異的に反応する抗体の組成物を投与することによる、ヒトまたは動物の患者の免疫調節の方法を提供することである。そのような組成物は、Ｂ７関連ポリペプチドの副刺激活性をブロックし、したがって免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）を下方調節すると期待し得る。１つの態様では、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドまたはその断片と特異的に反応するモノクローナル抗体の組成物を、例えば注射により、患者に投与して免疫調節または耐性の誘導をもたらす。そのような組成物は、単独でまたは１またはそれ以上の免疫調節分子と組み合わせて投与することができる。本明細書に記載の耐性を誘導するための方法は、移植の拒絶（臓器および骨髄）や移植片対宿主疾患、特に自家骨髄移植における免疫応答を予防するために予防的に使用することができる。そのような方法はまた、自己免疫疾患、移植の拒絶および患者において確立した移植片対宿主疾患の処置において、有用な治療であり得る。

【００１７】

本発明の更なる目的は、本明細書に記載されたＢ７関連ポリペプチド発現カセットを含む遺伝子操作されたベクターまたは細胞の組成物を投与することによる、ヒトまたは動物の患者の免疫調節の方法を提供することである。好ましい態様では、細胞は、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドまたはその断片もしくは誘導体を含む１またはそれ以上のＢ７関連ポリペプチドの発現が可能なようにトランスフェクトまたは形質導入され、次いで、例えば移植により受容者に導入される、マクロファージ等の抗原提示細胞である。本発明と一致して、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドをコードする遺伝子は、単独で、または他の免疫刺激分子をコードする遺伝子と組み合わせてトランスフェクトまたは形質導入することができる。

【００１８】

更なる目的および本発明によって得られる効果は、以下に記載する詳細な説明と例示から明らかであろう。

【００１９】

図面の説明

添付の図面は、本発明をさらに説明し、様々な態様を明確にすることで本発明の理解を助けるものである。本発明の図面では、ヌクレオチドおよびアミノ酸配列を１文字標記で表する。

【００２０】

図１Ａ～１Ｃは、ＢＳＬ１のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図１Ａは、Ｔ

ＮＦ－αで処置されたヒト微小血管内皮細胞から調製したｃＤＮＡライブラリーから単離された完全長クローンから決定した、ＢＳＬ１（配列番号１）のヌクレオチド配列を示す。；ヌクレオチド１－９２は５’－非翻訳領域を含み；ヌクレオチド９３－９５は、翻訳開始部位（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９３－９６２はタンパクコード領域をコードし；ヌクレオチド９６３－９６５は、翻訳終止シグナル（ＴＡＡ）を含み；ヌクレオチド９６３－１５７６は３’非翻訳領域を含み；およびヌクレオチド１５７７－１６０５はポリ（Ａ）＋ＲＮＡ尾部を含む。図１Ｂは、ＢＳＬ１（配列番号２）の推定アミノ酸配列を示す；アミノ酸１－２４０は、推定細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む。図１Ｃは、分化型ヒト単球から調製したｃＤＮＡライブラリーから単離された完全長クローンから決定した、ＢＳＬ１（配列番号３）のヌクレオチド配列を示す。；ヌクレオチド１－９２は５’非翻訳領域を含み；ヌクレオチド９３－９５は、翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９３－９６２はタンパクコード配列を含み；ヌクレオチド９６３－９６５は、翻訳終止シグナル（ＴＡＡ）を含み；およびヌクレオチド９６３－３６２１　３’非翻訳領域（独特配列を太字で示す）を含む。

【００２１】

図２Ａ～２Ｂは、ＢＳＬ１－Ｉｇ融合構築物のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図２Ａは、ＢＳＬ１－Ｉｇ融合構築物（配列番号４）のヌクレオチド配列を示す；ヌクレオチド１－７２は、推定ＣＤ５シグナル配列をコードし；ヌクレオチド７３－７８はＳｐｅｌ開裂部位を含み；ヌクレオチド７８－７２９は推定ＢＳＬ１　ＥＣＤをコードし；ヌクレオチド７３０－１４４０は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分をコードし；およびヌクレオチド１４４１－１４４３は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図２ＢはＢＳＬ１－Ｉｇ推定アミノ酸配列（配列番号５）を示す。

【００２２】

図３Ａ～３Ｆは、ＢＳＬ２クローンのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図３Ａは、ＢＳＬ２－４６１６８１１クローンのヌクレオチド配列（配列番号６）を示す；ヌクレオチド１－１２はベクター配列を含み；ヌクレオチド１２１－１２３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み、ヌクレオチド２０４－２０５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド１５１６－１５８７は、推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド１７２３－１７２５は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図３Ｂは、ＢＳＬ２４６１６８１１クローンの推定アミノ酸配列を示す（配列番号７）；アミノ酸（１－４６５）は推定ＥＣＤを含む。図３ＣはＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１クローンのヌクレオチド配列（配列番号１０）を示す；ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）をコードし；ヌクレオチド８４－８５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド７４２－８１３は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド９４９－９５１は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図３Ｄは、ＢＳＬ２　Ｌ１６５－２１クローンの推定アミノ酸配列（配列番号　１１）を示す；アミノ酸１－２４７は推定ＥＣＤを含む。図３ＥはＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂクローンのヌクレオチド配列（配列番号１２）を示し；ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）をコードし；ヌクレオチド８４－８５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド７４２－８１３は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド９４９－９５１は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図３ＦはＢＳＬ２　Ｌ１６５－３５ｂクローンの推定アミノ酸配列（配列番号１３）を示す；アミノ酸１－２４７は推定ＥＣＤを含む。

【００２３】

図４Ａ～４Ｂは、ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ融合構築物のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図４Ａは、ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇクローンのヌクレオチド配列（配列番号８）を示す：ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド１－１３９４は天然ＢＳＬ２－４６１６８１１配列をコードし；ヌクレオチド１３９５は融合タンパク質の構築を促進するために導入されたサイレントな突然変異であり；ヌクレオチド１３９６－２０９７は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分をコードし；ヌクレオチド２０９５－２０９７は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図４Ｂは、ＢＳＬ２

－４６１６８１１－Ｉｇ融合タンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号９）を示す；アミノ酸１－４６５はＢＳＬ２－４６１６８１１の天然配列を含み；アミノ酸４６６－６９８はヒトＩｇＧのＦｃ部分を含む。

【００２４】

図５Ａ～５ＢはＢＳＬ３のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図５ＡはＢＳＬ３のヌクレオチド配列（配列番号１４）を示す：ヌクレオチド１－３２６は５’非翻訳領域を含み；ヌクレオチド３２７－３２９は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９８１－１０５５は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド１１４６－１１４８は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。図５ＢはＢＳＬ３推定アミノ酸配列を示す（アミノ酸１－２７３）（配列番号１５）；アミノ酸１－２１９は推定ＥＣＤを含む。

【００２５】

図６Ａ－６Ｂは、ＢＳＬ３－Ｉｇ融合構築物のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を示す。図６Ａは、ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）（配列番号１６）のヌクレオチド配列を示す：ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド１－６５１は、天然ＢＳＬ３配列をコードし；ヌクレオチド６５２－６５４は、構築の間に導入された人口配列をコードし；ヌクレオチド６５５－１３５６はヒトＩｇＧのＦｃドメインをコードする。図６Ｂは、ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）（配列番号１７）の推定アミノ酸配列を示す；アミノ酸１－２１７は天然ＢＳＬ３配列を示し；アミノ酸２１８は構築中に導入された人工配列を含み；アミノ酸２１９－４５１はヒトＩｇＧのＦｃドメインを含む。

【００２６】

図７Ａ－７Ｈは、試薬およびＢＳＬ１、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３について行った発現分析の結果を示す。図７Ａは、ノーザンブロット分析に使用したＢＳＬ１プローブ（配列番号１８）のヌクレオチド配列を示す。図７Ｂは、ノーザンブロット分析に使用したＢＳＬ２プローブ（配列番号１９）のヌクレオチド配列を示す。図７Ｃは、ＢＳＬ３プローブ（配列番号２０）のヌクレオチド配列を示す。図７Ｄは、ノーザンブロット分析によって決定された様々な細胞において観察されたＢＳＬ１、ＢＳＬ３、およびＢＳＬ３ｍＲＮＡのレベルを示す；「ＰＢＴ」は、末梢血Ｔ細胞を示し；「ＣＤ３／ＣＤ２８」は抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体による刺激を示す；「ＰＭＡ」はホルボール１２ミリステート１３アセテートによる刺激を示す；「ＬＰＳ」はリポ多糖による刺激を示す；「ＰＢＭ」は、末梢血単球を示す；「ＰＨＡ」はフィトヘマグルチニンによる刺激を示す；「ＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４」はＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４による刺激を示す；「ＨＭＶＥＣ」はヒト血管微小血管内皮細胞を示す；「ＴＮＦα」はＴＮＦ－αによる刺激を示す；および「Ｈ２９２（飢餓状態）」は血清飢餓Ｈ２９２細胞を示す。図７Ｅは、放射性同位元素で標識したＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌプローブを用いて、商業的に入手可能なブロットのノーザン分析によって決定された様々な種類の組織における、ＢＳＬ３発現レベルを示す。図７Ｆは、放射性同位元素で標識した ＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌプローブを用いて、商業的に入手可能なマイクロアレイのハイブリダイゼーション分析によって決定された様々な種類の組織における、ＢＳＬ３発現レベルを示す。図７Ｇは、定量的ＰＣＲによって決定された様々な種類の組織におけるＢＳＬ１発現レベルを示す。図７Ｈは、定量的ＰＣＲによって決定された様々な種類の組織におけるＢＳＬ３発現レベルを示す。

【００２７】

図８Ａ－８Ｅは、ＰＣＲ分析を行い、刺激有りまたは無しでの、種々のタイプの細胞におけるＢＳＬ２－４６１６８１１またはＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物の相対的レベルを決定した結果を示す。上の矢印はＢＳＬ２－４６１６８１１転写物を表するバンドを示している；下の矢印はＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物を表するバンドを示している。図８Ａは、ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの、Ｒａｊｉ、Ｒａｍｏｓ、ＰＭ－ＬＣＬ、およびＰＬ ＬＣＬ細胞タイプについての結果を示す。図８Ｂは、刺激有りまたは無しでの、ＣＥ－ＬＣＬ細胞、ＨＬ６０、Ｔｈｐ１、およびＨＵＶＥＣ細胞タイプについての結果を示す。図８Ｃは、ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの

、末梢血Ｔ細胞についての結果を示す。２人の別々のドナー（ドナー０７９およびドナー１２４）から単離された細胞の結果を示す。図８Ｄは、ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの、ＣＥＭおよびＨＵＴ７８細胞についての結果を示す。図８Ｅは、テンプレートとしてＢＳＬ２－４６１６８１１プラスミドを用いたＰＣＲ反応の結果を示す。レーン１：λＢｓｔＥＩＩ ＤＮＡラダー；レーン２：ＰＣＲ産物。上の矢印は、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物からのＰＣＲ産物のサイズを示す。下の矢印は、ＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物についての推定ＰＣＲ産物のサイズを示す。結果は、フォワードプライマーが、ＢＳＬ２－４６１６８１１の第２の可変折り曲げ部におけるホモローガス部位よりも第１の可変折り曲げ部における特異的結合部位に優先的に結合することを示している。

【００２８】

図９Ａ－９Ｆは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いて行った蛍光細胞分析分離装置（ＦＡＣＳ）の結果を示す。図９Ａは、ＢＳＬ１モノクローナル抗体を用いたＡ５４９上皮肺細胞のＦＡＣＳ分析を示す。カラム１：モノクローナル抗体なし；カラム２：アイソタイプ対照；カラム３：ＢＳＬ１ハイブリドーマ上清３２図９Ｂは、ＢＳＬ２４６１６８１１モノクローナル抗体を用いたＡ５４９上皮肺細胞のＦＡＣＳ分析を示す。カラム１：モノクローナル抗体なし；カラム２：アイソタイプ対照；カラム３：ＢＳＬ２ ＭＡｂ １Ｆ７Ｇ２；カラム４：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ２Ｂ１０Ｄ７；カラム５：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ３Ｅ６Ｄ３；カラム６：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ４Ｃ２Ｃ６；カラム７：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ５Ｄ７Ｅ２。図９Ｃは、ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた種々の細胞タイプのＦＡＣＳ分析を示す。図９Ｄは、ＴＮＦ－α刺激有りまたは無しでの、ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）のＦＡＣＳ分析を示す。図９Ｅ－９Ｆは、ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた、ＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ４またはＰＨＡ有りまたは無しでの、末梢血単核球（ＰＢＭＣｓ）のＦＡＣＳ分析を示す。図９Ｅは、ドナー１２６から単離された細胞の結果を示す；図９Ｆは、ドナー１４５から単離された細胞の結果を示す。

【００２９】

図１０Ａ－１０Ｅは、ＣＤ３ モノクローナル抗体の存在下で、ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ（ＢＳＬ２ｖｃｖｃｉｇ）およびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質を用いた末梢血Ｔ細胞の副刺激を示す。Ｌ６－Ｉｇ融合タンパク質をネガティブコントロールとして使用する。図１０Ａは、ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す。図１０Ｂは、ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。図１０Ｃ－１０Ｄは、ドナー７８から単離された細胞の結果を示す。図１０Ｅ－１０Ｆは、ドナー１２４から単離された細胞の結果を示す。図１０Ｇ－１０Ｊは、ＢＳＬ２またはＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた末梢血Ｔ細胞の副刺激の遮断を示す。図１０Ｇおよび１０１は、ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ２４６１６８１１－Ｉｇ（ＢＳＬ２ｖｃｖｃｉｇ）で刺激されＢＳＬ２モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム１：ＢＳＬ２－１Ｆ７Ｇ２ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ２－２Ｂ１０Ｄ７ ＭＡｂ；カラム３：ＢＳＬ２－３Ｅ６Ｄ３ ＭＡｂ；カラム４：ＢＳＬ２－５Ｄ７Ｅ２ ＭＡｂ；およびカラム５：アイソタイプ対照抗体。図１０Ｇは、ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す；図１０１は、ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。図１０Ｈおよび１０Ｊは、ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質で刺激されＢＳＬ３モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム １：ＢＳＬ３－１Ａ４Ａ１ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ３－２Ｂ６Ｈ７ ＭＡｂ；およびカラム３：アイソタイプ対照抗体。図１０Ｈは、ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す。；図１０Ｊは、ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。

【００３０】

発明の詳細な記載

本発明の方法による、Ｂ７関連因子の同定、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３と称する３つのＢ７関連因子、は同定されており、特徴付けられている。このようなＢ７関連因

子は、異なる時に、異なる病気および疾患の状態において、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞の活性化の分子の基礎を提供し得る。 さらに、開示したＢ７関連因子は、本明細書に詳細に記載された方法を持ちいて、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞の活性を調節することによる特定の疾患の予防または処置に利用することができる。このような方法を、以下に詳細に記載する癌または免疫関連疾患の予防または処置として使用することができる。

【００３１】

ｃＤＮＡライブラリーからのＢ７関連遺伝子の同定：Ｂ７関連因子を同定するために、いくつかの十分確立された技術を用いて、ｃＤＮＡライブラリーを構築し分析することができる。メッセンジャーＲＮＡは、Ｂ７－１および／またはＢ７関連因子を発現している細胞から得ることができる。例えば、ｍＲＮＡを分化したヒト末梢血単核球細胞から得ることができる。あるいは、ｍＲＮＡは、非ホジキンリンパ腫の患者から単離された腫瘍細胞等の腫瘍性Ｂ細胞の種々のサブセットから得ることができる（Ｌ．Ｃｈａｐｅｒｏｔ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｅｘｐ．Ｈｅｍａｔｏｌ．２７：４７９－８８）。そのような細胞は、Ｂ７－１を発現することが知られており、したがって、Ｂ７関連因子を発現し得、さらにｃＤＮＡライブラリーの構築のためのｍＲＮＡの供給源として供し得る。

【００３２】

全細胞ｍＲＮＡは、例えば、グアニジン－チオシアネイト抽出法（Ｊ．Ｍ．Ｃｈｉｒｇｗｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９７９）Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １８：５２９４－５２９９；Ｃｈｏｍｃｚｙｎｓｋｉ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．１６２：１５６－９）などの、様々な技術によって単離することができる。単離した後、ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをオリゴ（ｄＴ）セルロースを用いて精製することができる。精製したポリ（Ａ）＋ＲＮＡは、次に、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応を用いて、ｃＤＮＡ合成のためのテンプレートとして用いることができる（ＲＴ－ＰＣＲ；ｓｅｅ Ｃ．Ｒ．Ｎｅｗｔｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）ＰＣＲ ２ｎｄ Ｅｄ、Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌおよび）。逆転写の後、慣用の技術（Ｈ．Ｏｋａｙａｍａ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．２：１６１；Ｕ．Ｇｕｂｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｇｅｎｅ ２５：２６３参照）を用いてｃＤＮＡを２本鎖ＤＮＡに変換することができる。

【００３３】

２本鎖ｃＤＮＡのクローニングは、当分野で周知の技術を用いて行うことができる（Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ クローニング、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、ＮＹ；Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ参照）１またはそれ以上の制限酵素でｃＤＮＡを切断する必要を未然に取り除くために、クローニングの前に合成アダプターを使用することは、特に好ましい（例えば、Ｅ．Ｃ．Ｂｏｔｔｇｅｒ（１９８９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ７：９２５－６，９２８－９０を参照）この方法を使用して、ベクターとの連結の前に、非自己相同的な、キネースドアダプターをＤＮＡに付加することができる。実質的には、任意のアダプターを使用することができる。

【００３４】

適当なプロモーターを供給するベクターにおいてセンス方向に配置するとｃＤＮＡライブラリー配列が発現し得る。ベクターはまた、複製起点および種々のエンハンサー配列、スプライスアクセプター／ドナー配列、およびポリアデニル化配列を含み得る。ベクターは、ベクター構築物を含む細胞の選択を可能にするマーカーをさらに含み得る。マーカーは、誘発性でも非誘発性遺伝子でもよく、一般的に誘導下または非誘導下それぞれで陽性の選択が可能にするものである。マーカー遺伝子の例には、ネオマイシン、ジヒドロ葉酸還元酵素、グルタミン合成酵素等が挙げられる。特に、好ましいｃＤＮＡライブラリーは種々の商業的な供給源から得ることができる（例えば、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、

Ｉｎｃ．、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ；Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）。

【００３５】

ｃＤＮＡライブラリーは、発現クローニング技術を利用して、Ｂ７関連因子をクローニングするために使用することができる（Ｂ．Ｓｅｅｄ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：３３６５－３３６９；Ａ．Ａｒｕｆｆｏ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８４：８５７３－８５７７を参照）。１つの態様では、プラスミドＤＮＡを周知のトランスフェクションの方法により細胞系に導入し（例えば、ＤＥＡＥ－デキストラン）、ｃＤＮＡ挿入物を複製および発現させる。抗Ｂ７－１ モノクローナル抗体（例えば１３３およびＢ１．１）および抗ネズミＩｇＧおよびＩｇＭコートされた免疫磁気ビーズを用いてトランスフェクトされた細胞からＢ７－１抗原を減少させる。Ｂ７関連因子を発現するトランスフェクション体をＣＴＬＡ－４－ＩｇおよびＣＤ２８－Ｉｇとインキュベーションした後、抗ヒトＩｇ免疫グロブリンでパンニングすることにより陽性として選択する。パンニングの後、エピソームＤＮＡをパンニングした細胞から取り出し、コンピテント細菌宿主、好ましくは大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）内へトランスフェクトする。次いで、プラスミドＤＮＡをその細胞系に再導入し、発現とパンニングのサイクルを少なくとも２回繰り返す。最後のパンニングサイクルの後、プラスミドＤＮＡを個々のコロニーから調製し、細胞系内でトランスフェクトし、ＣＴＬＡ－４ｌｇおよびＣＤ２８－Ｉｇを用いる間接免疫蛍光法によりＢ７関連ポリペプチドの発現について分析する。クローニングの後、ＣＴＬＡ－４－Ｉｇとの反応性が強いコロニーからプラスミドを調製した後、慣用の配列決定技術を用いて配列を決定する（Ｇ．Ｗ．Ｓｌａｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９８）電気泳動 １９：１５２５－４１を参照）。

【００３６】

タンパク配列データベースにおけるＢ７関連遺伝子の同定：別法として、Ｂ７関連因子を入手可能な配列データベースをスクリーニングすることによって同定することができる。以前に同定されたＢ７因子をコードするポリペプチド（例えば、Ｂ７－１、Ｂ７－２またはＢ７－Ｈ１）または本明細書に記載のＢ７関連因子（例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３）は、様々なタンパク データベースのポリペプチド配列と比較することができる。公に入手可能なタンパク配列データベース、例えば、ＧｅｎＢａｎｋ、ＧｅｎＰｅｐｔ、ＳＷＩＳＳ ＰＲＯＴ、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｄａｔａ Ｂａｎｋ（ＰＤＢ）、Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ Ｒｅｓｏｕｒｃｅ（ＰＩＲ）、Ｈｕｍａｎ ＵｎｉＧｅｎｅ（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ）を、さらなるＢ７関連因子が哺乳類、好ましくはヒトに存在するかどうかを調べるために使用することができる。あるいは、私有のタンパク配列データベース、例えばＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ配列データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）を使用してＢ７関連因子を同定することができる。比較的重複の少ない配列を有するデータベース、例えばＰＩＲまたはＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴデータベース、を使用して配列の一致の統計的有意性を高めることができる。但し、より包括的で新しいデータベース例えば、ＧｅｎＢａｎｋ、ＧｅｎＰｅｐｔおよびＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃ配列データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）が好ましい。

【００３７】

当分野における任意の方法を使用して並べ、タンパク質配列データベースにあるこれまでに同定されたＢ７因子配列と比較することができる。好ましくは、ＢＬＡＳＴプログラムを用いる（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０；Ｓ．Ｋａｒｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８７：２２６４－６８；Ｓ．Ｋａｒｌｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０：５８７３－７）。ＢＬＡＳＴは以前に同定されたタンパク質の配列とデータベースのタンパク質の配列との間の局所的なアライメントを同定し、変化によって生じる局所的なアライ

メントの可能性を推定する。オリジナルのＢＬＡＳＴプログラムはギャップのない局所的なアライメントを用いているが、ＷＵ－ＢＬＡＳＴ２／ＢＬＡＳＴ ｖ２．０（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．２６６，４６０－４８０）、ＳＳＥＡＲＣＨ（Ｔ．Ｆ．Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１４７：１９５－１９７）やＦＡＳＴＡプログラム（Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８３：６３－９８）のような、より最近になって開発されたＢＬＡＳＴプログラムは、に類似したギャップのある局所的なアライメントを取り込むよう修正されている。さらに、弱いが生物学的に関連のある配列類似性を同定するために、位置特異的累次積分ＢＬＡＳＴ（ＰＳＩ ＢＬＡＳＴ）プログラムが開発されている（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）核酸ｓ Ｒｅｓ．２５：３３８９－３４０２）。さらに、関連性の低いタンパク質が共有している特異的なパターンまたは配列モチーフを同定するためのパターン－ヒット－主導ＢＬＡＳＴ（ＰＨＩ－ＢＬＡＳＴ）プログラムが設計されている（Ｚ．Ｚｈａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９８）核酸ｓ Ｒｅｓ．２６：３９８６－３９９０）。特色を有するＢＬＡＳＴプログラムは、またヒト、微生物およびマラリアゲノム配列の調査並びにベクター、免疫グロブリンおよび推定ヒトコンセンサス配列（Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ（ＮＣＢＩ）、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）の調査を行うために利用可能である。

【００３８】

ＦＡＳＴＡおよびＢＬＡＳＴプログラムはいずれも、対象の配列とデータベースの配列との間の非常に短い正確な配列の合致を同定し、最善の短い配列一致（「ヒット」）を解析して、配列相同性を有するより長い鎖が存在するかどうかを判断し、ついでその最善のヒットを動的計画法により最適化する（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０；Ｗ．Ｒ．Ｐｅａｒｓｏｎ前掲）。対照的に、ＳＳＥＡＲＣＨプログラムは、対象の配列をデータベースのすべての配列と二つ一組の比較で比較する（Ｔ．Ｆ．Ｓｍｉｔｈ ｅｔ ａｌ．前掲）。このように、ＳＳＥＡＲＣＨプログラムは、ＢＬＡＳＴやＦＡＳＴＡプログラムよりも感度が高いと考えられるが、かなり遅い。ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡプログラムは、検索速度を上げるためにいくつかの近似を用いており、感度および選択性を上げてＳＳＥＡＲＣＨプログラムのパフォーマンスに近づけるために統計的パラメータ（以下参照）を用いている。特定の配列アライメントプログラムは、配列検索が必要とするものまたは個人的な好みに基づいて選択することができる。場合によっては、アライメント検索の結果を確認するためまたは不明瞭な検索結果を解明するために、１以上のアライメント検索プログラムを用いる必要があるかもしれない。

【００３９】

典型的には、ＢＬＡＳＴ解析は、

（ｉ）各残基に対して重み付けをしたホモロジー値を割り当てるスコアリングマトリックス（例えば、ＢＬＯＳＳＵＭ ６２またはＰＡＭ １２０）および

（ｉｉ）反復度の高い配列を認識して計算から除外するフィルタリングプログラム（例えばＳＥＧまたはＸＮＵ）を用いる。次いで、（スコアリングマトリックスとフィルタリングプログラムを用いて）ＢＬＡＳＴ比較を行うことにより、関連することが知られている配列間で適当なホモロジーカットオフを決める。カットオフを本明細書に記載するとおりに校正すれば、他の適当なスコアリングマトリックスおよびフィルタリングプログラムを使用してもよいということは理解されるであろう。即ち、特定のカットオフポイントは、異なった標準パラメータを使用する場合に変更してもよいが、関連性の高い配列をそれらの特定のパラメータを用いて比較するときに示すＰ（Ｎ）スコアに対応する。

【００４０】

Ｂ７関連核酸

本発明の１つの態様は、ＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）またはそれらの断片等のヌクレオチド

配列を有する単離された核酸に関する。本発明の核酸分子は、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよい。好ましい核酸はヒトＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）、または断片ｓまたは機能的等価物ｓ ｔｈｅｒｅｏｆをコードするＤＮＡである。このような核酸は、少なくとも、１５、２０、２５、５０、６０、１００、２００、２４０、２５５、２７０、３００、３０５、３１０、４１０、５００、６３０、７００、または１０００個の隣接したヌクレオチドを含み得る。

【００４１】

本願において「単離された」なる語は、細胞の物質または培地を実質的に含まない、Ｂ７関連核酸、ポリペプチド、ペプチド，タンパク融合物、または抗体を意味する。単離されたまたは実質的に精製された分子は、５０％未満、好ましくは約２５％未満、および最も好ましくは約１０％未満の、その分子と会合した細胞成分を含む。

【００４２】

「機能的等価物」は、機能的に等価なＢ７関連因子をコードするヌクレオチド配列を包含するものと意図する。Ｂ７関連タンパクの機能的等価物には、Ｂ７関連タンパクの少なくとも１つの特徴的な機能（例えば、リガンド結合、抗原性、細胞内または細胞間の活性）を示す断片または変異体が包含される．例えば、Ｂ７関連因子のヌクレオチド配列内の、特にコドンの３つの塩基における、ＤＮＡ配列多型は、遺伝コードの縮重のために、コードされたタンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさない「サイレントな」突然変異を生じ得る。

【００４３】

好ましい態様には、ＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）のポリヌクレオチド配列と、少なくとも６０、７０、８０、８５、９０、９５、９７、９８、９９、９９．５、または１００％の配列同一性を共有する単離された核酸を包含する。このポリヌクレオチド配列は同一であってもよいＢＳＬ１（配列番号１および３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）のヌクレオチド配列と同一であってよく、または参照配列と比較して、ヌクレオチドの変化をある整数個まで含んでいてもよい

【００４４】

当分野で知られている「同一性」は、配列を比較することによって決定されるような、２またはそれ以上のポリペプチド配列間のまたは２またはそれ以上のポリヌクレオチド配列間の関連性である。当分野では、「同一性」は、場合によっては、そのような配列の配列間の一致によって決定されるような、ポリペプチドまたはポリヌクレオチド間の程度も意味する。「同一性」および「類似性」は、以下の文献に記載の方法が挙げられるがこれらに限定されない、周知の方法により容易に計算することができる（Ｃｏｍｐｕｔａｔｉｏｎａｌ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｌｅｓｋ、Ａ．Ｍ．、ｅｄ．、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９８８；Ｂｉｏｃｏｍｐｕｔｉｎｇ．ＩｎｆｏｒｍａｔｉｃｓおよびＧｅｈｏｍｅ Ｐｒｏｊｅｃｔｓ、Ｓｍｉｔｈ、Ｄ．Ｗ．、ｅｄ．、Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９３；コンピュータ 解析 ｏｆ 配列を解析しａｔａ、Ｐａｒｔ Ｉ、Ｇｒｉｆｆｉｎ、Ａ．Ｍ．、およびＧｒｉｆｆｉｎ、Ｈ．Ｇ．、ｅｄｓ．、ヒトａ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｊｅｒｓｅｙ、１９９４；配列解析 ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、ｖｏｎ Ｈｅｉｎｊｅ、Ｇ．，Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、１９８７；および配列解析 プライマー、Ｇｒｉｂｓｋｏｖ、Ｍ．および Ｄｅｖｅｒｅｕｘ、Ｊ．、ｅｄｓ．、Ｍ Ｓｔｏｃｋｔｏｎ Ｐｒｅｓｓ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、１９９１；およびＣａｒｉｌｌｏ、Ｈ．、およびＬｉｐｍａｎ、Ｄ．、ＳＩＡＭ Ｊ．Ａｐｐｌｉｅｄ Ｍａｔｈ．、４８：１０７３（１９８８）。

【００４５】

核酸について、配列の同一性は、ＢＬＡＳＴＮ２アルゴリズム（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．、１９９７、Ｎｕｃｌ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．、２５：３３８９－３４０

２）を用いて、対象の配列を公に入手可能な配列データベース（ＮＣＢＩ）の配列と比較することによって決定することができる。典型的な検索用パラメータ：Ｅ＝０．０５、ｖ＝５０、Ｂ＝５０（ここで、Ｅは期待される可能性のあるスコアカットオフであり、Ｖは結果報告に回帰するデータベースエントリーの数であり、Ｂは、結果報告に回帰する配列アライメントの数である（Ｓ．Ｆ．Ａｌｔｓｃｈｕｌ ｅｔ ａｌ．、１９９０、Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．、２１５：４０３－４１０））。

【００４６】

別の手段では、ヌクレオチド配列の同一性を次式を用いて計算する：同一性（％）＝（同一なヌクレオチドの数）／（ヌクレオチドの配列の長さ）×１０００。この式に関して、配列の長さに内部ギャップも含まれるが末端のギャップは含まない。あるいは、ヌクレオチド配列の同一性を以下に記載する特定のハイブリダイゼーション条件を用いて実験的に求めることができる。

【００４７】

本発明によれば、核酸の変化は、少なくとも１つのヌクレオチド欠失、転位およびトランスバージョンを含む置換、挿入または修飾（例えば、ＲＮＡまたはＤＮＡアナログ、脱リン酸化、メチル化または標識による）からなる群から選択される。変化は、参照ヌクレオチド配列の５’または３’末端の位置またはそれら末端の位置の間の、参照配列におけるヌクレオチドのうちの個々に散らばった、または参照配列内の１またはそれ以上の隣接した群における任意の場所で生じ得る。ＢＳＬ１（配列番号１および３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）またはＢＳＬ３（配列番号１４）の核酸配列の変化は、コード配列において、ナンセンス、ミスセンスまたはフレームシフト突然変異を生じ得、それによりその核酸によってコードされるポリペプチドを改変する。

【００４８】

本発明はさらに、ＢＳＬ１（配列番号１および３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）核酸配列から誘導されるスプライス変異体も包含する。本明細書に記載の、「スプライス変異体」なる語は、ゲノムＤＮＡの一次転写物の分化したプロセシングによって生じた変異体のＢ７関連核酸およびポリペプチドを意味する。別のスプライス変異体は、例えば、本明細書に記載のＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）のいずれか１つを含み得る。別のスプライス変異体にはさらに、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３のイントロン／エクソンの他の組合せも含まれ得、これは当業者が決定することができる。別のスプライス変異体は、実験的に、例えば細胞ＲＮＡを単離、分析することにより（例えば、サザンブロッティングまたはＰＣＲ）、またはＢ７関連核酸プローブまたは本明細書に記載のプライマーを用いてｃＤＮＡライブラリーをスクリーニングすることにより決定することができる。別の手段では、当業者が入手可能な種々の方法、コンピュータプログラムまたはコンピュータシステムを用いて別のスプライス変異体を推定することができる。

【００４９】

スプライス部位の推定の一般的方法は、Ｎａｋａｔａ、１９８５、核酸ｓ Ｒｅｓ．１３：５３２７－５３４０に記載されている。さらに、スプライス部位を例えばＧＲＡＩＬ（Ｅ．Ｃ．Ｕｂｅｒｂａｃｈｅｒ および Ｒ．Ｊ．Ｍｕｒａｌ、１９９１、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８８：１１２６１－１１２６５；Ｅ．Ｃ．Ｕｂｅｒｂａｃｈｅｒ、１９９５、Ｔｒ末端 Ｂｉｏｔｅｃｈ．、１３：４９７－５００；ｈｔｔｐ：／／ｇｒａｉｌ．ｌｓｄ．ｏｒｎｌ．ｇｏｖ／ｇｒａｉｌｅｘｐ）；ＧｅｎＶｉｅｗ（Ｌ．Ｍｉｌａｎｅｓｉ ｅｔ ａｌ．、１９９３、Ｐｒｏｃｅｅｄｉｎｇｓ ｏｆ Ｓｅｃｏｎｄ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｏｎｆｅｒｅｎｃｅ ｏｎ Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ、Ｓｕｐｅｒｃｏｍｐｕｔｉｎｇ、およびＣｏｍｐｌｅｘ Ｇｅｎｏｍｅ 解析、Ｈ．Ａ．Ｌｉｍ ｅｔ ａｌ．（ｅｄｓ）、Ｗｏｒｌｄ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ、Ｓｉｎｇａｐｏｒｅ、ｐｐ．５７３－５８８；ｈｔｔｐ：／／１２５．ｉｔｂａ．ｍｉ．ｃｎｒ．ｉＶ¯ｗｅｂｇｅｎｅ／ｗｗｗｇｅｎｅ¯ｈｅｌｐ．ｈｔｍｌ）；ＳｐｌｉｃｅＶｉｅｗ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｉｔｂ

a．mi．cnr．it／webgene）；およびHSPL（V．V．Solovyev et al．、1994、核酸s Res．22：5156－5163；V．V．Solovyev et al．、1994，”Prediction of ヒトExons by オリゴヌクレオチドCompositionおよびDiscriminant 解析 of Spliceable Open Reading Frames，”R．Altman et al．（eds）、Second International conference on Intelligent systems for Molecular Biology、AAAI Press、Menlo Park、CA、pp．354－362；V．V．Solovyev et al．、1993，”Identification Of ヒトGene Functional Regions Based On オリゴヌクレオチドComposition，”L．Hunter et al．（eds）、In Proceedings of First International conference on Intelligent System for Molecular Biology、Bethesda、pp．371－379）コンピュータ systemsを用いて推定することができる。

【0050】

さらに、GeneParser（E．E．SnyderおよびG．D．Stormo、1995、J．Mol．Biol．248：1－18；E．E．SnyderおよびG．D．Stormo、1993、Nucl．Acids Res．21（3）：607－613；http：／／mcdb．colorado．edu／－eesnyder／GeneParser．html）；MZEF（M．Q．Zhang、1997、Proc．Natl．Acad．Sci．USA、94：565－568；http：／／argon．cshl．org／genefinder）；MORGAN（S．Salzberg et al．、1998、J．Comp．Biol．5：667－680；S．Salzberg et al．（eds）、1998、Computational Methods in Molecular Biology、Elsevier Science、New York、NY、pp．187203）；VEIL（J．H末端erson et al．、1997、J．Comp．Biol．4：127－141）；GeneScan（S．Tiwari et al．、1997、CABIOS（Biolnformatics）13：263－270）；GeneBuilder（L．Milanesi et al．、1999、Bioinformatics 15：612－621）；Eukaryotic GeneMark（J．Besemer et al．、1999、Nucl．Acids Res．27：3911－3920）；およびFEXH（V．V．Solovyev et al．、1994、核酸s Res．22：5156－5163）等のコンピュータプログラム。さらに、例えばRNASPL（V．V．Solovyev et al．、1994、核酸s Res．22：5156－5163）；またはINTRON（A．Globek et al．、1991、INTRON version 1．1 manual、Laboratory of Biochemical Genetics、NIMH、Washington、D．C．）プログラムを用いて、cDNA配列におけるスプライス部位（即ち、以前のまたは可能性のあるスプライス部位）を推定することができる。

【0051】

本発明はさらに、BSL1（配列番号1および3）、BSL2（配列番号6、10、または12）、またはBSL3（配列番号14）の天然の存在する多型を包含する。すべての生物のゲノムは、遺伝子配列の変異体を生じる継続的な進化の過程で自然発生的な突然変異を受けることは当業者は理解するであろう（Gusella、1986、Ann．Rev．Biochem．55：831－854）。制限断片長多型（RFLPs）には、配列の制限断片の長さを変えるDNA配列における変異が含まれる（Botstein et al．、1980、Am．J．Hum．Genet．32，314－331（1980））。RFLPsは、ヒトおよび動物の遺伝子解析において広く用いられている

（ＷＯ ９０／１３６６８；ＷＯ ９０／１１３６９；Ｄｏｎｉｓ－Ｋｅｌｌｅｒ、１９８７、Ｃｅｌｌ ５１：３１９－３３７；Ｌおよびｅｒｅｔａｌ．、１９８９、Ｇｅｎｅｔｉｃｓ １２１：８５－９９を参照）。短鎖反復配列（ＳＴＲｓ）には、縦列のジ－、トリ－およびテトラヌクレオチド反復モチーフが含まれ、繰り返し配列数多型（ＶＮＴＲ）とも呼ばれる。ＶＮＴＲｓは、身元確認や父子鑑定（米国特許第５，０７５，２１７号；Ａｒｍｏｕｒｅｔａｌ．、１９９２、ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔ．３０７：１１３－１１５；Ｈｏｒｎｅｔａｌ．、ＷＯ ９１／１４００３；Ｊｅｆｆｒｅｙｓ、ＥＰ ３７０，７１９）、および多くの遺伝地図作製の研究において使用されている。

【００５２】

一塩基多型（ＳＮＰｓ）は、ＲＦＬＰＳ、ＳＴＲｓ、およびＶＮＴＲｓよりもさらに頻繁である。ＳＮＰｓはタンパクのコード配列（例えばエクソン）、または非コード配列（例えばイントロン、５’ＵＴＲ、３’ＵＴＲ）において生じ得る。タンパクコード領域におけるＳＮＰｓはタンパク質のアミノ酸配列に影響を及ぼさないサイレントな突然変異を含み得る。あるいは、タンパク質コード領域におけるＳＮＰｓは、以下に詳述する、保存的なまたは非保存的なアミノ酸変化を生じ得る。場合によっては、ＳＮＰｓは、欠陥のあるまたは遺伝病を引き起こすかもしれない他の変異タンパク質の発現を惹起することもある。例えば、ｐ－グロビン（鎌状赤血球貧血）および ＣＦＴＲ（嚢胞性線維症）遺伝子において、タンパク質コード配列内のＳＮＰｓは遺伝病を引き起こし得る。非コード配列では、ＳＮＰｓは欠陥のあるタンパク質の発現ももたらし得る（例えば、欠陥のあるスプライシングの結果として）。他の一塩基多型は表現型に対する影響は及ぼさない。

【００５３】

一塩基多型はＲＦＬＰｓおよびＶＮＴＲｓと同様に用いることができるが、 いくつかの効果を発揮する。一塩基多型は、高い頻度で起こる傾向があり、他の多型と比較して、概してゲノムにわたってより均等な間隔で存在する。さらに、他の多型のタイプと比較して、異なるＳＮＰｓを区別しやすいことが多い（例えば、対立遺伝子特異的なハイブリダイゼーションプローブまたはプライマーを用いる分析の使用によって）。本発明の１つの態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸は少なくとも１つのＳＮＰを含む。これらＳＮＰｓの様々な組合せもまた本発明によって包含される。好ましい態様では、Ｂ７関連ＳＮＰは、本明細書に詳述されている障害のような免疫系の障害に関連している。

【００５４】

さらに、本発明は、ＢＳＬ１（配列番号１および３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）核酸配列と中程度のホモロジーを共有し、適度にストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸分子とハイブリダイズする核酸分子を包含する。より好ましくは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸配列と実質的な相同性を共有し、ストリンジェンシーの高い条件下でＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸分子とハイブリダイズする核酸分子である。本明細書に記載の、「中程度の相同性」とは、参照配列に対し少なくとも６０％の配列同一性を共有する配列を意味し（例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２またはＢＳＬ３）、「実質的な相同性」とは、参照配列に対し少なくとも９０％の配列同一性を共有する配列を意味する。但し、スプライス変異体として生じる、または保存的なアミノ酸置換（または縮重コドンの置換）によって修飾される、上記よりも低い相同性のレベルを含むポリペプチドおよびそのようなポリペプチドをコードする核酸は本発明の範囲に属すると解釈されるということは認識される。

【００５５】

本明細書において用いられる「ハイブリダイゼーション条件」は、２本鎖の核酸ハイブリッドが２本の１本鎖の核酸から形成して、安定に保たれる条件を意味する。当業者に知られているように、ハイブリッド配列の安定性はハイブリッドの融解温度（Ｔｍ）に反映される（Ｆ．Ｍ．Ａｕｓｕｂｅｌｅｔａｌ．、Ｅｄｓ，（１９９５）Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ、Ｊｏｈｎ ＷｉｌｅｙおよびＳｏｎｓ、Ｉｎｃ．、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹを参照）。Ｔｍは、配列の相同性が１

％減少するごとに約０．５～１．５℃下がる。一般に、ハイブリッド配列の安定性はそのハイブリッドの長さとグアニン／シトシン含量、ナトリウムイオン濃度およびインキュベーション温度の関数である。概して、ハイブリダイゼーション反応を、ストリンジェンシーの低い条件下で開始した後、洗液をストリンジェンシーの高いものに変える。ハイブリダイゼーションのストリンジェンシーの基準は、このような洗浄条件に関係する。

【００５６】

本発明によれば、「高いストリンジェンシー」条件は、例えば、４０℃にて、５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ 溶液、５×ＳＳＰＥ、および０．２％ＳＤＳ中のハイブリダイゼーション、次いで６５℃での０．１×ＳＳＰＥおよび０．１％ＳＤＳ中での洗浄によってもたらされる。対照的に、「中程度のストリンジェンシー」は、例えば、４２℃での、５０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、５×ＳＳＰＥ、および０．２％ ＳＤＳ中のハイブリダイゼーション、次いで６５℃での０．２×ＳＳＰＥおよび０．２％ ＳＤＳ中での洗浄によってもたらされる。さらに、「低いストリンジェンシー」条件は、例えば、４２℃での、１０％ホルムアミド、５×Ｄｅｎｈａｒｄｔ’ｓ溶液、６×ＳＳＰＥ、および０．２％ ＳＤＳ中でのハイぶりだいざーション、次いで５０℃での１×ＳＳＰＥおよび０．２％ ＳＤＳ中での洗浄によってもたらされる。これらの条件は、当業者に周知の種々の緩衝液および温度を用いて変更することができるということは理解される。

【００５７】

本発明の好ましい態様において、核酸は、Ｂ７関連因子の少なくとも一部をコードするＤＮＡである。新規のＢ７関連因子をコードする核酸分子は、活性化されたＢリンパ球に存在するｍＲＮＡから得ることができる。Ｂ細胞ゲノムＤＮＡからＢ７関連因子をコードする核酸分子を得ることも可能である。したがって、Ｂ７関連因子をコードする核酸は、本明細書に詳細に記載したプロトコルにしたがってｃＤＮＡまたはゲノムライブラリーのいずれかからクローニングすることができる。新規のＢ７関連因子をコードする核酸は、本明細書において提供される核酸配列情報にしたがって、確立されたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）技術（ｓｅｅ Ｋ．Ｍｕｌｌｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｓｙｍｐ．Ｑｕａｎｔ．Ｂｉｏｌ．５１：２６０；Ｋ．Ｈ．Ｒｏｕｘ（１９９５）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．４：Ｓ１８５）を用いて、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡからクローニングすることもできる。本発明の核酸分子またはその断片は、標準的な技術を用いて化学的に合成することもできる。ペプチド合成のように、商業的に入手可能なＤＮＡ合成装置において完全に自動化された固相合成法を含め、ポリデオキシヌクレオチドを化学的に合成する様々な方法が、知られている（例えば、Ｉｔａｋｕｒａ らの米国特許第４，５９８，０４９号；Ｃａｒｕｔｈｅｒｓらの米国特許第４，４５８，０６６；Ｉｔａｋｕｒａの米国特許第４，４０１，７９６号および同第４，３７３，０７１号を参照）。

【００５８】

新規のＢ７関連因子をコードする核酸分子の１またはそれ以上のヌクレオチドにおける変異（ヌクレオチドの約３～４％まで）が、天然の対立遺伝子の変異に起因する集団における個人の間で存在し得るということは、当業者には明らかであろう。任意のおよびすべてのそのようなヌクレオチド変異および生じるアミノ酸多型は本発明の範囲内である。さらに、１またはそれ以上のアイソフォームまたは関連した、本明細書に記載のＢ７関連因子のファミリーの交差反応するメンバーもあり得る。そのようなアイソフォームまたはファミリーのメンバーは、Ｂ７関連因子（例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３）に対して機能およびアミノ酸配列において関連するポリペプチドであると定義されるが、異なる位置で遺伝子によってコードされる。

【００５９】

ＤＮＡ配列の突然変異は、単純な欠失または挿入、塩基の一群の系統的な欠失、挿入または置換、または１個の塩基の置換を作製するための方法を含む、数多くの方法のうちのいずれか１つによって、Ｂ７関連因子をコードする核酸に導入して、所望の変異体を作製す

ることができる。アミノ酸置換または欠失を作製するためのＢ７関連核酸分子の突然変異は、部位特異的突然変異誘発により好ましく得ることができる。部位特異的突然変異誘発は当業者によく知られており、商業的な供給元から入手することができる（例えば、Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪを参照）。どのアミノ酸を、生物学的または免疫学的活性を損なうことなく、置換、挿入または欠失し得るかの判断の指針は、当分野で周知のコンピュータプログラム、例えば、ＤＮＡＳＴＡＲソフトウエア（ＤＮＡＳＴＡＲ、Ｉｎｃ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を用いて見出すことができる。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸分子の突然変異体は、発現したポリペプチドまたはペプチドが免疫または炎症細胞（例えば、Ｔ細胞）を調節することが可能である場合は、本発明の範囲内にと考えられる。

【００６０】

新規のＢ７関連因子をコードする核酸配列の断片は、Ａ断片 ｏｆ 核酸 ｍｏｌｅｃｕｌｅ ｅｎｃｏｄｉｎｇ ａ ｎｏｖｅｌＢ７ｒｅｌａｔｅｄ ｆａｃｔｏｒ ｉｓ ｄｅｆｉｎｅｄ ａｓ ａ ヌクレオチド配列ｈａｖｉｎｇ ｆｅｗｅｒ ヌクレオチドｔｈａｎ ヌクレオチド配列ｅｎｃｏｄｉｎｇ ｅｎｔｉｒｅアミノ酸配列ｏｆ ｔｈｅＢ７関連因子の全アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列よりも少ないヌクレオチドを有するヌクレオチド配列として定義される。．核酸断片 ｗｈｉｃｈ ｅｎｃｏｄｅ ポリペプチド ｗｈｉｃｈ ｒｅｔａｉｎ ａｂｉｌｉｔｙ ｔｏ ｂｉｎｄ ｔｏ ｔｈｅｉｒ ｎａｔｕｒａｌ リガンド（ｓ）ｏｎ Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞の天然のリガンドに結合する能力を保持しているポリペプチドをコードする核酸断片、および免疫応答を増幅またはブロックする（例えば、一次活性化シグナルを受け取ったＴ細胞によるリンホカイン産生および／または増殖によって確認される）は、本発明の範囲内に入ると考えられる。例えば、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドに結合しＴ細胞に対する副刺激を送達する能力を保持するＢ７関連因子のポリペプチドまたはペプチドをコードする核酸断片は、本発明の範囲に入る。一般に、Ｂ７関連因子の断片をコードする核酸分子は、成熟タンパク質のコード配列から選択される。しかし、場合によっては、リーダー配列を含むコード領域の断片のすべてまたは一部を選択することが望ましいこともある。

【００６１】

本発明の１つの態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ 核酸配列はｃａｎ ｂｅ ｕｓｅｄ ａｓ ａプローブ ｆｏｒ ａｓｓａｙｉｎｇ ａ ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ ｓａｍｐｌｅ ｆｏｒ 発現 ｏｆ １またはそれ以上のＢ７関連因子の発現のための生物学的サンプルを分析するためのプローブとして、またはＤＮＡスクリーニングまたはＰＣＲ増幅のためのプライマーとして用いることができる。好ましくは、このような断片は、少なくとも８個の隣接したヌクレオチドの長さ、より好ましくは少なくとも１２個の隣接したヌクレオチドの長さ、さらに好ましくは１５個の隣接したヌクレオチドの長さおよびさらに好ましくは少なくとも２０個の隣接したヌクレオチドの長さである。本発明の範囲に属する核酸分子はさらに、リンカー配列、修飾制限エンドヌクレアーゼ部位、および組換えタンパク質またはその断片の分子のクローニング、発現または精製に有用なその他の配列を含む。本発明の核酸分子は、さらに放射性同位元素、または化学発光物質、傾向物質またはその他の標識化合物と結合させてもよい（例えば、ジゴキシゲニン）。さらに、本ａＰＣｈツ名の核酸分子は、核酸修飾酵素、例えば、キナーゼまたはホスファターゼによって修飾されていてもよい。核酸分子のこれらのおよび他の修飾は当分野においてよく知られている。

【００６２】

さらに、Ｂ７関連因子または生物学的に活性なその断片をコードする核酸分子、は、融合タンパク質（キメラタンパク質とも呼ばれる）をコードするためにヘテロローガスな配列と連結することができる。例えば、本明細書に記載のＢ７関連因子およびヒトＩｇＧのＦｃドメインを含む融合タンパク質をコードする核酸を構築するのに有用であろう。得られるＢＳＬ１－Ｉｇ、ＢＳＬ２－ＩｇおよびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質は、次に宿主細胞内で発現させ、免疫調節に有用な医薬組成物を製造するために使用することができる（

以下参照）。Ｂ７関連ポリペプチドを含む融合タンパク質は、Ｂ７関連ポリペプチドまたは抗体の単離や精製に使用することもできる（以下参照）。さらに、融合タンパク質は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の細胞のリガンドまたは結合パートナーを同定するために用いることができる（以下参照）。

【００６３】

Ｂ７関連核酸発現ベクター

本発明の更なる態様は、本明細書に記載の、少なくとも１つの調節配列に作動可能なように連結した、少なくとも１つのＢ７関連因子をコードする核酸を含む発現ベクターに関する。「作動可能なように」は、ヌクレオチド配列がそのヌクレオチド配列の発現が可能になるように調節配列に連結していることを意味する。調節配列は当分野に知られており、適当な宿主細胞における目的タンパク質の発現を指揮するように選択する。したがって、調節配列の用語には、プロモーター、エンハンサーおよびその他の発現調節エレメントが含まれる（Ｄ．Ｖ．Ｇｏｅｄｄｅｌ（１９９０）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｅｎｚｙｍｏｌ．１８５：３－７を参照）。発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択および／または発現させる所望のポリペプチド等の因子に依存し得るということは理解される。

【００６４】

本発明で使用するのに適当な宿主細胞としては、細菌、真菌、酵母、植物、昆虫、および動物細胞、特に哺乳類およびヒト細胞が挙げられる。好ましい複製および遺伝系としては、Ｍ１３、ＣｏｌＥ１、ＳＶ４０、バキュロウイルス、ラムダ、アデノウイルス、ＣＥＮ ＡＲＳ、２μｍＡＲＳなどが挙げられる。いくつかの調節エレメント（例えばプロモーター）は単離されており、様々な宿主においてヘテロローガスなタンパク質の転写および翻訳に有効であることが示されている。そのような調節領域、単離の方法、操作のやり方などは、当分野に知られている。細菌プロモーターの非限定的な例としては、β－ラクタマーゼ（ペニシリナーゼ）プロモーター；ラクトースプロモーター；トリプトファン（ｔｒｐ）プロモーター；ａｒａＢＡＤ（アラビノース）オペロンプロモーター；λ－由来P_1プロモーターおよびＮ遺伝子リボース結合部位および、ｔｒｐおよびｌａｃＵＶ５プロモーターの配列由来のハプロイドｔａｃプロモーターが挙げられる。酵母プロモーターの非限定的な例としては、３－ホスホグリセリン酸キナーゼプロモーター、グリセルアルデヒド－３－リン酸デヒドロゲナーゼ（ＧＡＰＤＨ）プロモーター、ガラクトキナーゼ（ＧＡＬ１）プロモーター、ガラクトピメラーゼプロモーター、およびアルコール脱水素酵素（ＡＤＨ１）プロモーターが挙げられる。哺乳類細胞に適したプロモーターとしては、シミアンウイルス４０（ＳＶ４０）、ラウス肉腫ウイルス（ＲＳＶ）、アデノウイルス（ＡＤＶ）、およびウシ乳頭腫ウイルス（ＢＰＶ）等に由来のウイルスプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。.

【００６５】

真核細胞はさらに、遺伝子発現を調節する、ターミネーター配列、ポリアデニル化配列およびエンハンサー配列を必要とするかもしれない。遺伝子の増幅を引き起こす配列も望ましいかもしれない。これらの配列は等分野においてよく知られている。さらに、シグナル配列および／またはプレタンパクもしくはプロタンパク配列等の、細菌、酵母および動物細胞が含まれるがこれに限定されない細胞からの組換え産物の分泌を促進する配列を含んでいてもよい。そのような配列は等分野において十分に記載されている。

【００６６】

適当な発現ベクターとしては、ｐＵＣ、ｐＢｌｕｅｓｃｒｉｐｔ（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）、ｐＥＴ（Ｎｏｖａｇｅｎ、Ｉｎｃ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）、およびｐＲＥＰ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）プラスミドが挙げられるがこれに限定されない。ベクターは、クローニングまたは発現のための１またはそれ以上の複製および遺伝系、宿主における選択のための１またはそれ以上のマーカー、例えば抗生物質耐性、および１またはそれ以上の発現カセットを含む。挿入されたコード配列は、標準的な方法により合成し、天然の供給源から単離し、またはハイブリッドとして調製することができる。コード配列の転写調節エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、および／またはインシュレーター）お

よび／またはその他のアミノ酸コード配列への連結は、確立された方法を用いて実施することができる。

【００６７】

１つの態様において、発現ベクターは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドの少なくとも一部をコードする核酸を含む。別の態様では、発現ベクターは、Ｂ７関連因子をコードするＤＮＡ配列および別のＢ７関連因子またはヘテロローガスなポリペプチドまたはペプチドをコードするＤＮＡ配列を含む。そのような発現ベクターは、宿主細胞をトランスフェクトして、それによって以下に記載の核酸分子によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含む、ポリペプチドまたはペプチドを産生させるために使用することができる。

【００６８】

Ｂ７関連ポリペプチド

本発明の更なる態様は、Ｂ７関連ポリペプチドおよびＢ７関連ペプチドを単離する方法に関する。本明細書に用いられる、「タンパク質」および「ポリペプチド」は同義である。ペプチドは、タンパク質またはポリペプチドの断片または一部、好ましくは、完全なタンパク質と同じまたは等価な機能または活性を有する断片または一部でとして定義される。Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドの天然に存在する形態および組換え形態は、本発明の分析および処置に用いることができる。細胞内または細胞外リゼート等の天然の供給源からのポリペプチドまたはペプチドを直接単離および精製するための方法は、当分野においてよく知られている（Ｅ．Ｌ．Ｖ．ＨａｒｒｉｓおよびＳ．Ａｎｇａｌ、Ｅｄｓ．（１９８９）Ｐｒｏｔｅｉｎ精製カラムＭｅｔｈｏｄｓ：Ａ ＰｒａｃｔｉｃａｌＡｐｐｒｏａｃｈ、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌおよび）。そのような方法として、調製用ディスクゲル電気泳動、等電点フォーカシング、高速液体クロマトグラフィー（ＨＰＬＣ）、逆相ＨＰＬＣ、ゲル濾過、イオン交換および分配クロマトグラフィー、および向流分配、およびその組合せが挙げれられるがこれらに限定されない。天然に存在するポリペプチドは、多くの可能な供給源、例えば、血漿、体細胞および組織または体液を精製することができる。

【００６９】

組換えＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドを製造するために、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドをコードするＤＮＡ配列を、インタクトな宿主細胞または無細胞の翻訳系における発現に適当なベクター内にクローニングする（例えば、Ｊ．Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．前掲）。原核および真核ベクターおよび宿主細胞を用いることができる。ベクター、宿主細胞、または翻訳系の具体的な選択は、本発明を実施するのには重要ではない。所望であれば、与えられた生物におけるより効率的な発現のために、ＤＮＡ配列を最適化することができる。例えば、コドンを変更して、当業者が常套的に行っている技術を用いて与えられた宿主細胞または無細胞翻訳系における好ましいコドンの使用に適合させることができる。

【００７０】

目的によっては、ペプチドまたはポリペプチドが精製を容易にするための更なる配列タグを有している組換え系においてペプチドまたはポリペプチドを産生させることが好ましいかもしれない。そのようなマーカーとしては、エピトープタグおよびタンパク質タグが含まれる。エピトープタグの非限定的な例としては、ｃ－ｍｙｃ、ヘマグルチニン（ＨＡ）、ポリヒスチジン（６Ｘ－ＨＩＳ）、ＧＬＵ－ＧＬＵ、およびＤＹＫＤＤＤＤＫ（ＦＬＡＧ（登録商標））エピトープタグが挙げられる。エピトープタグは、数多くの確立された方法によってペプチドに付加することができる。エピトープタグのＤＮＡ配列は、ＰＣＲ増幅において使用するオリゴヌクレオチドまたはスループライマーとして、ペプチドコード配列内へ挿入することができる。別法として、ペプチドコード配列は、エピトープタグを有する融合物を作出する特定のベクター内、例えば、ｐＲＳＥＴベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡ）、へクローニングすることができる。タンパク質タグの非限定的な例としては、グルタチオン－Ｓ－トランスフェラーゼ（Ｇ

ＳＴ）、緑色蛍光タンパク質（ＧＦＰ）、およびマルトース結合タンパク質（ＭＢＰ）が挙げられる。タンパク質タグをいくつかの周知の方法によってペプチドまたはポリペプチドに結合する。１つの方法では、ポリペプチドまたはペプチドのコード領域をそのポリペプチドまたはペプチドと目的のタンパク質タグとの融合物を作出するベクター内へクローニングすることができる。適当なベクターとしては、典型的なプラスミド、ｐＧＥＸ（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）、ｐＥＧＦＰ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）、およびＰＭＡＬ（登録商標）（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌおよび Ｂｉｏ Ｌａｂｓ、Ｉｎｃ．、Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ）が挙げられるが、これに限定されない。発現後、エピトープまたはタンパク質タグを有するポリペプチドまたはペプチドを、適当な固相マトリックスでのクロマトグラフィーにより翻訳系の粗製リゼートまたは宿主細胞から精製することができる。場合によっては、精製後に、エピトープまたはタンパク質タグ（プロテアーゼ開裂により）を除去してもよい。

【００７１】

本発明に従う使用に適当な無細胞発言系としては、ウサギ網状赤血球リゼート、小麦麦芽抽出物、イヌ膵臓ミクロソーム膜、大腸菌Ｓ３０抽出物、およびカップリングした転写／翻訳系（Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）が挙げられる。これらの系は、クローニングベクター、コード領域および適当なプロモーターエレメントを含むＤＮＡ断片またはＲＮＡ配列の添加によって組換えポリペプチドまたはペプチドの発現が可能になる。

【００７２】

組換えクローニングベクターのための宿主細胞としては、細菌、ａｒｃｈｅ細菌、真菌、植物、昆虫および動物細胞、特に哺乳類細胞が挙げれれる。特に、興味深いのは、大腸菌、Ｂ．ｓｕｂｔｉｌｉｓ、Ｓ．ａｕｒｅｕｓ、Ｓ．ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ、Ｓ．ｐｏｍｂｅ、Ｎ．ｃｒａｓｓａ、ＳＦ９、Ｃ１２９，２９３、ＮＩＨ ３Ｔ３、ＣＨＯ、ＣＯＳ、およびＨｅＬａ細胞である。このような細胞は、エレクトロポレーション、$CaCl_2$－、ＬｉＣｌ－、ＬｉＡｃ／ＰＥＧ－、スフェロプラスティング、Ｃａ－ホスフェート、ＤＥＡＥ－デキストラン、リポソーム化したＤＮＡ取り込み、インジェクション、マイクロインジェクション、マイクロインジェクタイルボンバードメント、またはその他の確立された方法を含むいずれかの適当な方法によって、必要に応じて、形質転換、トランスフェクトまたは形質導入することができる。

【００７３】

Ｉｎ ｏｒｄｅｒ ｔｏ ｉｄｅｎｔｉｆｙ ｈｏｓｔ細胞 ｔｈａｔ ｃｏｎｔａｉｎ 発現ベクター、ａ ｇｅｎｅ ｔｈａｔ ｃｏｎｔａｉｎｓ ａ ｓｅｌｅｃｔａｂｌｅ ｍａｒｋｅｒ ｉｓ ｇｅｎｅｒａｌｌｙ ｉｎｔｒｏｄｕｃｅｄ ｉｎｔｏ ｈｏｓｔ細胞 ａｌｏｎｇ ｗｉｔｈ ｇｅｎｅ ｏｆ ｉｎｔｅｒｅｓｔ．Ｐｒｅｆｅｒｒｅｄ ｓｅｌｅｃｔａｂｌｅ ｍａｒｋｅｒｓ ｉｎｃｌｕ発現ベクターを含む宿主細胞を同定するために、選択可能なマーカーを含む遺伝子は、目的の遺伝子と共に宿主細胞内へ遺伝子導入する。好ましい選択可能マーカーとしては、例えばＧ４１８、ハイグロマイシン、メトトレキセートまたはアンピシリンなどの薬物に対する耐性を与えるものが挙げられる。選択可能マカーは、目的遺伝子と同じプラスミドに導入することができる。薬物耐性マーカーを有する細胞は、対応する薬物を含む培地で生存するので、目的遺伝子を含む宿主細胞は薬物選択によって同定する。

【００７４】

生存細胞を組換えＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドまたはその融合物の産生についてスクリーニングすることができる。１つの態様では、組換えポリペプチドは細胞表面に分泌され、およびＢ細胞抗原に対するリガンド（例えば、ＣＤ２８－Ｉｇ）で細胞表面染色により同定することができる。別の態様では、組換えポリペプチドは、宿主細胞の細胞質に保持され、抗Ｂ７関連ポリペプチド抗体を用いる細胞抽出物において同定することができる。さらに別の態様では、か用性組換えポリペプチドは培地に分泌され、抗Ｂ７関連ポ

リペプチド抗体で培地をスクリーニングすることにより同定される。可溶性の、分泌された組換えＢ７ポリペプチドは、細胞質および／または膜貫通領域を含まない、ポリペプチドの細胞外ドメインまたはその任意の断片を含む。細胞表面および細胞質組換えＢ７関連ポリペプチドは、細胞質のタンパク質の溶解および抽出の後、単離することができ、そのこで、分泌した組換えＢ７関連ポリペプチドを標準的な技術によって培地から単離することができる（Ｉ．Ｍ．Ｒｏｓｅｎｂｅｒｇ、Ｅｄ．（１９９６）Ｐｒｏｔｅｉｎ 解析および精製カラム：Ｂｅｎｃｈｔｏｐ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ、Ｂｉｒｋｈａｕｓｅｒ、Ｂｏｓｔｏｎ、Ｃａｍｂｒｉｄｇｅ、ＭＡ参照）。

【００７５】

抗体ベースの方法は、天然のまたは組換えにより産生したＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドを精製するために用いることができる。そこから得られるこれらのポリペプチドまたはペプチドを認識する抗体は、当分野で知られ実施されている方法を用いて製造および単離することができる（以下参照）。Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドを、抗体を結合させた固相マトリックスを用いてクロマトグラフィーにより粗製のリゼートから精製することができる（Ｅ．ＨａｒｌｏｗおよびＤ．Ｌａｎｅ、１９９９、Ｕｓｉｎｇ 抗ｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹを参照）。当分野で知られているその他の方法も利用することができる。

【００７６】

Ｂ７関連因子を細胞表面上に発現する形質転換した宿主細胞（例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３）またはその一部は、本発明の範囲に属する。例えば、肉腫、メラノーマ、白血病、リンパ腫、悪性腫瘍または神経芽細胞腫等の腫瘍細胞を少なくとも１つのＢ７関連因子の発現を指揮する発現ベクターにより形質転換することができる。そのような形質転換細胞は、本明細書に詳細に記載された腫瘍免疫を処置するのに使用することができる。

【００７７】

Ｂ７関連ポリペプチド

本発明の更なる態様は、Ｂ７関連ポリペプチドを単離することに関する。本発明は、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチド、およびその断片および機能的等価物を包含する。そのようなポリペプチドは、少なくとも５、１２、２０、３０、５０、１００、１７０、２００、２１０、３００、または５００個の隣接したアミノ酸残基を含む。好ましくは、ＢＳＬ１（配列番号 ２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号 １５）ポリペプチドと中程度の相同性を共有するポリペプチドである。より好ましくは、ＢＳＬ１（配列番号 ２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）と実質的な相同性を共有するポリペプチドである。

【００７８】

「機能的等価物」なる語は、アミノ酸配列が与えられたＢ７関連ポリペプチド、例えばＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドの配列、とは異なるタンパク質を包含するものと意図されるが、そのような相違が、少なくとも１つのＢ７関連ポリペプチドの特徴的な機能（例えば、リガンド結合、抗原性、細胞間または細胞内活性）を示す修飾タンパク質をもたらすようなタンパク質を包含するものと意図する。例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチドは、このポリペプチドの機能（即ち、Ｔ細胞増殖を副刺激するこれらポリペプチドの能力）に直接関与しないアミノ酸残基の置換、付加または欠失などの修飾を有していてもよい。さらに、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドに結合することが可能なＢ７関連ポリペプチドの非天然のアナログは、機能的等価物と考えられる。Ｂ７関連ポリペプチドの機能的等価物を産生させるための、これらポリペプチドの様々な修飾は本明細書に詳細に記載されている。

【００７９】

溶解性を増大させる、治療または予防効果（反応性）、または安定性（例えば、生体外での保管期限および生体内でのタンパク質分解に対する耐性）を高める目的等のために、Ｂ７関連ポリペプチドの構造を修飾することも可能である。そのような修飾タンパク質は、本明細書に記載のＢ７関連ポリペプチドの機能的等価物であると考えられる。好ましくは、Ｂ７関連ポリペプチドを、Ｔ細胞増殖を副刺激する能力を保持するように修飾する。Ｔ細胞上のＣＤ２８またはＣＤ２８関連リガンドと相互作用するのに必須であることが示されている残基は、必須のアミノ酸を、その存在によってレセプターの相互作用が増大、減少はするが、相互作用の消失や誘起はもたらさないことが分かっている別のアミノ酸、好ましくは類似のアミノ酸残基（保存的置換）で置換することによって修飾することができる。さらに、レセプター相互作用に必須であるそれらのアミノ酸残基を修飾することができる。そのアミノ酸を導入することによって反応性が増大、減少し得るが、反応性は誘起しない別のアミノ酸で置換することにより修飾することができる。例えば、Ｂ７関連ポリペプチドをシステイン残基を、アラニン、セリン，トレとニン、ロイシンまたはグルタミン酸等の他のアミノ酸で置換することにより修飾して、ジスルフィド結合による二量体化を防止することができる。さらに、本発明のＢ７関連ポリペプチドのアミノ酸側鎖を化学的に修飾することができる。また、Ｂ７関連ポリペプチドをアミノ酸配列の環化によって修飾することができる。

【００８０】

安定性および／または反応性を増大させるために、Ｂ７関連ポリペプチドを改変して１またはそれ以上の多型をアミノ酸配列に組み込むことができる。さらに、Ｄ－アミノ酸、非天然のアミノ酸または非アミノ酸アナログを置換または付加して修飾ポリペプチドを製造することができる。さらに、本明細書に記載のＢ７関連ポリペプチドをポリエチレングリコール（ＰＥＧ）を用いて、既知の方法（Ｗｉｅ ｅｔ ａｌ．前掲）により修飾してＰＥＧが結合したタンパク質を製造することができる。さらに、ＰＥＧをタンパク質の化学合成の間に付加することができる。その他の可能な修飾としては、還元／アルキル化（Ｔａｒｒ（１９８６）Ｍｅｔｈｏｄｓ ｏｆ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｍｉｃｒｏｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ、Ｊ．Ｅ．Ｓｉｌｖｅｒ、Ｅｄ．、ヒトａ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｌｉｆｔｏｎ、ＮＪ、ｐｐ．１５５－１９４）；アシル化（Ｔａｒｒ前掲）；適当な担体との化学的カップリング（ＭｉｓｈｅｌｌおよびＳｈｉｉｇｉ、Ｅｄｓ．（１９８０）Ｓｅｌｅｃｔｅｄ Ｍｅｔｈｏｄｓ ｉｎ Ｃｅｌｌｕｌａｒ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ、ＷＨ Ｆｒｅｅｍａｎ、Ｓａｎ Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ、ＣＡ；米国特許第４，９３９，２３９；またはＢ７関連ポリペプチドの温和なホルマリン処理（Ｍａｒｓｈ（１９７１）Ｉｎｔ Ａｒｃｈ．ｏｆ Ａｌｌｅｒｇｙおよびａｐｐｌ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．４１：１９９－２１５）が挙げられる。

【００８１】

修飾されたポリペプチドは保存的変化を有し、置換されたアミノ酸が同様の構造または化学的特性を有する。例えばロイシンのイソロイシンによる置換。時には、修飾されたポリペプチドは、非保存的変化を有することができる。例えば、トリプトファンによるグリシンの置換。生物学的または免疫学的活性を損なうことなく、どのアミノ酸残基を置換挿入または欠失するかの判断の指針は、当分野で周知のコンピュータプログラム、例えば、ＤＮＡＳＴＡＲソフトウエア（ＤＮＡＳＴＡＲ、Ｉｎｃ．，Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を用いて見出すことができる。

【００８２】

非限定的な例として、Ｂ７関連アミノ酸配列の保存的置換は、以下の表にしたがって行うことができる：

元の残基	保存的置換
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln、His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn、Gln
Ile	Leu、Val
Leu	Ile、Val
Lys	Arg、Gln、Glu
Met	Leu、Ile
Phe	Met、Leu、Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp、Phe
Val	Ile、Leu

【００８３】
機能または免疫における実質的変化は、上記の表に示されているものよりも保存性の低い置換を選択することによって作製することができる。例えば、変更する領域、例えば、α－ヘリックスルまたはβ－シート構造；標的部位での分子の電荷または疎水性；または側鎖のかさ高さにおいて、より有意の影響をポリペプチドの構造に及ぼす非保存的置換を行うことができる。ｓｕｂｓｔｉｔｕｔｉｏｎｓ ｗｈｉｃｈ ｇｅｎｅｒａｌｌｙ ａｒｅ ｅｘｐｅｃｔｅｄ ｔｏ ｐｒｏｄｕｃｅ ｇｒｅａｔｅｓｔ ｃｈａｎｇｅｓ ｉｎ ポリペプチドの特性の大きな変化をもたらすと一般に予想される置換は、１）疎水性残基、例えば、セリルまたはトレオニルで（を）、疎水性残基、例えばロイシル、イソロイシル、フェニルアラニル、バリルまたはアラニルを（で）置換する；２）システインまたはプロリンで（を）任意の他の残基を（で）置換する；３）正に荷電した側鎖を有する残基、例えばリシル、アルギニル、またはヒスチジルで（を）負に荷電した残基、例えばグルタミルまたはアスパルチルを（で）置換する；または４）かさ高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニンで（を）側鎖を持たない残基、例えばグリシンを（で）置換する。
【００８４】

好ましいポリペプチドの態様は、さらに、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）のアミノ酸配列と少なくとも６０，７０，８０、８５，９０，９５，９７，９８，９９，９９．５または１００％を同一性を共有するアミノ酸配列を含む単離されたポリペプチドを包含する。このポリペプチド配列は配列ｏｆ ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）の配列と同一、または参照配列との比較である特定の整数個のアミノ酸変化まで含んでいてもよい。

【００８５】

配列同一性の百分率は、コンピュータプログラムを用いて計算するかまたは配列を直接比較することができる。２つの配列間の同一性を決定するための好ましいコンピュータプログラム法としては、ＧＣＧプログラムパッケージ、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴＰ、およびＴＢＬＡＳＴＮ（例えばＤ．Ｗ．Ｍｏｕｎｔ、２００１、Ｂｉｏｉｎｆｏｒｍａｔｉｃｓ：配列およびＧｅｎｏｍｅ 解析、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹを参照）が挙げられるがこれに限定されない。ＢＬＡＳＴＰおよびＴＢＬＡＳＴＮプログラムは、ＮＣＢＩおよびその他の供給元から公に入手可能である。周知のＳｍｉｔｈ Ｗａｔｅｒｍａｎアルゴリズムを用いて同一性を決定してもよい。

【００８６】

アミノ酸配列の比較のためのパラメータの例としては、以下のものが挙げられる：１）ＮｅｅｄｌｅｍａｎおよびＷｕｎｓｃｈ、１９７０、Ｊ Ｍｏｌ、Ｂｉｏｌ．４８：４４３－４５３のアルゴリズム；２）ＨｅｎｔｉｋｏｆｆおよびＨｅｎｔｉｋｏｆｆ、１９９２、Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：１０９１５－１０９１９のＢＬＯＳＳＵＭ６２比較マトリックス；３）ギャップペナルティ＝１２；および４）ギャップ長ペナルティ＝４。これらのパラメータに関して有用なプログラムは、「ギャップ」プログラムとして公に入手可能である（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）。後述のパラメータは、ポリペプチド比較のためのデフォルトのパラメータである（末端のギャップにはペナルティなし）。

【００８７】

あるいは、次式を用いてポリペプチド配列同一性を計算することができる：％同一性＝（同一の残基の数）／（アミノ酸残基のアライメントの長さ）×１００ 。この計算に関して、アライメントの長さには内部ギャップを含めるが末端のギャップは含めない。

【００８８】

本発明によれば、ポリペプチド配列は、配列ｏｆ ＢＳＬ１（例えば配列番号２），ＢＳＬ２（例えば配列番号７、１１、または１３）またはＢＳＬ３（例えば配列番号１５）の配列と同一であっても、特定の整数の数のアミノ酸の変更までを含んでいてもよい。ポリペプチドの変更は、保存的および非保存的な置換または挿入を含む、少なくとも１つのアミノ酸の欠失、置換からなる群から選択される。変化は、参照ポリペプチド配列のアミノまたはカルボキシ末端の位置で、またはそれら末端の間の任意の位置で、参照配列におけるアミノ酸または参照配列内の１またはそれ以上の隣接したアミノ酸の群において個々に分散して生じ得る。具体的な態様では、ポリペプチド変異体は、一塩基多型および／または別のスプライス変異体を含むＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３核酸によってコードされる。ポリペプチドはさらに、例えば、リン酸化、硫酸化またはアシル化によって修飾してもよい。それらは、放射性同位元素および蛍光化合物を含むがこれに限定されない、直接または間接的に検出可能なシグナルを提供することが可能な標識で修飾してもよい。

【００８９】

本発明はさらに、本明細書に記載の、ＢＳＬ１（例えば配列番号２）、ＢＳＬ２（例えば配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（例えば配列番号１５）タンパクまたはポリペプチドの、単離された、合成されたおよび／または組換えにより製造された部分または断片に関する。ポリペプチド断片（即ち、ペプチド）は、自身で完全なまたは部分的な機能を有するように、またはお互いに混合すると（完全に、部分的に、または単独で

機能しない）、１またはそれ以上の他のポリペプチドと自律的に集まって、本発明のＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３タンパク質の少なくとも１つの機能的な特性を有するタンパク質を再構成するように、製造することができる。さらに、Ｂ７関連ポリペプチド断片は、例えば、本明細書に記載の１またはそれ以上のポリペプチドのドメイン（例えば膜貫通または細胞外ドメイン）を含んでいてもよい。

【００９０】

機能保存的な変異体を含め、本発明のポリペプチドは、野生型のまたは突然変異細胞（例えばヒト細胞または細胞系）から、ヘテロローガスな生物または細胞（例えば細菌、酵母、昆虫、植物、および哺乳動物細胞）から、またはタンパクコード配列が導入され発現する無細胞翻訳系（例えば小麦麦芽、ミクロソーム膜または細菌抽出物）から単離することができる。さらに、ポリペプチドは、組換え融合タンパク質の一部であってよい。ポリペプチドはまた、化学合成により有利に製造することができる。ポリペプチドはにより化学的に合成してもポリペプチド、独占的固相合成法、部分的固相合成法、断片、条件または古典的な液中合成を含むが、これに限定されない、商業的に入手し得る自動化された手法によって、化学的に合成することができる。本発明のポリペプチドの天然の形態および組換え体はいずれも、結合活性について化合物をスクリーニングするために使用することができる。本発明のポリペプチドは、本明細書に詳細に記載される、治療用剤、並びに抗体を製造するための抗原成分として使用される。

【００９１】

Ｂ７関連ポリペプチドに対する抗体

本発明の別の態様は、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド、好ましくはＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチド、またはそれらから誘導される断片を特異的に認識する抗体を包含する。本明細書において使用される、「抗体」は、エピトープ決定基と結合することが可能な、インタクトな分子、並びにＦａｂ、Ｆ（ａｂ）２、およびＦｖ等のその断片を意味する。Ｂ７関連ポリペプチド、好ましくはＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチド、と結合する抗体は、単離されたＢ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を、免疫原または免疫抗原として用いて当分野で知られた方法によって製造することができる（Ｉ．Ｌｅｆｋｏｖｉｔｓ、Ｅｄ．，（１９９６）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍａｎｕａｌ Ａｃａｄｅｍｉｃ Ｐｒｅｓｓ、Ｉｎｃ．、Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ、ＣＡを参照）。当業者によって理解されるように、特に短いペプチドを用いる場合、所望であれば、免疫原をキャリアータンパク質に結合させて免疫原性を増大させることができる。ペプチドに化学的に結合させるのに一般に使用されているキャリアーとしては、血清アルブミン、例えばウシ、ヒツジ、ヤギまたは魚類血清アルブミン、サイログロブリンおよびキーホールリンペットヘモシニアンが挙げられる。次いで、結合させた免疫原キャリアーを受容動物（例えばマウス、ラット、ヒツジ、ヤギまたはウサギ）を免疫するのに用いる。

【００９２】

「抗原決定基」なる語は、特定の抗体と接触する分子の断片（即ちエピトープ）を意味する。Ｂ７－ポリペプチドまたはペプチド断片を宿主動物を免疫するために使用する場合、ポリペプチドまたはペプチド断片の多くの領域が、そのポリペプチドまたはペプチドの与えられた領域または三次元構造に特異的に結合する抗体の産生を誘導し得る。そのような領域または構造は、抗原決定基またはエピトープと呼ばれる。抗原決定基は、抗体に対する結合に関してインタクトな抗原（即ち、免疫応答を惹起するのに使用する免疫原）と拮抗し得る。ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドまたはペプチドに特異的な抗原決定基が好ましい。Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド由来の免疫原は、上記の技術を用いて得ることができる。例えば、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を天然または組換えの供給源から単離することができ、ゲル、特にＳＤＳ－ＰＡＧＥゲルからポリペプチドまたはペプチドを切取ることにより精製することができる。

【００９３】

本発明のＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、またはＢＳＬ３－特異的抗体としては、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体が挙げられる。抗体は、Ｂ７関連ポリペプチド由来の免疫原成分で免疫することによって宿主動物において惹起するか、または免疫細胞のインビトロ免疫（感作）によって形成することができる。抗体の産生を惹起するための免疫原として使用する免疫原成分は、 血漿から得るか、組換えにより産生させるか、または化学的合成することができる。抗原はさらに、適当な抗体コードＤＮＡでプログラムされた組換え系において産生させることもできる。あるいは、抗体を精製された重鎖および軽鎖の生化学的な再構成により構築することができる。抗体としては、ハイブリッド抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体（例えば、Ｃ．Ｊ．Ｑｕｅｅｎ ｅｔ ａｌ．の米国特許第５，５８５，０８９を参照）および一価抗体が挙げられる。抗体のＦａｂ断片断片、Ｆａｂ’およびＦ（ａｂ）２断片も含まれる。とりわけ、Ｂ７関連因子の、分泌された細胞表面形態または細胞質内の可溶性形態を特異的に認識する抗体を単離することができる。

【００９４】

本発明の免疫原成分に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、周知の技術によって製造することができる。ハイブリドーマは、不死化細胞系と所望の抗体を産生するＢリンパ球との融合によって産生することができる。あるいは、抗体産生細胞系を作製するための非融合法も可能であり、本発明の範囲に含まれる（Ｃａｓａｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２３４：４７６参照）。不死化細胞系は典型的には形質転換した哺乳類細胞、特にげっ歯類、ウシおよびヒト起源のミエローマ細胞である。最も頻繁には、便宜上、およびラットまたはマウスミエローマ細胞系を用いる。ハイブリドーマを選択するために、ＨＡＴ（ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン）選択等の標準的な手順を使用することができる。イムノブロッティンング、ＥＬＩＳＡ（酵素免疫測定吸着法；Ｅ．Ｅｎｇｖａｌｌ ｅｔ ａｌ．（１９７１）Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ、８：８７１－４；およびＤ．Ｊ．Ｒｅｅｎ（１９９４）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．３２：４６１－６）、ＲＩＡ（ラジオイムノアッセイ）、または比較分析等の標準的なイムノアッセイによって細胞の培地を分析することにより、所望のモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを選択することができる。抗体は、標準的なタンパク精製技術を用いて培地から回収することができる（Ｔｉｊｓｓｅｎ（１９８５）ＰｒａｃｔｉｃｅおよびＴｈｅｏｒｙ ｏｆ Ｅｎｚｙｍｅ Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ、Ｅｌｓｅｖｉｅｒ、Ａｍｓｔｅｒｄａｍを参照）。

【００９５】

１つの態様では、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片と反応する抗体は生物学的サンプルにおけるＢ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を同定または単離するための本発明の方法にしたがって使用する。Ｂ７関連ポリペプチドをサンプルから単離するあｔめに、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を特異的に認識し結合する抗体を固体の指示体に結合させ、この抗体結合した固体の支持体をサンプルまたはそのサンプルのアリコートとインキュベーションし、交代と結合したポリまたはペプチドを固体の支持体から溶出する。サンプルにおけるＢ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を検出するために、サンプルを、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片を特異的に認識し結合する抗体とを、その抗体とそのポリペプチドまたはペプチド断の結合が可能な条件下でインキュベーションし、抗体のＢ７関連ポリペプチドまたはペプチド断片との結合を測定する。

【００９６】

Ｂ７関連核酸またはポリペプチドを用いる分析

Ｂ７関連因子の発現解析：いくつかの十分に確立された技術を使用して、Ｂ７関連因子の発現レベル、パターンおよび細胞型特異性を調べることができる。例えば、ｍＲＮＡレベルを、ノーザンブロット解析（Ｊ．Ｃ．Ａｌｗｉｎｅ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５３５０－５３５４；Ｉ．Ｍ．Ｂｉｒｄ（１９９８）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３２５－３６．）を利用して測定することができ、それにより、ポリ（Ａ）$^{+}$ＲＮＡが細胞から単離され、ゲル電気泳動によって分離され、支持体表面にブッロッティングされ（例えばニトロセル

ロースまたはＩｍｍｏｂｉｌｏｎ－Ｎｙ＋（Ｍｉｌｌｉｐｏｒｅ Ｃｏｒｐ．、Ｂｅｄｆｏｒｄ、ＭＡ））、および目的のｍＲＮＡとハイブリダイズすることが可能な標識された（例えば蛍光標識されたまたは放射性同位元素で標識された）オリゴヌクレオチドプローブとインキュベーションされる。あるいは、ｍＲＮＡレベルを定量的（Ｗ．Ｍ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２６：１１２－１２２を参照）ＲＴ－ＰＣＲ解析または半定量的ＲＴ－ＰＣＲ解析（Ｒｅｎ ｅｔ ａｌ．Ｍｏｌ．脳 Ｒｅｓ．５９：２５６－６３）によって測定することができる。この技術によって、ポリ（Ａ）$^{+}$ ＲＮＡが細胞から単離され、ｃＤＮＡ合成に用いられ、そして得られたｃＤＮＡをテンプレートとハイブリダイズすることが可能なＰＣＲプライマーとインキュベーションし、目的のｍＲＮＡの細胞内レベルに近いＰＣＲ産物のレベルを産生するテンプレート配列を増幅する。別の技術、即ち ｉｎ ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーションは、ｍＲＮＡレベルを測定するために使用される（ｒｅｖｉｅｗｅｄ ｂｙ Ａ．Ｋ．Ｒａａｐ（１９９８）Ｍｕｔａｔ．Ｒｅｓ．４００：２８７－２９８を参照）。Ｉｎ ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション法は、細胞を、目的のｍＲＮＡとハイブリダイズすることが可能な標識された（例えば蛍光標識されたまたはジゴキシゲニン標識された）オリゴヌクレオチドプローブとインキュベーションした後、その細胞を顕微鏡で観察することにより、細胞内のｍＲＮＡの可視化された検出が可能となるものである。

【００９７】

Ｂ７関連遺伝子の染色体地図作成：Ｂ７関連遺伝子の染色体の位置は、当分野で周知の様々な方法によって決定することができる。例えば、高分解能染色体染色法を用いることができる（Ｍ．Ｒｏｎｎｅ（１９９０）Ｉｎ Ｖｉｖｏ ４：３３７－６５を参照）。抗分解能染色法は、ＤＮＡ合成阻害剤（例えばメトトレキセートまたはチミジン）またはＤＮＡ結合剤（例えば臭化エチジウム）を用いて同期させた有糸分裂初期の細胞から得た伸張された染色体を用いる。但し、これらの方法は、染色体の比較的大きな領域（約３Ｍｂ）に遺伝子をマッピングするためにのみ使用することができる。より正確な遺伝子地図作製のためには、蛍光ｉｎ ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション法（ＦＩＳＨ）を使用することができる。特に、高解像度ＦＩＳＨ法（Ａ．Ｐａｌｏｔｉｅ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ａｎｎ．Ｍｅｄ．２８：１０１－１０６）は、遊離のクロマチン、ＤＮＡ線維、または機械的に伸張させた染色体を用いて、数ｋｂ～３００ ｋｂのサイズの範囲の遺伝子配列をマップする。あるいは、遺伝子の染色体の位置を適当なゲノムデータベース、例えば、Ｅｎｔｒｅｚ Ｇｅｎｏｍｅ ウェブサイト（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ：８０／ｅｎｔｒｅｚ／ｑｕｅｒｙ．ｆｃｇｉ？ｄｂ＝Ｇｅｎｏｍｅ；Ｎａｔｉｏｎａｌ Ｃｅｎｔｅｒ ｆｏｒ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ Ｉｎｆｏｒｍａｔｉｏｎ、Ｂｅｔｈｅｓｄａ、ＭＤ）で入手可能なヒトゲノムデータベースから決定することができる。

【００９８】

Ｔ細胞リガンドの同定：本明細書に記載のＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドは、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞（即ち、ＣＤ２８－またはＣＴＬＡ－４－関連リガンド）上の同族のリガンドを同定するために使用することができる。候補のリガンドまたはそれらから由来する断片は、当分野で周知の多くの方法によって同定し解析することができる（Ｔ．Ｅ．Ｃｒｅｉｇｈｔｏｎ、Ｅｄ．、１９９７、Ｐｒｏｔｅｉｎｓ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ：Ａ Ｐｒａｃｔｉｃａｌ Ａｐｐｒｏａｃｈ、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌおよび参照）。例えば、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドに結合するＴ細胞リガンドは、動物、好ましくはヒトの免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）からえら得られた抽出物またはリゼートから同定することができる。これらの供給源から得られたタンパク質をドデシル硫酸ナトリウム－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）を用いてバンドに分離し、エレクトロブロッテリングにより、例えば、適当な固相の支持体または膜（例えばニトロセルロースまたはフッ化ポリビニリデン（ＰＶＤＦ））へ移すことができる。次いで、固相の支持体または膜は、標識されたＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドとの特異的な結合を示すバンドに対

応したＢ７関連ポリペプチドまたはペプチド、例えばＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３タンパクの、標識された形態とインキュベーションし、同定し、単離し、精製し、およびアミノ酸解析および／またはエドマン分解により解析して、それらに由来するペプチドの配列を決定することができる。

【００９９】

別法として、Ｂ７関連ポリペプチドを含む融合タンパク質を、固相の支持体に結合させて、適当なｃＤＮＡライブラリーでトランスフェクトされた細胞、例えばＣＨＯまたはＣＯＳ細胞などから得られた抽出物とインキュベーションすることができる。例えば、ｃＤＮＡライブラリーは、休止または活性化された不死化ヒトＴ細胞系、例えばＣＥＭ、ＨＵＴ７８、またはＪｕｒｋａｔ細胞系など、または末梢血、扁桃、脾臓、胸腺または他の特定にリンパ組織から得られた休止または活性化トＴ細胞から構築することができる。このような細胞は、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）、またはホルボール１２－ミリステート－１３－アセテート（ＰＭＡ）とイノマイシンの添加によって活性化することができる。ｃＤＮＡライブラリー構築物は、融合タンパク質とは異なる除去可能なエピトープタグ（上記参照）を含んで、その融合タンパク質と会合したライブラリー発現産物の精製を容易にすることができる。ついで、単離されたライブラリー発現産物を単離して特徴付けることができる。さらに、Ｂ７関連ポリペプチドを含む融合タンパク質を固相の支持体（例えばａ カラム ｃｏｍｐｒｉｓｉｎｇ ｂｅａｄｓ ｔｈａｔ ｓｐｅｃｉｆｉｃａｌｌｙ ｂｉｎｄ ｔｏ 融合タンパク質）に結合させ、Ｔ細胞のような、欠くことのできない膜タンパク質に富む細胞から得られたリゼートとインキュベーションすることができる。融合タンパク質と会合した細胞内のタンパク質は、ＭＡＬＤＩ－ＴＯＦ解析（Ｍａｔｒｉｘ Ａｓｓｉｓｔｅｄ Ｌａｓｅｒ Ｄｅｓｏｒｐｔｉｏｎ Ｉｏｎｉｚａｔｉｏｎ Ｔｉｍｅ Ｏｆ Ｆｌｉｇｈｔ 解析；ｒｅｖｉｅｗｅｄ ｂｙ Ｙａｔｅｓ ＪＲ ３ｒｄ．（１９９８）Ｊ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．３３：１－１９；Ｐ．Ｃｈａｕｒおよび ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ａｍ．Ｓｏｃ．Ｍａｓｓ Ｓｐｅｃｔｒｏｍ．１０：９１－１０３）を用いて、単離し、特徴付けることができる。融合タンパクとしては、例えば、ＦＬＡＧ（登録商標）（Ｂ．Ｌ．Ｂｒｉｚｚａｒｄ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １６：７３０－７３５）、６Ｘ－ＨＩＳ、およびＧＳＴ標識融合タンパク質（上記参照）が挙げられ、これらは、ｗｈｉｃｈ ｃａｎ ｂｅ ａｔｔａｃｈｅｄ ｔｏ ｓｏｌｉｄ ｓｕｐｐｏｒｔｓ ｔｈａｔ ａｒｅ コンジュゲート ｗｉｔｈ 抗ＦＬＡＧ（登録商標）抗体、ニッケル、またはグルタチオン分子それぞれが結合した固体の支持体に結合している。このような融合タンパク質を産生させ精製する方法は、当業者には周知である。

【０１００】

別の適当なリガンド結合分析は、酵母ツーハイブリッドシステムである（Ｆｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３４０：２４５－２４６；米国特許第５，２８３，１７３）。ツーハイブリッドシステムは、タンパク質間相互作用を介して転写活性化因子のＤＮＡ結合ドメインおよび転写活性化ドメインの会合によって転写活性化の活性の再構成することによるものである。酵母ＧＡＬ４転写活性化因子をこの方方に用いることができるが、他の転写因子を使用することができ、当分野においてよく知られている。ツーハイブリッドシステムを行うためには、ＧＡＬ４ＤＮＡ結合ドメインおよびＧＡＬ４転写活性化ドメインを、目的ポリペプチドへの融合物として、別々に発現させる。例えば、ある１つの融合タンパク質を、ＧＡＬ４ＤＮＡ結合ドメインに融合したＢ７関連ポリペプチドと比較する。他方の融合タンパク質は、例えば、ＧＡＬ４転写活性化ドメインに融合したポリペプチドをコードするＴ細胞ｃＤＮＡライブラリーと比較することができる。もし、２つの、同時発現した融合タンパク質が宿主細胞の核に於いて相互作用すれば、レポーター遺伝子（例えばＬａｃＺ）は活性化されて検出可能な表現型を生じる。ツーハイブリッド相互作用を示す宿主細胞は、ｃＤＮＡライブラリーを含むプラスミドを単離するために用いることができる。これらのプラスミドは、解析して、候補のＴ細胞リガンドの核酸配列および推定ポリペプチド配列を決定することができる。

【０１０１】
スリーハイブリッド（Ｌｉｃｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１２８１７－１２８２１）、およびリーバースツーハイブリッド（Ｖｉｄａｌ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１０３１５－１０３２０）システムのような、ｉｎ ｖｉｖｏの関連の方法も、別の手段として供し得る。ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｍａｔｃｈｍａｋｅｒ（登録商標）システムおよびプロトコル（ＣＬＯＮＴＥＣＨ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）などの、商業的に入手可能なツーハイブリッドシステムも使用することができる。（Ａ．Ｒ．Ｍ末端ｅｌｓｏｈｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：４８２；Ｅ．Ｍ．Ｐｈｉｚｉｃｋｙ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖ．５９：９４；Ｍ．Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９５）核酸ｓ Ｒｅｓ．２３：１１５２；Ｓ．Ｆｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｔｒ末端 Ｇｅｎｅｔ．１０：２８６；および米国特許第６，２８３，１７３および５，４６８，６１４なども参照）

【０１０２】
リガンド結合分析から得られたリガンド配列は、ＧｅｎＰｅｐｔ、ＳＷＩＳＳ－ＰＲＯＴ、およびＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）などが挙げられるがこれに限定されない、利用可能なデータベースの対象となる配列と比較することができる。例えば、ＢＬＡＳＴ解析（上記参照）を用いて、以前に同定されたおよび注釈付きの配列を含むこれらのデータベース、を完全長のポリペプチドおよび遺伝子配列について検索することができる。リガンドの完全長の配列が分からない場合は、伸張したまたは重複した部分的なクローンを当分野において慣用的に知られ実施されている技術によって得ることができる。そのような技術の非限定的な例としては、ゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡのプラスミドまたはファージとハイブリダイゼーション；Ｂ７関連因子プライマーを用いる同じライブラリーからのＰＣＲ；またはゲノムＤＮＡまたはｃＤＮＡへの直接的なハイブリダイゼーションまたはＰＣＲが挙げられる。次いで、断片配列整列プログラム（ＰＨＲＡＰ；Ｎｉｃｋｅｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９７）核酸ｓ Ｒｅｓ．２５：２７４５－２７５１）を用いて、これらのクローンの配列を解析し、完全長の遺伝子を構築することができる。

【０１０３】
Ｂ７関連因子活性の解析：本明細書に記載の特徴的なＢ７関連ポリペプチド活性を保持している断片、突然変異体または変異体のスクリーニングは、いくつかの異なる分析の１またはそれ以上を用いて行うことができる。例えば、ＣＨＯ細胞等の適当な細胞を、クローニングされた変異体でトランスフェクトした後、間接的な免疫蛍光およびフローサイトメトリーによって細胞表面の表現型について解析することができる。トランスフェクトされた細胞の細胞表面の発現は、細胞表面型のＢ７関連因子と選択的に反応し得るモノクローナル抗体を用いて評価することができる（上記参照）。分泌型のＢ７関連因子の産生は、Ｂ７関連因子と特異的に反応するモノクローナル抗体を用いた免疫沈降によって評価することができる。

【０１０４】
より好ましくは、他の分析は、Ｂ７関連因子の機能的な特徴を利用する。上記に記載したように、Ｂ７関連因子のそのＴ細胞リガンドへの結合によって、細胞が増大したレベルのリンホカイン、特にインターロイキン－２を産生する。即ち、Ｂ７関連因子の機能は、インターロイキン－２または他の新規なおよびまだ同定されていないサイトカインのような、リンホカインの合成を測定することにより、および／または初期の活性化シグナルを受け取ったＣＤ２８＋ Ｔ細胞によるＴ細胞増殖を分析することにより、評価することができる。インターロイキン－２に関するいくつかの慣用的な分析のいずれかを用いることができる（Ｃ．Ｂ．Ｔｈｏｍｐｓｏｎ（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：１３３３参照）。

【０１０５】

同じ基本的機能分析をＢ７関連ポリペプチド、ペプチド、融合タンパク質、またはＴ細胞活性化をブロックする抗体をスクリーニングするためにも使用することができる。正常な共刺激シグナルをブロックし、アネルギーの状態を誘導するタンパク質の活性は、細胞表面Ｂ細胞活性化抗原Ｂ７を発現し、抗原を提示する抗原提示細胞を用いるＴ細胞を活性化への後の試みを用いて測定することができる。Ｔ細胞が活性化の試みに対して反応しないならば、、ＩＬ－２合成およびＴ細胞増殖によって決定されるように、アネルギーの状態は、等分野において既知の方法によって誘導され測定することができる（Ｒ．Ｈ．Ｓｃｈｗａｒｔｚ（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４８：１３４９－１３５６参照）。

【０１０６】

Ｂ７関連因子の調節物質

ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリペプチド、ポリヌクレオチド、変異体またはその断片は、対応するＢ７関連ポリペプチドのレベルまたは活性を調節する試験物質をスクリーニングするために使用することができる（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビター）。さらに、Ｂ７関連分子をは、細胞内のＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する内因的調節物質を同定するために使用することができる。本発明の１つの態様では、完全長のＢＳＬ１（例えば配列番号２）、ＢＳＬ２（例えば配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（例えば配列番号１５）ポリペプチドは、調節物質を同定するために使用する。あるいは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチドの変異体または断片を使用する。そのような断片としては、例えば、本明細書に記載の、Ｂ７関連ポリペプチドの１またはそれ以上のドメイン（例えば細胞外および膜貫通ドメイン）が挙げられる。特に興味深いのは、ヒト細胞において比較的毒性の低いレベルを有する物質を同定するスクリーニング分析である。この目的のために、ｉｎ ｖｉｔｒｏ タンパク－タンパク結合分析、電気泳動度シフト分析、イムノアッセイなどを含め、広く様々な分析法を用いることができる。

【０１０７】

本明細書に用いられる「調節物質」なる用語は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリペプチドの生理学的機能、安定性またはレベルを直接的にまたは間接的に変化させることが可能な、任意の試験物質、分子、タンパク質、ペプチド、または化合物をいう。本明細書に詳細に記載するように、本発明のＢ７関連ポリペプチドまたはポリヌクレオチドに結合する調節物質は、診断的応用および／または医薬組成物に有用である可能性を示している。調節物質として有用な試験物質には数多くの化学的なクラスが包含されるが、典型的には、有機分子、好ましくは５０～約２５００ダルトンの分子量を有する小さい有機分子である。そのような分子は、タンパク質との構造的な相互作用、好ましくは水素結合、に必要な官能基を含むことができ、典型的には。少なくともアミン、カルボニル、ヒドロキシルまたはカルボキシル基、好ましくは官能基の少なくとも２つを含むことができる。調節物質として使用することができる試験物質は、しばしば１またはそれ以上の上記の官能基で置換された、環状の炭素またはヘテロ環および／または芳香族または多環芳香族構造を含む。試験物質はまた、ペプチド、糖類、脂肪酸、ステロイド、プリン、ピリミジン、それらの誘導体、構造的同族体または組合せを含む生物分子も包含し得る。

【０１０８】

調節物質として用い得る試験物質としては、例えば、以下のものが挙げられる：１）ペプチド、例えばＩｇ－ｔａｉｌｅｄ融合ペプチドおよびコンビナトリアルケミストリーによってＤ－および／またはＬ－立体配置のアミノ酸から得られるランダムペプチドライブラリーのメンバー（例えばＬａｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４；Ｈｏｕｇｈｔｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８４－８６参照）などの可溶性ペプチド；２）ホスホペプチド（例えばランダムおよび部分的変性志向のホスホペプチドライブラリーのメンバー、、例えばＳｏｎｇｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．，（１９９３）Ｃｅｌｌ ７２：７６７－７７８参照）；３）抗体（例えばポリクローナル、モノクローナル、ヒト化、抗イディオタイプ、キメラおよび１本鎖抗体並びに抗体のＦａｂ、Ｆ（ａｂ’）２、Ｆａｂ発現ライブラリー断片およびエピトープ結合断片）；および

４）小さい有機および無機分子。

【０１０９】

試験物質および調節物質は、合成または天然の化合物の幅広い供給源から得ることができる。合成化合物ライブラリーは、例えば、Ｍａｙｂｒｉｄｇｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏ.（Ｔｒｅｖｉｌｌｅｔ、Ｃｏｒｎｗａｌｌ、ＵＫ）；Ｃｏｍｇｅｎｅｘ（Ｐｒｉｎｃｅｔｏｎ、ＮＪ）、Ｂｒおよびｏｎ Ａｓｓｏｃｉａｔｅｓ（Ｍｅｒｒｉｍａｃｋ、ＮＨ）、およびＭｉｃｒｏｓｏｕｒｃｅ（Ｎｅｗ Ｍｉｌｏｒｄ、ＣＴ）から商業的に入手することができる。Ａｌｄｒｉｃｈ Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｍｐａｎｙ、Ｉｎｃ.（Ｍｉｌｗａｕｋｅｅ、ＷＩ）から希少なライブラリーを入手することができる。細菌、真菌、植物、または動物抽出物を含む天然化合物のライブラリーは、例えば、Ｐａｎ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ（Ｂｏｔｈｅｌｌ、ＷＡ）から入手することができる。さらに、ランダムかされたオリゴヌクレオチドの発現を含め、ランダム化および目的化された幅広い有機化合物の合成および生物分子のために数多くの手段が利用可能である。

【０１１０】

別法として、細菌、真菌、植物および動物抽出物の形態の天然化合物のライブラリーは容易に作製することができる。分子ライブラリーの合成方法は、容易に利用可能である（例えば、ＤｅＷｉｔｔ ｅｔ ａｌ.（１９９３）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９０：６９０９；Ｅｒｂ ｅｔ ａｌ.（１９９４）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９１：１１４２２；Ｚｕｃｋｅｒｍａｎｎ ｅｔ ａｌ.（１９９４）Ｊ. Ｍｅｄ. Ｃｈｅｍ. ３７：２６７８；Ｃｈｏ ｅｔ ａｌ.（１９９３）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６１：１３０３；Ｃａｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ.（１９９４）Ａｎｇｅｗ. Ｃｈｅｍ. Ｉｎｔ. Ｅｄ. Ｅｎｇｌ. ３３：２０５９；Ｃａｒｅｌｌ ｅｔ ａｌ.（１９９４）Ａｎｇｅｗ. Ｃｈｅｍ. Ｉｎｔ. Ｅｄ. Ｅｎｇｌ. ３３：２０６１；およびｉｎ Ｇａｌｌｏｐ ｅｔ ａｌ.（１９９４）Ｊ. Ｍｅｄ. Ｃｈｅｍ. ３７：１２３３参照）。さらに、天然および合成化合物のおよびライブラリーは、慣用的な、化学的、物理的および生化学的手段によって容易に修飾することができ（例えばＢｏｎｄｅｌｌｅ ｅｔ ａｌ.（１９９６）Ｔｒ末端 ｉｎ Ｂｉｏｔｅｃｈ. １４：６０参照）、コンビナトリアルライブラリーを作製するのに用いることができる。別の手段では、以前に同定された薬理学的物質を、アシル化、アルキル化、エステル化、アミジン化（ａｍｉｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ）等の直接的なまたはランダムな化学修飾に付し、そのアナログをＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３調節活性についてスクリーニングすることができる。

【０１１１】

生物学的ライブラリーを含む、コンビナトリアルライブラリーを作成するための数多くの方法が当分野で知られている。；空間的に接近可能な並列の固相または溶液相のライブラリー；デコンヴォルーションを必要とする合成ライブラリー；「１ビーズ１化合物」ライブラリー法；およびアフェニティークロマトグラフィー選択を用いた合成ライブラリー法。生物学的ライブラリー法はポリペプチドライブラリーに限定されるが、他の４つの方法は、ポリペプチド、非ペプチドオリゴマー、または化合物の小さい分子ライブラリーに対して利用可能である（Ｋ. Ｓ. Ｌａｍ、１９９７、抗ｃａｎｃｅｒ Ｄｒｕｇ Ｄｅｓ. １２：１４５）。

【０１１２】

ライブラリーは、溶液中（例えばＨｏｕｇｈｔｅｎ,（１９９２）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １３：４１２－４２１）、またはビーズ（Ｌａｍ,（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５４：８２－８４）、チップ（Ｆｏｄｏｒ,（１９９３）Ｎａｔｕｒｅ ３６４：５５５－５５６）、細菌または胞子（Ｌａｄｎｅｒ 米国特許第５,２２３,４０９）、プラスミド（Ｃｕｌｌ ｅｔ ａｌ.（１９９２）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ８９：１８６５－１８６９）、またはファージ（ＳｃｏｔｔおよびＳｍｉｔｈ,（１９９０）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：３８６－３９０；Ｄｅｖｌｉｎ、１９９０、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：４０４－４０６；Ｃｗｉｒｌａ ｅｔ ａｌ.（１９９０）Ｐｒｏｃ

．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９７：６３７８－６３８２；Ｆｅｌｉｃｉ，（１９９１）Ｊ．ＭｏＬ Ｂｉｏｌ．２２２：３０１－３１０；Ｌａｄｎｅｒ前掲）上でスクリーニングすることができる。

【０１１３】

スクリーニング分析が結合分析である場合、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、アナログ、またはその断片は、標識と結合させることができ、その標識は直接的または間接的に検出可能なシグナルを生じることができる。様々な標識としては、放射性同位元素、蛍光、化学発光、酵素、特異的に結合する分子、粒子、例えば磁性粒子等が挙げられる。特異的に結合する分子としては、ビオチンとストレプタビジン、ジゴキシンとアンチジゴキシンの組などが挙げられる。特異的な結合メンバーについては、通常、周知の手順に従い、その相補的なメンバーを検出に供する分子で標識する。

【０１１４】

様々な他の物質をスクリーニング分析に組み込むことができる。これらには、最適なタンパク質－タンパク質結合を促進し、および／または非特異的なまたはバックグラウンドの相互作用を減少させるために用いられる、塩、天然のタンパク質、例えばアルブミン、界面活性剤などが含まれる。分析の効率を高める試薬、例えば、プロテアーゼ阻害剤、ヌクレアーゼ阻害剤、抗菌剤等を、使用することができる。これらの成分は必要な結合を生じる任意の順序で加える。インキュベーションは、最適な活性を促進する任意の温度、典型的には４～４０℃で行う。インキュベーション時間は最適な活性について選択するが、迅速な高性能スクリーニングを促進するように最適化する。通常、０．１～１時間出十分であろう。一般に、これらの濃度に対する異なった応答を得るために、複数の分析混合物を、種々の物質濃度と平行して分析にかける。典型的には、これら濃度のうちの１つネガティブコントロール、即ち、濃度０または検出レベルよりも低くする。

【０１１５】

無細胞スクリーニング分析を行うために、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチドまたは断片のいずれかを表面に固定化して、これら分子に結合する調節物質の同定を促進し、分析の自動化に適合させることが望ましいかもしれない。例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドおよびアフィニティータグを含む融合タンパク質を、本明細書に詳細に記載するよるように製造することができる。ある１つの態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドを含むＧＳＴ融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズまたはグルタチオン誘導体化マイクロタイタープレート上に吸着させる（Ｓｉｇｍａ Ｃｈｅｍｉｃａｌ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）。細胞リゼート（例えば３５Ｓ－標識ポリペプチドを含む）を、複合体形成を可能にする条件下（例えば、塩および ｐＨについての生理学的条件）で、ポリペプチド被覆ビーズに加える。インキュベーション後、ポリペプチド被覆ビーズを洗浄して結合しなかったポリペプチドを除去し、固定化された放射性同位元素標識の量を測定する。あるいは、複合体を解離し、上清中に存在する放射性同位元素標識を測定する。別の方法では、ビーズをＳＤＳ－ＰＡＧＥにより解析してＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３結合ポリペプチドを同定する。

【０１１６】

様々な結合分析を用いてＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドの機能またはレベルを変化させるアゴニストまたはアンタゴニストを同定することができる。そのような分析は、試験物質と、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物との相互作用を検出するように設計する。相互作用は、結合の直接測定により検出することができる。あるいは、相互作用を、タンパク構造の安定化／不安定化、または生物学的機能の活性化／阻害等の、結合の間接的なインジケーターにより検出することができる。有用な結合分析の非限定的な例は以下に記載する。

【０１１７】

調節物質ｓ ｔｈａｔ ｂｉｎｄ ｔｏ ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチ

ド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物またはその断片に結合する調節物質は、リアルタイムの二分子相互作用解析（ＢＩＡ；Ｓｊｏｌおよびｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ａｎａｌ．Ｃｈｅｍ．６３：２３３８－２３４５；Ｓｚａｂｏ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｕｒｒ．Ｏｐｉｎ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｂｉｏｌ．５：６９９－７０５；例えばＢｌＡｃｏｒｅＴ””；ＬＫＢ Ｐｈａｒｍａｃｉａ、Ｓｗｅｄｅｎ）を用いて同定することができる。さらに、調節物質はシンチレーション近似解析（ＳＰＡ、ｄｅｓｃｒｉｂｅｄ ｉｎ 米国特許第４，５６８，６４９）によって解析することもできる。ミトコンドリア標的シグナルを用いた結合分析（Ｈｕｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９８５）ＥＭＢＯ Ｊ．４：２０６１－２０６８；ＥｉｌｅｒｓおよびＳｃｈａｔｚ，（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２２：２２８－２３１）固体の基材上で合成される多くの定義されたポリマーもまた利用することができる。

【０１１８】

ツーハイブリッドシステムを使用して調節物質を同定することができる（例えば米国特許第５，２８３，３１７号；Ｚｅｒｖｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｃｅｌｌ ７２：２２３－２３２；Ｍａｄｕｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１２０４６－１２０５４；Ｂａｒｔｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ １４：９２０－９２４；Ｉｗａｂｕｃｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｏｎｃｏｇｅｎｅ ８：１６９３－１６９６；およびＢｒｅｎｔ ＷＯ ９４／１０３００を参照）。あるいは、スリーハイブリッド（Ｌｉｃｉｔｒａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１２８１７－１２８２１）、およびリバースツーハイブリッド（Ｖｉｄａｌ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１０３１５－１０３２０）システムを使用することができる。商業的に入手可能なツーハイブリッドシステム、例えばＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｍａｔｃｈｍａｋｅｒ（登録商標）システムおよびプロトコル（ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ、Ｉｎｃ．、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）（Ａ．Ｒ．Ｍ末端ｅｌｓｏｈｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｃｕｒｒ．Ｏｐ．Ｂｉｏｔｅｃｈ．５：４８２；Ｅ．Ｍ．Ｐｈｉｚｉｃｋｙ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ Ｒｅｖ．５９：９４；Ｍ．Ｙａｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９５）核酸ｓ Ｒｅｓ．２３：１１５２；Ｓ．Ｆｉｅｌｄｓ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｔｒ末端 Ｇｅｎｅｔ．１０：２８６；および米国特許第６，２８３，１７３および５，４６８，６１４も参照）もまた有用である。

【０１１９】

ここ数年、短期間で数万もの試験物質のスクリーニングを可能にする、自動化された分析のいくつかの方法が開発されている。高性能スクリーニング法は、本発明での使用に特に好ましい。本明細書に記載の結合分析は、高性能スクリーニングに適合させることができる、または代わりのスクリーニングを利用してもよい。例えば、少なくとも１つの多孔性マトリックスを用いる連続式高性能スクリーニング（ＣＦ－ＨＴＳ）によって、研究者は、大量の試験物質を幅広生物学的または生化学的活性について試験することができる（Ｂｅｕｔｅｌらの米国特許第５，９７６，８１３号を参照）。さらに、ＣＦ－ＨＴＳを使用して多段階分析を行うことができる。

【０１２０】

診断

本発明の別の態様によれば、Ｂ７関連ポリヌクレオチドまたはその断片は、診断目的で使用することができる。使用することができるＢ７関連ポリヌクレオチドとしては、オリゴヌクレオチド配列、相補的ＲＮＡおよびＤＮＡ分子、およびＰＮＡｓが挙げられる。ポリヌクレオチドを使用して、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ ポリヌクレオチドの発現（過少または過剰発現）が疾患と関連し得る生物学的サンプルにおける、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ｍＲＮＡのレベルを検出し、定量することができる。診断的分析は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３の発現の不在、存在、増加および減少を区別し、治療的処置または介入の間のＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ ポリヌクレオチド

レベルの調節をモニターするために用いることができる。
【０１２１】
１つの態様では、ＰＣＲプローブを用いて、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ゲノムＤＮＡ配列、およびＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、およびＢＳＬ３－関連核酸配列を含むＢ７関連ポリヌクレオチド配列を検出することができる。そのプローブの選択性、即ち、選択性の高い領域から作製されたものかどうか、例えば５’調節領域の少なくとも８～１０または１２～１５個の隣接したヌクレオチド、または選択性の低い領域、例えば特に３’コード領域、およびハイブリダイゼーションまたは増幅のストリンジェンシー（最大、高い、中程度のまたは低い）は、そのプローブがＢ７関連ポリペプチド、そのアレルまたは関連する配列をコードする天然に存在する配列のみを同定するかどうかを決定する。
【０１２２】
プローブは、ＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、およびＢＳＬ３－関連配列の検出にも用いることができ、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ポリヌクレオチドまたは相補的配列、またはその断片と、少なくとも６０％、好ましくは９０％以上の同一性を含む。本発明のプローブは、ＤＮＡまたはＲＮＡであってよく、プローブはＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）のヌクレオチド配列の全部または断片またはその相補的な配列を含んでいてもよく、天然に存在するＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドヌクレオチドのプロモーター、エンハンサーエレメント、およびイントロンを含んでいてもよい。
【０１２３】
Ｍｅｔｈｏｄｓ ｆｏｒ ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ ｓｐｅｃｉｆｉｃプローブｓ ｆｏｒ Ｂ７関連ポリヌクレオチドのための特異的なプローブを作製する方法としては、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）またはその断片の核酸配列の、ｍＲＮＡプローブの作製のためのベクター中へのクローニングが挙げられる。そのようなベクターは当分野において知られており、商業的に入手可能で、適当なＲＮＡポリペプチドポリメラーゼと適当な標識されたヌクレオチドの添加によって ｉｎ ｖｉｔｒｏ でＲＮＡプローブを合成するために用いることができる。ハイブリダイゼーションプローブは、様々なディテクター／レポーター群、例えば３２Ｐまたは３５Ｓ等の放射性ヌクレオチド、または、例えばアビジン／ビオチンカップリングシステムによってプローブにカップリングしたアルカリホスファターゼ等の酵素標識、によって標識することができる。
【０１２４】
様々な標識および結合方法が当業者に知られ、用いられており、様々な核酸およびアミノ酸分析に用いられている。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドに関連する配列を検出するための、標識されたハイブリダイゼーションまたはＰＣＲプローブの製造方法には、オリゴー標識、ニック翻訳、末端標識、または標識されたヌクレオチドを用いるＰＣＲ増幅がある。あるいは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ポリヌクレオチド配列、またはその一部またはその断片は、ｍＲＮＡプローブの産生のためのベクター中へクローニングすることができる。そのようなベクターは当分野で知られており、商業的に入手可能であり、Ｔ７、Ｔ３、またはＳＰ（６）などの適当なＲＮＡポリメラーゼおよび標識されたヌクレオチドの添加により ｉｎ ｖｉｔｒｏ でＲＮＡプローブを合成するために使用することができる。これらの手順は、様々な商業的に入手可能なキット（例えばｆｒｏｍ Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｉｎｃ．、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ；Ｐｒｏｍｅｇａ Ｃｏｒｐ．、Ｍａｄｉｓｏｎ ＷＩ；およびＵ．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｃｏｒｐ．、Ｕ．Ｓ．Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｍｅｒｓｈａｍ、Ｃレベルおよび、ＯＨ）を用いて行うことができる。使用できる適当なレポーター分子または標識としては、放射性ヌクレオチド、酵素、蛍光、化学発光または発色物質、並びに基質、コファクター、インヒビター、磁性粒子などが挙げられる。
【０１２５】

Ｂ７関連ポリヌクレオチド配列、またはその断片もしくは相補配列は、サザンまたはノーザン分析、ドットブロットまたは他のメンブレンをベースとする方法において；ＰＣＲ法において；またはディップスティック、ピン、ＥＬＩＳＡまたはバイオチップ分析において、患者の生体の体液または組織を用いて患者の状態、例えばＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３のレベルまたは発現、または変化したＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３発現を検出することができる。そのような定性または定量方法は、当分野においてよく知られている（Ｇ．Ｈ．ＫｅｌｌｅｒおよびＭ．Ｍ．Ｍａｎａｋ、１９９３、ＤＮＡプローブｓ、２ｎｄ Ｅｄ、Ｍａｃｍｉｌｌａｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｅｒｓ Ｌｔｄ．、Ｅｎｇｌおよび；Ｄ．Ｗ．ＤｉｅｆｆｅｎｂａｃｈおよびＧ．Ｓ．Ｄｖｅｋｓｌｅｒ、１９９５、ＰＣＲ プライマー．：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｐｒｅｓｓ、Ｐｌａｉｎｖｉｅｗ、ＮＹ；Ｂ．Ｄ．ＨａｍｅｓおよびＳ．Ｊ．Ｈｉｇｇｉｎｓ、１９８５、Ｇｅｎｅプローブｓ １、２、ＩＲＬ Ｐｒｅｓｓ ａｔ Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌおよび）。

【０１２６】

ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３ オリゴヌクレオチドは、化学的に合成、酵素的に作製または組換え供給源から産生され得る。オリゴマーは、特定の遺伝子または状態の同定に最適化された条件下で用いる、好ましくは２つのヌクレオチド配列を含む、１つはセンス方向を有する（５’から３’）であり他方はアンチセンス方向（３’から５’’）。同一の２つのオリゴマー、入れ子になったオリゴマーのセット、またはさらにはオリゴマーの縮重プールを、密接に関連するＤＮＡまたはＲＮＡ配列の検出および／または定量のため、ストリンジェンシーの低い条件下で用いる。.

【０１２７】

Ｂ７関連因子の発現を定量するのに適当な方法には、放射性同位元素の標識またはビオチン化ヌクレオチド、対照の核酸の同時増幅、および実験結果がそれに基づいて補間される標準曲線（Ｐ．Ｃ．Ｍｅｌｂｙ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １５９：２３５－２４４；およびＣ．Ｄｕｐｌａａ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２２９－２３６）が含まれる。複数のサンプルを定量する速度は、目的のオリゴマーが様々な異なる希釈率で存在し、分光学的または比色応答が迅速な定量をもたらす、ＥＬＩＳＡ法において分析を実行することによって促進される。

【０１２８】

特定の態様では、Ｂ７関連ポリペプチドヌクレオチドまたはその断片に対する核酸配列の相補性は、特に本明細書に記載されるような異常な免疫応答に関連する疾患を検出する分析において有用であり得る。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３ポリヌクレオチドは、標準的な方法によって標識することができ、ハイブリダイゼーション複合体の形成に適当な条件下で患者から得た生物学的サンプルに加えることができる。適当なインキュベーション期間の後、サンプルを洗浄してシグナルを定量し、標準値と比較することができる。試験サンプル中のシグナルの量が、比較されるネガティブコントロールの（正常な）サンプルから有意に変化しているならば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３ ヌクレオチド配列の変化したレベルを、関連する疾患の存在と関連付けることができる。そのような分析はさらに、動物実験、臨床実験または個人の患者について、特定の予防または治療的レジメの効果を評価するために用いることができる。

【０１２９】

１またはそれ以上のＢ７関連因子の変化した発現に関連する疾患の診断の基礎を提供するために、発現に関する正常なまたは標準的なプロファイルを確立する。これは、正常な患者、動物またはヒト、から採取した生物学的サンプルを、ハイブリダイゼーションまたは増幅に適した条件下で、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、ＢＳＬ３ ポリペプチドヌクレオチド、またはその断片に相補的な配列とインキュベーションすることにより達成することができる。標準的なハイブリダイゼーションは、正常な患者から得られた数値を、実質的に精製されたポリヌクレオチドの既知の量を用いた実験から得られた数値と比較することにより定

量することができる。正常なサンプルから得られた標準値は、その疾患について症状を発症している患者から得られた数値と比較することができる。標準値と対象（患者）との間の偏差をその状態の存在を確定するために用いる。

【０１３０】

その疾患が診断され治療プロトコルが開始されれば、ハイブリダイゼーション分析を定期的に繰り返して、その患者における発現のレベルが正常な人において観察されるレベルに近づき始めているかどうかについて評価する。継続的な分析から得られた結果は、数日から数ヶ月の期間にわたる治療の効果を示すために用いることができる。

【０１３１】

過剰に活性の高いまたは過剰に活性の低い免疫反応が関与する疾患について、、個体から得られた生物学的サンプル（例えば、体液、細胞、組織抽出物）におけるＢ７関連転写物の異常なレベル（減少したまたは増加した）の存在は、疾患の発症の素因を示し得るか、または実際の臨床的症状が出現する前にその疾患を検出する手段を提供し得る。このタイプのより確実な診断によって、保険の専門家は、より早期に予防的措置または積極的治療を行うことが可能で、それにより、その疾患の発症または更なる進行を防止することができる。

【０１３２】

１つの特定の態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３オリゴヌクレオチドをＰＣＲベースの診断のために使用することができる。例えば、ＰＣＲを使用して、公開された方法にしたがって（Ｔ．Ｔ．Ｎｉｋｉｆｏｒｏｖ ｅｔ ａｌ．（１９９４）核酸ｓ Ｒｅｓ．２２（２０）：４１６７－７５；Ｔ．Ｔ．Ｎｉｋｉｆｏｒｏｖ ｅｔ ａｌ．（１９９４）ＰＣＲ Ｍｅｔｈｏｄｓ Ａｐｐｌ．３（５）：２８５－９１）、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３の遺伝子ビット解析（ＧＢＡ）を行うことができる。ＰＣＲベースのＧＢＡでは、多型部位を含むゲノムＤＮＡ配列の特定の断片を、１つの修飾されていないプライマーと１つのホスホロチオエート修飾されたプライマーを用いてＰＣＲにより最初に増幅する。２本鎖のＰＣＲ産物を１本鎖にした後、マルチウェルプレートのウェル中で固定化したオリゴヌクレオチドプライマーをハイブリダイズさせる。とりわけ、プライマーは、目的の多型部位に隣接するようにアニールするように設計する。プライマーの３’末端は、個々に標識したジデオキシヌクレオチド三リン酸の混合物を用いて伸張させる。次いで、伸張した塩基上の標識を読取る。好ましくは、半自動化されたＥＬＩＳＡまたはバイオチップ方式（例えばＳ．Ｒ．Ｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９７）核酸ｓ Ｒｅｓ．２５（２４）：５０６５－７１；Ｔ．Ｔ．Ｎｉｋｉｆｏｒｏｖ ｅｔ ａｌ．（１９９４）核酸ｓ Ｒｅｓ．２２（２０）：４１６７－７５を参照）でＧＢＡを行う。

【０１３３】

本発明の別の態様では、オリゴヌクレオチド、または本明細書に記載のＢ７関連ポリヌクレオチド配列の少なくとも１つから得られるより長い断片は、マイクロアレー（例えばバイオチップ）システムの標的として用いることができる。マイクロアレイは、 大量の遺伝子の発現レベルを同時にモニターして（転写イメージを作製し）、遺伝子による変異体、突然変異体および多型を同定するのに用いることができる。この情報は、遺伝子の機能を決定し、疾患の遺伝子的根拠を理解し、疾患を診断し、治療剤または予防剤の活性を提示させモニターするために用いることができる。マイクロアレイの製造および使用は、Ｃｈｅｅ ｅｔ ａｌ．のＷＯ ９５／１１９９５；Ｄ．Ｊ．Ｌｏｃｋｈａｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｎａｔｕｒｅ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １４：１６７５１６８０；Ｍ．Ｓｃｈｅｎａ ｅｔ ａｌ．（１９９６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９３：１０６１４－１０６１９；米国特許第６，０１５，７０２ ｔｏ Ｐ．Ｌａｉ ｅｔ ａｌ．；Ｊ．Ｗｏｒｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（２０００）マイクロアレイ Ｂｉｏｃｈｉｐ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｍ．Ｓｃｈｅｎａ、ｅｄ．、Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ Ｂｏｏｋ、Ｎａｔｉｃｋ、ＭＡ、ｐｐ．６５－８６；Ｙ．Ｈ．Ｒｏｇｅｒｓ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ａｎａｌ．Ｂｉｏｃｈｅｍ．２６６（１）：２３－３０；Ｓ．

Ｒ．Ｈｅａｄ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．プローブｓ．１３（２）：８１－７；Ｓ．Ｊ．Ｗａｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｂｉｏｌ．Ｐｓｙｃｈｉａｔｒｙ ４８（１２）：１１４７－５６に記載されている。

【０１３４】

本発明の１つの態様ではＢ７関連ポリヌクレオチド配列のアレイを含むマイクロアレイを用いて、個人におけるＢ７関連因子の発現レベルを測定することができる。特に、変化した特に、ｔｏ ｄｉａｇｎｏｓｅ ａｎ ｉｎｄｉｖｉｄｕａｌ ｗｉｔｈ ａ ｃｏｎｄｉｔｉｏｎまたはｄｉｓｅａｓｅ ｃｏｒｒｅｌａｔｅｄ ｗｉｔｈ ａｌｔｅｒｅｄ ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３発現レベルに関連した状態または疾患を有する個人を診断するために、ヒトまたは動物から得たサンプル（例えばｍＲＮＡを含む）を、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３ ポリペプチドヌクレオチド（例えばＤＮＡ）を減少する濃度（例えば１ｎｇ、０．１ｎｇ、０．０１ｎｇ、など）で含むアレイを含むバイオチップ上でプローブとして用いることができる。試験サンプルを、疾患を有するおよび正常なサンプルから得られたサンプルと比較する。バイオチップは、集団における、欠失、挿入およびミスマッチが含まれるがこれに減退されない、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３突然変異または多型を同定するために用いることもできる。例えば、突然変異は、（ｉ）本発明のＢ７関連ポリヌクレオチドをバイオチップ上に配置すること；（ｉｉ）試験サンプルをとり（例えばｍＲＮＡを含む）、そのサンプルをバイオチップに加えること；（ｉｉｉ）試験サンプルがそのチップ上に結合しているＢ７関連ポリヌクレオチドと、種々のハイブリダイゼーション条件下で、ハイブリダイズするかどうか測定すること（例えばＶ．Ｒ．Ｃｈｅｃｈｅｔｋｉｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｂｉｏｍｏｌ．Ｓｔｒｕｃｔ．Ｄｙｎ．１８（１）：８３－１０１参照）によって同定することができる。あるいは、マイクロアレイ配列解析を行うことができる（例えばＥ．Ｐ．ＤｉａｍおよびＩｓ（２０００）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４６（１０）：１５２３－５参照）。

【０１３５】

本発明の別の態様では、Ｂ７関連核酸配列、またはその相補的配列または断片は、天然のゲノム配列をマッピングするのに有用なプローブとして用いることができる。配列は、特定の染色体、染色内の特定の領域、または人工的染色体構築物（ＨＡＣｓ）、酵母人工染色体（ＹＡＣｓ）、細菌人工染色体（ＢＡＣｓ）、細菌ＰＩ構築物または単一の染色体ｃＤＮＡライブラリーにマッピングすることができる（Ｃ．Ｍ．Ｐｒｉｃｅ（１９９３）Ｂｌｏｏｄ Ｒｅｖ．、７：１２７－１３４およびｂｙ Ｂ．Ｊ．Ｔｒａｓｋ（１９９１）Ｔｒ末端 Ｇｅｎｅｔ．７：１４９－１５４参照）。

【０１３６】

本発明の更なる態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドに特異的に結合する抗体を、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドヌクレオチドまたはポリペプチドの過少発現または過剰発現によって特徴づけられる状態または疾患の診断、またはＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドまたはペプチド、またはＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ アゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビターで処置される患者をモニターするための分析において用いることができる。診断目的に有用な抗体は、本明細書に記載の、治療方法における使用するための抗体と同じようにして製造することができる。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドについての診断分析には、抗体および生物学的サンプル（例えばヒト体液、細胞、組織または細胞または組織の動物抽出物）におけるタンパクを検出するための標識を利用する方法が含まれる。抗体は、修飾有りまたは無しで用いることができ、それらにレポーター分子が、共有結合または非共有結合のいずれかで連結することにより標識されていてもよい。当分野で知られている様々なレポーター分子を用いることができ、そのいくつかを本明細書に記載する。

【０１３７】

数多くの蛍光物質が知られており、Ｂ７関連ポリペプチドまたはそれに結合する抗体を標

識するために用いることができる。これらには、例えば、フルオレセイン、ローダミン、オーラミン、テキサスレッド、ＡＭＣＡブルーおよびルシファーイエローが含まれる。具体的な検出物質は、ヤギにおいて調製し、イソチオシアネートでフルオレセインと結合させた抗ウサギ抗体である。Ｂ７関連ポリペプチドまたはそれに対する抗体を放射性エレメントまたは酵素で標識することもできる。放射能レベルは、現在利用可能な計測方法のいずれかによって検出することができる。好ましい放射性同位元素としては、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、^{36}Ｃｌ、Ｃｒ、^{57}Ｃｏ、^{58}Ｃｏ、^{59}Ｆｅ、^{90}Ｙ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉおよび^{186}Ｒｅが挙げられる。酵素標識が同様に有用であり、現在用いられている熱量分析、分光学的分析、電流滴定またはガス定量法のいずれかによって検出することができる。酵素は、カルボジイミド、ジイソシアネート、グルタルアルデヒドなどの架橋分子との反応により結合させることができる。これらの方法に用いることができる、多くの酵素が知られており利用することができる。好ましいのは、ペルオキシダーゼ、グルクロニダーゼ、ｐ－Ｄ－グルコシダーゼ、－Ｄ－ガラクトシダーゼ、ウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ＋ペルオキシダーゼ、およびアルカリホスファターゼ（例えば米国特許第３，６５４，０９０号；同第３，８５０，７５２号；および同第４，０１６，０４３号を参照）。

【０１３８】

抗体ベースの診断およびそれらの応用は、当業者にはよく知られており、本発明にしたがって用いることができる。非限定的な例として、「拮抗的な」（米国特許第３，６５４，０９０号および同第３，８５０，７５２号）、「サンドウィッチ」（米国特許第４，０１６，０４３）、および「二重抗体」または「ＤＡＳＰ」分析も用いることができる。ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、およびＦＡＣＳを含む、Ｂ７関連ポリペプチドレベルを測定するための方法は、当分野において知られており、変化したまたは異常なレベルのＢ７関連ポリペプチド発現を診断するための基礎を提供する。Ｎｏｒｍａｌまたはｓｔおよびａｒｄ ｖａｌｕｅｓ ｆｏｒ Ｂ７関連ポリペプチド発現の正常なまたは標準的な数値は、正常な患者、好ましくはヒト、から採取した生物学的サンプルを、Ｂ７関連ポリペプチドに対する抗体と、複合体形成に適当な条件下でインキュベーションすることによって確定することができる。標準的な複合体形成の量は、様々な方法によって定量することができる；測光的方法が好ましい。対象のサンプルにおいて発現したＢ７関連ポリペプチドのレベル、ネガティブコントロール（正常な）サンプル、およびポジティブコントロール（疾患の）サンプルを標準値と比較する。標準値と対象の数値との間の偏差によって疾患を診断するためのパラメータを確定する。

【０１３９】

特に、Ｂ７関連ポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、疾患に関連するまたは疾患のなりやすさ、特に本明細書に記載する免疫系の障害に関係しているので、更なる態様において、本発明は、Ｂ７関連ポリヌクレオチドまたはポリペプチドを検出するための診断用キットに関する。そのようなキットは異化の１またはそれ以上を含む：

（ａ）Ｂ７関連ポリペプチドヌクレオチド、好ましくはＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）、またはその断片のヌクレオチド配列；または

（ｂ）（ａ）の配列に相補的なヌクレオチド配列；または

（ｃ）Ｂ７関連ポリペプチド、好ましくはＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）、またはその断片の配列のポリペプチド；または

（ｄ）Ｂ７関連ポリペプチドに対する抗体、好ましくはＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）のポリペプチドに対する抗体、またはその断片に結合可能な抗体。そのような任意のキットにおいて、（ａ），（ｂ），（ｃ）または（ｄ）は実質的な成分および使用説明書を含むことができる。本キットはさらに、緩衝剤や安定化剤等の重要ではない成分を含むこともできる。

【０１４０】

本発明は、さらにＢ７関連因子における突然変異を同定するために利用することができる遺伝子スクリーニングのための試験キットを包含し得る。患者を突然変異ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ２ＤＮＡによって同定し、その突然変異をＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３における既知の突然変異、特定の状態または疾患を含むデータベースと比較することによって、特定の状態または疾患の同定および／または確認ができる。したがって、そのようなキットは、特異的なプライマーで患者のｍＲＮＡを転写すること、および別のセットのプライマーを用いて得られたｃＤＮＡを増幅すること、を含むＰＣＲベースの試験を含む。増幅された産物は、ゲル電気泳動で検出でき、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３についての既知の標準とそれぞれ比較することができる。好ましくは、このキットは、患者の血液、血清、唾液サンプルを用い、ＤＮＡは、標準的な技術を用いて抽出する。次いで、既知の突然変異に連結するプライマーをＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３の断片を増幅するために用いる。次いで、増幅された部分の配列を解析し、突然変異の存在を調べる。

【０１４１】

治療

医薬組成物：本発明は、本明細書に詳述する、Ｂ７関連核酸、ポリペプチド、抗体、リガンド、調節物質（例えばアゴニスト、アンタゴニスト、またはインヒビター）、またはその断片もしくは機能的変異体、および生理学的に許容し得る担体、賦形剤、賦形剤、または希釈剤を含有する組成物に関する。本発明はさらに、本発明の治療方法を実施するのに有用な医薬組成物に関する。好ましくは、医薬組成物には、添加剤、製薬的に許容し得る賦形剤（担体）および、活性成分として、１またはそれ以上の本明細書に記載の、Ｂ７関連ポリペプチド、核酸、リガンド、調節物質、抗体、またはその断片または機能的等価物を含有する。Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドは天然に存在する細胞成分なので、望ましくない免疫学的合併症の危険を最小限にして個人の循環系に投与することができる。

【０１４２】

活性成分として生物学的な試薬を含有する医薬組成物の製造は、当分野において十分理解されている。典型的には、そのような成分を注射可能なように、液体の溶液または懸濁液として製造するが、注射前の液体中の溶液または懸濁液のために固体の形態でも製造することができる。これらの調製物をエマルションとすることもできる。活性な治療剤は、しばしば製薬的に許容し得る、活性成分と適合し得る賦形剤と混合する。適当な賦形剤は、例えば、水、食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組合せである。さらに、所望ならば、組成物は、活性成分の有効性を高める、湿潤剤または乳化剤、ｐＨ緩衝剤等の少量の補助物質を含有することができる。

【０１４３】

医薬組成物は、製造して、処置される障害または疾患によって確立された方法にしたがい、治療プロトコルにおいて用いることができる（例えば、Ｐ．Ｄ．Ｍａｙｎｅ（１９９６）Ｃｌｉｎｉｃａｌ Ｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｉｎ ＤｉａｇｎｏｓｉｓおよびＴｒｅａｔｍｅｎｔ、６ｔｈ ｅｄ．、Ｏｘｆｏｒｄ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐｒｅｓｓ、Ｏｘｆｏｒｄ、Ｅｎｇｌおよび；Ｇｉｌｍａｎ ｅｔ ａｌ．、Ｅｄｓ．（１９９０）ＧｏｏｄｍａｎおよびＧｉｌｍａｎ’ｓ：Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ、８ｔｈ ｅｄ．、Ｐｅｒｇａｍｏｎ Ｐｒｅｓｓ；Ａｖｉｓ ｅｔ ａｌ．、Ｅｄｓ．（１９９３）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ Ｍｅｄｉｃａｔｉｏｎｓ、Ｄｅｋｋｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ；およびＬｉｅｂｅｒｍａｎ ｅｔ ａｌ．、Ｅｄｓ．（１９９０）Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｄｏｓａｇｅ Ｆｏｒｍｓ：Ｄｉｓｐｅｒｓｅ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｄｅｋｋｅｒ、Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ、ＮＹ）。

【０１４４】

医薬組成物は、中性または塩の形態として製造することができる。塩は、塩酸、硫酸、酢酸、乳酸、酒石酸、リンゴ酸およびコハク酸が挙げられるがこれに限定されない、多くの酸と形成することができる。組成物は、溶液、懸濁液錠剤、丸剤、カプセル剤、徐放化合

物、または粉末剤の形態を取ることができる。そのような製剤は、１０％～９５％（ｗ／ｗ）、好ましくは２５％－７０％（ｗ／ｗ）の活性成分を含有することができる。活性化合物を注射により投与する場合、例えば、１投与単位ごとに、１μｇ～３ｍｇおよび好ましくは約２０μｇ～５００μｇの活性化合物（例えばＢ７関連関連ポリペプチド）を投与することができる。医薬調製物および組成物はさらに１またはそれ以上の生理学的に許容し得る担体、賦形剤、希釈剤、崩壊剤、滑沢剤、流動化剤、充填剤、着色剤、投与ビークル、吸収増強剤、安定化剤、または抗菌剤を含有することができる。そのような組成物および調製物の製造および形成は、当分野において知られ実施されている方法によって行われる。

【０１４５】

製剤例は以下の通りである：

注射用製剤Ｉ：

成分	mg／mL
ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ MAb	5.0
デキストロース USP 4	5.0
亜硫酸水素ナトリウム USP	3.2
エデト酸二ナトリウム USP	0.1
注射用水 q.s.a.d.	1.0 ml

注射用製剤ＩＩ：

成分	mg／mL
ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ MAb	5.0
亜硫酸水素ナトリウム USP	3.2
エデト酸二ナトリウム USP	0.1
注射用水 q.s.a.d.	1.0 ml

注射用製剤ＩＩＩ：

成分	mg／mL
ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３タンパク、Ig-融合タンパク質、またはアゴニスト	10.0
亜硫酸水素ナトリウム USP	3. 2
エデト酸二ナトリウム USP	0. 1
注射用水 q. s. a. d.	1.0 ml

注射用製剤ＩＶ：

成分	mg／mL
ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３タンパク、Ig-融合タンパク質、またはアゴニスト	10.0
デキストロース USP 4	5.0
亜硫酸水素ナトリウム USP	3. 2
エデト酸二ナトリウム USP	0. 1
注射用水 q. s. a. d.	1.0 ml

【０１４６】
本明細書に用いられる、「ｐｇ」は、ピコグラム、「ｎｇ」はナノグラム、「ｍＬ」はミリグラム、および「ｌ」はリットルを意味する。
【０１４７】
医薬組成物の製造後、適当な容器に入れ、表示された状態の処置のためにラベルが付す。そのようなラベルに、投与方法を記載することが多い。調製物は、経口または非経口経路で全身的に投与することができる。非限定的な非経口投与経路としては、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、経皮、吸入、鼻内、動脈内、鞘内、経腸、舌下または直腸が挙げられる。
【０１４８】
１またはそれ以上のＢ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、ペプチド断片、またはこれらの成分と特異的に結合する抗体を含む、医薬組成物の治療上有効な量は、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞の変化した活性化レベルに関連した疾患または障害を減少、改善または取り除くのに十分な量である。有効な量を、１回の投与でまたは投与の繰り返しで処置される個人に導入することができる。治療的投与は予防的投与の後、疾患の処置の後に行うことができる。予防的に有効な量は、疾患を防止するのに有効な量であり、具体的な病気と患者に依存するであろう。治療上有効な量は、最初に、例えば、細胞カルチャー分析または動物モデル、例えばマウス、ラット、ウサギ、ヒツジ、ヤギ、ブタ、または非ヒト霊長類など、において見積もることができる。動物モデルは、最大許容用量および適当な投与経路を決定するために用いることができる。そして、そのような情報をヒトにおけ

る有用な投与量および投与経路を決定するために用いることができる。

【０１４９】

患者に対する本発明の治療組成物の投与は、知られている方法を用いて、所望の結果を達成するのに有用な用量と期間で行うことができる。例えば、Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、ペプチド、またはこれらの化合物と反応する抗体の治療上活性な量は、その人の年齢、性別、および体重、およびその人において所望の応答を引き出す処置の能力に依存して変わり得る。投与量は、最適な治療応答をもたらすように調製し得る。例えば、何回かの投与を連続して毎日投与するか、または治療状況の緊急性に応じて比例して減少させることができる。

【０１５０】

さらに、遺伝子導入治療：Ｂ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、またはＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチド配列を含む断片を含むペプチド断片をコードする遺伝子を有するように遺伝子操作された宿主細胞を免疫調節を必要とする人に導入することができる。宿主細胞によるＢ７関連ポリペプチドまたはペプチドの発現と産生の後、産生したＢ７関連ポリペプチド、融合タンパク質、またはペプチドは、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドと結合して受容者における免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性化を調節するように作用し得る。宿主細胞は、当業者に知られた様々な分子の技術および方法、例えば、トランスフェクション、感染、または形質導入により遺伝子操作することができる。本明細書において用いる形質導入は、一般に、外来のまたはヘテロローガスな遺伝子を含むように遺伝子操作された細胞を、ウイルスまたは非ウイルスベクターの細胞への導入することをいう。さらに一般的には、形質導入は、プラスミドまたは非ウイルスベクターに組み込まれた外来遺伝子を含むように遺伝子操作された細胞をいう。宿主細胞は、種々のベクターによってトランスフェクトまたは形質導入することができ、このようにして発現した産物を筋肉内に輸送するための遺伝子送達ビークルとして供することができる。

【０１５１】

ウイルスベクターは、遺伝子導入治療には好ましいが、当分野で知られた様々な方法によって、所望の遺伝子産物をコードする核酸配列を含むように細胞を遺伝子操作することができる。例えば、融合、トランスフェクション、リポソー無の使用によるリポフェクション、エレクトロポレーション、ＤＥＡＥ－デキストランまたはリン酸カルシウムによる沈殿、または核酸で被覆した粒子（例えば金粒子）による粒子衝撃（ｂｉｏｌｉｓｔｉｃｓ）、マイクロインジェクション、または遺伝子操作された微生物（Ｋ．Ｙａｚａｗａ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：２６９－２７４）によって細胞を遺伝子操作することができる。活性な生物活性産物の発現のための、ヘテロローガスな（即ち外来の）核酸（ＤＮＡまたはＲＮＡ）の筋肉細胞内への導入のためのベクターは、当分野においてよく知られている。そのようなベクターは、プロモーター 配列、好ましくは細胞特異的で発現させる配列の上流に配置させたプロモーターを有する。ベクターはさらに、場合により、トランスフェクションの成功およびベクターに含まれた核酸配列の発現の指標としての発現のための、１またはそれ以上の発現可能なマーカー遺伝子を含むことができる。さらに、ベクターは、望ましくない免疫原性が最小限になるよう、および所望の遺伝子産物の長期間の発現が最大限になるよう最適化することができる（Ｎａｂｅｌ（１９９９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９６：３２４－３２６参照）。さらに、処置の対象となる細胞のタイプに基づいてベクターを選択することができる。例えば、腫瘍または癌細胞の処置のためのベクターが記載されている（Ｐ．Ｌ．Ｈａｌｌｅｎｂｅｃｋ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１０：１７２１－１７３３；Ｔ．Ｓｈｉｂａｔａ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：４９３－４９８；Ｍ．Ｐｕｈｉｍａｎｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃａｎｃｅｒ Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．７：６６－７３；Ｎ．Ｋｒａｕｚｅｗｉｃｚ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６５：７３－８２）。

【０１５２】

宿主細胞のトランスフェクションまたは感染のためのベクター構築物の例としては、複製欠陥ウイルスベクター、ＤＮＡウイルスまたはＲＮＡウイルス（レトロウイルス）ベクター、例えばアデノウイルス、単純ヘルペスウイルス、およびアデノ－随伴ウイルスベクターが挙げられる。アデノ－随伴ウイルスベクターは、単一の標準であり、複数の核酸のコピーを細胞の核へ効率的に送達することが可能である。好ましいのは、アデノウイルスベクターである。ベクターは、通常実質的に原核生物のＤＮＡは含まず、数多くの異なる機能的な核酸配列を含むことができる。そのような機能的な配列の例は、誘導プロモーター（例えば強力なプロモーター、誘導的プロモーターなど）および宿主細胞を活性化するエンハンサーを含め、転写および翻訳開始および終止調節配列を含むＤＮＡ配列であり得る。機能的配列の一部として、目的のタンパク質をコードするオープンリーディング配列（ポリヌクレオチド配列）も含まれ得る。フランキング配列もまた、部位特異的な組込みのために含むことができる。一例として、状況によっては、５’フランキング配列の相同的組換えが可能で、これにより転写開始領域の性質が変化し、誘導的または非誘導的な転写をもたらして翻訳を増大または減少させる。

【０１５３】

一般に、コードされ発現するＢ７関連因子を細胞内に存在し得る、即ち、細胞質、核または細胞のオルガネラに保持され得る、または細胞によって分泌され得る。分泌について、Ｂ７関連構造遺伝子に存在する天然のシグナル配列は保持され得る。ポリペプチドまたはペプチドが、大きなＢ７関連因子の断片である場合、分泌されプロセシング部位でプロセシングされると、所望のタンパク質が天然配列を有するように、シグナル配列を調製することができる。本発明に従って使用するための、目的のコード配列の具体的な例としては、ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号 ：７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）ポリペプチドコード配列が挙げられる。以前に言及したように、ベクター構築物を含む細胞の選択のためのマーカーを存在させることができる。マーカーは、誘導的かまたは非誘導的遺伝子であり、一般に誘導条件下または誘導無し、それぞれポシティブな選択が可能である。マーカー遺伝子の例としては、ネオマイシン、ジヒドロ葉酸還元酵素、グルタミン合成酵素等が挙げられる。

【０１５４】

用いられるベクターは、一般に、複製の起点および当業者に慣用的に用いられている宿主細胞における複製に必要なその他の遺伝子も含む。一例として、特定のウイルスによってコードされる複製起点および複製に関連するタンパク質を含む複製系は、構築物の一部として含まれ得る。複製系は、複製に必要な遺伝子コード産物が細胞を結果的に形質転換しないよう選択しなければならない。そのような複製系は、複製欠陥アデノウイルス（Ｇ．Ａｃｓａｄｉ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｈｕｍ．Ｍｏｌ．Ｇｅｎｅｔ．３：５７９－５８４）およびＥｐｓｔｅｉｎ－Ｂａｒｒウイルスによって示される。複製欠陥ベクター、特に複製欠陥のレトロウイルスベクターの例は、ＢＡＧである（ｓｅｅ Ｐｒｉｃｅ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ、８４：１５６；Ｓａｎｅｓ ｅｔ ａｌ．（１９８６）ＥＭＢＯＪ．、５：３１３３）。最終的な遺伝子構築物が、１またはそれ以上の目的の遺伝子、例えば、生物活性な代謝分子をコードする遺伝子を含み得ることは理解されよう。さらに、当業者に知られ実施されている方法およびプロトコルを用いて、ｃＤＮＡ、合成により製造されるＤＮＡまたは染色体ＤＮＡを用いることができる。

【０１５５】

遺伝子治療の１つの方法によれば、Ｂ７関連因子をコードするベクターを受容者の細胞内へ直接注入する（ｉｎ ｖｉｖｏ 遺伝子治療）。あるいは、目的の受容者から得られた細胞を外植し、Ｂ７関連因子をコードするように遺伝子を修飾し、そのドナーへ再移植する（ｅｘ ｖｉｖｏ 遺伝子治療）。ｅｘ ｖｉｖｏ 法は、効率的なウイルス遺伝子の導入に有利であり、ｉｎ ｖｉｖｏ 遺伝子導入法よりも優れている。ｅｘ ｖｉｖｏ 遺伝子治療によれば、宿主細胞を、Ｂ７関連遺伝子産物をコードする少なくとも１つのＢ７関連遺伝子を含む操作されたウイルスベクターで最初に感染させ、食塩水またはリン酸緩衝食塩水

等の、生理学的に許容し得る担体または賦形剤中で懸濁させた後、宿主に投与する。所望の遺伝子産物を注入した細胞によって発現させ、この遺伝子産物を宿主へ導入する。それにより、導入された遺伝子産物は、免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性化の変化したレベルに関連する疾患を処置または改善するために用いることができる。

【０１５６】

免疫調節の方法：本発明によれば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３核酸およびポリペプチド配列を、免疫応答（例えばＴ細胞活性化）を上方調節（増幅）または下方調節（抑制）する能力を有する治療剤の開発において用いることができる。特に、Ｂ７関連ポリペプチドは、ＣＤ２８と相互作用しそれにより免疫細胞の活性を上方調節し得る。あるいは、Ｂ７関連ポリペプチドは、ＣＴＬＡ－４と相互作用して、免疫細胞の活性を下方調節し得る。例えば、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドに結合するがＴ細胞に対する共刺激シグナルを生じない、可溶性の、二量体の形態のＢ７関連ポリペプチドは、Ｔ細胞活性化をブロックするために用いることができ、それにより、患者の寛容を誘導する特異的な手段がもたらされる。同様に、１またはそれ以上のＢ７関連因子に対する抗体を用いてＢ７関連因子およびその同族リガンドとの間の相互作用をブロックし、それにより免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性化を阻止することができる。さらに、ＩｇＧ分子の少なくともＦｃドメインに融合したＢ７関連因子（例えばＴ細胞）の少なくとも断片を含む融合タンパク質は、Ｂ７関連因子の同族リガンドを発現する細胞を上方調節または下方調節するために用いることができる。さらに、１またはそれ以上のＢ７関連Ｂ因子のヌクレオチド配列に結合するアンチセンスまたは３本鎖オリゴヌクレオチドを使用して、これら因子の発現を減少させることができる。対照的に、ＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドに結合し、Ｔ細胞等の免疫または炎症応答細胞に共刺激シグナルをもたらす、細胞表面、Ｂ７関連因子の多価形態を用いてこれら細胞の活性化を増大させることができる。動物またはヒトの患者において、免疫または炎症細胞（例えばＴ細胞）の活性を上方調節または下方調節するために、１以上のＢ７関連因子、融合タンパク質、抗体、または治療上活性なその断片を用いることができる。

【０１５７】

さらに具体的には、本明細書に記載のＢ７関連因子の与えられた構造および機能を用いて、多くの方法によりＢ７関連因子の機能を上方調節または下方調節することができる。１またはそれ以上のＢ７関連因子機能の下方調節または阻止（即ち、活性化されたＴ細胞による高いレベルのリンパ球合成の阻止）は、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、紅斑性狼瘡、橋本病甲状腺炎、原発性ｍｉｘ水腫、グレーブス病、悪性貧血、自己免疫性萎縮性胃炎、インスリン依存性糖尿病、Ｇｏｏｄｐａｓｔｕｒｅ症候群、重症筋無力症、天疱瘡、クローン病、交換性眼炎、自己免疫性ブドウ膜炎、自己免疫性溶血性貧血、特発性血小板減少症、原発性胆汁性肝硬変，潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、多発性筋炎および混合性結合組織病等の自己免疫疾患の処置に有用である。乾癬、慢性閉塞性肺疾患、喘息、およびアテローム性動脈硬化症に関連する炎症の処置のためにＢ７関連因子を上方調節してもよい。さらに、組織、骨髄、および臓器移植、および移植片対宿主疾患の処置のためにＢ７関連因子を下方調節してよい。例えば、Ｔ細胞機能のブロックは、組織移植における組織破壊の減少をもたらす。典型的には、組織移植において、移植片の拒絶は、その組織を外来の物質と認識することによって開始され、それに続いてその移植片を破壊する免疫反応が起きる。本発明のＢ７関連分子は、以下に詳細に記載する癌を処置または阻止するためにも用いることができる。

【０１５８】

本発明によって提供されるＢ７関連核酸分子は、１またはそれ以上のＢ７関連因子の機能をブロックするための治療を設計するために用いることができる。特に、アンチセンスまたは３本鎖オリゴヌクレオチドを投与してＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３因子の発現を阻止することができる。例えば、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３ｍＲＮＡにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えばＤＮＡ オリゴヌクレオチド）は、ｍＲＮＡをＲｎａｓｅＨ消化の標的とするために用いることができる。あるい

は、ＢＳＬ１（配列番号１または３）、ＢＳＬ２（配列番号６、１０、または１２）、またはＢＳＬ３（配列番号１４）ｍＲＮＡの翻訳開始部位とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドはｍＲＮＡの翻訳を阻止するために用いることができる。別の方法では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３遺伝子の２本鎖ＤＮＡに結合するオリゴヌクレオチドを投与することができる。そのようなオリゴヌクレオチドは、３本鎖の構築物を形成することができ、標的とするＢ７関連因子をコードするＤＮＡの巻き戻しと翻訳を阻止する。いずれの場合も、適当なオリゴヌクレオチドを合成し、医薬組成物として製剤化することができ、患者に投与することができる。ｓｙｎｔｈｅｓｉｓおよびｕｔｉｌｉｚａｔｉｏｎ ｏｆ アンチセンスおよび3本鎖オリゴヌクレオチドの合成および利用は以前から記載されている（例えばH. Ｓｉｍｏｎ ｅｔ ａｌ.（１９９９）アンチセンス 核酸 Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ. ９：５２７－３１；Ｆ. Ｘ. Ｂａｒｒｅ ｅｔ ａｌ.（２０００）Ｐｒｏｃ. Ｎａｔｌ. Ａｃａｄ. Ｓｃｉ. ＵＳＡ ９７：３０８４－３０８８；Ｒ. Ｅｌｅｚ ｅｔ ａｌ.（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ. Ｂｉｏｐｈｙｓ. Ｒｅｓ. Ｃｏｍｍｕｎ. ２６９：３５２－６；Ｅ. Ｒ. Ｓａｕｔｅｒ ｅｔ ａｌ.（２０００）Ｃｌｉｎ. Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ. ６：６５４－６０）。

【０１５９】

本発明によれば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然に存在するオリゴヌクレオチド種または天然に存在するサブユニットから形成された合成種またはそれらに近い同族体である。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドと同様に機能する部分を含んでいてもよいが、天然に存在しない部分を有する。即ち、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、変化した糖部分または糖と糖との間の結合を有していてもよい。これらの例としては、ホスホロチオエートおよび当分野で知られているその他の硫黄含有基である。

【０１６０】

好ましい態様では、アンチセンスオリゴヌクレオチドの少なくとも１つのホスホジエステル結合は、その活性を調節するべきＲＮＡが存在している細胞の領域内へその組成物を浸透させる能力を増大するように機能する構造で置換されている。そのような置換に、ホスホロチオエート結合、メチルホスホネート結合または短いアルキル鎖またはシクロアルキル構造が含まれることが好ましい。その他の好ましい態様によれば、ホスホジエステル結合は実質的に非イオン性で非キラルな構造で１回、またはキラルおよびエナンチオマー特異的な構造で置換する。当業者は、本発明において用いるためにその他の結合を選択することができるであろう。

【０１６１】

アンチセンスオリゴヌクレオチドは、少なくともいくつかの修飾された塩基の形態を含む種を含んでいてもよい。即ち、もともと天然に通常存在するもの以外のプリンおよびピリミジンを用いることができる。同様に、ヌクレオチドサブユニットのフラノシル部分の修飾もまた、本発明の信条にしたがう限り、引き起こすことができる。そのような修飾の例としては２’－Ｏ－アルキル－および２’－ハロゲン－置換 ヌクレオチドである。本発明に有用な糖部分の２’位での修飾の非限定的な例としては、ＯＨ、ＳＨ、SCH_3、Ｆ、OCH_3、ＯＣＮ、$O(CH_2)_n NH_2$および$O(CH_2)_n CH_3$（ここで、ｎは１～約１０である）が挙げられる。そのようなアンチセンスオリゴヌクレオチドは、天然のオリゴヌクレオチドまたは天然の構造と１またはそれ以上の異なる相違を有する合成されたオリゴヌクレオチドと機能的に交換可能である。そのようなアナログはすべて、効果的に機能してＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ＤＮＡまたはＲＮＡとハイブリダイズしてその機能を阻害するかぎり、本発明に包含される。

【０１６２】

アンチセンス治療について、本発明に従うオリゴヌクレオチドは好ましくは、約３～約５０のサブユニットを含む。そのようなオリゴヌクレオチドおよびアナログが約８～約２５のサブユニットを含む、さらには約１２～約２０サブユニットを有することがより好ましい。本明細書に定義されるように、「サブユニット」は、ホスホジエステルまたは他の結合によって隣接するサブユニットに適切に結合した塩基と糖の組合せである。

【０１６３】
アンチセンスオリゴヌクレオチドは、標準的な技術によって製造することができる（例えばＳｈｅｗｍａｋｅｒ ｅｔ ａｌ．、米国特許第５，１０７，０６５参照）。本発明にしたがって用いられるオリゴヌクレオチドは、固相合成の周知技術によって便利におよび常套的に製造することができる。そのような合成のための装置は、ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ（Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を含め、いくつかの製造販売元から入手可能である。そのような合成のためのその他の方法も用いることができるが、オリゴヌクレオチドの実際の合成は、十分に当業者の能力の範囲内である。ホスホロチオエートおよびアルキル化誘導体などの他のオリゴヌクレオチドの製造もよく知られている。

【０１６４】
本発明のオリゴヌクレオチドは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ＲＮＡ（例えばｍＲＮＡ）またはＤＮＡにハイブリダイズ可能なように設計することができる。例えば、Ｂ７関連ｍＲＮＡにハイブリダイズするオリゴヌクレオチド（例えばＤＮＡオリゴヌクレオチド）をＲｎａａｓｅＨ消化にＲＮＡを標的化するために用いることができる。あるいは、Ｂ７関連ｍＲＮＡの翻訳開始部位にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドは、ｍＲＮＡの翻訳を阻止するために用いることができる。別の態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の２本鎖のＤＮＡに結合するオリゴヌクレオチドを投与することができる。そのようなオリゴヌクレオチドは、３本鎖の構築物を形成することができ、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドをコードするＤＮＡの転写を阻害する。三重らせんのペアリングは、二重らせんが、ポリメラーゼ、翻訳因子または調節分子の結合が可能になるほどに十分開くのを阻止する。３本鎖ＤＮＡを用いた最近の治療の進歩は記載されている（例えば、Ｊ．Ｅ．Ｇｅｅ ｅｔ ａｌ．（１９９４）ＭｏｌｅｃｕｌａｒおよびＩｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃ Ａｐｐｒｏａｃｈｅｓ、Ｆｕｔｕｒａ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．、Ｍｔ．Ｋｉｓｃｏ、ＮＹ参照）。

【０１６５】
非限定的な例として、アンチセンスオリゴヌクレオチドを位かの領域とハイブリダイズするように標的化することができる：：ｍＲＮＡキャップ領域；翻訳開始部位；転写終止部位；転写開始部位；翻訳終止部位；ポリアデニル化配列シグナル；３’非翻訳領域；５’非翻訳領域；５’コード領域；ｍｉｄコード領域；および３’コード領域。好ましくは、５’コード配列に位置するいずれかの約１５－３５ ヌクレオチドを含む、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の最も独特な５’配列とハイブリダイズするように相補的なオリゴヌクレオチドを設計することができる。オリゴソフトウエア（Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ Ｉｎｓｉｇｈｔｓ、Ｉｎｃ．、Ｃａｓｃａｄｅ、ＣＯ；ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．オリゴ．ｎｅｔ）を用いて適当なオリゴヌクレオチドを設計することができる。

【０１６６】
本発明によれば、アンチセンスオリゴヌクレオチドを合成し、医薬組成物として製剤化し、患者に投与することができる。アンチセンスおよび３本鎖オリゴヌクレオチドの合成および利用は以前から記載されている（例えばＨ．Ｓｉｍｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）アンチセンス 核酸 Ｄｒｕｇ Ｄｅｖ．９：５２７－３１；Ｆ．Ｘ．Ｂａｒｒｅ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９７：３０８４－３０８８；Ｒ．Ｅｌｅｚ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｂｉｏｃｈｅｍ．Ｂｉｏｐｈｙｓ．Ｒｅｓ．Ｃｏｍｍｕｎ．２６９：３５２－６；Ｅ．Ｒ．Ｓａｕｔｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｃｌｉｎ．Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．６：６５４－６０）。あるいは、レトロウイルス、アデノウイルス、ヘルペスまたはワクシニアウイルス、または種々の細菌プラスミドから得られた発現ベクターを標的器官、組織または細胞集団へ送達するために使用することができる。当業者によく知られた方法を用いて、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドをコードする核酸配列に相補的な核酸配列を発現する組換えベクターを構築することができる。これらの技術は、Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）および ｉｎ Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９２）に記載されている。例えば、高レベルの翻訳不能なセンスまたはアンチセンス配列を発現する発現ベクターで細

胞または組織を形質転換することにより、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３発現を誘導することができる。ＤＮＡへの組込みが存在しない場合でも、そのようなベクターは、内因的な核によりそれらが無効にされるまで、ＲＮＡ分子を転写し続ける。非複製ベクターによる一過性発現は１ヶ月またはそれ以上続き、ベクター系に適当な複製エレメントが含まれているとさらに長くなる。

【０１６７】

ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ 発現を阻害する特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの能力を試験するために様々な分析を用いることができる。例えば、ｍＲＮＡレベルをノーザンブロット解析（Ｓａｍｂｒｏｏｋ ｅｔ ａｌ．（１９８９）；Ａｕｓｕｂｅｌ ｅｔ ａｌ．（１９９２）；Ｊ．Ｃ．Ａｌｗｉｎｅ ｅｔ ａｌ．（１９７７）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ７４：５３５０－５３５４；Ｉ．Ｍ．Ｂｉｒｄ（１９９８）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３２５３６）、定量的または半定量的ＲＴ－ＰＣＲ解析（ｓｅｅ、例えばＷ．Ｍ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｂｉｏｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ２６：１１２－１２２；Ｒｅｎ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｍｏｌ．脳Ｒｅｓ．５９：２５６－６３；Ｊ．Ｍ．Ｃａｌｅ ｅｔ ａｌ．（１９９８）、Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１０５：３５１７１）、またはｉｎ ｓｉｔｕ ハイブリダイゼーション（ｒｅｖｉｅｗｅｄ ｂｙ Ａ．Ｋ．Ｒａａｐ（１９９８）Ｍｕｔａｔ．Ｒｅｓ．４００：２８７－２９８）により分析することができる。あるいは、例えばウェスタンブロット解析、間接免疫蛍光法、免疫沈降法（例えばＪ．Ｍ．Ｗａｌｋｅｒ（１９９８）Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｏｎ ＣＤ－ＲＯＭ、ヒトａ Ｐｒｅｓｓ、Ｔｏｔｏｗａ、ＮＪ参照）によって、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドのレベルを測定することにより、アンチセンスオリゴヌクレオチドを分析することができる。

【０１６８】

本発明によって提供されるＢ７関連ポリペプチド配列は、免疫応答細胞（例えばＴ細胞）の活性をブロックまたは増強するための治療剤を設計するのに有用である。例えば、ヒトＩｇＧのＦｃドメインに結合したＢ７関連ポリペプチドの可溶性部分を含む融合タンパク質は、上記の標準的な組換え法により構築することができる。ＢＳＬＩ－Ｉｇ、ＢＳＬ２－Ｉｇ、および／またはＢＳＬ３－Ｉｇ、融合タンパク質は、医薬組成物として製造することができ患者に投与することができる。ＢＳＬ１－Ｉｇ、ＢＳＬ２－Ｉｇ、および／またはＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質は、特異的なＴ細胞を破壊するために標的化し、それにより全体の細胞活性化を減少させることができる。そのような処置法は、心臓同種移植を阻止するためにＣＴＬＡ－４－Ｉｇを用いた動物実験においてモデル化することができる（Ｔｕｒｋａ ｅｔ ａｌ．前掲）。このような方法をヒトにおける使用、および種々の移植および自己免疫疾患を含む、他の状態における使用に適応させ得ることは当業者に理解されよう。あるいは、ＢＳＬ１－Ｉｇ、ＢＳＬ２－Ｉｇ、および／またはＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質をＴ細胞活性化を増強するために使用することができる。例えば、ＢＳＬ２－ＩｇおよびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質は、本明細書に記載の共刺激分子として使用することができる。

【０１６９】

別法として、Ｂ７関連ポリペプチドまたはペプチドと特異的に反応する抗体を用いて免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性をブロックすることができる。ＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号：１５）配列を含むペプチドまたはポリペプチドに結合する抗体または関連する抗体断片を医薬組成物として製剤化し、単独または組み合わせて患者に投与することができる。次いで、そのような抗体は、Ｂ７関連ポリペプチドとＣＤ２８および／またはＣＤ２８関連リガンドとの相互作用を阻害し、それによりＴ細胞活性化を阻止することができる。Ｂ７関連因子に対する抗体を用いる処置は、ＣＤ２８、Ｂ７－１、またはＢ７－２に対する抗体（Ｄ．Ｊ．Ｌｅｎｓｈｏｗ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｔｒａｎｓ植物ａｔｉｏｎ ６０：１１７１－１１７８；Ｙ．Ｓｅｋｏ ｅｔ ａｌ．（１９９８）Ｃｉｒｃ．Ｒｅｓ

．８３：４６３－４６９；Ａ．Ｈａｃｚｋｕ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ａｍ．Ｊ．Ｒｅｓｐｉｒ．Ｃｒｉｔ．Ｃａｒｅ Ｍｅｄ．１５９：１６３８－１６４３）を用いる動物実験でモデル化することができる。当業者は、そのような方法を、ヒトにおける使用および炎症または移植が関与する様々な状態での使用に適合させることができる。

【０１７０】

非ヒトの供給源から産生した抗体ベースの治療は、ヒトの患者において、望ましくない免疫応答を引き起こし得ることに注意しなければならない。この問題を最小限にするために、キメラ抗体誘導体を製造することができる。キメラ抗体は、非ヒト動物の可変領域とヒトの定常領域を結合したものである。キメラ抗体は、当分野で知られている方法にしたがって構築することができる（Ｍｏｒｒｉｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．Ｕ．ＳＡ８１：６８５１；Ｔａｋｅｄａ ｅｔ ａｌ．（１９８５）Ｎａｔｕｒｅ ３１４：４５２；米国特許第４，８１６，５６７ ｏｆ Ｃａｂｉｌｌｙ ｅｔ ａｌ．；米国特許第４，８１６，３９７ ｏｆ Ｂｏｓｓ ｅｔ ａｌ．；Ｅｕｒｏｐｅａｎ Ｐａｔｅｎｔ Ｐｕｂｌｉｃａｔｉｏｎ ＥＰ １７１４９６；ＥＰ ０１７３４９４；Ｕｎｉｔｅｄ Ｋｉｎｇｄｏｍ Ｐａｔｅｎｔ ＧＢ ２１７７０９６Ｂ参照）。さらに、当分野で知られた方法のいずれかにより抗体をさらに「ヒト化」することができる（例えばＴｅｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ８０：７３０８－７３１２；Ｋｏｚｂｏｒ ｅｔ ａｌ．（１９８３）Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ Ｔｏｄａｙ ４：７２７９；Ｏｌｓｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８２）Ｍｅｔｈ．Ｅｎｚｙｍｏｌ．９２：３－１６；国際特許出願ＷＯ ９２／０６１９３；ＥＰ ０２３９４００）。ヒト化抗体は、商業的な供給源から得ることもできる（例えばＳｃｏｔｇｅｎ Ｌｉｍｉｔｅｄ、Ｍｉｄｄｌｅｓｅｘ、Ｇｒｅａｔ Ｂｒｉｔａｉｎ）。ヒト化抗体による免疫治療は、慢性疾患の状況の処置または繰り返しの抗体処置を必要とする状況に対して増加した有効性を長期間もたらし得る。

【０１７１】

別の更なる方法において、Ｂ７関連因子の単離されたリガンドを、免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性を下方調節するために使用することができる。例えば、本明細書に詳細に記載した方法にしたがって、Ｂ７関連因子リガンドを含む可溶性の融合タンパク質を製造し、単離し、医薬組成物を製造するために使用することができる。次いで、この医薬組成物を、上に記載したように、患者に投与して、１またはそれ以上の内因的Ｂ７関連因子に結合させ、免疫または炎症応答細胞（例えばＴ細胞）の活性化をブロックすることができる。

【０１７２】

Ｂ７関連因子の上方調節は治療において有用でもある。なぜなら、ウイルス感染は細胞傷害性Ｔ細胞によって取り除かれるので、より迅速なまたは完全な感染性ウイルスの除去が動物またはヒトの患者において有益である場合には、細胞傷害活性の増大が治療上有用であろう。とりわけ、Ｂ７－１は、同族リガンドとの相互作用によりＴ細胞の細胞傷害性を増大するように作用する。即ち、Ｂ７関連ポリペプチドの可溶性の活性な形態は、免疫不全（例えばＨＩＶ）、乳頭腫（例えばＨＰＶ）、ヘルペス（例えばＨＳＶ）、脳炎、インフルエンザ（例えばヒトインフルエンザウイルスＡ）、および風邪（例えばヒトライノウイルス）ウイルス感染等の、局所的なまたは全身的なウイルス感染の処置のために投与することができる。例えば、活性な多価Ｂ７関連因子の医薬製剤を局所的に投与して、ヘルペス病変または帯状疱疹または陰部疣贅等のウイルス性の皮膚病を処置することができる。あるいは、活性な多価Ｂ７関連因子の医薬組成物を全身投与して、ＡＩＤＳ、インフルエンザ、風邪または脳炎等の全身性のウイルス疾患を処置することができる。

【０１７３】

さらに、Ｂ７関連因子機能の調節は、腫瘍免疫の誘導において有用であり得る。例えば、腫瘍細胞（例えば肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、または癌腫細胞）を、少なくとも１つのＢ７関連因子、例えばＢＳＬ１（配列番号２）、ＢＳＬ２（配列番号７、１１、または１３）、またはＢＳＬ３（配列番号１５）の少なくとも断片ををコ

ードする核酸を有するように遺伝子操作し、患者に投与して患者における腫瘍特異的寛容を阻止することができる。とりわけ、Ｂ７－１ ｉｎＢ７ネガティブマウス腫瘍細胞におけるＢ７－１の異所性の発現は、マウスにおいて、腫瘍拒絶を伴うＴ細胞介在の特異的免疫および腫瘍の攻撃に対する長期間の保護を誘導することが示されている（Ｌ．Ｃｈｅｎ ｅｔ ａｌ．前掲；Ｓ．Ｔｏｗｎｓ末端 ｅｔ ａｌ．前掲；Ｓ．Ｂａｓｋａｒ ｅｔ ａｌ．前掲）。Ｂ７関連因子を用いる腫瘍または癌細胞遺伝子治療は、動物実験においてモデル化することができる（Ｋ．Ｄｕｎｕｓｓｉ－Ｊｏａｎｎｏｐｏｕｌｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｊ．Ｐｅｄｉａｔｒ．Ｈｅｍａｔｏｌ．Ｏｎｃｏｌ．１９：３５６－３４０；Ｋ．Ｈｉｒｏｉｓｈｉ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．６：１９８８－１９９４；Ｂ．Ｋ．Ｍａｒｔｉｎ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１６２：６６６３６６７０；Ｍ．Ｋｕｉｐｅｒ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ａｄｖ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．Ｂｉｏｌ．４６５：３８１－３９０）、または遺伝子導入治療にＢ７－１またはＢ７－２遺伝子を用いるヒト第Ｉ相臨床試験（Ｈ．Ｌ．Ｋａｕｆｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｈｕｍ．Ｇｅｎｅ Ｔｈｅｒ．１１：１０６５－１０８２）。様々な腫瘍または癌細胞での使用にそのような方法を適合させることができることは理解されよう。さらに、腫瘍免疫は、免疫細胞を直接刺激するＢ７関連融合タンパク質の投与によって達成することができる（例えばＶ．Ｌｉｎｇらの国際特許出願第ＷＯ０１／２１７９６号を参照）。

【０１７４】

薬理遺伝学：本発明のＢ７関連ポリペプチドおよびポリヌクレオチドは薬理遺伝学分析、即ち個人の遺伝子型と治療組成物または薬物に対するその人の応答との関係の試験、においても有用である。例えば、Ｅｉｃｈｅｌｂａｕｍ、Ｍ．（１９９６）Ｃｌｉｎ．Ｅｘｐ．Ｐｈａｒｍａｃｏｌ．Ｐｈｙｓｉｏ．２３（１０－１１）：９８３９８５、およびＬｉｎｄｅｒ、Ｍ．Ｗ．（１９９７）Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．４３（２）：２５４－２６６を参照。個人の遺伝子型は、身体に対する治療様式または身体の治療剤の代謝様式を決定し得る。さらに、薬物代謝酵素の活性は、治療活性の強度および持続時間の両方に影響を及ぼす。治療剤の活性または代謝における相違は、重篤な毒性または治療の破綻を招き得る。したがって、医師または臨床医は、Ｂ７関連ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物、断片、または調節物質を投与するかどうかの決定、並びに用量および／またはＢ７関連ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物、断片、または調節物質による治療または予防的処置のレジメの計画において、関係する薬理遺伝学試験から得られた知識の適用を考慮することができる。

【０１７５】

一般に、２つのタイプの薬理遺伝学的状態を識別することができる。遺伝子の状態は、身体に対する薬物作用の様式を変化させる（変化した薬物作用）、または薬物を代謝する身体の様式を変化させる（改変された薬物代謝）１つの因子に起因し得る。これらの状態は、稀有な欠陥としてまたは天然に存在する多型として起こり得る。例えば、グルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ欠損（Ｇ６ＰＤ）は一般的な遺伝性酵素異常症であり、オキシダント薬の服用（抗マラリア薬、スルホンアミド、鎮痛薬、ニトロフラン）およびソラマメの摂取後に貧血をもたらす。

【０１７６】

薬物代謝酵素（例えばＮ－アセチルトランスフェラーゼ２（ＮＡＴ２）およびシトクロームＰ４５０酵素ＣＹＰ２Ｄ６およびＣＹＰ２Ｃ１９）の遺伝子多型の発見によって、患者が期待した薬理効果を得られない、または過大な薬物応答や重篤な毒性を標準的で安全な用量で服用した後に示す理由が明らかになった。これらの多型は、集団において２つの表現型、高代謝能（ＥＭ）および低代謝能（ＰＭ）としてで発現される。ＰＭの罹患率は、異なる集団の間で異なる。ｇｅｎｅ ｃｏｄｉｎｇ ｆｏｒ ＣＹＰ２Ｄ６をコードする遺伝子は、高多型性であり、いくつかの突然変異がＰＭにおいて同定されており、すべて機能的なＣＹＰ２Ｄ６の不在につながっている。低代謝能は、標準的用量で服用した場合に、過大な薬物応答や副作用に遭遇することが非常に多い。代謝物が活性な治療部分であ

れば、ＰＭは治療的応答を示さない。このことは、コデイン介在の鎮痛作用について、そのＣＹＰ２Ｄ６により形成した代謝物のモルヒネにより実証されている。他の極端な、超急速代謝能は、標準的用量で応答することができない。最近の研究によって、超急速代謝能はＣＹＰ２Ｄ６遺伝子の増幅に依存していることが示されている。

【０１７７】

類推するに、遺伝子多型または突然変異は、様々な活性を有する集団における、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３のアレル変異につながり得る。それにより、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、および／またはＢＳＬ３ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、臨床医が処置のやり方に影響を及ぼし得る遺伝素質を確認することを可能にする。即ち、ＢＳＬベースの処置では、多型または突然変異によって、処置に対する反応が大きいまたは少ない個人が生じる。したがって、用量は、多型を含む集団内で治療効果を最大限にするために修正する必要があろう。遺伝子型特定に変わるものとして、特定の多型ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを同定することができる。

【０１７８】

薬物応答を予測し得る遺伝子を同定するために、いくつかの薬物遺伝学的方法を用いることができる。１つの薬物遺伝学的方法である、「ゲノムワイド相関」は、主としてヒトゲノムの高分解能染色体マップによるものである。この高分解能マップはこれまでに同定された遺伝子関連マーカー（例えば、ヒトゲノムにおいて６０，０００－１００，０００の多型または可変部位からなり、その各々が２つの変異体を有する、「ビーアレル」遺伝子マーカーマップ）を示している。高分解能遺伝子地図を、第ＩＩ相／第ＩＩＩ相の薬理試験に参加している統計的に有意の数の患者のそれぞれのゲノムのマップと比較して、特定の観察された薬物応答または副作用に関連するマーカーを同定することができる。あるいは、高分解能マップをヒトゲノムにおける数千万の既知の一塩基多型（ＳＮＰｓ）の組合せから作成することができる。本明細書において用いられる「ＳＮＰ」は、ＤＮＡ鎖の１個のヌクレオチド塩基において起きた共通の変化である。例えば、ＳＮＰはＤＮＡ１０００塩基あたり１回起こり得る。ＳＮＰは、疾患の過程に関与することがあるが、大部分は疾患とは無関係である。そのようなＳＮＰの発生に基づいて遺伝子地図を作成し、個人を、個々のゲノムにおけるＳＮＰの特定のパターンによって、遺伝子のカテゴリーにグループ分けすることができる。この方法では、遺伝子的に類似したヒトの間で共通する特徴を考慮して、治療レジメをその遺伝子的に類似した人のグループに合わせることができる、例えば、Ｄ．Ｒ．Ｐｆｏｓｔ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｔｒ末端 Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ．１８（８）：３３４－８を参照。

【０１７９】

別の例として、「候補遺伝子法」を用いることができる。この方法によれば、薬物の標的をコードする遺伝子が分かっている場合、その遺伝子の共通する変異体すべてを、その集団において適正に容易に同定することができ、他のものに対する１つの遺伝子の変化が特定の薬物応答に関係するかどうかを判断することができる。

【０１８０】

更なる例として「遺伝子発現プロファイリング法」を用いることができる。この方法は、薬物（例えば Ｂ７関連ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物、断片、または調節物質）で処置した動物の遺伝子発現を試験して、遺伝子の経路が発生した毒性に関係しているかを判断するものである。

【０１８１】

薬理遺伝学法の１つから得られた情報を用いて、個人における予防的または治療的処置のための適当な用量および処置レジメを決定することができる。投与または薬物の選択に適用する場合、この知識によって有害な反応または治療の失敗を回避することができ、患者をＢ７関連ポリペプチド、ポリペプチドヌクレオチド、機能的等価物、断片、または調節物質で処置するときに、治療的または予防的効果が高まる。

【０１８２】

Ｂ７関連ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、臨床試験およびその他の処置の間の治

療効果をモニターするのにも有用である。したがって、Ｂ７関連ポリペプチドまたはポリペプチドヌクレオチドを用いた処置の期間にわたって、遺伝子発現、ポリペプチドレベル、または活性を増大させるまたは減少させるように設計された試薬の治療効果をモニターすることができる。例えば、モニタリングは：（ｉ）薬剤の投与の前に患者から投与前サンプルを得ること；（ｉｉ）投与前サンプルにおけるポリペプチドの発現または活性のレベルを検出すること；（ｉｉｉ）１またはそれ以上の投与後サンプルを患者から得ること；（ｉｖ）投与後サンプル中のポリペプチドの発言のレベルまたは活性を検出すること；（ｖ）投与前サンプルにおけるポリペプチドの発現または活性のレベルを、投与後サンプルにおける発現または活性のレベルを比較すること；および（ｖｉ）薬剤の投与量をしかるべく増加または減少させることによって行うことができる。

【０１８３】

動物モデル

Ｂ７関連ポリヌクレオチドは、遺伝子改変された非ヒト動物またはヒト細胞系を作製するために用いることができる。任意の非 非ヒト動物を用いることができるが、典型的な動物は、マウス、ラットまたはモルモット等のげっ歯類である。遺伝子改変された動物または細胞系は、ポリヌクレオチド配列（例えばエクソン配列）の欠失、置換、挿入または修飾を含むように改変された遺伝子を有することができる。そのような改変によって、遺伝子を機能しないようにして（即ち、ｎｕｌｌ 突然変異）「ノックアウト」動物または細胞系を作製することができる。さらに、遺伝子操作された動物は、異なる生物（例えばヒト）から得られる、またはごう性または組換え法により製造された、１またはそれ以上の外来または天然に存在しない遺伝子、例えば「外来遺伝子」または「オルソログ」、を含むことができる。遺伝子改変された動物または細胞系を用いてＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３機能、調節を試験し、およびＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、またはＢＳＬ３－関連疾患のための処置を開発することができる。特に、ノックアウト動物および細胞系を用いて、ＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、またはＢＳＬ３－関連疾患の解析のための動物モデルおよびｉｎ ｖｉｔｒｏ モデルを確立することができる。さらに、ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３を発現するトランスジェニック動物を薬物発見の取り組みのために用いることができる。

【０１８４】

「トランスジェニック動物」は、標的化された組換えまたはマイクロインジェクションまたは組換えウイルスによる感染等の、細胞以下のレベルでの周到な遺伝子操作によって、改変されたまたは直接的もしくは間接的に受け取られた遺伝子情報を有する１またはそれ以上の細胞を含む任意の動物である。「トランスジェニック動物」は古典的な交配または試験管内受精を包含することを意図せず、むしろ、１またはそれ以上の細胞が組換えＤＮＡ分子により改変されたまたは組換えＤＮＡ分子を受け入れた動物を包含することを意味する。この組換えＤＮＡ分子を特定された遺伝子座に特異的に標的化するか、または染色体内にランダムに組み込ませることができ、あるいは染色体外で複製するＤＮＡであってもよい。

【０１８５】

本明細書において用いられる「オルソログ」は、異なった種に由来する類似の遺伝子またはポリペプチドに対して相同性を有するある種から得られた遺伝子またはポリペプチドを意味する。例えば、ヒトＢＳＬ３（配列番号１５）とマウスＡＦ１４２７８０ ポリペプチドはオルソログである。

【０１８６】

トランスジェニックマウスは、生殖細胞系列または接合体の処置の後に選択することができる。例えば、外因的なＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３遺伝子または変異体の発現は、遺伝子を、プロモーターおよび場合によりエンハンサーに作動可能なように連結させ、その構築物を接合体へマイクロインジェクションすることによって達成することができる（例えばＨｏｇａｎ ｅｔ ａｌ．（１９９４）Ｍａｎｉｐｕｌａｔｉｎｇ マウス Ｅｍｂｒｙｏ、Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏ

ｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ、Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ、ＮＹ参照）。そのような処置としては、外因的遺伝子および破壊された相同遺伝子の挿入が挙げられる。あるいは、動物の遺伝子を慣用技術を用いて他の遺伝子改変の挿入または欠失突然変異似よって破壊することができる。（例えばＣａｐｅｃｃｈｉ，（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１２８８；Ｖａｌａｎｃｕｉｓ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｍｏｌ．ＣｅｌｌＢｉｏｌ．、１１：１４０２；Ｈａｓｔｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ、３５０：２４３；Ｓｈｉｎｋａｉ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ、６８：８５５；Ｍｏｍｂａｅｒｔｓ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｃｅｌｌ、６８：８６９；Ｐｈｉｌｐｏｔｔ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５６：１４４８；Ｓｎｏｕｗａｅｒｔ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２５７：１０８３；Ｄｏｎｅｈｏｗｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｎａｔｕｒｅ、３５６：２１５を参照）。

【０１８７】

本発明の１態様では、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ノックアウトマウスを周知の方法にしたがって作製することができる（例えばＭ．Ｒ．Ｃａｐｅｃｃｈｉ，（１９８９）Ｓｃｉｅｎｃｅ、２４４：１２８８－１２９２；Ｐ．Ｌｉ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｃｅｌｌ ８０：４０１－４１１；Ｌ．Ａ．Ｇａｌｌｉ－Ｔａｌｉａｄｏｒｏｓ ｅｔ ａｌ．（１９９５）Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ １８１（１）：１－１５；Ｃ．Ｈ．Ｗｅｓｔｐｈａｌ ｅｔ ａｌ．（１９９７）Ｃｕｒｒ．Ｂｉｏｌ．７（７）：５３０－３；Ｓ．Ｓ．Ｃｈｅａｈ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｍｅｔｈｏｄｓ Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．１３６：４５５－６３を参照）。ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３クローンを用いてネズミホモローグを単離することができる。そして、ネズミホモローグを用いて、対応する染色体座での相同的組換えにより、マウスにおいてＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３を破壊することができる、ネズミＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３標的化構築物を調製することができる。この標的化構築物は、天然のマウス遺伝子の機能的断片の場所に挿入する、破壊されたまたは欠失したネズミＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３配列を含むことができる。例えば、構築物は、マウスＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３タンパクーコード領域にいおいて挿入を含むことができる。

【０１８８】

好ましくは、標的化構築物は、ポジティブンなまたはネガティブな選択両方のためマーカーを含む。ポジティブ選択マーカーは、マーカーを欠いている細胞の選択的排除を可能にするが、ネガティブ選択マーカーはマーカーを有する細胞の排除を可能にする。特に、ポジティブ選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子等の抗生物質耐性遺伝子であってよく、マウスＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３のコード配列内に位置して機能しなくなるようにするが、同時にその構築物を選択可能にする。単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（ＨＳＶ ｔｋ）遺伝子は、それを有する細胞を排除するための二次マーカーとして使用することができる、ネガティブ選択マーカーの一例である。ＨＳＶ ｔｋ 遺伝子を有する細胞は、癌シクロビルの存在下で選択的に死滅する。一例として、ポジティブ選択マーカーは、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の座で組み込む構築物の領域内の標的化構築物上に位置付けることができる。したがって、全構築物が細胞内に存在する場合、ポジティブおよびネガティブ選択マーカーの両方が存在するであろう。構築物がゲノム内に組み込まれればポジティブ選択マーカーは存在するが、ネガティブ選択マーカーは消失するであろう。

【０１８９】

例えば胚性幹細胞（ＥＳ）において、標的化構築物を用いることができる。ＥＳ細胞は、試験管内で培養した移植前の胚から得ることができる（Ｍ．Ｊ．Ｅｖａｎｓ ｅｔ ａｌ．（１９８１）Ｎａｔｕｒｅ ２９２：１５４－１５６；Ｍ．Ｏ．Ｂｒａｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９８４）Ｎａｔｕｒｅ ３０９：２５５－２５８；Ｇｏｓｓｌｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｐｒｏｃ．Ｎａｆｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８３：９０６５－９０６９；Ｒｏｂｅｒｔｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８６）Ｎａｔｕｒｅ ３２２：４４５－４４８；Ｓ．Ａ．Ｗｏｏｄ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａ

ｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ９０：４５８２４５８４）。標的化構築物はＤＮＡトランスフェクションまたはレトロウイルス介在の形質導入等の標準的な方法によってＥＳ細胞内へ効率的に導入することができる。その後、形質転換されたＥＳ細胞を非ヒト動物から得た胚盤胞と混合する。導入されたＥＳ細胞は、胚を形成し、キメラ動物を生じる生殖細胞系をもたらす（Ｒ．Ｊａｅｎｉｓｃｈ，（１９８８）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４０：１４６８－１４７４）。遺伝子標的化されたトランスジェニックマウスにおける遺伝子標的化ＥＳ細胞の使用は、これまでに記載されており（Ｔｈｏｍａｓ ｅｔ ａｌ．（１９８７）Ｃｅｌｌ ５１：５０３－５１２）、ほかで概説されている（Ｆｒｏｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｃｅｌｌ ５６：１４５－１４７；Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８９、Ｔｒ末端 ｉｎ Ｇｅｎｅｔ．５：７０－７６；Ｂａｒｉｂａｕｌｔ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．Ｍｅｄ．６：４８１－４９２；Ｗａｇｎｅｒ，（１９９０）ＥＭＢＯ Ｊ．９：３０２５－３０３２；Ｂｒａｄｌｅｙ ｅｔ ａｌ．（１９９２）ＢｉｏｌＴｅｃｈｎｏｌｏｇｙ １０：５３４－５３９）。

【０１９０】

相同的に組換えと起こしたＥＳ細胞を選択するために、いくつかの方法を用いることができる。１つの方法は、形質転換細胞のプールを、相同的挿入について選択するためのＰＣＲおよび、そのあとの個々のクローンのスクリーニングを用いる（Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９８８）核酸ｓ Ｒｅｓ．１６：８８８７－８９０３；Ｋｉｍ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｇｅｎｅ １０３：２２７－２３３）。別の方法では、相同的挿入が起こったとこにのみ活性であるように構築されたマーカー遺伝子を用い、これらの組換え体が直接選択されるようにする（Ｓｅｄｉｖｙ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８６：２２７－２３１）。例えば、上記のポジティブ－ネガティブ選択（ＰＮＳ）法を用いることができる（例えばＭａｎｓｏｕｒ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｎａｔｕｒｅ ３３６：３４８－３５２；Ｃａｐｅｃｃｈｉ、１９８９、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４４：１２８８－１２９２；Ｃａｐｅｃｃｈｉ，（１９８９）Ｔｒ末端 ｉｎ Ｇｅｎｅｔ．５：７０－７６を参照）。特に、ＰＮＳ法は、低レベルで発現する標的化遺伝子に有用である。

【０１９１】

ノックアウトマウスにおける機能的なＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の不在は、例えば、ＲＮＡ解析、タンパク発現解析、および機能性試験により確認することができる。ＲＮＡ解析について、ＲＮＡサンプルをノックアウトマウスの異なる臓器から調製し、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３転写物をその転写物に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いるノーザンブロットにおいて検出する。タンパク質発現検出については、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドに特異的な抗体を、例えば、フローサイトメトリー解析、免疫組織化学染色、および活性分析において用いる。あるいは、ノックアウトマウス殻集めた異なるタイプの細胞の調製物を用いて機能解析を行う。

【０１９２】

トランスジェニック動物を作成するためのいくつかの方法を用いることができる。１つの方法では、相同的組換えによりターゲティングベクターをＥＳ細胞に組み込ませ、染色体間の組換え現象を用いて選択可能なマーカーを排除し、そして導入遺伝子のみを残す（Ａ．Ｌ．Ｊｏｙｎｅｒ ｅｔ ａｌ．（１９８９）Ｎａｔｕｒｅ ３３８（６２１１）：１５３－６；Ｐ．Ｈａｓｔｙ ｅｔ ａｌ．（１９９１）Ｎａｔｕｒｅ ３５０（６３１５）：２４３－６；Ｖ．ＶａｌａｎｃｉｕｓおよびＯ．Ｓｍｉｔｈｉｅｓ，（１９９１）Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ Ｂｉｏｌ．１１（３）：１４０２－８；Ｓ．Ｆｉｅｒｉｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９３）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ９０（１８）：８４６９－７３）。別の方法では、２またはそれ以上の種を作出する；一方の種は相同的組換えによる遺伝子ノックアウトを含み、他方の１またはそれ以上の種は、導入遺伝子を含む。ノックアウト種をトランスジェニック種を掛け合わせて、元の野生型の対立遺伝子が導入遺伝子で置き換わった（同じ部位ではないが）新しい動物系列を作製する。とりわけ、ノックアウトおよびトランスジェニック動物は、商業的施設によって作製され得る（

例えばＬｅｒｎｅｒ Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ、Ｃレベルおよび、ＯＨ；Ｂ＆Ｋ Ｕｎｉｖｅｒｓａｌ、Ｉｎｃ．、Ｆｒｅｍｏｎｔ、ＣＡ；ＤＮＸ トランスジェニックＳｃｉｅｎｃｅｓ、Ｃｒａｎｂｕｒｙ、ＮＪ；Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ、Ｉｎｃ．、Ｓｔ． Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ）。

【０１９３】

ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３をコードする核酸分子を含むトランスジェニック動物（例えばマウス）は、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２またはＢＳＬ３の改変された発現の効果を調べるために ｉｎ ｖｉｖｏ モデルにおいて用いることができる。そのような動物は、例えば免疫系の障害、疾患または状態を処置するための化合物等の、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３の活性を阻害または調節するのに有効な化合物を見出すための薬物評価および発見の取り組みにおいても使用することができる。当業者は、標準的な技術を用いて、ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドを産生するトランスジェニック動物を作製し、薬物評価および発見のプロジェクトにおいてその動物を用いることができる（例えばＷａｇｎｅｒの米国特許第４，８７３，１９１号； Ｌｅｄｅｒの米国特許第４，７３６，８６６号）。

【０１９４】

本発明の別の態様では、トランスジェニック動物は、ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３をコードするヌクレオチド配列が組織特異的なプロモーターに作動可能なように連結しており、それによってコード配列がその特異的な組織においてのみ発現するような組換え発現ベクターを含むことができる。例えば、組織特異的プロモーターは、哺乳類細胞特異的プロモーターであり、発現した組換えタンパク質は動物の乳から回収される。

【０１９５】

本発明のさらに別の態様では、ａ ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３「ノックアウト」は、内因的なＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドを特異的に認識する動物の抗体（例えば中和抗体）を投与することによって作製することができる。抗体は、内因的なＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドの機能を破壊するように作用し、それによってｎｕｌｌ 表現型を生じ得る。１つの具体例では、マウスＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ ポリペプチドまたはペプチドを抗体の作製に用いることができる。そして、これらの抗体をマウスに投与して、対応するマウスのタンパク質の機能を破壊することができる。

【０１９６】

さらに、ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３、およびそれらの関連疾患を調べるために非哺乳類生物を用いることができる。例えば、Ｃ． ｅｌｅｇａｎｓ、Ｄ． ｍｅｌａｎｏｇａｓｔｅｒ、およびＳ． ｃｅｒｅｖｉｓｉａｅ等のモデル生物を用いることができる。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３ホモローグは、これらのモデル生物において同定することができ、突然変異または欠失させてＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、またはＢＳＬ３欠陥種を作製することができる。そして、ヒトＢＳＬ１、ＢＳＬ２、またはＢＳＬ３を、「相補的な」欠陥種に対する能力について試験することができる。ＢＳＬ１－、ＢＳＬ２－、またはＢＳＬ３－欠陥種は薬物スクリーニングのために使用することもできる。ＢＳＬ１、ＢＳＬ２またはＢＳＬ３ホモローグは、ヒト遺伝子に対応する生物学的機能を理解する助けになり、結合するタンパク質（例えばアゴニストおよびアンタゴニスト）の同定する助けとなる。

【０１９７】

実施例

本明細書に記載する実施例は本発明の様々な態様の説明を意味するものであって、本発明の限定を何ら意図するものではない。

【０１９８】

実施例１：ＢＳＬ１の同定

単球の調製：エルトリエーションによりヒト単球を末梢血単核球細胞から得た。エルトリエーション緩衝液は、１ＬのＲＰＭＩ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ／Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏ

ｇｉｅｓ Ｉｎｃ．、Ｒｏｃｋｖｉｌｌｅ、ＭＤ；Ｃａｔ． ＃１１８７５－０８５）と２．５ｍＭ ＥＤＴＡおよび１０μｇ／ｍＬポリミキシンＢを含む。この緩衝液をエルトリエーション操作の前日に調製し、室温で保存した。エルトリエーション操作のために、２２５ｍＬのＥＤＴＡ 全血／ドナーを採取し調製した。２０ミリリットルのエルトリエーション緩衝液 を１２本の５０ｍＬ遠心チューブに加え、２２５ｍＬの血液をチューブに等分した。１２ミリリットルのｆｉｃｏｌｌ 溶液（白血球分離媒体）を用いて各チューブ内の混合物の下に敷いた（ＡｃｃｕＰｒｅｐ Ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅｓ、Ａｃｃｕｒａｔｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ Ｃｏ．；Ｃａｔ． ＃１０５３９８０）。遠心チューブを１８００ｒｐｍで２５分間遠心した。

【０１９９】

ヒツジ赤血球細胞を以下の手順で調製した。１２ミリリットルのヒツジ Ｂｌｏｏｄ Ａｌｓｅｖｅｒ’ｓ（ＳＲＢＣ；Ｃｏｌｏｒａｄｏ 血清 Ｃｏ．、Ｄｅｎｖｅｒ、ＣＯ；Ｃａｔ． ＃ＣＳ１１１２）を再懸濁し、２０００ｒｐｍで１０分間遠心した。ＳＲＢＣペレットの上部の被膜を除きペレットをエルトリエーション緩衝液で２回洗浄した。それぞれの洗浄の後に、ペレットを２２００ｒｐｍで８分間遠心した。２回目の洗浄の後で、ペレットを５ｍＬのエルトリエーション緩衝液に再懸濁して冷蔵した。

【０２００】

遠心の後、ｆｉｃｏｌｌ下層チューブの上清を吸引して約５ｍＬの界面層を残した。次いで、界面層を、各チューブの赤血球細胞をかき乱さないよう注意深く新しいチューブへ取り出した。２本の５０ｍＬチューブの界面層を混合し、新しい５０ｍＬチューブへ移し、合計６本の５０ｍＬチューブを得た。エルトリエーション緩衝液を各チューブに加えて最終体積を各チューブあたり５０ｍＬとした。チューブを１８００ｒｐｍで１０分間遠心し、上清を除いた。各ドナーから得た末梢血単核球を合わせて２つのチューブに分け、およびチューブあたり４０ｍＬのエルトリエーション緩衝液に再懸濁した。チューブ１５００ｒｐｍで１０分間遠心し、上清を吸引してペレットを、チューブあたり３０ｍＬのエルトリエーション緩衝液に再懸濁した。

【０２０１】

この工程の後、３ｍＬの洗浄したＳＲＢＣを各チューブに加え、混合物を１０００ｒｐｍで５分間遠心した。ペレットを氷上で少なくとも１時間インキュベーションし、チューブを逆さにすることにより、各ペレットをしずかに再懸濁した。１２ミリリットルのｆｉｃｏｌｌを用いて混合物を各チューブの下層に沈めた。チューブを２５００ｒｐｍで２０分間遠心し、界面層を前記のとおり新しいチューブに取り出した。界面層を１０ｍＬエルトリエーション緩衝液に懸濁し、エルトリエーション操作の開始まで氷上で保存した。

【０２０２】

単球のエルトリエーション：エルトリエーションは以下の通りに行った。エルトリエーションポンプスピードを約６５ｍＬ／分にセットし、および保存用エタノールを供給ラインから除去した。供給ライン、チャンバー、およびローターを約１００ｍＬの蒸留水で洗浄した。ポンプスピードを５０ｍＬ／分に減速し、エルトリエーション緩衝液を供給ライン、チャンバー、およびローターを通じて通した。供給ラインに気泡がないかチェックし、気泡があれば取り除いた。次いで、遠心スピードを１９５０±１ｒｐｍにセットし、およびポンプ１５ｍＬ／分に修正した。次いで、ポンプスピード１１ｍＬ／分に減速し、チャンバーの栓を閉じた。

【０２０３】

細胞を加えるため、導入シリンジの栓を閉じ、排出口ピペットを、１１ｍＬ／分画分のラベルを付した５０ｍＬサンプルチューブ内へ入れた。細胞を混合して導入シリンジへ加えた。導入しリンジの栓を開き、導入チューブを１０ｍＬエルトリエーション緩衝液でリンスした。５ ｍｌ細胞がシリンジ内に残ったら、エルトリエーション緩衝液を加えてこの工程をもう一回繰り返した。この工程の後、導入シリンジの栓を閉じおよびチャンバーの栓を開いた。

【０２０４】

１１（２画分）、１４、１６、および３６（２画分）ｍＬ／分のポンプスピードで５０ミリリットルの画分を集め、氷上に置いた。これまでの観察に基づけば、単球は、３６ｍＬ／分の画分に存在すると予想される。単球画分を１８００ｒｐｍで８分間遠心し、細胞を、１μｇ／ｍＬポリミキシンＢを添加した１０ｍＬの２５％ウシ胎児血清／ＲＰＭＩに再懸濁した。細胞を計数し、使用するまで氷上で保存した。

【０２０５】

細胞培養条件：単離した末梢血単核球を、ペニシリン／ストレプトマイシン、２ｍＭグルタミン、１％ 非必須アミノ酸、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、およびＩＬ－４（７５ ｎｇ／ｍＬ）およびＧＭ－ＣＳＦ（１５ ｎｇ／ｍＬ）サイトカイン（それぞれＧｉｂｃｏ ＢＲＬより入手）を懸濁した１０％ウシ胎仔血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ、Ｌｏｇａｎ、ＵＴ）を含むＲＰＭＩ １６４０培地に再懸濁した。細胞懸濁液（５×１０^{5} 細胞／ｍＬ）を組織培養フラスコに移し、３７℃で５％CO_2 を含むチャンバー内で７日間インキュベーションした。インキュベーション期間の後、培養細胞を激しくピペッティングして細胞をフラスコから取り出す。ヒト単球性細胞系 ＴＨＰ１を３７℃および５％CO_2 にて、ペニシリン／ストレプトマイシンおよび２ｍＭグルタミンを添加したう１０％ウシ胎児血清を含むＲＰＭＩ １６４０培地中で最終濃度５×１０^{5} 細胞／ｍＬまで培養した。

【０２０６】

ポリ（Ａ）＋ＲＮＡ単離：ＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４分化ヒト末梢血単核球細胞（２×１０８細胞）およびＴＨＰ１ ヒト単球（２×１０８細胞）を４℃にて、ＰＢＳ（Ｇｉｂｃｏ ＢＲＬ）で２回洗浄した。ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをＦａｓｔ Ｔｒａｃｋ ２．０キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｃｏｒｐ．、Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）を用いて直接単離した。

【０２０７】

サブトラクションライブラリー構築：ｃＤＮＡサブトラクションライブラリーは、ＣＬＯＮＴＥＣＨ ＰＣＲ－Ｓｅｌｅｃｔ（登録商標）ｃＤＮＡサブトラクションキット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ、Ｐａｌｏ Ａｌｔｏ、ＣＡ）を用いて作製した。製造者のプロトコルに従い、２．０μｇのＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４分化ヒト末梢血単球 ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをテスターサンプルとして、２．０μｇの休止ＴＨＰ１ 単球 ポリ（Ａ）＋ＲＮＡをドライバーサンプルとして用いた。１０回のセカンダリＰＣＲを一緒にして１．２％アガロースゲル上で行った。約０．３ ｋｂ～１．５ ｋｂの断片をＱＩＡＧＥＮゲル抽出キット（ＱＩＡＧＥＮ、Ｖａｌｅｎｃｉａ、ＣＡ）を用いてゲル精製し、ＴＡ クローニングベクター、ｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へ挿入した。ＴＯＰ１０Ｆ’コンピテントＥ．ｃｏｌｉ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をトランスフェクトして、５０ μｇ／ｍＬアンピシリンを含有するＬａｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）プレートに蒔いた。約３００個のクローンを単離して、同様の濃度のアンピシリンを含有するＬＢ培養液中で培養した。ＱＩＡＧＥＮ ミニプレップスピン（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてプラスミドを単離し、ＡＢＩサイクルシクエンサー（ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ、ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて配列を解析した。

【０２０８】

完全長クローニング：ＢＳＬ１の５’および３’末端をクローニングするために、ＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ末端の迅速増幅）ｃＤＮＡ増幅キット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を製造者の指示にしたがって用いた。５’および３’ＲＡＣＥ ライブラリーを、ＴＮＦ－αで１時間処理したヒト微小血管 内皮細胞から得た１．０μｇのポリ（Ａ）＋ＲＮＡテンプレートを用いて構築した。５’－ＲＡＣＥ－ＰＣＲ混合物は、合計２５μＬ中に、１．５μＬの５’－ＲＡＣＥ レディｃＤＮＡ、０．４μＭＪＮＦ １５５ プライマー（５’－ＧＧＣＡＴＡＡＴＡＡＧＡＴＧＧＣＴＣＣＣ－３’）（配列番号２１）、１×ユニバーサルプライマーミックス（ＵＰＭ）、２００、μＭｄＮＴＰ、１×Ａｄｖａｎｔａｑ Ｐｌｕｓ ＰＣＲ 緩衝液（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）、および１×Ａｄｖａｎｔａｑ Ｐｌｕｓ ポリメラーゼ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を含有した。３’－ＲＡＣＥ－ＰＣＲ 混合物は、同じ緩衝条件、３’－ＲＡＣＥ レディｃＤＮＡ、および０．４ μＭ ＪＮＦ １５４ プライマー（５’－ＣＡＴＧＡＡＣＴＧＡＣＡＴＧＴＣＡＧＧＣ－３’）（配列番号 ：２２

）を含有した。両反応物を伝統的なタッチダウンＰＣＲ法を用いてインキュベーションした：９４℃にて３０秒間、６５℃にて３０秒間、および７２℃にて３分間のインキュベーション５サイクル； ９４℃にて３０秒間、６３℃にて３０秒間、および７２℃にて３分間のインキュベーション５サイクル；および９４℃にて３０秒間、６２℃にて３０秒間、および７２℃にて３分間のインキュベーション１５サイクル。

【０２０９】

ＰＣＲ産物を２．０％ アガロースゲルを用いる電気泳動によって単離し、ＤＮＡを臭化エチジウム染色により可視化した。５’－ＲＡＣＥ反応物の８８８－ｂｐ断片および３’－ＲＡＣＥ反応物の１，１１０－ｂｐ断片をＱＩＡＧＥＮゲル抽出キットを用いて精製し、１０μＬの蒸留水に再懸濁した。６μＬの各断片をｐＣＲ２．１－ＴＡ クローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）にライゲーションし、ライゲーション混合物を用いてＴＯＰ１０Ｆ’ウルトラコンピテント Ｅ．ｃｏｌｉ細胞（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をトランスフェクトした。トランスフェクトした細胞を５０μｇ／ｍＬアンピシリン、４０ｍｇ／ｍＬＸ－ｇａｌ、および１００ｍＭＩＰＴＧを添加したＬＢプレートに蒔いた。コロニーを単離し、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを添加した４ｍＬのＬＢ倍溶液中で３７℃にて一晩培養した。プラスミドをＱＩＡＧＥＮ ミニプレップスピンキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて単離し、３０μＬの蒸留水に再懸濁し、ＡＢＩサイクルシークエンサー（ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ、ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて配列を解析した。

【０２１０】

完全長クローンを作製するために、ＪＮＦ１５５ＲＡＣＥ５．１、ＪＮＦ１５４ＲＡＣＥ３．２、およびｐＣＲ２．１を共にライゲーションした。ＪＮＦ１５５ＲＡＣＥ５．１をＸｈｏＩおよびＨｉｎｄｌｌｌで二重に消化した。ＪＮＦ１５４ＲＡＣＥ３．２ ＨｉｎｄｌｉｌおよびＥｃｏＲｌで二重に消化した。ＴＡ クローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）をＸｈｏＩおよびＥｃｏＲｌで消化した。各断片をＱＩＡＧＥＮゲル抽出キットで精製し水に再懸濁した。１μＬの各消化断片をＴ４ ＤＮＡリガーゼを用いる同じ反応で共にライゲーションした。 ライゲーション混合物を用いてＴＯＰ１０Ｆ’Ｅ．ｃｏｌｉ ウルトラコンピテント細胞をトランスフェクトし、５０μｇ／ｍＬアンピシリン、４０ ｍｇ／ｍＬＸ－ｇａｌ、および１００ｍＭＩＰＴＧを含むＬＢプレートに蒔いた。コロニープレートから単離し、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢ培養液中で３７℃にて培養した。完全長ＢＳＬ１を含むプラスミドをＱＩＡＧＥＮ ミニプレップスピンキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて精製し、配列を解析した（ＡＢＩサイクルシークエンサー；ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。完全長ＢＳＬ１ 配列（ｐＴＡＤＶ：ＢＳＬ１）をコードするＤＮＡを有するプラスミドは、２０００年６月６日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ ２０１１０２２０９ ＵＳＡ）にＡＴＣＣ 受託番号ＰＴＡ－１９８９として寄託された。

【０２１１】

実施例２：ＢＳＬ１のキャラクタリゼーション

ＢＳＬ１クローンの配列解析：完全長ＢＳＬ１ ヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列は、ＴＮＦ－α処理したヒト微小血管 内皮細胞 ｃＤＮＡ サブトラクションライブラリーから単離されたクローン（図１Ａおよび１Ｂ）およびＧＭ ＣＳＦ／ＩＬ－４分化ヒト単球 ｃＤＮＡライブラリーから単離したクローンから決定した（図１Ｃ）。ＢＳＬ１クローンのためのシークエンシングプライマーを表１に示す。

【０２１２】

表１

プライマー	配列	配列番号
JNF 292 フォワード	CATTTACAAAGAGAGGTCGG	23
JNF 298 リバース	AGGGTTATTTTAAGTACCGACC	24
JNF 293 フォワード	GGAAATGTATGTTAAAAGCACG	25
JNF 297 リバース	GGCATGGATCCTCAGCCCTGGG	26
JNF 294 フォワード	GAGACCCATGGGCTCTCCAGGG	27
JNF 296 リバース	GTTCAAGCACAACGAATGAGGC	28
JNF 295 フォワード	TGGCTTTGCCACATGTCAAGGC	29

【０２１３】

両ＢＳＬ１クローンは同一のコード配列を有していたが、分化ヒト単球 ｃＤＮＡライブラリーから得たクローンは、ＢＳＬ１遺伝子の３’非翻訳領域に異なる開裂を含んでいた（図２Ｂ；太字参照）。ＢＳＬ１のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図１Ａ－１Ｃに示す。

【０２１４】

ＢＳＬ１をコードするＥＳＴクローンは、公的なデータベース（ＧｅｎＢａｎｋ）および し民営のデータベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）から同定し、表２に示す。

表２

ｸﾛｰﾝID	ﾃﾞｰﾀﾍﾞｰｽ	組織	長さ (bp)	位置 (1-3797)
Al733919	GenBank	卵巣腫瘍	429	401-829
AA292201	GenBank	卵巣腫瘍	430	401-830
AA399416	GenBank	卵巣腫瘍	325	506-830
3166966H1	Incyte	$CD4^+$ T ﾘﾝﾊﾟ球 t/CD3、CD28 Ab's	197	415-611
4415633H1	Incyte	末梢血単核球、t/抗IL-10、LPS 253	542-794	
AA368815	GenBank	胎盤、胎児	55	998-1052
5611256H1	Incyte	末梢血単核球、t/抗IL-10、LPS、SUB	254	1005-1258
5048659F6	Incyte	胎盤、胎児	332	1016-1347
3680369H1	incyte	肺、aw/喘息	240	1203-1442
AI202916	GenBank	生殖細胞腫瘍、ﾌﾟｰﾙ、SUB	259	1381-1639
AA373164	GenBank	肺線維芽細胞系、HSC172、胎児	274	1416-1689
4354914H1	Incyte	肥満、睾丸、aw/乳腺腫	288	1449-1736
AA037078	GenBank	線維芽細胞、老人	365	1529-1893
171033R6	Incyte	骨髄	273	1785-2057
R30906/ R30861*	GenBank	胎盤、新生児	1932	1867-3798

＊完全長配列は示さず。

【０２１５】

ＢＳＬ１ コード配列および推定アミノ酸配列は、Ｂ７－Ｈ１およびＰＤ－Ｌ１としても同定されている（Ｈ．Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．５：１３６５－９；ＧｅｎＰｅｐｔ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＮＰ０５４８６２；Ｇ．Ｊ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１０２７－１０３４）。さらに、Ｂ７－Ｈ１のマウスのホモローグが同定されている（Ｈ．Ｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｂｌｏｏｄ ９７：１８０９－１８１６）。とりわけ、マウスおよびヒトＢ７－Ｈ１因しは共刺激分子として記載されており（Ｈ．Ｄｏｎｇ ｅｔ ａｌ．（１９９９）Ｎａｔｕｒｅ Ｍｅｄ．５：１３６５－９；Ｈ．Ｔａｍｕｒａ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｂｌｏｏｄ ９７：１８０９－１８１６）、ＰＤ－Ｌ１は、Ｔ細胞増殖のインヒビターとして記載されている（Ｇ．Ｊ．Ｆｒｅｅｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２０００）Ｊ．Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１９２：１０２７－１０３４）。

【０２１６】

染色体マッピング：ＢＳＬ１は、放射線ハイブリッドマッピングを用いてこれまでにマッピングされている（Ｔ．　Ｉｓｈｉｄａ　ｅｔ　ａｌ．（１９９９）ＣｙｔｏＧｅｎｅｔ．Ｃｅｌｌ　Ｇｅｎｅｔ．　８５：２３２－６）。ＧｅｎＢａｎｋ　ＥＳＴ　ＡＡ３９９４１６を用いたＮＣＢＩ’ｓ　Ｇｅｎｅｍａｐ’９９の解析は、ＢＳＬ１遺伝子がＡＦＭ２７４ｘｅ１－ｓｔＳＧ４６３８９（ＢＳＬ１）－ＡＦＭ２４２ｘｈ６の順序で染色体９ｐ２４に連結していることを示した。

【０２１７】

ＢＳＬ１発現解析：休止末梢血Ｔ細胞、抗ＣＤ３／抗ＣＤ２８抗体で刺激された末梢血Ｔ細胞、ホルボール１２　ミリステート　１３アセテート（ＰＭＡ）で刺激された末梢血Ｔ細胞、フィトヘマグルチニン（ＰＨＡ）で刺激された末梢血Ｔ細胞、休止ＴＨＰ１　単球、リポ多糖（ＬＰＳ）で刺激されたＴＨＰ１、休止末梢血単核球、ＰＨＡで刺激された休止末梢血単核球、ＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４で刺激された休止末梢血単核球、ＲＡＪ　Ｂ細胞、ＲＡＭＯＳ　Ｂ細胞、休止ヒト微小血管内皮細胞（ＨＭＶＥＣ）、ＴＮＦ－αで刺激されたＨＭＶＥＣ、および血清飢餓Ｈ２９２　ヒト肺　上皮細胞を含む、いくつかのタイプの細胞のノーザンブロット解析によりＢＳＬ１発現パターンを決定した。

【０２１８】

細胞培養条件：末梢血Ｔ細胞は、１０％ヒト血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中で３７℃、５％CO_2にて４８時間培養した。抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体で刺激した末梢血Ｔ細胞を、１０％　ヒト血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０中、１μｇ／ｍＬ抗ＣＤ３モノクローナル抗体（Ｐ．Ｓ．Ｌｉｎｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ａｎｎ．Ｒｅｖ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１：１９１－２１２）および１μｇ／ｍＬ抗ＣＤ２８モノクローナル抗体（Ｌｉｎｓｌｅｙ　ｅｔ　ａｌ．前掲）の存在下で３７℃、５％CO_2にて２４～７２時間培養した。ＰＭＡおよびイノマイシンで刺激した末梢血Ｔ細胞を１０％ヒト血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中、１μｍ　イノマイシンを添加した３０　ｎｇ／ｍＬＰＭＡの存在下で３７℃、５％CO_2にて４８時間培養した。ＰＨＡで刺激した末梢血Ｔ細胞を、３μｇ／ｍＬＰＨＡの存在下で１０％ヒト血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中で３７℃、５％CO_2にて４８時間培養した。不死化ヒト単球性細胞系から得たＴＨＰ１細胞を、１０％ウシ胎仔血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中、３７℃、５％CO_2にて、１００ｎｇ／ｍＬＬＰＳ有りまたは無しで２時間培養した。末梢血単核球を、テフロンプレートにて、２５％ウシ胎仔血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中、３７℃、５％CO_2で、１μｇ／ｍＬＰＨＡまたは１５　ｎｇ／ｍＬＧＭ－ＣＳＦ＋７５　ｎｇ／ｍＬＩＬ－４有りまたは無しで、７日間培養した。不死化ヒトＢ細胞系から得たＲＡＪＩおよびＲＡＭＯＳ細胞は、１０％ウシ胎仔血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中、３７℃、５％CO_2にて培養した。ＨＭＶＥＣは、１０％ウシ胎仔血清を添加したＤＭＥＭ中、３７℃、５％CO_2にて、１０　ｎｇ／ｍＬＴＮＦα有りまたは無しで１～２４時間培養した。不死化ヒト肺上皮細胞系から得たＨ２９２細胞は、１０％ウシ胎仔血清を添加したＲＰＭＩ　１６４０（Ｈｙｃｌｏｎｅ）中、３７℃、５％CO_2にて培養したのち、血清不含培地中で１６時間培養して回収した。

【０２１９】

ノーザンブロット解析　：ノーザンブロット解析のために、各細胞タイプから得た０．５μｇの全ポリ（Ａ）＋ＲＮＡを３％　ホルムアルデヒドを含む１．２％アガロースゲルにて分離し、２０×ＳＳＣを移動緩衝液として用いてＨｙｂｏｎｄ－Ｎ＋　ナイロンメンブレン（Ａｍｅｒｓｈａｍ）に一晩移動させたした。

【０２２０】

ついでこのメンブレンを自己架橋させ、４×ＳＳＰＥで洗浄し、風乾した。次いでメンブレンを６５℃にてＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ　溶液（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）中、１時間プレハイブリダイゼーションした後、［^{32}Ｐ］　ｄＣＴＰ－放射性同位元素で標識した（ＮＥＮ、Ｂｏｓｔｏｎ、ＭＡ）ランダムプライムドＢＳＬ１　ｃＤＮＡプローブとハイブリダイズさせた。プローブを６６６ｂｐのＢＳＬ１　ＨｉｎｄｌｌｌＰｓｔｌ断片（図６Ａ）

から得、これをＮｕｃＴｒａｐ精製カラム（Ｓｔｒａｔａｇｅｎｅ）を用いて精製し、放射性同位元素で標識して比活性を２．０×１０６ ｃｐｍ／ｍＬとした。ハイブリダイゼーションの後、メンブレンを０．０５％ ＳＤＳを添加した６５℃の２．０×ＳＳＣで洗浄し、－７０℃で７２時間フィルムに露光した。

【０２２１】

３．８ ｋｂのＢＳＬ１ ｍＲＮＡ転写物をいくつかのタイプの細胞において検出した。特に、ＰＨＡで刺激された末梢血単核球およびＴＮＦαで刺激したＨＭＶＥＣにおいて高レベルのＢＳＬ１ｍＲＮＡが検出された（図７Ｄ）。中程度のレベルのＢＳＬ１ｍＲＮＡは、抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８モノクローナル抗体で７２時間刺激した末梢血Ｔ細胞において検出された（図７Ｄ）． 中程度のレベルのＢＳＬ１ｍＲＮＡは、ＬＰＳで刺激したＴＨＰ１細胞においても観察された（図７Ｄ）。しかしながら、ＢＳＬ１ｍＲＮＡは休止ＴＨＰ１細胞、休止ＢＪＡＢ細胞、ＬＰＳ－活性化 ＢＪＡＢ細胞、休止末梢血Ｔ細胞、ＰＢＴ活性化末梢血Ｔ細胞、またはＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４－活性化末梢血単核球においては検出されなかった（図７Ｄ）。さらに、ＢＳＬ１ｍＲＮＡは、休止ＲＡＪＩ細胞、休止ＲＡＭＯＳ細胞、または血清飢餓Ｈ２９２細胞においては検出されなかった（図７Ｄ）。

【０２２２】

ＢＳＬ１－Ｉｇ融合構築物：ＢＳＬ１推定細胞外ドメイン（ＥＣＤ；アミノ酸２３－２９０）に対応するＤＮＡ断片は、完全長ＢＳＬ１－ｐＣＲ２．１およびＢＳＬ１ ＥＣＤの５’および ３’末端にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマー：ＪＮＦ １８４ フォワードプライマー５’－ＴＣＡＧＧＴＡＣＴＡＧＴＧＴＴＣＣＣＡＡＧＧＡＣＣＴＡＴＡＴＧＴＧＧ－３’）（配列番号３０）；およびＪＮＦ １８５ リバース プライマー（５’－ＧＡＴＴＣＧＡＧＡＴＣＴＣＣＴＣＧＡＧＴＣＣＴＴＴＣＡＴＴＴＧＧＡＧＧＡＴＧＴＧＣＣ－３’（配列番号３１）をテンプレートとして用いてＰＣＲにより増幅した。ＰＣＲは、合計５０μＬ中の約１００ ｎｇのテンプレート ＤＮＡ、０．４μＭの各プライマー、２００μＭ ＤＮＴＰ、１×Ａｄｖａｎｔａｇｅ ２ ＰＣＲ 緩衝液、および１×Ａｄｖａｎｔａｇｅ ２ ポリメラーゼ（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を用いて行った。ＰＣＲ混合物 を９４℃にて３０秒間、６２℃にて３０秒間、および７２℃にて１分間インキュベーションし、これを３０サイクル繰り返した。ＰＣＲ産物を１．２％ アガロースゲル上でゲル電気泳動により分離し、ＤＮＡを臭化エチジウム染色により可視化した。ＢＳＬ１ ＥＣＤに対応する６８０－ｂｐ断片を、ＱＩＡＧＥＮゲル抽出キット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いてアガロースゲルから精製し３２μＬの蒸留水に再懸濁した。

【０２２３】

次いで、ＢＳＬ１ ＥＣＤ断片をＳｐｅｌおよびＢｇｌｌｌ制限エンドヌクレアーゼを用いて消化し、５ Ｕ／μＬＴ４ ＤＮＡリガーゼ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）を用いて、ＳｐｅｌＢａｍＨｌ消化したＰＤ１９ベクターに一方向にクローニングした。ライゲーション混合物を用いてＤＨ５αコンピテントＥ ｃｏｌｉ細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）をトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬａｕｒｉａ－Ｂｅｒｔａｎｉ（ＬＢ）プレートに蒔いた。プレート３７℃で一晩インキュベーションし、およびコロニー単離し、５０μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢ培養液中３７℃で一晩培養した。プラスミドをＱＩＡＧＥＮ ミニプレップスピンキットを用いて単離し、５０μＬの蒸留水にに再懸濁し、ＡＢＩサイクルシークエンサー（ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ、Ｆｏｓｔｅｒ Ｃｉｔｙ、ＣＡ）を用いて配列を解析した。プライマー配列は以下のとおりであった：センス ＪＮＦ １８４（５’－ＴＣＡＧＧＴＡＣＴＡＧＴＧＴＴＣＣＣＡＡＧＧＡＣＣＡＴＡＴＧＴＧＧ－３’）（配列番号３２）および アンチセンス ＪＮＦ １８５（５’－ＧＡＴＴＣＧＡＧＡＴＣＴＣＣＴＣＧＡＧＴＣＴＴＴＣＡＴＴＧＧＧＧＡＴＧＴＧＣＣ－３’）（配列番号３３）。

【０２２４】

ＢＳＬ１－Ｉｇ（ｐＤ１９ ：ＢＳＬ１ｌｇ）をコードするＤＮＡを有するプラスミドは、２０００年6月6日に、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、

ＶＡ ２０１１０－２２０９ ＵＳＡ）にＡＴＣＣ 受託番号 ＰＴＡ－１９９２として寄託された。ＢＳＬ１－Ｉｇのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図２Ａおよび２Ｂに示す。

【０２２５】

ＢＳＬ１モノクローナル抗体：ＢＳＬ１－Ｉｇ融合タンパク質は、以下、ＢＳＬ３－Ｉｇについて記載するように、アフィニティー精製カラムにより精製した。次いで、精製した融合タンパク質をＢＳＬ３－Ｉｇについて記載したプロトコルを用いてマウスの免疫に使用した。この後、ハイブリドーマ細胞系を構築しＢＳＬ１モノクローナル抗体（ＭＡｂｓ）を、以下ＢＳＬ３について記載したとおり単離した。さらに、ＢＳＬ１ ＭＡｂｓを全細胞ＥＬＩＳＡにより特異性についてスクリーニングした。全細胞ＥＬＩＳＡのために、ＣＯＳ細胞を完全長ＢＳＬ１（Ｌ１５６－３）で一過性トランスフェクションした。細胞をトランスフェクションから４日後にヴェルセンで取り上げた。細胞をＰＢＳで２回洗浄し、１０％ ＦＢＳを添加したＰＢＳに５．０×10^6 細胞／ｍＬの濃度で再懸濁した。次いで、５０μＬの細胞を加え、Ｆａｌｃｏｎ ３９１１ ９６－ウェルプレートの各ウェルに加え、氷上で３０分間インキュベーションした。次いで、推定されるＢＳＬ１ハイブリドーマから得られた上清をウェル毎に加え、氷上で３０分間インキュベーションした。細胞をＰＢＳ中で２回洗浄した。次いで、細胞を、ＰＢＳ中１：１０００に希釈したヤギ抗マウス ＨＲＰ－コンジュゲート二次抗体（Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｃａｔ． ＃ＮＡ９３１０）に再懸濁した。細胞を氷上で３０分間インキュベーションし、ＰＢＳで２回洗浄し、１２５μＬのＰＢＳに再懸濁した。その後、、細胞を新しいプレートに移した。細胞をＰＢＳ中で洗浄し、２５μＬのＰＢＳ２懸濁した．次に、１２５μＬのペルオキシダーゼ溶液 Ｂ（ＫＰＬ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ；Ｃａｔ． ＃５０－６５－００）とＴＭＢ ペルオキシダーゼ基質（ＫＰＬ Ｃａｔ． ＃５０－７６－０１）を加えた。発色させた。細胞をペレット化し、および１００μＬの上清をＩｍｍｕｌｏｎ ２プレートに移した。１００μＬの１Ｎ硫酸でクエンチし、プレートをOD_{450}／OD_{630}で読み取った。

【０２２６】

実施例３：ＢＳＬ２の同定

データベース検索：ＢＳＬ２は、Ｂ７－１またはＢ７－２ アミノ酸配列を照会配列として用いて、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ配列データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）のＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡ解析によって同定した。ＢＬＡＳＴ 解析いついては、ＢＬＯＳＳＵＭ－６２ スクアリングマトリックスを用い（Ｓ． Ｈｅｎｉｋｏｆｆ ｅｔ ａｌ．（１９９２）Ｐｒｏｃ Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ８９：１０９１５－１０９１９）、残りのパラメーターはデフォルトの設定にした。ＦＡＳＴＡ解析については、すべてのパラメーターをデフォルトの設定にした（Ｗ． Ｒ． Ｐｅａｒｓｏｎ ｅｔ ａｌ．（１９８８）Ｐｒｏｃ． Ｎａｔｌ． Ａｃａｄ． Ｓｃｉ． ＵＳＡ ８５：２４４４－２４４８）。配列データベース検索によって2つの Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ’テンプレート’：２５２８９９．６と可能性のあるスプライス変異体２５２８９９．８（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ テンプレートはｍＲＮＡ転写物を示すと考えられるコンセンサス ＥＳＴ 配列である）が同定された。

【０２２７】

ＢＳＬ２ クローンの配列解析：Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ テンプレート ２５２８９９．８を用いてＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１を同定した。Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１は、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ライブラリー ＩＤ Ｎｏ． ＢＲＡＹＤＩＴ０１に属し、もとは病気の視床下部組織に由来するポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用いて構築された。Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１をＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓから入手し、表３に示すプライマーを用いて配列解析（ＡＢＩサイクルシークエンサー、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）に用いた。

表３

クローン	プライマー	配列	配列番号
4616811	392. 423	GGTGCACAGCTTTGCTGA	34
4616811	392. 415	GCTGTGCACCAGCTGTTT	35
4616811	392. 439	GCTATGAAAGGTCCAGAG	36
4616811	392. 499	GAATCTGGTGGTGTCCAA	37
4616811	392. 1716	CTCTGTCACCATCACAGG	38
4616811	392. 852	CTCTGTCACCATCACACC	39
4616811	392. 523	GAAATCCCGGATGCTCAC	40
4616811	392. 766A	ACCACACGTGTTCCAGCA	41
4616811	392. 766B	TGCTGGAACACGTGTGGT	42
4616811	392. 383	GGCCCTCAGCAAAGCTGT	43
4616811	392. 1448	AGCTGTAGGTGCCATTCG	44
4616811	392. 892	AGGGACCTGGACCTCCAC	45
4616811	392. 1528	TGGGGGGAATGTCATAGG	46
4616811	392. 1215	AGCAGGCAGGATGACTTA	47
46168111	392. 1242	AACAGACCACCCACAACC	48
6487516	314. 570	GCAAATGGCACCTACAGC	49
6487516	314. 634	TCTGGGGTGTGATGGTGA	50
6487516	314. 450	ATGAAAGGTCCAGAGGGC	51
6487516	314. 584	ACCCATAATTCTTACCCA	52
6487516	314. 824	CACAGCTCTGTTTGATCT	53
6487516	314.644	CTCCTACCCTCTGGCTGC	54

【０２２８】
とりわけ、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１の推定アミノ酸配列は、２セットのＶ／Ｃ（可変／定常ドメイン）折り畳みを含んでいたが、典型的なＢ７関連アミノ酸配列は、Ｖ／Ｃ 折り畳みを１つのみ含む。Ｓｅｑｗｅｂ Ｇａｐ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔａｅｒ Ｇｒｏｕｐ）解析は、ＢＳＬ２－４６１６８１１は、Ｂ７－１、Ｂ７－２、ＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１ ヌクレオチド配列と５０％未満の配列同一性を共有したが、ＢＳＬ２－４６１６８１１アミノ酸は、Ｂ７－１、Ｂ７－２、およびＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１アミノ酸配列と３５％未満の配列同一性を共有していた。ＢＳＬ２－４６１６８１１に類似の配列が、Ｇ．Ｗ．Ｂｅｃｋｅｒ ｅｔ ａｌ．の国際特許出願ＷＯ ００／６８２６６においてアミロイド前駆体プロテアーゼとして同定さている。
【０２２９】
Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１（ＢＳＬ２－４６１６８１１）のヌクレオチドおよび推定アミノ酸 配列を図３Ａおよび３Ｂにしめす。ＢＳＬ２－４６１６８１１をコードするＤＮＡを有するプラスミド（ｐＩＮＣＹ ：ＢＳＬ２－４６１６８１１）は、２０００年6月6日に、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ ２０１１０－２２０９ ＵＳＡ）に、ＡＴＣＣ 受託番号ＰＴＡ－１９９３として寄託された。
【０２３０】
完全長クローニング ： Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ クローン４６１６８１１の配列を確認するために、ＰＣＲ プライマーを設計して、クローンの推定翻訳開始コドンから推定翻訳終止コドンまでのヌクレオチド配列を増幅した：フォワードプライマーＢＳＬ２－７（５’ ＡＴＧＣＴＧＣＧＴＣＧＧＣＧ－３’）（配列番号５５）；リバースプライマーＢＳＬ２－８（５’－ ＴＣＡＧＧＣＴＡＴＴＴＣＴＴＧＴＣＣＡＴＣＡＴＣ－３’）（配列番号５６）。
【０２３１】
ＨＭＶＥＣ ライブラリーは、ＲＡＣＥ反応テンプレートとして、ＴＮＦ－αで１時間処

理したヒト微小血管内皮細胞から得たポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用い、説明書にしたがってＳＭＡＲＴ ＲＡＣＥ ｃＤＮＡ増幅キット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を用いて構築した。ＰＣＲ混合物は、１μＬのＰＣＲ－レディＨＭＶＥＣ ライブラリー、５ μＬのＰＣＲ 緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、１．５μＬの５０ｍＭＭｇＣＩ$_2$、１μＬの１０ｍＭｄＮＴＰｓ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ／Ｒｏｃｈｅ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｃａｌｓ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）、２５ ｐＭｏｌのＢＳＬ２－７ プライマー、２５ ｐＭｏｌのＢＳＬ２－８ プライマー、および１μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ Ｅｎｚｙｍｅミックスを全量５０μＬに含有した。ＰＣＲは、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ Ｔｈｅｒｍａｌ Ｃｙｃｌｅｒ ９７００型で行った。ＰＣＲ 混合物を９４℃にて１分間インキュベーションした後、９４℃にて３０秒間、６０℃にて３０秒間、および７２℃にて４５秒間のインキュベーションを３５サイクル、次いで７２℃にて１０分間のインキュベーションを行った。

【０２３２】

１μＬのＰＣＲ混合物を説明書にしたがってｐＣＲ２．１（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）に直接ライゲーションした。ライゲーション混合物の半分を、説明書にしたがって、Ｍａｘ－Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αＥ ｃｏｌｉ細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）のトランスフェクションに使用した。トランスフェクションされた細胞を、１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび３０ ｐｇ／ｍＬＸ－ｇａｌ を添加したＬＢ寒天プレートに蒔き。３７℃で一晩培養した。白色のコロニーを単離し、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液中で３７℃で培養した。

【０２３３】

プラスミドＤＮＡは、Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用い、説明書にしたがって、培養した細菌から単離した。ＤＮＡをＥｃｏＲｌで消化してクローニングされた挿入物を遊離させ、消化混合物を１％ アガロースゲルの電気泳動で解析した。７００ ｂｐより大きい挿入断片の配列を、ベクター－特異的Ｍ１３（５’－ＧＴＴＴＴＣＣＣＡＧＴＣＡＣＧＡＣ－３’）（配列番号５７）および Ｍ１３ リバース（５’ ＣＡＧＧＡＡＡＣＡＧＣＴＡＴＧＡＣ－３’）（配列番号５８）シークエンシングプライマー（ＡＢＩサイクルシークエンサー、ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）を用いて解析した。

【０２３４】

配列解析によって、ＢＳＬ２の２つのスプライス変異体がクローニングされた ：ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ。ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂスプライス変異体は、１つのＶ／Ｃ折り畳みを含むアミノ酸配列は他方と９５％同一であった。Ｓｅｑｗｅｂ Ｇａｐ 解析（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ）はまた、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ ヌクレオチドが共有するＢ７－１、Ｂ７－２、およびＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１ ヌクレオチド配列と５０％未満の配列同一性を共有するが、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂアミノ酸は、Ｂ７－１、Ｂ７－２、およびＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１ アミノ酸配列と３５％未満の配列同一性を共有していた。

【０２３５】

配列解析はさらにＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１のアミノ酸およびヌクレオチド配列が、Ｋ．Ｐ．Ｂａｋｅｒらの国際特許出願ＷＯ ９９／４６２８１において報告されたＰＲ０３５２アミノ酸およびヌクレオチド配列とそれぞれ９９％未満の配列同一性を共有するを示した。ＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂのアミノ酸およびヌクレオチド配列は、ＰＲ０３５２アミノ酸およびヌクレオチド配列とそれぞれ、９９．５％未満の配列同一性を共有していた。

【０２３６】

ＧＣＧ Ｇａｐ プログラム（ＧＣＧ、Ｍａｄｉｓｏｎ、ＷＩ）を用いたアミノ酸配列アライメントは、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＰＲ０３５２と同一のアミノ酸残基を共有する最も長い鎖が８８の連続したアミノ酸であることを示した。ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３

５ｂおよびＰＲ０３５２と共通するアミノ酸残基の最も長い鎖は１６８個の連続するアミノ酸であった。ＢＳＬ２４６１６８１１およびＰＲ０３５２と共通するアミノ酸残基の最も長い鎖は２０６個の連続するアミノ酸であった。

【０２３７】

ヌクレオチド配列アライメントは、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＰＲ０３５２と共通する塩基の最も長い鎖は２５４個の連続するヌクレオチドであることを示した。。ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂおよびＰＲ０３５２と共通する塩基の最も長い鎖は３０５個の連続するヌクレオチドであった。ＢＳＬ２－４６１６８１１およびＰＲ０３５２と共通する塩基の最も長い鎖は３０２個の連続するアミノ酸であった。とりわけ、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂは、Ｔ細胞活性化の共刺激分子であるＢ７－Ｈ３と同一であった（Ａ．Ｉ．Ｃｈａｐｏｖａｌ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：２６９－２７４）。

【０２３８】

ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１スプライス変異体のヌクレオチドおよび推定アミノ酸 配列を図３Ｃおよび３Ｄに示し、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂのヌクレオチドおよび推定アミノ酸 配列を図３Ｅおよび３Ｆに示す。ＢＳＬ２ Ｌ１６５－２１をコードするＤＮＡを有するプラスミド（ｐＣＲ２．１：ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１）は、２０００年６月６日に、Ａｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ ２０１１０２２０９ ＵＳＡ）へ、ＡＴＣＣ 受託番号ＰＴＡ－１９８７として寄託された。さらに、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂをコードするＤＮＡを有するプラスミド（ｐＣＲ２．１：ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ）は、２０００年６月６日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ ２０１１０－２２０９ ＵＳＡ）へ、ＡＴＣＣ 受託番号ＰＴＡ－１９８８として寄託された。

【０２３９】

実施例４：ＢＳＬ２のキャラクタリゼーション

ＢＳＬ２ 発現ｊ解析 ：ＢＳＬ２ 発現パターンは、図６Ｂに示したＢＳＬ２－４６１６８１１－由来プローブとＢＳＬ１（上記参照）について記載した手順を用いて、様々な組織および細胞タイプのノーザンブロット解析により決定した。いくつかの細胞のタイプにおいて３．６ ｋｂのＢＳＬ２ ｍＲＮＡ転写物が検出された。特に、高レベルのＢＳＬ２ ｍＲＮＡが、ＴＮＦ－αで刺激されたすべてのＨＭＶＥＣにおいて検出された。中程度のレベルのＢＳＬ２ｍＲＮＡが、休止ＴＨＰ１細胞およびＬＰＳで刺激されたＴＨＰ１細胞において検出された（図７Ｄ）。対照的に、低レベルのＢＳＬ２ｍＲＮＡがＰＨＡまたはＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４で刺激された末梢血単核球において検出され、ＢＳＬ２ｍＲＮＡは休止または末梢血Ｔ細胞、または休止ＲＡＪＩ細胞、休止ＲＡＭＯＳ細胞、または血清飢餓Ｈ２９２細胞では検出されなかった（図７Ｄ）。

【０２４０】

ＢＳＬ２－４６１６８１１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂの相対存在量を決定するＰＣＲ解析：ＢＳＬ２－４６１６８１１またはＢＳＬ２－Ｌ１６５－ ３５ｂが、ＢＳＬ２の支配的な種であるのかどうか、および細胞のタイプおよび／または刺激のタイプに対応しているのかどうかを調べるために、以下の実験法を用いた。ＢＳＬ２のゲノム配列の解析は、その配列がイントロンで分離されたエクソンをいくつか含んでいることを示した。一次転写物がこの配列から産生し、その一次転写物がスプライシングによりＢＳＬ２－４６１６８１１成熟ＲＮＡになったものと考えられる。ＢＳＬ２－４６１６８１１配列の解析は、その配列が以下のものをコードしていることを示した ：５’ＵＴＲ、開始ＡＴＧ、シグナルペプチド配列、可変Ｉｇ 折り畳み（ｖ１）、Ｉｇ 定常折り畳み（ｃ１）、Ｉｇ Ｖ 折り畳み（ｖ２）、 Ｉｇ Ｃ折り畳み（ｃ２）、短いヒンジ推定膜貫通ドメイン、短い細胞質尾部、終止コドンおよび ３’ＵＴＲ。

【０２４１】

ｖ１およびｃ１（ｖ１ｃ１）配列がｖ２およびｃ２（ｖ２ｃ２）配列とアミノ酸レベルで約９５％同一であったので、ＢＳＬ２－４６１６８１１コード配列はヒトゲノムにおいて独特であると思われる。重要なことに、構造上重要な残基のすべてがｖ１ｃ１およびｖ２ｃ２ アミノ酸配列において保存されており、ｖ１ｃ１からｖ２ｃ２への変化の大部分が保存的な変化であった。ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－ ３５ｂ配列（１つのみのＶおよびＣ 折り畳みを含んだ）のＢＳＬ２４６１６８１１配列との比較は、それぞれの場合において、ｖ１ からｖ２の正確にホモローガスな場所へのシフトをもたらすスプライシング現象が起こったことを示した。しかし、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１は、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂとは異なる場所でｖ１から ｖ２へシフトした。

【０２４２】

ヌクレオチドレベルでｖ１ ｃ１と２ｃ２は９６％ 同一であるにもかかわらず、ＧＣＧＧａｐを用いた２つの領域間の配列の比較は、比較的相同性の低い１つの短い領域を明らかにした。この相同性の低い短い領域を利用してフォワードプライマー指定 ＢＳＬ２－９を設計した。ＢＳＬ２－９を設計して、ｖ１に特異的に結合させた（図８ＥはＢＳＬ２－９ プライマーの特異性を示す）。リバースプライマー、ＢＳＬ２１１ を設計してヒンジ配列にハイブリダイズさせた。

【０２４３】

とりわけ、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物は、ｖ１にＢＳＬ２－９ ｖ１－結合部位およびｖ２にホモローガス部位を両方とも含んでいた。ＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物は、ＢＳＬ２－９ ｖ１ 結合部位のみを含んでいた。ＢＳＬ２ Ｌ１６５－２１転写物は、ｖ２部位のみを含んでいた。したがって、プライマー ＢＳＬ２－９およびＢＳＬ２－１１を用いて行うＰＣＲは以下のものを産生すると期待された：１）ＢＳＬ２－４６１６８１１を代表する約１１５０ ｂｐのＰＣＲ産物；または２）ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂを代表する約５５０ ｂｐのＰＣＲ産物。

【０２４４】

最初に、ＢＳＬ２－４６１６８１１プラスミドを用いてＰＣＲ行い、ＢＳＬ２－９ プライマーの選択性を確認した。２μＬ１０ ｎｇ／ｐＩ ＢＳＬ２－４６１６８１１プラスミドＤＮＡ、５、μＬのＰＣＲ 緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、１．５μＬの２５ｍＭＭｇＣＩ$_2$（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、１μＬの１０ｍＭｄＮＴＰｓ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、２．５ μＬの１０ ｐＭｏｌ／．ｉ ＢＳＬ２－９ プライマー（５’ＴＧＧＴＧＣＡＣＡＧＣＴＴＴＧＣＴ ３’）（配列番号５９）、２．５μＬの１０ ｐＭｏｉ／μＬのＢＳＬ２－１１ プライマー（５’ＴＣＴＧＧＧＧＧＧＡＡＴＧＴＣＡＴ ３’）（配列番号６０）、０．５ μＬの５Ｕ／ｍＬ ＧｉｂｃｏＢＲＬ 白金Ｔａｑ ＤＮＡ ポリメラーゼ（Ｃａｔ． ＃１０９６６－０１８）、および３５ μＬのＨ$_2$０を用いてＰＣＲを行った。ＰＣＲは、以下のサイクル条件を用いてＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ９７００にて行った：９４℃にて３０秒間；次いで、９４℃にて３０秒間、６１℃にて３０秒間、７２℃にて６０秒間を３５サイクル；次いで、７２℃にて１０分間。この後、４０ μＬのＰＣＲ反応物をラムダＢｓｔＥｌｌ ＤＮＡラダー（Ｎｅｗ Ｅｎｇｌおよび Ｂｉｏｌａｂｓ Ｂｅｖｅｒｌｙ、ＭＡ；Ｃａｔ． ＃３０１－４Ｓ）の隣で１．２％ アガロースゲルに付した。１１５０ ｂｐのバンドが優性であり、ＢＳＬ２－９ ＰＣＲプライマーがＢＳＬ２－４６１６８１１ 配列に特異的であることを示した（図８Ｅ）。

【０２４５】

Ｒａｊｉ、Ｒａｍｏｓ、ＰＭ－ＬＣＬ、ＰＬ－ＬＣＬ、およびＣＥ－ＬＣＬ Ｂ－様細胞系；ＨＬ－６０およびＴｈｐ１ 単球様細胞系；およびＣＥＭおよびＨｕｔ７８ Ｔ様細胞系を１０％ ＦＢＳおよび１ ％ ＧｉｂｃｏＢＲＬ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ １６４０中、５×１０^5 細胞／ｍＬの濃度まで培養した。培養物を分けて、Ｂ様およびＴ様培養細胞の半分を３０ ｎｇ／ｍＬＰＭＡおよび１ Ｍ イノマイシンで２４時間刺激した。単球性細胞系を１μｇ／ｍＬＬＰＳで２４時間刺激した。早期ＨＵＶＥＣを９０％コンフルエンスになるまで培養し、培養細胞の半分を１０ｎｇ／ｍＬＴＮＦαで刺激し、６または２４時間後に回収した。刺激されなかったＨＵＶＥＣは２４時間

後に回収した。

【０２４６】

２人のドナー由来の末梢血Ｔ細胞を上記のとおり精製した。細胞を（１×１０^{6} 細胞／ｍＬ）１０％ ヒト血清および１％ ＧｉｂｃｏＢＲＬ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ １６４０に添加した。次いで、細胞を３７℃、５％ＣＯ$_{2}$ にて７２時間インキュベーションした。フラスコを、ＰＢＳ中の１μｇ／ｍＬＣＤ３ Ｍａｂ Ｇ１９．４（本明細書に記載）で３７℃にて４時間コーティングした。フラスコＰＢＳで２回洗浄し、１０％ ヒト血清および１ ％ ＧｉｂｃｏＢＲＬ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ １６４０中の細胞（１×１０^{5} 細胞／ｍＬ）を添加した。ＣＤ２８ ＭＡｂ ９．３（以前に記載された）を終濃度１μｇ／ｍＬになるように加えた。細胞を３７℃、５％ＣＯ$_{2}$ にて ７２時間培養した。細胞を、１０％ ヒト血清および１％ ＧｉｂｃｏＢＲＬ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ １６４０に加えた（１×１０^{6} 細胞／ｍＬ）。ＰＭＡを３０ ｎｇ／ｍＬになるまで加え、イノマイシンを１μＭになるまで加えて、３７℃、５％ＣＯ$_{2}$ にて４８時間インキュベーションした。刺激されたＴ細胞の増殖が目で確認された。すべてのタイプの細胞をペレット化し、ドライアイス上で乾燥させて使用するまで－７０℃で保存した。

【０２４７】

Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ（Ｃａｒｌｓｂａｄ、ＣＡ）ＳＮＡＰ 全ＲＮＡ単離キット（Ｃａｔ． ＃Ｋ１９５０－０１）を用い、説明書にしたがって全ＲＮＡを調製した。オリゴ ｄＴプライミングのために、第１鎖のｃＤＮＡを、ＲＴ－ＰＣＲ用のＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｓｕｐｅｒｓｃｒｉｐｔ Ｆｉｒｓｔ－Ｓｔｒａｎｄ Ｓｙｎｔｈｅｓｉｓ Ｓｙｓｔｅｍ（Ｃａｔ． ＃１１９０４－０１８）を用い、説明書にしたがって作製した。ＰＣＲは２μＬの第１鎖 ｃＤＮＡ、５μＬのＰＣＲ 緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、１．５μＬの２５ｍＭＭｇＣｌ$_{2}$（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、１μＬの１０ｍＭｄＮＴＰｓ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、２．５μＬの１０ ｐＭｏｌ／、μＬのＢＳＬ２－９ プライマー（５’ＴＧＧＴＧＣＡＣＡＧＣＴＴＴＧＣＴ ３’）（配列番号６１）、２．５μＬの１０ｐＭｏｌ／ ＢＳＬ２－ １１ プライマー（５’ＴＣＴＧＧＧＧＧＧＡＡＴＧＴＣＡＴ ３’）（配列番号６２）、０．５ μＬの５Ｕ／μＬ ＧｉｂｃｏＢＲＬ白金Ｔａｑ ＤＮＡ ポリメラーゼ（Ｃａｔ． ＃１０９６６－０１８）、および３５ μＬのｄＨ$_{2}$０を用いて行った。ＰＣＲは、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ ９７００で、以下のサイクル条件を用いて行った： ９４℃にて３０秒間；次いで９４℃にて３０秒間、６１℃にて３０秒間、７２℃にて６０秒間を３５サイクル；次いで７２℃にて１０分間。この後、４０μＬのＰＣＲ反応物を１．２％ アガロースゲルに付した。

【０２４８】

ＰＣＲ 解析は、ある特定の細胞のタイプが、刺激ありまたは無しで、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物を主に含んでいることを示した。刺激されなかったおよび刺激された ＰＬ－ＬＣＬ細胞は、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物よりも高いレベルのＢＳＬ２－４６１６８１１転写物を示した（図８Ａ）。刺激されなかったおよび刺激されたＨＵＶＥＣ細胞は、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物よりも高いレベルのＢＳＬ２－４６１６８１１転写物（図８Ｂ）を示した。

【０２４９】

対照的に、他のタイプの細胞は、刺激有りまたは無しで、主にＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物を含んでいた。刺激されたＲａｊｉ細胞、および刺激されていない刺激されていないおよび刺激されたＲａｍｏｓ細胞は、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物よりも高いレベルのＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物を示した（図８Ａ）。刺激されていないおよび刺激されたＨＬ６０細胞は、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物よりも高いレベルのＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物を示した（図８Ｂ）。

【０２５０】

さらに、ある特定のタイプの細胞は、活性化によってＢＳＬ２４６１６８１１転写物 レベルの増加を示した。刺激されていないＰＭ－ＬＣＬ細胞は高レベルのＢＳＬ２－４６１

６８１１転写物を示し、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物と比較して刺激により増加した（図８Ａ）。同様に、刺激されていないＣＥ－ＬＣＬ細胞は、高いレベルのＢＳＬ２４６１６８１１転写物を示し、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物と比較して刺激により増加した（図８Ｂ）。刺激されていないＴｈｐ１細胞は、同等のレベルのＢＳＬ２－４６１６８１１およびＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物を示したが、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物のレベルは刺激により増加した（図８Ｂ）。ドナー０７９由来の刺激されていない末梢血Ｔ細胞は、主にＢＳＬ－Ｌ１６５－３５ｂを示したが、刺激によりＢＳＬ２－４６１６８１１優勢にシフトした。ドナー１２４由来の末梢血Ｔ細胞は、刺激により、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂからＢＳＬ２－４６１６８１１へ劇的にはシフトしなかった（図８Ｃ）。刺激されていないＣＥＭ細胞は、高いレベルのＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物を示したが、活性化によりＢＳＬ２－４６１６８１１転写物が増加した（図８Ｄ）。

【０２５１】

その他のタイプの細胞は、活性化によりＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ レベルの増大を示した。刺激されていないＨＵＴ７８細胞は高いレベルのＢＳＬ２－４６１６８１１転写物を示したが、活性化によりＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂ転写物のレベルが増大した（図８Ｄ）。これらの結果は、４つのＩｇ折り畳みすべてにおけるアミノ酸配列の保存、４つのＩｇ折り畳みすべてにおける構造上重要なアミノ酸残基の保存、およびｖ１ｃ１とｖ２ｃ２との間のアミノ酸の相違の保存的性質とあいまって、ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂおよびＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１（ＢＳＬ２ｖｃ）とは区別されるＢＳＬ２－４６１６８１１（ＢＳＬ２ｖｃｖｃ）の機能の根拠となっている。

【０２５２】

ＰＣＲ人為的な結果の存在を排除するために、ＴＮＦαで２４時間活性化されたＰＣＲ産物を、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ Ｏｒｉｇｉｎａｌ ＴＡ クローニングキット（Ｃａｔ．＃Ｋ２０００－０１）を用いて説明書にしたがってクローニングした。構築物を細菌細胞をトランスフェクトするために用い、および２５個の白色のコロニーを単離し、１００ｐｇ／ｍＬアンピシリンを添加したＬＢにて培養した。ＤＮＡプレップを作製し、配列解析を行った。２５個のクローンのうち、１０個のクローンが挿入物を含んでおらず、３個のクローンが読取可能な配列を産生せず、３個のクローンは広範な欠失を有するＢＳＬ２－関連配列を含み、および残りの９個のクローンがＢＳＬ２－４６１６８１１と一致する配列を産生した。

【０２５３】

注目すべきことに、ＰＣＲ産物 ｃｏｒｒｅｓｐｏｎｄｉｎｇ ｔｏ ＢＳＬ２４６１６８１１またはＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂに対応するＰＣＲ産物が、刺激されていないＲａｊｉ細胞において観察されなかった。この結果を確認するために、ＰＣＲを刺激されていないおよび刺激されていないＲａｊｉ細胞について既に記載されているように繰り返した。再度、ＰＣＲ産物が刺激されていないＲａｊｉ細胞において検出されなかった。この後、Ｇ３ＰＤＨ プライマーと刺激されていないおよび刺激されたＲａｊｉ細胞から得られたテンプレートを用いてＰＣＲを行った。サイクル条件は、アニーリング温度を５５℃にし、伸張時間を４５秒間にした以外は上記と同じであった。比較的同じ両のＧ３ＰＤＨ産物が刺激されていないおよび刺激されたＲａｊｉ細胞の両方において検出された。このことは、刺激されていないＲａｊｉ細胞が検出可能なＢＳＬ２転写物を含んでいないという観察結果を更に支持した。

【０２５４】

ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ融合構築物：ＢＳＬ２４６１６８１１－Ｉｇプラスミドを構築するために、ＢＳＬ２－４６１６８１１細胞外ドメインを第１鎖ｃＤＮＡ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ．＃１１９０４－０１８）からＰＣＲ増幅した。ｃＤＮＡは、１００ｎｇ／ｍＬＬＰＳで２時間刺激されたＴＨＰ１細胞から精製したＲＮＡから調製した。ＲＮＡは、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ ＦａｓｔＴｒａｃｋ ２．０（Ｃａｔ．＃Ｋ１５９３０２）を用いて精製した。ＰＣＲ反応物には、１μＬのｃＤＮＡ；５μＬのＧｉｂｃｏＢＲＬ １０×ＰＣＲ 緩衝液；１．５μＬの２５ｍＭＭｇＣｌ$_2$；１μＬの１０ｍＭｄＮＴ

Ｐｓ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ）；２．５μＬのＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１－Ｉｇ－１ プライマー（１０ ｐＭ／μＬ）；２．５μＬのＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１－Ｉｇ－２ プライマー（１０ ｐＭ／μＬ）；１μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ポリメラーゼ（Ｃａｔ．＃８４１７－１）；および３５．５μＬのｍｉｌｌｉＱ H_2Oを含有させた。プライマーは以下の配列を含んでいた：ＢＳＬ２Ｌ１６５－２１－Ｉｇ－１ ：５’ｇｇ ｇｇｔ ａｃｃ ＡＴＧ ＣＴＧ ＣＧＴ ＣＧＧ ＣＧ ３’（配列番号６３）；ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１－Ｉｇ－２ ：５’ｃｇ ｇａａ ｔｔｃ ＴＧＧ ＧＧＧ ＧＡＡ ＴＧＴ ＣＡＴ ＡＧ ３’（配列番号６４）。ＰＣＲサンプルを９４℃にて１分間インキュベーションした後、次いで９４℃にて３０秒間、５９℃にて３０秒間、および７２℃にて４５秒間のインキュベーションを３５サイクル行い、次いで７２℃にて１０分間のインキュベーションを行った。

【０２５５】

次いで、３０μＬのＰＣＲ反応物を１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルに付した。約１１００ ｂｐのバンドを切り出し、ＱＩＡＧＥＮ Ｇｅｌ 抽出キット（Ｃａｔ．＃２８７０４）を用いて精製した。１μＬの精製したＰＣＲ産物（Ｌ２５４）を、ＴＡ クローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ；Ｃａｔ．＃Ｋ２０５０－０１）を用いてｐＣＲ２．１へライゲーションした。５μＬのライゲーション混合物をＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５－αコンピテントバクテリア（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１８２５８－０１２）へトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を、１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび８００μｇＸ－Ｇａｌを含むＬＢプレートに蒔いた。白色のコロニーを１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬＬＢ培養液に接種し、３７℃にて１８時間培養した。プラスミドＤＮＡをＱＩＡＧＥＮ スピンミニプレップキット（Ｃａｔ．＃２７１０６）を用いて精製した。プラスミドＤＮＡをＫｐｎｌおよびＥｃｏＲｌを用いて消化した。約１３００ ｂｐの挿入物を含むプラスミドを、Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ 自動化ＤＮＡ シークエンサー（ＡＢＩ ３７００ ｃａｐｉｌｌａｒｙ ａｒｒａｙ シークエンサーｓ）を用いて配列解析した。Ｌ２５４－７は、野生型ＢＳＬ２－４６１６８１１ 配列を含むと決定された。

【０２５６】

ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分を、前に記載した０．００１μＬのＢＳＬ１－Ｉｇ；５μＬのＧｉｂｃｏＢＲＬ ＰＣＲ 緩衝液；１．５μＬ ２５ｍＭｍｇＣｌ$_2$；１μＬの１０ｍＭ ｄＮＴＰｓ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ）；２．５μＬのＩｇ－１ プライマー（１０ ｐＭ／ｌｌ）２．５μＬのＢＳＬ１ｌｇ－２ プライマー（１０ ｐＭ／ ｌ）；１μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ポリメラーゼ；３６μＬの ｄH_2Oを用いて、ＰＣＲ増幅した。プライマーは以下の配列を含んだ：ＩｇＧ－１ ：５’ｇｇａａ ｔｔｃ ＧＡＧ ＣＣＣ ＡＡＡ ＴＣＴ ＴＧＴ ＧＡＣ ＡＡ ３’（配列番号６５）；ＢＳＬ１ Ｉｇ－２ ｇｃ ｇｃ ｔｃｔ ａｇａ ＴＣＡ ＴＴＴ ＡＣＣ ＣＧＧ ＡＧＡ ＣＡＧ Ｇ（配列番号６６）。ＰＣＲサンプルを９４℃にて１分間インキュベーションし；次いで９４℃にて３０秒間、５９℃にて３０秒間、および７２℃にて３０秒間のインキュベーションを２５サイクル行い；次いで７２℃にて１０分間のインキュベーションを行った。

【０２５７】

次いで、３０μＬのＰＣＲ反応物を１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルに付した。約７００ ｂｐのバンドを切り出し、ＱＩＡＧＥＮ Ｑｉａｑｕｉｃｋゲル抽出キットを用いて精製した。２μＬの精製された断片（Ｌ１７４）を、ＴＡ クローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてｐＣＲ２．１にライゲーションした。５μＬのライゲーション混合物をＧｉｂｃｏＢＲＬ ＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５－αコンピテントバクテリアへトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を、１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび８００μｇＸ－Ｇａｌを含むＬＢプレートに蒔いた。プレートを３７℃で１８時間インキュベーションした。白色のコロニーを１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬＬＢ培養液に接種し、３７℃にて１８時間培養した。プラスミドＤＮＡをＱＩＡ

ＧＥＮ Ｑｉａｐｒｅｐスピンミニプレップキットを用いて精製した。プラスミドＤＮＡをＥｃｏＲｌで消化し、アガロースゲルに付した。約９００ ｂｐの挿入物を含むプラスミドを配列解析した。Ｌ１７４－３は野生型ヒトＩｇＧ１ Ｆｃ 配列を含むと決定された。

【０２５８】

Ｌ１７４－３をＥｃｏＲｌ／Ｘｂａｌで消化し、１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルで分離した。約７５０ ｂｐのバンドを切り出し、ＱＩＡＧＥＮ ゲル抽出キットを用いて精製した。１０μＬの精製された断片を濃度を見積もるための鎖の隣でアガロースゲルに付した。約２０ ｎｇのＥｃｏＲｌ／Ｘｂａｌ断片は、ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ 緩衝液中で希釈しされたＧｉｂｃｏＢＲＬ高濃度Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ（５ Ｕ／μＬ）を用いて４０ｎｇのＥｃｏＲｌ／Ｘｂａｌ消化されたｐＣＤＮＡ３．１＋ベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）へライゲーションした（Ｌｉｇａｔｉｏｎ ２００）。５μＬのライゲーション混合物をＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５－αコンピテントバクテリア（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）へトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を１００ ｐｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢプレートに蒔いた。プレートを３７℃にて１８時間インキュベーションした。 コロニーを１００ ｐｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢ培養液中に接種した。プラスミドＤＮＡをＱＩＡＧＥＮ スピンミニプレップキットを用いて精製し、配列を解析した。Ｌ２００－１配列は、Ｌ１７４－３ 配列と同一であると決定された。

【０２５９】

Ｌ２５４－７ ＢＳＬ２－４１４６８１１構築物をＫｐｎｉｌＥｃｏＲｌで消化した。約１３００ ｂｐのバンドを１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルから切り出し、Ｋｐｎｌ／ＥｃｏＲｌで消化されたＬ２００－１ Ｆｃ構築物にラーゲーションした。５μＬのライゲーション反応物をＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５－α細胞へトランスフェクトし１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢプレートに蒔いた。コロニーを培養し、プラスミド ＤＮＡを上記の通り精製した。プラスミドＤＮＡをＫｐｎｌ／Ｘｂａｌで消化し、上記の通りアガロースゲルで分離した。約２ ｋｂのバンドを含むプラスミドの配列を上記の通り解析した。ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇは野生型ＢＳＬ２－４６１６８１１および野生型ヒトＩｇＧ１ 配列を含むと決定された。ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇのヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図４Ａおよび４Ｂに示す。

【０２６０】

ＢＳＬ２モノクローナル抗体：ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ融合タンパク質をアフィニティー精製により、以下ＢＳＬ３－Ｉｇについて記載するように精製した。次いで、精製した融合タンパク質を用いて、４度目のブーストを使用すること以外はＢＳＬ３－Ｉｇについて記載されたプロトコルを用いてマウスを免疫した。この後、ハイブリドーマ細胞系を構築し、ＢＳＬ２ ＭＡｂｓを、以下ＢＳＬ３について記載するように単離した。

【０２６１】

実施例５：ＢＳＬ３の同定

データベース検索：ＢＳＬ３を、照会配列としてＢ７－１またはＢ７－２タンパク、およびＢＳＬ２検索について記載されたパラメーターを用いて、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ配列データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）のＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡ 解析により同定した。配列データベース検索によって、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ’遺伝子’１１７３２７（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ 遺伝子は類似の配列でグループ分けされるＥＳＴ配列であり、１つのゲノムの座の産生物を示すと考えられる）を同定した。Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ遺伝子１７３２７はその後Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ遺伝子８９９８９８として改名された。二次スクリーニングにおいて、前に記載された検索パラメーターを用いて、ＢＬＡＳＴおよびＦＡＳＴＡプログラムを用いＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ配列データベース（Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ）をマウス ＡＦ１４２７８０遺伝子（１１７３２７遺伝子の潜在的なオルソログ）に関連する配列について検索した。これらの検索によってＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ遺伝子 １４

３５２２が同定された。

【０２６２】

次いで、１４３５２２および１１７３２７遺伝子を用いて、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓクローン ３８４４０３１および３２０７８１１をそれぞれ同定した。３８４４０３１ クローンは、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ライブラリー ＩＤ Ｎｏ．ＤＥＮＤＮＴ０１に属しており、はじめに末梢血由来の未処理の樹状細胞から単離されたポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用いて構築された。３２０７８１１ クローンは、Ｉｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓ ライブラリー ＩＤ Ｎｏ．ＰＥＮＣＮＯＴ０３に属しており、はじめに海綿体組織から単離されたポリ（Ａ）＋ＲＮＡを用いて構築された。３８４４０３１および３２０７８１１クローンをＩｎｃｙｔｅ Ｇｅｎｏｍｉｃｓから得、表４に示すプライマーを用いて、配列を解析した（ＡＢＩサイクルシークエンサー、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。

【０２６３】

表４

クローン	ﾌﾟﾗｲﾏｰ	配列	配列番号
3844031	316. 491	GAAGGCCTCTACCAGGTC	67
3844031	316. 512	CTTTAGGCGCAGAACACT	68
3844031	316. 203	AAGGGTCAGCTAATGCTC	69
3844031	316. 379	TCAGTTTGCACATCTGTA	70
3844031	316. 1538	TATGCTATCAAGATTCCA	71
3844031	316. 1839	GTAAAGTGCAGTAGTGCT	72
3844031	316. 1601	TATGAGCTCACAGACAGG	73
32078'f 1	315. 560	AGGTTCAGATAGCACTGT	74
3207811	315. 468	ACTTATCTGAAATTGCTG	75
3207811	315. 493	TTGATATGCTCATACGTT	76
3207811	315. 1011	GAATTCTGTGGGTCCAGG	77
3207811	315. 601	CATGTTTAATGGTGGTTT	78
3207811	315. 498	AAAGCTGTATTCTTCAAA	79

【０２６４】

ＢＳＬ３の完全長クローニング：ＢＳＬ３の５’末端をクローニングするために、ＳＭＡＲＴＴ（登録商標）ＲＡＣＥ（ｃＤＮＡ 末端の迅速増幅）ｃＤＮＡ増幅キット（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）を、説明書にしたがって用いた。５’ＲＡＣＥ ライブラリーを、ＴＮＦ－αで１時間処理したヒト微小血管 内皮細胞から得られた１．０μｇのポリ（Ａ）＋ＲＮＡテンプレートを用いて構築した。５’ＲＡＣＥ反応混合物は、２μＬの ＲＡＣＥ－レディｃＤＮＡ、１×ＰＣＲ 緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、２００ μＭ のｄＮＴＰ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）、１．５ｍＭＭｇＣｌ$_2$、１μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ｅｎｚｙｍｅミックス、１×ＣＬＯＮＴＥＣＨ ＳＭＡＲＴプライマー、および２５ ｐＭｏｌ ＢＳＬ３ ３’特異的プライマー（ＢＳＬ３－２ ５’ ＧＡＡＣＡＣＴＧＧＴＧＡＣＣＴＧＧＴＡＧＡＧ－３’）（配列番号８０）を合計５０μＬに含んだ。５’ＲＡＣＥ反応は、ＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ ９７００ 装

置（ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）で、９４℃にて１分間の最初の変性工程、次いで９４℃にて３０秒間、６２℃にて３０秒間、７２℃にて３０秒間のインキュベーションを３５サイクル、次いで７２℃にて１０分間でのインキュベーションを用いて行った。

【０２６５】

ＰＣＲ産物は、０．５×ＴＢＥおよび１０μｇ／ｍＬ臭化エチジウム（Ｂｉｏ－Ｒａｄ）を添加した１．２％ アガロースゲル（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）を用いたゲル電気泳動により解析した。約８７５ ｂｐの断片をゲルから切り出し、ＱＩＡＧＥＮ Ｑｉａｑｕｉｃｋ Ｇｅｌ 抽出キットを用い、説明書にしたがって精製した。１μＬの精製された断片を、全体積１０μＬ中の２μＬのｐＣＲ２．１ ｐＴＡＤＶ クローニングベクター（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）、２ μＬのライゲーションカクテル（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、および４ UのＴ４ ＤＮＡリガーゼ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）と混合し、ライゲーション混合物を１４℃にて４時間インキュベーションした。５μＬのライゲーション混合物を用いてＭａｘ－Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αＥ．ｃｏｌｉ細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）を、説明書にしたがって、トランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび３０μｇ／ｍＬＸ－ｇａｌを含むＬＢプレートに蒔いた。白色のコロニーを取り、１００μｇ／ｍＬのアンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液中で培養した。Ｑｉａｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（ＱＩＡＧＥＮ）を用いて、ＤＮＡをバクテリアから精製した。プラスミドＤＮＡをＥｃｏＲｌで消化し、アガロースゲル電気泳動で解析した。ＥｃｏＲｌ断片を含む約９００ ｂｐのプラスミド単離体を配列解析のために保った（ＡＢＩサイクルシークエンサー、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）。配列はＳｅｑｗｅｂ Ｇａｐ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ）により解析した。

【０２６６】

次いで、５’ＲＡＣＥ ライブラリーをＰＣＲ増幅のためのテンプレートとして用いた。ＰＣＲ 混合物は、合計５０μＬ中に、１μｇの５’ＲＡＣＥ ライブラリーテンプレート、１×ＰＣＲ 緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、２００ μＭ ｄＮＴＰ（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ）、１．５ｍＭｍｇＣｌ$_2$、１μＬの ＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ 酵素ミックス、２５ ｐＭｏｌ フォワード プライマー（ＢＳＬ３－３：５’－ＣＣＧＧＧＧＴＡＣＣＡＴＧＡＴＣＴＴＣＣＴＣＣＴＧＣＴＡＡＴＧＴＴＧ－３’）（配列番号８１）、および２５ ｐＭｏｌ リバース プライマー（ＢＳＬ３－４：５’ ＧＣＧＣＴＣＴＡＧＡＴＣＡＧＡＴＡＧＣＡＣＴＧＴＴＣＡＣＴＴＣＣＣ－３’）（配列番号８２）を含んだ。ＰＣＲは、 ＧｅｎｅＡｍｐ ＰＣＲ Ｓｙｓｔｅｍ ９７００（ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）装置で、９４℃にて１分間の最初の変性工程、次いで９４℃にて３０秒間、６０℃にて３０秒間、７２℃にて３０秒間のインキュベーション３０サイクル、および７２℃にて１０分間のインキュベーションを用いて行った。

【０２６７】

約８００ ｂｐのＢＳＬ３ＰＣＲ産物を得た。ＢＳＬ３断片をクローニングするために、１μＬのＰＣＲ産物を２μＬのｐＣＲ２．１ クローニングベクター（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）、２μＬのライゲーション緩衝液（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、４ Ｕ Ｔ４ ＤＮＡリガーゼ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）、および４μＬのH_2Oと混合した。ライゲーション混合物を１４℃にて４時間インキュベーションし、５μＬの混合物を用いてＭａｘ－Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αＥ．ｃｏｌｉ細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）をトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび３０、ｕｇ／ｍＬＸ－ｇａｌを含むＬＢ寒天プレートに蒔き、１８個の白色のコロニーを単離し、１００μｇ／ｍＬｏｆ アンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液中で培養した。Ｑｉａｐｒｅｐ Ｓｐｉｎ Ｍｉｎｉｐｒｅｐキット（ＱＩＡＧＥＮ）を説明書にしたがって用いて、ＤＮＡを培養細菌から精製した。プラスミドＤＮＡをＥｃｏＲｌで消化し、アガロースゲル電気泳動により解析した。１６個のプラスミド単離体は、約８００ ｂｐのＥｃｏＲＩ断片を含み、ベクター特異的Ｍ１３およびＭ１３リバース プライマー（上記参照）を用いた配列解析（ＡＢＩサイクルシークエンサー、ＰＥ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍｓ）のために保存した。

【０２６８】
Ｓｅｑｗｅｂ Ｇａｐ（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ）解析は、ＢＳＬ３ Ｉｎｃｙｔｅ ＧｅｎｏｍｉｃｓクローンおよびＢＳＬ３ ５’ＲＡＣＥ産物の最適なアライメントを示した。Ｓｅｑｗｅｂ Ｇａｐ 解析（Ｇｅｎｅｔｉｃｓ Ｃｏｍｐｕｔｅｒ Ｇｒｏｕｐ）はさらに、ＢＳＬ３ ヌクレオチド配列がＢ７－１、Ｂ７－２、またはＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１ ヌクレオチド配列に対して５５％未満の配列同一性を共有するが、ＢＳＬ３アミノ酸はＢ７－１、Ｂ７－２、およびＢＳＬ１／Ｂ７－Ｈ１ アミノ酸配列に対して４５％未満の配列同一性を共有することを示した。
【０２６９】
さらに、ＢＳＬ３ Ｃ末端アミノ酸は、１７４アミノ酸にわたって、ＧｅｎＢａｎｋ Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＡＫ００１８７２によってコードされるアミノ酸配列に対して９８％未満の同一性を共有する。ＧＣＧ Ｇａｐ プログラムを用いたアミノ酸配列アライメントは、ＢＳＬ３とＡＫ００１８７２に共通する同一の残基の最も長い鎖が９９個の連続するアミノ酸であることを示した。ＧＣＧ Ｇａｐを用いたヌクレオチド配列アライメントは、ＢＳＬ３とＡＫ００１８７２に共通する同一の塩基の最も長い鎖が２３９個の連続するヌクレオチドであることを示した。とりわけ、ＢＳＬ３のマウス オルソログは、ＧｅｎＢａｎｋ データベースから同定された（Ａｃｃｅｓｓｉｏｎ Ｎｏ．ＡＦ１４２７８０）。ＢＳＬ３ Ｎ末端アミノ酸は、マウス ＡＦ１４２７８０に対応するアミノ酸配列に対して、２５０アミノ酸の鎖にわたって約７０％の配列同一性を共有する。さらに、注目すべきことに、ＢＳＬ３は、Ｔ細胞増殖の明らかなインヒビターであるＰＤ－Ｌ２としても同定されている（Ｙ．Ｌａｔｃｈｍａｎ ｅｔ ａｌ．（２００１）Ｎａｔｕｒｅ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２：２６１－２６８）。
【０２７０】
ＢＳＬ３のヌクレオチドおよび推定アミノ酸 配列を図５Ａおよび５Ｂに示す。ＢＳＬ３をコードするＤＮＡを有するプラスミド（ｐＣＲ２．１：ＢＳＬ３）ハ、２０００年６月６日にＡｍｅｒｉｃａｎ Ｔｙｐｅ Ｃｕｌｔｕｒｅ Ｃｏｌｌｅｃｔｉｏｎ（ＡＴＣＣ、１０８０１ Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｂｌｖｄ．、Ｍａｎａｓｓａｓ、ＶＡ ２０１１０－２２０９ ＵＳＡ）へ、ＡＴＣＣ 受託番号ＰＴＡ－１９８６として寄託された。
【０２７１】
ＢＳＬ１、ＢＳＬ２、およびＢＳＬ３配列情報を表５にまとめる。
表５

BSL NO.	配列の名称	核酸(NA) 配列番号	NA 図面番号	ｱﾐﾉ酸(AA) 配列番号	AA 図面番号
1	BSL1(TNF-a)	1	1A	2	1B
1	BSL1(GM-CSF/IL-4)	3	1C	2	1B
1	BSL1-Ig	4	2A	5	2B
2	BSL2-4616811	6	3A	7	3B
2	BSL2-L165-21	10	3C	11	3D
2	BSL2-L165-35b	12	3E	13	3F
2	BSL2-4616811-Ig	8	4A	9	4B
3	BSL3-L143	14	5A	15	58
3	BSL3-L232-6-Ig	16	6A	17	6B

【０２７２】
実施例６：ＢＳＬ３のキャラクタリゼーション
ＢＳＬ３ 発現 解析 ：ＢＳＬ３ 発現パターンを、図７Ｃに示したＢＳＬ３プローブおよびＢＳＬ１について記載した手順を用いて、様々なタイプの細胞のノーザンブロット解析により決定した。２．７ ｋｂの ＢＳＬ３ ｍＲＮＡ転写物が様々なタイプの細胞において検出された。特に、高レベルのＢＳＬ３ｍＲＮＡが、ＴＮＦαで刺激されたＨＭＶＥＣのすべてにおいて検出された（図７Ｄ）。中程度のレベルのＢＳＬ３ｍＲＮＡは、ＰＨＡまたはＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４で刺激された末梢血単核球において検出された（図７Ｄ）。しかしながら、ＢＳＬ３ｍＲＮＡは、残りのタイプの細胞において検出されなかった（図７Ｄ）。
【０２７３】
さらに、複数の組織ノーザンブロットおよび発現アレイをＣＬＯＮＴＥＣＨ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓから購入し、P^{32}－標識ＢＳＬ３プローブとハイブリダイズした。簡潔に言えば、９００ ｂｐのＢＳＬ３断片（ＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌ）を、ＫｐｎｌおよびＸｂａｌ制限エンドヌクレアーゼを用いてクローンＬ１６８－２から単離し、１．２％ アガロースゲルに付し、ＱＩＡＧＥＮ Ｇｅｌ 抽出キットを用いて精製した。ランダムプライムＤＮＡ 標識キット（Ｒｏｃｈｅ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、ＩＮ）を用いて、約３０ ｎｇのＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌを放射性同位元素で標識した（６０００ Ｃｉ／ｍｍｏｌ P^{32}－ＤＣＴＰ）。取りこまれなかったヌクレオチドをＮｕｃＴｒａｐプローブ精製カラム（Ｓｔｒａｔｇｅｎｅ、Ｌａ Ｊｏｌｌａ、ＣＡ）を用いて除去した。放射性同位元素で標識した ＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌプローブを、ＥｘｐｒｅｓｓＨｙｂ ハイブリダイゼーション溶液（ＣＬＯＮＴＥＣＨ）の３．０×10^{6} ｃｐｍ／ｍＬの比活性で加え、６５℃で一晩インキュベーションした。ブロットを０．１×ＳＳＣ／０．１％ ＳＤＳで６２℃にて洗浄し、７２時間フィルムに感光した。
【０２７４】
ノーザンブロット解析は、高レベルのＢＳＬ３転写物が脾臓組織に存在すること；中程度のレベルのＢＳＬ３転写物が胸腺、睾丸、および小腸組織に存在すること；および低レベルのＢＳＬ３転写物が心臓、、胎盤、肺、肝臓、骨格筋、前立腺、結腸、リンパ節、気管、および副腎組織、そしてＢｕｒｋｉｔｔ’ｓ リンパ腫 Ｒａｊｉ細胞系（図７Ｅ）に存在することを示した。マイクロアレイ解析は、高レベルのＢＳＬ３転写物が脾臓組織；中

程度のレベルのＢＳＬ３転写物が肺、肝臓、胎盤、胎児脾臓脾臓、リンパ節、および胎児胸腺組織に存在すること；および低レベルのＢＳＬ３転写物が心臓、大動脈、脳梁、左心房 、右心房、空腸、胸腺、胎児肝臓、および乳腺組織に存在することを示した（図７Ｆ）。

【０２７５】

定量的ＰＣＲ：ＢＳＬ１およびＢＳＬ３ 発現パターンを定量的ＰＣＲによって実証した。ヒトの複数の組織ｃＤＮＡ（ＭＴＣＴＭ）パネル（Ｃａｔ． ＃ＰＴ３１５８－１）をＣＬＯＮＴＥＣＨから購入した。各ＰＣＲ反応物につき、ｃＤＮＡ５μＬを用いた。表６に示すように、ヒトおよびマウスＢＳＬ１およびＢＳＬ３ ＰＣＲ プライマーをプライマー３ プログラム（Ｗｈｉｔｅｈｅａｄ Ｉｎｓｔｉｔｕｔｅ ｆｏｒ Ｂｉｏｍｅｄｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ；Ｓｔｅｖｅ Ｒｏｚｅｎ、Ｈｅｌｅｎ Ｊ． Ｓｋａｌｅｔｓｋｙ、１９９８、プライマー３）によって設計した。

表６

ﾌﾟﾗｲﾏｰ	配列	配列番号	ﾇｸﾚｵﾁﾄﾞ
ﾋﾄBSL1 ﾌｫﾜｰﾄﾞ	TACAAGCGAATTACTGTGAA	83	459-479
ﾋﾄBSL1 ﾘﾊﾞｰｽ	GATGTGCCAGAGGTAGTTCT	84	773-793
ﾋﾄBSL3 ﾌｫﾜｰﾄﾞ	AATAGAGCATGGCAGCAATG	85	419-439
ﾋﾄBSL3 ﾘﾊﾞｰｽ	GGCGACCCCATAGATGATTA	86	634-654
ﾋﾄ18s rRNA ﾌｫﾜｰﾄﾞ	CCAGTAAGTGCGGGTCAT	87	7-25
ﾋﾄ18s rRNA ﾘﾊﾞｰｽ	TTCACCTACGGAAACCTT	88	196-214

【０２７６】

ＳＹＢＲ Ｇｒｅｅｎ ＰＣＲ Ｃｏｒｅ Ｒｅａｇｅｎｔｓ（Ｃａｔ． ＃４３０６７３６）をＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍから購入した。リアルタイムＰＣＲをＡＢＩ Ｐｒｉｓｍ（登録商標） ５７００ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍ ＰＥ Ａｐｐｌｉｅｄ Ｂｉｏｓｙｓｔｅｍにて行った。ＰＣＲサンプルに対し、９５℃にて１５秒間、５５℃にて２０秒間、および７５℃にて１分間でのインキュベーションを４０サイクル行った。ＢＳＬ１ ＰＣＲ産物は３３４ ｂｐであり；ＢＳＬ３ ＰＣＲ産物は２３５ ｂｐであり；１８Ｓ ｒＲＮＡ ＰＣＲは２０７ ｂｐであった。ＰＣＲおよび収集の後、解離曲線試験を行った。さらに、ＰＣＲサンプルをアガロースゲル電気泳動により解析してＰＣＲ産物のサイズを確認した。

【０２７７】

データ処理および提示：各ＰＣＲ反応物について、限界サイクル数（C_T）を、リアルタイムＰＣＲ装置による読み出しとして作成した。データは、ＡＢＩ Ｐｒｉｓｍｅ ５７００ Ｓｅｑｕｅｎｃｅ Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ Ｓｙｓｔｅｍのマニュアルにしたがって処理

した。簡潔に言えば、ＢＳＬ１およびＢＳＬ３のC_T を各サンプルにおける１８Ｓ ｒＲＮＡのC_Tに標準化する。次いで、データから最も低い発現レベルを示すサンプルの標準化したC_Tを差し引く。ＢＳＬ１については、最も低い発現レベルは、扁桃組織でみられた。ＢＳＬ３については、最も低い発現レベルは、骨格筋において見られた。最終のデータは、最も低い発現レベルに対して増加した倍数で表す。

【０２７８】

定量的ＰＣＲは、高レベルのＢＳＬ１転写物がリンパ節、脾臓脾臓、肺、および胎盤組織に存在すること；中程度のレベルのＢＳＬ１転写物が胸腺および膵臓 組織に存在すること；および低レベルのＢＳＬ１転写物が心臓、脳、腎臓、成人肝臓、骨格筋、骨髄、白血球、胎児肝臓、および扁桃組織に存在することを示した（図７Ｇ）。ＢＳＬ３については、高レベルの転写物がリンパ節および脾臓 組織に存在し；低レベルのＢＳＬ３転写物が胸腺、肺、扁桃、心臓、膵臓、胎盤、腎臓、骨髄、胎児肝臓、および成人肝臓 組織に存在していた（図７Ｈ）。

【０２７９】

ＢＳＬ３－ｉｇ（Ｌ２３２－６）融合構築物：ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）構築物は、以下の手順を用いて作製した。ＢＳＬ３のＥＣＤを上記のとおり、０．０１μＬのｐＣＲ２．１：ＢＳＬ３（Ｌ１４３－４）を用いてＰＣＲにより増幅した；５μＬのＧｉｂｃｏＢＲＬ ＰＣＲ 緩衝液；１．５μＬの２５ｍＭｍｇCl_2；１μＬの１０ｍＭｄＮＴＰｓ；２．５μＬのＢＳＬ３－３ プライマー（１０ ｐＭ／Ｉｌｌ）；２．５μＬのＢＳＬ３１ｇ－６ プライマー（１０ ｐＭ／μＬ）；１ μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ポリメラーゼ；３６μＬのdH_2O。プライマーはイかの配列を含んでいた：ＢＳＬ３－３：５’ｃｃ ｇｇ ｇｇｔ ａｃｃ ＡＴＧ ＡＴＣ ＴＴＣ ＣＴＣ ＣＴＧ ＣＴＡ ＡＴＧ ＴＴＧ ３’（配列番号８９）；ＢＳＬ３１ｇ－６ ：５’ｃｇ ｇａａ ｔｔｃ ＧＧＴ ＣＣＴ ＧＧＧ ＴＴＣ ＣＡＴ ＣＴＧ ３’（配列番号９０）。ＰＣＲサンプルを９４℃にて１分間インキュベーションし；次いで９４℃にて３０秒間、５９℃にて３０秒間、および７２℃にて３０秒間のインキュベーションを２０サイクル行い；次いで７２℃にて１０分間インキュベーションした。

【０２８０】

この後、３８μＬのＰＣＲ産物をＫｐｎＩ／ＥｃｏＲＩで消化し１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルに付した。約６５０ ｂｐのバンドを切取りＱＩＡＧＥＮゲル抽出キットで精製した。１０μＬの精製した断片をサイズ標準の隣でアガロースゲルに付した。１０ｎｇの断片を（Ｌ２３２）２０ｎｇのＫｐｎＩ／ＥｃｏＲＩ消化したＬ２００－１（以前に記載した）にライゲーションした。５μＬのライゲーション混合物をＧｉｂｃｏＢＲＬ ＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αコンピテントバクテリアへトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢプレートに蒔いた。プレートを３７℃にて１８時間インキュベーションした。コロニーを１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液中に接種し、３７℃で１８時間培養した。ＤＮＡをＱＩＡＧＥＮ スピンミニプレップキットで精製し、Ｐｍｅｌで消化した。消化したサンプルをアガロースゲルに付し、約１５００ ｂｐの断片を含むプラスミドの配列を解析した。Ｌ２３２－６は、野生型ＢＳＬ３ 配列を有すると決定された。ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）のヌクレオチドおよび推定アミノ酸配列を図６Ａおよび６Ｂに示す。

【０２８１】

ＢＳＬ３－Ｉａ（Ｌ２７５－１）融合構築物：ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２７５－１）構築物は、以下の手順にしたがって作製した。ＢＳＬ３－Ｉｇを０．００１μＬのＬ２３２－６；５μＬのＧｉｂｃｏＢＲＬ ＰＣＲ 緩衝液；１．５μＬの２５ｍＭ$MgCl_2$；１ μＬの１０ｍＭＢｏｅｈｒｉｎｇｅｒ－Ｍａｎｎｈｅｉｍ ｄＮＴＰｓ；２．５μＬのＢＳＬ３－５ プライマー（１０ ｐＭ／μＬ）；２．５μＬのＢＳＬ１ Ｉｇ－２ プライマー（１０ ｐＭ／μＬ）；１μＬのＣＬＯＮＴＥＣＨ Ａｄｖａｎｔａｇｅ ポリメラーゼ；および３５．５ μＬのdH_2Oを用いてＬ２３２－６からＰＣＲ増幅した。プライマーは以下の配列を含んでいた：ＢＳＬ３－５：５’ｃｇ ｇｇａ ｔｔｃ ＡＴＧ ＡＴＣ ＴＴ

ＣＣＴＣＣＴＧＣＴＡＡＴＧＴＴ３’（配列番号９１）；ＢＳＬ１Ｉｇ－２：５’ｇｃｇｃｔｃｔａｇａＴＣＡＴＴＴＡＣＣＣＧＧＡＧＡＣＡＧＧ３’（配列番号９２）。ＰＣＲサンプルを９４℃にて１分間インキュベーションし；次いで９４℃にて３０秒間、５８℃にて３０秒間、および７２℃にて１．５分間のインキュベーションを２０サイクル行い；次いで７２℃にて１０分間のインキュベーションを行った。

【０２８２】

この後、２μＬのＰＣＲ反応物を、ＴＡ クローニングキット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いてｐＣＲ２．１へライゲーションした（Ｌ２６２）。５μＬのライゲーションをＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αコンピテント細胞（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）にトランスフェクトし、トランスフェクトされた細胞を１００μｇ／ｍＬアンピシリンおよび８００μｇのＸ－Ｇａｌを含むＬＢプレートに蒔いた。プレートを３７℃にて１８時間インキュベーションした。白色のコロニーを１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液に接種し、３７℃にて１８時間培養した。プラスミドＤＮＡをＱＩＡＧＥＮスピンミニプレップキットを用いて精製した。プラスミドＤＮＡをＢａｍＨｌ／Ｘｂａｌで消化し、アガロースゲルで解析した。約１３００ ｂｐの断片を含むプラスミドの配列を解析した。Ｌ２６２－２は、野生型ＢＳＬ３配列を含んでいると決定された。

【０２８３】

Ｌ２６２－２をＢａｍＨＩ／Ｘｂａｌで消化し、１．２％アガロース０．５×ＴＢＥゲルに付した。約１３００ ｂｐの断片をＱＩＡＧＥＮゲル抽出キットを用いて精製した。１０ｎｇの精製された断片を３０ｎｇのＢａｍＨｌ／Ｘｂａｌ消化したｐＤ１８（ｐＤ１６およびｐＤ１７ プラスミドに関連する、米国特許第６，０５１，２２８に記載）にライゲーションした。５μＬのライゲーションをＧｉｂｃｏＢＲＬ ＭＡＸ Ｅｆｆｉｃｉｅｎｃｙ ＤＨ５αコンピテントバクテリアにトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、１００μｇ／ｍＬアンピシリンを含むＬＢプレートに蒔き、３７℃にて１８時間培養した。コロニーを１００ ｐｇ／ｍＬアンピシリンを含む５ｍＬのＬＢ培養液に接種し、３７℃にて１８時間培養した。プラスミドＤＮＡをＱＩＡＧＥＮ スピンミニプレップキットを用いて精製した。プラスミドＤＮＡをＢａｍＨｌ ｐｌｕｓ ＸｂａｌまたはＨｉｎｄｌｌｌで消化し、消化したサンプルをアガロースゲルで解析した。制限地図によって決定されるように、Ｌ２７５－１～Ｌ２７５－９は正確な構築物を含む。

【０２８４】

ＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質の精製：ＢＳＬ３－Ｉｇ（ヒト－ＩｇＧ１）の精製は、１段階のアフィニティー精製によって達成した。ＢＳＬ３－Ｉｇを発現している一過性トランスフェクションされたＣＯＳ細胞の上清を固定化タンパク質Ａのセファロースカラムに適用した。カラムを、２８０ｎｍでの吸光度がベースラインのレベルになるまでＰＢＳで洗浄した。結合したタンパクを免疫純粋のＩｇＧ溶出緩衝液（Ｐｉｅｒｃｅ Ｃｈｅｍｉｃａｌ、Ｒｏｃｋｆｏｒｄ、ＩＬ；Ｃａｔ．＃２１００４）で溶出した。結合タンパク質を含む画分を１／８ ｖ／ｖの３Ｍリン酸ナトリウム（ｐＨ）で中和した。得られた調製物をＰＢＳに対して透析し、濾過した（０．２μｍ）。すべての緩衝液は、０．０２％ｗ／ｖアジ化ナトリウムを含んでいた。

【０２８５】

ＢＳＬ３ ポリペプチドによる免疫：最初の免疫のために、１～３ヶ月齢のマウスを用いた（ＢａｌｂＣ；Ｈａｒｌａｎ、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ、Ｉｎｄｉａｎａ）。ＲＩＢＩアジュバントを以下のように調製した。１つのバイアルに、０．５ ｍｇのＭＰＬ（モノホスホリル脂質Ａ；ＲＩＢＩ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｉｎｃ．、Ｈａｍｉｌｔｏｎ、ＭＴ）；０．５ ｍｇ ＴＤＭ（合成トレハロースディコリノマイコレート；ＲＩＢＩ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｉｎｃ．）；および４０μＬのスクアレンと０．２％ Ｔｗｅｅｎ ８０を一緒に混合した。混合物を４０～４５℃に５～１０分間加温し２ｍＬのＢＳＬ３ ポリペプチド／ＰＢＳ（１２５μｇ／ｍＬ）を加えた。溶液を数分間激しく攪拌した。次いで、溶液をシリンジに吸い上げ、すぐにマウスに注射した。

【０２８６】
用量は、ＲＩＢＩ Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ、Ｉｎｃ．の推奨に従う。最初の注射について、約１００μｇのＢＳＬ３ ポリペプチドを、ＰＢＳ 中の２５０μＬの１×ＲＩＢＩに再懸濁した。混合物を２１ゲージの針で腹腔内注射した。２回目およびその後の注射については、ブーストは少なくとも３週間の間隔を空ける。注射は半分の用量にした。３回目の注射から少なくとも３週間後に、力価が許容可能なレベルに達したら（以下参照）、動物に最後の追加免疫を行う。最後の注射について、約１ ｍｇ／ｍＬのＢＳＬ３ ポリペプチドをＰＢＳに再懸濁し（ＲＩＢＩは除外）、混合物を尾静脈から静脈内注射した。３～４日後に動物を回収した。
【０２８７】
力価レベルをモニターするために、血清サンプルを最初の免疫の前（バックグラウンド）、力価モニタリングのための各免疫から７～１０日後に採取した。り化レベルは、ＥＬＩＳＡにより測定した。血清は、眼出血、または尾部出血により採取した。典型的には、血清試験のために２００μＬの血液を採取した。
【０２８８】
ハイブリドーマ細胞系：以下の試薬を用いてハイブリドーマ細胞系を構築した：Ｉｓｃｏｖｅｓ 修飾Ｄｕｌｂｅｃｃｏ’ｓ培地（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１２４４０－０５３）；５６℃で３９０分間熱不活化したウシ胎仔血清（Ｈｙｃｌｏｎｅ；Ｃａｔ．＃Ａ１１１５Ｌ、Ｌｏｔ ＃１１１５２５６４）；Ｌ－グルタミン ２００ ｍｍ、１００×（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃２５０３０－０８１）；ペニシリン／ストレプトマイシン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１５１４０－１２２）；ＯＲＩＧＥＮハイブリドーマクローニング因子（Ｉｇｅｎ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ、Ｉｎｃ．、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ；Ｃａｔ．＃ＩＧ５０－０６１５、Ｌｏｔ ＃８０７７）；ＨＴ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １００×（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１１０６７－０３０）；ＨＡＴ Ｓｕｐｐｌｅｍｅｎｔ １００×（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃３１０６２－０３７）；ＰＥＧ １５００，（Ｂｏｅｈｒｉｎｇｅｒ Ｍａｎｎｈｅｉｍ；Ｃａｔ．＃７８３ ６４１）；Ｌａｂ Ｓｅｒｖｉｃｅｓより入手した赤血球溶解緩衝液（Ｃａｔ．＃３ＫＬ－４４９）；Ｔｒｙｐａｎｅ Ｂｌｕｅ；７０％ Ｅｔｈａｎｏｌ；ＡＴＣＣより入手したミエローマ細胞（Ｐ３ｘ）。
【０２８９】
以下の実験装置と備品を使用した：層流フード；CO_2 インキュベーター；ｍｉｃｒｏｓｃｏｐｅ；３７℃のウォーターバス；遠心機；９６ウェル平底組織培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ；Ｃａｔ．＃２５８６０－９６）；血清診断用ピペットおよび統合型ペトリ皿（Ｆａｌｃｏｎ）；５０ｍＬ遠心チューブ（Ｃｏｒｎｉｎｇ；Ｃａｔ．＃４３０９２１）；１５ｍＬコニカルチューブ（Ｆａｌｃｏｎ；Ｃａｔ．＃２０９６）；オーツクレー済みのはさみおよび鉗子；マルチチャンネルピペット；大口径２００μＬピペットチップ（Ｄｅｎｖｉｌｌｅ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ、Ｉｎｃ．、Ｍｅｔｕｃｈｅｎ、ＮＪ；Ｃａｔ．＃Ｐ１１０５－ＣＰ）；滅菌ピペットチップ（ＶＷＲ、Ｂｕｆｆａｌｏ Ｇｒｏｖｅ、ＩＬ；Ｃａｔ．＃５３５０８－７９４）。
【０２９０】
ＨＡＴおよびＨＴ培地を以下の通り作製した：

HAT培地		HT培地	
IMDM	500mL	IMDM	500mL
L-グルタミン	2.5ml	L-グルタミン	2.5ml
Pen/Strep	5ml	Pen/Strep	5ml
HAT上清	5ml	HT 上清	5ml
Origen Hy. Clon. F.	最終10%	Origen Hy. Clon. F.	最終10%

【０２９１】
静脈内または腹腔内のＰＢＳ中での融合の３～４日前にマウスに最終のブーストを行った。ミエローマ細胞を対数増殖（対数期）させ続けた。マウスを安楽死させ、各マウスから脾臓を無菌的に採取した。加温したＦＢＳ不含Ｉｓｃｏｖｅｓ 溶液を含むペトリ皿に脾臓を置いた。脾臓細胞の上清を調製し遠心チューブに入れた。ＨＡＴ－感受性ミエローマ細胞を５０ｍＬの遠心チューブに別々に入れた。脾臓細胞およびミエローマ細胞を４００×ｇで５分間遠心し、上清を吸引した。脾臓から得た赤血球細胞を５ｍＬＲＢＣ溶解緩衝液で１分間溶解し、チューブをＳＦ培地（ハイブリドーマ血清不含培地；ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１２０４５－０７６）で満たした。脾臓細胞を５０ｍＬＳＦ培地で洗浄し、脾臓細胞とミエローマ細胞を別の遠心チューブ内で４００×ｇで５分間遠心した。脾臓細胞とミエローマ細胞を計数し、２５ｍＬのＳＦ培地に再懸濁した。ミエローマ細胞を脾臓細胞に１：４の割合で添加した。混合物を４００×ｇで１０分間遠心して硬いペレットを形成し、すべての培地溶液吸引により除去した。
【０２９２】
細胞融合実験のために、ＰＥＧ、ＳＦ培地、およびＨＡＴ培地を３７℃でインキュベーションした。１ｍＬの５０％ ＰＥＧを細胞に１分間加え（ＰＥＧは３０秒間加え細胞を３０秒間攪拌した）。ＰＥＧ 溶液をチューブの側面に加え、ペレットを静かに攪拌した。攪拌しながら、１ｍＬのＳＦ培地を細胞に１分間加え、８ｍＬのＳＦ培地を細胞に２分間加えた。細胞を４００×ｇで １０分間遠心し上清を吸引した。ペレットにピペットが直接向けて攪拌して、細胞を１０ｍＬＨＡＴ選択培地に静かに再懸濁した。さらにＨＡＴ培地を加えて細胞の濃度を5×10^{5}細胞／ｍＬにした。細胞を９６ウェルの組織カルチャープレートに5×10^{4}細胞／ウェルで分注した。３日後、ＨＴ培地を１００μＬで加えた。約１０日後、クローンを抗体産物について試験した。陽性のクローン を２４－ウェルプレートの１ウェルに増殖させた。陽性のクローンを再試験し、アイソタイプを決定し、Ｔ２５まで増殖させた（０．２５ ｃｍ^{2} 組織 培養フラスコ）。
【０２９３】
ＥＬＩＳＡ解析：陽性クローンを試験するために、ＥＬＩＳＡ 解析を以下の試薬と備品を用いて行った：コーティング用炭酸塩／炭酸水素塩 ｐＨ ９．６（Ｓｉｇｍａ、Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ、ＭＯ；Ｃａｔ．＃Ｃ－３０４１）；Ｉｍｍｕｌｏｎ ２ ＥＵＳＡ プレート（Ｄｙｎｅｘ、Ｃｈ抗ｌｌｙ、ＶＡ；Ｃａｔ．＃０１１０１０３４５５）；１×の濃度に調製した１０× ＰＢＳ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ）； １Ｘ ＰＢＳ中にＴｗｅｅｎ ２０（終濃度０．０５％）を含有する洗浄緩衝液；５％ ＮＦＭ脱脂乳を添加した洗浄緩衝液を含むブロック緩衝液／サンプル希釈液；および５０％ ＴＭＢ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｓ Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ；Ｃａｔ．＃５０－７６－０１）および ５０％ ペルオキシダーゼ（Ｋｉｒｋｅｇａａｒｄ ＆ Ｐｅｒｒｙ Ｌａｂｓ Ｃａｔ．＃５０－ ６５－００）を含む色原体混合物。
【０２９４】
ＥＬＩＳＡのために、カーボネート／ビカーボネート中、プレートを７５μＬ／ウェル（

１ｐｇ／ｍＬ）のＢＳＬ３－Ｉｇで４℃にて一晩コーティングした。プレートをＰＢＳ Ｔｗｅｅｎ ２０（Ｓｋａｔｒｏｎを用いて）で洗浄し、室温で、３００μＬのブロック緩衝液で４５分間ブロックした。プレートを振りながら乾かし、ブロッキング緩衝液中で希釈した７５μＬ／ウェルの血清（血清は１：５０の割合で希釈した後、３の因数で段階希釈した）を室温で４５分間インキュベーションした。次いで、プレートを７５μＬ／ウェルの 抗マウス ＩｇＧブロッキング緩衝液（希釈率１：１００００；ＨＲＰ－標識；Ａｍｅｒｓｈａｍ Ｐｈａｒｍａｃｉａ Ｂｉｏｔｅｃｈ、Ｐｉｓｃａｔａｗａｙ、ＮＪ）中、室温で４５分間インキュベーションし、前記のとおりに洗浄した。その後で、プレートを１００μＬ／ウェルの発色原混合物とインキュベーションして、１５分間まで室温でインキュベーションすることができる。１００μＬの１Ｎ硫酸でシグナルをクエンチし、サンプルを４５０／６３０ ｎｍで読み取った。ＥＬＩＳＡを用いて、ハイブリドーマから得た上清をＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質に対して最初にスクリーニングし、次いでＩｇタンパク 単独に対してスクリーニングした。Ｉｇではなく、ＢＳＬ３－Ｉｇに結合する抗体を産生するハイブリドーマは、陽性のクローンとして指定した。

【０２９５】

サブクローニング ：最初の融合プレートから得た陽性クローンを増殖させた。増殖したら、細胞を２ラウンドの単一細胞クローニングに付してそれらがモノクローナルであることを確認した。各ハイブリドーマを９６ウェル組織培養プレートに０．５細胞／ウェルまたはそれ未満で加えた。肉眼で見えるコロニーが形成したら、上清をＥＬＩＳＡによりスクリーニングした。各ハイブリドーマからの陽性クローンの力価をＥＬＩＳＡにより測定した。最も強いシグナルをもたらしたクローンを増殖させて第２ラウンドのクローニングに付した。陽性クローンを再びＥＬＩＳＡによりスクリーニングし、力価を測定した。最も強力なシグナルをもたらしたクローンを増殖させておよび再び凍結した。

【０２９６】

ＥＸＡＭＰＬＥ ７：ＢＳＬモノクローナル抗体を用いる分析

ＢＳＬ１およびＢＳＬ２モノクローナル抗体ををを用いる肺上皮細胞のＦＡＣＳ分析：Ａ５４９、肺上皮細胞系を、Ｔ７５ フラスコ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ、ＮＪ；Ｃａｔ． ＃３５３１１１）中、１０％ ＦＢＳ（Ｓｕｍｍｉｔ、Ｆｔ Ｃｏｌｌｉｎｓ、ＣＯ；Ｃａｔ． ＃Ｓ－１００－０５）および １％ ペニシリン－ストレプトマイシン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ． ＃１５１４０－１２２）を添加したＲＰＭＩ １６４０（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ． ＃１１８７５－００５）にて、３７℃、５％ CO_2 で９０％コンフルエンスまで培養した。細胞をヴェルセン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ． ＃１５０４０－０６６）で取り上げＲＰＭＩ １６４０中で２回洗浄した。細胞を９６ウェルプレート（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｃａｔ． ＃３５３０７７）（２．５×10^5 細胞／ウェル）に加え、Ｂｅｃｋｍａｎ 卓上遠心機で２０００ ＲＰＭで遠心した。次に、細胞を、ＲＰＭＩ １６４０または１μｇのネガティブコントロール抗体（ＭＡｂ １５Ｅ１０ＡＡ３）を添加したＲＰＭ１１６４０またはまたはハイブリドーマ上清に再懸濁し、氷上で３０分間インキュベーションした。ついで細胞をＲＰＭ １６４０で２回洗浄し、ＲＰＭＩ １６４０中で１：５０に希釈したヤギ抗マウス 抗Ｆｃ ＦＩＴＣ コンジュゲート 抗体（ＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、Ｃａｍａｒｉｌｌｏ ＣＡ；Ｃａｔ． ＃ＡＭ１４４０８）に再懸濁した。その後、細胞を氷上で３０分間インキュベーションし、ＲＰＭＩ １６４０で２回洗浄し、ＲＰＭＩ １６４０に再懸濁し、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ ＦＡＣＳｃａｎで解析した。ＦＡＣＳ分析は、ＢＳＬ１ ＭＡｂ ３２Ｆ９Ａ７（図９Ａ）および ＢＳＬ２－４６１６８１１（図９Ｂ）ＭＡｂｓがすべてＡ５４９細胞に結合することを示した。.

【０２９７】

ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いる様々なタイプの細胞のＦＡＣＳ分析：ＢＳＬ３ ポリペプチドが様々なタイプの細胞の表面で発現するかどうかを調べるために、細胞を以下の表７に示す培地中で培養した。ＨＵＴ ７８に２０％ ＦＢＳ（Ｓｕｍｍｉｔ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ、Ｆｔ Ｃｏｌｌｉｎｓ、ＣＯ；Ｃａｔ． ＃Ｓ－１００－０５）を添

加した。他のすべての細胞系には、１０％ Ｓｕｍｍｉｔ ＦＢＳを添加した。さらに、すべての細胞系には１％ ペニシリン／ストレプトマイシン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１５１４０１２２）を添加した。すべての細胞系は３７℃、５％CO_2で培養した。

表７

細胞系	起源	培地
HL60	前骨髄性	ＲＰＭＩ 1640
THP1	単球	ＲＰＭＩ 1640
A549	肺上皮	ＲＰＭＩ 1640
H292	肺上皮	ＲＰＭＩ 1640
PM LCL	B lineage	ＲＰＭＩ 1640
PL LCL	B lineage	ＲＰＭＩ 1640
CE LCL	B lineage	ＲＰＭＩ 1640
Ramos	B lineage	ＲＰＭＩ 1640
OEM	T lineage	ＲＰＭＩ 1640
HUT78	T lineage	IMDM'
Jurkat	T lineage	ＲＰＭＩ 1640

[1] ＩＭＤＭ：ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１２４４０－０５３
[2] ＲＰＭＩ １６４０：ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１１８７５－００５

【０２９８】

細胞を約５×１０^{5}細胞／ｍＬまで増殖させた。細胞を血清不含ＲＰＭＩ １６４０中で２回洗浄し、再懸濁して２．５×１０^{6}細胞／ｍＬの終濃度にした。抗ＢＳＬ３ ＭＡｂ １Ａ４Ａ１ 抗体またはアイソタイプコントロールＭＡｂ １５Ｅ１０Ａ３ 抗体を５μｇ／ｍＬ加えおよび４℃にて３０分間インキュベーションした。細胞を血清不含ＲＰＭＩ １６４０中で２回洗浄し、ＦＩＴＣに結合した２％ ヤギ抗マウス ＩｇＧを添加した血清不含ＲＰＭＩ １６４０（ＢｉｏＳｏｕｒｃｅ、Ｃａｍａｒｉｌｌｏ、ＣＡ；Ｃａｔ．＃ＡＭ１４４０８）中に再懸濁した。細胞４℃で３０分間洗浄した。細胞を血清不含ＲＰＭＩ １６４０で２回洗浄し、Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ ＦＡＣＳｃａｎ（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｅｎｓｏｎ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ、ＮＪ）で解析した。ＢＳＬ３ ポリペプチドはＡ５４９（肺上皮）、Ｈ２９２（肺上皮）、ＰＭ ＬＣＬ（Ｂ ｌｉｎｅａｇｅ）、ＰＬ ＬＣＬ（Ｂ ｌｉｎｅａｇｅ）、ＣＥ ＬＣＬ（Ｂ ｌｉｎｅａｇｅ）、およびＨＵＴ７８（Ｔ ｌｉｎｅａｇｅ）細胞において発現した（図９Ｃ）。

【０２９９】

ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いるヒト臍静脈 内皮細胞のＦＡＣＳ分析：ＢＳＬ３モノクローナル抗体を使用して、ＴＮＦ－α刺激有りまたは無しで、ヒト臍静脈 内皮細胞におけるＢＳＬ３ ポリペプチドレベルを測定した。ヒト臍静脈 内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）は３７℃、５％CO_2にて、ＥＧＭ培地（Ｃｌｏｎｅｔｉｃｓ、Ｗａｌｋｅｒｓｖｉｌｌｅ、ＭＤ；Ｃａｔ．＃ＣＣ－４１７６）中でコンフルントになるまで培養した。ＴＮＦ－αは添加しないかまたは１０ ｎｇ／ｍＬを２４時間で添加する。細胞をヴェルセン（ＧｉｂｃｏＢＲＬ；Ｃａｔ．＃１５０４０－０６６）で取り上げ、および 上記の抗ＢＳＬ３ ＭＡｂ １Ａ４Ａ１ 抗体を用いるフローサイトメトトリーをために調製した。対照

として、フローサイトメトリーを抗体なしで行った。結果は、ＢＳＬ３ポリペプチドレベルがＴＮＦ－αで刺激されたＨＵＶＥＣにおいて増加することを示した（図９Ｄ）。この増加は、刺激されなかった細胞では観察されなかった（図９Ｄ）。ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いるヒト末梢血単核球のＦＡＣＳ分析：ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いて、ヒト末梢血単核球におけるＢＳＬ３ ポリペプチドレベルを、ＧＭ－ＣＳＦ ＩＬ－４またはＰＨＡ刺激有りまたは無しで測定した。末梢血単核球（ＰＢＭＣｓ）を以下のようにして精製した。血液サンプルを１２５０ｍＬのコニカルチューブに均等に分けた。エルトリエーション緩衝液１体積（室温で）を各サンプルに加えた。サンプルに１０ｍＬＬＳＭ（白血球分離混合物）ｆｉｃｏｌｌ 溶液を敷き、１８００ｒｐｍで２５分間遠心した。上層の赤身がかった物質を取り除き、ＬＳＭ層を新しいチューブに移した（ドナーあたり６ チューブ）。大部分のＰＢＭＣはＬＳＭ層の上層に観察された。エルトリエーション緩衝液（５０ ｍｌ）を各チューブに加え、混合物を １８００ｒｐｍで８分間遠心した。上清を吸引し、ＰＢＭＣを１５ｍＬのエルトリエーション緩衝液に再懸濁した。混合物を２つの新しい５０ｍＬコニカルチューブに移し（各チューブの全体積４５ｍＬ）、１０００ｒｐｍ で８分間遠心した。上清を吸引し、この操作をさらに２回繰り返した。

【０３００】

ＰＢＭＣを、２％ ＦＢＳを添加したＲＰＭＩ １６４０を含むフラスコに再懸濁し、３７℃、５％CO_2にて１時間培養した。フラスコを２０分間ごとに１回揺り動かした。フラスコを培地で静かに（２回）洗浄し、Ｔ細胞およびＢ細胞を取り出した。次にＲＰＭＩ １６４０ ＋ １０％ ＦＢＳおよび１ ％ ペニシリン／ストレプトマイシンでフラスコを十分に洗浄し、単球を得た。ＰＢＭＣを、１０％ ＦＢＳおよび１ ％ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ １６４０中で２回洗浄した。ＰＢＭＣを再懸濁して5×10^6細胞／ｍＬにし、フラスコに移した。ＰＢＭＣを３７℃、５％CO_2にて、刺激なしで４日間培養した。平行した実験では、ＰＢＭＣをＧＭ－ＣＳＦ（１５ ｎｇ／ｍＬ）および ＩＬ－４（７５ ｎｇ／ｍＬ）と４日間インキュベーションするか、またはＰＢＭＣをＰＨＡ（１μｇ／ｍＬ）と４日間インキュベーションした。フラスコＲＰＭＩ １６４０で十分に洗浄して単球を取り出した。ＰＢＭＣは、上記で様々な細胞系について記載したように、ＲＰＭＩ １６４０中で２回洗浄し、フローサイトメトリーにより試験した。結果は、ＢＳＬ３ ポリペプチドレベルがＧＭ－ＣＳＦ ＩＬ４またはＰＨＡ刺激によって増大することを示した（図９Ｅ－９Ｆ）。この増大は、刺激しなかった細胞においては観察されなかった（図９Ｅ－９Ｆ）。

【０３０１】

末梢血Ｔ細胞共刺激：９６ウェルプレート（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｃａｔ．＃３５３０７２）を、ＰＢＳ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ．＃１４１９０１４４）中の、示した量の抗 ＣＤ３ ＭＡｂ Ｇ１９．４（前に記載した）でコーティングした。プレートを４℃にて１６時間インキュベーションした。プレートをＰＢＳ中で２回洗浄した。次のタンパク質を加えた：ＰＢＳ中の、ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ（２０ μｇ／ｍＬ）、ＢＳＬ３－Ｉｇ（１５μｇ／ｍＬ）、またはＣｈｉ Ｌ６（１０ μｇ／ｍＬ）。Ｃｈｉ Ｌ６は、ヒトＩｇＧのＦｃ部分を含むタンパク断片であり、上記のＢＳＬ 融合タンパク質において使用されるＦｃ部分と同一である。種々の濃度のタンパクを用いて、同等のモル濃度にすることができる。プレートは３７℃にて４時間インキュベーションした。プレートをＰＢＳ中で２回洗浄した。末梢血Ｔ細胞は、上記の通りに精製した。１０％ ヒト血清（Ｓｉｇｍａ Ｃａｔ．＃Ｈ－４５２２）および １％ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ中で細胞を加えた（5×10^4細胞／ウェル）。細胞は３７℃、５％CO_2にて７２時間インキュベーションした。最後の８時間に、細胞を、５０μＣｉ／ｍＬ^{3}Ｈ－チミジン（ＮＥＮ Ｃａｔ．＃ＮＥＴ－０２７）を含むさらなる５０μＬの培地とインキュベーションした。細胞を、Ｐａｃｋａｒｄ ＧＦ／Ｃ プレート（Ｐａｃｋａｒｄ、Ｍｅｒｉｄｅｎ、ＣＴ；Ｃａｔ．＃６００５１７４）を用いて、Ｂｒａｎｄｅｌ細胞回収（Ｂｒａｎｄｅｌ、Ｇａｉｔｈｅｒｓｂｕｒｇ、ＭＤ）で集め、およびプレートを一晩風乾した。その後、５０μＬのＭｉｃｒｏｓｃｉｎｔ ２０（Ｐａｃｋａ

ｒｄ Ｃａｔ．＃６０１３６２１）を加え、および放射性標識をＰａｃｋａｒｄ Ｔｏｐｃｏｕｎｔ ＮＸＴで計測した。

【０３０２】

ＢＳＬ２およびＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた末梢血Ｔ細胞のブロック：９６ウェルプレート（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ Ｃａｔ．＃３５３０７２）を、ＰＢＳ（ＧｉｂｃｏＢＲＬ Ｃａｔ．＃１４１９０－１４４）中の２０μＬ／ｍＬのＭＡｂ Ｇ１９．４（前に記載した）でコーティングした。プレートを４℃にて１６時間インキュベーションした。プレートをＰＢＳ中で２回洗浄した。以下のタンパク質を加えた：ＰＢＳ中、ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ（２０ μｇ／ｍＬ）、ＢＳＬ３－Ｉｇ（１５μｇｇ／ｍＬ）、または（１０μｇ／ｍＬ）Ｌ６－Ｉｇ。種々の濃度のタンパクを用いて、同等のモル濃度にすることができる。プレートは３７℃にて４時間インキュベーションした。プレートをＰＢＳ中で２回洗浄した。末梢血Ｔ細胞は、上記の通りに精製した。１０％ ヒト血清（Ｓｉｇｍａ Ｃａｔ．＃Ｈ－４５２２）および １％ ペニシリン／ストレプトマイシンを添加したＲＰＭＩ中で細胞を加えた（５×１０^{4} 細胞／ウェル）。好ましいＢＳＬ２またはＢＳＬ３ ＭＡｂｓまたは対照のアイソタイプ ＭＡｂｓを加えて最終濃度２０μｇ／ｍＬにした。副刺激を分析するために、ＭＡｂｓは加えない。プレートを３７℃、５％CO_2 にて７２時間インキュベーションした。最後の８時間に、細胞を、５０μＣｉ／ｍＬ^{3} Ｈ－チミジン（ＮＥＮ Ｃａｔ．＃ＮＥＴ－０２７）を添加したさらなる５０μＬの培地とインキュベーションした。細胞を、Ｐａｃｋａｒｄ ＧＦ／Ｃ プレート（Ｃａｔ．＃６００５１７４）を用いて、Ｂｒａｎｄｅｌ細胞回収で集め、およびプレートを一晩風乾した。その後、５０μＬのＭｉｃｒｏｓｃｉｎｔ ２０（Ｐａｃｋａｒｄ Ｃａｔ．＃６０１３６２１）を加え、および放射性標識をＰａｃｋａｒｄ Ｔｏｐｃｏｕｎｔ ＮＸＴで計測した。

【０３０３】

結果は、ｒｅｓｕｌｔｓ ｉｎｄｉｃａｔｅｄ ｔｈａｔ ＢＳＬ２－４６１６８１１－ＩｇおよびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質が、ＣＤ３ ＭＡｂ Ｇ１９．４とインキュベートした末梢血Ｔ細胞に対する共刺激分子として作用するということを示した（図１０Ａ－１０Ｆ）。このことは、３つの別個な末梢血Ｔ細胞ドナー：ドナー０１０（図１０Ａ）；ドナー１２７（図１０Ｂ）；ドナー０７８（図１０Ｃ－１０Ｄ）；およびドナー１２４（図１０Ｅ－１０Ｆ）について確認された。結果はさらに、ＢＳＬ２およびＢＳＬ３ ＭＡｂｓがＢＳＬ２－４６１６８１１－ＩｇおよびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質の共刺激作用をそれぞれブロックすることを示した（図１０Ｇ－１０Ｊ）。このことは、２つの別個な末梢血Ｔ細胞ドナー：ドナー０１０（図１０Ｇ－１０Ｈ）；およびドナー１２７（図１０１－１０Ｊ）について確認された。本発明の範囲および精神から逸脱することなく、上記の組成物および方法において様々な変更が可能であり、上記の詳細な説明に記載された、添付の図面に示された、または添付の請求の範囲において定義された事項のすべては、説明を目的とするものであって、限定を意味するものではないということを意図する。

【０３０４】

ここに引用されたすべてのすべての特許、特許出願、公開された論文、書籍、リファレンス・マニュアル教科書、および要約の内容は、本発明が関係する技術水準をより完全に記述するために、その全内容が参考のために本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図１Ａ】ＴＮＦ－αで処置されたヒト微小血管内皮細胞から調製したｃＤＮＡライブラリーから単離された完全長クローンから決定した、ＢＳＬ１（配列番号１）のヌクレオチド配列を示す。；ヌクレオチド１－９２は５’－非翻訳領域を含み；ヌクレオチド９３－９５は、翻訳開始部位（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９３－９６２はタンパクコード領域をコードし；ヌクレオチド９６３－９６５は、翻訳終止シグナル（ＴＡＡ）を含み；ヌクレオチド９６３－１５７６は３’非翻訳領域を含み；およびヌクレオチド１５７７－１６０５はポリ（Ａ）＋ＲＮＡ尾部を含む。

【図１Ｂ】ＢＳＬ１（配列番号２）の推定アミノ酸配列を示す；アミノ酸１－２４０は、

推定細胞外ドメイン（ＥＣＤ）を含む。
【図１Ｃ】分化型ヒト単球から調製したｃＤＮＡライブラリーから単離された完全長クローンから決定した、ＢＳＬ１（配列番号３）のヌクレオチド配列を示す。；ヌクレオチド１－９２は５’非翻訳領域を含み；ヌクレオチド９３－９５は、翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９３－９６２はタンパクコード配列を含み；ヌクレオチド９６３－９６５は、翻訳終止シグナル（ＴＡＡ）を含み；およびヌクレオチド９６３－３６２１　３’非翻訳領域（独特配列を太字で示す）を含む。
【図２Ａ】ＢＳＬ１－Ｉｇ融合構築物（配列番号４）のヌクレオチド配列を示す；ヌクレオチド１－７２は、推定ＣＤ５シグナル配列をコードし；ヌクレオチド７３－７８はＳｐｅｌ開裂部位を含み；ヌクレオチド７８－７２９は推定ＢＳＬ１　ＥＣＤをコードし；ヌクレオチド７３０－１４４０は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分をコードし；およびヌクレオチド１４４１－１４４３は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図２Ｂ】ＢＳＬ１－Ｉｇ推定アミノ酸配列（配列番号５）を示す。
【図３Ａ】ＢＳＬ２－４６１６８１１クローンのヌクレオチド配列（配列番号６）を示す；ヌクレオチド１－１２はベクター配列を含み；ヌクレオチド１２１－１２３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み、ヌクレオチド２０４－２０５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド１５１６－１５８７は、推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド１７２３－１７２５は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図３Ｂ】ＢＳＬ２４６１６８１１クローンの推定アミノ酸配列を示す（配列番号７）；アミノ酸（１－４６５）は推定ＥＣＤを含む。
【図３Ｃ】ＢＳＬ２－Ｌ１６５－２１クローンのヌクレオチド配列（配列番号１０）を示す；ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）をコードし；ヌクレオチド８４－８５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド７４２－８１３は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド９４９－９５１は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図３Ｄ】ＢＳＬ２　Ｌ１６５－２１クローンの推定アミノ酸配列（配列番号　１１）を示す；アミノ酸１－２４７は推定ＥＣＤを含む。
【図３Ｅ】ＢＳＬ２－Ｌ１６５－３５ｂクローンのヌクレオチド配列（配列番号１２）を示し；ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）をコードし；ヌクレオチド８４－８５は推定シグナルペプチド開裂部位であり；ヌクレオチド７４２－８１３は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド９４９－９５１は、翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図３Ｆ】ＢＳＬ２　Ｌ１６５－３５ｂクローンの推定アミノ酸配列（配列番号１３）を示す；アミノ酸１－２４７は推定ＥＣＤを含む。
【図４Ａ】ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇクローンのヌクレオチド配列（配列番号８）を示す：ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド１－１３９４は天然ＢＳＬ２－４６１６８１１配列をコードし；ヌクレオチド１３９５は融合タンパク質の構築を促進するために導入されたサイレントな突然変異であり；ヌクレオチド１３９６－２０９７は、ヒトＩｇＧ１のＦｃ部分をコードし；ヌクレオチド２０９５－２０９７は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図４Ｂ】ＢＳＬ２－４６１６８１１－Ｉｇ融合タンパク質の推定アミノ酸配列（配列番号９）を示す；アミノ酸１－４６５はＢＳＬ２－４６１６８１１の天然配列を含み；アミノ酸４６６－６９８はヒトＩｇＧのＦｃ部分を含む。
【図５Ａ】図５ＡはＢＳＬ３のヌクレオチド配列（配列番号１４）を示す：ヌクレオチド１－３２６は５’非翻訳領域を含み；ヌクレオチド３２７－３２９は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド９８１－１０５５は推定膜貫通ドメインをコードし；ヌクレオチド１１４６－１１４８は翻訳終止シグナル（ＴＧＡ）を含む。
【図５Ｂ】ＢＳＬ３推定アミノ酸配列を示す（アミノ酸１－２７３）（配列番号１５）；アミノ酸１－２１９は推定ＥＣＤを含む。
【図６Ａ】ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）（配列番号１６）のヌクレオチド配列を示す

：ヌクレオチド１－３は翻訳開始シグナル（ＡＴＧ）を含み；ヌクレオチド１－６５１は、天然ＢＳＬ３配列をコードし；ヌクレオチド６５２－６５４は、構築の間に導入された人口配列をコードし；ヌクレオチド６５５－１３５６はヒトＩｇＧのＦｃドメインをコードする。

【図６Ｂ】ＢＳＬ３－Ｉｇ（Ｌ２３２－６）（配列番号１７）の推定アミノ酸配列を示す；アミノ酸１－２１７は天然ＢＳＬ３配列を示し；アミノ酸２１８は構築中に導入された人工配列を含み；アミノ酸２１９－４５１はヒトＩｇＧのＦｃドメインを含む。

【図７Ａ】ノーザンブロット分析に使用したＢＳＬ１プローブ（配列番号１８）のヌクレオチド配列を示す。

【図７Ｂ】ノーザンブロット分析に使用したＢＳＬ２プローブ（配列番号１９）のヌクレオチド配列を示す。

【図７Ｃ】ＢＳＬ３プローブ（配列番号２０）のヌクレオチド配列を示す。

【図７Ｄ】ノーザンブロット分析によって決定された様々な細胞において観察されたＢＳＬ１、ＢＳＬ３、およびＢＳＬ３ｍＲＮＡのレベルを示す；「ＰＢＴ」は、末梢血Ｔ細胞を示し；「ＣＤ３／ＣＤ２８」は抗ＣＤ３および抗ＣＤ２８抗体による刺激を示す；「ＰＭＡ」はホルボール１２ミリステート１３アセテートによる刺激を示す；「ＬＰＳ」はリポ多糖による刺激を示す；「ＰＢＭ」は、末梢血単球を示す；「ＰＨＡ」はフィトヘマグルチニンによる刺激を示す；「ＧＭ－ＣＳＦ／ＩＬ－４」はＧＭ－ＣＳＦおよびＩＬ－４による刺激を示す；「ＨＭＶＥＣ」はヒト血管微小血管内皮細胞を示す；「ＴＮＦα」はＴＮＦ－αによる刺激を示す；および「Ｈ２９２（飢餓状態）」は血清飢餓Ｈ２９２細胞を示す。

【図７Ｅ】放射性同位元素で標識したＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌプローブを用いて、商業的に入手可能なブロットのノーザン分析によって決定された様々な種類の組織における、ＢＳＬ３発現レベルを示す。

【図７Ｆ】放射性同位元素で標識した ＢＳＬ３／Ｋｐｎｌ＋Ｘｂａｌプローブを用いて、商業的に入手可能なマイクロアレイのハイブリダイゼーション分析によって決定された様々な種類の組織における、ＢＳＬ３発現レベルを示す。

【図７Ｇ】定量的ＰＣＲによって決定された様々な種類の組織におけるＢＳＬ１発現レベルを示す。

【図７Ｈ】定量的ＰＣＲによって決定された様々な種類の組織におけるＢＳＬ３発現レベルを示す。

【図８Ａ】ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの、Ｒａｊｉ、Ｒａｍｏｓ、ＰＭ－ＬＣＬ、およびＰＬ ＬＣＬ細胞タイプについての結果を示す。

【図８Ｂ】刺激有りまたは無しでの、ＣＥ－ＬＣＬ細胞、ＨＬ６０、Ｔｈｐ１、およびＨＵＶＥＣ細胞タイプについての結果を示す。

【図８Ｃ】ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの、末梢血Ｔ細胞についての結果を示す。２人の別々のドナー（ドナー０７９およびドナー１２４）から単離された細胞の結果を示す。

【図８Ｄ】ＰＭＡおよびイノマイシン刺激有りまたは無しでの、ＣＥＭおよびＨＵＴ７８細胞についての結果を示す。

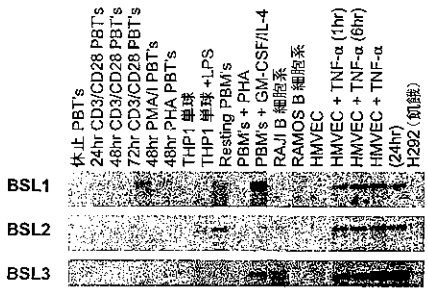
【図８Ｅ】テンプレートとしてＢＳＬ２－４６１６８１１プラスミドを用いたＰＣＲ反応の結果を示す。レーン１：λＢｓｔＥＩＩ ＤＮＡラダー；レーン２：ＰＣＲ産物。上の矢印は、ＢＳＬ２－４６１６８１１転写物からのＰＣＲ産物のサイズを示す。下の矢印は、ＢＳＬ２ Ｌ１６５－３５ｂ転写物についての推定ＰＣＲ産物のサイズを示す。結果は、フォワードプライマーが、ＢＳＬ２－４６１６８１１の第２の可変折り曲げ部におけるホモローガス部位よりも第１の可変折り曲げ部における特異的結合部位に優先的に結合することを示している。

【図９Ａ】ＢＳＬ１モノクローナル抗体を用いたＡ５４９上皮肺細胞のＦＡＣＳ分析を示す。カラム１：モノクローナル抗体なし；カラム２：アイソタイプ対照；カラム３：ＢＳＬ１ハイブリドーマ上清３２

【図９Ｂ】ＢＳＬ２４６１６８１１モノクローナル抗体を用いたＡ５４９上皮肺細胞のＦＡＣＳ分析を示す。カラム１：モノクローナル抗体なし；カラム２：アイソタイプ対照；カラム３：ＢＳＬ２ ＭＡｂ １Ｆ７Ｇ２；カラム４：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ２Ｂ１０Ｄ７；カラム５：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ３Ｅ６Ｄ３；カラム６：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ４Ｃ２Ｃ６；カラム７：ＢＳＬ２ Ｍａｂ ５Ｄ７Ｅ２。
【図９Ｃ】ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた種々の細胞タイプのＦＡＣＳ分析を示す。
【図９Ｄ】ＴＮＦ－α刺激有りまたは無しでの、ＢＳＬ３モノクローナル抗体を用いた、ヒト臍静脈内皮細胞（ＨＵＶＥＣ）のＦＡＣＳ分析を示す。
【図９Ｅ】ドナー１２６から単離された細胞の結果を示す。
【図９Ｆ】ドナー１４５から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ａ】ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｂ】ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｃ】ドナー７８から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｄ】ドナー７８から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｅ】ドナー１２４から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｆ】ドナー１２４から単離された細胞の結果を示す。
【図１０Ｇ】ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す。ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ２４６１６８１１－Ｉｇ（ＢＳＬ２ｖｃｖｃｉｇ）で刺激されＢＳＬ２モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム１：ＢＳＬ２－１Ｆ７Ｇ２ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ２－２Ｂ１０Ｄ７ ＭＡｂ；カラム３：ＢＳＬ２－３Ｅ６Ｄ３ ＭＡｂ；カラム４：ＢＳＬ２－５Ｄ７Ｅ２ ＭＡｂ；およびカラム５：アイソタイプ対照抗体。
【図１０Ｈ】ドナー０１０から単離された細胞の結果を示す。ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質で刺激されＢＳＬ３モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム １：ＢＳＬ３－１Ａ４Ａ１ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ３－２Ｂ６Ｈ７ ＭＡｂ；およびカラム３：アイソタイプ対照抗体。
【図１０Ｉ】ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ２４６１６８１１－Ｉｇ（ＢＳＬ２ｖｃｖｃｉｇ）で刺激されＢＳＬ２モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム１：ＢＳＬ２－１Ｆ７Ｇ２ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ２－２Ｂ１０Ｄ７ ＭＡｂ；カラム３：ＢＳＬ２－３Ｅ６Ｄ３ ＭＡｂ；カラム４：ＢＳＬ２－５Ｄ７Ｅ２ ＭＡｂ；およびカラム５：アイソタイプ対照抗体。
【図１０Ｊ】ドナー１２７から単離された細胞の結果を示す。ＣＤ３モノクローナル抗体およびＢＳＬ３－Ｉｇ融合タンパク質で刺激されＢＳＬ３モノクローナル抗体で遮断された細胞の結果を示す。カラム １：ＢＳＬ３－１Ａ４Ａ１ ＭＡｂ；カラム２：ＢＳＬ３－２Ｂ６Ｈ７ ＭＡｂ；およびカラム３：アイソタイプ対照抗体。

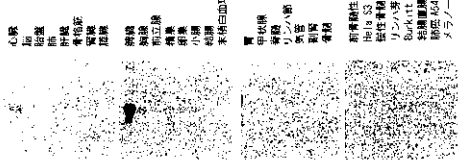
【図７Ｄ】

FIG. 7D



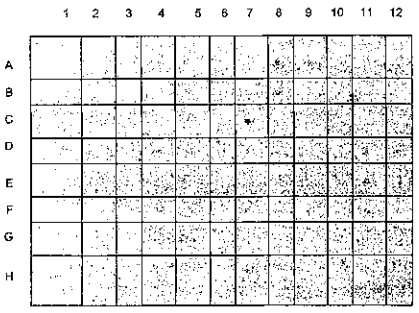
【図７Ｅ】

FIG. 7E



【図７Ｆ】

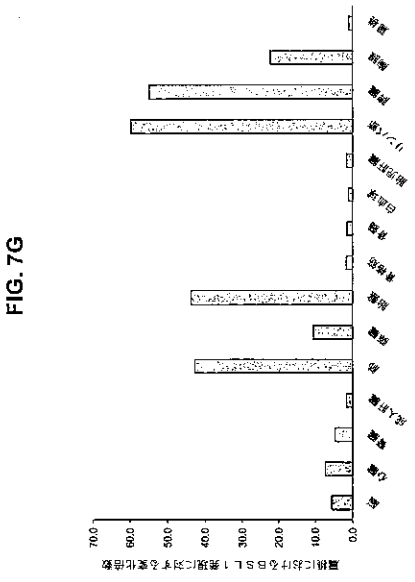
FIG. 7F



A１＝全脳
B１＝大脳皮質
C１＝前頭葉
D１＝頭頂葉
E１＝後頭葉
F１＝側頭葉
G１＝大脳皮質の中心前回
H１＝橋
A２＝左小脳
B２＝右小脳
C２＝脳梁
D２＝扁桃
E２＝尾状核
F２＝海馬
G２＝淡蒼
H２＝黒質
A３＝黒質
B３＝側座核
C３＝視床
D３＝下垂体
E３＝脊髄
F３＝ブランク
G３＝ブランク
H３＝ブランク
A４＝心臓
B４＝大動脈
C４＝左心房
D４＝右心房
E４＝左心室
F４＝右心室
G４＝心室中隔
H４＝心尖
A５＝食道
B５＝胃
C５＝十二指腸
D５＝空腸
E５＝回腸
F５＝回腸盲腸
G５＝盲腸
H５＝上行結腸
A６＝横行結腸
B６＝下降結腸
C６＝直腸
D６＝ブランク
E６＝ブランク
F６＝ブランク
G６＝ブランク
H６＝ブランク
A７＝腎臓
B７＝骨格筋
C７＝脾臓
D７＝胸腺
E７＝ＰＢＬ
F７＝リンパ節
G７＝骨髄
H７＝気管
A８＝肺
B８＝胎盤
C８＝膀胱
D８＝子宮
E８＝前立腺
F８＝精巣
G８＝卵巣
H８＝ブランク
A９＝肝臓
B９＝膵臓
C９＝副腎
D９＝甲状腺
E９＝唾液腺
F９＝乳腺
G９＝ブランク
H９＝ブランク
A１０＝白血病、ＨＬ－６０
B１０＝ＨｅＬａ Ｓ３
C１０＝白血病、Ｋ－５６２
D１０＝白血病、ＭＯＬＴ－４
E１０＝リンパ腫、Ｒａｊｉ
F１０＝リンパ腫、Ｄａｕｄｉ、
G１０＝結腸直腸、
癌、ＳＷ４８０
H１０＝肺癌、Ａ５４９
A１１＝胎児脳
B１１＝胎児心臓
C１１＝胎児腎臓
D１１＝胎児肝臓
E１１＝胎児横紋筋
F１１＝胎児脾臓
G１１＝胎児肺
H１１＝ブランク
A１２＝酵母全ＲＮＡ
B１２＝酵母全ｔＲＮＡ
C１２＝大腸菌ｒＲＮＡ
D１２＝大腸菌ＤＮＡ
E１２＝Ｐｏｌｙ ｒ（Ａ）
F１２＝ヒトＣｏｔ－１ＤＮＡ
G１２＝ヒトＤＮＡ１００ｎｇ
H１２＝ヒトＤＮＡ５００ｎｇ

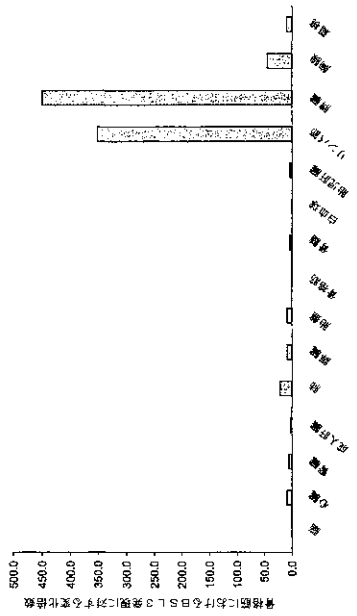
【図７Ｇ】

FIG. 7G



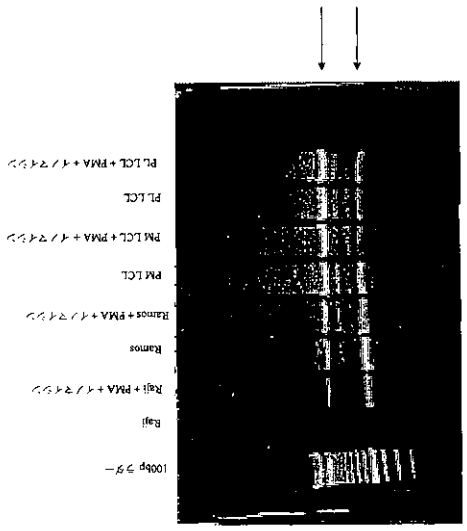
【図７Ｈ】

FIG. 7H



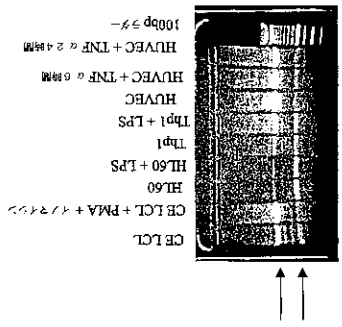
【図８Ａ】

FIG. 8A



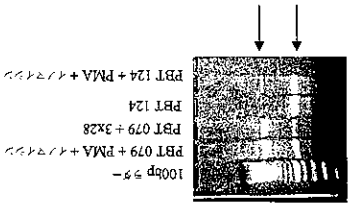
【図８Ｂ】

FIG. 8B



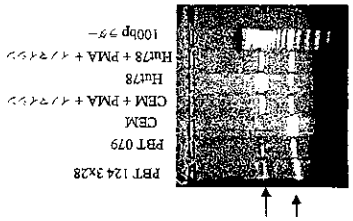
【図８Ｃ】

FIG. 8C



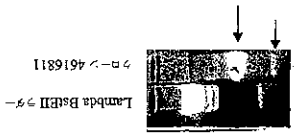
【図８Ｄ】

FIG. 8D



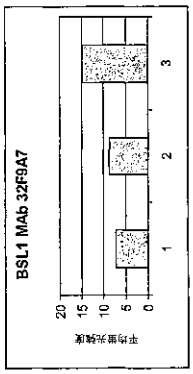
【図８Ｅ】

FIG. 8E



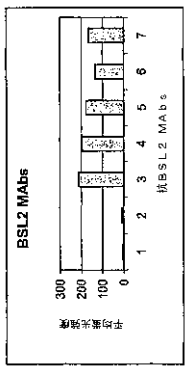
【図９Ａ】

FIG. 9A



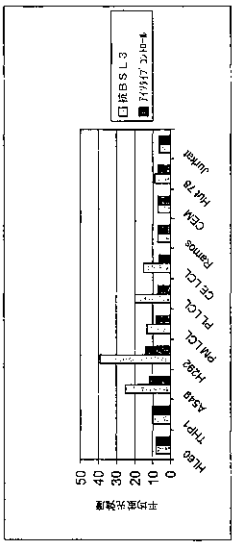
【図９Ｂ】

FIG. 9B



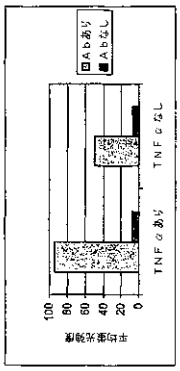
【図９Ｃ】

FIG. 9C



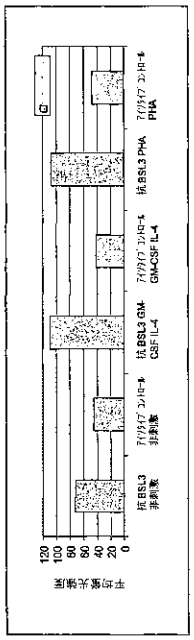
【図９Ｄ】

FIG. 9D



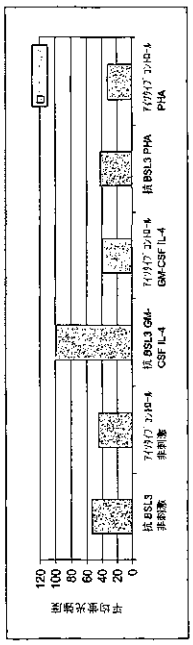
【図９Ｅ】

FIG. 9E



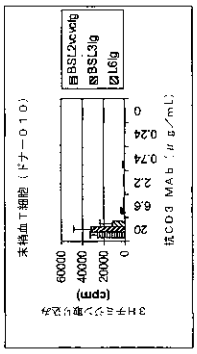
【図９Ｆ】

FIG. 9F



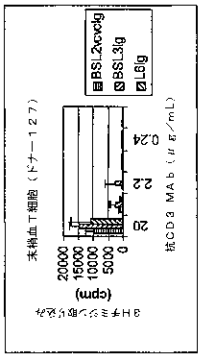
【図１０Ａ】

FIG. 10A



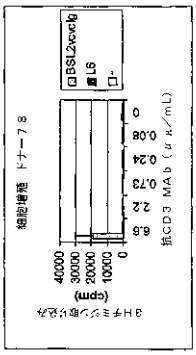
【図１０Ｂ】

FIG. 10B



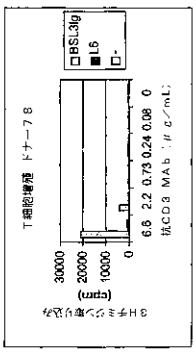
【図１０Ｃ】

FIG. 10C



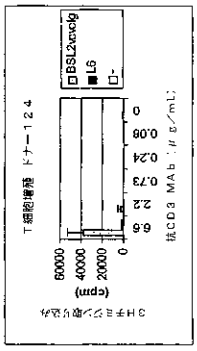
【図１０Ｄ】

FIG. 10D



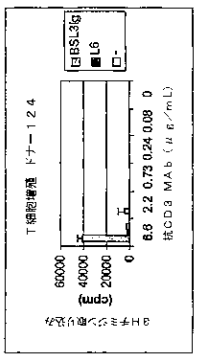
【図１０Ｅ】

FIG. 10E



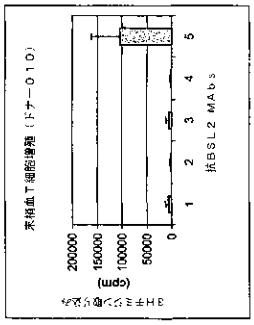
【図１０Ｆ】

FIG. 10F



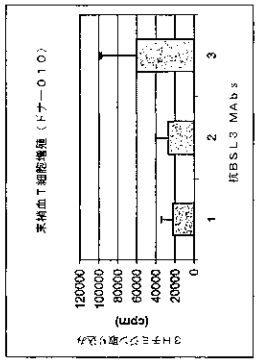
【図１０Ｇ】

FIG. 10G



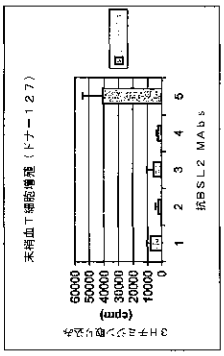
【図１０Ｈ】

FIG. 10H



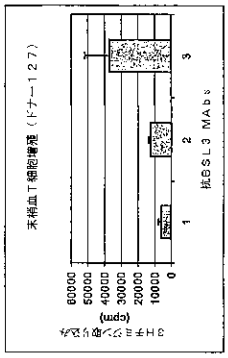
【図１０Ｉ】

FIG. 10I



【図１０Ｊ】

FIG. 10J



【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
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/94413 A2

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/705, C12N 15/12, 5/10, C07K 16/28, A61K 48/00, 38/17, 39/395, C12Q 1/68, G01N 33/53, A61K 39/395, A01K 67/027

(21) International Application Number: PCT/US01/18257

(22) International Filing Date: 6 June 2001 (06.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/209,811 6 June 2000 (06.06.2000) US
60/272,107 28 February 2001 (28.02.2001) US

(71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08540 (US).

(72) Inventors: MIKESELL, Glen, E.; 38 Bolton Road, Hamilton, NJ 08610 (US). CHANG, Han, 206 Salem Court No. 8, Princeton, NJ 08540 (US). FINGER, Joshua, N., 129 Winding Way, Yardley, PA 19067 (US). YANG, Guchen; 1 Makefield Road, Apartment D166, Morrisville, PA 19067 (US). LU, Pin; 19 Ivy Lane, Cherry Hill, NJ 08002 (US). ZHOU, Xia-Di; 15 Hampshire Drive, Plainsboro, NJ 08536 (US). PEACH, Robert, 10 High Point Drive, Churchville, PA 18966 (US).

(74) Agent: KLEIN, Christopher, A.; Bristol Myers Squibb Company, Patent Department, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08540 (US).

(81) Designated States (national): AU, CA, IL, JP, MX.

(84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

WO 01/94413 A2

(54) Title: B7 RELATED NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES USEFUL FOR IMMUNOMODULATION

(57) Abstract: The present invention provides nucleic acids encoding B7-related factors that modulate the activation of immune or inflammatory response cells, such as T cells. Also provided are expression vectors and fusion constructs comprising nucleic acids encoding B7-related polypeptides, including BSL1, BSL2, and BSL3. The present invention further provides isolated B7-related polypeptides, isolated fusion proteins comprising B7-related polypeptides, and antibodies that are specifically reactive with B7-related polypeptides, or portions thereof. In addition, the present invention provides assays utilizing B7-related nucleic acids, polypeptides, or peptides. The present invention further provides compositions of B7 related nucleic acids, polypeptides, fusion proteins, or antibodies that are useful for the immunomodulation of a human or animal subject.

B7-RELATED NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES USEFUL FOR IMMUNOMODULATION

RELATED APPLICATIONS

This application claims priority to U.S. Application Serial Number 60/209,811, filed June 6, 2000, and U.S. Application Serial Number 60/272,107, filed February 28, 2001, which are incorporated by reference in their entirety.

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to isolated nucleic acids encoding B7-related polypeptides, including BSL1, BSL2, and BSL3, which modulate cells that are important for immune and inflammatory responses, such as T-cells. Also related are expression vectors and fusion constructs comprising nucleic acids encoding B7-related polypeptides. The present invention further relates to isolated B7-related polypeptides, isolated fusion proteins comprising B7-related polypeptides, and antibodies that are specifically reactive with B7-related polypeptides, or portions thereof. In addition, the present invention relates to methods of isolating and identifying the corresponding counter-receptor(s) of the B7-related polypeptides, utilizing B7-related polypeptides, or fusion proteins. Also related are methods of immunomodulation of a subject by the administration of compositions of the B7-related polypeptides, fusion proteins, cognate antibodies, or portions or derivatives thereof. The present invention further relates to methods of immunomodulation of animal or human subjects by the administration of compositions of genetically engineered vectors comprising the B7-related polypeptide expression cassettes as disclosed herein.

BACKGROUND OF THE INVENTION

The primary response of T-cells, involving T-cell activation,

expansion, and differentiation is essential for the initiation of an immune response to a foreign antigen. The activation of T-cells by antigen presenting cells (APCs) requires at least two separate signals (K.E. Hellstrom et al. (1996) *Cancer Chemother. Pharmacol.* **38**:S40-1; N.K. Damle et al. (1992) *J. Immunol.* **148**:1985-92; J.M. Green et al. (1994) *Eur. J. Immunol.* **24**:265-72; E.C. Guinan et al. (1994) *Blood* **84**:3261-82; J.W. Hodge et al. (1995) *Cancer Res.* **55**:3598-603). The first signal causes T-cell entry into the cell cycle, and is mediated by foreign antigens presented by the major histocompatibility complex (MHC). The second signal, termed costimulation, causes cytokine production and T-cell proliferation, but is neither antigen-specific, nor MHC restricted (R.H. Schwartz (1990) *Science* **248**:1349-1356).

Costimulation is believed to be mediated by one or more distinct cells surface molecules expressed by APCs (M.K. Jenkins et al. (1988) *J. Immunol.* **140**:3324-3330; P.S. Linsley et al. (1991) *J. Exp. Med.* **173**:721-730; C.D. Gimmi, et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6575-6579; J.W. Young et al. (1992) *J. Clin. Invest.* **90**:229-237; L. Koulova et al. (1991) *J. Exp. Med.* **173**:759-762; H. Reiser et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**:271-275; G.A. van-Seventer et al. (1990) *J. Immunol.* **144**:4579-4586; J. M. LaSalle et al. (1991) *J. Immunol.* **147**:774-80; M. I. Dustin et al. (1989) *J. Exp. Med.* **169**:503; R.J. Armitage et al. (1992) *Nature* **357**:80-82; Y. Liu et al. (1992) *J. Exp. Med.* **175**:437-445). Considerable evidence suggests that B7, an APC cell-surface protein, is one such costimulatory molecule (P.S. Linsley et al. (1991) *J. Exp. Med.* **173**:721-730; C.D. Gimmi et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:6575-6579; L. Koulova et al. (1991) *J. Exp. Med.* **173**:759-762; H. Reiser et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 271-275; P.S. Linsley et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5031-5035; G.J. Freeman et al. (1991) *J. Exp. Med.* **174**:625-631).

B7 has been shown to bind to two counter-receptors (ligands)

expressed on T-cells, termed CD28 and CTLA-4. B7 binding to CD28 induces T-cells to proliferate and secrete IL-2 (P.S. Linsley et al. (1991) *J. Exp. Med.* 173, 721-730; C.D. Gimmi et al. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:6575-6579; C.B. Thompson et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1333-1337; C.H. June et al. (1990) *Immunol. Today* 11:211-6; F.A. Harding et al. (1992) *Nature* 356:607-609), allowing full T-cell activation. Conversely, B7 binding to CTLA-4 mediates T-cell down-regulation. The importance of the B7:CD28/CTLA-4 costimulatory pathway has been demonstrated *in vitro* and in several *in vivo* model systems. Blockade of this pathway results in the development of antigen specific tolerance in murine and humans systems (F.A. Harding et al. (1992) *Nature* 356:607-609; D.J. Lenschow et al. (1992) *Science* 257:789-792; L.A. Turka et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:11102-11105; C.D. Gimmi et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6586-6590). Conversely, the ectopic expression of B7 in B7 negative murine tumor cells induces T-cell mediated specific immunity accompanied by tumor rejection and long lasting protection to tumor challenge (L. Chen et al. (1992) *Cell* 71:1093-1102; S.E. Townsend et al. (1993) *Science* 259:368-370; S. Baskar et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5687-5690). Therefore, manipulation of the B7:CD28/CTLA-4 pathway offers great potential to stimulate or suppress immune responses in humans.

In addition to the previously characterized B7 molecule (referred to hereafter as B7-1) B7-1-like molecules have been identified (see, e.g., M. Azuma et al. (1993) *Nature* 366:76-79; C. Chen et al. (1994) *J. Immunol.* 152:4929-36; R.H. Reeves et al. (1997) *Mamm. Genome* 8:581-582; K. Ishikawa et al. (1998) *DNA Res.* 5:169-176; U.S. Patent No. 5,942,607 issued August 24, 1999 to Freeman et al.). In particular, PD-L1 and PD-L2 have been identified as inhibitors of T-cell activation (G.J. Freeman et al. (2000) *J. Exp. Med.* 192:1027-1034; Y. Latchman et al., (2001) *Nature Immunology* 2:261-268), whereas B7-H1, B7-H3, and B7-DC

have been described as co-stimulators of T-cell proliferation (H. Dong et al. (1999) *Nature Medicine* 5:1365-1369; A.I. Chapoval (2001) *Nature Immunology* 2:269-274; Tseng et al. (2001) *J. Exp. Med.* 193(7):839-45).

Thus, there is a growing family of factors related to B7-1, which modulate T-cell activation (reviewed by J. Henry et al. (1999) *Immunol. Today* 20:285-288). The identification, isolation, and characterization of B7-related factors are therefore important goals for the further understanding of T-cell activation and function in both normal and disease states in animals, particularly humans. Accordingly, the present invention discloses the discovery and characterization of three B7-related factors, termed BSL1, BSL2, and BSL3. Also disclosed are various assays and treatments utilizing the BSL1, BSL2, and BSL3 factors.

SUMMARY OF THE INVENTION

It is an object of the present invention to provide isolated nucleic acids encoding B7-related polypeptides that modulate inflammatory and immune responses, including T-cell activation. B7-related polypeptides within the scope of the invention include counter-receptors on the surface of APCs capable of binding CD28 and/or CD28-related ligand(s). Specifically, B7-related polypeptides include the BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptides, and soluble fragments or derivatives thereof. More specifically, the B7-related nucleic acid is:

i) a nucleic acid molecule comprising at least a fragment of a nucleotide sequence encoding a BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide;

ii) a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence encoding a polypeptide that shares moderate to substantial sequence homology with a BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide;

iii) a nucleic acid molecule capable of hybridizing to the BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) nucleotide sequences, or fragments thereof, under appropriate

conditions (e.g., moderate or high stringency hybridization conditions);

iv) a nucleic acid molecule which differs from the nucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) due to degeneracy in the genetic code, or recombinant or synthetic modifications; or

v) a nucleic acid molecule that shares at least substantial homology with the nucleic acid sequence set forth in SEQ ID NO:1, 3, 6, 10, 12, or 14.

In addition, nucleic acid probes useful for assaying a biological sample for the presence of APCs expressing the BSL1, BSL2, and BSL3 factors are encompassed by the present invention.

It is another object of the present invention to provide vectors (e.g., expression vectors) and fusion constructs comprising nucleic acids encoding B7-related polypeptides. Expression vectors direct the synthesis of the corresponding polypeptides or peptides in a variety of hosts, particularly eukaryotic cells, such as mammalian and insect cell culture, and prokaryotic cells, such as *Escherichia coli*. Expression vectors within the scope of the invention comprise a nucleic acid sequence encoding at least one B7-related polypeptide as described herein, and a promoter operatively linked to the nucleic acid sequence. In one embodiment, the expression vector comprises a DNA sequence encoding the extracellular domain of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) fused to a DNA sequence encoding the Fc region human immunoglobulin G1 (IgG1). Such expression vectors can be used to transform or transfect host cells to thereby produce polypeptides or peptides, including fusion proteins or peptides encoded by nucleic acid molecules as described herein.

It is yet another object of the present invention to provide isolated B7-related polypeptides, including the BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptides, or portions or derivatives thereof. Preferred B7-related polypeptides comprise the amino acid sequences of the BSL1 (SEQ ID

NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides, or portions thereof. Such polypeptides comprise at least a portion of the mature forms of the BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptides, and preferably comprise soluble forms of these polypeptides. Also encompassed by the present invention are polypeptides that share moderate to substantial homology with the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO:2, 7, 11, 13, or 15, which are naturally occurring isoforms of the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides, or modified recombinant polypeptides.

It is still another object of the present invention to provide isolated fusion proteins comprising the B7-related polypeptides, or portions or derivatives thereof, as disclosed herein. In one aspect, the fusion protein comprises an extracellular domain portion of a B7-related polypeptide fused to another polypeptide that alters the solubility, purification, binding affinity, and/or valency of the B7-related polypeptide. Preferably, a DNA molecule encoding an extracellular domain portion of the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides can be joined to DNA encoding the Fc region of human IgG1 to form DNA fusion products that encode the BSL1-Ig, BSL2-Ig, or BSL3-Ig fusion proteins.

It is a further object of the present invention to provide methods of isolating and identifying the corresponding counter-receptor(s) of the B7-related polypeptides, utilizing the isolated B7-related polypeptides, fusion proteins, or cognate antibodies disclosed herein. In one embodiment, isolated BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides, or portions thereof, can be incubated with protein extracts obtained from immune or inflammatory response cells, such as T-cells, to form a BSL/receptor complex, and then incubated with anti-BSL antibodies to isolate the BSL/receptor complex. Alternatively, a fusion protein comprising the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide can be incubated with protein extracts obtained from immune or inflammatory response cells, such as T-cells, and then incubated with antibodies that specifically react with the fusion protein. Receptors that bind to the B7-related polypeptides would be expected to

have significant immunomodulatory activity.

It is another object of the present invention to provide diagnostic methods and kits utilizing the B7-related factors of the present invention, including nucleic acids, polypeptides, antibodies, or functional fragments thereof. Such factors can be used, for example, in diagnostic methods and kits for measuring expression levels of B7-related factors, and to screen for various B7-related diseases. In addition, the B7-related nucleic acids described herein can be used to identify chromosomal abnormalities affecting BSL1, BSL2, or BSL3, and to identify allelic variants or mutations of BSL1, BSL2, or BSL3 in an individual or population.

It is yet another object of the present invention to provide isolated antibodies, including monoclonal and polyclonal antibodies, that are specifically reactive with the B7-related polypeptides, fusion proteins, or portions or derivatives thereof, as disclosed herein. Preferably, monoclonal antibodies are prepared to be specifically reactive with the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides, or portions or derivatives thereof.

It is another object of the present invention to provide methods of immunomodulation of a human or animal subject by the administration of compositions of the B7-related polypeptides, fusion proteins, or portions or derivatives thereof, as disclosed herein. Such compositions would be expected to up-regulate or down-regulate the activities of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells). For example, B7-related polypeptides in a composition may interact with CD28 and thereby up-regulate immune cell activity. Alternatively, B7-related polypeptides in a composition may interact with CTLA-4 and thereby down-regulate immune cell activity. In one embodiment, compositions of BSL1-Ig, BSL2-Ig, and BSL3-Ig, fusion proteins are administered, e.g. via injection, to a subject to provide systemic immunosupression or immunostimulation. Such compositions can be administered alone, or in combination with one or more immunomodulatory molecules.

It is still another object of the present invention to provide methods of immunomodulation of a human or animal subject by the administration of compositions of antibodies that are specifically reactive with the B7-related polypeptides, fusion proteins, or portions or derivatives thereof, as disclosed herein. Such compositions can be expected to block the co-stimulatory activities of the B7-related polypeptides, and to down-regulate immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells), accordingly. In one embodiment, compositions of monoclonal antibodies that are specifically reactive with the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides, or fragments thereof, are administered, e.g., via injection, to a subject to provide immunosupression or induced tolerance. Such compositions can be administered alone, or in combination with one or more immunomodulatory molecules. The methods of inducing tolerance described herein can be used prophylactically for preventing immune responses such as transplantation rejection (solid organ and bone marrow) and graft versus host disease, especially in autologous bone marrow transplantation. Such methods can also be useful therapeutically, in the treatment of autoimmune diseases, transplantation rejection, and established graft versus host disease in a subject.

It is a further object of the present invention to provide methods of the immunomodulation of a human or animal subject by the administration of compositions of genetically engineered vectors or cells comprising the B7-related polypeptide expression cassettes as disclosed herein. In a preferred embodiment, the cells are antigen presenting cells, such as a macrophages, which are transfected or transduced to allow expression of one or more of the B7-related polypeptides, including the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides, or fragments or derivatives thereof, and then introduced e.g., via transplantation, into the recipient. Consistent with the present invention, the genes encoding the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides can be transfected or transduced alone, or in combination with

genes encoding other immunomodulatory molecules.

Additional objects and advantages afforded by the present invention will be apparent from the detailed description and exemplification hereinbelow.

DESCRIPTION OF THE FIGURES

The appended drawings of the figures are presented to further describe the invention and to assist in its understanding through clarification of its various aspects. In the figures of the present invention, the nucleotide and amino acid sequences are represented by their one-letter abbreviations.

Figures 1A-1C illustrate the nucleotide and predicted amino acid sequence of BSL1. **Figure 1A** shows the nucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:1) determined from the full-length clone isolated from a cDNA library prepared from human microvascular endothelial cells treated with TNF-alpha; nucleotides 1-92 contain the 5'-untranslated region; nucleotides 93-95 contain the translation initiation signal (ATG); nucleotides 93-962 encode the protein coding region; nucleotides 963-965 contain the translation termination signal (TAA); nucleotides 963-1576 contain the 3'-untranslated region; and nucleotides 1577-1605 contain the poly(A)$^+$ RNA tail. **Figure 1B** shows the predicted amino acid sequence of BSL1 (SEQ ID NO:2); amino acids 1-240 contain the predicted extracellular domain (ECD). **Figure 1C** shows the nucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:3) determined from the full-length clone isolated from a cDNA library prepared from GM-CSF/IL-4 differentiated human monocyte cells; nucleotides 1-92 contain the 5'-untranslated region; nucleotides 93-95 contain the translation initiation signal (ATG); nucleotides 93-962 contain the protein coding sequence; nucleotides 963-965 contain the translation stop signal (TAA); and nucleotides 963-3621 contain the 3'-untranslated region (unique sequence is shown in bold).

Figures 2A-2B illustrate the nucleotide and predicted amino acid sequence of the BSL1-Ig fusion construct. **Figure 2A** shows the

nucleotide sequence of the BSL1-Ig fusion construct (SEQ ID NO:4); nucleotides 1-72 encode the predicted CD5 signal sequence; nucleotides 73-78 contain the *Spe*I restriction site; nucleotides 78-729 encode the predicted BSL1 ECD; nucleotides 730-1440 encode the Fc portion of human IgG1; and nucleotides 1441-1443 contain the translation stop signal (TGA). **Figure 2B** shows the BSL1-Ig predicted amino acid sequence (SEQ ID NO:5).

Figures 3A-3F illustrate the nucleotide and predicted amino sequences of the BSL2 clones. **Figure 3A** shows the nucleotide sequence of the BSL2-4616811 clone (SEQ ID NO:6); nucleotides 1-12 include vector sequence; nucleotides 121-123 contain the translation initiation signal (ATG); between nucleotides 204-205 is the predicted signal peptide cleavage site; nucleotides 1516-1587 encode the predicted transmembrane domain; nucleotides 1723-1725 contain the translation termination signal (TGA). **Figure 3B** shows the predicted amino acid sequence of the BSL2-4616811 clone (SEQ ID NO:7); amino acids (1-465) contain the predicted ECD. **Figure 3C** shows the nucleotide sequence of the BSL2-L165-21 clone (SEQ ID NO:10); nucleotides 1-3 encode the translation initiation signal (ATG); between nucleotides 84-85 is the predicted signal peptide cleavage site; nucleotides 742-813 encode the predicted transmembrane domain; nucleotides 949-951 contain the translation termination signal (TGA). **Figure 3D** shows the predicted amino acid sequence of the BSL2-L165-21 clone (SEQ ID NO:11); amino acids 1-247 contain the predicted ECD. **Figure 3E** shows the nucleotide sequence of the BSL2-L165-35b clone (SEQ ID NO:12); nucleotides 1-3 encode the translation initiation signal (ATG); between nucleotides 84-85 is the predicted signal peptide cleavage site; nucleotides 742-813 encode the predicted transmembrane domain; nucleotides 949-951 contain the translation termination signal (TGA). **Figure 3F** shows the predicted amino acid sequence of the BSL2-L165-35b clone (SEQ ID NO:13); amino acids 1-247 contain the predicted ECD.

Figures 4A-4B illustrate the nucleotide and predicted amino sequences of the of the BSL2-4616811-Ig fusion construct. **Figure 4A** shows the nucleotide sequence of the BSL2-4616811-Ig clone (SEQ ID NO:8): nucleotides 1-3 contain the translation initiation signal (ATG); nucleotides 1-1394 encode the native BSL2-4616811 sequence; nucleotide 1395 is a silent mutation introduced to facilitate construction of the fusion protein; nucleotides 1396-2097 encode the Fc portion of human IgG1; nucleotides 2095-2097 contain the translation termination signal (TGA). **Figure 4B** shows the predicted amino acid sequence of the BSL2-4616811-Ig fusion protein (SEQ ID NO:9); amino acids 1-465 of contain the native sequence of BSL2-4616811; amino acids 466-698 contain the Fc domain of human IgG.

Figures 5A-5B illustrate the nucleotide and predicted amino acid sequence of BSL3. **Figure 5A** shows the nucleotide sequence of BSL3 (SEQ ID NO:14): nucleotides 1-326 contain 5' untranslated region; nucleotides 327-329 contain the translation initiation signal (ATG); nucleotides 981-1055 encode a predicted transmembrane domain; nucleotides 1146-1148 contain the translation termination signal (TGA) **Figure 5B** shows the BSL3 predicted amino acid sequence (amino acids 1-273) (SEQ ID NO:15); amino acids 1-219 contain the predicted ECD.

Figures 6A-6B illustrate the nucleotide and predicted amino sequences of the of the BSL3-Ig fusion construct. **Figure 6A** shows the nucleotide sequence of BSL3-Ig (L232-6) (SEQ ID NO:16): nucleotides 1-3 contain the translation initiation signal (ATG); nucleotides 1-651 encode the native BSL3 sequence; nucleotides 652-654 encode an artificial sequence introduced during construction; nucleotides 655-1356 encode the Fc domain of human IgG. **Figure 6B** shows the predicted amino acid sequence of BSL3-Ig (L232-6) (SEQ ID NO:17); amino acids 1-217 contain the native BSL3 sequence; amino acid 218 contains an artificial sequence introduced during construction; amino acids 219-451 contain the Fc domain of human IgG.

Figures 7A-7H illustrate the reagents and results of expression analysis performed for BSL1, BSL2, and BSL3. **Figure 7A** shows the nucleotide sequence of the BSL1 probe (SEQ ID NO:18) used for northern blot analysis. **Figure 7B** shows the nucleotide sequence of the BSL2 probe (SEQ ID NO:19) used for northern blot analysis. **Figure 7C** shows the nucleotide sequence of the BSL3 probe (SEQ ID NO:20). **Figure 7D** shows the levels of BSL1, BSL3, and BSL3 mRNA observed in various cell types as determined by northern blot analysis; "PBT" indicates peripheral blood T-cells; "CD3/CD28" indicates stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies; "PMA" indicates stimulation with phorbol 12 myristate 13 acetate; "LPS" indicates stimulation with lipopolysaccharide; "PBM" indicates peripheral blood monocytes; "PHA" indicates stimulation with phytohemaglutinin; "GM-CSF/IL-4" indicates stimulation with GM-CSF and IL-4; "HMVEC" indicates human microvascular endothelial cells; "TNF-alpha" indicates stimulation with TNF-alpha; and "H292 (Starved) indicates serum starved H292 cells. **Figure 7E** shows BSL3 expression levels in various tissue types as determined by northern analysis of commercially available blots using radiolabeled BSL3/*Kpn*I+*Xba*I probe. **Figure 7F** shows BSL3 expression levels in various tissue types as determined by hybridization analysis of commercially available microarrays using radiolabeled BSL3/*Kpn*I+*Xba*I probe. **Figure 7G** shows BSL1 expression levels in various tissue types as determined by quantitative PCR. **Figure 7H** shows BSL3 expression levels in various tissue types as determined by quantitative PCR.

Figures 8A-8E illustrate the results of PCR analysis performed to determine the relative levels of the BSL2-4616811 or BSL2-L165-35b transcripts in various cell types, with or without stimulation. The top arrow points to the bands representing the BSL2-4616811 transcript; the bottom arrow points to the bands representing the BSL2-L165-35b transcript. **Figure 8A** shows the results for Raji, Ramos, PM-LCL, and PL-LCL cell types, with or without PMA and ionomycin stimulation. **Figure 8B**

shows the results for CE-LCL cells, HL60, Thp1, and HUVEC cell types, with or without stimulation. **Figure 8C** shows the results for peripheral blood T-cells with or without PMA and ionomycin stimulation. The results from cells isolated from two separate donors are shown (donor 079 and donor 124). **Figure 8D** shows the results for CEM and HUT78 cells, with or without PMA and ionomycin stimulation. **Figure 8E** shows the results of a PCR reaction using BSL2-4616811 plasmid as template. Lane 1: Lambda *Bst*EII DNA ladder; lane 2: PCR product. The upper arrow points to the size of the predicted PCR product from the BSL2-4616811 transcript. The lower arrow points to the size of the predicted PCR product for the BSL2-L165-35b transcript. The results demonstrate that the forward primer preferentially binds the specific binding site in the first variable fold rather than for the homologous site in the second variable fold of BSL2-4616811.

Figures 9A-9F illustrate the results of fluorescence activated cell sorting (FACS) performed using BSL1, BSL2, and BSL3 monoclonal antibodies. **Figure 9A** shows FACS analysis of A549 epithelial lung cells using BSL1 monoclonal antibodies. Column 1: no monoclonal antibodies; column 2: isotype control; column 3: BSL1 hybridoma supernatant 32. **Figure 9B** shows FACS analysis of A549 epithelial lung cells using BSL2-4616811 monoclonal antibodies. Column 1: no monoclonal antibodies; column 2: isotype control; column 3: BSL2 MAb 1F7G2; column 4: BSL2 Mab 2B10D7; column 5: BSL2 Mab 3E6D3; column 6: BSL2 Mab 4C2C6; column 7: BSL2 Mab 5D7E2. **Figure 9C** shows FACS analysis of various cell types using BSL3 monoclonal antibodies. **Figure 9D** shows FACS analysis of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with or without TNF-alpha stimulation using BSL3 monoclonal antibodies. **Figures 9E-9F** shows FACS analysis of peripheral blood monocytes (PBMCs) with or without GM-CSF/IL4 or PHA stimulation using BSL3 monoclonal antibodies. Figure 9E shows results from cells isolated from donor 126; Figure 9F shows results from cells isolated from donor 145.

Figures 10A-10E illustrate co-stimulation of peripheral blood T-cells using BSL2-4616811-Ig (BSL2vcvcIg) and BSL3-Ig fusion proteins in the presence of CD3 monoclonal antibody. The L6-Ig fusion protein is used as a negative control. **Figure 10A** shows results from cells isolated from donor 010. **Figure 10B** shows results from cells isolated from donor 127. **Figures 10C-10D** show results from cells isolated from donor 78. **Figures 10E-10F** show results from cells isolated from donor 124. **Figures 10G-10J** illustrate the blockade of co-stimulation of peripheral blood T-cells using BSL2 or BSL3 monoclonal antibodies. **Figures 10G and 10I** show the results from cells stimulated with CD3 monoclonal antibodies and BSL2-4616811-Ig (BSL2vcvcIg) and blockaded with BSL2 monoclonal antibodies. Column 1: BSL2-1F7G2 MAb; column 2: BSL2-2B10D7 MAb; column 3: BSL2-3E6D3 MAb; column 4: BSL2-5D7E2 MAb; and column 5: isotype control antibody. Figure 10G shows results from cells isolated from donor 010; Figure 10I shows results from cells isolated from donor 127. **Figures 10H and 10J** show the results from cells stimulated with CD3 monoclonal antibodies and BSL3-Ig fusion protein and blockaded with BSL3 monoclonal antibodies. Column 1: BSL3-1A4A1 MAb; column 2: BSL3-2B6H7 MAb; and column 3: isotype control antibody. Figure 10H shows results from cells isolated from donor 010; Figure 10J shows results from cells isolated from donor 127.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

Identification of B7-related factors

In accordance with the methods of the present invention, three B7-related factors, designated BSL1, BSL2, and BSL3, have been identified and characterized. Such B7-related factors may provide a molecular basis for the activation of immune or inflammatory response cells, such as T-cells, at different times and in different illnesses and disease states. In addition, the disclosed B7-related factors can be utilized in the prevention or treatment certain diseases by modulating the activity of immune or inflammatory response cells, such as T-cells, using the methods described

in detail herein. Such methods can be used as prophylaxis or treatments for cancers or immune-related disorders as detailed below.

Identification of B7-related genes from cDNA libraries: To identify B7-related factors, cDNA libraries can be constructed and analyzed using several well-established techniques. Messenger RNA can be obtained from cells expressing B7-1 and/or B7-related factors. For example, mRNA can be obtained from differentiated human peripheral blood mononuclear cells. Alternatively, mRNA can be obtained from various subsets of neoplastic B cells, including tumor cells isolated from patients with non-Hodgkin's lymphoma (L. Chaperot et al. (1999) *Exp. Hematol.* **27**:479-88). Such cells are known to express B7-1 and, thus, may express B7-related factors, and can also serve as a source of the mRNA for construction of the cDNA library.

Total cellular mRNA can be isolated by a variety of techniques, e.g., guanidinium-thiocyanate extraction (J.M. Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* **18**:5294-5299; Chomczynski et al. (1987) *Anal. Biochem.* **162**:156-9). Following isolation, poly(A)$^+$ RNA can be purified using oligo(dT) cellulose. The purified poly(A)$^+$ RNA can then be used as a template for cDNA synthesis utilizing reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR; see C.R. Newton et al. (1997) *PCR* 2nd Ed, Scientific Publishers, Oxford, England). Following reverse transcription, the cDNA can be converted to double stranded DNA using conventional techniques (see H. Okayama et al. (1982) *Mol. Cell. Biol.* **2**:161; U. Gubler et al. (1983) *Gene* **25**:263).

Cloning of the double stranded cDNAs can be accomplished using techniques that are well known in the art (see J. Sambrook et al. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY; F.M. Ausubel et al. (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY). The use of synthetic adaptors prior to cloning is particularly preferred, since it obviates the need for cleavage of the cDNA with one or more restriction enzymes (see, for

example, E.C. Bottger (1989) *Biotechniques* 7:925-6, 928-90). Using this method, non-self complementary, kinased adaptors can be added to the DNA prior to ligation with the vector. Virtually any adaptor can be employed.

A cDNA library sequence can be expressed when placed in the sense orientation in a vector that supplies an appropriate promoter. Vectors may also include an origin of replication and various enhancer sequences, splice acceptor/donor sequences, and polyadenylation sequences. Vectors may further include a marker that allows for selection of cells containing the vector construct. Markers may be an inducible or non-inducible gene and will generally allow for positive selection under induction, or without induction, respectively. Examples of marker genes include neomycin, dihydrofolate reductase, glutamine synthetase, and the like. Notably, prepared cDNA libraries can be obtained from various commercial sources (e.g., Incyte Genomics, Inc., St. Louis, MO; Stratagene, La Jolla, CA)

The cDNA library can be used to clone B7-related factors utilizing expression cloning techniques (see B. Seed et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3365-3369; A. Aruffo et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:8573-8577). In one embodiment, plasmid DNA is introduced into a cell line by known methods of transfection (e.g., DEAE-Dextran) and allowed to replicate and express the cDNA inserts. B7-1 antigen is depleted from the transfected cells using an anti-B7-1 monoclonal antibody (e.g., 133 and B1.1) and anti-murine IgG and IgM coated immunomagnetic beads. Transfectants expressing B7-related factors are positively selected by incubation with CTLA-4-Ig and CD28-Ig followed by panning with anti-human Ig immunoglobulin. After panning, episomal DNA is recovered from the panned cells and transfected into a competent bacterial host, preferably *Escherichia coli* (*E. coli*). Plasmid DNA is subsequently reintroduced into the cell line and the cycle of expression and panning repeated at least two times. Following the final panning cycle, plasmid DNA is prepared from individual colonies, transfected into the cell line and analyzed for expression

of the B7-related polypeptides by indirect immunofluorescence with CTLA-4-Ig and CD28-Ig. After cloning, plasmids are prepared from the clones strongly reactive with the CTLA-4-Ig, and then sequenced using conventional sequencing techniques (reviewed in G.W. Slater et al. (1998) *Electrophoresis* 19:1526-41).

Identification of B7-related genes in protein sequence databases: Alternatively, B7-related factors can be identified by screening available sequence databases. The polypeptide sequence encoded by a previously identified B7 factor (e.g., B7-1, B7-2, or B7-H1) or a B7-related factor disclosed herein (e.g., BSL1, BSL2, or BSL3), can be compared with the polypeptide sequences present in various protein databases. Publicly available protein sequence databases, e.g., GenBank, GenPept, SWISS-PROT, Protein Data Bank (PDB), Protein Information Resource (PIR), Human UniGene (National Center for Biotechnology Information), can be used to determine if additional B7-related factors are present in mammalian, preferably human, species. Alternatively, privately owned protein sequence databases, e.g., the Incyte Genomics sequence database (Incyte Genomics), can be used to identify B7-related factors. Databases with relatively few redundant sequences, e.g., PIR or SWISS-PROT databases, can be used to improve the statistical significance of a sequence match. However, databases which are more comprehensive and up-to-date, e.g., GenBank, GenPept, and Incyte Genomics sequence databases (Incyte Genomics), are preferred.

Any method known in the art can be used to align and compare the previously identified B7 factor sequence with the sequences present in the protein sequence databases. Preferably, the BLAST program is used (S.F. Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**:403-410; S. Karlin et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:2264-68; S. Karlin et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:5873-7). BLAST identifies local alignments between the sequence of the previously identified protein and the protein sequences in the database, and predicts the probability of the local

alignment occurring by chance. Although the original BLAST programs utilized ungapped local alignments, more recently developed BLAST programs such as WU-BLAST2/BLAST v2.0 (S. F. Altschul et al. (1996) Methods Enzymol. 266, 460-480) have been modified to incorporate gapped local alignments similar to SSEARCH (T.F. Smith et al. (1981) *J. Mol. Biol.* **147**:195-197) and FASTA programs (W.R. Pearson (1990) *Methods Enzymol.* **183**:63-98). In addition, position-specific-iterated BLAST (PSI-BLAST) programs have been developed to identify weak but biologically relevant sequence similarities (S.F. Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402). Furthermore, pattern-hit-initiated BLAST (PHI-BLAST) programs have been designed to identify specific patterns or sequence motifs shared by distantly-related proteins (Z. Zhang et al. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**:3986-3990). Specialized BLAST programs are also available for performing searches of human, microbial, and malaria genome sequences, as well as searches for vector, immunoglobulin, and predicted human consensus sequences (National Center for Biotechnology Information (NCBI), Bethesda, MD).

Both FASTA and BLAST programs identify very short exact sequence matches between the query sequence and the databases sequences, analyze the best short sequence matches ("hits") to determine if longer stretches of sequence similarity are present, and then optimize the best hits by dynamic programming (S.F. Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**:403-410; W.R. Pearson, *supra*). In contrast, the SSEARCH program compares the query sequence to all the sequences in the database via pair-wise sequence comparisons (T.F. Smith et al., *supra*). Thus, the SSEARCH program is considered more sensitive than the BLAST and FASTA programs, but it is also significantly slower. The BLAST and FASTA programs utilize several approximations to increase their searching speed, and utilize statistical parameters (see below) to increase sensitivity and selectivity to approximate the performance of the SSEARCH program. A particular sequence alignment program can be chosen based on the

requirements of a sequence search, or individual preferences. In some cases, it may be necessary to use more than one search alignment program to confirm search alignment results or resolve ambiguous search results.

Typically, BLAST analysis employs (i) a scoring matrix (such as, e.g., BLOSSUM 62 or PAM 120) to assign a weighted homology value to each residue and (ii) a filtering program(s) (such as SEG or XNU) that recognizes and eliminates highly repeated sequences from the calculation. An appropriate homology cutoff is then determined by performing BLAST comparisons (using a particular scoring matrix and filtering program) between sequences that are known to be related. It will be understood that other appropriate scoring matrices and filtering programs may be used when the cutoff is calibrated as described herein. That is, the particular cutoff point may vary when different standard parameters are used, but it will correspond to the P(N) scores exhibited when highly related sequences are compared using those particular parameters.

B7-related nucleic acids

One aspect of the present invention pertains to isolated nucleic acids having a nucleotide sequence such as BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14), or fragments thereof. The nucleic acid molecules of the invention can be DNA or RNA. A preferred nucleic acid is a DNA encoding the human BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or fragments or functional equivalents thereof. Such nucleic acids can comprise at least 15, 20, 25, 50, 60, 100, 200, 240, 255, 270, 300, 305, 310, 410, 500, 630, 700, or 1000 contiguous nucleotides.

The term "isolated" as used throughout this application refers to a B7-related nucleic acid, polypeptide, peptide, protein fusion, or antibody, that is substantially free of cellular material or culture medium. An isolated or substantially purified molecule contains less than about 50%, preferably less than about 25%, and most preferably less than about 10%, of the cellular components with which it was associated.

The term "functional equivalent" is intended to include nucleotide sequences encoding functionally equivalent B7-related factors. A functional equivalent of a B7-related protein includes fragments or variants that perform at least one characteristic function of the B7-related protein (e.g., ligand-binding, antigenic, intra-, or intercellular activity). For example, DNA sequence polymorphisms within the nucleotide sequence of a B7-related factor, especially those within the third base of a codon, may result in "silent" mutations, which do not affect the encoded amino acid sequence of the protein due to the degeneracy of the genetic code.

Preferred embodiments include an isolated nucleic acid sharing at least 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5, or 100% sequence identity with a polynucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:15). This polynucleotide sequence may be identical to the nucleotide sequences of BSL1 (SEQ ID NO:1 and 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14), or may include up to a certain integer number of nucleotide alterations as compared to the reference sequence.

"Identity," as known in the art, is a relationship between two or more polypeptide sequences or two or more polynucleotide sequences, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between polypeptide or polynucleotide sequences, as the case may be, as determined by the match between strings of such sequences. "Identity" and "similarity" can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in (*Computational Molecular Biology*, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; *Biocomputing. Informatics and Genome Projects*, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; *Computer Analysis of Sequence Data*, Part I, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; *Sequence Analysis in Molecular Biology*, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and *Sequence Analysis Primer*, Gribskov, M. and

Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM *J. Applied Math.*, **48**:1073 (1988).

For nucleic acids, sequence identity can be determined by comparing a query sequences to sequences in publicly available sequence databases (NCBI) using the BLASTN2 algorithm (S.F. Altschul et al., 1997, *Nucl. Acids Res.*, **25**:3389-3402). The parameters for a typical search are: E = 0.05, v = 50, B = 50, wherein E is the expected probability score cutoff, V is the number of database entries returned in the reporting of the results, and B is the number of sequence alignments returned in the reporting of the results (S.F. Altschul et al., 1990, *J. Mol. Biol.*, **215**:403-410).

In another approach, nucleotide sequence identity can be calculated using the following equation: % identity = (number of identical nucleotides) / (alignment length in nucleotides) * 100. For this calculation, alignment length includes internal gaps but not terminal gaps. Alternatively, nucleotide sequence identity can be determined experimentally using the specific hybridization conditions described below.

In accordance with the present invention, nucleic acid alterations are selected from the group consisting of at least one nucleotide deletion, substitution, including transition and transversion, insertion, or modification (e.g., via RNA or DNA analogs, dephosphorylation, methylation, or labeling). Alterations may occur at the 5' or 3' terminal positions of the reference nucleotide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the nucleotides in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. Alterations of a nucleic acid sequence of BSL1 (SEQ ID NO:1 and 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) may create nonsense, missense, or frameshift mutations in the coding sequence, and thereby alter the polypeptide encoded by the nucleic acid.

Also encompassed by the present invention are splice variants derived from the BSL1 (SEQ ID NO:1 and 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) nucleic acid sequences. As used herein, the

term "splice variant" refers to variant B7-related nucleic acids and polypeptides produced by differential processing of the primary transcript(s) of genomic DNA. An alternate splice variant may comprise, for example, any one of the sequences of BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12) disclosed herein. Alternate splice variants can also comprise other combinations of introns/exons of BSL1, BSL2, or BSL3, which can be determined by those of skill in the art. Alternate splice variants can be determined experimentally, for example, by isolating and analyzing cellular RNAs (e.g., Southern blotting or PCR), or by screening cDNA libraries using the B7-related nucleic acid probes or primers described herein. In another approach, alternate splice variants can be predicted using various methods, computer programs, or computer systems available to practitioners in the field.

General methods for splice site prediction can be found in Nakata, 1985, *Nucleic Acids Res.* 13:5327-5340. In addition, splice sites can be predicted using, for example, the GRAIL™ (E.C. Uberbacher and R.J. Mural, 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:11261-11265; E.C. Uberbacher, 1995, *Trends Biotech.*, 13:497-500; http://grail.lsd.ornl.gov/grailexp); GenView (L. Milanesi et al., 1993, *Proceedings of the Second International Conference on Bioinformatics, Supercomputing, and Complex Genome Analysis*, H.A. Lim et al. (eds), World Scientific Publishing, Singapore, pp. 573-588; http://l25.itba.mi.cnr.it/~webgene/wwwgene_help.html); SpliceView (http://www. itba.mi.cnr.it/webgene); and HSPL (V.V. Solovyev et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:5156-5163; V.V. Solovyev et al., 1994, "The Prediction of Human Exons by Oligonucleotide Composition and Discriminant Analysis of Spliceable Open Reading Frames," R. Altman et al. (eds), *The Second International conference on Intelligent systems for Molecular Biology*, AAAI Press, Menlo Park, CA, pp. 354-362; V.V. Solovyev et al., 1993, "Identification Of Human Gene Functional Regions Based On Oligonucleotide Composition," L. Hunter et al. (eds), *In Proceedings of First*

International conference on Intelligent System for Molecular Biology, Bethesda, pp. 371-379) computer systems.

Additionally, computer programs such as GeneParser (E.E. Snyder and G.D. Stormo, 1995, *J. Mol. Biol.* **248**: 1-18; E.E. Snyder and G.D. Stormo, 1993, *Nucl. Acids Res.* **21**(3): 607-613; http://mcdb.colorado.edu/~eesnyder/ GeneParser.html); MZEF (M.Q. Zhang, 1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**:565-568; http://argon.cshl.org/genefinder); MORGAN (S. Salzberg et al., 1998, *J. Comp. Biol.* **5**:667-680; S. Salzberg et al. (eds), 1998, *Computational Methods in Molecular Biology*, Elsevier Science, New York, NY, pp. 187-203); VEIL (J. Henderson et al., 1997, *J. Comp. Biol.* **4**:127-141); GeneScan (S. Tiwari et al., 1997, *CABIOS (BioInformatics)* **13**: 263-270); GeneBuilder (L. Milanesi et al., 1999, *Bioinformatics* **15**:612-621); Eukaryotic GeneMark (J. Besemer et al., 1999, *Nucl. Acids Res.* **27**:3911-3920); and FEXH (V.V. Solovyev et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* **22**:5156-5163). In addition, splice sites (i.e., former or potential splice sites) in cDNA sequences can be predicted using, for example, the RNASPL (V.V. Solovyev et al., 1994, *Nucleic Acids Res.* 22:5156-5163); or INTRON (A. Globek et al., 1991, INTRON version 1.1 manual, Laboratory of Biochemical Genetics, NIMH, Washington, D.C.) programs.

The present invention also encompasses naturally-occurring polymorphisms of BSL1 (SEQ ID NO:1 and 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14). As will be understood by those in the art, the genomes of all organisms undergo spontaneous mutation in the course of their continuing evolution generating variant forms of gene sequences (Gusella, 1986, *Ann. Rev. Biochem.* **55**:831-854). Restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) include variations in DNA sequences that alter the length of a restriction fragment in the sequence (Botstein et al., 1980, *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314-331 (1980). RFLPs have been widely used in human and animal genetic analyses (see WO 90/13668; WO 90/11369; Donis-Keller, 1987, *Cell* **51**:319-337; Lander et al., 1989,

Genetics 121: 85-99). Short tandem repeats (STRs) include tandem di-, tri- and tetranucleotide repeated motifs, also termed variable number tandem repeat (VNTR) polymorphisms. VNTRs have been used in identity and paternity analysis (U.S. Pat. No. 5,075,217; Armour et al., 1992, *FEBS Lett.* 307:113-115; Horn et al., WO 91/14003; Jeffreys, EP 370,719), and in a large number of genetic mapping studies.

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are far more frequent than RFLPS, STRs, and VNTRs. SNPs may occur in protein coding (e.g., exon), or non-coding (e.g., intron, 5'UTR, 3'UTR) sequences. SNPs in protein coding regions may comprise silent mutations that do not alter the amino acid sequence of a protein. Alternatively, SNPs in protein coding regions may produce conservative or non-conservative amino acid changes, described in detail below. In some cases, SNPs may give rise to the expression of a defective or other variant protein and, potentially, a genetic disease. SNPs within protein-coding sequences can give rise to genetic diseases, for example, in the β-globin (sickle cell anemia) and CFTR (cystic fibrosis) genes. In non-coding sequences, SNPs may also result in defective protein expression (e.g., as a result of defective splicing). Other single nucleotide polymorphisms have no phenotypic effects.

Single nucleotide polymorphisms can be used in the same manner as RFLPs and VNTRs, but offer several advantages. Single nucleotide polymorphisms tend to occur with greater frequency and are typically spaced more uniformly throughout the genome than other polymorphisms. Also, different SNPs are often easier to distinguish than other types of polymorphisms (e.g., by use of assays employing allele-specific hybridization probes or primers). In one embodiment of the present invention, a BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid contains at least one SNP. Various combinations of these SNPs are also encompassed by the invention. In a preferred aspect, a B7-related SNP is associated with a immune system disorder, such as the disorders described in detail herein.

Further encompassed by the present invention are nucleic

acid molecules that share moderate homology with the BSL1 (SEQ ID NO:1 and 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) nucleic acid sequences, and hybridize to the BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid molecules under moderate stringency hybridization conditions. More preferred are nucleic acid molecules that share substantial homology with the BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid sequences and hybridize to the BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid molecules under high stringency hybridization conditions. As used herein, the phrase "moderate homology" refers to sequences which share at least 60% sequence identity with a reference sequence (e.g., BSL1, BSL2 or BSL3), whereas the phrase "substantial homology" refers to sequences that share at least 90% sequence identity with a reference sequence. It is recognized, however, that polypeptides and the nucleic acids encoding such polypeptides containing less than the above-described level of homology arising as splice variants or that are modified by conservative amino acid substitutions (or substitution of degenerate codons) are contemplated to be within the scope of the present invention.

The phrase "hybridization conditions" is used herein to refer to conditions under which a double-stranded nucleic acid hybrid is formed from two single nucleic acid strands, and remains stable. As known to those of skill in the art, the stability of the hybrid sequence is reflected in the melting temperature (T_m) of the hybrid (see F.M. Ausubel et al., Eds, (1995) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY). The T_m decreases approximately 0.5°C to 1.5°C with every 1% decrease in sequence homology. In general, the stability of a hybrid sequence is a function of the length and guanine/cytosine content of the hybrid, the sodium ion concentration, and the incubation temperature. Typically, the hybridization reaction is initially performed under conditions of low stringency, followed by washes of varying, but higher, stringency. Reference to hybridization stringency relates to such washing conditions.

In accordance with the present invention, "high stringency"

conditions can be provided, for example, by hybridization in 50% formamide, 5 X Denhardt's solution, 5 X SSPE, and 0.2% SDS at 42°C., followed by washing in 0.1 X SSPE and 0.1% SDS at 65°C. By comparison, "moderate stringency" can be provided, for example, by hybridization in 50% formamide, 5 X Denhardt's solution, 5 X SSPE, and 0.2% SDS at 42°C, followed by washing in 0.2 X SSPE and 0.2% SDS at 65°C. In addition, "low stringency" conditions can be provided, for example, by hybridization in 10% formamide, 5 X Denhardt's solution, 6 X SSPE, and 0.2% SDS at 42°C, followed by washing in 1 X SSPE and 0.2% SDS at 50°C. It is understood that these conditions may be varied using a variety of buffers and temperatures well known to those skilled in the art.

In a preferred embodiment of the present invention, the nucleic acid is a DNA molecule encoding at least a portion of the B7-related factor. A nucleic acid molecule encoding a novel B7-related factor can be obtained from mRNA present in activated B lymphocytes. It may also be possible to obtain nucleic acid molecules encoding B7-related factors from B cell genomic DNA. Thus, a nucleic acid encoding a B7-related factor can be cloned from either a cDNA or a genomic library in accordance with the protocols described in detail herein. Nucleic acids encoding novel B7-related factors can also be cloned from genomic DNA or cDNA using established polymerase chain reaction (PCR) techniques (see K. Mullis et al. (1986) *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* **51**:260; K.H. Roux (1995) *PCR Methods Appl.* **4**:S185) in accordance with the nucleic acid sequence information provided herein. The nucleic acid molecules of the invention, or fragments thereof, can also be chemically synthesized using standard techniques. Various methods of chemically synthesizing polydeoxynucleotides are known, including solid-phase synthesis which, like peptide synthesis, has been fully automated in commercially available DNA synthesizers (see, for example, U.S. Patent No. 4,598,049 to Itakura et al.; U.S. Patent No. 4,458,066 to Caruthers et al.; U.S. Patent Nos. 4,401,796 and 4,373,071 to Itakura).

It will be appreciated by one skilled in the art that variations in one or more nucleotides (up to about 3-4% of the nucleotides) of the nucleic acid molecules encoding novel B7-related factors may exist among individuals within a population due to natural allelic variation. Any and all such nucleotide variations and resulting amino acid polymorphisms are within the scope of the invention. Furthermore, there may be one or more isoforms or related, cross-reacting family members of the B7-related factors described herein. Such isoforms or family members are defined as polypeptides that are related in function and amino acid sequence to a B7-related factor (e.g., BSL1, BSL2, or BSL3), but encoded by genes at different loci. In addition, it is possible to modify the DNA sequence of B7-related factors using genetic techniques to produce proteins or peptides with altered amino acid sequences.

DNA sequence mutations can be introduced into a nucleic acid encoding a B7-related factor by any one of a number of methods, including those for producing simple deletions or insertions, systematic deletions, insertions or substitutions of clusters of bases or substitutions of single bases, to generate desired variants. Mutations of the B7-related nucleic acid molecule to generate amino acid substitutions or deletions are preferably obtained by site-directed mutagenesis. Site directed mutagenesis systems are well known in the art, and can be obtained from commercial sources (see, for example, Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ). Guidance in determining which amino acid residues may be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity may be found using computer programs well known in the art, for example, DNASTAR software (DNASTAR, Inc., Madison, WI). Mutant forms of the BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid molecules are considered within the scope of the present invention, where the expressed polypeptide or peptide is capable modulating the activity of immune or inflammatory cells (e.g., T-cells).

A fragment of the nucleic acid molecule encoding a novel B7-

related factor is defined as a nucleotide sequence having fewer nucleotides than the nucleotide sequence encoding the entire amino acid sequence of the B7-related factor. Nucleic acid fragments which encode polypeptides which retain the ability to bind to their natural ligand(s) on immune or inflammatory response cells, such as T-cells, and either amplify or block immune responses (as evidenced by, for example, lymphokine production and/or T-cell proliferation by T-cells that have received a primary activation signal) are considered within the scope of the invention. For example, nucleic acid fragments that encode polypeptides or peptides of a B7-related factor that retain the ability of the polypeptides or peptides to bind CD28 and/or CD28-related ligand(s) and deliver a co-stimulatory signal to T-cells are within the scope of the invention. Generally, the nucleic acid molecule encoding a fragment of a B7-related factor will be selected from the coding sequence for the mature protein. However, in some instances it may be desirable to select all or part of a fragment or fragments from the coding region that includes the leader sequence.

In one embodiment of the present invention, a nucleic acid molecule corresponding to a fragment of a BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acid sequence can be used as a probe for assaying a biological sample for the expression of one or more B7-related factors, or as a primer for DNA sequencing or PCR amplification. Preferably, such fragments are at least 8 contiguous nucleotides in length, more preferably at least 12 contiguous nucleotides in length, even more preferably at least 15 contiguous nucleotides in length, and even more preferably at least 20 contiguous nucleotides in length. Nucleic acid molecules within the scope of the invention may also contain linker sequences, modified restriction endonuclease sites, and other sequences useful for molecular cloning, expression, or purification of recombinant protein or fragments thereof. Nucleic acid molecules in accordance with the present invention may also be conjugated with radioisotopes, or chemiluminescent, fluorescent, or other labeling compounds (e.g., digoxigenin). In addition, the nucleic acid

molecules of the present invention may be modified by nucleic acid modifying enzymes, for example, kinases or phosphatases. These and other modifications of nucleic acid molecules are well known in the art.

In addition, a nucleic acid molecule that encodes a B7-related factor, or a biologically active fragment thereof, can be ligated to a heterologous sequence to encode a fusion protein (also called a chimeric protein). For example, it may be useful to construct a nucleic acid encoding a fusion protein comprising a B7-related factor and the Fc domain of human IgG as described herein. The resulting BSL1-Ig, BSL2-Ig, and BSL3-Ig fusion proteins can then be expressed in host cells, and used to prepare pharmaceutical compositions useful for immunomodulation (see below). Fusion proteins comprising B7-related polypeptides can also be used for the isolation and purification of B7-related polypeptides or antibodies (see below). In addition, fusion proteins can be used to identify cellular ligands or binding partners for BSL1, BSL2, or BSL3 (see below).

B7-related nucleic acid expression vectors

Another aspect of the present invention pertains to expression vectors comprising a nucleic acid encoding at least one B7-related factor, as described herein, operably linked to at least one regulatory sequence. "Operably linked" is intended to mean that the nucleotide acid sequence is linked to a regulatory sequence in a manner that allows expression of the nucleotide sequence. Regulatory sequences are known in the art and are selected to direct expression of the desired protein in an appropriate host cell. Accordingly, the term regulatory sequence includes promoters, enhancers and other expression control elements (see D.V. Goeddel (1990) *Methods Enzymol.* 185:3-7). It should be understood that the design of the expression vector may depend on such factors as the choice of the host cell to be transfected and/or the type of polypeptide desired to be expressed.

Appropriate host cells for use with the present invention include bacteria, fungi, yeast, plant, insect, and animal cells, especially mammalian and human cells. Preferred replication and inheritance systems

include M13, ColE1, SV40, baculovirus, lambda, adenovirus, CEN ARS, 2μm ARS and the like. Several regulatory elements (e.g., promoters) have been isolated and shown to be effective in the transcription and translation of heterologous proteins in the various hosts. Such regulatory regions, methods of isolation, manner of manipulation, etc. are known in the art. Non-limiting examples of bacterial promoters include the β-lactamase (penicillinase) promoter; lactose promoter; tryptophan (trp) promoter; araBAD (arabinose) operon promoter; lambda-derived P_1 promoter and N gene ribosome binding site; and the hybrid tac promoter derived from sequences of the trp and lac UV5 promoters. Non-limiting examples of yeast promoters include the 3-phosphoglycerate kinase promoter, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) promoter, galactokinase (GAL1) promoter, galactoepimerase promoter, and alcohol dehydrogenase (ADH1) promoter. Suitable promoters for mammalian cells include, without limitation, viral promoters, such as those from Simian Virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV), adenovirus (ADV), and bovine papilloma virus (BPV).

Eukaryotic cells may also require terminator sequences, polyadenylation sequences, and enhancer sequences that modulate gene expression. Sequences that cause amplification of the gene may also be desirable. These sequences are well known in the art. Furthermore, sequences that facilitate secretion of the recombinant product from cells, including, but not limited to, bacteria, yeast, and animal cells, such as secretory signal sequences and/or preprotein or proprotein sequences, may also be included. Such sequences are well described in the art.

Suitable expression vectors include, but are not limited to, pUC, pBluescript (Stratagene), pET (Novagen, Inc., Madison, WI), and pREP (Invitrogen) plasmids. Vectors can contain one or more replication and inheritance systems for cloning or expression, one or more markers for selection in the host, e.g. antibiotic resistance, and one or more expression cassettes. The inserted coding sequences can be synthesized by standard

methods, isolated from natural sources, or prepared as hybrids. Ligation of the coding sequences to transcriptional regulatory elements (e.g., promoters, enhancers, and/or insulators) and/or to other amino acid encoding sequences can be carried out using established methods.

In one embodiment, the expression vector comprises a nucleic acid encoding at least a portion of the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide. In another embodiment, the expression vector comprises a DNA sequence encoding the B7-related factor and a DNA sequence encoding another B7-related factor or a heterologous polypeptide or peptide. Such expression vectors can be used to transfect host cells to thereby produce polypeptides or peptides, including fusion proteins or peptides encoded by nucleic acid molecules as described below.

Isolation of B7-related polypeptides

Yet another aspect of the present invention pertains to methods of isolating B7-related polypeptides and related peptides. As used herein, the terms "protein" and "polypeptide" are synonymous. Peptides are defined as fragments or portions of proteins or polypeptides, preferably fragments or portions having the same or equivalent function or activity as the complete protein. Both naturally occurring and recombinant forms of the B7-related polypeptides or peptides may be used in assays and treatments according to the present invention. Methods for directly isolating and purifying polypeptides or peptides from natural sources such as cellular or extracellular lysates are well known in the art (see E.L.V. Harris and S. Angal, Eds. (1989) *Protein Purification Methods: A Practical Approach*, IRL Press, Oxford, England). Such methods include, without limitation, preparative disc-gel electrophoresis, isoelectric focusing, high-performance liquid chromatography (HPLC), reversed-phase HPLC, gel filtration, ion exchange and partition chromatography, and countercurrent distribution, and combinations thereof. Naturally occurring polypeptides can be purified from many possible sources, for example, plasma, body cells and tissues, or body fluids.

To produce recombinant B7-related polypeptides or peptides, DNA sequences encoding the B7-related polypeptides or peptides are cloned into a suitable vector for expression in intact host cells or in cell-free translation systems (see J. Sambrook et al., *supra*). Prokaryotic and eukaryotic vectors and host cells may be employed. The particular choice of a vector, host cell, or translation system is not critical to the practice of the invention. DNA sequences can be optimized, if desired, for more efficient expression in a given host organism. For example, codons can be altered to conform to the preferred codon usage in a given host cell or cell-free translation system using techniques routinely practiced in the art.

For some purposes, it may be preferable to produce peptides or polypeptides in a recombinant system wherein the peptides or polypeptides carry additional sequence tags to facilitate purification. Such markers include epitope tags and protein tags. Non-limiting examples of epitope tags include c-myc, haemagglutinin (HA), polyhistidine (6X-HIS), GLU-GLU, and DYKDDDDK (FLAG®) epitope tags. Epitope tags can be added to peptides by a number of established methods. DNA sequences of epitope tags can be inserted into peptide coding sequences as oligonucleotides or through primers used in PCR amplification. As an alternative, peptide-coding sequences can be cloned into specific vectors that create fusions with epitope tags; for example, pRSET vectors (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Non-limiting examples of protein tags include glutathione-S-transferase (GST), green fluorescent protein (GFP), and maltose binding protein (MBP). Protein tags are attached to peptides or polypeptides by several well-known methods. In one approach, the coding sequence of a polypeptide or peptide can be cloned into a vector that creates a fusion between the polypeptide or peptide and a protein tag of interest. Suitable vectors include, without limitation, the exemplary plasmids, pGEX (Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ), pEGFP (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), and pMAL™ (New England BioLabs, Inc., Beverly, MA). Following expression, the epitope or

protein tagged polypeptide or peptide can be purified from a crude lysate of the translation system or host cell by chromatography on an appropriate solid-phase matrix. In some cases, it may be preferable to remove the epitope or protein tag (i.e., via protease cleavage) following purification.

Suitable cell-free expression systems for use in accordance with the present invention include rabbit reticulocyte lysate, wheat germ extract, canine pancreatic microsomal membranes, *E. coli* S30 extract, and coupled transcription/translation systems (Promega Corp., Madison, WI). These systems allow the expression of recombinant polypeptides or peptides upon the addition of cloning vectors, DNA fragments, or RNA sequences containing coding regions and appropriate promoter elements.

Host cells for recombinant cloning vectors include bacterial, archebacterial, fungal, plant, insect and animal cells, especially mammalian cells. Of particular interest are *E. coli, B. subtilis, S. aureus, S. cerevisiae, S. pombe, N. crassa*, SF9, C129, 293, NIH 3T3, CHO, COS, and HeLa cells. Such cells can be transformed, transfected, or transduced, as appropriate, by any suitable method including electroporation, $CaCl_2$-, LiCl-, LiAc/PEG-, spheroplasting-, Ca-Phosphate, DEAE-dextran, liposome-mediated DNA uptake, injection, microinjection, microprojectile bombardment, or other established methods.

In order to identify host cells that contain the expression vector, a gene that contains a selectable marker is generally introduced into the host cells along with the gene of interest. Preferred selectable markers include those that confer resistance to drugs, such as G418, hygromycin, methotrexate, or ampicillin. Selectable markers can be introduced on the same plasmid as the gene of interest. Host cells containing the gene of interest are identified by drug selection, as cells that carry the drug-resistance marker survive in growth media containing the corresponding drug.

The surviving cells can be screened for production of recombinant B7-related polypeptides, or peptides or fusions thereof. In one

embodiment, the recombinant polypeptides are secreted to the cell surface, and can be identified by cell surface staining with ligands to the B cell antigens (e.g., CD28-Ig). In another embodiment, the recombinant polypeptides are retained in the cytoplasm of the host cells, and can be identified in cell extracts using anti-B7-related polypeptide antibodies. In yet another embodiment, soluble recombinant polypeptides are secreted into the growth media, and can be identified by screening the growth media with anti-B7-related polypeptide antibodies. A soluble, secreted recombinant B7-polypeptide includes the extracellular domain of the polypeptide, or any fragment thereof, that does not include the cytoplasmic and/or transmembrane regions. The cell-surface and cytoplasmic recombinant B7-related polypeptides can be isolated following cell lysis and extraction of cellular proteins, while the secreted recombinant B7-related polypeptides can be isolated from the cell growth media by standard techniques (see I.M. Rosenberg, Ed. (1996) *Protein Analysis and Purification: Benchtop Techniques*, Birkhauser, Boston, Cambridge, MA).

Antibody-based methods can used to purify natural or recombinantly produced B7-related polypeptides or peptides. Antibodies that recognize these polypeptides, or peptides derived therefrom, can be produced and isolated using methods known and practiced in the art (see below). B7-related polypeptides or peptides can then be purified from a crude lysate by chromatography on antibody-conjugated solid-phase matrices (see E. Harlow and D. Lane, 1999, *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Other purification methods known and used in the art may also be employed.

It is noted that transfected host cells that express B7-related factors (e.g., BSL1, BSL2, and/or BSL3,) or portions thereof on the surface of the cell are within the scope of this invention. For example, a tumor cell such as a sarcoma, melanoma, leukemia, lymphoma, carcinoma, or neuroblastoma can be transfected with an expression vector directing the expression of at least one B7-related factor on the surface of the tumor cell.

Such transfected tumor cells can be used to treat tumor immunity as described in detail herein.

B7-related polypeptides

A further aspect of the present invention pertains to isolated B7-related polypeptides. The present invention encompasses the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides, and fragments and functional equivalents thereof. Such polypeptides can comprise at least 5, 12, 20, 30, 50, 100, 170, 200, 210, 300, or 500 contiguous amino acid residues. Preferred are polypeptides that share moderate homology with BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptides. More preferred are polypeptides that share substantial homology with BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15).

The term "functional equivalent" is intended to include proteins which differ in amino acid sequence from a given B7-related polypeptide, such as sequence of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide, but where such differences result in a modified protein which performs at least one characteristic function of the B7-related polypeptide (e.g., ligand-binding, antigenic, intra- or intercellular activity). For example, a functional equivalent of a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide may have a modification such as a substitution, addition or deletion of an amino acid residue which is not directly involved in the function of this polypeptide (i.e., the ability of these polypeptides to co-stimulate T-cell proliferation). In addition, non-naturally occurring analogs of B7-related polypeptides capable of binding CD28 and/or CD28-related ligand(s) are considered functional equivalents. Various modifications of the B7-related polypeptides to produce functional equivalents of these polypeptides are described in detail herein.

It is also possible to modify the structure of a B7-related polypeptide for such purposes as increasing solubility, enhancing therapeutic or prophylactic efficacy (reactivity), or stability (e.g., shelf life *ex*

vivo and resistance to proteolytic degradation *in vivo*). Such modified proteins are considered functional equivalents of the B7-related polypeptides as defined herein. Preferably, the B7-related polypeptides are modified so that they retain the ability to co-stimulate T-cell proliferation. Those residues shown to be essential to interact with the CD28 or CD28-related ligands on T-cells can be modified by replacing the essential amino acid with another, preferably similar amino acid residue (a conservative substitution) whose presence is shown to enhance, diminish, but not eliminate, or not effect receptor interaction. In addition, those amino acid residues that are not essential for receptor interaction can be modified by being replaced by another amino acid whose incorporation may enhance, diminish, or not effect reactivity. For example, a B7-related polypeptide can be modified by substitution of cysteine residues with other amino acids, such as alanine, serine, threonine, leucine, or glutamic acid, to prevent dimerization via disulfide linkages. In addition, the amino acid side chains of a B7-related polypeptide of the invention can be chemically modified. Also, a B7-related polypeptide can be modified by cyclization of the amino acid sequence.

In order to enhance stability and/or reactivity, the B7-related polypeptides can be altered to incorporate one or more polymorphisms in the amino acid sequence. Additionally, D-amino acids, non-natural amino acids, or non-amino acid analogs can be substituted or added to produce a modified polypeptide. Furthermore, the B7-related polypeptides disclosed herein can be modified using polyethylene glycol (PEG) according to known methods (Wie et al., *supra*) to produce a protein conjugated with PEG. In addition, PEG can be added during chemical synthesis of the protein. Other possible modifications include reduction/alkylation (Tarr (1986) *Methods of Protein Microcharacterization*, J. E. Silver, Ed., Humana Press, Clifton, NJ, pp. 155-194); acylation (Tarr, *supra*); chemical coupling to an appropriate carrier (Mishell and Shiigi, Eds. (1980) *Selected Methods in Cellular Immunology*, W H Freeman, San Francisco, CA; U.S. Patent No. 4,939,239;

or mild formalin treatment (Marsh (1971) *Int. Arch. of Allergy and Appl. Immunol.* 41:199-215) of the B7-related polypeptide.

Modified polypeptides can have conservative changes, wherein a substituted amino acid has similar structural or chemical properties, e.g., replacement of leucine with isoleucine. More infrequently, a modified polypeptide can have non-conservative changes, e.g., substitution of a glycine with a tryptophan. Guidance in determining which amino acid residues can be substituted, inserted, or deleted without abolishing biological or immunological activity can be found using computer programs well known in the art, for example, DNASTAR software (DNASTAR, Inc., Madison, WI)

As non-limiting examples, conservative substitutions in the B7-related amino acid sequence can be made in accordance with the following table:

Original Residue	Conservative Substitution(s)
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr

Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Substantial changes in function or immunogenicity can be made by selecting substitutions that are less conservative than those shown in the table, above. For example, non-conservative substitutions can be made which more significantly affect the structure of the polypeptide in the area of the alteration, for example, the alpha-helical, or beta-sheet structure; the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site; or the bulk of the side chain. The substitutions which generally are expected to produce the greatest changes in the polypeptide's properties are those where 1) a hydrophilic residue, e.g., seryl or threonyl, is substituted for (or by) a hydrophobic residue, e.g., leucyl, isoleucyl, phenylalanyl, valyl, or alanyl; 2) a cysteine or proline is substituted for (or by) any other residue; 3) a residue having an electropositive side chain, e.g., lysyl, arginyl, or histidyl, is substituted for (or by) an electronegative residue, e.g., glutamyl or aspartyl; or 4) a residue having a bulky side chain, e.g., phenylalanine, is substituted for (or by) a residue that does not have a side chain, e.g., glycine.

Preferred polypeptide embodiments further include an isolated polypeptide comprising an amino acid sequence sharing at least 60, 70, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99, 99.5 or 100% identity with an amino acid sequence of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15). This polypeptide sequence may be identical to the sequence of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or may include up to a certain integer number of amino acid alterations as compared to the reference sequence

Percent sequence identity can be calculated using computer programs or direct sequence comparison. Preferred computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, FASTA, BLASTP, and TBLASTN

(see, e.g., D.W. Mount, 2001, *Bioinformatics: Sequence and Genome Analysis*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). The BLASTP and TBLASTN programs are publicly available from NCBI and other sources. The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Exemplary parameters for amino acid sequence comparison include the following: 1) algorithm from Needleman and Wunsch, 1970, *J Mol. Biol.* 48:443-453; 2) BLOSSUM62 comparison matrix from Hentikoff and Hentikoff, 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919; 3) gap penalty = 12; and 4) gap length penalty =4. A program useful with these parameters is publicly available as the "gap" program (Genetics Computer Group, Madison, WI). The aforementioned parameters are the default parameters for polypeptide comparisons (with no penalty for end gaps).

Alternatively, polypeptide sequence identity can be calculated using the following equation: % identity = (the number of identical residues) / (alignment length in amino acid residues) * 100. For this calculation, alignment length includes internal gaps but does not include terminal gaps.

In accordance with the present invention, polypeptide sequences may be identical to the sequence of BSL1 (e.g., SEQ ID NO:2), BSL2 (e.g., SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (e.g., SEQ ID NO:15), or may include up to a certain integer number of amino acid alterations. Polypeptide alterations are selected from the group consisting of at least one amino acid deletion, substitution, including conservative and non-conservative substitution, or insertion. Alterations may occur at the amino- or carboxy-terminal positions of the reference polypeptide sequence or anywhere between those terminal positions, interspersed either individually among the amino acids in the reference sequence or in one or more contiguous groups within the reference sequence. In specific embodiments, polypeptide variants may be encoded by BSL1, BSL2, or BSL3 nucleic acids comprising single nucleotide polymorphisms and/or alternate splice variants. Polypeptides may also be modified by, for example,

phosphorylation, sulfation, or acylation. They may also be modified with a label capable of providing a detectable signal, either directly or indirectly, including, but not limited to, radioisotopes and fluorescent compounds.

The invention also relates to isolated, synthesized and/or recombinant portions or fragments of a BSL1 (e.g., SEQ ID NO:2), BSL2 (e.g., SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (e.g., SEQ ID NO:15) protein or polypeptide as described herein. Polypeptide fragments (i.e., peptides) can be made which have full or partial function on their own, or which when mixed together (though fully, partially, or nonfunctional alone), spontaneously assemble with one or more other polypeptides to reconstitute a functional protein having at least one functional characteristic of a BSL1, BSL2, or BSL3 protein of this invention. In addition, B7-related polypeptide fragments may comprise, for example, one or more domains of the polypeptide (e.g., the transmembrane or extracellular domain) disclosed herein.

The polypeptides of the present invention, including function-conservative variants, may be isolated from wild-type or mutant cells (e.g., human cells or cell lines), from heterologous organisms or cells (e.g., bacteria, yeast, insect, plant, and mammalian cells), or from cell-free translation systems (e.g., wheat germ, microsomal membrane, or bacterial extracts) in which a protein-coding sequence has been introduced and expressed. Furthermore, the polypeptides may be part of recombinant fusion proteins. The polypeptides can also, advantageously, be made by synthetic chemistry. Polypeptides may be chemically synthesized by commercially available automated procedures, including, without limitation, exclusive solid phase synthesis, partial solid phase methods, fragment condensation or classical solution synthesis. Both the naturally occurring and recombinant forms of the polypeptides of the invention can advantageously be used to screen compounds for binding activity. The polypeptides of the invention also find use as therapeutic agents as well as antigenic components to prepare antibodies as described in detail herein.

Antibodies to B7-related polypeptides

Another aspect of the present invention encompasses antibodies that specifically recognize B7-related polypeptides or peptides, preferably the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides, or fragments derived therefrom. As used herein, "antibody" refers to intact molecules as well as fragments thereof, such as Fab, $F(ab)_2$, and Fv, which are capable of binding an epitopic determinant. Antibodies that bind to a B7-related polypeptide, preferably the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide, can be prepared using the isolated B7-related polypeptide or peptide fragments as the immunogen or immunizing antigen by methods known in the art (see I. Lefkovits, Ed., (1996) *Immunology Methods Manual* Academic Press, Inc., San Diego, CA). As will be appreciated by those having skill in the art, the immunogen can be conjugated to a carrier protein, if desired, to increase immunogenicity, particularly, if a small peptide is used. Commonly used carriers that are routinely used chemically coupled to peptides include serum albumins, e.g., bovine, sheep, goat, or fish serum albumin, thyroglobulin, and keyhole limpet hemocyanin. The coupled immunogen-carrier is then used to immunize a recipient animal (e.g., mouse, rat, sheep, goat, or rabbit).

The term "antigenic determinant" refers to that fragment of a molecule (i.e., an epitope) that makes contact with a particular antibody. When the B7-polypeptide or peptide fragment is used to immunize a host animal, numerous regions of the polypeptide or peptide fragment may induce the production of antibodies which bind specifically to a given region or three-dimensional structure on the polypeptide or peptide. Such regions or structures are referred to as antigenic determinants or epitopes. An antigenic determinant may compete with the intact antigen (i.e., the immunogen used to elicit the immune response) for binding to an antibody. Preferred are those antigenic determinants that are specific for the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide or peptide. B7-related polypeptide- or peptide-derived

immunogens can be obtained using techniques as described above. For example, B7-related polypeptide or peptide fragments can be isolated from natural or recombinant sources and purified by excising the polypeptides or peptide fragments from gels, particularly SDS-PAGE gels.

BSL1-, BSL2-, or BSL3-specific antibodies according to the present invention include polyclonal and monoclonal antibodies. The antibodies can be elicited in an animal host by immunization with B7-related polypeptide-derived immunogenic components or can be formed by *in vitro* immunization (sensitization) of immune cells. The immunogenic components used as immunogens to elicit the production of antibodies can be isolated from plasma, recombinantly produced, or chemically synthesized. The antibodies can also be produced in recombinant systems programmed with appropriate antibody-encoding DNA. Alternatively, the antibodies can be constructed by biochemical reconstitution of purified heavy and light chains. The antibodies include hybrid antibodies, chimeric antibodies, humanized antibodies (see, for example, U.S. Patent No. 5,585,089 to C.J. Queen et al.) and univalent antibodies. Also included are Fab fragments, Fab' and $F(ab)_2$ fragments of antibodies. Notably, antibodies that specifically recognize either the secreted, cell surface form, or the cytoplasmic, soluble form of a B7-related factor can be isolated.

Hybridomas that produce monoclonal antibodies against the immunogenic components of the invention can be produced by well-known techniques. Hybridomas can be produced by the fusion of an immortalized cell line with a B-lymphocyte that produces the desired antibody. Alternatively, non-fusion techniques for generating immortal antibody-producing cell lines are possible, and are within the purview of the present invention (see Casali et al. (1986) *Science* **234**:476). Immortalized cell lines are typically transformed mammalian cells, particularly myeloma cells of rodent, bovine, and human origin. Most frequently, rat or mouse myeloma cell lines are employed as a matter of convenience and availability. Standard procedures can be used to select hybridomas, such as HAT

(hypoxanthine-aminopterin-thymidine) selection. Hybridomas that secrete desired monoclonal antibodies can be selected by assaying the cells' culture medium by standard immunoassays, such as immunoblotting, ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay; E. Engvall et al. (1971) *Immunochemistry*, 8:871-4; and D.J. Reen (1994) *Methods Mol. Biol.* 32:461-6), RIA (radioimmunoassay), or comparable assays. Antibodies can be recovered from the medium using standard protein purification techniques (see Tijssen (1985) *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays*, Elsevier, Amsterdam).

In one embodiment, antibodies that react with a B7-related polypeptide or peptide fragment are used in accordance with the present invention to identify or isolate a B7-related polypeptide or peptide fragment in a biological sample. To isolate a B7-related polypeptide from a sample, antibodies that specifically recognize and bind to a B7-related polypeptide or peptide fragment are conjugated to a solid support, the antibody-conjugated solid support is incubated with the sample or an aliquot of the sample, and the polypeptide or peptide that binds to the antibodies is eluted from the solid support. To detect a B7-related polypeptide or peptide fragment in a sample, the sample is incubated with antibodies that specifically recognize and bind to a B7-related polypeptide or peptide fragment under conditions that allow the antibodies to bind to the polypeptide or peptide fragment, and the binding of the antibodies to the B7-related polypeptide or peptide fragment is determined.

Assays utilizing B7-related nucleic acids or polypeptides

Expression analysis of B7-related factors: Several well-established techniques can be used to determine the expression levels, patterns, and cell-type specificity of the B7-related factors. For example, mRNA levels can be determined utilizing northern blot analysis (J.C. Alwine et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5350-5354; I.M. Bird (1998) *Methods Mol. Biol.* 105:325-36.), whereby poly(A)$^+$ RNA is isolated from cells, separated by gel electrophoresis, blotted onto a support surface (e.g.,

nitrocellulose or Immobilon-Ny+ (Millipore Corp., Bedford, MA)), and incubated with a labeled (e.g., fluorescently labeled or radiolabeled) oligonucleotide probe that is capable of hybridizing with the mRNA of interest. Alternatively, mRNA levels can be determined by quantitative (for review, see W.M. Freeman et al. (1999) *Biotechniques* 26:112-122) or semi-quantitative RT-PCR analysis (Ren et al. *Mol. Brain Res.* 59:256-63). In accordance with this technique, poly(A)$^+$ RNA is isolated from cells, used for cDNA synthesis, and the resultant cDNA is incubated with PCR primers that are capable of hybridizing with the template and amplifying the template sequence to produce levels of the PCR product that are proportional to the cellular levels of the mRNA of interest. Another technique, *in situ* hybridization, can also be used to determine mRNA levels (reviewed by A.K. Raap (1998) *Mutat. Res.* 400:287-298). *In situ* hybridization techniques allow the visual detection of mRNA in a cell by incubating the cell with a labeled (e.g., fluorescently labeled or digoxigenin labeled) oligonucleotide probe that hybridizes to the mRNA of interest, and then examining the cell by microscopy.

Chromosomal mapping of B7-related genes: The chromosomal location of B7-related genes can be determined by various techniques known in the art. For example, high-resolution chromosomal banding can be used (reviewed by M. Ronne (1990) *In Vivo* 4:337-65). High-resolution banding techniques utilize elongated chromosomes from cells at early mitotic stages, which have been synchronized using DNA-synthesis inhibitors (e.g., methotrexate or thymidine) or DNA-binding agents (e.g., ethidium bromide). However, these techniques can only be used to map a gene to a relatively large region of a chromosome (~3 Mb). For more accurate gene mapping, fluorescence *in situ* hybridization (FISH) techniques can be used. In particular, high-resolution FISH techniques (A. Palotie et al. (1996) *Ann. Med.* 28:101-106) utilize free chromatin, DNA fibers, or mechanically-stretched chromosomes to map gene sequences ranging from several kilobases to 300 kb in size. Alternatively, the chromosomal location

of a gene can be determined from the appropriate genome database, for example, the *Homo sapiens* genome database available at the Entrez Genome website (http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/entrez/query.fcgi?db=Genome; National Center for Biotechnology Information, Bethesda, MD)

Identification of T-cell ligands: The B7-related polypeptides or peptides disclosed herein can be used to identify their cognate ligands on immune or inflammatory response cells, such as T-cells (i.e., CD28- or CTLA-4-related ligands). Candidate ligands, or fragments derived therefrom, can be identified and analyzed by many well-known methods in the art (see T.E. Creighton, Ed., 1997, *Proteins Structure: A Practical Approach*, IRL Press at Oxford Press, Oxford, England). For example, T-cell ligands that bind to the B7-related polypeptides or peptides can be identified from extracts or lysates obtained from animal, preferably human, immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells). The proteins obtained from these sources can be separated into bands using sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transferred by electroblotting, for example, onto a suitable solid-phase support or membrane (e.g., nitrocellulose or polyvinylidene fluoride (PVDF)). The solid-phase support or membrane can then be incubated with a labeled form of a B7-related polypeptide or peptide, e.g., BSL1, BSL2, or BSL3 proteins that correspond to bands that exhibit specific binding with the labeled B7-related polypeptide or peptide can then be identified, isolated, purified, and analyzed by amino acid analysis and/or Edman degradation to determine the amino acid sequence of peptides derived therefrom.

As an alternative approach, a fusion protein comprising a B7-related polypeptide can be attached to a solid support and incubated with extracts obtained from cells, such as CHO or COS cells, that are transfected with an appropriate cDNA library. For example, a cDNA library can be constructed from resting or activated immortal human T-cell lines, such as CEM, HUT78, or Jurkat cell lines, or from resting or activated human T-cells

derived from peripheral blood, tonsil, spleen, thymus or other specialized lymphoid tissues. Such cells can be activated by the addition of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies, phytohemaglutinin (PHA), or phorbol 12-myristate-13-acetate (PMA) with ionomycin. The cDNA library construct can contain a removable epitope tag (see above) that is different from the fusion protein, and will facilitate purification of the library expression product(s) that associate with the fusion protein. The isolated library expression product(s) can then be isolated and characterized. In addition, a fusion protein comprising a B7-related polypeptide can be attached to a solid support (e.g., a column comprising beads that specifically bind to the fusion protein) and incubated with lysates obtained from cells, such as T-cells, that are enriched for integral membrane proteins. The cellular proteins that associate with the fusion protein can be isolated and then characterized using MALDI-TOF analysis (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time Of Flight Analysis; reviewed by Yates JR 3rd. (1998) *J. Mass Spectrom.* **33**:1-19; P. Chaurand et al. (1999) *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**:91-103). Fusion proteins can include, for example, FLAG®-(B.L. Brizzard et al. (1994) *Biotechniques* **16**:730-735), 6X-HIS, and GST-tagged fusion proteins (see above), which can be attached to solid supports that are conjugated with anti-FLAG® antibodies, nickel, or glutathione molecules, respectively. Methods of producing and purifying such fusion proteins are well known in the art.

Another suitable ligand-binding assay is the yeast two-hybrid system (Fields et al. (1989) *Nature* **340**:245-246; U.S. Patent No. 5,283,173). The two-hybrid system relies on the reconstitution of transcription activation activity by association of the DNA-binding and transcription activation domains of a transcriptional activator through protein-protein interaction. The yeast GAL4 transcriptional activator may be used in this way, although other transcription factors have been used and are well known in the art. To carryout the two-hybrid assay, the GAL4 DNA-binding domain and the GAL4 transcription activation domain are

expressed, separately, as fusions to potential interacting polypeptides. For example, one fusion protein can comprise a B7-related polypeptide fused to the GAL4 DNA-binding domain. The other fusion protein can comprise, for example, a T-cell cDNA library encoded polypeptide fused to the GAL4 transcription activation domain. If the two, coexpressed fusion proteins interact in the nucleus of a host cell, a reporter gene (e.g. LacZ) is activated to produce a detectable phenotype. The host cells that show two-hybrid interactions can be used to isolate the containing plasmids containing the cDNA library sequences. These plasmids can be analyzed to determine the nucleic acid sequence and predicted polypeptide sequence of the candidate T-cell ligand.

Related, *in vivo*, methods such as the three-hybrid (Licitra et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:12817-12821), and reverse two-hybrid (Vidal et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10315-10320) systems may serve as alternative approaches. Commercially available two-hybrid systems such as the CLONTECH Matchmaker™ systems and protocols (CLONTECH, Palo Alto, CA) may be also be used. (See also, A.R. Mendelsohn et al. (1994) *Curr. Op. Biotech.* **5**:482; E.M. Phizicky et al. (1995) *Microbiological Rev.* **59**:94; M. Yang et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**:1152; S. Fields et al. (1994) *Trends Genet.* **10**:286; and U.S. Patent No. 6,283,173 and 5,468,614).

Ligand sequence(s) obtained from ligand-binding assay(s) can be compared with subject sequences in available databases such as, without limitation, GenPept, SWISS-PROT, and Incyte Genomics databases (Incyte Genomics). These databases, which contain previously identified and annotated sequences, may be searched for the full-length polypeptide and gene sequence using, for example, BLAST analysis (see above). In cases where the full-length sequences of the ligands are not available, extended or overlapping partial clones may be obtained by techniques conventionally known and practiced in the art. Non-limiting examples of such techniques include hybridization to plasmid or phage libraries of

genomic DNA or cDNA; PCR from the same libraries using B7-related factor primer pairs; or hybridization or PCR directly to genomic DNA or cDNA. These clones may then be sequenced and assembled into full-length genes using the fragment sequence alignment program (PHRAP; Nickerson et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:2745-2751).

Assays for B7-related factor activity: Screening the fragments, mutants or variants for those which retain characteristic B7-related polypeptide activity as described herein can be accomplished using one or more of several different assays. For example, appropriate cells, such as CHO cells, can be transfected with the cloned variants and then analyzed for cell surface phenotype by indirect immunofluorescence and flow cytometry. Cell surface expression of the transfected cells is evaluated using a monoclonal antibody specifically reactive with a cell surface form of a B7-related factor (see above). Production of secreted forms of the B7-related factors can be evaluated by immunoprecipitation using a monoclonal antibody specifically reactive with a B7-related factor.

Other, more preferred, assays take advantage of the functional characteristics of the B7-related factors. As previously set forth, the binding of the B7-related factors to its T-cell ligand(s) causes the cells to produce increased levels of lymphokines, particularly of interleukin-2. Thus, B7-related factor function can be assessed by measuring the synthesis of lymphokines, such as interleukin-2 or other novel and as yet undefined cytokines, and/or assaying for T-cell proliferation by $CD28^+$ T-cells that have received a primary activation signal. Any one of several conventional assays for interleukin-2 can be employed (see C.B. Thompson (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1333).

The same basic functional assays can also be used to screen for B7-related polypeptides, peptides, fusion proteins, or antibodies that block T-cell activation. The ability of such proteins to block the normal costimulatory signal and induce a state of anergy can be determined using subsequent attempts at stimulation of the T-cells with antigen presenting

cells that express cell surface B cell activation antigen B7 and present antigen. If the T-cells are unresponsive to the activation attempts, as determined by IL-2 synthesis and T-cell proliferation, a state of anergy has been induced and can be determined by methods known in the art (see R.H. Schwartz (1990) *Science* 248:1349-1356).

Modulators of B7-related factors

The BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptides, polynucleotides, variants, or fragments thereof, can be used to screen for test agents (e.g., agonists, antagonists, or inhibitors) that modulate the levels or activity of the corresponding B7-related polypeptide. In addition, B7-related molecules can be used to identify endogenous modulators that bind to BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides or polynucleotides in the cell. In one aspect of the present invention, the full-length BSL1 (e.g., SEQ ID NO:2), BSL2 (e.g., SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (e.g., SEQ ID NO:15) polypeptide is used to identify modulators. Alternatively, variants or fragments of a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide are used. Such fragments may comprise, for example, one or more domains of the B7-related polypeptide (e.g., the extracellular and transmembrane domains) disclosed herein. Of particular interest are screening assays that identify agents that have relatively low levels of toxicity in human cells. A wide variety of assays may be used for this purpose, including *in vitro* protein-protein binding assays, electrophoretic mobility shift assays, immunoassays, and the like.

The term "modulator" as used herein describes any test agent, molecule, protein, peptide, or compound with the capability of directly or indirectly altering the physiological function, stability, or levels of the BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptide. Modulators that bind to the B7-related polypeptides or polynucleotides of the invention are potentially useful in diagnostic applications and/or pharmaceutical compositions, as described in detail herein. Test agents useful as modulators may encompass numerous chemical classes, though typically they are organic molecules, preferably small organic compounds having a molecular weight of more than 50 and

less than about 2,500 daltons. Such molecules can comprise functional groups necessary for structural interaction with proteins, particularly hydrogen bonding, and typically include at least an amine, carbonyl, hydroxyl or carboxyl group, preferably at least two of the functional chemical groups. Test agents which can be used as modulators often comprise cyclical carbon or heterocyclic structures and/or aromatic or polyaromatic structures substituted with one or more of the above functional groups. Test agents can also comprise biomolecules including peptides, saccharides, fatty acids, steroids, purines, pyrimidines, derivatives, structural analogs, or combinations thereof.

Test agents finding use as modulators may include, for example, 1) peptides such as soluble peptides, including Ig-tailed fusion peptides and members of random peptide libraries (see, e.g., Lam et al. (1991) *Nature* **354**:82-84; Houghten et al. (1991) *Nature* **354**:84-86) and combinatorial chemistry-derived molecular libraries made of D- and/or L-configuration amino acids; 2) phosphopeptides (e.g., members of random and partially degenerate, directed phosphopeptide libraries, see, e.g., Songyang et al., (1993) *Cell* **72**:767-778); 3) antibodies (e.g., polyclonal, monoclonal, humanized, anti-idiotypic, chimeric, and single chain antibodies as well as Fab, $F(ab')_2$, Fab expression library fragments, and epitope-binding fragments of antibodies); and 4) small organic and inorganic molecules.

Test agents and modulators can be obtained from a wide variety of sources including libraries of synthetic or natural compounds. Synthetic compound libraries are commercially available from, for example, Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, NJ), Brandon Associates (Merrimack, NH), and Microsource (New Milford, CT). A rare chemical library is available from Aldrich Chemical Company, Inc. (Milwaukee, WI). Natural compound libraries comprising bacterial, fungal, plant or animal extracts are available from, for example, Pan Laboratories (Bothell, WA). In addition, numerous means are available for

random and directed synthesis of a wide variety of organic compounds and biomolecules, including expression of randomized oligonucleotides.

Alternatively, libraries of natural compounds in the form of bacterial, fungal, plant and animal extracts can be readily produced. Methods for the synthesis of molecular libraries are readily available (see, e.g., DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:6909; Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11422; Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* **37**:2678; Cho et al. (1993) *Science* **261**:1303; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **33**:2061; and in Gallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* **37**:1233). In addition, natural or synthetic compound libraries and compounds can be readily modified through conventional chemical, physical and biochemical means (see, e.g., Blondelle et al. (1996) *Trends in Biotech.* **14**:60), and may be used to produce combinatorial libraries. In another approach, previously identified pharmacological agents can be subjected to directed or random chemical modifications, such as acylation, alkylation, esterification, amidification, and the analogs can be screened for BSL1-, BSL2-, and BSL3-modulating activity.

Numerous methods for producing combinatorial libraries are known in the art, including those involving biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the 'one-bead one-compound' library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to polypeptide libraries, while the other four approaches are applicable to polypeptide, non-peptide oligomer, or small molecule libraries of compounds (K. S. Lam, 1997, *Anticancer Drug Des.* **12**:145).

Libraries may be screened in solution (e.g., Houghten, (1992) *Biotechniques* **13**:412-421), or on beads (Lam, (1991) *Nature* **354**:82-84), chips (Fodor, (1993) *Nature* **364**:555-556), bacteria or spores (Ladner U.S. Pat. No. 5,223,409), plasmids (Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*

89:1865-1869), or on phage (Scott and Smith, (1990) *Science* **249**:386-390; Devlin, 1990, *Science* **249**:404-406; Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6378-6382; Felici, (1991) *J. Mol. Biol.* **222**:301-310; Ladner, *supra*).

Where the screening assay is a binding assay, a BSL1, BSL2, and BSL3 polypeptide, polynucleotide, analog, or fragment thereof, may be joined to a label, where the label can directly or indirectly provide a detectable signal. Various labels include radioisotopes, fluorescers, chemiluminescers, enzymes, specific binding molecules, particles, e.g. magnetic particles, and the like. Specific binding molecules include pairs, such as biotin and streptavidin, digoxin and antidigoxin, etc. For the specific binding members, the complementary member would normally be labeled with a molecule that provides for detection, in accordance with known procedures.

A variety of other reagents may be included in the screening assay. These include reagents like salts, neutral proteins, e.g. albumin, detergents, etc., that are used to facilitate optimal protein-protein binding and/or reduce non-specific or background interactions. Reagents that improve the efficiency of the assay, such as protease inhibitors, nuclease inhibitors, anti-microbial agents, etc., may be used. The components are added in any order that produces the requisite binding. Incubations are performed at any temperature that facilitates optimal activity, typically between 4° and 40°C. Incubation periods are selected for optimum activity, but may also be optimized to facilitate rapid high-throughput screening. Normally, between 0.1 and 1 hr (hour) will be sufficient. In general, a plurality of assay mixtures is run in parallel with different agent concentrations to obtain a differential response to these concentrations. Typically, one of these concentrations serves as a negative control, i.e. at zero concentration or below the level of detection.

To perform cell-free screening assays, it may be desirable to immobilize either the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide, polynucleotide, or

fragment to a surface to facilitate identification of modulators that bind to these molecules, as well as to accommodate automation of the assay. For example, a fusion protein comprising a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide and an affinity-tag can be produced as described in detail herein. In one embodiment, a GST-fusion protein comprising a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide is adsorbed onto glutathione sepharose beads (Sigma Chemical, St. Louis, MO) or glutathione-derivatized microtiter plates. Cell lysates (e.g., containing ^{35}S-labeled polypeptides) are added to the polypeptide-coated beads under conditions to allow complex formation (e.g., at physiological conditions for salt and pH). Following incubation, the polypeptide-coated beads are washed to remove any unbound polypeptides, and the amount of immobilized radiolabel is determined. Alternatively, the complex is dissociated and the radiolabel present in the supernatant is determined. In another approach, the beads are analyzed by SDS-PAGE to identify BSL1-, BSL2-, or BSL3-binding polypeptides.

Various binding assays can be used to identify agonist or antagonists that alter the function or levels of the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide. Such assays are designed to detect the interaction of test agents with BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides, polynucleotides, functional equivalents, or fragments thereof. Interactions may be detected by direct measurement of binding. Alternatively, interactions may be detected by indirect indicators of binding, such as stabilization/destabilization of protein structure, or activation/inhibition of biological function. Non-limiting examples of useful binding assays are detailed below.

Modulators that bind to BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides, polynucleotides, functional equivalents, or fragments thereof, can be identified using real-time Bimolecular Interaction Analysis (BIA; Sjolander et al. (1991) *Anal. Chem.* **63**:2338-2345; Szabo et al. (1995) *Curr. Opin. Struct. Biol.* 5:699-705; e.g., BIAcore™; LKB Pharmacia, Sweden). Modulators can also be identified by scintillation proximity assays (SPA, described in U.S. Patent No. 4,568,649). Binding assays using

mitochondrial targeting signals (Hurt et al. (1985) *EMBO J.* 4:2061-2068; Eilers and Schatz, (1986) *Nature* 322:228-231) a plurality of defined polymers synthesized on a solid substrate (Fodor et al. (1991) *Science* 251:767-773) may also be employed.

Two-hybrid systems may be used to identify modulators (see, e.g., U.S. Pat. No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Biotechniques* 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and Brent WO 94/10300). Alternatively, three-hybrid (Licitra et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:12817-12821), and reverse two-hybrid (Vidal et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:10315-10320) systems may be used. Commercially available two-hybrid systems such as the CLONTECH Matchmaker™ systems and protocols (CLONTECH Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) are also useful (see also, A.R. Mendelsohn et al. (1994) *Curr. Op. Biotech.* 5:482; E.M. Phizicky et al. (1995) *Microbiological Rev.* 59:94; M. Yang et al. (1995) *Nucleic Acids Res.* 23:1152; S. Fields et al. (1994) *Trends Genet.* 10:286; and U.S. Patent No. 6,283,173 and 5,468,614).

Several methods of automated assays have been developed in recent years so as to permit screening of tens of thousands of test agents in a short period of time. High-throughput screening methods are particularly preferred for use with the present invention. The binding assays described herein can be adapted for high-throughput screens, or alternative screens may be employed. For example, continuous format high throughput screens (CF-HTS) using at least one porous matrix allows the researcher to test large numbers of test agents for a wide range of biological or biochemical activity (see U.S. Patent No. 5,976,813 to Beutel et al.). Moreover, CF-HTS can be used to perform multi-step assays.

Diagnostics

According to another embodiment of the present invention, the B7-related polynucleotides, or fragments thereof, may be used for diagnostic purposes. The B7-related polynucleotides that may be used

include oligonucleotide sequences, complementary RNA and DNA molecules, and PNAs. The polynucleotides may be used to detect and quantify levels of BSL1, BSL2, and BSL3 mRNA in biological samples in which expression (or under- or overexpression) of BSL1, BSL2, and BSL3 polynucleotide may be correlated with disease. The diagnostic assay may be used to distinguish between the absence, presence, increase, and decrease of the expression of BSL1, BSL2, and BSL3, and to monitor regulation of BSL1, BSL2, and BSL3 polynucleotide levels during therapeutic treatment or intervention.

In one aspect, PCR probes can be used to detect B7-related polynucleotide sequences, including BSL1, BSL2, and BSL3 genomic DNA sequences and BSL1-, BSL2-, and BSL3-related nucleic acid sequences. The specificity of the probe, whether it is made from a highly specific region, e.g., at least 8 to 10 or 12 or 15 contiguous nucleotides in the 5' regulatory region, or a less specific region, e.g., especially in the 3' coding region, and the stringency of the hybridization or amplification (maximal, high, intermediate, or low) will determine whether the probe identifies only naturally occurring sequences encoding the B7-related polypeptide, alleles thereof, or related sequences.

Probes may also be used for the detection of BSL1-, BSL2-, and BSL3-related sequences, and should preferably contain at least 60%, preferably greater than 90%, identity to the BSL1, BSL2, and BSL3 polynucleotide, or a complementary sequence, or fragments thereof. The probes of this invention may be DNA or RNA, the probes may comprise all or a fragment of the nucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or a complementary sequence thereof, and may include promoter, enhancer elements, and introns of the naturally occurring BSL1, BSL2, or BSL3 polynucleotide.

Methods for producing specific probes for B7-related polynucleotides include the cloning of nucleic acid sequences of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or a

fragment thereof, into vectors for the production of mRNA probes. Such vectors are known in the art, commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by means of the addition of the appropriate RNA polymerases and the appropriate labeled nucleotides. Hybridization probes may be labeled by a variety of detector/reporter groups, e.g., radionucleotides such as ^{32}P or ^{35}S, or enzymatic labels, such as alkaline phosphatase coupled to the probe via avidin/biotin coupling systems, and the like.

A wide variety of labels and conjugation techniques are known and employed by those skilled in the art and may be used in various nucleic acid and amino acid assays. Means for producing labeled hybridization or PCR probes for detecting sequences related to polynucleotides encoding the BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide include oligo-labeling, nick translation, end-labeling, or PCR amplification using a labeled nucleotide. Alternatively, BSL1, BSL2, or BSL3 polynucleotide sequences, or any portions or fragments thereof, may be cloned into a vector for the production of an mRNA probe. Such vectors are known in the art, are commercially available, and may be used to synthesize RNA probes *in vitro* by addition of an appropriate RNA polymerase, such as T7, T3, or SP(6) and labeled nucleotides. These procedures may be conducted using a variety of commercially available kits (e.g., from Amersham Pharmacia Biotech, Inc., Piscataway, NJ; Promega Corp., Madison WI; and U.S. Biochemical Corp., U.S. Biochemical Amersham, Cleveland, OH). Suitable reporter molecules or labels which may be used include radionucleotides, enzymes, fluorescent, chemiluminescent, or chromogenic agents, as well as substrates, cofactors, inhibitors, magnetic particles, and the like.

B7-related polynucleotide sequences, or fragments, or complementary sequences thereof, can be used in Southern or Northern analysis, dot blot, or other membrane-based technologies; in PCR technologies; or in dip stick, pin, ELISA or biochip assays utilizing fluids or tissues from patient biopsies to detect the status of, e.g., levels or

overexpression of BSL1, BSL2, or BSL3, or to detect altered BSL1, BSL2, or BSL3 expression. Such qualitative or quantitative methods are well known in the art (G.H. Keller and M.M. Manak, 1993, *DNA Probes*, 2nd Ed, Macmillan Publishers Ltd., England; D.W. Dieffenbach and G. S. Dveksler, 1995, *PCR Primer: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, NY; B.D. Hames and S.J. Higgins, 1985, *Gene Probes 1*, 2, IRL Press at Oxford University Press, Oxford, England).

BSL1, BSL2, and BSL3 oligonucleotides may be chemically synthesized, generated enzymatically, or produced from a recombinant source. Oligomers will preferably comprise two nucleotide sequences, one with a sense orientation (5' → 3') and another with an antisense orientation (3' → 5'), employed under optimized conditions for identification of a specific gene or condition. The same two oligomers, nested sets of oligomers, or even a degenerate pool of oligomers may be employed under less stringent conditions for detection and/or quantification of closely related DNA or RNA sequences.

Methods suitable for quantifying the expression of B7-related factors include radiolabeling or biotinylating nucleotides, co-amplification of a control nucleic acid, and standard curves onto which the experimental results are interpolated (P.C. Melby et al. (1993) *J. Immunol. Methods* 159:235-244; and C. Duplaa et al. (1993) *Anal. Biochem.* 229-236). The speed of quantifying multiple samples may be accelerated by running the assay in an ELISA format where the oligomer of interest is presented in various dilutions and a spectrophotometric or colorimetric response gives rapid quantification.

In a particular aspect, a nucleic acid sequence complementary to a B7-related polynucleotide, or fragment thereof, may be useful in assays that detect diseases relating to aberrant immune responses, particularly those described herein. A BSL1, BSL2, and/or BSL3 polynucleotide can be labeled by standard methods, and added to a biological sample from a subject under conditions suitable for the formation of hybridization

complexes. After a suitable incubation period, the sample can be washed and the signal is quantified and compared with a standard value. If the amount of signal in the test sample is significantly altered from that of a comparable negative control (normal) sample, the altered levels of BSL1, BSL2, and/or BSL3 nucleotide sequence can be correlated with the presence of the associated disease. Such assays may also be used to evaluate the efficacy of a particular prophylactic or therapeutic regimen in animal studies, in clinical trials, or for an individual patient.

To provide a basis for the diagnosis of a disease associated with altered expression of one or more B7-related factors, a normal or standard profile for expression is established. This may be accomplished by incubating biological samples taken from normal subjects, either animal or human, with a sequence complementary to a BSL1, BSL2, BSL3 polynucleotide, or a fragment thereof, under conditions suitable for hybridization or amplification. Standard hybridization may be quantified by comparing the values obtained from normal subjects with those from an experiment where a known amount of a substantially purified polynucleotide is used. Standard values obtained from normal samples may be compared with values obtained from samples from patients who are symptomatic for the disease. Deviation between standard and subject (patient) values is used to establish the presence of the condition.

Once the disease is diagnosed and a treatment protocol is initiated, hybridization assays may be repeated on a regular basis to evaluate whether the level of expression in the patient begins to approximate that which is observed in a normal individual. The results obtained from successive assays may be used to show the efficacy of treatment over a period ranging from several days to months.

With respect to diseases involving a hyperactive or hypoactive immune response, the presence of an abnormal levels (decreased or increased) of B7-related transcript in a biological sample (e.g., body fluid, cells, tissues, or cell or tissue extracts) from an individual may indicate a

predisposition for the development of the disease, or may provide a means for detecting the disease prior to the appearance of actual clinical symptoms. A more definitive diagnosis of this type may allow health professionals to employ preventative measures or aggressive treatment earlier, thereby preventing the development or further progression of the disease.

In one particular aspect, BSL1, BSL2, and BSL3 oligonucleotides may be used for PCR-based diagnostics. For example, PCR can be used to perform Genetic Bit Analysis (GBA) of BSL1, BSL2, and/or BSL3 in accordance with published methods (T.T. Nikiforov et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**(20):4167-75; T.T. Nikiforov et al. (1994) *PCR Methods Appl.* **3**(5):285-91). In PCR-based GBA, specific fragments of genomic DNA containing the polymorphic site(s) are first amplified by PCR using one unmodified and one phosphorothioate-modified primer. The double-stranded PCR product is rendered single-stranded and then hybridized to immobilized oligonucleotide primer in wells of a multi-well plate. Notably, the primer is designed to anneal immediately adjacent to the polymorphic site of interest. The 3' end of the primer is extended using a mixture of individually labeled dideoxynucleoside triphosphates. The label on the extended base is then determined. Preferably, GBA is performed using semi-automated ELISA or biochip formats (see, e.g., S.R. Head et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**(24):5065-71; T.T. Nikiforov et al. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**(20):4167-75).

In another embodiment of the present invention, oligonucleotides, or longer fragments derived from at least one B7-related polynucleotide sequence described herein may be used as targets in a microarray (e.g., biochip) system. The microarray can be used to monitor the expression level of large numbers of genes simultaneously (to produce a transcript image), and to identify genetic variants, mutations, and polymorphisms. This information may be used to determine gene function, to understand the genetic basis of a disease, to diagnose disease, and to

develop and monitor the activities of therapeutic or prophylactic agents. Preparation and use of microarrays have been described in WO 95/11995 to Chee et al.; D.J. Lockhart et al. (1996) *Nature Biotechnology* **14**:1675-1680; M. Schena et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:10614-10619; U.S. Patent No. 6,015,702 to P. Lal et al.; J. Worley et al. (2000) *Microarray Biochip Technology*, M. Schena, ed., Biotechniques Book, Natick, MA, pp. 65–86; Y.H. Rogers et al. (1999) *Anal. Biochem.* **266**(1):23-30; S.R. Head et al. (1999) *Mol. Cell. Probes.* **13**(2):81-7; S.J. Watson et al. (2000) *Biol. Psychiatry* **48**(12):1147-56.

In one application of the present invention, microarrays containing arrays of B7-related polynucleotide sequences can be used to measure the expression levels of B7-related factors in an individual. In particular, to diagnose an individual with a condition or disease correlated with altered BSL1, BSL2, and/or BSL3 expression levels, a sample from a human or animal (containing, e.g., mRNA) can be used as a probe on a biochip containing an array of BSL1, BSL2, and/or BSL3 polynucleotides (e.g., DNA) in decreasing concentrations (e.g., 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, etc.). The test sample can be compared to samples from diseased and normal samples. Biochips can also be used to identify BSL1, BSL2, and BSL3 mutations or polymorphisms in a population, including but not limited to, deletions, insertions, and mismatches. For example, mutations can be identified by: (i) placing B7-related polynucleotides of this invention onto a biochip; (ii) taking a test sample (containing, e.g., mRNA) and adding the sample to the biochip; (iii) determining if the test samples hybridize to the B7-related polynucleotides attached to the chip under various hybridization conditions (see, e.g., V.R. Chechetkin et al. (2000) *J. Biomol. Struct. Dyn.* **18**(1):83-101). Alternatively microarray sequencing can be performed (see, e.g., E.P. Diamandis (2000) *Clin. Chem.* **46**(10):1523-5).

In another embodiment of this invention, a B7-related nucleic acid sequence, or a complementary sequence, or fragment thereof, can be used as probes which are useful for mapping the naturally occurring

genomic sequence. The sequences may be mapped to a particular chromosome, to a specific region of a chromosome, or to artificial chromosome constructions (HACs), yeast artificial chromosomes (YACs), bacterial artificial chromosomes (BACs), bacterial PI constructions, or single chromosome cDNA libraries (see C.M. Price (1993) *Blood Rev.*, 7:127-134 and by B.J. Trask (1991) *Trends Genet.* 7:149-154).

In a further embodiment of the present invention, antibodies which specifically bind to a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide may be used for the diagnosis of conditions or diseases characterized by underexpression or overexpression of the BSL1, BSL2, or BSL3 polynucleotide or polypeptide, or in assays to monitor patients being treated with a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide or peptide, or a BSL1, BSL2, or BSL3 agonist, antagonist, or inhibitor. The antibodies useful for diagnostic purposes may be prepared in the same manner as those for use in therapeutic methods, described herein. Diagnostic assays for a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide include methods that utilize the antibody and a label to detect the protein in biological samples (e.g., human body fluids, cells, tissues, or extracts of cells or tissues). The antibodies may be used with or without modification, and may be labeled by joining them, either covalently or non-covalently, with a reporter molecule. A wide variety of reporter molecules that are known in the art may be used, several of which are described herein.

A number of fluorescent materials are known and can be utilized to label a B7-related polypeptide or antibodies that specifically bind thereto. These include, for example, fluorescein, rhodamine, auramine, Texas Red, AMCA blue and Lucifer Yellow. A particular detecting material is anti-rabbit antibody prepared in goats and conjugated with fluorescein through an isothiocyanate. B7-related polypeptides or antibodies thereto can also be labeled with a radioactive element or with an enzyme. The radioactive label can be detected by any of the currently available counting procedures. Preferred isotopes include ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, ^{36}Cl, ^{51}Cr, ^{57}

Co, ^{58}Co, ^{59}Fe, ^{90}Y, ^{125}I, ^{131}I, and ^{186}Re. Enzyme labels are likewise useful, and can be detected by any of the presently utilized calorimetric, spectrophotometric, fluorospectrophotometric, amperometric, or gasometric techniques. The enzyme can be conjugated by reaction with bridging molecules such as carbodiimides, diisocyanates, glutaraldehyde, and the like. Many enzymes, which can be used in these procedures, are known and can be utilized. Preferred are peroxidase, β-glucuronidase, β-D-glucosidase, β-D-galactosidase, urease, glucose oxidase plus peroxidase, and alkaline phosphatase (see, e.g., U.S. Pat. Nos. 3,654,090; 3,850,752; and 4,016,043).

Antibody-based diagnostics and their application are familiar to those skilled in the art and may be used in accordance with the present invention. As non-limiting examples, "competitive" (U.S. Pat. Nos. 3,654,090 and 3,850,752), "sandwich" (U.S. Pat. No. 4,016,043), and "double antibody," or "DASP" assays may be used. Several procedures including ELISA, RIA, and FACS for measuring B7-related polypeptide levels are known in the art and provide a basis for diagnosing altered or abnormal levels of B7-related polypeptide expression. Normal or standard values for B7-related polypeptide expression are established by incubating biological samples taken from normal subjects, preferably human, with antibody to the B7-related polypeptide under conditions suitable for complex formation. The amount of standard complex formation may be quantified by various methods; photometric means are preferred. Levels of the B7-related polypeptide expressed in the subject sample, negative control (normal) sample, and positive control (disease) sample are compared with the standard values. Deviation between standard and subject values establishes the parameters for diagnosing disease.

In another of its aspects, this invention relates to diagnostic kits for detecting B7-related polynucleotide(s) or polypeptide(s) as it relates to a disease or susceptibility to a disease, particularly the disorders of the

immune system described herein. Such kits comprise one or more of the following:

(a) a B7-related polynucleotide, preferably the nucleotide sequence of BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14), or a fragment thereof; or

(b) a nucleotide sequence complementary to that of (a); or

(c) a B7-related polypeptide, preferably the polypeptide of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or a fragment thereof; or

(d) an antibody to a B7-related polypeptide, preferably to the polypeptide of BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), or an antibody bindable fragment thereof. It will be appreciated that in any such kits, (a), (b), (c), or (d) may comprise a substantial component and that instructions for use can be included. The kits may also contain peripheral reagents such as buffers, stabilizers, etc.

The present invention also includes a test kit for genetic screening that can be utilized to identify mutations in B7-related factors. By identifying patients with mutated BSL1, BSL2, and/or BSL2 DNA and comparing the mutation to a database that contains known mutations in BSL1, BSL2, and BSL3, and a particular condition or disease, identification and/or confirmation of, a particular condition or disease can be made. Accordingly, such a kit would comprise a PCR-based test that would involve transcribing the patients mRNA with a specific primer, and amplifying the resulting cDNA using another set of primers. The amplified product would be detectable by gel electrophoresis and could be compared with known standards for BSL1, BSL2, and/or BSL3. Preferably, this kit would utilize a patient's blood, serum, or saliva sample, and the DNA would be extracted using standard techniques. Primers flanking a known mutation would then be used to amplify a fragment of BSL1, BSL2, and/or BSL3. The amplified piece would then be sequenced to determine the presence of a mutation.

Therapeutics

Pharmaceutical compositions: The present invention contemplates compositions comprising a B7-related nucleic acid, polypeptide, antibody, ligand, modulator (e.g., agonist, antagonist, or inhibitor), or fragments or functional variants thereof, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent as described in detail herein. The present invention further contemplates pharmaceutical compositions useful in practicing the therapeutic methods of this invention. Preferably, a pharmaceutical composition includes, in admixture, a pharmaceutically acceptable excipient (carrier) and one or more of a B7-related polypeptide, nucleic acid, ligand, modulator, antibody, or fragment or functional equivalent thereof, as described herein, as an active ingredient. Because B7-related polypeptides or peptides are naturally occurring cellular components, they may be administered to an individual's circulatory system with minimal risk of undesired immunological complications.

The preparation of pharmaceutical compositions that contain biological reagents as active ingredients is well understood in the art. Typically, such compositions are prepared as injectables, either as liquid solutions or suspensions, however, solid forms suitable for solution in, or suspension in, liquid prior to injection can also be prepared. The preparation can also be emulsified. The active therapeutic ingredient is often mixed with excipients that are pharmaceutically acceptable and compatible with the active ingredient. Suitable excipients are, for example, water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, or the like and combinations thereof. In addition, if desired, the composition can contain minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, pH-buffering agents, which enhance the effectiveness of the active ingredient.

Pharmaceutical compositions can be produced and employed in treatment protocols according to established methods depending on the disorder or disease to be treated (see, for example, P.D. Mayne (1996) *Clinical Chemistry in Diagnosis and Treatment*, 6th ed., Oxford University Press, Oxford, England; Gilman et al., Eds. (1990) *Goodman and Gilman's:*

The Pharmacological Basis of Therapeutics, 8th ed., Pergamon Press; Avis et al., Eds. (1993) *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications*, Dekker, New York, NY; and Lieberman et al., Eds. (1990) *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems*, Dekker, New York, NY).

Pharmaceutical compositions may be produced as neutral or salt forms. Salts can be formed with many acids, including, but not limited to, hydrochloric, sulfuric, acetic, lactic, tartaric, malic and succinic acids. Compositions can take the form of solutions, suspensions, suppositories, tablets, pills, capsules, sustained release compounds, or powders. Such formulations can contain 10%-95% (w/w) of the active ingredient, preferably 25%-70% (w/w). If the active compound is administered by injection, for example, about 1 μg-3 mg and preferably from about 20 μg-500 μg of active compound (e.g., B7-related polypeptide) per dosage unit may be administered. Pharmaceutical preparations and compositions can also contain one or more physiologically acceptable carrier(s), excipient(s), diluent(s), disintegrant(s), lubricant(s), plasticizer(s), filler(s), colorant(s), dosage vehicle(s), absorption enhancer(s), stabilizer(s), or bacteriocide(s). The production and formulation of such compositions and preparations are carried out by methods known and practiced in the art.

Exemplary formulations are given below:

Intravenous Formulation I:

Ingredient	mg/ml
BSL1, BSL2, or BSL3 MAb	5.0
dextrose USP	45.0
sodium bisulfite USP	3.2
edetate disodium USP	0.1
water for injection q.s.a.d.	1.0 ml

Intravenous Formulation II:

Ingredient	mg/ml
BSL1, BSL2, or BSL3 MAb	5.0

sodium bisulfite USP	3.2
disodium edetate USP	0.1
water for injection q.s.a.d.	1.0 ml

Intravenous Formulation III

Ingredient	mg/ml
BSL1, BSL2, or BSL3 protein, Ig-fusion protein, or agonist	10.0
sodium bisulfite USP	3.2
disodium edetate USP	0.1
water for injection q.s.a.d.	1.0 ml

Intravenous Formulation IV

Ingredient	mg/ml
BSL1, BSL2, or BSL3 protein, Ig-fusion protein, or agonist	10.0
dextrose USP	45.0
sodium bisulfite USP	3.2
edetate disodium USP	0.1
water for injection q.s.a.d.	1.0 ml

As used herein, "pg" means picogram, "ng" means nanogram, "μg" mean microgram, "mg" means milligram, "μl" mean microliter, "ml" means milliliter, and "l" means liter.

Following the preparation of pharmaceutical compositions, they may be placed in appropriate containers and labeled for the treatment of indicated conditions. Such labeling can include amount, frequency, and method of administration. Preparations may be administered systemically by oral or parenteral routes. Non-limiting parenteral routes of administration include subcutaneous, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, transdermal, inhalation, intranasal, intra-arterial, intrathecal, enteral, sublingual, or rectal.

A therapeutically effective amount of a pharmaceutical composition containing one or more B7-related polypeptides, fusion proteins, peptide fragments, or antibodies that specifically react with these

components is an amount sufficient to reduce, ameliorate, or eliminate a disease or disorder related to altered activation levels of immune or inflammatory response cells, such as T-cells. An effective amount can be introduced in one administration or over repeated administrations to an individual being treated. Therapeutic administration can be followed by prophylactic administration, after treatment of the disease. A prophylactically effective amount is an amount effective to prevent disease and will depend upon the specific illness and subject. The therapeutically effective dose may be estimated initially, for example, either in cell culture assays or in animal models, usually mice, rats, rabbits, dogs, sheep, goats, pigs, or non-human primates. The animal model may also be used to determine the maximum tolerated dose and appropriate route of administration. Such information can then be used to determine useful doses and routes for administration in humans.

Administration of the therapeutic compositions of the present invention to a subject can be carried out using known procedures, at dosages and for periods of time effective to achieve the desired result. For example, a therapeutically active amount B7-related polypeptides, fusion proteins, peptides, or antibodies that react with these components may vary according to factors such as the age, sex, and weight of the individual, and the ability of the treatment to elicit a desired response in the individual. Dosages may be adjusted to provide the optimum therapeutic response. For example, several sequential doses may be administered daily or the dose may be proportionally reduced as indicated by the exigencies of the therapeutic situation.

Gene transfer therapy: In addition, host cells that are genetically engineered to carry the gene encoding a B7-related polypeptide, fusion protein, or peptide fragment comprising a fragment of the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide sequence, can be introduced into an individual in need of immunomodulation. Following expression and production of the B7-related

polypeptide or peptide by the host cell, the so-produced B7-related polypeptide, fusion protein, or peptide can act to bind CD28 and/or CD28-related ligand(s) to modulate the activation of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells) in the recipient. Host cells may be genetically engineered by a variety of molecular techniques and methods known to those having skill in the art, for example, transfection, infection, or transduction. Transduction as used herein commonly refers to cells that have been genetically engineered to contain a foreign or heterologous gene via the introduction of a viral or non-viral vector into the cells. Transfection more commonly refers to cells that have been genetically engineered to contain a foreign gene harbored in a plasmid, or non-viral vector. Host cells can be transfected or transduced by different vectors and thus can serve as gene delivery vehicles to transfer the expressed products into muscle.

Although viral vectors are preferred for gene transfer therapies, cells can be genetically engineered to contain nucleic acid sequences encoding the desired gene product(s) by various methods known in the art. For example, cells can be genetically engineered by fusion, transfection, lipofection mediated by the use of liposomes, electroporation, precipitation with DEAE-Dextran or calcium phosphate, particle bombardment (biolistics) with nucleic acid-coated particles (e.g., gold particles), microinjection, or genetically engineered microorganisms (K. Yazawa et al. (2000) *Cancer Gene Ther.* 7:269-274). Vectors for introducing heterologous (i.e., foreign) nucleic acid (DNA or RNA) into muscle cells for the expression of active bioactive products are well known in the art. Such vectors possess a promoter sequence, preferably a promoter that is cell-specific and placed upstream of the sequence to be expressed. The vectors may also contain, optionally, one or more expressible marker genes for expression as an indication of successful transfection and expression of the nucleic acid sequences contained in the vector. In addition, vectors can be optimized to minimize undesired immunogenicity and maximize long-term expression of the desired gene

product(s) (see Nabel (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:324-326). Moreover, vectors can be chosen based on cell-type that is targeted for treatment. For example, vectors for the treatment of tumor or cancer cells have been described (P.L. Hallenbeck et al. (1999) *Hum. Gene Ther.* 10:1721-1733; T. Shibata et al. (2000) *Gene Ther.* 7:493-498; M. Puhlmann et al. (2000) *Cancer Gene Ther.* 7:66-73; N. Krauzewicz et al. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* 465:73-82).

Illustrative examples of vehicles or vector constructs for transfection or infection of the host cells include replication-defective viral vectors, DNA virus or RNA virus (retrovirus) vectors, such as adenovirus, herpes simplex virus and adeno-associated viral vectors. Adeno-associated virus vectors are single stranded and allow the efficient delivery of multiple copies of nucleic acid to the cell's nucleus. Preferred are adenovirus vectors. The vectors will normally be substantially free of any prokaryotic DNA and may comprise a number of different functional nucleic acid sequences. An example of such functional sequences may be a DNA region comprising transcriptional and translational initiation and termination regulatory sequences, including promoters (e.g., strong promoters, inducible promoters, and the like) and enhancers which are active in the host cells. Also included as part of the functional sequences is an open reading frame (polynucleotide sequence) encoding a protein of interest. Flanking sequences may also be included for site-directed integration. In some situations, the 5'-flanking sequence will allow homologous recombination, thus changing the nature of the transcriptional initiation region, so as to provide for inducible or noninducible transcription to increase or decrease the level of transcription, as an example.

In general, the encoded and expressed B7-related factor may be intracellular, i.e., retained in the cytoplasm, nucleus, or an organelle of a cell, or may be secreted by the cell. For secretion, the natural signal sequence present in the B7-related structural gene may be retained. When the polypeptide or peptide is a fragment of a B7-related factor that is larger,

a signal sequence may be provided so that, upon secretion and processing at the processing site, the desired protein will have the natural sequence. Specific examples of coding sequences of interest for use in accordance with the present invention include the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) polypeptide coding sequences. As previously mentioned, a marker may be present for selection of cells containing the vector construct. The marker may be an inducible or non-inducible gene and will generally allow for positive selection under induction, or without induction, respectively. Examples of marker genes include neomycin, dihydrofolate reductase, glutamine synthetase, and the like.

The vector employed will generally also include an origin of replication and other genes that are necessary for replication in the host cells, as routinely employed by those having skill in the art. As an example, the replication system comprising the origin of replication and any proteins associated with replication encoded by a particular virus may be included as part of the construct. The replication system must be selected so that the genes encoding products necessary for replication do not ultimately transform the cells. Such replication systems are represented by replication-defective adenovirus (see G. Acsadi et al. (1994) *Hum. Mol. Genet.* 3:579-584) and by Epstein-Barr virus. Examples of replication defective vectors, particularly, retroviral vectors that are replication defective, are BAG, (see Price et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:156; Sanes et al. (1986) *EMBO J.*, 5:3133). It will be understood that the final gene construct may contain one or more genes of interest, for example, a gene encoding a bioactive metabolic molecule. In addition, cDNA, synthetically produced DNA or chromosomal DNA may be employed utilizing methods and protocols known and practiced by those having skill in the art.

According to one approach for gene therapy, a vector encoding a B7-related factor is directly injected into the recipient cells (*in vivo* gene therapy). Alternatively, cells from the intended recipients are

explanted, genetically modified to encode a B7-related factor, and reimplanted into the donor (*ex vivo* gene therapy). An *ex vivo* approach provides the advantage of efficient viral gene transfer, which is superior to *in vivo* gene transfer approaches. In accordance with ex vivo gene therapy, the host cells are first infected with engineered viral vectors containing at least one B7-related gene encoding a B7-related gene product, suspended in a physiologically acceptable carrier or excipient such as saline or phosphate buffered saline, and the like, and then administered to the host. The desired gene product is expressed by the injected cells, which thus introduce the gene product into the host. The introduced gene products can thereby be utilized to treat or ameliorate a disorder that is related to altered levels of the activation of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells).

Methods of immunomodulation: In accordance with the present invention, the BSL1, BSL2, and BSL3 nucleic acid and polypeptide sequences can be used in the development of therapeutic reagents having the ability to either up-regulate (amplify) or down-regulate (suppress) immune responses (e.g., T-cell activation). In particular, B7-related polypeptides may interact with CD28 and thereby up-regulate immune cell activity. Alternatively, B7-related polypeptides may interact with CTLA-4 and thereby down-regulate immune cell activity. For example, soluble, dimeric forms of the B7-related polypeptides that bind to the CD28 and/or CD28-related ligand(s) but fail to provide a costimulatory signal to T-cells, can be used to block T-cell activation, and thereby provide a specific means by which to induce tolerance in a subject. Similarly, antibodies directed against one or more B7-related factors can be used to block the interaction between the B7-related factors and their cognate ligand(s), thereby preventing the activation of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells). In addition, fusion proteins comprising at least a fragment of a B7-related factor fused to at least the Fc domain of an IgG molecule can be used to up- or down-regulate cells expressing the cognate ligand(s) of the

B7-related factor (e.g., T-cells). Furthermore, antisense or triplex oligonucleotides that bind to the nucleotide sequence of one or more B7-related factors can be used to decrease the expression these factors. In contrast, cell surface, multivalent forms of B7-related factors that bind to CD28 and/or CD28-related ligand(s) and provide a costimulatory signal to immune or inflammatory response cells, such as T-cells, can be used to increase the activation of these cells. It is also possible to utilize more than one B7-related factor, fusion protein, antibody, or therapeutically active fragments thereof, in order to up-regulate or down-regulate the activity of immune or inflammatory cells (e.g., T-cells) in an animal or human subject.

More specifically, given the structure and function of the B7-related factors disclosed herein, it is possible to up-regulate or down-regulate the function of a B7-related factor in a number of ways. Down-regulating or preventing one or more B7-related factor functions (i.e., preventing high level lymphokine synthesis by activated T-cells) should be useful in treating autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Lupus erythematosus, Hashimoto's thyroiditis, primary mixedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, insulin dependent diabetes mellitus, good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic opthalmia, autoimmune uveitis, autoimmune hemolytic anemis, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, ulcerative colitis, Sjogren's syndrome, polymyositis and mixed connective tissue disease. B7-related factors may also be down-regulated for the treatment of inflammation related to psoriasis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and atherosclerosis. In addition, B7-related factors may be down-regulated for the treatment of tissue, bone marrow, and organ transplantation, and graft versus host disease. For example, blockage of T-cell function should result in reduced tissue destruction in tissue transplantation. Typically, in tissue transplants, rejection of the transplant is initiated by its recognition as foreign material, followed by an immune reaction that destroys the

transplant. The B7-related molecules of the present invention can also be used to treat or prevent cancers as described in detail below.

The B7-related nucleic acid molecules provided by the present invention can be used to design therapeutics to block the function of one or more B7-related factors. In particular, antisense or triplex oligonucleotides can be administered to prevent the expression of the BSL1, BSL2, and/or BSL3 factors. For example, an oligonucleotide (e.g., DNA oligonucleotide) that hybridizes to the BSL1, BSL2, and/or BSL3 mRNA can be used to target the mRNA for RnaseH digestion. Alternatively, an oligonucleotide that hybridizes to the translation initiation site of the BSL1 (SEQ ID NO:1 or 3), BSL2 (SEQ ID NO:6, 10, or 12), or BSL3 (SEQ ID NO:14) mRNA be used to prevent translation of the mRNA. In another approach, oligonucleotides that bind to the double-stranded DNA of the BSL1, BSL2, and/or BSL3 gene(s) can be administered. Such oligonucleotides can form a triplex construct and prevent the unwinding and transcription of the DNA encoding the targeted B7-related factor. In all cases, the appropriate oligonucleotide can be synthesized, formulated as a pharmaceutical composition, and administered to a subject. The synthesis and utilization of antisense and triplex oligonucleotides have been previously described (e.g., H. Simon et al. (1999) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9:527-31; F.X. Barre et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:3084-3088; R. Elez et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **269**:352-6; E.R. Sauter et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:654-60).

In the context of this invention, antisense oligonucleotides are naturally-occurring oligonucleotide species or synthetic species formed from naturally-occurring subunits or their close homologs. Antisense oligonucleotides may also include moieties that function similarly to oligonucleotides, but have non-naturally-occurring portions. Thus, antisense oligonucleotides may have altered sugar moieties or inter-sugar linkages. Exemplary among these are phosphorothioate and other sulfur containing species which are known in the art.

In preferred embodiments, at least one of the phosphodiester bonds of the antisense oligonucleotide has been substituted with a structure that functions to enhance the ability of the compositions to penetrate into the region of cells where the RNA whose activity is to be modulated is located. It is preferred that such substitutions comprise phosphorothioate bonds, methyl phosphonate bonds, or short chain alkyl or cycloalkyl structures. In accordance with other preferred embodiments, the phosphodiester bonds are substituted with structures which are, at once, substantially non-ionic and non-chiral, or with structures which are chiral and enantiomerically specific. Persons of ordinary skill in the art will be able to select other linkages for use in the practice of the invention.

Antisense oligonucleotides may also include species that include at least some modified base forms. Thus, purines and pyrimidines other than those normally found in nature may be so employed. Similarly, modifications on the furanosyl portions of the nucleotide subunits may also be effected, as long as the essential tenets of this invention are adhered to. Examples of such modifications are 2'-O-alkyl- and 2'-halogen-substituted nucleotides. Some non-limiting examples of modifications at the 2' position of sugar moieties which are useful in the present invention include OH, SH, SCH_3, F, OCH_3, OCN, $O(CH_2)_n NH_2$ and $O(CH_2)_n CH_3$, where n is from 1 to about 10. Such antisense oligonucleotides are functionally interchangeable with natural oligonucleotides or synthesized oligonucleotides, which have one or more differences from the natural structure. All such analogs are comprehended by this invention so long as they function effectively to hybridize with BSL1, BSL2, or BSL3 DNA or RNA to inhibit the function thereof.

For antisense therapeutics, the oligonucleotides in accordance with this invention preferably comprise from about 3 to about 50 subunits. It is more preferred that such oligonucleotides and analogs comprise from about 8 to about 25 subunits and still more preferred to have from about 12 to about 20 subunits. As defined herein, a "subunit" is a base and sugar

combination suitably bound to adjacent subunits through phosphodiester or other bonds.

Antisense oligonulcleotides can be produced by standard techniques (see, e.g., Shewmaker et al., U.S. Patent No. 5,107,065). The oligonucleotides used in accordance with this invention may be conveniently and routinely made through the well-known technique of solid phase synthesis. Equipment for such synthesis is available from several vendors, including PE Applied Biosystems (Foster City, CA). Any other means for such synthesis may also be employed, however, the actual synthesis of the oligonucleotides is well within the abilities of the practitioner. It is also will known to prepare other oligonucleotide such as phosphorothioates and alkylated derivatives.

The oligonucleotides of this invention are designed to be hybridizable with BSL1, BSL2, or BSL3 RNA (e.g., mRNA) or DNA. For example, an oligonucleotide (e.g., DNA oligonucleotide) that hybridizes to B7-related mRNA can be used to target the mRNA for RnaseH digestion. Alternatively, an oligonucleotide that hybridizes to the translation initiation site of B7-related mRNA can be used to prevent translation of the mRNA. In another approach, oligonucleotides that bind to the double-stranded DNA of BSL1, BSL2, or BSL3 can be administered. Such oligonucleotides can form a triplex construct and inhibit the transcription of the DNA encoding BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptides. Triple helix pairing prevents the double helix from opening sufficiently to allow the binding of polymerases, transcription factors, or regulatory molecules. Recent therapeutic advances using triplex DNA have been described (see, e.g., J.E. Gee et al. (1994) *Molecular and Immunologic Approaches*, Futura Publishing Co., Mt. Kisco, NY).

As non-limiting examples, antisense oligonucleotides may be targeted to hybridize to the following regions: mRNA cap region; translation initiation site; translational termination site; transcription initiation site; transcription termination site; polyadenylation signal; 3' untranslated region;

5' untranslated region; 5' coding region; mid coding region; and 3' coding region. Preferably, the complementary oligonucleotide is designed to hybridize to the most unique 5' sequence in BSL1, BSL2, or BSL3, including any of about 15-35 nucleotides spanning the 5' coding sequence. Appropriate oligonucleotides can be designed using OLIGO software (Molecular Biology Insights, Inc., Cascade, CO; http://www.oligo.net).

In accordance with the present invention, the antisense oligonucleotide can be synthesized, formulated as a pharmaceutical composition, and administered to a subject. The synthesis and utilization of antisense and triplex oligonucleotides have been previously described (e.g., H. Simon et al. (1999) *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 9:527-31; F.X. Barre et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:3084-3088; R. Elez et al. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 269:352-6; E.R. Sauter et al. (2000) *Clin. Cancer Res.* 6:654-60). Alternatively, expression vectors derived from retroviruses, adenovirus, herpes or vaccinia viruses, or from various bacterial plasmids may be used for delivery of nucleotide sequences to the targeted organ, tissue or cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant vectors which will express nucleic acid sequence that is complementary to the nucleic acid sequence encoding a BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide. These techniques are described both in Sambrook et al. (1989) and in Ausubel et al. (1992). For example, BSL1, BSL2, or BSL3 expression can be inhibited by transforming a cell or tissue with an expression vector that expresses high levels of untranslatable sense or antisense sequences. Even in the absence of integration into the DNA, such vectors may continue to transcribe RNA molecules until they are disabled by endogenous nucleases. Transient expression may last for a month or more with a non-replicating vector, and even longer if appropriate replication elements included in the vector system.

Various assays may be used to test the ability of specific antisense oligonucleotides to inhibit BSL1, BSL2, or BSL3 expression. For

example, mRNA levels can be assessed northern blot analysis (Sambrook et al. (1989); Ausubel et al. (1992); J.C. Alwine et al. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5350-5354; I.M. Bird (1998) *Methods Mol. Biol.* 105:325-36), quantitative or semi-quantitative RT-PCR analysis (see, e.g., W.M. Freeman et al. (1999) *Biotechniques* 26:112-122; Ren et al. (1998) *Mol. Brain Res.* 59:256-63; J.M. Cale et al. (1998), *Methods Mol. Biol.* 105:351-71), or *in situ* hybridization (reviewed by A.K. Raap (1998) *Mutat. Res.* 400:287-298). Alternatively, antisense oligonucleotides may be assessed by measuring levels of BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide, e.g., by western blot analysis, indirect immunofluorescence, immunoprecipitation techniques (see, e.g., J.M. Walker (1998) *Protein Protocols on CD-ROM*, Humana Press, Totowa, NJ).

The B7-related polypeptide sequences provided by the present invention may also be useful in the design of therapeutic agents to block or enhance the activity of immune response cells (e.g., T-cells). For example, a fusion protein comprising the soluble portion of a B7-related polypeptide conjugated with the Fc domain of human IgG can be constructed by standard recombinant techniques, described above. The BSL1-Ig, BSL2-Ig, and/or BSL3-Ig, fusion proteins can be prepared as a pharmaceutical composition and administered to a subject. The BSL1-Ig, BSL2-Ig, and/or BSL3-Ig fusion proteins can be used to target specific T-cells for destruction, thereby reducing overall T-cell activation. Such treatment methods can be modeled on animal experiments, which utilize CTLA-4-Ig to prevent cardiac allograft rejection (Turka et al., *supra*). It will be understood by a person skilled in the art that such methods may be adapted for use in humans, and for use with other conditions, including various transplants and autoimmune diseases. Alternatively, the BSL1-Ig, BSL2-Ig, and/or BSL3-Ig fusion proteins can be used to enhance T-cell activation. For example, BSL2-Ig and BSL3-Ig fusion proteins can be used as co-stimulatory molecules as disclosed in detail herein.

As an alternative approach, antibodies that specifically react with B7-related polypeptides or peptides can be used to block the activity of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells). Antibodies or related antibody fragments that bind to peptides or polypeptides comprising the BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15) sequences can be formulated as pharmaceutical compositions and administered alone or in combination to a subject. Such antibodies can then inhibit the interaction of the B7-related polypeptides with CD28 and/or CD28-related ligands, and thereby prevent T-cell activation. Treatments utilizing antibodies directed against B7-related factors may be modeled on animal experiments, which use antibodies against CD28, B7-1, or B7-2 (D.J. Lenshow et al. (1995) Transplantation 60:1171-1178; Y. Seko et al. (1998) *Circ. Res.* 83:463-469; A. Haczku et al. (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:1638-1643). One skilled in the art may adapt such methods for use in humans, and for use with various conditions involving inflammation or transplantation.

It is noted that antibody-based therapeutics produced from non-human sources can cause an undesired immune response in human subjects. To minimize this problem, chimeric antibody derivatives can be produced. Chimeric antibodies combine a non-human animal variable region with a human constant region. Chimeric antibodies can be constructed according to methods known in the art (see Morrison et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851; Takeda et al. (1985) Nature 314:452; U.S. Patent No. 4,816,567 of Cabilly et al.; U.S. Patent No. 4,816,397 of Boss et al.; European Patent Publication EP 171496; EP 0173494; United Kingdom Patent GB 2177096B). In addition, antibodies can be further "humanized" by any of the techniques known in the art, (e.g., Teng et al. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80:7308-7312; Kozbor et al. (1983) *Immunology Today* 4: 7279; Olsson et al. (1982) Meth. Enzymol. 92:3-16; International Patent Application No. WO 92/06193; EP 0239400). Humanized antibodies can be also be obtained from commercial sources

(e.g., Scotgen Limited, Middlesex, Great Britain). Immunotherapy with a humanized antibody may result in increased long-term effectiveness for the treatment of chronic disease situations or situations requiring repeated antibody treatments.

In yet another approach, an isolated ligand of a B7-related factor can be used to down-regulate the activity of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells). For example, a soluble fusion protein comprising a B7-related factor ligand can be produced, isolated, and used to produce a pharmaceutical composition in accordance with the methods described in detail herein. This pharmaceutical composition can then be administered to a subject to bind to one or more endogenous B7-related factor(s) and block the activation of immune or inflammatory response cells (e.g., T-cells) as previously described.

Up-regulation of a B7-related factor function may also be useful in therapy. Because viral infections are cleared primarily by cytotoxic T-cells, an increase in cytotoxic activity would be therapeutically useful in situations where more rapid or thorough clearance of an infective viral agent would be beneficial to an animal or human subject. Notably, B7-1 acts to increase the cytotoxicity of T-cells though interactions with its cognate ligand(s). Thus, soluble active forms of B7-related polypeptides can be administered for the treatment of local or systemic viral infections, such as immunodeficiency (e.g., HIV), papilloma (e.g., HPV), herpes (e.g., HSV), encephalitis, influenza (e.g., human influenza virus A), and common cold (e.g., human rhinovirus) viral infections. For example, pharmaceutical formulations of active multivalent B7-related factors can be administered topically to treat viral skin diseases such as herpes lesions or shingles, or genital warts. Alternatively, pharmaceutical compositions of active, multivalent B7-related factors can be administered systemically to treat systemic viral diseases such as AIDS, influenza, the common cold, or encephalitis.

In addition, modulation of B7-related factor function may be

useful in the induction of tumor immunity. For example, tumor cells (e.g., sarcoma, melanoma, lymphoma, leukemia, neuroblastoma, or carcinoma cells) can be genetically engineered to carry a nucleic acid encoding at least a fragment of at least one B7-related factor, such as BSL1 (SEQ ID NO:2), BSL2 (SEQ ID NO:7, 11, or 13), or BSL3 (SEQ ID NO:15), and then administered to a subject to traverse tumor-specific tolerance in the subject. Notably, ectopic expression of B7-1 in B7 negative murine tumor cells has been shown to induce T-cell mediated specific immunity accompanied by tumor rejection and prolonged protection to tumor challenge in mice (L. Chen et al., *supra*; S. Townsend et al., *supra*; S. Baskar et al., *supra*). Tumor or cancer cell gene therapy treatments utilizing B7-related factors may be modeled on animal experiments (see K. Dunussi-Joannopoulos et al. (1997) *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **19**:356-340; K. Hiroishi et al. (1999) *Gene Ther.* **6**:1988-1994; B.K. Martin et al. (1999) *J. Immunol.* **162**:6663-6670; M. Kuiper et al. (2000) *Adv. Exp. Med. Biol.* **465**:381-390), or human phase I trial experiments (H.L. Kaufman et al. (2000) *Hum. Gene Ther.* **11**:1065-1082), which use B7-1 or B7-2 for gene transfer therapy. It will be understood that such methods may be adapted for use with various tumor or cancer cells. Additionally, tumor immunity may be achieved by administration of a B7-related fusion protein that directly stimulates the immune cells (see e.g., International Patent Application No. WO 01/21796 to V. Ling et al.).

Pharmacogenetics: The B7-related polypeptides and polynucleotides of the present invention are also useful in pharmacogenetic analysis, i.e., the study of the relationship between an individual's genotype and that individual's response to a therapeutic composition or drug. See, e.g., Eichelbaum, M. (1996) *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **23**(10-11):983-985, and Linder, M. W. (1997) *Clin. Chem.* **43**(2):254-266. The genotype of the individual can determine the way a therapeutic acts on the body or the way the body metabolizes the therapeutic. Further, the activity of drug metabolizing enzymes affects both the intensity and duration of therapeutic

activity. Differences in the activity or metabolism of therapeutics can lead to severe toxicity or therapeutic failure. Accordingly, a physician or clinician may consider applying knowledge obtained in relevant pharmacogenetic studies in determining whether to administer a B7-related polypeptide, polynucleotide, functional equivalent, fragment, or modulator, as well as tailoring the dosage and/or therapeutic or prophylactic treatment regimen with a B7-related polypeptide, polynucleotide, functional equivalent, fragment, or modulator.

In general, two types of pharmacogenetic conditions can be differentiated. Genetic conditions can be due to a single factor that alters the way the drug act on the body (altered drug action), or a factor that alters the way the body metabolizes the drug (altered drug metabolism). These conditions can occur either as rare genetic defects or as naturally occurring polymorphisms. For example, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency (G6PD) is a common inherited enzymopathy which results in haemolysis after ingestion of oxidant drugs (anti-malarials, sulfonamides, analgesics, nitrofurans) and consumption of fava beans.

The discovery of genetic polymorphisms of drug metabolizing enzymes (e.g., N-acetyltransferase 2 (NAT 2) and cytochrome P450 enzymes CYP2D6 and CYP2C19) has provided an explanation as to why some patients do not obtain the expected drug effects or show exaggerated drug response and serious toxicity after taking the standard and safe dose of a drug. These polymorphisms are expressed in two phenotypes in the population, the extensive metabolizer (EM) and poor metabolizer (PM). The prevalence of PM is different among different populations. The gene coding for CYP2D6 is highly polymorphic and several mutations have been identified in PM, which all lead to the absence of functional CYP2D6. Poor metabolizers quite frequently experience exaggerated drug response and side effects when they receive standard doses. If a metabolite is the active therapeutic moiety, PM show no therapeutic response. This has been demonstrated for the analgesic effect of codeine mediated by its CYP2D6-

formed metabolite morphine. At the other extreme, ultra-rapid metabolizers fail to respond to standard doses. Recent studies have determined that ultra-rapid metabolism is attributable to CYP2D6 gene amplification.

By analogy, genetic polymorphism or mutation may lead to allelic variants of BSL1, BSL2, and/or BSL3 in the population which have different levels of activity. The BSL1, BSL2, and/or BSL3 polypeptides or polynucleotides thereby allow a clinician to ascertain a genetic predisposition that can affect treatment modality. Thus, in a BSL-based treatment, polymorphism or mutation may give rise to individuals that are more or less responsive to treatment. Accordingly, dosage would necessarily be modified to maximize the therapeutic effect within a given population containing the polymorphism. As an alternative to genotyping, specific polymorphic polypeptides or polynucleotides can be identified.

To identify genes that predict drug response, several pharmacogenetic methods can be used. One pharmacogenomics approach, "genome-wide association", relies primarily on a high-resolution map of the human genome. This high-resolution map shows previously identified gene-related markers (e.g., a "bi-allelic" gene marker map which consists of 60,000-100,000 polymorphic or variable sites on the human genome, each of which has two variants). A high-resolution genetic map can then be compared to a map of the genome of each of a statistically significant number of patients taking part in a Phase II/III drug trial to identify markers associated with a particular observed drug response or side effect. Alternatively, a high-resolution map can be generated from a combination of some 10 million known single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the human genome. As used herein, a "SNP" is a common alteration that occurs in a single nucleotide base in a stretch of DNA. For example, a SNP may occur once per every 1000 bases of DNA. A SNP may be involved in a disease process, however, the vast majority may not be disease-associated. Given a genetic map based on the occurrence of such SNPs, individuals can be grouped into genetic categories depending on a particular pattern of

SNPs in their individual genome. In this way, treatment regimens can be tailored to groups of genetically similar individuals, taking into account traits that may be common among such genetically similar individuals. See, e.g., D.R. Pfost et al. (2000) *Trends Biotechnol.* 18(8):334-8.

As another example, the "candidate gene approach", can be used. According to this method, if a gene that encodes a drug target is known, all common variants of that gene can be fairly easily identified in the population and it can be determined if having one version of the gene versus another is associated with a particular drug response.

As yet another example, a "gene expression profiling approach", can be used. This method involves testing the gene expression of an animal treated with a drug (e.g., a B7-related polypeptide, polynucleotide, functional equivalent, fragment, or modulator) to determine whether gene pathways related to toxicity have been turned on.

Information obtained from one of the pharmacogenetics approaches described herein can be used to determine appropriate dosage and treatment regimens for prophylactic or therapeutic treatment an individual. This knowledge, when applied to dosing or drug selection, can avoid adverse reactions or therapeutic failure and thus enhance therapeutic or prophylactic efficiency when treating a subject with a B7-related polypeptide, polynucleotide, functional equivalent, fragment, or modulator.

B7-related polypeptides or polynucleotides are also useful for monitoring therapeutic effects during clinical trials and other treatment. Thus, the therapeutic effectiveness of an agent that is designed to increase or decrease gene expression, polypeptide levels, or activity can be monitored over the course of treatment using the B7-related polypeptides or polynucleotides. For example, monitoring can be performed by: (i) obtaining a pre-administration sample from a subject prior to administration of the agent; (ii) detecting the level of expression or activity of the polypeptide in the pre-administration sample; (iii) obtaining one or more post-administration samples from the subject; (iv) detecting the level of

expression or activity of the polypeptide in the post-administration samples; (v) comparing the level of expression or activity of the polypeptide in the pre-administration sample with the polypeptide in the post-administration sample or samples; and (vi) increasing or decreasing the administration of the agent to the subject accordingly.

Animal Models

B7-related polynucleotides can be used to generate genetically altered non-human animals or human cell lines. Any non-human animal can be used; however typical animals are rodents, such as mice, rats, or guinea pigs. Genetically engineered animals or cell lines can carry a gene that has been altered to contain deletions, substitutions, insertions, or modifications of the polynucleotide sequence (e.g., exon sequence). Such alterations may render the gene nonfunctional, (i.e., a null mutation) producing a "knockout" animal or cell line. In addition, genetically engineered animals can carry one or more exogenous or non-naturally occurring genes, e.g., "transgenes" or "orthologs", that are derived from different organisms (e.g., humans), or produced by synthetic or recombinant methods. Genetically altered animals or cell lines can be used to study BSL1, BSL2, or BSL3 function, regulation, and to develop treatments for BSL1-, BSL2-, or BSL3-related diseases. In particular, knockout animals and cell lines can be used to establish animal models and *in vitro* models for analysis of BSL1-, BSL2-, or BSL3-related diseases. In addition, transgenic animals expressing human BSL1, BSL2, or BSL3 can be used in drug discovery efforts.

A "transgenic animal" is any animal containing one or more cells bearing genetic information altered or received, directly or indirectly, by deliberate genetic manipulation at a subcellular level, such as by targeted recombination or microinjection or infection with recombinant virus. The term "transgenic animal" is not intended to encompass classical cross-breeding or *in vitro* fertilization, but rather is meant to encompass animals in which one or more cells are altered by, or receive, a recombinant DNA

molecule. This recombinant DNA molecule may be specifically targeted to a defined genetic locus, may be randomly integrated within a chromosome, or it may be extrachromosomally replicating DNA.

As used herein, the term "ortholog" denotes a gene or polypeptide obtained from one species that has homology to an analogous gene or polypeptide from a different species. For example, the human BSL3 (SEQ ID NO:15) and mouse AF142780 polypeptides are orthologs.

Transgenic animals can be selected after treatment of germline cells or zygotes. For example, expression of an exogenous BSL1, BSL2, or BSL3 gene or a variant can be achieved by operably linking the gene to a promoter and optionally an enhancer, and then microinjecting the construct into a zygote (see, e.g., Hogan et al. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Such treatments include insertion of the exogenous gene and disrupted homologous genes. Alternatively, the gene(s) of the animals may be disrupted by insertion or deletion mutation of other genetic alterations using conventional techniques (see, e.g., Capecchi, (1989) *Science*, **244**:1288; Valancuis et al. (1991) *Mol. Cell Biol.*, **11**:1402; Hasty et al. (1991) *Nature*, **350**:243; Shinkai et al. (1992) *Cell*, **68**:855; Mombaerts et al. (1992) *Cell*, **68**:869; Philpott et al. (1992) *Science*, **256**:1448; Snouwaert et al. (1992) *Science*, **257**:1083; Donehower et al. (1992) *Nature*, **356**:215).

In one aspect of the invention, BSL1, BSL2, or BSL3 knockout mice can be produced in accordance with well-known methods (see, e.g., M.R. Capecchi, (1989) *Science*, **244**:1288-1292; P. Li et al. (1995) *Cell* 80:401-411; L.A. Galli-Taliadoros et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 181(1):1-15; C.H. Westphal et al. (1997) *Curr. Biol.* 7(7):530-3; S.S. Cheah et al. (2000) *Methods Mol. Biol.* 136:455-63). The human BSL1, BSL2, and BSL3 clones can be used isolate murine homologs. A murine homologs can then be used to prepare a murine BSL1, BSL2, or BSL3 targeting construct that can disrupt BSL1, BSL2, or BSL3 in the mouse by homologous recombination at the corresponding chromosomal locus. The

targeting construct can comprise a disrupted or deleted murine BSL1, BSL2, or BSL3 sequence that inserts in place of the functioning fragment of the native mouse gene. For example, the construct can contain an insertion in the murine BSL1, BSL2, or BSL3 protein-coding region.

Preferably, the targeting construct contains markers for both positive and negative selection. The positive selection marker allows the selective elimination of cells that lack the marker, while the negative selection marker allows the elimination of cells that carry the marker. In particular, the positive selectable marker can be an antibiotic resistance gene, such as the neomycin resistance gene, which can be placed within the coding sequence of murine BSL1, BSL2, or BSL3 to render it non-functional, while at the same time rendering the construct selectable. The herpes simplex virus thymidine kinase (HSV tk) gene is an example of a negative selectable marker that can be used as a second marker to eliminate cells that carry it. Cells with the HSV tk gene are selectively killed in the presence of gangcyclovir. As an example, a positive selection marker can be positioned on a targeting construct within the region of the construct that integrates at the BSL1, BSL2, or BSL3 locus. The negative selection marker can be positioned on the targeting construct outside the region that integrates at the BSL1, BSL2, or BSL3 locus. Thus, if the entire construct is present in the cell, both positive and negative selection markers will be present. If the construct has integrated into the genome, the positive selection marker will be present, but the negative selection marker will be lost.

The targeting construct can be employed, for example, in embryonal stem cell (ES). ES cells may be obtained from pre-implantation embryos cultured *in vitro* (M.J. Evans et al. (1981) *Nature* **292**:154-156; M.O. Bradley et al. (1984) *Nature* **309**:255-258; Gossler et al. (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:9065-9069; Robertson et al. (1986) *Nature* **322**:445-448; S. A. Wood et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:4582-4584). Targeting constructs can be efficiently introduced into the ES cells

by standard techniques such as DNA transfection or by retrovirus-mediated transduction. Following this, the transformed ES cells can be combined with blastocysts from a non-human animal. The introduced ES cells colonize the embryo and contribute to the germ line of the resulting chimeric animal (R. Jaenisch, (1988) *Science* **240**:1468-1474). The use of gene-targeted ES cells in the generation of gene-targeted transgenic mice has been previously described (Thomas et al. (1987) *Cell* **51**:503-512) and is reviewed elsewhere (Frohman et al. (1989) *Cell* **56**:145-147; Capecchi, 1989, *Trends in Genet.* **5**:70-76; Baribault et al. (1989) *Mol. Biol. Med.* **6**:481-492; Wagner, (1990) *EMBO J.* 9:3025-3032; Bradley et al. (1992) *Bio/Technology* **10**: 534-539).

Several methods can be used to select homologously recombined murine ES cells. One method employs PCR to screen pools of transformant cells for homologous insertion, followed by screening individual clones (Kim et al. (1988) *Nucleic Acids Res.* **16**:8887-8903; Kim et al. (1991) *Gene* **103**:227-233). Another method employs a marker gene is constructed which will only be active if homologous insertion occurs, allowing these recombinants to be selected directly (Sedivy et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**:227-231). For example, the positive-negative selection (PNS) method can be used as described above (see, e.g., Mansour et al. (1988) *Nature* **336**:348-352; Capecchi, 1989, *Science* **244**:1288-1292; Capecchi, (1989) *Trends in Genet.* **5**:70-76). In particular, the PNS method is useful for targeting genes that are expressed at low levels.

The absence of functional BSL1, BSL2, or BSL3 in the knockout mice can be confirmed, for example, by RNA analysis, protein expression analysis, and functional studies. For RNA analysis, RNA samples are prepared from different organs of the knockout mice and the BSL1, BSL2, or BSL3 transcript is detected in Northern blots using oligonucleotide probes specific for the transcript. For protein expression detection, antibodies that are specific for the BSL1, BSL2, or BSL3

polypeptide are used, for example, in flow cytometric analysis, immunohistochemical staining, and activity assays. Alternatively, functional assays are performed using preparations of different cell types collected from the knockout mice.

Several approaches can be used to produce transgenic mice. In one approach, a targeting vector is integrated into ES cell by homologous recombination, an intrachromosomal recombination event is used to eliminate the selectable markers, and only the transgene is left behind (A.L. Joyner et al. (1989) *Nature* **338**(6211):153-6; P. Hasty et al. (1991) *Nature* **350**(6315):243-6; V. Valancius and O. Smithies, (1991) *Mol. Cell Biol.* **11**(3):1402-8; S. Fiering et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(18):8469-73). In an alternative approach, two or more strains are created; one strain contains the gene knocked-out by homologous recombination, while one or more strains contain transgenes. The knockout strain is crossed with the transgenic strain to produce new line of animals in which the original wild-type allele has been replaced (although not at the same site) with a transgene. Notably, knockout and transgenic animals can be produced by commercial facilities (e.g., The Lerner Research Institute, Cleveland, OH; B&K Universal, Inc., Fremont, CA; DNX Transgenic Sciences, Cranbury, NJ; Incyte Genomics, Inc., St. Louis, MO).

Transgenic animals (e.g., mice) containing a nucleic acid molecule which encodes human BSL1, BSL2, or BSL3, may be used as *in vivo* models to study the effects of altered expression of BSL1, BSL2, or BSL3. Such animals can also be used in drug evaluation and discovery efforts to find compounds effective to inhibit or modulate the activity of BSL1, BSL2, or BSL3, such as for example compounds for treating immune system disorders, diseases, or conditions. One having ordinary skill in the art can use standard techniques to produce transgenic animals which produce human BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide, and use the animals in drug evaluation and discovery projects (see, e.g., U.S. Patent No. 4,873,191 to Wagner; U.S. Patent No. 4,736,866 to Leder).

In another embodiment of the present invention, the transgenic animal can comprise a recombinant expression vector in which the nucleotide sequence that encodes human BSL1, BSL2, or BSL3 is operably linked to a tissue specific promoter whereby the coding sequence is only expressed in that specific tissue. For example, the tissue specific promoter can be a mammary cell specific promoter and the recombinant protein so expressed is recovered from the animal's milk.

In yet another embodiment of the present invention, a BSL1, BSL2, or BSL3 "knockout" can be produced by administering to the animal antibodies (e.g., neutralizing antibodies) that specifically recognize an endogenous BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide. The antibodies can act to disrupt function of the endogenous BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide, and thereby produce a null phenotype. In one specific example, a murine BSL1, BSL2, or BSL3 polypeptide or peptide can be used to generate antibodies. These antibodies can then be given to a mouse to knockout the function of the corresponding mouse protein.

In addition, non-mammalian organisms may be used to study BSL1, BSL2, or BSL3, and their related diseases. For example, model organisms such as *C. elegans*, *D. melanogaster*, and *S. cerevisiae* may be used. BSL1, BSL2, or BSL3 homologues can be identified in these model organisms, and mutated or deleted to produce a BSL1-, BSL2-, or BSL3-deficient strain. Human BSL1, BSL2, or BSL3 can then be tested for the ability to "complement" the deficient strain. BSL1-, BSL2-, or BSL3-deficient strains can also be used for drug screening. The study of BSL1, BSL2, or BSL3 homologs can facilitate the understanding of the biological function corresponding human gene, and assist in the identification of binding proteins (e.g., agonists and antagonists).

EXAMPLES

The examples as set forth herein are meant to exemplify the various aspects of the present invention and are not intended to limit the invention in any way.

EXAMPLE 1: Identification of BSL1

Preparation of monocytes: Human monocytes were obtained from peripheral blood mononuclear cells by elutriation. The elutriation buffer contained 1 liter RPMI (GibcoBRL/Life Technologies Inc., Rockville, MD; Cat. #11875-085) with 2.5 mM EDTA and 10 μg/ml polymyxin B. The buffer was prepared 1 day prior to the elutriation procedure, and stored at room temperature. For the elutriation procedure, 225 ml EDTA whole blood/donor was obtained and prepared. Twenty milliliters of elutriation buffer was added to twelve 50 ml centrifuge tubes, and the 225 ml blood was divided equally among the tubes. Twelve milliliters of ficoll solution (lymphocyte separation medium) was used to underlay the mixture in each tube (AccuPrep Lymphocytes, Accurate Scientific Co.; Cat. # 1053980). The tubes were centrifuged at 1800 rpm for 25 min (minutes).

Sheep's red blood cells were prepared by the following procedure. Twelve milliliters of Sheep Blood Alsever's (SRBC; Colorado Serum Co., Denver, CO; Cat. # CS1112) was resuspended, and centrifuged at 2000 rpm for 10 min. The top coating of the SRBC pellet was removed, and the pellet was washed 2 times with elutriation buffer. Following each wash, the pellet was centrifuged at 2200 rpm for 8 min. After the second wash, the pellet was resuspended in 5 ml elutriation buffer and refrigerated.

Following centrifugation, the supernatant of the ficoll underlay tubes was aspirated to leave behind approximately 5 ml of the interface layer. The interface layer was then carefully removed to a new tube, without disturbing the red cell pellet in each tube. The interface layers of two 50 ml tubes was combined and transferred to a new 50 ml tube, resulting in a total of six 50 ml tubes. Elutriation buffer was added to each tube to bring final volume to 50 ml per tube. The tubes were centrifuged at 1800 rpm for 10 min, and the supernatant was removed. The peripheral blood monocytes from each donor was combined and divided between two tubes, and resuspended in 40 ml elutriation buffer per tube. The tubes were centrifuged at 1500 rpm for 10 min, the supernatant was aspirated, and the

pellet was resuspended in 30 ml elutriation buffer per tube.

Following this step, 3 ml of washed SRBC was added to each tube, and the mixture was centrifuged at 1000 rpm for 5 min. The pellet was incubated on ice for at least 1 hr, and each pellet was gently resuspended by inverting the tubes. Twelve milliliters of ficoll was used to underlay the mixture in each tube. The tubes were centrifuged at 2500 rpm for 20 min, and the interface layers were removed to new tubes as previously described. The interface layers were then resuspended in 10 ml elutriation buffer and stored on ice until the start of the elutriation procedure.

Elutriation of monocytes: Elutriation was performed as follows. The elutriation pump speed was set to ~65 ml/min, and the storage ethanol was removed from the feed lines for the pump. The feed lines, chambers, and rotor were washed with ~100 ml distilled water. Pump speed was reduced to 50 ml/min, and elutriation buffer was passed through the feed lines, chamber, and rotor. The feed lines were checked for the presence of bubbles, and any bubbles were removed. The centrifuge speed was then set at 1950 ± 1 rpm, and the pump was calibrated at 15 ml/min. The pump speed was then reduced to 11 ml/min and the stopcock to the chamber was closed.

To load cells, the loading syringe stopcock was closed and the outlet pipet was placed in the 50 ml sample tube labeled as 11 ml/min fraction. The cells were mixed and added to the loading syringe. The stopcock of the loading syringe was opened and the feeding tube was rinsed with 10 ml elutriation buffer. When ~ 0.5 ml cells remained in the syringe, elutriation buffer was added and this step was repeated one more time. Following this step, the loading syringe stopcock was closed and the chamber stopcock was opened.

Fifty milliliter fractions were collected at 11 (2 fractions), 14, 16, and 36 (2 fractions) ml/min pump speeds, and then placed on ice. In accordance with previous observations, the monocytes were predicted to be in the 36 ml/min fraction. The monocyte fraction was centrifuged at 1800

rpm for 8 min, and the cells were resuspended in 10 ml 25% Fetal Bovine Serum/RPMI with 1 µg/ml polymyxin B. The cells were counted and stored on ice until use.

Cell culture conditions: The isolated peripheral blood monocytes were resuspended in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (Hyclone, Logan, UT) supplemented with penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, 1% non-essential amino acids, 1 mM sodium pyruvate, and IL-4 (75 ng/ml) and GM-CSF (75 ng/ml) cytokines (each from GibcoBRL). The cell suspension (5×10^5 cells/ml) was transferred to tissue culture flasks and incubated in chambers containing 5% CO_2 at 37°C for 7 days. Following the incubation period, the cell cultures were pipetted vigorously to remove cells from the flask. The human monocytic cell line THP1 was grown at 37C and 5% CO_2 to a final concentration of 5×10^5 cells/ml in RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum supplemented with penicillin/streptomycin and 2 mM glutamine.

Poly(A)$^+$ RNA isolation: GM-CSF/IL-4 differentiated human peripheral blood mononuclear cells (2×10^8 cells) and THP1 human monocytes (2×10^8 cells) were washed twice with PBS (GibcoBRL) at 4°C. Poly(A)$^+$ RNA was isolated directly using the Fast Track™ 2.0 kit (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA).

Subtraction library construction: A cDNA subtraction library was made using the CLONTECH PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (CLONTECH, Palo Alto, CA). Manufacturer's protocols were followed using 2.0 µg of GM-CSF/IL-4 differentiated human peripheral blood monocyte poly (A)$^+$ RNA as the tester sample and 2.0 µg of resting THP1 monocyte poly(A)$^+$ RNA as the driver sample. Ten secondary PCRs were combined and run on a 1.2% agarose gel. Fragments ranging from approximately 0.3 kb to 1.5 kb were gel purified using the QIAGEN gel extraction kit (QIAGEN, Valencia, CA) and inserted into the TA cloning vector, pCR2.1 (Invitrogen). TOP10F' competent *E. coli* (Invitrogen) were transfected and plated onto

Lauria-Bertani (LB) plates containing 50 μg/ml ampicillin. Approximately 300 clones were isolated and grown in LB broth containing similar concentrations of ampicillin. Plasmids were isolated using QIAGEN miniprep spin (QIAGEN) and sequenced using ABI cycle sequencers (ABI Prism, PE Applied Biosystems).

Full-length cloning: To clone the 5' and 3' ends of BSL1, the SMART™ RACE (rapid amplification of cDNA ends) cDNA Amplification kit (CLONTECH) was used according to the manufacturer's directions. The 5' and 3' RACE libraries were constructed using 1.0 μg of poly(A)$^+$ RNA template obtained from human microvascular endothelial cell treated with TNF-alpha for 1 hr. The 5'-RACE-PCR mixture contained 1.5 μl of 5'-RACE ready cDNA, 0.4 μM JNF 155 primer (5'-GGCATAATAAGATGGCTCCC-3') (SEQ ID NO:21), 1 X Universal Primer Mix (UPM), 200 μM dNTP, 1 X Advantaq Plus PCR buffer (CLONTECH), and 1 X Advantaq Plus Polymerase (CLONTECH) in a total volume of 25 μl. The 3'-RACE-PCR mixture contained the same buffer conditions, 3'-RACE ready cDNA, and 0.4 μM JNF 154 primer (5'-CATGAACTGACATGTCAGGC-3') (SEQ ID NO:22). Both reactions were incubated using a traditional touchdown PCR approach: 5 cycles of incubation at 94°C for 30 sec (seconds), 65°C for 30 sec, and 72°C for 3 min; 5 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 63°C for 30 sec, and 72°C for 3 min; and 15 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 3 min.

The PCR products were isolated by electrophoresis using a 2.0% agarose gel, and DNA was visualized by ethidium bromide staining. An 888-bp fragment from the 5'-RACE reaction and a 1,110-bp fragment from the 3'-RACE reaction were purified using the QIAGEN gel extraction kit and resuspended in 10 μl distilled water. Six microliters of each fragment was ligated into pCR2.1-TA cloning vector (Invitrogen), and the ligation mixture was used to transfect TOP10F' ultracompetent *E. coli* cells (Invitrogen). Transfected cells were plated onto LB plates supplemented

with 50 μg/ml ampicillin, 40 mg/ml X-gal, and 100 mM IPTG. Colonies were isolated and grown overnight at 37°C in 4 ml of LB-broth supplemented with 50 μg/ml ampicillin. Plasmids were isolated using the QIAGEN miniprep spin kit (QIAGEN), resuspended in 30 μl distilled water, and sequenced using an ABI cycle sequencer (ABI Prism, PE Applied Biosystems).

To generate the full-length clone, JNF155RACE5.1, JNF154RACE3.2, and pCR2.1 were ligated together. JNF155RACE5.1 was doubly digested with *Xho*I and *Hind*III. JNF154RACE3.2 was doubly digested with *Hind*III and *Eco*RI. The TA cloning vector (Invitrogen) was digested with *Xho*I and *Eco*RI. Each fragment was purified using the QIAGEN gel extraction kit and resuspended in water. One microliter of each digested fragment was ligated together in the same reaction using T4 DNA ligase. The ligation mixture was used to transfect TOP10F' *E. coli* ultracompetent cells, plated onto LB plates containing 50 μg/ml ampicillin, 40 mg/ml X-gal, and 100 mM IPTG. Colonies were isolated from the plates, and grown in LB broth containing 50 μg/ml ampicillin overnight at 37°C. Plasmids containing full-length BSL1 were purified using the QIAGEN miniprep spin kit (QIAGEN), and sequenced (ABI cycle sequencer; PE Applied Biosystems). The plasmid carrying DNA encoding the full-length BSL1 sequence (pTADV:BSL1) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1989, on June 6, 2000.

EXAMPLE 2: Characterization of BSL1

Sequence analysis of the BSL1 clones: The full-length BSL1 nucleotide and predicted amino acid sequence was determined from a clone isolated from TNF-alpha treated human microvascular endothelial cell cDNA subtraction library (Figures 1A and 1B) and a clone isolated from a GM-CSF/IL-4 differentiated human monocyte cDNA library (Figures 1C). The sequencing primers for the BSL1 clones are shown in Table 1.

TABLE 1

Primer	Sequence	SEQ ID NO:
JNF 292 forward	CATTTACAAAGAGAGGTCGG	23
JNF 298 reverse	AGGGTTATTTTAAGTACCGACC	24
JNF 293 forward	GGAAATGTATGTTAAAAGCACG	25
JNF 297 reverse	GGCATGGATCCTCAGCCCTGGG	26
JNF 294 forward	GAGACCCATGGGCTCTCCAGGG	27
JNF 296 reverse	GTTCAAGCACAACGAATGAGGC	28
JNF 295 forward	TGGCTTTGCCACATGTCAAGGC	29

Both BSL1 clones had identical coding sequences, however, the clone obtained from the differentiated human monocyte cDNA library contained a different sequence in the 3' untranslated region of the BSL1 gene (Figure 2B; see bold text). The nucleotide and predicted amino acid sequences of BSL1 are shown in Figures 1A-1C.

EST clones encoding BSL1 were identified from public (GenBank) and private (Incyte Genomics) databases, and are shown in Table 2.

TABLE 2

Clone ID	Data-base	Tissue	Length (bp)	Position (1-3797)
AI733919	GenBank	Ovary tumor	429	401-829
AA292201	GenBank	Ovary tumor	430	401-830
AA399416	GenBank	Ovary tumor	325	506-830
3166968H1	Incyte	$CD4^+$ T lymphos t/CD3, CD28 Ab's	197	415-611
4415633H1	Incyte	Peripheral Blood Monocytes, t/anti-IL-10, LPS	253	542-794
AA368815	GenBank	Placenta, fetal	55	998-1052
5611256H1	Incyte	Peripheral Blood Monocytes, t/anti-IL-10, LPS, SUB	254	1005-1258
5048659F6	Incyte	Placenta, fetal	332	1016-1347
3680369H1	Incyte	Lung, aw/asthma	240	1203-1442
AI202916	GenBank	Germ cell tumor, pool, SUB	259	1381-1639

AA373164	GenBank	Lung fibroblast line, HSC172, fetal	274	1418-1689
4354914H1	Incyte	Fat, auxiliary, aw/breast adenoCA	288	1449-1736
AA037078	GenBank	Fibroblasts, senescent	365	1529-1893
171033R6	Incyte	Bone Marrow	273	1785-2057
R30906/ R30861*	GenBank	Placenta, neonatal	1932	1867-3798

*Full-length sequence not known.

It is noted that the BSL1 coding sequence and predicted amino acid sequence have also been identified as B7-H1 and PD-L1 (H. Dong et al. (1999) *Nature Med.* 5:1365-9; GenPept Accession No. NP_054862; G.J. Freeman et al. (2000) *J. Exp. Med.* **192**:1027-1034). In addition, a murine homolog of B7-H1 has been identified (H. Tamura et al. (2001) *Blood* 97:1809-1816). Notably, the mouse and human B7-H1 factors have been described as costimulatory molecules (H. Dong et al. (1999) *Nature Med.* 5:1365-9; H. Tamura et al. (2001) *Blood* 97:1809-1816), whereas PD-L1 has been described as an inhibitor of T-cell proliferation (G.J. Freeman et al. (2000) *J. Exp. Med.* **192**:1027-1034).

Chromosomal Mapping: BSL1 was previously mapped utilizing radiation hybrid mapping (T. Ishida et al. (1999) *CytoGenet. Cell Genet.* 85:232-6). Analysis of NCBI's Genemap '99 using GenBank EST AA399416 indicated that the BSL1 gene was linked to chromosome 9p24 with the order of AFM274xe1 - stSG46389 (BSL1) - AFM242xh6.

BSL1 expression analysis: BSL1 expression patterns were determined by northern blot analysis of several cell types, including resting peripheral blood T-cells, peripheral blood T-cells stimulated with anti-CD3/anti-CD28 antibodies, peripheral blood T-cells stimulated with phorbol 12 myristate 13 acetate (PMA), peripheral blood T-cells stimulated with phytohemaglutinin (PHA), resting THP1 monocytes, THP1 stimulated with lipopolysacharide (LPS), resting peripheral blood monocytes, resting peripheral blood monocytes stimulated with PHA, resting peripheral blood monocytes stimulated with GM-CSF and IL-4, RAJI B cells, RAMOS B cells,

resting human microvascular endothelial cells (HMVEC), HMVEC stimulated with TNF-alpha, and serum starved H292 human lung epithelial cells.

Cell culture conditions: Peripheral blood T-cells were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 10% human serum at 37°C and 5% CO_2 for 48 hr. Peripheral blood T-cells stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies were grown in RPMI 1640 with 10% human serum at 37°C and 5% CO_2 for 24-72 hr in the presence of 1 µg/ml anti-CD3 monoclonal antibodies (P.S. Linsley et al. (1993) *Ann. Rev. Immunol.* 11:191-212) and 1 µg/ml anti-CD28 monoclonal antibodies (Linsley et al., *supra*). Peripheral blood T-cells stimulated with PMA and ionomycin were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 10% human serum at 37°C and 5% CO_2 for 48 hr in the presence of 30 ng/ml PMA with 1 µM ionomycin. Peripheral blood T-cells stimulated with PHA were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 10% human serum at 37°C and 5% CO_2 for 48 hr in the presence of 3 µg/ml PHA. THP1 cells obtained from an immortal human monocytic cell line were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 10 % fetal bovine serum at 37°C and 5% CO_2 with or without 100 ng/ml LPS for 2 hr. Peripheral blood monocytes were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 25% fetal bovine serum in teflon plates at 37°C and 5% CO_2 with or without 1 µg/ml PHA or 15 ng/ml GM-CSF with 75 ng/ml IL-4 for 7 days. RAJI and RAMOS cells obtained from immortal human B cell lines were grown in RPMI 1640 (Hyclone) with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO_2. HMVEC were grown in DMEM with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO_2 with or without 10 ng/ml TNF-alpha for 1-24 hr. H292 cells obtained from an immortal human lung epithelial cell line were grown in RPM1 1640 (Hyclone) with 10% fetal bovine serum at 37°C and 5% CO_2, and then grown in serum free medium for 16 hr prior to harvest.

Northern blot analysis: For northern blot analysis, 0.5 µg of total poly(A)$^+$ RNA obtained from each cell type was separated on a 1.2% agarose gel containing 3% formaldehyde, and transferred to a Hybond-N+ nylon membrane (Amersham) overnight using 20 X SSC as transfer buffer.

The membrane was then auto-crosslinked, washed with 4 X SSPE, and allowed to air-dry. The membrane was then prehybridized at 65°C in ExpressHyb solution (CLONTECH) for 1 hr, and then hybridized with a [^{32}P]dCTP-radiolabeled (NEN, Boston, MA) random primed BSL1 cDNA probe. The probe was obtained from a 686 bp BSL1 *HindIII/PstI* fragment (Figure 6A), which was purified using the NucTrap purification column (Stratagene), and radiolabeled to have a specific activity of 2.0 x 10^8 cpm/ml. Following hybridization, the membrane was washed in 2.0 X SSC with 0.05% SDS at 65°C, and exposed to film for 72 hr at -70°C.

A 3.8 kb BSL1 mRNA transcript was detected in several cell types. In particular, high levels of BSL1 mRNA were detected in peripheral blood monocytes stimulated with PHA, and in HMVEC stimulated with TNF-alpha (Figure 7D). Moderate levels of BSL1 mRNA were detected in peripheral blood T-cells following stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies for 72 hr (Figure 7D). Moderate levels of BSL1 mRNA were also observed in THP1 cells stimulated with LPS (Figure 7D). However, BSL1 mRNA was not detected in resting THP1 cells, resting BJAB cells, LPS-activated BJAB cells, resting peripheral blood T-cells, PBT-activated peripheral blood T-cells, or GM-CSF/IL-4-activated peripheral blood monocytes (Figure 7D). In addition, BSL1 mRNA was not detected in resting RAJI cells, resting RAMOS cells, or serum starved H292 cells (Figure 7D).

BSL1-Ig fusion construct: The DNA fragment corresponding to the BSL1 predicted extracellular domain (ECD; amino acids 23-290) was amplified by PCR utilizing full-length BSL1-pCR2.1 as a template, and oligonucleotide primers that hybridize to the 5' and 3' ends of the BSL1 ECD: JNF 184 forward primer 5'-TCAGGTACTAGTGTT CCCAAGGACCTATATGTGG-3') (SEQ ID NO:30); and JNF 185 reverse primer (5'-GATTCGAGATCTCCTCGAGTCCTTTCATTTGGAGGATGTGC C-3' (SEQ ID NO:31). PCR was performed using ~100 ng template DNA, 0.4 μM of each primer, 200 μM dNTP, 1X Advantage 2 PCR buffer, and 1 X

Advantage 2 Polymerase (CLONTECH) in a total volume of 50 µl. The PCR mixture was incubated at 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, and 72°C for 1 min, and this was repeated for 30 cycles. The PCR products were separated by gel electrophoresis on a 1.2% agarose gel, and the DNA was visualized by ethidium bromide staining. A 680-bp fragment corresponding to the BSL1 ECD was purified from the agarose gel using the QIAGEN gel extraction kit (QIAGEN), and the resuspended in 32 µl distilled water.

The BSL1 ECD fragment was then digested using *Spe*I and *Bgl*II restriction endonucleases and directionally cloned into *SpeI/BamH*I-digested PD19 vector using 5 U/µl T4 DNA ligase (GibcoBRL). The ligation mixture was used to transfect DH5 alpha competent *E. coli* cells (GibcoBRL), and transfected cells were plated onto Lauria-Bertani (LB) plates containing 50 µg/ml ampicillin. Plates were incubated overnight at 37°C, and colonies were isolated and grown overnight at 37°C in LB broth containing 50 µg/ml ampicillin. Plasmids were isolated using the QIAGEN miniprep spin kit, resuspended in 50 µl distilled water, and sequenced using ABI cycle sequencer (PE Biosystems, Foster City, CA). Primer sequences were as follows: sense JNF 184 (5'-TCAGGTACTAG TGTTCCCAAGGACCATATGTGG-3') (SEQ ID NO:32) and anti-sense JNF 185 (5'-GATTCGAGATCTCCTCGAGTCTTTCATTGGGGATGTGCC-3') (SEQ ID NO:33).

The plasmid carrying DNA encoding BSL1-Ig (pD19:BSL1Ig) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1992, on June 6, 2000. The nucleotide and predicted amino acid sequence of BSL1-Ig is shown in Figures 2A and 2B.

BSL1 monoclonal antibodies: The BSL1-Ig fusion protein was purified by affinity purification as described for BSL3-Ig, below. The purified fusion protein was then used to immunize mice using the protocol described for BSL3-Ig. Following this, hybridoma cell lines were constructed and BSL1 monoclonal antibodies (MAbs) were isolated as described for BSL3,

below. In addition, BSL1 MAbs were screened for specificity by whole cell ELISA. For whole cell ELISA, COS cells were transiently transfected with full length BSL1 (L156-3). Cells were lifted with versene on day 4 following transfection. Cells were washed twice in PBS and resuspended in PBS with 10% FBS at a concentration of 5.0×10^6 cells/ml. Then, 50 µl of cells were added to each well of a Falcon 3911 96-well plate and incubated on ice for 30 min. Next, 50 µl supernatant from the putative BSL1 hybridomas was added per well and incubated on ice 30 min. Cells were washed twice in PBS. Cells were then resuspended in goat anti-mouse HRP-conjugated secondary antibodies (Amersham Cat. # NA9310) diluted 1:1000 in PBS. Cells were incubated on ice for 30 min, washed twice in PBS, and resuspended in 125 µl PBS. Following this, cells were transferred to a fresh plate. Cells were washed in PBS and resuspended in 25 µl PBS. Next, 125 µl Peroxidase solution B (KPL, Gaithersburg, MD; Cat. #50-65-00) with TMB peroxidase substrate (KPL Cat. # 50-76-01) was added. Color was allowed to develop. Cells were pelleted, and 100 µl supernatant was transferred to an Immulon 2 plate. The signal was quenched with 100 µl 1 N sulfuric acid, and the plates were read at OD_{450}/OD_{630}.

EXAMPLE 3: Identification of BSL2

Database searches: BSL2 was identified by BLAST and FASTA analysis of the Incyte Genomics sequence databases (Incyte Genomics) utilizing the B7-1 or B7-2 amino acid sequences as query sequences. For BLAST analysis, the BLOSSUM-62 scoring matrix was used (S. Henikoff et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919), and the remaining parameters were set to the default designations. For FASTA analysis, all the parameters were set to the default designations (W.R. Pearson et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448). The sequence database searches identified two Incyte Genomics 'templates': 252899.6 and the potential splice variant 252899.8 (Incyte Genomics templates are consensus EST sequences that are considered to represent

mRNA transcripts).

Sequence analysis of the BSL2 clone: Incyte Genomics template 252899.8 was used to identify Incyte Genomics clone 4616811. Incyte Genomics clone 4616811 belongs to Incyte Genomics Library ID No. BRAYDIT01, which was originally constructed using poly(A)$^+$ RNA from diseased hypothalamus tissue. Incyte Genomics clone 4616811 was obtained from Incyte Genomics and used for sequence analysis (ABI cycle sequencer, PE Biosystems) with the primers shown in Table 3.

TABLE 3

Clone	Primer	Sequence	SEQ ID NO:
4616811	392.423	GGTGCACAGCTTTGCTGA	34
4616811	392.415	GCTGTGCACCAGCTGTTT	35
4616811	392.439	GCTATGAAAGGTCCAGAG	36
4616811	392.499	GAATCTGGTGGTGTCCAA	37
4616811	392.1716	CTCTGTCACCATCACAGG	38
4616811	392.852	CTCTGTCACCATCACACC	39
4616811	392.523	GAAATCCCGGATGCTCAC	40
4616811	392.766A	ACCACACGTGTTCCAGCA	41
4616811	392.766B	TGCTGGAACACGTGTGGT	42
4616811	392.383	GGCCCTCAGCAAAGCTGT	43
4616811	392.1448	AGCTGTAGGTGCCATTCG	44
4616811	392.892	AGGGACCTGGACCTCCAC	45
4616811	392.1528	TGGGGGGAATGTCATAGG	46
4616811	392.1215	AGCAGGCAGGATGACTTA	47
4616811	392.1242	AACAGACCACCCACAACC	48
6487516	314.570	GCAAATGGCACCTACAGC	49
6487516	314.634	TCTGGGGTGTGATGGTGA	50
6487516	314.450	ATGAAAGGTCCAGAGGGC	51
6487516	314.584	ACCCATAATTCTTACCCA	52
6487516	314.824	CACAGCTCTGTTTGATCT	53

6487516	314.644	CTCCTACCCTCTGGCTGC	54

Notably, the predicted amino acid sequence of Incyte Genomics clone 4616811 contained 2 sets of V/C (variable/constant domain) folds, whereas typical B7-related amino acid sequences contain only 1 set of V/C folds. Seqweb Gap (Genetics Computer Group) analysis indicated that the BSL2-4616811 sequence shared less than 50% sequence identity with B7-1, B7-2, BSL1/B7-H1 nucleotide sequences, while the BSL2-4616811 amino acid sequence shared less than 35% sequence identity with the B7-1, B7-2, and BSL1/B7-H1 amino acid sequences. A sequence similar to BSL2-4616811 has been identified as an amyloid precursor protease in International Patent Application No. WO 00/68266 to G.W. Becker et al.

The nucleotide and predicted amino acid sequences of Incyte Genomics clone 4616811 (BSL2-4616811) are shown in Figures 3A and 3B. The plasmid carrying DNA encoding BSL2-4616811 (pINCY:BSL2-4616811) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1993, on June 6, 2000.

Full-length cloning: To verify the sequence of Incyte Genomics clone 4616811, PCR primers were designed to amplify the nucleotide sequence from the predicted translation start codon to the predicted translation stop codon of the clone: forward primer BSL2-7 (5'-ATGCTGCGTCGGCG-3') (SEQ ID NO:55); reverse primer BSL2-8 (5'-TCAGGCTATTTCTTGTCCATCATC-3') (SEQ ID NO:56).

A HMVEC library was constructed utilizing the SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (CLONTECH) according to manufacturer's instructions, using poly(A)$^+$ RNA obtained from human microvascular endothelial cells treated with TNF-alpha for 1 hr as the RACE reaction template. The PCR mixture included 1 µl PCR-ready HMVEC library, 5 µl PCR buffer (GibcoBRL), 1.5 µl 50 mM $MgCl_2$, 1 µl 10 mM dNTPs

(Boehringer Mannheim Biochemicals/Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN), 25 pMol BSL2-7 primer, 25 pMol BSL2-8 primer, and 1 µl CLONTECH Advantage Enzyme mix in a total volume of 50 µl. PCR was performed in a PE Biosystems Thermal Cycler model 9700. The PCR mixture was incubated at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec, followed by incubation at 72°C for 10 min.

One microliter of the PCR mixture was ligated directly into pCR2.1 (Invitrogen) according to the manufacturer's directions. One half of the ligation mixture was used to transfect Max-Efficiency DH5 alpha *E coli* cells (GibcoBRL) in accordance with the manufacturer's directions. Transfected cells were plated onto LB agar plates with 100 µg/ml ampicillin and 30 µg/ml X-gal and incubated at 37°C overnight. White colonies were isolated and grown overnight at 37°C in 5 ml LB broth containing 100 µg/ml ampicillin.

Plasmid DNA was isolated from the bacterial culture using Spin Miniprep kit (QIAGEN) according to the manufacturer's directions. DNA was digested with *EcoR*I to release the cloned insert, and the digestion mixture was analyzed by electrophoresis on a 1% agarose gel. Insert fragments larger than 700 bp were sequenced using the vector-specific M13 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3') (SEQ ID NO:57) and M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') (SEQ ID NO:58) sequencing primers (ABI cycle sequencer, PE Applied Biosystems).

Sequence analysis indicated that two splice variants of BSL2 had been cloned: BSL2-L165-21 and BSL2-L165-35b. The BSL2-L165-21 and BSL2-L165-35b splice variants encoded amino acid sequences that each contained one V/C fold and were ~95% identical to one another. Seqweb Gap analysis (Genetics Computer Group) also indicated that the BSL2-L165-21 and BSL2-L165-35b nucleotide sequences shared less than 50% sequence identity with B7-1, B7-2, and BSL1/B7-H1 nucleotide sequences, while the BSL2-L165-21 and BSL2-L165-35b amino acid

sequences shared less than 35% sequence identity with the B7-1, B7-2, and BSL1/B7-H1 amino acid sequences.

Sequence analysis further indicated that the amino acid and nucleotide sequences of BSL2-L165-21 shared less than 99% sequence identity with the PRO352 amino acid and nucleotide sequences, respectively, reported in International Patent Application No. WO 99/46281 to K.P. Baker et al. The amino acid and nucleotide sequences of BSL2-L165-35b shared less than 99.5% sequence identity with the PRO352 amino acid and nucleotide sequences, respectively.

Amino acid sequence alignments using GCG Gap program (GCG, Madison, WI) indicated that the longest stretch of identical amino acid residues shared by BSL2-L165-21 and PRO352 was 88 contiguous amino acids in length. The longest stretch of identical amino acid residues shared by BSL2-L165-35b and PRO352 was 168 contiguous amino acids in length. The longest stretch of identical amino acids shared by BSL2-4616811 and PRO352 was 206 contiguous amino acids in length.

Nucleotide sequence alignments indicated that the longest stretch of identical bases shared by BSL2-L165-21 and PRO352 was 254 contiguous nucleotides in length. The longest stretch of identical bases shared by BSL2-L165-35b and PRO352 was 305 contiguous nucleotides in length. The longest stretch of identical bases shared by BSL2-4616811 and PRO352 was 302 contiguous nucleotides in length. Notably, BSL2-L165-35b has also been identified as B7-H3, a co-stimulatory molecule for T-cell activation (A.I. Chapoval et al. (2001) *Nature Immunology* **2**:269-274).

The nucleotide and predicted amino acid sequences of the BSL2-L165-21 splice variant are shown in Figures 3C and 3D, while the nucleotide and predicted amino acid sequences of BSL2-L165-35b are shown in Figures 3E and 3F. The plasmid carrying DNA encoding BSL2-L165-21 (pCR2.1:BSL2-L165-21) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1987, on June 6, 2000. In

addition, the plasmid carrying DNA encoding BSL2-L165-35b (pCR2.1:BSL2-L165-35b) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1988, on June 6, 2000.

EXAMPLE 4: Characterization of BSL2

BSL2 expression analysis: BSL2 expression patterns were determined by northern blot analysis of various tissue and cell types, using the BSL2-4616811-derived probe shown in Figure 6B, and the procedure described for BSL1 (see above). A 3.6 kb BSL2 mRNA transcript was detected in several cell types. In particular, high levels of BSL2 mRNA were detected in all HMVEC stimulated with TNF-alpha. Moderate levels of BSL2 mRNA were detected in resting THP1 cells, and THP1 cells activated with LPS (Figure 7D). In contrast, low levels of BSL2 mRNA were detected in peripheral blood monocytes stimulated with PHA or GM-CSF/IL-4, and BSL2 mRNA was not detected in resting or stimulated peripheral blood T-cells, or in resting RAJI cells, resting RAMOS cells, or serum starved H292 cells (Figure 7D).

PCR assay to determine relative abundance of BSL2-4616811 and BSL2-L165-35b: To determine whether BSL2-4616811 or BSL2-L165-35b was predominant species of BSL2, and whether predominance corresponded with cell type and/or stimulus type, the following experimental approach was used. Analysis of the genomic sequence of BSL2 indicated that the sequence includes several exons separated by introns. It was presumed that a primary transcript was produced from this sequence, and the primary transcript was spliced to yield BSL2-4616811 mature RNA. Analysis of BSL2-4616811 sequence showed that it coded for the following: a 5' UTR, an initiating ATG, a signal peptide sequence, a variable Ig fold (v1), an Ig constant fold (c1), an Ig V fold (v2), an Ig C fold (c2), a short hinge a putative transmembrane domain, a short cytoplasmic tail, a stop codon, and a 3' UTR.

The BSL2-4616811 coding sequence appeared unique in the human genome, as the v1 and c1 (v1c1) sequence was about 95% identical to the v2 and c2 (v2c2) sequence at the amino acid level. Importantly, all of the structurally important residues were conserved in the v1c1 and v2c2 amino acid sequences, and most of the changes from v1c1 to v2c2 were conservative changes. Comparison of the BSL2-L165-21 and BSL2-L165-35b sequences (which contained only single V and C folds) to the BSL2-4616811 sequence indicated that in each case, a splicing event occurred which resulted in a shift from v1 to the exactly homologous place in v2. However, BSL2-L165-21 shifted from v1 to v2 at a different place than BSL2-L165-35b.

Despite the 98% identity between v1c1 and v2c2 at the nucleotide level, sequence comparison between the two regions using GCG Gap revealed one short region of relatively low homology. A forward primer designated BSL2-9 was designed to take advantage of this short region of low homology. BSL2-9 was designed to bind specifically to v1 (Figure 8E demonstrates the specificity of the BSL2-9 primer). A reverse primer, BSL2-11 was designed to hybridize to the hinge sequence.

Notably, the BSL2-4616811 transcript contained both the BSL2-9 v1-binding site in v1 and the homologous site in v2. The BSL2-L165-35b transcript contained only the BSL2-9 v1 binding site. The BSL2-L165-21 transcript contained only the v2 site. Accordingly, PCR performed with primers BSL2-9 and BSL2-11 was expected to produce: 1) a PCR product of approximately 1150 bp, representing BSL2-4616811; or 2) a PCR product of about 550 bp, representing BSL2-L165-35b.

PCR was initially conducted with BSL2-4616811 plasmid to confirm the specificity of the BSL2-9 primer. PCR was performed using 2 μl 10 ng/μl BSL2-4616811 plasmid DNA, 5 μl PCR buffer (GibcoBRL), 1.5 μl of 25 mM $MgCl_2$ (GibcoBRL), 1 μl of 10 mM dNTPs (GibcoBRL), 2.5 μl of 10 pMol/μl BSL2-9 primer (5' TGGTGCACAGCTTTGCT 3') (SEQ ID NO:59), 2.5 μl of 10 pMol/μl BSL2-11 primer (5' TCTGGGGGGAATGTCAT 3') (SEQ

ID NO:60), 0.5 µl of 5U/µl GibcoBRL platinum Taq DNA polymerase (Cat. # 10966-018), and 35 µl dH_2O. PCR was performed on a PE Biosystems 9700 using the following cycling conditions: 94°C for 30 sec; followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 61°C for 30 sec, 72°C for 60 sec; followed by 72°C for 10 min. Following this, 40 µl of the PCR reaction was run on a 1.2% agarose gel next to Lambda *Bst*EII DNA ladder (New England Biolabs Beverly, MA; Cat. # 301-4S). The 1150 bp band was predominant, indicating that the BSL2-9 PCR primer was specific for the BSL2-4616811 sequence (Figure 8E).

Raji, Ramos, PM-LCL, PL-LCL, and CE-LCL B-like cell lines; HL-60 and Thp1 monocytic like cell lines; and CEM and Hut78 T-like cell lines were grown in RPMI 1640 with 10% FBS and 1% GibcoBRL penicillin/streptomycin to a concentration of 5 X 10^5 cells/ml. The cultures were split and one-half of the B-like and T-like cell cultures were stimulated with 30 *ng/ml* PMA and 1 µM ionomycin for 24 hr. Monocytic cell lines were stimulated with 1 µg/ml LPS for 24 hr. Early passage HUVEC were grown to 90% confluence, and one-half of the culture was stimulated with 10 ng/ml TNFα, and harvested at 6 or 24 hr. Unstimulated HUVEC were harvested at 24 hr.

Peripheral blood T-cells from two donors were purified as described, above. Cells were added (1 x 10^6 cells/ml) to RPMI 1640 with 10% human serum and 1% GibcoBRL penicillin/streptomycin. Cells were then incubated at 37°C and 5% CO_2 for 72 hr. T75 flasks were coated with 1 µg/ml CD3 Mab G19.4 (described herein) in PBS for 4 hr at 37°C. The flask was washed twice with PBS, and cells were added (1 x 10^5 cells/ml) in RPMI 1640 with 10% human serum and 1% GibcoBRL penicillin/streptomycin. CD28 MAb 9.3 (previously described) was added to a final concentration of 1 µg/ml. Cells were grown at 37°C and 5% CO_2 for 72 hr. Cells were added (1 x 10^6 cells/ml) to RPMI 1640 with 10% human serum and 1% GibcoBRL penicillin/streptomycin. PMA was added to 30

ng/ml and ionomycin was added to 1 μM and incubated at 37°C and 5% CO_2 for 48 hr. Proliferation of stimulated T-cells was confirmed visually. All cell types were pelleted and frozen on dry ice and stored at - 70°C until use.

Total RNA was prepared using the Invitrogen (Carlsbad, CA) SNAP total RNA isolation kit (Cat. # K1950-01) according to the manufacturer's instructions. First strand cDNA was produced using the GibcoBRL Superscript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Cat. # 11904-018) according to the manufacturer's instructions for oligo dT priming. PCR was performed using 2 μl first strand cDNA, 5 μl PCR buffer (GibcoBRL), 1.5 μl of 25 mM $MgCl_2$ (GibcoBRL), 1 μl of 10 mM dNTPs (GibcoBRL), 2.5 μl of 10 pMol/μl BSL2-9 primer (5' TGGTGCACAGCTTTGCT 3') (SEQ ID NO:61), 2.5 μl of 10 pMol/μl BSL2-11 primer (5' TCTGGGGGGAATGTCAT 3') (SEQ ID NO:62), 0.5 μl of 5U/μl GibcoBRL platinum Taq DNA polymerase (Cat. # 10966-018), and 35 μl dH_2O. PCR was performed on a PE Biosystems 9700 using the following cycling conditions: 94°C for 30 sec; followed by 35 cycles of 94°C for 30 sec, 61°C for 30 sec, 72°C for 60 sec; followed by 72°C for 10 min. Following this, 40 μl of the PCR reaction was run on a 1.2% agarose gel.

PCR analysis indicated that certain cell types contained predominantly the BSL2-4616811 transcript, with or without stimulation. Unstimulated and stimulated PL-LCL cells showed higher levels of the BSL2-4616811 transcript than the than the BSL2-L165-35b transcript (Figure 8A). Both unstimulated and stimulated HUVEC cells showed higher levels of the BSL2-4616811 transcript than the BSL2-L165-35b transcript (Figure 8B).

In contrast, other cell types contained predominantly the BSL2-L165-35b transcript, with or without stimulation. Stimulated Raji cells, and unstimulated and stimulated Ramos cells showed higher levels of the BSL2-L165-35b transcript than the BSL2-4616811 transcript (Figure 8A).

Unstimulated and stimulated HL60 cells showed higher levels of the BSL2-L165-35b transcript than the BSL2-4616811 transcript (Figure 8B).

In addition, certain cell types showed an increase in BSL2-4616811 transcript levels upon activation. Unstimulated PM-LCL cells showed higher levels of the BSL2-4616811 transcript, which increased relative to the BSL2-L165-35b transcript upon stimulation (Figure 8A). Similarly, unstimulated CE-LCL cells showed higher levels of the BSL2-4616811 transcript, which increased relative to the BSL2-L165-35b transcript upon stimulation (Figure 8B). Unstimulated Thp1 cells showed equivalent levels of the BSL2-4616811 and the BSL2-L165-35b transcript, however, levels of the BSL2-4616811 transcript increased upon stimulation (Figure 8B). Unstimulated peripheral blood T cells from donor 079 showed predominantly BSL-L165-35b but shifted to predominantly BSL2-4616811 upon stimulation. Peripheral blood T cells from donor 124 showed a less dramatic shift from BSL2-L165-35b to BSL2-4616811 upon stimulation (Figure 8C). Unstimulated CEM cells showed higher levels of the BSL2-L165-35b transcript, but levels of the BSL2-4616811 transcript increased upon activation (Figure 8D).

Other cell types showed an increase in BSL2-L165-35b levels upon activation. Unstimulated HUT78 cells showed higher levels of the BSL2-4616811 transcript, but levels of the BSL2-L165-35b transcript increased upon activation (Figure 8D). These results, coupled with the conservation of the amino acid sequences in all four Ig folds, the conservation of structurally important amino acid residues in all four Ig folds, and the conservative nature of the amino acid differences between v1c1 and v2c2, support a function for BSL2-4616811 (BSL2vcvc) which is distinct from BSL2-L165-35b and BSL2-L165-21 (BSL2vc).

To rule out the presence of PCR artifacts, the PCR product from HUVEC activated with TNFα for 24 hr was cloned using the Invitrogen Original TA Cloning Kit (Cat. # K2000-01) according to the manufacturer's directions. The construct was used to transfect bacterial cells, and 25 white

colonies were isolated and grown in LB with 100 µg/ml ampicillin. DNA preps were made and sequencing was performed. Of the 25 clones, 10 clones did not contain insert, 3 clones did not produce readable sequence, 3 clones contained BSL2-related sequences with extensive deletions, and the remaining 9 clones produced sequence consistent with BSL2-4616811.

It was noted that no PCR product corresponding to BSL2-4616811 or BSL2-L165-35b was observed in unstimulated Raji cells. To confirm this result, PCR was repeated for unstimulated and unstimulated Raji cells as previously described. Again, no PCR product was detected for the unstimulated Raji cells. Following this, PCR was performed using G3PDH primers with template isolated from unstimulated and stimulated Raji cells. Cycling conditions were identical to those described above, except the annealing temperature was 55°C, and the extension time was 45 sec. Relatively equal amounts of G3PDH product was detected for both unstimulated and stimulated Raji cells. This provided further support for the observation that unstimulated Raji cells do not contain detectable BSL2 transcript.

BSL2-4616811-Ig fusion construct: To construct the BSL2-4616811-Ig plasmid, the BSL2-4616811 extracellular domain was PCR amplified from first strand cDNA (GibcoBRL Cat. # 11904-018). cDNA was prepared from RNA purified from THP1 cells stimulated with 100 ng/ml LPS for 2 hr. RNA was purified using Invitrogen FastTrack 2.0 (Cat. # K1593-02). The PCR reaction included 1 µl cDNA; 5 µl GibcoBRL 10 X PCR buffer; 1.5 µl 25 mM $MgCl_2$; 1 µl 10 mM dNTPs (Boehringer-Mannheim); 2.5 µl BSL2-L165-21-Ig-1 primer (10 pM/µl); 2.5 µl BSL2-L165-21-Ig-2 primer (10 pM/µl); 1 µl CLONTECH Advantage polymerase (Cat. # 8417-1); and 35.5 µl milliQ H_2O. The primers contained the following sequence: BSL2-L165-21-Ig-1: 5' gg ggt acc ATG CTG CGT CGG CG 3' (SEQ ID NO:63); BSL2-L165-21-Ig-2: 5' cg gaa ttc TGG GGG GAA TGT CAT AG 3' (SEQ ID NO:64). PCR samples were incubated at 94°C for 1 min, followed by 35

cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 59°C for 30 sec, and 72°C for 45 sec, followed by incubation at 72°C for 10 min.

Following this, 30 µl of the PCR reaction was run on a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel. A band of approximately 1100 bp was excised and purified using QIAGEN Gel Extraction Kit (Cat. # 28704). One microliter of the purified PCR product (L254) was ligated into pCR2.1 using the TA cloning kit (Invitrogen; Cat. # K2050-01). Five microliters of the ligation mixture was transfected into MAX Efficiency DH5-alpha competent bacteria (GibcoBRL; Cat. # 18258-012), and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin and 800 µg X-Gal. White colonies were inoculated into 5 ml LB broth containing 100 µg/ml ampicillin, and grown at 37°C for 18 hr. Plasmid DNA was purified with QIAGEN spin miniprep kit (Cat. # 27106). Plasmid DNA was digested with *Kpn*I and *Eco*RI. Plasmids containing inserts of about 1300 bp were sequenced using Applied Biosystems automated DNA sequencers (ABI 3700 capillary array sequencers). L254-7 was determined to contain wild-type BSL2-4616811 sequence.

The Fc portion of human IgG1 was PCR amplified using 0.001 µl BSL1-Ig, described previously; 5 µl GibcoBRL PCR buffer; 1.5 µl 25 mM $MgCl_2$; 1 µl 10 mM dNTPs (Boehringer-Mannheim); 2.5 µl Ig-1 primer (10 pM/µl) 2.5 µl BSL1Ig-2 primer (10 pM/µl); 1 µl CLONTECH Advantage polymerase; 36 µl dH_2O. The primers contained the following sequence: IgG-1: 5'g gaa ttc GAG CCC AAA TCT TGT GAC AA 3' (SEQ ID NO:65); BSL1Ig-2 gc gc tct aga TCA TTT ACC CGG AGA CAG G (SEQ ID NO:66). PCR samples were incubated at 94°C for 1 min; followed by 25 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 59°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec; followed by incubation at 72°C for 10 min.

Following this, 30 µl of the PCR reaction was run on a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel. A band of about 700 bp was excised and purified using QIAGEN Qiaquick gel extraction kit. Two microliters of the purified

fragment (L174) was ligated into pCR2.1 using the TA cloning kit (Invitrogen). Five microliters of the ligation mixture was transfected into GibcoBRL MAX Efficiency DH5-alpha competent bacteria, and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin and 800 µg X-gal. Plates were incubated for 18 hr at 37°C. White colonies were inoculated into 5 ml LB broth containing 100 µg/ml ampicillin and grown at 37°C for 18 hr. Plasmid DNA was prepared using QIAGEN Qiaprep spin miniprep kit. Plasmid DNA was digested with *EcoR*I and run on an agarose gel. Plasmids containing inserts of about 900 bp were sequenced. L174-3 was determined to contain wild-type human IgG1 Fc sequence.

L174-3 was digested with *EcoR*I/*Xba*I and separated on a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel. A band of about 750 bp was excised and purified using QIAGEN gel extraction kit. Ten microliters of the purified fragment was run on an agarose gel next to a standard to obtain an estimate of the concentration. Approximately 20 ng of the *EcoR*I/*Xba*I fragment was ligated (Ligation 200) into 40 ng of *EcoR*I/*Xba*I digested pCDNA3.1+ vector (Invitrogen) using GibcoBRL high concentration T4 DNA ligase (5 U/µl) diluted in GibcoBRL T4 DNA ligase buffer. Five microliters of the ligation mixture was transfected into MAX Efficiency DH5-alpha competent bacteria (GibcoBRL), and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin. Plates were incubated at 37°C for 18 hr. Colonies were inoculated into LB broth containing 100 µg/ml ampicillin. Plasmid DNA was purified using QIAGEN spin miniprep kit and sequenced. The L200-1 sequence was determined to be identical to the L174-3 sequence.

The L254-7 BSL2-4146811 construct was digested with *Kpn*I/*Eco*RI. A band of about 1300 bp was excised from a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel and ligated into the L200-1 Fc construct digested with *Kpn*I/*Eco*RI. Five microliters of the ligation reaction was transfected into MAX Efficiency DH5-alpha cells and plated onto LB plates containing 100

μg/ml ampicillin. Colonies were grown, and plasmid DNA was purified as above. Plasmid DNA was digested with *KpnI/XbaI* and separated on an agarose gel as above. Plasmids containing a band of about 2 kb were sequenced as above. BSL2-4616811-Ig was determined to contain the wild-type BSL2-4616811 and wild-type human IgG1 sequences. The nucleotide and predicted amino acid sequence of BSL2-4616811-Ig is shown in Figures 4A and 4B.

BSL2 monoclonal antibodies: The BSL2-4616811-Ig fusion protein was purified by affinity purification as described for BSL3-Ig, below. The purified fusion protein was then used to immunize mice using the protocol described for BSL3-Ig, except that a fourth boost was used. Following this, hybridoma cell lines were constructed and BSL2 MAbs were isolated as described for BSL3, below.

EXAMPLE 5: Identification of BSL3

Database searches: BSL3 was identified by BLAST and FASTA analysis of the Incyte Genomics sequence databases (Incyte Genomics) utilizing the B7-1 or B7-2 proteins as query sequences, and the parameters described for the BSL2 searches. The sequence database searches identified Incyte Genomics 'gene' 117327 (an Incyte Genomics gene is an EST sequence that is grouped with similar sequences, and considered to represent the product of a single genomic locus). The Incyte Genomics gene 17327 has since been renamed as Incyte Genomics gene 899898. In a secondary screen, the BLAST and FASTA programs were used to search the Incyte Genomics sequence databases (Incyte Genomics) for sequences related to the mouse AF142780 gene (potential ortholog of the 117327 gene), using the previously described search parameters. These searches identified Incyte Genomics gene 143522.

The 143522 and 117327 genes were then used to identify Incyte Genomics clones 3844031 and 3207811, respectively. The 3844031 clone belongs to Incyte Genomics Library ID No. DENDTNT01, which was originally constructed utilizing poly(A)$^+$ RNA isolated from untreated dendritic

cells from peripheral blood. The 3207811 clone belongs to Incyte Genomics Library ID No. PENCNOT03, which was originally constructed utilizing poly(A)$^+$ RNA isolated from corpus cavernosum tissue. The 3844031 and 3207811 clones were obtained from Incyte Genomics, and sequenced (ABI cycle sequencer, PE Biosystems) using the primers shown in Table 4.

TABLE 4

Clone	Primer	Sequence	SEQ ID NO:
3844031	316.491	GAAGGCCTCTACCAGGTC	67
3844031	316.512	CTTTAGGCGCAGAACACT	68
3844031	316.203	AAGGGTCAGCTAATGCTC	69
3844031	316.379	TCAGTTTGCACATCTGTA	70
3844031	316.1538	TATGCTATCAAGATTCCA	71
3844031	316.1839	GTAAAGTGCAGTAGTGCT	72
3844031	316.1601	TATGAGCTCACAGACAGG	73
3207811	315.560	AGGTTCAGATAGCACTGT	74
3207811	315.468	ACTTATCTGAAATTGCTG	75
3207811	315.493	TTGATATGCTCATACGTT	76
3207811	315.1011	GAATTCTGTGGGTCCAGG	77
3207811	315.601	CATGTTTAATGGTGGTTT	78
3207811	315.498	AAAGCTGTATTCTTCAAA	79

Full-length cloning of BSL3: To clone the 5' end of BSL3, the SMART™ RACE (rapid amplification of cDNA ends) cDNA Amplification kit (CLONTECH) was used according to the manufacturer's directions. The 5' RACE library was constructed using 1.0 μg of poly(A)$^+$ RNA template obtained from human microvascular endothelial cell treated with TNF-alpha for 1 hr. The 5' RACE reaction mixture contained 2 μl RACE-ready cDNA, 1 X PCR buffer (GibcoBRL), 200 μM dNTP (Boehringer Mannheim), 1.5 mM $MgCl_2$, 1 μl CLONTECH Advantage enzyme mix, 1 X CLONTECH SMART primer, and 25 pMol BSL3 3' specific primer (BSL3-2 5'-

GAACACTGGTGACCTGGTAGAG-3') (SEQ ID NO:80) in a total volume of 50 µl. The 5' RACE reaction was performed in a GeneAmp PCR System 9700 machine (PE Applied Biosystems) using an initial denaturation step of incubation at 94°C for 1 min, followed by 35 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 62°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, followed by incubation at 72°C for 10 min.

The PCR products were analyzed by gel electrophoresis using a 1.2% agarose gel (GibcoBRL) with 0.5 X TBE and 10 µg/ml ethidium bromide (Bio-Rad). An ~875 bp fragment was excised from the gel and purified using the QIAGEN Qiaquick Gel Extraction kit according to the manufacturers directions. One microliter of the purified fragment was mixed with 2 µl pCR2.1 pTADV cloning vector (CLONTECH), 2 µl ligation cocktail (GibcoBRL), and 4 U T4 DNA ligase (GibcoBRL) in a total volume of 10 µl, and the ligation mixture was incubated at 14 C for 4 hr. Five microliters of the ligation mixture was used to transfect Max-Efficiency DH5 alpha *E. coli* cells (GibcoBRL) according to the manufacturers directions, and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin and 30 µg/ml X-gal. White colonies were picked and grown in 5 ml of LB broth containing 100 µg/ml of ampicillin. DNA was purified from the bacteria using the Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN). Plasmid DNA was digested with *EcoR*I and analyzed by agarose gel electrophoresis. Plasmid isolates containing an *EcoR*I fragment of approximately 900 bp were retained for sequencing (ABI cycle sequencer, PE Biosystems). The sequence was analyzed by Seqweb Gap (Genetics Computer Group).

The 5' RACE library was then used as a template for PCR amplification. The PCR mixture contained 1 µg 5' RACE library template, 1 X PCR buffer (GibcoBRL), 200 µM dNTP (Boehringer Mannheim), 1.5 mM $MgCl_2$, 1 µl CLONTECH Advantage enzyme mix, 25 pMol forward primer (BSL3-3: 5'-CCGGGGTACCATGATCTTCCTCCTGCTAATGTTG-3') (SEQ ID NO:81), and 25 pMol reverse primer (BSL3-4: 5'-

GCGCTCTAGATCAGATAGCACTGTTCACTTCCC-3') (SEQ ID NO:82) in a total volume of 50 µl. PCR was performed in a GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems) machine using an initial denaturation step of incubation at 94°C for 1 min, followed by 30 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, and followed by incubation at 72°C for 10 min.

An ~800 bp BSL3 PCR product was obtained. To clone the BSL3 fragment, 1 µl of the PCR product was mixed with 2 µl pCR2.1 cloning vector (Invitrogen), 2 µl ligation buffer (GibcoBRL), 4 U T4 DNA ligase (GibcoBRL), and 4 µl H_2O. The ligation mixture was incubated at 14°C for 4 hr, and 5 µl microliters of the mixture was used to transfect Max-Efficiency DH5 alpha *E. coli* cells (GibcoBRL). Transfected cells were plated onto LB agar plates containing 100 µg/ml ampicillin and 30 µg/ml X-gal, and 18 white colonies were isolated and grown in 5 ml of LB broth containing 100 µg/ml of ampicillin. DNA was purified from the bacterial culture using the Qiaprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's directions. Plasmid DNA was digested with *EcoR*I and analyzed by agarose gel electrophoresis. Sixteen plasmid isolates contained *EcoR*I fragment of ~800 bp, and were retained for sequencing (ABI cycle sequencer, PE Biosystems) using the vector-specific M13 and M13 reverse primers (see above).

Seqweb Gap (Genetics Computer Group) analysis indicated the optimal alignment of the sequences of the BSL3 Incyte Genomics clones and the BSL3 5' RACE product. Seqweb Gap analysis (Genetics Computer Group) also indicated that the BSL3 nucleotide sequence shared less than 55% sequence identity with B7-1, B7-2, or BSL1/B7-H1 nucleotide sequences, while the BSL3 amino acid sequence shared less than 45% sequence identity with the B7-1, B7-2, and BSL1/B7-H1 amino acid sequences.

In addition, the BSL3 C-terminal amino acid sequence shared less than 98% identity to the amino acid sequence encoded by GenBank

Accession No. AK001872, over a stretch of 174 amino acids. Amino acid sequence alignments using the GCG Gap program indicated that the longest stretch of identical residues shared by BSL3 and AK001872 was 99 contiguous amino acids in length. Nucleotide sequence alignments using GCG Gap indicated that the longest stretch of identical bases shared by BSL3 and AK001872 was 239 contiguous nucleotides in length. Notably, a mouse ortholog of BSL3 was identified from the GenBank Database (Accession No. AF142780). The BSL3 N-terminal amino acid sequence shared approximately 70% sequence identity with the amino acid sequence corresponding mouse AF142780, over a stretch of 250 amino acids. In addition, it was noted that BSL3 has also been identified as PD-L2, an apparent inhibitor of T-cell proliferation (Y. Latchman et al. (2001) *Nature Immunology* **2**:261-268).

The nucleotide and predicted amino acid sequences of BSL3 are shown in Figures 5A and 5B. The plasmid carrying DNA encoding BSL3 (pCR2.1:BSL3) was deposited with the American Type Culture Collection (ATCC, 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 USA), under ATCC Designation No. PTA-1986, on June 6, 2000.

The BSL1, BSL2, and BSL3 sequence information is summarized in Table 5.

TABLE 5

BSL NO.	Sequence Name	Nucleic Acid (NA) SEQ ID NO:	NA FIG NO.	Amino Acid (AA) SEQ ID NO:	AA FIG. NO.
1	BSL1 (TNF-α)	1	1A	2	1B
1	BSL1 (GM-CSF/IL-4)	3	1C	2	1B
1	BSL1-Ig	4	2A	5	2B
2	BSL2-4616811	6	3A	7	3B
2	BSL2-L165-21	10	3C	11	3D
2	BSL2-L165-35b	12	3E	13	3F
2	BSL2-4616811-Ig	8	4A	9	4B
3	BSL3-L143	14	5A	15	5B

3	BSL3-L232-6-Ig	16	6A	17	6B

EXAMPLE 6: Characterization of BSL3

BSL3 expression analysis: BSL3 expression patterns were determined by northern blot analysis of various cell types, using the BSL3 probe shown in Figure 7C, and the procedure described for BSL1. A 2.7 kb BSL3 mRNA transcript was detected in several cell types. In particular, high levels of BSL3 mRNA were detected in all HMVEC stimulated with TNF-alpha (Figure 7D). Moderate levels of BSL3 mRNA were detected in peripheral blood monocytes stimulated with PHA or GM-CSF/IL-4 (Figure 7D). However, or BSL3 mRNA was not detected in any of the remaining cell types (Figure 7D).

In addition, multiple tissue northern blots and expression arrays were purchased from CLONTECH Laboratories and hybridized with P^{32}-labeled BSL3 probe. Briefly, a 900 bp BSL3 fragment (BSL3/*KpnI*+*XbaI*) was isolated from clone L168-2 using *KpnI* and *XbaI* restriction endonucleases, run on a 1.2% agarose gel, and purified using the QIAGEN Gel Extraction Kit. Approximately 30 ng of BSL3/*KpnI*+*XbaI* was radiolabeled (6000 Ci/mmol P^{32}-dCTP) using the Random Primed DNA Labeling Kit (Roche, Indianapolis, IN). Unincorporated nucleotides were removed using NucTrap Probe Purification Columns (Stratgene, La Jolla, CA). Radiolabeled BSL3/*KpnI*+*XbaI* probe was added at a specific activity of 3.0×10^6 cpm/ml of ExpressHyb hybridization solution (CLONTECH) and incubated overnight at 65°C. Blots were washed with 0.1X SSC / 0.1% SDS at 62°C and exposed to film for 72 hr.

Northern blot analysis indicated that high levels of BSL3 transcript were present in spleen tissue; moderate levels of BSL3 transcript were present in thymus, testis, ovary, and small intestine tissues; and low levels of BSL3 transcript were present in heart, placenta, lung, liver, skeletal muscle, prostate, colon, lymph node, trachea, and adrenal gland tissues, and Burkitt's lymphoma Raji cell line (Figure 7E). Microarray analysis

indicated that high levels of BSL3 transcript were present in spleen tissue; moderate levels of BSL3 transcript were present in lung, liver, placenta, fetal spleen, lymph node, and fetal thymus tissues; and low levels of BSL3 transcript were present in heart, aorta, corpus callosum, left atrium, right atrium, jejunum, thymus, fetal liver, and mammary gland tissues (Figure 7F).

Quantitative PCR: BSL1 and BSL3 expression patterns were determined by quantitative PCR. Human Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panels (Cat. # PT3158-1) were purchased from CLONTECH. For each PCR reaction, 5µl of cDNA was used. Human and murine BSL1 and BSL3 PCR primers were designed by Primer3 program (Whitehead Institute for Biomedical Research; Steve Rozen, Helen J. Skaletsky, 1998, Primer3) as shown in Table 6.

TABLE 6

Primer	Sequence	SEQ ID NO:	nucleotides
human BSL1 forward	TACAAGCGAATTACTGTGAA	83	459-479
human BSL1 reverse	GATGTGCCAGAGGTAGTTCT	84	773-793
human BSL3 forward	AATAGAGCATGGCAGCAATG	85	419-439;
human BSL3 reverse	GGCGACCCCATAGATGATTA	86	634-654
human 18s rRNA forward	CCAGTAAGTGCGGGTCAT	87	7-25
human 18s rRNA reverse	TTCACCTACGGAAACCTT	88	196-214

SYBR Green PCR Core Reagents (Cat. # 4306736) were purchased from PE Applied Biosystem. Real-time PCR was performed on ABI Prism® 5700 Sequence Detection System PE Applied Biosystem. PCR samples were incubated at 95°C for 15 sec, 55°C for 20 sec, and 75°C for 1 min for 40 cycles. The BSL1 PCR product was 334 bp; the BSL3 PCR product was 235 bp; the 18S rRNA PCR was 207 bp. Following PCR and data collection, dissociation curve studies were performed. In addition, PCR samples were analyzed by agarose gel electrophoresis to confirm the size of the PCR product.

Data processing and presentation: For each PCR reaction, a threshold cycle number (C_T) was generated as a read-out by the real-time PCR machine. The data was processed according to the manual of ABI Prism® 5700 Sequence Detection System. Briefly, the C_T of BSL1 and BSL3 was normalized to the C_T of 18S rRNA in the each sample. The data was then subtracted by the normalized C_T in the sample showing lowest expression levels. For BSL1, the lowest expression levels were found in tonsil tissue. For BSL3, the lowest expression levels were found in skeletal muscle. The final data was presented as the fold increase over the lowest expression levels.

Quantitative PCR indicated that high levels of BSL1 transcript were present in lymph node, spleen, lung, and placenta tissue; moderate levels of BSL1 transcript were present in thymus and pancreas tissue; and low levels of BSL1 transcript were present in heart, brain, kidney, adult liver, skeletal muscle, bone marrow, leukocyte, fetal liver, and tonsil tissue (Figure 7G). For BSL3, high levels of transcript were present in lymph node and spleen tissue; and low levels of BSL3 transcript were present in thymus, lung, tonsil, heart, pancreas, placenta, kidney, bone marrow, fetal liver, and adult liver tissue(Figure 7H).

BSL3-Ig (L232-6) fusion construct: The BSL3-Ig (L232-6) consfruct was made using the following procedure. The ECD of BSL3 was amplified by PCR using 0.01 µl pCR2.1:BSL3 (L143-4), described above; 5 µl GibcoBRL PCR buffer; 1.5 µl 25 mM $MgCl_2$; 1 µl 10 mM dNTPs; 2.5 µl BSL3-3 primer (10 pM/µl); 2.5 µl BSL3Ig-6 primer (10 pM/µl); 1 µl CLONTECH Advantage polymerase; 36 µl dH_2O. The primers contained the following sequence: BSL3-3: 5' cc gg ggt acc ATG ATC TTC CTC CTG CTA ATG TTG 3' (SEQ ID NO:89); BSL3Ig-6: 5' cg gaa ttc GGT CCT GGG TTC CAT CTG 3' (SEQ ID NO:90). PCR samples were incubated at 94°C for 1 min; followed by 20 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 59°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec; followed by incubation at 72°C for 10 min.

Following this, 38 µl of the PCR product was digested with *KpnI/EcoRI* and run on a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel. A band of about 650 bp was excised and purified with QIAGEN gel extraction kit. Ten microliters of the purified fragment was run on an agarose gel next to a size standard. Ten nanograms of fragment was ligated (L232) to 20 ng of *KpnI/EcoRI* digested L200-1 (described previously). Five microliters of the ligation mixture was transfected into GibcoBRL MAX Efficiency DH5 alpha competent bacteria, and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin. Plates were incubated at 37°C for 18 hr. Colonies were inoculated into 5 ml of LB broth containing 100 µg/ml ampicillin and grown for 18 hr at 37°C. DNA was purified using QIAGEN spin miniprep kit and digested with *PmeI*. The digested samples were run on an agarose gel and plasmids that contained fragments of about 1500 bp were sequenced. L232-6 was determined to have wild-type BSL3 sequence. The nucleotide and predicted amino acid sequence of BSL3-Ig (L232-6) is shown in Figures 6A and 6B.

BSL3-Ig (L275-1) fusion construct: The BSL3-Ig (L275-1) construct was made using the following procedure. BSL3-Ig was PCR amplified from L232-6 using 0.001 µl L232-6; 5 µl GibcoBRL PCR buffer; 1.5 µl 25 mM $MgCl_2$; 1 µl 10 mM Boehringer-Mannheim dNTPs; 2.5 µl BSL3-5 primer (10 pM/µl); 2.5 µl BSL1Ig-2 primer (10 pM/µl); 1 µl CLONTECH Advantage polymerase; and 35.5 µl dH_2O. The primers contained the following sequence: BSL3-5: 5' cg gga ttc ATG ATC TTC CTC CTG CTA ATG TT 3' (SEQ ID NO:91); BSL1Ig-2: 5' gc gc tct aga TCA TTT ACC CGG AGA CAG G 3' (SEQ ID NO:92). PCR samples were incubated at 94°C for 1 min; followed by 20 cycles of incubation at 94°C for 30 sec, 58°C for 30 sec, and 72°C for 1.5 min; followed by incubation at 72°C for 10 min.

Following this, 2 µl of the PCR reaction was ligated (L262) into pCR2.1 using the TA cloning kit (Invitrogen). Five microliters of the ligation

was transfected into MAX Efficiency DH5 alpha competent cells (GibcoBRL), and transfected cells were plated onto LB plates containing 100 μg/ml ampicillin and 800 μg of X-Gal. Plates were incubated at 37°C for 18 hr. White colonies were inoculated into 5 ml of LB broth containing 100 μg/ml ampicillin and grown at 37°C for 18 hr. Plasmid DNA was purified using QIAGEN spin miniprep kit. Plasmid DNA was digested with *Bam*HI/*Xba*I and analyzed on an agarose gel. Plasmids that contained an approximately 1300 bp fragment were sequenced. L262-2 was determined to contain the wild-type BSL3 sequence.

L262-2 was digested with *Bam*HI/*Xba*I and run on a 1.2% agarose 0.5 X TBE gel. An approximately 1300 bp fragment was purified using QIAGEN gel extraction kit. Ten nanograms of the purified fragment was ligated into 30 ng of *Bam*HI/*Xba*I digested pD18 (related to pD16 and pD17 plasmids, described in U.S. Patent No. 6,051,228). Five microliters of the ligation was transfected into GibcoBRL MAX Efficiency DH5 alpha competent bacteria. Transfected cells were plated onto LB plates containing 100 μg/ml ampicillin and grown at 37°C for 18 hr. Colonies were inoculated into 5 ml of LB broth containing 100 μg/ml ampicillin and grown at 37°C for 18 hr. Plasmid DNA was purified using QIAGEN spin miniprep kit. Plasmid DNA was digested with *Bam*HI plus *Xba*I or *Hind*III, and the digested samples were analyzed on an agarose gel. As determined by restriction mapping, L275-1 through L275-9 contained the correct construction.

Purification of BSL3-Ig fusion protein: Purification of BSL3-Ig (human-IgG1) was accomplished by one-step affinity purification. Supernatant from transiently transfected COS cells expressing BSL3-Ig was applied to a Sepharose column of immobilized protein A. The column was washed with PBS until the absorbance at 280 nm reached the baseline level. Bound protein was eluted with Immuno Pure IgG Elution Buffer (Pierce Chemical, Rockford, IL; Cat. # 21004). Fractions containing the bound protein were neutralized with 1/8 v/v of 3 M sodium phosphate, pH 7.

The resulting preparation was dialyzed against PBS, filtered (0.2 μm). All buffers contained 0.02% w/v sodium azide.

Immunization with BSL3 polypeptide: For the initial immunization, mice between 1 and 3 months were used (BalbC, Harlan, Indianapolis, Indiana). RIBI adjuvant was prepared as follows. In one vial, 0.5 mg MPL (monophosphoryl lipid A; RIBI Immunochemical Research, Inc., Hamilton, MT); 0.5 mg TDM (synthetic trehalose dicorynomycolate; RIBI Immunochemical Research, Inc.); and 40 μl Squalene with 0.2% Tween 80 were mixed together. The mixture was warmed to 40-45°C for 5-10 min, and 2 ml of BSL3 polypeptide/PBS (125 μg/ml) was added. The solution was vortexed vigorously for several minutes. The solution was drawn into a syringe and injected immediately into the mice.

Dosages followed recommendations by RIBI Immunochemical Research, Inc. For the first injection, approximately 100 μg of BSL3 polypeptide was resuspended in 250 μl of 1X RIBI in PBS. The mixture was injected intraperitoneally with 21 gauge needle. For second and later injections, boosts were given at least 3 weeks apart. Injections were at half dose. At least 3 weeks following the third injection, once the titer reached an acceptable level (see below), the animal was given a final boost. For final injections, approximately 1 mg/ml of BSL3 polypeptide was resuspended in PBS (RIBI was omitted), and the mixture was administered intravenously via tail veins. Animals were harvested 3-4 days later.

To monitor titer levels, sera samples were taken before initial immunization (background) and 7-10 days after each immunization for titer monitoring. Titer levels were measured by ELISA. Sera was harvested by eye-bleed, or tail-bleed. Typically, 200 μl of blood was removed for sera testing.

Hybridoma cell lines: Hybridoma cell lines were constructed using the following reagents: Iscoves Modified Dulbecco's Medium (GibcoBRL; Cat. #12440-053); Fetal Bovine Serum (Hyclone; Cat. # A-1115L, Lot # 11152564) heat inactivated for 30 min at 56^{0}C; L-Glutamine-

200 mm, 100 X (GibcoBRL; Cat. # 25030-081); Penicillin/Streptomycin (GibcoBRL; Cat. # 15140-122); ORIGEN Hybridoma Cloning Factor (Igen International, Inc., Gaithersburg, MD; Cat. # IG50-0615, Lot #8077); HT Supplement 100X (GibcoBRL; Cat. # 11067-030); HAT Supplement 100X (GibcoBRL; Cat. # 31062-037); PEG 1500, (Boehringer Mannheim; Cat. # 783 641); Red Blood Cell Lysing Buffer from Lab Services (Cat. # 3KL-449); Trypane Blue; 70% Ethanol; Myeloma Cells (P3x) from ATCC.

The following equipment and supplies were used: laminar flow hood; CO_2 incubator; inverted microscope; 37^{0}C water bath; centrifuge; 96-well flat bottom tissue culture plates (Corning; Cat. # 25860-96); Serological pipets and Integrid petri dishes (Falcon); 50 ml centrifuge tubes (Corning; Cat. # 430921); 15 ml conical tubes (Falcon; Cat. # 2096); autoclaved scissors and forceps; multichannel pipet; wide orifice 200 µl pipet tips (Denville Scientific, Inc., Metuchen, NJ; Cat. # P1105-CP); sterile pipet tips (VWR, Buffalo Grove, IL; Cat. # 53508-794).

HAT and HT medium were made as follows:

HAT Medium		HT Medium	
IMDM	500 ml	IMDM	500 ml
L-Glutamine	2.5 ml	L-Glutamine	2.5 ml
Pen/Strep	5 ml	Pen/Strep	5 ml
HAT Supplement	5 ml	HT Supplement	5 ml
Origen Hy. Clon. F.	10% Final	Origen Hy. Clon. F.	10% Final

Mice were given a final boost 3-4 days prior to fusion in PBS intravenously or intraperitoneal. Myeloma cells were kept in exponential growth (log phase). The mice were euthanized, and the spleen from each mouse was aseptically harvested. The spleen was placed in a petri dish containing warm Iscoves solution without FBS. A spleen cell suspension was prepared and transferred to a centrifuge tube. HAT-sensitive myeloma cells were placed in a separate 50 ml centrifuge tube. Spleen cells and myeloma cells were centrifuged at 400xg for 5 min, and the supernatant

was aspirated. The red blood cells from the spleen were lysed with 5 ml RBC Lysing Buffer for 1 min, and the tube was filled with SF media (hybridoma serum-free media; GibcoBRL; Cat. # 12045-076). Splenocytes were washed with 50 ml SF media, and spleen cells and myeloma cells were centrifuged in separate centrifuge tubes at 400xg for 5 min. Spleen cells and myeloma cells were counted and resuspended in 25 ml with SF media. Myeloma cells were added to spleen cells to give a 1:4 ratio. The mixture was centrifuged at 400xg for 10 min to form a tight pellet, and all media solution was removed by aspiration.

For the cell fusion experiments, PEG, SF media, and HAT media were incubated at 37°C. One ml of 50% PEG was added to the cells for 1 min (PEG was added for 30 sec and cells were stirred for 30 sec). The PEG solution was added to the side of the tube, and the pellet was gently stirred. With stirring, 1 ml of SF media was added to the cells for 1 min, and 8 ml of SF media was added to the cells for 2 min. Cells were centrifuged at 400xg for 10 min, and the supernatant was aspirated. Cells were gently resuspended in 10 ml HAT selective media by aiming pipet directly at pellet and stirring. Additional HAT media was added to bring cell concentration to 5×10^5 cells/ml. Cells were aliquotted into 96-well tissue culture plates at 5×10^4 cells/well. After 3 days, HT media was added at 100 µl/well. Approximately 10 days later, clones were tested for antibody production. Positive clones were expanded to 1 well of 24-well plate. Positive clones were then re-tested, isotyped, and expanded to T25 (0.25 cm square tissue culture flask).

ELISA analysis: To test for positive clones, ELISA analysis was performed using the following reagents and supplies: carbonate/bicarbonate pH 9.6 (Sigma, St. Louis, MO; Cat. # C-3041) for coat; Immulon 2 ELISA plates (Dynex, Chantilly, VA; Cat. # 0110103455); 10X PBS (GibcoBRL) made to 1X concentration; wash buffer comprising Tween 20 (0.05% final concentration) in 1X PBS; block buffer/sample diluent comprising wash buffer with 5% NFM non-fat milk; and chromogen

mixture comprising 50% TMB (Kirkegaard & Perry Labs Gaithersburg, MD; Cat. # 50-76-01) and 50% peroxidase (Kirkegaard & Perry Labs Cat. # 50-65-00).

For ELISA, plates were coated with 75 µl/well (1 µg/ml) BSL3-Ig in carbonate/bicarbonate overnight at 4°C. Plates were washed with PBS Tween 20 (using Skatron), and blocked with 300 µl block buffer for 45 min at room temperature. Plates were flicked dry and incubated with 75µl/well sera diluted in blocking buffer (sera was diluted 1:50 for highest concentration and then serially diluted by factors of three) for 45 min at room temperature, and washed as before. Plates were then incubated with 75µl/well anti-mouse IgG in blocking buffer (1:10000 dilution; HRP-labeled; Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) for 45 min at room temperature, and washed as before. Following this, plates were incubated with 100 µl/well chromogen mixture, and incubated up to 15 min at room temperature. The signal was quenched with 100 µl 1N sulfuric acid, and samples were read at 450/630 nm. Using ELISA, supernatants from hybridomas were initially screened against BSL3-Ig fusion protein, and then screened against Ig protein alone. Hybridomas that produced antibodies that bound to BSL3-Ig, but not Ig, were designated as positive clones.

Subcloning: Positive clones from the initial fusion plate were expanded. Once growing, cells were put through two rounds of single cell cloning to ensure that they were monoclonal. Each hybridoma was plated in a 96-well tissue culture plate at a concentration of 0.5 cells/well or less. Once macroscopic colonies formed, supernatants were screened by ELISA. Positive clones from each hybridoma were titered by ELISA. The clones giving rise to the strongest signals were expanded and put through a second round of cloning. Positive clones were again screened by ELISA and titered. The clones giving rise to the strongest signal were expanded and frozen back.

EXAMPLE 7: Assays using BSL Monoclonal Antibodies

FACS Analysis of Lung Epithelial Cells Using BSL1 and BSL2 Monoclonal Antibodies: A549, a lung epithelium cell line was cultured in RPMI 1640 (GibcoBRL Cat. # 11875-005) plus 10% FBS (Summit, Ft Collins, CO; Cat. # S-100-05) and 1% Penicillin-Streptomycin (GibcoBRL Cat. # 15140-122) at 37°C and 5% CO_2 to 90% confluence in a T75 flask (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ; Cat. # 353111). Cells were lifted with Versene (GibcoBRL Cat. # 15040-066) and washed twice in RPMI 1640. Cells were added to a 96-well plate (Becton Dickinson Cat. # 353077) (2.5 x 10^5 cells per well), and centrifuged at 2000 RPM in a Beckman tabletop centrifuge. Next, cells were resuspended in RPMI 1640 or RPMI1640 with 1 μg negative control antibody (MAb 15E10AA3) or hybridoma supernatant, and incubated on ice for 30 min. Cells were then washed twice in RPMI 1640, and resuspended in goat anti-mouse anti-Fc FITC conjugated antibodies (BioSource, Camarillo CA; Cat. # AMI4408) diluted 1:50 in RPMI 1640. Following this, cells were incubated on ice for 30 min, washed twice in RPMI 1640, resuspended in RPMI 1640, and analyzed on a Becton Dickinson FACScan. FACS analysis indicated that BSL1 MAb 32F9A7 (Figure 9A) and BSL2-4616811 (Figure 9B) MAbs all bound to the A549 cells.

FACS Analysis of Various Cell Types Using BSL3 Monoclonal Antibodies: To determine whether BSL3 polypeptide was expressed on the surface of various cell types, cells were grown in media as shown in Table 7, below. HUT 78 was supplemented with 20% FBS (Summit Biotechnology, Ft Collins, CO; Cat. # S-100-05). All other cell lines were supplemented with 10% Summit FBS. In addition, all cell lines were supplemented with 1% penicillin/streptomycin (GibcoBRL; Cat. # 15140-122). All cell lines were grown at 37°C with 5% CO_2.

TABLE 7

CELL LINE	ORIGIN	MEDIA
HL60	pre myeloid	RPMI 1640

THP1	monocytic	RPMI 1640
A549	lung epithelium	RPMI 1640
H292	lung epithelium	RPMI 1640
PM LCL	B lineage	RPMI 1640
PL LCL	B lineage	RPMI 1640
CE LCL	B lineage	RPMI 1640
Ramos	B lineage	RPMI 1640
CEM	T lineage	RPMI 1640
HUT 78	T lineage	IMDM[1]
Jurkat	T lineage	RPMI 1640[2]

[1]IMDM: GibcoBRL; Cat. # 12440-053
[2]RPMI 1640: GibcoBRL; Cat. # 11875-005

Cells were grown to about 5 x 10^5 cells/ml. Cells were washed twice in serum free RPMI 1640 and resuspended to give a final concentration of 2.5 x 10^6 cells/ml. Anti-BSL3 MAb 1A4A1 antibodies or isotype control MAb 15E10A3 antibodies were added to 5 μg/ml and incubated at 4°C for 30 min. Cells were washed twice in serum free RPMI 1640 and resuspended in serum free RPMI 1640 plus 2% goat anti-mouse IgG conjugated to FITC (BioSource, Camarillo, CA; Cat. # AMI4408). Cells were incubated 30 min at 4°C. Cells were washed twice in serum free RPMI 1640 and analyzed on a Becton Dickenson FACScan (Becton Dickenson, Franklin Lakes, NJ). BSL3 polypeptide was expressed on A549 (lung epithelium), H292 (lung epithelium), PM LCL (B lineage), PL LCL (B lineage), CE LCL (B lineage), and HUT78 (T lineage) cells (Figure 9C).

FACS Analysis of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Using BSL3 Monoclonal Antibodies: BSL3 monoclonal antibodies were used to measure BSL3 polypeptide levels on human umbilical vein endothelial cells with or without TNF-alpha stimulation. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were grown at 37°C with 5% CO_2 in EGM media (Clonetics, Walkersville, MD; Cat. # CC-4176) and grown to confluence. TNF-alpha was omitted or added to 10 ng/ml for 24 hr. Cells

were lifted with Versene (GibcoBRL; Cat. # 15040-066) and prepared for flow cytometry using anti-BSL3 MAb 1A4A1 antibodies as described above. As a control, flow cytometry was performed without antibodies. The results indicated that BSL3 polypeptide levels increased on TNF-alpha stimulated HUVEC (Figure 9D). This increase was not observed in unstimulated cells (Figure 9D).

FACS Analysis of Human Peripheral Blood Monocytes using BSL3 Monoclonal Antibodies: BSL3 monoclonal antibodies were used to measure BSL3 polypeptide levels on human peripheral blood monocytes with or without GM-CSF IL-4 or PHA stimulation. Peripheral blood monocytes (PBMCs) were purified as follows. Blood samples were aliquotted equally among twelve 50 ml conical tubes. One volume of elutriation buffer (at room temperature) was added to each of the samples. Samples were underlayed with 10 ml LSM (lymphocyte separation mixture) ficoll solution, and centrifuged at 1800 rpm for 25 min. The upper layer of reddish material was removed, and the LSM layer was transferred to a new tube (6 tubes per donor). Most of the PBMCs were observed on top of the LSM layer. Elutriation buffer (50 ml) was added to each tube, and the mixture was centrifuged at 1800 rpm for 8 min. The supernatant was aspirated, and the PBMCs were resuspended in 15 ml elutriation buffer. The mixture was transferred into 2 new 50 ml conical tubes. (45 ml total volume per tube), and centrifuged at 1000 rpm for 8 min. The supernatant was aspirated, and this process was repeated two more times.

PBMCs were resuspended in flasks containing RPMI 1640 with 2% FBS, and incubated at 37°C with 5% CO_2 for one hr. Flasks were rocked once every 20 min. Flasks were washed gently (twice) with media to remove T-cells and B cells. Flasks were then washed vigorously with RPMI 1640 plus 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin to obtain monocytes. PBMCs were washed twice in RPMI 1640 with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin. PBMCs were resuspended to 5 x 10^6 cells/ml, and transferred to flasks. PBMCs were incubated at 37°C with 5% CO_2 without

stimulation for four days. In parallel experiments, PBMCs were incubated with GM-CSF (15 ng/ml) and IL-4 (75 ng/ml) for four days, or PBMCs were incubated with PHA (1 μg/ml) for four days. Flasks were washed vigorously with RPMI 1640 to remove the monocytes. PBMCs were washed twice in RPMI 1640 examined by flow cytometry as described for the various cell lines, above. The results indicated that BSL3 polypeptide levels increased on GM-CSF IL4 or PHA stimulated cells (Figures 9E-9F). This increase was not observed in unstimulated cells (Figures 9E-9F).

Peripheral Blood T Cell Costimulation: 96-well plates (Becton Dickinson Cat. # 353072) were coated with the indicated amount of anti-CD3 MAb G19.4 (described previously) in PBS (GibcoBRL Cat. # 14190-144). Plates were incubated at 4°C for 16 hr. Plates were washed twice in PBS. The following proteins were added: BSL2-4616811-Ig (20 μg/ml), BSL3-Ig (15 μg/ml), or Chi L6 (10 μg/ml) in PBS. Chi L6 is a protein fragment that comprises the Fc portion of human IgG, and is identical to the Fc portion used in the BSL fusion proteins, described above. Different concentrations of protein were used to give equivalent molarity. Plates were incubated at 37°C for 4 hr. Plates were washed twice in PBS. Peripheral blood T-cells were purified as described, above. Cells were added (5×10^4 cells per well) in RPMI with 10% human serum (Sigma Cat. # H-4522) and 1% penicillin/streptomycin. Cells were incubated at 37°C and 5% CO_2 for 72 hr. During the last 8 hr, cells were incubated with an additional 50 μl of media containing 50 μCi/ml ^{3}H-thymidine (NEN Cat. # NET-027). Cells were harvested on a Brandel cell harvester (Brandel, Gaithersburg, MD) using Packard GF/C plates (Packard, Meriden, CT; Cat. # 6005174), and the plates were air-dried overnight. After this, 50 μl Microscint 20 (Packard Cat. # 6013621) was added, and the radiolabel was counted on a Packard Topcount NXT.

Blockade of Peripheral Blood T Cell Costimulation Using BSL2 and BSL3 Monoclonal Antibodies: 96-well plates (Becton Dickinson Cat. # 353072) were coated with 20 μg/ml CD3 MAb G19.4 (previously described)

in PBS (GibcoBRL Cat. # 14190-144). Plates were incubated at 4°C for 16 hr. Plates were washed twice in PBS. The following proteins were added: BSL2-4616811-Ig (20 μg/ml), BSL3-Ig (15 μg/ml), or (10 μg/ml) L6-Ig in PBS. Different concentrations of protein were used to give equivalent molarity. Plates were incubated at 37°C for 4 hr. Plates were washed twice in PBS. Peripheral blood T-cells were purified as described, above. Cells were added (5×10^4 cells per well) in RPMI with 10% human serum (Sigma Cat. # H-4522) and 1% GibcoBRL penicillin/streptomycin. Purified BSL2 or BSL3 MAbs or control isotype MAbs were added to a final concentration of 20 μg/ml. To assay co-stimulation, MAbs were omitted. Plates were incubated at 37°C and 5% CO_2 for 72 hr. During the last eight hours, cells were incubated in an additional 50 μl of media with 50 μCi/ml ^{3}H-thymidine (NEN Cat. # NET-027). The cells were harvested on a Brandel cell harvester using Packard GF/C plates (Cat. # 6005174) the plates were air-dried overnight. Following this, 50 μl Microscint 20 (Packard Cat. # 6013621) was added, and the radiolabel was counted on a Packard Topcount NXT.

The results indicated that BSL2-4616811-Ig and BSL3-Ig fusion proteins acted as co-stimulatory molecules for peripheral blood T-cells incubated with CD3 MAb G19.4 (Figures 10A-10F). This was confirmed with three separate peripheral blood T-cells donors: donor 010 (Figure 10A); donor 127 (Figure 10B); donor 078 (Figures 10C-10D); and donor 124 (Figures 10E-10F). The results further indicated that BSL2 and BSL3 MAbs blocked the co-stimulatory effect of the BSL2-4616811-Ig and BSL3-Ig fusion proteins, respectively (Figures 10G-10J). This was confirmed with two separate peripheral blood T-cells donors: donor 010 (Figures 10G-10H); and donor 127 (Figures 10I-10J).

As various changes can be made in the above compositions and methods without departing from the scope and spirit of the invention, it is intended that all subject matter contained in the above description, shown in the accompanying drawings, or defined in the appended claims be

interpreted as illustrative, and not in a limiting sense.

The contents of all patents, patent applications, published articles, books, reference manuals, texts and abstracts cited herein are hereby incorporated by reference in their entirety to more fully describe the state of the art to which the present invention pertains.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 7, 11, 13, and 15.

2. An isolated nucleic acid molecule encoding a polypeptide selected from the group consisting of:

a) a polypeptide comprising at least 20 contiguous amino acids of SEQ ID NO:2;

b) a polypeptide comprising at least 210 contiguous amino acids of SEQ ID NO:7;

c) a polypeptide comprising at least 90 contiguous amino acids of SEQ ID NO:11;

d) a polypeptide comprising at least 170 contiguous amino acids of SEQ ID NO:13; and

e) a polypeptide comprising at least 100 contiguous amino acids of SEQ ID NO:15;

3. An isolated nucleic acid molecule that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of:

a) an amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:2;

b) an amino acid sequence that is at least 90% identical to SEQ ID NO:7;

c) an amino acid sequence that is at least 99% identical to SEQ ID NO:11;

d) an amino acid sequence that is at least 99.5% identical to SEQ ID NO:13;

e) an amino acid sequence that is at least 98% identical to SEQ ID NO:15;

4. An isolated nucleic acid molecule comprising nucleotide sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:1, 3, 6, 10, 12, and 14.

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

a) a nucleotide sequence comprising at least 60 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3;

b) a nucleotide sequence comprising at least 630 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:6;

c) a nucleotide sequence comprising at least 270 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:10;

d) a nucleotide sequence comprising at least 410 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:12; and

e) a nucleotide sequence comprising at least 300 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:14;

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

a) a nucleotide sequence comprising at least 25 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:3;

b) a nucleotide sequence comprising at least 305 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:6;

c) a nucleotide sequence comprising at least 255 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:10;

d) a nucleotide sequence comprising at least 310 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:12; and

e) a nucleotide sequence comprising at least 240 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:14;

7. An isolated nucleic acid molecule comprising a sequence which is complementary to the sequence of the nucleic acid molecule according to any one of claims 1-5.

8. An isolated nucleic acid molecule comprising a sequence which is complementary to the sequence of the nucleic acid molecule according to claim 6.

9. An isolated nucleic acid molecule comprising:

a) a nucleotide sequence encoding an extracellular domain of an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 7, 11, 13, and 15; and

b) a nucleotide sequence encoding an Fc domain of immunoglobulin G.

10. A vector comprising the nucleic acid molecule according to any one of claims 1-6.

11. A vector comprising the nucleic acid molecule according to any one of claims 7-8.

12. A vector comprising the nucleic acid molecule according to claim 9.

13. A host cell comprising the vector according to claim 10, wherein the host cell is selected from the group consisting of bacterial, yeast, insect, mammalian, and plant cells.

14. A host cell comprising the vector according to claim 11, wherein the host cell is selected from the group consisting of bacterial, yeast, insect, mammalian, and plant cells.

15. A host cell comprising the vector according to claim 12, wherein the host cell is selected from the group consisting of bacterial, yeast, insect, mammalian, and plant cells.

16. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule according to any one of claims 1-5.

17. An isolated polypeptide encoded by the nucleic acid molecule according to claim 9.

18. An isolated antibody that binds to the polypeptide according to claim 16.

19. The antibody according to claim 18 which is monoclonal.

20. A hybridoma cell which produces the antibody according to claim 19.

21. A pharmaceutical composition comprising the nucleic acid molecule according to claim 8, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

22. A pharmaceutical composition comprising the host cell according to claim 13, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

23. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide according to claim 15, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

24. A pharmaceutical composition comprising the polypeptide according to claim 16, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

25. A pharmaceutical composition comprising the antibody according to claim 19, and a physiologically acceptable carrier, excipient, or diluent.

26. A method of identifying a ligand which binds to a B7-related polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 7, 11, 13, and 15, comprising:

a) providing a solid support having attached thereto the B7-related polypeptide;

b) contacting the support with polypeptides obtained from a biological sample, and incubating the support under conditions to allow one or more sample polypeptides to associate with the B7-related polypeptide; and

c) determining whether B7-related polypeptide associates with one or more sample polypeptides, thereby identifying a ligand that binds to the B7-related polypeptide.

27. A method of identifying a test agent which binds to a B7-related polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:2, 7, 11, 13, and 15, comprising:

a) providing a solid support having attached thereto the B7-related polypeptide;

b) contacting the support with test agents, and incubating the support under conditions to allow one or more test agents to associate with the B7-related polypeptide; and

c) determining whether B7-related polypeptide associates with one or more test agents, thereby identifying a test agent that binds to the B7-related polypeptide.

28. A method of increasing or decreasing T-cell activity in a subject comprising: administering to the subject the pharmaceutical composition according to any one of claims 21-25 in an amount effective to increase or decrease immune cell activity.

29. The method according to claim 28, wherein the subject is diagnosed with a viral infection.

30. The method according to claim 29, wherein the viral infection is selected from the group consisting of human immunodeficiency virus, human papilloma virus, herpes simplex virus, human encephalitis virus, human rhinovirus, and human influenza virus infections.

31. The method according to claim 28, wherein the subject is diagnosed with cancer.

32. The method according to claim 28, wherein the subject is diagnosed with a condition selected from the group consisting of tissue rejection, bone marrow rejection, organ transplant rejection, and graft versus host disease.

33. The method according to claim 28, wherein the subject is diagnosed with condition associated with inflammation.

34. The method according to claim 33, wherein the condition is selected from the group consisting of psoriasis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and atherosclerosis.

35. The method according to claim 28, wherein the subject is diagnosed with an autoimmune disease.

36. The method according to claim 35, wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Lupus erythematosus, Hashimoto's thyroiditis, primary mixedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, insulin dependent diabetes mellitus, good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic opthalmia, autoimmune uveitis, autoimmune hemolytic anemis, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, ulcerative colitis, Sjogren's syndrome, polymyositis, and mixed connective tissue disease.

37. A method of diagnosing a condition which is associated with increased immune cell activity, comprising:

a) contacting the isolated nucleic acid of any one of claims 6 and 8 with a biological sample under high stringency conditions that allow the nucleic acid to hybridize to a nucleic acid in the sample, and thereby form a complex;

b) measuring the hybridization complex of (a); and

c) comparing the amount of hybridization complex of (a) to an amount of hybridization complex in a standard biological sample, wherein an increase from the standard amount indicates diagnosis of the condition.

38. The method according to claim 37, wherein the condition is selected from the group consisting of tissue rejection, bone marrow rejection, organ transplant rejection, and graft versus host disease.

39. The method according to claim 37, wherein the condition is associated with inflammation.

40. The method according to claim 37, wherein the condition is selected from the group consisting of psoriasis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and atherosclerosis.

41. The method according to claim 37, wherein the condition is an autoimmune disease.

42. The method of claim 41, wherein the autoimmune disease is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Lupus erythematosus, Hashimoto's thyroiditis, primary mixedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, insulin dependent diabetes mellitus, good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic opthalmia, autoimmune uveitis, autoimmune hemolytic anemis, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, ulcerative colitis, Sjogren's syndrome, polymyositis, and mixed connective tissue disease.

43. A method of diagnosing a condition which is associated with increased immune cell activity, comprising:

a) contacting the isolated antibody of claim 19 with a biological sample under conditions that allow the antibody to bind to an amino acid sequence in the sample, and thereby form a complex;

b) detecting the complex of (a); and

c) comparing the amount of complex of (a) to an amount of complex in a standard biological sample, wherein an increase from the standard amount indicates diagnosis of the condition.

44. The method according to claim 43, wherein the condition is selected from the group consisting of tissue rejection, bone marrow rejection, organ transplant rejection, and graft versus host disease.

45. The method according to claim 43, wherein the condition is associated with inflammation.

46. The method according to claim 45, wherein the condition is selected from the group consisting of psoriasis, chronic obstructive pulmonary disease, asthma, and atherosclerosis.

47. The method according to claim 43, wherein the condition is an autoimmune disease.

48. The method of claim 47, wherein the disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, Lupus erythematosus, Hashimoto's thyroiditis, primary mixedema, Graves' disease, pernicious anemia, autoimmune atrophic gastritis, insulin dependent diabetes mellitus, good pasture's syndrome, myasthenia gravis, pemphigus, Crohn's disease, sympathetic opthalmia, autoimmune uveitis, autoimmune hemolytic anemis, idiopathic thrombocytopenia, primary biliary cirrhosis, ulcerative colitis, Sjogren's syndrome, polymyositis, and mixed connective tissue disease.

49. A kit for detecting a B7-related nucleic acid molecule comprising:

a) the isolated nucleic acid molecule according to any one of claims 6 or 8; and

b) at least one component to detect binding of the isolated nucleic acid molecule to a B7-related nucleic acid molecule.

50. A kit for detecting a B7-related polypeptide comprising:

a) the isolated antibody of claim 19; and

b) at least one component to detect binding of the isolated antibody to a B7-related polypeptide sequence.

51. A transgenic mouse comprising the nucleic acid molecule according to any one of claims 1-6.

52. A cell line comprising the nucleic acid molecule according to any one of claims 1-6.

FIG. 1A

```
1     acgcgggggt gccgcgcggc cccagttctg cgcagcttcc cgaggctccg
51    caccagccgc gcttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa agatgaggat
101   atttgctgtc tttatattca tgacctactg gcatttgctg aacgcattta
151   ctgttacggt tcccaaggac ctatatgtgg tagagtatgg tagcatatg
201   acaattgaat gcaaattccc agtagaaaaa caattagacc tggctgcact
251   aattgtctat tgggaaatgg aggataagaa cattattcaa tttgtgcatg
301   gagaggaaga cctgaaggtt cagcatagta gctacagaca gagggccggg
351   ctgttgaagg accagctctc cctgggaaat gctgcacttc agattcacaga
401   tgtgaaattg caggatgcag gggtgtaccg ctgcatgatc agctatggtg
451   gtgccgacta caagcgaatt actgtgaaag tcaatgcccc atacaacaaa
501   atcaaccaaa gaattttggt tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact
551   gacatgtcag gctgagggct accccaaggc cgaagtcatc tggacaagca
601   gtgaccatca agtcctgagt ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga
651   gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca ctgagaatca acacaacaac
701   taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct gaggaaaacc
751   atacagctga attggtcatc ccagaactac ctctggcaca tcctccaaat
801   gaaaggactc acttggtaat tctgggagcc atcttattat gccttggtgt
851   agcactgaca ttcatcttcc gtttaagaaa agggagaatg atggatgtga
901   aaaaatgtgg catccaagat acaaactcaa agaagcaaag tgatacacat
951   ttggaggaga cgtaatccag cattggaact tctgatcttc aagcagggat
1001  tctcaacctg tggtttaggg gttcatcggg gctgagcgtg acaagaggaa
1051  ggaatgggcc cgtgggatgc aggcaatgtg ggacttaaaa ggcccaagca
1101  ctgaaaatgg aacctgcgaa agcagaggag gagaatgaag aaagatggag
1151  tcaaacaggg agcctggagg gagaccttga tactttcaaa tgcctgaggg
1201  gctcatcgac gcctgtgaca gggagaaagg atacttctga acaaggagcc
1251  tccaagcaaa tcatccattg ctcatcctag gaagacgggt tgagaatccc
1301  taatttgagg gtcagttcct gcagaagtgc cctttgcctc cactcaatgc
1351  ctcaatttct tttctgcatg actgagagtc tcagtgttgg aacggcacag
1401  tatttatgta tgagtttttc ctatttattt tgagtctgtg aggtcttctt
1451  gtcatgtgag tgtggttgtg aatgatttct tttgaagata tattgtagta
1501  gatgttacaa ttttgtcgcc aaactaaact tgctgcttaa tgatttgctc
1551  acatctagta aaacatggag tattcaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa
1601  aaaa
```

FIG. 1B

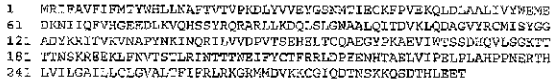

1 MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEME
61 DKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGG
121 ADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTT
181 TTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPNERTH
241 LVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET

FIG. 1C

```
1     acgcgggggt gcgcgcggc cccagttctg cgcagcttcc cgaggctccg
51    caccagccgc gctttctgtcc gcctgcaggg cattccagaa agatgaggat
101   atttgctgtc tttatattca tgacctactg gcatttgctg aacgcattta
151   ctgttcacggt tcccaaggac ctatatgtgg tagagtatgg tagcaatatg
201   acaattgaat gcaaattccc agtagaaaaa caattagacc tggctgcact
251   aattgtctat tgggaaatgg aggataagaa cattattcaa tttgtgcatg
301   gagaggaaga cctgaaggtt cagcatagta gctacagaca gagggcccgg
351   ctgttgaagg accagctctc cctgggaaat gctgcacttc agatcacaga
401   tgtgaaattg caggatgcag gggtgtaccg ctgcatgatc agctatggtg
451   gtgccgacta caagcgaatt actgtgaaag tcaatgcccc atacaacaaa
501   atcaaccaaa gaattttggt tgtggatcca gtcacctctg aacatgaact
551   gacatgtcag gctgagggct accccaaggc cgaagtcatc tggacaagca
601   gtgaccatca agtcctgagt ggtaagacca ccaccaccaa ttccaagaga
651   gaggagaagc ttttcaatgt gaccagcaca ctgagaatca acacaacaac
701   taatgagatt ttctactgca cttttaggag attagatcct gaggaaaacc
751   atacagctga attggtcatc ccagaactac ctctggcaca tcctccaaat
801   gaaaggactc actggtaat tctgggagcc atcttattat gccttggtgt
851   agcactgaca ttcatcttcc gtttaagaaa agggagaatg atggatgtga
901   aaaaatgtgg catccaagat acaaactcaa agaagcaaag tgatacacat
951   ttggaggaga cgtaatccag cattggaact tctgatcttc aagcagggat
1001  tctcaacctg tggtttaggg gttcatcggg gctgagcgtg acaagaggaa
1051  ggaatgggcc cgtgggatgc aggcaatgtg ggacttaaaa ggcccaagca
1101  ctgaaaatgg aacctgcgaa agcagaggag gagaatgaag aaagatggag
1151  tcaaacaggg agcctggagg gagaccttga tactttcaaa tgcctgaggg
1201  gcttcatcgac gcctgtgaca gggagaaagg atacttctga acaaggagcc
1251  tccaagcaaa tcatccattg ctcatcctag gaagacgggt tgagaatccc
1301  taatttgagg gtcagttcct gcagaagtgc cctttgcctc cactcaatgc
1351  ctcaatttct tttctgcatg actgagagtc tcagtgttgg aacgggacag
1401  tatttatgta tgagtttttc ctatttattt tgagtctgtg aggtcttctt
1451  gtcatgtgag tgtggttgtg aatgatttct tttgaagata tattgtagta
1501  gatgttacaa ttttgtcgcc aaactaaact tgctgcttaa tgatttgctc
1551  acatctagta aaacatggag tatttgtaag gtgcttggtc tcctctataa
1601  gtacaagtat acattggaag cataaagatc aaaccgttgg ttgcatagga
1651  tgtcaccttt atttaaccca ttaatactct ggttgaccta atcttattct
1701  cagacctcaa gtgtctgtgc agtatctgtt ccatttaaat atcagcttta
1751  caattatgtg gtagcctaca cacataatct catttcatcg ctgtaaccac
1801  cctgttgtga taaccactat tattttaccc atcgtacagc tgaggaagca
1851  aacagattaa gtaacttgcc caaaccagta aatagcagac ctcagactgc
1901  cacccactgt cctttataa tacaatttac agctatattt tactttaagc
1951  aattctttta ttcaaaaacc atttattaag tgccottgca atatcaatcg
2001  ctgtgccagg cattgaatct acagatgtga gcaagacaaa gtacctgtcc
2051  tcaaggagct catagtataa tgaggagatt aacaagaaaa tgtattatta
2101  caatttagtc cagtgtcata gcataaggat gatgcgaggg gaaaaccgga
2151  gcagtgttgc caagaggagg aaataggcca atgtggtctg ggacggttgg
2201  atatacttaa acatcttaat aatcagagta attttcattt acaaagagag
2251  gtcggtactt aaaataaccc tgaaaaataa cactggaatt cctttctag
2301  cattatattt attcctgatt tgcctttgcc atataatcta atgcttgttt
```

FIG. 1C (CON'T)

```
2351  atatagtgtc tggtattgtt taacagttct gtcttttcta tttaaatgcc
2401  actaaatttt aaattcatac ctttccatga ttcaaaattc aaaagatccc
2451  atgggagatg gttggaaaat ctccacttca tcctccaagc cattcaagtt
2501  tcctttccag aagcaactgc tactgccttt cattcatatg ttcttctaaa
2551  gatagtctac atttggaaat gtatgttaaa agcacgtatt tttaaaattt
2601  ttttcctaaa tagtaacaca ttgtatgtct gctgtgtact ttgctatttt
2651  tatttatttt agtgtttctt atatagcaga tggaatgaat ttgaagttcc
2701  cagggctgag gatccatgcc ttcttttgttt ctaagttatc tttcccatag
2751  cttttcatta tctttcatat gatccagtat atgttaaata tgtcctacat
2801  atacatttag acaaccacca tttgttaagt atttgctcta ggacagagtt
2851  tggatttgtt tatgtttgct caaaaggaga cccatgggct ctccagggtg
2901  cactgagtca atctagtcct aaaaagcaat cttattatta actctgtatg
2951  acagaatcat gtctggaact tttgttttct gctttctgtc aagtataaac
3001  ttcactttga tgctgtactt gcaaaatcac attttctttc tggaaattcc
3051  ggcagtgtac cttgactgct agctaccctg tgccagaaaa gcctcattcg
3101  ttgtgcttga acccttgaat gccaccagct gtcatcacta cacagccctc
3151  ctaagaggct tcctggaggt ttcgagattc agatgccctg ggagatccca
3201  gagtttcctt tccctcttgg ccatattctg gtgtcaatga caaggagtac
3251  cttggctttg ccacatgtca aggctgaaga aacagtgtct ccaacagagc
3301  tccttgttat ctgtttgtac atgtgcattt gtacagtaat tggtgtgaca
3351  gtgttctttg tgtgaattac aggcaagaat tgtggctgag caaggcacat
3401  agtctactca gtctatttct aagtcctaac tcctccttgt ggtgttggat
3451  ttgtaaggca ctttatccct tttgtctcat gtttcatcgt aaatggcata
3501  ggcagagatg atacctaatt ctgcatttga ttgtcacttt ttgtacctgc
3551  attaatttaa taaaatattc ttatttattt tgttacttgg taaaaaaaaa
3601  aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a
```

FIG. 2A

```
1    atgcccatgcggtctctgcaaccgctggccaccttgtacctgctggggatgctggtcgct
61   tcctgcctcggaactagtgttcccaaggacctatatgtggtagagtatggtagcaatatg
121  acaattgaatgcaaattcccagtagaaaaacaattagacctggctgcactaattgtctat
181  tgggaaatgcaggataagaacattattcaatttgtgcatggagaggaagacctgaaggtt
241  cagcatagtagctacagacagagggcccggctgttgaaggaccagctctccctgggaaat
301  gctgcacttcagatcacagatgtgaaattgcaggatgcaggggtgtaccgctgcatgatc
361  agctatggtggtgccgactacaagccgaattactgtgaaagtcaatgccccatacaacaaa
421  atcaaccaaagaattttggttgtggatccagtcacctctgaacatgaactgacatgtcag
481  gctgagggctaccccaaggccgaagtcatctggacaagcagtgaccatcaagtcctgagt
541  ggtaagaccaccaccaccaattccaagagaggaggagaagctttttcaatgtgaccagcaca
601  ctgagaatcaacacaacaactaatgagatttttctactgcactttaggagattagatcct
661  gaggaaaaccatacagctgaattggtcatcccagaactacctctggcacatcctccaaat
721  gaaaggactcgaggagatcccgaggagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgccca
781  ccgtgcccagcacctgaactcctgggggaccgtcagtcttcctcttccccccaaaaccc
841  aaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagc
901  cacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgcc
961  aagacaagccgcgcgggaggagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacc
1021 gtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagcc
1081 ctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacag
1141 gtgtacaccctgcccccatcccgggatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgc
1201 ctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccg
1261 gagaacaactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctac
1321 agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtg
1381 atgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa
1441 tga
```

FIG. 2B

```
1   MPMGSLQPLATLYLLGMLVASCLGTSVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVY
61  WEMEDKNIIQFVHGEEDLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMI
121 SYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVVDPVTSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLS
181 GKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPPN
241 ERTRGDPEEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS
301 HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA
361 LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
421 ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
```

FIG. 3A

```
1     attcggctcg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca
51    gagtgggcgc ggcgcggcag gggcagcctt ccaccacggg gagcccagct
101   gtcagccgcc tcacaggaag atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg
151   ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg
201   agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca ctggtgggca
251   ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcatg
301   gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca
351   cagctttgct gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg
401   ccctcttccc ggacctgctg gcacagggca acgcatccct gaggctgcag
451   cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg
501   ggatttcgcc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga
551   agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg
601   gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt
651   ctggcaggat gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc
701   agatggccaa cgagcagggc tttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg
751   gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc ctggtgcgca acccccgtgct
801   gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacacccccag agaagcccca
851   caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg accccggtggt ggccctagtg
901   ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag
951   cctggcacag ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg
1001  tgcacagttt caccgaaggc cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc
1051  acggccctct tcccggacct gctggcacaa ggcaatgcat ccctgaggct
1101  gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc ttcgtgagca
1151  tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac
1201  tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga
1251  cacggtgacc atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg
1301  tgttctggca ggatgggcag ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg
1351  tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg
1401  ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg cgcaacccca
1451  tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg
1501  acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct
1551  cattgcactg ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac
1601  agagctgtga ggaggagaat gcaggagctg aggaccagga tggggaggga
1651  gaaggctcca agacagccct gcagcctctg aaacactctg acagcaaaga
1701  agatgatgga caagaaatag cctgaccatg aggaccaggg agctgctacc
1751  cctccctaca gctcctaccc tctggctgca atggggctgc actgtgagcc
1801  ctgccccaa cagatgcatc ctgctctgac aggtgggctc cttctccaaa
1851  ggatgcgata cacagaccac tgtgcagcct tatttcccca atggacatga
1901  ttcccaagta atcctgctgc ctttttttctt atagacacaa tgaacagacc
1951  acccacaacc ttagttctct aagtcatcct gcctgctgcc ttatttcaca
2001  gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc accaccctct
```

FIG. 3A (CON'T)

```
2051  tcttccagtg ctgcgtggac catctggctg cctttttct ccaaaagatg
2101  caatattcag actgactgac cccctgcctt atttcaccaa agacacgatg
2151  catagtcacc ccggccttgt ttctccaatg gccgtgatac actagtgatc
2201  atgttcagcc ctgcttccac ctgcatagaa tcttttcttc tcagacaggg
2251  acagtgcggc ctcaacatct cctggagtct agaagctgtt tcctttcccc
2301  tccttcctcc tcttgctcta gccttaatac tggcctttte cctcccctgcc
2351  ccaagtgaag acagggcact ctgcgcccac cacatgcaca gctgtgcatg
2401  gagacctgca ggtgcacgtg ctggaacacg tgtggttccc ccctggccca
2451  gcctcctctg cagtgcccct ctcccctgcc catcctcccc acggaagcat
2501  gtgctggtca cactggttct ccagggctct gtgatggggc ccctgggggt
2551  cagcttctgt ccctctgcct tctcacctct ttgttccttt cttttcatgt
2601  atccattcag ttgatgttta ttgagcaact acagatgtca gcactgtgtt
2651  aggtgctggg ggccctgcgt gggaagataa agttcctccc tcaaggactc
2701  ccatccagc tgggagacag acaactaact acactgcacc ctgcggtttg
2751  cagggggctc ctgcctggct ccctgctcca cacctcctct gtggctcaag
2801  gcttcctgga tacctcaccc ccatcccacc cataattctt acccagagca
2851  tggggttggg gcggaaacct ggagagaggg acatagcccc tcgccacggc
2901  tagagaatct ggtggtgtcc aaaatgtctg tccaggtgtg ggcaggtggg
2951  caggcaccaa ggccctctgg acctttcata gcagcagaaa aggcagagcc
3001  tggggcaggg cagggccagg aatgctttgg ggacaccgag gggactgccc
3051  cccacccca ccatggtgct attctggggc tggggcagtc ttttcctggc
3101  ttgcctctgg ccagctcctg gcctctggta gagtgagact tcagacgttc
3151  tgatgccttc cggatgtcat ctctccctgc cccaggaatg gaagatg
```

FIG. 3B

```
1    MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
51   SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
101  AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151  PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201  LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
251  VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
301  RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
351  AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGQ
401  GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
451  GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEEN
501  AGAEDQDGEG EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA
```

FIG. 3C

```
1    atgctgcgtc ggcgggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
51   cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc
101  ctgaagaccc agtggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgcgctgc
151  tccttctccc ccgagcctgg cttcagcctg gcacagctca acctcatctg
201  gcagctgaca gacaccaaac agctggtgca cagtttcacc gaaggccggg
251  accagggcag cgcctatgcc aacgccacgg ccctcttccc ggacctgctg
301  gcacaaggca atgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga
351  gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg
401  tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga agcccagcat gaccctggag
451  cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
501  ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat gggcagggtg
551  tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
601  ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac
651  ctacagctgc ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct
701  ctgtcaccat cacagggcag cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg
751  gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt gcactgctgg tggccctggc
801  tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag gagaatgcag
851  gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag
901  cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctg
951  a
```

FIG. 3D

```
1    MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLRC
51   SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFT EGRDQGSAYA NRTALFPDLL
101  AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151  PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201  LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
251  VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEGSKTALQ
301  PLKHSDSKED DGQEIA*
```

FIG. 3E

```
1    atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
51   cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc
101  ctgaagaccc agtggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc
151  tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg gcacagctca accttatctg
201  gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct gagggccagg
251  accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
301  gcacaaggca atgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga
351  gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg
401  tcagcctgca ggtggccgct cctactcga agcccagcat gaccctggag
451  cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
501  ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat gggcagggtg
551  tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
601  ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac
651  ctacagctgc ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct
701  ctgtcaccat cacagggcag cctatgacat tcccccaga ggccctgtgg
751  gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt gcactgctgg tggccctggc
801  tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag gagaatgcag
851  gagctgagga ccaggatggg gagggagaaa gctccaagac agccctgcag
901  cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcctga
```

FIG. 3F

```
1    MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
51   SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
101  AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
151  PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
201  LFDVHSVLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW
251  VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEESKTALQ
301  PLKHSDSKED DGQEIA
```

FIG. 4A

```
   1  atgctgcgtc ggcgggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc
  51  cctgggagca ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc
 101  ctgaagaccc agtggtggca ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc
 151  tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg gcacagctca acctcatctg
 201  gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct gagggcaagg
 251  accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg
 301  gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga
 351  gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgctgccg
 401  tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga agcccagcat gaccctggag
 451  cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg gtgaccatca cgtgctccag
 501  ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat gggcagggtg
 551  tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc
 601  ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac
 651  ctacagctgc ctggtgcgca acccgtgct gcagcaggat gcgcacagct
 701  ctgtcaccat cacaccccag agaagcccca caggagccgt ggaggtccag
 751  gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg ggcaccgatg ccaccctgcg
 801  ctgctccttc tcccccgagc ctggcttcag cctggcacag ctcaacctca
 851  tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc
 901  cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct
 951  gctggcacaa ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg
1001  acgagggcag cttcacctgc ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgct
1051  gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac tcgaagccca gcatgaccct
1101  ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc atcacgtgct
1151  ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg tgttctggca ggatgggcag
1201  ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca
1251  gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg
1301  gcacctacag ctgcctggtg cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac
1351  ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg acattccccc cagaattcga
1401  gcccaaatct tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg
1451  aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tccccccaaa acccaaggac
1501  accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tggtggacgt
1551  gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg
1601  aggtgcataa tgccaagaca aagcgcgggg aggagcagta caacagcacg
1651  taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg
1701  caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gcccccatcg
1751  agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac
1801  accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac
1851  ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga
1901  gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac
1951  tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag
2001  gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggctctgc
2051  acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaatga
```

FIG. 4B

```
   1  MLRRRGSPGM GVHVGAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC
  51  SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL
 101  AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE
 151  PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG
 201  LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ
 251  VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG
 301  RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA
 351  AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDGQ
 401  GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH
 451  GSVTITGQPM TFPPEPEPKS CDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD
 501  TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST
 551  YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY
 601  TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD
 651  SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK*
```

FIG. 5A

```
   1  gctttcgtca gttcctcaga actagttctg gtttgactca ctctcatgtt
  51  acggcaaacc ttaagctgga tgaacaactt ttcttctctt gaatatatct
 101  taacgccaaa ttttgagtgc tttttgttta cccatcctca tatgtcccag
 151  ctggaaagaa tcctgggttg gagctactgc atgttgattg ttttgttttt
 201  cctttttggct gttcattttg gtggctacta taaggaaatc taacacaaac
 251  agcaactgtt ttttgttgtt tactttttgca tctttacttg tggagctgtg
 301  gcaagtcctc atatcaaata cagaacatga tcttcctcct gctaatgttg
 351  agcctggaat tgcagcttca ccagatagca gttttattca cagtgacagt
 401  ccctaaggaa ctgtacataa tagagcatgg cagcaatgtg accctggaat
 451  gcaactttga cactggaagt catgtgaacc ttggagcaat aacagccagt
 501  ttgcaaaagg tggaaaatga tacatcccca caccgtgaaa gagccacttt
 551  gctggaggag cagctgcccc tagggaaggc ctcgttccac atacctcaag
 601  tccaagtgag ggacgaagga cagtaccaat gcataatcat ctatggggtc
 651  gcctgggact acaagtacct gactctgaaa gtcaaagctt cctacaggaa
 701  aataaacact cacatcctaa aggttccaga aacagatgag gtagagctca
 751  cctgccaggc tacaggttat cctctggcag aagtatcctg gccaaacgtc
 801  agcgttcctg ccaacaccag ccactccagg acccctgaag gcctctacca
 851  ggtcaccagt gttctgcgcc taaagccacc ccctggcaga aacttcagct
 901  gtgtgttctg gaatactcac gtgagggaac ttactttggc cagcattgac
 951  cttcaaagtc agatggaacc caggacccat ccaacttggc tgcttcacat
1001  tttcatcccc tcctgcatca ttgctttcat tttcatagcc acagtgatag
1051  ccctaagaaa acaactctgt caaaagctgt attcttcaaa agacacaaca
1101  aaaagacctg tcaccacaac aaagagggaa gtgaacagtg ctatctgaac
1151  ctgtggtctt gggagccagg gtgacctgat atgacatcta aagaagcttc
1201  tggacttcga acaagaattc ggtggcctgc agagcttgcc atttgcactt
1251  ttcaaatgcc tttggatgac ccagcacttt aatctgaaac ctgcaacaag
1301  actagccaac acctggccat gaaacttgcc ccttcactga tctggactca
1351  cctctggagc ctatggcttt aagcaagcac tactgcactt tacagaatta
1401  cccccactgga tcctggaccc acagaattcc ttcaggatcc ttcttgctgc
1451  cagactgaaa gcaaaaggaa ttatttcccc tcaagttttc taagtgattt
1501  ccaaaagcag aggtgtgtgg aaatttccag taacagaaac agatgggttg
1551  ccaatagagt tatttttttat ctatagcttc ctctgggtac tagaagaggc
1601  tattgagact atgagctcac agacagggct tcgcacaaac tcaaatcata
1651  attgacatgt tttatggatt actggaattct tgatagcata atgaagttgt
1701  tgtaattaac agagagcatt taaatataca ctaagtgcac aaatttgtgga
1751  gtaaagtcat caagctctgt ttttgaggtc taagtcacaa agcatttgtt
1801  ttaacctgta atggcaccat gtttaatggt ggtttttttt ttgaactaca
1851  tctttccttt aaaaattatt ggtttctttt tattttgttt taccttagaa
1901  atcaattata tacagtcaaa aatatttgat atgctcatac gttgtatctg
1951  cagcaatttc agataagtag ctaaaatggc caaagcccca aactaagcct
2001  cctttctgg ccctcaatat gactttaaat ttgacttttc agtgcctcag
2051  tttgcacatc tgtaatacag caatgctaag tagtcaaggc ctttgataat
2101  tggcactatg gaaatcctgc aagatcccac tacatatgtg tggagcagaa
2151  gggtaactag gctacagtaa cagcttaatt ttgttaaatt tgttctttat
2201  actggagcca tgaagctcag agcattagct gacccttgaa ctattcaaat
2251  gggcacatta gctagtataa cagacttaca taggtgggcc taaagcaagc
2301  tccttaactg agcaaaattt ggggcttatg agaatgaaag ggtgtgaaat
2351  tgactaacag acaaatcata catctcagtt tctcaattct catgtaaatc
2401  agaggaatgcc tttagaaatt accaaagtgt tccat
```

FIG. 5B

```
1    MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV
51   NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY
101  QCIIIYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL
151  AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR
201  ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPSC IIAFIFIATV IALRKQLCQK
251  LYSSKDTTKR PVTTTKREVN SAI*
```

FIG. 6A

```
   1  atgatcttcc tcctgctaat gttgagcctg gaattgcagc ttcaccagat
  51  agcagcttta ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac ataatagagc
 101  atggcagcaa tgtgaccctg gaatgcaact ttgacactgg aagtcatgtg
 151  aaccttggag caataacagc cagtttgcaa aaggtggaaa atgatacatc
 201  cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg cccctaggga
 251  aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga aggacagtac
 301  caatgcataa tcatctatgg ggtcgcctgg gactacaagt acctgactct
 351  gaaagtcaaa gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc ctaaaggttc
 401  cagaaacaga tgaggtagag ctcacctgcc aggctacagg ttatcctctg
 451  gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt cctgccaaca ccagccactc
 501  caggaccact gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg cgcctaaagc
 551  caccccctgg cagaaacttc agctgtgtgg tctggaatac tcacgtgagg
 601  gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg aacccaggac
 651  cgaattcgag cccaaatctt gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc
 701  cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag tcttcctctt ccccccaaaa
 751  cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc cctgaggtca catgcgtggt
 801  ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac tggtacgtgg
 851  acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa agccgcggga ggagcagtac
 901  aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg
 951  gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag
1001  ccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca
1051  caggtgtaca ccctgcccca tcccgggat gagctgacca agaaccaggt
1101  cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac atcgccgtgg
1151  agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc
1201  gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc tacagcaagc tcaccgtgga
1251  caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg
1301  aggctctgca caaccactac acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt
1351  aaatga
```

FIG. 6B

```
  1  MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV
 51  NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY
101  QCIIIYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL
151  AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVVWNTHVR
201  ELTLASIDLQ SQMEPRTEFE PKSCDKTHTC PPCPAPELLG GPSVFLFPPK
251  PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY
301  NSTYRVVSVL TVLHQDWLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP
351  QVYTLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP
401  VLDSDGSFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG
451  K*
```

FIG. 7A

```
1    agcttttcaa tgtgaccagc acactgagaa tcaacacaac aactaatgag
51   attttctact gcacttttag gagattagat cctgaggaaa accatacagc
101  tgaattggtc atcccagaac tacctctggc acatcctcca aatgaaagga
151  ctcacttggt aattctggga gccatcttat tatgccttgg tgtagcactg
201  acattcatct tccgtttaag aaaagggaga atgatggatg tgaaaaaatg
251  tggcatccaa gatacaaact caaagaagca aagtgataca catttggagg
301  agacgtaatc cagcattgga acttctgatc ttcaagcagg gattctcaac
351  ctgtggttta ggggttcatc ggggctgagc gtgacaagag gaaggaatgg
401  gcccgtggga tgcaggcaat gtgggactta aaaggcccaa gcactgaaaa
451  tggaacctgg cgaaacagag gaggagaatg aagaaagatg gagtcaaaca
501  gggagcctgg agggagacct tgatactttc aaatgcctga ggggctcatc
551  gacgcctgtg acagggagaa aggatacttc tgaacaagga gcctccaagc
601  aaatcatcca ttgctcatcc taggaagacg ggttgagaat ccctaatttg
651  agggtcagtt cctgca
```

FIG. 7B

```
1     attcggctcg agggcgactg agccaggctg ggccgcgtcc ctgagtccca
51    gagtcggcgc ggcgcggcag gggcagcctt ccaccacggg gagcccagct
101   gtcagccgcc tcacaggaag atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg
151   ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgcgagca ctgtggttct gcctcacagg
201   agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca ctggtgggca
251   ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg
301   gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca
351   cagctttgct gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg
401   ccctcttccc ggacctgctg gcacagggca acgcatccct gaggctgcag
451   cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc acctgcttcg tgagcatccg
501   ggatttcggc agcgctgccg tcagcctgca ggtggccgct ccctactcga
551   agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc agggacacg
601   gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt
651   ctggcaggat gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtccc
701   agatggccaa cgagcagggc ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg
751   gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc ctggtgcgca accccgtgct
801   gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag agaagcccca
851   caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccggtggt ggccctagtg
901   ggcaccgatg ccaccctgcg ctgctccttc tccccgagcc ctggcttcag
951   cctggcacag ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg
1001  tgcacagttt caccgaaggc cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc
1051  acggccctct tccccgacct gctggcacaa ggcaatgcat ccctgaggct
1101  gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc ttcgtgagca
1151  tccgggattt cggcagcgct gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac
1201  tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga
1251  cacggtgacc atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggctgagg
1301  tgttctggca ggatgggcag ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg
1351  tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt gatgtgcaca gcgtcctgcg
1401  ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg cgcaaccccg
1451  tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg
1501  acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct
1551  cattgcactg ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac
1601  agagctgtga ggaggagaat gcaggagctg aggaccagga tggggaggga
1651  gaaggctcca agacagccct gcagcctctg aaacactctg acagcaaaga
1701  agatgatgga caagaaatag cctgaccatg aggaccaggg agctgctacc
1751  cctcctaca gctcctaccc tctggctgca atggggctgc actgtgagcc
1801  ctgccccaa cagatgcatc ctgctctgac aggtgggctc cttctccaaa
1851  ggatgcgata cacagaccac tgtgcagcct tatttctcca atggacatga
1901  ttcccaagtc atcctgctgc ctttttcttt atagacacaa tgaacagacc
1951  acccacaacc ttagttctct aagtcatcct gcctgctgcc ttatttcaca
2001  gtacatacat ttcttaggga cacagtacac tgaccacatc accaccctct
2051  tcttccagtg ctgcgtggac catctggctg cctttttttt ccaaaagatg
```

FIG. 7B (CON'T)

```
2101  caatattcag actgactgac ccccigcctt atttcaccaa agacacgatg
2151  catagtcacc ccggccttgt ttctccaatg gccgtgatac actagtgatc
2201  atgttcagcc ctgcttccac ctgcatagaa tcttttcttc tcagacaggg
2251  acagtgcggc ctcaacatct ccrggagtct agaagctgtt tcctttcccc
2301  tccttcctcc tcttgctcta gccttaatac tggccttttc cctcctgcc
2351  ccaagtgaag acagggcact ctgcgcccac cacatgcaca gctgtgcatg
2401  gagacctgca ggtgcacgtg ctggaacacg tgtggttccc ccctggccca
2451  gcctcctctg cagtgccccc ctcccctgcc catcctcccc acggaagcat
2501  gtgctggtca cactggttct ccagcgggtct gtgatggggc ccctgggggt
2551  cagcttctgt ccctctgcct tctcacctct ttgttcctit ctttticatgt
2601  atccattcag ttgatgttta ttgagcaact acagatgtca gcactgtgtt
2651  aggtgctggg ggccctgcgt gggaagataa agttcctccc tcaaggactc
2701  cccatccagc tgggagacag acaactaact acactgcacc ctgcggtttg
2751  cagggggctc ctgcctggct ccctgctcca cacctcctct gtggctcaag
2801  gcttcctgga tacctcaccc ccatcccacc cataattctt acccagagca
2851  tggggttggg gcggaaacct ggagagaggg acatagcccc tcgccacggc
2901  tagagaatct ggtggtgtcc aaaatgtctg tccaggtgtg ggcaggtggg
2951  caggcaccaa ggcccicigg acctttcata gcagcagaaa aggcagagcc
3001  tggggcaggg cagggccagg aatgctttgg ggacaccgag gggactgccc
3051  cccaccccca ccatggtgct attctggggc tggggcagtc ttttcctggc
3101  ttgccictgg ccagctcctg gcctctggta gagtgagact tcagacgttc
3151  tgatgccttc cggatgtcat ctctccctgc cccaggaatg gaagatg
```

FIG. 7C

```
1    ccggggtacc atgatcttcc tcctgctaat gttgagcctg gaattgcagc
51   ttcaccagat agcagcttta ttcacagtga cagtccctaa ggaactgtac
101  ataatagagc atggcagcaa tgtgaccctg gaatgcaact ttgacactgg
151  aagtcatgtg aaccttggag caataacagc cagtttgcaa aaggtggaaa
201  atgatacatc cccacaccgt gaaagagcca ctttgctgga ggagcagctg
251  ccctagggga aggcctcgtt ccacatacct caagtccaag tgagggacga
301  aggacagtac caatgcataa tcatctatgg ggtcgcctgg gactacaagt
351  acctgactct gaaagtcaaa gcttcctaca ggaaaataaa cactcacatc
401  ctaaaggttc cagaaacaga tgaggtagag ctcacctgcc aggctacagg
451  ttatcctctg gcagaagtat cctggccaaa cgtcagcgtt cctgccaaca
501  ccagccactc caggacccct gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg
551  cgcctaaagc caccccctgg cagaaacttc agctgtgtgt tctggaatac
601  tcacgtgagg gaacttactt tggccagcat tgaccttcaa agtcagatgg
651  aacccaggac ccatccaact cggctgcttc acatttttcat ccctcctgc
701  atcattgctt tcatttttcat agccacagtg atagccctaa gaaaacaact
751  ctgtcaaaag ctgtattctt caaaagacac aacaaaaaga cctgtcacca
801  caacaaagag ggaagtgaac agtgctatct gatctagagc gc
```

FIG. 7D

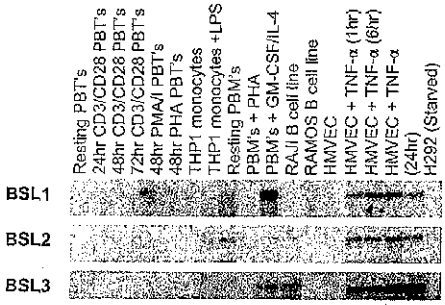

Resting PBT's
24hr CD3/CD28 PBT's
48hr CD3/CD28 PBT's
72hr CD3/CD28 PBT's
48hr PMA/I PBT's
48hr PHA PBT's
THP1 monocytes
THP1 monocytes +LPS
Resting PBM's
PBM's + PHA
PBM's + GM-CSF/IL-4
RAJI B cell line
RAMOS B cell line
HMVEC
HMVEC + TNF-α (1hr)
HMVEC + TNF-α (6hr)
HMVEC + TNF-α (24hr)
H292 (Starved)
BSL1
BSL2
BSL3

FIG. 7E

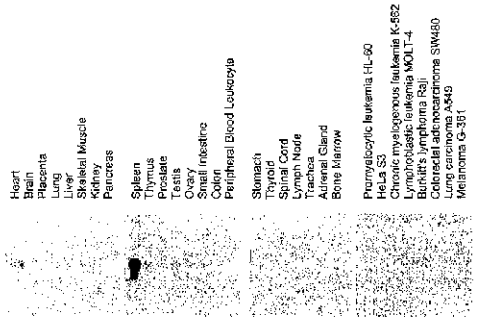
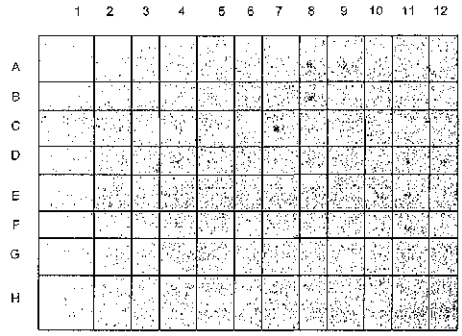

Heart
Brain
Placenta
Lung
Liver
Skeletal Muscle
Kidney
Pancreas
Spleen
Thymus
Prostate
Testis
Ovary
Small intestine
Colon
Peripheral Blood Leukocyte
Stomach
Thyroid
Spinal Cord
Lymph Node
Trachea
Adrenal Gland
Bone Marrow
Promyelocytic leukemia HL-60
HeLa S3
Chronic myelogenous leukemia K-562
Lymphoblastic leukemia MOLT-4
Burkitt's lymphoma Raji
Colorectal adenocarcinoma SW480
Lung carcinoma A549
Melanoma G-361

FIG. 7F

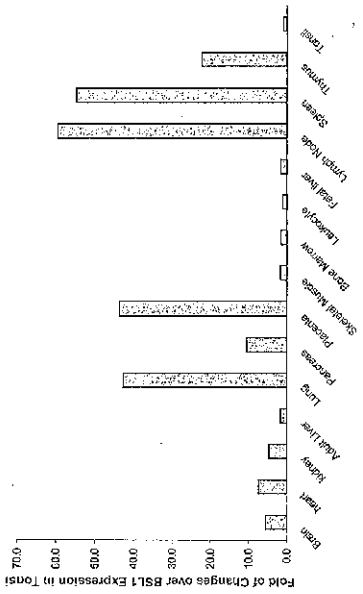


A1= whole brain
B1= cerebral cortex
C1= frontal lobe
D1= parietal lobe
E1= occipital lobe
F1= temporal lobe
G1= paracental gyrus of crebral cortex
H1= pons
A2= cerebellum, left
B2= cerebellum, right
C2= corpus callosum
D2= amygdala
E2= caudate nucleus
F2= hippocampus
G2= medulla oblongata
H2= putamen
A3= substantia nigra
B3= accumbens nucleus
C3= thalamus
D3= pituitary gland
E3= spinal cord
F3= Blank
G3= Blank
H3= Blank
A4= heart
B4= aorta
C4= atrium, left
D4= atrium, right
E4= ventricle, left
F4= ventricle, right
G4= interventricular septum
H4= apex of the heart

A5= esophagus
B5= stomach
C5= duodenum
D5= jejunum
E5= ileum
F5= #cecum
G5= appendix
H5= colon, ascending
A6= colon, transverse
B6= colon, descending
C6= rectum
D6= Blank
E6= Blank
F6= Blank
G6= Blank
H6= Blank
A7= kidney
B7= skeletal muscle
C7= spleen
D7= thymus
E7= PBL
F7= lymph node
G7= bone marrow
H7= trachea
A8= lung
B8= placenta
C8= bladder
D8= uterus
E8= prostate
F8= testis
G8= ovary
H8= Blank

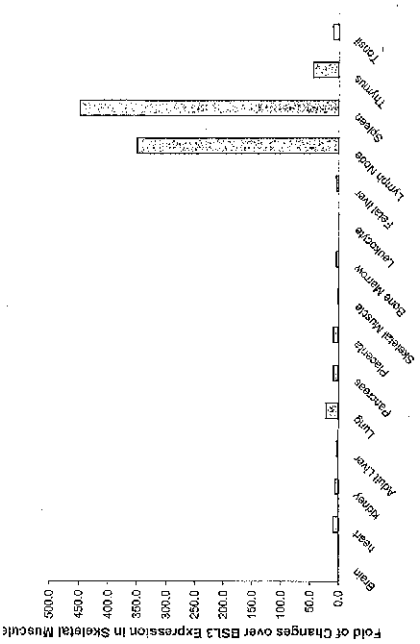
A9= liver
B9= pancreas
C9= adrenal gland
D9= thyroid gland
E9= salivary gland
F9= mammary gland
G9= Blank
H9= Blank
A10= leukemia, HL-60
B10= HeLa S3
C10= leukemia, K-562
D10= leukemia, MOLT-4
E10= lymphoma, Raji
F10= lymphoma, Daudi
G10= colorectal carcinoma, SW480
H10= lung carcinoma, A549
A11= fetal brain
B11= fetal heart
C11= fetal kidney
D11= fetal liver
E11= fetal spleen
F11= fetal thymus
G11= fetal lung
H11= Blank
A12= yeast total RNA
B12= yeast tRNA
C12= *E. coli* rRNA
D12= *E. coli* DNA
E12= Poly r(A)
F12= human Cot-1 DNA
G12= human DNA 100 ng
H12= human DNA 500 ng

FIG. 7G


Fold of Change over BSL1 Expression in Tonsi
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
Brain
Heart
Kidney
Adult Liver
Lung
Pancreas
Placenta
Skeletal Muscle
Bone Marrow
Leukocyte
Fetal liver
Lymph Node
Spleen
Thymus
Tonsil

27/37

FIG. 7H


Fold of Changes over BSL3 Expression in Skeletal Muscle
500.0
450.0
400.0
350.0
300.0
250.0
200.0
150.0
100.0
50.0
0.0
Brain
Heart
Kidney
Adult Liver
Lung
Pancreas
Placenta
Skeletal Muscle
Bone Marrow
Leukocyte
Fetal Liver
Lymph Node
Spleen
Thymus
Tonsil

28/37

FIG. 8A

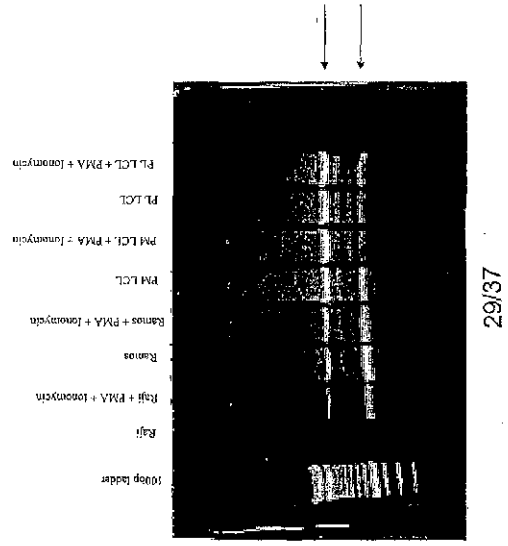

100bp ladder
Raji
Raji + PMA + ionomycin
Ramos
Ramos + PMA + ionomycin
PM LCL
PM LCL + PMA + ionomycin
PL LCL
PL LCL + PMA + ionomycin

FIG. 8C

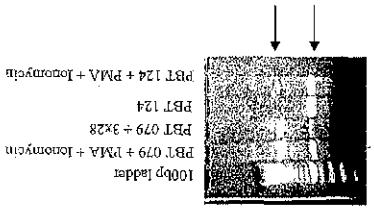
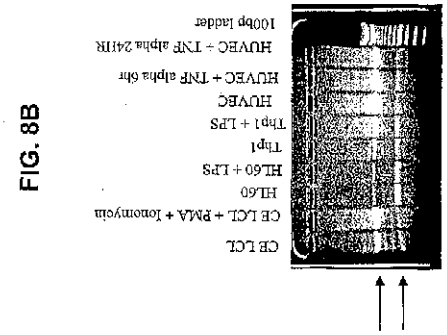


FIG. 8B



30/37

FIG. 8E

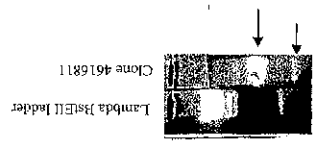

Lambda JstIEII ladder
Clone 4616811

FIG. 8D

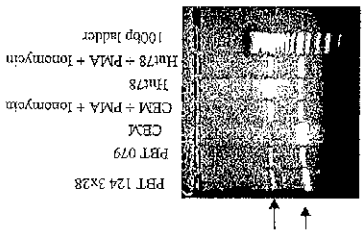

PBT 124 3x28
PBT 079
CEM
CEM + PMA + Ionomycin
Hut78
Hut78 + PMA + Ionomycin
100bp ladder

FIG. 9A

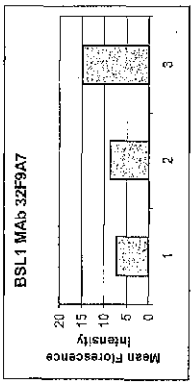
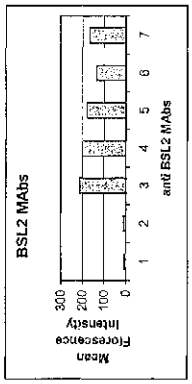


FIG. 9B



32/37

FIG. 9C

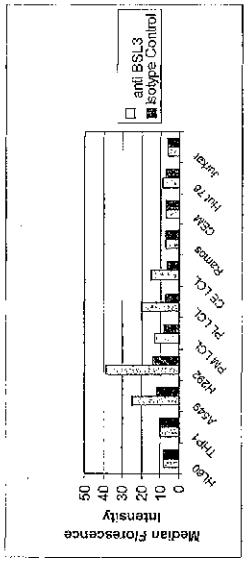
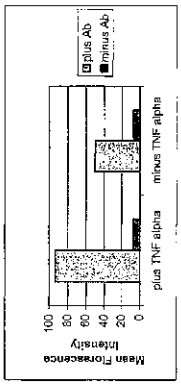


FIG. 9D



33/37

FIG. 9E

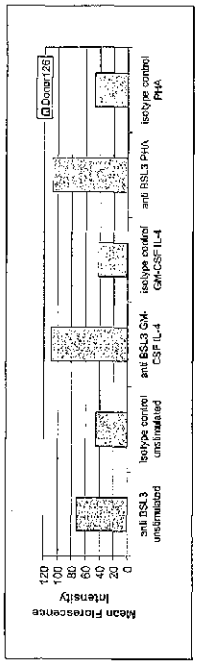
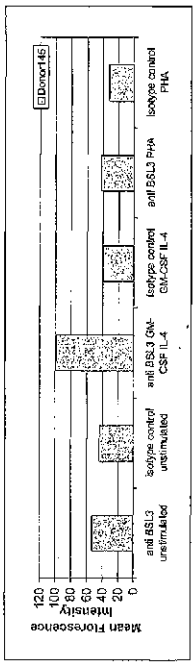


FIG. 9F



34/37

FIG. 10A

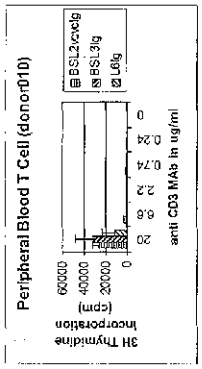
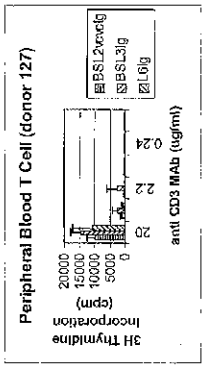


FIG. 10B



35/37

FIG. 10D

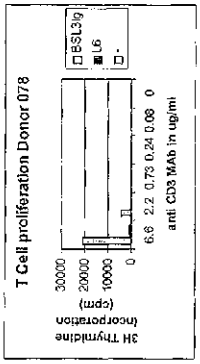


FIG. 10F

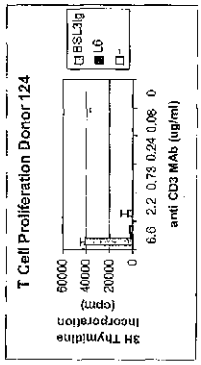


FIG. 10C

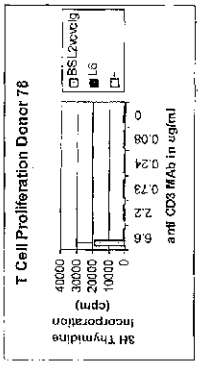
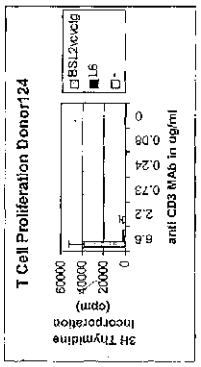


FIG. 10E



36/37

FIG. 10G

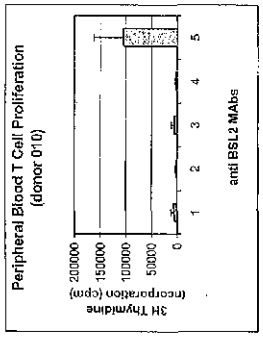


FIG. 10H

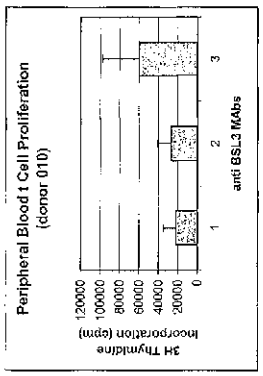


FIG. 10I

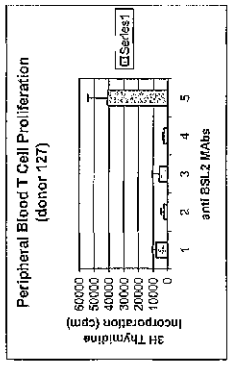
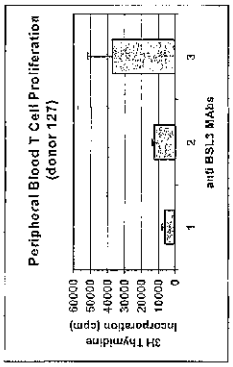


FIG. 10J



37/37

【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
13 December 2001 (13.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/094413 A3

(51) International Patent Classification⁷: C07K 14/705, C12N 15/12, 5/10, C07K 16/28, A61K 48/00, 38/17, 39/395, C12Q 1/68, G01N 33/53, A01K 67/027

(21) International Application Number: PCT/US01/18257

(22) International Filing Date: 6 June 2001 (06.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/209,811 6 June 2000 (06.06.2000) US
60/272,109 28 February 2001 (28.02.2001) US

(71) Applicant: BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY [US/US]; Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08540 (US).

(72) Inventors: MIKESELL, Glen, E.; 38 Bolton Road, Hamilton, NJ 08610 (US). CHANG, Hau; 206 Salem Court No. 8, Princeton, NJ 08540 (US). FINGER, Joshua, N.; 129 Winding Way, Yardley, PA 19067 (US). YANG, Guchen; 1 Makefield Road, Apartment D106, Morrisville, PA 19067 (US). LI, Pin; 19 Ivy Lane, Cherry Hill, NJ 08003 (US). ZHOU, Xia-Di; 15 Hampshire Drive, Plainsboro, NJ 08536 (US). PEACH, Robert; 10 High Point Drive, Churchville, PA 18966 (US).

(74) Agent: KLEIN, Christopher, A.; Bristol-Myers Squibb Company, Patent Department, Route 206 and Provinceline Road, Princeton, NJ 08540 (US).

(81) Designated States (*national*): AE, CA, JP, MX.

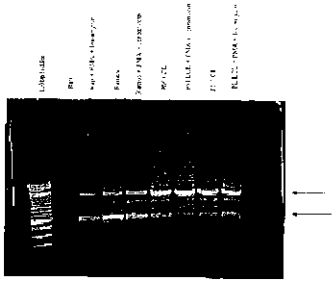
(84) Designated States (*regional*): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Published:
with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
25 July 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: B7 RELATED NUCLEIC ACIDS AND POLYPEPTIDES AND THEIR USES FOR IMMUNOMODULATION



(57) Abstract: The present invention provides nucleic acids encoding B7-related factors that modulate the activation of immune or inflammatory response cells, such as T cells. Also provided are expression vectors and fusion constructs comprising nucleic acids encoding B7-related polypeptides, including BSL1, BSL2, and BSL3. The present invention further provides isolated B7-related polypeptides, isolated fusion proteins comprising B7-related polypeptides, and antibodies that are specifically reactive with B7 related polypeptides, or portions thereof. In addition, the present invention provides assays utilizing B7 related nucleic acids, polypeptides, or peptides. The present invention further provides compositions of B7-related nucleic acids, polypeptides, fusion proteins, or antibodies that are useful for the immunomodulation of a human or animal subject.

WO 01/094413 A3

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18257

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07K14/705 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/28 A61K48/00
A61K38/17 A61K39/395 C12Q1/68 G01N33/53 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 C12Q G01N A01K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, GENSEQ, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DONG H ET AL: "B7-H1, A THIRD MEMBER OF THE B7 FAMILY, CO-STIMULATES T-CELL PROLIFERATION AND INTERLEUKIN-10 SECRETION" NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING, CO, US, vol. 5, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 1635-1639, XP000971288 ISSN: 1078-8956 cited in the application	1-18, 21-25, 49,50,52
Y	the whole document	18-20, 25,28-48
Y	WO 98 19706 A (IDEC PHARMA CORP) 14 May 1998 (1998-05-14) abstract; claims 16-26	18-20, 25,28, 32,33, 35,36

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of box C. [X] Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
7 February 2002	10 5. 02

Name and mailing address of the ISA	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340 2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	ALCONADA RODRIG.., A

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 01/18257

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 99 47558 A (SIM GEK KEE ;YANG SHUMIN (US); HESKA CORP (US); SELLINS KAREN S (U) 23 September 1999 (1999-09-23) page 3, line 2-12 ---	29-48
P,X	WO 01 14556 A (DANA FARBER CANCER INST INC) 1 March 2001 (2001-03-01) page 3, line 5 -page 6, line 25 page 59, line 4 -page 66, line 30 page 81, line 20 -page 83, line 12 examples 4,8 -----	1-52

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 01/18257

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

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

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 28-36 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound.

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:

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:

see additional sheet

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. [X] 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.:

1-52 (partially)

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

Form PCT/ISA/210 (continuation of first sheet (1)) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT International Application No. PCT/US 01/18257

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-52 (partially)

An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence of SEQ ID NOs: 1 or 3, encoding for a B7-related polypeptide BSL1 of SEQ ID NO:2; vector and host cells comprising said nucleic acid; an anti-BSL1 specific monoclonal antibody and an hybridoma producing it; pharmaceutical compositions comprising the BSL1 polypeptide, host cells or the anti-BSL1 antibodies; methods for identifying ligands and test agents that bind to BSL1; methods of increasing or decreasing T-cell in a subject having a viral infection, cancer, an autoimmune disease or transplant rejection activity by administering to said subject the pharmaceutical composition of the invention; a method of diagnosing a condition associated with increased immune activity by detecting an increase int he amount of BSL1 mRNA or polypeptide; kits for detection of BSL1-related nucleic acid and polypeptide; transgenic mouse and cell line comprising a BSL1-related nucleic acid molecule.

2. Claims: 1-52 (partially)

As invention 1, but referring to the isolated nucleic acid sequences of SEQ ID NO:6, 10 and 12 encoding three alternative splice forms of the B7-related polypeptide BSL2 of, respectively, SEQ ID NOs: 7, 11 and 13.

3. Claims: 1-52 (partially)

As invention 1, but referring to the isolated nucleic acid sequences of SEQ ID NO:14 encoding the B7-related polypeptide BSL3 of SEQ ID NO:15.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/US 01/18257

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 9819706	A	14-05-1998	AU	739058	B2	04-10-2001
			AU	5100998	A	29-05-1998
			BR	9713498	A	29-02-2000
			CN	1244128	A	09-02-2000
			EP	1007090	A1	14-06-2000
			JP	2001504693	T	10-04-2001
			NO	992212	A	08-07-1999
			WO	9819706	A1	14-05-1998
WO 9947558	A	23-09-1999	AU	3107699	A	11-10-1999
			CA	2323746	A1	23-09-1999
			WO	9947558	A2	23-09-1999
WO 0114556	A	01-03-2001	AU	6806500	A	19-03-2001
			AU	7072700	A	19-03-2001
			WO	0114556	A1	01-03-2001
			WO	0114557	A1	01-03-2001

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

フロントページの続き

(51)Int.Cl.[7]	FI		テーマコード（参考）
Ａ６１Ｋ 35/78	Ａ６１Ｋ 35/78	Ｘ	４Ｃ０８５
Ａ６１Ｋ 38/00	Ａ６１Ｋ 39/395	Ｕ	４Ｃ０８７
Ａ６１Ｋ 39/395	Ａ６１Ｋ 48/00		４Ｃ０８８
Ａ６１Ｋ 48/00	Ａ６１Ｐ 1/04		４Ｈ０４５
Ａ６１Ｐ 1/04	Ａ６１Ｐ 1/16		
Ａ６１Ｐ 1/16	Ａ６１Ｐ 3/10		
Ａ６１Ｐ 3/10	Ａ６１Ｐ 5/14		
Ａ６１Ｐ 5/14	Ａ６１Ｐ 7/04		
Ａ６１Ｐ 7/04	Ａ６１Ｐ 7/06		
Ａ６１Ｐ 7/06	Ａ６１Ｐ 9/10	１０１	
Ａ６１Ｐ 9/10	Ａ６１Ｐ 11/00		
Ａ６１Ｐ 11/00	Ａ６１Ｐ 11/06		
Ａ６１Ｐ 11/06	Ａ６１Ｐ 17/02		
Ａ６１Ｐ 17/02	Ａ６１Ｐ 17/06		
Ａ６１Ｐ 17/06	Ａ６１Ｐ 19/02		
Ａ６１Ｐ 19/02	Ａ６１Ｐ 19/04		
Ａ６１Ｐ 19/04	Ａ６１Ｐ 21/00		
Ａ６１Ｐ 21/00	Ａ６１Ｐ 21/04		
Ａ６１Ｐ 21/04	Ａ６１Ｐ 25/28		
Ａ６１Ｐ 25/28	Ａ６１Ｐ 27/02		
Ａ６１Ｐ 27/02	Ａ６１Ｐ 29/00		
Ａ６１Ｐ 29/00	Ａ６１Ｐ 31/12		
Ａ６１Ｐ 31/12	Ａ６１Ｐ 31/14		
Ａ６１Ｐ 31/14	Ａ６１Ｐ 31/16		
Ａ６１Ｐ 31/16	Ａ６１Ｐ 31/18		
Ａ６１Ｐ 31/18	Ａ６１Ｐ 31/20		
Ａ６１Ｐ 31/20	Ａ６１Ｐ 31/22		
Ａ６１Ｐ 31/22	Ａ６１Ｐ 35/00		
Ａ６１Ｐ 35/00	Ａ６１Ｐ 37/04		
Ａ６１Ｐ 37/04	Ａ６１Ｐ 37/06		
Ａ６１Ｐ 37/06	Ａ６１Ｐ 43/00	１０５	
Ａ６１Ｐ 43/00	Ａ６１Ｐ 43/00	１０７	
Ｃ０７Ｋ 14/47	Ｃ０７Ｋ 14/47		
Ｃ０７Ｋ 16/18	Ｃ０７Ｋ 16/18		
Ｃ０７Ｋ 19/00	Ｃ０７Ｋ 19/00		
Ｃ１２Ｎ 1/15	Ｃ１２Ｎ 1/15		
Ｃ１２Ｎ 1/19	Ｃ１２Ｎ 1/19		
Ｃ１２Ｎ 1/21	Ｃ１２Ｎ 1/21		
Ｃ１２Ｎ 5/10	Ｃ１２Ｑ 1/68	Ａ	
Ｃ１２Ｎ 15/02	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｄ	
Ｃ１２Ｑ 1/68	Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｍ	
Ｇ０１Ｎ 33/53	Ｇ０１Ｎ 33/566		
Ｇ０１Ｎ 33/566	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｃ	
// Ｃ１２Ｐ 21/08	Ｃ１２Ｎ 15/00	Ｃ	
	Ｃ１２Ｎ 5/00	Ｂ	
	Ａ６１Ｋ 37/02		
	Ｃ１２Ｐ 21/08		

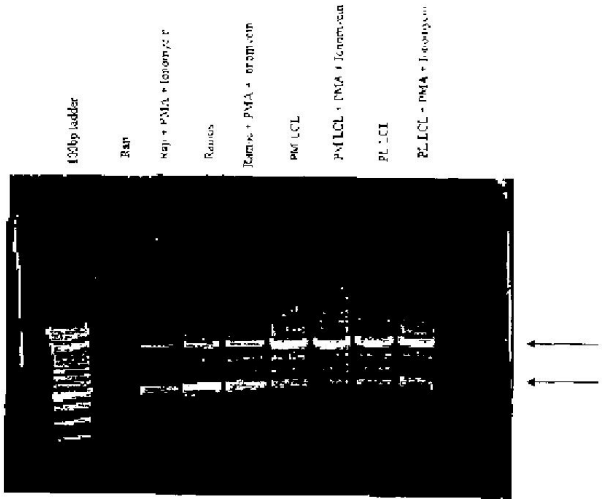
テフロン

(72)発明者 グレン・イー・マイクセル
アメリカ合衆国０８６１０ニュージャージー州ハミルトン、ボルトン・ロード３８番
(72)発明者 ハン・チャン
アメリカ合衆国０８５４０ニュージャージー州プリンストン、セーレム・コート・ナンバー８、２０６番
(72)発明者 ジョシュア・エヌ・フィンガー
アメリカ合衆国９２０６９カリフォルニア州サン・マルコス、ウッドランド・パークウェイ２２２番、アパートメント２５４
(72)発明者 グチェン・ヤン
アメリカ合衆国１９０６７ペンシルベニア州モリスビル、アパートメント・ディ１６６、メイクフィールド・ロード１番
(72)発明者 ピン・ル
アメリカ合衆国０８００２ニュージャージー州チェリー・ヒル、アイビー・レイン１９番
(72)発明者 シャーディ・ジョウ
アメリカ合衆国０８５３６ニュージャージー州プレインズボロ、ハンプシャー・ドライブ１５番
(72)発明者 ロバート・ピーチ
アメリカ合衆国９２１２９カリフォルニア州サンディエゴ、ビア・カバロ・ロホ１２８４８番

Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 BA80 CA04 CA07 CA09 CA12 CA20 DA01
DA02 DA06 DA11 DA12 EA04 GA03 GA11 GA18 HA03 HA13
HA14
4B063 QA01 QA19 QQ02 QQ53 QQ79 QR32 QR35 QR40 QR48 QR56
QS34 QX02
4B064 AG27 CA10 CA20 CC01 CC24 DA01 DA13
4B065 AA26X AA58X AA72X AA90X AA91X AA93Y AB01 AB05 AC14 BA02
CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA07 AA13 BA02 BA08 BA20 BA22 CA18 CA53 DA01
NA14 ZA15 ZA33 ZA45 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75 ZA89 ZA94
ZA96 ZB02 ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB21 ZB22 ZB26 ZB33
ZC06 ZC35 ZC41 ZC55
4C085 AA14 BB11 BB17 BB18 CC02 CC07 CC08 CC21 CC31 DD23
DD62 DD63 EE01
4C087 AA01 AA02 BC30 BC83 CA12 NA14 ZA15 ZA33 ZA45 ZA55
ZA59 ZA66 ZA75 ZA89 ZA94 ZA96 ZB02 ZB08 ZB09 ZB11
ZB15 ZB21 ZB22 ZB26 ZB33 ZC06 ZC35 ZC41 ZC55
4C088 AB99 BA16 NA14 ZA15 ZA33 ZA45 ZA55 ZA59 ZA66 ZA75
ZA89 ZA94 ZA96 ZB02 ZB08 ZB09 ZB11 ZB15 ZB21 ZB22
ZB26 ZB33 ZC06 ZC35 ZC41 ZC55
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA22
EA50 FA71 FA72 FA74 GA26

专利名称(译)	B7相关核酸和多肽可用于免疫调节		
公开(公告)号	JP2004500863A	公开(公告)日	2004-01-15
申请号	JP2002501961	申请日	2001-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	百时美施贵宝公司		
申请(专利权)人(译)	布里斯托尔 - 迈尔斯宝公司		
[标]发明人	グレンイーマイクセル ハンチャン ジョシュアエヌフィンガー グチェンヤン ピンル シャディジョウ ロバートピーチ		
发明人	グレン·イー·マイクセル ハン·チャン ジョシュア·エヌ·フィンガー グチェン·ヤン ピン·ル シャ-ディ·ジョウ ロバート·ピーチ		
IPC分类号	A01K67/027 A61K35/12 A61K35/64 A61K35/74 A61K36/00 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/47 C07K14/705 C07K16/18 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/566 A61K35/78		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 C07K14/70532 C07K16/2827 C07K2317/56 C07K2317/76 C07K2319/00 C07K2319/30 Y10S435/81		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A01K67/027 A61K35/12 A61K35/64 A61K35/74.A A61K35/78.X A61K39/395.U A61K48/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/04 A61P7/06 A61P9/10.101 A61P11/00 A61P11/06 A61P17/02 A61P17/06 A61P19/02 A61P19/04 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/12 A61P31/14 A61P31/16 A61P31/18 A61P31/20 A61P31/22 A61P35/00 A61P37/04 A61P37/06 A61P43/00.105 A61P43/00.107 C07K14/47 C07K16/18 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.C C12N15/00.C C12N5/00.B A61K37/02 C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/CA20 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024/DA11 4B024/DA12 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/HA03 4B024/HA13 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ53 4B063/QQ79 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR40 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS34 4B063/QX02 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC01 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA26X 4B065/AA58X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/BA20 4C084/BA22 4C084/CA18 4C084/CA53 4C084/DA01 4C084/NA14 4C084/ZA15 4C084/ZA33 4C084/ZA45 4C084/ZA55 4C084/ZA59 4C084/ZA66 4C084/ZA75 4C084/ZA89 4C084/ZA94 4C084		

	/ZA96 4C084/ZB02 4C084/ZB08 4C084/ZB09 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB21 4C084/ZB22 4C084/ZB26 4C084/ZB33 4C084/ZC06 4C084/ZC35 4C084/ZC41 4C084/ZC55 4C085/AA14 4C085 /BB11 4C085/BB17 4C085/BB18 4C085/CC02 4C085/CC07 4C085/CC08 4C085/CC21 4C085/CC31 4C085/DD23 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC30 4C087 /BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZA15 4C087/ZA33 4C087/ZA45 4C087/ZA55 4C087/ZA59 4C087/ZA66 4C087/ZA75 4C087/ZA89 4C087/ZA94 4C087/ZA96 4C087/ZB02 4C087/ZB08 4C087 /ZB09 4C087/ZB11 4C087/ZB15 4C087/ZB21 4C087/ZB22 4C087/ZB26 4C087/ZB33 4C087/ZC06 4C087/ZC35 4C087/ZC41 4C087/ZC55 4C088/AB99 4C088/BA16 4C088/NA14 4C088/ZA15 4C088 /ZA33 4C088/ZA45 4C088/ZA55 4C088/ZA59 4C088/ZA66 4C088/ZA75 4C088/ZA89 4C088/ZA94 4C088/ZA96 4C088/ZB02 4C088/ZB08 4C088/ZB09 4C088/ZB11 4C088/ZB15 4C088/ZB21 4C088 /ZB22 4C088/ZB26 4C088/ZB33 4C088/ZC06 4C088/ZC35 4C088/ZC41 4C088/ZC55 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045 /DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA71 4H045/FA72 4H045/FA74 4H045/GA26
优先权	60/209811 2000-06-06 US 60/272107 2001-02-28 US
外部链接	Espacenet

摘要(译)

本发明提供了编码B7相关因子的核酸，其调节免疫或炎症反应细胞如T细胞的活化。还提供了表达载体和融合构建体，其包含编码B7相关多肽的核酸，包括BSL1，BSL2和BSL3。本发明进一步提供分离的B7相关多肽，包含B7相关多肽的分离的融合蛋白，和与B7相关多肽或其部分特异性反应的抗体。此外，本发明提供了利用B7相关核酸，多肽或肽的测定法。本发明还提供了B7相关核酸，多肽，融合蛋白或抗体的组合物，其可用于人或动物受试者的免疫调节。