

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5004390号
(P5004390)

(45) 発行日 平成24年8月22日 (2012. 8. 22)

(24) 登録日 平成24年6月1日 (2012. 6. 1)

(51) Int. Cl.

F 1

C 1 2 N 15/09 (2006. 01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 14/705 (2006. 01)

C O 7 K 14/705

C O 7 K 16/28 (2006. 01)

C O 7 K 16/28

C 1 2 N 1/15 (2006. 01)

C 1 2 N 1/15

C 1 2 N 1/19 (2006. 01)

C 1 2 N 1/19

請求項の数 21 (全 67 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2001-518869 (P2001-518869)
 (86) (22) 出願日 平成12年8月23日 (2000. 8. 23)
 (65) 公表番号 特表2003-507069 (P2003-507069A)
 (43) 公表日 平成15年2月25日 (2003. 2. 25)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2000/023256
 (87) 国際公開番号 W02001/014556
 (87) 国際公開日 平成13年3月1日 (2001. 3. 1)
 審査請求日 平成19年8月21日 (2007. 8. 21)
 (31) 優先権主張番号 60/150, 390
 (32) 優先日 平成11年8月23日 (1999. 8. 23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 399052796
 ダイナ ファーバー キャンサー インス
 ティチュート, インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ O 2
 2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
 ベニュー 4 5 0
 (74) 代理人 100068526
 弁理士 田村 恭生
 (74) 代理人 100100158
 弁理士 鯨島 睦
 (74) 代理人 100138900
 弁理士 新田 昌宏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規 B 7-4 分子およびその用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号1または3に記載のヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 2】

配列番号2または4に記載の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 3】

配列番号1または3に記載のヌクレオチド配列と少なくとも95%同一なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子であって、該核酸分子にコードされたポリペプチドの、活性化 T 細胞の刺激ならびに増殖の誘導を含む、機能的活性を変化させない該核酸分子。

【請求項 4】

a) 配列番号1または3に記載のヌクレオチド配列の完全長と少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む核酸分子、

b) 配列番号1または3に記載のヌクレオチド配列からなる核酸、またはその相補物の少なくとも500ヌクレオチドの断片を含む核酸分子、および

c) 配列番号2または4に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子からなる群から選ばれるヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子であって、

抗原またはポリクロナルアクチベーターとの相互作用により T 細胞レセプター介在シグナルを受け取った T 細胞に、第二非 T 細胞レセプター介在シグナルをもたらすことにより

10

20

T細胞増殖を共刺激するポリペプチドをコードする該核酸分子。

【請求項 5】

請求項 1、2、3、または 4 のいずれかに記載の核酸分子のヌクレオチド配列と相補的なヌクレオチド配列を含む単離された核酸分子。

【請求項 6】

請求項 1、2、3、または 4 のいずれかに記載の核酸分子およびヘテロローガスなポリペプチドをコードする ヌクレオチド配列 を含む単離された核酸分子。

【請求項 7】

請求項 1、2、3、または 4 のいずれかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 8】

発現ベクターである請求項 7 記載のベクター。

【請求項 9】

請求項 8 記載の発現ベクターでトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項 10】

請求項 9 記載の宿主細胞を適切な培養液中で培養してポリペプチドを製造することを含むポリペプチドの製造方法。

【請求項 11】

a) 配列番号1または3に記載のヌクレオチド配列を含む核酸と少なくとも90%同一なヌクレオチド配列を含む核酸分子によりコードされるポリペプチド、

b) 配列番号2または4に記載のアミノ酸配列と少なくとも90%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチド、からなる群から選ばれる単離されたポリペプチドであって、

抗原またはポリクローナルアクチベーターとの相互作用によりT細胞レセプター介在シグナルを受け取ったT細胞に、第二非T細胞レセプター介在シグナルをもたらすことによりT細胞増殖を共刺激するポリペプチド。

【請求項 12】

配列番号2または4に記載のアミノ酸配列を含む請求項 11 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 13】

さらにヘテロローガスなアミノ酸配列を含む請求項 12 記載のポリペプチド。

【請求項 14】

該ヘテロローガスなアミノ酸配列が免疫グロブリン分子から誘導される請求項 13 記載のポリペプチド。

【請求項 15】

配列番号2のアミノ酸19-245または配列番号4のアミノ酸19-238を含む請求項 13 記載のポリペプチド。

【請求項 16】

請求項 11 または 12 記載のポリペプチドと選択的に結合する抗体。

【請求項 17】

活性化T細胞と請求項 11 または 12 記載のポリペプチドを接触させることによりT細胞の共刺激を調節することを含むin vitroでT細胞の共刺激を調節する方法。

【請求項 18】

試料中の請求項 11 または 12 記載のポリペプチドの存在を検出する方法であって、

a) 該ポリペプチドと選択的に結合する化合物と試料を接触させ、

b) 該化合物が試料中のポリペプチドと結合するか否かを測定することにより試料中の請求項 11 または 12 記載のポリペプチドの存在を検出する方法。

【請求項 19】

活性化T細胞を配列番号2または4に記載のB7-4ポリペプチドと接触させてT細胞の共刺激をin vitroで調節するための医薬を製造するための、配列番号2または4に記載のB7-4ポリペプチドの使用。

【請求項 20】

配列番号2のアミノ酸残基19～245または配列番号4のアミノ酸残基19～238からなる単離されたポリペプチド。

【請求項 2 1】

配列番号2または4に記載のポリペプチドと選択的に結合する抗体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(発明の背景)

T細胞が外来タンパク質と反応するには、抗原提示細胞 (APC) が静止 (レスティング) Tリンパ球に2つのシグナルを与える必要がある (Jenkins, M. および Schwartz, R. (1987) J. Exp. Med. 165, 302-319; Mueller, D.L., et al. (1990) J. Immunol. 144, 3701-3709)。免疫応答に特異性を付与する最初のシグナルは、主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) に関連して提示された外来抗原性ペプチドを認識した後にT細胞レセプター (TCR) を介して導入される。共刺激 (共刺激) と呼ばれる第二のシグナルは、T細胞を増殖させ機能的になるようにする (Lenschow et al. 1996. Annu. Rev. Immunol. 14:233)。共刺激は抗原特異的でも、MHC制限的でもなく、APCにより発現した1またはそれ以上の異なる細胞表面分子により提供されると考えられる (Jenkins, M.K., et al. 1988 J. Immunol. 140, 3324-3330; Linsley, P.S., et al. 1991 J. Exp. Med. 173, 721-730; Gimmi, C.D., et al., 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6575-6579; Young, J.W., et al. 1992 J. Clin. Invest. 90, 229-237; Koulova, L., et al. 1991 J. Exp. Med. 173, 759-762; Reiser, H., et al. 1992 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 271-275; van-Seventer, G.A., et al. (1990) J. Immunol. 144, 4579-4586; LaSalle, J.M., et al., 1991 J. Immunol. 147, 774-80; Dustin, M.I., et al., 1989 J. Exp. Med. 169, 503; Armitage, R.J., et al. 1992 Nature 357, 80-82; Liu, Y., et al. 1992 J. Exp. Med. 175, 437-445)。

【0002】

APC上に発現したCD80 (B7-1) およびCD86 (B7-2) タンパク質は、重要な共刺激分子である (Freeman et al. 1991 J. Exp. Med. 174:625; Freeman et al. 1989 J. Immunol. 143:2714; Azuma et al. 1993 Nature 366:76; Freeman et al. 1993. Science 262:909)。B7-2は一次免疫応答において主な役割を果たすようであり、免疫応答の過程でその後でアップレギュレーションするB7-1は一次T細胞応答の持続、または二次T細胞応答の共刺激 (costimulation) に重要かもしれない (Bluestone. 1995. Immunity. 2:555)。

【0003】

B7-1およびB7-2が結合するリガンドの1つであるCD28は、静止T細胞上に構成的に発現し、活性化後に発現が増大する。T細胞レセプターを介したシグナリング後、CD28の連結 (ligation) および共刺激シグナルのトランスダクションは、T細胞に増殖を誘導し、IL-2を分泌させる (Linsley, P.S., et al. 1991 J. Exp. Med. 173, 721-730; Gimmi, C.D., et al. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 6575-6579; June, C.H., et al. 1990 Immunol. Today. 11, 211-6; Harding, F.A., et al. 1992 Nature. 356, 607-609)。CTLA4 (CD152) と呼ばれる第二リガンドはCD28とホモログスであるが、静止T細胞には発現せず、T細胞の活性化に従うようである (Brunet, J.F., et al., 1987 Nature 328, 267-270)。CTLA4は、T細胞応答の負の調節に重要であるらしい (Waterhouse et al. 1995. Science 270:985)。CTLA4のブロックは阻害的シグナルを除去し、CTLA4の凝集はT細胞応答をダウンレギュレーションする阻害的シグナルをもたらしることがわかってきた (Allison および Krummel. 1995. Science 270:932)。B7分子はCD28よりCTLA4に高い親和性を有し (Linsley, P.S., et al., 1991 J. Exp. Med. 174, 561-569)、B7-1およびB7-2はCTLA4分子の異なる領域と結合することがわかってきており、異なるCTLA4との結合動態を有する (Linsley et al. 1994. Immunity. 1:793)。CD28およびCTLA4に関連する、そのリガンドを有する新規B7ファミリーのメンバーである (Aicher A. et al. (2000) J. Immunol. 164:4689-96; Mages H.W. et al. (2000) Eur. J. Immunol. 30:1040-7; Brodie D. et al. (2000) Curr. Biol. 10:333-6; Ling V. et al. (2000) J. Immunol. 164:1653-7; Yoshin

aga S.K. et al. (1999) Nature 402:827-32)新規分子、ICOSが同定された (Hutloff et al. 1999. Nature. 397:263; WO 98/38216)。T細胞がさらなる共刺激シグナルを受け取ることなくT細胞レセプターを介してのみ刺激されると、T細胞は非応答性、アネルギー性となるか、または死滅し、免疫応答のダウンレギュレーションを招く。

【0004】

B7:CD28/CTLA4共刺激経路の重要性がin vitroおよびいくつかのin vivoモデル系で示されてきた。この共刺激経路のブロックはネズミおよびヒト系において抗原特異的トレランスの発現をもたらす(Harding, F.A., et al. (1992) Nature. 356, 607-609; Lenschow, D. J., et al. (1992) Science. 257, 789-792; Turka, L.A., et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89, 11102-11105; Gimmi, C.D., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6586-6590; Boussiotis, V., et al. (1993) J. Exp. Med. 178, 1753-1763)。逆に、B7陰性ネズミ腫瘍細胞によるB7の発現は、腫瘍の拒絶や腫瘍攻撃に対する長期防御を伴うT細胞介在(性)特異免疫を誘導する(Chen, L., et al. (1992) Cell 71, 1093-1102; Townsend, S.E.およびAllison, J.P. (1993) Science 259, 368-370; Baskar, S., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5687-5690.)。したがって、共刺激経路の操作は、ヒトにおける免疫応答を刺激または抑制する大きな可能性をもたらす。

【0005】

(発明の要約)

本発明は、少なくとも部分的に、本明細書でB7-4ファミリーと呼ぶ、新規核酸分子およびそのような核酸分子によりコードされたポリペプチドの発見に基づく。好ましいB7-4分子には、専門的抗原提示細胞の表面抗原(例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞)および他の抗原提示細胞(例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、繊維芽細胞、乏突起(神経)膠細胞)が含まれ、T細胞増殖を共刺激し、そして/またはB7メンバーを認識する抗体、例えば、抗BB1抗体と結合する。本発明のB7-4核酸およびポリペプチド分子は、例えば免疫応答を調節するのに有用である。したがって、ある局面において、本発明はB7-4をコードする核酸の検出用プライマーまたはハイブリダイゼーションプローブに適した核酸断片およびB7-4ポリペプチドをコードする単離された核酸分子を提供する。

【0006】

ある態様において、本発明のB7-4核酸分子は、配列番号1または3を含むヌクレオチド配列またはその相補物と(例えば、ヌクレオチド配列の完全長に対して)少なくとも50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上同一である。

【0007】

好ましい態様において、単離された核酸分子には配列番号1または3で示されるヌクレオチド配列またはその相補物が含まれる。別の好ましい態様において、本発明の単離された核酸分子はB7-4ポリペプチドのアミノ酸配列をコードする。本発明の別の態様において、非B7-ポリペプチドをコードする核酸分子に対して特にB7-4核酸分子を検出する核酸分子、好ましくはB7-4核酸分子を特徴とする。例えば、ある態様において、そのような核酸分子は長さが少なくとも20、30、40、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、または800ヌクレオチドであり、ストリンジェント条件下で配列番号1または3に示すヌクレオチド配列を含む核酸分子またはその相補物とハイブリダイズする。

【0008】

他の好ましい態様において、ストリンジェント条件下で、配列番号1または3を含む核酸分子とハイブリダイズする該核酸分子は、ヒトB7-4ポリペプチドの天然のアレル変異体をコードする。

【0009】

本発明の別の態様では、B7-4核酸分子、例えば、B7-4核酸分子をコードする鎖に対してアンチセンスである単離された核酸分子を提供する。

【0010】

本発明の別の態様では、B7-4核酸分子を含むベクターを提供する。ある態様において、該ベクターは組換え発現ベクターである。別の態様において、本発明は本発明のベクターを含む宿主細胞を提供する。本発明は、ポリペプチドを産生するように組換え発現ベクターを含む本発明の宿主細胞、例えば哺乳動物宿主細胞、例えば非ヒト哺乳動物細胞を適切な培地中で培養することによりポリペプチド、好ましくはB7-4ポリペプチドを製造するための方法も提供する。

【0011】

本発明の別の局面は、単離されたまたは組換えB7-4ポリペプチドおよびタンパク質を特徴とする。ある態様において、該単離されたポリペプチドはヒトまたはネズミB7-4ポリペプチドである。さらに別の態様において、単離されたB7-4ポリペプチドは可溶性B7-4ポリペプチドである。さらなる態様において、該単離されたB7-4ポリペプチドは、例えば、貫膜ドメインを有する細胞の表面に発現する。

10

【0012】

さらなる態様において、単離されたB7-4ポリペプチドは、活性化T細胞のサイトカイン分泌および／または増殖に役割を果たす。別の態様において、単離されたB7-4ポリペプチドは、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1または3のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイスするヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる。

【0013】

本発明の別の態様は、単離されたポリペプチド、好ましくは配列番号1または3を含むヌクレオチド配列またはその相補物と（ヌクレオチド配列の完全長に対して）少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% またはそれ以上同一なヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされるB7-4ポリペプチドを特徴とする。

20

【0014】

本発明の別の態様は、単離されたポリペプチド、好ましくは配列番号2または4を含むアミノ酸配列と（例えば、完全長アミノ酸に対して）少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98% またはそれ以上同一なヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされるB7-4ポリペプチドを特徴とする。

【0015】

さらに本発明は、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1または3のヌクレオチド配列を含む核酸分子またはその相補物とハイブリダイズするヌクレオチド配列を有する核酸分子によりコードされる単離されたB7-4ポリペプチドを特徴とする。

30

【0016】

本発明のポリペプチドは、非B7-4ポリペプチド（例えばヘテロローガスなアミノ酸）と機能性(operatively)に連結して融合タンパク質を形成することができる。さらに本発明は、本発明のポリペプチド、好ましくはB7-4ポリペプチドと特異的に結合する抗体、例えばモノクローナルまたはポリクローナル抗体を特徴とする。さらに、B7-4ポリペプチド、例えば、生物学的に活性なポリペプチドは、所望により医薬的に許容される担体を含む医薬組成物中に組み込むことができる。

【0017】

別の局面において本発明は、B7-4核酸分子またはポリペプチドを検出できる物質と生物試料を接触させることにより生物試料中のB7-4核酸分子またはポリペプチドの存在を検出する生物試料中のB7-4核酸分子またはポリペプチドの存在を検出する方法を提供する。

40

【0018】

別の局面において本発明は、B7-4ポリペプチド活性の指標を検出できる物質と生物試料を接触させることにより生物試料中のB7-4ポリペプチド活性の存在を検出する生物試料中のB7-4活性の存在を検出する方法を提供する。

【0019】

別の局面において、本発明はB7-4活性を調節する物質とB7-4ポリペプチドを発現することができる細胞を接触させることにより細胞中のB7-4活性を調節することを含むB7-4ポ

50

リペプチド活性の調節方法を提供する。ある態様において、該物質はB7-4活性を阻害する。別の態様において、該物質はB7-4活性を刺激する。別の態様において、該物質は好ましくは特にB7-4ポリペプチドと結合する抗体である。別の態様において、該物質はB7-4遺伝子の転写またはB7-4 mRNAの翻訳を調節することによりB7-4の発現を調節する。さらに別の態様において、該物質はB7-4 mRNAまたはB7-4遺伝子のコーディング鎖とアンチセンスであるヌクレオチド配列を有する核酸分子である。

【0020】

ある態様において、本発明の方法は、B7-4分子のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションのいずれかの調節により利益がある病状または障害(異常な(異常型)B7-4ポリペプチドまたは核酸発現もしくは活性を特徴とする)を有する対象を、対象にB7-4モジュレーターである物質を投与することにより処置(治療)するのに用いられる。ある態様において、B7-4モジュレーターはB7-4ポリペプチドである。別の態様において、B7-4モジュレーターはB7-4核酸分子である。さらに別の態様において、B7-4モジュレーターはペプチド、ペプチドミメティック(peptidomimetic)、または他の小分子である。好ましい態様において、異常なB7-4ポリペプチドまたは核酸発現を特徴とする障害は、B7-4活性の調節による利益がある免疫系の障害または病状である。

【0021】

本発明は、(i) B7-4ポリペプチドをコードする遺伝子の異常な修飾または突然変異、(ii) 遺伝子の誤調節、および(iii) B7-4ポリペプチドの異常な翻訳後修飾の少なくとも1つを特徴とする遺伝子変化が存在するかしないかを確認するための診断的アッセイ法も提供する(ここで、該遺伝子の野生型はB7-4活性を有するポリペプチドをコードする)。

【0022】

別の局面において、本発明はB7-4ポリペプチドと結合するかまたはその活性を調節する化合物の同定方法を提供する。該方法には、それぞれB7-4活性を有するB7-4ポリペプチドを含む指標組成物を提供し、該指標組成物と被検化合物を接触させ、指標組成物のB7-4活性に対する被検化合物の影響を測定し、B7-4ポリペプチドの活性を調節する化合物を同定することが含まれる。

【0023】

別の局面において、本発明はB7-4膜ポリペプチドをコードする導入遺伝子を保持する細胞を含む非ヒトトランスジェニック動物に関する。

【0024】

(発明の詳細な説明)

先に特徴づけたBリンパ球活性化抗原、例えばB7-1およびB7-2に加え、抗原提示細胞(例えば、B細胞、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞、ケラチノサイト、内皮細胞、星状細胞、繊維芽細胞、乏突起(神経)膠細胞)の表面上にT細胞を共刺激する他の抗原が存在する。本発明は、少なくとも一部は、ケラチノサイトおよび胎盤cDNAライブラリーから単離され、T細胞を共刺激する本明細書でB7-4ポリペプチドと呼ぶ新規分子の発見に基づく。B7-4ポリペプチドの活性化T細胞を共刺激する能力は、例えばWO 96/40915または米国特許第5,580,756号(この内容は本明細書の一部を構成する)に記載の当該分野で知られた技術を用いて照明することができる。

【0025】

ある態様において、本発明はB7タンパク質に対するアミノ酸配列の相同性に基づいて同定されるB7-4核酸分子、好ましくはヒトB7-4分子を特徴とする(このようなファミリーを以下に記載する)。

【0026】

B7-4核酸およびポリペプチド分子

ある態様において、本発明の単離された核酸分子は、真核性タンパク質 B7-4ポリペプチドをコードする。B7-4ファミリーの分子は、シグナルドメイン、IgVドメインおよびIgCドメインを含む多くの保存領域を共有する。これら領域はともにIgスーパーファミリーメンバーのドメインであり、当該分野で認識されている。これらドメインは、Igホールドと呼

10

20

30

40

50

ばれる異なるホールディングパターンを有する構造単位に対応する。Igホールドはすべてではないがほとんどのドメインの2シート間に保存されたジスルフィド結合を有する5-10アミノ酸のアンチパラレルβ鎖からなる2つのβシートのサンドイッチからなる。Ig、TCR、およびMHC分子のIgCドメインは、同じタイプの配列パターンを共有し、Igスーパーファミリー内でC1-セットと呼ばれる。他のIgCドメインは他のセット内にある。IgVドメインも配列パターンを共有し、Vセットドメインと呼ばれる。IgVドメインはC-ドメインより長く、さらなるβ鎖対を形成する。

【0027】

2つの新規ヒトB7-4分子が同定された。1つの形は、短い親水性ドメインを有し、貫膜ドメインを持たない天然のB7-4可溶性ポリペプチドであり、本明細書ではB7-4Sと呼ぶ(配列番号2に示す)。1つの形は、本明細書でB7-4Mと呼ぶ貫膜および細胞質ドメインを有する細胞関連ポリペプチドである(配列番号4に示す)。

10

【0028】

B7-4タンパク質は、シグナル配列、およびIgVドメインおよびIgCドメインを含む。配列番号2のシグナル配列はアミノ酸1-18で示される。配列番号4のシグナル配列は約アミノ酸1-18で示される。配列番号2のIgVドメインは、約アミノ酸19-134で示され、配列番号4のIgVドメインは約アミノ酸19-134で示される。配列番号2のIgCドメインは約アミノ酸135-227で示され、配列番号4のIgCドメインは約アミノ酸135-227で示される。配列番号2に示すB7-4の親水性尾部は約アミノ酸228-245で示される。配列番号4に示すB7-4ポリペプチドは配列番号4の約アミノ酸239-259で示される貫膜ドメインおよび配列番号4の約アミノ酸260-290で示される細胞質ドメインを含む。

20

【0029】

ネズミB7-4分子も同定された。ネズミcDNA配列を図5に示し、ネズミB7-4アミノ酸配列を図6に示す。本発明はこれらネズミB7-4分子にも関する。

【0030】

本発明の種々の局面を下記小節でより詳細に記載する。

I. 定義

活性化T細胞について、本明細書で用いている用語「共刺激する(costimulate)」には、例えば、抗原またはポリクローナルアクチベーターとの相互作用によりT細胞-レセプター介在性シグナルを受け取ったT細胞の増殖またはエフェクター機能、例えば、サイトカイン分泌を誘導する第二、非-T細胞レセプター介在性シグナルをもたらす分子の能力が含まれる。そのような共刺激シグナルは、T細胞の、抗原に対する非応答性、アネルギー、または細胞死を誘導するのを防ぐことができる。

30

【0031】

ある種の保存された構造および機能的特徴を有する分子ファミリーを含むB7-4タンパク質および核酸分子。本発明のタンパク質および核酸分子に関して用語「ファミリー」は、共通構造ドメインまたはモチーフを有する、本明細書に記載のアミノ酸またはヌクレオチド配列と十分な相同性を有する2またはそれ以上のタンパク質または核酸分子を意味するものとする。そのようなファミリーメンバーは、天然または非天然であり得、同じ種または異なる種のいずれ由来でもあり得る。例えば、ファミリーはヒト起源の第一タンパク質、およびヒト起源の他の異なるタンパク質を含むか、または非ヒト起源の相同物を含むことができる。ファミリーのメンバーは共通の機能特性を有していてもよい。本明細書に記載のB7-4分子は、B7ファミリーの分子のメンバーである。本明細書で用いている用語「B7ファミリー」または「B7分子」には、B7ポリペプチド、例えば、B7-1、B7-2、B7-3(抗体BB-1により認識される)、および/またはB7-4と配列相同性を有する共刺激分子が含まれる。例えば、ヒトB7-1およびB7-2は、NCBIのBLASTプログラムを用いてデフォルトパラメーター(イグジステンス(existence) 11およびエクステンション1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照)に示すgapペナルティを有するBlosum62マトリックス)と比較したとき約26%のアミノ酸配列同一性を共有する。

40

【0032】

50

好ましいB7ポリペプチドは、例えば可溶性で存在するとき、活性化T細胞に共刺激を与えてT細胞増殖および／またはサイトカイン分泌を誘導するか、またはT細胞の共刺激を阻害することができる。好ましいB7ファミリーメンバーには、B7-1、B7-2、およびB7-4、およびその可溶性断片もしくは誘導体が含まれる。ある態様において、B7ファミリーメンバーはCTLA4、CD28、ICOS、および／または免疫細胞上の他のリガンドと結合し、免疫細胞の共刺激を阻害または誘導する能力を有する。

【0033】

さらに、好ましいB7ファミリーメンバーは、1またはそれ以上の他のB7ファミリーメンバーに対して生じた抗体と結合する。例えば抗BB1抗体はB7-4分子を認識する。

【0034】

B7-4ポリペプチドに関して本明細書で用いている用語「活性」はB7-4タンパク質の構造に固有の活性を含む。用語「活性」には、活性化T細胞を共刺激し、増殖および／またはサイトカイン分泌を誘導する能力が含まれる。さらに、用語「活性」にはB7-4ポリペプチドのその天然リガンドに結合する能力が含まれる。

【0035】

本明細書で用いている「天然の」核酸分子とは、天然のヌクレオチド配列を有する(例えば、天然タンパク質をコードする)RNAまたはDNA分子をいう。

【0036】

本明細書で用いている「アンチセンス」核酸には、タンパク質をコードする「センス」核酸と相補的な、例えば二本鎖cDNA分子をコードする鎖と相補的な、mRNA配列と相補的なまたは遺伝子のコーディング鎖と相補的なヌクレオチド配列を含む。

【0037】

本明細書で用いている用語「コーディング領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を表し、用語「非コーディング領域」はアミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域(例えば、5'および3'非翻訳領域)を表す。

【0038】

本明細書で用いている用語「ベクター」は、それと連結している別の核酸を輸送することができる核酸分子を表す。あるタイプのベクターは、さらなるDNA断片が連結してよい環状二本鎖DNAループを表す「プラスミド」である。ある種のベクターは、導入される宿主細胞中で自己複製することができる(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞中に導入されると宿主細胞のゲノムに統合され、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、ある種のベクターは、機能性に(operatively)連結した遺伝子の発現を誘導することができる。そのようなベクターを、本明細書では「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」という。一般的に、組換えDNA技術に用いる発現ベクターはプラスミドの形であることが多い。プラスミドは最も普通に用いられる形のベクターであるから、本明細書において「プラスミド」および「ベクター」は互換的にもちいてよい。しかしながら、本発明はそのような他の形の発現ベクター、例えば同じ機能をもたらすウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス)を含むものとする。

【0039】

本明細書で用いている用語「宿主細胞」は本発明の核酸、例えば組換え発現ベクターを導入した細胞を表すものとする。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は本明細書では互換的に用いる。そのような用語は、特定の対象細胞だけでなくそのような細胞の子孫または潜在的子孫を表すと理解すべきである。突然変異や環境の影響により次世代にある種の修飾が生じるかも知れないので、そのような子孫は実際には親細胞と同じではないが、本明細書で用いている用語の範囲に含まれる。

【0040】

本明細書で用いている「トランスジェニック動物」とは、1またはそれ以上の動物細胞が「導入遺伝子」を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスをいう。

10

20

30

40

50

用語「導入遺伝子」は、トランスジェニック動物を生じる細胞のゲノムに統合される、トランスジェニック動物の1またはそれ以上の細胞種または組織においてコードされた遺伝子産物の発現を誘導する成熟動物のゲノム中に残っている外来DNAを表す。

【0041】

本明細書で用いている用語「ホモローガスな組換え動物」は、動物の発生前に動物細胞、例えば胚細胞中に導入される内在遺伝子と外来遺伝子間のホモローガスな組換えにより内在性遺伝子が増加しているある種のトランスジェニック非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスを表す。

【0042】

本明細書で用いている用語「単離されたタンパク質」は、細胞から単離するか、または組換えDNA技術により製造したときには他のタンパク質、細胞物質および培養液を、また、化学的に合成したときには化学的前駆体や他の化学物質を実質的に含まないタンパク質を表す。

10

【0043】

本明細書で用いている用語「抗体」は、免疫グロブリン分子および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性な部分、すなわち、抗原と結合する（相互作用する）抗原結合部位、例えばFabおよびF(ab')₂断片、1本鎖抗体、scFv、Fd、または他の断片を含む。好ましくは、本発明の抗体はB7-4分子と特異的または実質的に特異的に結合する。本明細書で用いている用語「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」は、抗原の特定のエピトープと免疫反応することができる抗原結合部位を1種のみ含む抗体分子のポピュレーションを表し、用語「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」は、特定の抗原と相互作用することができる抗原結合部位を複数種含む抗体分子のポピュレーションを表す。すなわち、モノクローナル抗体組成物は、典型的には免疫反応する特定抗原との単結合親和性を示す。

20

【0044】

特定タンパク質のアミノ酸配列と遺伝子コードで定義したタンパク質をコードすることができるヌクレオチド配列（以下に示す）の明確な対応が知られている。同様に、特定核酸分子のヌクレオチド配列と遺伝子コードで定義した核酸分子によりコードされたアミノ酸配列の明確な対応が知られている。

遺伝子コード

30

アラニン(Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT
アルギニン(Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT
アスパラギン(Asn, N)	AAC, AAT
アスパラギン酸(Asp, D)	GAC, GAT
システイン(Cys, C)	TGC, TGT
グルタミン酸(Glu, E)	GAA, GAG
グルタミン(Gln, Q)	CAA, CAG
グリシン(Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT
ヒスチジン(His, H)	CAC, CAT
イソロイシン(Ile, I)	ATA, ATC, ATT
ロイシン(Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG
リジン(Lys, K)	AAA, AAG
メチオニン(Met, M)	ATG
フェニルアラニン(Phe, F)	TTC, TTT
プロリン(Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT
セリン(Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT
トレオニン(Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT
トリプトファン(Trp, W)	TGG
チロシン(Tyr, Y)	TAC, TAT
バリン(Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT
ターミナルシグナル(終止)	TAA, TAG, TGA

10

20

【0045】

遺伝子コードのよく知られた重要な特徴は冗長性であり、タンパク質を生成するのに用いるほとんどのアミノ酸について2以上のコーディングヌクレオチドトリプレットが用いられる(上記)。したがって、多くの異なるヌクレオチド配列が所定のアミノ酸配列をコードすることがある。そのようなヌクレオチド配列は、すべての有機体で同じアミノ酸配列の産生をもたらすので機能的に等価と考えられる(ある種の有機体はある配列を他の配列より効率的に翻訳することがある)。さらに、場合によりプリンまたはピリミジンのメチル化変異体が所定のヌクレオチド配列に見られるかもしれない。そのようなメチル化はトリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸のコーディング関係に影響しない。

30

【0046】

上記のことから、本発明のB7-4ポリペプチド(またはそのあらゆる部分)をコードするDNAまたはRNA分子を用い、DNAまたはRNA分子をアミノ酸配列に翻訳する遺伝子コードを用いてB7-4アミノ酸配列を導くことができる。同様に、あらゆるB7-4アミノ酸配列について、B7-4タンパク質をコードし得る対応するヌクレオチド配列を遺伝子コードから推定することができる(その冗長性によりあらゆる所定のアミノ酸配列について複数の核酸配列を生じるであろう)。すなわち、本明細書におけるB7-4ヌクレオチド配列の記載および/または開示は、該ヌクレオチド配列によりコードされるアミノ酸配列の記載および/または開示も含むと考えられよう。同様に、本明細書のB7-4アミノ酸配列の記載および/または開示は、該アミノ酸配列をコードし得るすべての考えられるヌクレオチド配列の記載および/または開示も含むと考えるべきである。

40

【0047】

II. 単離された核酸分子

本発明のある局面は、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分をコードする核酸分子、およびB7-4をコードする核酸(例えば、B7-4 mRNA)を同定するためのハイブリダイゼーションプローブとして用いるのに十分な核酸断片およびB7-4核酸分子の増幅または突然変異用PCRプライマーとして用いる断片をコードする単離された核酸分子に関する。本明細書で用いている用語「核酸分子」は、DNA分子(例えば、cDNAまたはゲノムcDNA)およびRNA分子(例えば、mRNA)およびヌクレオチド類似体を用いて得られた該DNAまたはRNA遺伝子の類似体を含むものとする。該核酸分子は1本鎖または二本鎖であり得るが二本鎖D

50

NAが好ましい。

【0048】

「単離された」核酸分子は、該核酸の天然の供給源に存在する他の核酸分子から分離されたものである。例えば、ゲノムDNAに関して、用語「単離された」には、ゲノムDNAが天然に結合している染色体から分離された核酸分子が含まれる。好ましくは「単離された」核酸分子は、該核酸分子が誘導される有機体のゲノムDNAにおいて天然に該核酸と隣り合った配列（すなわち、該核酸の5'および3'末端に位置する配列）がない。例えば、種々の態様において、単離されたB7-4核酸分子は、該核酸が誘導される細胞のゲノムDNAにおいて天然に核酸分子と隣り合った、約5 kb、4kb、3kb、2kb、1 kb、0.5 kbまたは0.1 kb以下のヌクレオチド配列を含むことができる。さらに、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、組換え技術で製造したときに他の細胞物質または培養液を実質的に含まないか、化学合成したときに化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まないことがある。しかしながら、「単離された」B7-4核酸分子は、ゲノムDNAにおいて通常 B7-4配列と隣り合っていない他のヌクレオチド配列と連結してよい(例えば、B7-4ヌクレオチド配列はベクター配列と連結してよい)。ある好ましい態様において、「単離された」核酸分子、例えばcDNA分子は、他の細胞物質も含まないかもしれない。しかしながら、他の細胞物質を含まないB7-4核酸分子が「単離された」と考える必要はない(例えば、哺乳動物DNAから分離し、細菌細胞中に挿入されたB7-4 DNA分子はまだ「単離された」と考えられよう)。

10

【0049】

本発明の核酸分子、例えば、配列番号1または3のヌクレオチド配列を有する核酸分子またはその部分は本明細書に記載の配列情報と標準的分子生物学的技術を用いて単離することができる。例えば、ハイブリダイゼーションプローブに配列番号1または3の核酸分子のすべてまたは部分を用い、標準的ハイブリダイゼーションおよびクローニング技術を用いてB7-4核酸分子を単離することができる(例えば、Sambrook, J., Fritsch, E. F., および Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載のように)。

20

【0050】

さらに、配列番号1または3のすべてまたは部分を含む核酸分子は、それぞれ配列番号1または3の配列に基づいて設計された合成オリゴヌクレオチドプライマーを用いてポリメラーゼ鎖反応(PCR)により単離することができる。

30

【0051】

本発明の核酸は、cDNA、mRNAまたはゲノムDNAを鋳型とし、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて標準的PCR増幅技術にしたがって増幅することができる。そのように増幅した核酸を適切なベクター中にクローニングし、DNA配列分析により特徴付けることができる。さらに、B7-4ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドを標準的合成技術、例えば自動DNA合成装置を用いて製造することができる。

【0052】

好ましい態様において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または3に示すヌクレオチド配列を含む。

40

【0053】

別の好ましい態様において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または3に示すヌクレオチド配列の相補物、またはこれらヌクレオチド配列のあらゆる部分である核酸分子を含む。配列番号1または3に示すヌクレオチド配列と相補性の核酸分子は、それぞれ配列番号1または3に示すヌクレオチド配列とハイブリダイズして安定な二本鎖を形成するように、それぞれ配列番号1または3に示すヌクレオチド配列と十分相補性である。

【0054】

さらに別の好ましい態様において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1または3に示すヌクレオチド配列と（例えば、完全長該ヌクレオチド配列に対して）少なくとも約50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%またはそれ以上ホモローガスな

50

ヌクレオチド配列またはこれらヌクレオチド配列のあらゆる部分を含む。

【0055】

さらに、本発明の核酸分子は、配列番号1または3の核酸配列の部分、例えばプローブまたはプライマーとして用いることができる断片、またはB7-4タンパク質の生物学的に活性な部分をコードする断片のみを含むことができる。B7-4遺伝子のクローニングから決定したヌクレオチド配列により、他の種由来のB7-4ファミリー相同体および他のB7-4ファミリーメンバーの同定および／またはクローニングに用いるのに設計されたプローブおよびプライマーを作製することができる。典型的には、該プローブ／プライマーは、実質的に純粋なオリゴヌクレオチドを含む。典型的には、オリゴヌクレオチドは、ストリンジェント条件下で、配列番号1または3のセンス配列、または配列番号1または3の天然のアレル変異体または突然変異体の少なくとも約12または15、好ましくは約20または25、より好ましくは約30、35、40、45、50、55、60、65、または75連続ヌクレオチドとハイブリダイスするヌクレオチド配列の領域を含む。具体的態様において、本発明の核酸分子は、長さが少なくとも350、400、450、500、550、600、650、700、750、または800ヌクレオチドの、ストリンジェントハイブリダイゼーション条件下で配列番号1または3の核酸分子とハイブリダイスするヌクレオチド配列を含む。

10

【0056】

別の態様において、第二核酸分子は配列番号1または3の少なくとも約500、600、700、800、900、または1000連続ヌクレオチドを含む。

【0057】

20

ある態様において、例えば、プローブとして用いる本発明の核酸分子は、配列番号1の部分、配列番号1の約ヌクレオチド815～約850または配列番号1の約ヌクレオチド320～856を含まない。別の態様において、本発明の核酸分子は、配列番号3の部分、配列番号3の約ヌクレオチド314～約734、約ヌクレオチド835～860、約ヌクレオチド1085～約1104、または約ヌクレオチド1286～約1536を含まない。

【0058】

ある態様において、本発明の核酸分子は配列番号1または配列番号3の少なくとも約500連続ヌクレオチドを含む。好ましい態様において、本発明の核酸分子は、配列番号1の少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900または少なくとも約950連続ヌクレオチド、または配列番号3の約1000連続ヌクレオチドを含む。別の態様において、本発明の核酸分子は、配列番号3の少なくとも約1500または1550ヌクレオチドを含む。

30

【0059】

好ましくは、本発明の単離された核酸分子は、配列番号1のコーディング領域の少なくとも部分(ヌクレオチド59-793に示す)または配列番号3(ヌクレオチド53-922に示す)を含む。別の態様において、B7-4核酸分子は配列番号1の約ヌクレオチド1～約ヌクレオチド319を含む。別の態様において、B7-4核酸分子は配列番号1の約ヌクレオチド855～約ヌクレオチド968を含む。別の態様において、B7-4核酸分子は、配列番号3の約ヌクレオチド1～約ヌクレオチド314を含む。別の態様において、B7-4核酸分子は、配列番号3の約ヌクレオチド955～約ヌクレオチド1285を含む。別の態様において、B7-4核酸分子は、配列番号3の約ヌクレオチド1535～約ヌクレオチド1552を含む。

40

【0060】

別の態様において、本発明の核酸分子は、配列番号1または配列番号3の少なくとも約500、少なくとも約600、少なくとも約700、少なくとも約800、少なくとも約900または少なくとも約1000連続ヌクレオチドを含む核酸分子と、少なくとも70%同一、より好ましくは80%同一、さらにより好ましくは90%同一である。

【0061】

B7-4ヌクレオチド配列に基づくプローブを用い、同じかまたはホモローガスなタンパク質をコードするゲノム配列または転写物を検出することができる。好ましい態様において、該プローブは、さらにそれと結合した標識群を含み、例えば、該標識群は放射性同位元素

50

、蛍光化合物、酵素、または酵素補助因子であり得る。そのようなプローブは、例えば、対象由来の細胞中のB7-4をコードする核酸のレベルを測定、例えば、B7-4 mRNAレベルを検出するか、またはゲノムB7-4遺伝子が突然変異するかもしれないかどうかを決定することによりB7-4タンパク質が誤発現している細胞または組織を同定するための診断試験用キットの部分として用いることができる。

【0062】

「B7-4タンパク質の生物学的に活性な部分」をコードする核酸断片は、B7-4生物活性を有するポリペプチド(B7-4タンパク質の生物活性は本明細書に記載している)をコードする配列番号1または3のヌクレオチド配列の部分を単離し、B7-4タンパク質のコードされた部分を発現させ(例えば、*in vitro*組換え発現により)、B7-4タンパク質のコードされた部分の活性を評価することにより製造することができる。

10

【0063】

遺伝子コードの縮重により配列番号1または3と異なる、配列番号1および3によりコードされるものと同じB7-4メンバーのタンパク質をコードする核酸分子は本発明に含まれる。したがって、別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、配列番号2または配列番号4に示すアミノ酸配列を有するタンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。別の態様において、本発明の単離された核酸分子はB7-4タンパク質をコードするヌクレオチド配列を有する。

【0064】

配列番号1または3に示すB7-4ヌクレオチド配列に加えて、B7-4タンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらすDNA配列の多形性がポピュレーション(例えば、ヒトポピュレーション)中に存在してよいことを当業者は認識するであろう。B7-4遺伝子におけるそのような遺伝子の多形性は、天然のアレル変異によりポピュレーション内に個々に存在してよい。本明細書で用いている用語「遺伝子」および「組換え遺伝子」は、B7-4タンパク質、好ましくは哺乳動物B7-4タンパク質をコードするオープンリーディングフレームを含み、さらに非コーディング制御配列およびイントロンを含むことができる核酸分子を表す。そのような天然のアレル変異体は機能的B7-4タンパク質と非機能的B7-4タンパク質の両方を含み、典型的にはB7-4遺伝子のヌクレオチド配列に1-5%の変動を生じることができる。あらゆる、すべてのそのようなヌクレオチドの変動とそれによるB7-4遺伝子のアミノ酸の、天然のアレル変異の結果であり、B7-4タンパク質の機能的活性を変化させない多形性は本発明の範囲内にあるものとする。

20

30

【0065】

さらに、他のB7-4ファミリーメンバーをコードする、配列番号1または3のB7-4ファミリー配列と異なるヌクレオチド配列を有する核酸分子は本発明の範囲内にあるものとする。例えば、別のB7-4cDNAはヒトB7-4のヌクレオチド配列に基づいて同定することができる。さらに、配列番号1または3のB7-4配列と異なるヌクレオチド配列を有する、異なる種由来のB7-4タンパク質をコードする核酸分子は、本発明の範囲内にあるものとする。例えば、マウスB7-4 cDNAはヒトB7-4分子のヌクレオチド配列に基づいて同定することができる。

【0066】

本発明のB7-4 cDNAの相同体およびに対応する核酸分子は、本明細書に開示したcDNAまたはその部分をハイブリダイゼーションプローブとし、標準的ハイブリダイゼーション技術にしたがって本明細書に開示したB7-4核酸に対する相同性に基づいて単離することができる。例えば、B7-4 DNAは、配列番号1または3のすべてまたは部分をハイブリダイゼーションプローブとし、標準的ハイブリダイゼーション技術(例えば、Sambrook, J., et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989に記載の)を用いてヒトゲノムDNAライブラリーから単離することができる。さらに、B7-4遺伝子のすべてまたは部分を含む核酸分子は、配列番号1または3の配列に基づいて設計したオリゴヌクレオチドプライマーを用いる複製連鎖反応(polymerase chain reaction)により単離することができる。例えば、mRNAは細胞から単離することができ(例えば、Chirgwin et al. (1979) *Biochemistry* 18: 5294-5299の

40

50

グアニジニウム-チオシアネート抽出法により)、cDNAは逆転写酵素(例えば、Moloney ML V逆転写酵素(Gibco/BRL, Bethesda, MDから入手可能)またはAMV逆転写酵素(Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FLから入手可能))を用いて調製することができる。PCR増幅用の合成オリゴヌクレオチドプライマーは、配列番号1または3に示すヌクレオチド配列に基づいて設計することができる。本発明の核酸分子は、cDNAまたはゲノムDNAを鋳型とし、適切なオリゴヌクレオチドプライマーを用いて標準的PCR増幅技術を用いて増幅することができる。そのようにして増幅した核酸を適切なベクター中にクローンし、DNA配列分析により特徴付けることができる。さらに、B7-4ヌクレオチド配列に対応するオリゴヌクレオチドは標準的合成法、例えば自動DNA合成装置を用いて製造することができる。

10

【0067】

別の態様において、本発明の単離された核酸分子は、長さが少なくとも15、20、25、30ヌクレオチドまたはそれ以上であり、ストリンジェント条件下で配列番号1または3のヌクレオチド配列を含む核酸分子とハイブリダイズする。他の態様において、核酸分子は長さが少なくとも30、50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、または600ヌクレオチドである。本明細書で用いている用語「ストリンジェント条件下でハイブリダイズする」は、互いに少なくとも30%、40%、50%、または60% ホモロジーなヌクレオチド配列が典型的には互いにハイブリダイズしたままでのハイブリダイゼーションおよび洗浄条件を示すものとする。好ましくは、該条件は、互いに少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約80%、さらにより好ましくは少なくとも約85%または90%ホモロジーな配列が、典型的には互いにハイブリダイズしたままであるような条件を示すものとする。そのようなストリンジェント条件は当業者に知られており、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6に記載されている。ストリンジェントハイブリダイゼーション条件の好ましい非制限的例は、約45℃、6X塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(SSC)中でハイブリダイゼーションし、次いで50-65℃、0.2 X SSC、0.1% SDSで1回またはそれ以上洗浄することである。好ましくは、ストリンジェント条件下でハイブリダイズする本発明の単離された核酸分子は天然の核酸分子に対応する。

20

【0068】

本明細書で用いている用語「天然の」核酸分子は、天然のヌクレオチド配列を有する(例えば、天然のタンパク質をコードする)RNAまたはDNA分子を表す。配列番号1および3に示すB7-4ヌクレオチド配列に加えて、当業者は、B7-4のヌクレオチドまたはアミノ酸配列の小さな変化をもたらすDNA配列の多形性がポピュレーション内に存在してよいことを認識するであろう。B7-4遺伝子のそのような遺伝子の多形性は天然のアレル変異体によりポピュレーション内の個体間に存在してよい。そのような天然のアレル変異体は、典型的には、該遺伝子のヌクレオチド配列に1-2 %の変動をもたらす得る。そのようなヌクレオチドの変動と天然のアレル変異体の結果であり、B7-4ポリペプチドの機能的活性を変化させない、得られるB7-4におけるアミノ酸の多形性は本発明の範囲内である。

30

【0069】

ポピュレーション中に存在するB7-4配列の天然のアレル変異体に加えて、当業者はさらに、例えば配列番号1または3のヌクレオチド配列中に突然変異を導入し、B7-4タンパク質の機能的活性を変化させることなくコートされたタンパク質のアミノ酸配列の変化をもたらしてよいことを認識するであろう。例えば、「非必須」アミノ酸残基に生じるヌクレオチドの置換が配列番号1または3の配列中に生じてよい。「非必須」アミノ酸残基は、B7-4分子の機能的活性を変化させることなくB7-4核酸分子の野生型配列(例えば、配列番号1または3の配列)から変化させることができる残基である。非必須であり、置換になじみやすい残基の例は、B7ファミリーメンバー(またはB7-4ファミリーメンバー)のアミノ酸を整合させ、保存されていない残基を決定することにより当業者が同定することができる。そのような残基は保存されていないのでより置換になじみやすいようである。

40

【0070】

50

したがって、本発明の別の局面は、B7-4活性に必須でないアミノ酸残基の変化を含むB7-4タンパク質をコードする核酸分子に関する。そのようなB7-4タンパク質は、配列番号2または4由来のアミノ酸配列と異なり、さらに固有のB7-4活性を保持する。B7-4タンパク質の非天然の変異体をコードする単離された核酸分子は、1またはそれ以上のアミノ酸の置換、付加、または欠失がコードされたタンパク質中に導入されるように配列番号1または3のヌクレオチド配列中に1またはそれ以上のヌクレオチド置換、付加、または欠失を導入することにより調製することができる。突然変異は標準的技術、例えば部位指向性突然変異誘発およびPCR介在性突然変異誘発により配列番号1または3中に導入することができる。好ましくは、保存性のアミノ酸置換は1またはそれ以上の非必須アミノ酸残基に生じる。「保存性のアミノ酸置換」はアミノ酸残基が同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されているものである。同様な側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、塩基性側鎖(例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電の極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン)、 β 分岐鎖側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含めて当該分野で定義されてきた。すなわち、B7-4中の非必須アミノ酸残基を同じ側鎖ファミリー由来の別のアミノ酸残基で置換することが好ましい。

10

【0071】

20

あるいはまた、別の態様において、例えば飽和突然変異誘発により、B7-4コーディング配列のすべてまたは部分に無作為に突然変異を導入することができ、得られた突然変異体のDNAに対する結合能および／または転写活性化能をスクリーニングすることにより機能的活性を保持する突然変異体を同定することができる。突然変異誘発後、コードされたB7-4突然変異体タンパク質を宿主細胞中で組換え的に発現させ、該突然変異体タンパク質の機能的活性をB7-4活性を評価するのに利用できるアッセイを用いて測定することができる。したがって、本発明の別の局面は、活性に本質的でないアミノ酸残基の変化を含むB7-4タンパク質をコードする核酸分子に関する。

【0072】

30

本発明のさらに別の局面は、B7-4融合タンパク質をコードする単離された核酸分子に関する。少なくとも、非B7-4タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする第二ヌクレオチド配列と機能的に連結したB7-4タンパク質、ポリペプチドまたはペプチドをコードする第一ヌクレオチド配列を含むそのような核酸分子は標準的組換えDNA技術により製造することができる。

【0073】

好ましい態様において、突然変異体 B7-4タンパク質について、1)活性化T細胞の増殖および／またはエフェクター機能を共刺激する(または例えば可溶形では共刺激を阻害する)、2)抗B7抗体と結合する、および／または3)B7-4リガンドと結合する能力を評価することができる。

【0074】

40

上記B7-4タンパク質をコードする核酸分子に加えて、本発明の別の局面はそれに対してアンチセンスである単離された核酸分子に関する。「アンチセンス」核酸は、タンパク質をコードする「センス」核酸と相補的な、例えば、二本鎖cDNA分子のコーディング鎖と相補的もしくはmRNA配列と相補的なヌクレオチド配列を含む。したがって、アンチセンス核酸はセンス核酸と水素結合することができる。アンチセンス核酸は完全B7-4コーディング鎖、またはその部分とのみ相補的であり得る。ある態様において、アンチセンス核酸分子は、B7-4をコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の「コーディング領域」に対してアンチセンスである。用語「コーディング領域」は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を表す。別の態様において、アンチセンス核酸分子は、B7-4をコードするヌクレオチド配列のコーディング鎖の「非コーディング領域」に対してアン

50

チセンスである。用語「非コーディング領域」は、アミノ酸に翻訳されない、コーディング領域と隣り合った5'および3'配列を表す(すなわち、5'および3'非翻訳領域ともいう)。

【0075】

コーディング鎖配列が本明細書に記載のB7-4をコードするとすれば、本発明のアンチセンス核酸はワトソンとクリックの塩基対化の法則に従って設計することができる。アンチセンス核酸分子はB7-4 mRNAの全コーディング領域と相補的であり得るが、より好ましくは、B7-4 mRNAのコーディングまたは非コーディング領域の部分とのみアンチセンスであるオリゴヌクレオチドである。例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドは、B7-4 mRNAの翻訳開始部位の周辺領域と相補的であり得る。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、例えば長さが約5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50ヌクレオチドであり得る。本発明のアンチセンス核酸は、当該分野で知られた方法を用いる化学合成および酵素ライゲーション反応を用いて構築することができる。例えば、アンチセンス核酸(例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド)は、天然のヌクレオチドまたは該分子の生物学的安定性を増大させるかもしくはアンチセンスとセンス核酸間の二本鎖型の生物学的安定性を増大させるように種々に修飾したヌクレオチド、例えば、ホスホロチオエート誘導体およびアクリジン置換ヌクレオチドを用いて化学的に合成することができる。該アンチセンス核酸を生じるのに用いることができる修飾ヌクレオチドの例には、5-フルオロウラシル、5-ブロモウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-(カルボキシヒドロキシメチル)ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、β-D-ガラクトシルクエオシン、イノシン、N6-イソペンチルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、β-D-マンノシルクエオシン、5'-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンチルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、ウィブトキシシン(wybutoxosine)、シュードウラシル、クエオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、5-メチル-2-チオウラシル、3-(3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル)ウラシル、(acp3)_w、および2,6-ジアミノプリンが含まれる。あるいはまた、アンチセンス核酸は核酸がアンチセンス方向(配置)にサブクローンされている発現ベクターを用いて生物学的に製造することができる(すなわち、挿入核酸から転写されたRNAは、さらに以下に記載する目的とする標的核酸とアンチセンス方向にあるであろう)。

【0076】

本発明のアンチセンス核酸分子は、B7-4タンパク質をコードする細胞性mRNAおよび／またはゲノムDNAとハイブリダイスするかまたは結合し、例えば、転写および／または翻訳を阻害することにより該タンパク質の発現を阻害するようにin situで生じるかまたは対象に投与される。ハイブリダイゼーションは安定な二本鎖を形成する通常のヌクレオチド相補性によるか、または、例えばDNA二本鎖と結合するアンチセンス核酸分子の場合は二重らせんの主要なグループ(groove)の特異的相互作用を介することができる。本発明のアンチセンス核酸分子の投与経路の例には、組織部位への直接注射が含まれる。あるいはまた、アンチセンス核酸分子を選んだ細胞を標的にするように修飾し、ついでこれを全身的に投与することができる。例えば、全身投与ではアンチセンス分子を、例えばアンチセンス核酸分子を細胞表面レセプターまたは抗原と結合するペプチドもしくは抗体と結合させることにより選択した細胞表面に発現したレセプターまたは抗原と特異的に結合するように修飾することができる。アンチセンス核酸分子は本明細書に記載のベクターを用いて細胞に供給することもできる。アンチセンス分子の十分な細胞内濃度を達成するには、アンチセンス核酸分子が強いpol IIまたはpol IIIプロモーターの制御下に置かれるベクター構築物が好ましい。

【0077】

さらに別の態様において、本発明のアンチセンス核酸分子は α -アノメリックな核酸分子である。 α -アノメリックな核酸分子型の特異的二本鎖ハイブリッドは、通常の β -ユニットと違って鎖が互いに平行に走る相補性RNAとの特異的二本鎖ハイブリッドを形成する (Gaultier et al. (1987) Nucleic Acids. Res. 15:6625-6641)。アンチセンス核酸分子は2'-*o*-メチルリボヌクレオチド (Inoue et al. (1987) Nucleic Acids Res. 15:6131-6148) またはキメラRNA-DNA類似体 (Inoue et al. (1987) FEBS Lett. 215:327-330) も含む。

【0078】

さらに別の態様において、本発明のアンチセンス核酸はリボソームである。リボソームは、相補的な領域を有するmRNAのような一本鎖核酸を開裂させることができるリボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNA分子である。すなわち、リボソーム (例えば、ハンマーヘッドリボソーム (HaseloffおよびGerlach (1988) Nature 334:585-591) に記載) を用いてB7-4 mRNA転写物を触媒的に開裂させてB7-4 mRNAの翻訳を阻害することができる。B7-4をコードする核酸に対する特異性を有するリボソームは本明細書に記載のB7-4 cDNAのヌクレオチド配列 (すなわち、配列番号1または3) に基づいて設計することができる。例えば、活性部位のヌクレオチド配列がB7-4コーディングmRNA中の開裂するヌクレオチド配列と相補的なTetrahymena L-19 IVS RNAの誘導体を構築することができる。例えば、Cech et al. U.S. Patent No. 4,987,071; およびCech et al. 米国特許第5,116,742号参照。あるいはまた、B7-4 mRNAを用いて、RNA分子のプールから特異的リボヌクレアーゼ活性を有する触媒的RNAを選択することができる。例えば、Bartel, D. およびSzostak, J.W. (1993) Science 261:1411-1418参照。

【0079】

あるいはまた、B7-4の制御領域 (例えば、B7-4プロモーターおよび/またはエンハンサー) と相補的なヌクレオチド配列をターゲッティング (標的化) して標的細胞中のB7-4遺伝子の転写を妨げる三重ラセン構造を形成することによりB7-4遺伝子発現を阻害することができる。一般的には、Helene, C. (1991) Anticancer Drug Des. 6(6):569-84; Helene, C. et al. (1992) Ann. N.Y. Acad. Sci. 660:27-36; およびMaher, L.J. (1992) Bioassays 14(12):807-15参照。

【0080】

さらに別の態様において、本発明のB7-4核酸分子の塩基部分、糖部分、またはホスフェートバックボーンを修飾し、例えば分子の安定性、ハイブリダイゼーション、または溶解性を改善することができる。例えば、該核酸分子のデオキシリボースホスフェートバックボーンを修飾してペプチド核酸を生成することができる (Hyrup B. et al. (1996) Bioorganic & Medicinal Chemistry 4 (1): 5-23参照)。本明細書で用いている用語「ペプチド核酸」または「PNA」は、デオキシリボースホスフェートバックボーンがシュードペプチドバックボーンで置換されており、4個の天然のヌクレオベースのみが保持されている核酸ミミック (mimics) 例えば、DNAミミックを表す。PNAの天然のバックボーンは、低イオン強度条件下でDNAおよびRNAと特異的にハイブリダイスできることを示された。PNAオリゴマーの合成は、Hyrup B. et al. (1996)、上記; Perry-O'Keefe et al. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 14670-675に記載の標準固相ペプチド合成プロトコルを用いて行うことができる。

【0081】

B7-4核酸分子のPNAは、治療的および診断的用途に用いることができる。例えば、PNAは、例えば転写もしくは翻訳停止を誘導するかまたは複製を阻害することにより遺伝子発現の配列-特異的調節のためのアンチセンスまたは抗遺伝子物質として用いることができる。B7-4核酸分子のPNAは、遺伝子中の一塩基対の突然変異の分析 (例えば、PNA-直接PCRクランピングにより) に、他の酵素と組み合わせて用いるときの「人工的制限酵素」 (例えば、S1ヌクレアーゼ (Hyrup B. (1996)、上記)、またはDNAシーケンシングまたはハイブリダイゼーション用のプローブまたはプライマー (Hyrup B. et al. (1996) 上記; Perry-O'Keefe 上記) として用いることもできる。

【0082】

別の態様において、PNAに脂質親和性または他のヘルパー基を結合させるか、PNA-DNAキメラを形成させるか、またはリボソームまたは当該分野で知られた他の薬剤供給（ドラッグデリバリー）技術を用いることにより、PNAB7-4のPNAを修飾することができる（例えば、その安定性または細胞への取り込みを増大させる）。例えば、B7-4核酸分子のPNA-DNAキメラを生成することができ、これによりPNAおよびDNAの有利な特性を組みあわせることができよう。そのようなキメラでは、PNA部分は高い結合親和性と特異性をもたらし、DNA認識酵素（例えば、RNase HおよびDNAポリメラーゼ）がDNA部分と相互作用する。PNA-DNAキメラは、塩基スタッキング、ヌクレオベース間の結合数、および方向について選んだ適切な長さのリンカーを用いて結合することができる（Hyrup B. (1996)、上記）。PNA-DNAキメラの合成は、Hyrup B. (1996)、上記およびFinn P.J. et al. (1996) *Nucleic Acids Res.* 24 (17): 3357-63の記載に従って行うことができる。例えば、DNAは、標準的ホスホラミダイトカップリング化学を用い固相支持体上で合成することができ、修飾ヌクレオシド類似体、例えば、5'-(4-メトキシトリチル)アミノ-5'-デオキシ-チミジンホスホラミダイトをPNAとDNA 5'末端の間に用いることができる（Mag, M. et al. (1989) *Nucleic Acid Res.* 17: 5973-88）。次に、PNAモノマーを段階的にカップリングさせて5' PNA断片と3' DNA断片を含むキメラ分子を生成する（Finn P.J. et al. (1996)、上記）。あるいはまた、5' DNA断片および3' PNA断片を用いてキメラ分子を合成することができる（Peterser, K.H. et al. (1975) *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 5: 1119-11124）。

10

【0083】

別の態様において、該オリゴヌクレオチドは、他の付属群、例えばペプチド（例えば、in vivoで宿主細胞レセプターをターゲティングするための）、または細胞膜（例えば、Letting et al. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. US.* 86:6553-6556; Lemaitre et al. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:648-652; PCT公開公報W088/09810参照）または血液脳関門（例えば、PCT公開公報W089/10134参照）を横切る移動を促す物質を含んでよい。さらに、オリゴヌクレオチドは、ハイブリダイゼーション誘発開裂物質（例えば、Krol et al. (1988) *Bio-Techniques* 6:958-976参照）または挿入（intercalating）物質を用いて修飾することができる（例えば、Zon (1988) *Pharm. Res.* 5:539-549参照）。このために、オリゴヌクレオチドを別の分子（例えば、ペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送物質、またはハイブリダイゼーション誘発開裂物質）とコンジュゲートしてよい。

20

30

【0084】

III. 単離されたB7-4タンパク質および抗B7-4抗体

本発明のある局面は、単離されたB7-4タンパク質、およびその生物学的に活性な部分、ならびに抗B7-4抗体を生じる免疫原として用いるのに適したポリペプチド断片に関する。ある態様において、天然のB7-4タンパク質は、標準的タンパク質精製技術により細胞または組織供給源から単離することができる。別の態様において、B7-4タンパク質は組換えDNA技術により製造される。組換え発現に代わって、標準的ペプチド合成技術を用いてB7-4タンパク質またはポリペプチドを化学的に合成することができる。

【0085】

「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、B7-4タンパク質を誘導する細胞または組織供給源由来の細胞物質または他の夾雑物を実質的に含まないか、または化学合成したときに化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない。用語「細胞物質を実質的に含まない」には、B7-4タンパク質が単離されるかまたは組換え的に製造される細胞の細胞成分から該タンパク質を分離する該タンパク質の製造が含まれる。

40

ある態様において、用語「細胞物質を実質的に含まない」には、約30%（乾燥重量で）以下の非B7-4タンパク質（本明細書では「夾雑タンパク質」ともいう）、より好ましくは約20%以下の非B7-4タンパク質、さらにより好ましくは約10%以下の非B7-4タンパク質、および最も好ましくは約5%以下の非B7-4タンパク質を有するB7-4タンパク質調製物が含まれる。B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分を組換え的に製造する場合は、培養液を

50

実質的に含まない、すなわち、培養液が容量で該タンパク質調製物の約20%以下、より好ましくは約10%以下、および最も好ましくは約5%以下であることも好ましい。

【0086】

用語「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」には、B7-4タンパク質の合成に参与する化学物質前駆体または他の化学物質から該タンパク質を分離する該タンパク質の製造が含まれる。ある態様において、用語「化学物質前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」には、化学物質前駆体または非B7-4化学物質が約30%（乾燥重量で）以下、より好ましくは化学物質前駆体または非B7-4化学物質が約20%以下、さらにより好ましくは化学物質前駆体または非B7-4化学物質が約10%以下、最も好ましくは化学物質前駆体または非B7-4化学物質が約5%以下であるB7-4タンパク質の製造が含まれる。本発明の別の局面は単離されたB7-4タンパク質に関する。好ましくは、B7-4タンパク質は、配列番号1または3によってコードされるアミノ酸配列を含む。別の好ましい態様では、該タンパク質は配列番号2または4のアミノ酸配列を含む。他の態様では、該タンパク質は、配列番号2または4に示すアミノ酸配列と少なくとも50%、少なくとも60%のアミノ酸同一性、より好ましくは70%のアミノ酸同一性、より好ましくは80%、さらにより好ましくは90%または95%のアミノ酸同一性がある。

10

【0087】

他の態様において、本発明はB7-4タンパク質の単離された部分を提供する。B7-4タンパク質には、シグナル配列、およびIgVドメインおよびIgCドメインが含まれる。配列番号2のシグナル配列はアミノ酸1-18で示される。配列番号4のシグナル配列は約アミノ酸1-18で示される。配列番号2のIgVドメインは約アミノ酸19-134で示され、配列番号4のIgVドメインは約アミノ酸19-134で示される。配列番号2のIgCドメインは、約アミノ酸135-227で示され、配列番号4のIgCドメインは約アミノ酸135-227で示される。配列番号2に示すB7-4の親水性尾部（末尾）は約アミノ酸228-245に示す親水性尾部を含む。配列番号4のB7-4ポリペプチドは、配列番号4の約アミノ酸239-259で示される貫膜ドメイン、および配列番号4の約アミノ酸260-290で示される細胞質ドメインを含む。

20

【0088】

さらに本発明は、可溶形のB7-4タンパク質に関する。そのような形は、例えば配列番号2に示すような天然のものか、または操作されており、例えば、B7-4タンパク質の細胞外ドメインを含むことができる。B7-4細胞外ドメインの例には配列番号4の約アミノ酸19-238が含まれる。

30

【0089】

ある態様において、B7-4ポリペプチドの細胞内ドメインは、成熟形のB7-4ポリペプチド、例えば、IgVおよびIgCドメインを含むが、B7-4ポリペプチドの貫膜および細胞質ドメイン（例えば、配列番号4の約アミノ酸19～アミノ酸238）または配列番号2の約アミノ酸19～アミノ酸245を含まない。

【0090】

B7-4タンパク質の生物学的に活性な部分は、完全長B7-4タンパク質より少ないアミノ酸を含み、B7-4タンパク質の少なくとも1つの活性を有する、アミノ酸配列と十分にホモロジーであるかそれから誘導されるアミノ酸配列を含むペプチドを含む。典型的には、生物学的に活性な部分はB7-4タンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。B7-4タンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば長さが少なくとも10、25、50、100、150、200アミノ酸またはそれ以上であるポリペプチドであり得る。

40

【0091】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸配列の同一率を決定するには、最適に比較する目的で該配列を一直線に並べる（例えば、最適に並べるために第一および第二アミノ酸または核酸配列の一方または両方にギャップを導入し、比較のためにホモロジーでない配列を無視することができる）。好ましい態様において、比較のために一直線に並べた参照配列の長さは、参照配列の長さの少なくとも30%、好ましくは40%、より好ましくは少なくとも50%、さらにより好ましくは少なくとも60%、およびさらにより好ましくは少なくとも70%

50

、80%、または90%である。対応する位置の残基を比較し、ある配列の位置が他の配列の対応する位置と同じ残基で占められているとき、該分子のその位置は同一である。したがって、2つの配列間の同一率は2つの配列が共有する同じ位置の数の関数である（すなわち、同一%＝同一位置数／総位置数×100）である。2つ配列間の同一率は2配列を最適に並べるために導入する必要があるギャップの数および各ギャップの長さを考慮した該配列が共有する同一位置の数の関数である。本明細書で用いているアミノ酸または核酸の「同一性」はアミノ酸または核酸の「相同性」と同意義である。

【0092】

2配列間の同一率の決定および配列の比較は数学的アルゴリズムを用いて行われる。好ましい態様において、2アミノ酸配列間の同一率は、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム(<http://www.gcg.com>で入手可能)を用い、Blosum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスおよびギャップ加重値16、14、12、10、8、6、または4、および長さ加重値1、2、3、4、5、または6を用いて求めた。さらに別の好ましい態様において、2ヌクレオチド配列間の同一率は、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム(<http://www.gcg.com>で入手可能)を用い、NWSgapdna.CMPマトリックスおよびギャップ加重値40、50、60、70、または80および長さの加重値 1、2、3、4、5、または6を用いて求めた。

【0093】

本発明の核酸およびタンパク質配列は、例えば、他のファミリーメンバーまたは関連配列を同定するためにさらに公開データベースを検索するための「問い合わせ (query) 配列」として用いることができる。そのような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLAST プログラム (バージョン2.0)を用いておこなうことができる。BLAST ヌクレオチド検索をNBLAST、スコア=100、コード長=12にて行い、本発明の7-4核酸分子とホモローガスなヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索をXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3にて実施し、本発明のB7-4タンパク質分とホモローガスなアミノ酸配列を得ることができる。比較のためのギャップを入れた配列を得るには、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のごとくギャップド (Gapped) BLAST を用いることができる。BLASTおよびギャップドBLASTプログラムを用いる場合は、各プログラムのデフォルトパラメーター (例えば、XBLASTおよびNBLAST)を用いることができる。例えば、本発明のヌクレオチド配列を、デフォルトBlastnマトリックス1-3を用い、ギャップペナルティセットのイグジスタンス11およびエクステンション1を用いて分析した。本発明のアミノ酸配列は、デフォルトセッティング: Blosum62マトリックスを用い、イグジスタンス11およびエクステンション1のギャップペナルティセットを用いて分析した。 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>参照。

【0094】

本発明は、B7-4キメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書で用いている B7-4「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、非B7-4ポリペプチドと機能性に結合したB7-4ポリペプチドを含む。「B7-4ポリペプチド」はB7-4ポリペプチドに対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを表し、「非B7-4ポリペプチド」はB7-4タンパク質と実質的にホモローガスでないタンパク質、例えばB7-4タンパク質と異なり、同じまたは異なる微生物に由来するタンパク質に対応するアミノ酸配列を有するポリペプチドを表す。B7-4融合タンパク質のなかでB7-4ポリペプチドはB7-4タンパク質のすべてまたは部分に対応することができる。好ましい態様において、B7-4融合タンパク質は、B7-4タンパク質の少なくとも1つの生物学的に活性な部分、例えば、B7-4タンパク質の細胞外ドメインを含む。融合タンパク質において、用語「機能性に結合した (operatively linked)」は、B7-4ポリペプチドおよび非B7-4ポリペプチドが互いにインフレームに融合していることを示すものとする。非B7-4ポリペプチドはB7-4タンパク質のN末端またはC末端と結合することができる。

【0095】

例えば、ある態様において、該融合タンパク質は、B7-4メンバー配列がGST配列の末端と融合しているGST-B7-4メンバー融合タンパク質である。別の態様において、融合タンパク

質は、B7-4メンバー配列がインフルエンザヘマグルチニンエピトープtagとインフレーションに融合するようにB7-4メンバーヌクレオチド配列がベクター、例えばpCEP4-HAベクター(Herrschner, R.F. et al. (1995) Genes Dev. 9:3067-3082)に挿入されているB7-4メンバー-HA融合タンパク質である。そのような融合タンパク質は、組換えB7-4メンバーの精製を促すことができる。

【0096】

B7-4融合タンパク質は、B7-4活性を有する第一ペプチドをコードするヌクレオチド配列および第一ペプチドの溶解性、親和性、安定性、または結合価(valency)を変化させる部分に対応する第二ペプチドをコードするヌクレオチド配列、例えば免疫グロブリン定常領域を組換え的に発現させることにより製造することができる。好ましくは、第一ペプチドは、B7-4ポリペプチドの部分(例えば、活性化T細胞を共刺激するのに十分な配列番号4に示す配列のアミノ酸残基1-238または19-238(シグナル配列を開裂後)部分)からなる。第二ペプチドは、免疫グロブリン定常領域、例えばヒトC γ 1ドメインまたはC γ 4ドメイン(例えば、ヒトIgC γ 1またはヒトIgC γ 4のヒンジ、CH2およびCH3領域、(例えば、Caponらの、米国特許第5,116,964号、第5,580,756号、第5,844,095号など参照。この内容は本明細書の一部を構成する)を含むことができる。得られるB7-4-Ig融合タンパク質はB7-4溶解性、結合親和性、安定性および/または結合価(すなわち、分子あたりの利用可能な結合部位数)を変化させ、タンパク質の精製効率を増加させることができよう。組換え技術により製造される融合タンパク質およびペプチドを分泌させ、該タンパク質またはペプチドを含む細胞と培養液の混合物から単離することができる。あるいはまた、タンパク質またはペプチドを細胞質に保持させ、細胞を回収し、溶解させ、該タンパク質を単離してよい。典型的には細胞培養は、宿主細胞、培地および他の副産物を含む。細胞培養に適した培地は当該分野でよく知られている。タンパク質およびペプチドは当該分野で知られたタンパク質およびペプチドを精製するための技術を用いて細胞培養液、宿主細胞、または両方から単離することができる。宿主細胞をトランスフェクトし、タンパク質およびペプチドを精製する技術は当該分野で知られている。

【0097】

特に好ましいB7-4 Ig融合タンパク質には、免疫グロブリン定常領域とカップリングした細胞外ドメイン部分または可変領域様ドメインが含まれる。免疫グロブリン定常領域は免疫グロブリン構造に固有のエフェクター活性を低下または排除する遺伝子修飾を含んでよい。例えば、B7-4ポリペプチドの細胞外部分をコードするDNAを、例えばWO97/28267に記載の部位指向性突然変異誘発により修飾したヒトIgC γ 1および/またはIgC γ 4のヒンジ、CH2およびCH3領域をコードするDNAと結合することができる。

【0098】

好ましくは、本発明のB7-4融合タンパク質は標準的組換えDNA技術により製造される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片を、例えば、ライゲーションにブラントエンドまたはスタグガー(stagger)エンドの末端を用い、制限酵素で消化して適切な末端を得、適切な粘着末端を充填し、望ましくない結合を避けるためにアルカリホスファターゼ処理し、酵素的に連結する通常の技術に従ってインフレーションと一緒に結合する。別の態様において、融合遺伝子は自動DNA合成装置を含む通常の技術により合成することができる。あるいはまた、遺伝子断片PCR増幅を、2つの連続した遺伝子断片間に相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて行うことができ、次いでこれをアニールおよび再増幅してキメラ遺伝子配列を精製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992参照)。さらに、融合部分をすでにコードしている多くの発現ベクターが市販されている(例えば、GSTポリペプチドまたはHAエピトープtag)。融合部分がB7-4タンパク質とインフレーションに連結されるようにB7-4コーディング核酸をそのような発現ベクター中にクローンすることができる。

【0099】

別の態様において、融合タンパク質は、N末端にヘテロローガスなシグナル配列を含むB7-

10

20

30

40

50

4タンパク質である。ある宿主細胞(例えば、哺乳動物宿主細胞)におけるB7-4の発現および／または分泌は、ヘテロローガスなシグナル配列を用いることにより増加させることができる。

【0100】

本発明のB7-4融合タンパク質を医薬組成物に組み込み、in vivoで対象に投与することができる。B7-4融合タンパク質を用いることは、免疫学的障害、例えば自己免疫病の治療または移植の場合に治療的に有用であろう。さらに、本発明のB7-4-融合タンパク質を免疫原に用いて対象に抗B7-4抗体を産生させ、B7-4リガンドを精製し、スクリーニングアッセイにおいてB7-4とB7-4リガンドとの相互作用を阻害する分子を同定することができる。

【0101】

好ましくは、本発明のB7-4キメラまたは融合タンパク質は、標準的組換えDNA技術により製造される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片は、例えば、ライゲーションにブラントエンドまたはスタグガーエンドの末端を用い、制限酵素で消化して適切な末端を得、適切な粘着末端を充填し、望ましくない結合を避けるためにアルカリホスファターゼ処理し、酵素的に連結する通常の技術に従ってインフレームと一緒に結合する。別の態様において、融合遺伝子を自動DNA合成装置を含む通常の技術により合成することができる。あるいはまた、遺伝子断片PCR増幅を、2つの連続した遺伝子断片間に相補的なオーバーハングを生じるアンカープライマーを用いて行うことができ、次いでこれをアニールおよび再増幅してキメラ遺伝子配列を精製することができる(例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992参照)。さらに、融合部分をすでにコードしている多くの発現ベクターが市販されている(例えば、GSTポリペプチド)。融合部分がB7-4タンパク質とインフレームに連結されるようにB7-4コーディング核酸をそのような発現ベクター中にクローンすることができる。

【0102】

本発明は、B7-4アゴニスト(ミメティクス)またはB7-4アンタゴニストとして機能する種々のB7-4タンパク質にも関する。B7-4タンパク質の変異体は、突然変異誘発、例えば、B7-4タンパク質の不連続点突然変異またはランケーションにより生じさせることができる。B7-4タンパク質のアゴニストは天然のB7-4タンパク質の生物活性またはそのサブセットを実質的に保持し得る。B7-4タンパク質のアンタゴニストは、例えばB7-4タンパク質の細胞活性を競合的に調節することにより天然のB7-4タンパク質の1またはそれ以上の活性を阻害することができる。すなわち、機能が限定された変異体で処理することにより特定の生物学的効果を誘導することができる。ある態様において、天然の該タンパク質の生物活性のサブセットを有する変異体で対象を処理すると、天然のB7-4タンパク質で処置するのに比べて対象の副作用が少ない。

【0103】

ある態様において、B7-4アゴニスト(ミメティクス)またはB7-4アンタゴニストとして機能するB7-4タンパク質変異体は、B7-4タンパク質の突然変異体、例えばランケーション突然変異体の組み合わせライブラリーにおいてB7-4タンパク質アゴニストまたはアンタゴニスト活性をスクリーニングすることにより同定することができる。ある態様において、B7-4変異体の多彩なライブラリーは核酸レベルでの組み合わせ突然変異誘発により生じ、多彩な遺伝子ライブラリーによりコードされる。B7-4変異体の多彩なライブラリーは、例えば、考えられるB7-4配列の縮重セットが個々のポリペプチドまたはそのなかにB7-4配列のセットを含むより大きな融合タンパク質のセット(例えば、ファージ表現用の)として発現し得るように合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列内に酵素的に結合することにより製造することができる。縮重オリゴヌクレオチド配列から考えられるB7-4変異体のライブラリーを作製するのに用いることができる種々の方法がある。縮重遺伝子配列の化学合成を自動DNA合成装置を用いて行い、次いで合成遺伝子を適切な発現ベクターに連結することができる。遺伝子の縮重セットを用いることにより、ある混合物において考えられるB7-4配列の所望のセットをコードする配列すべてを供給することができる。縮重オリゴヌクレオチドの合成方法は当該分野で知られている(例えば、Narang, S.A. (1983) Tet

10

20

30

40

50

rahedron 39:3; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science 198:1056; Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477参照)。

【0104】

さらに、B7-4タンパク質をコードする配列の断片のライブラリーを用いてスクリーニング用のB7-4断片の多彩なポピュレーションを作製し、次いでB7-4タンパク質変異体を選択することができる。ある態様において、ニッキングが分子あたり約1個だけ生じる条件下で、B7-4コーディング配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを編成させ、DNAを復元して種々のニッキングを生じた生成物からのセンス/アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼで処理することにより再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、得られた断片ライブラリーを発現ベクターに連結することによりコーディング配列断片のライブラリーを作製することができる。この方法によりB7-4タンパク質の種々のサイズの内部断片、N末端およびC末端をコードする発現ライブラリーを誘導することができる。

10

【0105】

点突然変異またはトランケーションにより作製した組み合わせライブラリーの遺伝子産物をスクリーニングし、選択した特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリーをスクリーニングするための種々の技術が当該分野で知られている。そのような技術は、B7-4タンパク質の組み合わせ突然変異誘発により生じた遺伝子ライブラリーを速やかにスクリーニングするのに適させることができる。大遺伝子ライブラリーをスクリーニングするための高処理量の分析法になじむ最も広く用いられる技術には、通常、複製可能な発現ベクター中に遺伝子ライブラリーをクローンし、得られたベクターのライブラリーで適切な細胞を形質転換し、所望の活性を検出することにより、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を促す条件下で組み合わせ遺伝子を発現させることが含まれる。ライブラリー中の機能的突然変異体の頻度を増大させる新規技術である再帰アンサンブル (ensemble) 突然変異誘発 (REM) をスクリーニングアッセイと組み合わせて用い、B7-4変異体を同定することができる (ArkinおよびYouvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815; Delagrave et al. (1993) タンパク質 Engineering 6(3):327-331)。

20

【0106】

ある態様において、細胞ベースのアッセイを用いて多彩なB7-4ライブラリーを分析することができる。例えば、発現ベクターのライブラリーを、通常B7-4を合成し、分泌する細胞系にトランスフェクトすることができる。次に、トランスフェクトした細胞をB7-4および特定の突然変異体B7-4を分泌し、細胞上清中のB7-4活性に対する該突然変異体発現の影響を、例えば、あらゆる多くの酵素的アッセイにより検出することができる。次に、プラスミドDNAを細胞から回収してB7-4活性の強化または阻害をスコアにし、さらに個々のクローンを特徴づける。

30

【0107】

単離されたB7-4タンパク質またはその部分もしくは断片を免疫原に、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体を製造するための標準的技術を用いてB7-4と結合する抗体を産生することができる。完全長B7-4タンパク質を用いることができるか、または本発明は免疫原として用いるB7-4の抗原性ペプチド断片を提供する。B7-4の抗原性ペプチドは、少なくとも8アミノ酸残基を含み、該ペプチドに対する抗体がB7-4と特異的免疫複合体を形成するようにB7-4のエピトープを含む。好ましくは、該抗原性ペプチドは少なくとも10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも15アミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも20アミノ酸残基、最も好ましくは少なくとも30アミノ酸残基を含む。

40

【0108】

あるいはまた、B7-4ポリペプチドの抗原性ペプチド断片を免疫原として用いることができる。B7-4ポリペプチドの抗原性ペプチド断片は、典型的には配列番号2または4に示す少なくとも8アミノ酸残基を含み、該ペプチドに対する抗体がB7-4分子と免疫複合体を形成するようにB7-4ポリペプチドのエピトープを含む。抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、該タンパク質表面に位置するB7-4の領域、例えば親水性領域である。ある態様

50

において、抗体はB7-4分子と実質的に特異的に結合する。別の態様において、抗体はB7-4ポリペプチドと特異的に結合する。

【0109】

好ましくは、該抗原性ペプチドは少なくとも約10アミノ酸残基、より好ましくは少なくとも約15アミノ酸残基、さらにより好ましくは少なくとも約20アミノ酸残基、および最も好ましくは少なくとも約30アミノ酸残基を含む。該抗原性ペプチドに含まれる好ましいエピトープは、該タンパク質表面に位置する（例えば親水性領域）、B7-4ポリペプチドに特有のB7-4ポリペプチドの領域である。ある態様において、そのようなエピトープはある種、例えばマウスまたはヒト、由来のB7-4タンパク質に特異的である（すなわち、種にわたって保存されていないB7-4ポリペプチド領域に及ぶ抗原性ペプチドを免疫原に用い、そのような非保存残基を本明細書に記載のアラインメントを用いて決定することができる。）。B7-4タンパク質の標準的疎水性分析を実施し親水性領域を同定することができる。

10

【0110】

典型的には、B7-4免疫原を用いて適切な対象（例えばウサギ、ヤギ、マウス、または他の哺乳動）を免疫原で免疫することにより抗体を製造する。適切な免疫原性調製物は、例えば組換え的に発現させたB7-4タンパク質や化学的に合成したB7-4ペプチドを含むことができる。さらに該調製物はアジュバント、例えばFreund完全または不完全アジュバント、または同様の免疫刺激物質を含むことができる。免疫原性B7-4調製物による適切な対象の免疫によりポリクローナル抗B7-4抗体反応が誘導される。

20

【0111】

したがって、本発明の別の局面は、抗B7-4抗体に関する。ポリクローナル抗B7-4抗体は適切な対象をB7-4免疫原で免疫することにより上記のごとく製造することができる。免疫された対象における抗B7-4抗体価は、標準的技術、例えば固定化B7-4ポリペプチドを用いる酵素免疫測定法(ELISA)により経時的にモニターすることができる。所望により、B7-4ポリペプチドに対して生じる抗体分子を哺乳動物（例えば血液から）単離し、さらに、よく知られた技術、例えばプロテインAクロマトグラフィーにより精製してIgG分画を得ることができる。免疫後の適切なとき、例えば抗B7-4抗体価が最も高いときに、抗体産生細胞を対象から得、これを用いて標準的方法、例えばKohlerおよびMilstein (1975, Nature 256:495-497)に最初に記載のハイブリドーマ技術(Brown et al. (1981) J. Immunol 127:539-46; Brown et al. (1980) J Biol Chem 255:4980-83; Yeh et al. (1976) PNAS 76:2927-31; およびYeh et al. (1982) Int. J. Cancer 29:269-75も参照のこと)、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozbor et al. (1983) Immunol Today 4:72)、EBVハイブリドーマ技術(Cole et al. (1985), Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96)、またはトリオーマ技術によりモノクローナル抗体を製造することができる。モノクローナル抗体ハイブリドーマを製造する技術はよく知られている（一般的には、R. H. Kenneth, Monoclonal Antibodies中: A New Dimension In Biological Analyses, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980); E. A. Lerner (1981) Yale J. Biol. Med., 54:387-402; M. L. Gefter et al. (1977) Somatic Cell Genet., 3:231-36参照）。簡単には、不死化細胞系(典型的にはミエローマ)を、上記のごとくB7-4免疫原で免疫した哺乳動物由来のリンパ球（典型的には脾臓細胞）と融合させ、得られるハイブリドーマ細胞の培養上清をスクリーニングしてB7-4ポリペプチドと特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを同定する。

30

40

【0112】

リンパ球と不死化細胞系を融合するのに用いるあらゆる種々のよく知られたプロトコールを抗B7-4モノクローナル抗体を産生するのに適用することができる(例えば、G. Galfre et al. (1977) Nature 266:55052; Gefter et al. Somatic Cell Genet., cited、上記; Lerner, Yale J. Biol. Med., cited、上記; Kenneth, Monoclonal Antibodies、上記参照)。さらに、当業者は、そのような方法には有用と思われる多くの変動があることを認識するであろう。典型的には、不死化細胞系(例えば、ミエローマ細胞系)は同じ哺乳動物種のリンパ球として誘導される。例えば、ネズミハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製

50

物で免疫したマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞系と融合させることにより作製することができる。好ましい不死化細胞系は、ヒポキサンチン、アミノプレンリンおよびチミジン（「HAT培地」）を含む培養液に感受性のマウスミエローマ細胞系である。あらゆる多くのミエローマ細胞系例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653またはSp2/0-Ag14ミエローマ系を標準的技術にしたがって融合パートナーに用いてよい。これらミエローマ系はAmerican Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Mdから入手できる。典型的には、HAT感受性マウスミエローマ細胞をポリエチレングリコール（「PEG」）を用いてマウス脾臓細胞と融合する。次に、融合によって得られるハイブリドーマ細胞を、非融合ミエローマ細胞および非生産的に融合したミエローマ細胞を殺すHAT培地を用いて選択する（非融合脾臓細胞は形質転換されていないので数日後に死滅する）。本発明モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば標準的ELISAアッセイを用い、ハイブリドーマ培養上清のB7-4分子と結合する抗体をスクリーニングすることにより検出される。

10

【0113】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを製造する別の方法として、組換え組み合わせ免疫グロブリンライブラリー（例えば、抗体ファージ表現ライブラリー）をB7-4でスクリーニングし、B7-4ポリペプチドと結合する免疫グロブリンライブラリーメンバーを単離することによりモノクローナル抗B7-4抗体を同定し、単離することができる。ファージ表現ライブラリーを作製し、スクリーニングするためのキットは市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System、カタログ番号27-9400-01、およびStratagene SurfZAP™ Phage Display Kit、カタログ番号240612）。さらに、抗体表現ライブラリーの作製およびスクリーニングに特に適した方法および試薬の例は、例えば、Ladner et al. 米国特許第 5,223,409号；Kang et al. 国際公開公報WO 92/18619；Dower et al. 国際公開公報WO 91/17271；Winter et al. 国際公開公報WO 92/20791；Markland et al. 国際公開公報WO 92/15679；Breitling et al. 国際公開公報WO 93/01288；McCafferty et al. 国際公開公報WO 92/01047；Garrard et al. 国際公開公報WO 92/09690；Ladner et al. 国際公開公報WO 90/02809；Fuchs et al. (1991) Bio/Technology 9:1370-1372；Hay et al. (1992) Hum Antibod Hybridomas 3:81-85；Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281；Griffiths et al. (1993) EMBO J 12:725-734；Hawkins et al. (1992) J Mol Biol 226:889-896；Clarkson et al. (1991) Nature 352:624-628；Gram et al. (1992) PNAS 89:3576-3580；Garrard et al. (1991) Bio/Technology 9:1373-1377；Hoogenboom et al. (1991) Nuc Acid Res 19:4133-4137；Barbas et al. (1991) PNAS 88:7978-7982；およびMcCafferty et al. Nature (1990) 348:552-554に記載されている。

20

30

【0114】

さらに、標準的組換えDNA技術を用いて製造することができる組換え抗B7-4抗体、例えばヒトおよび非ヒト部分の両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は本発明の範囲内である。そのようなキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該分野で知られた組換えDNA技術、例えば下記に記載の方法を用いて製造することができる。Robinson et al. 国際公開公報PCT/US86/02269；Akira, et al. 欧州特許出願第184,187号；Taniguchi, M., 欧州特許出願第171,496号；Morrison et al. 欧州特許出願第173,494号；Neuberger et al. PCT特許出願WO 86/01533；Cabilly et al. 米国特許第4,816,567号；Cabilly et al. 欧州特許出願第125,023号；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；Liu et al. (1987) PNAS 84:3439-3443；Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526；Sun et al. (1987) PNAS 84:214-218；Nishimura et al. (1987) Canc. Res. 47:999-1005；Wood et al. (1985) Nature 314:446-449；およびShaw et al. (1988) J. Natl Cancer Inst. 80:1553-1559；Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207；Oi et al. (1986) BioTechniques 4:214；Winter 米国特許第5,225,539号；Jones et al. (1986) Nature 321:552-525；Verhoeyan et al. (1988) Science 239: 1534；およびBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060。

40

【0115】

さらに、ヒト化抗体は、例えば米国特許第5,565,332号に記載の標準的プロトコールに従

50

って製造することができる。別の態様において、抗体鎖または特異的結合対メンバーは、特異的結合対メンバーのポリペプチド鎖と複製可能な遺伝子表現パッケージの成分の融合物をコードする核酸分子を含むベクターと単結合対メンバーの第二ポリペプチド鎖をコードする核酸分子を含むベクターを、例えば米国特許第5,565,332号、第5,871,907号、または第5,733,743号に記載の当該分野で知られた技術を用いて組換えることにより製造することができる。

【0116】

抗B7-4抗体(例えば、モノクローナル抗体)を用い、標準的技術、例えばアフィニティクロマトグラフィーまたは免疫沈降によりB7-4ポリペプチドを単離することができる。抗B7-4抗体は、細胞からの天然のB7-4ポリペプチドの、また宿主細胞中に発現した組換え的に製造されたB7-4ポリペプチドの精製を促進することができる。さらに、抗B7-4抗体を用いてB7-4タンパク質(例えば、細胞溶解物または細胞上清中)を検出することができる。該抗体を検出可能な物質とカップリング(すなわち、物理的に連結)することにより検出を促すことができる。したがって、ある態様において、本発明の抗B7-4抗体を標識可能な物質で標識する。検出可能な物質の例には、種々の酵素、補欠分子団(prosthetic group)、蛍光物質、ルミネッセント物質、および放射性物質が含まれる。適切な酵素の例には、ホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが含まれる。適切な補欠分子団複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが含まれ、適切な蛍光物質の例にはアンペリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリドまたはフィコエリスリンが含まれ、ルミネッセント物質の例には、ルミノールが含まれ、また適切な放射性物質の例には ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H が含まれる。

【0117】

本発明のさらに別の局面は、

(a)動物を免疫原性B7-4タンパク質またはB7-4ポリペプチドに独特なその免疫原性部分で免疫し、

(b)B7-4タンパク質と特異的に結合する動物抗体を単離することを含む工程により得ることができる抗B7-4抗体に関する。

【0118】

IV. 組換え発現ベクターおよび宿主細胞

本発明の別の局面は、B7-4ファミリータンパク質(またはその部分)をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターに関する。本明細書で用いている用語「ベクター」は、連結される別の核酸を輸送することができる核酸分子を表す。ベクターの1タイプが「プラスミド」であり、さらなるDNA断片を連結することができる環状二本鎖DNAループを表す。別のタイプのベクターは、さらなるDNA断片をウイルスゲノムに連結することができるウイルスベクターである。ある種のベクターは導入される宿主細胞中で自己複製することができる(例えば、細菌性複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞に導入されたら宿主細胞のゲノムに統合され、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある種のベクターは機能性に連結している遺伝子の発現を支持することができる。そのようなベクターを本明細書では「発現ベクター」という。一般的には、組換えDNA技術において有用な発現ベクターはプラスミドの形であることが多い。プラスミドは最も普通に用いられるベクターの形であるから、本明細書では「プラスミド」と「ベクター」は互換的に用いることができる。しかしながら、本発明は、同等の機能を示すそのような他の形の発現ベクター、例えばウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス)を含むものとする。

【0119】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞中で本発明の核酸を発現させるのに最適な形の該核酸を含んでおり、このことは組換え発現ベクターが、発現すべき核酸配列と機能性に

連結した、発現に用いる宿主細胞に基づいて選んだ1またはそれ以上の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて「機能性に連結した」とは目的とするヌクレオチド配列が制御配列と該ヌクレオチド配列が発現できるように連結していることを意味するものとする(例えば、*in vitro* 転写/翻訳系中、または該ベクターを宿主細胞に導入する場合は 宿主細胞中)。用語「制御配列」は、プロモーター、エンハンサー、他の発現制御エレメント(例えば、ポリアデニル化シグナル)を含むものとする。そのような制御配列には、例えばGoeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。制御配列は、多くのタイプの宿主細胞中でヌクレオチドの構造的な発現を指示するものと、ある種の宿主細胞中でのみヌクレオチド配列の発現を指示するもの(例えば、組織特異的制御配列)が含まれる。当業者は、発現ベクターの設計が形質転換する宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベルなどの因子に依存し得ることを認識するであろう。本発明の発現ベクターを宿主細胞に導入し、本明細書に記載の核酸によりコードされた融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを産生することができる。

10

【0120】

本発明の組換え発現ベクターは、原核細胞または真核細胞中でB7-4タンパク質を発現するように設計することができる。例えば、B7-4タンパク質は、細菌細胞、例えば*E. coli*、昆虫細胞(バクテリオファージ発現ベクターを用いる)、酵母細胞または哺乳動物細胞中で発現させることができる。適切な宿主細胞についてはさらにGoeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)に記載されている。あるいはまた、組換え発現ベクターは、例えばT7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを用いて*in vitro*で転写し、翻訳することができる。

20

【0121】

原核生物におけるタンパク質の発現は、融合または非融合タンパク質の発現を指示する構造的または誘導性プロモーターを含むベクターを有する*E. coli*中で行われることが最も多い。融合ベクターは、その中にコードされるタンパク質、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に多くのアミノ酸を加える。典型的にはそのような融合ベクターは以下の3つの目的に役立つ: 1)組換えタンパク質の発現を増大させ、2)組換えタンパク質の可溶性を増大させ、そして3)アフィニティ精製でリガンドとして作用することにより組換えタンパク質の精製を助ける。しばしば、融合発現ベクターでは、タンパク質分解的開裂部位を融合部分と組換えタンパク質の連結部に導入することにより融合タンパク質の精製後に融合部分から組換えタンパク質を分離することができる。そのような酵素およびその同起源の認識配列は、第Xa因子、トロンピン、およびエンテロキナーゼを含む。典型的な融合発現ベクターには、それぞれ、グルタチオン S-トランスフェラーゼ(GST)、マルトース結合タンパク質、またはプロテインAを標的組換えタンパク質と融合するpGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B.およびJohnson, K.S. (1988) Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)、およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ)が含まれる。

30

【0122】

精製融合タンパク質は、B7-4活性アッセイ(例えば、以下に記載の直接アッセイまたは競合アッセイ)、または例えばB7-4タンパク質に特異的な抗体を産生するのに利用できる。

40

【0123】

適切な誘導性(inducible)非融合*E. coli*発現ベクターには、pTrc (Amann et al., (1988) Gene 69:301-315)およびpET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 60-89)が含まれる。pTrcベクターからの標的遺伝子発現はハイブリッド-lac融合プロモーターからの宿主のRNAポリメラーゼ転写に依存する。pET 11dベクターからの標的遺伝子発現は、同時発現したウイルスRNAポリメラーゼ(T7 *gn1*)を介したT7 *gn10*-lac融合プロモーターの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下でT7 *gn1*遺伝子を保持する内在プロファージから宿主株BL21(DE3)またはHMS174(DE3)により提供される。

50

【0124】

E. coliにおける組換えタンパク質発現を最小化する1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク分解的に開裂する能力を欠く宿主細菌中で該タンパク質を発現させることである (Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128)。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンがE. coli中で優先的に利用されるものであるように発現ベクター中に挿入する該核酸の核酸配列を変化させることである (Wada et al., (1992) Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明のそのような核酸配列の変更は標準的DNA合成技術により実施することができる。

【0125】

別の態様において、B7-4発現ベクターは酵母発現ベクターである。酵母S.cerevisiae中で発現させるためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldari, et al., (1987) EMBO J. 6:229-234)、pMFa (KurjanおよびHerskowitz, (1982)細胞30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., (1987) Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)、およびpicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA)が含まれる。

【0126】

あるいはまた、B7-4タンパク質はバクテリオファージ発現ベクターを用いて昆虫細胞中で発現させることができる。培養昆虫細胞(例えば、Sf 9細胞)中でタンパク質を発現させるのに利用できるバクテリオファージベクターにはpAcシリーズ (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(Lucklow およびSummers (1989) Virology 170:31-39)が含まれる。

【0127】

さらに別の態様において、本発明の核酸は哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現する。哺乳動物発現ベクターの例には、pCDM8 (Seed, B. (1987) Nature 329:840) およびpMT2PC (Kaufman et al. (1987) EMBOJ. 6:187-195)が含まれる。哺乳動物細胞を用いる場合、発現ベクターの制御機能はウイルス制御エレメントにより提供されることが多い。例えば、普通に用いられるプロモーターにはポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびSimian Virus 40が含まれる。原核細胞および真核細胞両方の適切な発現系については、Sambrook, J., Fritsh, E. F., およびManiatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989の16および17章参照。

【0128】

別の態様において、組換え哺乳動物発現ベクターは特定細胞種に優先的に核酸の発現を指示することができる(例えば、組織特異的制御エレメントを用いて該核酸を発現させる)。組織特異的制御エレメントは当該分野で知られている。適切な組織特異的プロモーターの例には、限定されるものではないが、アルブミンプロモーター(肝臓特異的; Pinkert et al. (1987) Genes Dev. 1:268-277)、リンフォイド特異的プロモーター(CalameおよびEaton (1988) Adv. Immunol. 43:235-275)、特にT細胞レセプターのプロモーター(Winoto およびBaltimore (1989) EMBO J. 8:729-733)および免疫グロブリン(Banerji et al. (1983) Cell 33:729-740; QueenおよびBaltimore (1983) Cell 33:741-748)、ニューロン特異的プロモーター(例えば、ニューロフィラメントプロモーター; ByrneおよびRuddle (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5473-5477)、膵臓特異的プロモーター(Edlund et al. (1985) Science 230:912-916)、および乳腺特異的プロモーター(例えば、乳清プロモーター; 米国特許第4,873,316号および欧州特許出願公開公報第264,166号)。発生的に制御されるプロモーターには、例えば、ネズミ hoxプロモーター(KesselおよびGruss (1990) Science 249:374-379)および α -フェットタンパク質プロモーター(CampesおよびTilghman (1989) Genes Dev. 3:537-546)が含まれる。

【0129】

あるいはまた、B7-4ポリペプチドはバクテリオファージ発現ベクターを用いて昆虫細胞中で発現させることができる。培養昆虫細胞(例えば、Sf 9細胞)中でタンパク質を発現させる

10

20

30

40

50

のに利用できるバクテリオファグベクターには、pAcシリーズ(Smith et al., (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165)およびpVLシリーズ(Lucklow, V.A., および Summers, M.D., (1989) Virology 170:31-39)が含まれる。

【0130】

さらに別の態様において、本発明の核酸分子は哺乳動物発現ベクターを用いて哺乳動物細胞中で発現させることができる。哺乳動物発現ベクターの例には、pMex-NeoI、pCDM8 (Seed, B., (1987) Nature 329:840)、およびpMT2PC (Kaufman et al. (1987), EMBOJ. 6:187-195)が含まれる。哺乳動物細胞を用いる場合は、発現ベクターの制御機能は、ウイルス制御エレメントにより提供されることが多い。例えば、普通に用いられるプロモーターはポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス (Simian Virus) 40である。

10

【0131】

さらに、哺乳動物細胞に用いる誘導性制御系、例えば遺伝子発現が重金属イオンにより制御されている系が当該分野で知られている (例えば、Mayo et al. (1982) 細胞29:99-108; Brinster et al. (1982) Nature 296:39-42; Searle et al. (1985) Mol. Cell Biol. 5:1480-1489参照)、熱ショック (例えば、Nouer et al. (1991) in Heat Shock Response, ed. Nouer, L., CRC, Boca Raton, FL, pp167-220参照)、ホルモン(例えば、Lee et al. (1981) Nature 294:228-232; Hynes et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2038-2042; Klock et al. (1987) Nature 329:734-736; Israel & Kaufman (1989) Nucl. Acids Res. 17:2589-2604; およびPCT公開公報WO 93/23431参照)、FK506関連分子(例えば、PCT公開公報WO 94/18317参照)、またはテトラサイクリン(Gossen, M. および Bujard, H. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5547-5551; Gossen, M. et al. (1995) Science 268:1766-1769; PCT公開公報WO 94/29442; およびPCT公開公報WO 96/01313参照)。したがって、別の態様において、本発明はB7-4 DNAが誘導性真核性プロモーターが機能性に連結し、真核細胞中でB7-4タンパク質を誘導性に発現させることができるa 組換え発現ベクターを提供する。

20

【0132】

本発明は、さらに発現ベクター中にアンチセンス方向にクローンされたDNA分子を含む組換え発現ベクターを提供する。すなわち、DNA分子は、B7-4 mRNAとアンチセンスであるRNA分子の発現 (DNA分子の転写により) させるように制御配列と機能性に連結している。種々の細胞種、例えば、ウイルスプロモーターおよび/またはエンハンサーの連続的発現を指示するアンチセンス方向にクローンされた核酸と機能性に連結している制御配列を選択することができるか、またはアンチセンスRNAの構成的、組織特異的もしくは細胞種特異的発現を指示する制御配列を選択することができる。アンチセンス発現ベクターは、高効率な制御配列の制御下でアンチセンス核酸が産生される組換えプラスミド、ファージミッドまたは弱毒化ウイルスの形であり得、その活性を該ベクターを導入する細胞種により測定することができる。アンチセンス遺伝子を用いる遺伝子発現の制御については、Weintraub, H. et al., Antisense RNA as a molecular tool for genetic analysis, Reviews - Trends in Genetics, Vol. 1(1) 1986参照。

30

【0133】

本発明の別の局面は、本発明の組換え発現ベクターを導入することができる宿主細胞に関する。用語「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」は本明細書では互換的に用いる。そのような用語は特定の対象細胞だけでなく、そのような細胞の子孫もしくは潜在的子孫も示すと理解される。そのような修飾は突然変異または環境的影響により次世代に生じることがあるので、そのような子孫は実際に親細胞と同一でないかも知れないが、まだ本明細書で用いる用語の範囲内に含まれる。

40

【0134】

宿主細胞はあらゆる原核細胞もしくは真核細胞であり得る。例えば、B7-4タンパク質は、細菌細胞、例えばE. coli、昆虫細胞、酵母、または哺乳動物細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)またはCOS細胞)に発現させることができる。他の適切な宿主細胞

50

胞は当業者に知られている。

【0135】

ベクターDNAは通常の形質転換またはトランスフェクション技術により原核細胞または真核細胞に導入することができる。本明細書で用いている用語「形質転換」および「トランスフェクション」は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン介在性トランスフェクション、リポフェクション、またはエレクトロポレーションを含む宿主細胞内に外来核酸（例えば、DNA）を導入するための種々の当該分野で知られた技術を表すものとする。宿主細胞の適切な形質転換法またはトランスフェクション法は、Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989)、および他の実験マニュアルに記載されている。

10

【0136】

哺乳動物細胞を安定にトランスフェクションするには、用いる発現ベクターおよびトランスフェクション技術に応じて、細胞の小分画のみについて外来DNAをそのゲノムに統合してよいことが知られている。これら統合物を確認し、選択するには、一般的には、選択可能なマーカー（例えば抗生物質耐性）をコードする遺伝子を目的遺伝子と共に宿主細胞に導入する。好ましい選択可能なマーカーには薬剤耐性をもたらすもの、例えばG418、ヒグロマイシン、およびメトトレキサートが含まれる。選択可能なマーカーをコードする核酸はB7-4タンパク質をコードするベクターと同じベクターを用いて宿主細胞に導入するか、または別のベクターを用いて導入することができる。導入された核酸で安定にトランスフェクションされた細胞は薬剤選択により確認することができる（例えば、選択可能なマーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生存し、他の細胞は死ぬ）。

20

【0137】

培養中の本発明の宿主細胞、例えば原核または真核宿主細胞を用いてB7-4タンパク質を産生（すなわち、発現）することができる。したがって、さらに本発明は本発明の宿主細胞を用いるB7-4タンパク質の産生方法を提供する。ある態様において、本方法は、本発明の宿主細胞を適正な培地中で培養しB7-4タンパク質を産生することを含む。別の態様において、さらに本方法は培地または宿主細胞からB7-4タンパク質を単離することを含む。

【0138】

本発明のある酒の宿主細胞を用いて非ヒトトランスジェニック動物を作製することもできる。例えば、ある態様において、本発明の宿主細胞はB7-4コーディング配列が導入されている受精卵母細胞または胚幹細胞である。次に、そのような宿主細胞を用いて外来B7-4配列がそのゲノムに導入された非ヒトトランスジェニック動物、または内在B7-4配列が変化したホモローガスな組換え動物を作製することができる。そのような動物はB7-4ポリペプチドの機能および/または活性を研究し、B7-4活性のモジュレーターを同定および/または評価するのに有用である。本明細書で用いている「トランスジェニック動物」は、1またはそれ以上の動物細胞が導入遺伝子を含む非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはげっ歯類、例えばラットまたはマウスである。他のトランスジェニック動物の例には、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ヤギ、ニワトリ、両生類などが含まれる。導入遺伝子は、トランスジェニック動物が発生する細胞のゲノムに統合され、成熟動物のゲノムにとどまり、トランスジェニック動物の1またはそれ以上の細胞種または組織中でコードされた遺伝子産物の発現を指示する外来DNAである。本明細書で用いている「ホモローガスな組換え動物」は、動物の発生前に動物細胞、例えば動物の胚細胞中に導入された外来DNA分子と内在遺伝子間のホモローガスな組換えにより内在B7-4遺伝子が改変した非ヒト動物、好ましくは哺乳動物、より好ましくはマウスである。

30

40

【0139】

本発明のトランスジェニック動物は、例えばマイクロインジェクション、レトロウイルス感染により受精卵母細胞の雄性前核内にB7-4をコードする核酸を導入し、該卵母細胞を偽妊娠雌フォスター動物中で発生させることにより作製することができる。

【0140】

50

配列番号1または3のB7-4cDNA配列を非ヒト動物のゲノムに導入遺伝子として導入することができる。あるいはまた、ヒトB7-4遺伝子の非ヒト相同体、例えばマウスまたはラットB7-4遺伝子を導入遺伝子として用いることができる。あるいはまた、B7-4遺伝子相同体、例えば別のB7-4ファミリーメンバーを配列番号1または3のB7-4ファミリーのcDNA配列とのハイブリダイゼーションに基づいて単離し（さらに先の小節Iに記載）、導入遺伝子として用いることができる。導入遺伝子の発現効率を増すために導入遺伝子はイントロン配列およびポリアデニル化シグナルを含むこともできる。組織特異的制御配列をB7-4導入遺伝子遺伝子と機能性に連結し、特定細胞にB7-4タンパク質の発現を指示することができる。胚操作およびマイクロインジェクションにより特にマウスのような動物でトランスジェニック動物を作製する方法は当該分野で常套化してきており、例えば、Leder et al., 米国特許第4,736,866号および第4,870,009号、Wagner et al., 米国特許第4,873,191号、およびHogan, B., *Manipulating the Mouse Embryo* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)に記載されている。他のトランスジェニック動物を作製するのに同じ方法を用いる。トランスジェニック始祖（founder）動物をそのゲノムのB7-4導入遺伝子の存在、および/または該動物の組織または細胞中のB7-4 mRNAの発現に基づいて同定することができる。次に、トランスジェニック始祖動物を用いて該導入遺伝子を保有する動物をさらに繁殖させることができる。さらにB7-4タンパク質をコードする導入遺伝子を保有するトランスジェニック動物をさらに他の導入遺伝子を保有する他のトランスジェニック動物と交配することができる。

ホモローガスな組換え動物を作製するには、欠失、付加、または置換を導入することによりB7-4遺伝子を改変、例えば機能的に破壊したB7-4遺伝子の少なくとも部分を含むベクターを作製する。B7-4遺伝子はヒト遺伝子（例えば、配列番号1または3）であり得るが、より好ましくはヒトB7-4遺伝子の非ヒト相同体である（例えば配列番号1または3のヌクレオチド配列とのストリンジェントハイブリダイゼーションにより単離されたcDNA）。例えば、マウスB7-4遺伝子を用いてマウスゲノムの内在B7-4遺伝子を改変するのに適したホモローガスな組換えベクターを構築することができる。好ましい態様において、ホモローガスな組換えにおいて、内在B7-4遺伝子が機能的に破壊されるように該ベクターを設計する（すなわち、機能的タンパク質をコードしない。「ノックアウト」ベクターともいう）。あるいはまた、ホモローガスな組換えにおいて、内在B7-4遺伝子を突然変異させるかまたは改変するが、まだ機能的タンパク質をコードするように該ベクターを設計することができる（例えば、上流制御領域を改変することにより内在B7-4タンパク質の発現を改変することができる）。ホモローガスな組換えベクターにおいて、B7-4遺伝子の改変部分はB7-4遺伝子のさらなる核酸配列により5'および3'末端が側面を接し、胚幹細胞中の内在B7-4遺伝子とベクターにより保持された外来B7-4遺伝子の間に生じるホモローガスな組換えが生じる。さらなるフランキングB7-4核酸配列は、内在遺伝子とホモローガスな組換えがうまくできる十分な長さがある。典型的にはフランキングDNAの数キロ塩基（5'および3'両末端）が該ベクター中に含まれる（ホモローガスな組換えベクターの転写については、例えば、Thomas, K.R.およびCapecchi, M. R. (1987) *Cell* 51:503参照）。ベクターを胚幹細胞に導入し（例えばエレクトロポレーションにより）、導入されたB7-4遺伝子が内在B7-4遺伝子とホモローガスに組換えられた細胞を選択する（例えば、Li, E. et al. (1992) *Cell* 69:915参照）。次に、選択した細胞を動物（例えばマウス）の胚盤胞に注射し凝集キメラを形成する（例えば、Bradley, A., *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells*中: A Practical Approach, E.J. Robertson, ed. (IRL, Oxford, 1987) pp. 113-152参照）。次に、キメラ胚を適切な適切な偽妊娠雌フォスター動物に移植し、胚を妊娠末期まで成長させることができる。胚細胞中のホモローガスに組換えられたDNAを保有する子孫を用いて、動物の全細胞が導入遺伝子の生殖細胞伝達によりホモローガスに組換えられたDNAを含む動物を繁殖させることができる。ホモローガスな組換えベクターおよびホモローガスな組換え動物を構築する方法はさらにBradley, A. (1991) *Current Opinion in Biotechnology* 2:823-829、およびPCT国際公開公報: WO 90/11354 (Le Mouellec et al.) ; WO 91/01140 (Smithies et al.) ; WO 92/0968 (Zijlstra et al.) ; およびWO 93/04169 (Berns

10

20

30

40

50

et al)に記載されている。

【0141】

前記に加え、当業者は、ホモローガスな組換えのための当該分野で知られた他のアプローチを本発明に応用できることを認識するであろう。酵素支援部位特異的統合系は当該分野で知られており、第二標的DNA分子中の予め決定された位置にDNA分子を統合するのに応用することができる。そのような酵素支援統合系の例には、Creリコンビナーゼ (recombinase) -lox標的系(例えば、Baubonis, W.およびSauer, B. (1993) Nucl. Acids Res. 21:2025-2029;およびFukushige, S.およびSauer, B. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7905-7909に記載)、およびリコンビナーゼ-FRT標的系(例えば、Dang, D.T.およびPerrimon, N. (1992) Dev.Genet. 13:367-375;およびFiering, S. et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8469-8473に記載)が含まれる。例えばPCT公開公報W0 94/29442およびPCT公開公報W0 96/01313に記載の、テトラサイクリンに制御される誘導可能なホモローガスな組換え系も用いることができる。

10

【0142】

例えば、別の態様において、導入遺伝子の発現を制御する選択した系を含むトランスジェニック非ヒト動物を作製することができる。そのような系の1例にバクテリオファージP1のcre/loxPリコンビナーゼ系がある。cre/loxPリコンビナーゼ系の記載については、例えば、Lakso et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:6232-6236参照。リコンビナーゼ系の別の例にはSaccharomyces cerevisiaeのFLPリコンビナーゼ系(O'Gorman et al. (1991) Science 251:1351-1355)がある。cre/loxPリコンビナーゼ系を用いて導入遺伝子の発現を制御する場合は、Creリコンビナーゼと選択したタンパク質の両方をコードする導入遺伝子を含む動物が必要である。そのような動物は、例えば、選択したタンパク質をコードする導入遺伝子を含むものと、リコンビナーゼをコードする導入遺伝子を含むものの2つのトランスジェニック動物を交配させて「二重」トランスジェニック動物を構築することにより得ることができる。

20

【0143】

本明細書に記載の非ヒトトランスジェニック動物のクローンはWilmut, I. et al. (1997) Nature 385:810-813、およびPCT国際公開公報W0 97/07668およびW0 97/07669に記載の方法に従って作製することもできる。簡単には、トランスジェニック動物由来の細胞、例えば体細胞を単離し、増殖周期を出てG0期に入るように誘導することができる。次に、静止細胞を、例えば電気パルスを用いて静止細胞を単離する同じ種の動物から得た除核卵母細胞と融合させることができる。次に、再構築卵母細胞を培養して桑実胚または胚盤胞に成長させ、次いで偽妊娠雌フォスター動物に移す。この雌フォスター動物から生まれた子は細胞例えば体細胞を単離する動物のクローンであろう。

30

【0144】

V. 医薬組成物

本発明のB7-4モジュレーター（「活性核酸分子」）（例えば、B7-4核酸分子、タンパク質、抗体、またはB7-4活性のモジュレーターとして同定された核酸分子を含むB7-4阻害または刺激物質）を、投与するのに適切な医薬組成物に組み込むことができる。典型的には、そのような組成物は核酸分子、タンパク質、または抗体および医薬的に許容される担体を含む。本明細書で用いている用語「医薬的に許容される担体」は、医薬の投与に適合するあらゆるすべての溶媒、分散媒質、コーティング剤、抗菌剤および抗真菌剤、等張物質および吸収遅延剤などを含むものとする。そのような媒質および物質の医薬的に活性な物質への使用は当該分野でよく知られている。あらゆる通常の媒質および物質が活性物質と非適合性である範囲を除き、該組成物におけるそれらの使用が予期される。補助的活性化化合物も該組成物に組み込むことができる。

40

【0145】

本発明の医薬組成物は、意図した投与経路に適合するように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば静脈内、皮内、皮下、経口（例えば吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が含まれる。非経口、皮内、または皮下適用に用いる溶液剤やサスペン

50

ジョン剤は、以下の成分を含むことができる：無菌希釈剤、例えば注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒；抗菌剤、例えばベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えばアスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えばエチレンジアミン四酢酸；緩衝剤、例えばアセテートまたはホスフェート、および張性調整物質、例えば塩化ナトリウムまたはデキストロース。pHは酸または塩基、例えば塩酸または水酸化ナトリウムで調整することができる。非経口用製剤は、ガラスもしくはプラスチック製のアンプル、ディスポーザブルシリンジ、または多用量バイアルに封入することができる。

【0146】

注射用に適した医薬組成物には、無菌水性溶液（水溶性）または分散剤および無菌注射用溶液剤または分散剤を即時調製するための無菌粉末剤が含まれる。静脈投与に適した担体には、生理食塩水、静菌水、Cremophor EL(登録商標) (BASF, Parsippany, NJ)、またはリン酸緩衝生理食塩水(PBS)が含まれる。すべての場合において、該組成物は無菌で、注射針通過性(syringability)がよい程度の液体でなければならない。該組成物は製造および貯蔵条件下で安定であり、微生物、例えば細菌や真菌の汚染作用を防止しなければならない。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコールなど）、およびその適切な混合物を含む溶媒または分散媒質であり得る。例えば、レシチンのようなコーティングを用い、分散剤の場合は所望の粒子サイズを維持し、または界面活性剤を用いることにより適切な流動性を維持することができる。微生物の作用の防止は種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成することができる。多くの例において、組成物に等張剤、例えば糖、ポリアルコール、例えばマンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましいであろう。注射用組成物の持続的吸収は、組成物中に吸収を遅らせる物質、例えばアルミニウムモノステアレートおよびゼラチンを含むことにより達成することができる。

【0147】

無菌注射用溶液剤は、必要な上記成分の一つまたは混合物を含む適切な溶媒中に必要な量の活性化化合物(例えば、B7-4タンパク質または抗B7-4抗体)を混合し、次いでろ過滅菌することにより製造することができる。一般的に、分散剤は、基本分散媒質と上記の必要な他の成分を含む無菌ビークルと活性化化合物を混合することにより製造される。無菌注射用溶液剤を製造するための無菌粉末剤の場合、好ましい製造方法は真空乾燥および凍結乾燥により、活性成分と予め無菌ろ過した溶液からのあらゆるさらに所望の成分の粉末を得ることである。

【0148】

一般的には経口用組成物は、不活性希釈剤または食用担体を含む。それらはゼラチンカプセルに封入するか、圧縮して錠剤とすることができる。治療用経口投与のためには、活性化化合物を賦形剤と混合し、錠剤、トローチ剤またはカプセル剤の形で用いることができる。液体担体中の化合物を経口的に適用し、うがいして(swish)吐き出すかまたは飲み込む、うがい薬に用いる経口用組成物は液体担体を用いて製造することもできる。医薬的に適合性の結合剤、および/またはアジュバント物質を組成物の部分として含むことができる。錠剤、丸剤、カプセル剤、トローチ剤などはあらゆる下記成分もしくは同様の性質を有する化合物を含むことができる：結合剤、例えば微晶質セルロース、ガムトラガカントまたはゼラチン；賦形剤、例えばデンプンまたは乳頭、崩壊剤、例えばアルギニン酸、Primogel、デンプン；グリダント(glidant)、例えばコロイド状二酸化ケイ素；甘味料、例えばショ糖またはサッカリン；または香味料、例えばペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジ調味料。

【0149】

吸入で投与するには、化合物を、適切なプロペラント、例えば二酸化炭素のようなガスを含む加圧容器もしくはディスペンサー、またはネブライザーからエアロゾルスプレーの形で供給する。

10

20

30

40

50

【0150】

全身投与は、経粘膜法や経皮法によることもできる。経粘膜または経皮投与では、浸透させるバリアーに適した浸透剤を製剤に用いる。そのような浸透剤は一般に当該分野で知られており、例えば経粘膜投与では海面活性剤、胆汁酸塩、フシディック酸(fusidic acid)誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻スプレーまたは坐剤を用いて達成することができる。経皮投与では活性化化合物を当該分野で一般的に知られた軟膏、塗剤、ゲルまたはクリームに製剤される。

【0151】

該化合物は直腸供給では坐剤（例えば通常の坐剤用基剤、例えばココアバターおよび他のグリセリド）または滞留浣腸剤の形で製造することもできる。

10

【0152】

ある態様において、移植およびマイクロカプセル供給システムを含む放出制御製剤のように、活性化化合物を、該化合物が身体から急速に排除されるのを保護する担体を用いて調製する。例えば、エチレンビニルアセテート、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルソエステル、およびポリ乳酸のような生体分解性、生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような製剤の製造方法は当業者に明らかであろう。該物質はAlza CorporationおよびNova Pharmaceuticals, Inc.から市販品を得ることもできる。リポソームサスペンション（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体を用いて感染細胞に標的化したリポソームを含む）を医薬的に許容される担体として用いることもできる。これは、米国特許第4,522,811号に記載しているような当業者に知られた方法にしたがって製造することができる。

20

【0153】

投与および用量の均一性が容易な単位投与剤形の経口または非経口用組成物に製剤化するのが特に有利である。本明細書で用いている単位投与剤形とは、各単位が所望の治療効果を生ずるように計算された予め決定された量の活性化化合物を必要な医薬担体と一緒に含む、治療すべき対象のための単位用量として適した物理的に分離した単位をいう。本発明の単位投与剤形の仕様は、活性化化合物の独特の特性と達成すべき特定の治療効果、ならびに個体を治療するためのそのような活性化化合物を合成するための当該分野に固有の制限に直接依存し、指示される。

【0154】

30

そのような化合物の毒性および治療効果は、細胞培養または実験動物を用いる標準的医薬的方法（例えば、LD50（ポピュレーションの50%に対する致死用量）およびED50（ポピュレーションの50%に治療的に有効な用量）を決定するための）により決定することができる。毒性作用と治療効果の用量比が治療指数であり、LD50/ED50比で表すことができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を用いてよいが、非感染細胞に対する潜在的損傷を最小限にとどめ、副作用を減らすために罹患組織部位に該化合物を標的化する供給システムを設計するよう留意すべきである。

【0155】

細胞培養アッセイおよび動物試験から得られたデータを用いてヒトに用いるある範囲の用量を製剤化することができる。そのような化合物の用量は、好ましくは毒性がほとんどまたはまったくないED50を含む循環濃度の範囲内にある。該用量は用いる用量形と用いる投与経路に応じてこの範囲内で変更してよい。本発明の本発明に用いるあらゆる化合物について、治療的に有効な用量は、細胞培養アッセイで最初に推定することができる。動物モデルで用量を処方し、細胞培養において決定したIC50を含む循環血漿濃度（すなわち、症状の半最大阻止を達成する被検化合物の濃度）を達成することができよう。そのような情報を用いてヒトに有用な用量をより性格に決定することができる。血漿中レベルは例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定することができよう。

40

【0156】

本発明の核酸分子をベクター中に挿入し、遺伝子治療ベクターとして用いることができる。遺伝子治療ベクターは、例えば静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号参照）

50

または定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057）により対象に供給することができる。遺伝子治療ベクターの治療的製剤には許容される希釈剤中の遺伝子治療ベクターを含むか、または遺伝子供給ベクターが固定される徐放マトリックスを含むことができる。あるいはまた、完全な遺伝子供給ベクター、例えばレトロウイルスベクターを組換え細胞から無傷で作製することができる医薬製剤は該遺伝子供給システムをもたらず1またはそれ以上の細胞を含むことができる。

医薬組成物は、容器、パック、またはディスベンサー中に、投与指示書と一緒に入れることができる。

【0157】

VI. 本発明の使用および方法

本明細書に記載の核酸分子、タンパク質、タンパク質類似体、および抗体は1またはそれ以上の下記方法に用いることができる：

a) 治療、例えば免疫応答のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーション法、b) スクリーニングアッセイ；c) 予測医学（predictive medicine）（例えば、診断的アッセイ、予知的（予後）アッセイ、モニター臨床試験、および薬理遺伝学）。本発明の単離された核酸分子を用いて、例えばB7-4タンパク質を発現させ（遺伝子治療適用において宿主細胞中の組換え発現ベクターを介して）、B7-4 mRNAまたはB7-4遺伝子中の遺伝子変化を検出し（例えば生物試料中）、そしてさらに以下に記載のB7-4活性を調節することができる。B7-4タンパク質を用いてB7-4インヒビターの不十分もしくは過剰な産生を特徴とする障害を治療することができる。さらにB7-4タンパク質を用いて、天然のB7-4リガンドをスクリーニングし、B7-4活性を調節する薬剤または化合物をスクリーニングし、B7-4タンパク質の不十分もしくは過剰な産生、またはB7-4野生型タンパク質に比べて活性が低下しているかもしくは異常なB7-4タンパク質形の産生を特徴とする障害を治療することができる。さらに、本発明の抗B7-4抗体を用いて、B7-4タンパク質を検出および単離し、B7-4タンパク質のバイオアベイラビリティを調節し、B7-4活性を調節、例えば免疫応答を調節することができる。

【0158】

A. 治療（処置）方法：

本発明は、異常なB7-4発現または活性に関連する障害を有するかまたは障害の危険性がある（または感受性がある）対象の予防的および治療的方法を提供する。

【0159】

1. 予防的方法

ある局面において、本発明は、B7-4ポリペプチドまたはB7-4ポリペプチドの発現または少なくとも1つのB7-4活性を調節する物質を対象に投与することにより、対象の、異常なB7-4発現もしくは活性に関連する病気または病状を抑制する方法を提供する。異常なB7-4発現または活性が関与するかまたはそれによって引き起こされる病気の危険性がある対象は、例えば本明細書に記載のあらゆる診断または予知的アッセイまたはその組み合わせにより確認することができる。B7-4異常に特徴的な症状が現れる前に予防物質の投与を行い、病気または障害を予防するかまたはその進行を遅らせることができる。B7-4異常または状態の種類に応じて、例えばB7-4ポリペプチド、B7-4アゴニストまたはB7-4アンタゴニスト物質を用いて対象を治療することができる。適切な物質は本明細書に記載のスクリーニングアッセイに基づいて決定することができる。

【0160】

2. 治療方法

本発明の別の局面は、治療目的でB7-4の発現または活性を調節する方法に関する。したがって、典型的な態様において、本発明の調節方法は、細胞とB7-4ポリペプチドまたは細胞関連B7-4タンパク質活性の1またはそれ以上の活性を調節する物質と接触させることを含む。B7-4タンパク質活性を調節する物質は本明細書に記載の物質、例えば核酸またはタンパク質、B7-4タンパク質の天然の標的分子（B7-4リガンド）、B7-4抗体、B7-4アゴニストまたはアンタゴニスト、B7-4アゴニストまたはアンタゴニストのペプチドミメティックス

(mimetics) または他の小分子であってよい。

【0161】

ある態様において、該物質は1またはそれ以上のB7-4活性を刺激する。そのような刺激物質の例には、活性B7-4タンパク質および細胞内に導入されたB7-4ポリペプチドをコードする核酸分子が含まれる。別の態様において、該物質は1またはそれ以上のB7-4活性を阻害する。そのような阻害物質の例には、アンチセンスB7-4核酸分子、可溶性B7-4分子、抗B7-4抗体、およびB7-4インヒビターが含まれる。これら調節方法はin vitro (例えば、該細胞を該物質と培養することにより)またはin vivo (例えば、対象に該物質を投与することにより)で行うことができる。したがって、本発明はB7-4タンパク質の調節が利益をもたらす病気もしくは障害、例えば免疫応答のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが利益をもたらすか、またはB7-4タンパク質または核酸分子の異常な発現もしくは活性を特徴とする障害に罹患した個体を治療する方法を提供する。ある態様において、本方法はB7-4の発現もしくは活性を調節させる(例えば、アップレギュレーションまたはダウンレギュレーションする)物質(例えば、本明細書に記載のスクリーニングアッセイにより同定される物質)、またはその混合物を投与することを含む。別の態様において、本方法は、低下するかまたは異常なB7-4発現もしくは活性を代償する治療としてB7-4タンパク質または核酸分子を投与することを含む。

10

【0162】

B7-4活性の刺激は、B7-4が異常にダウンレギュレーションされ、および/またはB7-4活性の増加が有益な効果を持つと思われる状況において望ましい。同様に、B7-4活性の阻害は、B7-4が異常にアップレギュレーションされ、および/またはB7-4活性の低下が有益な効果を持つと思われる状況において望ましい。

20

【0163】

3. 免疫応答のダウンレギュレーション

B7-4ポリペプチドの機能を多くの方法でダウンレギュレーションすることにより免疫応答をダウンレギュレーションすることができる。ダウンレギュレーションはすでに増進した免疫応答を阻害またはブロックする形でも、免疫応答の誘導の抑制に関与してもよい。活性化T細胞の機能はT細胞の応答を抑制するか、またはT細胞の特異的トレランス(耐性)を誘導するか、またはその両方により阻害することができよう。T細胞応答の免疫抑制は、一般的に該細胞を抑制物質に連続的に暴露することが必要な活性で非抗原特異的なプロセスである。T細胞の非応答性またはアネルギーを誘導することを含むトレランスは、一般に抗原特異的である免疫抑制とは区別でき、耐性化物質への暴露を止めた後に持続する。トレランスは、耐性化物質の非存在下で起きる、特異抗原に対する再暴露に対するT細胞の応答がないことで証明することができる。

30

【0164】

例えば、一次活性化シグナルを受けたT細胞に共刺激シグナルを供給することができないB7-4ポリペプチド(B7-4ポリペプチドの可溶性単量体形を含む)またはB7-4融合T(例えばB7-4-Ig)、および抗B7-4抗体を用いてT細胞上のB7-4リガンドをブロックし、対象における免疫抑制を生じ、および/またはトレランスを誘導する特異的方法を提供することができる。B7-4ポリペプチドおよび融合タンパク質およびブロッキング抗体のそのようなブロッキングまたは阻害形は、先に本明細書に記載のin vitro共刺激アッセイに加えたときにT細胞増殖および/またはサイトカイン産生を阻害する能力により同定することができる。単量体形とは対照的に、完全細胞表面のB7-4ポリペプチドのようなB7-4ポリペプチド形は好ましくはT細胞に共刺激シグナルを伝達し、共刺激シグナルを受け取っていない活性化T細胞と比べてサイトカインの分泌増加をもたらす。

40

【0165】

ある態様において、別のBリンパ球抗原(例えば、B7-1またはB7-2)の活性を有する第二ペプチドと融合したB7-4第一ペプチドを含む融合タンパク質を用いてT細胞性免疫応答を修飾することができる。あるいはまた、Bリンパ球抗原(例えば、B7-2および/またはB7-1を有するB7-4ポリペプチド)の活性を有する2つの別のペプチド、またはブロッキング抗体

50

(例えば、抗B7-2および／または抗B7-1 モノクローナル抗体を含むB7-4ポリペプチドに対する抗体)の組み合わせを一組成物として混合するか、または別々に投与し(同時にまたは連続して)、対象のT細胞性免疫応答をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションすることができる。さらに、B7-4ポリペプチド活性と、B7-1および／またはB7-1活性を有する1またはそれ以上のペプチドの治療的活性量を、免疫応答に影響する他の免疫調節試薬といっしょに用いることができる。他の免疫調節試薬の例にはブロッキング抗体(例えば、CD28、CTLA4、および／またはICOSに対する、または他のT細胞マーカーまたはサイトカインに対する)、融合タンパク質(例えば、CTLA4Ig)、または免疫抑制剤(例えばラパマイシン、サイクロスポリンA、またはFK506)が含まれる。

【0166】

本発明の核酸分子から作製されるペプチドは、T細胞を破壊してT細胞機能をブロックする治療剤の構築にも有用かもしれない。例えば、記載したようにB7-4ポリペプチドの天然の分泌形を用いることができる。あるいはまた、そのような分泌形は標準的遺伝子操作技術により構築することができる。B7-4ポリペプチドの可溶形を毒素、例えばリシンと結合することにより、T細胞の活性化を抑制することができる物質を製造することができる。イムノトキシンの1つまたは混合物(例えば、B7-4-リシンとB7-2-リシンおよび／またはB7-1-リシン)を患者に注入することによりT細胞、特にCD28およびCTLA4の発現量が高い活性化T細胞を死滅させることができる。一価形のためのB7-4ポリペプチドの可溶形は上記のごとくB7-4ポリペプチド機能をブロッキングするのに有用かもしれない(いずれの場合も担体分子を用いてよい)。

【0167】

B7-4ポリペプチド機能の別の抑制方法は、アンチセンスまたは三重オリゴヌクレオチドを用いることによる。例えば、B7-4ポリペプチド翻訳開始部位の周辺領域と相補的なオリゴヌクレオチドを合成することができる。1またはそれ以上のアンチセンスオリゴヌクレオチドを典型的には200 μ g/mlで細胞培地に加えるか、または患者に投与することによりB7-4ポリペプチドの合成を妨げることができる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは細胞に取り込まれ、B7-4 mRNAとハイブリダイズして翻訳を抑制する。あるいはまた、三重構築物を形成してDNAの巻き戻しと転写を防ぐ二本鎖DNAと結合するオリゴヌクレオチドを用いることができる。その結果、B7-4ポリペプチドの合成がブロックされる。

【0168】

1またはそれ以上のB7-4ポリペプチド機能のダウンレギュレーションまたは防止、例えば、活性化T細胞による高レベルのリンホカイン合成の防止は、組織、皮膚、および臓器移植の状況、ならびに移植片対宿主病(GVHD)において有用であろう。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はずである。典型的には、組織移植では移植物の拒絶はT細胞が移植片を外来物と認識することで始まり、次いで移植物を破壊する免疫応答が生じる。B7リンパ球抗原と免疫細胞上のその天然のリガンド(例えば、B7-4ポリペプチドの可溶性単量体形のみ、または別のB7ペプチドの単量体形と組み合わせて)の相互作用を阻害またはブロックする分子((例えば、B7-1、B7-2)またはブロッキング抗体)を移植前に投与することにより、対応する共刺激シグナルを伝達することなく免疫細胞上の天然のリガンドに対する該分子の結合をもたらすことができる。このようにBリンパ球抗原の機能をブロックすることにより、免疫細胞、例えばT細胞によるサイトカイン合成を防ぎ、免疫抑制物質として作用する。さらに、共刺激を欠くことは、T細胞を無力化し、対象にトレランスを誘導するのに十分である。さらに、Bリンパ球抗原ブロッキング試薬により長期トレランスを誘導することで、これらブロッキング試薬の反復投与の必要性を避けることができよう。対象における十分な免疫抑制またはトレランスを達成するには、Bリンパ球抗原混合物の機能をブロックすることも必要かもしれない。例えば、下記各抗原の活性を有するペプチド混合物の可溶形またはこれら抗原に対するブロッキング抗体(別個にかまたは単一組成物中で一緒に)を移植前に投与することによりB7-1およびB7-4、B7-2およびB7-4、またはB7-1およびB7-2、およびB7-4ポリペプチドの機能をブロックすることが望ましいかもしれない。あるいはまた、B7-4ポリペプチドの阻害形を

、他の抑制物質、例えば、他のT細胞マーカーまたはサイトカイン、他の融合タンパク質、例えばCTLA4Igに対するブロッキング抗体、または免疫抑制剤とともに用いることができる。

【0169】

臓器移植片拒絶またはGVHDを防ぐ特定のブロッキング試薬の効果は、ヒトにおける効果を推測する動物モデルを用いて評価することができる。B7ポリペプチドは種を超えてアミノ酸の保存を表現するので、他のB7-4抗原は種を超えて機能し、動物系においてヒトタンパク質からなる試薬を用いることができるようである。用いることができる適切な系の例には、ラットにおける同種心臓移植、マウスにおける異種すい臓アイレット細胞移植が含まれ、これらはどちらもLenschow et al., Science, 257: 789-792 (1992)およびTurka et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 11102-11105 (1992)に記載のCTLA4Ig融合タンパク質のin vivo免疫抑制効果を試験するのに用いられた。さらに、GVHDのネズミモデル (Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 846-847参照)を用いて該疾病の発現に対するB7-4ポリペプチドのin vivoブロッキング作用の効果を測定することができる。

10

【0170】

例えば、B7-4ポリペプチド活性のみを有するペプチド、またはB7-1活性を有するペプチドおよび／またはB7-2活性を有するペプチドを組み合わせて用いることによるB7-4ポリペプチド機能のブロッキングも自己免疫疾患の治療に治療的に有用かもしれない。多くの自己免疫障害は、自己組織と反応し、該疾患の病状に關与するサイトカインおよび自己抗体の産生を促進するT細胞の不適切な活性化の結果である。自己反応性T細胞の活性化を防ぐことにより疾患の症状を減少または排除することができよう。Bリンパ球抗原のレセプター：リガンド相互作用を崩壊させることによりT細胞の共刺激をブロックする試薬の投与によりT細胞の活性化を阻害し、該疾患の過程に關与する自己抗体またはT細胞誘導性サイトカインの産生を防ぐことができる。さらに、ブロッキング試薬は自己反応性T細胞の抗原特異的トレランスを誘導し、該疾患の長期軽減をもたらすことができよう。自己免疫障害を予防もしくは軽減するブロッキング試薬の効果は、多くのよく特徴づけられたヒト自己免疫疾患の動物モデルを用いて測定することができる。例にはネズミ実験的自己免疫脳炎、MRL/lpr/lprマウスまたはNZBハイブリッドマウスの全身性紅斑性狼瘡、ネズミ自己免疫性コラーゲン関節炎、NODマウスおよびBBラットの糖尿病、およびネズミ実験的重症筋無力症が含まれる (Paul ed., Fundamental Immunology, Raven Press, New York, 1989, pp. 840-856参照)。

20

30

【0171】

アトピー性アレルギーにおけるIgE抗体反応は高度にT細胞依存性であり、Bリンパ球抗原誘導性T細胞活性化の阻害はアレルギーおよびアレルギー性反応の治療に治療的に有用であるかもしれない。B7-4タンパク質の阻害型、例えばB7-4ポリペプチド活性のみ、または別のBリンパ球抗原、例えばB7-1またはB7-2を組み合わせたペプチドをアレルギーの対象に投与し、該対象のT細胞介在性アレルギー反応を阻害することができる。T細胞のB7-4共刺激の阻害は、適切なMHC分子と共にアレルゲンへの曝露に付随して起こる。アレルギー反応は、アレルゲンの侵入経路、および肥満細胞または好塩基球上のIgEの蓄積パターンに応じて全身的または局所的であってよい。すなわち、B7-4タンパク質の阻害型の適切な投与により局所的または全身的にT細胞性アレルギー反応を阻害する必要があるかもしれない。

40

【0172】

B7-4抗原機能のブロックを介したT細胞活性化の阻害もT細胞のウイルス感染において治療的に重要かもしれない。例えば、後天性免疫不全症候群(AIDS)において、ウイルスの複製はT細胞の活性化により刺激される。B7-4機能のブロッキングはウイルス複製レベルを低下させ、AIDSの経過を改善するかもしれない。さらに、Bリンパ球抗原、すなわち、B7-2および／またはB7-1とB7-4の組み合わせの機能をブロックすることも望ましいかもしれない。

50

【0173】

4. 免疫応答のアップレギュレーション

免疫応答をアップレギュレーションする手段としてのBリンパ球抗原機能のアップレギュレーションも治療に有用かもしれない。免疫応答のアップレギュレーションは、存在する免疫応答を増大させるかまたは最初の免疫応答を誘導する形であってよい。例えば、ウイルス感染の場合にはBリンパ球抗原機能を刺激することにより免疫応答を増大させることが有用かもしれない。ウイルス感染は主として細胞溶解性T細胞により除去される。本発明によれば、T細胞上の天然のリガンドと相互作用するB7-4ポリペプチドは少なくともある種のT細胞の細胞溶解活性を増大させると考えられる。すなわち、可溶性B7-4ペプチド単独または多価形の種々のB7ポリペプチドの組み合わせを加えることによる共刺激経路を介したT細胞活性の刺激は、ウイルスのより急速または完全な排除が有益な状況において治療的に有用であろう。これらには、ウイルス性皮膚疾患、例えばヘルペスまたは帯状疱疹（shingles）が含まれ、この場合は、多価可溶性B7-4ポリペプチド、またはB7-1活性を有するペプチドおよび/またはB7-2活性を有するペプチドを含むそのようなペプチドの組み合わせが皮膚に局所的に供給される。さらに、全身性ウイルス疾患、例えばインフルエンザ、普通の風邪、および脳炎はBリンパ球抗原の刺激型を全身的に投与することにより改善されよう。

10

【0174】

あるいはまた、患者からT細胞を除去し、*in vitro*でT細胞を、B7-4ポリペプチド（単独でかまたはB7-1活性を有するペプチドおよび/またはB7-2活性を有するペプチドと組み合わせて）または可溶性B7-4ペプチドの刺激型（単独でかまたはB7-1活性を有するペプチドおよび/またはB7-2活性を有するペプチドと組み合わせて）と一緒に発現しているウイルス抗原でパルスしたAPCで共刺激し、*in vitro*活性化T細胞を患者に再導入することにより感染患者の抗ウイルス免疫応答を増大させることができよう。抗ウイルス免疫応答を増大させる別の方法は、患者から感染細胞を単離し、それを本明細書に記載のBリンパ球抗原の活性を有するペプチドをコードする核酸分子でトランスフェクトして該細胞表面にB7-4抗原のすべてまたは部分を発現させ、該トランスフェクト細胞を患者に再導入することであろう。今や感染細胞は、*in vivo*でT細胞に共刺激シグナルを供給し、それを活性化することができよう。

20

【0175】

刺激型のBリンパ球抗原は、種々の病原体に対するワクチンにおいて予防的に用いることもできよう。病原体、例えばウイルスに対する免疫は、適切なアジュバントを用い、ウイルスTと刺激型のB7-4ポリペプチドと一緒にワクチネーションすることにより誘導されよう。あるいはまた、B7-4抗原の活性を有するペプチドおよび病原性抗原の遺伝子をコードする発現ベクター、例えば本明細書に記載のB7-4ポリペプチドをコードする核酸分子を発現するよう操作されたワクシニアウイルス発現ベクターをワクチネーションに用いることができる。DNAワクチンは種々の手段、例えば注射（例えば、筋肉内、皮内、または粒子加速器または圧縮ガスを用いて皮膚に該粒子を注射する遺伝子銃を用いて上皮にDNAコートした金粒子をバイオリスティック(biolistic)注射(Haynes et al. 1996. J. Biotechnol. 44:37))により投与することができる。あるいはまた、DNAワクチンは非侵襲手段により投与することができる。例えば、純粋または急速処方DNAを呼吸器系に供給するか、または他の場所を標的化することができる（例えば、DNAの経口供給によるPeyersパッチ、Schubert. 1997. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:961）。弱毒微生物を用いて粘膜表面に供給することができる (Sizemore et al. 1995. Science. 270:29)。

30

40

【0176】

例えば、B7-4ポリペプチドおよびMHCクラスI α 鎖タンパク質および β 2マイクログロブリンを同時発現させたトランスフェクト細胞によるB7-4ポリペプチドとクラスI MHCタンパク質の提示は、細胞溶解性CD8⁺ T細胞の活性化をもたらす、ウイルス感染からの免疫をもたらすことができよう。ワクチンが有用な病原体には、肝炎B、肝炎C、エプスタイン・バー・ウイルス、サイトメガロウイルス、HIV-1、HIV-2、結核、および住血吸虫症が含まれ

50

る。

【0177】

別の適用において、Bリンパ球抗原機能のアップレギュレーションまたは増強は腫瘍免疫の誘導に有用かもしれない。少なくとも1種のB7-4抗原をコードする核酸でトランスフェクトした腫瘍細胞（例えば、肉腫、メラノーマ、リンパ腫、白血病、神経芽細胞腫、癌）を対象に投与し、対象における腫瘍特異的トレランスを克服することができる。所望により、該腫瘍細胞をトランスフェクトし、B7ポリペプチド（例えば、B7-1、B7-2、B7-4）の組み合わせを発現させることができる。例えば、患者から得た腫瘍細胞を、*ex vivo*で、B7-4ポリペプチド単独、またはB7-1活性および／またはB7-2活性を有するペプチドと組み合わせた発現を指示する発現ベクターでトランスフェクトすることができる。トランスフェクトした腫瘍細胞を患者に戻し、トランスフェクトした細胞表面に該ペプチドを発現させる。あるいはまた、遺伝子治療技術を用いて*in vivo*でトランスフェクションするための腫瘍細胞を標的化することができる。

10

【0178】

該腫瘍細胞表面にBリンパ球抗原の活性を有するペプチドの存在は、T細胞に必要な共刺激シグナルを提供し、トランスフェクト腫瘍細胞に対するT細胞性免疫応答を誘導する。さらに、MHCクラスIまたはMHCクラスII分子を欠くかまたは十分な量のMHCクラスIまたはMHCクラスII分子を発現することができない腫瘍細胞を、MHCクラスIα鎖タンパク質およびβ2マイクログロブリンタンパク質またはMHCクラスIIα鎖タンパク質およびMHCクラスIIβ鎖タンパク質のすべてまたは部分（例えば、細胞質ドメイントランケート部分）をコードする核酸でトランスフェクトし、該細胞表面にMHCクラスIまたはMHCクラスIIタンパク質を発現させることができる。Bリンパ球抗原（例えば、B7-1、B7-2、B7-4）の活性を有するペプチドと適切なクラスIまたはクラスII MHCの同時発現は、トランスフェクト腫瘍細胞に対するT細胞性免疫応答を誘導する。所望により、MHCクラスII関連タンパク質の発現をブロックするアンチセンス構築物をコードする遺伝子、例えば不変鎖をB7-4ポリペプチドをコードするDNAで同時にトランスフェクションし、腫瘍関連抗原の提示を促し、腫瘍特異的免疫を誘導することができる。B7陰性ネズミ腫瘍細胞によりB7-1の発現は、腫瘍拒絶とマウスへの腫瘍攻撃に対する持続的防御を伴うT細胞性特異免疫を誘導することがわかった(Chen, L., et al. (1992)細胞71, 1093-1102; Townsend, S.E.およびAllison, J.P. (1993) Science 259, 368-370; Baskar, S., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 5687-5690)。すなわち、ヒト対象におけるT細胞性免疫応答の誘導は対象における腫瘍特異的トレランスを克服するのに十分かもしれない。

20

30

【0179】

別の態様において、当該分野で知られた技術を用いて抗腫瘍免疫を誘導するため、刺激型の1またはそれ以上のB7-4ペプチド（例えば、細胞表面に発現した）を腫瘍を有する患者に投与し、T細胞に共刺激シグナルを与えることができる。

【0180】

さらに別の態様において、例えばアンチセンスRNAを用いて阻害型のB7-4分子の産生を阻害し、免疫応答をアップレギュレーションすることができる。例えば、ある態様において、腫瘍細胞による阻害性B7-4分子の産生を阻害し、抗腫瘍免疫を増大させることができる。

40

【0181】

特異的態様において、T細胞を対象から得、*ex vivo*で培養し、T細胞のポピュレーションを増大させる(*expand*)。さらなる態様において、次いでT細胞を対象に投与する。例えば、当該分野で知られているようにT細胞に一次活性化シグナルおよび共刺激シグナルを与えてT細胞を刺激し、*in vitro*で増殖させることができる。種々の形のB7-4タンパク質を用いて、T細胞の増殖を共刺激することもできる。ある態様において、PCT特許出願WO 94/29436に記載の方法にしたがって*ex vivo*でT細胞を培養する。共刺激分子は可溶性で、細胞膜に付着するか、または固体表面、例えばビーズに付着させることができる。

【0182】

50

B. B7-4介在性共刺激により誘導されたサイトカインの同定

本明細書に記載のB7-4分子を用いてB7-4ポリペプチドによる刺激に応じてT細胞により産生されるサイトカインを同定することができる。T細胞は、一次活性化シグナル、例えばホルボールエステル、抗CD3抗体、または好ましくはMHCクラスII分子関連抗原により *in vitro* で最適下刺激を受け、次いで、刺激型のB7-4抗原、例えばB7-4ポリペプチドをコードする核酸でトランスフェクトされた、表面に該ペプチドを発現する細胞によるか、または可溶性、刺激型の該ペプチドにより共刺激シグナルを受けることができる。培地中に放出された既知のサイトカインを、ELISAによるか、またはサイトカインをブロックし、サイトカインにより誘導されるT細胞増殖もしくは他の細胞種の増殖を阻害する抗体の能力により同定することができる。IL-4 ELISAキットは、IL-7ブロッキング抗体同様、Genzyme (Cambridge MA) から入手可能である。IL-9およびIL-12に対するブロッキング抗体はGenetics Institute (Cambridge, MA) から入手可能である。

【0183】

上記 *in vitro* T細胞共刺激アッセイを、共刺激により誘導されるかもしれない新規サイトカインを同定する方法に用いることもできる。例えば、CD28/CTLA4経路の刺激はIL-2分泌を増強するようであるが、ICOS経路の刺激はIL-10分泌を増強するようである (Hutloff et al. 199. Nature 397:263)。共刺激で誘導される特定の活性、例えばT細胞増殖が既知のサイトカインに対するブロッキング抗体を添加して阻害することができない場合は、該活性は未知のサイトカインの作用で生じているかもしれない。共刺激後、このサイトカインを通常の方法により培地から単離し、T細胞増殖誘導能によりその活性が測定されよう。

【0184】

トレランスの誘導を妨げるサイトカインを同定するには、上記T細胞共刺激アッセイを用いることができる。この場合、T細胞に一次活性化シグナルを与え、選択したサイトカインと接触させるが、共刺激シグナルは与えない。該T細胞を洗浄し、静止させた後、該細胞を一次活性化シグナルと共刺激シグナルで再攻撃する。T細胞が反応（例えば、増殖またはサイトカインを誘導）しなければ、該細胞はトレランスになっており、該サイトカインはトレランスの誘導を妨げていない。しかしながら、T細胞が反応すれば、トレランスの誘導は該サイトカインにより妨げられている。トレランスの誘導を妨げることができるそれらサイトカインは、移植物のレシピエントまたは自己免疫病を有する対象にトレランスを誘導するためのより効率的な手段として、Bリンパ球抗原をブロックする試薬と共に *in vivo* でブロックするための目標となり得る。例えば、B7-4ブロッキング試薬をサイトカインブロッキング抗体と一緒に対象に投与することがあろう。

【0185】

C. 共刺激に影響を与える分子の同定

本発明の新規Bリンパ球抗原の活性を有するペプチドの別の適用は、1またはそれ以上のこれらペプチドを、共刺激後のT細胞による細胞内シグナリングおよび/または共刺激リガンド結合のモジュレーターであるまだ未定義の分子として発見するためのスクリーニングアッセイに用いることである。例えば、B7-4分子の活性を有するペプチドを用いる固相結合アッセイを用いて、B7-4が結合する、該抗原の適切なT細胞リガンド（例えば、CD28、CTLA4、またはICOS）との結合を阻害する分子が同定されよう。さらに、上記 *in vitro* T細胞共刺激アッセイを用い、T細胞増殖および/またはサイトカイン産生を阻害する（B7-4分子のそのリガンドに対する結合は妨げない）能力により決定される、共刺激後のT細胞を介した細胞内シグナリングに干渉する分子が同定されよう。例えば、化合物、サイクロスポリンAはT細胞レセプター経路を介する刺激によるT細胞の活性化を阻害するが、CD28/CTLA4経路を介するものは阻害しない。したがって、異なる細胞内シグナリング経路が共刺激に関与している。CD28/CTLA4経路を介して細胞内シグナリングと干渉する分子は、*in vivo* で免疫抑制剤として有効であろう（サイクロスポリンAの効果と同様）。

【0186】

D. B7-4ポリペプチドの発現を調節する分子の同定

本発明のタンパク質およびペプチドを用いて作製された抗体は、細胞上のB7-4ポリペプチ

10

20

30

40

50

ドの発現を調節する分子のためのスクリーニングアッセイに用いることができる。例えば、活性化シグナルに応じてB7-4ポリペプチドの発現を誘導する細胞内シグナリングをもたらす分子は、細胞表面上の1またはそれ以上のB7-4ポリペプチドの発現をアッセイすることにより確認することができる。該分子存在下の抗B7-4またはBB-1抗体による免疫蛍光染色の減少は、該分子が細胞内シグナルを阻害することを示すであろう。B7-4ポリペプチド発現をアップレギュレーションする分子は免疫蛍光染色の増加をもたらす。あるいはまた、B7-4ポリペプチドの発現に対する分子の効果は、本発明のプローブを用いる細胞のB7-4 mRNAレベルを検出することにより測定することができる。例えば、B7-4ポリペプチドを発現する細胞を、試験すべき分子と接触させ、細胞中のB7-4 mRNAレベルの増加または低下を、標準的技術、例えば、検出可能なマーカーで標識したB7-4 cDNAプローブを用いるmRNAまたは総ポリ(A+)RNAの通常のドットプロットまたはノーザンブリダイゼーション分析により検出することができる。B7-4ポリペプチドの発現を調節する分子は、可溶性ブロッキングまたは刺激試薬単独でまたは組み合わせて免疫応答をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションするために治療的に有用かも知れない。例えば、B7-4の発現を阻害する分子は、免疫抑制のためにB7-4ブロッキング試薬と一緒に投与されよう。上記アッセイで試験することができる分子には、サイトカイン、例えばIL-4、 γ INF、IL-10、IL-12、GM-CSFおよびプロスタグランジンが含まれる。

【0187】

E. スクリーニングアッセイ:

本発明は、モジュレーター、すなわち、B7-4タンパク質と結合する、例えばB7-4発現またはB7-4活性に対する刺激または阻害効果を有する候補、または被検化合物または物質(例えば、ペプチド、ペプチドミメティック、小分子または他の薬剤)を同定するための方法(本明細書では「スクリーニングアッセイ」ともいう)を提供する。

【0188】

ある態様において、本発明は、B7-4タンパク質またはポリペプチドもしくはその生物学的に活性な部分を結合するか、またはその活性を調節する、例えばB7-4ポリペプチドの、その固有のリガンドとの相互作用する能力を調節する候補もしくは被検化合物をスクリーニングするためのアッセイを提供する。本発明の被検化合物は、生物学的ライブラリー;空間的にアドレスできる(addressable)パラレル固相もしくは液相ライブラリー;デコンボリューション(deconvolution)を要する合成ライブラリー法;「1ビーズ1化合物」ライブラリー法;およびアフィニティクロマトグラフィー選択を用いる合成ライブラリー法を含む当該分野で知られた組み合わせライブラリー法を用いるあらゆる多くのアプローチを用いて得ることができる。生物学的ライブラリーアプローチはペプチドライブラリーに限られるが、他の4つのアプローチはペプチド、非ペプチドオリゴマー、または低分子化合物ライブラリーに適用できる(Lam, K.S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145)。

【0189】

分子ライブラリーの合成方法の例は、当該分野で、例えば、DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 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; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061;およびGallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233に記載されている。

【0190】

化合物ライブラリーは、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(Ladner USP 5,223,409)、スポア(孢子)(Ladner USP '409)、プラスミド(Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869)、もしくはファージ(ScottおよびSmith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310); (Ladner、上記)上に存在してよい。

【0191】

別の態様において、アッセイは、B7-4標的分子（例えば、B7-4リガンドまたは細胞内相互作用分子リン酸化物質）を発現する細胞を被検化合物と接触させ、B7-4標的分子の活性を調節する（例えば、刺激または阻害）被検化合物の能力を測定することを含む細胞ベースのアッセイである。B7-4標的分子の活性を調節する被検化合物の能力の測定は、例えば、B7-4タンパク質の、B7-4標的分子またはそのリガンドと結合もしくは相互作用する能力を測定することにより達成することができる。B7-4タンパク質の、B7-4のリガンドと結合もしくは相互作用する能力の測定は、例えば直接結合により達成することができる。

【0192】

直接結合アッセイにおいて、B7-4タンパク質とB7-4標的分子の結合が複合体中の標識B7-4タンパク質を検出することによって検出できるように、B7-4タンパク質を放射性同位元素や標識酵素とカップリングさせる。例えば、B7-4分子、例えば、B7-4タンパク質を直接または間接的に¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³Hで標識し、該放射性同位元素を放射能励起（radioemission）を直接カウントするか、またはシンチレーションカウンティングにより検出することができる。あるいはまた、B7-4分子を、例えばホースラディッシュペーパーオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、またはルシフェラーゼ、および適切な基質の生成物への変換を測定することにより検出される酵素標識で酵素的に標識することができる。

【0193】

いかなる相互作用物質の標識なしに、B7-4とその標的分子間の相互作用を調節する化合物の能力を決定することも本発明の範囲内である。例えば、微小生理機能測定装置（micropHysiometer）を用いてB7-4またはその標的分子を標識することなくB7-4とその標的分子の相互作用を検出することができる。McConnell, H. M. et al. (1992) Science 257:1906-1912。本明細書で用いている「微小生理機能測定装置」（例えばCytosensor（サイトセンサー））は、細胞が光でアドレス可能な電位差センサー(LAPS)を用いてその環境を酸性化する速度を測定する分析装置である。この酸性化速度の変化を化合物とレセプターの相互作用の指標に用いることができる。

【0194】

好ましい態様において、B7-4タンパク質の、B7-4標的分子と結合もしくは相互作用する能力の検出は、該標的分子の活性を測定することにより達成することができる。例えば、該標的分子の活性は、該標的の細胞性第二メッセンジャー（例えばT細胞中のチロシンキナーゼ活性）の誘導を検出し、該標的の触媒／酵素的活性を適切な基質で検出し、レポーター遺伝子の誘導を検出し（検出可能なマーカー、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼをコードする核酸と機能性に連結した標的反応性制御エレメントを含む）、または標的制御細胞反応を検出することにより測定することができる。例えば、B7-4タンパク質の、B7-4標的分子と結合もしくは相互作用する能力の測定は、例えば増殖系における化合物のT細胞共刺激をダウンレギュレーションする化合物の能力を測定するか、またはB7-4ポリペプチドの、B7-4ポリペプチドの部分を認識する抗体と結合する能力に干渉することにより達成することができる。

【0195】

ある別の態様において、本発明のアッセイは、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分を被検化合物と接触させ、該被検化合物の、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分と結合する能力を測定する無細胞アッセイである。被検化合物とB7-4タンパク質との結合は、上記のごとく直接または間接的に測定することができる。好ましい態様において、該アッセイは、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分を、B7-4と結合してアッセイ混合物を形成する既知の化合物と接触させ、被検化合物の、B7-4タンパク質と相互作用する能力を測定することを含む（ここで、被検化合物の、B7-4タンパク質と相互作用する能力の測定は、該被検化合物の、B7-4ポリペプチドまたはその生物学的に活性な部分と優先的に結合する能力を既知化合物と比較して測定することを含む）。

【0196】

別の態様において、該アッセイはB7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分が被検

10

20

30

40

50

化合物と接触し、被検化合物の、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分を調節（例えば、刺激または阻害）する能力を測定する無細胞アッセイである。被検化合物のB7-4タンパク質の活性を調節する能力の測定は、例えばB7-4タンパク質のB7-4標的分子と結合する能力を上記直接結合の測定法の一つを用いて測定することにより達成することができる。B7-4タンパク質のB7-4標的分子との結合能の測定は、リアルタイムBiomolecular Interaction Analysis (BIA)のような技術を用いて達成することもできる。Sjolander, S. およびUrbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63:2338-2345およびSzabo et al. (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5:699-705。本明細書で用いている「BIA」は、いかなる相互作用物質(例えば、BIAコア)も標識することなく生物特異的相互作用をリアルタイムで試験する技術である。表面プラスモン (plasmon) 反応 (SPR) の光学的減少の変化を生物分子間のリアルタイム相互作用の指標に用いることができる。

10

【0197】

別の態様において、被検化合物のB7-4タンパク質の活性を調節する能力の測定は、B7-4タンパク質の、B7-4標的分子（例えば、B7-4介在性シグナルトランスダクション経路成分）の活性をさらに調節する能力を測定することにより達成することができる。例えば、上記のごとく適切な標識に対するエフェクター分子の活性を測定するか、または適切な標的に対するエフェクターの結合を測定することができる。

【0198】

さらに別の態様において、無細胞アッセイは、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分とB7-4タンパク質とアッセイ混合物を形成する既知化合物と接触させ、該アッセイ混合物を被検化合物と接触させ、次いで被検化合物のB7-4タンパク質と相互作用する能力を測定することを含む。ここで、被検化合物のB7-4タンパク質と相互作用する能力の測定には、B7-4タンパク質の、B7-4標的分子と優先的に結合するかまたはその活性を調節する能力を測定することが含まれる。

20

【0199】

本発明の無細胞アッセイは、可溶性および/または膜結合型のタンパク質(例えば、B7-4タンパク質またはその生物学的に活性な部分、またはB7-4と結合するレセプター)の使用になじむ。膜結合型のタンパク質を用いる（例えば、細胞表面B7-4レセプター）無細胞アッセイの場合は、可溶化剤を利用して膜結合型の該タンパク質を溶液に保つことが望ましい。そのような可溶化剤の例には、非イオン性界面活性剤、例えば、n-オクチルグルコシド、n-ドデシルグルコシド、n-ドデシルマルトシド、オクタノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド、Triton(登録商標)X-100、Triton(登録商標)X-114、The sit(登録商標)、イソトリデシポリ(エチレングリコールエーテル)_n、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ]-1-プロパンスルホネート(CHAPS)、3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアミノ]-2-ヒドロキシ-1-プロパンスルホネート(CHAPSO)、またはN-ドデシル-N,N-ジメチル-3-アンモニオ-1-プロパンスルホネートが含まれる。

30

【0200】

本発明の上記アッセイ法の2以上の態様において、B7-4またはその標的分子のいずれかを固定することにより、該タンパク質の両方または一方の複合型の非複合型からの分離を促し、該アッセイの自動化に適合させることが望ましいかもしれない。候補化合物の存在下および非存在下における被検化合物のB7-4タンパク質との結合、またはB7-4タンパク質と標的分子の相互作用は、反応体を含むのに適したあらゆる容器中で達成することができる。そのような例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微量遠心チューブが含まれる。ある態様において、タンパク質の1または両方をマトリックスと結合させるドメインを加えた融合タンパク質を提供することができる。例えば、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ/B7-4融合タンパク質またはグルタチオン-S-トランスフェラーゼ/標的融合タンパク質をグルタチオンセファロースビーズ(Sigma Chemical, St. Louis, MO)またはグルタチオン誘導 (derivatized) マイクロタイタープレートに吸着させ、次いで被検化合物、または被検化合物と非吸着標的タンパク質もしくはB7-4タンパク質と混合し、該混合物を複合体形成を助ける条件（例えば、塩およびpHについては生理学的条件）下で該混

40

50

合物をインキュベーションすることができる。インキュベーション後、ビーズまたはマイクロタイタープレートウェルを洗浄してあらゆる非結合成分を除去し、ビーズの場合は該マトリックスを固定し、例えば上記のごとく直接または間接的に複合体を測定する。あるいはまた、該複合体をマトリックスから解離させ、標準的技術を用いてB7-4の結合レベルや活性を測定することができる。

【0201】

マトリックスにタンパク質を固定するための他の技術を本発明のスクリーニングアッセイに用いることもできる。例えば、B7-4タンパク質またはaB7-4標的分子をビオチンおよびストレプトアビジンのコンジュゲーションを利用して固定化することができる。ビオチン化B7-4タンパク質または標的分子を、当該分野でよく知られている技術(例えば、ビオチン化キット, Pierce Chemicals, Rockford, IL)を用いてビオチン-NHS(N-ヒドロキシ-スクシンイミド)から作製し、ストレプトアビジンコート96ウェルプレート(Pierce Chemical)のウェルに固定化する。あるいはまた、B7-4タンパク質とその標的分子との結合に干渉せず、B7-4タンパク質または標的分子と反応する抗体を該プレートのウェルに誘導し、非結合標的またはB7-4タンパク質を抗体とのコンジュゲーションによりウェルに捕捉させる。そのような複合体の検出方法には、GST固定化複合体に関する上記方法に加え、B7-4タンパク質または標的分子と反応する拘置アを用いる複合体の免疫検出、およびB7-4タンパク質または標的分子に付随する酵素活性の検出に基づく酵素結合アッセイが含まれる。

【0202】

別の態様において、B7-4発現の調節は細胞を候補化合物と接触させ、細胞中のB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現を測定する方法を用いて同定する。候補化合物の存在下におけるB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現レベルを候補化合物の非存在下におけるB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現レベルと比較する。次に、候補化合物をこの比較に基づいてB7-4発現のモジュレーターとして同定することができる。例えば、候補化合物の存在下で非存在下よりB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現が大きい(例えば、統計的に有意に大きい)とき、候補化合物はB7-4 mRNAまたはタンパク質発現の刺激物質とみなされる。あるいはまた、候補化合物の存在下で非存在下よりB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現が少ない(例えば、統計的に有意に少ない)とき、候補化合物はB7-4 mRNAまたはタンパク質発現のインヒビターとみなされる。細胞におけるB7-4 mRNAまたはタンパク質の発現レベルは本明細書に記載のB7-4 mRNAまたはタンパク質の検出法により測定することができる。

【0203】

本発明のさらに別の局面において、B7-4タンパク質、好ましくはB7-4M膜結合型を、2ハイブリッドアッセイまたは3ハイブリッドアッセイにおいて「おとり(bait)タンパク質」に用い(例えば、U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos et al. (1993)細胞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 W094/10300参照)、B7-4と結合または相互作用する、B7-4活性に関連する他のタンパク質(「B7-4結合タンパク質」または「B7-4-bp」)を同定することができる。そのようなB7-4結合タンパク質も、例えばB7-4介在性シグナリング経路の下流のエレメントとしてB7-4タンパク質またはB7-4標的によるシグナルの伝達に関与するようである。

【0204】

2ハイブリッドシステムは、分離可能なDNA結合および活性化ドメインからなるほとんどの転写因子のモジュール性に基づく。簡単には、該アッセイは2つの異なるDNA構築物を利用する。一つの構築物では、B7-4タンパク質をコードする遺伝子を既知転写因子(例えば、GAL-4)のDNA結合ドメインをコードする遺伝子と融合する。他の構築物では、未同定タンパク質をコードするDNA配列のライブラリー由来のDNA配列(「獲物(pre)」または「試料(サンプル)」)を既知転写因子の活性化ドメインをコードする遺伝子と融合する。「おとり」および「獲物」タンパク質はin vivoで相互作用してB7-4依存性複合体を形成し、転写因子の配列結合および活性化ドメインをきわめて接近させる。この接近は、転写因子と反応する転写制御部位と機能性に連結したレポーター遺伝子(例えば、LacZ)の転写

をもたらす。レポーター遺伝子の発現を検出し、機能的転写因子を含む細胞コロニーを単離して用いることにより、B7-4タンパク質と相互作用するタンパク質をコードするクローン化遺伝子を得ることができる。

【0205】

さらに本発明は上記スクリーニングアッセイにより同定される新規物質に関する。したがって、適切な動物モデルを用い、本明細書に記載のごとく同定した物質をさらに使用することも本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載のごとく同定した物質（例えば、B7-4調節物質、アンチセンスB7-4核酸分子、B7-4-特異的抗体、またはB7-4結合パートナー）を動物モデルに用い、そのような物質を用いる治療の効果、毒性、または副作用を測定することができる。あるいはまた、本明細書に記載のごとく同定した物質を動物モデルに用いてそのような物質の作用機序を検討することができる。さらに、本発明は本明細書に記載の治療のための上記スクリーニングアッセイにより同定された新規物質の使用に関する。

10

【0206】

F. 検出アッセイ

本明細書で同定したcDNA配列の部分または断片（および対応する完全遺伝子配列）をポリヌクレオチド試薬として多くの方法に用いることができる。例えば、該配列を用いて(i)染色体上のそれらの個々の遺伝子をマッピング、すなわち、遺伝病に関連する遺伝子領域の位置を確認し、(ii)微小生物試料から個体を確認し（組織タイピング）、(iii)生物試料の法医学的同定を助けることができる。これらの適用は下記小節に記載されている。

20

【0207】

1. 染色体マッピング

遺伝子の配列（または配列の部分）を単離したら、この配列を用いて該遺伝子の染色体上の位置をマッピングすることができる。この方法は染色体マッピングと呼ばれている。したがって、本明細書に記載のB7-4ヌクレオチド配列の部分または断片を用いて染色体上のB7-4遺伝子の位置をマッピングすることができる。染色体に対するB7-4配列のマッピングは、病気に関連した遺伝子とこれらの配列の相互関係を明らかにする上で重要な第一段階である。

【0208】

簡単に述べると、B7-4ヌクレオチド配列からPCRプライマー（好ましくは長さ15-25bp）を製造することにより、B7-4遺伝子が染色体に対してマッピングされ得る。B7-4配列のコンピューター分析を用いることにより、ゲノムDNAにおいて複数のエクソンに及ぶわけではない、すなわち増幅プロセスを複雑にすることのないプライマーが予測され得る。次いで、これらのプライマーは、個々のヒト染色体を含む体細胞ハイブリッドのPCRスクリーニングに使用され得る。B7-4配列に対応するヒト遺伝子を含むハイブリッドのみ、増幅された断片を生じる。

30

【0209】

体細胞ハイブリッドは、異なる哺乳類（例、ヒトおよびマウス細胞）からの体細胞を融合することにより製造される。ヒトおよびマウス細胞のハイブリッドが成長および分裂するとき、それらは徐々に無作為な順序でヒト染色体を失うが、マウス染色体は保持している。特定酵素を欠くが故にマウス細胞は成長し得ないが、ヒト細胞は成長し得る培地を用いることにより、必要とされる酵素をコード化する遺伝子を含む一つのヒト染色体が保持される。様々な培地を用いることにより、ハイブリッドセルラインのパネルが確立され得る。一パネルにおける各セルラインは、単一ヒト染色体または少数のヒト染色体、および完全なセットのマウス染色体を含むため、特定ヒト染色体に対する個々の遺伝子のマッピングが容易に行われ得る。（D'Eustachio, P.ら（1983）Science 220:919-924）。ヒト染色体の断片のみを含む体細胞ハイブリッドはまた、転座および欠失を伴うヒト染色体を用いることにより製造され得る。

40

【0210】

体細胞ハイブリッドのPCRマッピングは、特定染色体に特定配列を割当てて迅速な方法

50

である。単一のサーマルサイクラーを用いると、3個またはそれ以上の配列が一日に割当てられ得る。B7-4ヌクレオチド配列を用いてオリゴヌクレオチドプライマーを設計することにより、特異的染色体からの断片のパネルで部分的な位置推定が達成され得る。同様に90、1p、または1v配列をその染色体に対してマッピングするのに使用され得る他のマッピング戦略には、in situ ハイブリダイゼーション (Fan, Y. ら (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6223-27に記載)、標識フローソート (flow-sorted) 染色体によるプレスクリーニング、および染色体特異的 cDNA ライブラリーとのハイブリダイゼーションによる前選別がある。

【0211】

さらに、中期染色体拡散へのDNA配列の蛍光in situ ハイブリダイゼーション (FISH) を用いることにより、一段階で正確な染色体位置決定が行われ得る。染色体拡散は、有糸分裂紡錘体を崩壊させる化学物質、例えばコルセミドにより分裂が中期で遮断された細胞を用いて行われ得る。染色体は、トリプシンで簡単に処理され、次いでギエムザにより染色され得る。明暗バンドのパターンが各染色体で展開することにより、染色体が個々に同定され得る。FISH技術は、500または600塩基程度の短いDNA配列で使用され得る。しかしながら、1000塩基より大きいクローンは、単純な欠失に関して十分なシグナル強度を伴う特有の染色体位置に結合する可能性が高い。好ましくは、1000塩基、およびさらに好ましくは2000塩基あれば、妥当な時間量で良い結果を得るのに充分である。この技術の検討については、Verma ら、Human Chromosomes: A Manual of Basic Techniques (ペルガモン・プレス、ニューヨーク、1988) 参照。

【0212】

染色体マッピング用試薬は、単一染色体またはその染色体における単一部位をマークするのに個々に使用され得るか、または試薬のパネルは多様な部位および/または多様な染色体をマークするのに使用され得る。遺伝子の非コーディング領域に対応する試薬が実際にマッピング目的には好ましい。コーディング配列は、遺伝子ファミリー内に保存されている可能性が高いため、染色体マッピング中におけるクロスハイブリダイゼーションの機会が多くなると思われる。

【0213】

一旦配列が正確な染色体位置にマッピングされると、染色体における配列の物理的位置は、遺伝地図データと相互関係を示し得る (上記データは、例えば、McKusick, V., Mendelian Inheritance in Manに見出される、ジョーンズ・ホプキンス・ユニバーシティー・ウェルチ・メディカル・ライブラリーを通じてオンラインで入手可能)。次いで、同じ染色体領域にマッピングされた、遺伝子と病気の間関係は、例えば Egeland, J. ら (1987) Nature 325: 783-787に記載された、連鎖分析 (物理的近接遺伝子の共遺伝) を通して確認され得る。

【0214】

さらに、B7-4遺伝子に関連した病気に罹患および非罹患の個体間におけるDNA配列の差異が測定され得る。突然変異が罹患個体の一部または全部では観察されるが、非罹患個体からは全く観察されない場合、突然変異は特定疾患の誘因であると考えられる。罹患および非罹患個体の比較は、一般的にまず染色体における構造的変化、例えば染色体拡散から認識できるかまたはDNA配列に基いたPCRを用いて検出可能な欠失または転座を探すことを含む。最後に、幾つかの個体からの遺伝子を完全に配列決定することにより、突然変異の存在が確認され、多型からの突然変異が区別され得る。

【0215】

2. 組織タイピング

本発明のB7-4配列はまた、微生物学的サンプルからの個体の確認に使用され得る。例えば、アメリカ合衆国軍部は、その人員の身元確認を目的とする制限切断断片長多型 (RFLP) の使用を考えている。この技術では、個人のゲノムDNAを1種またはそれ以上の制限酵素で消化し、サザン・ブロットでプローブすると、同定するための特有なバンドが生成される。この方法によると、喪失、交換または盗難され得るため、積極的な確

認が困難である現行「認識票」の限界が黙認されることはない。本発明の配列は、RFLP用の追加的DNAマーカーとして有用である（米国特許5272057に記載）。

【0216】

さらに、本発明の配列を使用することにより、個体ゲノムから選択された部分の実際の一塩基毎のDNA配列を決定する代替的技術が提供され得る。すなわち、本明細書に記載されたB7-4ヌクレオチド配列を使用することにより、配列の5'および3'末端から2種のPCRプライマーが製造され得る。次いで、これらのプライマーを用いて、個体のDNAが増幅され、それに続いてその配列決定が行われ得る。

【0217】

この方法で製造された、個体からの対応するDNA配列のパネルにより、特有な個体同定手段が提供され得るもので、これは、各個体が対立遺伝子の異なる故に上記DNA配列の特有なセットを有することによる。本発明の配列を使用することにより、個体および組織から上記同定配列が得られる。本発明のB7-4ヌクレオチド配列は、ヒトゲノムの一部分を特有な形で表す。対立遺伝子変異は、これらの配列のコーディング領域ではある程度まで、および非コーディング領域ではかなりの程度まで起こる。個人間における対立遺伝子変異は、各500塩基当たり約1回の頻度で起こると評価されている。本明細書に記載されている配列は各々、ある程度まで、個体からのDNAが同定目的のために比較され得る標準として使用され得る。非コーディング領域に見られる多型の数が多いため、個体を同定するのに必要な配列は少ない。配列番号1または3の非コーディング配列は、各々が100塩基の非コーディング増幅配列を生じる恐らくは10~1000プライマーから成るパネルにより積極的な個体同定手段を快適な形で提供し得る。予測されたコーディング配列が使用される場合、積極的な個体同定に関してより適当なプライマー数は、500-2000となる。

【0218】

本明細書に記載されたB7-4ヌクレオチド配列からの試薬のパネルを用いることにより、個体に特有な同定データベースを作成する場合、それらの同じ試薬が後で個体からの組織同定に使用され得る。特有な同定データベースを用いると、生存または死亡している個体の積極的な確認手段は極めて小さな組織サンプルからでも作成され得る。

【0219】

3. 法医学的生物学における部分的B7-4配列の使用
DNAに基く同定技術はまた、法医学的生物学でも使用され得る。法医学的生物学は、例えば犯罪的行為の犯人を積極的に確認する手段として犯罪現場で発見された生物学的証拠の遺伝子タイピングを用いる科学分野である。かかる確認を行うため、PCR技術を用いることにより、犯罪現場で発見された非常に小さな生物学的サンプル、例えば組織、例えば毛髪または皮膚、または体液、例えば血液、唾液または精液から採取されたDNA配列が増幅され得る。次いで、増幅された配列は標準と比較され得、それによって生物学的サンプルの出所が確認され得る。

【0220】

本発明の配列を用いることにより、例えば別の「同定マーカー」（すなわち、特定個体に特有なものである別のDNA配列）を提供することによりDNAに基く法医学的同定手段の信頼度を高め得る、ヒトゲノムにおける特異的な位置にターゲッティングされたポリヌクレオチド試薬、例えばPCRプライマーが提供され得る。上記で述べたところによると、実際の塩基配列情報は、制限酵素生成断片により形成されたパターンに代わる正確な手段として同定に使用され得る。非コーディング領域で見られる多型の数が多いと、この技術を用いて個体を識別するのが容易になるため、非コーディング領域にターゲッティングされた配列は、この用途に特に適している。ポリヌクレオチド試薬の例には、少なくとも20塩基、好ましくは少なくとも30塩基の長さを有するB7-4ヌクレオチド配列またはその一部分がある。

【0221】

さらに、本明細書に記載されたB7-4ヌクレオチド配列を用いることにより、ポリヌク

レオチド試薬、例えば、*in situ* ハイブリダイゼーション技術で特異的組織、例えば脳組織を同定するのに使用され得る例えば標識または標識可能なプローブが提供され得る。これは、法医学病理学者が出所不明の組織を提示された場合に非常に有用である。上記 B7-4 プローブのパネルは、種および／または器官タイプによる組織の確認に使用され得る。

【0222】

同様の方式で、これらの試薬、例えば B7-4 プライマーまたはプローブは、汚染物質に関する組織培養物のスクリーニング（すなわち、培養物中における異なるタイプの細胞から成る混合物の存在に関するスクリーニング）に使用され得る。

【0223】

G. 予測的医学

本発明はまた、診断的検定（アッセイ）、予知検定およびモニタリング臨床試験が予知（予測）目的に使用されることにより、個体を予防的に処置する予測的医学分野に関するものである。従って、本発明の一態様は、生物学的サンプル（例、血液、血清、細胞、組織）の状況で B7-4 タンパク質および／または核酸発現並びに B7-4 活性を測定するための診断的検定法に関するものであり、それによって個体が異常型の B7-4 発現または活性に関連した病気または障害に罹患しているか、または発病の危険に瀕しているか否かが決定される。本発明はまた、個体が、B7-4 タンパク質、核酸発現または活性に関連した疾患を発病する危険があるか否かを測定するための予知（または予測的）検定法を提供する。例えば、B7-4 遺伝子における突然変異は、生物学的サンプルで検定され得る。上記検定法を予知または予測目的で使用するにより、B7-4 タンパク質、核酸発現または活性を特徴とするかまたはそれに関連した疾患の発病前に個体を予防的に処置し得る。

【0224】

本発明の別の態様は、臨床試験において B7-4 の発現または活性に対する薬剤（例、薬物、化合物）の影響をモニターすることに関するものである。

これらおよび他の薬剤については下記の項でより詳細に記載されている。

【0225】

1. 診断的検定

【0226】

生物学的サンプルにおける B7-4 タンパク質または核酸の存在または非存在を検出する方法の例では、生物学的サンプルを試験対象から入手し、B7-4 タンパク質または核酸の存在が生物学的サンプルから検出されるように、B7-4 タンパク質または B7-4 タンパク質をコード化する核酸（例、mRNA、ゲノム DNA）を検出し得る化合物または薬剤と生物学的サンプルを接触させる。B7-4 mRNA またはゲノム DNA を検出するのに好ましい薬剤は、B7-4 mRNA またはゲノム DNA にハイブリダイズし得る標識核酸プローブである。核酸プローブは、例えばヒト B7-4 核酸、例えば配列番号 1 または 3 の核酸またはその一部分、例えば少なくとも 15、30、50、100、250 または 500 ヌクレオチド長のオリゴヌクレオチドであり、ストリンジェント条件下で B7-4 mRNA またはゲノム DNA と特異的にハイブリダイズするのに十分なものであり得る。本発明の診断的検定で使用される他の適当なプローブもここに記載されている。

【0227】

好ましい B7-4 タンパク質検出薬剤は、B7-4 タンパク質に結合し得る抗体、好ましくは検出可能な標識を伴う抗体である。抗体は、ポリクローナルまたは好ましくはモノクローナルであり得る。無傷の抗体またはその断片（例、Fab または F(ab')₂）が使用され得る。プローブまたは抗体に関する「標識された」の語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体に結合（すなわち、物理的結合）させることによるプローブまたは抗体の直接標識、並びに直接標識されている別の試薬との反応性によるプローブまたは抗体の間接標識を包含するものとする。間接標識の例には、蛍光標識 2 次抗体を用いて 1 次抗体を検出する方法およびビオチンで DNA プローブを末端標識することにより蛍光標識スト

レプトアビジンにより検出させ得る方法が含まれる。「生物学的サンプル」の語は、対象から単離された組織、細胞および生物学的流体、並びに対象内に存在する組織、細胞および流体を包含するものとする。すなわち、本発明の検出方法を用いることにより、インビトロおよびインビボで生物学的サンプルにおけるB7-4 mRNA、タンパク質、またはゲノムDNAが検出され得る。例えば、B7-4 mRNAのインビトロ検出技術には、ノーザン・ハイブリダイゼーションおよびin situ ハイブリダイゼーションがある。B7-4タンパク質のインビトロ検出技術には、酵素結合イムノソルベント検定法(ELISA法)、ウエスタン・ブロット、免疫沈降法および免疫蛍光法がある。B7-4ゲノムDNAのインビトロ検出技術にはサザン・ハイブリダイゼーションがある。さらに、B7-4タンパク質のインビボ検出技術には、標識抗B7-4抗体を対象に導入する技術がある。例えば、抗体は、対象におけるその存在および位置が標準的技術により検出され得る放射性マーカーで標識され得る。

10

【0228】

一態様において、生物学的サンプルは、試験化合物からのタンパク質分子を含む。別法として、生物学的サンプルは、試験対象からのmRNA分子または試験対象からのゲノムDNA分子を含み得る。好ましい生物学的サンプルは、対象から慣用的手段により単離された血清サンプルである。

【0229】

別の態様において、本発明方法では、さらに対照対象から対照生物学的サンプルを入手し、B7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在が生物学的サンプルから検出されるように、B7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAを検出し得る化合物または薬剤と対照サンプルを接触させ、そして対照サンプルにおけるB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在を試験サンプルにおけるB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの存在と比較する。

20

【0230】

本発明はまた、生物学的サンプルにおいてB7-4の存在を検出するためのキットを包含する。例えば、キットは、生物学的サンプルにおいてB7-4タンパク質またはmRNAを検出し得る標識化合物または薬剤、サンプル中のB7-4の量を測定する手段、およびサンプル中のB7-4の量を標準と比較する手段を含み得る。化合物または薬剤は、適当な容器にパッケージされ得る。さらにこのキットは、B7-4タンパク質または核酸の検出にキットを使用するための使用説明書も含み得る。

30

【0231】

2. 予知的検定法

さらに、本明細書に記載されている診断方法を用いることにより、異常型B7-4発現または活性に関連した病気または障害を発症する危険がある対象が認識され得る。例えば、本明細書に記載された検定法、例えば前述の診断的検定法または後記検定法は、B7-4タンパク質、核酸発現または活性に関連した疾患を発病する危険がある対象を認識するのに使用され得る。すなわち、本発明は、試験サンプルを対象から入手し、B7-4タンパク質または核酸(例、mRNA、ゲノムDNA)を検出する、異常型B7-4発現または活性と関連した病気または障害の確認方法であって、B7-4タンパク質または核酸の存在が、異常型B7-4発現または活性と関連した病気または障害に罹患しているかまたはその危険がある対象に特徴的なものである方法を提供する。ここで使用されている「試験サンプル」は、興味の対象から得られた生物学的サンプルを包含する。例えば、試験サンプルは、生物体液(例、血清)、細胞サンプルまたは組織であり得る。

40

【0232】

さらに、ここに記載されている予知的検定法を用いると、対象に薬剤(例、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子または他の薬剤候補)を投与することにより、異常型B7-4発現または活性と関連した病気または障害が処置され得るか否かが測定され得る。すなわち、本発明は、異常型B7-4発現または活性と関連した疾患用の薬剤によって対象が有効に処置され得るか否かを測定する

50

方法であって、試験サンプルを入手し、B7-4タンパク質または核酸発現または活性を検出する（例、B7-4タンパク質または核酸発現または活性の存在量が、薬剤を投与されることにより異常型B7-4発現または活性と関連した疾患が処置され得る対象にとって特徴的なものである）方法を提供する。

【0233】

また本発明方法を用いると、B7-4遺伝子における遺伝子改変を検出することにより、遺伝子が改変された対象がB7-4遺伝子と関連した疾患にかかる危険があるか否かが決定され得る。好ましい態様において、本方法は、対象からの細胞サンプルにおいて、B7-4タンパク質をコード化する遺伝子の完全性またはB7-4遺伝子の誤発現に影響を及ぼす改変の少なくとも一つを特徴とする遺伝子改変の存在または非存在を検出することを含む。例えば、上記遺伝子改変は、1) B7-4遺伝子からの1個またはそれ以上のヌクレオチドの欠失、2) B7-4遺伝子への1個またはそれ以上のヌクレオチドの付加、3) B7-4遺伝子の1個またはそれ以上のヌクレオチドの置換、4) B7-4遺伝子の染色体再編成、5) B7-4遺伝子のメッセンジャーRNA転写物のレベルの改変、6) B7-4遺伝子の異常型修飾、例えばゲノムDNAのメチル化パターンの場合、7) B7-4遺伝子のメッセンジャーRNA転写物の非野生型スプライシングパターンの存在、8) B7-4タンパク質の非野生型レベル、9) B7-4遺伝子の対立遺伝子喪失、および10) B7-4タンパク質の不適切な翻訳後修飾のうち少なくとも一つの存在を確認することにより検出され得る。ここに記載されているように、当業界ではB7-4遺伝子における改変の検出に使用され得る多数の検定技術が知られている。好ましい生物学的サンプルは、対象から慣用的手段により単離された組織または血清サンプル、例えば心臓組織サンプルである。

【0234】

ある種の態様において、改変の検出は、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例、米国特許第4683195および4683202号参照）、例えばアンカーPCRまたはRACE PCRまたは別法としてライゲーション連鎖反応（LCR）（例、Landegranら（1988）Science 241: 1077-1080、およびNakazawaら（1994）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91: 360-364参照）においてプローブ／プライマーの使用を必要としており、後者の方は、B7-4遺伝子において点突然変異を検出するのに特に有用であり得る（Abravayaら（1995）Nucleic Acids Res. 23: 675-682参照）。この方法は、患者から細胞のサンプルを採取し、サンプルの細胞から核酸（例、ゲノム、mRNAまたは両方）を単離し、B7-4遺伝子（存在する場合）のハイブリダイゼーションおよび増幅が行われる条件下B7-4遺伝子と特異的にハイブリダイズする一つまたはそれ以上のプライマーと核酸サンプルを接触させ、そして増幅産物の存在または非存在を検出するか、または増幅産物のサイズを検出し、対照サンプルと長さ比較する段階を含み得る。PCRおよび／またはLCRは、本明細書に記載された突然変異検出に使用される技術のいずれかと共に予備的増幅段階として使用するのが望ましいことであり得ると予測される。

【0235】

別の増幅方法には、自立的配列複製法（Guatelli,J.C.ら、（1990）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87: 1874-1878）、転写増幅システム（Kwoh,D.Y.ら（1989）Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 1173-1177）、Q-ベータ・レプリカーゼ（Lizardi,P.M.ら（1988）Biotechnology 6: 1197）、または他の核酸増幅方法があり、次いで当業界の専門技術者によく知られた技術を用いて増幅された分子の検出が行なわれる。これらの検出計画は、存在する核酸分子の数が非常に低い場合、上記分子の検出に特に有用である。

【0236】

別の態様において、サンプル細胞からのB7-4遺伝子における突然変異は、制限酵素開裂パターンの改変により確認され得る。例えば、サンプルおよび対照DNAを単離し、増幅（所望ならば）し、1種またはそれ以上の制限エンドヌクレアーゼで消化し、断片長の

サイズをゲル電気泳動により測定し、比較する。サンプルおよび対照DNA間の断片長サイズの差異は、サンプルDNAにおける突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの用途（例えば、米国特許第5498531号参照）については、リボザイム開裂部位の発生または喪失による特異的突然変異の存在について評価するのに利用され得る。

【0237】

他の態様において、B7-4における遺伝子突然変異は、サンプルおよび対照核酸、例えばDNAまたはRNAを、数百または数千のオリゴヌクレオチドプローブを含む高密度アレイにハイブリダイズさせることにより同定され得る（Cronin, M.T. ら（1996）Hum. Mutat. 7: 244-255、Kozal, M.J. ら（1996）Nat. Med. 2: 753-759）。例えば、B7-4における遺伝子突然変異は、Cronin, M.T. ら（1996）前出に記載されたライト生成DNAプローブを含む二次元アレイで確認され得る。簡単に述べると、プローブの第1ハイブリダイゼーションアレイを用いて、サンプルおよび対照におけるDNAの長い伸長を通して走査し、連続オーバーラッププローブの線形アレイを作成することにより配列間の塩基変化を確認し得る。この段階により、点突然変異の確認が行われる。この段階の後、第2ハイブリダイゼーションアレイによって、検出された全ての変異または突然変異に相補的な小さい特化されたプローブアレイを用いることにより特異的突然変異の特性確認が行われる。各突然変異アレイは、平行プローブセットにより構成されており、一方は野生型遺伝子に相補的であり他方は突然変異遺伝子に相補的である。

【0238】

さらに別の態様では、当業界で公知の様々な配列決定反応のいずれかを用いることにより、B7-4遺伝子の直接配列決定が行われ、サンプルB7-4の配列を対応する野生型（対照）配列と比較することにより突然変異が検出され得る。配列決定反応の例には、マクサムおよびギルバート（（1977）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 560）またはサンガー（（1977）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463）により開発された技術に基くものがある。また、マスペクトロメトリーによる配列決定を含め（例、PCT国際公開第WO94/16101、Cohenら（1996）Adv. Chromatogr. 36: 127-162、およびGriffinら（1993）Appl. Biochem. Biotechnol. 38: 147-159参照）、診断的検定（（1995）Biotechniques 19: 448）の遂行時には様々な自動化配列決定方法のいずれかが利用され得ると考えられる。

【0239】

B7-4遺伝子において突然変異を検出する他の方法には、開裂薬剤からの防御を用いてRNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ2本鎖におけるミスマッチ塩基を検出する方法がある（Myersら（1985）Science 230: 1242）。一般に、当業界の「ミスマッチ開裂」技術は、組織サンプルから得られた潜在的突然変異体RNAまたはDNAと野生型B7-4配列を含む（標識）RNAまたはDNAをハイブリダイズさせることにより形成されたヘテロ2本鎖を提供することにより開始される。2本鎖デュプレックスは、デュプレックスの1本鎖領域、例えば対照およびサンプル鎖間における塩基対ミスマッチ故に存在する領域を開裂する薬剤で処理される。例えば、RNA/DNAデュプレックスをリボヌクレアーゼで処理し、DNA/DNAハイブリッドをS1ヌクレアーゼで処理することにより、ミスマッチ領域が酵素的に消化され得る。他の態様において、DNA/DNAまたはRNA/DNAデュプレックスをヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびピペリジンで処理することにより、ミスマッチ領域が消化され得る。ミスマッチ領域の消化後、生成した物質を変性ポリアクリルアミドゲルでサイズにより分離し、突然変異部位を測定する。例えば、Cottonら（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 4397、Saleebaら（1992）Methods Enzymol. 217: 286-295参照。好ましい態様では、対照DNAまたはRNAが検出用に標識され得る。

【0240】

さらに別の態様において、ミスマッチ開裂反応は、細胞のサンプルから得られたB7-4 cDNAにおける点突然変異を検出しマッピングするために特定された系において2本鎖DNAにおけるミスマッチ塩基対を認識する1種または以上のタンパク質（いわゆる「

DNA mismatches修復」酵素)を使用する。例えば、エシェリキア・コリ (E.coli) の mutY 酵素は、G/A mismatches の A を開裂し、ヒラ細胞からのチミジン DNA グリコシラーゼは G/T mismatches の T を開裂する (Hsu ら (1994) Carcinogenesis 15: 1657-1662)。実例的態様によると、B7-4 配列、例えば野生型 B7-4 配列に基いたプローブを、試験細胞 (複数可) からの cDNA または DNA 産物とハイブリダイズさせる。デュプレックスを DNA mismatches 修復酵素で処理し、開裂産物がある場合、それらは、電気泳動プロトコルなどから検出され得る。例えば、米国特許第 5459039 号参照。

【0241】

他の態様において、電気泳動移動度の改変を利用することにより、B7-4 遺伝子における突然変異が確認されよう。例えば、1 本鎖立体配座多型 (SSCP) を用いることにより、突然変異体および野生型核酸間における電気泳動移動度の差異を検出してよい (Orita ら (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 2766、Cotton (1993) Mutat.Res. 285: 125-144、および Hayashi (1992) Genet.Anal.Tech.Appl. 9: 73-79 も参照)。サンプルおよび対照 B7-4 核酸の 1 本鎖 DNA 断片は変成され、そして復元されよう。1 本鎖核酸の 2 次構造は配列により変化し、電気泳動移動度が改変されることにより、単一塩基の変化でさえ検出可能となる。DNA 断片は標識されるかまたは標識プローブにより検出されよう。検定法の感度は (DNA よりも) RNA を用いることにより高められ得、この場合 2 次構造は配列変化に対する感受性が高くなる。好ましい態様において、対象方法はヘテロデュプレックス分析を用いることにより、電気泳動移動度の変化に基いて 2 本鎖ヘテロデュプレックス分子を分離する (Keen ら (1991) Trends Genet. 7: 5)。

【0242】

さらに別の態様では、変性勾配ゲル電気泳動 (DGGE) を用いて、変性剤の勾配を含むポリアクリルアミドゲルにおける突然変異体または野生型断片の動きを検定する (Myers ら (1985) Nature 313: 495)。DGGE を分析方法として使用するとき、DNA に修飾を加え、例えば PCR によって約 40bp の高融解性 GC-リッチ DNA の GC クランプを付加することにより、完全には変性しないということが確実にされ得る。他の態様において、温度勾配が変性勾配の代わりに使用され、対照およびサンプル DNA の移動度の差異が確認される (Rosenbaum および Reissner (1987) Biophys.Chem. 265: 12753)。

【0243】

他の点突然変異検出技術の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅または選択的プライマー伸長があるが、これらに限定はされない。例えば、既知突然変異が中央に配置され、次いで完全マッチが見出される場合のみハイブリダイゼーションさせ得る条件下標的 DNA とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーが製造され得る (Saiki ら (1986) Nature 324: 163、Saiki ら (1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86: 6230)。オリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーション膜に結合させ、標識標的 DNA とハイブリダイズさせるとき、上記対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは PCR 増幅標的 DNA または若干の異なる突然変異体とハイブリダイゼーションされる。

【0244】

別法として、選択的 PCR 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術を本発明に関連して使用してよい。特異的増幅用プライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、興味の対象である突然変異を分子の中心 (従って、増幅は分別的ハイブリダイゼーションによる) (Gibbs ら (1989) Nucleic Acids Res. 17: 2437-2448) または、適当な条件下で mismatches によりポリメラーゼ伸長が阻止または低減化され得る一プライマーの先端 3' 末端 (Prossner ら (1993) Tibtech 11: 238) に担い得る。さらに突然変異領域に新規制限部位を導入して開裂に基く検出手段を作成することが望ましいものであり得る (Gasparini ら (1992) Mol.Cell Probes 6: 1)。ある種の態様では、また

増幅用Taqリガーゼを用いても増幅が遂行され得ると予測される (Barany (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189)。かかる場合では、5'配列の3'末端に完全マッチが存在する場合のみ連結反応が起こるため、増幅の存在または非存在を探すことにより特異的部位における既知突然変異の存在の検出が可能となる。

【0245】

本明細書記載の方法は、例えば、ここに記載されている少なくとも1種のプローブ核酸または抗体試薬を含む予めパッケージされた診断用キットを利用することにより遂行され、好都合にはこれを例えば臨床設定で使用するにより、B7-4遺伝子に関与する疾患または病気の徴候または家族歴を呈する患者を診断することができよう。

【0246】

さらに、B7-4が発現される細胞型または組織であれば、本明細書に記載された予知的(予後)検定で利用することができよう。

【0247】

VII. B7-4調節(モジュレーション)物質の投与

本発明のB7-4調節物質は、T細胞仲介免疫応答を促進または抑制するためインビボ(in vivo)医薬投与に適した生物学的適合形態で対象に投与される。「インビボ投与に適した生物学的適合形態」は、投与されるタンパク質の形態でタンパク質の治療効果が毒性作用より影響力がある場合を包含する。対象の語は、免疫応答が誘導され得る生きている生物体、例えば哺乳類を包含するものとする。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラットおよびそのトランスジェニック種がある。本明細書に記載された薬剤の投与は、治療活性量の薬剤を単独または医薬的に許容し得る担体と組み合わせて含む薬理学的形態で行われ得る。

【0248】

本発明治療組成物の治療活性量の投与は、所望の成果を達成するのに必要な用量および期間に有効な量として定義される。例えば、B7-4ポリペプチドの治療活性量は、様々な因子、例えば個体の病状、年齢、性別および体重、並びに個体において所望の応答を誘導するペプチドの能力により異なり得る。服用方法を調節することにより、最適治療応答が提供されよう。例えば、幾つかの分割用量を毎日投与するかまたは治療状況の緊急性が示すところに従い用量を比例的に低減化してよい。

【0249】

B7-4調節物質(例、ペプチド、核酸分子、または抗体)は、慣用的方法で例えば注射(皮下、静脈内など)、経口投与、吸入、経皮適用または直腸投与により投与してよい。投与経路により、活性化合物は、化合物を不活化し得る酵素、酸および他の自然条件の作用から化合物を保護する物質でコーティングされよう。例えば、非経口投与以外の方法によりB7-4調節物質を投与するためには、ペプチドの不活化を阻止する物質でペプチドをコーティングするかまたはその物質とペプチドを共投与するのが望ましい場合があり得る。

【0250】

B7-4調節物質は、適当な担体、希釈液またはアジュバント中で個体に投与され得、酵素阻害剤と共にまたは適当な担体、例えばリポソーム中で共投与され得る。医薬的に許容し得る希釈液には、食塩水および水性緩衝液がある。アジュバントはその最も広い意味で使用されており、免疫刺激性化合物、例えばインターフェロンも包含する。ここで考えられるアジュバントには、レゾルシノール類、非イオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルがある。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート(DEEP)およびトラシロールがある。リポソームには、水中油中水型乳剤および慣用的リポソームが含まれる(Sternaら(1984) J.Neuroimmunol. 7:27)。

【0251】

活性化合物はまた、非経口的または腹腔内的に投与され得る。また、分散液もグリセリン、液体ポリエチレングリコールおよびその混合物および油中で製造され得る。通常の貯蔵

10

20

30

40

50

および使用条件下では、これらの製剤は微生物の増殖を阻止するための保存剤を含み得る。

【0252】

注射可能用途に適した医薬組成物には、滅菌水溶液（水可溶性の場合）または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液の即座製造用滅菌粉末がある。どの場合も、組成物は無菌状態でなくてはならず、容易に注射できる程度には流動性がなくてはならない。組成物は製造および貯蔵条件下で安定していなくてはならず、微生物、例えば細菌および真菌の汚染作用から保護されなければならない。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセリン、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびその適当な混合物を含む溶媒または分散媒質であり得る。適切な流動性は、例えば、コーティング、例えばレシチンの使用、分散液の場合には要求される粒子サイズの維持および界面活性剤の使用により維持され得る。微生物作用の阻止は、様々な抗菌および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサルなどにより達成され得る。多くの場合、等張剤、例えば糖類、ポリアルコール類、例えばマニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを組成物中に含ませるのが好ましい。注射可能組成物の長期間吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを組成物に含ませることにより達成され得る。

10

【0253】

滅菌注射可能溶液は、上記で列挙された成分の一つまたは組み合わせと共に適当な溶媒中必要とされる量で活性化合物（例、B7-4ポリペプチド）を組み込んだ後、必要に応じて滅菌濾過することにより製造され得る。一般的に、分散液は、基本的分散媒質および上記で列挙されたものから必要とされる他の成分を含む滅菌賦形剤中に活性化合物を組み込むことにより製造される。滅菌注射可能溶液製造用滅菌粉末の場合、好ましい製造方法は、真空乾燥および凍結乾燥であり、有効成分（例、ペプチド）と先に滅菌濾過された溶液からの追加的な所望の成分があればそれも含む粉末が生成される。

20

【0254】

上記要領で、活性化合物が好適に保護されている場合、タンパク質は例えば不活性希釈液または同化性食用担体により経口投与され得る。ここで使用されている「医薬的に許容し得る担体」は、あらゆる溶媒、分散媒質、コーティング、抗菌および抗真菌剤、等張および吸収遅延剤などを全て包含する。医薬的活性物質用の上記媒質および薬剤の使用は当業界ではよく知られている。慣用的媒質または薬剤が活性化合物と不適合性である場合を除き、治療組成物中におけるその使用が考えられる。また補足的活性化合物も組成物中に組み込まれ得る。

30

【0255】

投与を容易にし、用量を均一にするために非経口組成物を単位用量形態で製剤化するのが特に有利である。ここで使用されている単位用量形態は、処置される哺乳類対象に対する単位用量として適した物理的に独立した単位を包含し、各単位は、必要とされる医薬用担体と共に所望の治療効果を生じるよう計算された予め定められた量の活性化合物を含む。本発明の単位用量形態に関する具体的内容は、（a）活性化合物特有の特徴および達成すべき特定の治療効果、および（b）個体における感受性を処置するため上記活性化合物を調合する場合の当技術分野固有の限界により直接的に規定される。

40

【0256】

本発明の一態様では、B7-4タンパク質に対する抗体の治療有効量が対象に投与される。ここで定義されている抗体の治療有効量（すなわち有効用量）は、約0.001~30mg/kg（体重）、好ましくは約0.01~25mg/kg（体重）、さらに好ましくは約0.1~20mg/kg（体重）、さらに好ましくは約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kgまたは5~6mg/kg（体重）の範囲である。熟練した専門家であれば、ある種の因子が対象を効果的に処置するのに要求される用量に影響し得、それには病気または障害の重症度、先行処置、対象の全般的健康状態および／または年齢、並びに他に存在する病気が含まれるが限定はされないことを認めるはずである。さらに、治療有効量の

50

抗体による対象の処置は、単一処置を含み得るかまたは、好ましくは一連の処置を含み得る。好ましい例では、対象を、約1～10週間、好ましくは約2～8週間、さらに好ましくは約3～7週間、さらに好ましくは約4、5または6週間、週に1回約0.1～20mg/kg（体重）の範囲の抗体で処理する。また、処置に使用される抗体の有効用量は特定処置の経過中に増加または減少し得ると考えられる。用量の変化は本明細書記載の診断的検定の結果によるものであり得る。

【0257】

B7-4タンパク質の発現または活性に対する薬剤（例、薬物または化合物）の影響のモニタリングは、基本的薬剤スクリーニングでも臨床試験でも適用され得る。例えば、B7-4遺伝子発現、タンパク質レベルを増加させるかまたはB7-4活性をアップレギュレーションするものとして本明細書記載のスクリーニング検定法により測定された薬剤の有効性は、B7-4遺伝子発現、タンパク質レベルの減少、またはB7-4活性のダウンレギュレーションを呈する対象の臨床試験でモニターされ得る。他方、B7-4遺伝子発現、タンパク質レベルを減少させるか、またはB7-4活性をダウンレギュレーションするものとしてスクリーニング検定により測定された薬剤の有効性は、B7-4遺伝子発現、タンパク質レベルの増加、またはB7-4活性のアップレギュレーションを呈する対象の臨床試験でモニターされ得る。上記臨床試験において、B7-4遺伝子、および好ましくは、疾患に関連した他の遺伝子の発現または活性は、特定細胞の表現型の「リードアウト」またはマーカーとして使用され得る。

【0258】

限定を意図したものではないが、例えば、B7-4活性を調節する（例、本明細書記載のスクリーニング検定法で確認された）薬剤（例、化合物、薬物または小分子）処理により細胞で調節される遺伝子、例えばB7-4が同定され得る。すなわち、例えば臨床試験においてB7-4関連疾患に対する薬剤の効果を試験するために、細胞を単離し、RNAを調製し、B7-4およびB7-4関連疾患に関連する他の遺伝子の発現レベルについてそれぞれ分析し得る。遺伝子発現レベル（すなわち、遺伝子発現パターン）は、本明細書に記載された、ノーザン・ブロット分析またはRT-PCRにより、または別法として本明細書記載の方法の一つにより、生産されたタンパク質の量を測定することにより、またはB7-4または他の遺伝子の活性レベルを測定することにより定量され得る。この点で、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答の指標である、マーカーとしての役割を果たし得る。従って、この応答状態は、個体の薬剤処置の前、およびその間の様々な時点で測定されよう。

【0259】

好ましい態様において、本発明は、薬剤（例、本明細書記載のスクリーニング検定法により確認されたアゴニスト、アンタゴニスト、ペプチドミメティクス、タンパク質、ペプチド、核酸、小分子または他の薬剤候補）による対象の処置の有効性をモニターする方法であって、(i) 薬剤投与前に対象から投与前サンプルを入手し、(ii) 投与前サンプルにおいてB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現レベルを検出し、(iii) 対象から1個またはそれ以上の投与後サンプルを入手し、(iv) 投与後サンプルにおいてB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性レベルを検出し、(v) 投与前サンプルにおけるB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの発現または活性レベルを、投与後サンプル（複数も可）におけるB7-4タンパク質、mRNAまたはゲノムDNAの場合と比較し、および(vi) それによって対象への薬剤投与を改変する段階を含む方法を提供する。例えば、薬剤投与の増加は、B7-4の発現または活性を検出されたレベルよりも高くする、すなわち薬剤の有効性を高めるのに望ましい手段であり得る。他方、薬剤投与の減少は、B7-4の発現または活性を検出されたレベルよりも低くする、すなわち薬剤の有効性を低下させるのに望ましい手段であり得る。かかる態様によると、B7-4発現または活性は、観察可能な表現型応答の非存在下であっても、薬剤有効性の指標として使用できよう。

【0260】

以下、実施例によりこの発明をさらに説明するが、それらを限定としてみなすべきではない。この出願全体を通して引用された全ての参考文献、特許および公開特許出願の内容、並びに図面および配列リストは出典明示により本明細書の一部とする。

【0261】

(実施例)

実施例 1. B7-4 cDNA 分子の単離

ヒト B7-1 の細胞外ドメインのタンパク質配列を用いることにより、相同性ポリペプチドをコード化する核酸分子について公開データベースを検索した。EST データベースにおける 2 種のオーバーラップ配列 AA292201 および AA399416 が同定された。これらの配列を用いて、次の要領でヒト活性化ケラチノサイトおよび胎盤 cDNA ライブラリーから完全長 B7-4 cDNA を単離した。

【0262】

これらの EST から配列 CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA および AGGTGCTAGGGGACAGTGTTAGACA をもつオリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドを用いることにより、濾胞性リンパ腫の症例の脾臓、活性化 B 細胞、INF- γ 活性化ケラチノサイト、正常な脾臓および胎盤からの mRNA の逆転写により調製された cDNA を鋳型として用いて PCR 反応をプライミングした。条件は、94℃で 1 分、94℃で 30 秒、56℃で 30 秒、68℃で 1 分を 35 サイクル、68℃で 3 分、4℃保持であった。鋳型は全て 389bp の予測されたサイズのバンドを与えた。INF- γ 活性化ケラチノサイトの PCR からの 389bp 産物を、アガロースゲル電気泳動により精製し、0.05 ミリモルのピオチン-21-dUTP および上記プライマーを含む PCR 反応において 0.12 ng を鋳型として使用した。条件は、94℃で 1 分、94℃で 30 秒、56℃で 30 秒、68℃で 2 分を 20 サイクル、68℃で 5 分、4℃保持であった。ピオチニル化 PCR 産物をヌクレオスピнкаラム (クロンテク) で精製し、クロンキャプチャー cDNA 選別方法 (クロンテク) においてプローブとして使用した。60 ng の変性ピオチニル化 PCR 産物を、30 μ l の最終体積中 2 ミリモルの CoCl_2 、1 $\times$ RecA 緩衝液、1 μ g の RecA タンパク質、1 $\times$ ATP とインキュベーションした。反応物を 37℃で 15 分インキュベーションした。0.7 μ g の活性化ケラチノサイト cDNA ライブラリーのプラスミド DNA および 0.4 μ g のヒト胎盤 cDNA ライブラリーを加え、インキュベーションを 20 分間続行した。50 ng の EcoRV 消化ラムダ DNA を反応物に加え、5 分間インキュベーションした。0.6 μ l の 10% SDS および 5.6 μ g のプロテインゼ K を加え、37℃で 10 分間インキュベーションした。1 μ g の 0.1 モル PMSF を加えることにより、プロテインゼ K を不活化した。ストレプトアビジン磁気ビーズを 10 分間剪断したサケ精液 DNA 5 μ g とプレインキュベーションし、ビーズを磁石で捕捉し、上清を除去し、ビーズを 30 μ l の結合緩衝液 (1 ミリモルの EDTA、1 モルの NaCl、10 ミリモルのトリス-HCl、pH 7.5) に再懸濁した。ビーズを反応物に加え、反応物を室温で穏やかに混合しながら 30 分間インキュベーションした。ビーズを磁石で捕捉し、上清を除去した。ビーズを 1 ml の洗浄緩衝液 (1 ミリモルの EDTA、2 モルの NaCl、10 ミリモルのトリス-HCl、pH 7.5) で洗浄し、ビーズを磁石で捕捉し、上清を除去した。洗浄手順を 3 回反復した。1 ml の滅菌 H_2O を洗浄したビーズに加え、37℃で 5 分間インキュベーションし、ビーズを磁石で捕捉し、上清を除去した。0.1 ml の溶離緩衝液 (1 ミリモルの EDTA、0.1 N の NaOH) を加え、室温で 5 分間インキュベーションすることにより捕捉された DNA を溶離し、ビーズを磁石で捕捉し、上清を除去し、新しい管に取っておいた。担体および pH 中和剤を含む沈澱混合物 22.5 μ l を 2.5 倍量のエタノールと一緒に加えた。プラスミド DNA を遠心分離により濃縮し、 H_2O に再溶解した。プラスミド DNA を電気穿孔によりエシェリキア・コリ (E.coli) DH10B/P3 へ再導入し、7.5 μ g/ml のテトラサイクリンおよび 25 μ g/ml のアンピシリンを含む LB-寒天プレートで選別した。コロニーをナイトランフィルターに取り上げ、CAGCTATGGTGGTGCCGACTACAA、AGGTGCTAGGGGACAGTGTTAGACA、および TCGCTTG

10

20

30

40

50

T A G T C G G C A C C A C C A T A の配列をもつ 32 P 標識オリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた。オリゴは全て A A 2 9 2 2 0 1 配列からである。最終洗浄条件は、 $2\times$ S S C、0.1% S D S、5 5℃で 2 0 分間であった。2つのハイブリダイズしているコロニーを採取し、c D N A 挿入体の配列を決定した。

【0263】

配列決定により、2形態の B 7-4 分子が示された。第1形態の分泌された B 7-4 (B 7-4 S) は、膜アンカーを伴わず短い疎水性ドメインを有するタンパク質をコード化する。この形態のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 1 および 2 に示されている。第2形態の B 7-4 膜 (B 7-4 M) は、貫膜および短い細胞質ドメインを有するタンパク質をコード化する。この形態のヌクレオチドおよびアミノ酸配列は、それぞれ配列番号 3 および 4 に示されている。同定された B 7-4 ファミリーの両構成員は、図 3 および 4 で説明されているように、シグナル、I g V および I g C ドメインを有する。B 7-4 M 形態は、B 7-1 および B 7-2 が約 2 6 % の同一性を有する場合の条件下、存在 1 1 および伸長 1 で設定されたギャップペナルティでデフォルト Blosum 6 2 マトリックスを用いて計算したところ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> 参照) ヒト B 7-1 とは約 2 1 % のアミノ酸同一性およびヒト B 7-2 とは約 2 0 % のアミノ酸同一性を有する。

10

【0264】

実施例 2. B 7-4 m R N A の発現

B 7-4 の可溶性形態の m R N A は、他のサイズもあり得るが、約 1.2 kb であると予測される。第2形態の m R N A は約 3.8 kb であり、少数の m R N A は 1.6 および 6.5 kb である。

20

【0265】

B 7-4 ポリペプチドの発現を分析した。グアニジンチオシアネートによるホモジネート化および塩化セシウム遠心分離により R N A を調製した。等量の R N A (約 2 μ g ポリ (A) + R N A) をアガロースゲル電気泳動にかけ、プロットし、そして B 7-4 S および B 7-4 M の両形態に共通した 32 P 標識 B 7-4 c D N A の一部分とハイブリダイズさせた。これらの B 7-4 m R N A は、胎盤、肺および心臓では高度発現され、胸腺では中程度に発現される。さらに、これらの B 7-4 ポリペプチドは、骨格筋、腎臓、脾臓、前立腺、精巣、卵巣、小腸、結腸および末梢血白血球では弱く発現される。それらはまた、肝臓または脳では非常に弱く発現されることが見出された。B 7-4 m R N A は非刺激単球では発現されなかったが、I F N- γ により強く誘導された。同様に、これらのポリペプチドの発現は、T P A / I F N- γ によりケラチノサイトで、および I F N- γ により樹状細胞で誘導されることが見出された。これらの B 7-4 m R N A は、非刺激 B 細胞では発現されなかったが、I g 架橋により誘導された。

30

【0266】

また、これらの B 7-4 m R N A の発現を様々なセルラインで調べた。それらが B セルライン、例えば Raji、Ramos、L B L、Nalm 6 および D H L-4 では発現されるところは見出されなかった。それらはまた、T セルライン、例えば Jurkat、Rex、C E M、H P B - A L L、Peer 4 および H 9 または H T L V-1 形質転換 T セルライン、例えば S P P および M T 2 または脊髄系 U 9 3 7 では発現されなかった。

40

【0267】

実施例 3. T 細胞リガンドまたは抗体への B 7-4 分子の結合

C O S 細胞をベクター D N A (p c D N A I)、または B 7-4 M c D N A を含む発現プラスミドによりトランスフェクションした。72 時間後、トランスフェクションされた C O S 細胞を、37℃で 30 分間 0.5 ミリモル E D T A 含有 P B S 中においてインキュベーションすることにより脱離させた。

【0268】

B 7-4 M を発現する C O S 細胞が様々な T 細胞受容体および抗体に結合する能力を試験した。B 7-4 トランスフェクション C O S 細胞による C D 2 8 I g、C T L A 4-I g および対照 I g の結合の F A C S 分析は、C D 2 8 I g も C T L A 4-I g も B 7-4 と

50

は結合しないことを示した(図8)。B7-4Mを発現するCOS細胞がIgGおよびネズミICOS-his 融合タンパク質に結合する能力についても試験した。ヒトB7-4とネズミICOSの結合は全く検出されなかった(図9)。図10に示されているところによると、FACS分析は、BB1(抗B7-1および抗B7-3)の結合を示したが、B7-4トランスフェクションCOS細胞に対するIgMまたは133(抗B7)抗体については示さなかった(示した実験では不安定トランスフェクタントを使用)。

【0269】

実施例4. B7-4分子によるT細胞増殖の共刺激

B7-4ポリペプチドがヒトT細胞増殖を共刺激する能力を試験した。

先に報告されているように(Gimmi, C.D.ら(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90、6586-6590)、B細胞、ナチュラルキラー細胞およびマクロファージに対して指向したモノクローナル抗体を用いた免疫磁気ビーズ枯渇法によりヒトCD28⁺T細胞を単離した。B7-4およびベクタートランスフェクションCOS細胞をトランスフェクションの72時間後に採取し、1時間25 μl/mlのマイトマイシン-Cとインキュベーションし、十分に洗浄した。特定の試験を受けたことがない10⁵のT細胞を、プレート結合抗CD3 mAb+示されたDNA構築物によりトランスフェクションされた20000のマイトマイシン-c処理COS細胞により刺激した。

【0270】

72時間インキュベーションの最後の12時間に組込まれた3H-チミジン(1 μCi)によりT細胞増殖を測定した。図11および12に示されている通り、B7-4を発現するCOS細胞は、T細胞増殖を共刺激し得る。

【0271】

実施例5. B7-4 mRNA発現のさらなる特性検定:ノーザン・ブロット分析

マウスおよびヒト多重組織ノーザン・ブロット(クロンテク、パロアルト、カリフォルニア)を、製造業者の使用説明書に従いQuickHyb(ストラタジーン、ラジョラ、カリフォルニア)において³²P-dCTP放射性標識cDNAプローブによりプローブした。ヒトB7-4プローブは、配列番号1のコーディング領域および3'非翻訳領域に及ぶcDNAの1kb BamHI/NotI断片により構成された。マウスB7-4プローブは、コーディング領域からの300bp cDNA断片により構成された。対照アクチンプローブはクロンテクにより供給された。ブロットを、室温で2×SSC、0.1% SDS、次に65℃で0.2×SSC、0.1% SDS中2回洗浄し、オートラジオグラフィーにより調べた。

【0272】

B7-4 mRNAは、心臓、ヒト胎盤およびヒト胎児肝臓では高レベルで、そして脾臓、リンパ節、胸腺およびマウス肝臓では低レベルで発現された。

【0273】

B7-4 mRNAは、PU5-1.8、RAW264.7、K-Balb、M-MSV-Balb/3T3、Hepa1-6、R1.1、L1210、P38D1、P815およびNB41A3細胞を含む、様々な形質転換マウスセルラインで発現された。

【0274】

実施例6. B7-4 mRNA発現のさらなる特性検定

抗原提示細胞におけるB7-4 mRNA発現を調べ、それらの細胞におけるB7-1およびB7-2の発現と比較した。

【0275】

RNAブロットハイブリダイゼーションの場合、1.6kbヒトおよび3.6kbネズミB7-4 cDNAをXbaI消化により切除し、γ-³²P-ATPおよびDNAポリメラーゼIのクレノウ断片での無作為プライミングにより標識した。Freeman, G.J.ら(1992) J. Immunol. 149: 3795-3801の記載に従いRNAブロットをハイブリダイズさせた。

【0276】

ヒト樹状細胞を末梢血から取り出した。フィコル勾配での分画化後、単核細胞を単離した。非付着細胞を除去し、残りの細胞を150 ng/ml ヒト GM-CSF (R&D システムズ) および 100 ng/ml ヒト IL-4 (R&D システムズ) 中で2日間培養した。非付着樹状細胞を単離し (CD80⁺ CD86⁺ HLA-DR⁺ CD54⁺ CD58⁺ CD1a⁺)、GM-CSF 単独で培養するかまたは GM-CSF、2.5 µg/ml LPS (シグマ・ケミカルズ) および 10 µg/ml のヒトインターフェロン-γ により活性化した。活性化の4時間および20時間後に、細胞を採取し、RNeasyキット (キアゲン) を用いて RNA を単離した。

【0277】

磁気活性化細胞選別によりネズミ骨髄単核細胞から顆粒球、リンパ球および Ia⁺ 細胞を免疫枯渇させ、ペトリ皿で GM-CSF および IL-4 により培養した。樹状細胞を培養7日後の非付着集団として採取すると、75-80% CD11c⁺、高 Ia⁺ 細胞であることが立証された。細胞を LPS およびヒトインターフェロン-γ により活性化した。

【0278】

RNA プロットハイブリダイゼーションによるヒト血液単核細胞における発現の分析は、B7-2 が非刺激単核細胞により発現されることはないが、インターフェロン-γ 処理時には急速にアップレギュレーションされることを立証した。別のプロ炎症性サイトカイン、腫瘍壊死因子 (TNF) -α で単核細胞を処理すると、培地単独の場合に見出されるのと類似した低レベルの誘導がもたらされたが、これはプラスチックへの付着による活性化の結果であると思われる。主要 4.2 kb B7-4 mRNA に加えて、少数の 1.8 kb B7-4 mRNA 群もインターフェロン-γ 処理単核細胞において観察された。Raji セルラインによってではなく、細胞表面免疫グロブリン架橋により活性化されたヒト B 細胞による B7-4 の発現もまた観察された。同様に、B7-1 は非刺激単核細胞により発現されることはないが、B7-4 発現と類似した速度論でインターフェロン-γ に応答してアップレギュレーションされる。対照的に、B7-2 mRNA は単核細胞で構成的に発現され、インターフェロン-γ または TNF-α 処理はレベルに影響を及ぼさない。

【0279】

B7-1、B7-2 および B7-4 の発現パターンは異なる。CD28 および CTLA-4 のリガンドの一つである B7-2 は単球に構成的に発現するが、B7-1 および B7-2 の構成的発現はいかなる器官にもみられない。B7-1 および B7-2 の発現は、樹状細胞、マクロファージおよび B 細胞 (Boussiotis, 1996. Immunol. Rev. 153:5)、ならびにある種の繊維芽細胞および上皮細胞で誘導することができる。これに対し、B7-4 は非リンパ系実質臓器、例えば心臓、胎盤、骨格筋、および肺に構成的に発現するが、小腸では発現しない。B7-4 はある種の癌にも発現する。

【0280】

ネズミ組織において、約 3.7 kb の B7-4 mRNA 転写物がノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより検出された。ネズミ B7-4 mRNA の分布はヒト B7-4 のそれと密接に近似しており、心臓、胸腺および肺では高レベルであり、腎臓、脾臓および肝臓では低レベルであった。

【0281】

実施例 7. B7-4 の染色体局在性

B7-4 遺伝子の染色体局在性を、クァンタム (トロント、カナダ) から購入できる単染色体ブロットキットを用いて測定した。B7-4 S および B7-4 M の両方を認識する配列でブロットをプローブした。この方法を用いると、B7-4 ポリペプチドはヒト染色体 9 に局在し、B7-1 および B7-2 はヒト染色体 3 に局在していた。ブチロフィリン類はまた、B7-4 群との限られたアミノ酸配列同一性を共有しており、染色体 6 における主要組織適合性遺伝子複合体に局在していた。B7-4 の染色体位置は、クァンタム・テクノロジーズ (カナダ) から入手され得る単染色体体細胞ハイブリッド DNA 鋳型の PCR 増幅における B7-4 特異的プライマーを用いて確認された。

【0282】

実施例 8. B7-4 に対するネズミ抗体の生成

ネズミまたはヒト B7-4 cDNA を含む哺乳類発現ベクター (pEF6 または pcDNA3.1 (インビトロゲン)) を製造した。cDNA/ベクター構築物を、1 mg/ml で 0.9% 食塩水に溶かした (TE または PBS ではない)。

【0283】

免疫化前、0.9% 食塩水中 1 mg/ml の心臓毒素 (シグマ #C-1777) 78 µl を、免疫化されているマウスの各後脚の前脛骨筋に注射した。次いで、各マウスを 5 日間単独で放置した。

【0284】

マウスに麻酔をかけた後、1 mg/ml 精製 B7-4 cDNA/ベクター構築物 (0.9% 食塩水中) 50 µl を、各再生前脛骨筋に注射した。

【0285】

免疫化の約 6 日後標準方法を用いて、例えば ELISA 検定法で抗体力価を測定した。cDNA 免疫化を 3 サイクルの間 2-4 週間ごとに反復した (抗体力価が > 1:10000 になるまで)。次いで、B7-4 でトランスフェクションした CHO 細胞によりマウスをブーストした。

【0286】

適当な抗体力価を有するマウスから単離した脾臓細胞を採取した。脾臓細胞を融合相手 SP2-0 と融合することによりハイブリドーマを製造した。ハイブリドーマおよび抗体を、標準方法を用いて操作した (例えば、“Antibodies: A Laboratory Manual”, Harlow, E. および Lane, D., コールドスプリングハーバー・ラボラトリー (1988) 参照、出典明示により本明細書の一部とする)。

【0287】

抗体 2A3、10D9、5A9 および 11D12 は、スクリーニング検定法で選択されたものに含まれた。これらの抗体は、ヒト B7-4 によりトランスフェクションされた COS または CHO 細胞には結合するが、模擬トランスフェクション細胞またはマウス B7-4 によりトランスフェクションされた細胞には結合しないことが見出された。抗体を用いることにより、様々な細胞集団における B7-4 の存在が検出された。B7-4 発現は、特に心臓組織、腫瘍細胞 (肺腫瘍細胞、卵巣腫瘍細胞、胸部腫瘍細胞、上皮腫瘍細胞および扁平上皮癌を含む)、胎盤および胸腺上皮で観察された。

【0288】

実施例 9. B7-4 に対する完全ヒト抗体の産生

この実施例では、B7-4 に対する完全ヒト抗体を、ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるマウスで産生させる。トランスジェニックマウスは、標準的方法を用いて、例えば Hogan ら、“Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual” (コールドスプリングハーバー・ラボラトリー、出典明示により本明細書の一部とする) に従い製造されるかまたは購入される。胚性幹細胞を公開された方法 (Teratocarcinomas and embryonic stem cells: a practical approach, Robertson, E.J. 編、IRL プレス、ワシントン DC、1987、Zijlstra ら (1989) Nature 342: 435-438、および Schwartzberg ら (1989) Science 246: 799-803、各々出典明示により本明細書の一部とする) に従い操作する。DNA クローニング方法は、Sambrook, J. ら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第 2 版 (1989、コールドスプリングハーバー・ラボラトリー・プレス、コールドスプリングハーバー、ニューヨーク、出典明示により本明細書の一部とする) に従い実施される。オリゴヌクレオチドは、例えばアプライド・バイオシステムズのオリゴヌクレオチド合成装置で製造業者により提供された仕様書に従い合成するかまたは購入する。

【0289】

精製または組換え B7-4 または B7-4 の細胞外ドメインの免疫原性部分を少なくとも含む融合タンパク質を用いてトランスジェニックマウスを免疫化する。100 µL の燐酸緩衝食塩水 (PBS) 中約 400 µg の B7-4 を、各マウスに腹腔内注射する。約 6 日

10

20

30

40

50

後後方眼窩洞出血により血清サンプルを集める。

【0290】

B7-4に関する抗体反応性および特異性を、間接的酵素結合イムノソルベント検定法（ELISA）を用いて評価する。幾つかの免疫グロブリンスーパーファミリー分子を対照（例、CTLA4およびCD28）として試験することにより、B7-4に関する抗体の抗体特異性を分析する。PD-L2に結合するヒトフレームワーク領域を有する抗体は、マウス免疫グロブリンとの交差反応性をもたないヒトIgMおよびヒトIgGサブクラスに特異的な酵素コンジュゲートにより検出される。簡単に述べると、PVCマイクロタイタープレートは、PBS中5 µg/mL B7-4により37℃で一夜ウェルをコーティングすることにより、B7-4でコーティングされる。血清サンプルをPBS、5%血清、0.5%トウィーン-20中で希釈し、ウェルにおいて室温で1時間、次いで同希釈液中抗ヒトIgG FcおよびIgG F(ab')₂ホースラディッシュペルオキシダーゼまたは抗ヒトIgM Fcホースラディッシュペルオキシダーゼとインキュベーションする。室温で1時間後、ABTS基質（シグマ、セントルイス、ミズーリ）を加えることにより酵素活性を評価し、415-490nmで30分後読み取る。同マウスからの免疫前血清サンプルにおいて、同じ標的抗原に対するヒト抗体の力価についても試験する。

10

【0291】

適当な抗体力価を有するマウスから単離された脾臓細胞を採取する。脾臓細胞を適当な融合相手（例、骨髓腫細胞）に融合することにより、ハイブリドーマが製造される。“Antibodies: A Laboratory Manual” Ed Harlowおよび David Lane（コールドスプリングハーバー・ラボラトリー（1988）、出典明示により本明細書の一部とする）に従いハイブリドーマおよび抗体に操作を加える。

20

【0292】

均等内容事項

当業界の熟練した専門家であれば、ここに記載された本発明の実施態様について多くの均等内容事項を認めるはずであり、または常用の実験を用いるだけでそれらを確認することができるはずである。かかる均等内容事項は、本明細書の請求の範囲に包含されるものとする。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ヒト分泌B7-4、B7-4Sをコードするヌクレオチド配列を示す。

30

【図2】 ヒトB7-4、B7-4Mをコードするヌクレオチド配列を示す。

【図3】 ヒトB7-4Sのアミノ酸配列、およびシグナル、IgV、IgC、および親水性尾部ドメインを示す。

【図4】 ヒトB7-4Mのアミノ酸配列、およびシグナル、IgV、IgC、および貫膜および細胞質ドメインを示す。

【図5】 ネズミB7-4のヌクレオチド配列を示す。

【図6】 ネズミB7-4のアミノ酸配列を示す。

【図7】 ヒトおよびネズミB7-4アミノ酸配列のアラインメントを示す。

【図8】 B7-4M-トランスフェクトCOS細胞によるCD28Ig、CTLA4-Ig、およびコントロールIgの結合のFACS分析結果を示す。

40

【図9】 B7-4M-トランスフェクトCOS細胞によるIgGおよびネズミICOS-his融合タンパク質の結合のFACS分析結果を示す。

【図10】 B7-4M-トランスフェクトCOS細胞に対するIgM、BB1および133抗体の結合のFACS分析結果を示す。

【図11】 B7-4M (292)でトランスフェクトしたCOS細胞がT細胞の増殖を共刺激することができることを示す。

【図12】 B7-4M (292)でトランスフェクトしたCOS細胞がT細胞の増殖を共刺激することができることを示す。

【図 1】

GCITCCCGAGGCTCCGACCGCGCTTCTGTCGCGCTGCAGGGCATTCCAGAAAGA
 GAAAGATGAGGATATTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGTCTG
 AACGCATTTACTGTCCAGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTA
 GCAATATGACAATTGAATGCAAAATCCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGC
 TGCAATAATTGTCTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATTCAATTGTGC
 ATGGAGAGGAAGACCTGAAGGTTACGATAGTAGCTACAGACAGAGGGGCC
 GGCTGTTGAAGACCGCTCTCCCTGGGAAATGTGCACCTTCAGATCACAGA
 TGTGAAATTGCAGGATGCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAOCTATGGTGT
 GCCGACTACAAGGAATTTACTGTGAAAGTCAATGGCCATACAAACAAATCA
 ACCAAAGAAATTTGTGTGTGATCCAGTCACTTGAACATGAATGAATGT
 CAGGCTGAGGGCTACCCCAAGGCCGAAGTCACTCTGGACAAGCAGTGAACATC
 AAGTCTGTGAGTGTGAAGACCACCAACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAAGC
 TTTTCAATGTGACCAAGCAGCACTGAGAATCAACACAACAATAATGAGATTT
 CTACTGCACCTTTAGGAGATTAGATCCTGAGGAAACCATACAGCTGAATTG
 GTCATCCAGGTAATATTCTGAATGTGTCCATTAAATATGTCTAACACTGTC
 CCTAGCACTAGCATGATGTCTGCCTATCATGATCATTCAGTGAATTTGTA
 TAAATGAATGAATGAATAACACTATTGTTACAAAATATATCCTAATTCCTCAC
 CTCCATTATCCAAACCATATTGTTACTTAATAAACATTGACAGATATTTAT
 GGAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

FIGURE 1

【図 2】

CGAGGCTCCGACCGAGCGGCTTCTGTCGCGCTGCAGGGCATTCCAGAAAGA
 TGAGGATATTGCTGTCTTTATATTCATGACCTACTGGCATTGTCTGAACGCAAT
 TACTGTCCAGGTTCCCAAGGACCTATATGTGGTAGAGTATGGTAGCAATATGAC
 AATTGAATTGCAAAATTCAGTAGAAAAACAATTAGACCTGGCTGCACAAATGT
 CTATTGGGAAATGGAGGATAAGAACATTATCAATTGTGCAATGGAGAGGAG
 ACCTGAAGGTTTCAGCATAGTAGCTACAGACAGAGGGGCCGCTGTGTAAGGAC
 CAGCTCTCCCTGGGAAATGTGCACCTTCAGATCACAGATGTGAAATTCAGGAT
 GCAGGGGTGTACCGCTGCATGATCAGCTATGGTGGTGCCGACTACAAGCGAAT
 TACTGTGAAAGTCAATGCCCATACAAACAAATCAACCAAGCAATTTGTGTGT
 GGAATCCAGTCACTCTGAACATGAACAGATGTGACAGCTGAGGGCTACCTCA
 AGGCCGAAGTCACTTGGACAAGCAGTGAACATCAAGTCTGTGAGTGAAGACC
 ACCACCAACCAATTCCAAGAGAGAGGAGAGGCTTTTCAATGTGAACGACACT
 GAGAATCAACACAACAATAATGAGATTTTCTACTGCACTTTAGGAGATTAGA
 TCTGTGAGGAAACCATACAGCTGAATGTGTGATCCAGAACTACCTGTGGACA
 TCTTCAAAATGAAGGACTCACTTGGTAATTCCTGGAGGCCATCTTATTATGCCCT
 GTGTAGCACTGACATTCATCTTCCTTTAAGAAAGGAGGAGATGATGATGT
 GAAAAAATGTGGCATCCAAGATACAAACTCAAGAAAGCAAGGATGATACATTT
 GGAGGAGACGTAAATCCAGCAATGGAACTTCTGATCTTCAAGCAGGAGATTCTCA
 ACTGTGTGTTTAGGGGTTCTTCCGGGCTGAGCTGACAAAGAGGAAGGAATGG
 GCCGTGGGATGCAGGCAATGTGGGACTTAAAGGCCCAAGCACTGAAAAATG
 GAACCTGGGAAAGCAGAGAGGAGGAATGAAGAAAGATGGAGTCAACACAGG
 AGCCTGGAGGAGGACCTTGATCTTTCAAATGCCGTGAGGGGCTCATCGAGCC
 TGTGACAGGAGAGAAAGGATCTCTGAACAAGGAGCTCCCAAGCAATCATCC
 ATTGCTCATCTTAGGAAGACGGGTTGAGAATCCCTAATTTGAGGGTCAGTTCT
 GCAGAAGTGCCCTTTGCTCTCCACTCAATGCCCTCAATTTGTTTCTGCATGACTGA
 GAGTCTCAGTGTGGAAACGGGACAGTATTATGATGAGTGTTCCTATTATT
 TGAGTCTGTGAGGTCTTCTGTCATGTGAGTGTGTGTGAATGATTTCTTTGA
 AGATATATTGTAGATGTTACAAATTTGTCCGCAAACTAAACCTTGTCTCTAA
 TGATTGCTCAGATCTAGTAAAAACATGGAGTATTGTAAAAA

FIGURE 2

【図 3】

292 分泌 (245 アミノ酸)

シグナル / IgV / IgC / 親水性基

(a) (b) (c) (d)

Ig システイン、大太字

MRIFAVFIFMTYWHLLNA (シグナル)

FTVTPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYEMEDKN
 IIQFVHGEEDLKVQHSYRQARLLKQDLSLGNALQITDVKLQD
 AGVRCMSYGGADYKRITVKVNAPY (IgV)

NKINQRLVVDVPTSEHLETCQAEYKPAEVIWTSDDHQVLSGKT
 TITNSKREKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
 VIP (IgC)

GNILNVSIIKICLTLPST (親水性基)

FIGURE 3

【図 4】

292 膜 (290 アミノ酸)

シグナル / IgV / IgC / 質膜 (下線)

+ 細胞質

Ig システイン、大太字

MRIFAVFIFMTYWHLLNA (シグナル)

FTVTPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYEMEDKN
 IIQFVHGEEDLKVQHSYRQARLLKQDLSLGNALQITDVKLQD
 AGVRCMSYGGADYKRITVKVNAPY (IgV)

NKINQRLVVDVPTSEHLETCQAEYKPAEVIWTSDDHQVLSGKT
 TITNSKREKLFNVTSLRINTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAEL
 VIP (IgC)

ELPLAHPNERTHLVILGAILLGLVALTFELRLKGRMDVKKC
 GIQDTNSKKQSDHLEET (質膜 + 細胞質)

FIGURE 4

Figure 5

Figure 5
(continued)

Figure 6

69%

Figure 7

【図 8】

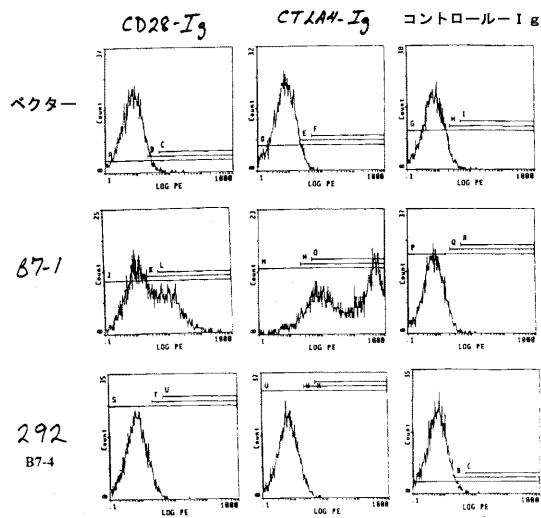


Figure 8

【図 9】

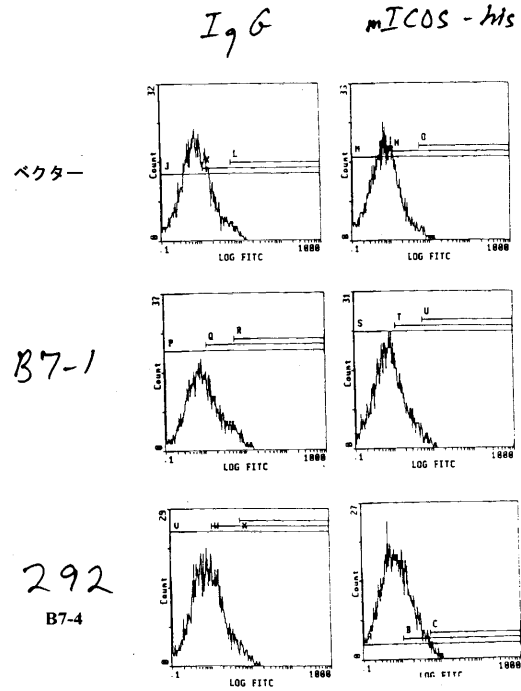


Figure 9

【図 10】

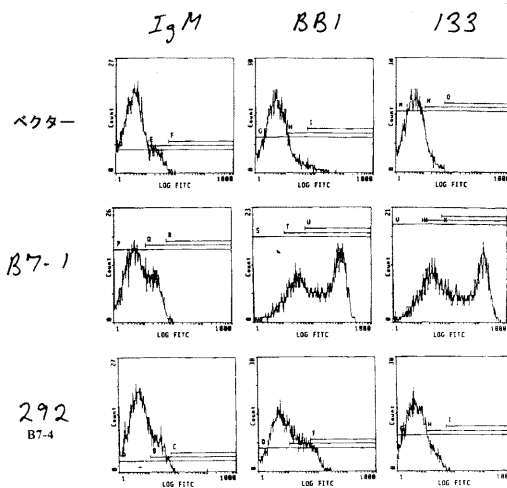
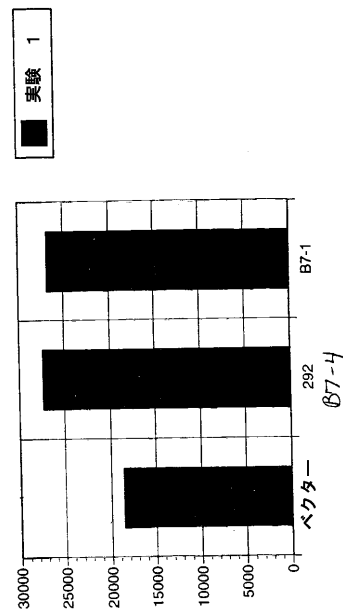


Figure 10

【図 11】



【図 12】

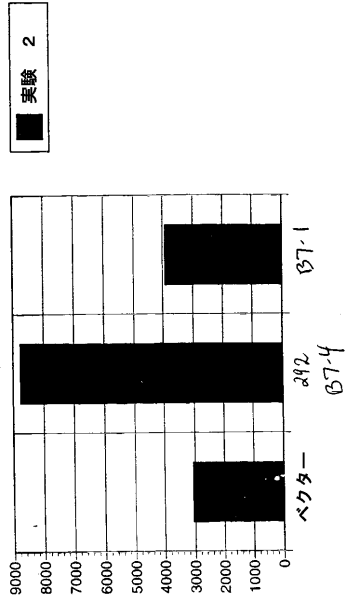


FIGURE 12

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N 1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N 5/00 1 0 1
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P 21/02 C
A 6 1 K	38/00	(2006.01)	A 6 1 K 37/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N 33/53 D

- (72)発明者 ゴードン・フリーマン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ブルックライン、ウォールナット・ストリート 3 0 5 番
- (72)発明者 バシリキ・ブーシオティス
アメリカ合衆国 0 2 1 4 6 マサチューセッツ州ブルックライン、ワシントン・ストリート 4 4 番、
アパートメント・ナンバー 4 0 3
- (72)発明者 タチアナ・チェルノワ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ブライトン、ナンバー 2、サミット・アベニュー 3 2 8 番
- (72)発明者 ネリー・マレンコビッチ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州ボストン、ハンティントン・アベニュー 6 5 0 番

審査官 藤井 美穂

- (56)参考文献 特開 2 0 0 2 - 1 9 1 3 6 3 (J P, A)
特表 2 0 0 3 - 5 0 7 4 9 1 (J P, A)
J. Immunol., 1 9 9 8 年, Vol.161, pp.5943-5951
実験医学増刊, 1 9 9 7 年, Vol.15, No.11, pp.1336-1340
Journal of Biological Chemistry, 1 9 9 5 年, Vol.270, No.36, pp.21181-21187
NATURE MEDICINE, 1 9 9 9 年 1 2 月 1 日, Vol.5 No.12, pp.1365-1369
J. Exp. Med., 2 0 0 0 年 1 0 月, Vol.192, No.7, pp.1027-1034
Wilson RK, Definition:zt50f01.r1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAG
E:725785 5-, mRNA sequence, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AA292201
, Apr 2 1997 uploaded, 2 0 1 0 年 7 月 1 3 日, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?val=1940188&sat=EST&satkey=933376>>
Wilson RK, Definition:zt50f01.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAG
E:725785 3-, mRNA sequence, Database DDBJ/EMBL/GenBank [online], Accession No.AA399416
, Apr 2 1997 uploaded, 2 0 1 0 年 7 月 1 3 日, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sviewer/viewer.fcgi?val=2053179&sat=EST&satkey=1040948>>

- (58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)
- C12N 1/00 - 7/08
C12N 15/00 - 15/90
C12N 9/00 - 9/99
C12P 1/00 - 41/00
UniProt/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)

专利名称(译)	新型B7-4分子及其用途		
公开(公告)号	JP5004390B2	公开(公告)日	2012-08-22
申请号	JP2001518869	申请日	2000-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	Dana Farber癌症研究所有限公司		
[标]发明人	ゴードンフリーマン バシリキブーシオティス タチアナチエルノワ ネリーマレンコビッチ		
发明人	ゴードン・フリーマン バシリキ・ブーシオティス タチアナ・チエルノワ ネリー・マレンコビッチ		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 A61K38/00 G01N33/53 G01N33/50 A61K39/00 A61K39/395 A61K45/06 A61P35/00 A61P37/02 C12N15/12 G01N33/15		
CPC分类号	A61K45/06 A61K39/00 A61K2039/55516 C07K14/70503 C07K14/70532 C07K16/2803 C07K16/2827 C07K2317/21 C07K2317/24 C07K2317/622 C07K2319/30		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/705 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C A61K37/02 G01N33/53.D		
代理人(译)	新田正弘		
审查员(译)	藤井美穂		
优先权	60/150390 1999-08-23 US		
其他公开文献	JP2003507069A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了分离的核酸分子，命名为B7-4核酸分子，其编码新的B7-4多肽。本发明还提供了反义核酸分子，含有B7-4核酸分子的重组表达载体，已导入表达载体的宿主细胞，以及已引入或破坏B7-4基因的非人转基因动物。本发明还进一步提供了分离的B7-4蛋白，融合蛋白，抗原肽和抗B7-4抗体。还提供了利用本发明组合物的诊断，筛选和治疗方法。

292 膜 (2907ミ/膜)

シグナル/IgV/IgC/ 重鎖 (下線)
+ 軽鎖質

Ig システイン、大キ

NRIFAVFIETWHLNA (シグナル)

FTVVPKDLVVEYGSNMTECKFPVEKQLDLAALIVYWMEDKN
IIQFVHGEEDLVKHSSYRQRARLLKQSLGNAALQITDVKLQD
AGVYRCMISYGGADYKRIIVKVNAPY (49)

NKINQRLIVDPVPTSEHETCQAGGYPKAEVINTSSDHQVLSGKT
TTTNSKREELFWVYSTLRINTTNEIFYCTPRRLDPENHTAEL
VIP (49)

ELPLAHPNERTHLVIGAILLCIGVALTEFLERLAKGRMMVKKC
GIQDTNSKKQSDHLEET (重鎖 + 軽鎖質)