

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532624

(P2004-532624A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004. 10. 28)

|                                    |                |             |
|------------------------------------|----------------|-------------|
| (51) Int. Cl. <sup>7</sup>         | F I            | テーマコード (参考) |
| <b>C 1 2 N 15/09</b>               | C 1 2 N 15/00  | 4 B O 2 4   |
| <b>A O 1 K 67/027</b>              | A O 1 K 67/027 | 4 B O 6 3   |
| <b>A 6 1 K 35/14</b>               | A 6 1 K 35/14  | 4 B O 6 4   |
| <b>A 6 1 K 35/26</b>               | A 6 1 K 35/26  | 4 B O 6 5   |
| <b>A 6 1 K 35/28</b>               | A 6 1 K 35/28  | 4 C O 8 4   |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 346 頁) 最終頁に続く |                |             |

|               |                              |          |                          |
|---------------|------------------------------|----------|--------------------------|
| (21) 出願番号     | 特願2002-570683 (P2002-570683) | (71) 出願人 | 500049831                |
| (86) (22) 出願日 | 平成14年3月4日 (2002. 3. 4)       |          | ザイモジェネティクス, インコーポレイテ     |
| (85) 翻訳文提出日   | 平成15年9月2日 (2003. 9. 2)       |          | イド                       |
| (86) 国際出願番号   | PCT/US2002/006267            |          | アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 2 |
| (87) 国際公開番号   | W02002/070655                |          | , シアトル, イーストレイク アベニュー    |
| (87) 国際公開日    | 平成14年9月12日 (2002. 9. 12)     |          | イースト 1 2 0 1             |
| (31) 優先権主張番号  | 60/273, 035                  | (74) 代理人 | 100099759                |
| (32) 優先日      | 平成13年3月2日 (2001. 3. 2)       |          | 弁理士 青木 篤                 |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      | (74) 代理人 | 100077517                |
| (31) 優先権主張番号  | 60/279, 232                  |          | 弁理士 石田 敬                 |
| (32) 優先日      | 平成13年3月27日 (2001. 3. 27)     | (74) 代理人 | 100087871                |
| (33) 優先権主張国   | 米国 (US)                      |          | 弁理士 福本 積                 |
|               |                              | (74) 代理人 | 100087413                |
|               |                              |          | 弁理士 古賀 哲次                |
| 最終頁に続く        |                              |          |                          |

(54) 【発明の名称】 マウスサイトカイン受容体

## (57) 【要約】

サイトカイン類及びそれらの受容体は、基本的研究、動物モデルにおいて、及び治療剤として有用であることがわかっている。本発明は、IL - TIFサイトカインを結合し、そして拮抗する、“マウスZcytor16”と称する新規サイトカイン受容体を供給する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

- (a) アミノ酸残基 24 ~ 230 ;
- (b) アミノ酸残基 27 ~ 230 ;
- (c) アミノ酸残基 27 ~ 126 ; 及び
- (d) アミノ酸残基 131 ~ 230 から成る群からの、配列番号 38 又は配列番号 48 のアミノ酸配列の少なくとも 15 個の連続したアミノ酸残基を含んで成る単離されたポリペプチド。

## 【請求項 2】

前記ポリペプチドが、

- (a) アミノ酸残基 24 ~ 230 ;
- (b) アミノ酸残基 27 ~ 230 ;
- (c) アミノ酸残基 27 ~ 126 ; 及び
- (d) アミノ酸残基 131 ~ 230 から成る群からの、配列番号 38 又は配列番号 48 のアミノ酸配列を含んで成る請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

10

## 【請求項 3】

前記ポリペプチドが、

- (a) アミノ酸残基 24 ~ 230 ;
- (b) アミノ酸残基 27 ~ 230 ;
- (c) アミノ酸残基 27 ~ 126 ; 及び
- (d) アミノ酸残基 131 ~ 230 から成る群からの、配列番号 38 又は配列番号 48 のアミノ酸配列から成る請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

20

## 【請求項 4】

- (a) アミノ酸残基 24 ~ 230 ;
- (b) アミノ酸残基 27 ~ 230 ;
- (c) アミノ酸残基 27 ~ 126 ; 及び
- (d) アミノ酸残基 131 ~ 230 から成る群からの、配列番号 38 又は配列番号 48 の対照アミノ酸配列に対して少なくとも 90 % 同一であるアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

## 【請求項 5】

前記単離されたポリペプチドが、

- (a) アミノ酸残基 24 ~ 230 ;
- (b) アミノ酸残基 27 ~ 230 ;
- (c) アミノ酸残基 27 ~ 126 ; 及び
- (d) アミノ酸残基 131 ~ 230 から成る群からの、配列番号 38 又は配列番号 48 のアミノ酸配列を含んで成る請求項 4 記載の単離されたポリペプチド。

30

## 【請求項 6】

- (a) 配列番号 39 又は配列番号 49 のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、又は (b) 配列番号 37 又は配列番号 47 のヌクレオチド 8 ~ 697、もしくは 77 ~ 697、もしくは 86 ~ 697 のヌクレオチド配列、又は配列番号 37 又は配列番号 47 のヌクレオチド 8 ~ 697、もしくは 77 ~ 697、もしくは 86 ~ 697 のヌクレオチド配列の相補体から成る核酸分子に対して、緊縮洗浄条件下でハイブリダイズされたまま存続する核酸分子のいずれかである単離された核酸分子。

40

## 【請求項 7】

前記核酸分子によりコードされるアミノ酸配列と、配列番号 38 又は配列番号 48 のその対応するアミノ酸配列との間のいずれかの差異が、保存性アミノ酸置換による請求項 6 記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 8】

配列番号 37 又は配列番号 47 のヌクレオチド 8 ~ 697、もしくは 77 ~ 697、もしくは 86 ~ 697 のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 6 記載の単離された核酸分子。

## 【請求項 9】

50

請求項8記載の単離された核酸分子を含んで成るベクター。

【請求項10】

請求項8記載の単離された核酸分子、転写プロモーター及び転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターであって、前記プロモーターが前記核酸分子により操作可能に連結され、そして前記核酸分子が前記転写ターミネーターにより作用可能に連結される発現ベクター。

【請求項11】

細菌、酵母細胞、菌類細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞及び植物細胞の群から選択された、請求項10記載の発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞。

【請求項12】

マウスZcytor16タンパク質の生成方法であって、請求項10記載の発現ベクターを含んで成り、そして前記マウスZcytor16タンパク質を生成する組換え宿主細胞を培養することを含んで成る方法。

【請求項13】

前記培養された組換え宿主細胞からマウスZcytor16タンパク質を単離することをさらに含んで成る請求項12記載の方法。

【請求項14】

請求項3記載のポリペプチドと結合する抗体又は抗体フラグメント。

【請求項15】

前記抗体が、(a)ポリクローナル抗体、(b)ネズミモノクローナル抗体、(c)(b)に由来するヒト適合された抗体、及び(d)ヒトモノクローナル抗体から成る群から選択される請求項14記載の抗体。

【請求項16】

請求項14記載の抗体と特異的に結合する抗-イディオタイプ抗体。

【請求項17】

請求項3記載のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質。

【請求項18】

前記融合タンパク質が、免疫グロブリン成分をさらに含んで成る請求項17記載の融合タンパク質。

【請求項19】

アミノ酸24~230又は27~230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記アミノ酸差異が保存性アミノ酸置換から成り；そして前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドがIL-TIFを結合するか、又はIL-TIF活性を拮抗することを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項20】

前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、ホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項19記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項21】

前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項20記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項22】

前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド(配列番号35)、可溶性IL-10受容体ポリペプチド(配列番号36)、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド(配列番号34)をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項20記載の単離されたポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチド。

【請求項 23】

アミノ酸 24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドであって、前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドがホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成することを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 24】

前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成る請求項23記載の単離されたポリヌクレオチド。

10

【請求項 25】

前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項23記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 26】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドがさらに、細胞内ドメインをコードする請求項23記載の単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 27】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドがさらに、親和性標識を含んで成る請求項23記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 28】

次の作用可能に連続された要素：

（a）転写プロモーター；アミノ酸 24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸配列を有する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第1 DNAセグメント；及び転写ターミネーター；及び

（b）第2 転写プロモーター；可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第2 DNAセグメント；及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記第1 及び第2 DNAセグメントが単一の発現のベクター内に含まれるか、又は独立した発現ベクター内に含まれることを特徴とする発現ベクター。

30

【請求項 29】

前記第1 及び第2 DNAセグメントに作用可能に連結される分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項28記載の発現ベクター。

【請求項 30】

前記第2 DNAセグメントが、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）を含んで成るポリペプチドをコードする請求項28記載の発現ベクター。

【請求項 31】

請求項28記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する培養された細胞。

40

【請求項 32】

請求項28記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記第1 及び第2 DNAセグメントが独立した発現ベクター上に位置し、そして細胞中に同時トランスフェクトされ、そして細胞が前記DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する培養された細胞。

【請求項 33】

請求項28記載の発現ベクターを導入されている培養された細胞であって、前記DNAセグメントによりコードされるヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体ポリペプチドを発現

50

する培養された細胞。

【請求項 3 4】

前記細胞が、可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドヘテロダイマー又はマルチマー複合体を分泌する請求項31記載の細胞。

【請求項 3 5】

前記細胞が、IL - TIFを結合し、又はIL - TIF活性を拮抗する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドヘテロダイマー又はマルチマー複合体を分泌する請求項31記載の細胞。

【請求項 3 6】

下記成分：

アミノ酸 24 ~ 230又は27 ~ 230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を有するポリペプチドをコードする第1 DNAセグメント；及び可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り枠を整合して連結され；そして前記第1及び他のDNAセグメントが前記融合タンパク質をコードすることを特徴とするDNA構造体。 10

【請求項 3 7】

少なくとも1つの他のDNAセグメントが、可溶性CRF2 - 4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL - 10受容体ポリペプチド（配列番号36）又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）を含んで成るポリペプチドをコードする請求項36記載のDNA構造体。 20

【請求項 3 8】

次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

請求項36記載の融合タンパク質をコードするDNA構造体；及び

転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターであって、

前記プロモーターが前記DNA構造体に作用可能に連結され、そして前記DNA構造体が前記転写ターミネーターに作用可能に連結されることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 3 9】

請求項38記載の発現ベクターを含んで成る培養された細胞であって、前記DNA構造体によりコードされるポリペプチドを発現する細胞。 30

【請求項 4 0】

融合タンパク質の生成方法であって、

請求項39記載の細胞を培養し；そして

前記細胞により生成されるポリペプチドを単離することを含んで成る方法。

【請求項 4 1】

アミノ酸 24 ~ 230又は27 ~ 230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る、IL - TIFを結合するか又はIL - TIF活性を拮抗する単離された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチド。 40

【請求項 4 2】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、ホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項41記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4 3】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項42記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4 4】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性CRF2 - 4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL - 10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体 50

複合体を形成する請求項42記載の単離されたポリペプチド。

【請求項45】

アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る単離された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドであって、前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドがホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成することを特徴とする単離されたポリヌクレオチド。

【請求項46】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項45記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項47】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）を含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する請求項45記載の単離されたポリペプチド。

【請求項48】

前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドが、親和性標識、化学的成分、毒素又はラベルをさらに含んで成る請求項45記載の単離されたポリペプチド。

【請求項49】

可溶性受容体サブユニットを含んで成り、ここで前記可溶性受容体サブユニットの少なくとも1つが、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体。

20

【請求項50】

可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドをさらに含んで成る請求項49記載の単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体。

【請求項51】

可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成る請求項49記載の単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体。

30

【請求項52】

ヘテロダイマー又はマルチマー複合体を形成する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドの生成方法であって、  
請求項31記載の細胞を培養し；そして  
前記細胞により生成される可溶性受容体ポリペプチドを単離することを含んで成る方法。

【請求項53】

可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドに対する抗体を生成するための方法であって、  
下記群：

（a）アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドを含んで成るモノマー又はホモダイマー可溶性受容体を含んで成るポリペプチド；

40

（b）可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチド；

（c）可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチド；及び

（d）可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチドから選択された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドにより動物を接種し；ここで

50

前記ポリペプチドが、抗体を生成するために前記動物において免疫応答を誘発し；そして前記動物から抗体を単離することを含んで成る方法。

【請求項54】

アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドを含んで成るホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体に対して特異的に結合する、請求項53記載の方法により生成される抗体。

【請求項55】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項54記載の抗体。

【請求項56】

請求項49記載のホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体に対して特異的に結合する抗体。 10

【請求項57】

造血細胞及び造血細胞前駆体のIL-TIF-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法であって、可溶性サイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるような可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物と共に骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る方法。

【請求項58】

前記造血細胞及び造血前駆体細胞が、リンパ球である請求項57記載の方法。 20

【請求項59】

前記リンパ球が、マクロファージ又はT細胞である請求項58記載の方法。

【請求項60】

IL-TIF-誘発された又はIL-9誘発された炎症を低めるための方法であって、炎症を低めるために十分な量の、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドの組成物を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る方法。

【請求項61】

炎症を有する哺乳類において炎症応答を抑制するための方法であって、

(1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定し； 30

(2) 医薬的に許容できるビークル中、請求項41記載の可溶性マウスZcytor16サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；

(3) 血清アミロイドAタンパク質の後-投与レベルを決定し；

(4) 段階(3)における血清アミロイドAタンパク質のレベルに、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較することを含んで成り、ここで血清アミロイドAタンパク質レベルの上昇又は下降の欠失が炎症応答の抑制の表示である方法。

【請求項62】

患者における癌を検出するための方法であって、

患者から組織又は生物学的サンプルを得；

前記組織又は生物学的サンプルを、請求項14記載の抗体と共に、前記抗体が前記組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし； 40

前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合される抗体を可視化し；そして

正常な対照組織又は生物学的サンプルに、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される抗体のレベルを比較し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに対する、前記患者組織又は生物学的サンプルに結合される抗体のレベルの上昇が前記患者における癌の表示である方法。

【請求項63】

患者における癌を検出するための方法であって、

患者から組織又は生物学的サンプルを得； 50

配列番号37又は配列番号47の少なくとも14個の連続したヌクレオチド又は配列番号37又は配列番号47の補体を含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；

前記組織又は生物学的サンプルを、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイズする条件下でインキュベートし；

前記組織又は生物学的サンプルにおける前記ラベルされたポリヌクレオチドを可視化し；そして

正常な対照組織又は生物学的サンプルに対して、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおけるラベルされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのレベルを比較し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、前記患者組織又は生物学的サンプルに対するラベルにされたポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの上昇が前記患者における癌の表示である方法。

10

【請求項64】

配列番号38又は配列番号48の残基1～230もしくは24～230もしくは27～230を過剰発現するトランスジェニックマウス。

【請求項65】

前記配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230又は27～230の発現が、組織 - 特異的又は組織 - 制限されたプロモーターを用いて発現される請求項64記載のトランスジェニックマウス。

【請求項66】

前記配列番号38又は配列番号48の残基1～230もしくは24～230もしくは27～230の発現が、上皮 - 特異的、結腸 - 特異的又は卵巣 - 特異的プロモーターを用いて発現される請求項64記載のトランスジェニックマウス。

20

【請求項67】

前記マウスが、正常なマウスに比較して、配列番号38又は配列番号48の残基1～230もしくは24～230もしくは27～230を発現しない請求項64記載のトランスジェニックマウス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は一般的に、ヒトZcytor16（アメリカ特許出願番号第09/728,911号）に対するネズミオルト体である、マウス細胞により発現される新規タンパク質に関する。特に、本発明は、“マウスZcytor 16”と称する受容体をコードする新規遺伝子、及びマウスZcytor 16ポリペプチド、及び前記ポリペプチドに対する抗体をコードする核酸分子に関する。

30

【背景技術】

【0002】

サイトカインは、多くの細胞型の増殖及び分化の調節を包含する種々の生物学的効果を仲介する可溶性の小さなタンパク質である（例えば、Araiなど., *Annu. Rev. Biochem.* 56: 783 (1990); Mosmann, *Curr. Opin. Immunol.* 3:311 (1991); Paul and Seder, *Cell* 76: 241 (1994) を参照のこと）。サイトカイングループを構成するタンパク質は、インターロイキン、インターフェロン、コロニー刺激因子、腫瘍壊死因子及び他の調節分子を包含する。例えば、ヒトインターロイキン - 17は、インターロイキン - 6、細胞内付着分子1、インターロイキン - 8、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子の発現、及びプロスタグランジンE2発現を刺激し、そしてCD34<sup>+</sup>造血前駆体の好中球への選択的成熟において役割を演じるサイトカインである。（Yaoなど., *J. Immunol.* 155: 5483 (1995); Fossiez など., *J. Exp. Med.* 183: 2593 (1996)）。

40

【0003】

サイトカインを結合する受容体は典型的には、高い親和性でサイトカインを結合し、そしてこの結合現象を、一定の受容体サブユニットの細胞質部分を通して細胞にトランスダクションする1又は複数の膜内在性タンパク質から構成される。サイトカイン受容体は、それらの細胞外リガンド結合ドメインにおける類似性に基づいて、いくつかのクラスに分類されている。例えば、インターフェロンの結合及び/又はその効果のトランスダクション

50



を担当する受容体鎖は、特徴的な200個の残基の細胞外ドメインに基づいて、タイプIIサイトカイン受容体ファミリーのメンバーである。

サイトカイン及びそれらの受容体の明らかにされたインビボ活性は、他のサイトカイン、サイトカイン受容体、サイトカインアゴニスト及びサイトカインアンタゴニストの臨床学的可能性及びそれらについての必要性を示す。

#### 【発明の開示】

##### 【0004】

本発明は、“マウスZcytor 16”と称する新規受容体を提供する。本発明はまた、マウスZcytor16ポリペプチド及びマウスZcytor16融合タンパク質、並びにそのようなポリペプチド及びタンパク質をコードする核酸分子、及びそれらの核酸分子及びアミノ酸配列の使用 10 方法を提供する。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0005】

##### 1. 概観：

マウスZcytor 16をコードする実例のヌクレオチド配列は、配列番号37により提供される。コードされるポリペプチドは、次ぎのアミノ酸配列を有する：

##### 【0006】

##### 【化1】

MMPKHCLLGL LILLSSATE IQPARVSLTL QKVRFQSRNF  
HNILHWQAGS SLPSNNSIYF VQYKMYGQSQ WEDKVDCWGT TALFCDLTNE  
TLDPYELYYG RVMTACAGRH SAWTRTPRFT PWWETKLDPP VVTITRVNAS  
LRVLLRPPEL PNRNQSGKNA SMETYYGLVY RVFTINNSLE KEQKAYEGTQ  
RAVEIEGLIP HSSYCVVAEM YQPMFDRRSP RSKERCVQIP (配列番号：38)

20

##### 【0007】

前記230個のアミノ酸ポリペプチドは、新規クラスIIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインとしても呼ばれる細胞外ドメインを表す。Zcytor16ポリペプチドの特徴は、配列番号38のアミノ酸残基1～23での推定上のシグナル配列、及び配列番号38の残基24～230からの成熟可溶性受容体ポリペプチドを包含する。前記受容体は、配列番号38のアミノ酸残基31～122(フィブロネクチンIIIドメインI)、及び131～229(フィブロネクチンIIIドメインII)含んで成るクラスIIサイトカイン受容体ファミリーの特徴を示す、免疫グロブリンスーパーファミリー(Ig)ドメインとも呼ばれる2種のフィブロネクチンIIIドメイン、及びIgドメイン間に存在するリンカー(すなわち、配列番号38のアミノ酸残基127～130での)を有する。従って、本発明の分子は、配列番号38のアミノ酸31～229を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。 40

##### 【0008】

さらに、Zcytor16ポリペプチドの追加の変異体は、配列番号38のアミノ酸残基27～122、24～122、31～126、27～126又は24～126(フィブロネクチンIIIドメインI)、及び131～229又は230(フィブロネクチンIIIドメインII)を含んで成るポリペプチド、及びIgドメイン間に存在するリンカー(すなわち、配列番号38のアミノ酸残基123～130又は127～130での)を包含する。従って、本発明の分子は、配列番号38のアミノ酸24又は27～229又は230を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。さらに、Zcytor 16は、クラスIIサイトカインの特徴を示す次の保存されたモチーフ及び残基を含む：配列番号38の残基219～222からのSXWS(配列番号46)-様モチーフ；配列番号38の残基46、71及び113での保存されたトリプトファン残基；及び配列番号38の残基77、85、205及び226 50

での保存されたシステイン残基。

【0009】

マウスZcytor16遺伝子は、肺、脾臓、胎盤、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、平滑筋、脾臓、胃及び精巣cDNAにおいて特に発現され、そして特定の単核細胞、例えば活性化されたT-細胞及びB-細胞サブセットにおいて発現されることが予測される。ポリペプチド配列の一例整列は、マウスZcytor16（配列番号38）が図1に示されるようなヒトZytor16配列（配列番号2）（アメリカ特許出願第09/728,911号）のオルト体であることを示す。マウスZcytor 16をコードする実例のヌクレオチド配列は、配列番号47により提供される。コードされるポリペプチドは、次ぎのアミノ酸配列を有する：

【0010】

【化2】

MMPKHCLLGL LILLSSATE IQPARVSLTPQ

KVRFQSRNFH

NILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWEDKVCWGTTALFCDLTNETLD

PYELYYGRVMTACAGRHSWTRTPRFTPPWWETKLDPPVVTITRVNASLRVLL

RPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTTNSLEKEQKAYEGTQRAVEIEGLI

PHSSYCVVAEMYQPMFDRRSPRSKERCVHIP（配列番号：48）。

【0011】

前記230個のアミノ酸ポリペプチドは、新規クラスIIサイトカイン受容体のサイトカイン-結合ドメインとしても呼ばれる細胞外ドメインを表す。配列番号48の配列は、次の2種のアミノ酸により配列番号38とは異なる：配列番号38に示されるアミノ酸30（Leu）及び28（Gln）は、配列番号48に示されるアミノ酸30（Pro）及び228（His）である。Zcytor16ポリペプチドの特徴は、配列番号48のアミノ酸残基1～23での推定上のシグナル配列、及び配列番号48の残基24～230からの成熟可溶性受容体ポリペプチドを包含する。前記受容体は、配列番号48のアミノ酸残基31～122（フィブロネクチンIIIドメインI）、及び131～229（フィブロネクチンIIIドメインII）含んで成るクラスIIサイトカイン受容体ファミリーの特徴を示す、免疫グロブリンスーパーファミリー（Ig）ドメインとも呼ばれる2種のフィブロネクチンIIIドメイン、及びIgドメイン間に存在するリンカー（すなわち、配列番号48のアミノ酸残基127～130での）を有する。

【0012】

従って、本発明の分子は、配列番号48のアミノ酸31～229を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。さらに、Zcytor16ポリペプチドの追加の変異体は、配列番号48のアミノ酸残基27～122、24～122、31～126、27～126又は24～126（フィブロネクチンIIIドメインI）、及び131～229又は230（フィブロネクチンIIIドメインII）を含んで成るポリペプチド、及びIgドメイン間に存在するリンカー（すなわち、配列番号48のアミノ酸残基123～130又は127～130での）を包含する。

【0013】

従って、本発明の分子は、配列番号48のアミノ酸24又は27～229又は230を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。さらに、Zcytor16は、クラスIIサイトカインの特徴を示す次の保存されたモチーフ及び残基を含む：配列番号48の残基219～222からのSXWS（配列番号46）-様モチーフ；配列番号48の残基46、71及び113での保存されたトリプトファン残基；及び配列番号48の残基77、85、205及び226での保存されたシ

10

20

30

40

50

ステイン残基。

ヒトZcytor 16をコードする実例のヌクレオチド配列は、配列番号 1 により提供される。

コードされるポリペプチドは、次ぎのアミノ酸配列を有する：

【 0 0 1 4 】

【 化 3 】

MMPKHCFLGF LISFLTGVA GTQSTHESLK PQRVQFQSRN  
 FHNILQWQPG RALTGNSSVY FVQYKIYGQR QWKNKEDCWG TQELSCDLTS  
 ETSDIQEPYY GRVRAASAGS YSEWSMTPRF TPWWETKIDP PVMNITQVNG  
 SLLVLHAPN LPYRYQKEKN VSIEDYYELL YRVFIINNSL EKEQKVYEGA  
 HRAVEIEALT PHSSYCVVAE IYQPMLDRRS QRSEERCVEI P (配列番号：2).

10

【 0 0 1 5 】

前記231個のアミノ酸ポリペプチドは、新規クラスIIサイトカイン受容体のサイトカイン結合ドメインとしても呼ばれる細胞外ドメインを表す。Zcytor16ポリペプチドの特徴は、配列番号2のアミノ酸残基1～21又は1～22での推定上のシグナル配列、及び配列番号2の残基22～231又は23～231からの成熟可溶性受容体ポリペプチドを包含する。前記受容体は、配列番号2のアミノ酸残基32～123(フィブロネクチンIIIドメインI)、及び132～230(フィブロネクチンIIIドメインII)含んで成るクラスIIサイトカイン受容体ファミリーの特徴を示す、免疫グロブリンスーパーファミリー(Ig)ドメインとも呼ばれる2種のフィブロネクチンIIIドメイン、及びIgドメイン間に存在するリンカー(すなわち、配列番号2のアミノ酸残基128～131での)を有する。

20

【 0 0 1 6 】

従って、本発明の分子は、配列番号2のアミノ酸32～230を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。さらに、Zcytor16ポリペプチドの追加の変異体は、配列番号2のアミノ酸残基28～123、23～123、22～123、又は32～127、28～127又は23～127、22～127(フィブロネクチンIIIドメインI)、及び132～230又は231(フィブロネクチンIIIドメインII)を含んで成るポリペプチド、及びIgドメイン間に存在するリンカー(すなわち、配列番号2のアミノ酸残基124～131又は128～131での)を包含する。

30

【 0 0 1 7 】

従って、本発明の分子は、配列番号2のアミノ酸22、23又は28～132～230又は231を含んで成るサイトカイン結合ドメインを含むポリペプチドを包含する。さらに、Zcytor16は、クラスIIサイトカインの特徴を示す次の保存されたモチーフ及び残基を含む：配列番号2の残基220～223からのSXWS(配列番号46)様モチーフ；配列番号2の残基47、72及び114での保存されたトリプトファン残基；及び配列番号2の残基78、86、206及び227での保存されたシステイン残基。Zcytor16遺伝子は、単球、リンパ球、胎盤、脾臓、扁桃及び他の組織において発現され、そしてヒト染色体6q23-q24に存在する。

40

【 0 0 1 8 】

上記に記載されるZcytor16ポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列をコードするそれらの対応するポリヌクレオチドは、配列番号1(ヒトZcytor16)及び配列番号37、及び配列番号47(マウスZcytor16)に示される通りである。

【 0 0 1 9 】

下記のように、本発明は、(a)アミノ酸残基24～230又は27～230、(b)アミノ酸残基27～126、(c)アミノ酸残基131～230、及び(d)アミノ酸残基1～230から成る群から選択された、配列番号38又は配列番号48の対照アミノ酸配列に対して少なくとも70%、少

50

なくとも80%、又は少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んで成る単離されたポリペプチドを提供する。本発明はまた、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列から成るポリペプチドと特異的に結合する抗体と特異的に結合する、上記に開示されるような単離されたポリペプチドを提供する。例示的ポリペプチドは、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24~230又は27~230のいずれかを含んで成るポリペプチド又は本明細書に記載されるそのフラグメントを包含する。さらに、本発明はまた、IL-TIF(例えば、配列番号15で示されるようなヒトIL-TIFポリペプチド配列、又は配列番号41で示されるようなマウスIL-TIFポリペプチド配列)を結合する、上記に開示されるような単離されたポリペプチドを提供する。ヒトIL-TIFポリヌクレオチド配列は、配列番号14で示される。マウスIL-TIFポリヌクレオチド配列は、配列番号40で示される。

10

**【0020】**

本発明はまた、(a)アミノ酸残基24~230、又は27~230、(b)アミノ酸残基27~126、(c)アミノ酸残基131~230、及び(d)アミノ酸残基1~230から成る群から選択された、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列の少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んで成る単離されたポリペプチドを提供する。例示的ポリペプチドは、アミノ酸残基(a)~(d)を含むか、又はそれらから成るポリペプチドを包含する。さらに、本発明はまた、IL-TIFを結合する、上記に例示されるような単離されたポリペプチドを提供する。

**【0021】**

本発明はまた、本発明はまた、変異体マウスZcytor 16ポリペプチドを包含し、ここで前記変異体ポリペプチドのアミノ酸配列は、少なくとも70%の同一性、少なくとも80%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性又は95%以上の同一性から成る群から選択された、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24~230、又は27~230との同一性を共有し、そして前記変異体ポリペプチドのアミノ酸配列と配列番号38又は配列番号48のその対応するアミノ酸配列との間のいずれかの差異は1又は複数の保存性アミノ酸置換によるものである。さらに、本発明はまた、IL-TIFを結合する、上記に開示されるような単離されたポリペプチドを提供する。

20

**【0022】**

本発明はさらに、そのようなポリペプチドと特異的に結合する抗体及び抗体フラグメントを提供する。典型的な抗体は、ポリクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体、ネズミモノクローナル抗体に由来するヒト適合された抗体及びヒトモノクローナル抗体を包含する。例示的な抗体フラグメントは、 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、 $Fab'$ 、 $Fab$ 、 $Fv$ 、 $scFv$ 及び最少認識単位を包含する。本発明はさらに、キャリアー、及び本明細書に記載されるペプチド、ポリペプチド、又は抗体を含んで成る組成物を提供する。

30

**【0023】**

本発明はまた、(a)配列番号39又は配列番号49のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b)配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24~230又は27~230のいずれかを含んで成るアミノ酸配列をコードする核酸分子、及び(c)配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド77又は86~697630のヌクレオチド配列、又は配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド77又は86~697の補体を含んで成る核酸分子に対して、緊縮洗浄条件下でハイブリダイズされたまま存続する核酸分子から成る群から選択された、マウスZcytor16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。

40

**【0024】**

例示的な核酸分子は、核酸分子(c)によりコードされるアミノ酸配列と配列番号38又は配列番号48のその対応するアミノ酸配列との間のいずれかの差異が保存性アミノ酸置換のためであるそれらの核酸を包含する。本発明はさらに、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド8~697を含んで成る単離された核酸分子にも関する。さらに、本発明はまた、IL-TIFを結合する、上記に開示されるような単離されたポリヌクレオチドを提供する。

**【0025】**

本発明はまた、そのような核酸分子を含んで成るベクター及び発現ベクターを包含する。

50

そのような発現ベクターは、転写プロモーター及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記プロモーターが前記核酸分子に作用可能に連結され、そして前記核酸分子が転写ターミネーターに作用可能に連結される。本発明はさらに、それらのベクター及び発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞及び組換えウィルスを包含する。例示的な宿主細胞は、細菌、酵母、菌類、昆虫、哺乳類、及び植物細胞を包含する。そのような発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞は、発現ベクターを含んで成り、そしてマウスZcytor 16タンパク質を生成するそのような組換え宿主を培養し、そして任意には、その培養された宿主細胞からマウスZcytor 16タンパク質を単離することによって、マウスZcytor 16ポリペプチドを調製するために使用され得る。

【0026】

さらに、本発明は、医薬的に許容できるキャリアー、及び少なくとも1つのそのような発現ベクター、又はそのような発現ベクターを含んで成る組換えウィルスを含んで成る医薬組成物を提供する。本発明はさらに、医薬的に許容できるキャリアー及び本明細書に記載されるポリペプチドを含んで成る医薬組成物を包含する。

【0027】

本発明はまた、生物学的サンプルにおけるマウスZcytor 16 RNAの存在を検出するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a) マウスZcytor 16核酸プローブと、(i) 前記生物学的サンプルから単離された試験RNA分子、又は(ii) 前記単離されたRNA分子から合成された核酸分子のいずれかとを、ハイブリダイゼーション条件下で接触せしめ、ここで前記プローブが、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列の一部、又はその相補体から成るヌクレオチド配列を含んで成り；そして(b) 前記核酸プローブ、及び前記試験RNA分子又は合成された核酸分子のいずれかのハイブリッドの形成を検出し、ここで前記ハイブリッドの存在が前記生物学的サンプルにおけるマウスZcytor 16 RNAの存在を示す。例えば、適切なプローブは、次の配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列から成る：ヌクレオチド77、86、又は100～373；ヌクレオチド77、86又は100～694；ヌクレオチド401～694又は697；及びヌクレオチド8～694又は697。他の適切なプローブは、それらのヌクレオチド配列の補体、又は前記ヌクレオチド配列又はそれらの補体の一部から成る。

【0028】

本発明はさらに、生物学的サンプルにおけるマウスZcytor 16の存在を検出するための方法を提供し、ここで前記方法は、(a) 前記生物学的サンプルと、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列から成るポリペプチドと特異的に結合する抗体、又は抗体フラグメントとを接触せしめ、ここで前記接触が、前記生物学的サンプルへの前記抗体又は抗体フラグメントの結合を可能にする条件下で行われ、そして(b) 前記結合された抗体又は結合された抗体フラグメントのいずれかを検出する段階を含んで成る。そのような抗体又は抗体フラグメントはさらに、放射体同位体、蛍光ラベル、化学ルミネセントラベル、酵素ラベル、生物ルミネセントラベル及びコロイド状金から成る群から選択された検出できるラベルを含んで成る。

【0029】

本発明はまた、それらの検出方法を行うためのキットを提供する。例えば、Zcytor 16遺伝子発現の検出のためのキットは、核酸分子を含んで成る容器を含んで成り、ここで前記核酸分子は、(a) 配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド77、86、又は100～694または697、または8～694または697のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、及び(b) 少なくとも8個のヌクレオチドから成る(a)のフラグメントである核酸分子から成る群から選択される。そのようなキットはまた、核酸分子の存在を示すことができる1又は複数の試薬を含んで成る第2容器を含んで成る。他方では、マウスZcytor 16タンパク質の検出のためのキットは、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列から成るポリペプチドと特異的に結合する、抗体又は抗体フラグメントを含んで成る容器を含んで成る。

【0030】

本発明はまた、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列から成るポリペプチドを特異的に結合する抗体又は抗体フラグメントを特異的に結合する、抗-イディオタイプ抗体又は

10

20

30

40

50

抗 - イディオタイプ抗体フラグメントも企画する。典型的な抗 - イディオタイプ抗体は、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24～230、又は27～230から成るポリペプチドを特異的に結合する抗体と結合する。

【0031】

本発明はさらに、マウスZcytor 16分泌シグナル配列をコードするヌクレオチド配列、及び生物学的活性のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含んで成る単離された核酸分子を包含し、ここで前記マウスZcytor 16分泌シグナル配列は、配列番号38又は配列番号48の残基1～23のアミノ酸配列を含んで成る。生物学的活性のポリペプチドは、第VI因子、プロインスリン、インスリン、卵胞刺激ホルモン、組織型プラスミノゲン活性化因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン、コロニー刺激因子、インターフェロン、エリトロボエチン、及びトロポポエチンを包含する。さらに、本発明は、マウスZcytor 16分泌シグナル配列及びポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を提供し、ここで前記マウスZcytor 16分泌シグナル配列は、配列番号38又は配列番号48の残基1～23のアミノ酸配列を含んで成る。

10

【0032】

本発明はまた、マウスZcytor 16ポリペプチド及び免疫グロブリン成分を含んで成る融合タンパク質を提供する。そのような融合タンパク質においては、免疫グロブリン成分は、免疫グロブリンH鎖不変領域、例えばヒトFcフラグメントであり得る。本発明はさらに、そのような融合タンパク質をコードする単離された核酸分子を包含する。

【0033】

本発明はまた、マウスZcytor16細胞外ドメインを含んで成る、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体を提供する。そのような受容体は可溶性であるか、又は膜結合され、そしてZcytor16 リガンド、IL-TIF (例えば、配列番号15に示されるようなヒトIL-TIF、及び配列番号41に示されるようなマウスIL-TIF) のアンタゴニストとして作用する。好ましい態様においては、そのような受容体は、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24～230、又は27～230を含んで成る少なくとも1つのZcytor16細胞外ドメインポリペプチドを含んで成る可溶性受容体である。本発明はさらに、そのような受容体ポリペプチドをコードする単離された核酸分子も包含する。

20

【0034】

本発明はまた、マウスZcytor16細胞ドメイン、例えば上記に記載されるそれらのドメインを含んで成る、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体に対するポリクローナル及びモノクローナル抗体を提供する。さらに、Zcytor16リガンド、IL-TIF (配列番号15、及び配列番号41)、すなわちZcytor16受容体経の結合を拮抗するそのような抗体が使用され得る。

30

【0035】

本発明はまた、患者における癌を検出するための方法を提供し、ここで患者から組織又は生物学的サンプルを得；前記組織又は生物学的サンプルを、請求項16記載の抗体と共に、前記抗体が前記組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合される抗体を可視化し；そして正常な対照組織又は生物学的サンプルに、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される抗体のレベルを比較し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに対する、前記患者組織又は生物学的サンプルに結合される抗体のレベルの上昇が前記患者における癌の表示である。

40

【0036】

本発明はまた、患者における癌を検出するための方法を提供し、ここで患者から組織又は生物学的サンプルを得配列番号37又は配列番号47の少なくとも14個の連続したヌクレオチド又は配列番号37又は配列番号47の補体を含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；前記組織又は生物学的サンプルを、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイズする条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおける前記ラベルされたポリヌクレオチドを可視化し；そして正常な対照組織又は生物

50

学的サンプルに対して、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおけるラベルされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのレベルを比較し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、前記患者組織又は生物学的サンプルに対するラベルにされたポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの上昇が前記患者における癌の表示である。

#### 【0037】

本発明のそれらの及び他の観点、次の特定の記載に基づいて明らかに成るであろう。さらに、種々の文献が下記に同定され、そして引用により組み込まれる。

#### 【0038】

##### 2. 定義:

次の記載においては、多くの用語が広範囲に使用される。次の定義は、本発明の理解を促進するために提供される。

#### 【0039】

本明細書において使用される場合、“核酸”又は“核酸分子”とは、ポリヌクレオチド、例えばデオキシリボ核酸(DNA)又はリボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、ポリメラーゼ鎖反応(PCR)により生成されるフラグメント、及び連結、切断、エンドヌクレアーゼ作用及びエキソヌクレアーゼ作用のいずれかにより生成されるフラグメントを言及する。核酸分子は、天然に存在するヌクレオチド(例えばDNA及びRNA)、又は天然に存在するヌクレオチドの類似体(例えば天然に存在するヌクレオチドの - 鏡像異性体形)、又は両者の組み合わせであるモノマーから構成され得る。修飾されたヌクレオチドは、糖成分において、及び/又はピリミジン又はプリン塩基成分において変更を有することができる。糖修飾は、ハロゲン、アルキル基、アミン及びアジド基による1又は複数のヒドロキシル基の置換を包含し、又は糖はエーテル又はエステルとして機能され得る。

#### 【0040】

さらに、全糖成分は、立体的に及び電子的に類似する構造体、例えばアザ-糖及びカルボン酸糖類似体により置換さえ得る。塩基成分における修飾の例は、アルキル化されたプリン及びピリミジン、アシル化されたプリン又はピリミジン、又は他の良く知られている複素環式置換基を包含する。核酸モノマーは、ホスホジエステル結合又はそのような結合の類似体により結合さえ得る。ホスホジエステル結合の類似体は、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニオチオエート、ホスホラニリデート、ホスホラミデート、及び同様のものを包含する。用語“核酸分子”とはまた、いわゆる、ポリアミド主鎖に結合される天然に存在するか又は修飾された核酸塩基を含んで成る“ペプチド核酸”も包含する。核酸は一本鎖又は二本鎖のいずれかであり得る。

#### 【0041】

用語“核酸分子の補体”とは、相補的ヌクレオチド配列、及び対照ヌクレオチド配列に比較して逆の配向を有する核酸分子である。例えば、配列5' ATGCACGGG 3' は、5' CCCG TGCAT 3' に対して相補的である。

用語“コンチグ(contig)”とは、他の核酸分子に対する一連の連続した同一の又は相補的な配列を有する核酸分子を示す。連続した配列とは、核酸分子の全体において、又はその一部に沿って、一定の長さの核酸分子を“オーバーラップ”すると言われる。

#### 【0042】

用語“縮重ヌクレオチド配列”とは、1又は複数の縮重コドンを含むヌクレオチドの配列(ポリペプチドをコードする対照ポリヌクレオチドに比較して)を示す。縮重コドンは、ヌクレオチドの異なったトリプレットを含むが、しかし同じアミノ酸残基をコードする(すなわち、GAU及びGACトリプレットはそれぞれAspをコードする)。

用語“構造遺伝子”とは、特定のポリペプチドの特徴のアミノ酸の配列に翻訳されるメッセンジャーRNA(mRNC)に転写される核酸分子を言及する。

#### 【0043】

“単離された核酸分子”とは、生物のゲノムDNAに組み込まれない核酸分子である。例え

10

20

30

40

50

ば、細胞のゲノムDNAから分離された成長因子をコードするDNA分子が、単離されたDNA分子である。単離された核酸分子のもう1つの例は、生物のゲノムに組み込まれない、化学的に合成された核酸分子である。特定の種から単離された核酸分子は、その種からの染色体の完全なDNA分子よりも小さい。

“核酸分子構造体”とは、天然においては存在しない配置で組み合わせられ、そして並置された核酸のセグメントを含むようヒト介在を通して修飾された - 本鎖又は二本鎖の核酸分子である。

【0044】

“線状DNA”とは、遊離5'及び3'及び末端を有する非環状DNA分子を示す。線状DNAは、閉環DNA分子、例えばプラスミドから、酵素消化又は物理的な破壊により調製され得る。

“相補的DNA(cDNA)”とは、逆転写酵素によりmRNA鋳型から形成される一本鎖DNA分子である。典型的には、mRNAの一部に対して相補的なプライマーは、逆転写の開始のために使用される。当業者はまた、そのような一本鎖DNA分子及びその相補的DNA鎖から成る二本鎖DNA分子を言及するために用語“cDNA”を用いる。用語“cDNA”はまた、RNA鋳型から生成されたcDNA分子のクローンも言及する。

【0045】

“プローブ及び/又はプライマー”とは、本明細書において使用される場合、RNA又はDNAであり得る。DNAはcDNA又はゲノムDNAのいずれかであり得る。ポリヌクレオチドプローブ及びプライマーは、一本鎖又は二本鎖DNA又はRNA、一般的に合成オリゴヌクレオチドであるが、しかしクローン化されたcDNA又はゲノム配列又はその補体から生成され得る。分析用プローブは一般的に、少なくとも20個の長さのヌクレオチドであるが、但し幾分短いプローブ(14~17個のヌクレオチド)が使用され得る。PCRプライマーは、少なくとも5個の長さのヌクレオチド、好ましくは15又はそれ以上のnt、よりも好ましくは20~30のntである。短いポリヌクレオチドは、遺伝子の小さな領域が分析のために標的化される場合に使用され得る。遺伝子の全体的な分析のためには、ポリヌクレオチドは、全エキソン又はそれ以上を含んで成る。プローブは、検出できるシグナルを供給するために、当業界において良く知られている技法を用いて多くの源、例えばMolecular Probe, Inc., Eugene, OR及びAmersham Corp., Arlington Heights, ILから市販されている、酵素、放射性核種、蛍光団、化学ルミネセンス、常磁性粒子及び同様のものによりラベルされ得る。

【0046】

“プロモーター”とは、構造遺伝子の転写を方向づけるヌクレオチド配列である。典型的には、プロモーターは、構造遺伝子の転写開始部位に最も近い、遺伝子の5'非コードに領域位置する。転写の開始において機能するプロモーター内の配列要素は、しばしば、コンセンサスヌクレオチド配列により特徴づけられる。

【0047】

それらのプロモーター要素は、RNAポリメラーゼ結合部位、TATA配列、CAAT配列、分化 - 特異的要素(DSE: McGeheeなど., Mol. Endocrinol. 7: 511 (1993))、サイクリックのAMP応答要素(CRE)、血清応答要素(SRE: Treisman, Seminars in Cancer Biol. 1: 47 (1990))、グルココルチコイド応答要素(GRE)及び他の転写因子のための結合部位、例えばCRE/ATF(0'Reillyなど., J. Biol. Chem. 267: 19938 (1992))、AP2(Yeなど., J. Biol. Chem. 269: 25728 (1994))、SP1、cAMP応答要素結合タンパク質(CREB; Loeken, Gene Expr. 3: 253 (1993))、及びオクタマー因子(一般的には、Watsonなど., eds., Molecular Biology of the Gene, 4<sup>th</sup> ed. (The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 1987), and Lemaigre and Rousseau, Biochem. J. 303: 1 (1994))を包含する。プロモーターが誘発プロモーターである場合、転写の速度は誘発剤に反応して上昇する。対照的に、転写の速度は、プロモーターが構成プロモーターである場合、誘発剤により調節されない。抑制できるプロモーターはまた知られている。

【0048】

“コアプロモーター”は、TATAボックス及び転写の開始を包含するプロモーター機能のための必須ヌクレオチド配列を含む。この定義によれば、コアプロモーターは、活性を増強

10

20

30

40

50



し又は組織特異的活性を付与することができる特定の配列の不在下で検出できる活性を有しても又は有さなくても良い。

“調節要素”は、コアプロモーターの活性を調節するヌクレオチド配列である。例えば、調節要素は、特定の細胞、組織又はオルガネラにおいて独占的に又は選択的に転写を可能にする細胞因子と結合するヌクレオチド配列を含むことができる。それらのタイプの調節要素は通常、“細胞 - 特異的”、“組織 - 特異的”、又は“オルガネラ - 特異的”態様で発現される遺伝子に結合されている。

【0049】

“エンハンサー”は、転写の開始部位に対してエンハンサーの距離又は配向に関係なく、転写の効率を高めることができるタイプの調節要素である。

10

【0050】

“異種DNA”とは、所定の宿主細胞内に天然において存在しない、DNA分子又はDNA分子の集団を言及する。特定宿主細胞に対して異種であるDNA分子は、宿主DNAが非宿主DNA（すなわち、外来性DNA）と組み合わせられる限り、宿主細胞種（すなわち、内因性DNA）に由来するDNAを含むことができる。例えば、転写プロモーターを含んで成る宿主DNAセグメントに作用可能に連結されるポリペプチドをコードする非宿主DNAセグメントを含むDNA分子は、異種DNA分子であると思われる。逆に言えば、異種DNA分子は、外来プロモーターと作用可能に連結される内因性遺伝子を含むことができる。もう1つの例として、野生型細胞に由来する遺伝子を含んで成るDNA分子は、そのDNA分子が野生型遺伝子を欠いている突然変異細胞中に導入される場合、異種DNAであると思われる。

20

【0051】

“ポリペプチド”とは、天然又は合成的に生成されても、ペプチド結合により連結されるアミノ酸残基のポリマーである。約10個よりも少ないアミノ酸残基のポリペプチドは通常、“ペプチド”として言及される。

“タンパク質”は、1又は複数のポリペプチド鎖を含んで成る高分子である。タンパク質はまた、非ペプチド成分、例えば炭水化物基を含むことができる。炭水化物及び他の非ペプチド置換基は、タンパク質が生成される細胞により付加され、そして細胞型により変化するであろう。タンパク質は、それらのアミノ酸主鎖により本明細書において定義され；置換基、例えば炭水化物基は一般的に、特定されないが、しかしそれにもかかわらず、存在することができる。

30

【0052】

非宿主DNA分子によりコードされるペプチド又はポリペプチドは“異種”ペプチド又はポリペプチドである。

“組み込まれた遺伝子要素”とは、その要素がヒト操作を通して細胞中に導入された後、宿主細胞の染色体中に組み込まれているDNAのセグメントである。本発明においては、組み込まれた遺伝子要素は通常、エレクトロポレーション又は他の技法により細胞中に導入される線状化されたプラスミドに由来する。組み込まれた遺伝子要素は、元の宿主細胞からその子孫に通過される。

【0053】

“クローニングベクター”は、宿主細胞において自律的に複製する能力を有する、核酸分子、例えばプラスミド、コスミド、又はバクテリオファージである。クローニングベクターは典型的には、ベクターの必須の生物学的機能を失わないで、決定できる態様で核酸分子の挿入を可能にする1又は少数の制限エンドヌクレアーゼ認識部位、及びクローニングベクターにより形質転換された細胞の同定及び選択への使用のために適切であるマーカー遺伝子をコードするヌクレオチド配列を含む。マーカー遺伝子は典型的には、テトラサイクリン耐性又はアンピシリン耐性を付与する遺伝子を含む。

40

【0054】

“発現ベクター”は、宿主細胞において発現される遺伝子をコードする核酸分子である。典型的には、発現ベクターは、転写プロモーター、遺伝子及び転写ターミネーターを含む。遺伝子発現は通常、プロモーターの制御下に配置され、そしてそのような遺伝子はプロ

50

モーターに“作用可能に結合される”と言われる。同様に、調節要素及びコアプロモーターは、調節要素がコアプロモーターの活性を調節する場合、作用可能に連結される。

【0055】

“組換え宿主”とは、異種核酸分子、例えばクローニングベクター又は発現ベクターを含む細胞である。本明細書においては、組換え宿主の例は、発現ベクターからZcytor 16を生成する細胞である。対照的に、Zcytor 16は、Zcytor 16の“天然源”であり、そして発現ベクターを欠いている細胞により生成さえ得る。

“インテグレイティブ組換え体”は、異種DNAが細胞ゲノムDNA中に組み込まれるようになる組換え宿主細胞である。

【0056】

“融合タンパク質”は、少なくとも2つの遺伝子のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子により発現されるハイブリッドタンパク質である。例えば、融合タンパク質は、親和性マトリックスを結合するポリペプチドにより融合されるZcytor 16ポリペプチドの少なくとも一部を含むことができる。そのような融合タンパク質は、親和性クロマトグラフィーを用いて、多量のZcytor 16を単離するための手段を提供する。

【0057】

用語“受容体”とは、“リガンド”と称する生物活性分子に結合する、細胞結合されたタンパク質を示す。この相互作用は、細胞に対するリガンドの効果を介在する。受容体は、膜結合されたシトソール又は核；モノマー（例えば、胸腺刺激性ホルモン受容体、 - アドレナリン作用受容体）又はマルチマー（例えば、PDGF受容体、成長ホルモン受容体IL-3受容体、GM-CSF受容体、G-CSF受容体、エリトロポエチン受容体及びIL-6受容体）であり得る。膜結合された受容体は、細胞外リガンド-結合ドメイン、及び典型的には、シグナルトランスダクションに関与する細胞内エフェクタードメインを含んで成る多-ドメイン構造により特徴づけられる。一定の膜結合された受容体においては、細胞外リガンド-結合ドメイン及び細胞内エフェクタードメインは、完全な機能的受容体を含んで成る別々のポリペプチドに位置する。

【0058】

一般的に、受容体へのリガンドの結合は、細胞の代謝における変更を導く、細胞におけるエフェクタードメインと他の分子との間の相互作用を引き起こす受容体のコンホメーション変化をもたらす。受容体-リガンド相互作用にしばしば連結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、サイクリックAMPを生成の上昇、細胞カルシウムの代謝、膜脂質の代謝、細胞付着、イノシトール脂質の加水分解及びリン脂質の加水分解を包含する。

【0059】

“可溶性受容体”とは、細胞膜に結合されない受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、最も通常には、トランスメンブラン及び細胞質ドメイン、及び例えば、糖ホスホイノシトール(gpi)を通しての細胞膜への他の連鎖を欠いているリガンド-結合受容体ポリペプチドである。可溶性受容体は、追加のアミノ酸残基、例えばポリペプチドの精製を提供するか、又は基質へのポリペプチドの結合のための部位を提供する親和性標識、又は免疫グロブリン不変領域配列を含むことができる。多くの細胞-表面受容体は、タンパク質加水分解により生成されるか又は他のスプライシングされたmRNAから翻訳される、天然に存在する可溶性カウンターパートを有する。

【0060】

適切な受容体は、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーであり得、そしてマルチマー受容体は一般的に、9個以上のサブユニットを含まず、好ましくは6個以上のサブユニットを含まず、そして最も好ましくは、3個以上のサブユニットを含まない。受容体ポリペプチドは、それらがそれぞれ、膜固定化又はシグナルトランスダクションを提供するそれらのセグメントの十分な部分を欠いている場合、トランスメンブラン及び細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に有さないと言われる。クラスI及びクラスIIサイトカイン受容体の可溶性受容体は一般的に、トランスメンブランドメイン及び細胞内ド

10

20

30

40

50

メインを有さない細胞外サイトカイン結合ドメインを含んで成る。

【0061】

例えば、代表的な可溶性受容体は、配列番号35で示されるようなCRF2 - 4 ( Genbank受託番号第Z17227号 ) についての可溶性受容体 ; 配列番号36で示されるようなIL - 10R ( Genbank受託番号第U00672号及びNM001558号 ) についての可溶性受容体 ; 及び配列番号34で示されるようなzcytor11 ( アメリカ特許第5,965,704号 ) についての可溶性受容体を包含する。既知のクラスI又はクラスIIサイトカイン配列がトランスメンブランドメイン及び細胞内ドメインを有さない細胞外サイトカイン結合ドメインを含んで成ることを明確に記載することは、当業者のレベルの範囲内である。さらに、当業者は、遺伝子コードを用いて、そのような受容体ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを容易に決定することができる。

10

【0062】

用語“ 分泌シグナル配列 ”とは、それが合成される細胞の分泌路を通してより大きなポリペプチドを、より大きなポリペプチドの成分として方向づけるペプチド ( “ 分泌ペプチド ” ) をコードするDNA配列を示す。前記のより大きなポリペプチドは、分泌路を通しての移動の間、分泌ペプチドを除去するために通常分解される。

【0063】

“ 単離されたポリペプチド ” は、汚染性細胞成分、例えば炭水化物、脂質又は天然においてポリペプチドに関連している他のタンパク質性不純物を実質的に含まないポリペプチドである。典型的には、単離されたポリペプチドの調製物は、高く精製された形で、すなわち少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、95%以上の純度、又は99%以上の純度でポリペプチドを含む。特定のタンパク質調製物が単離されたポリペプチドを含むことを示すための1つの手段は、タンパク質調製物のドデシル硫酸ナトリウム ( SDS ) - ポリアクリルアミドゲル電気泳動及びゲルのクーマシーブルー染色によるシングルバンドの出現によるものである。しかしながら、用語“ 単離された ” とは、他の物理形、例えばダイマー又は他のグリコシル化された又は誘導体化された形での同じポリペプチドの存在を排除しない。

20

【0064】

用語“ アミノ - 末端 ” 及び “ カルボキシル - 末端 ” とは、ポリペプチド内の位置を示すために本明細書において使用される。その状況が可能である場合、それらの用語は、接近性又は相対的位置を示すためにポリペプチドの特定の配列又は一部に関して使用される。例えば、ポリペプチド内の対象配列のカルボキシル末端側に位置する一定の配列は、その対照配列のカルボキシル末端に隣接して位置するが、しかし完全なポリペプチドのカルボキシル末端では必ずしも必要ではない。

30

用語“ 発現 ” とは、遺伝子生成物の生合成を言及する。例えば、構造遺伝子においては、発現はmRNAへの構造遺伝子の転写及び1又は複数のポリペプチドへのmRNAの翻訳を包含する。

【0065】

用語“ スプライス変異体 ” とは、遺伝子から転写されるRNAの二者択一の形を示すために、本明細書において使用される。スプライス変異は、転写されたRNA分子内の、又は通常低いが、別々に転写されたRNA分子間の二者択一のスプライシング部位の使用を通して天然において生じ、そして同じ遺伝子から転写されるいくつかのmRNAをもたらすことができる。スプライス変異体は、変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。用語スプライス変異体はまた、遺伝子から転写されるmRNAのスプライス変異体によりコードされるポリペプチドを示すために本明細書において使用される。

40

本明細書において使用される場合、用語“ イムノモジュレータ - ” とは、サイトカイン、幹細胞成長因子、リンフォトキシン、同時 - 刺激分子、造血因子及びそれらの分子の合成類似体を包含する。

【0066】

用語“ 相補体 / 抗 - 相補体対 ” とは、適切な条件下で、非共有的に会合される安定した対

50

を形成する非同一性成分を示す。例えば、ビオチン及びアビジン(又はストレプトアビジン)は、相補体/抗-相補体対の基本型メンバーである。他の典型的な相補体/抗-相補体対は、受容体/リガンド対、抗体/抗原(又はハプテン又はエピトープ)対、センス/アンチセンスポリヌクレオチド対、及び同様のものを包含する。補体/抗-補体対の続く解離が所望される場合、その補体/抗-補体対は好ましくは、 $< 10^9 \text{ M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

#### 【0067】

“抗-イディオタイプ抗体”とは、免疫グロブリンの可変領域ドメインと結合する抗体である。本明細書においては、抗-イディオタイプの抗体は、抗-マウスZcytor 16抗体の可変領域と結合し、そして従って、抗-イディオタイプ抗体はマウスZcytor 16のエピトープを模倣する。

10

“抗体フラグメント”は、抗体の一部、例えば $\text{F(ab}')_2$ 、 $\text{F(ab)}_2$ 、 $\text{Fab}'$ 、 $\text{Aab}$ 及び同様のものである。構造に関係なく、抗体フラグメントは、損なわれていない抗体により認識される同じ抗原と結合する。例えば、抗-マウスZcytor 16モノクローナル抗体フラグメントは、マウスZcytor 16のエピトープと結合する。

#### 【0068】

用語“抗体フラグメント”はまた、特定の抗原に結合する、合成の又は遺伝的に構築されたポリペプチド、例えばL鎖可変領域から成るポリペプチド、H及びL鎖の可変領域から成る“Fv”フラグメント、L及びH鎖可変領域がペプチドリッガーにより連結されている組換え一本鎖ポリペプチド分子(“svFvタンパク質”)、及び超可変領域を模倣するアミノ酸残基から成る最少認識単位を包含する。

20

“キメラ抗体”は、嚙歯動物抗体に由来する種々のドメイン及び相補的決定領域を含む組換えタンパク質であるが、ところが抗体分子の残りはヒト抗体に由来する。

#### 【0069】

“ヒト適合された抗体”は、モノクローナル抗体のネズミ相補的決定領域がネズミ免疫グロブリンのH及びL可変鎖からヒト可変ドメインに移行されている組換えタンパク質である。

本明細書において使用される場合、“治療剤”は、治療のために有用である接合体を生成するために抗体成分に接合される分子又は原子である。治療剤の例は、薬剤、毒素、イムノモジュレーター、キレート化剤、硼素化合物、光活性剤又は染料、及び放射生同位体を包含する。

30

“検出できるラベル”は、診断のために有用な分子を生成するために抗体成分に接合され得る分子又は原子である。検出できるラベルの例は、キレート化剤、光活性剤、放射性同位体、蛍光剤、常磁性イオン又は他のマーカー成分を包含する。

#### 【0070】

“親和性標識”とは、第2ポリペプチドの精製又は検出を提供し、又は基質への第2ポリペプチドの結合のための部位を供給するために、第2ポリペプチドに結合され得るポリペプチドセグメントを示すために本明細書において使用される。主に、抗体又は、他の特異的結合剤が利用できるいずれかのペプチド又はタンパク質が親和性標識として使用され得る。

40

#### 【0071】

親和性標識は、ポリ-ヒスチジン系、すなわちプロテインA (Nilsson など., EMB0 J. 4: 1075, 1985; Nilsson など., Methods Enzymol. 198: 3, 1991), グルタチオンSトランスフェラーゼ (Smits and Johnson, Gene 67: 31, 1988), Glu-Glu親和性標識 (Grussenmeyer など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), 物質P、すなわちFlag<sup>TM</sup> ペプチド (Hopp など., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプトアビジン結合ペプチド、又は他の抗原性エピトープ又は結合ドメインを包含する。一般的に、Ford など., Protein Expression and Purification 2:95-107, 1991を参照のこと。親和性標識をコードする核酸分子は、商品供給者(例えばPharmacia Biotech, Piscataway, NJ; Eastman Kodak, New Haven, CT; New England Biolabs, Beverly, MA)から入

50

手できる。

【0072】

“裸の抗体”は、抗体フラグメントに対立するものとして、治療剤により接合されない完全な抗体である。裸の抗体は、ポリクローナル及びモノクローナル抗体、並びに一定の組換え抗体、例えばキメラ性及びヒト適合された抗体を包含する。

本明細書において使用される場合、用語“抗体成分”は、完全な抗体及び抗体フラグメントの両者を包含する。

“免疫接合体”は、治療剤又は検出できるラベルと抗体成分との接合体である。

【0073】

本発明において使用される場合、用語“抗体融合タンパク質”とは、抗体成分及びマウス Zcytor 16ポリペプチド成分を含んで成る組換え分子を言及する。抗体融合タンパク質の例は、マウスZcytor 16細胞ドメイン、及びFcドメイン又は抗原-結合領域のいずれかを含んで成るタンパク質を包含する。

“標的ポリペプチド”又は“標的ペプチド”は、少なくとも1つのエピトープを含み、そして標的細胞、例えば腫瘍細胞、又は感染剤抗原を担持する細胞上で発現されるアミノ酸配列である。T細胞は、標的ポリペプチド又は標的ペプチドに、主要組織適合性複合体分子により提供されるペプチドエピトープを認識し、そして典型的には、標的細胞を溶解し、又は標的細胞の例に他の免疫細胞を補充し、それにより標的細胞を殺害する。

【0074】

“抗原性ペプチド”は、T細胞により認識されるMHC-ペプチド複合体を形成するために、主要組織適合複合体分子を結合し、それにより、T細胞への提供に基づいて細胞毒性リンパ球応答を誘発するペプチドである。従って、抗原性ペプチドは、適切な主要組織適合性複合体分子に結合し、そして細胞毒性T細胞応答、例えば抗原を結合するか又は発現する標的細胞に対する細胞溶解又は特異的サイトカイン開放を誘発することができる。抗原性ペプチドは、抗原提供細胞又は標的細胞上に、クラスI又はクラスII主要組織適合性複合体分子に関して結合され得る。

【0075】

真核生物においては、RNAポリメラーゼIIは、mRNAを生成するために構造遺伝子の転写を触媒する。核酸分子はRNAポリメラーゼII鋳型を含むより企画され、ここでRNA転写体は特定のmRNAの配列に対して相補的である配列を有する。RNA転写体は、“アンチセンスRNA”と呼ばれ、そしてアンチセンスRNAをコードする核酸分子は“アンチセンス遺伝子”と呼ばれる。アンチセンスRNA分子は、mRNA分子に結合することができ、mRNA翻訳の阻害をもたらす。

【0076】

“マウスZcytor 16に対して特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチド”又は“マウスZcytor 16アンチセンスオリゴヌクレオチド”は、(a)マウスZcytor 16遺伝子の一部と共に安定した三量体を形成できるか、又は(b)マウスZcytor 16遺伝子のmRNA転写体の一部と共に安定した二量体を形成できる配列を有するオリゴヌクレオチドである。

“リボザイム”は、触媒中心を含む核酸分子である。この用語は、RNA酵素、自己スプライシングRNA、自己分解性RNA及びそれらの触媒機能を行う核酸分子を包含する。

“外部案内配列”は、細胞内mRNAの特定種に内因性リボザイム、すなわちRNアーゼPを方向づけ、RNアーゼPによるmRNAの分解をもたらす核酸分子である。外部案内配列をコードする核酸分子は、“外部案内配列遺伝子”と呼ばれる。

【0077】

用語“変異体マウスZcytor 16遺伝子”は、配列番号38又は配列番号48の修飾であるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子を言及する。そのような変異体は、天然に存在する多型現象のマウスZcytor 16遺伝子、及び配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列の保存性アミノ酸置換を含む合成遺伝子を包含する。マウスZcytor 16遺伝子の追加の変異体形は、本明細書に記載されるヌクレオチド配列の挿入又は欠失を含む核酸分子である。変異体マウスZcytor 16遺伝子は、その遺伝子が配列番号37又は配列番号47

のヌクレオチド配列を有する核酸分子、又はその補体と、緊縮条件下でハイブリダイズするかどうかを決定することによって同定され得る。

【0078】

他方では、変異体マウスZcytor 16遺伝子は、配列 - 比較により同定さえ得る。2つのアミノ酸配列は、その2つのアミノ酸配列のアミノ酸残基が、最大の応答により整列される場合、同じである場合、“100%のアミノ酸配列同一性”を有する。配列比較は、標準のソフトウェアプログラム、例えばDNASTAR (Madison, Wisconsin) により製造されるLASER GENE生物情報コンピューターサイトに包含されるそれらのプログラムを用いて行われ得る。

【0079】

最適な整列を決定することによって、2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列を比較するための他の方法は、当業者に良く知られている（例えば、Peruski and Peruski, The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research (ASM Press, Inc. 1997), Wu など. (eds.), “Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins.” In Methods in Gene Biotechnology, Pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), 及びBishop (ed.), Guide to Human Genome Computing, 2<sup>nd</sup> Edition (Academic Press, Inc. 1998) を参照のこと）。配列同一性を決定するための特定の方法は下記に記載される。

【0080】

変異体マウスZcytor 16遺伝子又は変異体マウスZcytor 16ポリペプチドを同定するために使用される特定の方法にもかかわらず、変異体遺伝子又はそれによりコードされるポリペプチドは、その抗 - ウィルス又は抗 - 増殖活性により、又は抗 - マウスZcytor 16抗体に対して特異的に結合する能力により機能的に特徴づけられる。変異体マウスZcytor 16遺伝子又は変異体マウスZcytor 16ポリペプチドはまた、本明細書に記載される生物学的又は生化学的アッセイを用いて、そのリガンド、IL - TIFに結合する能力を機能的に特徴づけられ得る。

【0081】

用語“対立遺伝子変異体”とは、同じ染色体遺伝子座を占める遺伝子の複数の遺伝子の二者択一形のいずれかを示すために、本明細書において使用される。対立遺伝子変異は、突然変異を通して天然では生じ、そして集団内の表現型多型現象をもたらすことができる。遺伝子突然変異は、サイレントであり(コードされたポリペプチドにおける変化がない)、又は変更されたアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードすることができる。用語、対立遺伝子変異体はまた、遺伝子の対立遺伝子変異体によりコードされるタンパク質を示すために本明細書において使用される。

【0082】

用語“オルト体(orthology)”とは、異なった種からのポリペプチド又はタンパク質の機能的相対物である、1つの種から得られるポリペプチド又はタンパク質を示す。オルト体間の配列の差異は、特定化の結果である。

“パラ体(paralogs)”とは、生物によって製造される、異なっているが、しかし構造的に関連するタンパク質である。パラ体は、遺伝子重複を通して生じると思われる。例えば、 $\alpha$  - グロビン、 $\beta$  - グロビン及びミオグロビンは、お互いパラ体である。

【0083】

本発明は、マウスZcytor 16遺伝子の機能的フラグメントを包含する。本発明においては、マウスZcytor 16遺伝子の“機能的フラグメント”は、本明細書に記載されるドメインであるか、又は抗 - マウスZcytor 16抗体と少なくとも特異的に結合する、マウスZcytor 16ポリペプチドの一部をコードする核酸分子を言及する。

標準分析法の不正確さのために、ポリマーの分子量及び長さは、おおよそその値であることが理解される。そのような値が“約”X又は“およそ”Xとして表される場合、Xの言及された値は、 $\pm 10\%$ で正確であると理解されるであろう。

【0084】

10

20

30

40

50

### 3. マウスZcytor 16ポリヌクレオチド又は遺伝子の生成:

マウスZcytor 16遺伝子をコードする核酸分子は、配列番号37又は配列番号47に基づいてのポリヌクレオチドプローブを用いて、マウスcDNA又はゲノムライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。それらの技法は、標準であり、そして十分に確立されている。

#### 【0085】

例示されるように、マウスZcytor 16遺伝子をコードする核酸分子は、ヒトcDNAライブラリーから単離され得る。この場合、第1段階は、当業者に良く知られている方法を用いて、組織、例えばマウスZcytor 16が特異的に発現される組織からRNAを単離することによって、cDNAライブラリーを調製することである。一般的に、RNA単離技法は、細胞を分解する  
10 ための方法、RNAのRNAアーゼ指図された分解を阻害するための手段、及びDNA、タンパク質及び多糖類汚染物からRNAを分離する方法を提供すべきである。

#### 【0086】

例えば、全RNAは、液体窒素において組織を凍結し、その凍結された組織を乳針及び乳棒により粉碎し、細胞を溶解し、フェノール/クロロホルムの溶液により前記粉碎された組織を抽出し、タンパク質を除き、そして塩化リチウムによる選択的沈殿によりRNAを残る不純物から分離することによって単離され得る（例えば、Ausubel など., (eds.), Short  
Protocols in Molecular Biology, 3<sup>rd</sup> Edition pages4-1~4-6 (John Wiley& Sons 1995) [“Ausubel (1995)”]; Wuなど., Methods in Gene Biotechnology, pages33-41 (CRC Press, Inc. 1997) [“Wu(1997)”]を参照のこと)。  
20

#### 【0087】

他方では、全RNAは、粉碎された組織をグアニジニウムイソチオシアネートにより抽出し、有機溶媒により抽出し、そしてRNAを汚染物から示差遠心分離により分離することによって単離され得る（例えば、Chirgwinなど., Biochemistry 18: 52 (1979); Ausubel (1995) P.4-1~4-6; Wu (1997) P.33-41 を参照のこと)。

cDNAライブラリーを構成するために、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAが全RNA調製物から単離されるべきである。ポリ(A)<sup>+</sup>RNAは、オリゴ(dT) - セルロースクロマトグラフィーの標準技法を用いて、全RNAから単離され得る（例えば、Aviv and Leder, Proc. Natl. Acad.Sci. USA69: 1408 (1972); Ausubel (1995) P. 4-11~4-12を参照のこと)。

#### 【0088】

二本鎖cDNA分子は、当業者に良く知られている技法を用いて、ポリ(A)<sup>+</sup>RNAから合成される（例えば、Wu (1997) P.41-46を参照のこと）。さらに、市販のキットが、二本鎖cDNA分子を合成するために使用され得る。例えば、そのようなキットは、Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporation (Madison, WI) 及びSTRATAGENE (La Jolla, CA) から入手できる。  
30

#### 【0089】

種々のクローニングベクターが、cDNAライブラリーの構成のために適切である。例えば、cDNAライブラリーは、バクテリオファージに由来するベクター、例えば gt10バクターにおいて調製され得る。例えば、Huynhなど., “Construction and Screening cDNA Libraries in gt10 and 11” in DNA Cloning: A Practical Approach Vol. 1, Glover (ed.)  
40 ), page 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) at pages 47-52 を参照のこと。

他方では、二本鎖cDNA分子は、プラスミドベクター、例えばPBLUESCRIPTベクター (STRATAGENE; La Jolla, CA), LAMDA GEM-4 (Promega Corp.) 又は他の市販のベクター中に挿入され得る。適切なクローニングベクターはまた、American Type Culture Collection (Manassas, VA) から入手できる。

#### 【0090】

クローン化されたcDNA分子を増幅するために、cDNAライブラリーが、標準技法を用いて、原核宿主中に挿入される。例えば、cDNAライブラリーは、例えばLife Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD) から得られるコンピテントE.コリDH5又はDH10B細胞中に導入され得る。  
50

## 【0091】

ヒトゲノムライブラリーは、当業界において良く知られている手段により調製され得る（例えばAusubel (1995) p. 5-1~5-6; Wu (1997) p. 307-327を参照のこと）。ゲノムDNAは、界面活性剤Sarkosylにより組織を溶解し、その溶解物をプロテイナーゼKにより消化し、不溶性残骸を溶解物から遠心分離により清浄し、イソプロパノールを用いて溶解物から核酸を沈殿し、そして塩化セシウム密度グラジエント上で再懸濁されたDNAを精製することによって単離され得る。

## 【0092】

ゲノムライブラリーの生成のために適切であるDNAフラグメントは、ゲノムDNAのランダム切断により、又は制限エンドヌクレアーゼによるゲノムDNAの部分消化により得られる。ゲノムDNAフラグメントは、従来の技法、例えば適切な末端を供給するために制限酵素消化の使用、DNA分子の所望しない連結を回避するためにアルカリホスファターゼ処理の使用、及び適切がりガーゼによる連結に従って、ベクター、例えばバクテリオファージ又はコスミドベクター中に挿入され得る。そのような操作のための技法は当業界において良く知られている（例えば、Ausubel (1995) p. 5-1~5-6; Wu (1997) p. 307-327 を参照のこと）。

10

## 【0093】

他方では、ゲノムライブラリーは、市販源、例えばResearch Genetic (Huntsville, AL) 及びATCC (Marassas, VA) から得られる。

cDNA又はゲノムクローンを含むライブラリーは、標準方法を用いて、配列番号37又は配列番号47に基づかれる1又は複数のポリヌクレオチドプローブによりスクリーンされ得る（例えば、Ausubel (1995) p. 6-1~6-11を参照のこと）。

20

## 【0094】

マウスZcytor 16遺伝子をコードする核酸分子はまた、本明細書に記載されるように、マウスZcytor 16遺伝子のヌクレオチド配列に基づくヌクレオチド配列を有するオリゴヌクレオチドプライマーによるポリメラーゼ鎖反応（PCR）を用いて得られる。PCRによるライブラリーのスクリーニングの一般的方法は、例えば、Yuなど., “Use of The Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries”. In Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Application, White (ed.), p.211-215 (Humana Press, Inc. 1993)により提供される。さらに、関連する遺伝子を単離するためへのPCRの使用の技法は、例えばPreston, “Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols; Current Metods and Applications. White (ed.), pages 317-337 (Humana Press, Inc. 1993) により記載される。

30

## 【0095】

下記のようにして生成された抗 - マウスZcytor 16抗体はまた、cDNAライブラリーからのマウスZcytor 16遺伝子をコードするDNA配列を単離するためにも使用され得る。例えば、抗体は gt11発現ライブラリーをスクリーンするために使用され、又は抗体はハイブリッド選択及び翻訳に続くイムノスクリーニングのために使用され得る（例えば、Ausubel (1995) p.6-12~6-16; Margolis など., “Screening expression libraries with antibody and Protein Probes” in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover など (eds.) p. 1-14 (Oxford University Press 1995) を参照のこと）。

40

## 【0096】

他に、マウスZcytor 16遺伝子は、お互いプライムする長いオリゴヌクレオチド、及び本明細書に記載されるヌクレオチド配列を用いて、核酸分子を合成することによって得られる（例えば、Ausubel (1995) p.8-8~8-9を参照のこと）。ポリメラーゼ鎖反応を用いての確立された技法は、少なくとも2 kbの長さのDNA分子を合成する能力を提供する（Adang など., Plant Molec. Biol. 21: 1131 (1993). Bambot など., PCR Methods and Applications 2:266 (1993), Dilfon など., “Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Constrauction of Synthetic Genes,” in Methods in Molecular Biology, Vol

50



. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications. White (ed.), Pages 263-268. (Humana Press. Inc. 1993), 及び Holowachuk など., PCR Methods Appl. 4: 299 (1995)。

【 0 0 9 7 】

本発明の核酸分子はまた、ホスホラミジット方法のようなプロトコールを用いて、“遺伝子機会”により合成され得る。化学的に合成される二本鎖DNAが遺伝子又は遺伝子フラグメントの合成のような用途のために必要とされる場合、個々の相補的鎖は別々に製造される。短い遺伝子（60～80の塩基対）の生成は技術的に簡単であり、そして相補的鎖を合成し、そして次にそれらをアニーリングすることによって達成され得る。しかしながら、長い遺伝子（300以上の塩基対）の生成に関しては、化学的DNA合成の間、個々のサイクルのカップリング効率はめったに100%ではないので、特殊な手段が必要とされる。 10

【 0 0 9 8 】

この問題を克服するために、合成遺伝子（二本鎖）が、20～100個の長さのヌクレオチドである一本鎖フラグメントからモジュラー形でアセンブルされる。ポリヌクレオチド合成の再考のためには、例えば、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA (ASM Press 1994), Itakura など., Annu. Rev. Biochem. 53: 323 (1984), など Climie など., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87: 633 (1990) を参照のこと。

【 0 0 9 9 】

マウスZcytor 16cDNA又はマウスZcytor 16ゲノムフラグメントの配列は、標準の方法を用いて決定され得る。本明細書に開示されるマウスZcytor 16ポリヌクレオチド配列はまた、マウスZcytor 16遺伝子の5'側の非コード領域をクローン化するためのプロンプト又はプライマーとして使用され得る。マウスZcytor 16は限定された数の特定の組織において発現されるので、マウスZcytor 16遺伝子からのプロモーター要素は、例えばトランスジェニック動物の特定の組織又は、又は遺伝子治療を受けている患者において異種遺伝子の発現を方向づけるために使用され得る。マウスZcytor 16プロモーター又は調節要素を含むゲノムフラグメントの同定は、十分に確立された技法、例えば欠失分析を用いて達成され得る（一般的には、Ausubel (1995) を参照のこと）。 20

【 0 1 0 0 】

5'側フランギング配列のクローニングはまた、アメリカ特許第5,641,670号に開示される方法に従って、“遺伝子活性化”によるマウスZcytor 16タンパク質の生成を促進する。手短かに言及すれば、細胞における内因性マウスZcytor 16遺伝子の発現は、少なくとも標的配列、調節配列、エキソン、及び対になっていないスプライスドナー部位を含んで成るDNA構造体を、マウスZcytor 16遺伝子座中に導入することによって変更される。標的配列は、内因性マウスZcytor 16遺伝子座を有する構造体の相同組換えを可能にするマウスZcytor 16 5'側非コード配列であり、それにより、前記構造体内の配列は内因性マウスZcytor 16コード配列により作用可能に連結されるようになる。この場合、内因性マウスZcytor 16プロモーターが、他の調節は列により置換されるか又はそれにより補充され、増強された組織特異的、又は他方では、調節された発現が提供される。 30

【 0 1 0 1 】

4. マウスZcytor 16遺伝子変異体の生成：

本発明は、本明細書に開示されるマウスZcytor 16ポリペプチドをコードする種々の核酸分子、例えばDNA及びRNA分子を提供する。当業者は、遺伝子コードの縮重の観点から、相当の配列変動がそれらのポリヌクレオチド分子間で可能であることを容易に認識するであろう。配列番号3は、それぞれ配列番号2のヒトZcytor 16ポリペプチドをコードするすべての核酸分子を包含する縮重ヌクレオチド配列である。同様に、配列番号39は、配列番号38のマウスZcytor 16ポリペプチドをコードするすべての核酸分子を包含する縮重ヌクレオチド配列であり；そして配列番号49は、配列番号48のマウスZcytor 16ポリペプチドをコードするすべての核酸分子を包含する縮重ヌクレオチド配列である。 40

【 0 1 0 2 】

当業者は、配列番号39及び配列番号49の縮重配列がまた、Tに代わってUを置換することによって、それぞれ配列番号38及び配列番号48をコードするすべてのRNA配列を提供することを認識するであろう。さらに、本発明はまた、配列番号38及び配列番号48の受容体ポリペプチドに対して実質的に相同である少なくとも1つのマウスZcytor 16受容体サブユニット含んで成る単離された可溶性モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチドを提供する。従って、本発明は、配列番号39のヌクレオチド1～693、及び配列番号49のヌクレオチド1～693を含んで成るマウスZcytor 16ポリペプチド-コード核酸分子及びそれらのRNA同等物を企画する。さらに、配列番号39及び配列番号49に関して、配列番号37、配列番号38、配列番号47及び配列番号48として本明細書において記載されるマウスZcytor 16フラグメントがまた企画される。

10

**【0103】**

表1は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号39又は配列番号49内に使用される1文字コードを示す。“解”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“相補体”とは、相補的ヌクレオチドのためのコードを示す。例えば、コードYはC又はTのいずれかを示し、そしてその補体RはA又はGを示し、AはTに対して相補的であり、そしてGはCに対して相補的である。

**【0104】****【表1】**

表 1

| ヌクレオチド | 解       | 相補体 | 解       |
|--------|---------|-----|---------|
| A      | A       | T   | T       |
| C      | C       | G   | G       |
| G      | G       | C   | C       |
| T      | T       | A   | A       |
| R      | A G     | Y   | C T     |
| Y      | C T     | R   | A G     |
| M      | A C     | K   | G T     |
| K      | G T     | M   | A C     |
| S      | C G     | S   | C G     |
| W      | A T     | W   | A T     |
| H      | A C T   | D   | A G T   |
| B      | C G T   | V   | A C G   |
| V      | A C G   | B   | C G T   |
| D      | A G T   | H   | A C T   |
| N      | A C G T | N   | A C G T |

10

20

30

所定のアミノ酸についてのすべての可能なコドンを含む、配列番号39又は配列番号49に使用される縮重コドンが表2に示される。

【 0 1 0 5 】

【 表 2 】

表 2

| アミノ酸    | 1文字コード | コドン                     | 縮重コドン |
|---------|--------|-------------------------|-------|
| Cys     | C      | TGC TGT                 | TGY   |
| Ser     | S      | AGC AGT TCA TCC TCG TCT | WSN   |
| Thr     | T      | ACA ACC ACG ACT         | ACN   |
| Pro     | P      | CCA CCC CCG CCT         | CCN   |
| Ala     | A      | GCA GCC GCG GCT         | GCN   |
| Gly     | G      | GGA GGC GGG GGT         | GGN   |
| Asn     | N      | AAC AAT                 | AAY   |
| Asp     | D      | GAC GAT                 | GAY   |
| Glu     | E      | GAA GAG                 | GAR   |
| Gln     | Q      | CAA CAG                 | CAR   |
| His     | H      | CAC CAT                 | CAY   |
| Arg     | R      | AGA AGG CGA CGC CGG CGT | MGN   |
| Lys     | K      | AAA AAG                 | AAR   |
| Met     | M      | ATG                     | ATG   |
| Ile     | I      | ATA ATC ATT             | ATH   |
| Leu     | L      | CTA CTC CTG CTT TTA TTG | YTN   |
| Val     | V      | GTA GTC GTG GTT         | GTN   |
| Phe     | F      | TTC TTT                 | TTY   |
| Tyr     | Y      | TAC TAT                 | TAY   |
| Trp     | W      | TGG                     | TGG   |
| Ter     |        | TAA TAG TGA             | TRR   |
| Asn Asp | B      |                         | RAY   |
| Glu Gln | Z      |                         | SAR   |
| 任意      | X      |                         | NNN   |

10

20

30

40

50

## 【 0 1 0 6 】

当業者は、いくらかのあいまいさが、個々のアミノ酸をコードするすべての可能なコドンの代表である縮重コドンの決定において導入されることを理解するであろう。例えば、セリン（WSN）のための縮重コドンは、ある環境下で、アルギニン（AGR）をコードすることができ、そしてアルギニン（MGN）のための縮重コドンは、ある環境下で、セリン（AGY）

をコードすることができる。類似する関係が、フェニルアラニン及びロイシンをコードするコドン間に存在する。従って、縮重配列により包含されるいくつかのポリヌクレオチドは、変異体アミノ酸配列をコードすることができるが、しかし当業者は、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列への参照によりそのような変異体配列を容易に同定することができる。変異体配列は、本明細書に記載のようにして官能性について容易に試験され得る。

#### 【0107】

異なった種は“選択的コドン使用法”を示すことができる。一般的には、Grantham, など., Nuc. Acids Res. 8: 1893 - 912, 1980; Haas, など., Curr. Biol. 6: 315 - 24, 1996 ; Wain - Hobson, など., Gene 13: 355 - 64, 1981; Grosjean and Fiera, Gene 18: 199 - 209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14: 3075 - 87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158: 573 - 97, 1982; Sharyp and Matassi, Curr. Opin. Genet. Dev. 4: 851 (1994), Kane, Curr. Opin. Biotechnol. 6: 494(1995), 及びMakrides, Microbiol. Rev. 60: 512(1996) を参照のこと。本明細書において使用される場合、用語、“選択的コドン使用法”又は“選択的コドン”とは、一定の種の細胞に最も頻繁に使用され、従って個々のアミノ酸をコードする可能なコドンの1又は少数の代表を好むタンパク質翻訳コドンを言及する技術的用語である(表2を参照のこと)。

10

#### 【0108】

例えば、アミノ酸トレオニン(Thr)は、ACA、ACC、ACG、又はACTによりコードされるが、しかし哺乳類細胞においては、ACCが最も通常に使用されるコドンであり；他の種においては、例えば昆虫細胞、酵母、ウィルス又は細菌においては、異なったThrコドンが好ましい。特定の種のための選択的コドンは、当業界において知られている種々の方法により、本発明のポリヌクレオチド中に導入され得る。例えば、組換えDNA中への選択的コドン配列の導入は、特定の細胞型又は種内でタンパク質の翻訳により効果的にすることによって、そのタンパク質の生成を増強する。従って本明細書に開示される縮重コドン配列は、当業界において通常使用され、そして本明細書において開示される種々の細胞型及び種においてポリペプチドの発現を最適化するための鋳型として作用する。選択コドンを含む配列は、種々の種における発現について試験され、そして本明細書に開示される官能性について試験され得る。

20

#### 【0109】

本発明はさらに、他の種(オルト体)からの相対物を表すポリペプチド及び核酸分子を供給する。それらの種は、哺乳類、鳥類、両性類、八虫類、魚類、昆虫及び他の脊椎及び無脊椎動物種を包含するが、但しそれらだけには限定されない。特に興味あるものは、他の哺乳類種、例えばヒト、ラット、ブタ、羊、ウシ、犬、ネコ、馬及び他の霊長類リガンドからのZcytor 16ポリペプチドである。マウスZcytor 16ポリペプチドのオルト体は、従来のクローニング技法と組合して、本発明により供給される情報及び組成物を用いてクローン化され得る。例えば、マウスZcytor 16 cDNAは、マウスZcytor 16を発現する組織又は細胞型から得られるmRNAを用いてクローン化され得る。mRNAの適切な源は、本明細書に開示される配列から企画されたプローブによりノザンプロットをプローブすることによって同定され得る。次に、ライブラリーが陽性の組織又は細胞系のmRNAから調製される。

30

40

#### 【0110】

Zcytor 16コードのcDNAが種々の方法、例えば完全な又は部分的なZcytor16 cDNAにより、又は前記開示される配列に基づく1又は複数の変性プローブにより、プローブすることによって単離され得る。cDNAはまた、本明細書に開示される代表的なマウスZcytor 16配列から企画されたプライマーを用いて、ポリメラーゼ鎖反応を用いてもクローン化され得る。さらに、cDNAライブラリーが、宿主細胞を形質転換し、又はトランスフェクトするために使用され、そして興味あるcDNAの発現がマウスZcytor 16ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。

#### 【0111】

当業者は、配列番号37又は配列番号47に開示される配列がマウスZcytor 16の単一の対立

50

遺伝子を表し、そして対立遺伝子変動及び交互のスプライシングが生じることが予測されることを認識するであろう。本明細書に開示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子変異体は、標準の方法に従って、異なった個人からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。本明細書に開示されるヌクレオチド配列の対立遺伝子変異体、例えばサイレント突然変異を含むそれらの変異体及び突然変異がアミノ酸配列変更をもたらすそれらの変異体は、本明細書に開示されるアミノ酸配列の対立遺伝子変異体であるタンパク質のように、本発明の範囲内である。マウスZcytor 16ポリペプチドの性質を保持する、もう1つのスプライスされたmRNAから生成されるcDNAは、そのようなcDNA及びmRNAによりコードされるポリペプチドと同じように、本発明の範囲内に包含される。それらの配列の対立遺伝子変異体及びスプライス変異体は、当業界において知られている標準の方法に従って、異なった個人又は組織からのcDNA又はゲノムライブラリーをプローブすることによってクローン化され得る。

10

#### 【0112】

上記で論じられた方法を用いて、当業者は、配列番号37又は配列番号47、又は配列番号38又は配列番号48に対して実質的に相同である可溶性受容体サブユニット、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸22~230、又は27~23、0又はそれらの対立遺伝子変異体を含んで成り、そして野生型マウスzcytor16受容体のリガンド-結合性質を保持する種々のポリペプチドを調製することができる。そのような性質はまた、一般的に本明細書に開示されるような追加のポリペプチドセグメントを包含することができる。

#### 【0113】

本発明のある態様においては、単離された核酸分子は、本明細書に開示されるヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子に対して、緊縮条件下でハイブリダイズするであろう。例えば、そのような核酸分子は、緊縮条件下で、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド8~694又は697、又は77、86、又は100~694又は697のヌクレオチド配列から成る核酸分子、又は配列番号37又は配列番号47に対して相補的なヌクレオチド配列又は配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド8~694又は697、又は77、86、又は100~694又は697を含んで成る核酸分子にハイブリダイズすることができる。一般的に、緊縮条件は、定義されたイオン強度及びpHで、特定の配列のための熱溶融点( $T_m$ )よりも約5℃低くあるよう選択される。 $T_m$ は、標的配列の50%が好ましく適合されたプローブに対してハイブリダイズする温度(定義されたイオン強度及びpH下で)である。

20

30

#### 【0114】

1対の核酸分子、例えばDNA-DNA、RNA-RNA及びDNA-RNAは、ヌクレオチド配列がいくらかの程度の相補性を有する場合、ハイブリダイズすることができる。ハイブリッド二重ヘリックスにおけるミスマッチ塩基対を許容できるが、しかしハイブリッドの安定性はミスマッチの程度により影響される。ミスマッチハイブリッドの $T_m$ は、1~1.5%の塩基対ミスマッチごとに1℃低下する。ハイブリダイゼーション条件の緊縮性の変更は、ハイブリッドに存在するであろうミスマッチの程度に対する制御を可能にする。緊縮性の程度は、ハイブリダイゼーション温度が上昇し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度が低下するにつれて、上昇する。緊縮ハイブリダイゼーション条件は、ハイブリッドの熱溶融点( $T_m$ )よりも約5~25℃低い温度、及び1Mまでの $Na^+$ を有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。

40

#### 【0115】

より低い温度でのより高い温度の緊縮性は、緩衝溶液における個々の1%ホルムアミドについて約1℃、ハイブリッドの $T_m$ を低めるホルムアミドの添加により達成され得る。一般的に、そのような緊縮条件は、20~70℃の温度、及び6×SSC及び0~50%のホルムアミドを含むハイブリッド緩衝液を包含する。高い程度の緊縮性は、40~70℃の温度で及び4×SSC及び0~50%のホルムアミドを有するハイブリダイゼーション緩衝液により達成され得る。高い緊縮条件は典型的には、42~70℃の温度、及び1×SSC及び0~50%のホルムアミドを有するハイブリダイゼーション緩衝液を包含する。異なった程度の緊縮液が、

50

標的配列への最大の特異的結合を達成するために、ハイブリダイゼーション、及び洗浄の間、使用され得る。典型的には、ハイブリダイゼーションに続く洗浄は、ハイブリダイズされた複合体からハイブリダイズされていないポリヌクレオチドプローブを除去するために、上昇する程度の緊縮性で行われる。

#### 【0116】

上記条件は、ガイドとして作用することを意味し、そしてそれは特定のポリペプチドハイブリッドとの使用のためのそれらの条件を適合するために、十分に当業者の能力の範囲内である。特定の標的配列についての $T_m$ は、標的配列の50%が完全に適合されたプローブ配列にハイブリダイズするであろう温度（定義された条件下での）である。 $T_m$ に影響を及ぼすそれらの条件は、ポリヌクレオチドプローブのサイズ及び塩基対含有率、ハイブリダイゼーション溶液のイオン温度、及びハイブリダイゼーション溶液における不安定化剤の存在を包含する。

10

#### 【0117】

$T_m$ を計算するための多くの等式は当業界において知られており、そして種々の長さのDNA、RNA及びDNA-RNAハイブリッド及びポリヌクレオチドプローブ配列に対して特異的である（例えば、Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1988); Ausubel など., (eds.), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), Guide to Molecular Cloning Techniques, (Academic Press, Inc. 1987); 及びWetmur, Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 26:227 (1990)を参照のこと）。配列分析ソフトウェア、例えばOLIGO6.0 (LSR; Long Lake, MN) 及びPrimer Premier 4.0 (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), 並びにインターネット上のサイトが所定の配列を分析し、そして使用者の定義された基準に基づいて $T_m$ を計算するための手段を入手できる。

20

#### 【0118】

そのようなプログラムはまた、定義された条件下で所定の配置を分析し、そして適切なプローブ配列を同定することができる。典型的には、50以上の塩基対の長いポリヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションは、計算された $T_m$ よりも約20~25 低い温度で行われる。50以下の塩基対の小さなプローブに関しては、ハイブリダイゼーションは典型的には、 $T_m$ 又はそれよりも5~10 以下で行われる。これは、DNA-DNA及びDNA-RNAハイブリッドに関して、最大速度のハイブリダイゼーションを可能にする。

30

#### 【0119】

ヌクレオチド配列の長さは、ハイブリッド形成の速度及び安定性に影響を及ぼす。小さなプローブ配列、すなわち50個以下の塩基対は、相補的配列との平衡化にすばやく達するが、しかし安定したハイブリッドは形成されない。インキュベーション時間（およそ分~時）が、ハイブリッド形成を達成するために使用され得る。より長いプローブ配列はよりゆっくりと平衡化するが、しかし低い温度でさえ、より安定した複合体を形成する。インキュベーションは、一晚又はそれ以上の間、進行せしめられる。一般的に、インキュベーションは、計算されたコット時間の3倍に等しい期間、行われ得る。コット時間、すなわちポリヌクレオチド配列が再会合するのにかかる時間は、当業界において知られている方法により、特定の配列について計算され得る。

40

#### 【0120】

ポリヌクレオチド配列の塩基対組成が、ハイブリッド複合体の熱安定性をもたらし、それにより、ハイブリダイゼーション温度の選択及びハイブリダイゼーション緩衝液のイオン強度に影響を及ぼす。A-T対は、塩化ナトリウムを含む水溶液においてG-C対よりも低い安定性である。従って、G-C含有率が高いほど、ハイブリッドはより安定する。配列内のG及びC残基の平等な分布がまた、ハイブリッド安定性に正に寄与する。さらに、塩基対組成は、所定の配列の $T_m$ を変えるために操作され得る。例えば5-メチルデオキシシチンは、デオキシシチンより置換され得、そして5-プロモデオキシウリジンは、デオキシシチンにより置換され得、そして5-プロモデオキシウリジンは $T_m$ を高めるためにチミジンにより置換され、そして7-デアズ-2'-デオキシグアノシンは、 $T_m$ に対する依存

50

性を低めるためにグアニシンにより置換され得る。

#### 【0121】

ハイブリダイゼーション緩衝液のイオン濃度はまた、ハイブリッドの安定性に影響お及ぼす。ハイブリダイゼーション緩衝液は一般的にブロッキング剤、例えばDenhardt溶液 (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.)、変性されたサケ精子DNA、粉乳 (BLOTTO)、ヘパリン又はSDS、及びNa<sup>+</sup>源、例えばSSC (1 × SSC: 0.15: NのNaCl、15mMのクエン酸ナトリウム) 又はSSPE (1 × SSPE: 1.8MのNaCl、10mMのNaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、1mMのEDTA、pH7.7)を含む。典型的には、ハイブリダイゼーション緩衝液は、10mM ~ 1 MのNa<sup>+</sup>を含む。不安定剤又は変性剤、例えば、ホルムアミド、テトラアルキルアンモニウム塩、グアニジウムカチオン又はチオシアネートカチオンのハイブリダイゼーション溶液への添加が、ハイブリッドのT<sub>m</sub>を変更するであろう。典型的には、ホルムアミドが、より便利で且つ低い温度でのインキュベーションの実施を可能にするために、50%までの濃度で使用される。ホルムアミドはまた、RNAプローブを用いる場合、非特異的バックグラウンドを低めるためにも作用する。

10

#### 【0122】

例示のように、変異体マウスZcytor 16ポリペプチドをコードする核酸分子が、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列 (又はその補体) を有する核酸分子により、50%ホルムアミド、5 × SSC、50mMのリン酸ナトリウム (pH7.6)、5 × Denhardt's 溶液 (100 × Denhardt's 溶液: 2% (w/v) のFicoll 400, 2% (w/v) のポリビニルピロリドン及び2% (w/v) のウシ血清アルブミン)、10%の硫酸デキストラン及び20 µg/mlの変性され、切断されたサケ精子DNAを含んで成る溶液において、42 °で一晩ハイブリダイズされ得る。当業者は、それらのハイブリダイゼーション条件の変動性を考慮することができる。例えば、ハイブリダイゼーション混合物は、ホルムアミドを含まない溶液において、高度で、例えば約65 °でインキュベートされ得る。さらに、予備混合されたハイブリダイゼーション溶液が入手でき (例えば、CLONTECH Laboratories, Inc. からのEXPRESSHYB Hybridization Solution)、そしてハイブリダイゼーションは製造業者の説明書に従って行われ得る。

20

#### 【0123】

ハイブリダイゼーションに続いて、核酸分子は、緊縮条件下で、又は高い緊縮条件下で、ハイブリダイズされなかった核酸分子を除去するために洗浄され得る。典型的な緊縮洗浄条件は、0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む0.5 × ~ 2 × SSC溶液による55 ~ 65 °での洗浄を包含する。すなわち、変異体マウスZcytor 16ポリペプチドをコードする核酸分子は、緊縮洗浄条件下で、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列 (又はその補体) を有する核酸分子とハイブリダイズし、ここで前記洗浄緊縮性は、55 ~ 65 °での、0.1% SDSを含む0.5 × ~ 2 × SSC溶液、例えば55 °での、0.1% SDSを含む0.5 × SSC溶液、又は65 °での0.1% SDSを含む2 × SSC溶液に等しい。当業者は、例えば洗浄溶液におけるSSCをSSPEにより置換することによって同等の条件を容易に製造することができる。

30

#### 【0124】

典型的な高い緊縮洗浄条件は、50 ~ 65 °での0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を含む0.1 × ~ 0.2 × SSCの溶液による洗浄を包含する。例えば、変異体マウスZcytor 16ポリペプチドをコードする核酸分子は、高い緊縮洗浄条件下で、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列 (又はその補体) を有する核酸分子とハイブリダイズし、ここで前記洗浄緊縮性は、50 ~ 65 °での、0.1% SDSを含む0.1 × ~ 0.2 × SSC溶液、例えば50 °での、0.1% SDSを含む0.1 × SSC溶液、又は65 °での0.1% SDSを含む0.2 × SSC溶液に等しい。

40

#### 【0125】

本発明はまた、配列番号38又は配列番号48のポリペプチド又はそれらのオルト体に対して実質的に類似する配列同一性を有する単離されたマウスZcytor 16ポリペプチドも提供する。用語“実質的に類似する配列同一性”とは、配列番号38又は配列番号48で示される配列又はそれらのオルト体に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも95%以上の配列同一性を有するポリペプチドを示すために本明細書において使用される。

50



## 【 0 1 2 6 】

本発明はまた、2種の次の基準を用いて同定され得るマウスZcytor 16変異体核酸分子を企画する：配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列とコードされたポリペプチドとの間の類似性の決定、及びハイブリダイゼーションアッセイ。そのようなマウスZcytor 16変異体は、(1) 55～65 での0.1% SDSを含む $0.5 \times \sim 2 \times$  SSC溶液に等しい緊縮洗浄条件下で、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、そして(2) 配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は95%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。他方では、マウスZcytor16変異体は、(1) 50～65 での0.1% SDSを含む $0.1 \times \sim 0.2 \times$  SSC溶液に等しい、高い緊縮洗浄条件下で、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列（又はその補体）を有する核酸分子とハイブリダイズし、そして(2) 配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は95%以上の配列同一性を有するポリペプチドをコードする核酸分子として特徴づけられ得る。

10

## 【 0 1 2 7 】

%配列同一性は、従来の方法により決定される。例えば、Altschulなど., Bull. Math. Bio. 48 : 603 - 616, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 10915 - 10919, 1992を参照のこと。手短に言及するば、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ拡張ペナルティー、及び表3（アミノ酸は標準の1文字コードにより示される）に示されるようなHenikoff and Henikoff（前記）の“BLOS UM62”評点マトリックスを用いて、その整合評点を最適化するために整合される。次に、%同一性が次のようにして計算される。

20

## 【 0 1 2 8 】

## 【 数 1 】

[同一適合の合計数]

$$\frac{[\text{長い方の配列の長さ}] + \left[ \begin{array}{l} \text{2種の配列を整合させるために長い方の} \\ \text{配列に導入されるギャップの数} \end{array} \right]}{\times 100}$$

30

## 【 0 1 2 9 】

## 【 表 3 】

表 3

|   | A  | R  | N  | D  | C  | Q  | E  | G  | H  | I  | L  | K  | M  | F  | P  | S  | T  | W  | Y  | V |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|
| A | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| R | -1 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| N | -2 | 0  | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| D | -2 | -2 | 1  | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| C | 0  | -3 | -3 | -3 | 9  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| Q | -1 | 1  | 0  | 0  | -3 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| E | -1 | 0  | 0  | 2  | -4 | 2  | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| G | 0  | -2 | 0  | -1 | -3 | -2 | -2 | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| H | -2 | 0  | 1  | -1 | -3 | 0  | 0  | -2 | 8  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| I | -1 | -3 | -3 | -3 | -1 | -3 | -3 | -4 | -3 | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| L | -1 | -2 | -3 | -4 | -1 | -2 | -3 | -4 | -3 | 2  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |   |
| K | -1 | 2  | 0  | -1 | -3 | 1  | 1  | -2 | -1 | -3 | -2 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |   |
| M | -1 | -1 | -2 | -3 | -1 | 0  | -2 | -3 | -2 | 1  | 2  | -1 | 5  |    |    |    |    |    |    |   |
| F | -2 | -3 | -3 | -3 | -2 | -3 | -3 | -3 | -1 | 0  | 0  | -3 | 0  | 6  |    |    |    |    |    |   |
| P | -1 | -2 | -2 | -1 | -3 | -1 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | -1 | -2 | -4 | 7  |    |    |    |    |   |
| S | 1  | -1 | 1  | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | -1 | -2 | -2 | 0  | -1 | -2 | -1 | 4  |    |    |    |   |
| T | 0  | -1 | 0  | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -2 | -1 | -1 | -1 | -1 | -2 | -1 | 1  | 5  |    |    |   |
| W | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -2 | -3 | -2 | -2 | -3 | -2 | -3 | -1 | 1  | -4 | -3 | -2 | 11 |    |   |
| Y | -2 | -2 | -2 | -3 | -2 | -1 | -2 | -3 | 2  | -1 | -1 | -2 | -1 | 3  | -3 | -2 | -2 | 2  | 7  |   |
| V | 0  | -3 | -3 | -3 | -1 | -2 | -2 | -3 | -3 | 3  | 1  | -2 | 1  | -1 | -2 | -2 | 0  | -3 | -1 | 4 |

10

20

30

## 【 0 1 3 0 】

当業者は、2種のアミノ酸配列を整列するために多くの確立されたアルゴリズムが存在することを理解している。Pearson and Lipmanの“FASTA”類似性調査アルゴリズムは、1つのアミノ酸配列及び推定上のマウスZcytor 16変異体のアミノ酸配列により供給される同一性のレベルを試験するための適切なタンパク質整列方法である。前記FASTAアルゴリズムは、Pearson and Lipman, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988), 及びPearson, Meth. Enzymol. 183: 63 (1990) により記載される。手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号38又は配列番号48）及び保存性アミノ酸置換、挿入又は欠失を考慮しないで、最高密度の同一性（ktup変数が1である場合）又は対の同一性（ktup=2である場合）のいずれかを有する試験配列により共有される領域を同定することによって配列を特徴づける。

40

## 【 0 1 3 1 】

次に、最高密度の同一性を有する10の領域が、アミノ酸置換マトリックスを用いて、すべての対合されたアミノ酸の類似性を比較することによって再評価され、そして前記領域の末端が、最高の評点に寄与するそれらの残基のみを含むよう“整えられる”。“カットオフ”値（配列の長さ及びktup値に基づいて予定された式により計算される）よりも高い評点を有するいくつかの領域が存在する場合、その整えられた初期領域が、その領域がギャップとのおおよそその一列配列を形成するために結合され得るかどうかを決定するために試

50

験される。

【0132】

最終的に、2種のアミノ酸配列の最高評点領域が、アミノ酸挿入及び欠失を可能にする、Needleman-Wunsch アルゴリズム (Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48: 444, 1970 ; Sellers, SIAM J. Appl. Math. 26: 787, 1974) の変法を用いて整列される。FASTA 分析のための好ましいパラメーターは次のものである: ktup= 1、ギャップ開始ペナルティー= 10、ギャップ拡張ペナルティー= 1 及び置換マトリックス= BLOSUM62。それらのパラメーターは、Appendix 2 of Pearson, 1990 (前記) に説明されるように、評点マトリックスを調節することによってFASTAプログラム中に導入され得る。

【0133】

FASTAはまた、上記に開示されるような割合を用いて、核酸分子の配列同一性を決定するためにも使用され得る。ヌクレオチド配列比較のためには、ktup値は、上記に設定される他のパラメーターを伴って、1 ~ 6、好ましくは3 ~ 6、最も好ましくは3であり得る。

【0134】

本発明は、本明細書に開示されるアミノ酸配列に比較して、1又は複数の保存性アミノ酸変更を有するポリペプチドをコードする核酸分子を包含する。例えば、配列番号38又は配列番号48の1又は複数のアミノ酸置換を含む変異体を得られ、ここでアルキルアミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸配列におけるアルキルアミノ酸に代わって置換され、芳香族アミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸における芳香族アミノ酸に代わって置換され、硫黄含有アミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸配列における硫黄含有アミノ酸に代わって置換され、ヒドロキシ含有アミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸配列におけるヒドロキシ含有アミノ酸に代わって置換され、酸性アミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸配列における酸性アミノ酸に代わって置換され、塩基性アミノ酸がマウスZcytor 16アミノ酸配列における塩基性アミノ酸に代わって置換され、又は二塩基性モノカルボン酸アミノ酸マウスZcytor 16アミノ酸配列における二塩基性モノカルボン酸アミノ酸に代わって置換される。

【0135】

通常のアミノ酸の中で、“保存性アミノ酸置換”は、次のグループの個々内のアミノ酸間の置換により示される: (1) グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、(2) フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン、(3) セリン及びトレオニン、(4) アスパラギン酸及びグルタミン酸、(5) グルタミン及びアスパラギン、及び(6) リシン、アルギニン及びヒスチジン。BLOSUM62表は、関連するタンパク質の500以上のグループの高く保存された領域を表す、タンパク質配列セグメントの約2,000の局所の複数整列に由来するアミノ酸置換マトリックスである [Henikoff and Henikoff, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 89: 10915 (1992)]。

【0136】

従って、BLOSUM62置換頻度は、本発明のアミノ酸配列中に導入され得る保存性アミノ酸置換を定義するために使用され得る。単に化学的性質に基づいてのアミノ酸置換を企画することが可能であるが(上記で論じられたように)、用語“保存性アミノ酸置換”とは、-1よりも大きなBLOSUM62値により表される置換を言及する。例えば、アミノ酸置換は、その置換が0, 1, 2又は3のBLOSUM62値により特徴づけられる場合、保存性である。このシステムによれば、好ましい保存性アミノ酸置換は、少なくとも1(例えば、1, 2又は3)のBLOSUM62値により特徴づけられ、ところがより好ましくは保存性置換は、少なくとも2(例えば、2又は3)のBLOSUM62値により特徴づけられる。

【0137】

Zcytor 16の特定の変異体は、その対応するアミノ酸配列(すなわち、配列番号2)に対して、少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%又は95%以上の配列同一性を有することによって特徴づけられ、ここでアミノ酸配列の変動は、1又は複数のアミノ酸置換による。

【0138】

10

20

30

40

50

マウスZcytor 16遺伝子における保存性アミノ酸変化が、配列番号37又は配列番号47のいずれか1つに列挙されるヌクレオチドに代わってヌクレオチドを置換することによって導入され得る。そのような“保存性アミノ酸”変異体は、例えばオリゴヌクレオチド指図された突然変異誘発、リンカー走査突然変異誘発、ポリメラーゼ鎖反応を用いての突然変異誘発及び同様の方法により得られる (Ausubel (1995) pages 8-10 ~ 8-22; 及び McPherson (ed.), Directed Mutagenesis: A Practical Approach (IRL Press 1991) を参照のこと)。変異体マウスZcytor 16ポリペプチドが、抗 - マウスZcytor 16抗体を特異的に結合する能力により同定され得る。

#### 【0139】

本発明のタンパク質はまた、天然に存在しないアミノ酸残基を含んで成る。天然に存在しないアミノ酸は、トランス - 3 - メチルプロリン、2,4 - メタプロリン、シス - 4 - ヒドロキシプロリン、トランス - 4 - ヒドロキシプロリン、N - メチルグリシン、アロ - トレオニン、メチルトレオニン、ヒドロキシエチルシステイン、ヒドロキシエチルホモシステイン、ニトログルタミン、ホモグルタミン、ピペコリン酸、チアゾリジンカルボン酸、デヒドロプロリン、3 - 及び 4 - メチルプロリン、3,3 - ジメチルプロリン、tert - ロイシン、ノルバリン、2 - アザフェニルアラニン、3 - アザフェニルアラニン、4 - アザフェニルアラニン、及び 4 - フルオロフェニルアラニンを包含する。天然に存在しないアミノ酸残基をタンパク質中に導入するためのいくつかの方法が当業界において知られている。

#### 【0140】

例えばナンセンス突然変異が化学的にアミノアシル化されたサブレッサー tRNA を用いて抑制されるインビトロシステムが使用され得る。アミノ酸を合成し、そして tRNA をアミノアシル化するための方法は、当業者において知られている。ナンセンス突然変異を含むプラスミドの転写及び翻訳は、E. コリ S30 抽出物及び市販の酵素及び他の試薬の含んで成る細胞フリーシステムにおいて実施される。タンパク質は、クロマトグラフィーにより精製される。例えば、Rovertson など., J. Am. Chem. Soc. 113: 2722, 1991; Ellman など., Meth. Enzymol. 202: 301, 1991; Chung など., Science 259: 806 - 09, 1993; 及び Chung など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10145 - 49, 1993 を参照のこと。

#### 【0141】

第2の方法においては、翻訳は、突然変異誘発された mRNA 及び化学的にアミノアミル化されたサブレッサー - tRNA のマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵母細胞において行われる (Turcatti など., J. Biol. Chem. 271: 1991 - 98, 1996)。第3の方法においては、E. コリ細胞が、置換される予定である天然のアミノ酸 (例えば、フェニルアラニン) の不在下で及び所望する天然に存在しないアミノ酸 (例えば、2 - アザフェニルアラニン、3 - アザフェニルアラニン、4 - アザフェニルアラニン又は 4 - フルオロフェニルアラニン) の存在下で培養される。天然に存在しないアミノ酸は、その天然の相対物の代わりにタンパク質中に導入される。Koide など., Biochem. 33: 7470 - 46, 1994 を参照のこと。天然に存在するアミノ酸残基は、インビトロ化学的に修飾により天然に存在しない種に転換され得る。化学的修飾は、置換の範囲をさらに拡張するために特定部位の突然変異誘発と組み合わせられ得る (Wynn and Richards, Protein Sci. 2: 395 - 403, 1993)。

#### 【0142】

限定された数の非保存性アミノ酸、遺伝子コードによりコードされないアミノ酸、天然に存在しないアミノ酸、及び不自然なアミノ酸が、Zcytor 16 アミノ酸により置換され得る。

#### 【0143】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸は、当業界において知られている方法、例えば特定部位の突然変異誘発又はアラニン - 走査突然変異誘発により同定され得る (Cunningham and Wells, Science 244: 1081 - 1085, 1989; Bass など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 4498 - 502, 1991), Coombs and Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Pr

10

20

30

40

50

rotein Engineering” , in Proteins: Analysis and Design, Angeletti(ed.) Ppages 259-311(Academic Press, Inc. 1998))。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子中のあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、前記分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるように、生物学的活性について試験される。また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699 - 5708, 1996を参照のこと。

#### 【0144】

配列分析はマウスZcytor 16リガンド結合領域を同定するために使用され得るが、マウスZcytor 16結合活性(例えば、リガンドIL-TIF又は抗-マウスZcytor 16抗体へのZcytor 16の結合)において役割を演ずるアミノ酸はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異と共に、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定されるように、構造体の物理的分析によっても決定され得る。例えば、de Ves など., Science 255: 306 (1992), Smith など., J. Mol. Biol. 224: 899 (1992), 及びWlodaver など., FEBS Lett. 309:59 (1992) を参照のこと。

10

#### 【0145】

複数アミノ酸置換は、突然変異誘発及びスクリーニングの既知方法、例えばReidhaar-Olson and Sauer (science 241: 53 - 57, 1988) 又はBowie and Sauer ( Proc. Natl. Acad. Sci. USA86:2152 - 2156, 1989 ) により開示される方法を用いて行われ、そして試験される。手短に言及すれば、それらの著者は、ポリペプチドにおける複数の位置を同時ランダム化し、機能的ポリペプチドをスクリーンし、そして次に個々の位置での可能な置換の範囲を決定するために、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定するための方法を開示する。使用され得る他の方法は、ファージ表示(例えば、Lowman など., Biochem. 30 : 10832 - 10837, 1991; Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号; Huse, WIP0公開W0 92 / 06204号)、及び領域 - 指図された突然変異誘発(Derbyshire など., Gene 46 : 145, 1986; Ner など., DNA 7 : 127, 1988 ) を包含する。さらに、ビオチン又はFITCによりラベルされたマウスZcytor 16は、マウスZcytor 16リガンドの発現クローニングのために使用され得る。

20

#### 【0146】

開示されるマウスZcytor 16ヌクレオチド及びポリペプチド配列の変異体は、Stemmer, Nature 370 : 389 - 91, 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 10747 - 51, 1994及びWIP0公開WI97 / 20078により開示されるように、DNA シャフリングを通して生成され得る。手短に言及すれば、変異体DNA分子が、ランダムに導入された点突然変異をもたらず、親DNAのランダム断片化、続く、PCRを用いてのアセンブリーによるインビトロ相同組換えにより生成される。この技法は、前記工程中に追加の変動性を導入するために、親DNAのファミリー、例えば異なった種からの対立遺伝子変異体又はDNAを用いて改良され得る。所望する活性の選択又はスクリーニング、突然変異誘発及びアッセイの続くさらなる相互作用が、有害な変化に対して同時に選択しながら、所望する突然変異について選択することによって、配列の急速な“進化”を提供する。

30

#### 【0147】

本明細書に開示されるような突然変異誘発方法は、宿主細胞におけるクローン化された突然変異誘発されたポリペプチドの活性を検出するために高処理量の自動化されたスクリーニング方法と組み合わせられ得る。生物学的に活性のポリペプチド又は抗-マウスZcytor 16抗体と結合するポリペプチドをコードする突然変異誘発されたDNA分子が、宿主細胞から回収され、そしてすぐに、近代的装置を用いて配列され得る。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける個々のアミノ酸残基の重要性の急速な決定を可能にし、そして未知の構造のポリペプチドに適用され得る。

40

#### 【0148】

本発明はまた、マウスZcytor 16ポリペプチドの“機能的フラグメント”及びそのような機能的フラグメントをコードする分子を包含する。核酸分子の通常の欠失分析は、マウスZcytor 16ポリペプチドをコードする核酸分子の機能的フラグメントを得るために行われ

50

得る。例示されるように、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列を有するDNA分子は、一連の欠失を得るためにBal3 Tヌクレアーゼにより消化され得る。次に、フラグメントが正しい読み取り枠を整合して発現ベクター中に挿入され、そして発現されたポリペプチドが単離され、そして細胞-細胞相互作用について、又は抗-マウスZcytor 16抗体を結合する能力について試験される。エキソヌクレアーゼ消化のための1つの方法は、欠失を導入するためにオリゴヌクレオチド-指図された突然変異誘発を使用し、又は所望するフラグメントの生成を特定するために停止コドンを使用することである。他方では、マウスZcytor 16遺伝子の特定のフラグメントは、ポリメラーゼ鎖反応を用いて合成され得る。

#### 【0149】

インターフェロンのいずれかの又は両末端での切断に対する研究により例示されるこの一般的アプローチは、Horisberger and Di Marco, pharmac. Ther. 66: 507 (1995) により要約されている。さらに、タンパク質の機能的分析のための標準技法は、例えばTreutterなど., Molec. Gen. Genet. 240: 113 (1993), Content など., “Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon”, in Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems, Cantell (ed.), Pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, “The EGF Enzyme”, in Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1, Boynton など., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985), Counaillieu など., J. Biol. Chem. 270: 29270 (1995); Fukunaga など., J. Biol. Chem. 270: 25291 (1995); Yamaguchi など., Biochem. Pharmacol. 50: 1295 (1995); 及びMeiselなど., Plant Molec. Biol. 30: 1 (1996)により記載される。

#### 【0150】

本明細書に開示される特定の配列の分析は、表4に示される1組の例示的機能フラグメントを提供し、個々で“Fmドメイン”はフィブロネクチンIIIドメインを示すために使用される。表4に示さない、本発明書に記載される追加のマウスZcytor 16機能的変異体ドメインをコードするヌクレオチドが、配列番号37又は配列番号47に関して、決定され得る。そのようなフラグメントは、配列番号37又は配列番号47の次のヌクレオチドを配列、すなわちヌクレオチド77、86又は100～373及びヌクレオチド8～694又は697、及びそれらによりコードされるアミノ酸配列、例えば配列番号38又は配列番号48に示されるそれらを、それぞれ包含する。

#### 【0151】

#### 【表4】

| マウスZcytor 16<br>特徴 | アミノ酸残基<br>(配列番号38又は配列番号48) | ヌクレオチド<br>(配列番号37又は配列番号47) |
|--------------------|----------------------------|----------------------------|
| 第1Fmドメイン           | 31-122                     | 100-373                    |
| 第2Fmドメイン           | 131-229                    | 401-694                    |
| 両Fmドメイン            | 31-229                     | 100-694                    |

#### 【0152】

本発明はまた、本明細書に開示されるアミノ配列に比較して、アミノ配列変化を有するマウスZcytor 16遺伝子の機能的フラグメントも企画する。変異体マウスZcytor 16遺伝子は、上記のように、開示されるヌクレオチド及びアミノ酸配列との同一性のレベルを決定することにより、構造体に基づいて同定され得る。構造体に基づいて変異体遺伝子を同定するもう1つのアプローチは、可能性ある変異体マウスZcytor 16遺伝子をコードする核酸

分子が、上記のように、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列を有する核酸分子にハイブリダイズすることができるかどうかを決定することである。

【0153】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのマウスZcytor 16ポリペプチドに関しては、当業者は、上記表1及び2に示される情報を用いて、その変異体をコードする十分な縮重ポリヌクレオチド配列を容易に生成することができる。さらに、当業者は、本明細書に記載されるヌクレオチド及びアミノ酸配列に基づいて、種々のマウスZcytor 16変異体に標準のソフトウェアを使用することができる。従って、本発明は、次の配列、すなわち配列番号37又は配列番号47、配列番号38又は配列番号48、及び配列番号39又は配列番号49の少なくとも1つの配列を提供するデータ構造によりコードされるコンピューターに読み取り可能媒体を包含する。

10

【0154】

適切な形のコンピューター読み取り可能媒体は、磁気媒体及び光学的読み取り可能な媒体を包含する。磁気媒体の例は、ハード又は固定されたドライブ、ランダムアクセス記憶(RAM)チップ、フロッピーディスク、デジタルリニアテープ(DLT)、ディスクカーシ及びZIPディスクを包含する。光学的読み取り可能な媒体は、コンパクトディスク(例えば、CD-読み取りのみ記憶(ROM)、CD-再書き込みできる(RW)及びCD-再記録できる)、及びデジタル可転性/ビデオディスク(DVD)(例えば、DVD-ROM、DVD-RAM及びDVD+RW)により例示される。

【0155】

本発明はまた、本明細書に記載されるマウスZcytor 16ポリペプチドのエピトープ-担持の部分を含んで成るポリペプチドフラグメント又はペプチドも提供する。そのようなフラグメント又はペプチドは、完全なタンパク質が免疫原として使用される場合、抗体応答を誘発するタンパク質の一部である“免疫原性エピトープ”を含んで成る。免疫原性エピトープ-担持のペプチドは、標準方法を用いて同定され得る。(例えば、Geysenなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA81: 3988, 1983を参照のこと)。

20

【0156】

対照的に、ポリペプチドフラグメント又はペプチドは、抗体が特異的に結合することができるタンパク質分子の領域である“抗原性エピトープ”を含んで成る。一定のエピトープは、線状又は連続した範囲のアミノ酸から成り、そしてそのようなエピトープの抗原性は、変性剤により破壊されない。タンパク質のエピトープを模倣する比較的短い合成ペプチドがタンパク質に対する抗体の生成を刺激するために使用され得ることは、当業界において知られている(例えば、Sutcliffeなど., Science 219: 660, 1983を参照のこと)。従って、本発明の抗原性エピトープ-担持のペプチド及びポリペプチドは、本明細書に記載されるポリペプチドと結合する抗体を生ぜしめるために有用である。

30

【0157】

抗原性エピトープ-担持のペプチド及びポリペプチドは好ましくは本明細書に開示されるアミノ酸配列の少なくとも4~10個のアミノ酸、少なくとも10~15個のアミノ酸、又は約15~約30個のアミノ酸を含む。そのようなエピトープ-担持のペプチド及びポリペプチドは、本明細書に記載されるように、マウスZcytor 16ポリペプチドのフラグメント化又は化学的ペプチド合成により生成され得る。さらに、エピトープは、ランダムペプチドライブラリーのファージ表示により選択され得る(例えば、Lane and Stephen, Curr. Opin. Immunol. 5: 268, 1993, 及びCortese など., Curr. Opin. Biotechnol. 7: 616, 1996を参照のこと)。

40

【0158】

エピトープを含んで成る小さなペプチドからエピトープを同定し、そして抗体を生成するための標準の方法は、例えばMole, “Epitope Mapping,” in Methods in Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.), Pages 105-16 (The Humana Press, Inc., 1992), Price, “Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies,” in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritte

50

r and Ladyman (eds.), page 60-84 (Cambridge University Press 1995), 及び Coligan など. (eds.), Current Protocols in Immunology, pages 9.3.1-9.3.5 and pages 9.4.1-9.4.11 (John Wiley & Sons, 1997)により記載される。

#### 【0159】

##### 6. マウス Zcytor 16ポリペプチドの生成：

十分な長さのポリペプチド；可溶性モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体；十分な長さの受容体；受容体フラグメント（例えば、リガンド-結合フラグメント）；機能的フラグメント；及び融合タンパク質を包含する本発明のポリペプチドは、従来の技法に従って、組換え宿主細胞において生成され得る。マウス Zcytor 16遺伝子を発現するためには、ポリペプチドをコードする核酸分子が、発現ペプチドにおいて転写発現を制御し、そして次に、宿主細胞中に導入される調節配列に作用可能に連結されるべきである。転写調節配列、例えばプロモーター及びエンハンサーの他に、発現ベクターは、翻訳調節配列、及び発現ベクターを担持する細胞の選択のために適切なマーカー遺伝子を包含することができる。

10

#### 【0160】

真核細胞において外来性タンパク質の生成のために適切である発現ベクターは、典型的には、(1)細胞宿主における発現ベクターの増殖及び選択を提供するための細菌複製起点及び抗生物質耐性マーカーをコードする真核DNA要素；(2)転写の開始を制御する真核DNA要素、例えばプロモーター；及び(3)転写体のプロセッシングを制御するDNA要素、例えば転写終結/ポリアデニル化配列を含む。上記で論じられたように、発現ベクターはまた、異種ポリペプチドを、宿主細胞の分泌経路中に方向づける分泌配列コードするヌクレオチド配列を包含する。例えば、マウス Zcytor 16発現ベクターは、マウス Zcytor 16遺伝子、及びいずれかの分泌された遺伝子に由来する分泌配列を含むことができる。

20

#### 【0161】

本発明のマウス Zcytor 16タンパク質は、哺乳類細胞において発現され得る。適切な哺乳類宿主細胞の例は、アフリカミドリザル腎細胞 (Vero; ATCC CRL1587)、ヒト胚腎細胞 (293-HEK; ATCC CRL1573)、子供のハムスター腎細胞 (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL8544, ATCC CRL10314)、イヌ腎細胞 (MDCK; ATCC CCL34)、チャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 [Chasinなど., Som. Cell. Molec. Genet. 12: 555 (1986)]、ラット下垂体細胞 (CH1; ATCC CCL82)、HeLa S3細胞 (ATCC CCL2.2)、ラット肝癌細胞 (H-4-II-E; ATCC CRL1548)、SV40-形質転換されたモンキー腎細胞 (COS-1; ATCC CRL1650) 及びネズミ胚細胞 (NIH-3T3; ATCC CRL1658) を包含する。

30

#### 【0162】

哺乳類宿主に関しては、転写及び翻訳シグナルは、ウィルス源、例えばアデノウィルス、ウシ乳頭腫ウィルス、サルウィルス又は同様のものに由来することができ、ここで調節するシグナルは、高レベルの発現を有する特定の遺伝子に関連している。適切な転写及び翻訳調節配列はまた、哺乳類遺伝子、例えばアクチン、コラーゲン、ミコシン及びメタロチオネイン遺伝子から得られる。

#### 【0163】

転写調節配列は、RNA合成の開始を方向づけるために十分なプロモーター領域を含む。適切な真核プロモーターは、マウスメタロチオネインI遺伝子のプロモーター (Hamerなど., J. Molec. Appl. Genet. 1: 273 (1982))、ヘルペスウィルスのTKプロモーター (Mcknight, Cell 31: 355 (1982))、SV40初期プロモーター (Benoistなど., Nature 290: 304 (1981))、Rous肉腫ウィルスプロモーター (Gormanなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 6777 (1982))、サイトメガロウィルスプロモーター (Foeckingなど., Gene 45: 101 (1980)) 及びマウス乳腫瘍ウィルスプロモーター (一般的には、Etcheverry, "Expression of Engineered Protein in Mammalian Cell Culture", in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland など., (eds.), p. 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照のこと) を包含する。

40

#### 【0164】

50



他方では、原核プロモーター、例えばバクテリオファージT3 RNAポリメラーゼプロモーターは、その原核プロモーターが真核プロモーターにより調節される場合、哺乳類細胞におけるマウスZcytor 16遺伝子発現を制御するために使用され得る (Zhouなど., Mol. Cell. Biol. 10: 4529 (1990), 及びKaukamanなど., Nucl. Acids Res. 19: 4485 (1991) を参照のこと)。

#### 【0165】

一定の態様においては、マウスZcytor16モノマー又はホモダイマー可溶性受容体ポリペプチドをコードするDNA配列、又はヘテロダイマー又はマルチマーマウスZcytor16可溶性受容体、例えばCRF2-4又はIL10Rポリペプチドの追加のサブユニットをコードするDNA配列は、発現ベクター内のその発現のために必要とされる他の遺伝子要素、例えば一般的に転写プロモーター及びターミネーターに作用可能に連結される。前記ベクターはまた、通常、1又は複数の選択マーカー及び1又は複数の複製起点を含むが、但し、当業者は、一定のシステム内で、選択マーカーが、別のベクターに基づいて供給され得、そして外因性DNAの複製が宿主細胞ゲノム中への組み込みにより供給され得ることを認識するであろう。

10

#### 【0166】

プロモーター、ターミネーター、選択マーカー、ベクター及び他の要素の選択は、当業者のレベル内である。多くのそのような要素は、文献に記載されており、そして市販されている。可溶性受容体複合体の複数の成分は、個々の発現ベクターに基づいて同時トランスフェクトされ得、又は単一の発現ベクターに含まれ得る。タンパク質複合体の複数成分を発現するそのような技法は、当業界において良く知られている。

20

#### 【0167】

発現ベクターは、種々の標準の技法、例えばリン酸カルシウムトランスフェクション、リポソーム-介在性トランスフェクション、マイクロプロジェクト-介在性供給、エレクトロポレーション及び同様のものを用いて、宿主細胞中に導入され得る。好ましくは、トランスフェクトされた細胞が選択され、そして増殖され、宿主細胞ゲノムに安定して組み込まれる発現ベクターを含んで成る組換え宿主細胞が供給される。真核細胞中にベクターを導入するための技法、及び優性選択マーカーを用いてのそのような安定した形質転換体を選択するための技法は、例えばAusubel (1995) 及びMurray (ed.), Gene Transfer and Expression Protocols (Humana Press 1991) により記載される。

#### 【0168】

例えば、1つの適切な選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性を付与する遺伝子である。この場合、選択は、ネオマイシン型薬物、例えばG-418又は同様のもの存在下で実施される。“増幅”として言及される方法である選択システムは、興味ある遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。増幅は、低レベルの選択剤の存在下でトランスフェクタントを培養し、そして次に、導入された遺伝子の生成物を高レベルで生成する細胞を選択するために選択剤の量を高めることによって実施される。

30

#### 【0169】

好ましい増幅可能選択マーカーは、メトトレキセートに対する耐性を付与するジヒドロ葉酸レダクターゼである。他の耐薬物性遺伝子(例えば、ヒグロマイシン耐性、複数薬物耐性、ピューロマイシン アセチルトランスフェラーゼ)もまた、使用され得る。変更された表現型を導入する他のマーカー、例えば緑色蛍光タンパク質、又は細胞表面タンパク質、例えばCD4, CD8, クラスI MHC、胎盤アルカリホスファターゼが、FACS分類又は磁気ビース分離技法のような手段により、トランスフェクトされていない細胞とトランスフェクトされた細胞とを分類するために使用され得る。

40

#### 【0170】

マウスZcytor 16ポリペプチドはまた、ウィルス供給システムを用いて、培養された哺乳類細胞により生成され得る。この目的のための典型的なウィルスは、アデノウィルス、ヘルペスウィルス、レトロウィルス、ワクシニアウィルス及びアデノ関連ウィルス(AAV)を包含する。アデノウィルス、すなわち二本鎖DNAウィルスは現在、異種核酸の供給のための最も研究されている遺伝子トランスファーベクターである (Becker など., Meth. Ce

50

II Bio. 43: 161 - 89, 1994; 及び J. T. Douglas and D.T. Curiel, Science & Medicine 4: 44 - 53, 1997 を参照のこと)。アデノウィルスシステムの利点は、比較的大きなDNA挿入体の収容、高い力価に増殖する能力、広範囲の哺乳類細胞型を感染する能力、及び異なったプロモーターを含む多数の入手できるベクターとの使用を可能にする柔軟性を包含する。

#### 【0171】

アデノウィルスゲノムの一部を欠失することによって、異種DNAの大きな挿入体（7kbまでの）が収容され得る。それらの挿入体は、直接的な連結により、又はトランスフェクトされたプラスミドによる相同組換えにより、ウィルスDNA中に導入され得る。EI遺伝子が宿主細胞により供給されない場合、複製の無能性をもたらす、ウィルスベクターからの必須EI遺伝子を欠失することは任意である。例えば、アデノウィルスベクター - 感染されたヒト293細胞（ATCC No. CRL - 1573, 45504, 45505）は、有意な量のタンパク質を生成するために比較的高い細胞密度で、付着細胞として、又は懸濁培養物において増殖され得る（Garnierなど., Cytotechnol. 15: 145 (1994) を参照のこと）。

10

#### 【0172】

マウスZcytor 16はまた、他の高等真核細胞、例えば鳥類、菌類、昆虫、酵母、又は植物細胞においても発現され得る。バキュロウィルスシステムは、昆虫細胞中に、クローン化されたマウスZcytor 16遺伝子を導入するための効果的な手段を提供する。適切な発現ベクターは、オートグラファ・カリホルニカ（*Autographa californica*）核多角体病ウィルス（AcMNPV）に基づかれており、そして良く知られているプロモーター、例えばショウジョウバエ熱ショックタンパク質（hsp）70プロモーター、オートグラファ・カルホルニカ核多角体病ウィルス即時 - 初期遺伝子プロモーター（ie-1）及び遅延された初期39K プロモーター、バキュロウィルスp10プロモーター及びショウジョウバエメタロチオネインプロモーターを含む。

20

#### 【0173】

組換えバキュロウィルスを製造するための第2の方法は、Luckow（Luckow, VA, など., J. Virol 67: 4566 - 79, 1993）により記載されるトランスポゾンに基づくシステムを利用する。トランスファーベクターを利用するこのシステムは、Bac - to - Bac<sup>TM</sup>キット（Life Technologies, Rockville, MD）として市販されている。このシステムは、“bacmid” と呼ばれる大きなプラスミドとして、E.コリに維持されるバキュロウィルスゲノム中に、マウスZcytor16ポリペプチドをコードするDNAを移動せしめるために、Tn7トランスポゾンを含むトランスファーベクター、pFastBac1<sup>TM</sup>（Life Technologies）を利用する。Hill - Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971 - 6, 1990; Bonning, B.C. など., J. Gen. Virol. 75: 1551 - 6, 1994; 及びChazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。

30

#### 【0174】

さらに、トランスファーベクターは発現されたマウスZcytor 16リガンドポリペプチドのC - 又はN - 末端でエピトープ標識、例えばGlu - Glu エピトープ標識をコードするDNAとのイン - フレーム融合体を含むことができる（Grussenmeyer, T. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 82: 7952 - 6, 1985）。当業界において知られている技法を用いて、マウスZcytor 16遺伝子を含むトランスファーベクターにより、E.コリが形質転換され、そして組換えバキュロウィルスの表示である断続的lacZ遺伝子を含むbacmidについてスクリーンされる。組換えバキュロウィルスゲノムを含むbacmid DNA が、通常の技法を用いて単離される。例示的なPFASTBACベクターは、相当の程度まで修飾され得る。

40

#### 【0175】

例えば、前記ポリヒドリンプロモーターは、除去され、そしてバキュロウィルス感染において早めに発現され、そして分泌されたタンパク質を発現するために好都合であることが知られているバキュロウィルス塩基性タンパク質プロモーター（また、Pcor, p6.9又はMPプロモーターとしても知られている）により置換され得る。Hill - Perkins, M.S. and Possee, R.D., J. Gen. Virol. 71: 971 - 6, 1990; Bonning, B.C. など., J. Gen. Virol. 50

75: 1551 - 6, 1994; 及び Chazenbalk, G. D., and Rapoport, B., J. Biol Chem. 270: 1543 - 9, 1995 を参照のこと。

#### 【 0 1 7 6 】

そのようなトランスファーベクター構造体においては、塩基性タンパク質プロモーターの短い又は長いバージョンが使用され得る。さらに、昆虫タンパク質に由来する分泌シグナル配列により天然のマウス Zcytor 16 リガンド分泌シグナル配列を置換しているトランスファーベクターが構成され得る。例えば、エクジステロイド・グルコシルトランスフェラーゼ (EGT)、ミツバチ Melittin (Invitrogen, Carlsbad, CA) 又はバキュロウィルス gp67 (PharMingem, San Diego, CA) からのシグナル配列は、生来のマウス Zcytor 16 分泌シグナル配列を置換するために、構造体で使用され得る。

10

#### 【 0 1 7 7 】

組換えウィルス又は bacmid は、宿主細胞をトランスフェクトするために使用される。適切な昆虫宿主細胞は、IPLB - Sf - 21 に由来する細胞系、スポドプテラフルギペルダ (Spodoptera frugiperda) さなぎ卵巣細胞系、例えば Sf9 (ATCC CRL 1711)、Sf21AE 及び Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA)、及び ショウジョウバエ Schneider - 2 細胞、並びに トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来する HIGH FIVE0 細胞系 (Invitrogen) を包含する (アメリカ特許第 5,300,435 号)。

#### 【 0 1 7 8 】

市販の血清フリー培地が、細胞の増殖及び維持のために使用され得る。適切な培地は、Sf9 細胞に関しては、Sf900II<sup>TM</sup> (Life Technologies) 又は ESF921<sup>TM</sup> (Expression Systems) ; 及び トリコプルシア・ニ 細胞に関しては、Ex-cell10405<sup>TM</sup> (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 又は Express Five0<sup>TM</sup> (Life Technologies) を包含する。組換えウィルスが使用される場合、細胞は典型的には、組換えウィルスストックが 0.1 ~ 10、より典型的には、約 3 の感染の多重度 (MOI) で添加される地点で、約  $2 \sim 5 \times 10^5$  個の細胞  $1 \sim 2 \times 10^6$  個の細胞の接種密度で触媒される。

20

#### 【 0 1 7 9 】

バキュロウィルスでの組換えタンパク質を生成するための確立された技法は、Bailey など., "Manipulation of Baculovirus Vectors", in Methods in Molecular Biology, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols, Murray (ed.), P. 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991) により、Patel など., "The baculovirus expression system", in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover など., (eds.) p.205-244 (Oxford University Press 1995) により、Ausubel (1995) p.16-37 ~ 16-57 により、Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995) により、及び Lucknow, "Insect Cell Expression Technology", in Protein Engineering: Principles and Practice. Cleland など. (eds.), p.183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) により提供される。

30

#### 【 0 1 8 0 】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本明細書に開示される遺伝子を発現するためにも使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビシアエ (Saccharomyces cerevisiae)、ピチア・パストリス (Pichia pastoris) 及び ピチア・メタノリカ (Pichia methanolica) を包含する。酵母における発現のための適切なプロモーターは、GAL1 (ガラクトース)、PGK (ホスホグリセリンキナーゼ)、ADH (アルコールデヒドロゲナーゼ)、AOX1 (アルコールオキシダーゼ)、HIS4 (ヒスチジノールデヒドロゲナーゼ) 及び同様のものからのプロモーターを包含する。外因性 DNA により S. セレビシアエ 細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、例えば Kawasaki, アメリカ特許第 4,599,311 号; Kawasaki など., アメリカ特許第 4,931,373 号; Brake, アメリカ特許第 4,870,008 号; Welch など., アメリカ特許第 5,037,743 号; 及び Murray など., アメリカ特許第 4,845,075 号により開示される。

40

#### 【 0 1 8 1 】

形質転換された細胞は、選択マーカー、通常、耐薬物性、又は、特定の栄養物 (例えば口

50

イシン)の不在下で増殖する能力により決定される表現型により選択される。サッカロミセス・セレビスシアエへの使用のための好ましいベクターシステムは、グルコース含有培地における増殖により形質転換された細胞の選択を可能にする、Kawasaki など、(アメリカ特許第4,931,373号)により開示されるPOT1ベクターシステムである。酵母への使用のための適切なプロモーター及びターミネーターは、解糖酵素遺伝子(例えば、Kawasaki, アメリカ特許第4,599,311号; Kingsmanなど、, アメリカ特許第4,615,974号; 及びBitter, アメリカ特許第4,977,092号を参照のこと)及びアルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子からのものを包含する。また、アメリカ特許第4,990,446号; 第5,063,154号; 第5,139,936号; 及び第4,661,454号を参照のこと。

#### 【0182】

他の酵素、例えばハンセンラ・ポリモルファ(*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ボンベ(*Schizosaccharomyces pombe*)、クルイベリミセス・ラクチス(*Kluyveromyces lactis*)、クルイベリミセス・フラギリリス(*Kluyveromyces fragilis*)、ウスチラゴ・マイジス(*Ustilago maydis*)、ピチア・パストリス(*Pichia pastoris*)、ピチア・メタノリカ(*Pichia methanolica*)、ピチア・グイレルモンジ(*Pichia guilliermondii*)、及びカンジタ・マルトサ(*Candida maltosa*)のための形質転換システムは、当業界において知られている。

#### 【0183】

例えば、Gleeson など、, J. Gen. Microbiol. 132: 3459 - 3465, 1986 及びCregg, アメリカ特許第4,882,279号を参照のこと。アスペルギラス細胞は、Mcknight など、, アメリカ特許第4,935,349号の方法に従って使用され得る。アクレモニウム・クリソゲナム(*Acremonium chrysogenum*)を形質転換するための方法は、Sumino , , アメリカ特許第5,162,228号により開示される。ニューロスポラ(*Neurospora*)を形質転換するための方法は、Lambowitz, アメリカ特許第4,486,533号により開示される。

#### 【0184】

例えば、組換えタンパク質の生成のための宿主としてのピチア・メタノリカの使用は、Raymond、アメリカ特許第5,716,808号、Raymond、アメリカ特許第5,736,383号、Raymondなど、, Yeast 14: 11-23 (1998)、及びWIPO公開W097/17450, W097/17451、W098/02536及びW098/02565に開示される。P.メタノリカの形質転換に使用するためのDNA分子は通常、形質転換の前、好ましくは線状化される、二本鎖の環状プラスミドとして調製されるであろう。P.メタノリカにおけるポリペプチド生成のためには、プラスミドにおけるプロモーター及びターミネーターは、P.メタノリカ遺伝子、例えばP.メタノリカアルコール利用遺伝子(AUG1又はAUG2)のものであることが好ましい。他の有用なプロモーターは、ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DHAS)、ギ酸デヒドロゲナーゼ(FMD)、及びカタラーゼ(CAT)遺伝子のものを包含する。

#### 【0185】

宿主染色体中へのDNAの組み込みを促進するためには、宿主DNA配列を両端に有するプラスミドの完全な発現セグメントを有することが好ましい。ピチア・メタノリカへの使用のための好ましい選択マーカーは、アデニンの不在下でade2宿主細胞の増殖を可能にする、ホスホリボシル-5-アミノイミダゾールカルボキシラーゼ(AIRC; EC. 4.1.1.21)をコードするP.メタノリカADE2遺伝子である。メタノールの使用を最少にすることが所望される大規模産業方法のためには、両メタノール利用遺伝子(AUG1及びAUG2)が欠失されている宿主細胞を使用することが好ましい。

#### 【0186】

分泌されたタンパク質の生成のためには、液胞プロテアーゼ遺伝子(PEP4及びPRB1)を欠いている宿主細胞が好ましい。エレクトロポレーションが、P.メタノリカ細胞中への、興味あるポリペプチドをコードするDNAを含むプラスミドの導入を促進するために使用される。2.5~4.5kV/cm,好ましくは約3.75kV/cmの電場の強さ、及び1~40m秒、最も好ましくは約20m秒の時定数( $\tau$ )を有する、指数的に減衰する、パルスされた電場を用いて、エレクトロポレーションによりP.メタノリカ細胞を形質転換することが好ましい。

10

20

30

40

50

## 【0187】

発現ベクターはまた、植物プロトプラスト、損なわれていない植物組織又は単離された植物細胞中にも導入され得る。植物組織中に発現ベクターを導入するための方法は、アグロバクテリウム・ツメファシエンス (*Agrobacterium tumefaciens*)、マイクロプロジェクトル - 介在性供給、DNA注射、エレクトロポレーション及び同様のものによる植物組織の直接的な感染又はそれらと共にs植物細胞の同時培養を包含する。例えば、Horschなど., Science 227: 1229 (1995)、Kleinなど., Biotechnology 10: 268 (1992) 及びMikiなど., “Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants”, in Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, Glick など. (eds.), P.67-88 (CRC Press, 1993) を参照のこと。

10

## 【0188】

他方では、マウスZcytor 16遺伝子は、原核宿主細胞において発現され得る。原核細胞においてマウスZcytor 16ポリペプチドを発現するために使用され得る適切なプロモーターは、当業者に良く知られており、そしてT4, T3, Sp6及びT7ポリメラーゼを認識できるプロモーター、バクテリオファージの $P_R$ 及び $P_L$ プロモーター、E.コリのtrp, recA, 熱ショック、lacUV5, tac, lpp-lacSpr, phoA及びlacZプロモーター、B.スブチリスのプロモーター、バチルス・バクテリオファージのプロモーター、ストレプトミセスプロモーター、バクテリオファージのintプロモーター、pBR322のblaプロモーター及びクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子のCATプロモーターを包含する。原核プロモーターは、Glick, J. Ind. Microbiol. 1: 277 (1987), Watsonなど., molecular Biology of the Gene, 4<sup>th</sup> Ed. (Benjamin Cummins 1987), 及びAusubelなど. (1995) により再考されている。

20

## 【0189】

適切な原核宿主は、E.コリ及びバチルス・スブチリス (*Bacillus subtilis*) を包含する。E.コリの適切な株は、BL21 (DE3), BL21 (DE3) pLysS, BL21 (DE3)pLysE, DH1, DH4, DH5, DH51, DH51F, DH51MCR, DH 10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451及びER1647を包含する (例えば、Brown (ed.), Molecular Biology Labfax (Academic Press 1991) を参照のこと)。バチルス・スブチリスの適切な株は、BR151, YB886, MI119, MI120及びBI70を包含する (例えば、Hardy, “Bacillus Cloning Methods”, in DNA Cloning: A Practical Approach, Glover (ed.) (IRL Press 1985) を参照のこと)。

30

## 【0190】

細菌、例えばE.コリにおいてマウスZcytor 16ポリペプチドを発現する場合、そのポリペプチドは、典型的には不溶性顆粒として細胞質に保持され得、又は細菌の分泌配列により細胞周辺腔に向けられ得る。前者の場合、細胞は溶解され、そして顆粒が回収され、そして例えばグアニジンイソチオシアネート又はウレアを用いて変性される。次に、変性されたポリペプチドが再生され、そして例えばウレア、及び還元された及び酸化されたグルタチオンの組み合わせの溶液に対する透析、続く緩衝溶液に対する透析により、前記変成体を希釈することによって二量体化され得る。後者の場合、ポリペプチドは、細胞周辺腔の内容物を開放するために細胞を破壊し (例えば、音波処理又は浸透ショックにより)、そしてタンパク質を回収することによって、細胞周辺腔から可溶性及び機能性形で回収され、それにより、変性及び再生のための必要性を回避することができる。

40

## 【0191】

原核宿主においてタンパク質を発現するための方法は、当業者に良く知られている (例えば、Williamsなど., “Expression of foreign protein in E.coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies” in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover など. (eds.), P.15 (Oxford University Press 1995), Ward など., “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies” in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, p. 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), 及びGeorgiou, “Expression of Proteins in Bacteria”, in Protein Engineering: Prin

50

ciples and Practice; Cleland など. (eds.), p101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)を参照のこと)。

細菌、酵母、昆虫及び植物細胞中に発現ベクターを導入するための標準方法は、Ausubel (1995) により提供される。

#### 【0192】

哺乳類細胞系により生成される外来性タンパク質を発現し、そして回収するための一般的方法は、例えばEtcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture" in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland など. (eds.), p163 (Wiley-Liss, Inc. 1996) により提供される。細菌系により生成されるタンパク質を回収するための標準技法は、例えばGrisshammer など., "Purification of Over-Produced proteins from E.coli cells" in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover など. (eds.), p.59-92 (Oxford University Press 1995) により提供される。バキュロウィルス系から組換えタンパク質を単離するための確立された方法は、Richardson (ed.), Baculovirus Expression Protocols (The Humana Press, Inc. 1995)により記載される。

#### 【0193】

他方では、本発明のポリペプチドは、独占的固相合成、部分固相方法、フラグメント縮合又は従来の溶液合成により合成され得る。それらの合成方法は、当業者に良く知られている(例えば、Merrifield, J. Am. Chem. Soc. 85: 2149 (1963), Stewart et al., "Solid Phase Peptide Synthesis" (2<sup>nd</sup> Edition), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer and Rapp, Chem. Pept. 3.3 (1986). Atherton など., Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach (IRL Press 1989). Fields and Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis." Methods in Enzymology Volume 289 (Academic Press 1997), 及び Lloyd-Williams など., Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins (CRC Press, Inc. 1997)を参照のこと)。

#### 【0194】

全体的な化学合成方法、例えば“生来の化学的連結”及び“発現されたタンパク質連結”における変動性もまた標準である(例えば、Dawsonなど., Science 266: 776 (1994), Hackengなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA94: 7845 (1997), Dawson, Methods Enzymol. 287: 34 (1997), Muir など., proc. Natl. Acad. Sci. USA95: 6705 (1998),及び Severinov and Muir, J. Biol. Chem. 273: 16205 (1998)を参照のこと)。

#### 【0195】

本発明のペプチド及びポリペプチドは、配列番号38又は配列番号48の少なくとも6個、少なくとも9個又は少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んで成る。例示のように、ポリペプチドは、次ぎの配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列のいずれかの少なくとも6個、少なくとも9個又は少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んで成る：アミノ酸残基1~230、アミノ酸残基24~230、又は27~230、及びアミノ酸残基27~126、アミノ酸残基131~230、又は本明細書に開示される他のフラグメント。本発明の1つの態様においては、ポリペプチドは、それらのアミノ酸配列の20個、30個、40個、50個、100個又はそれ以上の連続した残基を含んで成る。そのようなペプチド及びポリペプチドをコードする核酸分子は、ポリメラーゼ鎖反応プライマー及びプローブとして有用である。

#### 【0196】

さらに、マウスZcytor16ポリペプチドは、高等真核生物細胞内でモノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーとして発現され得る。そのような細胞は、少なくともマウスZcytor16ポリペプチド(“マウスZcytor16-含有受容体”、又は“マウスZcytor16-含有受容体ポリペプチド”)を含んで成る、マウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチドを生成するために使用され得るか、又はスクリーニングシステムにおいてアッセイ細胞として使用され得る。本発明の1つの観点においては、マウスZcytor16細胞外ドメインを含んで成る本発明のポリペプチドは、培養された細胞により生成され、そして前記細胞は、天然のリガンドを包含する、受容体の

ためのリガンド、及び天然のリガンドのアゴニスト及びアンタゴニストについてスクリーニングするために使用される。

#### 【0197】

このアプローチを要約するために、受容体をコードするcDNA又は遺伝子が、その発現のために必要とされる他の遺伝子要素（例えば、転写プロモーター）と共に組合せられ、そしてその得られる発現ベクターが宿主細胞中に挿入される。DNAを発現し、そして機能的受容体を生成する細胞が選択され、そして種々のスクリーニングシステム内に使用される。モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体複合体の個々の成分が、同じ細胞において発現され得る。さらに、前記モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体複合体の成分が、上記のように、トランスフェクトの複雑なアセンブリー及びスクリーニングを可能にするために、トランスメンブランドメイン又は他の膜融合成分に融合され得る。

10

#### 【0198】

マウスZcytor16受容体の発現及び受容体 - 介在性シグナルのトランスダクションへの使用のために適切な哺乳類細胞は、マウスZcytor16と共に機能的な複合体を形成できる他の受容体サブユニットを発現する細胞を包含する。それらのサブユニットは、インターフェロン受容体ファミリーの、又は他のクラスI又はクラスIIサイトカイン受容体、例えばCRF2 - 4（Genbank受託番号Z17227号）、IL - 10R（Genbank受託番号第U00672号及びNM001558号）、Zcytor11（アメリカ特許第5,965,704号）、Zcytor7（アメリカ特許第5,945,511号）及びIL - 9Rのそれらのサブユニットを包含することができる。発現されるべき受容体と同じ種からの細胞を使用することがまた好ましい。好ましい態様においては、細胞は、その増殖のための外来性供給造血成長因子に依存する。このタイプの好ましい細胞系は、GM - CSF - 依存性ヒト白血病細胞系である、ヒトTF - 1細胞系（ATCC番号CRL - 2003）及びAML - 193細胞系（ATCC番号CRL - 9589）、及びIL - 3依存性ネズミブレ - B細胞系であるBaF3（Palacios and Steinmetz, Cell41: 727-734（1985））である。

20

#### 【0199】

適切な宿主細胞が、必要な受容体サブユニット、又は所望する細胞応答のために必要とされる他の細胞成分を生成するために構築され得る。このアプローチは、細胞系がいずれかの種からの受容体サブユニットを発現するために構築され得、それにより、種特異性から生じる可能性ある限界を克服するので、好都合である。ヒト受容体cDNAの種オルト体がクローン化され、そして同じ種からの細胞系、例えばBaF3細胞系におけるマウスcDNA内に使用され得る。従って、1つの造血成長因子、例えばGM - CSF又はIL - 3に依存する細胞系が、マウスZcytor16受容体、例えばIL - 3TIFを通して作用するもう1つのサイトカインに依存するように成るよう構築され得る。

30

#### 【0200】

機能的受容体を発現する細胞が、スクリーニングアッセイ内に使用される。種々の適切な通常のアッセイは、当業界において良く知られている。それらのアッセイは、標的細胞における生物学的反応の検出に依存する。1つのそのようなアッセイは、細胞増殖アッセイである。細胞は、試験化合物の存在又は不在下で培養され、そして細胞増殖は、例えばトリチウム化されたチミジンの組み込みを測定することにより、又は3 - （4,5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル） - 2,5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド（MTT）（Mosmann, J. Immunol. Meth. 65: 55-63, 1983）の代謝性分解に基づく比色分析により検出される。他のアッセイ型は、レポーター遺伝子を発現するよう、さらに構築される細胞を用いる。レポーター遺伝子は、レポーター - 連結経路に応答するプロモーター要素に連結され、そしてアッセイは、レポーター遺伝子の転写の活性化を検出する。

40

#### 【0201】

これに関しての好ましいプロモーター要素は、血清応答要素、又はSREである（例えば、Shawなど., Cell 563-572, 1989を参照のこと）。好ましいそのようなレポーター遺伝子は、ルシフェラーゼ遺伝子である（de Wetなど., Mol. Cell. Biol. 7: 1987）。ルシフェラーゼ遺伝子の発現は、当業界において知られている方法を用いて発光により検出される

50

(Baumgartnerなど., J. Biol. Chem. 269: 19094-29101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41; 11, 1993)。ルシフェラーゼアッセイキットは、例えばPromega Corp., Madison, WIから市販されている。

#### 【0202】

この型の標的細胞系は、化学物質、細胞 - ならし培養培地、菌類ブイヨン、土壌サンプル、水サンプル及び同様のもののライブラリーをスクリーンするために使用され得る。例えば、細胞 - ならし培地サンプルのバンクが、リガンドを生成する細胞を同定するために標的細胞に対してアッセイされ得る。次に、陽性細胞が、プールに分けられ、宿主細胞中にトランスフェクトされ、そして発現される、哺乳類細胞発現ベクターにおいてcDNAライブラリーを生成するために使用される。次にトランスフェクトされた細胞からの培地サンプルがアッセイされ、続くプールの分割、トランスフェクション、継代培養、及び陽性細胞の再アッセイが伴ない、リガンドを発現するクローン細胞系が単離され得る。

10

#### 【0203】

マウスZcytor16受容体のための天然のリガンドはまた、十分な長さの受容体又は受容体融合体（例えば、トランスメンブランに融合されるマウスZcytor16細胞外ドメイン、及びもう1つのサイトカイン受容体のシグナル化ドメインを含んで成る）を含んで成る細胞系を突然変異誘発し、そしてそれを、オートクライン増殖を選択する条件下で培養することによって同定され得る。WIPO公開W095/21930号を参照のこと。典型的な方法においては、マウスZcytor16及び必要な追加のサブユニットを発現するIL - 3依存性BaF3細胞が、例えば2 - メチルメタンスルホネート（EMS）により突然変異誘発される。

20

#### 【0204】

次に、細胞が、IL - 3の存在下で回収され、そしてIL - 3及びIL - 4を欠いている培養培地に移される。生存細胞が、可溶性受容体を培養培地に添加するか、又は野生型BaF3細胞及び受容体を発現するBaF3細胞に基づいてならし培地をアッセイすることによって、マウスZcytor16リガンド（例えば、IL - TIF）の生成についてスクリーンされる。この方法を用いて、IL - TIFを発現する細胞及び組織が同定され得る。そのような方法は、異なった種、例えばヒトからのIL-TIFを検出するために使用され得、そしてヒトIL-TIFを発現するそのような細胞、癌及び組織が本発明のマウスZcytor16ポリペプチドを用いて同定され得る。

#### 【0205】

さらに、いくつかのIL - TIF応答細胞系が知られており（Dumontierなど., J. Immunol. 164: 1814-1819, 2000; Dumoutier, L. など., Proc. Nat' l. Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000; Xie MHなど., J. Biol. Chem. 275: 31335-31339, 2000; Kotenko SVなど., JBC in press), そしてIL - TIF受容体サブユニットZcytor11を発現するそれらの細胞も知られている。例えば、次の細胞が、IL - TIFに対して応答性である：TK - 10（Xie MHなど., 前記）（ヒト腎癌）；SW480（ATCC No. CCL-228）（ヒト結腸腺癌）；HepG2（ATCC No. HB-8065）（ヒト肝癌）；PC12（ATCC No. CRL-1721）（ネズミニューロン細胞モデル；ラット褐色細胞腫）；及びMES13（ATCC No. CRL-1927）（ネズミ腎系球体間質細胞系）。

30

#### 【0206】

さらに、Zcytor11（IL - TIF受容体）を発現する次のいくつかの細胞系がまた、IL - TIFに対する応答細胞のための候補体でもある：A549（ATCC No. CCL-185）（ヒト肺癌）；G - 361（ATCC No. CRL-1424）（ヒト黒色腫）；及びCaki - 1（ATCC No. HTB-46）（ヒト腎癌）。これらの細胞は、異種システム、例えばヒトにおいてさえIL - TIFアンタゴニスト又は抗 - 炎症因子としてマウスZcytor16の官能性を評価するためにアッセイにおいて使用され得る。

40

#### 【0207】

本発明により提供される追加のスクリーニングアプローチは、ハイブリッド受容体ポリペプチドの使用を包含する。それらのハイブリッドポリペプチドは、2種の一般的な種類に分類される。第1の種類においては、マウスZcytor16の細胞内ドメインが、第2受容体のリガンド - 結合ドメインに連結される。好ましくは、第2受容体は、造血サイトカイン受

50



容体、例えばmpl受容体である（Souyriなど., Cell63: 1137-1147, (1990)）。ハイブリッド受容体はさらに、いずれかの受容体に由来するトランスメンブランドメインを含んで成る。次にハイブリッド受容体をコードするDNA構造体が宿主細胞中に挿入される。

【0208】

ハイブリッド受容体を発現する細胞が、結合ドメインのためのリガンドの存在下で培養され（例えば、mpl受容体細胞外ドメインが使用される場合、TP0）、そして応答についてアッセイされる。このシステムは、容易に入手できるリガンドを用いて、マウスZcytor16により介在されるシグナルトランスダクションを分析するための手段を提供する。このシステムはまた、特定の細胞系が本発明のマウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体によりトランスダクトされるシグナルに対して応答できるかどうかを決定するためにも使用され得る。

10

【0209】

第2種類のハイブリッド受容体ポリペプチドは、第2受容体、好ましくは造血サイトカイン受容体の細胞内ドメイン及びトランスメンブランドメインと共に、マウスZcytor16の細胞外（リガンド結合）ドメイン（たぶん、配列番号38又は配列番号48の残基24~230、又は27~230）を含んで成る。この第2種類の本発明の受容体のハイブリッドZacytor11モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーが、前記第2受容体によりトランスダクトされるシグナルに対して応答できることが知られている細胞において発現される。

【0210】

さらに、それらの2種類の種類のハイブリッド受容体は、IL-TIFを検出するためのアッセイの開発のための応答性細胞型の同定を可能にする。さらに、そのような細胞は、競争型アッセイにおいて本発明の可溶性受容体アンタゴニストをアッセイするためにIL-TIFの存在下で使用され得る。そのようなアッセイにおいては、本発明の可溶性受容体の存在下でIL-TIFの増殖又はシグナルトランスダクション活性の低下は、アンタゴニスト活性を示す。さらに、IL-TIF-可溶性受容体結合アッセイはまた、可溶性受容体がIL-TIF活性を拮抗するかどうかを評価するためにも使用され得る。

20

【0211】

7. マウスZcytor 16融合タンパク質及び接合体の生成：

1つの一般的な種類のマウスZcytor 16類似体は、本明細書に開示されるアミノ酸配列の突然変異であるアミノ酸配列を有する変異体である。もう1つの一般的な種類のマウスZcytor 16類似体は、下記のように、抗-イディオタイプ抗体及びそのフラグメントにより供給される。さらに、抗-イディオタイプの可変ドメインを含んで成る組換え抗体が、類似体として使用され得る（例えば、Monfardiniなど., *proc. Assoc. Am. Physicians* 108: 420 (1996)を参照のこと）。抗-イディオタイプマウスZcytor 16抗体の可変ドメインはマウスZcytor 16を模倣するので、それらのドメインは、例えばIK-TIFに対するマウス又はヒトZcytor 16結合活性を提供することができる。抗-イディオタイプ触媒性抗体を生成するための方法は、当業者に知られている（例えば、Joronなど., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 672:216(1992), Fribouletなど., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:229(1994),及びAvalleなど., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 864:118(1998)を参照のこと）。

30

【0212】

Zcytor 16類似体を同定するもう1つのアプローチは、結合ライブラリーの使用により提供される。ファージ表示及び他の結合ライブラリーを構成し、そしてスクリーニングする方法は、例えばKayなど., *Phage Display of Peptide and Proteins* (Academic Press 1996), Verdine, アメリカ特許第5,783,384号、Kay, など., アメリカ特許第5,747,334号及びKauffmanなど., アメリカ特許第5,723,323号号により提供される。マウスZcytor 16ポリペプチドは、インビボ及びインビトロの両者において使用される。例示として、マウスZcytor 16の可溶形が、培養された細胞により生成されるZcytor 16リガンドの効果を阻害するために、細胞培養培地に添加され得る。

40

【0213】

マウスZcytor 16の融合タンパク質は、組換え宿主においてマウスZcytor 16を発現するた

50

めに、そして発現されたマウスZcytor 16を単離するために使用され得る。下記に記載されるように、特定のマウスZcytor 16融合タンパク質はまた、診断及び治療にも使用される。1つのタイプの融合タンパク質は、組換え宿主細胞からのマウスZcytor 16ポリペプチドを案内するペプチドを含んで成る。マウスZcytor 16ポリペプチドを、真核細胞の分泌経路中に方向づけるためには、分泌シグナル配列（また、シグナルペプチド、リーダー配列、プレプロ配列又はプレ配列としても知られている）が、マウスZcytor 16発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列はマウスZcytor 16に由来するが、適切なシグナル配列はまた、もう1つの分泌されたタンパク質から誘導されるか、又は新たに合成され得る。

#### 【0214】

分泌シグナル配列は、マウスZcytor 16 - コード配列に作用可能に連結され、すなわち2つの配列は正しく読み取り枠を整合して連結され、そして宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、興味あるポリペプチドをコードするヌクレオチド配列の5'側に位置するが、但し一定の分泌シグナル配列は、興味あるヌクレオチド配列の他の場所に位置することもできる（例えば、Welchなど., アメリカ特許第5,037,743号；Hollandなど., アメリカ特許第5,143,830号を参照のこと）。

#### 【0215】

マウスZcytor 16又は哺乳類細胞により生成されるもう1つのタンパク質（例えば、アメリカ特許第5,641,655号に記載されるような組織タイプのプラスミノーゲン活性化因子シグナル配列）は、組換え哺乳類宿主におけるマウスZcytor 16の発現のために有用であるが、酵母シグナル配列は、酵母細胞における発現のために有用である。適切な酵母シグナル配列の例は、酵母対合現象 - 因子（MF 1遺伝子によりコードされる）、インパーターゼ（SUC2遺伝子によりコードされる）又は酸性ホスファターゼ（PHO遺伝子によりコードされる）に由来するそれらのものである。例えば、Romanos など., “Expression of Cloned Genes in Yeast” in DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover and Hames (eds.), p.123-167 (Oxford University Press 1995) を参照のこと。

#### 【0216】

マウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチドは、細胞外ドメイン、例えば配列番号38又は48のアミノ酸24～230又は27～230、又は非ヒト受容体のその対応する領域をコードする切断されたDNAを発現することによって調製され得る。好ましくは、細胞外ドメインポリペプチドは、トランスメンブラン及び細胞内ポリペプチドセグメントを実質的に有さない形で調製され得る。宿主細胞からの受容体ドメインの輸送を方向づけるために、受容体DNAが、分泌ポリペプチド、例えばt-PA分泌ペプチドをコードする第2 DNAセグメントに連結される。

#### 【0217】

分泌された受容体ドメインの精製を促進するためには、C - 末端拡張、例えばポリ - ヒスチジン標識、物質P、Flag<sup>TM</sup> ペプチド（Hoppなど., Biotechnology 6: 1204-1210, (1988)；Eastman Kodak Co., New Haven, CTから入手できる）、又は抗体又は他の特異的結合剤が入手できるもう1つのポリペプチド又はタンパク質が、受容体ポリペプチドに融合され得る。さらに、ヘテロダイマー及びマルチマー非 - マウスZcytor16サブユニット細胞外サイトカイン結合ドメインがまた、上記のようにして調製される。

#### 【0218】

他のアプローチにおいては、マウスZcytor16の受容体細胞外ドメイン又は他のクラスI又はIIサイトカイン受容体成分が、免疫グロブリンH鎖不変領域、典型的には、2種の不変領域ドメイン及びヒンジ領域を含むが、しかし可変領域を欠いているFcフラグメントとの融合体として発現され得る（Słodziewski, AZなど., アメリカ特許第6,018,026号及び第5,750,375号を参照のこと）。本発明の可溶性マウスZcytor16、可溶性マウスZcytor16/CRF 2-4ヘテロダイマー、及びモノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーポリペプチドは、そのような融合体を包含する。そのような融合体は典型的には、マルチマー

10

20

30

40

50

分子として分泌され、ここでFc部分はお互いジスルフィド結合され、そして2種の受容体ポリペプチドがお互い密接して整列される。

#### 【0219】

このタイプの融合は、リガンドを特異的に滴定することによってインビトロでシグナルを阻止するために、インビトロアッセイ手段として、そして循環リガンドを結合し、そしてそれを循環からクリアランスするために、それらを非経口投与することによって、インビボでのアンタゴニストとして、溶液から同起源のリガンドを親和性精製するために使用され得る。リガンドを精製するために、マウスZcytor16-Igキメラが、リガンドを含むサンプル（例えば、細胞ならし培養培地又は組織抽出物）に、受容体-リガンド結合を促進する条件（典型的には、ほぼ生理学的温度、pH及びイオン強度）下で、添加される。次に、キメラ-リガンド複合体が、固体支持体（例えば、不溶性樹脂ビーズ）上に固定されるタンパク質Aを用いて、混合物により分離される。

10

#### 【0220】

次に、リガンドが、従来の化学的技法を用いて、例えば塩又はpHグラジエントにより溶離される。他の手段においては、キメラ自体が、上記のようにして行われる結合及び溶離により、固体支持体に結合され得る。前記キメラ、急性期応答、例えば血清アミロイドA（SAA）、C-反応性タンパク質（CRP）及び同様のものを包含する炎症性応答を調節するためにインビボで使用され得る。高い結合親和性を有するキメラは、非経口（例えば、筋肉内、皮下又は静脈内注射による）投与される。循環分子は、リガンドを結合し、そして通常の生理学的工程により循環からクリアランスされる。アッセイへの使用のために、キメラは、Fc領域を通して支持体に結合され、そしてELISA型に使用される。さらに、そのような方法は、マウスIL-TIF、及びオルト体性リガンド、例えばヒトIL-TIFを単離するために、本発明のポリペプチドを用いて適用され得る。

20

#### 【0221】

本発明はさらに、1又は複数のポリペプチド融合体を含んで成る、種々の他のポリペプチド融合体及び関連するマルチマータンパク質を提供する。例えば、可溶性マウスZcytor16受容体又は可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマーポリペプチド、例えば可溶性マウスZcytor16/CRF2-4は、アメリカ特許第5,155,027号及び第5,567,584号に開示されるように、二量体化するタンパク質への融合体として調製され得る。これに關しての好ましい二量体化するタンパク質は、免疫グロブリン不変領域ドメイン、例えばIgG 1及びヒトL鎖を包含する。免疫グロブリン-可溶性マウスZcytor16受容体又は免疫グロブリン-可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチド、例えば免疫グロブリン-可溶性マウスZcytor16/CRF2-4融合体は、種々のマルチマーマウスZcytor16受容体類似体を生成するために、遺伝子的に構築された細胞において発現され得る。

30

#### 【0222】

補助ドメインは、可溶性マウスZcytor16受容体又は可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチド、例えば可溶性マウスZcytor16/CRF2-4に、それらを特定の細胞、組織又は高分子（例えば、コラーゲン、又はZcytor16リガンド、IL-TIFを発現する細胞）に標的化するために融合さえ得る。マウスZcytor16ポリペプチドは、複数の成分、例えば精製及び標的化ドメインのための親和性標識に融合され得る。ポリペプチド融合体はまた、特にドメイン間に1又は複数の切断部位を含むことができる。Tuanなど., Connective Tissue Research 34: 1-9, 1996を参照のこと。

40

#### 【0223】

細菌細胞においては、毒性を低め、安定性を高め、そして発現されたタンパク質の回収性を高めるために、異種タンパク質を融合タンパク質として発現することが、しばしば所望される。例えばマウスZcytor16は、グルタチオンS-トランスフェラーゼポリペプチドを含んで成る融合タンパク質として発現され得る。グルタチオンS-トランスフェラーゼ融合タンパク質は、典型的には、可溶性であり、そして固定されたグルタチオンカラム上でE. コリ融解物から容易に精製できる。類似するアプローチにおいては、マルトース結合タンパク質ポリペプチドを含んで成るマウスZcytor16融合タンパク質は、アミロース樹脂

50

カラムにより単離され得、そして切断されたタンパク質A遺伝子のC-末端を含んで成る融合タンパク質は、IgG-セファロースを用いて精製され得る。

#### 【0224】

細菌細胞において異種ポリペプチドを、融合タンパク質として発現するために確立された技法は、Williamsなど., “Expression of Foreign Proteins in E. coli Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies”, in DNA Cloning 2: A Practical Approach, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover and Hames (Eds.), p.15-58 (Oxford University Press 1995) により記載される。さらに、市販の発現システムが利用できる。例えば、PINPOINT Xaタンパク質精製システム (Promega Corporation, Madison, WI) は、アビジンを含んで成る樹脂により、発現の間、ビオチニル化されるポリペプチドを含んで成る融合タンパク質を単離するための方法を提供する。

10

#### 【0225】

原核又は真核細胞により発現される異種ポリペプチドを単離するために有用であるペプチド標識は、ポリヒスチジン標識 (ニッケル-キレート化樹脂に対する親和性を有する)、c-myc標識、カルモジュリン結合タンパク質 (カルモジュリン親和性クロマトグラフィーにより単離される)、物質P、RYIRS 標識 (抗-RYIRS抗体と結合する)、Gln-Gln標識及びFLAG標識 (抗-FLG抗体と結合する) を包含する。例えば、Luoなど., Srch. Biochem. Biophys. 329: 215 (1996), Morganti など., Biotechnol. Appl. Biochem. 23: 67 (1996), 及びZhengなど., Gene 186: 55 (1997) を参照のこと。そのようなペプチド標識コードする核酸分子は、例えばSigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO) から入手できる。

20

#### 【0226】

本発明はまた、分泌経路中に他のポリペプチドを方向づけるために本発明のマウスZcytor 16ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列の使用を企画する。配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基1~23に由来する分泌シグナル配列が当業界において知られており、そして本明細書に開示される方法を用いてもう1つのポリペプチドに作用可能に連結されるシグナル融合ポリペプチドが製造され得る。本発明の融合ポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は好ましくは、分泌路中に追加のペプチドを方向づけるためにその追加のペプチドにアミノ末端的に融合される。そのような構造体は、当業界において知られている多くの用途を有する。例えば、それらの新規の分泌シグナル配列融合構造体は通常分泌されないタンパク質の活性成分、例えば受容体の分泌を方向づけることができる。

30

#### 【0227】

そのような融合は、分泌路を通してペプチドを方向づけるためにインビボ又はインビトロで使用され得る。後者に関して、典型的なポリペプチドは、医薬的活性の分子、例えば第VIIa因子、プロインスリン、インスリン、卵胞刺激ホルモン、組織タイプのプラスミノゲン活性化因子、腫瘍壊死因子、インターロイキン (例えば、インターロイキン-(IL-1)~IL-15)、コロニー刺激因子 (例えば、顆粒球-コロニー刺激因子 (G-CSF) 及び顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子 (GM-CSF))、インターフェロン (例えば、インターフェロン-、-、-、-、-、- 及び-)、幹細胞増殖因子、例えば“SI因子”、エリトロポエチン及びトロポエチンを包含する。本発明の融合ポリペプチドに含まれるマウスZcytor16分泌シグナル配列は好ましくは、追加のペプチドを分泌経路中に方向づけるために、その追加のペプチドにアミノ末端融合される。マウスZcytor16分泌シグナル配列を含んで成る融合タンパク質は、標準の技法を用いて構成され得る。

40

#### 【0228】

もう1つの形の融合タンパク質は、マウスZcytor16ポリペプチド、及び2又は3個の複領域ドメイン及びヒンジ領域を含むが、しかし可変領域を欠いている免疫グロブリンH鎖不変領域、典型的なFcフラグメントを含んで成る。例示のように、Chang など., (アメリカ特許第5,723,125号) は、ヒトインターフェロン及びヒト免疫グロブリンFcフラグメントを含んで成る融合タンパク質を記載する。インターフェロンのC-末端は、ペプチドリン

50

カー成分によりFcフラグメントのN-末端に連結される。ペプチドリッカーの例は、免疫学的に不活性であるT細胞不活性配列を主に含んで成るペプチドである。

#### 【0229】

典型的なペプチドリッカーは、アミノ酸配列：GGSGG SGGGG SGGGG S（配列番号4）を有する。融合タンパク質においては、好ましいFc成分は、溶液において安定性であり、そして活性を活性化する補体をほとんど有さないか又は完全に有さないヒト鎖である。従って、本発明はマウスZcytor16成分及びヒトFcフラグメントを含んで成るマウスZcytor16融合タンパク質を企画し、ここで前記マウスZcytor16成分のC-末端は、ペプチドリッカー、例えば配列番号4のアミノ酸配列から成るペプチドを通してFcフラグメントのN-末端に結合される。マウスZcytor16成分は、マウスZcytor16分子又はそのフラグメントであり得る。例えば、融合タンパク質は、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24～230、又は27～230及びFcフラグメント（例えば、ヒトFcフラグメント）を含んで成る。

10

#### 【0230】

もう1つの態様においては、マウスZcytor16融合タンパク質は、IgG配列、IgG配列のアミノ酸末端に共有結合されるマウスZcytor16成分、及びマウスZcytor16のアミノ酸末端に共有結合されるシグナルペプチドを含んで成り、ここで前記IgG配列は、次の順序での次の要素から成る：CH<sub>2</sub>ドメイン及びCH<sub>3</sub>ドメイン。従って、IgG配列はCH<sub>1</sub>ドメインを欠いている。マウスZcytor16成分は、本明細書に記載されるように、マウスZcytor16活性、例えばZcytor16リガンド、例えばマウス及びヒトIL-TIFと結合する能力を示す。抗体及び非抗体部分の両者を含んで成る融合タンパク質を生成するこの一般的なアプローチは、LaRoche

20

#### 【0231】

マウスZcytor16成分及びFc成分を含んで成る融合タンパク質は、インビトロアッセイ手段として使用され得る。例えば生物学的サンプルにおけるZcytor16リガンド、例えばマウス又はヒトIL-TIFの存在は、マウスZcytor16-免疫グロブリン融合タンパク質を用いて検出され得、ここでマウスZcytor16成分は、前記リガンド、及び高分子、例えばタンパク質A又は抗-Fc抗体を結合するために使用され、すなわち固体支持体に融合タンパク質を結合するために使用される。さらに、そのようなシステムは、Zcytor16リガンドのその受容体への結合を妨害するアゴニスト及びアンタゴニストを同定するために使用され得る。

#### 【0232】

抗体融合タンパク質の他の例は、抗原-結合ドメイン、及びマウスZcytor16細胞外ドメインを含むマウスZcytor16フラグメントを含んで成るポリペプチドを包含する。そのような分子は、Zcytor16結合活性の有益性のための特定の組織を標的化するために使用され得る。

30

#### 【0233】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体を提供する。例えば、生物学的機能を付与するドメインの一部又はすべては、サイトカイン受容体ファミリーの他のメンバーからの機能的に同等のドメインにより本発明のマウスZcytor16間で置換され得る。ポリペプチド融合体は、マウスZcytor16融合類似体を生成するために、組換え宿主細胞において発現され得る。マウスZcytor16ポリペプチドは、複数の成分又はドメイン、例えば精製の親和性標識及び標的化ドメインに融合され得る。ポリペプチド融合体はまた、特にドメイン間での1又は複数の切断部位を含むことができる。例えば、Tuanなど、Connective Tissue Research 34; 1(1996)を参照のこと。

40

#### 【0234】

融合タンパク質は、その融合タンパク質の個々の成分を調製し、そしてそれらを化学的に接合することによって、当業者に知られている方法により調製され得る。他方では、正しく読み取り枠を整合して融合タンパク質の両成分をコードするポリヌクレオチドは、既知の技法を用いて生成され、そして本明細書に記載される方法により発現され得る。融合タンパク質の酵素的及び化学分解のための一般的な方法は、例えばAusubel (1995)、p. 16-19～16-25により記載される。

50

## 【0235】

マウスZcytor16ポリペプチドは、Zcytor16リガンド、例えばマウス及びヒトIL-TIFを同定し、そして単離するために使用される得る。例えば、本発明のタンパク質及びペプチドが、カラム上に固定され、そしてカラム上で作動する生物学的サンプルからのリガンドを結合するために使用され得る (Hermansonなど. (eds.), Immobilized Affinity Ligand Techniques, P. 195-202 (Academic Press 1992))。それ自体、本発明のマウスZcytor16ポリペプチドは、診断又は生成のためにIL-TIFを同定し、そして単離するために使用され得る。

## 【0236】

マウスZcytor16ポリペプチドの活性が、受容体結合及び続く生理学的細胞応答に関連する、細胞外酸性化速度又はプロトン排泄を測定する、珪素に基づくバイオセンサーのマイクロフィジオメーターにより測定され得る。典型的な装置は、Molecular Devices, Sunnyvale, CAにより製造されるCytosensor<sup>TM</sup> マイクロフィジオメーターである。種々の細胞応答、例えば細胞増殖、イオン輸送、エネルギー生成、炎症応答、調節及び受容体活性化及び同様のものが、この方法により測定され得る。

## 【0237】

例えば、McConnell, H.M.など., Science 257: 1906-1912, 1992; Pitchford, S. など., Meth. Enzymol. 228: 84-108, 1997; Arimilli, S. など., J. Immunol. Meth. 212: 49-59, 1998; Van Liefde, I. など., Eur. J. Pharmacol. 346: 87-95, 1998を参照のこと。さらに、マイクロフィジオメーターは、付着性又は非付着性真核又は原核細胞をアッセイするために使用され得る。時間にわたっての細胞培地における細胞外酸性化変化を測定することによって、マイクロフィジオメーターは、種々の刺激に対する細胞応答、例えばマウスZcytor16のアゴニスト、リガンド又はアンタゴニストを直接的に測定する。

## 【0238】

例えば、マイクロフィジオメーターは、マウスZcytor16ポリペプチドを発現しない対照の真核宿主に比較して、マウスZcytor16 - 発現真核細胞の応答を測定するために使用され得る。マウスZcytor16 - 調節刺激に対して応答性の適切な細胞は、マウスZcytor16発現バクターを含んで成る組換え宿主細胞、及び天然においてマウスZcytor16を発現する細胞を包含する。細胞外酸性化は、マウスZcytor16 - 調節された細胞応答についての1つの測定を提供する。さらに、このアプローチは、Zcytor16リガンド、そのアゴニスト及びアンタゴニストを同定するために使用され得る。例えば、分子は、マウスZcytor16ポリペプチドを発現する細胞を供給し、前記細胞の第1部分を、試験化合物の不在下で培養し、前記細胞の第2部分を、試験化合物の存在下で培養し、そして前記第1部分と比較して、前記第2部分が細胞応答を示すかどうかを決定することによって、Zcytor16リガンドのアゴニストとして同定され得る。

## 【0239】

他方では、固相システムが、Zcytor16リガンド、Zcytor16リガンドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するために使用され得る。例えば、マウスZcytor16ポリペプチド又はマウスZcytor16融合タンパク質、又はマウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体が、市販のバイオセンサー装置の受容体チップの表面上に固定され得る (BLACORE, Biacore AB; uppsala, Sweden)。この装置の使用は、例えば Karlsson, Immunol. Methods 145:229 (1991)、及び Cunningham and Wells, J. Mol. Biol. 234:554 (1993) により開示される。

## 【0240】

手短には、マウスZcytor16ポリペプチド又は融合タンパク質は、流動細胞内の金フィルムに結合されるデキストラン繊維に、アミン又はスルフヒドリル化学を用いて、共有結合される。次に、試験サンプルが、細胞を通して通される。リガンドがサンプルに存在する場合、それは固定されたポリペプチド又は融合タンパク質に結合し、培地の屈折率の変化を引き起こし、これが金フィルムの表面プラズモン共鳴の変化として検出される。このシステムは、結合親和性が計算され得るオン - 及びオフ - 速度の測定、及び結合の化学量論

10

20

30

40

50

の評価を可能にする。このシステムはまた、抗体 - 抗原相互作用、及び他の補体 / 抗 - 補体対の相互作用を試験するためにも使用され得る。

#### 【0241】

マウスZcytor16結合ドメインはさらに、Zcytor16リガンドアゴニストの推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関連して、核磁気共鳴、結晶学、電子回折又は光親和性ラベリングのような技法により決定されるように、耕造体の物理的分析により特徴づけられ得る。例えば、de Vosなど., Science 255:306 (1992), Smithなど., J. Mol. Biol. 224:899 (1992), 及びWlodaverなど., FEBS Lett. 309: 59 (1992) を参照のこと。

#### 【0242】

本発明はまた、マウスZcytor16ポリペプチドがポリマーにより連結される、化学的に修飾されたマウスZcytor16組成物を企画する。例示的なマウスZcytor16ポリペプチドは、機能的なトランスメンブランドメインを欠いている可溶性ポリペプチド、例えば配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基24~230又は27~230から成るポリペプチドである。典型的には、前記ポリマーは、マウスZcytor16結合体が水性環境、例えば生理学的環境において沈殿しないよう水溶性である。適切なポリマーの例は、単一の反応基、例えばアシル化のための活性エステル、又はアルキル化のためのアルデヒドを有する修飾されている1つのポリマーである。この場合、重合化の程度は調節され得る。反応性アルデヒドの例は、ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒド、又はモノ - ( $C_1 - C_{10}$ ) アルコキシ、又はそれらのアリアルコキシ誘導体である (例えば、Harrisなど., アメリカ特許第5,252,714号を参照のこと)。ポリマーは枝分かれ鎖であっても、又は枝分かれ鎖でなくても良い。さらに、ポリマーの混合物がマウスZcytor16接合体を生成するために使用され得る。

10

20

#### 【0243】

治療のために使用され得るマウスZcytor16接合体は、医薬的に許容できる水溶性ポリマー成分を含むことができる。適切な水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール (PEG)、モノメトキシ - PEG、モノ - ( $C_1 - C_{10}$ ) アルコキシ - PEG、アリアルコキシ - PEG、ポリ - (N - ビニルピロリドン) PEG、トレシルモノメトキシPEG、PEGプロピオンアルデヒド、ビス - スクシンイミジルカーボネートPEG、プロピレングリコールホモポリマー、酸化ポリプロピレン / 酸化エチレンコポリマー、ポリオキシエチル化されたポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、デキストラン、セルロース又は他の炭水化物基材のポリマーを包含する。適切なPEGは、約600~約60,000、例えば5,000、12,000及び25,000の分子量を有することができる。マウスZcytor16接合体はまた、そのような水溶性ポリマーの混合物も含むことができる。

30

#### 【0244】

マウスZcytor16接合体の1つの例は、マウスZcytor16成分、及びマウスZcytor16成分のN - 末端に結合される酸化ポリアルキル成分を含んで成る。PEGは、1つの適切な酸化ポリアルキルである。例示として、マウスZcytor16は、PEG、すなわち“PEG化”として知られている方法により修飾され得る。マウスZcytor16のPEG化は、当業界において知られているPEG化反応のいずれかにより行われ得る (例えば、ヨーロッパ特許第0154316号、Delgadoなど., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994) 及びFrancis など., Int. J. Hematol. 68: 1 (1998) を参照のこと)。

40

#### 【0245】

例えば、PEG化は反応性ポリエチレングリコール分子によるアシル化反応又はアルキル化反応により行われ得る。他のアプローチにおいては、マウスZcytor16接合体は、PEGの末端ヒドロキシ又はアミノ基が活性化されたリンカーにより置換されている活性化されたPEGを縮合することによって形成される (例えば、Karasiewiczなど., アメリカ特許第5,382,657号を参照のこと)。

#### 【0246】

アシル化によるPEG化は典型的には、マウスZcytor16ポリペプチドとPEGの活性エステル誘導体との反応を必要とする。活性化されたPEGエステルの例は、N - ヒドロキシスクシンイ

50

ミドにエステル化されたPEGである。本明細書において使用される場合、用語“アシル化”とは、マウスZcytor16と水溶性ポリマー間のタイプの結合を包含する：アミド、カルバメート、ウレタン及び同様のもの。アシル化によるPEG化されたZcytor16の調製方法は、典型的には、(a)マウスZcytor16ポリペプチドとPEG(例えば、PEGのアルデヒド誘導体の反応性エステル)とを、1又は複数のPEG基がマウスZcytor16に結合する条件下で反応せしめ、そして(b)その反応生成物を得る段階を含んで成る。一般的に、アシル化反応のための最適な反応条件は、既知のパラメーター及び所望する結果に基づいて決定されるであろう。例えば、PEG：マウスZcytor16の比が高いほど、ポリPEG化されたマウスZcytor16生成物の%が高くなる。

#### 【0247】

アシル化によるPEG化の生成物は典型的には、リシン - アミノ基がアシル結合を通してPEG化されるポリPEG化されたマウスZcytor16生成物である。典型的には、その得られるマウスZcytor16は、少なくとも95%、モノ - 、ジ - 又はトリ - ペルギレートされるが、但し高い程度のPEG化を有するいくつかの種は、その反応条件に依存して形成され得る。PEG化された種は、標準の精製方法、例えば透析、限外濾過、イオン交換クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー及び同様のものを用いて、接合されていないマウスZcytor16ポリペプチドから分離され得る。

#### 【0248】

アルキル化によるPEG化は一般的に、還元剤の存在下で、マウスZcytor16と、PEGの末端アルデヒド誘導体との反応を包含する。PEG基は好ましくは、 $-CH_2-NH$ 基を通してポリペプチドに結合される。

#### 【0249】

モノPEG化された生成物を生成するためへの還元性アルキル化を通しての誘導体化は、誘導体化のために利用できる異なったタイプの第1アミノ基の示差反応性を利用する。典型的には、前記反応は、リシン残基の - アミノ基とタンパク質のN - 末端残基の - アミノ基との間のpKa差異の利用を可能にするpHで行われる。そのような選択的誘導体化により、反応性基、例えばアルデヒドを含む水溶性ポリマーのタンパク質への結合が調節される。ポリマーとの接合は、他の反応性基、例えばリシン側鎖アミノ基の有意な修飾を伴わないで、タンパク質のN - 末端で優先的に生じる。本発明は、マウスZcytor16モノポリマー接合体の実質的な調製物を提供する。

#### 【0250】

モノポリマーマウスZcytor16接合体分子の実質的に均質な集団を生成するための還元性アルキル化は、(a)マウスZcytor16のアミノ末端での - アミノ基選択的修飾を可能にするために適切なpHでの還元性アルキル化条件下で反応性PEGとマウスZcytor16ポリペプチドとを反応せしめ、そして(b)反応生成物を得る段階を含んで成る。還元性アルキル化のために使用される還元剤は、水溶液において安定性であり、そして好ましくは、還元性アルキル化の初期工程において形成されるSchiff塩基のみを還元できるべきである。例示的な還元剤は、硼水素化ナトリウム、シアノ硼水素化ナトリウム、ジメチルアミンボラン、トリメチルアミンボラン及びピリジンボランを包含する。

#### 【0251】

モノポリマーマウスZcytor16接合体の実質的に均質な集団に関しては、還元性アルキル化反応条件は、マウスZcytor16のN - 末端への水溶性ポリマーの成分の結合を可能にするこれらの条件である。そのような反応条件に、N - 末端での - アミノ基とリシンアミノ基との間のpKa差異を提供する。pHはまた、使用されるポリマー：タンパク質の比にも影響を及ぼす。一般的に、pHが低い場合、タンパク質よりも過剰量のポリマーが、N - 末端 - 基が反応性であるほど、より多くのポリマーが最適な条件を達成するために、必要とされるので、所望される。pHが高い場合、ポリマー：マウスZcytor16は、より多くの反応性基が利用できるので、高くある必要はない。典型的には、pHは、3 ~ 9又は3 ~ 6の範囲内であろう。この方法は、マウスZcytor16 - 含有ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体接合体を製造するために使用され得る。

10

20

30

40

50



## 【0252】

考慮すべきもう1つの因子は、水溶性ポリマーの分子量である。一般的に、ポリマーの分子量が高いほど、より少数のポリマー分子がタンパク質に結合され得る。PEG化反応に関しては、典型的な分量は、約2kDa～約100kDa、約5kDa～約50kDa又は約12kDa～約25kDaである。水溶性ポリマー：Zcytor16のモル比は、一般的に、1：1～100：1の範囲であろう。典型的には、水溶性ポリマー：マウスZcytor16のモル比は、ポリPEG化に関して、1：1～20：1であり、そしてモノPEG化に関しては、1：1～5：1であろう。

## 【0253】

ポリペプチド及び水溶性ポリマー成分を含んで成る接合体を生成するための一般的な方法は当業界において知られている。例えば、Karasiewiczなど., アメリカ特許第5,382,657号、Greewaldなど., アメリカ特許第5,738,846号、Nieforthなど., Clin. Pharmacol. Ther. 59: 636 (1996), Monkarsh など., Anal. Biochem. 247: 434 (1997) を参照のこと。この方法は、マウスZcytor16 - 含有ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体接合体を製造するために使用され得る。

10

## 【0254】

本発明は、本明細書に記載されるペプチド又はポリペプチドを含んで成る組成物を企画する。そのような組成物はさらに、キャリアーを含むことができる。前記キャリアーは、従来の有機又は無機キャリアーであり得る。キャリアーの例は、水、緩衝液、アルコール、ポリエチレングリコール、マクロゲル、ゴマ油、トウモロコシ油及び同様のものを包含する。

20

## 【0255】

## 8. マウスZcytor16ポリペプチドの単離：

本発明のポリペプチドは、汚染性高分子、特に他のタンパク質及び核酸に対して、少なくとも約80%の純度、少なくとも約90%の純度、少なくとも約95%の純度、又は95%以上の純度に精製することが好ましく、そして感染性及び発熱性剤を有さない。本発明のポリペプチドはまた、99.9%以上の純度である医薬的に純粋な状態に精製され得る。特定の製剤においては、精製されたポリペプチドは、他のポリペプチド、特に動物起源の他のポリペプチドを実質的に有さない。

## 【0256】

分別及び/又は従来の精製方法は、天然源（例えば、扁桃組織）から精製されたマウスZcytor16、合成マウスZcytor16ポリペプチド、及び組換え宿主細胞から精製された組換えマウスZcytor16ポリペプチド及び融合マウスZcytor16ポリペプチドの調製物を得るために使用され得る。一般的に、硫酸アンモニウム沈殿及び酸又はカオトロピック剤抽出は、サンプルの分別のために使用される。典型的な精製段階は、ヒドロキシアパタイト、サイズ排除、FPLC及び逆相高性能液体クロマトグラフィーを包含する。適切なクロマトグラフィー用媒体は、誘導体化されたデキストラン、アガロース、セルロース、ポリアクリルアミド、特別なシリカ及び同様のものを包含する。

30

## 【0257】

PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。典型的なクロマトグラフィー用媒体は、フェニル、ブチル又はオクチル基により誘導体化されたもの、例えばフェニル - Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl ブチル650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、オクチル - Sepharose (Pharmacia)及び同様のもの；又はポリアクリル樹脂、例えばAmberchrom CG71 (Toso Haas)及び同様のものを包含する。適切な固体支持体は、ガラスビーズ、シリカ基材の樹脂、セルロース樹脂、アガロースビーズ、架橋されたアガロースビーズ、ポリスチレンビーズ、架橋されたポリアクリルアミド樹脂及びそれらが使用される条件下で不溶性である同様のものを包含する。それらの支持体は、アミノ基、カルボキシル基、スルフヒドリル基、ヒドロキシル基及び/又は炭水化物成分によるタンパク質の結合を可能にする反応性基より変性され得る。

40

## 【0258】

カップリング化学物質の例は、臭化シアン活性化、N - ヒドロキシスクシンイミド活性化

50

、エポキシド活性化、スルフヒドリル活性化、ヒドラジド活性化及びカルボジイミド カップリング化学物質のためのカルボキシル及びアミノ誘導体を包含する。それらの及び他の固体媒体は当業界において良く知られており、そして広く使用されており、そして商業的供給者から入手できる。ポリペプチド単離及び精製の特定方法の選択は、通常のことであり、そして選択された支持体の性質により一部決定される。例えば、Affinity Chromatography: Principles & Methods, Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden, 1988、及びDoonan, Protein Purification Protocols (The Humana Press 1996)を参照のこと。

#### 【0259】

マウスZcytor16単離及び精製における追加の変動は、当業者により調節され得る。例えば、下記のようにして得られる抗 - マウスZcytor16抗体は、免疫親和性精製により多量のタンパク質を単離するために使用され得る。 10

#### 【0260】

本発明のポリペプチドは、アニオン及びカチオン交換クロマトグラフィー、サイズ排除、及び親和性クロマトグラフィーを包含する方法の組み合わせより単離され得る。例えば、固定された金属イオン吸着 (IMAC) クロマトグラフィーが、ヒスチジンに富んでいるタンパク質、及びポリヒスチジン標識を含んでなるそれらのタンパク質を精製するために使用され得る。手短に言及すれば、ゲルがまず、二価金属イオンにより荷電され、キレートが形成される (Sulkowski, Trends in Biochem. 3: 1 - 7, 1985)。ヒスチジンに富んでいるタンパク質が、使用される金属イオンに依存して、異なった親和性を有するこのマトリックスに吸着され、そして競争溶出、pHの低下、又は強いキレート化剤の使用により溶出されるであろう。 20

#### 【0261】

他の精製方法は、レクチン親和性クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーによるグリコシル化されたタンパク質の精製を包含する (M. Deutscher, (ed.), Methods Enzymol. 182, 529(1990))。本発明のさらなる態様においては、興味あるポリペプチド、及び親和性標識 (例えばマルトース - 結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Gku標識、免疫グロブリンドメイン) の融合体が、精製を促進するために構成され得る。さらに、マウスZcytor16細胞外ドメインのリガンド - 結合性質が、例えばLI - TIFリガンドがカラムに結合され、そしてマウスZcytor16 - 含有受容体が結合され、そしてつづいて標準のクロマトグラフィー方法を用いて溶離される親和性クロマトグラフィーを用いることによって、例えばマウスZcytor16 - 含有可溶性受容体の精製のために開発され得る。 30

#### 【0262】

マウスZcytor16ポリペプチド又はそのフラグメントはまた、下記のようにして、化学合成を通して調製され得る。マウスZcytor16ポリペプチドは、モノマー又はマルチマーであり得；グリコシル化されても、又はグリコシル化されなくても良く；PEG化されても、又はPEG化されなくても良く；そして初期メチオニンアミノ酸残基を含むことができるか、又は含まなくても良い。

#### 【0263】

9. マウスZcytor16タンパク質に対する抗体の生成： 40

マウスZcytor16に対する抗体は、例えば抗原として、マウスZcytor16発現ベクターの生成物又は天然源から単離されたマウスZcytor16を用いて得られる。特に有用な抗 - マウスZcytor16抗体は、マウスZcytor16を、“特異的に結合する”。抗体は、その抗体が次の2つの性質の少なくとも1つを示す場合、特異的に結合すると思われる：(1) 抗体が限界レベルの結合活性を伴って、マウスZcytor16に結合し、そして(2) 抗体がマウスZcytor16に関連するポリペプチドと有意に交差反応しない場合。

#### 【0264】

第1の特徴に関しては、抗体は、それらが、 $10^6 \text{ M}^{-1}$  又はそれ以上、好ましくは $10^7 \text{ M}^{-1}$  又はそれ以上、より好ましくは $10^8 \text{ M}^{-1}$  又はそれ以上、及び最も好ましくは $10^9 \text{ M}^{-1}$  又はそれ以上の結合親和性 ( $K_a$ ) を伴って、マウスZcytor16ポリペプチド、ペプチド又はエピトープ 50

に結合する場合、特異的に結合する。抗体の結合親和性は、Scatchard 分析 (Scatchard, Ann. NY Acad. Sci. 51: 660 (1949)) により、当業者により容易に決定され得る。第 2 の特徴に関しては、抗体は、それらが、標準のウェスタンブロット分析を用いて、マウス Zcytor16 を検出するが、しかし現在知られているポリペプチドを検出しない場合、関連するポリペプチドと有意に交差反応しない。既知の関連するポリペプチドの例は、既知のサイトカイン受容体である。

#### 【0265】

抗 - マウス Zcytor16 抗体は、抗原性マウス Zcytor16 エピトープ - 担持ペプチドを用いて生成され得る。本発明の抗原性エピトープ - 担持ペプチド及びポリペプチドは、配列番号 38 又は配列番号 48 内に含まれる、少なくとも 9 個、又は 15 ~ 約 30 個のアミノ酸の配列、又は 10  
本明細書に開示されるもう 1 つのアミノ酸配列を含む。しかしながら、30 ~ 50 個のアミノ酸、又は本発明のポリペプチドの全アミノ酸配列までのいずれかの長さのアミノ酸を含む、本発明のアミノ酸配列の大きな部分を含んで成るペプチド又はポリペプチドはまた、マウス Zcytor16 と結合する抗体を誘発するためにも有用である。所望には、エピトープ担持ペプチドのアミノ酸配列は、水性溶媒において実質的な溶解性を提供するように選択される (すなわち、前記配列は、比較的親水性の残基を包含し、そして疎水性残基は好ましくは、回避される)。さらに、プロリン残基を含むアミノ酸配列がまた、抗体生成のために所望される。

#### 【0266】

例示のように、マウス Zcytor16 における可能性ある抗原性部位が、LASERGENE (DNASTAR; 20  
Madison, WI) の PROTEAN プログラム (バージョン 3.14) により実効されるように、Jameson-Wolf method, Jameson and Wolf, CABIOS 4: 181, (1988) を用いて、同定された。デフォルトパラメーター (default parameter) が、この分析に使用された。

#### 【0267】

Jameson - Wolf 方法は、タンパク質構造予測のために 6 種の主要サブルーチンを組合すことによって、可能性ある抗原決定基を予測する。手短には、Hopp - Woods 方法、Hopp など、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3924 (1981) が最初に、最大の局部親水性の領域を表すアミノ酸配列を同定するために使用された (パラメーター: 平均 7 個の残基)。第 2 段階においては、Emini 方法、Emini など、J. Virology 55: 836 (1985) が、表面確立を計算するために使用された (パラメーター: 表面決定限界値 (0.6) = 1)。第 3 に、Karplus - Schultz 方法、Karplus and Schultz, Naturwissenschaften 72: 212 (1985) が、主鎖柔軟性を予測するために使用された (パラメーター: 柔軟性限界値 (0.2) = 1)。  
30

#### 【0268】

分析の第 4 及び第 5 段階においては、二次構造の予測が、Chou-Fasman の方法、Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition", in Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation, Fasman (ed.), p.549-586 (1978) を用いて、データに適用された (Chou-Fasman パラメーター: コンホメーション表 = 64 タンパク質; 領域限界値 = 105; Grnner-Robson パラメーター: 及び 決定パラメーター = 0)。

#### 【0269】

第 6 のサブルーチンにおいては、柔軟性パラメーター及び水治療/溶媒接近性因子が、“抗原指数” として呼ばれる表面輪郭値を決定するために組合された。最終的に、ピーク拡大機能が、抗原指数に適用され、内部領域に対する表面領域の移動度に由来する追加の自由エネルギーを計算するために、それぞれのピーク値の 20, 40, 60 又は 80% を付加することによって主用表面ピークを拡大する。しかしながら、この計算は、ヘリカル領域がほとんど柔軟性になる傾向がないので、ヘリカル領域に存在するいずれかの主用ピークにも適用されなかった。

#### 【0270】

この分析の結果は、配列番号 38 又は配列番号 48 の次のアミノ酸配列が適切な抗原性ペプチドを提供することを示した: アミノ酸 35 ~ 40 (“抗原性ペプチド 1”)、アミノ酸 67 ~ 77  
50

(“抗原ペプチド2”)、アミノ酸88~94(“抗原性ペプチド3”)、アミノ酸108~119(“抗原性ペプチド4”)、アミノ酸108~130(“抗原ペプチド5”)、アミノ酸125~130(“抗原性ペプチド6”)、アミノ酸147~162(“抗原ペプチド7”)、アミノ酸177~190(“抗原ペプチド8”)、及びアミノ酸216~225(“抗原性ペプチド9”)。本発明は、マウスZcytor16に対する抗体を生成するために抗原性ペプチド1~9のいずれか1つの使用を企画する。本発明はまた、抗原性ペプチド1~9の少なくとも1つを含んで成るポリペプチドを企画する。

#### 【0271】

配列番号38又は配列番号48に示されるようなZcytor16タンパク質配列のHopp/Woods親水性プロフィールが生成され得る(Hoppなど., Proc Natl. Acad. Sci. 78: 3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986及びTriquierなど., Protein Engineering 11: 153-169, 1998)。前記プロフィールは、スライドする6-残基窓(sliding six-residue window)に基づかれている。埋もれたG, S及びT残基及び暴露されたH, Y及びW残基は無視された。例えば、Zcytor16においては、適切な抗原として作用する親水性領域は、配列番号38又は配列番号48に関して、次のものを包含する：(1)アミノ酸番号220~225；(2)アミノ酸番号216~221；(3)アミノ酸番号180~185；(4)アミノ酸番号179~184；及び及び(5)アミノ酸番号71~76。さらに、他の適切な抗原は、配列番号38又は配列番号48の残基24、27又は31~122または126；131~229又は230；1~229または230；及び24~229又は230を含んで成る。

#### 【0272】

さらに、適切な抗原はまた、もう1つのクラスI又はIIサイトカイン細胞外ドメイン、例えば可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチド、例えば可溶性マウスZcytor16/CRF2-4、マウスZcytor16/Zcytor11、マウスZcytor16/Zcytor7、及び同様のものを形成するそれらのドメインと組合して、マウスZcytor16サイトカイン結合又は上記に開示される細胞外ドメインを含んで成るマウスZcytor16ポリペプチドを包含する。

#### 【0273】

組換えマウスZcytor16タンパク質、又は天然源から単離されたマウスZcytor16に対するポリクローナル抗体は、当業者に良く知られている方法を用いて調製され得る。例えば、Greenなど., “Production of polyclonal Antisera,” in Immunochemical Protocols (Manion, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992), 及びWilliamsなど., “Expression of foreign proteins in E. coli using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies,” in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2<sup>nd</sup> Edition, Gloverなど., (eds.), page 15 (Oxford University press 1995を参照のこと)。

#### 【0274】

マウスZcytor16ポリペプチドの免疫原性は、アジュバント、例えばみょうばん(水酸化アルミニウム)又はフロイント完全又は不完全アジュバントの使用を通して高められ得る。免疫化のために有用なポリペプチドはまた、融合ポリペプチド、例えばマウスZcytor16又はその一部と、免疫グロブリンポリペプチド又はマルトース結合タンパク質との融合体を包含する。ポリペプチド免疫原は、十分な長さの分子又はその一部であり得る。ポリペプチド部分が“ハプテン-様”である場合、そのような部分は好都合には、免疫化のために高分子キャリアー(例えば、カサガイヘモシアニン(KLH)、ウシ血清アルブミン(BSA)又は破傷風トキソイド)に結合されるか又は連結され得る。

#### 【0275】

ポリクローナル抗体は典型的には、動物、例えば馬、牛、犬、鶏、ラット、マウス、ウサギ、テンジクネズミ、ヤギ又は羊において生ぜしめられるが、本発明の抗-マウスZcytor16抗体はまた、ヒトに近い霊長類抗体から誘導され得る。ヒトにおいて診断的に及び治療的に有用な抗体を生ぜしめるための一般的な技法は、例えばGoldenbergなど., 国際特許出願番号W091/11465号及びLosmanなど., Int. J. Cancer 46: 310, 1990に見出され得る。

#### 【0276】

10

20

30

40

50

他方では、モノクローナル抗 - マウスZcytor16抗体が生成され得る。特定抗原に対する嚙歯動物モノクローナル抗体は、当業者に知られている方法により得られる（例えば、Kohler など., *Nature* 256: 495 (1975), Coliga など., (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, page 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991), Picksley など., "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," in *DN A Cloning 2: Expression Systems*, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover など. (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995を参照のこと)。

#### 【0277】

手短には、モノクローナル抗体は、マウスZcytor16遺伝子生成物を含んで成る組成物をマウスに注射し、血清サンプルを除去することにより抗体生成の存在を確かめ、B - リンパ球を得るために脾臓を除去し、ハイブリドーマを生成するために前記リンパ球を骨髄腫細胞により融合し、ハイブリドーマをクローニングし、抗原に対する抗体を生成する陽性クローンを選択し、抗原に対する抗体を生成するクローンを培養し、そしてハイブリドーマ培養物から抗体を単離することに得られる。

10

#### 【0278】

さらに、本発明の抗 - マウスZcytor16抗体は、ヒトモノクローナル抗体から誘導され得る。ヒトモノクローナル抗体は、抗原攻撃に応答して特定のヒト抗体を生成するよう構築されたトランスジェニックマウスから得られる。この技法においては、ヒトH鎖及びL鎖遺伝子座の要素が、内因性H鎖及びL鎖遺伝子座の標的化された破壊を含む胚幹細胞系に由来するマウス株中に導入される。トランスジェニックマウスは、特定の抗原、例えばZcytor16に対して特異的なヒト抗体を合成することができ、そして前記マウスはヒト抗体 - 分泌性ハイブリドーマを生成するために使用され得る。トランスジェニックマウスからヒト抗体を得るための方法は、Greenなど., *Nat. Genet.* 7: 13, 1994, Lonberg など., *Nature* 368: 856, 1994, 及びTaylorなど., *Inc. Immun.* 6: 576, 1994により記載される。

20

#### 【0279】

モノクローナル抗体は、種々の十分に確立された技法により、ハイブリドーマ培養物から単離され、そして精製され得る。そのような単離技法は、プロテイン - Aセファロースによる親和性クロマトグラフィー、サイズ排除クロマトグラフィー及びイオン交換クロマトグラフィーを包含する（例えば、Coligan, page 2.7.1-2.7.12及びpage 2.9.1-2.9.3; Bainesなど., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", *Methods in Molecular Biology*, vol. 10, p. 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)を参照のこと)。

30

#### 【0280】

特定の用途に関しては、抗 - マウスZcytor16抗体のフラグメントを調製することが所望される。そのような抗体フラグメントは、例えば抗体のタンパク質加水分解により得られる。抗体フラグメントは、従来の方法による完全な抗体のペプシン又はパパイン消化により得られる。例示のように、抗体フラグメントは、 $F(ab')_2$ として示される5Sフラグメントを供給するためにペプシンによる抗体の酵素分解により生成され得る。このフラグメントはさらに、3.5S Fab' 単価フラグメントを生成するためにチオール還元剤を用いて分解され得る。

#### 【0281】

任意には、その分解反応は、ジスルフィド結合の分解に起因するスルフヒドリル基に関するブロッキング基を用いて行われ得る。他の手段としては、ペプシンを用いての酸素分解が2種の単位Fabフラグメント及びFcフラグメントを直接的に生成する。それらの方法は、例えば、Goldenberg, アメリカ特許第4,331,647号、Nisonoff など., *Arcg Biochem. Biophys.* 89: 230, 1960, Porter, *Biochem. J.* 73: 119, 1959, Edelman など., in *Methods in Enzymology* vol. 1, p. 422 (Academic Press 1967), 及びColigan, p. 2.8.1-2.8.10及び2.10-2.10.4により記載される。

40

#### 【0282】

抗体を分解する他の方法、例えば単価L - H鎖フラグメントを形成するためへのH鎖の分解、フラグメントの追加の分解、又は他の酵素的、化学的又は遺伝的技法がまた、そのフラ

50

グメントが損なわれていない抗体により認識される抗原に結合する限り、使用され得る。例えば、Fvフラグメントは、 $V_H$ 及び $V_L$ 鎖の会合を含んで成る。この会合は、Inbar など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 2659, 1972により記載のように、非共有的であり得る。他方では、可変鎖は、分子間ジスルフィド結合により連結され、又は化学物質、例えばグルテルアルデヒドにより交差結合され得る（例えば、Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992を参照のこと）。

#### 【0283】

Fvフラグメントは、ペプチドリinkerにより連結される $V_H$ 及び $V_L$ 鎖を含んで成る。それらの一本鎖抗原結合タンパク質（scFv）は、オリゴヌクレオチドにより連結される $V_H$ 及び $V_L$ ドメインをコードするDNA配列を含んで成る構造遺伝子を構成することによって調製される。構造遺伝子が、続いて、宿主細胞、例えばE.コリ中に導入される発現ベクター中に挿入される。組換え宿主細胞は、2種のVドメインを架橋するリンカーペプチドを有する単鎖ポリペプチドを合成する。ScFvを生成するための方法は、例えばWhitlow など., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:97, 1991により記載される。Bird など., Science 242:423, 1988, Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号、Packなど., Bio/Technology 11: 1271, 1993及びSandhu, 前記も参照のこと。

10

#### 【0284】

例示のように、scFvは、インビトロで、マウスZcytor16ポリペプチドにリンパ球を暴露し、そしてファージ又は類似するベクターにおける抗体表示ライブラリーを選択すること（例えば、固定された又はラベルされたマウスZcytor16タンパク質又はペプチドの作用を通して）によって得られる。可能性あるマウスZcytor16ポリペプチド結合ドメインを有するポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ（ファージ表示）又は細菌、例えばE.コリ上に表示されるランダムペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多くの手段、例えばランダム突然変異誘発及びランダムポリヌクレオチド合成を通して得られる。それらのランダムペプチド表示ライブラリーは、タンパク質又はポリペプチドであり得る既知の標的物、例えばリガンド又は受容体、生物学的又は合成高分子、又は有機又は無機物質と相互作用するペプチドについてスクリーンするために使用され得る。

20

#### 【0285】

そのようなランダム ペプチド表示ライブラリーを創造し、そしてスクリーニングするための技法は、当業界において知られており（Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号；Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号；Ladner など., アメリカ特許第5,403,484号及びLadner など., アメリカ特許第5,571,698号、及びKayなど., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996)）、そしてランダムペプチド表示ライブラリー及びそのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 及びPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されている。ランダムペプチド表示ライブラリーは、マウスZcytor16に結合するタンパク質を同定するために、本明細書に開示されるマウスZcytor16配列を用いてスクリーンされ得る。

30

40

#### 【0286】

抗体フラグメントのもう1つの形は、単一の相補性 - 決定領域（CDR）をコードするペプチドである。CDRペプチド（“最小認識単位”）は、興味ある抗体のCDRをコードする遺伝子を構成することによって得られる。そのような遺伝子は、例えば抗体 - 生成細胞のRNAから可変領域を合成するためにポリメラーゼ鎖反応を用いることによって調製される（例えば、Larrick など., Methods: A Companion to Methods in Enzymology 2:106, (1991), Courtenay-Luck, “Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,” in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritter など., (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995), 及びWard など., “Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,” in Monoclonal Antibodies: Principles a

50

nd Applications, Birch など., (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)を参照のこと)。

【0287】

他方では、抗 - マウスZcytor16抗体は、“ヒト適合された”モノクローナル抗体から誘導され得る。ヒト適合されたモノクローナル抗体は、マウス免疫グロブリンH及びL可変鎖からのマウス相補的決定領域を、ヒト可変ドメイン中に移行することにより生成される。次に、ヒト抗体の典型的な残基がネズミ相対物の骨格領域において置換される。ヒト適合されたモノクローナル抗体に由来する抗体成分の使用は、ネズミ不変領域の免疫原性に関連する可能性ある問題を回避する。ネズミ免疫グロブリン可変ドメインをクローン化するための一般的な技法は、例えば、Orlandiなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3833, 1989により記載される。 10

【0288】

ヒト適合されたモノクローナル抗体を生成するための技法は、例えば、Jones など., Nature 321:522, 1986, Carter など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285, 1992, Sandhu, Crit. Rev. Biotech. 12: 437, 1992, Singer など., J. Immunol. 150: 2844, 1993, Sudhir (ed.), Antibody Engineering Protocols (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, “Engineering Therapeutic Antibodies,” in Protein Engineering: Principles and Practice, Cleland など. (eds.), pages 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996), 及びQueen など., アメリカ特許第5,693,762号 (1997) により記載される。

【0289】

ポリクローナル抗 - イディオタイプ抗体は、標準技法を用いて、抗 - マウスZcytor16抗体又は抗体フラグメントにより動物を免疫化することにより調製され得る。例えば、Green など., “Production of Polyclonal Antisera” in Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols, Manson (ed.), P. 1-2 (Humana Press 1992) を参照のこと。また、Coligan, 前記、p.2.4.1-2.4.7も参照のこと。他方では、モノクローナル抗 - イディオタイプ抗体は、上記の技法により、抗 - マウスZcytor16抗体又は抗体フラグメントを免疫原として用いて調製され得る。もう1つの方法として、ヒト適合された抗 - イディオタイプ抗体又は人間に近い霊長類抗 - イディオタイプ抗体が、上記技法を用いて調製され得る。抗 - イディオタイプ抗体を調製するための方法は、例えばIrie, アメリカ特許第5,208,146号, Greeneなど., アメリカ特許第5,637,677号、及びVarthakovi and Minocha, J. Gen. Virol. 77: 1875, 1996により記載される。 30

【0290】

10. 遺伝子発現及び遺伝子構造を検出するためへのマウスZcytor16ヌクレオチド配列の使用:

核酸分子は、生物学的サンプルにおけるマウスZcytor16遺伝子の発現を検出するために使用され得る。適切なプローブ分子は、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列、又はその一部を含んで成る二本鎖核酸分子、及び配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド配列の補体、又はその一部を有する1本鎖核酸分子を包含する。本明細書において使用される場合、用語“一部”とは、少なくとも8個のヌクレオチド~少なくとも20個又はそれ以上のヌクレオチドを言及する。例示的なプローブは、他のサイトカイン受容体遺伝子における相当の領域に対して低い配列類似性を有する、マウスZcytor16遺伝子の領域と結合する。 40

【0291】

基本的アッセイにおいては、一本鎖プローブ分子が、プローブと標的マウスZcytor16 RNA種との間の塩基対合を促進する、温度及びイオン強度の条件下で、生物学的サンプルから単離されたRNAと共にインキュベートされる。末結合のプローブをハイブリダイズされた分子から分離した後、ハイブリッドの量が検出される。

【0292】

さらに、ヒト及びマウスにおけるZcytor16発現は組織 - 特異的ポリヌクレオチドプローブ、抗 - マウスzcytor16抗体及び検出であるので、組織におけるZcytor16ポリペプチドの存 50

在は、例えば、疾病又は癌組織の切除を包含する手術の後、特定の組織が存在するかどうかを評価するために使用される。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体は、すべての脾臓組織が、手術の後、例えば脾臓癌についての手術の後、切除されたかどうかを決定するための助剤として使用され得る。そのような場合、癌からの回復を最大化し、そして再発を最少にするためにすべての可能性ある疾病組織を除去することが、特に重要である。好ましい態様は、現場使用され得る、蛍光、放射性ラベルされた又は熱量計上のにラベルされた抗体を包含する。

#### 【0293】

さらに、抗 - マウスZcytor16抗体及び結合フラグメントは、マウスZcytor16を特異的に発現する細胞、例えば、単核細胞、リンパ球細胞、例えば活性化されたCD4<sup>+</sup> T-細胞及びCD19<sup>+</sup> B-細胞、及び本明細書に記載される他の細胞を標的化し、そして分類するために使用され得る。そのような細胞標的化及び分類方法は、当業界において良く知られている（例えば、"Molecular Biology of the Cell", 3<sup>rd</sup> Ed., Albert, B. など. (Garland Publishing, London & New York, 1994を参照のこと)。当業者は、細胞を研究するための細胞組織型の分離の重要性及び特定の細胞組織型の分離のためへの抗体の使用を認識するであろう。基本的には、細胞型の表面に結合する抗体は、抗体により認識される細胞のみが付着するであろう親和性表面を形成するために、種々のマトリックス、例えばコラーゲン、多糖ビーズ又はプラスチックにカップリングされる。

#### 【0294】

次に、結合された細胞は、従来の技術により回収される。他の方法は、蛍光活性化された細胞ソーター（FACS）による細胞の分離を包含する。この技法においては、蛍光色素に結合される抗体により細胞をラベリングする。次に、ラベルされた細胞は、FACS機械によりラベルされていない細胞から分離される。FACS分離においては、単一の列で移動する個々の細胞が、レーザービームを通過し、そして個々の細胞の蛍光が測定される。わずかにさらなる下流の小滴（ほとんどは、1つの細胞を含むか又はまったく含まない）が、振動ノズルにより形成される。単一の細胞を含むその小滴は、それらが含む細胞が蛍光であるかどうか依存して、形成の瞬間で、正又は負の電荷を自動的に付与され、そして次に、強い電界により適切な容器中に偏向される。そのような機械は、1000の細胞のうち1つを選択し、そして1秒当たり約5000個の細胞を分類できる。これは、細胞培養物について均等な細胞集団を生成する。

#### 【0295】

当業者は、本発明のマウスZcytor16ポリペプチドに対する抗体は、必ずしもすべての組織型がマウスZcytor16受容体を発現せず、そして生物学者がさらなる研究及び/又は身体中への治療的再移植のために特定の細胞型を分離することができることは重用であるので、有用である。これは、細胞、例えばマウスZcytor16が発現される免疫細胞において特に適切である。

#### 【0296】

さらに、マウスZcytor16ポリヌクレオチドプローブ、抗 - マウスZcytor16抗体及び検出の使用は、組織におけるマウスZcytor16ポリペプチドの存在が、自然流産の診断及び/又は予防において、又は胎盤の健康及び機能をモニターするために使用され得る。マウスZcytor16は胎盤において発現されるので、それは胎盤の決定的な機能、例えばトロホブラスト細胞の増殖又は生存、及び同様の機能において役割を演じることができる。従って、マウスZcytor16は、胎盤の機能、従って胚の成熟のために必須である。従って、マウスZcytor16ポリペプチド又は抗 - マウスZcytor16抗体の補充は、一定型の自然流産、又は胎盤におけるZcytor16の異常発現により引き起こされる子供の早産の予防及び処理において、又は胎盤の機能を評価するための診断剤として有益である。

#### 【0297】

例えば、マウスZcytor16は胎盤において通常発現されるので、マウスZcytor16発現の不在は、異常胎盤機能の表示であり得る。同様に、マウスZcytor16ポリヌクレオチドプローブ、すなわち抗 - マウスZcytor16抗体の使用は、一定のタイプの自然流産、又は胎盤におけ

10

20

30

40

50



るマウスZcytor16の異常発現により引き起こされる子供マウスの早産の予防及び処理において、又は胎盤の機能を評価するための診断剤として、動物管理において、例えば市販のマウス繁殖コロニー及びトランスジェニックマウス胚受容体において使用され得る。

#### 【0298】

RNA検出の十分に確立されたハイブリダイゼーション方法は、ノザン分析及びドット/スロット プロットハイブリダイゼーションを包含する（例えば、Ausubel 前記、p4 - 1 ~ 4 - 27、及びWuなど. (eds.)、" Analysis of Gene Expression at the RNA Level ", in Methods in Gene Biotechnology, p. 225-39, CRC Press, Inc., 1997を参照のこと）。核酸プローブは、放射性同位体、例えば<sup>32</sup>P又は<sup>35</sup>Sにより検出できるようラベルされ得る。他方では、マウスZcytor16 RNAは、非放射性ハイブリダイゼーション方法により検出され得る（例えば、Isaac (ed.), Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes, Humana Press, Inc., 1993を参照のこと）。典型的には、非放射能性検出は、クロモゲン又は化学ルミネセンス基質の酵素転換により達成される。例示的な非放射性成分は、ピオチン、フルオレセイン及びジゴキシゲニンを包含する。

10

#### 【0299】

マウスZcytor16オリゴヌクレオチドプローブはまた、インピボ診断のためにも有用である。例示として、<sup>16</sup>F - ラベルされたオリゴヌクレオチドが対象に投与され、そして陽電子射出断層撮影法により可視可され得る（Tavitian など., Nat. Med. 4: 467, 1998）。

#### 【0300】

多くの診断方法は、検出方法の感度を高めるために、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）を利用する。PCRを実施するための標準技法は良く知られている（一般的には、Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics, Humana Press, Inc., 1991; White (ed.), PCR Protocols: Current Methods and Applications, Humana Press, Inc., 1993; Cotter (ed.), Molecular Diagnosis of Cancer, Humana Press, Inc., 1996; Hanausek and Walszted (eds.), Tumor Marker Protocols, Humana Press, Inc., 1998; Lo (ed.), Clinical Applications of PCR, Humana Press, Inc., 1998及びMeltzer (ed.), PCR in Bioanalysis, Humana Press, Inc., 1998を参照のこと）。

20

PCRプライマーは、他のタンパク質、例えば、他のサイトカイン受容体タンパク質における相当の領域に対して低い配列類似性を有するマウスZcytor16遺伝子の一部を増幅するように企画される。

30

#### 【0301】

診断アッセイについてのPCRの1つの変法は、逆転写酵素 - PCR (RT - PCR) である。RT - PCR技法においては、RNAが生物学的サンプルから単離され、cDNAに逆転写され、そしてそのcDNAがマウスZcytor16プライマーと共にインキュベートされる（例えば、Wuなど. (eds.), " Rapid Isolation of Specific cDNA or Genes by PCR ", in Methods in Gene Biotechnology, P. 15-28, CRC Press, Inc. 1997を参照のこと）。次に、PCRが行われ、そして生成物が標準技法を用いて分析される。

#### 【0302】

例示のように、RNAは、例えば上記グアニジニウム - チオシアネート細胞溶解を用いて、生物学的サンプルから単離される。他方では、固相技法が、細胞溶解物からmRNAを単離するために使用され得る。逆転写反応は、ランダムオリゴヌクレオチド、dTの短いホモポリマー、又はマウスZcytor16アンチセンスオリゴマーを用いて、単離されたRNAにより感作され得る。オリゴ - dTプライマーは、対照の標的配列を提供することができる種々のmRNAヌクレオチド配列が増幅される利点を提供する。マウスZcytor16配列は、典型的には20個の長さの塩基である2種のフランキング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により増幅される。

40

#### 【0303】

PCR増幅方法は、種々のアプローチを用いて検出され得る。例えば、PCR生成物は、ゲル電気泳動により分別され、そして臭化エチジウム染色により可視化される。他方では、分別されたPCR生成物は、膜に移行され、検出できるようにラベルされたマウスZcytor16プロ

50

ープによりハイブリダイズされ、そしてオートラジオグラフィーにより試験され得る。追加の他のアプローチは、化学ルミネセンス検出及びC-TRAK比色アッセイを提供するために、ジゴキシゲニンによりラベルされたデオキシリボ核酸三ミリ酸の使用を包含する。

#### 【0304】

マウスZcytor16発現の検出のためのもう1つのアプローチは、サイクリングプローブ技法(CDT)であり、ここで一本鎖DNA標的物が過剰のDNA-RNA-DNAキメラプローブと結合し、複合体を形成し、RNA部分がRNアーゼHにより分化され、そして分解されたプローブの存在が検出される(例えば、Beggsなど., J. Clin. Microbiol. 34: 2985, 1996, 及び Bekkuouiなど., Biotechniques 20: 240, 1996を参照のこと)。マウスZcytor16配列の検出のための他の方法は、核酸配列に基づく増幅(NASBA)、交差ハイブリダイゼーションによる鋳型の協同増幅(CATCH)及びリガーゼ鎖反応(LCR)のようなアプローチを利用することができる(例えば、Marshallなど., アメリカ特許第5,686,272号(1997)、Dyerなど., J. Virol. Methods 60: 161, 1996; Ehrichtなど., Eur. J. Biochem. 243: 358, 1997; 及びChadwickなど., J. Viro. Methods 70:59, 1998を参照のこと)。他の標準方法も当業者に知られている。

10

#### 【0305】

マウスZcytor16プローブ及びプライマーはまた、組織サンプルにおける局在化されたZcytor16遺伝子発現を検出し、そして位置決定するためにも使用され得る。そのような現場ハイブリダイゼーションのための方法は、当業者に良く知られている(例えば、Choo (ed.), In situ Hybridization Protocols, Humana Press, Inc., 1994; We など. (eds.), "Analysis of Cellular DNA or Abundance of mRNA by Radioactive In Situ Hybridization (RISH)," in Methods in Gene Biotechnology, pages 259-278, CRC Press, Inc., 1997; 及びWuなど. (eds.), "Localizaion of DNA or Abundance of mRNA by Fluorescence In Situ Hybridization (RISH)," in Methods in Gene Biotechnology, pages 279-289, CRC Press, Inc., 1997を参照のこと)。

20

#### 【0306】

種々の追加の診断アプローチも当業者に良く知られている(例えば、Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics, Humana Press, Inc., 1991; Coleman and Tsongalis, Molecular Diagnostics, Humana Press, Inc., 1996; 及びElles, molecular Diagnosis of Genetics Diseases, Humana Press Inc., 1996を参照のこと)。適切な試験サンプルは、血液、尿、唾液、組織生検及び検死を包含する。

30

#### 【0307】

11. Zcytor16を検出するか又はIL-TIFに対するZcytor16の結合を拮抗するためへの抗-マウスZcytor16抗体の使用:

本発明は、Zcytor16の存在についてインビトロで生物学的サンプルをスクリーンするためへの抗-マウスZcytor16抗体の使用を企画する。1つのタイプのインビトロアッセイにおいては、抗-マウスZcytor16抗体が液相において使用される。例えば、生物学的サンプルにおけるマウスZcytor16の存在は、生物学的サンプルと、微量のラベルされたマウスZcytor16及び抗-マウスZcytor16抗体とを、マウスZcytor16とその抗体との間の結合を促進する条件下で混合することによって試験され得る。

40

#### 【0308】

サンプルにおけるマウスZcytor16及び抗-マウスZcytor16の複合体が、前記複合体を、抗体、例えばFc抗体又はスタフィロコカスタンパク質Aと結合する同定されたタンパク質とを接触することによって、反応混合物から分離され得る。生物学的サンプルにおけるマウスZcytor16の濃度は、抗体に結合されるラベルされたマウスZcytor16の量に反比例し、そして遊離ラベルにされたマウスZcytor16の量に直接的に関連する。例示的な試験サンプルは、血液、尿、唾液、組織生検及び検死材料を包含する。

#### 【0309】

他方では、抗-マウスZcytor16抗体が固相キャリアーに結合されるインビトロアッセイが行われ得る。例えば、抗体が、不溶性支持体、例えばポリマー-被覆されたビーズ、プレ

50

ート又は管に抗体を結合するために、ポリマー、例えばアミノデキストランに結合され得る。他の適切なインビトロアッセイは、当業者に明らかであろう。

#### 【0310】

もう1つのアプローチにおいては、抗 - マウスZcytor16抗体が、生検検体から調製された組織切片においてZcytor16を検出するために使用され得る。そのような免疫化学的検出が、比較的多くのマウスZcytor16を決定するために、及び試験される組織におけるZcytor16の分布を決定するために使用され得る。一般的な免疫化学的技法は、十分に確立されている（例えば、Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application." in *Mammalian Development: A Practical Approach*, Monk (ed.), pages 115-38 (IRL Press 1987), Coligan at pages 5.8.1-5.8.8, Ausubel (1995) at pages 14.6.1 to 14.6.13 (Wiley interscience 1990), and Manson (ed.), *Methods In Molecular Biology*. Vol. 10: *Immunochemical Proteocols* (The Humana Press. Inc. 1992) を参照のこと）。

10

#### 【0311】

免疫化学的検出は、生物学的サンプルと抗 - マウスZcytor16抗体とを接触し、そして次に、前記生物学的サンプルと、抗体に結合する検出できるラベルされた分子とを接触せしめることによって行われ得る。例えば、前記検出できるラベルされた分子は、抗 - マウスZcytor16抗体に結合する抗体成分を含んで成る。他方では、抗 - マウスZcytor16抗体は、アビジン/ストレプタビジン（又はビオチン）により接合され、そして検出できるラベルされた分子はビオチン（又はアビジン/ストレプタビジン）を含むことができる。この基本的技法の多くの変法は、当業者に良く知られている。

20

#### 【0312】

他方では、抗 - マウスZcytor16抗体が、抗 - マウスZcytor16免疫接合体を形成するために、検出できるラベルにより接合され得る。適切な検出できるラベルは、例えば放射生同位体、蛍光ラベル、化学ルミネセンスラベル、酵素ラベル、生物ルミネセンスラベル又はコロイド状金を包含する。そのような検出できるラベルされた免疫接合体の製造及び検出方法は、当業者に良く知られており、そして下記により詳細に記載される。

#### 【0313】

検出できるラベルは、オートラジオグラフィーにより検出される放射性同位体であり得る。本発明のために特に有用である同位体は、 $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$ 及び $^{14}\text{C}$ である。

抗 - マウスZcytor16免疫接合体はまた、蛍光化合物によりラベルされ得る。蛍光ラベルされた抗体の存在は、適切な波長の光に免疫接合体を暴露し、そして得られる蛍光を検出することによって決定される。蛍光ラベル化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、o - フタルアルデヒド及びフルオレサミンを包含する。

30

#### 【0314】

他方では、抗 - マウスZcytor16免疫接合体は、化合物ルミネセンス化合物に抗体化合物を接合することによって、検出的にラベルされ得る。化学ルミネセンス - 標識された免疫接合体の存在は、化学反応の間に生じるルミネセンスの存在を検出することによって決定される。化学ルミネセンスラベリング化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びオキサレートエステルを包含する。

40

#### 【0315】

同様に、化学ルミネセンス化合物は、本発明の抗 - マウスZcytor16免疫接合体をラベルするために使用され得る。生物発光は、触媒タンパク質が化学ルミネセンス反応の効率を高める生物学的システムに見出されるタイプの化学ルミネセンスである。生物ルミネセンスタンパク質の存在は、ルミネセンスの存在を検出することによって決定される。ラベリングのために有用である生物ルミネセンス化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクロリンを包含する。

#### 【0316】

他方では、抗 - マウスZcytor16免疫接合体は、酵素に抗 - マウスZcytor16抗体化合物を接

50

合することによって検出できるようラベルされ得る。抗 - マウスZcytor16 - 酵素接合体が適切な基質の存在下でインキュベートされる場合、酵素成分は、分光光度、蛍光又は可視手段により検出され得る化学成分を生成するために基質と反応する。多くの特異的免疫接合体を検出できるようにラベルするために使用され得る酵素の例は、 - ガラクトシダーゼ、グルコオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ及びアルカリホスファターゼを包含する。

#### 【0317】

当業者は、本発明に従って使用され得る他の適切なラベルを知っているであろう。抗 - マウスZcytor16抗体へのマーカー成分の結合は、当業界において知られている標準技法を用いて達成され得る。これに関しての典型的な方法論は、Kennedyなど., Clin. Chim. Acta 70:1 (1976), Schursなど., Clin. Acta 81:1 (1977), Shihなど., Int'l. J. Cancer 46:1101 (1990), steinなど., Cancer Res. 50:1330 (1990), 及びColigan、前期により記載される。

10

#### 【0318】

さらに、免疫化学的検出の便利さ及び多様性は、アビジン、ストレプトアビジン及びビオチンにより接合された抗 - マウスZcytor16抗体を用いることによって増強され得る (例えば、Wilchek. など., (eds.), "Avidin-Biotin Technology," Methods In Enzymology, Vol. 184 (Academic Press 1990), and Bayerなど., "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in Methods In Molecular Biology, Vol. 10, Manson (ed.) pages 149-162 (The Humana Press. Inc. 1992) を参照のこと)。

#### 【0319】

免疫アッセイを行うための方法は十分に確立されている。例えば、Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application, Ritter and Ladyman (eds.), Pages 180-208. (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology", in Monoclonal Antibodies; Principles and applications, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Diamandis, Immunoassay (Academic Press, Inc. 1996 を参照のこと)。

20

#### 【0320】

本発明はまた、Zcytor16遺伝子発現についての免疫学的診断アッセイを行うためのキットも企画する。そのようなキットは、抗 - マウスZcytor16抗体又は抗体フラグメントを含んで成る少なくとも1つの容器を含んで成る。キットはまた、マウスZcytor16抗体又は抗体フラグメントの存在を示すことができる1又は複数の試薬を含んで成る第2容器を含むことができる。そのようなインジケータ試薬の例は、検出できるラベル、例えば放射性ラベル、蛍光ラベル、化学ルミネセンスラベル、酵素ラベル、生物ルミネセンスラベル、コロイド状金及び同様のものを包含する。キットはまた、マウスZcytor16抗体又は抗体フラグメントが、Zcytor16タンパク質を検出するために使用される、使用者に伝達するための手段を含んで成る。例えば、文書の説明書は、封入される抗体又は抗体フラグメントが、マウスZcytor16を検出するために使用され得ることを言及する。文書の材料は容器に直接的に適用され、又は文書の材料は、パッケージング挿入体の形で提供され得る。

30

40

#### 【0321】

本明細書において有用な抗体を生成するか又は選択するための他の技法は、インビトロで、可溶性マウスZcytor16モノマー受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチドにリンパ球を暴露し、そしてファージ又は類似するベクターにおける抗体表示ライブラリーを選択すること (例えば、固定された又はラベルされた可溶性マウスZcytor16モノマー受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチドの使用を通して) を包含する。可能性ある結合ドメインを有するポリペプチド、例えば可溶性マウスZcytor16モノマー受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチドをコードする遺伝子は、ファージ (ファージ表示) 又は細菌、例えばE. コリ上に表示されるランダム

50

ペプチドライブラリーをスクリーニングすることによって得られる。

【0322】

前記ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列は、多くの手段、例えばランダム突然変異誘発及びランダムポリヌクレオチド合成を通して得られる。それらのランダムペプチド表示ライブラリーは、タンパク質又はポリペプチドであり得る既知の標的物、例えばリガンド又は受容体、生物学的又は合成高分子、又は有機又は無機物質と相互作用するペプチドについてスクリーンするために使用され得る。

【0323】

そのようなランダム ペプチド表示ライブラリーを創造し、そしてスクリーニングするための技法は、当業界において知られており (Ladner など., アメリカ特許第5,223,409号 ; Ladner など., アメリカ特許第4,946,778号 ; Ladner など., アメリカ特許第5,403,484号及びLadner など., アメリカ特許第5,571,698号、及びKayなど., Phage Display of Peptides and Proteins (Academic Press, Inc. 1996))、そしてランダムペプチド表示ライブラリー及びそのようなライブラリーをスクリーニングするためのキットは、例えばClontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) 及びPharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ) から市販されている。

10

【0324】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチドに結合するタンパク質を同定するために、本明細書に開示される可溶性マウスZcytor16モノマー受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチド配列を用いてスクリーンされ得る。可溶性マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチドと相互作用するそれらの“結合ペプチド”は、細胞、例えばZcytor16を発現する細胞を標識するために；親和性精製により相同体ポリペプチドを単離するために使用され得；それらは薬物、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的にまたは間接的に接合され得る。

20

【0325】

それらの結合ポリペプチドはまた、分析方法に、例えば発現ライブラリーをスクリーニングし、そして活性を中和するために、例えばIL-TIFリガンドと受容体との間の相互作用、又は受容体に対するウィルス結合を阻止すれためにも使用され得る。結合ポリペプチドはまた、可溶性マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチドの循環レベルを決定するために；根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性又は非 - 可溶性Zcytor16 - 含有受容体を検出し又は定量化するために、診断アッセイにも使用され得る。それらの結合ポリペプチドはまた、可溶性又は膜 - 結合されたマウスZcytor16モノマー受容体又はマウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチド (例えば、リガンドに対して結合する) 及びシグナルトランスダクションをインビトロ及びインビボで阻止するために、“アンタゴニス”として作用することができる。

30

【0326】

再び、それらの結合ポリペプチドは、抗 - マウスZcytor16モノマー受容体又は抗 - マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーポリペプチドとして作用し、そしてIL-TIF活性、及び受容体活性又はタンパク質 - 結合の阻害のために有用である。本発明の天然の受容体複合体に対して生ぜしめられた抗体は、それらがIL-TIFに対してより特異的に、又はわずか1つのサブユニットに対して生じせしめられた抗体よりも有力に作用することができるので、好ましい態様であり得る。さらに、本発明は抗体の拮抗性及び結合活性は、IL-TIF及びZcytor16 - 含有可溶性受容体の存在下でのIL-TIF増殖、シグナルトラップ、ルシファラーゼ又は結合アッセイにおいて、及び本明細書に記載される他の生物学的又は生化学的アッセイによりアッセイされ得る。

40

【0327】

モノマー性マウスZcytor16受容体又はマウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーマウスZcytor16 - 含有受容体に対する抗体は、Zcytor16受容体を発現する細胞

50

を標識するために；アフィニティー精製により可溶性Zcytor16 - 含有受容体ポリペプチドを単離するために；可溶性Zcytor16 - 含有受容体ポリペプチドの循環レベルを決定するための診断アッセイのために；根本的な病理学又は疾病のマーカーとして可溶性Zcytor16 - 含有受容体を検出し又は定量化するために；FACSを使用する分析方法において；発現ライブラリーをスクリーニングするために；IL-TIFアゴニストとして作用することができる抗 - インディオタイプ抗体を生成するために；及びインビトロでZcytor16受容体機能を阻止するか又はIL-TIF活性を阻止するための中和抗体又はアンタゴニストとして使用され得る。

#### 【0328】

適切な直接的標識又はラベルは、放射性核種、酵素、基質、補因子、ビオチン、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子及び同様のものを包含し；間接的な標識又はラベルは、中間体としてのビオチン - アビジン又は他の補体 / 抗 - 補体対の使用を特徴とする。本発明書における抗体及び結合タンパク質はまた、薬物、トキシン、放射性核種、及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体はインビボ診断又は治療用途のために使用され得る。さらに、可溶性マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチド又はそのフラグメントに対する抗体は、アッセイ、例えば当業界において知られているウェスタンブロット又は他のアッセイにおいて、変性された又は変性されていないマウス又はオルト体性Zcytor16 - 含有受容体ポリペプチド又はそのフラグメントを検出するためにインビトロで使用され得る。

10

#### 【0329】

可溶性マウスZcytor16受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体ポリペプチドに対する抗体は、その対応する受容体を発現する細胞を標識し、そしてそれらの発現レベルをアッセイするために、受容体ポリペプチドの循環レベルを決定するために診断アッセイ内での親和性精製のために、蛍光 - 活性化された細胞分類を用いる分析方法のために有用である。さらに、二価の抗体、及び抗 - インディオタイプ抗体が、Zcytor16リガンド、すなわちIL-TIFの効果を最少にするためにアゴニストとして使用され得る。

20

#### 【0330】

本明細書における抗体はまた、薬剤、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的に又は間接的に接合され得、そしてそれらの接合体は、治療用途を研究するためのネズミモデルにおいて、又は治療の用途において、インビボ診断のために使用される。例えば、本発明の可溶性マウスZcytor16受容体又は可溶性マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体ポリペプチドを認識する抗体又は結合ポリペプチドは、対応する抗 - 相補的分子（すなわち、マウスZcytor16 - 含有可溶性または膜 - 結合された受容体）を発現する組織又は器官を同定し、又は処理するために使用され得る。より特定には、可溶性マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチド又はその生物活性フラグメント又は一部に対する抗体が、検出可能な又は細胞毒性の分子に連結され、そしてZcytor16 - 含有受容体、例えばZcytor16 - 発現性癌又は一定の疾病状態を発現する細胞、組織又は器官を有する哺乳類に供給され得る。

30

#### 【0331】

適切な検出可能分子は、マウスZcytor16 - 含有受容体ポリペプチド、例えば“結合ポリペプチド”（上記に開示される結合ペプチドを包含する）、抗体、又はその生物活性フラグメント又は一部に直接的に又は間接的に結合され得る。適切な検出可能分子は、放射性核種、酵素、基質、補因子、インヒビター、蛍光マーカー、化学発光マーカー、磁気粒子、及び同様のものを包含する。

40

#### 【0332】

適切な細胞毒性分子は、ポリペプチド又は抗体に直接的に又は間接的に結合され得、そして細菌又は植物毒性（例えば、ジフテリア毒素、プソイドモナシス内毒素、リシン、アブリン及び同様のもの）、及び治療用放射性核種、例えばI - 131、レニウム - 188又はイットリウム - 90（ポリペプチド又は抗体に直接的に結合されるか、又はキレート成分により

50

間接的に結合される)を包含する。結合ポリペプチド又は抗体はまた、細胞毒性薬物、例えばアドリマイシンに結合され得る。検出可能又は細胞毒性分子の間接的な結合に関しては、検出可能又は細胞毒性分子は相補的/抗相補的対のメンバーにより結合され得、ここで他のメンバーは結合ポリペプチド又は抗体部分に結合される。それらの目的のためには、ビオチン/ストレプトタビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

#### 【0333】

もう1つの態様においては、結合ポリペプチド-毒素融合タンパク質又は抗体-毒素融合タンパク質は、標的化された細胞又は組織阻害又は除去(例えば、癌細胞又は組織を処理するために)のために使用され得る。他方では、結合ポリペプチドが複数の機能ドメイン(すなわち、活性化ドメイン又はリガンド結合ドメイン、及び標的化ドメイン)を有する場合、標的化ドメインのみを包含する融合タンパク質は、検出可能分子、細胞毒性分子又は相補的分子を、興味ある細胞又は組織型に向けるために適切である。例えば、単一のドメインのみを包含する融合タンパク質が相補的分子を含む場合、抗-相補的分子は検出可能又は細胞毒性分子に接合され得る。従って、そのようなドメイン-相補的分子融合タンパク質は、一般的抗-相補的-検出可能/細胞毒性分子接合体のための一般的標的化ビークルを表す。

10

#### 【0334】

もう1つの態様においては、マウスZcytor16結合ポリペプチド-サイトカイン又は抗体-サイトカイン融合タンパク質は、結合ポリペプチドサイトカイン又は抗-マウスZcytor16受容体抗体が過剰増殖性細胞を標的化する場合、標的組織(例えば、脾臓、膵臓、血液、リンパ球、結腸及び骨髓癌)のインビボ殺害を増強するために使用され得る(一般的には、Hornickなど., Blood 89: 4437-4447, 1997を参照のこと)。記載される融合タンパク質は、作用の所望する部位へのサイトカインの標的化を可能にし、それにより、サイトカインの高められた局部濃度を提供する。

20

#### 【0335】

適切な抗-マウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー抗体は、所望しない細胞又は組織(例えば、腫瘍又は白血病)を標的化し、そして融合されたサイトカインはエフェクター細胞による改良された標的細胞溶解を仲介する。例えば、この目的のための適切なサイトカインは、インターロイキン-2及び顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSM)を包含する。

30

他方では、本明細書に記載されるマウスZcytor16受容体結合ポリペプチド又は抗体融合タンパク質は、Zcytor16受容体-調節されたアポプトシス経路を直接的に刺激することにより、標的組織のインビボ殺害の増強のために使用され、Zcytor16-含有受容体を発現する高増殖性細胞の細胞死がもたらされる。

#### 【0336】

12. トランスジェニックマウスの生成:

“トランスジェニックマウス”として言及される、マウスZcytor16遺伝子を過剰発現するように構築されたマウス、及び“ノックアウトマウス”として言及される、マウスZcytor16遺伝子機能の完全な不在を示すマウスがまた、生成され得る(Snouwaertなど., Science 257: 1083, 1992; Lowellなど., Nature 366: 740-742, 1993; Capecchi, Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiterなど., Annu. Rev. Genet. 20: 465-499, 1986)。例えば、偏在的に、又は組織-特異的又は組織-制限されたプロモーター下でマウスZcytor16を過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用さえ得る。

40

#### 【0337】

例えば、野生型Zcytor16ポリペプチド、そのポリペプチドフラグメント又は変異体の過剰発現は、正常な細胞工程を変更することができ、又はZcytor16リガンドIL-TIFの機能を抑制し、Zcytor16発現が機能的に適切であり、そしてZcytor16、そのアゴニスト又はアンタゴニストのための治療標的物を示すことができる組織を同定する表現型をもたらす。例えば、構築する好ましいトランスジェニックマウスは、十分な長さのヒトZcytor16ポリペ

50

チド（配列番号2）、又はより好ましくは、十分な長さのマウスZcytor16ポリペプチド（配列番号38又は配列番号48）、又は成熟マウスポリペプチド（配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24～230又は27～230）を過剰発現するマウスである。

#### 【0338】

好ましい組織 - 特異的又は組織 - 制限されたプロモーターは、単球及びリンパ球 - 性制限された、上皮 - 特異的、肺 - 特異的、卵巣 - 特異的及び皮膚 - 制限されたプロモーターを包含する。さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾病との類似性を示すか、又は高められた又は投与されたIL-TIF（マウスにおけるIL-TIFアデノウイルスは、IL-TIF過剰発現が好中球及び血小板のレベルをインビボで高めることを示唆する）の効果を妨げる表原型をもたらすことができる。

10

#### 【0339】

同様に、ノックアウトマウスZcytor16は、Zcytor16がインビボで絶対的に必要とされる場所を決定するために使用され得る。そのようなノックアウト動物は、ヒトにおけるZcytor16機能の必要条件を理解するためのモデルとして作用する。ノックアウトマウスであるトランスジェニックマウスは、それらが内因性Zcytor16遺伝子機能の完全な不在を示すので、配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230、又は27～230を発現しない。ノックアウトマウスの表現型は、Zcytor16アンタゴニスト、例えば本明細書に記載されるそれらが有することができるインビボ効果の表示である。ネズミZcytor16 mRNA及びcDNAが単離され（配列番号37又は配列番号47）、そしてノックアウトマウスを生成するために続いて使用される、マウスZcytor16ゲノムDNAを単離するために使用され得る。

20

#### 【0340】

それらのトランスジェニック及びノックアウトマウスは、Zcytor16遺伝子及びそれによりコードされるタンパク質をインビボシステムにおいて研究するために使用され得、そして対応するヒト又は動物疾病（例えば、市販の生存動物集団におけるそれらの疾病）のためのインビボモデルとして使用され得る。本発明のマウスモデルは、免疫機能、炎症性疾患、癌生物学及び進行の研究のための腫瘍モデルとして特に適切である。そのようなモデルは、ヒト癌、免疫及び炎症性疾患に使用される治療分子の開発及び効力において有用である。例えば、ヒトZcytor16発現の上昇が、特定のヒト癌、例えば卵巣癌に関連するので、トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの両者は、癌のための有用な動物モデルとして作用する。

30

#### 【0341】

さらに、ヒトZcytor16発現の上昇が特定の単球細胞、例えばCD4<sup>+</sup> T-細胞及びCD19<sup>+</sup> B-細胞と関連しているので、マウスZcytor16トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの両者は、免疫機能、炎症、免疫障害、感染、貧血、造血及び他の癌のための有用な動物モデルとして作用するであろう。さらに、Zcytor16はIL-TIFのための受容体であるので、IL-TIFを用いてのマウスモデル（例えば、IL-TIFを伴って及びそれを伴わないで）へのマウスZcytor16トランスジェニック及びノックアウトマウスの使用は、IL-TIFに関連する、ヒト癌、免疫及び炎症患者に使用される治療分子の開発及び効能を研究し、そしてIL-TIFアンタゴニスト、例えば本明細書において論じられるZcytor16可溶性受容体のインビボでの効能及び有用性を評価するための追加の動物モデルとして作用することができる。

40

#### 【0342】

さらに、好ましい態様においては、Zcytor16トランスジェニックマウスは、特定の腫瘍、特に、卵巣癌、胃癌、子宮癌、直腸癌、肺癌及び食道癌についての動物モデルとして；及びZcytor16ポリペプチドがアンタゴニストである場合、IL-TIF-誘発された炎症についてのモデルとして作用することができる。そのようなマウスZcytor16トランスジェニック及びノックアウトモデルはまた、IL-TIF、化学治療剤、抗-IL-TIF抗体、抗-Zcytor16抗体、又は本明細書におけるZcytor16可溶性受容体の治療観点を評価するためにも使用され得る。さらに、本明細書に記載される、マウスZcytor16に対して指図されたマウスZcytor16アンチセンスポリヌクレオチド又はリボザイムのトランスジェニックマウス発現が、

50



上記トランスジェニックマウスに類似して使用され得る。

【0343】

トランスジェニックマウスは、すべての組織において、又は組織 - 特異的又は組織に好ましい調節要素の制御下で、マウスZcytor16遺伝子を過剰発現するよう構築され得る。マウスZcytor16のそれらの過剰生成体は、過剰発現に起因する表現型を特徴づけるために使用され得、そしてトランスジェニック動物は過剰マウスZcytor16により引き起こされるヒト疾病のためのモデルとして作用することができる。

【0344】

マウスZcytor16を過剰発現するトランスジェニックマウスはまた、大きな動物の乳汁又は血液におけるマウスZcytor16、例えば可溶性マウスZcytor16の生成のためのモデル生物反応体を提供する。トランスジェニックマウスを生成するための方法は、当業者に良く知られている（例えば、Jacob, "Expression and Knockout of interferons in Transgenic Mice," in Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice, Jacob (ed.), Pages 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky and Robl (eds.), Strategies in Transgenic Animal Science (ASM Press 1995), and Abbud and Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice," in Gen Expression Systems: using Nature for the Art of Expression, Fernandez and Hoeffler (eds.), pages 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)を参照のこと）。

【0345】

例えば、マウスZcytor16遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを生成するための方法は、成熟した受精能雄（種マウス）（B6C3f1, 生後2 - 8ヶ月（Tacomix Farms, Germantown, NY））、精管切除された雄（duds）（B6D2f1, 2 - 8ヶ月（Taconic Farms））、思春期直前受胎能雌（ドナー）（B6C3f1, 4-5週（Taconic Farms））、及び成熟した受胎能雌（受容体）（B6D2f1, 2 - 4ヶ月（taconic farms））により開始することができる。ドナーは、1週間、気候順応化され、そして次に、約8 IU/マウスのPregnant Mare's Serum Gonadotropin（Sigma Chemical Company, St. Louis, MO）I.P.により、及び46 - 47時間後、8 IU/マウスのヒトChorionic Gonadotropin（hCG（Sigma））L.P.により注射され、過剰排卵を誘発された。ドナーが、ホルモン注射に続いて、種マウスにより交配される。排卵は一般的に、hCG注射の13時間以内に生じる。交配は、交配の次の朝、膣栓の存在により確認される。

【0346】

受精された卵を手術用スコープ下で集める。卵管を集め、そして卵を、ヒアルロニダーゼ（Sigma）を含む尿検査用スライド中に開放する。卵を、1度、アヒルロニダーゼにより洗浄し、そして2度、Whitten's W640媒体（Menino and O'cloray, Biol. Reprod. 77: 159 (1986), 及びDienhart and Downs, Zygote 4: 129 (1996)により記載される）により洗浄し、これを5% CO<sub>2</sub>、5% O<sub>2</sub>及び90% N<sub>2</sub>と共に37℃でインキュベートする。次に、卵を、マイクロインジェクションまで、37℃/5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターに貯蔵する。マウスZcytor16コード配列を含むプラスミドDNA10 - 12 µgを、線状化し、ゲル精製し、そしてマイクロインジェクションのために5 - 10 ng/µlの最終濃度で、10 mMのトリス - HCl (pH7.4), 0.25 mMのEDTA (pH8.0)の溶液に再懸濁する。例えば、マウスZcytor16コード配列は、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸残基をコードすることができる。

【0347】

プラスミドDNAを、暖かな、CO<sub>2</sub>平衡化された鉱油により被覆された1度のW640媒体に含まれる、収穫された卵中にマイクロインジェクトする。DNAを注射用針中に吸い込み（0.75 mmのID, 1 mmのOD硼珪酸塩ガラス細管から引き抜かれる）、そして個々の卵中に注入する。注射用針により、個々の卵の、ハプロイド前核の1つ又は両者中に貫通する。数ピコリットルのDNAを前核中に注入し、そして注射用針を、核と接触しないよう引き抜く。前記方法を、すべての卵が注入されるまで、反復する。都合良くマイクロインジェクトされた卵を、前もってガス抜きされたW640媒体を有する器官組織 - 培養皿中に移し、37℃/5% CO<sub>2</sub>のインキュベーターにおいて一晩、貯蔵する。

10

20

30

40

50

## 【0348】

次の日、2細胞の胚を、偽妊娠受容体中に移す。受容体は、精管切除されたdudsとの交配の後、膣栓の存在により同定される。受容体に麻酔をし、そして背面左側上の毛を剃り、そして手術用顕微鏡に移す。切開を、皮膚において、及び胸郭、背部及び後脚により概略される腹部の中央、すなわち膝と脾臓との間の中途まで筋肉壁を通して行う。生殖器官を、小さな手術用ドレープ上に切除する。脂肪パッドを、手術用ドレープ上に広げ、そして子供用止血小鉗子 (Roboz, Rockville, MD) を、脂肪パッドに取り付け、そしてマウスの背部上をつるし、器官が腹部にスライドすることを防ぐ。

## 【0349】

鉱油、続いて交互にW640及び空気気泡を含む精巧なトランスファーピペットにより、前日の注入からの12~17個の健康な2細胞胚を、受容体中に移す。膨張した膨大部を位置決定し、そしてその膨大部と包との間の卵管を保持し、卵管の刻み目を前記包に隣接して、28gの針により行い、膨大部又は包を裂かないことを確かめる。

ピペットを、卵管における刻み目に移し、そして胚を吹き込み、最初の空気気泡のピペットからの除去を可能にする。脂肪パッドを軽く、腹膜中に押し込み、そして生殖器官を滑り込ませる。腹膜壁を、1つの縫合により閉じ、そして皮膚を傷口用クリップにより閉じる。マウスは、少なくとも4時間、37℃の暖かなスライド上で回復した。

## 【0350】

受容体を、対でカゴに戻し、そして19-21日の妊娠を可能にする。誕生後、19-21日の産後を、離乳の前に可能にする。離乳子供の性別を鑑別し、そして別々の性別のカゴに入れ、そして0.5cmの生検 (遺伝子型識別のために使用される) を、尾から、無菌のハサミにより取る。

## 【0351】

ゲノムDNAを、QIAGEN DNEASYキットを用いて、その製造業者の説明書に従って、切り取られた尾から調製する。ゲノムDNAを、同じプラスミドに導入されたマウスZcytor16遺伝子又は選択マーカー遺伝子を増幅するために企画されたプライマーを用いて、PCRにより分析する。動物がトランスジェニックであることが確かめられた後、それらは、トランスジェニック雌を野生型雄と共に、又はトランスジェニック雄を1又は複数の野生型雌と共に配置することによって、近交系に戻し交雑する。子供が生まれ、そして離乳され、性別を分け、そしてそれらの尾を、遺伝子型識別のために切り取る。

## 【0352】

生存動物におけるトランスジェニックの発現について調べるために、部分肝切除を行う。手術準備を、zyphoid工程下で直接的に上部腹部に行う。無菌技法を用いて、小さな1.5-2cmの切開を、胸骨下で行い、そして肝臓の左側葉を取り出す。4-0絹糸を用いて、下部葉を体腔外に確保するために、その下部葉の回りを縛る。クランプを用いて、その結び目を保持し、そして吸収性Dexon (American Cyanamid; Wayne, N. J.) の第2ループを、最初の結び目に隣接して配置する。遠位切断をDexon結び目から行い、そして約100mgの切除された肝臓組織を、無菌ペトリ皿に配置する。

## 【0353】

切除された肝臓切片を、14mlのポリプロピレン丸底管に移し、そして液体窒素において凍結し、そして次に、ドライアイス上に貯蔵する。手術部位を、縫合及び傷口用クリップにより閉じ、そして動物のカゴを、37℃で加熱されるパッド上に、手術の後、24時間、配置する。動物を手術の後、毎日調べ、そして傷口用クリップを、手術の7-10日後に取り除く。マウスZcytor16 mRNAの発現レベルを、RNA溶液ハイブリダイゼーションアッセイ又はポリメラーゼ鎖反応を用いて、個々のトランスジェニックマウスについて試験する。

## 【0354】

マウスZcytor16を過剰発現するトランスジェニックマウスを生成する他に、その遺伝子を異常に低く発現するか、又はまったく発現しないトランスジェニックマウスを構築することは有用である。そのようなトランスジェニックマウスは、マウスZcytor16の欠失に関連する疾病のための有用なモデルを提供する。上記で論じられたように、マウスZcytor16遺

10

20

30

40

50

伝子発現は、アンチセンス遺伝子、リボザイム遺伝子、又は外部案内配列遺伝子を用いて阻害され得る。マウスZcytor16遺伝子を過少発現するトランスジェニックマウスを生成するためには、そのような阻害配列がマウスZcytor16 mRNAに標的化される。特定の遺伝子の異常に低い発現をトランスジェニックマウスを生成するための方法は、当業者に知られている（例えば、Wuなど., “Gene Under Expression in Cultured Cells and Animals by Antisense DNA and DNA Strategies” in *Methods in Gene Biotechnology*, p. 205-224 (CRC Press 1997) を参照のこと）。

#### 【0355】

マウスZcytor16遺伝子発現をほとんどか又はまったく有さないトランスジェニックマウスを生成するための他のアプローチは、非官能性マウスZcytor16遺伝子により置換された、少なくとも1つの正常マウスZcytor16対立遺伝子を有するマウスを生成することである。非官能性マウスZcytor16遺伝子を企画する1つの方法は、もう1つの遺伝子、例えば選択マーカー遺伝子を、マウスZcytor16をコードする核酸分子内に挿入することである。いわゆるそれらの“ノックアウトマウス”を生成するための標準の方法は、当業者に知られている（例えば、Jacob, “Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice,” in *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), Pages 111-124 (Academic Press, Ltd, 1994), 及びWuなど., “New Strategies for Gene Knockout,” in *Methods in Gene Biotechnology*, Pages 339-365 (CRC Press 1997) を参照のこと）。

#### 【0356】

13. Zcytor16活性を有するポリペプチドの治療使用：

マウスZcytor16活性を有するアミノ酸配列は、Zcytor16リガンドを結合し、そして従って、内因性Zcytor16受容体とZcytor16リガンドとの結合を妨げることによって、免疫系を調節するために使用され得る。Zcytor16アンタゴニスト、例えば抗 - マウスZcyotr16抗体はまた、内因性Zcytor16受容体とのZcytor16リガンドの結合を阻害することによって、免疫系を調節するためにも使用され得る。従って、本発明は、適切な量のこのポリペプチドを欠いているか、又は過剰のZcytor16リガンドを生成する対象への、マウスZcytor16活性を有するタンパク質、ポリペプチド、及びペプチド（例えば、マウスZcytor16ポリペプチド、マウスZcytor16類似体（例えば、抗 - マウスZcytor16抗 - イディオタイプ抗体）、及びマウスZcytor16融合タンパク質）の使用を包含する。

#### 【0357】

マウスZcytor16アンタゴニスト（例えば、抗 - マウスZcytor16抗体）はまた、過剰のZcytor16リガンド又はZcytor16受容体のいずれかを生成する対象を処理するためにも使用され得る。適切な対象は、哺乳類、例えばヒトを包含する。さらに、本明細書に記載されるヒトZcytor16及びIL - TIF活性は、動物モデル、例えばヒト炎症、炎症疾患、免疫機能及び疾病並びに癌の研究、又はIL - TIF、化学治療剤、抗 - IL - TIF抗体、抗 - Zcytor16抗体、又は本明細書におけるZcytor16可溶性受容体の治療観点の評価について上記に記載されるマウスモデルにおけるマウスZcytor16の使用の有効性を強調する。

#### 【0358】

さらに、本発明者は、ヒトZcytor16受容体がT - 細胞誘発因子（IL - TIF）（配列番号15）（Dumoutier, L. など., *Proc. Nat' l. Acad. Sci.* 97: 10144-10149, 2000）を結合することを示しており；マウスIL - TIF配列（配列番号41）が、Dumontierなど., *J. Immunol.* 164: 1814-1819, 2000に示されている。さらに、共有所有のzcytor11（通常アメリカ特許第5,965,704号）及びCRF2-4受容体はまた、IL-TIFを結合する（WIPO公開W000/24758号；Dumontiernado., *J. Immunol.* 164: 1819, 2000；Spencer, SDなど., *J. Exp. Med.* 187: 571-578, 1998；Gibbs, Vc and Pennica *Gene* 186: 97-101, 1997 (CRF2-4 cDNA)；Xie, MHなど., *J. Biol. Chem.* 275: 31335-31339, 2000；及びKotenko, SVなど., *J. Biol. Chem. manuscript in press moo7837200*を参照のこと）。

#### 【0359】

さらに、IL - 10 受容体はIL - TIFのための受容体として包含され得、そしてCRF2-4と同

10

20

30

40

50

意語であると思われる (Dumoutier, L. など., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000; LiuY. など., J. Immunol. 152: 1821-1829, 1994 (IL-10R cDNA))。好ましい態様においては、可溶性受容体形のマウスZcytor16、すなわち配列番号38又は配列番号48の残基24~230は、インビボでのIL-TIFの効果を拮抗する、モノマーホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーである。そのようなマウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーに対する抗体及び結合ポリペプチドはまた、Zcytor16活性のアンタゴニストとしても作用する。

#### 【0360】

IL-TIFはIL-9の存在下で誘発されることが示されており、そしてTh1-型免疫応答、及び炎症の促進に関与すると思われる。IL-9は、種々の手段で、免疫機能の増殖、活性化、分化及び/又は誘発を刺激し、そしてぜん息、肺肥満細胞症及び他の疾病に関与する。IL-TIF又はIL-9機能のアンタゴニストは、そのようなヒト疾患に対して有効に使用され得る。本発明は、IL-TIFのそのような新規アンタゴニストを提供する。

10

#### 【0361】

IL-TIFは、急性相反応体、例えば血清アミロイドA (SAA)、IL-1-アンチキモトリプシン及びハプトグロビンの生成のアップ-レギュレーションに包含され、そしてIL-TIF発現は、IL-TIFが炎症応答に関与する示唆する、インビボでのリポ多糖 (LPS) の注入に基づいて高められ得ることが示されている (Dumoutier, L. など., Proc. Nat'l Acad. Sci. 97: 10144-10149, 2000)。急性相タンパク質、例えばSAAの生成は、炎症が有益である短期生存機構であると思われるが、しかしながら、長い期間、急性相タンパク質の維持が、慢性炎症に寄与し、そしてヒト健康に対して有害であり得る。再考のためには、Uhlir, C M and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265: 501-523, 1999, 及びBaumann H, and Gauldie, J. Immunology Today 15: 74-80, 1994を参照のこと。

20

#### 【0362】

さらに、急性相タンパク質SAAは、いくつかの慢性炎症患者の病因に関係し、アテローム硬化症及びリウマチ様関節炎に関与し、そしてアミロイド症において沈着するアミロイドAタンパク質への前駆体である (Uhlir, CM and Whitehead, 前記)。従ってIL-TIFが、前炎症性分子として作用し、そしてSAAの生成を誘発する場合、アンタゴニストが、炎症性疾患、及びIL-TIFにより誘発される急性相応答タンパク質に関連する他の疾病の処理において有用であろう。そのようなアンタゴニストが、本発明により提供される。例えば、IL-TIF-誘発された又はIL-9誘発された炎症を減じるための方法は、炎症を低めるのに十分な量の、可溶性マウスZcytor16-含有受容体の組成物を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る。

30

#### 【0363】

さらに、炎症を有する哺乳類における炎症応答を抑制するための方法は、(1) 血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定し；(2) 許容できる医薬ピークル中、本明細書に記載されるような可溶性マウスZcytor16サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；(3) 血清アミロイドAタンパク質の後投与レベルを決定し；(4) 段階(3)における血清アミロイドAタンパク質のレベルに、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較することを含んで成り、ここで血清アミロイドAタンパク質の上昇又は下降の欠失が炎症応答の抑制の表示である。

40

#### 【0364】

本発明の受容体は、少なくとも1つのマウスZcytor16受容体サブユニットを含む。ヘテロダイマー可溶性受容体に包含される第2受容体ポリペプチドは、インターフェロン-10受容体、インターフェロン (例えば、インターフェロン- $\gamma$ 、及び鎖、及びインターフェロン- $\gamma$  / 受容体 及び鎖)、zcytor7、zcytor11及びCRF2-4を含む受容体サブファミリーに属する。ヘテロダイマー可溶性受容体に包含される第2可溶性受容体ポリペプチドはまた、共有所有のアメリカ特許第5,965,704号に開示されるZcytor11可溶性受容体サブユニット；IL-10Rサブユニット、例えばIL-10R；又は共有所有のアメリカ特許第5,945,511号に開示されるzcytor7可溶性受容体サブユニットを含むことができる。CRF2-

50

4及びIL - 10受容体と共にzcytor11受容体は、IL - TIFにตอบสนองしてJAK - STAT経路をシグナル化することが示された（Xieなど., 前記；Kotenkoなど., 前記）。

【0365】

本発明によれば、モノマー又はホモダイマーマウスZcytor16受容体ポリペプチドの他に、可溶性マウスZcytor16受容体 + 可溶性CRF2-4受容体ヘテロダイマー（マウスZcytor16/CRF2-4）を含んで成る態様により例示されるように、ヘテロダイマー可溶性マウスZcytor16受容体は、IL - TIFのアンタゴニストとして作用することができる。他の態様は、マウスZcytor16/IL - 10R、マウスZcytor16/IL - 9R、マウスZcytor16/zcytor11、マウスZcytor16/zcytor7、及び他のクラスII受容体サブユニットを含んで成るヘテロダイマー、及びマウスZcytor16/CRF2-4/zcytor11又はマウスZcytor16/CRF2-4/IL - 10R（但し、それらだけに 10

【0366】

mRNA対応のマウスZcytor16 cDNAの組織分布の分析は、ヒトZcytor16組織分布に類似し（アメリカ特許出願09/728,911号）、そしてmRNAが胎盤及び脾臓において発現され、そしてZcytor16が、結合するリガンド（IL - TIF）が急性相応答の誘発を包含する疾患応答の誘発に 20  
関与することを示した（Dumoutier, L. など., Proc. Nat'l Acad. Sci: 97:10144-10149, 2000）。従って、本発明の特定の態様は、炎症及びヒト疾病又は病状、例えば膵炎、I型糖尿病（IDDM）、膵臓癌、Graves病、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、結腸及び小腸癌、憩室症、自己免疫疾患、敗血症、器官又は骨髄移植；外傷、手術又は感染による炎症；アミロイドーシス；巨脾腫；対宿主性移植片病において；及び炎症の阻害、免疫抑制、造血、免疫、炎症又はリンパ細胞、マクロファージ、T - 細胞（Th1及びTh2細胞を包含する）の増殖の低下、病原体又は抗原に対する免疫応答の抑制、又はIL - TIF又はIL-9サイトカイン生成の阻害が所望される場合、アンタゴニストとしての可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマーの使用に向けられる。

【0367】

さらに、本明細書に記載されるマウスZcytor16ポリペプチド、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー及び/又はマウスZcytor16ポリペプチド、モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー自体を結合する抗体又は結合ポリペプチドは、次のことを実施するために有用である：

【0368】

1）急性炎症、外傷、組織損傷、手術、敗血症又は感染の結果としての炎症、及び慢性炎症疾患、例えばぜん息、炎症性腸疾患（IBD）、慢性大腸炎、巨脾腫、リウマチ様関節炎、再発性急性炎症性エピソード（例えば、結核）、及びアミロイドーシス及びアラローム硬化症、Castleman病、ぜん息、及び急性相応答の誘発に関連する他の疾病の処理においてIL - TIF受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻止するために； 30

【0369】

2）マウスZcytor16を通して免疫細胞（例えば、リンパ球、単球、白血球）におけるシグナル化を妨げるか又は阻害するために、自己免疫疾患、例えばIDDM、多発性硬化症（MS）、全身性エリテマトーデス（SLE）、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの処理においてIL - TIF受容体を通してのシグナル化を拮抗するか又は阻害するために（Hughes Cなど., J. Immunol. 153: 3319-3325, 1994）；他方では、抗体、例えばマウスZcytor16含有受容体に対するモノクローナル抗体（MAb）はまた、自己免疫疾患を処理するために所望しない免疫細胞を消耗するためのアンタゴニストとしても使用され得る。ぜん息、アレルギー及び他のアトピー性疾患は、免疫応答を阻害するか又は攻撃性細胞を消耗するために、例えば可溶性マウスZcytor16受容体又はマウスZcytor16/CRF2 - 4ヘテロダイマーに対するMAbにより処理され得る。 40

【0370】

本発明のポリペプチド及び抗体を用いて、Zcytor16を通してシグナル化を阻止し、又は阻害することはまた、膵臓、肝臓及びニューロン細胞の疾病を治療することができる。IDDM、NIDDM、膵炎及び膵癌のためにも有益であり得る。マウスZcytor16は、拮抗性MAbが癌増 50

殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、癌のMAb治療のための標的物として作用することができる (Holliger P. and Hoogenboom, H: Nature Biotech. 16: 1015-1016, 1998)。可溶性マウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーに対するMAbはまた、腎症、糸球体硬化症、膜ニューロパシー、アミロイドーシス (他の組織の中で腎臓に影響を及ぼす)、腎動脈硬化症、種々の起原の糸球体腎炎、腎臓の線維増殖疾患、及びSLE、IDDM、II型糖尿病 (NIDDM)、腎腫瘍及び他の疾病に関連する腎機能不全を処理するためにも有用であり；

#### 【0371】

3) 自己免疫疾患、例えばIDDM、MS、SLE、重症筋無力症、リウマチ様関節炎及びIBDの処理においてIL-TIF受容体を通してのシグナル化を作用するか又は開始するために；抗 - 可溶性マウスZcytor16、抗 - 可溶性マウスZcytor16/CRF2-4ヘテロダイマー及びマルチマーモノクローナル抗体は、分化するリンパ球又は他の免疫細胞をシグナル化し、増殖を変更し、又は自己免疫性を改良する、サイトカイン又は細胞表面タンパク質の生成を変えることができる。特に、サイトカイン分泌の他のパターンに対するT-ヘルパー細胞応答の調節が、疾病を改善するために自己免疫応答を偏向することができる (Smith SAなど., J. Immunol. 160: 4841-4849, 1998)。同様にアゴニスト性抗 - マウスZcytor16、抗 - 可溶性マウスZcytor16/CRF2-4ヘテロダイマー及びマルチマーモノクローナル抗体は、ぜん息、アレルギー及びアトピー性疾患に関与する免疫細胞を表示し、消耗し、そして偏向するために使用され得る。

10

#### 【0372】

マウスZcytor16によるシグナル化はまた、膵臓、腎臓、下垂体及びニューロン細胞の疾病に有益であり得る。IDDM、NIDDM、膵癌のために有益であり得る。マウスZcytor16は、シグナル化MAbが癌増殖を阻害し、そして免疫介在性殺害を標的化する、膵臓のMAb治療のための標的物として作用することができる (Tutt, ALなど., J. Immunol. 161: 3175-3185, 1998)。同様に、腎細胞癌は、本発明のマウスZcytor16含有の可溶性受容体に対するモノクローナル抗体により処理され得る。

20

#### 【0373】

本明細書に記載される可溶性マウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマーポリペプチドは、上記に記載されるような自己免疫疾患、アトピー性疾患、NIDDM、膵炎及び腎機能不全の処理においてIL-TIF活性を中和するか、又は阻止するために使用され得る。可溶性形のマウスZcytor16は、T細胞により介在される抗体応答を促進するために、及び/又はリンパ球又は他の免疫細胞によるIL-4又は他のサイトカインの生成を促進するために使用され得る。

30

#### 【0374】

本発明の可溶性マウスZcytor16含有受容体は、IL-TIFサイトカインのアンタゴニストとして有用である。そのようなアンタゴニスト効果は、IL-TIFの直接的な中和又は結合により達成され得る。アンタゴニスト使用の他に、本発明の可溶性受容体は、IL-TIFを結合し、そしてそのリガンドを身体内の異なった組織、器官及び細胞に輸送するために、そのIL-TIFサイトカインのためのキャリアータンパク質として作用することができる。本発明の可溶性受容体は、特定の部位、例えば組織、特定の免疫細胞、単球又は腫瘍に可溶性受容体 - リガンド複合体を方向づける、分子、ポリペプチド又は化学的成分に融合されるか又はカップリングされ得る。例えば、急性感染又はいくつかの癌においては、有益性は、IL-TIFの作用による炎症及び局部急性相応答タンパク質の誘発に起因することができる。従って、本発明の可溶性受容体は、IL-TIFの作用を特異的に方向づけるために使用され得る。Cosman, D. Cytokine 5: 95-106, 1993; 及びFernandez - Botran, R. Exp. Opin. Invest. Drugs 9: 497-513, 2000を参照のこと。

40

#### 【0375】

さらに、本発明の可溶性受容体は、分解又はクリアランスからリガンドを安定化するか、又は身体内の作用の部位にリガンドを標的化することによって、リガンドの生物利用性及び/又は治療効力を高めるために、IL-TIFの安定化のために使用され得る。例えば、天然

50

に存在する IL - 6/可溶性 IL - 6R複合体は、IL - 6を安定化し、そしてgp130受容体を通してシグナル化することができる。Cosman, D. 前記及びFernandez - Botran, R, 前記を参照のこと。さらに、マウスZcytor16は、リガンド/可溶性受容体複合体を含むよう、同種リガンド、例えばそのIL-TIFと共に組合され得る。そのような複合体は、コンパニオン受容体サブユニット、例えばzcytor11又はCRF2-4を提供する細胞からの応答を刺激するために使用され得る。

#### 【0376】

マウスZcytor16/リガンド複合体の細胞特異性は、単独で投与されるリガンドについて見られるその特異性とは異なる。さらに、前記複合体は、異なった薬力学的性質、例えば影響を及ぼす半減期、用量/応答性及び器官又は組織特異性を有する。従って、マウスZcytor16/IL-TIF複合体は、免疫応答を増強し、又は系球体間質細胞又は肝細胞を刺激するためにアゴニスト活性を有することができる。他方では、IL6/IL6R複合体に対する応答に類似する複合体とヘテロダイマー化するシグナル化サブユニットを発現する組織のみが、影響され得る (Hirota H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 4862-4866, 1995; Hirano, T. in Thamsan, A. (ED.) "The Cytokine Handbook", 3<sup>rd</sup> ED., p. 248-209)。IL12及びCNTFのための可溶性受容体/サイトカイン複合体は、類似する活性を示す。

#### 【0377】

マウスZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチドはまた、IL-TIFリガンドの循環レベルの検出のために、及び急性相炎症応答に関連するIL-TIFの検出において、診断システム内で使用され得る。関連する態様においては、本発明のマウスZcytor16可溶性受容体に特異的に結合する抗体又は他の剤は、循環性受容体ポリペプチドを検出するために使用され得；逆に言えば、マウスZcytor16可溶性受容体自体が、循環性又は局部的に作用するIL-TIFポリペプチドを検出するために使用され得る。リガンド又は受容体ポリペプチドの高められた又は低められたレベルが、炎症又は癌を包含する病理学的状態の表示であり得る。IL-TIFは、関連する急性相炎症応答を誘発することが知られている。さらに、急性相タンパク質又は分子、例えばIL-TIFの検出は、一定の疾病状態（例えば、リウマチ様、関節炎）における慢性炎症状態の表示であり得る。そのような状態の検出は、疾病診断を助け、そして正しい治療の医者による選択を助けるよう作用する。

#### 【0378】

さらに、本発明の可溶性マウスZcytor16受容体ポリペプチドは、リガンドの存在が所望されない治療又は他の用途において、インビボ又はインビトロでリガンドを結合するために、“リガンドシンク (ligand sink)”、すなわちアンタゴニストとして使用され得る。例えば、多量の生物活性IL-TIFを発現する慢性炎症状態又は癌においては、可溶性マウスZcytor16受容体又は可溶性マウスZcytor16ヘテロダイマー及びマルチマー受容体ポリペプチド、例えば可溶性マウスZcytor16/CRF-2-4は、インビボで、リガンドの直接的なアンタゴニストとして使用され得、そして疾病に関連する進行及び病状の低下を助けることができ、そして進行及び徴候を低め、そして再発を妨げることに於いて治療の効果を増強するために、他の治療剤（例えば、ステロイド又は化学治療剤）と共に使用され得る。さらに、可溶性マウスZcytor16受容体ポリペプチドは、それらの癌の増殖を増強するリガンドをインビボで結合することによって、マウスZcytor16受容体を過剰発現する癌の進行を遅延するために使用され得る。

#### 【0379】

さらに、可溶性マウスZcytor16受容体ポリペプチドは、IL-TIF - 発現性炎症又は癌をインビボで検出するための診断用途において、又は組織サンプルにおいて使用され得る。例えば、本発明の可溶性マウスZcytor16受容体は、本明細書に記載されるような放射性ラベル又は蛍光ラベルに接合され得、そしてインビトロリガンド - 受容体型結合アッセイ又は蛍光イメージングアッセイを用いて、組織サンプルにおけるリガンドの存在を検出するために使用され得る。さらに、本発明の放射性ラベルされたマウスZcytor16受容体は、当業界において知られている放射性 - イメージングを通して、リガンド発現性固形腫瘍を検出するために、インビボで投与され得る。

10

20

30

40

50

## 【0380】

一般的に、投与されるマウスZcytor16（又はマウスZcytor16類似体又は融合タンパク質）の用量は、患者の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状态及びこれまでの医学的歴史のような要因に依存して変化するであろう。典型的には、約1 pg/kg～10mg/kg（剤の量/患者の体重）の範囲でのマウスZcytor16の用量（但し、それよりも低いか又は高い用量もまた、環境が指図する場合、投与され得る）を、受容体に供給することが所望される。

## 【0381】

マウスZcytor16ポリペプイドの対象への投与は、局部カテーテルを通しての灌流によるか又は直接的な病変内注入による、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、鞘内投与であり得る。注射により治療用タンパク質を投与する場合、投与は連続的注入によるか、又は一回又は複数回のボラスによることができる。

10

## 【0382】

投与の追加経路は、経口、粘膜、肺及び経皮を包含する。経口供給は、ポリエステル微小球、ゼイン微小球、プロテイノイド微小球、ポリシアノアクリレート微小球及び脂質基剤システムのために適切である（例えば、DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Protein", in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), p.255-288 (Plenum Press 1977) を参照のこと）。鼻腔内供給の実行可能性は、インスリン投与のそのような態様により例示される（例えば、Hinchcliffe and Illum, Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 199 (1997) を参照のこと）。

## 【0383】

マウスZcytor16を含んで成る乾燥又は液体粒子は、乾燥 - 粉末分散機、液体エーロゾル発生器又はネブライザーの助けにより調製され、そして吸入され得る（例えば、Pettit and Gombotz, TIBTECH 16: 343 (1998); Patton など., Adv. Drug Deliv. Rev. 35: 235 (1999) を参照のこと）。このアプローチは、エーロゾル化されたインスリンを肺に供給する電動吸入器であるAERX糖尿病治療システムにより例示される。研究によれば、48,000kDaほどの大きなタンパク質が、経皮投与の実行可能性を例示する、低周波超音波の助けにより治療濃度で皮膚を通して供給されることが示された（Mitragotriなど., Science 269: 850 (1995)）。エレクトロポレーションを用いての経皮供給は、マウスZcytor16活性を有する分子を投与するもう1つの手段を提供する（Pottsなど., Pharm. Biotechnol. 10: 213 (1997)）。

20

30

## 【0384】

マウスZcytor16結合活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はヘプチドを含んで成る医薬組成物は、医薬的に有用な組成物を調製する既知の方法に従って配合され得、それによれば、治療用タンパク質が医薬的に許容できるキャリアーと共に混合される。組成物は、その投与が受容体患者により許容され得る場合、“医薬的に許容できるキャリアー”であると言われる。無菌リン酸緩衝溶液は、医薬的に許容できるキャリアーの1つの例である。他の適切なキャリアーは、当業者に良く知られている。例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19<sup>th</sup> Edition (Mack Publishing Company 1995) を参照のこと。

## 【0385】

治療のためには、マウスZcytor16活性を有する分子及び医薬的に許容できるキャリアーが、治療的に有効な量で患者に投与される。マウスZcytor16活性を有するタンパク質、ポリペプチド又はペプチド、及び医薬的に許容できるキャリアーの組み合わせは、その投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的に有効な量”で投与されると言われる。剤は、その存在が受容体患者の生理学において検出される変化をもたらす場合、生理学的に有意である。例えば、炎症を処理するために使用される剤は、その存在が炎症応答を緩和する場合、生理学的に有意である。

40

## 【0386】

マウスZcytor16（又はマウスZcytor16類似体又は融合タンパク質）を含んで成る医薬組成物は、液体形、エーロゾル、又は固体形で維持され得る。液体形は、注射用溶液及び経口

50



懸濁液により例示される。典型的な固体形は、カプセル、錠剤及び調節された開放形を含む。後者の形は、ミニ浸透ポンプ及び移植体により例示される (Bremer など., *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade. "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer など., "Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), Pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey など., "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), Pages 93-117 (Plenum Press 1997))。

#### 【0387】

リポソームは、治療用ポリペプチドを、患者に、静脈内、腹膜内、鞘内、筋肉内、皮下、又は経口、吸入又は鼻腔内供給するための1つの手段を提供する。リポソームは、水性区画を取り組む1又は複数の脂質二層から成る微小ビークルである (一般的には、Bakker Woudenberg など., *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1): S61 (1993), Kim *Drugs* 46:618 (1993), and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)を参照のこと)。

#### 【0388】

リポソームは、組成において細胞膜に類似し、そして結果として、リポソームは安全に投与され、そして生分解性である。調製方法に依存して、リポソームは、単層又は多層性であり得、そしてリポソームは $0.02\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ 以上の範囲の直径でサイズ的に変化することができる。種々の剤がリポソームに封入され得る：疎水性剤は二層に分割され、そして親水性剤は内部水性空間内に封入される (例えば、Macky など., *Liposomes In Cell Biology and Pharmacology* (John Libbey 1987), 及びOstroなど., *American J. Hosp. Pharm.* 46: 1576 (1989)を参照のこと)。さらに、リポソームサイズ、二層の数、脂質組成、及びリポソームの電荷及び表面性質を変えることにより、封入される剤の治療利用性を調節することが可能である。

#### 【0389】

リポソームは、実質的にいずれかのタイプの細胞に吸着することができ、そして次に、封入された剤をゆっくりと開放する。他方では、吸収されたリポソームは、食細胞性である細胞によりエンドサイト-シス化され得る。エンドサイト-シスに続いて、リポソーム脂質のリソソーム内分解が伴ない、そして封入された剤が開放される (Scherphof など., *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446: 368 (1985))。静脈内投与の後、小さなリポソーム ( $0.1\sim 1.0\mu\text{m}$ ) は、典型的には、肝臓及び脾臓に主として位置する網内細胞系の細胞により摂取されるが、ところが $3.0\mu\text{m}$ よりも大きなリポソームは肺に沈着される。網内細胞系の細胞による小さなリポソームのこの好ましい摂取は、マクロファージ及び肝臓の腫瘍に化学治療剤を供給するために使用されて来た。

#### 【0390】

網内細胞系は、いくつかの方法、例えば多量のリポソーム粒子による飽和、又は薬理学的手段による選択的マクロファージ不活性化により回避され得る (Claassenなど., *Biochim. Biophys. Acta* 802: 428 (1984))。さらに、リポソーム膜中への糖脂質 - 又はポリエチレングリコール - 誘導されたリン脂質の組み込みは、網内細胞系による有意に低められた摂取をもたらすことが示されている (Allen など., *Biochim. Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen など., *Biochim. Biophys. Acta* 1150: 9 (1993))。

#### 【0391】

リポソームはまた、リン脂質組成を変えることによって、又はリポソーム中に受容体又はリガンドを挿入することによって、特定の細胞又は器官を標的化するためにも調製され得る。例えば、高い含有率の非イオン性界面活性剤により調製されたリポソームが、肝臓を標的化するために使用されて来た (Hayakawaなど., 日本特許04-244,018号; Katoなど., *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993))。それらの配合物は、メタノールにおいて、大豆ホ

10

20

30

40

50

スファチジルコリン、 $\alpha$ -トコフェロール及びエトキシ化され、水素付加されたヒマシ油 (HCO-60) を混合し、前記混合物を真空下で濃縮し、そして次に、前記混合物を水により再構成することによって調製された。大豆由来のステリルグルコシド混合物 (SG) 及びコレステロール (Ch) と共にジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC) のリポソーム配列物はまた、肝臓を標的化することが示されている (Shimizuなど., Biol. Pharm. Bull. 20:881 (1997))。

#### 【0392】

他方では、種々の標的化リガンドが、リポソーム、例えば抗体、抗体フラグメント、炭水化物、ビタミン及び輸送タンパク質の表面に結合され得る。例えば、リポソームは、肝臓細胞の表面上で独占的に発現されるアシアログリコプロテイン (ガラクトース) 受容体標的化するために、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体により変性され得る (Kato and Sugiyama, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst. 14: 287 (1997); Murahashiなど., Biol. Pharm. Bull. 20:259 (1997))。同様に、Wuなど., Hepatology 27: 772 (1988) は、アジアロフェチュインによるリポソームのラベリングが短くされたりポソーム結晶半減期を導き、そしてアジアロフェチュイン-ラベルされたりポソームの肝細胞による摂取を非常に高めたことを示している。

#### 【0393】

他方では、枝分かれ型のガラクトシル脂質誘導体を含んで成るリポソームの肝臓蓄積が、アジアロフェチュインの前注入により阻害され得る (Murahashiなど., Biol. Pharm. Bull. 20: 259 (1997))。ポリアコニチル化されたヒト血清アルブミンリポソームは、肝臓細胞へのリポソームの標的化のためのもう1つのアプローチを提供する (Kamps など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 11681 (1997))。さらに、Gehoなど., (アメリカ特許第4,603,044号) は、肝臓の特殊化された代謝細胞に関連する肝胆管受容体に対する特異性を有する、肝細胞-指図されたりポソーム小胞供給システムを記載する。

#### 【0394】

組織標的化へのより一般的なアプローチにおいては、標的細胞は、標的細胞により発現されるリガンドに対して特異的な、ビオチニル化された抗体によりプレラベルされる (Harasymなど., Adv. Drug Deliv. Rev. 32: 99 (1998))。遊離抗体の血漿排除の後、ストレプトアビジン-接合されたりポソームが投与される。もう1つのアプローチにおいては、標的化抗体は、リポソームに直接的に結合される (Harasymなど., Adv. Drug. Deliv. Rev. 32: 99 (1998))。

#### 【0395】

マウスZcytor16活性を有するポリペプチドは、タンパク質のマイクロカプセル封入の標準技法を用いて、リポソーム内に封入され得る (例えばAndersonなど., Infect. Immun. 31: 1099 (1981), Andersonなど., Cancer Res. 50: 1853 (1990), and Cobenなど., Biochim. Biophys. Acta 1063:95 (1991), Alving など., "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in Liposome Technology, 2<sup>nd</sup> Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassef など., Meth. Enzymol. 149: 124 (1987)を参照のこと)。上記に示されるように、治療的に有用なリポソームは、種々の成分を含むことができる。例えば、リポソームは、ポリ(エチレングリコール)の脂質誘導体を含むことができる (Allenなど., Biochim. Biophys. Acta 1150: 9 (1993))。

#### 【0396】

分解性ポリマー微小球が、治療用タンパク質の高い全身レベルを維持するため企画された。微小球は、分解性ポリマー、例えばポリ(ラクチド-コ-グリコリド) (PLG)、ポリ無水物、ポリ(オルトエステル)、モノ生分解性エチルビニルアセテートポリマー (タンパク質がポリマー封入される) から調製される Gombotz and Pettit, Bioconjugate Chem. 6:332 (1995); Ranade, "Role of Polymers in Drug Delivery." In Drug Delivery Systems, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maszkiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in Protein Delivery: Physical Systems, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (

10

20

30

40

50

Plenum Press 1997); Bartus など., Science 281:1161 (1998); Putney and Burke, Nature Biotechnology 16:153 (1998); Putney, Curr. Opin. Chem. Biol. 2:548 (1998)). ポリエチレングリコール (PEG) 被覆された超微小球はまた、治療用タンパク質の静脈内投与のためのキャリアーを提供することができる (例えば、Gref など., Pharm. Biotechnol. 10:167 (1997) を参照のこと)。

#### 【0397】

本発明はまた、上記で論じられたように、ポリペプチドがポリマーにより結合されている、結合マウスZcytor16活性、例えばマウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体を有する化学的に変性されたポリペプチド、及びマウスZcytor16アンタゴニスト、例えば抗 - マウスZcytor16抗体又は結合ポリペプチドを企画する。

10

#### 【0398】

他の用量形は、例えば、Anset and Popovich. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 5<sup>th</sup> Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical sciences. 19<sup>th</sup> Edition (Mack Publishing Company 1995) により、及びRanade and Hollinger, Drug Delivery Systems (CRC Press 1996) により示されるように、当業者により考案され得る。

#### 【0399】

例示のように、医薬組成物は、マウスZcytor16細胞外ドメイン、例えばマウスZcytor16モノマー、ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体、又はマウスZcytor16アンタゴニスト (例えば、マウスZcytor16ポリペプチドを結合する抗体又は抗体フラグメント) と共に1つのポリペプチドを含んで成る容器を含んで成るキットとして供給され得る。治療用ポリペプチドは、単一又は複数回の用量のための注射用溶液の形で、又は注射の前、再構成されるであろう無菌粉末として供給され得る。他方では、そのようなキットは、治療用ポリペプチドの投与のための乾燥粉末分散機、液体エーロゾル発生機又はネブライザーを包含することができる。そのようなキットはさらに、医薬組成物の指示及び使用法に対する文書での情報を包含する。さらに、そのような情報は、マウスZcytor16組成物が、マウスZcytor16に対する既知の過敏性を有する患者に禁忌を示される提示も包含することができる。

20

#### 【0400】

本発明のポリヌクレオチド及びポリペプチドは、さらに、遺伝学及び分子生物学、タンパク質化学、及び抗体生成及び分析に関連する実験用実習キットにおいて教育用用具として有用であろう。その独得のポリヌクレオチド及びポリペプチド配列のために、マウスZcytor16の分子は、試験のための標準として、又は“未知”として使用され得る。例えば、マウスZcytor16ポリヌクレオチドは、マウスZcytor16が発現されるべき遺伝子である、融合構造体を包含する、細菌、ウィルス又は哺乳類発現のための発現構造体をいかにして調製するかを学生に教授するために；ポリヌクレオチドの制限エンドヌクレアーゼ切断部位を決定するために；組成におけるマウスZcytor16ポリヌクレオチドのmRNA及びDNA位置を決定するために (すなわち、ノザン及びサザンブロット、及びポリメラーゼ鎖反応による) ；そして核酸ハイブリダイゼーションにより関連するポリヌクレオチド及びポリペプチドを同定するために、補助体として使用され得る。

30

40

#### 【0401】

マウスZcytor16ポリペプチドは、抗体の調製；ウェスタンブロットによるタンパク質の同定；タンパク質の精製；発現された合計のタンパク質に対する割合としての発現されたマウスZcytor16ポリペプチドの重量の決定；ペプチド分解部位の同定；アミノ及びカルボキシル末端標識のカップリング；アミノ酸配列分析；及び生来の及び標識されたタンパク質 (すなわち、受容体結合、シグナルトランスダクション、増殖及び分化) の生物学的活性のインビトロ及びインビボでのモニターリングのための補助体として、教育的に使用され得る。

#### 【0402】

50

マウスZcytor16ポリペプチドはまた、分析熟練、例えば、質量分析学、コンホメーション、例えば4個のヘリックスを決定するために、円二色性を、原子の立体構造を詳細に決定するために、X-線結晶学を、溶液におけるタンパク質の構造を表すために、核磁気共鳴分光学を教授するためにも使用され得る。例えば、マウスZcytor16を含むキットが、学生の分析熟練を開発するために未知のタンパク質として、又は学生の熟練の試験として、分析する学生に与えられ得る。アミノ酸配列は教師によっては知られており、すなわちタンパク質は学生の熟練を決定し、又はその熟練を進展せしめるための試験として学生に提供されるので、教師は、学生がポリペプチドを正しく分析したかどうかを知ることができる。あらゆるポリペプチドはユニークであるので、マウスZcytor16の教育的利用はそれ自体ユニークであろう。

10

#### 【0403】

さらに、マウスZcytor16は組織-特異的発現を有し、そしてクラスIIサイトカイン受容体構造及び明白な発現パターンを有するポリペプチドであるので、活性は増殖アッセイ、本明細書に記載されるルシフェラーゼ及び結合アッセイを用いて測定され得る。さらに、単球、前立腺、リンパ及び他の組織におけるマウスZcytor16ポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現は、診断及び組織-特異的同定及び方法の使用において学生を訓練するために分析され得る。さらに、マウスZcytor16ポリヌクレオチドは、染色体検出及び診断方法の使用に基づいて学生を訓練するために使用され得る。そのようなアッセイは、当業界において良く知られており、そしてサイトカイン受容体タンパク質について学生を教授し、そしてマウスZcytor16と当業界における他のサイトカイン受容体との間の種々の性質、例えば細胞に対する細胞効果、酵素運動学、種々の抗体結合親和性、組織特異性及び同様のものを試験するために、教育環境において使用され得る。

20

#### 【0404】

マウスZcytor16に対して特異的に結合する抗体は、マウスZcytor16を精製し、抗体をコードするポリヌクレオチドをクローニングし、そして配列決定するために、親和性クロマトグラフィーカラムをいかにして調製するかを学生に教授するための教授援助として、及び従って、ヒト適合された抗体をいかにして企画するかを学生に教授するための実習課目として使用され得る。さらに、マウスZcytor16に対して特異的に結合する抗体は、例えば当業界において知られている組織学的及び現場方法を用いて、活性化されたCD91+細胞、細胞分類又は卵巢癌組織の検出への使用のための教授助剤として使用され得る。

30

#### 【0405】

次に、マウスZcytor16遺伝子、ポリペプチド又は抗体は、試薬会社によりパッケージされ、そして学生が分子生物学の分野において熟練を得るために大学及び他の教育機関に市販される。個々の遺伝子及びタンパク質はユニークであるので、個々の遺伝子及びタンパク質は、実験実習課目における学生のためのユニークな挑戦及び学習経験を創造する。マウスZcytor16遺伝子、ポリペプチド又は抗体を含むそのような教育用キットは、本発明の範囲内で有と思われる。

#### 【0406】

第1の観点においては、本発明は、(a)アミノ酸残基24~230；(b)アミノ酸残基27~230；(c)アミノ酸残基27~126；及び(d)アミノ酸残基131~230から成る群からの、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列の少なくとも15個の連続したアミノ酸残基を含んで成る単離されたポリペプチドを提供する。1つの態様においては、上記に開示される単離されたポリペプチドは、(a)アミノ酸残基24~230；(b)アミノ酸残基27~230；(c)アミノ酸残基27~126；及び(d)アミノ酸残基131~230から成る群からの、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列を含んで成る。

40

#### 【0407】

もう1つの観点においては、上記に開示される単離されたポリペプチドは、(a)アミノ酸残基24~230；(b)アミノ酸残基27~230；(c)アミノ酸残基27~126；及び(d)アミノ酸残基131~230から成る群からの、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列から成る。もう1つの観点においては、上記に開示される単離されたポリペプチドは、(a)

50

アミノ酸残基24～230；(b)アミノ酸残基27～230；(c)アミノ酸残基27～126；及び  
(d)アミノ酸残基131～230から成る群からの、配列番号38又は配列番号48の対照アミノ  
酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含んで成る。もう1つの観点に  
おいては、上記に開示される単離されたポリペプチドは、(a)アミノ酸残基24～230；  
(b)アミノ酸残基27～230；(c)アミノ酸残基27～126；及び(d)アミノ酸残基131  
～230から成る群からの、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸配列を含んで成る。

#### 【0408】

第2の観点においては、本発明は、(a)配列番号39又は配列番号49のヌクレオチド配列  
を含んで成る核酸分子、又は(b)配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド8～697、  
又は77～697、又は86～697のヌクレオチド配列、又は配列番号37又は配列番号47のヌクレ  
オチド8～697、又は77～697、又は86～697のヌクレオチド配列の補体から成る核酸分子  
に対して、緊縮洗浄条件下でハイブリダイズされたまま存続する核酸分子のいずれかであ  
る単離された核酸分子を提供する。1つの観点においては、前記単離された核酸分子は、  
上記に開示される通りであり、ここで前記核酸分子によりコードされるアミノ酸配列と、  
配列番号38又は配列番号48のその対応するアミノ酸配列との間のいずれかの差異は、保存  
性アミノ酸置換による。もう1つの観点においては、上記に開示される単離された核酸分  
子は、配列番号37又は配列番号47のヌクレオチド8～697、又は77～697、又は86～697の  
ヌクレオチド配列を含んで成る。

10

#### 【0409】

第3の観点においては、本発明は、上記のような単離された核酸分子を含んで成るベクタ  
ーを提供する。

20

もう1の観点においては、本発明は、上記のような単離された核酸分子、転写プロモータ  
ー及び転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供し、ここで前記プロモータ  
ーが前記核酸分子により操作可能に連結され、そして前記核酸分子が前記転写ターミネータ  
ーにより作用可能に連結される。

#### 【0410】

もう1の観点においては、本発明は、細菌、酵母細胞、菌類細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞  
及び植物細胞の群から選択された、上記に開示される発現ベクターを含んで成る組換え宿  
主細胞。

もう1の観点においては、本発明は、上記のような発現ベクターを含んで成り、そして前  
記マウスZcytor16タンパク質を生成する組換え宿主細胞を培養することを含んで成る、マ  
ウスZcytor16タンパク質の生成方法を提供する。1つの態様においては、上記に開示され  
る方法は、前記培養された組換え宿主細胞からマウスZcytor16タンパク質を単離すること  
をさらに含んで成る。

30

#### 【0411】

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるポリペプチドと結合する抗体又は  
抗体フラグメントを提供する。1つの態様においては、上記に開示される抗体は、(a)  
ポリクローナル抗体、(b)ネズミモノクローナル抗体、(c)(b)に由来するヒト適  
合された抗体、及び(d)ヒトモノクローナル抗体から成る群から選択される。

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示される抗体と特異的に結合する抗-イデ  
ィオタイプ抗体を提供する。

40

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるポリペプチドを含んで成る融合タ  
ンパク質を提供する。1つの態様においては、上記に開示される融合タンパク質は、免疫  
グロブリン成分をさらに含んで成る。

#### 【0412】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は  
配列番号48に示されるようなアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残  
基の配列を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポ  
リヌクレオチドを提供し、ここで前記アミノ酸差異は保存性アミノ酸置換から成り；そし  
て前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチド

50

はIL-TIFを結合するか、又はIL-TIF活性を拮抗する。1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、ホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する。

#### 【0413】

もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド(配列番号35)、可溶性IL-10受容体ポリペプチド(配列番号36)、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド(配列番号34)をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。

10

#### 【0414】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸24~230又は27~230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチドを提供し、ここで前記ポリヌクレオチド配列によりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドはホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成る。

20

#### 【0415】

もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記ポリヌクレオチドによりコードされる可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド(配列番号35)、可溶性IL-10受容体ポリペプチド(配列番号36)、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド(配列番号34)をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドはさらに、細胞内ドメインをコードする。もう1つの態様においては、単離されたポリヌクレオチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドはさらに、親和性標識を含んで成る。

30

#### 【0416】

もう1の観点においては、本発明は、次の作用可能に連続された要素：(a)転写プロモーター；アミノ酸24~230又は27~230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸配列を有する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第1DNAセグメント；及び転写ターミネーター；及び(b)第2転写プロモーター；可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする第2DNAセグメント；及び転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供し、ここで前記第1及び第2DNAセグメントは単一の発現のベクター内に含まれるか、又は独立した発現ベクター内に含まれる。

40

#### 【0417】

1つの態様においては、上記に開示される発現ベクターはさらに、前記第1及び第2DNAセグメントに作用可能に連結される分泌シグナル配列をさらに含んで成る。もう1つの態様においては、発現ベクターは上記に開示される通りであり、ここで前記第2DNAセグメントは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド(配列番号35)、可溶性IL-10受容体ポリペプチド(配列番号36)、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド(配列番号34)を含んで成るポリペプチドをコードする。

#### 【0418】

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示される発現ベクターを含んで成る培養さ

50

れた細胞を提供し、ここで前記細胞は前記DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する。1つの態様においては、発現ベクターを含んで成る培養された細胞は上記の通りであり、ここで前記第1及び第2 DNAセグメントは独立した発現ベクター上に位置し、そして細胞中に同時トランスフェクトされ、そして細胞が前記DNAセグメントによりコードされるポリペプチドを発現する。

#### 【0419】

もう1つの態様においては、発現ベクターを導入されている培養された細胞は上記の通りであり、ここで前記細胞は前記DNAセグメントによりコードされるヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体ポリペプチドを発現する。もう1つの態様においては、上記に開示される細胞は、可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドヘテロダイマー又はマルチマー複合体を分泌する。もう1つの態様においては、上記に開示される細胞は、IL-TIFを結合し、又はIL-TIF活性を拮抗する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドヘテロダイマー又はマルチマー複合体を分泌する。

10

#### 【0420】

もう1の観点においては、本発明は、下記成分：アミノ酸24~230又は27~230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を有するポリペプチドをコードする第1 DNAセグメント；及び可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドをコードする少なくとも1つの他のDNAセグメントを含んで成る融合タンパク質をコードするDNA構造体を提供し、ここで前記第1及び他のDNAセグメントは読み取り枠の整合して連結され；そして前記第1及び他のDNAセグメントは前記融合タンパク質をコードする。1つの態様においては、融合タンパク質をコードするDNA構造体は上記に開示される通りであり、ここで少なくとも1つの他のDNAセグメントは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）を含んで成るポリペプチドをコードする。

20

#### 【0421】

もう1の観点においては、本発明は、次の作用可能に連結された要素：転写プロモーター：上記に開示されるような融合タンパク質をコードするDNA構造体；及び転写ターミネーターを含んで成る発現ベクターを提供し、ここで前記プロモーターは前記DNA構造体に作用可能に連結され、そして前記DNA構造体は前記転写ターミネーターに作用可能に連結される。

30

#### 【0422】

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるような発現ベクターを含んで成る培養された細胞を提供し、ここで前記細胞は前記DNA構造体によりコードされるポリペプチドを発現する。

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるような細胞を培養し；そして前記細胞により生成されるポリペプチドを単離することを含んで成る、融合タンパク質の生成方法を提供する。

#### 【0423】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸24~230又は27~230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸配列に対して少なくとも90%同一であるアミノ酸残基の配列を含んで成る、IL-TIFを結合するか又はIL-TIF活性を拮抗する単離された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドを提供する。1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、ホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する。

40

#### 【0424】

もう1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチ

50

ド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。

【0425】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る単離された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドを提供し、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドはホモダイマー、ヘテロダイマー、又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体

10

【0426】

もう1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）を含んで成るヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体を形成する。もう1つの態様においては、単離されたポリペプチドは上記に開示される通りであり、ここで前記可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドは、親和性標識、化学的成分、毒素又はラベルをさらに含んで成る。

【0427】

20

もう1の観点においては、本発明は、可溶性受容体サブユニットを含んで成る単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体を提供し、ここで前記可溶性受容体サブユニットの少なくとも1つが、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなアミノ酸残基の配列を含んで成る。もう1つの態様においては、上記に開示される単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体はさらに、可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る。もう1つの態様においては、上記に開示される単離されたヘテロダイマー又はマルチマー可溶性受容体複合体はさらに、可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）、可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）、又は可溶性zcytor11受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成る。

30

【0428】

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるような細胞を培養し；そして前記細胞により生成される可溶性受容体ポリペプチドを単離することを含んで成る、ヘテロダイマー又はマルチマー複合体を形成する可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドの生成方法を提供する。

【0429】

もう1の観点においては、本発明は、下記群：（a）アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドを含んで成るモノマー又はホモダイマー可溶性受容体を含んで成るポリペプチド；（b）可溶性クラスI又はクラスIIサイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチド；（c）可溶性CRF2-4受容体ポリペプチド（配列番号35）を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチド；及び（d）可溶性IL-10受容体ポリペプチド（配列番号36）を含んで成る可溶性サイトカイン受容体ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体をさらに含んで成る（a）のポリペプチドから選択された可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドにより動物を接種し；ここで前記ポリペプチドが、抗体を生成するために前記動物において免疫応答を誘発し；そして前記動物から抗体を単離することを含んで成る、可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドに対する抗体を生成するための方法を提供する。

40

【0430】

50



もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドを含んで成るホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体に対して特異的に結合する上記に開示されるような方法により生成される抗体を提供する。1つの態様においては、上記に開示されるような抗体はモノクローナル抗体である。

もう1の観点においては、本発明は、上記に開示されるようなホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体複合体に対して特異的に結合する抗体を提供する。

【0431】

もう1の観点においては、本発明は、可溶性サイトカイン受容体の不在下で培養される骨髓又は末梢血液細胞に比較して、骨髓又は末梢血液細胞における造血細胞の増殖又は分化を低めるのに十分な量の、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるような可溶性サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物と共に骨髓又は末梢血液細胞を培養することを含んで成る、造血細胞及び造血細胞前駆体のIL-TIF-誘発された増殖又は分化を阻害するための方法を提供する。1つの態様においては、前記造血細胞及び造血前駆体細胞は、リンパ球である。もう1つの態様においては、前記リンパ球は、マクロファージ又はT細胞である。

10

【0432】

もう1の観点においては、本発明は、炎症を低めるために十分な量の、アミノ酸24～230又は27～230からの配列番号38又は配列番号48に示されるようなポリペプチドの組成物を、炎症を有する哺乳類に投与することを含んで成る、IL-TIF-誘発された又はIL-9誘発された炎症を低めるための方法を提供する。

20

【0433】

もう1の観点においては、本発明は、(1)血清アミロイドAタンパク質のレベルを決定し；(2)医薬的に許容できるピークル中、請求項41記載の可溶性マウスZcytor16サイトカイン受容体ポリペプチドを含んで成る組成物を投与し；(3)血清アミロイドAタンパク質の後-投与レベルを決定し；(4)段階(3)における血清アミロイドAタンパク質のレベルに、段階(1)における血清アミロイドAタンパク質のレベルを比較することを含んで成る、炎症を有する哺乳類において炎症応答を抑制するための方法を提供し、ここで血清アミロイドAタンパク質レベルの上昇又は下降の欠失が炎症応答の抑制の表示である。

30

【0434】

もう1の観点においては、本発明は、患者から組織又は生物学的サンプルを得；前記組織又は生物学的サンプルを、上記に開示されるような抗体と共に、前記抗体が前記組織又は生物学的サンプルにおけるその相補的ポリペプチドに結合する条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおいて結合される抗体を可視化し；そして正常な対照組織又は生物学的サンプルに、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおける結合される抗体のレベルを比較する、患者における癌を検出するための方法を提供し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに対する、前記患者組織又は生物学的サンプルに結合される抗体のレベルの上昇が前記患者における癌の表示である。

【0435】

もう1の観点においては、本発明は、患者から組織又は生物学的サンプルを得；配列番号37又は配列番号47の少なくとも14個の連続したヌクレオチド又は配列番号37又は配列番号47の補体を含んで成るポリヌクレオチドをラベリングし；前記組織又は生物学的サンプルを、前記ポリヌクレオチドが相補的ポリヌクレオチド配列に対してハイブリダイズする条件下でインキュベートし；前記組織又は生物学的サンプルにおける前記ラベルされたポリヌクレオチドを可視化し；そして正常な対照組織又は生物学的サンプルに対して、前記患者からの組織又は生物学的サンプルにおけるラベルされたポリヌクレオチドハイブリダイゼーションのレベルを比較する、患者における癌を検出するための方法を提供し、ここで前記正常な対照組織又は生物学的サンプルに比較して、前記患者組織又は生物学的サンプルに対するラベルにされたポリヌクレオチドのハイブリダイゼーションの上昇が前記患者

40

50

における癌の表示である。

【0436】

もう1の観点においては、本発明は、配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230又は27～230を過剰発現するトランスジェニックマウスを提供する。1つの態様においては、前記配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230又は27～230の発現は、組織 - 特異的又は組織 - 制限されたプロモーターを用いて発現される。1つの態様においては、前記配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230又は27～230の発現が、上皮 - 特異的、結腸 - 特異的又は卵巣 - 特異的プロモーターを用いて発現される。1つの態様においては、前記マウスは、正常なマウスに比較して、配列番号38又は配列番号48の残基1～230又は24～230又は27～230を発現しない。

10

本発明は、次の非制限的例によりさらに例示される。

【実施例】

【0437】

例1. マウスZcytor16のクローニング、及びヒト及びマウスZcytor16可溶性受容体：Zcytor16CEE, Zcytor16CFLG, Zcytor16CHIS及びZcytor16 - Fc4を発現する哺乳類発現ベクターの構造

A. マウスZcytor16細胞外ドメインのクローニング：

ヒトZcytor16のマウスオルト体（アメリカ特許出願第09/728,911号）を同定し、そして“マウスZcytor16”と命名した。マウスZcytor16クローンのポリヌクレオチド配列は、それぞれ、配列番号37及び配列番号47に示され、そしてポリペプチド配列は、配列番号38及び配列番号48に示される。

20

【0438】

B. 可溶性Zcytor16受容体Zcytor16 - Fc4の哺乳類発現：

Zcytor16可溶性受容体Zcytor16sR/Fc4を発現する哺乳類発現ベクターの構造：

1つの発現ベクターを、C - 末端Fc4標識（配列番号5）に融合された可溶性ヒトZcytor16ポリペプチド（Zcytor16cR, すなわち配列番号2の残基22（Thr）～残基231（Pro）；配列番号13）を発現するために調製した。

【0439】

約630bpのPCR生成されたZcytor16 DNAフラグメントを、可溶性受容体をコードするZcytor16 DNAのそれぞれの5'及び3'末端でBamHI及びBglII制限部位を付加するためにPCRプライマーとしてオリゴZC29,181（配列番号6）及びオリゴZC29,182（配列番号17）を用いて創造した。Zcytor16 cDNA（配列番号1）（例1A）を含むプラスミドを、鋳型として使用した。Zcytor16フラグメントのPCR増幅を次の通りに行った：94 で1分（1サイクル）；94 で30秒、68 で90秒、続いて追加の68 での4分間のインキュベーション及び10 での維持（25サイクル）。反応を、クロロホルム/フェノール抽出及びイソプロパノール沈殿により精製し、そしてBamHI及びBglIIにより消化した（Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN）。1%アガロースゲル電気泳動により可視化されるような約630bpのバンドを、QiaexII<sup>TM</sup> 精製キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて、製造業者の説明に従って精製した。

30

【0440】

Fc4/pzmp20プラスミドは、CMVプロモーター、ヒトtPAリーダーペプチド、コード配列の挿入のための複数の制限部位、Fc4標識及びヒト成長ホルモントerミネーターを含む哺乳類発現ベクターである。前記プラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複製の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子、及びSV40ターミネーターを有する。Zcytor16sR/Fc4/pzmp20発現ベクターはヒトtPAリーダーペプチド（配列番号8及び9）を使用し、そしてZcytor16ポリペプチド配列の細胞外部位のC - 末端にFc4標識（配列番号5）を結合する。Fc4は、Fc受容体をもはや結合しないよう突然変異を含む、ヒトIgGに由来するFc領域である。

40

【0441】

約30ngの制限消化されたZcytor16sR挿入体及び約10ngの消化されたベクター（BglIIにより

50

切断された)を、約11で一晩、連結した。1 µlの連結反応を、DH10Bコンピテント細胞 (Gibco BRL, Rockville, MD)中に、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして50mg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを、個々のコロニーの液体培養物2mlから調製されたDNAの制限分析によりスクリーンした。陽性クローンの挿入体配列を、配列分析により確かめた。大規模プラスミド調製を、Qiagen (商標) Mega Prepキット (Qiagen)を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

類似する方法を用いて、ヘテロダイマー及びマルチマー受容体、例えばFc4により標識されたCRF2 - 4及びIL - 10RのマウスZcytor16 - Fc4融合体及びFc4融合体を調製した。

#### 【0442】

C. Zcytor16CEE, Zcytor16CLF及びZcytor16CHISを含むZcytor16哺乳類発現ベクターの構成:

1つの発現ベクター、すなわち、pC4Zcytor16CEE4, Zcytor16ポリペプチドの可溶性細胞外ドメイン (例えば、配列番号2のアミノ酸22~231; 配列番号13; 又は配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24~230)の発現のために調製し、ここで前記構造体は、予測される開始メチオニンから成り、そして予測されるトランスメンブランドメインに隣接して切断され、そしてC - 末端Glu - Glu標識 (配列番号10)を有するZcytor16ポリペプチドを発現するよう企画されている。

#### 【0443】

Zcytor16細胞外サイトカイン結合ドメインを含んで成るZcytor16 DNAフラグメントを、PCRを用いて創造し、そして精製する。切除されたDNAを、シグナルペプチド、例えば生来のZcytor16シグナルペプチドを有するプラスミド発現ベクター中にサブクローン化し、そしてZcytor16ポリペプチドコードのポリヌクレオチド配列のC - 末端にGlu - Glu標識 (配列番号10)を結合する。そのような哺乳類発現ベクターは、哺乳類プロモーター、コード配列の挿入のための複数の制限部位、停止コドン及び哺乳類ターミネーターを有する発現カセットを含む。このプラスミドはまた、複製のE. コリ起点、SV40プロモーター、エンハンサー及び複数の起点を有する哺乳類選択マーカー発現単位、DHFR遺伝子及びSV40ターミネーターも有することができる。

#### 【0444】

制限消化されたZcytor16挿入体及び前に消化されたベクターを、標準の分子生物学技法を用いて連結し、そしてDH10Bコンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)中に、その製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして50 µg/mlのアンピシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを、個々のコロニーから調製されたDNAの制限分析によりスクリーンした。陽性クローンの挿入体配列を、配列分析により確かめた。大規模プラスミド調製を、QIAGEN (商標) Maxi prepキット (Qiagen)を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

#### 【0445】

同じ方法を用いて、マウスZcytor16可溶性ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマー受容体 (非 - Zcytor16可溶性受容体サブユニット、例えば可溶性CRF2 - 4又はIL - 10R)、又は一列に並んで6個のHis残基 (配列番号12)から成るC - 末端HIS標識、及びC - 末端FLAG (配列番号11)標識、すなわちZcytor16FLAGを有する可溶性受容体を調製する。それらの構造体を構成するためには、前記ベクターは、glu-glu標識 (配列番号10)の代わりに、HIS又はFLAG (商標)標識のいずれかを有する。

#### 【0446】

#### 例2. 可溶性受容体ポリペプチドのトランスフェクション及び発現

トランスフェクションの前日、BHK570細胞 (ATCC NO. CRL - 10314; ATCC, Manassas, VA)を、通常のBHK DMEM (Gibco/BRL High Glucose)培地を含む10cmプレートに、50%集密性でプレートした。トランスフェクションの日、細胞を、血清フリー (SF) DMEMにより1度、洗浄し、続いてZcytor16sR/Fc4/pzmp20発現プラスミドによりトランスフェクトした。16 µgのヒトZcytor16sR - Fc4 DNA構造体 (例1B)を、640 µlの合計最終体積のSF DMEM中

10

20

30

40

50

に希釈した。希釈されたLipofectAMINE<sup>TM</sup> (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) 混合物 (605  $\mu$ lの培地中、35  $\mu$ lのLipofectAMINE<sup>TM</sup>) を、DNA混合物に添加し、そして室温で30分間インキュベートした。5mlのSF培地を、DNA/LipofectAMINE<sup>TM</sup> 混合物に添加し、次に、これを、BHK細胞に添加した。細胞を、38  $\pm$  5% CO<sub>2</sub>で5時間インキュベートし、この後、10% FBSと共に6.4mlのBHK培地を添加した。細胞を37  $\pm$  5% CO<sub>2</sub>で一晩インキュベートした。

#### 【0447】

トランスフェクションの約24時間後、BHK細胞を、1  $\mu$ Mのメトトレキセート (MTX) を有する選択培地に分けた。前記細胞を、安定したZcytor16sR - Fc4/BHK細胞系が同定されるまで、この状態で反復して分離した。Zcytor16可溶性受容体融合タンパク質の発現レベルを検出するために、トランスフェクトされたBHK細胞を、PBSにより洗浄し、そしてSF培地において72時間インキュベートした。SFならし培地を集め、そして20  $\mu$ lのサンプルを、還元条件下で、10% SDS - PAGEゲル上で展開した。タンパク質バンドを、ウェスタンブロットによりニトロセルロースフィルターにトランスファーし、そして融合タンパク質を、ヤギ - 抗 - ヒトIgG/HRP接合体 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA) を用いて検出した。Fc4に融合される異なった可溶性受容体を含む発現ベクターを、対照として使用した。安定したZcytor16sR - Fc4/BHK細胞の発現レベルは、約2mg/lであった。

10

#### 【0448】

タンパク質精製のために、トランスフェクトされたBHK細胞を、T - 162フラスコ中に移した。細胞が約80%の集密性に達するとすぐに、それらを、PBSにより洗浄し、そして100mlのSF培地において72時間インキュベートし、そして次に、ならし培地を、タンパク質精製のために集めた (例11)。

20

上記方法を用いて、マウスZcytor16可溶性受容体融合タンパク質を、同様にして発現する。

#### 【0449】

##### 例3 . E. コリにおけるZcytor16可溶性受容体の発現

A.hu Zcytor16/MBP-6H融合ポリペプチドを発現する発現ベクターpCZR225の構成：

マルトース結合タンパク質 (MBP) にC - 末端で融合されるZcytor16可溶性受容体をコードするポリヌクレオチドを含む発現ベクターを、相同組換えにより構成する。融合ポリペプチドは、ヒトZcytor16可溶性受容体 (例えば、配列番号13；又はマウスZcytor16に関しては、配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24~230) に融合される約388個のN - 末端アミノ酸MBP部分を含む。Zcytor16 cDNAのフラグメント (配列番号1；又は配列番号37又は配列番号47) を、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

30

#### 【0450】

次の2種のプライマーを、標準のPCR反応におけるZcytor16フラグメントの生成に使用する：(1) 1つは、約40bpのベクターフランキング配列及び約25bpのアミノ末端に対する配列を含み、及び(2) もう1つは、前記フランキングベクター配列に対応する3'末端約40bp及びZcytor16のカルボキシル末端に反応する配列約25bpを含む。100  $\mu$ lのPCR反応物2  $\mu$ lを、分析するために、1  $\times$  TBE緩衝液中、1.0% アガロースゲル上で試験し、そして予測されるおよそのフラグメントが見られる。残るPCR反応物を、第2のPCR管において組合し、そして無水エタノール400  $\mu$ lにより沈殿せしめる。沈殿されたDNAを、下記のようにして、適切に制限消化された受容体受容体ベクターpTAP98中への組換えのために使用し、MBP - Zcytor16融合体をコードする構造体を生成する。

40

#### 【0451】

プラスミドpTAP98は、プラスミドpRS316及びpMAL-c2に由来する。プラスミドpRS316は、サッカロミセス・セレビシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*) シャトルベクターである (Hieter P. and Sikorski, R., Genetics 122: 19-27, 1989)。pMAL-C2 (NEB) は、E. コリ発現プラスミドである。それは、tacプロモーター駆動MalE (MBPコードの遺伝子)、続いて、His標識、トロンピン切断部位、クローニング部位及びrrnBターミネーターを担持する。ベクターpTAP98を、酵母相同組換えを用いて構成する。100ngのEcoRI切断された、pM

50

AL-c2を、1  $\mu$ gのPvuI切断されたpRS316、1  $\mu$ gのリンカーと共に組合し、そして1  $\mu$ gのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において組合す。PCR生成物を、100%エタノール沈殿により濃縮する。

【0452】

コンピテント酵母細胞 (S.セレビシアエ) を、約1  $\mu$ gの上記Zcytor16受容体PCR生成物及び100ngのSmaI消化されたpTAP98ベクターを含む混合物数10  $\mu$ Lと共に組合し、そして標準方法を用いてエレクトロポレートし、そしてURA-Dプレート上にプレートし、そして30でインキュベートする。

【0453】

約48時間後、単一プレートからUra<sup>+</sup>酵母形質転換体を採取し、DNAを単離し、そしてエレクトロコンピテントE.コリ細胞 (例えば、MC1061, Casadabanなど., J. Mol. Biol. 138, 179-207) を形質転換し、そして標準方法を用いて、MM/CA+AMP 100mg/lプレート (Pryor and Leitinger, Protein Expression and Purification. 10:309-319, 1997) 上にプレートする。細胞を、100  $\mu$ g/mlのアンプシリンと共に、MM/CAにおいて、2時間、37で、振盪しながら増殖する。その培養物1mlを、1mMのIPTGにより誘発する。2~4時間後、個々の培養物250  $\mu$ lを、酸により洗浄されたガラスビーズ250  $\mu$ 、及び5% ME及び色素を含むThomex緩衝液 (8Mの尿酸、100mMトリス、pH7.0, 10%グリセロール、2mMのEDTA, 5% SDS) 250  $\mu$ lと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65に10分間、加熱する。その20  $\mu$ lを、4%~12%PAGEゲル (NOVEX) 上のラインあたりに負荷する。ゲルを、1xMES緩衝液において試験する。陽性クローンを、配列決定分析にゆだねる。

10

20

【0454】

1  $\mu$ lの配列決定DNAを用いて、BL21株を形質転換する。細胞を、2.0kV, 25  $\mu$ F及び400オームで電気パルスする。エレクトロポレーションに続いて、100mg/lのアンプシリンを含むMM/CA溶液0.6ml上にプレートする。細胞を、MM/CAにおいて増殖し、そして上記のようにして、IPTGにより誘発する。陽性クローンを用いて、ヒト又はマウスZcytor16/MBP-6H融合タンパク質のタンパク質精製のために、標準技法により増殖する。

【0455】

例4. マウスZcytor16可溶性受容体ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体を、精製されたマウスZcytor16/MBP-6Hポリペプチド (例3) 又は精製された組換えマウスZcytor16CEE又はマウスZcytor16-Fc4可溶性受容体 (例1; 例11) により、雌New zealand 白色ウサギを免疫化することによって、調製する。ウサギは、完全フロイントアジュバント (Pierce, Rockford, IL) 中、精製されたタンパク質200mgの初期腹腔内 (IP) 注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質100  $\mu$ gの追加免疫IP注射を、3週ごとに与えられる。第3の追加免疫注射の投与後7~10日で、動物は放血され、そして血清が集められる。次に、ウサギを、追加免疫し、そして3週ごとに放血する。

30

【0456】

マウスZcytor16 - 特異的ポリクローナル抗体を、CNBr-SEPHAROSE 1g当たり約10mgの適切に精製されたマウスZcytor16ポリペプチドを用いて調製されるCNBr-SEPHAROSE 4Bタンパク質カラム (Pharmacia LKB) を用いて、ウサギ血清から親和性精製し、続いて、PBSにおける20倍の透析を一晚、行う。Zcytor16 - 特異的抗体を、抗体標的物として適切な1  $\mu$ g/mlのタンパク質抗原を用いてのELISA力価調査により特徴づけるウサギ抗-Zcytor16親和性精製された抗体の検出の下限 (LLD) を、標準方法を用いて決定する。

40

【0457】

例5. マウスZcytor16受容体モノクローナル抗体

マウスZcytor16可溶性受容体モノクローナル抗体を、本明細書に記載される精製された組換えマウスZcytor16タンパク質により、雄BalbCマウス (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) を免疫化することによって、調製する。マウスは、完全フロイントアジュバント (Pierce, Rockford, IL) 中、精製されたタンパク質20mgの初期腹腔内 (IP) 注射、続いて、不完全フロイントアジュバント中、精製されたタンパク質10mgの追加免疫IP注射を

50

、2週ごとに与えられる。第3の追加免疫注射の投与後7～10日で、動物は放血され、そして血清が集められ、そして抗体力化を評価する。

【0458】

脾臓細胞を、高い力価のマウスから収穫し、そして4:1の融合比の脾臓細胞:骨髓腫細胞を用いての2種の別々の融合方法によりPEG 1500 (Boehringer Mannheim, UK) を用いて、ネズミSP2/0骨髓腫細胞に融合する (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press)。融合の後、10日間の増殖に続いて、特定の抗体-生成ハイブリドマーを、抗体標的物として、精製された組換えマウスZcytor16可溶性受容体タンパク質 (例6C) を用いて、ELISAにより、そして抗体標的物として、Zcytor16配列を発現するBa F3細胞 (例8) を用いて、FACSにより同定する。両方法によるその得られる陽性ハイブリドマーを、限界希釈法により3度クローン化する。

10

【0459】

例6. ORIGENアッセイを用いてのマウスZcytor16受容体ヘテロダイマー化の評価

可溶性マウスZcytor16受容体 (例11)、又はgp130 (Hibi, M. など., Cell63: 1149-1157, 1990) を、5倍モル過剰のスルホ-NHS-LC-ビオチン (Pierce, Inc., Rockford, IL) との反応により、製造業者のプロトコールに従って、ビオチニル化する。可溶性マウスZcytor16受容体及び他の可溶性受容体サブユニット、例えば可溶性IL-10R (sIL-10R) 又はCRF2-4受容体 (CRF2-4)、可溶性zcytor11受容体 (アメリカ特許5,965,704号) 又は可溶性zcytor7受容体 (アメリカ特許5,945,511号) を、5倍モル過剰のRu-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) により、製造業者のプロトコールに従って、ラベルする。

20

【0460】

可溶性マウスZcytor16受容体のビオチニル化され、そしてRu-BPY-NHP-ラベルされた形は、それぞれBio-Zcytor16受容体及びRu-Zcytor16と命名され; 他の可溶性受容体サブユニットのビオチニル化され、そしてRu-BPY-NHS-ラベルされた形も同様に命名され得る。アッセイを、マウスZcytor16ヘテロダイマー受容体を結合するリガンド、例えばIL-TIFを発現する細胞からのならし培地を用いて、又は精製されたIL-TIFを用いて行うことができる。

【0461】

初期受容体結合特徴化のために、一連サイトカイン又はならし培地を、それらがマウスZcytor16受容体ホモダイマー化を介在することができるかどうか、及びそれらが上記の可溶性サブユニットマウスZcytor16受容体へのヘテロダイマー化を介在できるかどうかを決定するために試験する。これを行うために、50µlのならし培地又はTBS-B含有の精製されたサイトカインを、例えば400ng/mlのRu-mZcytor16受容体及びBio-mZcytor16、又は400ng/mlのRu-mZcytor16受容体及びBio-gp130、又は400ng/mlのRu-CRF2-4及びBio-mZcytor16を含むTBS-B (20mMのトリス、150mMのNaCl、1mg/mlのBSA、pH7.2) 50µlと組合す。

30

【0462】

室温での1時間のインキュベーションに続いて、30µgのストレプトアビジン被覆された、2.8mmの磁気ビーズ (Dynal, Inc., Oslo, Norway) を添加し、そしてその反応を、室温でさらに1時間インキュベートする。次に、200µlのORIGENアッセイ緩衝液 (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) を添加し、そして受容体会合の程度を、M8 ORIGEN分析機 (Igen, Inc.) を用いて測定する。

40

【0463】

例7. zcytor17 受容体ヘテロダイマーを生成するための構造体

分泌されたマウスZcytor16ヘテロダイマーを発現するベクターを構成する。この構造体においては、Zcytor16の細胞外サイトカイン-結合ドメイン (例えば配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24～230) を、IgGガンマ1 (IgG 1) のH鎖に融合し、そしてヘテロマ-サイトカイン受容体サブユニット (例えば、gp130, LIF, IL-12, WSX-1又はIL-2受容体成分 (IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ ))、IL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分 (IL-4R $\alpha$ 、IL-BR、IL-13R $\alpha$ )、インターロイキン受容体サブユニットの細胞外部分 (例え

50

ば、CRF2-4、IL-9、IL-10、zcytor7、zcytor11、IL-4受容体成分）を、ヒトカップL鎖（ヒト L鎖）に融合する。

【0464】

A. IgG 1 及びヒト L鎖融合ベクターの構成：

IgG 1 のH鎖を、Zem229R哺乳発現ベクター（ATCC寄託番号69447号）中にクローン化し、その結果、5' EcoRI及び3' NheI部位を有するいずれかの所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインをクローン化でき、N-末端細胞外ドメイン-C-末端IgG 1融合体をもたらすことができる。この構造体に使用されるIgG 1フラグメントを、鋳型としてClontech h hFetal Liver cDNAライブラリーからIgG 1配列を単離するために、PCRを用いることにより製造する。PCR生成物を、本明細書に記載される方法を用いて、精製し、そしてMlu I及びEcoRI（Boehringer-Mannheim）により消化し、エタノール沈殿し、そして本明細書 10  
に開示される標準の分子生物学技法を用いて、MluI及びEcoRIにより前もって消化されたZem229R中に、所望する制限部位リンカーを含んで成るオリゴと共に連結する。

【0465】

ヒト L鎖を、Zem228R哺乳類発現ベクター（ATCC寄託番号69446号）においてクローン化し、その結果、5' EcoRI部位及び3' KpnI部位を有する、いずれかのサイトカイン受容体細胞外ドメインがクローン化し、N-末端サイトカイン細胞外ドメイン-C-末端ヒト L鎖融合体をもたらすことができる。KpnI部位はヒト L鎖配列内に位置するので、特定のプライマーが、サイトカイン受容体の所望する細胞外ドメインの3'末端を、このKpnI部 20  
位中にクローン化するよう企画される。前記プライマーは、その得られるPCR生成物が、KpnI部位までのヒト L鎖のセグメントと共に、所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインを含むよう企画される。

【0466】

このプライマーは好ましくは、KpnI部位で切断されたフラグメントの5'側で融合される所望するサイトカイン受容体細胞外ドメインの3'末端の少なくとも10個のヌクレオチドの部分を含んで成る。この構造体に使用されるヒト L鎖フラグメントを、上記で使 30  
用されるのと同じClontechヒト胎児肝臓cDNAライブラリーからヒト L鎖配列を単離するために、PCRを用いることによって製造する。PCR生成物を、本明細書に記載される方法を用いて精製し、そしてMluI及びEcoRI（Boehringer-Mannheim）により消化し、エタノール沈殿せしめ、そして本明細書に開示される標準の分子生物学技法を用いて、MluI及びEcoRIに 30  
より前もって消化されたZem228R中に、上記MluI/EcoRIリンカーにより連結する。

【0467】

B. 融合ベクター構造体中へのZcytor16受容体又はヘテロダイマーサブユニット細胞ドメインの挿入：

上記構造ベクターを用いて、IgG 1に融合されるマウスZcytor16を有する構造体を製造する。この構成は、標準方法及びEcoRI及びNheI制限部位を供給するオリゴを用いて、胎 40  
盤又は他のcDNAライブラリー（Clontech）matahaプラスミド（例1A）からのマウスZcytor16受容体の細胞外サイトカイン-結合ドメイン（配列番号38又は配列番号48のアミノ酸24~230）を、PCR処理することによって行われる。その得られるPCR生成物を、本明細書に記載のようにして、EcoRI及びNheIにより消化し、ゲル精製し、そして上記の前もってEcoRI及びNheI消化され、そしてバンド-精製されたZem229R/IgG 1中に連結する。得られるベクターを、配列決定し、Zcytor16/IgGガンマ1融合体が正しいことを確認する。

【0468】

L鎖に融合されるヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニット細胞外ドメインを有する別々の構造体をまた、上記のようにして構成する。CRF2-4/ヒト L鎖の構成を、標準方法を用いて、例えばリンパ球cDNAライブラリー（Clontech）、及びEcoRI及びKpnI制限部位を供給するオリゴから、PCRにより上記のように行う。得られるPCR生成物を、EcoRI及びKpnIにより消化し、そして次に、この生成物を、上記のようにして、前もってEcoRI及びKpnI消化され、そしてバンド-精製されたZem228R/ヒト L鎖ベクター中に連結する。得られるベクターを配列決定し、サイトカイン受容体サブユニット/ヒト L鎖融合体 50

が正しいことを確認する。

【0469】

D. マウスZcytor16及びヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニット細胞外ドメインの同時 - 発現 :

約15 $\mu$ gの個々の上記ベクターを、LipofectaminePlus<sup>TM</sup> 試薬 (Gibco/BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、哺乳類細胞、例えばBHK - 570細胞 (ATCC No. CRL-10314) 中に同時トランスフェクトする。トランスフェクトされた細胞を、1 $\mu$ Mのメトトレキセート (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) 及び0.5mg/mlのG418 (Gibco/BRL) を含むDMEM + 5% FBS (Gibco/BRL) において、10日間、選択する。得られるトランスフェクタントのプールを、10 $\mu$ mのMTX及び0.5mg/mlのG418において再び選択する。

10

【0470】

得られる二重選択された細胞のプールを用いて、タンパク質を生成する。このプールの3種の画分 (Nunc, Denmark) を用いて、血清フリーのならし培地10Lを生成する。このならし培地を、1mlのタンパク質 - Aカラム上に通し、そして約10, 750 $\mu$ lの画分に溶出する。最高のタンパク質濃度を有する画分をプールし、そしてPBSに対して透析する (10kDのMWのカットオフ)。最終的に、透析された材料を、通常の方法を用いてのアミノ酸分析 (AA) のために提供する。

【0471】

例8 . 増殖アッセイを用いてのマウスZcytor16受容体とヘテロダイマー化又は多重化する受容体サブユニットの決定

20

本明細書に記載される標準の方法を用いて、BaF3/mZcytor16 - MPLキメラ (ここで、マウスZcytor16の細胞外ドメイン (例えば、配列番号38又は48のアミノ酸24 ~ 230) がmpl受容体の細胞内シグナル化ドメインに整合して融合される) を発現する細胞を、IL - TIFの存在化での増殖応答について試験する。そのような細胞は、モノマー又はホモダイマーマウスZcytor16受容体のリガンド結合を測定するためのバイオアッセイ細胞系として作用する。

【0472】

さらに、追加のヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニットによりトランスフェクトされたBaF3/mZcytor16 - MPLキメラ細胞を、IL - TIFの存在下での増殖アッセイについて評価することができる。IL - TIFの存在下で、BaF3/mZcytor16 - MPL細胞がシグナル化する場合、これは、Zcytor16受容体がシグナルにホモダイマー化することができることを示唆する。IL - TIFリガンド、例えばCRF2-4の存在下でシグナル化する追加のMPL - クラスIIサイトカイン受容体融合体によるBaF3/MPL - mZcytor16細胞系のトランスフェクションは、ヘテロダイマーサイトカイン受容体サブユニットがマウスZcytor16受容体シグナル化のために必要とされるかどうか決定する。この目的のためへのMPL - 受容体融合体の使用は、マウスZcytor16受容体のための細胞内シグナル化ドメインの存在についての必要性を軽減する。

30

【0473】

次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、IL - TIFの存在下でアッセイし、そして増幅を通常の方法 (例えば、Alamar Blue アッセイ) を用いて測定する。BaF3/MPL-mZcytor16バイオアッセイ細胞系は、モノマー又はホモダイマー受容体活性のための対照として作用し、そして従って、種々の受容体複合体組み合わせによりシグナルを比較するための基線として使用される。トランスフェクトされていないバイオアッセイ細胞系は、バックグラウンド活性のための対照として作用し、そして従って、種々の受容体複合体組み合わせによりシグナル化を比較するための基線として使用される。リガンド (IL - TIF) を有さないBaF3/MPL-mZcytor16はまた、対照としても使用される。正しい受容体複合体の存在下でのIL - TIFは、IL - TIFの存在下でバックグラウンドよりも約5倍又はそれ以上、BaF3/mZcytor16 - MPL受容体細胞系の増殖を高めることが予測される。Zcytor16ヘテロダイマー及びマルチマー受容体の成分を発現する細胞は、IL - TIFの存在下で増殖すべきである。

40

【0474】

50



### 例 9 . インビトロでのマウスZcytor16受容体の再構成

Zcytor16 - シグナル化複合体に包含される成分を同定するために、受容体再構成の研究を、次の通りにして行う。ルシフェラーゼレポーター哺乳類発現ベクタープラスミドにより、本明細書に記載される標準方法を用いて、トランスフェクトされたBHK570細胞 (ATCC No. CRL-10314) は、IL-TIFの存在下でルシフェラーゼレポーターに対する、トランスフェクトされたマウスZcytor16受容体複合体からのシグナルトランスダクション応答を測定するために、バイオアッセイ細胞系として作用する。BHK細胞は、マウスZcytor16受容体を内因的に発現しない。

#### 【 0 4 7 5 】

典型的なルシフェラーゼレポーター哺乳類発現ベクターは、次の4種の遺伝子からのSTAT転写因子結合要素を含む相補的オリゴヌクレオチドにより構成されたKZ134プラスミドである：修飾されたc-fos Sis誘発性要素 (m67SIE又はhSIE) (Sadowski, H. など., Science 261: 1739-1744, 1993)、p21 WAF1遺伝子からのp21 SIE1 (Chin, Y. など., Science 272: 719-722, 1996)、 $\gamma$ -カゼイン遺伝子の乳腺応答要素 (Schmitt-Ney, M. など., Mol. Cell. Biol. 11: 3745-3755, 1991)、及びFc $\gamma$  RI遺伝子のSTAT誘発性要素 (Seidel, H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995)。

#### 【 0 4 7 6 】

それらのオリゴヌクレオチドは、Asp718 - XhoI適合性末端を含み、そして同じ酵素により消化されたc-Fosプロモーター (Poulsen, L.K. など., J. Biol. Chem. 273: 6229-6232, 1998) を有し、そしてネオマイシン選択マーカールを含む受容体ホタルルシフェラーゼレポーターベクター中に、標準の方法を用いて連結された。KZ134プラスミドを用いて、BHK又はBaF3細胞を標準のトランスフェクション及び選択方法により安定してトランスフェクトし、それぞれ、BHK/KZ134又はBaF3/KZ134細胞系を製造する。

#### 【 0 4 7 7 】

バイオアッセイ細胞を、mZcytor16 - mpl融合受容体のみによりトランスフェクトし、又は種々の他の既知受容体サブユニットの1つにより同時にトランスフェクトする。受容体複合体は、mZcytor16 - mpl受容体のみ、mZcytor16 - mpl受容体と1又は複数のCRF2-4、IL-9、IL-10、zcytor11、zcytor7クラスIIサイトカイン受容体サブユニット、又はIL-4受容体成分又はIL-2受容体成分 (IL-2R $\alpha$ 、IL-2R $\beta$ 、IL-2R $\gamma$ ) との種々の組合せ；mZcytor16 - mpl受容体と1又は複数のIL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分 (IL-4R $\alpha$ 、IL-13R $\alpha$ 、IL-13R $\beta$ )、及び他のインターロイキン受容体 (例えば、IL-15R $\alpha$ 、IL-7R $\alpha$ 、IL-9R $\alpha$ 、IL-21R (Zcytor16受容体)) との種々の組み合わせを包含するが、但しそれらだけには限定されない。

#### 【 0 4 7 8 】

次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、サイトカイン - ならし培地又は精製されたサイトカインの存在下でアッセイし、そしてルシフェラーゼ活性を通常の方法を用いて測定する。トランスフェクトされていないバイオアッセイ細胞系は、バックグラウンドルシフェラーゼ活性のための対照として作用し、そして従って、種々の受容体複合体組み合わせによるシグナルを比較するための基線として使用される。正しい受容体複合体の存在下でマウスZcytor16受容体を結合するならし培地又はサイトカインは、バックグラウンドよりも約5倍又はそれ以上のルシフェラーゼ読み取りを付与することが予測される。他方では、BaF3/ mZcytor16-mpl細胞系が上記のように同時 - トランスフェクトされ、そして増殖が測定される (例 8) 類似するアッセイを行うことができる。

#### 【 0 4 7 9 】

### 例 10 . COS細胞トランスフェクション及び分泌トラップ

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った：92  $\mu$ lの血清フリーDMEM培地 (500mlのDMEM中、55mgのピルビン酸ナトリウム、146mgのL - グルタミン、5mgのトランスフェリン、2.5mgのインスリン、1  $\mu$ gのセレニウム及び5mgのフェテュイン) 中、0.5  $\mu$ gのDNA及び5  $\mu$ lのリポフェクタミン (Gibco BRL) の混合物を、室温で30分間インキュベートし、そして次に、400mlの血清フリーDMEM培地を添加した。500  $\mu$ lの混合物を、 $1.5 \times 10^5$  個の

細胞/ウェルで12 - ウェル組織培養プレート上にプレートされ、そして37 で5時間前もってインキュベートされたCOS細胞上に添加した。追加の500  $\mu$  lの20% FBS DMEM培地 (500 mlのDMEM中、100mlのFBS、55mgのピルビン酸ナトリウム及び146mgのL - グルタミン) を添加し、そしてプレートを一晩インキュベートした。

#### 【0480】

分泌トラップを次の通りにして行った：培地を、PBSによりすすぎ、細胞を除き、そしてPBS中、1.8%ホルムアルデヒドにより15分間、固定した。次に、細胞を、TNT (水中、0.1Mのトリス - HCl、0.15MのNaCl、及び0.05%のTween - 20) により洗浄した。細胞を、PBS中、0.1% Triton - Xにより15分間、透過せしめ、そしてTNTにより洗浄した。細胞を、水中、TNB (0.1Mのトリス - HCl、0.15MのNaCl及び0.5%のブロッキング試薬 (NEN Renaissance TSA - Direct Kit) により1時間、阻止した。細胞を再びTNTにより洗浄した。次に、細胞を、TNB中、1 ~ 3  $\mu$  g/mlのヒトZcytor16可溶性受容体Fc4融合タンパク質 (Zcytor16sR - Fc4) (例11) と共に1時間インキュベートした。

10

#### 【0481】

細胞をTNTにより洗浄し、そして次に、TNB中に、1 : 200で希釈されたヤギ - 抗 - ヒトIg - HRP (Fc特異的 ; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) と共にさらに1時間インキュベートした。再び、細胞をTNTにより洗浄した。ヒトZcytor16sR - Fc4に陽性的に結合する抗体を、希釈緩衝液 (NENキット) 中、1 : 50に希釈されたフルオレセインチラミド試薬により検出し、そして4 ~ 6分間インキュベートし、そしてTNTにより洗浄した。細胞を、TNT中、1.5に希釈されたVectashield Mounting Media (Vector Labs Burlingame, CA) により保存した。細胞を蛍光顕微鏡上でFTTCフィルターを用いて可視化した。

20

#### 【0482】

Zcytor16はクラスIIサイトカイン受容体であるので、既知の又は孤児のクラスIIサイトカインとのZcytor16sR/Fc4融合タンパク質の結合を試験する。サイトカイン (中でも、IL - TIF、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、IL - 10) のcDNAを含むpZP7発現ベクターを、COS細胞中にトランスフェクトし、そしてトランスフェクトされたCOS細胞へのZcytor16sR/Fc4の結合を、上記のような分泌トラップアッセイを用いて行う。ヒトIL - TIFは陽性の結合を示した。それらのデータに基づけば、ヒトIL - TIF及びヒトZcytor16は、可能性あるリガンド - 受容体対である。類似する方法を用いて、マウスZcytor16がIL - TIFを結合するオルト体クラスII受容体であることを示す。

30

#### 【0483】

例11. トランスフェクトされたBHK570細胞からZcytor16 - Fc4ポリペプチドの精製

特にことわらない限り、すべての操作を4で行った。次の方法を、ヒトFc4に対するC - 末端融合体を含むヒトZcytor16ポリペプチド (Zcytor16 - Fc4; 例1) を精製するために使用した。ヒトZcytor16 - Fc4 (例2) によりトランスフェクトされたBHK570細胞からのならし培地約16, 500mlを、0.2  $\mu$  mの無菌フィルターを通して濾過し、そして次に、0.001mMのロイペプチン (Boehringer - Mannheim, Indianapolis, IN)、0.001mMのペプスタチン (Boehringer - Mannheim) 及び0.4mMのPefabloc (Boehringer - Mannheim) のプロテアーゼインヒビター溶液により補充した。

#### 【0484】

Porosタンパク質A50カラム (20mlの層体積、Applied Biosystems) を充填し、そして400mlのPBS (Gibco/BRL) により洗浄した。補充されたならし培地を、15ml/分の流速でカラム上に通し、続いて800mlのPBS (BRL/Gibco) により洗浄した。Zcytor16 - Fc4を、0.1Mのグリシン (pH3.0) によりカラムから溶出し、そして5mlの画分を、0.5mlの2Mのトリス (pH7.8) 中に直接的に集め、画分における最終pHを7.4に調節した。

40

#### 【0485】

カラム性能を、出発培地の還元性SDS - PAGEゲルのウェルターンプロット、及びカラム通過を通して特徴づけられた。ウェスタンプロットは、出発培地において60,000Daでの免疫反応性タンパク質を示す抗 - ヒトIgG HRP (Amersham) 抗体を使用し、ここで出発材料は前記カラム通過には存在せず、このことは完全な捕獲を示唆する。タンパク質A50溶出

50

画分を、還元性SDS PAGEゲルにより特徴づけた。このゲルは、画分3～11において60,000 Daでの強くクーマシーブルー染色されたバンドを示した。画分3～11をプールした。

【0486】

タンパク質A50溶出プールを、30,000Da Ultrafree Biomax 遠心分離濃縮機 (15mlの体積、Millipore) を用いて、44mlから4mlに濃縮した。Sephacryl S-300 ゲル濾過カラム (175mlの層体積; Pharmacia) を、350mlのPBS (BRL/Gibco) により洗浄した。濃縮されたプールを、1.5ml/分の流速でカラム上に注入し、続いて、225mlのPBS (BRL/Gibco) により洗浄した。溶出されたピークを、2ml画分に集めた。

【0487】

溶出された画分を、還元性及び非還元性銀染色された (Geno Technology) SDS PAGEゲルにより特徴づけた。還元性銀染色されたSDS PAGEゲルは、画分14～31において60,000Daでの強く染色されたバンドを示し、そして非還元性銀染色されたSDS PAGEゲルは、画分14～31において160,000Daでの強く染色されたバンドを示した。画分1～31をプールし、30,000Da Ultrafree Biomax遠心分離濃縮機 (15mlの体積、Millipore) を用いて、22mlに濃縮した。この濃縮物を、0.2μmのAcrodisc無菌フィルター (Pall Corporation) を通して濾過した。

【0488】

濃縮され、プールされた画分のタンパク質濃度を、BCA分析 (Pierce, Rockford, IL) により行い、そして材料をアリコートし、そして標準の方法に従って、-80℃で貯蔵した。プールされた画分の濃度は、1.50mg/mlであった。

この方法はまた、マウスZcytor16 - Fc4及び異種クラスII受容体Fc4融合体を精製するためにも使用される。

【0489】

例12. ノザンプロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒト及びマウスZcytor16組織分布

A. ノザンプロット及びドットプロットを用いてのヒトZcytor16組織分布:

ノザンプロット分析を、Human Multiple Tissue Northern Blots I, II, III (Clontech) 及び自家生成されたU - 937ノザンプロットを用いて行った。U - 937は、ヒト単芽球性前単球細胞系である。cDNAプローブを、オリゴZC25,9363 (配列番号16) 及びZC28,354 (配列番号17) を用いて生成した。PCR条件は次の通りであった: 94℃で1分; 94℃で15秒 (30サイクル); 60℃で30秒; 72℃で30秒及び72℃での5分間の最終延長。364bpの生成物を、1% TBEゲル上でのゲル電気泳動によりゲル精製し、そしてバンドをレーザーブレードにより切除する。

【0490】

cDNAを、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いてアガロースから抽出した。9ngのこのフラグメントを、Rediprime II (Amersham), すなわちランダムプライムラベリングシステムを用いて、<sup>32</sup>P - dCTPにより、製造業者の説明書に従って放射性ラベルした。組込まれなかった放射能を、Nuc - Trapカラム (Stratagene) を用いて、その製造業者の説明書に従って除去した。プロットを、ExpressHyb (Clontech) 溶液において65℃で3時間、プレハイブリダイズした。

【0491】

プロットを、 $1.0 \times 10^6$  cpm/mlのラベルされたプローブ、0.1mg/mlのサケ精子DNA及び0.5μg/mlのヒトcot - 1 DNAを含むExpresshyb溶液において65℃で一晩ハイブリダイズした。プロットを、2 × SSC、0.1% SDSにより室温で、0.1 × SSC、0.1% SDSにより55℃で30分間、2度、洗浄した。約1.0kb及び3.0kbのサイズの転写体を、脾臓及び胎盤において検出したが、しかし試験された他の組織においては検出しなかった。同じサイズの転写体及び追加の約1.2kbの転写体を、U - 937細胞系において検出した。

【0492】

B. PCRを用いての組織cDNAパネルにおけるヒトZcytor16の組織分布:

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、Zcytor16発現についてスクリーンした。

パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ヒト組織からの77種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表5に示される。前記cDNAは自家ライブラリーからであり、又はマラソンcDNAは自家RNA調製物、すなわちClontech RNA又はInvitrogen RNAからであった。マラソンcDNAは、マラソン - Ready<sup>TM</sup> キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、そしてクラスリンプライマーZC21,195 (配列番号18) 及びZC21,196 (配列番号19) によりQC試験し、そして次に、クラスリンバンドの強さに基づいて希釈された。

#### 【0493】

パネルサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の3種の試験を行った：(1) ライブラリーのために使用されるRNA品質を評価するために、自家cDNAを、個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、平均挿入体について試験し；(2) パネルサンプルにおけるcDNAの濃度の標準化を、5' ベクターオリゴZC14,063 (配列番号20) 及び3' - チューブリン特異的オリゴプライマーZC17,574 (配列番号21) 又は3' G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600 (配列番号22) を用いて、十分な長さの チューブリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、標準のPCR方法を用いて達成し；そして(3) サンプルを、可能なリボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。パネルを、ヒトゲノムのDNA (Clontech, Palo, Alto, CA) 陽性対照サンプルを含む96 - ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2 ~ 100pg/μlのcDNAを含んだ。

#### 【0494】

PCR反応を、オリゴZC25,963 (配列番号30) 及びZC25,964 (配列番号31)、Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech)、及びRadiload 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った：94 で1分 (1サイクル)、94 で10秒、60 で30秒及び72 で30秒 (38サイクル)、続いて72 で5分 (1サイクル)。予測される正しいDNAフラグメントサイズを、骨髄、胎児心臓、胎児腎臓、胎児筋肉、胎児皮膚、心臓、乳腺、胎盤、唾液腺、骨格筋、小腸、脊椎、脾臓、腎臓、胎児脳、食道腫瘍、子宮腫瘍、胃腫瘍、卵巣腫瘍、直腸腫瘍、肺腫瘍及びRPMI - 1788 (B - リンパ球細胞系) において観察した。Zcytor16発現は、このパネルにおいて試験された他の組織及び細胞系においては観察されなかった。

#### 【0495】

Zcytor16の発現パターンは、一定の組織 - 特異的腫瘍、特に卵巣癌、胃癌、子宮癌、直腸癌、肺癌及び食道癌における発現を示し、ここでZcytor16は、正常な組織においては発現されないが、しかし腫瘍細胞においては発現される。当業者は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体及び結合パターンが、生検、組織又は組織サンプル、特に卵巣癌、胃癌、子宮癌、直腸癌、肺癌及び食道癌組織における癌又は癌組織を検出するために診断剤として使用され得ることを理解する。本発明の分子についてのそのような診断使用は、当業界において知られており、そして本明細書に記載される。

#### 【0496】

さらに、ヒトZcytor16、すなわち1つのIL - TIFの受容体の発現パターンが、一定の特定の組織及び組織 - 特異的腫瘍における発現を示すので、天然のリガンド、すなわちIL - TIFを包含する結合パターンはまた、生検、組織又は組織学的サンプル (ここで、IL - TIF受容体が発現される)、及び特に、卵巣癌、胃癌、子宮癌、直腸癌、肺癌及び食道癌における特定の組織 (正常又は異常)、癌又は癌組織を検出するための診断剤としても使用され得る。IL - TIFはまた、その受容体、例えばZcytor16及びzcytor11が発現される他の組織を標的化するためにも使用され得る。さらに、そのような結合パターンは、腫瘍又は疾病組織の部位に治療剤を標的化するために、化学療法剤、毒性成分及び同様のものに接合され得る。そのような診断及び標的化された治療使用は、当業界において知られており、そして本明細書に記載される。

#### 【0497】

市販の第1鎖cDNAパネル (Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA

10

20

30

40

50

）をまた、上記のようにしてアッセイした。パネルは次のサンプルを含んだ：単核細胞、活性化された単核細胞、静止CD4+細胞、活性化されたCD4+細胞、静止CD8+細胞、活性化されたCD8+細胞、静止CD14+細胞、静止CD19+細胞及び活性化されたCD19+細胞。活性化されたCD4+細胞及び活性化されたCD19+細胞はZcytor16発現を示し、そして試験された他の細胞、例えば休止CD4+及び休止CD19+細胞はそうではなかった。

【 0 4 9 8 】

【 表 5 】

表 5

| 組織          | サンプル# |  | 組織         | サンプル# |
|-------------|-------|--|------------|-------|
| 副腎          | 1     |  | 膀胱         | 1     |
| 骨髄          | 3     |  | 脳          | 2     |
| 頸部          | 1     |  | 結腸         | 1     |
| 胎児脳         | 3     |  | 胎児心臓       | 2     |
| 胎児腎臓        | 1     |  | 胎児肝臓       | 2     |
| 胎児肺         | 1     |  | 胎児皮膚       | 1     |
| 心臓          | 2     |  | 胎児筋肉       | 1     |
| 腎臓          | 2     |  | 肝臓         | 1     |
| 肺           | 1     |  | リンパ節       | 1     |
| 乳腺          | 1     |  | メラノーマ      | 1     |
| 卵巣          | 1     |  | 脾臓         | 1     |
| 下垂体         | 2     |  | 胎盤         | 3     |
| 前立腺         | 3     |  | 直腸         | 1     |
| 唾液腺         | 2     |  | 骨格筋        | 1     |
| 小腸          | 1     |  | 脊椎         | 2     |
| 脾臓          | 1     |  | 子宮         | 1     |
| 胃           | 1     |  | 脂肪細胞ライブラリー | 1     |
| 精巣          | 5     |  | ランゲルハンス島   | 1     |
| 胸腺          | 1     |  | 前立腺SMC     | 1     |
| 甲状腺         | 2     |  | RPMI1788   | 1     |
| 気管支         | 1     |  | WI38       | 1     |
| 食道腫瘍        | 1     |  | 肺腫瘍        | 1     |
| 肝臓腫瘍        | 1     |  | 卵巣腫瘍       | 1     |
| 直腸腫瘍        | 1     |  | 胃腫瘍        | 1     |
| 子宮腫瘍        | 2     |  | CD3+ライブラリー | 1     |
| HaCATライブラリー | 1     |  | HPVライブラリー  | 1     |
| HPVSライブラリー  | 1     |  | MG63ライブラリー | 1     |
| K562        | 1     |  |            |       |

【 0 4 9 9 】

C. RT - PCRを用いてのヒト組織及び細胞系RNAパネルにおけるヒトZcytor16の組織分布：  
ヒト細胞系からのRNAのパネルを、RT - PCRを用いて、ヒトZcytor16発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして表 6 ~ 9 に示されるように、種々の正常及び癌性ヒト組織及び細胞系からの84種のRNAを含んだ。RNAは、自家又は購入された組織及び細胞

10

20

30

40

50

系から、RNAeasy Midi又はMiniキット (Qiagen, Valencia, CA) を用いて製造された。パネルは、サンプル当たり100ngのRNAを用いて、96 - ウェル型で設定された。RT - PCR反応は、オリゴヌクレオチドZC25,963 (配列番号30) 及びZC25,964 (配列番号31)、Rediload組織及びSUPERSCRIPT One RT-PCR System (Life Technologies, Gaithersburg, MD) を用いて設定された。

#### 【0500】

増幅を次の通りにして行った：50 で30分 (1サイクル)、続いて94 で15秒、59 で30秒、72 で30秒 (40サイクル)、次に72 で5分の最終延長。8 ~ 10  $\mu$  lのPCR反応生成物を、4 %アガロースゲルを用いて、標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。184bpの正しい推定されるcDNAフラグメントは、細胞系U-937、HL-60、ARPE-19、HaCat#1、HaCat#2、HaCat#3、及びHaCat#4；膀胱、癌性乳房、癌に隣接する正常乳房、気管支、結腸、潰瘍性大腸炎、十二指腸、子宮内膜、食道、胃 - 食道、心臓左心室、心臓心室、回腸、肝臓、肺、リンパ節、リンパ腫、乳房腺癌、乳腺、癌性卵巣、膵臓、耳下腺及び皮膚、脾臓リンパ腫及び小腸において観察された。Zcytor16発現は、このパネルにおいて試験された他の組織及び細胞系においては観察されなかった。

10

#### 【0501】

Zcytor16は、次の正常組織においてPCRにより検出可能的に発現される：消化系、例えば食道、胃 - 食道、膵臓、十二指腸、回腸、結腸、小腸；女性生殖系、例えば乳腺、子宮内膜、乳房 (癌組織に隣接する)；及び他の系、例えばリンパ節、皮膚、耳下腺、膀胱、気管支、心臓心室及び腎臓。さらに、Zcytor16は、次のいくつかのヒト腫瘍においてPCRにより検出可能的に発現される：女性生殖組織に関連する腫瘍、例えば乳腺癌、卵巣癌、子宮癌、他の乳癌；及び他の組織、例えばリンパ腫、胃腫瘍及び肺腫瘍。Zcytor16の発現は、女性生殖器官の正常組織、及びそれらの器官に関連するいくつかの腫瘍において見出される。Zcytor16は、Zcytor16が過剰発現され得るそれらの腫瘍のためのマーカーとして作用することができる。

20

#### 【0502】

Zcytor16に関して陽性のいくつかの癌は、外胚葉/上皮起源 (乳腺癌及び他の乳癌) に関連する。従って、Zcytor16は、上皮組織、例えば消化系及び女性生殖器官における上皮組織 (例えば、子宮内膜組織、上皮柱)、及び癌を包含する上皮組織のためのマーカーとして作用することができる。さらに、好ましい態様においては、Zcytor16は、一定の組織 - 特異的腫瘍、特に卵巣癌、胃癌、子宮癌、直腸癌、肺癌、及び食道癌のためのマーカーとして作用することができ、ここでZcytor16は正常組織においては発現しないが、しかし腫瘍組織においては発現される。診断目的のためへの本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体の使用は、当業者において知られており、そして本明細書に開示される。

30

#### 【0503】

#### 【表6】

表 6

| 組織         | サンプル# |  | 組織     | サンプル# |
|------------|-------|--|--------|-------|
| 副腎         | 6     |  | 十二指腸   | 1     |
| 膀胱         | 3     |  | 子宮内膜   | 5     |
| 脳          | 2     |  | 癌性十二指腸 | 1     |
| 脳髄膜腫       | 1     |  | 胃癌     | 1     |
| 乳房         | 1     |  | 食道     | 7     |
| 乳癌         | 4     |  | 胃－食道   | 1     |
| 癌に隣接する正常乳房 | 5     |  | 心臓大動脈  | 1     |
| 気管支        | 3     |  | 心臓左心室  | 4     |
| 結腸         | 15    |  | 心臓右心室  | 2     |
| 癌性結腸       | 1     |  | 心臓心室   | 1     |
| 癌に隣接する正常結腸 | 1     |  | 回腸     | 3     |
| 潰瘍性結腸炎     | 1     |  | 腎臓     | 15    |
|            |       |  | 癌性腎臓   | 1     |

10

20

【 0 5 0 4 】

【 表 7 】

表 7

| 組織/細胞系                   | サンプル# | 組織/細胞系     | サンプル# |
|--------------------------|-------|------------|-------|
| 293                      | 1     | HBL-100    | 1     |
| C32                      | 1     | Hs-294T    | 1     |
| HaCa#1                   | 1     | Molt4      | 1     |
| HaCa#2                   | 1     | RPMI       | 1     |
| HaCa#3                   | 1     | U-937      | 1     |
| HaCa#4                   | 1     | A-375      | 1     |
| WI-38                    | 1     | HCT-15     | 1     |
| WI-38+2 $\mu$ mのイノマイシン#1 | 1     | HT-29      | 1     |
| WI-38+2 $\mu$ mのイノマイシン#2 | 1     | MRC-5      | 1     |
| WI-38+5 $\mu$ mのイノマイシン#1 | 1     | RPT-1      | 1     |
| WI-38+5 $\mu$ mのイノマイシン#2 | 1     | RPT-2      | 1     |
| Caco-2                   | 1     | WM-115     | 1     |
| Caco-2, 分化された            | 1     | A-431      | 1     |
| DLD-1                    | 1     | WERI-Rb-1  | 1     |
| HRE                      | 1     | HEL-92.1.7 | 1     |
| HRCE                     | 1     | HuH-7      | 1     |
| MCF7                     | 1     | MV-4-11    | 1     |
| PC-3                     | 1     | U-138      | 1     |
| TF-1                     | 1     | CCRF-CEM   | 1     |
| 5637                     | 1     | Y-79       | 1     |
| 143B                     | 1     | A-549      | 1     |
| ME-180                   | 1     | EL-4       | 1     |
| 前立腺上皮                    | 1     | HeLa229    | 1     |
| U-20S                    | 1     | HUT78      | 1     |
| T-47D                    | 1     | NCI-H69    | 1     |
| Mg-63                    | 1     | SaOS2      | 1     |
| Raji                     | 1     | USMC       | 1     |
| U-373-MG                 | 1     | UASMC      | 2     |
| A-172                    | 1     | AoSMC      | 1     |
| CRL-1964                 | 1     | UtSMC      | 1     |
| CRL-1964+酪酸              | 1     | HepG2      | 1     |
| HUVEC                    | 1     | HepG2-IL6  | 1     |
| SK-Hep-1                 | 1     | NHEK#1     | 1     |
| SK-Lu-1                  | 1     | NHEK#2     | 1     |
| SK-MEL-2                 | 1     | NHEK#3     | 1     |
| K562                     | 1     | NHEK#4     | 1     |
| BeWo                     | 1     | ARPE-19    | 1     |
| FHS74. Int               | 1     | G-361      | 1     |
| HL-60                    | 1     | HISM       | 1     |
| Malme 3M                 | 1     | 3AsubE     | 1     |
| FHC                      | 1     | INT407     | 1     |
| HREC                     | 1     |            |       |

10

20

30

40

【 0 5 0 5 】

【 表 8 】



表 8

| 組織                    | サンプル# | 組織        | サンプル# |
|-----------------------|-------|-----------|-------|
| 肝臓                    | 10    | 肺         | 13    |
| リンパ節                  | 1     | 癌性肺       | 2     |
| リンパ腫                  | 4     | 癌に隣接する正常肺 | 1     |
| 乳腺腫                   | 1     | 筋肉        | 3     |
| 乳腺                    | 3     | 神経芽腫      | 1     |
| メリノリオーマ (melinorioma) | 1     | 網         | 2     |
| 骨原性肉腫                 | 2     | 卵巣        | 6     |
| 脾臓                    | 4     | 癌性卵巣      | 2     |
| 皮膚                    | 5     | 耳下腺       | 7     |
| 肉腫                    | 2     | 唾液腺       | 4     |

10

【 0 5 0 6 】

【 表 9 】

20

表 9

| 組織     | サンプル# | 組織  | サンプル# |
|--------|-------|-----|-------|
| 小腸     | 10    | 子宮  | 11    |
| 脾臓     | 3     | 子宮癌 | 1     |
| 脾臓リンパ腫 | 1     | 甲状腺 | 9     |
| 胃      | 13    |     |       |
| 胃癌     | 1     |     |       |

30

【 0 5 0 7 】

D. PCRを用いての組織パネルにおけるマウスZcytor16の組織分布：

ネズミ組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、マウスZcytor16発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ネズミ組織からの49種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表10に示される。前記cDNAは自家cDNAライブラリー又はマラソンcDNAからである。それらのcDNAを創造するために使用されるRNAは、自家RNA preps, Clontech RNA 又はInvitrogen RNAのいずれかからである。マウスマラソンcDNAは、マラソン - Ready<sup>TM</sup> キット (Clontech, Palo Alto, CA) を用いて製造され、そしてマウストランスフェリンプライマーZC10,651 (配列番号42) 及びZC10,565 (配列番号43) によりQC試験し、そして次に、トランスフェリンバンドの強さに基づいて希釈された。

40

【 0 5 0 8 】

自家ライブラリーを希釈し、ウエル当たり25ngのcDNAを供給した。パネルにおける増幅されたライブラリーサンプルの性質を評価するために、品質管理 (QC) についての次の3種の試験を行った： (1) ライブラリーのために使用されるRNA品質を評価するために、自家cDNAを、個々のcDNAライブラリーについてのベクター配列に対して特異的であるベクターオリゴによるPCRにより、平均挿入体について試験し； (2) パネルサンプルにおけるc

50

DNAの濃度の標準化を、5'ベクターオリゴZC14,063(配列番号20)及び3'-チューブリン特異的オリゴプライマーZC17,574(配列番号21)又は3'G3PDH特異的オリゴプライマーZC17,600(配列番号22)を用いて、十分な長さのチューブリン又はG3PDH cDNAを増幅するために、標準のPCR方法を用いて達成し;そして(3)サンプルを、可能なりボソーム又はミトコンドリアDNA汚染について調べるために配列決定に送った。

# 【0509】

パネルを、ヒトゲノムのDNA(Clontech, Palo, Alto, CA)陽性対照サンプルを含む96-ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2~100pg/ $\mu$ lのcDNAを含んだ。PCRを、オリゴZC38,001(配列番号44)及びZC38,022(配列番号45)、Advantage 2 Taq Polymerase Mix(Clontech, Palo Alto, CA), 及びRadiload 色素(Research Genetics, Inc., Huntsville, AL)を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った: 94 で2分(1サイクル); 94 で10秒、60 で20秒及び68 で30秒(35サイクル)、続いて68 で7分(1サイクル)。約12.5 $\mu$ lのPCR反応生成物を、約4%のアガロースゲルを用いて、標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。

10

# 【0510】

114塩基対の予測される正しいDNAフラグメントを、肺、脾臓、胎盤、唾液腺、骨格筋、皮膚、小腸、平滑筋、脾臓、胃及び精巣cDNAにおいて観察した。マウスZcytor16についてのそれらの初期発現結果は、本明細書において論じられるヒトZcytor16に関して見出される発現データを補強し、このことは、動物モデル、例えばマウスモデルへのマウスZcytor16の使用がヒトにおいて見出されるZcytor16のインビボ発現及び機能に合理的に影響を与えることを示唆する。

20

# 【0511】

## 【表10】

表10

| 組織         | サンプル<br># |  | 組織             | サンプル<br># |
|------------|-----------|--|----------------|-----------|
| 229        | 1         |  | 脾臓             | 1         |
| 7F2        | 1         |  | 胎盤             | 2         |
| 脂肪細胞-増幅された | 1         |  | Jakotay-前立腺細胞系 | 1         |
| ATC1.9     | 1         |  | NeLix-前立腺細胞系   | 1         |
| 脳          | 4         |  | Paris-前立腺細胞系   | 1         |
| CCC4       | 1         |  | Torres-前立腺細胞系  | 1         |
| CD90+増幅された | 1         |  | Tuvak-前立腺細胞系   | 1         |
| OC10B      | 1         |  | 唾液腺            | 2         |
| 樹状突起       | 1         |  | 骨格筋            | 1         |
| 胚          | 1         |  | 皮膚             | 2         |
| 心臓         | 2         |  | 小腸             | 1         |
| 腎臓         | 3         |  | 平滑筋            | 2         |
| 肝臓         | 2         |  | 脾臓             | 2         |
| 肺          | 2         |  | 胃              | 1         |
| MEWt#2     | 1         |  | 精巣             | 3         |
| P388D1     | 1         |  | 胸腺             | 1         |

30

40

# 【0512】

50

### 例13. 全長zcytor11を発現する発現ベクターの構成

完全なzcytor11受容体（共通所有のアメリカ特許第5,965,704号）を、全長zcytor16受容体cDNA（配列番号24；配列番号25のアミノ酸配列）及びプロマイシン耐性遺伝子を含むプラスミドpZP7PからのEcoRI及びXhoIによる消化により単離した。消化物を、1%低溶融点アガロース（Boehringer Mannheim）ゲル上で展開し、そして約1.5kbのzcytor11 cDNAを、Qiaquick<sup>TM</sup> ゲル抽出キット（Qiagen）を用いて、その製造業者の説明書に従って単離した。精製されたzcytor11 cDNAを下記のようにして、発現ベクター中に挿入した。

#### 【0513】

受容体発現ベクターpZP-7を、EcoRI（BRL）及びXbaI（BRL）により、製造業者の説明書に従って消化し、そして上記のようにしてゲル精製した。このベクターフラグメントを、上記で単離された、EcoRI及びXbaI切断されたMPL-zcytor17キメラ及び、EcoRI/BamHI 5' MPLフラグメントと共に連結反応において組合した。この連結は、T4リガーゼ（BRL）を用いて、12℃で一晩、行われた。連結のサンプルを、DH10B ElectroMAX<sup>TM</sup> エレクトロコンピテントE.コリ細胞においてエレクトロポレートした（25µF、200Ω、1.8V）。形質転換体をLB+アンピシリンプレート上にプレートし、そして単一のコロニーを、2mlのLB+アンピシリン中に採取し、そして一晩、増殖した。プラスミドDNAを、Wizard Miniprep s（Promega）を用いて単離し、そして個々をEcoRI及びXhoIにより消化し、挿入体の存在を確かめた。挿入体は約1.5kbであり、そして十分な長さであった。SpeI及びPstIによる消化を用いて、ベクターの正体を確かめた。

#### 【0514】

### 例14. CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞（BaF3/CRF2-4細胞）及びzcytor11受容体と共にCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞（BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞）の構成

十分な長さのCRF2-4受容体を発現するBaF3細胞を、下記CRF2-4発現ベクター30µgを用いて構成した。CRF2-4受容体を発現する前記BaF3細胞を、BaF3/CRF2-4を命名した。それらの細胞を対照として使用し、そしてさらに、十分な長さのzcytor11受容体によりトランスフェクトし（アメリカ特許第5,965,704号）、そして下記のようにしてIL-TIF活性についてのスクリーンを構成するために使用した。

#### 【0515】

#### A. CRF2-4受容体を発現するBaF3細胞の構成：

CRF2-4（Genbank受容体番号Z17227号）の十分な長さのcDNA配列を、Daudi細胞系cDNAライブラリーから単離し、そして次に、発現ベクターpZP7P中にクローン化した。

BaF3、すなわちネズミ骨髄に由来するインターロイキン-3（IL-3）依存性プレ-リンパ球細胞系（Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot など., Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986）を、10%熱-不活性化されたウシ胎児血清、2ng/mlのネズミIL-3（mIL-3）（R&D, Minneapolis, MN）、2mMのL-glutaMax-1<sup>TM</sup>（Gibco BRL）、1mMのビルビン酸ナトリウム（Gibco BRL）及びPSN抗生物質（Gibco BRL）により補充された完全培地（RPMI培地（JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS））において維持した。

#### 【0516】

エレクトロポレーションの前、CRF2-4/pZP7Pを調製し、そしてQiagen Maxi Prepキット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。エレクトロポレーションのためのBaF3細胞を、血清フリーRPMI培地により1度洗浄し、そして次に、血清フリーRPMI培地に10<sup>7</sup>個の細胞/mlの細胞密度で再懸濁した。1mlの再懸濁されたBaF3細胞を、30µgのCRF2-4/pZP7PプラスミドDNAと共に混合し、そして別々の使い捨てエレクトロポレーションチャンバー（GIBCO BRL）に移した。室温で、15分間のインキュベーションの後、細胞に、エレクトロポレーション装置（CELL-PORATOR<sup>TM</sup>; GIBCO BRL）により供給される2回の連続したショック（800 1Fad/300V.; 1180 1Fad/300V.）を与えた。

#### 【0517】

5-分間の回収時間の後、エレクトロポレートされた細胞を、50mlの完全培地に移し、そしてインキュベーターに、15-24時間（37℃、5%CO<sub>2</sub>）配置した。次に、細胞を回転沈降し、そしてT-162フラスコにおいて、2µg/mlのプロマイシンを含む完全培地50mlに再懸濁

し、プロマイシン耐性プールを単離した。この後、BaF3/CRF2-4細胞と呼ばれる、トランスフェクトされたBaF3細胞のプールを、下記のようにして、シグナル化能力についてアッセイした。さらに、それらの細胞を、下記のようにして、zcytor11受容体によりトランスフェクトした。

【0518】

B. CRF2-4及びzcytor11受容体を発現するBaF3細胞の構成：

十分な長さのzcytor11受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞を、上記例6に記載されるzcytor11発現ベクター30 $\mu$ gを用いて、上記例5Aに従って構成した。回収に続いて、トランスフェクタントを、200 $\mu$ g/mlのゼオシン及び2 $\mu$ g/mlのプロマイシンを用いて選択した。zcytor11受容体を発現するBaF3/CRF2-4細胞を、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞として命名した。それらの細胞を用いて、IL-TIF活性、及び例15に記載されるZcytor16アンタゴニスト活性についてスクリーンした。

10

【0519】

例15. Almar Blue増殖アッセイにおけるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を用いてのIL-TIFアンタゴニスト活性のスクリーニング

A. Almar Blue増殖アッセイにおけるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を用いてのIL-TIF活性のスクリーニング：

精製されたIL-TIF-CEE（例19）を用いて、下記のようにして増殖活性の存在について試験した。精製されたヒトZcytor16-Fc4（例11）を用いて、下記のようにしてこのアッセイにおいてIL-TIFの増殖応答を拮抗した。

20

【0520】

BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を、回転沈降し、そして上記例7Aに記載のようにして、但し、mIL3（この後、“mIL-3遊離培地”として言及される）を用いなくて、洗浄した。細胞を、回転し、そして3度洗浄し、mIL-3の除去を確保した。次に、細胞を血球計により計数した。細胞を、mIL-3遊離培地を用いて、ウェル当たり100 $\mu$ lの体積において、ウェル当たり5000個の細胞での96-ウェル形式でプレートした。

【0521】

BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞の増殖を、mIL-3遊離培地により、50, 10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06ng/mgの濃度に希釈にされたIL-TIF-CEEタンパク質を用いて評価した。100 $\mu$ lの前記希釈されたタンパク質を、BaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に添加した。合計アッセイ体積は200 $\mu$ lである。アッセイプレートを、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で3日間インキュベートし、この時点で、Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) を、20 $\mu$ l/ウェルで添加した。プレートを再び、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で24時間インキュベートした。Alamar Blueは、生存細胞の数に基づいて蛍光測定読み取りを与え、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的な測定である。

30

【0522】

プレートを再び、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>下で24時間インキュベートした。プレートを、波長544（励起）及び590（発光）で、SoftMax<sup>TM</sup> Proプログラムを用いて、Fmax<sup>TM</sup> プレートリーダー（Molecular Devices Sunnyvale, CA）上で読み取った。結果は、IL-TIF-CEEに対するBaF/CRF2-4/zcytor11細胞の用量-依存性増殖応答を確かめた。その応答は、測定される場合、50ng/mlの上限でバックグラウンドの約15倍～0.06ng/mgの下限での2倍の誘発であった。BaF3野生型細胞及びBaF3/CRF2-4細胞は、IL-TIF-CEEに反応して増殖せず、このことは、IL-TIFがCRF2-4/zcytor11ヘテロダイマー受容体に対して特異的であることを示す。

40

【0523】

Zcytor16がIL-TIF活性を拮抗できるかどうかを決定するために、上記アッセイを、精製された可溶性ヒトZcytor16/Fc4を用いて反復した。IL-TIFが10 $\mu$ g/mlでZcytor16と組合せられる場合、すべての濃度でのIL-TIFに対する応答は、バックグラウンドまで下降された。IL-TIFの増殖効果を可能にされた可溶性ヒトZcytor16の存在は、それがIL-TIFリガンドの可能性あるアンタゴニストであることを示す。このアッセイはまた、IL-TIFの拮

50

抗におけるマウスZcytor16活性を評価するためにも使用される。類似する結果が予測される。

#### 【0524】

#### 例16. MES13細胞におけるレポーターミニ - 遺伝子のIL - TIF活性化及びヒトZcytor16 - Fc4による活性の阻害

MES13細胞 (ATCC No. CRL-1927) を、ピルベート及び10%血清 (HyClone) により補充されたDMEM成長培地 (Life Technologies) を含む96 - ウェル組織培養クラスター (Costar) において、10,000個の細胞/ウェルでプレートした。次の日、培地を、0.1% BSA (Fract ionV: Sigma) により血清を置換することによって、血清フリーDMEM培地に交換した。この培地はまた、1000: 1の感染の多重度 (m.o.i.)、すなわち細胞当たり1000個のアデノ

10

#### 【0525】

細胞におけるアデノウイルス構造体の24時間の組み込みを可能にした後、培地を交換し、そして血清 - フリー培地により置換した。組換えZcytor16-Fc4融合体を有するか又は有さないヒト組換えIL - TIFを、ウェルにおいてその示される最終濃度で添加した (下記表11に記載されるようにして)。IL - TIF及びZcytor16 - Fc4の両者の希釈を、血清フリー培地により行った。0.1% BSAを、基本的アッセイ対照のために添加した。4時間後、細胞を溶解し、そしてレポーター遺伝子の活性化を示すルシフェラーゼ活性を、ルシフェラーゼアッセイシステムアッセイキット (Promega) 及びLabsystems Luminoskan発光計 (Labsyste ms, Helsinki, Finland) を用いて、溶解物において決定した。活性は、溶解物におけるルシフェラーゼ単位 (LU) として表される。結果は、下記表11に示される。

20

#### 【0526】

#### 【表11】

表11

| IL-TIFのレベル (ng/ml) | LU w/o zcytoR16 | LU w/10 $\mu$ /ml zcytoR16 |
|--------------------|-----------------|----------------------------|
| 0 (基本的BSA対照)       | 103 $\pm$ 2     | 104 $\pm$ 2                |
| 0.03               | 105 $\pm$ 3     | 104 $\pm$ 4                |
| 0.3                | 108 $\pm$ 4     | 99 $\pm$ 6                 |
| 3                  | 134 $\pm$ 8     | 98 $\pm$ 15                |
| 30                 | 188 $\pm$ 16    | 110 $\pm$ 3                |
| 300                | 258 $\pm$ 21    | 112 $\pm$ 30               |

30

#### 【0527】

それらの結果は、次の1つのことを示す: 第1に、MES13細胞はヒト組換えIL - TIFに対して応答し、そして従って、サイトカインのための内因性機能的受容体を有する。第2に、ヒトzcytoR16 - Fc4受容体融合体は、このサイトカインが使用される最高の用量でさえ、IL - TIFに対する応答を効果的に阻止するアンタゴニストとして作用する。従って、zcytor 16は、IL - TIFに対する内因的に応答できる細胞 (MES13)、すなわちサイトカインに応答するために追加の受容体成分の外因性発現を必要としない細胞に対するIL - TIFの効果的アンタゴニストである。このアッセイはまた、IL - TIFを拮抗することにおけるマウスZcy tor16活性を評価するために使用される。類似する結果が予測される。

40

#### 【0528】

アデノウイルスKZ136ベクターの構成は次の通りであった。オリジナルKZ136ベクターは、

50

Poulsen, LKなど. J. Biol. Chem. 273: 6228, 1998に開示される。CMVプロモーター/エンハンサー及びSV40 pA配列を、pACCMV. PLpA (T.C. Beckerなど., Meth. Immunology 43: 161-189, 1994) から取り出し、そしてAsp717/KpnI及びHind III部位 (オリゴZC13252 (配列番号26) 及びZC13453 (配列番号27)) を含むリンカーにより置換した。

#### 【0529】

STAT/SRE駆動のルシフェラーゼレポーターカセットを、Asp718/kpnI - Hind IIIフラグメントとして、ベクターKZ136 (Poulsen, LKなど., 前記) から切除し、そして適合されたpACベクター中に挿入した。組換えKZ136アデノウィルス (T.C. Beckerなど., 前記に記載のようにして、JM17アデノウィルスによる293細胞のトランスフェクションにより生成した。ブラック精製されたウィルスを増幅し、そしてアッセイの12~48時間前、5~50pfu/細胞での培養された細胞の感染のために使用した。ルシフェラーゼレポーターアッセイを、Poulsen, LKなど., 前記に記載のようにして、96ウェルマイクロプレートにおいて行った。

#### 【0530】

#### 例17. CEE - 標識されたIL - TIFを生成するための構造体

オリゴヌクレオチドを、Kozak配列及びIL - TIFのためのコード領域を含むが、その停止コドンを持たないPCRフラグメントを生成するために企画した。それらのオリゴヌクレオチドを、5'末端でKpnI部位及び3'末端でBamHI部位を有するよう企画し、C-末端Glu - Glu標識された (配列番号10) タンパク質の哺乳類発現のための本発明の標準ベクターのpHZ200 - CEE中へのクローニングを促進した。pHZ200ベクターはMT - 1プロモーターを含む。

#### 【0531】

PCR反応を、IL - TIF cDNAフラグメントを増幅するために、Turbo Pfuポリメラーゼ (Stratagene) を用いて行った。約20ngのヒトIL - TIFポリヌクレオチド鋳型 (配列番号14)、及びオリゴヌクレオチドZC28,590 (配列番号28) 及びZC28,580 (配列番号29) を、PCR反応に使用した。PCR反応条件は次の通りであった: 90 で60秒、55 で60秒及び72 で60秒 (30サイクル); 及び72 で10分; 続いて4 での維持。PCR生成物を、アガロース電気泳動により分離し、そしてQiaQuick<sup>TM</sup> (Qiagen) ゲル抽出キットを用いて精製した。単離された約600bpのDNAフラグメントを、KpnI及びBamHI (Boehringer - Mannheim) により消化し、上記のようにしてゲル精製し、そしてKpnI及びBamHIにより前もって消化されたpHZ200 - CEE中に連結した。

#### 【0532】

約1 µlの連結反応物を、DH10B ElectroMax<sup>TM</sup> コンピテント細胞 (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) 中に、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートし、そして100 µg/mlのアンプシリンを含むLBプレート上にプレートし、そして一晩インキュベートした。コロニーを採取し、そして上記のようなPCR条件と共に、オリゴヌクレオチドZC28,590 (配列番号28) 及びZC28,580 (配列番号29) を用いて、PCRによりスクリーンした。次に、挿入体を含むクローンを配列決定し、誤りのないIL - TIF挿入体を確認した。配列分析により確かめられるような正しいpHZ200 - IL - TIF - CEE構造体のMaxiprepsを行った。

#### 【0533】

#### 例18. IL - TIF可溶性受容体ポリペプチドのトランスフェクション及び発現

BHK570細胞 (ATCC No. CRL-10314) を、800 µlの血清フリー (SF) DMEM培地 (DMEM, Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) において、約 $1.2 \times 10^6$ 個の細胞/ウェル (6 - ウェルプレート) でプレートした。細胞を、血清フリー (SF) DMEM中、Lipofectin<sup>TM</sup> (Gibco BRL) を用いて、製造業者の説明書に従って、上記 (例10) IL - TIF - CEE包含発現プラスミドによりトランスフェクトした。

#### 【0534】

細胞を、37 で約5時間インキュベートし、次に、30mlのDMEM/5%のウシ胎児血清 (FBS) (Hyclone, Logan, UT) の最終体積で150mmのMAXIプレートを分離するために移した。プレートを37、5% CO<sub>2</sub> 下で一晩インキュベートし、そしてDNA: Lipofectin<sup>TM</sup> 混合物を、選択培地 (5% FBS/DMEM及び1 µMのメトトレキサート (MTX)) により次の日、置換し

た。

# 【 0 5 3 5 】

トランスフェクションの約10～12日後、コロニーを、5  $\mu$ MのMTXを有する5%FCS/DMEM 1mlを含む12-ウェルプレートに機械的に採取し、次に、集密性まで増殖した。次に、陽性の発現クローンコロニーのならし培地サンプルを、SDS-PAGE及びウェスタン分析により、発現レベルについて試験した。高い発現性のクローンを採取し、そして前記細胞により発現されるIL-TIF-CEEの精製についてのならし培地のサンプル生成のために拡張した(例19)。

# 【 0 5 3 6 】

## 例19. BHK570細胞からのIL-TIF可溶性受容体ポリペプチドの精製

特にことわらない限り、すべての操作は4で行われた。次の方法を、C-末端Glu-Glu(EE)標識(配列番号10)を含むIL-TIFポリペプチドを精製するために使用した。IL-TIF-CEE(例18)を発現するBHK細胞からのならし培地を、ProFlux A30上でAmicon S10Y3スパイラル遠心分離機により濃縮した。プロテアーゼインヒビター溶液を、前記濃縮されたならし培地に添加し、2.5mMのエチレンジアミン四酢酸(EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO)、0.003mMのロイペプチン(Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN)、0.001mMのペプスタチン(Boehringer-Mannheim)及び0.4mMのPefabloc(Boehringer-Mannheim)の最終濃度にした。サンプルを分析のために除去し、そして多量の体積を、精製を開始するまで、-80で凍結した。濃縮されたならし培地の合計の標的タンパク質濃度を、抗-EE HRP接合された抗体を用いて、SDS-PAGE及びウェスタンブロット分析により決定した。

# 【 0 5 3 7 】

約100mlカラムの抗-EE G-Sepharose(下記のように調製された)を、Waters AP-5, 5cm  $\times$  10cmガラスカラムに充填した。カラムを流動充填し、そしてリン酸緩衝溶液(PBS)(pH7.4)により、BioCad Sprint(PerSeptive BioSystems, Framingham, MA)上で平衡化した。濃縮されたならし培地を融解し、0.2ミクロンの無菌膜を通して濾過し、pHを7.4に調節し、次に、約1ml/分の流速で一晩カラム上に負荷した。カラムを、10カラム体積(CV)のリン酸緩衝溶液(PBS, pH7.4)により洗浄し、次に、5ml/分で、0.5mg/mlのEEペプチド(Anaspec, San Jose, CA)を含むPBS(pH6.0)200mlによりプラグ溶出した。使用されるEEペプチドは、配列EYMPME(配列番号10)を有する。

# 【 0 5 3 8 】

カラムを10CVのPBSにより洗浄し、次に、5CVの0.2Mグリシン(pH3.0)により溶出した。グリシン溶出されたカラムのpHを、2CVの5  $\times$  PBSにより7.0に調節し、次にPBS(pH2.4)により平衡化した。5mlの画分を、全溶出クロマトグラフィーにおいて集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターし;通過及び洗浄プールをまた、保存し、そして分析した。EE-ポリペプチド溶出ピーク画分を、抗-EE HRP接合抗体を用いて、SDS-PAGE銀染色及びウェスタンブロットを通して標的タンパク質について分析した。興味あるポリペプチド溶出画分をプールし、そして10,000ドルトン分子量カットオフ膜回転濃縮機(Millipore, Bedford, MA)を用いて、その製造業者の説明書に従って、60mlから5.0mlに濃縮した。

# 【 0 5 3 9 】

他の同時精製タンパク質からIL-TIF-CEEを分離するために、前記濃縮されたポリペプチド溶出のプールされた画分を、pH8.0で、POROS HQ-50(PerSeptive BioSystems, Framingham, MAからの強アニオン交換樹脂)にゆだねた。1.0  $\times$  6.0cmのカラムを充填し、そしてBioCad Sprint上に流動充填した。カラムを、対向イオンに荷電し、次に20mMのTRIS(pH8.0)(トリス(ヒドロキシメチルアミノメタン))により平衡化した。サンプルを、1:13に希釈し(PBSのイオン強度を低めるために)、次に5ml/分でPoros HQカラム上に充填した。

# 【 0 5 4 0 】

カラムを、10CVの20mMのトリス(pH8.0)により洗浄し、次に、40CVグラジエントの20mM

10

20

30

40

50

のトリス/1Mの塩化ナトリウム (NaCl) により10ml/分で溶出した。1.5mlの画分を、全クロマトグラフィー上で集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターした。溶出ピーク画分を、SDS - PAGE銀染色により分析した。興味ある画分をプールし、そして10,000ドルトン分子カットオフ膜回転濃縮機 (Millipore, Bedford, MA) を用いて、製造業者の説明に従って、1.5~2mlに濃縮した。

#### 【0541】

遊離EEペプチド及びいずれかの汚染性同時精製タンパク質からIL - TIF - CEEポリペプチドを分離するために、プールされた濃縮画分を、PBSにより平衡化し、そしてBioCad Sprintを用いて、1.0ml/分の流速で充填される、1.5×90cmのSephadex S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) カラム上でのサイズ排除クロマトグラフィー処理にゆだねた。1.5mlの画分を、全クロマトグラフィーを通して集め、そして280及び215nmでの吸光度をモニターした。ピーク画分を、SDS - PAGE銀染色により特徴づけ、そして最も純粋な画分のみをプールした。この材料は、精製されたIL - TIF - CEEポリペプチドを提供した。

10

#### 【0542】

この精製された材料を、最終的に、4mlのActiClean Etox (Sterogene) カラムにゆだね、いずれかの存する内毒素を除去した。サンプルを、PBSにより平衡化された重力カラム上に4度、通し、次にカラムを1回の3ml体積のPBSにより洗浄し、これを“清浄された”サンプルとしてプールした。次に、その材料を、0.2ミクロンの無菌膜を通して濾過し、そしてそれを等分するまで、-80 で貯蔵した。

#### 【0543】

ウェスタンブロットされた、クーマシーブルー及び銀色されたSDS - PAGEゲル上で、IL - TIF - CEEポリペプチドは、1つの主要バンドであった。精製された材料のタンパク質濃度を、BCA分析 (Pierce, Rockford, IL) により行い、そしてタンパク質を等分し、そして標準の方法に従って、-80 で貯蔵した。

20

#### 【0544】

抗 - EE Sepharoseを調製するために、100mlの層体積のプロテインG - Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) を、500mlのNalgene 0.45ミクロンフィルターユニットを用いて、0.02%アジ化ナトリウムを含むPBS100mlにより3度、洗浄した。ゲルを、6.0体積の200mMトリエタノールアミン (pH8.2) (TEA, Sigma, St. Louis, MO) により洗浄し、そして900mgの抗体を含む、等体積のEE抗体溶液を添加した。4 での一晩のインキュベーションの後、結合されなかった抗体を、上記のように、5体積の200mMのTEAにより樹脂を洗浄することによって除去した。

30

#### 【0545】

樹脂を2体積のTEAに再懸濁し、適切な容器に移し、そしてTEAに溶解されたジメチルピリミデート - 2HCl (Pierce, Rockford, IL) を、プロテインG - Sepharoseゲルに添加し、36mg/mlの最終濃度にした。ゲルを室温で45分間、揺り動かし、そして液体を、上記のようにしてフィルターユニットを用いて除去した。次に、ゲル上の非特異的部位を、200mMのTEA中、5体積の20mMのエタノールアミンと共に室温で10分間インキュベートすることによってブロックした。次に、ゲルを、0.02%のアジ化ナトリウムを含むPBS5体積により洗浄し、そしてこの溶液において4 で貯蔵した。

40

#### 【0546】

例20. ノザンブロット及びPCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor11組織分布

A. PCRを用いての組織パネルにおけるヒトzcytor11組織分布:

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、zcytor11発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして種々の正常及び癌性ヒト組織からの94種のマラソンcDNA及びcDNAサンプルを包含し、そして細胞系は下記表6に示される。PCR反応の他に、使用される方法は、例12に示される通りであった。PCR反応は、オリゴヌクレオチドZC14,666 (配列番号32) 及びZC14,742 (配列番号33)、Advantage 2 cDNAポリメラーゼ混合物 (Clontech, Palo Alto, CA) 及びRediload色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて設定された。

50



## 【0547】

増幅を、次の通りにして行った：94 で2分（1サイクル）、94 で15秒、51 で30秒、及び72 で30秒（40サイクル）、続いて72 で7分（1サイクル）。正しい予測されるDNAフラグメントは、膀胱、脳、頸部、結腸、胎児脳、胎児心臓、胎児腎臓、胎児肝臓、胎児肺、胎児皮膚、心臓、腎臓、肝臓、肺、メラノーマ、卵巣、脾臓、胎盤、前立腺、直腺、唾液腺、小腸、卵巣、胸腺、気管支、脊椎、甲状腺、肺腫瘍、卵巣腫瘍、直腸腫瘍、及び胃腫瘍において観察された。zcytor11発現は、このパネルにおいて試験された他の組織及び細胞系においては観察されなかった。

## 【0548】

市販の第1鎖cDNAパネル（Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA）をまた、上記のようにしてアッセイした。パネルは次のサンプルを含んだ：単核細胞、活性化された単核細胞、静止CD4+細胞、活性化されたCD4+細胞、静止CD8+細胞、活性化されたCD8+細胞、静止CD14+細胞、静止CD19+細胞及び活性化されたCD19+細胞。活性化されたCD8+及び活性化されたCD19+を除くすべてのサンプルは、zcytor11の発現を示した。

## 【0549】

B. RT-PCRを用いてのヒト細胞系及び組織パネルにおけるzcytor11の組織分布：

ヒト細胞系からのRNAのパネルを、RT-PCRを用いて、zcytor11発現についてスクリーンした。パネルは自家製造され、そして表7～10に示されるように、種々の正常及び癌性ヒト組織及び細胞系からの84種のRNAを含んだ。RNAは、自家又は購入された組織及び細胞系から、RNAeasy Midi又はMiniキット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて製造された。パネルは、サンプル当たり100ngのRNAを用いて、96-ウェル型で設定された。RT-PCR反応は、オリゴヌクレオチドZC14,666（配列番号32）及びZC14,742（配列番号33）、Rediload組織及びSUPERScript One RT-PCR System（Life Technologies, Gaithersburg, MD）を用いて設定された。

## 【0550】

増幅を次の通りにして行った：50 で30分（1サイクル）、続いて94 で15秒、52 で30秒、72 で30秒、次に72 で7分の最終延長（45サイクル）。8～10μlのPCR反応生成物を、4%アガロースゲルを用いて、標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。正しい推定されるcDNAフラグメントは、副腎、膀胱、乳房、気管支、正常結腸、結腸癌、十二指腸、子宮内膜、食道、胃癌、胃食道癌、心室、腸骨、正常腎臓、肝臓癌、肝臓、肺、リンパ節、脾臓、耳下腺、皮膚、小腸、胃、甲状腺及び子宮において観察された。zcytor11の発現を示す細胞系は、A-431、分化されたCaCo2、DLD-1、HBL-100、HCT-15、HepG2、HepG2+IL6、HuH7及びNHEK#1-4であった。zcytor11発現は、このパネルにおいて試験された他の組織及び細胞系においては観察されなかった。

## 【0551】

さらに、zcytor11、すなわちIL-TIF受容体の1つの発現パターンは、一定の特定の組織における発現を示すので、天然のリガンドIL-TIFを包含する結合パターンはまた、生検、組織又は組織学的サンプルにおける、特にIL-TIF受容体が発現される組織における特定の組織（正常又は異常）、癌又は癌組織を検出するための診断剤として使用され得る。IL-TIFはまた、その受容体、例えばzcytor11及びCRF2-4が発現される他の組織を標的化するために使用され得る。さらに、そのような結合パターンは、腫瘍又は疾病組織の部位に治療を標的化するために、化学療法剤、毒性成分及び同様のものに結合され得る。そのような診断及び標的化された治療は、当業界において知られており、そして本明細書に記載されている。

## 【0552】

zcytor11（上記）及びZcytor16（例12及び21の発現パターンは、IL-TIFの作用のための標的組織及び細胞型、及び従って、IL-TIFアンタゴニスト、例えばZcytor16を示した。zcytor11発現は一般的に、次の3種の生理学的システムにおいてZcytor16発現とオーバーラップした：消化系、女性生殖系及び免疫系。さらに、受容体（zcytor11）の発現パター

ンは、IL - TIFアンタゴニスト、例えばZcytor16が、次の2種の領域、すなわち炎症（例えば、IBD、クローン症、膵炎）及び癌（例えば、卵巣、結腸）におけるヒト疾病のための治療に使用されることを示した。すなわち、本発明のポリヌクレオチド及び抗体は、炎症、及びzcytor11受容体を発現する細胞とのIL - TIF相互作用の他のサイトカイン誘発効果を拮抗するために使用され得る。

#### 【0553】

さらに、zcytor11の発現は、潰瘍性大腸炎組織、IL - 6により誘発されたHepG2肝臓細胞系、活性化されたCD8 + T - 細胞及びCD19 + B - 細胞においてダウンレギュレートされるか又は不在であると思われた。しかしながら、休止CD19 + 細胞（上記）に比較して、Zcytor16は、活性化されたCD19 + B細胞（例2）においてアップレギュレートされると思われ、そしてzcytor11は、活性化されたCD19 + 細胞においてダウンレギュレートされる。それらのRT - PCR実験は、CD19 + 末梢血液細胞、すなわちBリンパ球がIL - TIFのための受容体、すなわちzcytoR11及びzcytoR16を発現することを示す。さらに、B細胞は、zcytoR11及びzcytoR16の調節された発現を示す。ミトゲンにより活性化されたB - リンパ球は、zcytoR11の発現を低め、そしてzcytoR16の発現を高める。これは、B細胞及び他の細胞に対するIL - TIFの活性を低めるよう作用する。

10

#### 【0554】

可溶性zcytoR16は、B細胞に対するIL - TIFの効果を中和するためにアンタゴニストとして作用する。これは、B細胞がキープレイヤーである次の疾患において有益である：自己免疫疾患、例えば全身性エリトーマシス（SLE）、重症筋無力症、免疫複合体病、及びIL - TIFにより悪化されるB - 細胞癌。また、B細胞が疾病病理学に寄与する次の自己免疫患者は、zcytoR16治療のための標的である：多発性硬化症、炎症性腸疾患（IBD）及びリウマチ様関節炎。zcytoR16治療は、アトピー性疾患、例えばぜん息、アレルギー性及びアトピー性皮膚炎（IgEの生成が疾病の病原に寄与する）においてIgEを生成するB細胞を低めるか又は阻害するために有益である。

20

#### 【0555】

B細胞悪性疾患は、上記に記載される“フィードバック阻害”の欠失を示すことができる。zcytoR16の投与は、IL - TIFシグナル化の制御を回復し、そしてB細胞悪性疾患を阻害する。手術による再切開又は化学療法に続いてのzcytoR16の投与は、B細胞悪性疾患を有する患者における最少の残存疾患を処理するために有用であり得る。調節の欠失は、zcytoR11の高められた発現の維持を導くことができる。従って、zcytoR11を標的化する治療用モノクローナル抗体のための標的物を創造する。

30

#### 【0556】

例21. 現場ハイブリダイゼーションを用いてのZcytor16を発現する細胞の同定

特にヒト組織を単離し、そして現場ハイブリダイゼーションによりヒトZcytor16発現についてスクリーンした。軟骨、結腸、虫垂、腸、胎児肝臓、肺、リンパ節、リンパ腫、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、皮膚、脾臓及び胸腺に関する種々のヒト組織を調製し、断片化し、そして現場ハイブリダイゼーションにゆだねた。組織を、標準方法を用いて、10%の緩衝化されたホルマリンに固定し、そしてパラフィンにおいてブロックした。組織を、4 ~ 8ミクロンに断片化した。

40

#### 【0557】

組織を、標準のプロトコール（“Development of non-isotopic in situ hybridization” at The Laboratory of Experiment Pathology (LEP), NIEHS, Research Triangle Park, NC; Webアドレス<http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.html>）を用いて調製した。手短には、組織断片を、HistoClear (National Diagnostics, Atlanta, GA) により脱パラフィン化し、そして次に、エタノールにより脱水した。次に、それらを、37 で2 ~ 7分間、プロティナーゼK (50 µg/ml) (Boehringer Diagnostics, Indianapolis, IN) により消化した。この段階に続いて、組織をアセチル化し、そして脱水した。

#### 【0558】

1つの現場プローブを、ヒトZcytor16配列（配列番号1のヌクレオチド1 ~ 693）に対し

50

て企画し、そして標準方法を用いて、配列番号1を含むプラスミドから単離した。T3 RNAポリメラーゼを用いて、アンチセンスプローブを生成した。そのプローブを、In Vitro Transcription System (Promega, Madison, WI) を用いて、ジゴキシゲニン (Boehringer) により、製造業者の説明書に従ってラベルした。

#### 【0559】

現場ハイブリダイゼーションを、ジゴキシゲニンによりラベルされたZcytor16プローブ(上記)により行った。プローブを、62.5 で12~16時間、1~5pモル/mlの濃度でスライドに付加した。続いて、スライドを、2×SSC及び0.1×SSCにより55 で洗浄した。シグナルを、チラミドシグナル増幅(TSA)(TSA、現場間接的キット; NEN)を用いて増幅し、そしてVector Red基質キット(Vector Lab)により、その製造業者の説明書に従って可視化した。次に、スライドを、ヘマトキシリン(Vector Laboratories, Burlingame, CA)により対比染色した。

#### 【0560】

シグナルを、試験されるいくつかの組織において観察した: 末梢組織におけるリンパ節、血漿細胞及び他の単核細胞は強い陽性であった。リンパ小節におけるほとんどの細胞は陰性であった。リンパ腫サンプルにおいては、陽性シグナルが有糸分裂及び多核細胞において見出された。脾臓においては、陽性シグナルが、小胞の末梢で拡散された単核細胞に見出された。胸腺においては、陽性のシグナルが、皮質及び骨髓の両者において拡散された単核細胞において見出された。胎児肝臓においては、強いシグナルが、洞様空間において、単核細胞の混合された集団において観察された。

#### 【0561】

肝細胞のサブセットはまた、陽性であった。炎症性虫垂においては、Peyerパッチ及び炎症部位における単核細胞が陽性であった。腸においては、いくつかの血漿細胞及び神経節細胞が陽性であった。正常な肺においては、Zcytor16が、肺胞上皮、及び間隙組織及び循環における単核細胞において発現された。肺癌組織においては、強いシグナルが、ほとんどの血漿細胞、及び末梢凝集体の末梢におけるいくつかの他の単核細胞において観察された。卵巣癌においては、上皮細胞は強い陽性であった。

#### 【0562】

いくつかの間隙細胞、たぶん単核細胞もまた陽性であった。正常な卵巣においては、シグナルは観察されなかった。正常及び脾炎の脾臓サンプルにおいては、線房細胞、及び腸間膜におけるいくつかの単核細胞が陽性であった。初期(8週)胎盤において、シグナルが栄養膜に観察された。皮膚においては、表皮における炎症浸潤物におけるいくつかの単核細胞は陽性であった。ケラチノサイトはまた、弱い陽性であった。前立腺癌においては、間隙組織における散在性単核細胞は陽性であった。関節軟骨においては、軟骨細胞は陽性であった。試験された他の組織、例えば正常卵巣、及び結腸腺癌は陰性であった。

#### 【0563】

要約すると、現場データは、Zcytor16についての上記の発現データと一致した。Zcytor16発現は、単核細胞において主として観察され、そして上皮はまた陽性であった。それらの結果は、ヒト細胞におけるZcytor16発現の存在、及び炎症、自己免疫疾患、又は他の免疫機能における、例えばプロ-炎症サイトカイン、例えばIL-1L(但し、それだけには限定されない)の結合における役割点を確認した。さらに、Zcytor16発現の検出は、例えば組織学的サンプルにおける単核細胞のためのマーカーとして使用され得る。

#### 【0564】

Zcytor16は、単核細胞、例えば正常組織(リンパ節、脾臓、胸腺、脾臓、腎臓、肝臓及び肺)、及び異常組織(炎症虫垂、肺癌、卵巣癌、脾炎、炎症性皮膚及び前立腺癌)において発現される。リンパ節、腸及び肺癌における血漿細胞がZcytor16に関して陽性であることは、注目すべきである。血漿細胞は、抗体合成を担当する、免疫学的に活性化されたリンパ球である。さらに、IL-1Lは、免疫学的に活性化されたT細胞において発現される。さらに、Zcytor16の発現は、活性化された(休止においてはでない)CD4+及びCD19+細胞においてのみ検出された(例12)。従って、Zcytor16は、一定のリンパ球、例えば単核

リンパ球及び制限された型の活性化されたリンパ球、例えば活性化されたCD4+及びCD19+の単離においてマーカーとして又は標的物として使用され得る。

【0565】

さらに、活性化された免疫細胞、例えば活性化されたCD4+及びCD19+細胞におけるZcytor16発現の存在は、Zcytor16が外来性侵入体、例えば微生物及び細胞残骸に対する身体の免疫防御反応に関与し、そして炎症及び癌形成の間、免疫応答において役割を演じること

【0566】

さらに、本明細書において論じられるように、いくつかの組織における上皮形、例えば肝細胞（内皮由来の上皮）、肺胞上皮（内皮由来の上皮）及び卵巣癌上皮（中胚葉由来の上皮）は、Zcytor16発現に関して陽性であった。Zcytor16の上皮発現は、肝臓及び肺における炎症応答及び/又は癌状態において変更され得る。従って、Zcytor16は、炎症又は癌の結果として、それらの組織における変化をモニターするためにマーカーとして使用され得る。さらに、Zcytor16発現の分析は、正常卵巣上皮がZcytor16発現に関して陰性であり、ところがそれは、卵巣癌上皮において強い陽性であることを示し、このことは、Zcytor16ポリヌクレオチド、ポリペプチド又は抗体が、本明細書に記載されるように、卵巣癌の診断及び処理のために診断マーカー及び/又は治療標的物として使用され得る証拠をさらに提供する。

【0567】

Zcytor16はまた、他の組織、例えば脾臓（正常及び脾炎組織）における腺房細胞、胎盤（外胚葉由来の）における栄養膜、軟骨（中胚葉由来の）における軟骨細胞、及び腸（外胚葉由来の）における神経節細胞においても検出された。Zcytor16自体は、それらの器官における対応する細胞の分化及び/又は正常機能に関与している。Zcytor16の可能性ある使用は、正常な代謝及び妊娠、骨形成/恒常性、及び腸の生理学的機能の維持及び同様のものを包含する。

【0568】

例22. IL-TIFポリペプチドのインビボ効果

マウス（雌、C57B1、生後8週；Charles River Labs, Kingston, NY）を、3種のグループに分けた。IL-TIFポリペプチド（配列番号15）を発現するアデノウィルスを、標準方法を用いて前もって製造した。日0で、親又はIL-TIFアデノウィルスを、第1グループ（n=8）及び第2グループ（n=8）にそれぞれ、尾の静脈を通して投与し、そして個々のマウスは、約0.1mlの体積中、約 $1 \times 10^{11}$ の粒子の用量を受けた。第3グループ（n=8）は、処理を受けなかった。

【0569】

日12で、マウスを計量し、そして血液をマウスから採血した。サンプルを、完全な血液計数（CBC）及び血清化学について分析した。好中球及び血小板計数の統計学的に有意な上昇が、親アデノウィルス処理グループに対して、IL-TIFアデノウィルス投与されたグループからの血液サンプルにおいて検出された。また、リンパ球及び赤血球細胞計数が、親アデノウィルス処理のグループに対して、IL-TIFアデノウィルス投与されたグループから有意に低められた。さらに、IL-TIFアデノウィルス処理されたマウスは、体重が低下し、ところが親アデノウィルス処理されたマウスは体重が増加した。

【0570】

前記結果は、IL-TIFが造血、すなわちインビボでの血液細胞形成に影響を及ぼすことを示した。IL-TIF自体は、異なった血液幹細胞に影響を及ぼす生物学的活性を有し、従って、特定の系統において一定の分化された血液細胞の上昇又は低下をもたらす。例えば、IL-TIFは、リンパ球を低めると思われ、これはたぶん、リンパ細胞を高める傾倒した前駆体の阻害のためである。この発見は、骨髓球性幹細胞の増殖及び/又は成長に対するIL-TIFの阻害効果と一致し（例23）、これは、IL-TIFが、それらの工程に関与する血液細胞に影響を及ぼすことによって、貧血、感染、炎症及び/又は免疫疾患において役割を演じることができる概念を支持する。IL-TIFに対するアンタゴニスト、例えば本発明の抗

10

20

30

40

50

体又はzcytor11可溶性受容体は、それらの疾病における治療剤として使用され得る。

【0571】

さらに、マウスにおけるIL-TIFアデノウィルスを用いるそれらの実験は、IL-TIFの過剰発現がインビボで好中球及び血小板のレベルを高めることを示唆する。これはK562細胞（例23）において見出される発見とは矛盾すると思われるが、特定のタンパク質の種々の活性を、インビトロ対インビボで観察されることは目立ったことではない。完全な動物システムにおいてIL-TIFに対する応答に関与する他の因子（例えば、サイトカイン及びモディファイアー遺伝子）が存在すると思われる。それにもかかわらず、IL-TIF及びその受容体は、種々の障害、例えば炎症、免疫障害、感染、貧血、造血及び他の癌及び同様のものの診断及び処理のための適切な試薬/標的物である。

10

【0572】

例23. IL-TIFは細胞毒性アッセイにおいてK-562細胞を溶解する

K-562細胞系（CRL-243、ATCC）は、細胞毒性アッセイのための高い感受性のインビトロ標的物としての広範な使用を達成している。K-562芽細胞は、赤血球、顆粒球及び単球シリーズの認識できる前駆体に自発的に分化する、多潜在性造血悪性細胞である（Lozzio, BBなど., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 546-550, 1981）。

【0573】

K562細胞を、ピルベート及び10%血清（HyClone）により補充されたDMEMフェノールフリーの成長培地（Life Technologies）を含む96-ウェル組織培養クラスター（Costar）に、5,000個の細胞/ウェルでプレートした。次の日、ヒト組換えIL-TIF（例19）、BSA対照又はレチノイン酸（K562細胞に対して細胞毒性であることが知られている）を添加した。72時間後、生存株MTT（Sigma, St. Louis, MO）、すなわちミトコンドリア活性及び細胞増殖の広く使用されるインジケータを、前記細胞に、0.5mg/mlの最終濃度で添加した。MMPを、ミトコンドリアデヒドロゲナーゼによりパープルホルマザン誘導体に転換する。24時間後、転換されたMMPを、ウェルに等体積の酸性イソプロパノール（無水イソプロパノール中、0.04NのHCl）を添加することによって溶解した。吸光度を570nmで測定し、そして650nmでのバックグラウンドを控除した。この実験設定においては、吸光度は細胞生存性に影響を及ぼす。表12に示される結果は、%細胞毒性として表される。

20

【0574】

【表12】

30

表12

| 剤      | 濃度           | %細胞毒性 |
|--------|--------------|-------|
| BSA対照  | 1 $\mu$ g/ml | 1.3   |
| レチノイン酸 | 100 $\mu$ M  | 62    |
| IL-TIF | 100ng/ml     | 16.2  |
| IL-TIF | 300ng/ml     | 32    |

40

【0575】

結果は、IL-TIFが骨髓性幹細胞に影響を及ぼすことができることを示す。骨髓性幹細胞は、普遍的血液幹細胞の娘細胞である。それらは、赤血球細胞、血小板巨核球、単球（又は、移動されたマクロファージ）、好中球及び好塩基球、等の前駆体である。K-562芽細胞は、赤血球細胞、顆粒球及び単級シリーズの前駆体に自発的に分化するので、それは骨髓性幹細胞として考慮され得る。従って、結果は、IL-TIFが骨髓性幹細胞の増殖及び/又

50

は成長に対する阻害活性を有することを示す。従って、IL - TIFは、貧血、感染、炎症及び/又は免疫疾患において役割を演じることができた。さらに、IL - TIFに対するアンタゴニスト、例えば抗体又はその可溶性受容体Zcytor16は、骨髓性幹細胞に対するIL - TIF活性を阻止するために、又は疾病、例えば貧血、感染、炎症及び/又は免疫疾患における治療試薬として使用され得る。

【0576】

例24. IL - TIF - 発現トランスジェニックマウス

A. マウスIL - TIFを発現するトランスジェニックマウスの生成：

リンパ特異的E $\mu$  LCKプロモーター、マウスIL - TIF (配列番号40)、ラットインスリンIIイントロン、IL - TIF cDNA及びヒト成長ホルモンポリA配列の5' フランキング配列を含むトランスジェニックベクターからのDNAフラグメントを、標準方法を用いて調製し、そして標準のマイクロインジェクションプロトコルを用いて、受精されたB6C3f1 (Taconic, Germantown, NY) ネズミ卵母細胞中へのマイクロインジェクションのために使用した。Hogan, B. など., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994を参照のこと。

10

【0577】

リンパ - 特異的E $\mu$  LCKプロモーターを有するマウスIL - TIFに対するトランスジェニックである25匹のマウスを、154匹の子供マウス間で同定した。11匹のトランスジェニック子供マウスは、生後数時間で死亡し、光沢の外観を有する9匹のトランスジェニック子供マウスは誕生の日、検死され、そして2匹は成熟した。発現レベルは、1匹の成熟動物においては低かった。検死された子供マウスからの組織を調製し、そして下記のようにして組織学的に試験した。

20

新生児子供マウスの光沢のある外観は、ドライであり、適切な授乳の低下をもたらすかのように、皮膚の硬化に関連しているように思われた。

【0578】

B. トランスジェニックマウスからの遺伝子型及び発現分析：

上記に記載される、E $\mu$  LCKプロモーターにより駆動されるマウスIL - TIFトランスジェニック系からの新生児子供マウスは、1日目 (生後1日)、異常性が観察され、そして組織採取のために殺害された。すべての子供マウスは独得の耳標識番号を与えられ、そして殺害の時点で光沢のある皮膚表現型を有するものとして明示されるそれが示された。12匹の子供マウスのうち、6匹は、光沢のある皮膚表現型を有することが観察され、そして2匹は“重度”の表現型として明示された。重度の表現型は、皮膚に特に光沢があり、そして非常にドライである、ほとんど移動性を有さない小さな子供マウスとして定義された。皮膚を、個々の子供マウスの左側部から採取し、そしてTissue - Tek包埋媒体において凍結した。

30

【0579】

遺伝子型分類は、光沢のある皮膚が、発現データは集められなかったが、トランスジェニック状態の良好なインジケーターであることを確証した。凍結された皮膚ブロックを、低温槽上で7  $\mu$  に断片化し、そしてCD3, CD4, CD8, マウスマクロファージ、B - 細胞、CD80及びMHCクラスIIの存在を調べるために染色した。染色プロトコルは、組織への市販の抗体の結合、ペルオキシダーゼラベルされた二次抗体による検出、及び染色を可視化するためのDAB色原体反応を包含した。

40

【0580】

トランスジェニックマウスは、それぞれ抗原提供細胞及び樹状突起細胞を染色する、MHCクラスII CD80においてより高いことが見出された。マクロファージマーカーはまた、野生型動物においてよりも、重度の及び非重度のトランスジェニック動物において、一層の細胞を検出したが、但し、それらの細胞の分布は上部真皮において非常に局在した。重度の表現型として分類された動物は、すべての3種のそれらのマーカーによる最も強い染色を有し、野生型に比較される場合、細胞強度及び細胞数における劇的な上昇を示した。

【0581】

50

この変動性は、それらのトランスジェニック創始者の子供マウスにおけるIL - TIFの発現レベルの差異のためであり得る。MHCクラスII陽性細胞は、ゆるい開放性群に配置される下部真皮に局在し、CD80陽性細胞は、筋肉/脂肪層における又はそのすぐ上部のいずれかにおける真皮下に卓越して存在した。それらの2種の細胞集団は、オーバーラップするようには思えない。すべての他のマーカーは、すべての動物において染色する同等のものであった。肥満細胞についてのトルイジンブルー染色は、野生型動物とトランスジェニック動物との間のわずかな差異を示すか、又はその差異を示さなかった。

#### 【0582】

C. トランスジェニックマウスからの組織の肉眼的評価：E $\mu$ LCKプロモーターを有するIL - TIF TGは新生児致死 - 病歴を有した：

誕生の日、IL - TIFトランスジェニック動物を含む一腹の子供マウスを安楽死せしめ、そして前身体を、10%緩衝されたホルマリンに含浸固定した。6匹のトランスジェニック及び2匹の非トランスジェニック子供マウスを、さらなる研究のために提供した。6匹のトランスジェニック動物のうち4匹は、安楽死の時点で、光沢のある皮膚を有することが示された。固定された組織を5個の断片に整えた（頭の縦断面、及び上部及び下部胸郭及び上部及び下部腹の横断面）。組織をパラフィンに包埋し、通常通りに処理し、5  $\mu$ mで断片化し（Jung 2065 Supercut microtome, leica Microsystems, Wetzlar, Germany）、そしてH&Eにより染色した。染色された組織は、有資格の獣医病理学者局（ACVP）により、顕微鏡（Nikon Eclipse E600, Nikon Inc., Melville, NY）下で評価された。

#### 【0583】

顕微鏡試験に基づいて、2匹のトランスジェニック子供マウスの表皮は、対照を包含する他の6匹のマウスの表皮よりも厚いことが観察された。他の異常性は、いずれかのマウスの皮膚及び他の組織において示されなかった。胸郭及び腹の対応する領域からの皮膚の代表的領域を、40倍の対物レンズ及び顕微鏡に備え付けられたCoolSnapデジタルカメラ（Roper Scientific, Inc., San Diego, CA）により画像化した。次に、表皮の厚さを、組織形態学的ソフトウェア（Scion Image for Windows (NIH Image), Scion Corp., Frederick, MD, V. B4.0.2）を用いて決定した。結果は次の通りであった：

#### 【0584】

#### 【表13】

表13

| 遺伝子型/表現型      | 平均胸郭皮膚の厚さ<br>( $\mu$ m) | 平均腹部皮膚の厚さ<br>( $\mu$ m) |
|---------------|-------------------------|-------------------------|
| 非トランスジェニック/正常 | 5.2                     | 5.4                     |
| トランスジェニック/非光沢 | 5.0                     | 6.7                     |
| トランスジェニック光沢   | 8.2                     | 7.4                     |
| トランスジェニック/すべて | 7.1                     | 7.1                     |

#### 【0585】

統計学的有意性を決定するにはマウスの数は不十分であった；しかしながら、トランスジェニック動物、特に光沢のある皮膚を有するそれらの動物は、非光沢性トランスジェニック動物及び非トランスジェニック対照よりも厚い表皮を有する傾向があった。光沢性トランスジェニック動物は、非光沢性トランスジェニック動物よりも高い発現レベルのIL - TIFを有することができる；しかしながら、発現レベルはそれらのマウスに関しては決定されなかった。

前述から、本発明の特定の態様が例示目的のために記載されて来たが、種々の修飾が本発明の範囲内で行われ得ることは理解されるであろう。従って、本発明は、添付の特許請求の範囲を除いて、制限されない。

【図面の簡単な説明】

【 0 5 8 6 】

【図 1】図 1 は、ヒトZcytor16 (hZcytor16) (配列番号 2) 及びマウスZcytor16 (mZcytor16) (配列番号 38) の一列整列である。図における “ : ” は、保存された置換であるアミノ酸を示す。完全な配列にわたってヒト配列とマウス配列との間に 66.2% の同一性 (231 個のアミノ酸オーバーラップ) が存在する。



## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/070655 A2

(51) International Patent Classification: C12N  
(21) International Application Number: PCT/US02/06267  
(22) International Filing Date: 4 March 2002 (04.03.2002)  
(25) Filing Language: English  
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:  
60/273,035 2 March 2001 (02.03.2001) US  
60/279,232 27 March 2001 (27.03.2001) US

(71) Applicant: ZYMOGENETICS, INC. [US/US]; 1201  
Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).

(72) Inventors: PRESNELL, Scott, R.; 2902 N. Puget Sound  
Avenue, Tacoma, WA 98407 (US); XU, Wenfeng; 12432  
54th Avenue West, Mukilteo, WA 98275 (US); KINDSVO-  
GEL, Wayne; 6014 24th Avenue Northeast, Seattle, WA  
98115 (US); CHEN, Zhi; 1321 Minor Avenue, Apartment  
B504, Seattle, WA 98101 (US).

(74) Agent: JOHNSON, Jennifer, K.; ZymoGenetics, Inc.,  
1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).

(81) Designated States (national): AF, AG, AL, AM, AT, AU,  
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,  
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,  
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,  
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,  
ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).

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

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-  
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-  
ning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/070655 A2

(54) Title: MOUSE CYTOKINE RECEPTOR

(57) Abstract: Cytokine and their receptors have proven usefulness in both basic research, animal models, and as therapeutics. The present invention provides a new cytokine receptor designated as "mouse Zcytor16," which can bind and antagonize the IL-11/ cytokine.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

## MOUSE CYTOKINE RECEPTOR

5

## TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to a new protein expressed by mouse cells that is a murine ortholog to human Zcytor16 (US Patent Application No. 09/728,911). In particular, the present invention relates to a novel gene that encodes a  
10 receptor, designated as "mouse Zcytor16," and to nucleic acid molecules encoding mouse Zcytor16 polypeptides, and antibodies to the polypeptide.

## BACKGROUND OF THE INVENTION

Cytokines are soluble, small proteins that mediate a variety of biological  
15 effects, including the regulation of the growth and differentiation of many cell types (see, for example, Arai *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 59:783 (1990); Mosmann, *Curr. Opin. Immunol.* 3:311 (1991); Paul and Seder, *Cell* 76:241 (1994)). Proteins that constitute the cytokine group include interleukins, interferons, colony stimulating factors, tumor necrosis factors, and other regulatory molecules. For example, human  
20 interleukin-17 is a cytokine which stimulates the expression of interleukin-6, intracellular adhesion molecule 1, interleukin-8, granulocyte macrophage colony-stimulating factor, and prostaglandin E2 expression, and plays a role in the preferential maturation of CD34+ hematopoietic precursors into neutrophils (Yao *et al.*, *J. Immunol.* 155:5483 (1995); Fossiez *et al.*, *J. Exp. Med.* 183:2593 (1996)).

25 Receptors that bind cytokines are typically composed of one or more integral membrane proteins that bind the cytokine with high affinity and transduce this binding event to the cell through the cytoplasmic portions of the certain receptor subunits. Cytokine receptors have been grouped into several classes on the basis of similarities in their extracellular ligand binding domains. For example, the receptor  
30 chains responsible for binding and/or transducing the effect of interferons are members

WO 02/070655

PCT/US02/06267

2

of the class II cytokine receptor family, based upon a characteristic about 200 residue extracellular domain.

The demonstrated *in vivo* activities of cytokines and their receptors illustrate the clinical potential of, and need for, other cytokines, cytokine receptors, cytokine agonists, and cytokine antagonists.

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 is an alignment of human Zcytor16 (hZcytor16) (SEQ ID NO:2), and mouse Zcytor16 (mZcytor16) (SEQ ID NO:38). The “.” in the figure indicates amino acids that are identical between the mouse and human sequences, and the “-” in the figure indicates amino acids that are conserved substitutions. There is a 66.2% identity between the human and mouse sequences over the entire sequence (231 amino acid overlap).

#### BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a novel receptor, designated “mouse Zcytor16.” The present invention also provides mouse Zcytor16 polypeptides and mouse Zcytor16 fusion proteins, as well as nucleic acid molecules encoding such polypeptides and proteins, and methods for using these nucleic acid molecules and amino acid sequences.

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

##### 1. Overview

An illustrative nucleotide sequence that encodes mouse Zcytor16 is provided by SEQ ID NO:37. The encoded polypeptide has the following amino acid sequence: MMPKHCLLGL LILLSSATE IQPARVSLTL QKVRFQSRNF HNILHWQAGS SLPSNNSIYF VQYKMYGQSQ WEDKVDWGT TALFCDLTNE TLDPYELYYG RVMTACAGRH SAWTRTPRFT PWWETKLDPP VVTITRVNAS LRVLLRPPPEL PNRNQSGKNA SMETYGYLVY RVFTINNSLE KEQKAYEGTQ RAVEIEGLIP HSSYCVVAEM YQPMFDRRSP RSKERCQVQP (SEQ ID NO:38). The 230 amino acid polypeptide represents the extracellular domain, also called a

WO 02/070655

PCT/US02/06267

3

cytokine-binding domain, of a new class II cytokine receptor. Features of the Zcytor16 polypeptide include putative signal sequences at amino acid residues 1 to 23 of SEQ ID NO:38, and a mature soluble receptor polypeptide from residues 24 to 230 of SEQ ID NO:38. The receptor has two fibronectin III domains, also called immunoglobulin superfamily (Ig) domains, characteristic of the class II cytokine receptor family that comprise amino acid residues 31 to 122 (fibronectin III domain I), and 131 to 229 (fibronectin III domain II) of SEQ ID NO:38, and a linker that resides between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid residues 127-130 of SEQ ID NO:38). Thus molecules of the present invention include polypeptides that include a cytokine binding domain comprising amino acids 31 to 229 of SEQ ID NO:38. Moreover, additional variants of the zcytor16 polypeptide include polypeptides that comprise amino acid residues 27 to 122, 24 to 122, 31 to 126, 27 to 126, or 24 to 126, (fibronectin III domain I), and 131 to 229 or 230 (fibronectin III domain II) of SEQ ID NO:38, and a linker that resides between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid residues 123-130, or 127-130 of SEQ ID NO:38). Thus molecules of the present invention include polypeptides that include a cytokine binding domain comprising amino acids 24, or 27, to 229 or 230 of SEQ ID NO:38. In addition, zcytor16 contains conserved motifs and residues characteristic of class II cytokines: an SXWS (SEQ ID NO:46) -like motif from residue 219-222 of SEQ ID NO:38; conserved Tryptophan residues at residues 46, 71, and 113 of SEQ ID NO:38; and conserved Cysteine residues at residues 77, 85, 205, and 226 of SEQ ID NO:38. The mouse *Zcytor16* gene is specifically expressed in Lung, Pancreas, Placenta, Salivary Gland, Skeletal Muscle, Skin, Small Intestine, Smooth Muscle, Spleen, Stomach, and Testis cDNAs and is expected to be expressed in specific mononuclear cells, such as activated T-cell and B-cell subsets. Alignment of the polypeptide sequences shows that mouse Zcytor16 (SEQ ID NO:38) is an ortholog of the human Zcytor16 sequence (SEQ ID NO:2) (US Patent Application No. 09/728,911) as shown in Figure 1.

Another illustrative nucleotide sequence that encodes a preferred mouse Zcytor16 is provided by SEQ ID NO:47. The encoded polypeptide has the following amino acid sequence: MMPKHCLLGL LILLSSATE IQPARVSLTPQ KVRFSRNFH

WO 02/070655

PCT/US02/06267

4

NILHWQAGSSLPSNNSIYFVQYKMYGQSQWEDKVDWGTALFCDLTNETLD  
 PYELYYGRVMTACAGRHSWTRTPRFTPWETKLDPPVVTITRVNASLRVLL  
 RPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSLEKEQKAYEGTQRAVEIEGLI  
 PHSSYCVVAEMYQPMFDRRSPRSKERCVHIF (SEQ ID NO:48). The 230 amino  
 5 acid polypeptide represents the extracellular domain, also called a cytokine-binding  
 domain, of a new class II cytokine receptor. The SEQ ID NO:48 sequence differs from  
 SEQ ID NO:38 by two amino acids: amino acid 30 (Leu) and 228 (Gln) shown in SEQ  
 ID NO:38 are amino acids 30 (Pro) and 228 (His) shown in SEQ ID NO:48. Features  
 of the Zcytor16 polypeptide include putative signal sequences at amino acid residues 1  
 10 to 23 of SEQ ID NO:48, and a mature soluble receptor polypeptide from residues 24 to  
 230 of SEQ ID NO:48. The receptor has two fibronectin III domains, also called  
 immunoglobulin superfamily (Ig) domains, characteristic of the class II cytokine  
 receptor family that comprise amino acid residues 31 to 122 (fibronectin III domain I),  
 and 131 to 229 (fibronectin III domain II) of SEQ ID NO:48, and a linker that resides  
 15 between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid residues 127-130 of SEQ ID NO:48). Thus  
 molecules of the present invention include polypeptides that include a cytokine  
 binding domain comprising amino acids 31 to 229 of SEQ ID NO:48. Moreover,  
 additional variants of the zcytor16 polypeptide include polypeptides that comprise  
 amino acid residues 27 to 122, 24 to 122, 31 to 126, 27 to 126, or 24 to 126,  
 20 (fibronectin III domain I), and 131 to 229 or 230 (fibronectin III domain II) of SEQ ID  
 NO:48, and a linker that resides between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid residues  
 123-130, or 127-130 of SEQ ID NO:48). Thus molecules of the present invention  
 include polypeptides that include a cytokine binding domain comprising amino acids  
 24, or 27, to 229 or 230 of SEQ ID NO:48. In addition, zcytor16 contains conserved  
 25 motifs and residues characteristic of class II cytokines: an SXWS (SEQ ID NO:46) -  
 like motif from residue 219-222 of SEQ ID NO:48; conserved Tryptophan residues at  
 residues 46, 71, and 113 of SEQ ID NO:48; and conserved Cysteine residues at residues  
 77, 85, 205, and 226 of SEQ ID NO:48.

An illustrative nucleotide sequence that encodes human Zcytor16 is  
 30 provided by SEQ ID NO:1. The encoded polypeptide has the following amino acid  
 sequence: MMPKHCFLGF LISFLLTGVA GTQSTHESLK PQRVQFQSRN

WO 02/070655

PCT/US02/06267

5

FHNILQWQPG RALTGNSSVY FVQYKIYGQR QWKNKEDCWG TQELSCDLTS  
 ETSDIQEPYY GRVRAASAGS YSEWSMTPRF TPWWETKIDP PVMNITQVNG  
 SLLVLHAPN LPYRYQKEKN VSIEDYYELL YRVFIINNSL EKEQKVYEGA  
 HRAVEIEALT PHSSYCVVAE IYQPMIDRRS QRSEERCVEI P (SEQ ID NO:2).

5 The 231 amino acid polypeptide represents the extracellular domain, also called a cytokine-binding domain, of a new class II cytokine receptor. Features of the Zcytor16 polypeptide include putative signal sequences at amino acid residues 1 to 21, or 1 to 22 of SEQ ID NO:2, and a mature soluble receptor polypeptide from residues 22 to 231 or 23 to 231 of SEQ ID NO:2. The receptor has two fibronectin III domains, also called  
 10 immunoglobulin superfamily (Ig) domains, characteristic of the class II cytokine receptor family that comprise amino acid residues 32 to 123 (fibronectin III domain I), and 132 to 230 (fibronectin III domain II) of SEQ ID NO:2, and a linker that resides between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid residues 128-131 of SEQ ID NO:2). Thus molecules of the present invention include polypeptides that include a cytokine  
 15 binding domain comprising amino acids 32 to 230 of SEQ ID NO:2. Moreover, additional variants of the zcytor16 polypeptide include polypeptides that comprise amino acid residues 28 to 123, 23 to 123, 22 to 123, or 32 to 127, 28 to 127, 23 to 127, 22 to 127, (fibronectin III domain I), and 132 to 230 or 231 (fibronectin III domain II) of SEQ ID NO:2, and a linker that resides between the Ig domains (*i.e.*, at amino acid  
 20 residues 124-131, or 128-131 of SEQ ID NO:2). Thus molecules of the present invention include polypeptides that include a cytokine binding domain comprising amino acids 22, 23, or 28 to 132 to 230 or 231 of SEQ ID NO:2. In addition, zcytor16 contains conserved motifs and residues characteristic of class II cytokines: an SXWS (SEQ ID NO:46) motif from residue 220-223 of SEQ ID NO:2; conserved Tryptophan  
 25 residues at residues 47, 72, and 114 of SEQ ID NO:2; and conserved Cysteine residues at residues 78, 86, 206, and 227 of SEQ ID NO:2. The *Zcytor16* gene is expressed in monocytes, lymphoid, placenta, spleen, tonsil and other tissues, and resides in human chromosome 6q23-q24.

The corresponding polynucleotides encoding the zcytor16 polypeptide  
 30 regions, domains, motifs, residues and sequences described above are as shown in SEQ ID NO:1 (human zcytor16) and SEQ ID NO:37, and SEQ ID NO:47 (mouse zcytor16).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

6

As described below, the present invention provides isolated polypeptides comprising an amino acid sequence that is at least 70%, at least 80%, or at least 90% identical to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230, (b) amino acid residues 27 to 126, (c) amino acid residues 131 to 230 and (d) amino acid residues 1 to 230. The present invention also provides isolated polypeptides as disclosed above that specifically bind with an antibody that specifically binds with a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Illustrative polypeptides include polypeptides comprising either amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 or a fragment thereof described herein. Moreover, the present invention also provides isolated polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF (e.g., human IL-TIF polypeptide sequence as shown in SEQ ID NO:15 or mouse IL-TIF polypeptide sequence as shown in SEQ ID NO:41). The human IL-TIF polynucleotide sequence is shown in SEQ ID NO:14. The mouse IL-TIF polynucleotide sequence is shown in SEQ ID NO:40.

The present invention also provides isolated polypeptides comprising at least 15 contiguous amino acid residues of an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230, (b) amino acid residues 27 to 126, (c) amino acid residues 131 to 230 and (d) amino acid residues 1 to 230. Illustrative polypeptides include polypeptides that either comprise, or consist of, amino acid residues (a) to (d). Moreover, the present invention also provides isolated polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF.

The present invention also includes variant mouse Zcytor16 polypeptides, wherein the amino acid sequence of the variant polypeptide shares an identity with amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of at least 70% identity, at least 80% identity, at least 90% identity, at least 95% identity, or greater than 95% identity, and wherein any difference between the amino acid sequence of the variant polypeptide and the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is due to one

WO 02/070655

PCT/US02/06267

7

or more conservative amino acid substitutions. Moreover, the present invention also provides isolated polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF.

The present invention further provides antibodies and antibody fragments that specifically bind with such polypeptides. Exemplary antibodies include polyclonal antibodies, murine monoclonal antibodies, humanized antibodies derived from murine monoclonal antibodies, and human monoclonal antibodies. Illustrative antibody fragments include F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, Fv, scFv, and minimal recognition units. The present invention further includes compositions comprising a carrier and a peptide, polypeptide, or antibody described herein.

The present invention also provides isolated nucleic acid molecules that encode a mouse Zcytor16 polypeptide, wherein the nucleic acid molecule is selected from the group consisting of: (a) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49, (b) a nucleic acid molecule encoding an amino acid sequence that comprises either amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 and (c) a nucleic acid molecule that remains hybridized following stringent wash conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of nucleotides 77 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or the complement of the nucleotide sequence of nucleotides 77 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. Illustrative nucleic acid molecules include those in which any difference between the amino acid sequence encoded by nucleic acid molecule (c) and the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is due to a conservative amino acid substitution. The present invention further contemplates isolated nucleic acid molecules that comprise nucleotides 8 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. Moreover, the present invention also provides isolated polynucleotides that encode polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF.

The present invention also includes vectors and expression vectors comprising such nucleic acid molecules. Such expression vectors may comprise a transcription promoter, and a transcription terminator, wherein the promoter is operably linked with the nucleic acid molecule, and wherein the nucleic acid molecule is operably linked with the transcription terminator. The present invention further includes recombinant host cells and recombinant viruses comprising these vectors and



WO 02/070655

PCT/US02/06267

8

expression vectors. Illustrative host cells include bacterial, yeast, fungal, insect, mammalian, and plant cells. Recombinant host cells comprising such expression vectors can be used to produce mouse *Zcytor16* polypeptides by culturing such recombinant host cells that comprise the expression vector and that produce the mouse  
5 *Zcytor16* protein, and, optionally, isolating the mouse *Zcytor16* protein from the cultured recombinant host cells.

In addition, the present invention provides pharmaceutical compositions comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least one of such an expression vector or recombinant virus comprising such expression vectors. The present invention  
10 further includes pharmaceutical compositions, comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a polypeptide described herein.

The present invention also contemplates methods for detecting the presence of mouse *Zcytor16* RNA in a biological sample, comprising the steps of (a) contacting a mouse *Zcytor16* nucleic acid probe under hybridizing conditions with  
15 either (i) test RNA molecules isolated from the biological sample, or (ii) nucleic acid molecules synthesized from the isolated RNA molecules, wherein the probe has a nucleotide sequence comprising a portion of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or its complement, and (b) detecting the formation of hybrids of the nucleic acid probe and either the test RNA molecules or the synthesized nucleic acid  
20 molecules, wherein the presence of the hybrids indicates the presence of mouse *Zcytor16* RNA in the biological sample. For example, suitable probes consist of the following nucleotide sequences of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47: nucleotides 77, 86, or 100 to 373; nucleotides 77, 86, or 100 to 694 or 697; nucleotides 401 to 694 or 697; and nucleotides 8 to 694 or 697. Other suitable probes consist of the complement  
25 of these nucleotide sequences, or a portion of the nucleotide sequences or their complements.

The present invention further provides methods for detecting the presence of mouse *Zcytor16* polypeptide in a biological sample, comprising the steps of: (a) contacting the biological sample with an antibody or an antibody fragment that  
30 specifically binds with a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, wherein the contacting is performed under conditions that

WO 02/070655

PCT/US02/06267

9

allow the binding of the antibody or antibody fragment to the biological sample, and (b) detecting any of the bound antibody or bound antibody fragment. Such an antibody or antibody fragment may further comprise a detectable label selected from the group consisting of radioisotope, fluorescent label, chemiluminescent label, enzyme label, bioluminescent label, and colloidal gold.

The present invention also provides kits for performing these detection methods. For example, a kit for detection of *Zcytor16* gene expression may comprise a container that comprises a nucleic acid molecule, wherein the nucleic acid molecule is selected from the group consisting of (a) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of nucleotides 77, 86, or 100 to 694 or 697, or 8 to 694 or 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, (b) a nucleic acid molecule that is a fragment of (a) consisting of at least eight nucleotides. Such a kit may also comprise a second container that comprises one or more reagents capable of indicating the presence of the nucleic acid molecule. On the other hand, a kit for detection of mouse *Zcytor16* protein may comprise a container that comprises an antibody, or an antibody fragment, that specifically binds with a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

The present invention also contemplates anti-idiotypic antibodies, or anti-idiotypic antibody fragments, that specifically bind an antibody or antibody fragment that specifically binds a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. An exemplary anti-idiotypic antibody binds with an antibody that specifically binds a polypeptide consisting of amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

The present invention also provides isolated nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence that encodes a mouse *Zcytor16* secretion signal sequence and a nucleotide sequence that encodes a biologically active polypeptide, wherein the mouse *Zcytor16* secretion signal sequence comprises an amino acid sequence of residues 1 to 23 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Illustrative biologically active polypeptides include Factor VIIa, proinsulin, insulin, follicle stimulating hormone, tissue type plasminogen activator, tumor necrosis factor, interleukin, colony stimulating factor, interferon, erythropoietin, and thrombopoietin.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

10

Moreover, the present invention provides fusion proteins comprising a mouse Zcytor16 secretion signal sequence and a polypeptide, wherein the mouse Zcytor16 secretion signal sequence comprises an amino acid sequence of residues 1 to 23, of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

5 The present invention also provides fusion proteins, comprising a mouse Zcytor16 polypeptide and an immunoglobulin moiety. In such fusion proteins, the immunoglobulin moiety may be an immunoglobulin heavy chain constant region, such as a human F<sub>C</sub> fragment. The present invention further includes isolated nucleic acid molecules that encode such fusion proteins.

10 The present invention also provides monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors comprising a mouse Zcytor16 extracellular domain. Such receptors are soluble or membrane bound, and act as antagonists of the Zcytor16 ligand, IL-TIF (e.g., the human IL-TIF as shown in SEQ ID NO:15, and mouse IL-TIF shown in SEQ ID NO:41). In a preferred embodiment, such receptors  
15 are soluble receptors comprising at least one mouse Zcytor16 extracellular domain polypeptide comprising amino acids 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. The present invention further includes isolated nucleic acid molecules that encode such receptor polypeptides.

The present invention also provides polyclonal and monoclonal  
20 antibodies to monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors comprising a mouse Zcytor16 extracellular domain such as those described above. Moreover, such antibodies can be used to antagonize the binding to the Zcytor16 ligand, IL-TIF (SEQ ID NO:15, and SEQ ID NO:41), to the Zcytor16 receptor.

The present invention also provides a method for detecting a cancer in a  
25 patient, comprising: obtaining a tissue or biological sample from a patient; incubating the tissue or biological sample with an antibody as described above under conditions wherein the antibody binds to its complementary polypeptide in the tissue or biological sample; visualizing the antibody bound in the tissue or biological sample; and comparing levels of antibody bound in the tissue or biological sample from the patient  
30 to a normal control tissue or biological sample, wherein an increase in the level of

WO 02/070655

PCT/US02/06267

11

antibody bound to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

The present invention also provides a method for detecting a cancer in a patient, comprising: obtaining a tissue or biological sample from a patient; labeling a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 or the complement of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47; incubating the tissue or biological sample with under conditions wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence; visualizing the labeled polynucleotide in the tissue or biological sample; and comparing the level of labeled polynucleotide hybridization in the tissue or biological sample from the patient to a normal control tissue or biological sample, wherein an increase in the labeled polynucleotide hybridization to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

These and other aspects of the invention will become evident upon reference to the following detailed description. In addition, various references are identified below and are incorporated by reference in their entirety.

## 2. Definitions

In the description that follows, a number of terms are used extensively. The following definitions are provided to facilitate understanding of the invention.

As used herein, "nucleic acid" or "nucleic acid molecule" refers to polynucleotides, such as deoxyribonucleic acid (DNA) or ribonucleic acid (RNA), oligonucleotides, fragments generated by the polymerase chain reaction (PCR), and fragments generated by any of ligation, scission, endonuclease action, and exonuclease action. Nucleic acid molecules can be composed of monomers that are naturally-occurring nucleotides (such as DNA and RNA), or analogs of naturally-occurring nucleotides (*e.g.*,  $\alpha$ -enantiomeric forms of naturally-occurring nucleotides), or a combination of both. Modified nucleotides can have alterations in sugar moieties and/or in pyrimidine or purine base moieties. Sugar modifications include, for example, replacement of one or more hydroxyl groups with halogens, alkyl groups,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

12

amines, and azido groups, or sugars can be functionalized as ethers or esters. Moreover, the entire sugar moiety can be replaced with sterically and electronically similar structures, such as aza-sugars and carbocyclic sugar analogs. Examples of modifications in a base moiety include alkylated purines and pyrimidines, acylated  
5 purines or pyrimidines, or other well-known heterocyclic substitutes. Nucleic acid monomers can be linked by phosphodiester bonds or analogs of such linkages. Analogs of phosphodiester linkages include phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphoroselenoate, phosphorodiselenoate, phosphoroanilothioate, phosphoranilidate, phosphoramidate, and the like. The term "nucleic acid molecule" also includes so-  
10 called "peptide nucleic acids," which comprise naturally-occurring or modified nucleic acid bases attached to a polyamide backbone. Nucleic acids can be either single stranded or double stranded.

The term "complement of a nucleic acid molecule" refers to a nucleic acid molecule having a complementary nucleotide sequence and reverse orientation as  
15 compared to a reference nucleotide sequence. For example, the sequence 5' ATGCACGGG 3' is complementary to 5' CCCGTGCAT 3'.

The term "contig" denotes a nucleic acid molecule that has a contiguous stretch of identical or complementary sequence to another nucleic acid molecule. Contiguous sequences are said to "overlap" a given stretch of a nucleic acid molecule  
20 either in their entirety or along a partial stretch of the nucleic acid molecule.

The term "degenerate nucleotide sequence" denotes a sequence of nucleotides that includes one or more degenerate codons as compared to a reference nucleic acid molecule that encodes a polypeptide. Degenerate codons contain different triplets of nucleotides, but encode the same amino acid residue (*i.e.*, GAU and GAC  
25 triplets each encode Asp).

The term "structural gene" refers to a nucleic acid molecule that is transcribed into messenger RNA (mRNA), which is then translated into a sequence of amino acids characteristic of a specific polypeptide.

An "isolated nucleic acid molecule" is a nucleic acid molecule that is not  
30 integrated in the genomic DNA of an organism. For example, a DNA molecule that encodes a growth factor that has been separated from the genomic DNA of a cell is an

WO 02/070655

PCT/US02/06267

13

isolated DNA molecule. Another example of an isolated nucleic acid molecule is a chemically-synthesized nucleic acid molecule that is not integrated in the genome of an organism. A nucleic acid molecule that has been isolated from a particular species is smaller than the complete DNA molecule of a chromosome from that species.

5 A "nucleic acid molecule construct" is a nucleic acid molecule, either single- or double-stranded, that has been modified through human intervention to contain segments of nucleic acid combined and juxtaposed in an arrangement not existing in nature.

"Linear DNA" denotes non-circular DNA molecules having free 5' and  
10 3' ends. Linear DNA can be prepared from closed circular DNA molecules, such as plasmids, by enzymatic digestion or physical disruption.

"Complementary DNA (cDNA)" is a single-stranded DNA molecule that is formed from an mRNA template by the enzyme reverse transcriptase. Typically, a primer complementary to portions of mRNA is employed for the initiation of reverse  
15 transcription. Those skilled in the art also use the term "cDNA" to refer to a double-stranded DNA molecule consisting of such a single-stranded DNA molecule and its complementary DNA strand. The term "cDNA" also refers to a clone of a cDNA molecule synthesized from an RNA template.

"Probes and/or primers" as used herein can be RNA or DNA. DNA can  
20 be either cDNA or genomic DNA. Polynucleotide probes and primers are single or double-stranded DNA or RNA, generally synthetic oligonucleotides, but may be generated from cloned cDNA or genomic sequences or its complements. Analytical probes will generally be at least 20 nucleotides in length, although somewhat shorter probes (14-17 nucleotides) can be used. PCR primers are at least 5 nucleotides in  
25 length, preferably 15 or more nt, more preferably 20-30 nt. Short polynucleotides can be used when a small region of the gene is targeted for analysis. For gross analysis of genes, a polynucleotide probe may comprise an entire exon or more. Probes can be labeled to provide a detectable signal, such as with an enzyme, biotin, a radionuclide, fluorophore, chemiluminescer, paramagnetic particle and the like, which are  
30 commercially available from many sources, such as Molecular Probes, Inc., Eugene,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

14

OR, and Amersham Corp., Arlington Heights, IL, using techniques that are well known in the art.

A "promoter" is a nucleotide sequence that directs the transcription of a structural gene. Typically, a promoter is located in the 5' non-coding region of a gene, proximal to the transcriptional start site of a structural gene. Sequence elements within promoters that function in the initiation of transcription are often characterized by consensus nucleotide sequences. These promoter elements include RNA polymerase binding sites, TATA sequences, CAAT sequences, differentiation-specific elements (DSEs; McGhee *et al.*, *Mol. Endocrinol.* 7:551 (1993)), cyclic AMP response elements (CREs), serum response elements (SREs; Treisman, *Seminars in Cancer Biol.* 1:47 (1990)), glucocorticoid response elements (GREs), and binding sites for other transcription factors, such as CRE/ATF (O'Reilly *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:19938 (1992)), AP2 (Ye *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:25728 (1994)), SP1, cAMP response element binding protein (CREB; Loeken, *Gene Expr.* 3:253 (1993)) and octamer factors (see, in general, Watson *et al.*, eds., *Molecular Biology of the Gene*, 4th ed. (The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. 1987), and Lemaigre and Rousseau, *Biochem. J.* 303:1 (1994)). If a promoter is an inducible promoter, then the rate of transcription increases in response to an inducing agent. In contrast, the rate of transcription is not regulated by an inducing agent if the promoter is a constitutive promoter. Repressible promoters are also known.

A "core promoter" contains essential nucleotide sequences for promoter function, including the TATA box and start of transcription. By this definition, a core promoter may or may not have detectable activity in the absence of specific sequences that may enhance the activity or confer tissue specific activity.

A "regulatory element" is a nucleotide sequence that modulates the activity of a core promoter. For example, a regulatory element may contain a nucleotide sequence that binds with cellular factors enabling transcription exclusively or preferentially in particular cells, tissues, or organelles. These types of regulatory elements are normally associated with genes that are expressed in a "cell-specific," "tissue-specific," or "organelle-specific" manner.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

15

An "enhancer" is a type of regulatory element that can increase the efficiency of transcription, regardless of the distance or orientation of the enhancer relative to the start site of transcription.

"Heterologous DNA" refers to a DNA molecule, or a population of  
5 DNA molecules, that does not exist naturally within a given host cell. DNA molecules heterologous to a particular host cell may contain DNA derived from the host cell species (*i.e.*, endogenous DNA) so long as that host DNA is combined with non-host DNA (*i.e.*, exogenous DNA). For example, a DNA molecule containing a non-host DNA segment encoding a polypeptide operably linked to a host DNA segment  
10 comprising a transcription promoter is considered to be a heterologous DNA molecule. Conversely, a heterologous DNA molecule can comprise an endogenous gene operably linked with an exogenous promoter. As another illustration, a DNA molecule comprising a gene derived from a wild-type cell is considered to be heterologous DNA if that DNA molecule is introduced into a mutant cell that lacks the wild-type gene.

15 A "polypeptide" is a polymer of amino acid residues joined by peptide bonds, whether produced naturally or synthetically. Polypeptides of less than about 10 amino acid residues are commonly referred to as "peptides."

A "protein" is a macromolecule comprising one or more polypeptide chains. A protein may also comprise non-peptidic components, such as carbohydrate  
20 groups. Carbohydrates and other non-peptidic substituents may be added to a protein by the cell in which the protein is produced, and will vary with the type of cell. Proteins are defined herein in terms of their amino acid backbone structures; substituents such as carbohydrate groups are generally not specified, but may be present nonetheless.

25 A peptide or polypeptide encoded by a non-host DNA molecule is a "heterologous" peptide or polypeptide.

An "integrated genetic element" is a segment of DNA that has been incorporated into a chromosome of a host cell after that element is introduced into the cell through human manipulation. Within the present invention, integrated genetic  
30 elements are most commonly derived from linearized plasmids that are introduced into



WO 02/070655

PCT/US02/06267

16

the cells by electroporation or other techniques. Integrated genetic elements are passed from the original host cell to its progeny.

A "cloning vector" is a nucleic acid molecule, such as a plasmid, cosmid, or bacteriophage, that has the capability of replicating autonomously in a host cell. Cloning vectors typically contain one or a small number of restriction endonuclease recognition sites that allow insertion of a nucleic acid molecule in a determinable fashion without loss of an essential biological function of the vector, as well as nucleotide sequences encoding a marker gene that is suitable for use in the identification and selection of cells transformed with the cloning vector. Marker genes typically include genes that provide antibiotic resistance, e.g., tetracycline resistance or ampicillin resistance.

An "expression vector" is a nucleic acid molecule encoding a gene that is expressed in a host cell. Typically, an expression vector comprises a transcription promoter, a gene, and a transcription terminator. Gene expression is usually placed under the control of a promoter, and such a gene is said to be "operably linked to" the promoter. Similarly, a regulatory element and a core promoter are operably linked if the regulatory element modulates the activity of the core promoter.

A "recombinant host" is a cell that contains a heterologous nucleic acid molecule, such as a cloning vector or expression vector. In the present context, an example of a recombinant host is a cell that produces mouse Zcytor16 from an expression vector. In contrast, mouse Zcytor16 can be produced by a cell that is a "natural source" of mouse Zcytor16, and that lacks an expression vector.

"Integrative transformants" are recombinant host cells, in which heterologous DNA has become integrated into the genomic DNA of the cells.

A "fusion protein" is a hybrid protein expressed by a nucleic acid molecule comprising nucleotide sequences of at least two polynucleotides, genes, or cDNAs. For example, a fusion protein can comprise at least part of a mouse Zcytor16 polypeptide fused with a polypeptide that binds an affinity matrix. Such a fusion protein provides a means to isolate large quantities of mouse Zcytor16 using affinity chromatography.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

17

The term "receptor" denotes a cell-associated protein that binds to a bioactive molecule termed a "ligand." This interaction mediates the effect of the ligand on the cell. Receptors can be membrane bound, cytosolic or nuclear; monomeric (*e.g.*, thyroid stimulating hormone receptor, beta-adrenergic receptor) or multimeric (*e.g.*, PDGF receptor, growth hormone receptor, IL-3 receptor, GM-CSF receptor, G-CSF receptor, erythropoietin receptor and IL-6 receptor). Membrane-bound receptors are characterized by a multi-domain structure comprising an extracellular ligand-binding domain and an intracellular effector domain that is typically involved in signal transduction. In certain membrane-bound receptors, the extracellular ligand-binding domain and the intracellular effector domain are located in separate polypeptides that comprise the complete functional receptor.

In general, the binding of ligand to receptor results in a conformational change in the receptor that causes an interaction between the effector domain and other molecule(s) in the cell, which in turn leads to an alteration in the metabolism of the cell. Metabolic events that are often linked to receptor-ligand interactions include gene transcription, phosphorylation, dephosphorylation, increases in cyclic AMP production, mobilization of cellular calcium, mobilization of membrane lipids, cell adhesion, hydrolysis of inositol lipids and hydrolysis of phospholipids.

A "soluble receptor" is a receptor polypeptide that is not bound to a cell membrane. Soluble receptors are most commonly ligand-binding receptor polypeptides that lack transmembrane and cytoplasmic domains, and other linkage to the cell membrane such as via glycosylphosphatidylinositol (gpi). Soluble receptors can comprise additional amino acid residues, such as affinity tags that provide for purification of the polypeptide or provide sites for attachment of the polypeptide to a substrate, or immunoglobulin constant region sequences. Many cell-surface receptors have naturally occurring, soluble counterparts that are produced by proteolysis or translated from alternatively spliced mRNAs. Soluble receptors can be monomeric, homodimeric, heterodimeric, or multimeric, with multimeric receptors generally not comprising more than 9 subunits, preferably not comprising more than 6 subunits, and most preferably not comprising more than 3 subunits. Receptor polypeptides are said to be substantially free of transmembrane and intracellular polypeptide segments when they lack sufficient

WO 02/070655

PCT/US02/06267

18

portions of these segments to provide membrane anchoring or signal transduction, respectively. Soluble receptors of class I and class II cytokine receptors generally comprise the extracellular cytokine binding domain free of a transmembrane domain and intracellular domain. For example, representative soluble receptors include a soluble receptor for CRF2-4 (Genbank Accession No. Z17227) as shown in SEQ ID NO:35; a soluble receptor for IL-10R (Genbank Accession No.s U00672 and NM\_001558) as shown in SEQ ID NO:36; and a soluble receptor for zcytor11 (US Patent No. 5,965,704) as shown in SEQ ID NO:34. It is well within the level of one of skill in the art to delineate what sequences of a known class I or class II cytokine sequence comprise the extracellular cytokine binding domain free of a transmembrane domain and intracellular domain. Moreover, one of skill in the art using the genetic code can readily determine polynucleotides that encode such soluble receptor polypeptides.

The term "secretory signal sequence" denotes a DNA sequence that encodes a peptide (a "secretory peptide") that, as a component of a larger polypeptide, directs the larger polypeptide through a secretory pathway of a cell in which it is synthesized. The larger polypeptide is commonly cleaved to remove the secretory peptide during transit through the secretory pathway.

An "isolated polypeptide" is a polypeptide that is essentially free from contaminating cellular components, such as carbohydrate, lipid, or other proteinaceous impurities associated with the polypeptide in nature. Typically, a preparation of isolated polypeptide contains the polypeptide in a highly purified form, *i.e.*, at least about 80% pure, at least about 90% pure, at least about 95% pure, greater than 95% pure, or greater than 99% pure. One way to show that a particular protein preparation contains an isolated polypeptide is by the appearance of a single band following sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel electrophoresis of the protein preparation and Coomassie Brilliant Blue staining of the gel. However, the term "isolated" does not exclude the presence of the same polypeptide in alternative physical forms, such as dimers or alternatively glycosylated or derivatized forms.

The terms "amino-terminal" and "carboxyl-terminal" are used herein to denote positions within polypeptides. Where the context allows, these terms are used

WO 02/070655

PCT/US02/06267

19

with reference to a particular sequence or portion of a polypeptide to denote proximity or relative position. For example, a certain sequence positioned carboxyl-terminal to a reference sequence within a polypeptide is located proximal to the carboxyl terminus of the reference sequence, but is not necessarily at the carboxyl terminus of the complete polypeptide.

The term "expression" refers to the biosynthesis of a gene product. For example, in the case of a structural gene, expression involves transcription of the structural gene into mRNA and the translation of mRNA into one or more polypeptides.

The term "splice variant" is used herein to denote alternative forms of RNA transcribed from a gene. Splice variation arises naturally through use of alternative splicing sites within a transcribed RNA molecule, or less commonly between separately transcribed RNA molecules, and may result in several mRNAs transcribed from the same gene. Splice variants may encode polypeptides having altered amino acid sequence. The term splice variant is also used herein to denote a polypeptide encoded by a splice variant of an mRNA transcribed from a gene.

As used herein, the term "immunomodulator" includes cytokines, stem cell growth factors, lymphotoxins, co-stimulatory molecules, hematopoietic factors, and synthetic analogs of these molecules.

The term "complement/anti-complement pair" denotes non-identical moieties that form a non-covalently associated, stable pair under appropriate conditions. For instance, biotin and avidin (or streptavidin) are prototypical members of a complement/anti-complement pair. Other exemplary complement/anti-complement pairs include receptor/ligand pairs, antibody/antigen (or hapten or epitope) pairs, sense/antisense polynucleotide pairs, and the like. Where subsequent dissociation of the complement/anti-complement pair is desirable, the complement/anti-complement pair preferably has a binding affinity of less than  $10^9 \text{ M}^{-1}$ .

An "anti-idiotypic antibody" is an antibody that binds with the variable region domain of an immunoglobulin. In the present context, an anti-idiotypic antibody binds with the variable region of an anti-mouse Zcytor16 antibody, and thus, an anti-idiotypic antibody mimics an epitope of mouse Zcytor16.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

20

An "antibody fragment" is a portion of an antibody such as F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, Fab', Fab, and the like. Regardless of structure, an antibody fragment binds with the same antigen that is recognized by the intact antibody. For example, an anti-mouse Zcytor16 monoclonal antibody fragment binds with an epitope of mouse Zcytor16.

5 The term "antibody fragment" also includes a synthetic or a genetically engineered polypeptide that binds to a specific antigen, such as polypeptides consisting of the light chain variable region, "Fv" fragments consisting of the variable regions of the heavy and light chains, recombinant single chain polypeptide molecules in which light and heavy variable regions are connected by a peptide linker ("scFv proteins"), and  
10 minimal recognition units consisting of the amino acid residues that mimic the hypervariable region.

A "chimeric antibody" is a recombinant protein that contains the variable domains and complementary determining regions derived from a rodent antibody, while the remainder of the antibody molecule is derived from a human antibody.

15 "Humanized antibodies" are recombinant proteins in which murine complementarity determining regions of a monoclonal antibody have been transferred from heavy and light variable chains of the murine immunoglobulin into a human variable domain.

As used herein, a "therapeutic agent" is a molecule or atom which is  
20 conjugated to an antibody moiety to produce a conjugate which is useful for therapy. Examples of therapeutic agents include drugs, toxins, immunomodulators, chelators, boron compounds, photoactive agents or dyes, and radioisotopes.

A "detectable label" is a molecule or atom which can be conjugated to an antibody moiety to produce a molecule useful for diagnosis. Examples of detectable  
25 labels include chelators, photoactive agents, radioisotopes, fluorescent agents, paramagnetic ions, or other marker moieties.

The term "affinity tag" is used herein to denote a polypeptide segment that can be attached to a second polypeptide to provide for purification or detection of the second polypeptide or provide sites for attachment of the second polypeptide to a  
30 substrate. In principal, any peptide or protein for which an antibody or other specific binding agent is available can be used as an affinity tag. Affinity tags include a poly-

WO 02/070655

PCT/US02/06267

21

histidine tract, protein A (Nilsson *et al.*, *EMBO J.* 4:1075 (1985); Nilsson *et al.*, *Methods Enzymol.* 198:3 (1991)), glutathione S transferase (Smith and Johnson, *Gene* 67:31 (1988)), Glu-Glu affinity tag (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7952 (1985)), substance P, FLAG peptide (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204 (1988)), streptavidin binding peptide, or other antigenic epitope or binding domain. See, in general, Ford *et al.*, *Protein Expression and Purification* 2:95 (1991). DNA molecules encoding affinity tags are available from commercial suppliers (e.g., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

A "naked antibody" is an entire antibody, as opposed to an antibody fragment, which is not conjugated with a therapeutic agent. Naked antibodies include both polyclonal and monoclonal antibodies, as well as certain recombinant antibodies, such as chimeric and humanized antibodies.

As used herein, the term "antibody component" includes both an entire antibody and an antibody fragment.

An "immunoconjugate" is a conjugate of an antibody component with a therapeutic agent or a detectable label.

As used herein, the term "antibody fusion protein" refers to a recombinant molecule that comprises an antibody component and a mouse Zcytor16 polypeptide component. Examples of an antibody fusion protein include a protein that comprises a mouse Zcytor16 extracellular domain, and either an Fc domain or an antigen-binding region.

A "target polypeptide" or a "target peptide" is an amino acid sequence that comprises at least one epitope, and that is expressed on a target cell, such as a tumor cell, or a cell that carries an infectious agent antigen. T cells recognize peptide epitopes presented by a major histocompatibility complex molecule to a target polypeptide or target peptide and typically lyse the target cell or recruit other immune cells to the site of the target cell, thereby killing the target cell.

An "antigenic peptide" is a peptide which will bind a major histocompatibility complex molecule to form an MHC-peptide complex which is recognized by a T cell, thereby inducing a cytotoxic lymphocyte response upon presentation to the T cell. Thus, antigenic peptides are capable of binding to an

WO 02/070655

PCT/US02/06267

22

appropriate major histocompatibility complex molecule and inducing a cytotoxic T cells response, such as cell lysis or specific cytokine release against the target cell which binds or expresses the antigen. The antigenic peptide can be bound in the context of a class I or class II major histocompatibility complex molecule, on an antigen  
5 presenting cell or on a target cell.

In eukaryotes, RNA polymerase II catalyzes the transcription of a structural gene to produce mRNA. A nucleic acid molecule can be designed to contain an RNA polymerase II template in which the RNA transcript has a sequence that is complementary to that of a specific mRNA. The RNA transcript is termed an "anti-sense RNA" and a nucleic acid molecule that encodes the anti-sense RNA is termed an  
10 "anti-sense gene." Anti-sense RNA molecules are capable of binding to mRNA molecules, resulting in an inhibition of mRNA translation.

An "anti-sense oligonucleotide specific for mouse *Zcytor16*" or a "mouse *Zcytor16* anti-sense oligonucleotide" is an oligonucleotide having a sequence (a)  
15 capable of forming a stable triplex with a portion of the mouse *Zcytor16* gene, or (b) capable of forming a stable duplex with a portion of an mRNA transcript of the mouse *Zcytor16* gene.

A "ribozyme" is a nucleic acid molecule that contains a catalytic center. The term includes RNA enzymes, self-splicing RNAs, self-cleaving RNAs, and nucleic  
20 acid molecules that perform these catalytic functions. A nucleic acid molecule that encodes a ribozyme is termed a "ribozyme gene."

An "external guide sequence" is a nucleic acid molecule that directs the endogenous ribozyme, RNase P, to a particular species of intracellular mRNA, resulting in the cleavage of the mRNA by RNase P. A nucleic acid molecule that encodes an  
25 external guide sequence is termed an "external guide sequence gene."

The term "variant mouse *Zcytor16* gene" refers to nucleic acid molecules that encode a polypeptide having an amino acid sequence that is a modification of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Such variants include naturally-occurring polymorphisms of mouse *Zcytor16* genes, as well as synthetic genes that contain conservative amino  
30 acid substitutions of the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Additional variant forms of mouse *Zcytor16* genes are nucleic acid molecules that

WO 02/070655

PCT/US02/06267

23

contain insertions or deletions of the nucleotide sequences described herein. A variant mouse *Zcytor16* gene can be identified, for example, by determining whether the gene hybridizes with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or its complement, under stringent conditions.

5 Alternatively, variant mouse *Zcytor16* genes can be identified by sequence comparison. Two amino acid sequences have "100% amino acid sequence identity" if the amino acid residues of the two amino acid sequences are the same when aligned for maximal correspondence. Similarly, two nucleotide sequences have "100% nucleotide sequence identity" if the nucleotide residues of the two nucleotide sequences  
10 are the same when aligned for maximal correspondence. Sequence comparisons can be performed using standard software programs such as those included in the LASERGENE bioinformatics computing suite, which is produced by DNASTAR (Madison, Wisconsin). Other methods for comparing two nucleotide or amino acid sequences by determining optimal alignment are well-known to those of skill in the art  
15 (see, for example, Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997), Wu *et al.* (eds.), "Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 123-151 (CRC Press, Inc. 1997), and Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing*, 2nd Edition (Academic Press, Inc. 1998)).  
20 Particular methods for determining sequence identity are described below.

Regardless of the particular method used to identify a variant mouse *Zcytor16* gene or variant mouse *Zcytor16* polypeptide, a variant gene or polypeptide encoded by a variant gene may be functionally characterized the ability to bind specifically to an anti-mouse *Zcytor16* antibody. A variant mouse *Zcytor16* gene or  
25 variant mouse *Zcytor16* polypeptide may also be functionally characterized the ability to bind to its ligand, IL-TIF, using a biological or biochemical assay described herein.

The term "allelic variant" is used herein to denote any of two or more alternative forms of a gene occupying the same chromosomal locus. Allelic variation arises naturally through mutation, and may result in phenotypic polymorphism within  
30 populations. Gene mutations can be silent (no change in the encoded polypeptide) or



WO 02/070655

PCT/US02/06267

24

may encode polypeptides having altered amino acid sequence. The term allelic variant is also used herein to denote a protein encoded by an allelic variant of a gene.

The term "ortholog" denotes a polypeptide or protein obtained from one species that is the functional counterpart of a polypeptide or protein from a different species. Sequence differences among orthologs are the result of speciation.

"Paralogs" are distinct but structurally related proteins made by an organism. Paralogs are believed to arise through gene duplication. For example,  $\alpha$ -globin,  $\beta$ -globin, and myoglobin are paralogs of each other.

The present invention includes functional fragments of mouse *Zcytor16* genes. Within the context of this invention, a "functional fragment" of a mouse *Zcytor16* gene refers to a nucleic acid molecule that encodes a portion of a mouse *Zcytor16* polypeptide which is a domain described herein or at least specifically binds with an anti-mouse *Zcytor16* antibody.

Due to the imprecision of standard analytical methods, molecular weights and lengths of polymers are understood to be approximate values. When such a value is expressed as "about" X or "approximately" X, the stated value of X will be understood to be accurate to  $\pm 10\%$ .

### 3. Production of mouse *Zcytor16* Polynucleotides or Genes

Nucleic acid molecules encoding a mouse *Zcytor16* gene can be obtained by screening a mouse cDNA or genomic library using polynucleotide probes based upon SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. These techniques are standard and well-established.

As an illustration, a nucleic acid molecule that encodes a mouse *Zcytor16* gene can be isolated from a cDNA library. In this case, the first step would be to prepare the cDNA library by isolating RNA from a tissue, such as a tissue wherein mouse *Zcytor16* is specifically expressed, using methods well-known to those of skill in the art. In general, RNA isolation techniques must provide a method for breaking cells, a means of inhibiting RNase-directed degradation of RNA, and a method of separating RNA from DNA, protein, and polysaccharide contaminants. For example, total RNA can be isolated by freezing tissue in liquid nitrogen, grinding the frozen tissue with a mortar

WO 02/070655

PCT/US02/06267

25

and pestle to lyse the cells, extracting the ground tissue with a solution of phenol/chloroform to remove proteins, and separating RNA from the remaining impurities by selective precipitation with lithium chloride (see, for example, Ausubel *et al.* (eds.), *Short Protocols in Molecular Biology*, 3<sup>rd</sup> Edition, pages 4-1 to 4-6 (John Wiley & Sons 1995) ["Ausubel (1995)"]; Wu *et al.*, *Methods in Gene Biotechnology*, pages 33-41 (CRC Press, Inc. 1997) ["Wu (1997)"]).

Alternatively, total RNA can be isolated by extracting ground tissue with guanidinium isothiocyanate, extracting with organic solvents, and separating RNA from contaminants using differential centrifugation (see, for example, Chirgwin *et al.*, *Biochemistry* 18:52 (1979); Ausubel (1995) at pages 4-1 to 4-6; Wu (1997) at pages 33-41).

In order to construct a cDNA library, poly(A)<sup>+</sup> RNA must be isolated from a total RNA preparation. Poly(A)<sup>+</sup> RNA can be isolated from total RNA using the standard technique of oligo(dT)-cellulose chromatography (see, for example, Aviv and Leder, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:1408 (1972); Ausubel (1995) at pages 4-11 to 4-12).

Double-stranded cDNA molecules are synthesized from poly(A)<sup>+</sup> RNA using techniques well-known to those in the art. (see, for example, Wu (1997) at pages 41-46). Moreover, commercially available kits can be used to synthesize double-stranded cDNA molecules. For example, such kits are available from Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Promega Corporation (Madison, WI) and STRATAGENE (La Jolla, CA).

Various cloning vectors are appropriate for the construction of a cDNA library. For example, a cDNA library can be prepared in a vector derived from bacteriophage, such as a  $\lambda$ gt10 vector. See, for example, Huynh *et al.*, "Constructing and Screening cDNA Libraries in  $\lambda$ gt10 and  $\lambda$ gt11," in *DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I*, Glover (ed.), page 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) at pages 47-52.

Alternatively, double-stranded cDNA molecules can be inserted into a plasmid vector, such as a pBLUESCRIPT vector (STRATAGENE; La Jolla, CA), a LAMDA GEM-4 (Promega Corp.) or other commercially available vectors. Suitable

WO 02/070655

PCT/US02/06267

26

cloning vectors also can be obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA).

To amplify the cloned cDNA molecules, the cDNA library is inserted into a prokaryotic host, using standard techniques. For example, a cDNA library can be introduced into competent *E. coli* DH5 or DH10B cells, which can be obtained, for example, from Life Technologies, Inc. or GIBCO BRL (Gaithersburg, MD).

A human genomic library can be prepared by means well known in the art (see, for example, Ausubel (1995) at pages 5-1 to 5-6; Wu (1997) at pages 307-327). Genomic DNA can be isolated by lysing tissue with the detergent Sarkosyl, digesting the lysate with proteinase K, clearing insoluble debris from the lysate by centrifugation, precipitating nucleic acid from the lysate using isopropanol, and purifying resuspended DNA on a cesium chloride density gradient.

DNA fragments that are suitable for the production of a genomic library can be obtained by the random shearing of genomic DNA or by the partial digestion of genomic DNA with restriction endonucleases. Genomic DNA fragments can be inserted into a vector, such as a bacteriophage or cosmid vector, in accordance with conventional techniques, such as the use of restriction enzyme digestion to provide appropriate termini, the use of alkaline phosphatase treatment to avoid undesirable joining of DNA molecules, and ligation with appropriate ligases. Techniques for such manipulation are well known in the art (see, for example, Ausubel (1995) at pages 5-1 to 5-6; Wu (1997) at pages 307-327).

Alternatively, human genomic libraries can be obtained from commercial sources such as Research Genetics (Huntsville, AL) and the American Type Culture Collection (Manassas, VA).

A library containing cDNA or genomic clones can be screened with one or more polynucleotide probes based upon SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, using standard methods (see, for example, Ausubel (1995) at pages 6-1 to 6-11).

Nucleic acid molecules that encode a mouse *Zcytor16* gene can also be obtained using the polymerase chain reaction (PCR) with oligonucleotide primers having nucleotide sequences that are based upon the nucleotide sequences of the mouse *Zcytor16* gene, as described herein. General methods for screening libraries with PCR

WO 02/070655

PCT/US02/06267

27

are provided by, for example, Yu *et al.*, "Use of the Polymerase Chain Reaction to Screen Phage Libraries," in *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), pages 211-215 (Humana Press, Inc. 1993). Moreover, techniques for using PCR to isolate related genes are described by, for example, Preston, "Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members," in *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), pages 317-337 (Humana Press, Inc. 1993).

Anti-mouse Zcytor16 antibodies, produced as described below, can also be used to isolate DNA sequences that encode mouse Zcytor16 genes from cDNA libraries. For example, the antibodies can be used to screen  $\lambda$ gt11 expression libraries, or the antibodies can be used for immunoscreening following hybrid selection and translation (see, for example, Ausubel (1995) at pages 6-12 to 6-16; Margolis *et al.*, "Screening  $\lambda$  expression libraries with antibody and protein probes," in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition*, Glover *et al.* (eds.), pages 1-14 (Oxford University Press 1995)).

As an alternative, a mouse Zcytor16 gene can be obtained by synthesizing nucleic acid molecules using mutually priming long oligonucleotides and the nucleotide sequences described herein (see, for example, Ausubel (1995) at pages 8-8 to 8-9). Established techniques using the polymerase chain reaction provide the ability to synthesize DNA molecules at least two kilobases in length (Adang *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 21:1131 (1993), Bambot *et al.*, *PCR Methods and Applications* 2:266 (1993), Dillon *et al.*, "Use of the Polymerase Chain Reaction for the Rapid Construction of Synthetic Genes," in *Methods in Molecular Biology, Vol. 15: PCR Protocols: Current Methods and Applications*, White (ed.), pages 263-268, (Humana Press, Inc. 1993), and Holowachuk *et al.*, *PCR Methods Appl.* 4:299 (1995)).

The nucleic acid molecules of the present invention can also be synthesized with "gene machines" using protocols such as the phosphoramidite method. If chemically-synthesized double stranded DNA is required for an application such as the synthesis of a gene or a gene fragment, then each complementary strand is made separately. The production of short genes (60 to 80 base pairs) is technically

WO 02/070655

PCT/US02/06267

28

straightforward and can be accomplished by synthesizing the complementary strands and then annealing them. For the production of longer genes (>300 base pairs), however, special strategies may be required, because the coupling efficiency of each cycle during chemical DNA synthesis is seldom 100%. To overcome this problem, 5 synthetic genes (double-stranded) are assembled in modular form from single-stranded fragments that are from 20 to 100 nucleotides in length. For reviews on polynucleotide synthesis, see, for example, Glick and Pasternak, *Molecular Biotechnology, Principles and Applications of Recombinant DNA* (ASM Press 1994), Itakura *et al.*, *Annu. Rev. Biochem.* 53:323 (1984), and Climie *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 87:633 (1990).

10 The sequence of a mouse *Zcytor16* cDNA or mouse *Zcytor16* genomic fragment can be determined using standard methods. Mouse *Zcytor16* polynucleotide sequences disclosed herein can also be used as probes or primers to clone 5' non-coding regions of a mouse *Zcytor16* gene. Because mouse *Zcytor16* is expressed in a limited number of specific tissues, promoter elements from a mouse *Zcytor16* gene can be used 15 to direct the expression of heterologous genes in, for example, specific tissues of transgenic animals or patients treated with gene therapy. The identification of genomic fragments containing a mouse *Zcytor16* promoter or regulatory element can be achieved using well-established techniques, such as deletion analysis (see, generally, Ausubel (1995)).

20 Cloning of 5' flanking sequences also facilitates production of mouse *Zcytor16* proteins by "gene activation," as disclosed in U.S. Patent No. 5,641,670. Briefly, expression of an endogenous mouse *Zcytor16* gene in a cell is altered by introducing into the mouse *Zcytor16* locus a DNA construct comprising at least a targeting sequence, a regulatory sequence, an exon, and an unpaired splice donor site.

25 The targeting sequence is a mouse *Zcytor16* 5' non-coding sequence that permits homologous recombination of the construct with the endogenous mouse *Zcytor16* locus, whereby the sequences within the construct become operably linked with the endogenous mouse *Zcytor16* coding sequence. In this way, an endogenous mouse *Zcytor16* promoter can be replaced or supplemented with other regulatory sequences to 30 provide enhanced, tissue-specific, or otherwise regulated expression.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

29

#### 4. *Production of mouse Zcytor16 Gene Variants*

The present invention provides a variety of nucleic acid molecules, including DNA and RNA molecules, that encode the mouse Zcytor16 polypeptides disclosed herein. Those skilled in the art will readily recognize that, in view of the degeneracy of the genetic code, considerable sequence variation is possible among these polynucleotide molecules. SEQ ID NO:3 is a degenerate nucleotide sequence that encompasses all nucleic acid molecules that encode the human Zcytor16 polypeptide of SEQ ID NO:2. Similarly, SEQ ID NO:39 is a degenerate nucleotide sequence that encompasses all nucleic acid molecules that encode the mouse Zcytor16 polypeptide of SEQ ID NO:38; and SEQ ID NO:49 is a degenerate nucleotide sequence that encompasses all nucleic acid molecules that encode the mouse Zcytor16 polypeptide of SEQ ID NO:48. Those skilled in the art will recognize that the degenerate sequence of SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:49 also provides all RNA sequences encoding SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:48 respectively, by substituting U for T. Moreover, the present invention also provides isolated soluble monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor polypeptides that comprise at least one mouse Zcytor16 receptor subunit that is substantially homologous to the receptor polypeptide of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Thus, the present invention contemplates mouse Zcytor16 polypeptide-encoding nucleic acid molecules comprising nucleotide 1 to nucleotide 693 of SEQ ID NO:39, and nucleic acid molecules comprising nucleotide 1 to nucleotide 693 of SEQ ID NO:49, and their RNA equivalents. Moreover, mouse zcytor16 fragments described herein in SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:38, SEQ ID NO:47 and SEQ ID NO:48 with reference to SEQ ID NO:39 and SEQ ID NO:49, are also contemplated.

Table I sets forth the one-letter codes used within SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49 to denote degenerate nucleotide positions. "Resolutions" are the nucleotides denoted by a code letter. "Complement" indicates the code for the complementary nucleotide(s). For example, the code Y denotes either C or T, and its complement R denotes A or G, A being complementary to T, and G being complementary to C.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

30

Table 1

| Nucleotide | Resolution | Complement | Resolution |
|------------|------------|------------|------------|
| A          | A          | T          | T          |
| C          | C          | G          | G          |
| G          | G          | C          | C          |
| T          | T          | A          | A          |
| R          | A G        | Y          | C T        |
| Y          | C T        | R          | A G        |
| M          | A C        | K          | G T        |
| K          | G T        | M          | A C        |
| S          | C G        | S          | C G        |
| W          | A T        | W          | A T        |
| H          | A C T      | D          | A G T      |
| B          | C G T      | V          | A C G      |
| V          | A C G      | B          | C G T      |
| D          | A G T      | H          | A C T      |
| N          | A C G T    | N          | A C G T    |

The degenerate codons used in SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49,  
5 encompassing all possible codons for a given amino acid, are set forth in Table 2.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

31

Table 2

| Amino Acid | One Letter Code | Codons                  | Degenerate Codon |
|------------|-----------------|-------------------------|------------------|
| Cys        | C               | TGC TGT                 | TGY              |
| Ser        | S               | AGC AGT TCA TCC TCG TCT | WSN              |
| Thr        | T               | ACA ACC ACG ACT         | ACN              |
| Pro        | P               | CCA CCC CCG CCT         | CCN              |
| Ala        | A               | GCA GCC GCG GCT         | GCN              |
| Gly        | G               | GGA GGC GGG GGT         | GGN              |
| Asn        | N               | AAC AAT                 | AAV              |
| Asp        | D               | GAC GAT                 | GAY              |
| Glu        | E               | GAA GAG                 | GAR              |
| Gln        | Q               | CAA CAG                 | CAR              |
| His        | H               | CAC CAT                 | CAY              |
| Arg        | R               | AGA AGG CGA CGC CGG CGT | MGN              |
| Lys        | K               | AAA AAG                 | AAR              |
| Met        | M               | ATG                     | ATG              |
| Ile        | I               | ATA ATC ATT             | ATH              |
| Leu        | L               | CTA CTC CTG CTT TTA TTG | YTN              |
| Val        | V               | GTA GTC GTG GTT         | GTN              |
| Phe        | F               | TTC TTT                 | TTY              |
| Tyr        | Y               | TAC TAT                 | TAY              |
| Trp        | W               | TGG                     | TGG              |
| Ter        | .               | TAA TAG TGA             | TRR              |
| Asn Asp    | B               |                         | RAY              |
| Glu Gln    | Z               |                         | SAR              |
| Any        | X               |                         | NNN              |



WO 02/070655

PCT/US02/06267

32

One of ordinary skill in the art will appreciate that some ambiguity is introduced in determining a degenerate codon, representative of all possible codons encoding an amino acid. For example, the degenerate codon for serine (WSN) can, in some circumstances, encode arginine (AGR), and the degenerate codon for arginine (MGN) can, in some circumstances, encode serine (AGY). A similar relationship exists between codons encoding phenylalanine and leucine. Thus, some polynucleotides encompassed by the degenerate sequence may encode variant amino acid sequences, but one of ordinary skill in the art can easily identify such variant sequences by reference to the amino acid sequences of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Variant sequences can be readily tested for functionality as described herein.

Different species can exhibit "preferential codon usage." In general, see, Grantham *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 8:1893 (1980), Haas *et al.* *Curr. Biol.* 6:315 (1996), Wain-Hobson *et al.*, *Gene* 13:355 (1981), Grosjean and Fiers, *Gene* 18:199 (1982), Holm, *Nucl. Acids Res.* 14:3075 (1986), Ikemura, *J. Mol. Biol.* 158:573 (1982), Sharp and Matassi, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4:851 (1994), Kane, *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:494 (1995), and Makrides, *Microbiol. Rev.* 60:512 (1996). As used herein, the term "preferential codon usage" or "preferential codons" is a term of art referring to protein translation codons that are most frequently used in cells of a certain species, thus favoring one or a few representatives of the possible codons encoding each amino acid (See Table 2). For example, the amino acid threonine (Thr) may be encoded by ACA, ACC, ACG, or ACT, but in mammalian cells ACC is the most commonly used codon; in other species, for example, insect cells, yeast, viruses or bacteria, different Thr codons may be preferential. Preferential codons for a particular species can be introduced into the polynucleotides of the present invention by a variety of methods known in the art. Introduction of preferential codon sequences into recombinant DNA can, for example, enhance production of the protein by making protein translation more efficient within a particular cell type or species. Therefore, the degenerate codon sequences disclosed herein serve as a template for optimizing expression of polynucleotides in various cell types and species commonly used in the art and disclosed herein. Sequences containing preferential codons can be tested and optimized for expression in various species, and tested for functionality as disclosed herein.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

33

The present invention further provides variant polypeptides and nucleic acid molecules that represent counterparts from other species (orthologs). These species include, but are not limited to mammalian, avian, amphibian, reptile, fish, insect and other vertebrate and invertebrate species. Of particular interest are Zcytor16

5 polypeptides from other mammalian species, including human, rat, porcine, ovine, bovine, canine, feline, equine, and other primate polypeptides. Orthologs of mouse Zcytor16 can be cloned using information and compositions provided by the present invention in combination with conventional cloning techniques. For example, a mouse Zcytor16 cDNA can be cloned using mRNA obtained from a tissue or cell type that

10 expresses mouse Zcytor16 as disclosed herein. Suitable sources of mRNA can be identified by probing northern blots with probes designed from the sequences disclosed herein. A library is then prepared from mRNA of a positive tissue or cell line.

A Zcytor16-encoding cDNA can be isolated by a variety of methods, such as by probing with a complete or partial cDNA or with one or more sets of

15 degenerate probes based on the disclosed sequences. A cDNA can also be cloned using the polymerase chain reaction with primers designed from the representative mouse Zcytor16 sequences disclosed herein. In addition, a cDNA library can be used to transform or transfect host cells, and expression of the cDNA of interest can be detected with an antibody to mouse Zcytor16 polypeptide.

20 Those skilled in the art will recognize that the sequence disclosed in SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 represents a single allele of mouse Zcytor16, and that allelic variation and alternative splicing are expected to occur. Allelic variants of this sequence can be cloned by probing cDNA or genomic libraries from different individuals according to standard procedures. Allelic variants of the nucleotide

25 sequences disclosed herein, including those containing silent mutations and those in which mutations result in amino acid sequence changes, are within the scope of the present invention, as are proteins which are allelic variants of the amino acid sequences disclosed herein. cDNA molecules generated from alternatively spliced mRNAs, which retain the properties of the mouse Zcytor16 polypeptide are included within the scope

30 of the present invention, as are polypeptides encoded by such cDNAs and mRNAs. Allelic variants and splice variants of these sequences can be cloned by probing cDNA

WO 02/070655

PCT/US02/06267

34

or genomic libraries from different individuals or tissues according to standard procedures known in the art.

Using the methods discussed above, one of ordinary skill in the art can prepare a variety of polypeptides that comprise a soluble receptor subunit that is substantially homologous to SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, amino acids 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, or allelic variants thereof and retain the ligand-binding properties of the wild-type mouse Zcytor16 receptor. Such polypeptides may also include additional polypeptide segments as generally disclosed herein.

Within certain embodiments of the invention, the isolated nucleic acid molecules can hybridize under stringent conditions to nucleic acid molecules comprising nucleotide sequences disclosed herein. For example, such nucleic acid molecules can hybridize under stringent conditions to nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, to nucleic acid molecules consisting of the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 694 or 697; or 77, 86, or 100 to 694 or 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or to nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence complementary to SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 or to nucleotides 8 to 694 or 697; or 77, 86, or 100 to 694 or 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or fragments thereof. In general, stringent conditions are selected to be about 5°C lower than the thermal melting point ( $T_m$ ) for the specific sequence at a defined ionic strength and pH. The  $T_m$  is the temperature (under defined ionic strength and pH) at which 50% of the target sequence hybridizes to a perfectly matched probe.

A pair of nucleic acid molecules, such as DNA-DNA, RNA-RNA and DNA-RNA, can hybridize if the nucleotide sequences have some degree of complementarity. Hybrids can tolerate mismatched base pairs in the double helix, but the stability of the hybrid is influenced by the degree of mismatch. The  $T_m$  of the mismatched hybrid decreases by 1°C for every 1-1.5% base pair mismatch. Varying the stringency of the hybridization conditions allows control over the degree of mismatch that will be present in the hybrid. The degree of stringency increases as the hybridization temperature increases and the ionic strength of the hybridization buffer

WO 02/070655

PCT/US02/06267

35

decreases. Stringent hybridization conditions encompass temperatures of about 5-25°C below the  $T_m$  of the hybrid and a hybridization buffer having up to 1 M  $Na^+$ . Higher degrees of stringency at lower temperatures can be achieved with the addition of formamide which reduces the  $T_m$  of the hybrid about 1°C for each 1% formamide in the buffer solution. Generally, such stringent conditions include temperatures of 20-70°C and a hybridization buffer containing up to 6x SSC and 0-50% formamide. A higher degree of stringency can be achieved at temperatures of from 40-70°C with a hybridization buffer having up to 4x SSC and from 0-50% formamide. Highly stringent conditions typically encompass temperatures of 42-70°C with a hybridization buffer having up to 1x SSC and 0-50% formamide. Different degrees of stringency can be used during hybridization and washing to achieve maximum specific binding to the target sequence. Typically, the washes following hybridization are performed at increasing degrees of stringency to remove non-hybridized polynucleotide probes from hybridized complexes.

The above conditions are meant to serve as a guide and it is well within the abilities of one skilled in the art to adapt these conditions for use with a particular polynucleotide hybrid. The  $T_m$  for a specific target sequence is the temperature (under defined conditions) at which 50% of the target sequence will hybridize to a perfectly matched probe sequence. Those conditions which influence the  $T_m$  include, the size and base pair content of the polynucleotide probe, the ionic strength of the hybridization solution, and the presence of destabilizing agents in the hybridization solution. Numerous equations for calculating  $T_m$  are known in the art, and are specific for DNA, RNA and DNA-RNA hybrids and polynucleotide probe sequences of varying length (see, for example, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition (Cold Spring Harbor Press 1989); Ausubel *et al.*, (eds.), *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley and Sons, Inc. 1987); Berger and Kimmel (eds.), *Guide to Molecular Cloning Techniques*, (Academic Press, Inc. 1987); and Wetmur, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 26:227 (1990)). Sequence analysis software such as OLIGO 6.0 (LSR; Long Lake, MN) and *Primer Premier 4.0* (Premier Biosoft International; Palo Alto, CA), as well as sites on the Internet, are available tools for

WO 02/070655

PCT/US02/06267

36

analyzing a given sequence and calculating  $T_m$  based on user defined criteria. Such programs can also analyze a given sequence under defined conditions and identify suitable probe sequences. Typically, hybridization of longer polynucleotide sequences, >50 base pairs, is performed at temperatures of about 20-25°C below the calculated  $T_m$ . For smaller probes, <50 base pairs, hybridization is typically carried out at the  $T_m$  or 5-10°C below. This allows for the maximum rate of hybridization for DNA-DNA and DNA-RNA hybrids.

The length of the polynucleotide sequence influences the rate and stability of hybrid formation. Smaller probe sequences, <50 base pairs, reach equilibrium with complementary sequences rapidly, but may form less stable hybrids. Incubation times of anywhere from minutes to hours can be used to achieve hybrid formation. Longer probe sequences come to equilibrium more slowly, but form more stable complexes even at lower temperatures. Incubations are allowed to proceed overnight or longer. Generally, incubations are carried out for a period equal to three times the calculated  $Cot$  time.  $Cot$  time, the time it takes for the polynucleotide sequences to reassociate, can be calculated for a particular sequence by methods known in the art.

The base pair composition of polynucleotide sequence will effect the thermal stability of the hybrid complex, thereby influencing the choice of hybridization temperature and the ionic strength of the hybridization buffer. A-T pairs are less stable than G-C pairs in aqueous solutions containing sodium chloride. Therefore, the higher the G-C content, the more stable the hybrid. Even distribution of G and C residues within the sequence also contribute positively to hybrid stability. In addition, the base pair composition can be manipulated to alter the  $T_m$  of a given sequence. For example, 5-methyldeoxycytidine can be substituted for deoxycytidine and 5-bromodeoxuridine can be substituted for thymidine to increase the  $T_m$ , whereas 7-deaz-2'-deoxyguanosine can be substituted for guanosine to reduce dependence on  $T_m$ .

The ionic concentration of the hybridization buffer also affects the stability of the hybrid. Hybridization buffers generally contain blocking agents such as Denhardt's solution (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), denatured salmon sperm DNA, tRNA, milk powders (BLOTTO), heparin or SDS, and a  $Na^+$  source, such as SSC

WO 02/070655

PCT/US02/06267

37

(1x SSC: 0.15 M sodium chloride, 15 mM sodium citrate) or SSPE (1x SSPE: 1.8 M NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, pH 7.7). Typically, hybridization buffers contain from between 10 mM - 1 M Na<sup>+</sup>. The addition of destabilizing or denaturing agents such as formamide, tetralkylammonium salts, guanidinium cations or thiocyanate cations to the hybridization solution will alter the T<sub>m</sub> of a hybrid. Typically, formamide is used at a concentration of up to 50% to allow incubations to be carried out at more convenient and lower temperatures. Formamide also acts to reduce non-specific background when using RNA probes.

As an illustration, a nucleic acid molecule encoding a variant mouse Zcytor16 polypeptide can be hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 (or its complement) at 42°C overnight in a solution comprising 50% formamide, 5x SSC, 50 mM sodium phosphate (pH 7.6), 5x Denhardt's solution (100x Denhardt's solution: 2% (w/v) Ficoll 400, 2% (w/v) polyvinylpyrrolidone, and 2% (w/v) bovine serum albumin), 10% dextran sulfate, and 20 µg/ml denatured, sheared salmon sperm DNA. One of skill in the art can devise variations of these hybridization conditions. For example, the hybridization mixture can be incubated at a higher temperature, such as about 65°C, in a solution that does not contain formamide. Moreover, premixed hybridization solutions are available (*e.g.*, EXPRESSHYB Hybridization Solution from CLONTECH Laboratories, Inc.), and hybridization can be performed according to the manufacturer's instructions.

Following hybridization, the nucleic acid molecules can be washed to remove non-hybridized nucleic acid molecules under stringent conditions, or under highly stringent conditions. Typical stringent washing conditions include washing in a solution of 0.5x - 2x SSC with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 55 - 65°C. As an illustration, nucleic acid molecules encoding a variant mouse Zcytor16 polypeptide remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 (or its complement) under stringent washing conditions, in which the wash stringency is equivalent to 0.5x - 2x SSC with 0.1% SDS at 55 - 65°C, including 0.5x SSC with 0.1% SDS at 55°C, or 2xSSC with 0.1% SDS at 65°C. One of skill in the art can readily devise equivalent conditions, for example, by substituting SSPE for SSC in the wash solution.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

38

Typical highly stringent washing conditions include washing in a solution of 0.1x - 0.2x SSC with 0.1% sodium dodecyl sulfate (SDS) at 50 - 65°C. For example, nucleic acid molecules encoding a variant mouse *Zcyltor16* polypeptide remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 (or its complement) under highly stringent washing conditions, in which the wash stringency is equivalent to 0.1x - 0.2x SSC with 0.1% SDS at 50 - 65°C, including 0.1x SSC with 0.1% SDS at 50°C, or 0.2xSSC with 0.1% SDS at 65°C.

The present invention also provides isolated mouse *Zcyltor16* polypeptides that have a substantially similar sequence identity to the polypeptides of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, or their orthologs. The term "substantially similar sequence identity" is used herein to denote polypeptides having at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95% or greater than 95% sequence identity to the sequences shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, or their orthologs.

The present invention also contemplates mouse *Zcyltor16* variant nucleic acid molecules that can be identified using two criteria: a determination of the similarity between the encoded polypeptide with the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, and a hybridization assay, as described above. Such mouse *Zcyltor16* variants include nucleic acid molecules (1) that remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 (or its complement) under stringent washing conditions, in which the wash stringency is equivalent to 0.5x - 2x SSC with 0.1% SDS at 55 - 65°C, and (2) that encode a polypeptide having at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95% or greater than 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Alternatively, mouse *Zcyltor16* variants can be characterized as nucleic acid molecules (1) that remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 (or its complement) under highly stringent washing conditions, in which the wash stringency is equivalent to 0.1x - 0.2x SSC with 0.1% SDS at 50 - 65°C, and (2) that encode a polypeptide having at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95% or greater than 95% sequence identity to the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

39

Percent sequence identity is determined by conventional methods. See, for example, Altschul *et al.*, *Bull. Math. Bio.* 48:603 (1986), and Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992). Briefly, two amino acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using a gap opening penalty of 10, a gap extension penalty of 1, and the "BLOSUM62" scoring matrix of Henikoff and Henikoff (*ibid.*) as shown in Table 3 (amino acids are indicated by the standard one-letter codes). The percent identity is then calculated as: ([Total number of identical matches]/ [length of the longer sequence plus the number of gaps introduced into the longer sequence in order to align the two sequences])(100).

10



Table 3[illegible]

WO 02/070655

PCT/US02/06267

41

Those skilled in the art appreciate that there are many established algorithms available to align two amino acid sequences. The "FASTA" similarity search algorithm of Pearson and Lipman is a suitable protein alignment method for examining the level of identity shared by an amino acid sequence disclosed herein and the amino acid sequence of a putative mouse Zcytor16 variant. The FASTA algorithm is described by Pearson and Lipman, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), and by Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990). Briefly, FASTA first characterizes sequence similarity by identifying regions shared by the query sequence (*e.g.*, SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48) and a test sequence that have either the highest density of identities (if the ktup variable is 1) or pairs of identities (if ktup=2), without considering conservative amino acid substitutions, insertions, or deletions. The ten regions with the highest density of identities are then rescored by comparing the similarity of all paired amino acids using an amino acid substitution matrix, and the ends of the regions are "trimmed" to include only those residues that contribute to the highest score. If there are several regions with scores greater than the "cutoff" value (calculated by a predetermined formula based upon the length of the sequence and the ktup value), then the trimmed initial regions are examined to determine whether the regions can be joined to form an approximate alignment with gaps. Finally, the highest scoring regions of the two amino acid sequences are aligned using a modification of the Needleman-Wunsch-Sellers algorithm (Needleman and Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444 (1970); Sellers, *SIAM J. Appl. Math.* 26:787 (1974)), which allows for amino acid insertions and deletions. Illustrative parameters for FASTA analysis are: ktup=1, gap opening penalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62. These parameters can be introduced into a FASTA program by modifying the scoring matrix file ("SMATRIX"), as explained in Appendix 2 of Pearson, *Meth. Enzymol.* 183:63 (1990).

FASTA can also be used to determine the sequence identity of nucleic acid molecules using a ratio as disclosed above. For nucleotide sequence comparisons, the ktup value can range between one to six, preferably from three to six, most preferably three, with other parameters set as described above.

The present invention includes nucleic acid molecules that encode a polypeptide having a conservative amino acid change, compared with an amino acid

WO 02/070655

PCT/US02/06267

42

sequence disclosed herein. For example, variants can be obtained that contain one or more amino acid substitutions of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, in which an alkyl amino acid is substituted for an alkyl amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, an aromatic amino acid is substituted for an aromatic amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, a sulfur-containing amino acid is substituted for a sulfur-containing amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, a hydroxy-containing amino acid is substituted for a hydroxy-containing amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, an acidic amino acid is substituted for an acidic amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, a basic amino acid is substituted for a basic amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence, or a dibasic monocarboxylic amino acid is substituted for a dibasic monocarboxylic amino acid in a mouse Zcytor16 amino acid sequence. Among the common amino acids, for example, a "conservative amino acid substitution" is illustrated by a substitution among amino acids within each of the following groups: (1) glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine, (2) phenylalanine, tyrosine, and tryptophan, (3) serine and threonine, (4) aspartate and glutamate, (5) glutamine and asparagine, and (6) lysine, arginine and histidine. The BLOSUM62 table is an amino acid substitution matrix derived from about 2,000 local multiple alignments of protein sequence segments, representing highly conserved regions of more than 500 groups of related proteins (Henikoff and Henikoff, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992)). Accordingly, the BLOSUM62 substitution frequencies can be used to define conservative amino acid substitutions that may be introduced into the amino acid sequences of the present invention. Although it is possible to design amino acid substitutions based solely upon chemical properties (as discussed above), the language "conservative amino acid substitution" preferably refers to a substitution represented by a BLOSUM62 value of greater than -1. For example, an amino acid substitution is conservative if the substitution is characterized by a BLOSUM62 value of 0, 1, 2, or 3. According to this system, preferred conservative amino acid substitutions are characterized by a BLOSUM62 value of at least 1 (e.g., 1, 2 or 3), while more preferred conservative amino acid substitutions are characterized by a BLOSUM62 value of at least 2 (e.g., 2 or 3).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

43

Particular variants of mouse Zcytor16 are characterized by having at least 70%, at least 80%, at least 90%, at least 95% or greater than 95% sequence identity to the corresponding amino acid sequence (e.g., SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48), wherein the variation in amino acid sequence is due to one or more conservative amino acid substitutions.

Conservative amino acid changes in a mouse *Zcytor16* gene can be introduced, for example, by substituting nucleotides for the nucleotides recited in SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. Such "conservative amino acid" variants can be obtained by oligonucleotide-directed mutagenesis, linker-scanning mutagenesis, mutagenesis using the polymerase chain reaction, and the like (see Ausubel (1995) at pages 8-10 to 8-22; and McPherson (ed.), *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). A variant mouse Zcytor16 polypeptide can be identified by the ability to specifically bind anti-mouse Zcytor16 antibodies.

The proteins of the present invention can also comprise non-naturally occurring amino acid residues. Non-naturally occurring amino acids include, without limitation, *trans*-3-methylproline, 2,4-methanoproline, *cis*-4-hydroxyproline, *trans*-4-hydroxyproline, *N*-methylglycine, *allo*-threonine, methylthreonine, hydroxyethylcysteine, hydroxyethylhomocysteine, nitroglutamine, homoglutamine, pipecolic acid, thiazolidine carboxylic acid, dehydroproline, 3- and 4-methylproline, 3,3-dimethylproline, *tert*-leucine, norvaline, 2-azaphenylalanine, 3-azaphenylalanine, 4-azaphenylalanine, and 4-fluorophenylalanine. Several methods are known in the art for incorporating non-naturally occurring amino acid residues into proteins. For example, an *in vitro* system can be employed wherein nonsense mutations are suppressed using chemically aminoacylated suppressor tRNAs. Methods for synthesizing amino acids and aminoacylating tRNA are known in the art. Transcription and translation of plasmids containing nonsense mutations is typically carried out in a cell-free system comprising an *E. coli* S30 extract and commercially available enzymes and other reagents. Proteins are purified by chromatography. See, for example, Robertson *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 113:2722 (1991), Ellman *et al.*, *Methods Enzymol.* 202:301 (1991), Chung *et al.*, *Science* 259:806 (1993), and Chung *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10145 (1993).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

44

In a second method, translation is carried out in *Xenopus* oocytes by microinjection of mutated mRNA and chemically aminoacylated suppressor tRNAs (Turcatti *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:19991 (1996)). Within a third method, *E. coli* cells are cultured in the absence of a natural amino acid that is to be replaced (e.g., phenylalanine) and in the presence of the desired non-naturally occurring amino acid(s) (e.g., 2-azaphenylalanine, 3-azaphenylalanine, 4-azaphenylalanine, or 4-fluorophenylalanine). The non-naturally occurring amino acid is incorporated into the protein in place of its natural counterpart. See, Koide *et al.*, *Biochem.* 33:7470 (1994). Naturally occurring amino acid residues can be converted to non-naturally occurring species by *in vitro* chemical modification. Chemical modification can be combined with site-directed mutagenesis to further expand the range of substitutions (Wynn and Richards, *Protein Sci.* 2:395 (1993)).

A limited number of non-conservative amino acids, amino acids that are not encoded by the genetic code, non-naturally occurring amino acids, and unnatural amino acids may be substituted for mouse Zcytor16 amino acid residues.

Essential amino acids in the polypeptides of the present invention can be identified according to procedures known in the art, such as site-directed mutagenesis or alanine-scanning mutagenesis (Cunningham and Wells, *Science* 244:1081 (1989), Bass *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:4498 (1991), Coombs and Corey, "Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering," in *Proteins: Analysis and Design*, Angeletti (ed.), pages 259-311 (Academic Press, Inc. 1998)). In the latter technique, single alanine mutations are introduced at every residue in the molecule, and the resultant mutant molecules are tested for biological activity to identify amino acid residues that are critical to the activity of the molecule. See also, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

Although sequence analysis can be used to further define the Zcytor16 ligand binding region, amino acids that play a role in mouse Zcytor16 binding activity (such as binding of mouse Zcytor16 to ligand IL-TIF, or to an anti-mouse Zcytor16 antibody) can also be determined by physical analysis of structure, as determined by such techniques as nuclear magnetic resonance, crystallography, electron diffraction or photoaffinity labeling, in conjunction with mutation of putative contact site amino

WO 02/070655

PCT/US02/06267

45

acids. See, for example, de Vos *et al.*, *Science* 255:306 (1992), Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899 (1992), and Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59 (1992).

Multiple amino acid substitutions can be made and tested using known methods of mutagenesis and screening, such as those disclosed by Reidhaar-Olson and Sauer (*Science* 241:53 (1988)) or Bowie and Sauer (*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:2152 (1989)). Briefly, these authors disclose methods for simultaneously randomizing two or more positions in a polypeptide, selecting for functional polypeptide, and then sequencing the mutagenized polypeptides to determine the spectrum of allowable substitutions at each position. Other methods that can be used include phage display (*e.g.*, Lowman *et al.*, *Biochem.* 30:10832 (1991), Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 5,223,409, Huse, international publication No. WO 92/06204, and region-directed mutagenesis (Derbyshire *et al.*, *Gene* 46:145 (1986), and Ner *et al.*, *DNA* 7:127, (1988)). Moreover, mouse Zcytor16 labeled with biotin or FITC can be used for expression cloning of Zcytor16 ligands.

Variants of the disclosed mouse Zcytor16 nucleotide and polypeptide sequences can also be generated through DNA shuffling as disclosed by Stemmer, *Nature* 370:389 (1994), Stemmer, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:10747 (1994), and international publication No. WO 97/20078. Briefly, variant DNA molecules are generated by *in vitro* homologous recombination by random fragmentation of a parent DNA followed by reassembly using PCR, resulting in randomly introduced point mutations. This technique can be modified by using a family of parent DNA molecules, such as allelic variants or DNA molecules from different species, to introduce additional variability into the process. Selection or screening for the desired activity, followed by additional iterations of mutagenesis and assay provides for rapid "evolution" of sequences by selecting for desirable mutations while simultaneously selecting against detrimental changes.

Mutagenesis methods as disclosed herein can be combined with high-throughput, automated screening methods to detect activity of cloned, mutagenized polypeptides in host cells. Mutagenized DNA molecules that encode biologically active polypeptides, or polypeptides that bind with anti-mouse Zcytor16 antibodies, can be recovered from the host cells and rapidly sequenced using modern equipment. These

WO 02/070655

PCT/US02/06267

46

methods allow the rapid determination of the importance of individual amino acid residues in a polypeptide of interest, and can be applied to polypeptides of unknown structure.

The present invention also includes "functional fragments" of mouse Zcytor16 polypeptides and nucleic acid molecules encoding such functional fragments. Routine deletion analyses of nucleic acid molecules can be performed to obtain functional fragments of a nucleic acid molecule that encodes a mouse Zcytor16 polypeptide. As an illustration, DNA molecules having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 can be digested with *Bal31* nuclease to obtain a series of nested deletions. The fragments are then inserted into expression vectors in proper reading frame, and the expressed polypeptides are isolated and tested for the ability to bind anti-mouse Zcytor16 antibodies. One alternative to exonuclease digestion is to use oligonucleotide-directed mutagenesis to introduce deletions or stop codons to specify production of a desired fragment. Alternatively, particular fragments of a mouse *Zcytor16* gene can be synthesized using the polymerase chain reaction.

This general approach is exemplified by studies on the truncation at either or both termini of interferons have been summarized by Horisberger and Di Marco, *Pharmac. Ther.* 66:507 (1995). Moreover, standard techniques for functional analysis of proteins are described by, for example, Treuter *et al.*, *Molec. Gen. Genet.* 240:113 (1993), Content *et al.*, "Expression and preliminary deletion analysis of the 42 kDa 2-5A synthetase induced by human interferon," in *Biological Interferon Systems, Proceedings of ISIR-TNO Meeting on Interferon Systems*, Cantell (ed.), pages 65-72 (Nijhoff 1987), Herschman, "The EGF Receptor," in *Control of Animal Cell Proliferation, Vol. 1*, Boynton *et al.*, (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985), Coumilleau *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:29270 (1995); Fukunaga *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:25291 (1995); Yamaguchi *et al.*, *Biochem. Pharmacol.* 50:1295 (1995), and Meisel *et al.*, *Plant Molec. Biol.* 30:1 (1996).

Analysis of the particular sequences disclosed herein provide a set of illustrative functional fragments presented in Table 4, wherein "F<sub>III</sub> Domain" is used to denote fibronectin III domains. The nucleotides encoding additional mouse zcytor16 functional variant domains described herein, not shown in Table 4, can be determined

WO 02/070655

PCT/US02/06267

47

with reference to SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. Such functional fragments include for example, the following nucleotide sequences of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47: nucleotides 77, 86, or 100 to 373; nucleotides 77, 86, or 100 to 694 or 697; nucleotides 401 to 694 or 697; and nucleotides 8 to 694 or 697, and amino acid sequences encoded thereby, e.g., such as those shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 respectively.

Table 4

| Mouse <i>Zcytor16</i><br>Feature | Amino acid residues<br>(SEQ ID NO:38 or<br>SEQ ID NO:48) | Nucleotides<br>(SEQ ID NO:37 or<br>SEQ ID NO:47) |
|----------------------------------|--|--|
| First F <sub>III</sub> Domain    | 31-122   | 100-373  |
| Second F <sub>III</sub> Domain   | 131-229  | 401-694  |
| Both F <sub>III</sub> Domains    | 31-229   | 100-694  |

The present invention also contemplates functional fragments of a mouse *Zcytor16* gene that have amino acid changes, compared with an amino acid sequence disclosed herein. A variant mouse *Zcytor16* gene can be identified on the basis of structure by determining the level of identity with disclosed nucleotide and amino acid sequences, as discussed above. An alternative approach to identifying a variant gene on the basis of structure is to determine whether a nucleic acid molecule encoding a potential variant mouse *Zcytor16* gene can hybridize to a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence, such as SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47.

For any mouse *Zcytor16* polypeptide, including variants and fusion proteins, one of ordinary skill in the art can readily generate a fully degenerate polynucleotide sequence encoding that variant using the information set forth in Tables 1 and 2 above. Moreover, those of skill in the art can use standard software to devise mouse *Zcytor16* variants based upon the nucleotide and amino acid sequences described herein. Accordingly, the present invention includes a computer-readable medium encoded with a data structure that provides at least one of the following sequences: SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, and SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49. Suitable forms of computer-readable media include



WO 02/070655

PCT/US02/06267

48

magnetic media and optically-readable media. Examples of magnetic media include a hard or fixed drive, a random access memory (RAM) chip, a floppy disk, digital linear tape (DLT), a disk cache, and a ZIP disk. Optically readable media are exemplified by compact discs (*e.g.*, CD-read only memory (ROM), CD-rewritable (RW), and CD-recordable), and digital versatile/video discs (DVD) (*e.g.*, DVD-ROM, DVD-RAM, and DVD+RW).

The present invention also provides polypeptide fragments or peptides comprising an epitope-bearing portion of a mouse Zcytor16 polypeptide described herein. Such fragments or peptides may comprise an "immunogenic epitope," which is a part of a protein that elicits an antibody response when the entire protein is used as an immunogen. Immunogenic epitope-bearing peptides can be identified using standard methods (see, for example, Geysen *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:3998 (1983)).

In contrast, polypeptide fragments or peptides may comprise an "antigenic epitope," which is a region of a protein molecule to which an antibody can specifically bind. Certain epitopes consist of a linear or contiguous stretch of amino acids, and the antigenicity of such an epitope is not disrupted by denaturing agents. It is known in the art that relatively short synthetic peptides that can mimic epitopes of a protein can be used to stimulate the production of antibodies against the protein (see, for example, Sutcliffe *et al.*, *Science* 219:660 (1983)). Accordingly, antigenic epitope-bearing peptides and polypeptides of the present invention are useful to raise antibodies that bind with the polypeptides described herein.

Antigenic epitope-bearing peptides and polypeptides can contain at least four to ten amino acids, at least ten to fifteen amino acids, or about 15 to about 30 amino acids of an amino acid sequence disclosed herein. Such epitope-bearing peptides and polypeptides can be produced by fragmenting a mouse Zcytor16 polypeptide, or by chemical peptide synthesis, as described herein. Moreover, epitopes can be selected by phage display of random peptide libraries (see, for example, Lane and Stephen, *Curr. Opin. Immunol.* 5:268 (1993), and Cortese *et al.*, *Curr. Opin. Biotechnol.* 7:616 (1996)). Standard methods for identifying epitopes and producing antibodies from small peptides that comprise an epitope are described, for example, by Mole, "Epitope Mapping," in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), pages 105-116

WO 02/070655

PCT/US02/06267

49

(The Humana Press, Inc. 1992), Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter and Ladyman (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995), and Coligan *et al.* (eds.), *Current Protocols in Immunology*, pages 9.3.1 - 9.3.5 and pages 9.4.1 - 9.4.11 (John Wiley & Sons 1997).

6. *Production of mouse Zcytor16 Polypeptides*

The polypeptides of the present invention, including full-length polypeptides; soluble monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors; full-length receptors; receptor fragments (e.g. ligand-binding fragments), functional fragments, and fusion proteins, can be produced in recombinant host cells following conventional techniques. To express a mouse *Zcytor16* gene, a nucleic acid molecule encoding the polypeptide must be operably linked to regulatory sequences that control transcriptional expression in an expression vector and then, introduced into a host cell. In addition to transcriptional regulatory sequences, such as promoters and enhancers, expression vectors can include translational regulatory sequences and a marker gene which is suitable for selection of cells that carry the expression vector.

Expression vectors that are suitable for production of a foreign protein in eukaryotic cells typically contain (1) prokaryotic DNA elements coding for a bacterial replication origin and an antibiotic resistance marker to provide for the growth and selection of the expression vector in a bacterial host; (2) eukaryotic DNA elements that control initiation of transcription, such as a promoter; and (3) DNA elements that control the processing of transcripts, such as a transcription termination/polyadenylation sequence. As discussed above, expression vectors can also include nucleotide sequences encoding a secretory sequence that directs the heterologous polypeptide into the secretory pathway of a host cell. For example, a mouse *Zcytor16* expression vector may comprise a mouse *Zcytor16* gene and a secretory sequence derived from any secreted gene.

Mouse *Zcytor16* proteins of the present invention may be expressed in mammalian cells. Examples of suitable mammalian host cells include African green monkey kidney cells (Vero; ATCC CRL 1587), human embryonic kidney cells (293-

WO 02/070655

PCT/US02/06267

50

HEK; ATCC CRL 1573), baby hamster kidney cells (BHK-21, BHK-570; ATCC CRL 8544, ATCC CRL 10314), canine kidney cells (MDCK; ATCC CCL 34), Chinese hamster ovary cells (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986)), rat pituitary cells (GH1; ATCC CCL82), HeLa S3 cells (ATCC CCL2.2), rat hepatoma cells (H-4-II-E; ATCC CRL 1548) SV40-transformed monkey kidney cells (COS-1; ATCC CRL 1650) and murine embryonic cells (NIH-3T3; ATCC CRL 1658).

For a mammalian host, the transcriptional and translational regulatory signals may be derived from viral sources, such as adenovirus, bovine papilloma virus, simian virus, or the like, in which the regulatory signals are associated with a particular gene which has a high level of expression. Suitable transcriptional and translational regulatory sequences also can be obtained from mammalian genes, such as actin, collagen, myosin, and metallothionein genes.

Transcriptional regulatory sequences include a promoter region sufficient to direct the initiation of RNA synthesis. Suitable eukaryotic promoters include the promoter of the mouse *metallothionein I* gene (Hamer *et al.*, *J. Molec. Appl. Genet.* 1:273 (1982)), the *TK* promoter of *Herpes* virus (McKnight, *Cell* 31:355 (1982)), the *SV40* early promoter (Benoist *et al.*, *Nature* 290:304 (1981)), the *Rous* sarcoma virus promoter (Gorman *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79:6777 (1982)), the cytomegalovirus promoter (Foecking *et al.*, *Gene* 45:101 (1980)), and the mouse mammary tumor virus promoter (see, generally, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), pages 163-181 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Alternatively, a prokaryotic promoter, such as the bacteriophage T3 RNA polymerase promoter, can be used to control mouse *Zcytor16* gene expression in mammalian cells if the prokaryotic promoter is regulated by a eukaryotic promoter (Zhou *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 10:4529 (1990), and Kaufman *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 19:4485 (1991)).

In certain embodiments, a DNA sequence encoding a mouse *Zcytor16* monomeric or homodimeric soluble receptor polypeptide, or a DNA sequence encoding an additional subunit of a heterodimeric or multimeric mouse *Zcytor16* soluble

WO 02/070655

PCT/US02/06267

51

receptor, e.g., CRF2-4 or IL10R, polypeptide is operably linked to other genetic elements required for its expression, generally including a transcription promoter and terminator, within an expression vector. The vector will also commonly contain one or more selectable markers and one or more origins of replication, although those skilled  
5 in the art will recognize that within certain systems selectable markers may be provided on separate vectors, and replication of the exogenous DNA may be provided by integration into the host cell genome. Selection of promoters, terminators, selectable markers, vectors and other elements is a matter of routine design within the level of ordinary skill in the art. Many such elements are described in the literature and are  
10 available through commercial suppliers. Multiple components of a soluble receptor complex can be co-transfected on individual expression vectors or be contained in a single expression vector. Such techniques of expressing multiple components of protein complexes are well known in the art.

An expression vector can be introduced into host cells using a variety of  
15 standard techniques including calcium phosphate transfection, liposome-mediated transfection, microprojectile-mediated delivery, electroporation, and the like. The transfected cells can be selected and propagated to provide recombinant host cells that comprise the expression vector stably integrated in the host cell genome. Techniques for introducing vectors into eukaryotic cells and techniques for selecting such stable  
20 transformants using a dominant selectable marker are described, for example, by Ausubel (1995) and by Murray (ed.), *Gene Transfer and Expression Protocols* (Humana Press 1991).

For example, one suitable selectable marker is a gene that provides resistance to the antibiotic neomycin. In this case, selection is carried out in the  
25 presence of a neomycin-type drug, such as G-418 or the like. Selection systems can also be used to increase the expression level of the gene of interest, a process referred to as "amplification." Amplification is carried out by culturing transfectants in the presence of a low level of the selective agent and then increasing the amount of selective agent to select for cells that produce high levels of the products of the  
30 introduced genes. A suitable amplifiable selectable marker is dihydrofolate reductase, which confers resistance to methotrexate. Other drug resistance genes (e.g.,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

52

hygromycin resistance, multi-drug resistance, puromycin acetyltransferase) can also be used. Alternatively, markers that introduce an altered phenotype, such as green fluorescent protein, or cell surface proteins such as CD4, CD8, Class I MHC, placental alkaline phosphatase may be used to sort transfected cells from untransfected cells by such means as FACS sorting or magnetic bead separation technology.

Mouse Zcytor16 polypeptides can also be produced by cultured mammalian cells using a viral delivery system. Exemplary viruses for this purpose include adenovirus, retroviruses, herpesvirus, vaccinia virus and adeno-associated virus (AAV). Adenovirus, a double-stranded DNA virus, is currently the best studied gene transfer vector for delivery of heterologous nucleic acid (for a review, see Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994), and Douglas and Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). Advantages of the adenovirus system include the accommodation of relatively large DNA inserts, the ability to grow to high-titer, the ability to infect a broad range of mammalian cell types, and flexibility that allows use with a large number of available vectors containing different promoters.

By deleting portions of the adenovirus genome, larger inserts (up to 7 kb) of heterologous DNA can be accommodated. These inserts can be incorporated into the viral DNA by direct ligation or by homologous recombination with a co-transfected plasmid. An option is to delete the essential *E1* gene from the viral vector, which results in the inability to replicate unless the *E1* gene is provided by the host cell. Adenovirus vector-infected human 293 cells (ATCC Nos. CRL-1573, 45504, 45505), for example, can be grown as adherent cells or in suspension culture at relatively high cell density to produce significant amounts of protein (see Garnier *et al.*, *Cytotechnol.* 15:145 (1994)).

Mouse Zcytor16 can also be expressed in other higher eukaryotic cells, such as avian, fungal, insect, yeast, or plant cells. The baculovirus system provides an efficient means to introduce cloned mouse Zcytor16 genes into insect cells. Suitable expression vectors are based upon the *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus (AcMNPV), and contain well-known promoters such as *Drosophila* heat shock protein (*hsp*) 70 promoter, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus immediate-early gene promoter (*ie-1*) and the delayed early 39K promoter,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

53

baculovirus *p10* promoter, and the *Drosophila metallothionein* promoter. A second method of making recombinant baculovirus utilizes a transposon-based system described by Luckow (Luckow, *et al.*, *J. Virol.* 67:4566 (1993)). This system, which utilizes transfer vectors, is sold in the BAC-to-BAC kit (Life Technologies, Rockville, MD). This system utilizes a transfer vector, PFASTBAC (Life Technologies) containing a Tn7 transposon to move the DNA encoding the mouse Zcytor16 polypeptide into a baculovirus genome maintained in *E. coli* as a large plasmid called a "bacmid." See, Hill-Perkins and Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990), Bonning, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994), and Chazenbalk, and Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995). In addition, transfer vectors can include an in-frame fusion with DNA encoding an epitope tag at the C- or N-terminus of the expressed mouse Zcytor16 polypeptide, for example, a Glu-Glu epitope tag (Grussenmeyer *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 82:7952 (1985)). Using a technique known in the art, a transfer vector containing a mouse Zcytor16 gene is transformed into *E. coli*, and screened for bacmids which contain an interrupted *lacZ* gene indicative of recombinant baculovirus. The bacmid DNA containing the recombinant baculovirus genome is then isolated using common techniques.

The illustrative PFASTBAC vector can be modified to a considerable degree. For example, the polyhedrin promoter can be removed and substituted with the baculovirus basic protein promoter (also known as P<sub>cor</sub>, p6.9 or MP promoter) which is expressed earlier in the baculovirus infection, and has been shown to be advantageous for expressing secreted proteins (see, for example, Hill-Perkins and Possee, *J. Gen. Virol.* 71:971 (1990), Bonning, *et al.*, *J. Gen. Virol.* 75:1551 (1994), and Chazenbalk and Rapoport, *J. Biol. Chem.* 270:1543 (1995). In such transfer vector constructs, a short or long version of the basic protein promoter can be used. Moreover, transfer vectors can be constructed which replace the native mouse Zcytor16 secretory signal sequences with secretory signal sequences derived from insect proteins. For example, a secretory signal sequence from Ecdysteroid Glucosyltransferase (EGT), honey bee Melittin (Invitrogen Corporation; Carlsbad, CA), or baculovirus gp67 (PharMingen; San Diego, CA) can be used in constructs to replace the native mouse Zcytor16 secretory signal sequence.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

54

The recombinant virus or bacmid is used to transfect host cells. Suitable insect host cells include cell lines derived from IPLB-Sf-21, a *Spodoptera frugiperda* pupal ovarian cell line, such as Sf9 (ATCC CRL 1711), Sf21AE, and Sf21 (Invitrogen Corporation; San Diego, CA), as well as *Drosophila* Schneider-2 cells, and the HIGH FIVEO cell line (Invitrogen) derived from *Trichoplusia ni* (U.S. Patent No. 5,300,435). Commercially available serum-free media can be used to grow and to maintain the cells. Suitable media are Sf900 II™ (Life Technologies) or ESF 921™ (Expression Systems) for the Sf9 cells; and Ex-cellO405™ (JRH Biosciences, Lenexa, KS) or Express FiveO™ (Life Technologies) for the *T. ni* cells. When recombinant virus is used, the cells are typically grown up from an inoculation density of approximately  $2.5 \times 10^5$  cells to a density of  $1.2 \times 10^6$  cells at which time a recombinant viral stock is added at a multiplicity of infection (MOI) of 0.1 to 10, more typically near 3.

Established techniques for producing recombinant proteins in baculovirus systems are provided by Bailey *et al.*, "Manipulation of Baculovirus Vectors," in *Methods in Molecular Biology, Volume 7: Gene Transfer and Expression Protocols*, Murray (ed.), pages 147-168 (The Humana Press, Inc. 1991), by Patel *et al.*, "The baculovirus expression system," in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition*, Glover *et al.* (eds.), pages 205-244 (Oxford University Press 1995), by Ausubel (1995) at pages 16-37 to 16-57, by Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995), and by Lucknow, "Insect Cell Expression Technology," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), pages 183-218 (John Wiley & Sons, Inc. 1996).

Fungal cells, including yeast cells, can also be used to express the genes described herein. Yeast species of particular interest in this regard include *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Pichia methanolica*. Suitable promoters for expression in yeast include promoters from *GAL1* (galactose), *PGK* (phosphoglycerate kinase), *ADH* (alcohol dehydrogenase), *AOX1* (alcohol oxidase), *HIS4* (histidinol dehydrogenase), and the like. Many yeast cloning vectors have been designed and are readily available. These vectors include Ylp-based vectors, such as YIp5, YRp vectors, such as YRp17, YEpl vectors such as YEpl3 and YCp vectors, such as YCp19. Methods for transforming *S. cerevisiae* cells with exogenous DNA and

WO 02/070655

PCT/US02/06267

55

producing recombinant polypeptides therefrom are disclosed by, for example, Kawasaki, U.S. Patent No. 4,599,311, Kawasaki *et al.*, U.S. Patent No. 4,931,373, Brake, U.S. Patent No. 4,870,008, Welch *et al.*, U.S. Patent No. 5,037,743, and Murray *et al.*, U.S. Patent No. 4,845,075. Transformed cells are selected by phenotype  
5 determined by the selectable marker, commonly drug resistance or the ability to grow in the absence of a particular nutrient (*e.g.*, leucine). A suitable vector system for use in *Saccharomyces cerevisiae* is the *POT1* vector system disclosed by Kawasaki *et al.* (U.S. Patent No. 4,931,373), which allows transformed cells to be selected by growth in glucose-containing media. Additional suitable promoters and terminators for use in  
10 yeast include those from glycolytic enzyme genes (see, *e.g.*, Kawasaki, U.S. Patent No. 4,599,311, Kingsman *et al.*, U.S. Patent No. 4,615,974, and Bitter, U.S. Patent No. 4,977,092) and alcohol dehydrogenase genes. See also U.S. Patents Nos. 4,990,446, 5,063,154, 5,139,936, and 4,661,454.

Transformation systems for other yeasts, including *Hansenula polymorpha*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces lactis*, *Kluyveromyces fragilis*, *Ustilago maydis*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *Pichia guilliermondii* and *Candida maltosa* are known in the art. See, for example, Gleeson *et al.*, *J. Gen. Microbiol.* 132:3459 (1986), and Cregg, U.S. Patent No. 4,882,279. *Aspergillus* cells  
15 may be utilized according to the methods of McKnight *et al.*, U.S. Patent No. 4,935,349. Methods for transforming *Acremonium chrysogenum* are disclosed by Sumino *et al.*, U.S. Patent No. 5,162,228. Methods for transforming *Neurospora* are disclosed by Lambowitz, U.S. Patent No. 4,486,533.

For example, the use of *Pichia methanolica* as host for the production of recombinant proteins is disclosed by Raymond, U.S. Patent No. 5,716,808, Raymond,  
25 U.S. Patent No. 5,736,383, Raymond *et al.*, *Yeast* 14:11-23 (1998), and in international publication Nos. WO 97/17450, WO 97/17451, WO 98/02536, and WO 98/02565. DNA molecules for use in transforming *P. methanolica* will commonly be prepared as double-stranded, circular plasmids, which are preferably linearized prior to transformation. For polypeptide production in *P. methanolica*, the promoter and  
30 terminator in the plasmid can be that of a *P. methanolica* gene, such as a *P. methanolica* alcohol utilization gene (*AUG1* or *AUG2*). Other useful promoters include



WO 02/070655

PCT/US02/06267

56

those of the dihydroxyacetone synthase (DHAS), formate dehydrogenase (FMD), and catalase (CAT) genes. To facilitate integration of the DNA into the host chromosome, it is preferred to have the entire expression segment of the plasmid flanked at both ends by host DNA sequences. A suitable selectable marker for use in *Pichia methanolica* is a *P. methanolica* *ADE2* gene, which encodes phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylase (AIRC; EC 4.1.1.21), and which allows *ade2* host cells to grow in the absence of adenine. For large-scale, industrial processes where it is desirable to minimize the use of methanol, host cells can be used in which both methanol utilization genes (*AUG1* and *AUG2*) are deleted. For production of secreted proteins, host cells can be deficient in vacuolar protease genes (*PEP4* and *PRB1*). Electroporation is used to facilitate the introduction of a plasmid containing DNA encoding a polypeptide of interest into *P. methanolica* cells. *P. methanolica* cells can be transformed by electroporation using an exponentially decaying, pulsed electric field having a field strength of from 2.5 to 4.5 kV/cm, preferably about 3.75 kV/cm, and a time constant (t) of from 1 to 40 milliseconds, most preferably about 20 milliseconds.

Expression vectors can also be introduced into plant protoplasts, intact plant tissues, or isolated plant cells. Methods for introducing expression vectors into plant tissue include the direct infection or co-cultivation of plant tissue with *Agrobacterium tumefaciens*, microprojectile-mediated delivery, DNA injection, electroporation, and the like. See, for example, Horsch *et al.*, *Science* 227:1229 (1985), Klein *et al.*, *Biotechnology* 10:268 (1992), and Miki *et al.*, "Procedures for Introducing Foreign DNA into Plants," in *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*, Glick *et al.* (eds.), pages 67-88 (CRC Press, 1993).

Alternatively, mouse *Zcytor16* genes can be expressed in prokaryotic host cells. Suitable promoters that can be used to express mouse *Zcytor16* polypeptides in a prokaryotic host are well-known to those of skill in the art and include promoters capable of recognizing the T4, T3, Sp6 and T7 polymerases, the  $P_R$  and  $P_L$  promoters of bacteriophage lambda, the *trp*, *recA*, heat shock, *lacUV5*, *tac*, *lpp-lacSpr*, *phoA*, and *lacZ* promoters of *E. coli*, promoters of *B. subtilis*, the promoters of the bacteriophages of *Bacillus*, *Streptomyces* promoters, the *int* promoter of bacteriophage lambda, the *bla* promoter of pBR322, and the CAT promoter of the chloramphenicol acetyl transferase

WO 02/070655

PCT/US02/06267

57

gene. Prokaryotic promoters have been reviewed by Glick, *J. Ind. Microbiol.* 1:277 (1987), Watson *et al.*, *Molecular Biology of the Gene*, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987), and by Ausubel *et al.* (1995).

Suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Suitable strains of *E. coli* include BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1, DH4I, DH5, DH5I, DH5IF', DH5IMCR, DH10B, DH10B/p3, DH11S, C600, HB101, JM101, JM105, JM109, JM110, K38, RR1, Y1088, Y1089, CSH18, ER1451, and ER1647 (see, for example, Brown (ed.), *Molecular Biology Labfax* (Academic Press 1991)). Suitable strains of *Bacillus subtilis* include BR151, YB886, MI119, MI120, and B170 (see, for example, Hardy, "Bacillus Cloning Methods," in *DNA Cloning: A Practical Approach*, Glover (ed.) (IRL Press 1985)).

When expressing a mouse Zcytor16 polypeptide in bacteria such as *E. coli*, the polypeptide may be retained in the cytoplasm, typically as insoluble granules, or may be directed to the periplasmic space by a bacterial secretion sequence. In the former case, the cells are lysed, and the granules are recovered and denatured using, for example, guanidine isothiocyanate or urea. The denatured polypeptide can then be refolded and dimerized by diluting the denaturant, such as by dialysis against a solution of urea and a combination of reduced and oxidized glutathione, followed by dialysis against a buffered saline solution. In the latter case, the polypeptide can be recovered from the periplasmic space in a soluble and functional form by disrupting the cells (by, for example, sonication or osmotic shock) to release the contents of the periplasmic space and recovering the protein, thereby obviating the need for denaturation and refolding.

Methods for expressing proteins in prokaryotic hosts are well-known to those of skill in the art (see, for example, Williams *et al.*, "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover *et al.* (eds.), page 15 (Oxford University Press 1995), Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Georgiou, "Expression of Proteins in Bacteria,"

WO 02/070655

PCT/US02/06267

58

in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), page 101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996)).

Standard methods for introducing expression vectors into bacterial, yeast, insect, and plant cells are provided, for example, by Ausubel (1995).

5 General methods for expressing and recovering foreign protein produced by a mammalian cell system are provided by, for example, Etcheverry, "Expression of Engineered Proteins in Mammalian Cell Culture," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), pages 163 (Wiley-Liss, Inc. 1996). Standard techniques for recovering protein produced by a bacterial system is provided by, for example, 10 Grishammer *et al.*, "Purification of over-produced proteins from *E. coli* cells," in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition*, Glover *et al.* (eds.), pages 59-92 (Oxford University Press 1995). Established methods for isolating recombinant proteins from a baculovirus system are described by Richardson (ed.), *Baculovirus Expression Protocols* (The Humana Press, Inc. 1995).

15 As an alternative, polypeptides of the present invention can be synthesized by exclusive solid phase synthesis, partial solid phase methods, fragment condensation or classical solution synthesis. These synthesis methods are well-known to those of skill in the art (see, for example, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149 (1963), Stewart *et al.*, "Solid Phase Peptide Synthesis" (2nd Edition), (Pierce Chemical Co. 1984), Bayer and Rapp, *Chem. Pept. Prot.* 3:3 (1986), Atherton *et al.*, *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach* (IRL Press 1989), Fields and Colowick, "Solid-Phase Peptide Synthesis," *Methods in Enzymology Volume 289* (Academic Press 1997), and Lloyd-Williams *et al.*, *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins* (CRC Press, Inc. 1997)). Variations in total chemical synthesis strategies, 25 such as "native chemical ligation" and "expressed protein ligation" are also standard (see, for example, Dawson *et al.*, *Science* 266:776 (1994), Hackeng *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:7845 (1997), Dawson, *Methods Enzymol.* 287: 34 (1997), Muir *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:6705 (1998), and Severinov and Muir, *J. Biol. Chem.* 273:16205 (1998)).

30 Peptides and polypeptides of the present invention comprise at least six, at least nine, or at least 15 contiguous amino acid residues of SEQ ID NO:38 or SEQ ID

WO 02/070655

PCT/US02/06267

59

NO:48. As an illustration, polypeptides can comprise at least six, at least nine, or at least 15 contiguous amino acid residues of any of the following amino acid sequences of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48: amino acid residues amino acid residues 1 to 230, amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230, and amino acid residues 27 to 126, amino acid residues 131 to 230, or other fragments disclosed herein. Within certain  
5       embodiments of the invention, the polypeptides comprise 20, 30, 40, 50, 100, or more contiguous residues of these amino acid sequences. Nucleic acid molecules encoding such peptides and polypeptides are useful as polymerase chain reaction primers and probes.

10       Moreover, mouse Zcytor16 polypeptides can be expressed as monomers, homodimers, heterodimers, or multimers within higher eukaryotic cells. Such cells can be used to produce mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor polypeptides that comprise at least one mouse Zcytor16 polypeptide ("mouse Zcytor16-comprising receptors" or "mouse Zcytor16-comprising  
15       receptor polypeptides"), or can be used as assay cells in screening systems. Within one aspect of the present invention, a polypeptide of the present invention comprising the mouse Zcytor16 extracellular domain is produced by a cultured cell, and the cell is used to screen for ligands for the receptor, including the natural ligand, IL-TIF, as well as agonists and antagonists of the natural ligand. To summarize this approach, a cDNA or  
20       gene encoding the receptor is combined with other genetic elements required for its expression (e.g., a transcription promoter), and the resulting expression vector is inserted into a host cell. Cells that express the DNA and produce functional receptor are selected and used within a variety of screening systems. Each component of the monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor complex can be  
25       expressed in the same cell. Moreover, the components of the monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor complex can also be fused to a transmembrane domain or other membrane fusion moiety to allow complex assembly and screening of transfectants as described above.

30       Mammalian cells suitable for use in expressing mouse Zcytor16 receptors and transducing a receptor-mediated signal include cells that express other receptor subunits that may form a functional complex with mouse Zcytor16. These

WO 02/070655

PCT/US02/06267

60

subunits may include those of the interferon receptor family or of other class II or class I cytokine receptors, e.g., CRF2-4 (Genbank Accession No. Z17227), IL-10R (Genbank Accession No.s U00672 and NM\_001558), zcytor11 (US Patent No. 5,965,704), zcytor7 (US Patent No. 5,945,511), and IL-9R. It is also preferred to use a cell from the same species as the receptor to be expressed. Within a preferred embodiment, the cell is dependent upon an exogenously supplied hematopoietic growth factor for its proliferation. Preferred cell lines of this type are the human TF-1 cell line (ATCC number CRL-2003) and the AML-193 cell line (ATCC number CRL-9589), which are GM-CSF-dependent human leukemic cell lines and BaF3 (Palacios and Steinmetz, *Cell* 41: 727-734, (1985)) which is an IL-3 dependent murine pre-B cell line. Other cell lines include BHK, COS-1 and CHO cells.

Suitable host cells can be engineered to produce the necessary receptor subunits or other cellular component needed for the desired cellular response. This approach is advantageous because cell lines can be engineered to express receptor subunits from any species, thereby overcoming potential limitations arising from species specificity. Species orthologs of the mouse receptor cDNA can be cloned and used within cell lines from the same species, such as a mouse cDNA in the BaF3 cell line. Cell lines that are dependent upon one hematopoietic growth factor, such as GM-CSF or IL-3, can thus be engineered to become dependent upon another cytokine that acts through the mouse Zcytor16 receptor, such as IL-TIF.

Cells expressing functional receptor are used within screening assays. A variety of suitable assays are known in the art. These assays are based on the detection of a biological response in a target cell. One such assay is a cell proliferation assay. Cells are cultured in the presence or absence of a test compound, and cell proliferation is detected by, for example, measuring incorporation of tritiated thymidine or by colorimetric assay based on the metabolic breakdown of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Mosman, *J. Immunol. Meth.* 65: 55-63, (1983)). An alternative assay format uses cells that are further engineered to express a reporter gene. The reporter gene is linked to a promoter element that is responsive to the receptor-linked pathway, and the assay detects activation of transcription of the reporter gene. A preferred promoter element in this regard is a serum response element,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

61

or SRE. See, e.g., Shaw *et al.*, *Cell* 56:563-572, (1989). A preferred such reporter gene is a luciferase gene (de Wet *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 7:725, (1987)). Expression of the luciferase gene is detected by luminescence using methods known in the art (e.g., Baumgartner *et al.*, *J. Biol. Chem.* 269:29094-29101, (1994); Schenborn and Goiffin, *Promega Notes* 41:11, 1993). Luciferase activity assay kits are commercially available from, for example, Promega Corp., Madison, WI. Target cell lines of this type can be used to screen libraries of chemicals, cell-conditioned culture media, fungal broths, soil samples, water samples, and the like. For example, a bank of cell-conditioned media samples can be assayed on a target cell to identify cells that produce ligand. Positive cells are then used to produce a cDNA library in a mammalian expression vector, which is divided into pools, transfected into host cells, and expressed. Media samples from the transfected cells are then assayed, with subsequent division of pools, re-transfection, subculturing, and re-assay of positive cells to isolate a cloned cDNA encoding the ligand.

A natural ligand for the mouse Zcytor16 receptor can also be identified by mutagenizing a cell line expressing the full-length receptor or receptor fusion (e.g., comprising the mouse Zcytor16 extracellular domain fused to the transmembrane and signaling domain of another cytokine receptor) and culturing it under conditions that select for autocrine growth. See WIPO publication WO 95/21930. Within a typical procedure, IL-3 dependent BaF3 cells expressing mouse Zcytor16 and the necessary additional subunits are mutagenized, such as with 2-ethylmethanesulfonate (EMS). The cells are then allowed to recover in the presence of IL-3, then transferred to a culture medium lacking IL-3 and IL-4. Surviving cells are screened for the production of a Zcytor16 ligand (e.g., IL-TIF), such as by adding soluble receptor to the culture medium or by assaying conditioned media on wild-type BaF3 cells and BaF3 cells expressing the receptor. Using this method, cells and tissues expressing IL-TIF can be identified. Such methods can be employed to detect IL-TIF from different species, e.g., human, and as such cells, cancers, and tissues expressing human IL-TIF can be identified using the mouse Zcytor16 polypeptides of the present invention.

Moreover several IL-TIF responsive cell lines are known (Dumontier *et al.*, *J. Immunol.* 164:1814-1819, 2000; Dumoutier, L. *et al.*, *Proc. Nat'l. Acad. Sci.*

WO 02/070655

PCT/US02/06267

62

97:10144-10149, 2000; Xie MH et al., *J. Biol. Chem.* 275: 31335-31339, 2000; Kotenko SV et al., JBC in press), as well as those that express the IL-TIF receptor subunit zcytor11. For example, the following cells are responsive to IL-TIF: TK-10 (Xie MH et al., *supra.*) (human renal carcinoma); SW480 (ATCC No. CCL-228) 5 (human colon adenocarcinoma); HepG2 (ATCC No. HB-8065) (human hepatoma); PC12 (ATCC No. CRL-1721) (murine neuronal cell model; rat pheochromocytoma); and MES13 (ATCC No. CRL-1927) (murine kidney mesangial cell line). In addition, some cell lines express zcytor11 (IL-TIF receptor) are also candidates for responsive cell lines to IL-TIF: A549 (ATCC No. CCL-185) (human lung carcinoma); G-361 10 (ATCC No. CRL-1424) (human melanoma); and Caki-1 (ATCC No. HTB-46) (human renal carcinoma). These cells can be used in assays to assess the functionality of mouse Zcytor16 as an IL-TIF antagonist or anti-inflammatory factor, even in heterologous systems, such as human.

An additional screening approach provided by the present invention 15 includes the use of hybrid receptor polypeptides. These hybrid polypeptides fall into two general classes. Within the first class, the intracellular domain of mouse Zcytor16, is joined to the ligand-binding domain of a second receptor. It is preferred that the second receptor be a hematopoietic cytokine receptor, such as mpl receptor (Souyri *et al.*, *Cell* 63: 1137-1147, (1990). The hybrid receptor will further comprise a 20 transmembrane domain, which may be derived from either receptor. A DNA construct encoding the hybrid receptor is then inserted into a host cell. Cells expressing the hybrid receptor are cultured in the presence of a ligand for the binding domain (e.g., TPO in the case the mpl receptor extracellular domain is used) and assayed for a response. This system provides a means for analyzing signal transduction mediated by 25 mouse Zcytor16 while using readily available ligands. This system can also be used to determine if particular cell lines are capable of responding to signals transduced by mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors of the present invention.

A second class of hybrid receptor polypeptides comprise the 30 extracellular (ligand-binding) domain of mouse Zcytor16 (approximately residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48) with an intracellular domain of

WO 02/070655

PCT/US02/06267

63

a second receptor, preferably a hematopoietic cytokine receptor, and a transmembrane domain. Hybrid zcytor11 monomers, homodimers, heterodimers and multimers of the present invention receptors of this second class are expressed in cells known to be capable of responding to signals transduced by the second receptor. Together, these two classes of hybrid receptors enable the identification of a responsive cell type for the development of an assay for detecting IL-TIF. Moreover, such cells can be used in the presence of IL-TIF to assay the soluble receptor antagonists of the present invention in a competition-type assay. In such assay, a decrease in the proliferation or signal transduction activity of IL-TIF in the presence of a soluble receptor of the present invention demonstrates antagonistic activity. Moreover IL-TIF-soluble receptor binding assays can also be used to assess whether a soluble receptor antagonizes IL-TIF activity.

#### 7. Production of mouse Zcytor16 Fusion Proteins and Conjugates

One general class of mouse Zcytor16 analogs are variants having an amino acid sequence that is a mutation of the amino acid sequence disclosed herein. Another general class of mouse Zcytor16 analogs is provided by anti-idiotypic antibodies, and fragments thereof, as described below. Moreover, recombinant antibodies comprising anti-idiotypic variable domains can be used as analogs (see, for example, Monfardini *et al.*, *Proc. Assoc. Am. Physicians* 108:420 (1996)). Since the variable domains of anti-idiotypic mouse Zcytor16 antibodies mimic mouse Zcytor16, these domains can provide mouse or human Zcytor16 binding activity, e.g., to IL-TIF. Methods of producing anti-idiotypic catalytic antibodies are known to those of skill in the art (see, for example, Joron *et al.*, *Ann. N Y Acad. Sci.* 672:216 (1992), Friboulet *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 47:229 (1994), and Avelle *et al.*, *Ann. N Y Acad. Sci.* 864:118 (1998)).

Another approach to identifying Zcytor16 analogs is provided by the use of combinatorial libraries. Methods for constructing and screening phage display and other combinatorial libraries are provided, for example, by Kay *et al.*, *Phage Display of Peptides and Proteins* (Academic Press 1996), Verdine, U.S. Patent No. 5,783,384, Kay, *et al.*, U.S. Patent No. 5,747,334, and Kauffman *et al.*, U.S. Patent No. 5,723,323.



WO 02/070655

PCT/US02/06267

64

Mouse Zcytor16 polypeptides have both *in vivo* and *in vitro* uses. As an illustration, a soluble form of mouse Zcytor16 can be added to cell culture medium to inhibit the effects of the Zcytor16 ligand produced by the cultured cells.

Fusion proteins of mouse Zcytor16 can be used to express mouse Zcytor16 in a recombinant host, and to isolate the produced mouse Zcytor16. As described below, particular mouse Zcytor16 fusion proteins also have uses in diagnosis and therapy. One type of fusion protein comprises a peptide that guides a mouse Zcytor16 polypeptide from a recombinant host cell. To direct a mouse Zcytor16 polypeptide into the secretory pathway of a eukaryotic host cell, a secretory signal sequence (also known as a signal peptide, a leader sequence, prepro sequence or pre sequence) is provided in the mouse Zcytor16 expression vector. While the secretory signal sequence may be derived from mouse Zcytor16, a suitable signal sequence may also be derived from another secreted protein or synthesized *de novo*. The secretory signal sequence is operably linked to a mouse Zcytor16-encoding sequence such that the two sequences are joined in the correct reading frame and positioned to direct the newly synthesized polypeptide into the secretory pathway of the host cell. Secretory signal sequences are commonly positioned 5' to the nucleotide sequence encoding the polypeptide of interest, although certain secretory signal sequences may be positioned elsewhere in the nucleotide sequence of interest (see, e.g., Welch *et al.*, U.S. Patent No. 5,037,743; Holland *et al.*, U.S. Patent No. 5,143,830).

Although the secretory signal sequence of mouse Zcytor16 or another protein produced by mammalian cells (e.g., tissue-type plasminogen activator signal sequence, as described, for example, in U.S. Patent No. 5,641,655) is useful for expression of mouse Zcytor16 in recombinant mammalian hosts, a yeast signal sequence is preferred for expression in yeast cells. Examples of suitable yeast signal sequences are those derived from yeast mating pheromone  $\alpha$ -factor (encoded by the *MF $\alpha$ 1* gene), invertase (encoded by the *SUC2* gene), or acid phosphatase (encoded by the *PHO5* gene). See, for example, Romanos *et al.*, "Expression of Cloned Genes in Yeast," in *DNA Cloning 2: A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover and Hames (eds.), pages 123-167 (Oxford University Press 1995).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

65

Mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor polypeptides can be prepared by expressing a truncated DNA encoding the extracellular domain, for example, a polypeptide which contains 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, or the corresponding region of a non-mouse receptor. It is preferred that the extracellular domain polypeptides be prepared in a form substantially free of transmembrane and intracellular polypeptide segments. To direct the export of the receptor domain from the host cell, the receptor DNA is linked to a second DNA segment encoding a secretory peptide, such as a t-PA secretory peptide. To facilitate purification of the secreted receptor domain, a C-terminal extension, such as a poly-histidine tag, substance P, Flag™ peptide (Hopp *et al.*, *Biotechnology* 6:1204-1210, (1988); available from Eastman Kodak Co., New Haven, CT) or another polypeptide or protein for which an antibody or other specific binding agent is available, can be fused to the receptor polypeptide. Moreover, heterodimeric and multimeric non-mouse Zcytor16 subunit extracellular cytokine binding domains are also prepared as above.

In an alternative approach, a receptor extracellular domain of mouse Zcytor16 or other class I or II cytokine receptor component can be expressed as a fusion with immunoglobulin heavy chain constant regions, typically an F<sub>C</sub> fragment, which contains two constant region domains and a hinge region but lacks the variable region (See, Sledziewski, AZ *et al.*, US Patent No. 6,018,026 and 5,750,375). The soluble mouse Zcytor16, soluble mouse Zcytor16/CRF2-4 heterodimers, and monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric polypeptides of the present invention include such fusions. Such fusions are typically secreted as multimeric molecules wherein the Fc portions are disulfide bonded to each other and two receptor polypeptides are arrayed in closed proximity to each other. Fusions of this type can be used to affinity purify the cognate ligand from solution, as an *in vitro* assay tool, to block signals *in vitro* by specifically titrating out ligand, and as antagonists *in vivo* by administering them parenterally to bind circulating ligand and clear it from the circulation. To purify ligand, a mouse Zcytor16-Ig chimera is added to a sample containing the ligand (e.g., cell-conditioned culture media or tissue extracts) under conditions that facilitate receptor-ligand binding (typically near-physiological

WO 02/070655

PCT/US02/06267

66

temperature, pH, and ionic strength). The chimera-ligand complex is then separated by the mixture using protein A, which is immobilized on a solid support (e.g., insoluble resin beads). The ligand is then eluted using conventional chemical techniques, such as with a salt or pH gradient. In the alternative, the chimera itself can be bound to a solid support, with binding and elution carried out as above. The chimeras may be used *in vivo* to regulate inflammatory responses including acute phase responses such as serum amyloid A (SAA), C-reactive protein (CRP), and the like. Chimeras with high binding affinity are administered parenterally (e.g., by intramuscular, subcutaneous or intravenous injection). Circulating molecules bind ligand and are cleared from circulation by normal physiological processes. For use in assays, the chimeras are bound to a support via the F<sub>C</sub> region and used in an ELISA format. Moreover, such methods can be applied using the polypeptides of the present invention to isolate mouse IL-TIF, as well as an orthologous ligand, e.g., human IL-TIF.

The present invention further provides a variety of other polypeptide fusions and related multimeric proteins comprising one or more polypeptide fusions. For example, a soluble mouse Zcytor16 receptor or soluble mouse Zcytor16 heterodimeric polypeptide, such as soluble mouse Zcytor16/CRF2-4, can be prepared as a fusion to a dimerizing protein as disclosed in U.S. Patents Nos. 5,155,027 and 5,567,584. Preferred dimerizing proteins in this regard include immunoglobulin constant region domains, e.g., IgG1, and the human  $\kappa$  light chain. Immunoglobulin-soluble mouse Zcytor16 receptor or immunoglobulin-soluble mouse Zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptide, such as immunoglobulin-soluble mouse Zcytor16/CRF2-4 fusions can be expressed in genetically engineered cells to produce a variety of multimeric mouse Zcytor16 receptor analogs. Auxiliary domains can be fused to soluble mouse Zcytor16 receptor or soluble mouse Zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptides, such as soluble mouse Zcytor16/CRF2-4 to target them to specific cells, tissues, or macromolecules (e.g., collagen, or cells expressing the Zcytor16 ligand, IL-TIF). A mouse Zcytor16 polypeptide can be fused to two or more moieties, such as an affinity tag for purification and a targeting domain. Polypeptide fusions can also comprise one or more cleavage sites, particularly between domains. See, Tuan et al., Connective Tissue Research 34:1-9, 1996.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

67

In bacterial cells, it is often desirable to express a heterologous protein as a fusion protein to decrease toxicity, increase stability, and to enhance recovery of the expressed protein. For example, mouse *Zcytor16* can be expressed as a fusion protein comprising a glutathione S-transferase polypeptide. Glutathione S-transferase fusion proteins are typically soluble, and easily purifiable from *E. coli* lysates on immobilized glutathione columns. In similar approaches, a mouse *Zcytor16* fusion protein comprising a maltose binding protein polypeptide can be isolated with an amylose resin column, while a fusion protein comprising the C-terminal end of a truncated Protein A gene can be purified using IgG-Sepharose. Established techniques for expressing a heterologous polypeptide as a fusion protein in a bacterial cell are described, for example, by Williams *et al.*, "Expression of Foreign Proteins in *E. coli* Using Plasmid Vectors and Purification of Specific Polyclonal Antibodies," in *DNA Cloning 2: A Practical Approach*, 2<sup>nd</sup> Edition, Glover and Hames (Eds.), pages 15-58 (Oxford University Press 1995). In addition, commercially available expression systems are available. For example, the PINPOINT Xa protein purification system (Promega Corporation; Madison, WI) provides a method for isolating a fusion protein comprising a polypeptide that becomes biotinylated during expression with a resin that comprises avidin.

Peptide tags that are useful for isolating heterologous polypeptides expressed by either prokaryotic or eukaryotic cells include polyHistidine tags (which have an affinity for nickel-chelating resin), *c-myc* tags, calmodulin binding protein (isolated with calmodulin affinity chromatography), substance P, the RYIRS tag (which binds with anti-RYIRS antibodies), the Glu-Glu tag, and the FLAG tag (which binds with anti-FLAG antibodies). See, for example, Luo *et al.*, *Arch. Biochem. Biophys.* 329:215 (1996), Morganti *et al.*, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 23:67 (1996), and Zheng *et al.*, *Gene* 186:55 (1997). Nucleic acid molecules encoding such peptide tags are available, for example, from Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO).

The present invention also contemplates that the use of the secretory signal sequence contained in the mouse *Zcytor16* polypeptides of the present invention to direct other polypeptides into the secretory pathway. A signal fusion polypeptide can be made wherein a secretory signal sequence derived from amino acid residues 1 to 23

WO 02/070655

PCT/US02/06267

68

of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is operably linked to another polypeptide using methods known in the art and disclosed herein. The secretory signal sequence contained in the fusion polypeptides of the present invention is preferably fused amino-terminally to an additional peptide to direct the additional peptide into the secretory pathway. Such constructs have numerous applications known in the art. For example, these novel secretory signal sequence fusion constructs can direct the secretion of an active component of a normally non-secreted protein, such as a receptor. Such fusions may be used in a transgenic animal or in a cultured recombinant host to direct peptides through the secretory pathway. With regard to the latter, exemplary polypeptides include pharmaceutically active molecules such as Factor VIIa, proinsulin, insulin, follicle stimulating hormone, tissue type plasminogen activator, tumor necrosis factor, interleukins (*e.g.*, interleukin-1 (IL-1), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, and IL-15), colony stimulating factors (*e.g.*, granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) and granulocyte macrophage-colony stimulating factor (GM-CSF)), interferons (*e.g.*, interferons- $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$ , - $\omega$ , - $\delta$ , and - $\tau$ ), the stem cell growth factor designated "S1 factor," erythropoietin, and thrombopoietin. The mouse Zcytor16 secretory signal sequence contained in the fusion polypeptides of the present invention is preferably fused amino-terminally to an additional peptide to direct the additional peptide into the secretory pathway. Fusion proteins comprising a mouse Zcytor16 secretory signal sequence can be constructed using standard techniques.

Another form of fusion protein comprises a mouse Zcytor16 polypeptide and an immunoglobulin heavy chain constant region, typically an F<sub>C</sub> fragment, which contains two or three constant region domains and a hinge region but lacks the variable region. As an illustration, Chang *et al.*, U.S. Patent No. 5,723,125, describe a fusion protein comprising a human interferon and a human immunoglobulin Fc fragment. The C-terminal of the interferon is linked to the N-terminal of the Fc fragment by a peptide linker moiety. An example of a peptide linker is a peptide comprising primarily a T cell inert sequence, which is immunologically inert. An exemplary peptide linker has the amino acid sequence: GGS GG SGGGG SGGGG S (SEQ ID NO:4). In this fusion protein, an illustrative Fc moiety is a human  $\gamma$ 4 chain, which is stable in solution and has little or no complement activating activity. Accordingly, the present invention

WO 02/070655

PCT/US02/06267

69

contemplates a mouse Zcytor16 fusion protein that comprises a mouse Zcytor16 moiety and a human Fc fragment, wherein the C-terminus of the mouse Zcytor16 moiety is attached to the N-terminus of the Fc fragment via a peptide linker, such as a peptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:4. The mouse Zcytor16 moiety  
5 can be a mouse Zcytor16 molecule or a fragment thereof. For example, a fusion protein can comprise amino acid residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 and an Fc fragment (*e.g.*, a human Fc fragment).

In another variation, a mouse Zcytor16 fusion protein comprises an IgG sequence, a mouse Zcytor16 moiety covalently joined to the aminoterminal end of the IgG sequence, and a signal peptide that is covalently joined to the aminoterminal of the mouse Zcytor16 moiety, wherein the IgG sequence consists of the following elements in the following order: a hinge region, a CH<sub>2</sub> domain, and a CH<sub>3</sub> domain. Accordingly, the IgG sequence lacks a CH<sub>1</sub> domain. The mouse Zcytor16 moiety displays a mouse Zcytor16 activity, as described herein, such as the ability to bind with a Zcytor16  
10 ligand, including mouse and human IL-TIF. This general approach to producing fusion proteins that comprise both antibody and nonantibody portions has been described by LaRochelle *et al.*, EP 742830 (WO 95/21258).

Fusion proteins comprising a mouse Zcytor16 moiety and an Fc moiety can be used, for example, as an *in vitro* assay tool. For example, the presence of a Zcytor16 ligand, including mouse or human IL-TIF, in a biological sample can be detected using a mouse Zcytor16-immunoglobulin fusion protein, in which the mouse Zcytor16 moiety is used to bind the ligand, and a macromolecule, such as Protein A or anti-Fc antibody, is used to bind the fusion protein to a solid support. Such systems can be used to identify agonists and antagonists that interfere with the binding of a Zcytor16  
20 ligand to its receptor.

Other examples of antibody fusion proteins include polypeptides that comprise an antigen-binding domain and a mouse Zcytor16 fragment that contains a mouse Zcytor16 extracellular domain. Such molecules can be used to target particular tissues for the benefit of Zcytor16 binding activity.

The present invention further provides a variety of other polypeptide fusions. For example, part or all of a domain(s) conferring a biological function can be  
30

WO 02/070655

PCT/US02/06267

70

swapped between mouse Zcytor16 of the present invention with the functionally equivalent domain(s) from another member of the cytokine receptor family. Polypeptide fusions can be expressed in recombinant host cells to produce a variety of mouse Zcytor16 fusion analogs. A mouse Zcytor16 polypeptide can be fused to two or more moieties or domains, such as an affinity tag for purification and a targeting domain. Polypeptide fusions can also comprise one or more cleavage sites, particularly between domains. See, for example, Tuan *et al.*, *Connective Tissue Research* 34:1 (1996).

Fusion proteins can be prepared by methods known to those skilled in the art by preparing each component of the fusion protein and chemically conjugating them. Alternatively, a polynucleotide encoding both components of the fusion protein in the proper reading frame can be generated using known techniques and expressed by the methods described herein. General methods for enzymatic and chemical cleavage of fusion proteins are described, for example, by Ausubel (1995) at pages 16-19 to 16-25.

Mouse Zcytor16 polypeptides can be used to identify and to isolate Zcytor16 ligands, including mouse and human IL-TIF. For example, proteins and peptides of the present invention can be immobilized on a column and used to bind ligands from a biological sample that is run over the column (Hermanson *et al.* (eds.), *Immobilized Affinity Ligand Techniques*, pages 195-202 (Academic Press 1992)). As such, mouse Zcytor16 polypeptides of the present invention can be used to identify and isolate IL-TIF for either diagnostic, or production purposes.

The activity of a mouse Zcytor16 polypeptide can also be observed by a silicon-based biosensor microphysiometer, which measures the extracellular acidification rate or proton excretion associated with receptor binding and subsequent physiologic cellular responses. An exemplary device is the CYTOSENSOR Microphysiometer manufactured by Molecular Devices, Sunnyvale, CA. A variety of cellular responses, such as cell proliferation, ion transport, energy production, inflammatory response, regulatory and receptor activation, and the like, can be measured by this method (see, for example, McConnell *et al.*, *Science* 257:1906 (1992), Pitchford *et al.*, *Meth. Enzymol.* 228:84 (1997), Arimilli *et al.*, *J. Immunol. Meth.*

WO 02/070655

PCT/US02/06267

71

212:49 (1998), Van Liefde *et al.*, *Eur. J. Pharmacol.* 346:87 (1998)). The microphysiometer can be used for assaying eukaryotic, prokaryotic, adherent, or non-adherent cells. By measuring extracellular acidification changes in cell media over time, the microphysiometer directly measures cellular responses to various stimuli, including agonists, ligands, or antagonists of mouse Zcytor16.

For example, the microphysiometer is used to measure responses of an mouse Zcytor16-expressing eukaryotic cell, compared to a control eukaryotic cell that does not express mouse Zcytor16 polypeptide. Suitable cells responsive to mouse Zcytor16-modulating stimuli include recombinant host cells comprising a mouse Zcytor16 expression vector, and cells that naturally express mouse Zcytor16. Extracellular acidification provides one measure for a mouse Zcytor16-modulated cellular response. In addition, this approach can be used to identify ligands, agonists, and antagonists of Zcytor16 ligand, IL-11F. For example, a molecule can be identified as an agonist of Zcytor16 ligand by providing cells that express a mouse Zcytor16 polypeptide, culturing a first portion of the cells in the absence of the test compound, culturing a second portion of the cells in the presence of the test compound, and determining whether the second portion exhibits a cellular response, in comparison with the first portion.

Alternatively, a solid phase system can be used to identify a Zcytor16 ligand, or an agonist or antagonist of a Zcytor16 ligand. For example, a mouse Zcytor16 polypeptide or mouse Zcytor16 fusion protein, or mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptor can be immobilized onto the surface of a receptor chip of a commercially available biosensor instrument (BIAcore, Biacore AB; Uppsala, Sweden). The use of this instrument is disclosed, for example, by Karlsson, *Immunol. Methods* 145:229 (1991), and Cunningham and Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554 (1993).

In brief, a mouse Zcytor16 polypeptide or fusion protein is covalently attached, using amine or sulfhydryl chemistry, to dextran fibers that are attached to gold film within a flow cell. A test sample is then passed through the cell. If a ligand is present in the sample, it will bind to the immobilized polypeptide or fusion protein, causing a change in the refractive index of the medium, which is detected as a change in



WO 02/070655

PCT/US02/06267

72

surface plasmon resonance of the gold film. This system allows the determination of on- and off-rates, from which binding affinity can be calculated, and assessment of stoichiometry of binding. This system can also be used to examine antibody-antigen interactions, and the interactions of other complement/anti-complement pairs.

5        Mouse Zcytor16 binding domains can be further characterized by physical analysis of structure, as determined by such techniques as nuclear magnetic resonance, crystallography, electron diffraction or photoaffinity labeling, in conjunction with mutation of putative contact site amino acids of Zcytor16 ligand agonists. See, for example, de Vos *et al.*, *Science* 255:306 (1992), Smith *et al.*, *J. Mol. Biol.* 224:899  
10        (1992), and Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59 (1992).

      The present invention also contemplates chemically modified mouse Zcytor16 compositions, in which a mouse Zcytor16 polypeptide is linked with a polymer. Illustrative mouse Zcytor16 polypeptides are soluble polypeptides that lack a functional transmembrane domain, such as a polypeptide consisting of amino acid  
15        residues 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. Typically, the polymer is water soluble so that the mouse Zcytor16 conjugate does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. An example of a suitable polymer is one that has been modified to have a single reactive group, such as an active ester for acylation, or an aldehyde for alkylation. In this way, the degree of  
20        polymerization can be controlled. An example of a reactive aldehyde is polyethylene glycol propionaldehyde, or mono-(C1-C10) alkoxy, or aryloxy derivatives thereof (see, for example, Harris, *et al.*, U.S. Patent No. 5,252,714). The polymer may be branched or unbranched. Moreover, a mixture of polymers can be used to produce mouse Zcytor16 conjugates.

25        Mouse Zcytor16 conjugates used for therapy can comprise pharmaceutically acceptable water-soluble polymer moieties. Suitable water-soluble polymers include polyethylene glycol (PEG), monomethoxy-PEG, mono-(C1-C10)alkoxy-PEG, aryloxy-PEG, poly-(N-vinyl pyrrolidone)PEG, tresyl monomethoxy PEG, PEG propionaldehyde, bis-succinimidyl carbonate PEG, propylene glycol  
30        homopolymers, a polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymer, polyoxyethylated polyols (*e.g.*, glycerol), polyvinyl alcohol, dextran, cellulose, or other carbohydrate-

WO 02/070655

PCT/US02/06267

73

based polymers. Suitable PEG may have a molecular weight from about 600 to about 60,000, including, for example, 5,000, 12,000, 20,000 and 25,000. A mouse Zcytor16 conjugate can also comprise a mixture of such water-soluble polymers.

One example of a mouse Zcytor16 conjugate comprises a mouse Zcytor16 moiety and a polyalkyl oxide moiety attached to the *N*-terminus of the mouse Zcytor16 moiety. PEG is one suitable polyalkyl oxide. As an illustration, mouse Zcytor16 can be modified with PEG, a process known as "PEGylation." PEGylation of mouse Zcytor16 can be carried out by any of the PEGylation reactions known in the art (see, for example, EP 0 154 316, Delgado *et al.*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 9:249 (1992), Duncan and Spreafico, *Clin. Pharmacokinet.* 27:290 (1994), and Francis *et al.*, *Int J Hematol* 68:1 (1998)). For example, PEGylation can be performed by an acylation reaction or by an alkylation reaction with a reactive polyethylene glycol molecule. In an alternative approach, mouse Zcytor16 conjugates are formed by condensing activated PEG, in which a terminal hydroxy or amino group of PEG has been replaced by an activated linker (see, for example, Karasiewicz *et al.*, U.S. Patent No. 5,382,657).

PEGylation by acylation typically requires reacting an active ester derivative of PEG with a mouse Zcytor16 polypeptide. An example of an activated PEG ester is PEG esterified to *N*-hydroxysuccinimide. As used herein, the term "acylation" includes the following types of linkages between mouse Zcytor16 and a water soluble polymer: amide, carbamate, urethane, and the like. Methods for preparing PEGylated mouse Zcytor16 by acylation will typically comprise the steps of (a) reacting a mouse Zcytor16 polypeptide with PEG (such as a reactive ester of an aldehyde derivative of PEG) under conditions whereby one or more PEG groups attach to mouse Zcytor16, and (b) obtaining the reaction product(s). Generally, the optimal reaction conditions for acylation reactions will be determined based upon known parameters and desired results. For example, the larger the ratio of PEG:mouse Zcytor16, the greater the percentage of polyPEGylated mouse Zcytor16 product.

The product of PEGylation by acylation is typically a polyPEGylated mouse Zcytor16 product, wherein the lysine  $\epsilon$ -amino groups are PEGylated via an acyl linking group. An example of a connecting linkage is an amide. Typically, the

WO 02/070655

PCT/US02/06267

74

resulting mouse Zcytor16 will be at least 95% mono-, di-, or tri-pegylated, although some species with higher degrees of PEGylation may be formed depending upon the reaction conditions. PEGylated species can be separated from unconjugated mouse Zcytor16 polypeptides using standard purification methods, such as dialysis, 5 ultrafiltration, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and the like.

PEGylation by alkylation generally involves reacting a terminal aldehyde derivative of PEG with mouse Zcytor16 in the presence of a reducing agent. PEG groups can be attached to the polypeptide via a  $-CH_2-NH$  group.

Derivatization via reductive alkylation to produce a monoPEGylated 10 product takes advantage of the differential reactivity of different types of primary amino groups available for derivatization. Typically, the reaction is performed at a pH that allows one to take advantage of the pKa differences between the  $\epsilon$ -amino groups of the lysine residues and the  $\alpha$ -amino group of the *N*-terminal residue of the protein. By such selective derivatization, attachment of a water-soluble polymer that contains a reactive 15 group such as an aldehyde, to a protein is controlled. The conjugation with the polymer occurs predominantly at the *N*-terminus of the protein without significant modification of other reactive groups such as the lysine side chain amino groups. The present invention provides a substantially homogenous preparation of mouse Zcytor16 monopolymer conjugates.

20 Reductive alkylation to produce a substantially homogenous population of monopolymer mouse Zcytor16 conjugate molecule can comprise the steps of: (a) reacting a mouse Zcytor16 polypeptide with a reactive PEG under reductive alkylation conditions at a pH suitable to permit selective modification of the  $\alpha$ -amino group at the amino terminus of the mouse Zcytor16, and (b) obtaining the reaction product(s). The 25 reducing agent used for reductive alkylation should be stable in aqueous solution and able to reduce only the Schiff base formed in the initial process of reductive alkylation. Illustrative reducing agents include sodium borohydride, sodium cyanoborohydride, dimethylamine borane, trimethylamine borane, and pyridine borane.

30 For a substantially homogenous population of monopolymer mouse Zcytor16 conjugates, the reductive alkylation reaction conditions are those that permit the selective attachment of the water-soluble polymer moiety to the *N*-terminus of

WO 02/070655

PCT/US02/06267

75

mouse Zcytor16. Such reaction conditions generally provide for pKa differences between the lysine amino groups and the  $\alpha$ -amino group at the N-terminus. The pH also affects the ratio of polymer to protein to be used. In general, if the pH is lower, a larger excess of polymer to protein will be desired because the less reactive the N-terminal  $\alpha$ -group, the more polymer is needed to achieve optimal conditions. If the pH is higher, the polymer:mouse Zcytor16 need not be as large because more reactive groups are available. Typically, the pH will fall within the range of 3 to 9, or 3 to 6. This method can be employed for making mouse Zcytor16-comprising homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptor conjugates.

Another factor to consider is the molecular weight of the water-soluble polymer. Generally, the higher the molecular weight of the polymer, the fewer number of polymer molecules which may be attached to the protein. For PEGylation reactions, the typical molecular weight is about 2 kDa to about 100 kDa, about 5 kDa to about 50 kDa, or about 12 kDa to about 25 kDa. The molar ratio of water-soluble polymer to mouse Zcytor16 will generally be in the range of 1:1 to 100:1. Typically, the molar ratio of water-soluble polymer to mouse Zcytor16 will be 1:1 to 20:1 for polyPEGylation, and 1:1 to 5:1 for monoPEGylation.

General methods for producing conjugates comprising a polypeptide and water-soluble polymer moieties are known in the art. See, for example, Karasiewicz *et al.*, U.S. Patent No. 5,382,657, Greenwald *et al.*, U.S. Patent No. 5,738, 846, Nieforth *et al.*, *Clin. Pharmacol. Ther.* 59:636 (1996), Monkarsh *et al.*, *Anal. Biochem.* 247:434 (1997). This method can be employed for making mouse Zcytor16-comprising homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptor conjugates.

The present invention contemplates compositions comprising a peptide or polypeptide described herein. Such compositions can further comprise a carrier. The carrier can be a conventional organic or inorganic carrier. Examples of carriers include water, buffer solution, alcohol, propylene glycol, macrogol, sesame oil, corn oil, and the like.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

76

8. *Isolation of mouse Zcytor16 Polypeptides*

The polypeptides of the present invention can be purified to at least about 80% purity, to at least about 90% purity, to at least about 95% purity, or greater than 95% purity with respect to contaminating macromolecules, particularly other proteins and nucleic acids, and free of infectious and pyrogenic agents. The polypeptides of the present invention may also be purified to a pharmaceutically pure state, which is greater than 99.9% pure. In certain preparations, purified polypeptide is substantially free of other polypeptides, particularly other polypeptides of animal origin.

Fractionation and/or conventional purification methods can be used to obtain preparations of mouse Zcytor16 purified from natural sources (*e.g.*, tonsil tissue), synthetic mouse Zcytor16 polypeptides, and recombinant mouse Zcytor16 polypeptides and fusion mouse Zcytor16 polypeptides purified from recombinant host cells. In general, ammonium sulfate precipitation and acid or chaotrope extraction may be used for fractionation of samples. Exemplary purification steps may include hydroxyapatite, size exclusion, FPLC and reverse-phase high performance liquid chromatography. Suitable chromatographic media include derivatized dextrans, agarose, cellulose, polyacrylamide, specialty silicas, and the like. PEI, DEAE, QAE and Q derivatives are suitable. Exemplary chromatographic media include those media derivatized with phenyl, butyl, or octyl groups, such as Phenyl-Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) and the like; or polyacrylic resins, such as Amberchrom CG 71 (Toso Haas) and the like. Suitable solid supports include glass beads, silica-based resins, cellulosic resins, agarose beads, cross-linked agarose beads, polystyrene beads, cross-linked polyacrylamide resins and the like that are insoluble under the conditions in which they are to be used. These supports may be modified with reactive groups that allow attachment of proteins by amino groups, carboxyl groups, sulfhydryl groups, hydroxyl groups and/or carbohydrate moieties.

Examples of coupling chemistries include cyanogen bromide activation, N-hydroxysuccinimide activation, epoxide activation, sulfhydryl activation, hydrazide activation, and carboxyl and amino derivatives for carbodiimide coupling chemistries. These and other solid media are well known and widely used in the art, and are

WO 02/070655

PCT/US02/06267

77

available from commercial suppliers. Selection of a particular method for polypeptide isolation and purification is a matter of routine design and is determined in part by the properties of the chosen support. See, for example, *Affinity Chromatography: Principles & Methods* (Pharmacia LKB Biotechnology 1988), and Doonan, *Protein Purification Protocols* (The Humana Press 1996).

Additional variations in mouse Zcytor16 isolation and purification can be devised by those of skill in the art. For example, anti-mouse Zcytor16 antibodies, obtained as described below, can be used to isolate large quantities of protein by immunoaffinity purification.

The polypeptides of the present invention can also be isolated by exploitation of particular properties. For example, immobilized metal ion adsorption (IMAC) chromatography can be used to purify histidine-rich proteins, including those comprising polyhistidine tags. Briefly, a gel is first charged with divalent metal ions to form a chelate (Sulkowski, *Trends in Biochem. Sci.* 10:1 (1985)). Histidine-rich proteins will be adsorbed to this matrix with differing affinities, depending upon the metal ion used, and will be eluted by competitive elution, lowering the pH, or use of strong chelating agents. Other methods of purification include purification of glycosylated proteins by lectin affinity chromatography and ion exchange chromatography (M. Deutscher, (ed.), *Meth. Enzymol.* 182:529 (1990)). Within additional embodiments of the invention, a fusion of the polypeptide of interest and an affinity tag (e.g., maltose-binding protein, an immunoglobulin domain) may be constructed to facilitate purification. Moreover, the ligand-binding properties of mouse Zcytor16 extracellular domain can be exploited for purification, for example, of mouse Zcytor16-comprising soluble receptors; for example, by using affinity chromatography wherein IL-2/TIF ligand is bound to a column and the mouse Zcytor16-comprising receptor is bound and subsequently eluted using standard chromatography methods.

mouse Zcytor16 polypeptides or fragments thereof may also be prepared through chemical synthesis, as described above. mouse Zcytor16 polypeptides may be monomers or multimers; glycosylated or non-glycosylated; PEGylated or non-PEGylated; and may or may not include an initial methionine amino acid residue.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

78

9. *Production of Antibodies to mouse Zcytor16 Proteins*

Antibodies to mouse Zcytor16 can be obtained, for example, using the product of a mouse Zcytor16 expression vector or mouse Zcytor16 isolated from a natural source as an antigen. Particularly useful anti-mouse Zcytor16 antibodies "bind specifically" with mouse Zcytor16. Antibodies are considered to be specifically binding if the antibodies exhibit at least one of the following two properties: (1) antibodies bind to mouse Zcytor16 with a threshold level of binding activity, and (2) antibodies do not significantly cross-react with polypeptides related to mouse Zcytor16.

With regard to the first characteristic, antibodies specifically bind if they bind to a mouse Zcytor16 polypeptide, peptide or epitope with a binding affinity ( $K_a$ ) of  $10^6 M^{-1}$  or greater, preferably  $10^7 M^{-1}$  or greater, more preferably  $10^8 M^{-1}$  or greater, and most preferably  $10^9 M^{-1}$  or greater. The binding affinity of an antibody can be readily determined by one of ordinary skill in the art, for example, by Scatchard analysis (Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51:660 (1949)). With regard to the second characteristic, antibodies do not significantly cross-react with related polypeptide molecules, for example, if they detect mouse Zcytor16, but not presently known polypeptides using a standard Western blot analysis. Examples of known related polypeptides include known cytokine receptors.

Anti-mouse Zcytor16 antibodies can be produced using antigenic mouse Zcytor16 epitope-bearing peptides and polypeptides. Antigenic epitope-bearing peptides and polypeptides of the present invention contain a sequence of at least nine, or between 15 to about 30 amino acids contained within SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 or another amino acid sequence disclosed herein. However, peptides or polypeptides comprising a larger portion of an amino acid sequence of the invention, containing from 30 to 50 amino acids, or any length up to and including the entire amino acid sequence of a polypeptide of the invention, also are useful for inducing antibodies that bind with mouse Zcytor16. It is desirable that the amino acid sequence of the epitope-bearing peptide is selected to provide substantial solubility in aqueous solvents (*i.e.*, the sequence includes relatively hydrophilic residues, while hydrophobic residues are typically avoided). Moreover, amino acid sequences containing proline residues may be also be desirable for antibody production.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

79

As an illustration, potential antigenic sites in mouse Zcytor16 were identified using the Jameson-Wolf method, Jameson and Wolf, *CABIOS* 4:181, (1988), as implemented by the PROTEAN program (version 3.14) of LASERGENE (DNASTAR; Madison, WI). Default parameters were used in this analysis.

5       The Jameson-Wolf method predicts potential antigenic determinants by combining six major subroutines for protein structural prediction. Briefly, the Hopp-Woods method, Hopp *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 78:3824 (1981), was first used to identify amino acid sequences representing areas of greatest local hydrophilicity (parameter: seven residues averaged). In the second step, Emini's method, Emini *et al.*,  
 10   *J. Virology* 55:836 (1985), was used to calculate surface probabilities (parameter: surface decision threshold (0.6) = 1). Third, the Karplus-Schultz method, Karplus and Schultz, *Naturwissenschaften* 72:212 (1985), was used to predict backbone chain flexibility (parameter: flexibility threshold (0.2) = 1). In the fourth and fifth steps of the analysis, secondary structure predictions were applied to the data using the methods of  
 15   Chou-Fasman, Chou, "Prediction of Protein Structural Classes from Amino Acid Composition," in *Prediction of Protein Structure and the Principles of Protein Conformation*, Fasman (ed.), pages 549-586 (Plenum Press 1990), and Garnier-Robson, Garnier *et al.*, *J. Mol. Biol.* 120:97 (1978) (Chou-Fasman parameters: conformation table = 64 proteins;  $\alpha$  region threshold = 103;  $\beta$  region threshold = 105; Garnier-  
 20   Robson parameters:  $\alpha$  and  $\beta$  decision constants = 0). In the sixth subroutine, flexibility parameters and hydropathy/solvent accessibility factors were combined to determine a surface contour value, designated as the "antigenic index." Finally, a peak broadening function was applied to the antigenic index, which broadens major surface peaks by adding 20, 40, 60, or 80% of the respective peak value to account for additional free  
 25   energy derived from the mobility of surface regions relative to interior regions. This calculation was not applied, however, to any major peak that resides in a helical region, since helical regions tend to be less flexible.

The results of this analysis indicated that the following amino acid sequences of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 would provide suitable antigenic  
 30   peptides: amino acids 35 to 40 ("antigenic peptide 1"), amino acids 67 to 77 ("antigenic peptide 2"), 88 to 94 ("antigenic peptide 3"), amino acids 108 to 119 ("antigenic



WO 02/070655

PCT/US02/06267

80

peptide 4"), amino acids 108 to 130 ("antigenic peptide 5"), amino acids 125 to 130 ("antigenic peptide 6"), amino acids 147 to 161 ("antigenic peptide 7"), amino acids 177 to 190 ("antigenic peptide 8"), and amino acids 216 to 225 ("antigenic peptide 9"). The present invention contemplates the use of any one of antigenic peptides 1 to 9 to generate antibodies to mouse Zcytor16. The present invention also contemplates polypeptides comprising at least one of antigenic peptides 1 to 9. A Hopp/Woods hydrophilicity profile of the Zcytor16 protein sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 can be generated (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 and Triquier et al., Protein Engineering 11:153-169, 1998). The profile is based on a sliding six-residue window. Buried G, S, and T residues and exposed H, Y, and W residues were ignored. For example, in Zcytor16, hydrophilic regions that serve as suitable antigens, include in reference to SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48: (1) amino acid number 220 to 225; (2) amino acid number 216 to 221; (3) amino acid number 180 to 185; (4) amino acid number 179 to 184; and (5) amino acid number 71 to 76. Moreover other suitable antigens comprise residues, 24, 27 or 31 to 122 or 126; 131 to 229 or 230; 1 to 229 or 230; and 24 to 229 or 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

Moreover, suitable antigens also include the mouse Zcytor16 polypeptides comprising a mouse Zcytor16 cytokine binding, or extracellular domain disclosed above in combination with another class I or II cytokine extracellular domain, such as those that form soluble mouse Zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptides, such as soluble mouse Zcytor16/CRF2-4, mouse Zcytor16/zcytor11, mouse Zcytor16/zcytor7, and the like.

Polyclonal antibodies to recombinant mouse Zcytor16 protein or to mouse Zcytor16 isolated from natural sources can be prepared using methods well-known to those of skill in the art. See, for example, Green *et al.*, "Production of Polyclonal Antisera," in *Immunochemical Protocols* (Manson, ed.), pages 1-5 (Humana Press 1992), and Williams *et al.*, "Expression of foreign proteins in *E. coli* using plasmid vectors and purification of specific polyclonal antibodies," in *DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition*, Glover *et al.* (eds.), page 15 (Oxford University Press 1995). The immunogenicity of a mouse Zcytor16 polypeptide can be increased through

WO 02/070655

PCT/US02/06267

81

the use of an adjuvant, such as alum (aluminum hydroxide) or Freund's complete or incomplete adjuvant. Polypeptides useful for immunization also include fusion polypeptides, such as fusions of mouse Zcytor16 or a portion thereof with an immunoglobulin polypeptide or with maltose binding protein. The polypeptide  
5 immunogen may be a full-length molecule or a portion thereof. If the polypeptide portion is "haptten-like," such portion may be advantageously joined or linked to a macromolecular carrier (such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or tetanus toxoid) for immunization.

Although polyclonal antibodies are typically raised in animals such as  
10 horses, cows, dogs, chicken, rats, mice, rabbits, guinea pigs, goats, or sheep, an anti-mouse Zcytor16 antibody of the present invention may also be derived from a subhuman primate antibody. General techniques for raising diagnostically and therapeutically useful antibodies in baboons may be found, for example, in Goldenberg *et al.*, international patent publication No. WO 91/11465, and in Losman *et al.*, *Int. J.*  
15 *Cancer* 46:310 (1990).

Alternatively, monoclonal anti-mouse Zcytor16 antibodies can be generated. Rodent monoclonal antibodies to specific antigens may be obtained by methods known to those skilled in the art (see, for example, Kohler *et al.*, *Nature* 256:495 (1975), Coligan *et al.* (eds.), *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1, pages  
20 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991) ["Coligan"], Picklesley *et al.*, "Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in *E. coli*," in *DNA Cloning 2: Expression Systems*, 2nd Edition, Glover *et al.* (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995)).

Briefly, monoclonal antibodies can be obtained by injecting mice with a  
25 composition comprising a mouse Zcytor16 gene product, verifying the presence of antibody production by removing a serum sample, removing the spleen to obtain B-lymphocytes, fusing the B-lymphocytes with myeloma cells to produce hybridomas, cloning the hybridomas, selecting positive clones which produce antibodies to the antigen, culturing the clones that produce antibodies to the antigen, and isolating the  
30 antibodies from the hybridoma cultures.

In addition, an anti-mouse Zcytor16 antibody of the present invention may be derived from a human monoclonal antibody. Human monoclonal antibodies are obtained from transgenic mice that have been engineered to produce specific human antibodies in response to antigenic challenge. In this technique, elements of the human heavy and light chain locus are introduced into strains of mice derived from embryonic stem cell lines that contain targeted disruptions of the endogenous heavy chain and light chain loci. The transgenic mice can synthesize human antibodies against specific antigens, e.g., Zcytor16, and the mice can be used to produce human antibody-secreting hybridomas. Methods for obtaining human antibodies from transgenic mice are described, for example, by Green *et al.*, *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg *et al.*, *Nature* 368:856 (1994), and Taylor *et al.*, *Int. Immun.* 6:579 (1994).

Monoclonal antibodies can be isolated and purified from hybridoma cultures by a variety of well-established techniques. Such isolation techniques include affinity chromatography with Protein-A Sepharose, size-exclusion chromatography, and ion-exchange chromatography (see, for example, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 and pages 2.9.1-2.9.3; Baines *et al.*, "Purification of Immunoglobulin G (IgG)," in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 10, pages 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992)).

For particular uses, it may be desirable to prepare fragments of anti-mouse Zcytor16 antibodies. Such antibody fragments can be obtained, for example, by proteolytic hydrolysis of the antibody. Antibody fragments can be obtained by pepsin or papain digestion of whole antibodies by conventional methods. As an illustration, antibody fragments can be produced by enzymatic cleavage of antibodies with pepsin to provide a 5S fragment denoted F(ab')<sub>2</sub>. This fragment can be further cleaved using a thiol reducing agent to produce 3.5S Fab' monovalent fragments. Optionally, the cleavage reaction can be performed using a blocking group for the sulfhydryl groups that result from cleavage of disulfide linkages. As an alternative, an enzymatic cleavage using pepsin produces two monovalent Fab fragments and an Fc fragment directly. These methods are described, for example, by Goldenberg, U.S. patent No. 4,331,647, Nisonoff *et al.*, *Arch Biochem. Biophys.* 89:230 (1960), Porter, *Biochem. J.* 73:119 (1959), Edelman *et al.*, in *Methods in Enzymology* Vol. 1, page 422 (Academic Press 1967), and by Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 and 2.10.-2.10.4.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

83

Other methods of cleaving antibodies, such as separation of heavy chains to form monovalent light-heavy chain fragments, further cleavage of fragments, or other enzymatic, chemical or genetic techniques may also be used, so long as the fragments bind to the antigen that is recognized by the intact antibody.

For example, Fv fragments comprise an association of V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> chains. This association can be noncovalent, as described by Inbar *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 69:2659 (1972). Alternatively, the variable chains can be linked by an intermolecular disulfide bond or cross-linked by chemicals such as glutaraldehyde (see, for example, Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437 (1992)).

The Fv fragments may comprise V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> chains which are connected by a peptide linker. These single-chain antigen binding proteins (scFv) are prepared by constructing a structural gene comprising DNA sequences encoding the V<sub>H</sub> and V<sub>L</sub> domains which are connected by an oligonucleotide. The structural gene is inserted into an expression vector which is subsequently introduced into a host cell, such as *E. coli*. The recombinant host cells synthesize a single polypeptide chain with a linker peptide bridging the two V domains. Methods for producing scFvs are described, for example, by Whitlow *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:97 (1991) (also see, Bird *et al.*, *Science* 242:423 (1988), Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 4,946,778, Pack *et al.*, *BioTechnology* 11:1271 (1993), and Sandhu, *supra*).

As an illustration, a scFV can be obtained by exposing lymphocytes to mouse Zcytor16 polypeptide *in vitro*, and selecting antibody display libraries in phage or similar vectors (for instance, through use of immobilized or labeled mouse Zcytor16 protein or peptide). Genes encoding polypeptides having potential mouse Zcytor16 polypeptide binding domains can be obtained by screening random peptide libraries displayed on phage (phage display) or on bacteria, such as *E. coli*. Nucleotide sequences encoding the polypeptides can be obtained in a number of ways, such as through random mutagenesis and random polynucleotide synthesis. These random peptide display libraries can be used to screen for peptides which interact with a known target which can be a protein or polypeptide, such as a ligand or receptor, a biological or synthetic macromolecule, or organic or inorganic substances. Techniques for creating and screening such random peptide display libraries are known in the art

WO 02/070655

PCT/US02/06267

84

(Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 5,223,409, Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 4,946,778, Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 5,403,484, Ladner *et al.*, U.S. Patent No. 5,571,698, and Kay *et al.*, *Phage Display of Peptides and Proteins* (Academic Press, Inc. 1996)) and random peptide display libraries and kits for screening such libraries are available commercially, for instance from CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA), and Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Random peptide display libraries can be screened using the mouse Zcytor16 sequences disclosed herein to identify proteins which bind to mouse Zcytor16.

Another form of an antibody fragment is a peptide coding for a single complementarity-determining region (CDR). CDR peptides ("minimal recognition units") can be obtained by constructing genes encoding the CDR of an antibody of interest. Such genes are prepared, for example, by using the polymerase chain reaction to synthesize the variable region from RNA of antibody-producing cells (see, for example, Larrick *et al.*, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology* 2:106 (1991), Courtenay-Luck, "Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application*, Ritter *et al.* (eds.), page 166 (Cambridge University Press 1995), and Ward *et al.*, "Genetic Manipulation and Expression of Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch *et al.*, (eds.), page 137 (Wiley-Liss, Inc. 1995)).

Alternatively, an anti-mouse Zcytor16 antibody may be derived from a "humanized" monoclonal antibody. Humanized monoclonal antibodies are produced by transferring mouse complementary determining regions from heavy and light variable chains of the mouse immunoglobulin into a human variable domain. Typical residues of human antibodies are then substituted in the framework regions of the murine counterparts. The use of antibody components derived from humanized monoclonal antibodies obviates potential problems associated with the immunogenicity of murine constant regions. General techniques for cloning murine immunoglobulin variable domains are described, for example, by Orlandi *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:3833 (1989). Techniques for producing humanized monoclonal antibodies are described, for example, by Jones *et al.*, *Nature* 321:522 (1986), Carter *et al.*, *Proc. Nat'l*

WO 02/070655

PCT/US02/06267

85

*Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12:437 (1992), Singer *et al.*, *J. Immun.* 150:2844 (1993), Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols* (Humana Press, Inc. 1995), Kelley, "Engineering Therapeutic Antibodies," in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland *et al.* (eds.), pages 399-434 (John Wiley & Sons, Inc. 1996), and by Queen *et al.*, U.S. Patent No. 5,693,762 (1997).

Polyclonal anti-idiotypic antibodies can be prepared by immunizing animals with anti-mouse Zcytor16 antibodies or antibody fragments, using standard techniques. See, for example, Green *et al.*, "Production of Polyclonal Antisera," in *Methods In Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Manson (ed.), pages 1-12 (Humana Press 1992). Also, see Coligan at pages 2.4.1-2.4.7. Alternatively, monoclonal anti-idiotypic antibodies can be prepared using anti-mouse Zcytor16 antibodies or antibody fragments as immunogens with the techniques, described above. As another alternative, humanized anti-idiotypic antibodies or subhuman primate anti-idiotypic antibodies can be prepared using the above-described techniques. Methods for producing anti-idiotypic antibodies are described, for example, by Irie, U.S. Patent No. 5,208,146, Greene, *et al.*, U.S. Patent No. 5,637,677, and Varthakavi and Minocha, *J. Gen. Virol.* 77:1875 (1996).

#### 10. Use of mouse Zcytor16 Nucleotide Sequences to Detect Gene Expression and Gene Structure

Nucleic acid molecules can be used to detect the expression of a mouse Zcytor16 gene in a biological sample. Suitable probe molecules include double-stranded nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or a portion thereof, as well as single-stranded nucleic acid molecules having the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or a portion thereof. Probe molecules may be DNA, RNA, oligonucleotides, and the like. As used herein, the term "portion" refers to at least eight nucleotides to at least 20 or more nucleotides. Illustrative probes bind with regions of the mouse Zcytor16 gene that have a low sequence similarity to comparable regions in other cytokine receptor genes.

In a basic assay, a single-stranded probe molecule is incubated with RNA, isolated from a biological sample, under conditions of temperature and ionic strength that promote base pairing between the probe and target mouse *Zcytor16* RNA species. After separating unbound probe from hybridized molecules, the amount of hybrids is detected.

In addition, as *Zcytor16* expression in humans and mice is tissue-specific, polynucleotide probes, anti-mouse *Zcytor16* antibodies, and detection the presence of *Zcytor16* polypeptides in tissue can be used to assess whether a specific tissue is present, for example, after surgery involving the excision of a diseased or cancerous tissue. As such, the polynucleotides, polypeptides, and antibodies of the present invention can be used as an aid to determine whether all spleen tissue is excised after surgery, for example, after surgery for spleen cancer. In such instances, it is especially important to remove all potentially diseased tissue to maximize recovery from the cancer, and to minimize recurrence. Preferred embodiments include fluorescent, radiolabeled, or calorimetrically labeled antibodies, that can be used *in situ*.

Moreover, anti-mouse *Zcytor16* antibodies and binding fragments can be used for tagging and sorting cells that specifically-express mouse *Zcytor16*, such as mononuclear cells, lymphoid cells, e.g. activated CD4+ T-cells and CD19+ B-cells, and other described herein. Such methods of cell tagging and sorting are well known in the art (see, e.g., "Molecular Biology of the Cell", 3<sup>rd</sup> Ed., Albert, B. *et al.* (Garland Publishing, London & New York, 1994). One of skill in the art would recognize the importance of separating cell tissue types to study cells, and the use of antibodies to separate specific cell tissue types. Basically, antibodies that bind to the surface of a cell type are coupled to various matrices such as collagen, polysaccharide beads, or plastic to form an affinity surface to which only cells recognized by the antibodies will adhere. The bound cells are then recovered by conventional techniques. Other methods involve separating cells by a fluorescence-activated cell sorter (FACS). In this technique one labels cells with antibodies that are coupled to a fluorescent dye. The labeled cells are then separated from unlabeled cells in a FACS machine. In FACS sorting individual cells traveling in single file pass through a laser beam and the fluorescence of each cell is measured. Slightly further down-stream, tiny droplets, most containing either one or

WO 02/070655

PCT/US02/06267

87

no cells, are formed by a vibrating nozzle. The droplets containing a single cell are automatically give a positive or negative charge at the moment of formation, depending on whether the cell they contain is fluorescent, and then deflected by a strong electric field into an appropriate container. Such machines can select 1 cell in 1000 and sort  
5 about 5000 cells each second. This produces a uniform population of cells for cell culture.

One of skill in the art would recognize that the antibodies to the mouse Zcytor16 polypeptides of the present invention are useful, because not all tissue types express the mouse Zcytor16 receptor and because it is important that biologists be able  
10 to separate specific cell types for further study and/or therapeutic re-implantation into the body. This is particularly relevant in cells such as immune cells, wherein mouse Zcytor16 is expressed.

Moreover, use of mouse Zcytor16 polynucleotide probes, anti-mouse Zcytor16 antibodies, and detection the presence of mouse Zcytor16 polypeptides in  
15 tissue can be used in the diagnosis and/or prevention of spontaneous abortions, or to monitor placental health and function. Since mouse Zcytor16 is expressed in the placenta, it could play a role in the critical functions of placenta, such as proliferation or survival of trophoblast cells, and the like. Thus, mouse Zcytor16 could be essential for the function of the placenta, thus maturation of embryos. Therefore, a supplement of  
20 mouse Zcytor16 polypeptide, or anti-mouse Zcytor16 antibodies may be beneficial in the prevention and treatment of certain types of spontaneous abortions, or premature birth of babies caused by abnormal expression of Zcytor16 in the placenta, or as a diagnostic to assess the function of the placenta. For example, as mouse Zcytor16 is normally expressed in placenta, the absence of mouse Zcytor16 expression may be  
25 indicative of abnormal placenta function. Similarly, use of mouse Zcytor16 polynucleotide probes, anti-mouse Zcytor16 antibodies, can be used in animal husbandry, for example in commercial mouse breeding colonies and transgenic mouse embryo recipients in the prevention and treatment of certain types of spontaneous abortions, or premature birth of pups caused by abnormal expression of mouse  
30 Zcytor16 in the placenta, or as a diagnostic to assess the function of the placenta.



WO 02/070655

PCT/US02/06267

88

Well-established hybridization methods of RNA detection include northern analysis and dot/slot blot hybridization (see, for example, Ausubel (1995) at pages 4-1 to 4-27, and Wu *et al.* (eds.), "Analysis of Gene Expression at the RNA Level," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 225-239 (CRC Press, Inc. 1997)).

- 5 Nucleic acid probes can be detectably labeled with radioisotopes such as  $^{32}\text{P}$  or  $^{35}\text{S}$ . Alternatively, mouse *Zcytor16* RNA can be detected with a nonradioactive hybridization method (see, for example, Isaac (ed.), *Protocols for Nucleic Acid Analysis by Nonradioactive Probes* (Humana Press, Inc. 1993)). Typically, nonradioactive detection is achieved by enzymatic conversion of chromogenic or chemiluminescent substrates.
- 10 Illustrative nonradioactive moieties include biotin, fluorescein, and digoxigenin.

Mouse *Zcytor16* oligonucleotide probes are also useful for *in vivo* diagnosis. As an illustration,  $^{18}\text{F}$ -labeled oligonucleotides can be administered to a subject and visualized by positron emission tomography (Tavitian *et al.*, *Nature Medicine* 4:467 (1998)).

- 15 Numerous diagnostic procedures take advantage of the polymerase chain reaction (PCR) to increase sensitivity of detection methods. Standard techniques for performing PCR are well-known (see, generally, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), White (ed.), *PCR Protocols: Current Methods and Applications* (Humana Press, Inc. 1993), Cotter (ed.), *Molecular*
- 20 *Diagnosis of Cancer* (Humana Press, Inc. 1996), Hanausek and Walaszek (eds.), *Tumor Marker Protocols* (Humana Press, Inc. 1998), Lo (ed.), *Clinical Applications of PCR* (Humana Press, Inc. 1998), and Meltzer (ed.), *PCR in Bioanalysis* (Humana Press, Inc. 1998)).

- PCR primers can be designed to amplify a portion of the mouse
- 25 *Zcytor16* gene that has a low sequence similarity to a comparable region in other proteins, such as other cytokine receptor proteins.

- One variation of PCR for diagnostic assays is reverse transcriptase-PCR (RT-PCR). In the RT-PCR technique, RNA is isolated from a biological sample, reverse transcribed to cDNA, and the cDNA is incubated with mouse *Zcytor16* primers
- 30 (see, for example, Wu *et al.* (eds.), "Rapid Isolation of Specific cDNAs or Genes by

WO 02/070655

PCT/US02/06267

89

PCR," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 15-28 (CRC Press, Inc. 1997)). PCR is then performed and the products are analyzed using standard techniques.

As an illustration, RNA is isolated from biological sample using, for example, the guanidium-thiocyanate cell lysis procedure described above.

5 Alternatively, a solid-phase technique can be used to isolate mRNA from a cell lysate. A reverse transcription reaction can be primed with the isolated RNA using random oligonucleotides, short homopolymers of dT, or mouse *Zcytor16* anti-sense oligomers. Oligo-dT primers offer the advantage that various mRNA nucleotide sequences are amplified that can provide control target sequences. mouse *Zcytor16* sequences are  
10 amplified by the polymerase chain reaction using two flanking oligonucleotide primers that are typically 20 bases in length.

PCR amplification products can be detected using a variety of approaches. For example, PCR products can be fractionated by gel electrophoresis, and visualized by ethidium bromide staining. Alternatively, fractionated PCR products can  
15 be transferred to a membrane, hybridized with a detectably-labeled mouse *Zcytor16* probe, and examined by autoradiography. Additional alternative approaches include the use of digoxigenin-labeled deoxyribonucleic acid triphosphates to provide chemiluminescence detection, and the C-TRAK colorimetric assay.

Another approach for detection of mouse *Zcytor16* expression is cycling  
20 probe technology (CPT), in which a single-stranded DNA target binds with an excess of DNA-RNA-DNA chimeric probe to form a complex, the RNA portion is cleaved with RNAase H, and the presence of cleaved chimeric probe is detected (see, for example, Beggs *et al.*, *J. Clin. Microbiol.* 34:2985 (1996), Bekkaoui *et al.*, *Biotechniques* 20:240 (1996)). Alternative methods for detection of mouse *Zcytor16* sequences can utilize  
25 approaches such as nucleic acid sequence-based amplification (NASBA), cooperative amplification of templates by cross-hybridization (CATCH), and the ligase chain reaction (LCR) (see, for example, Marshall *et al.*, U.S. Patent No. 5,686,272 (1997), Dyer *et al.*, *J. Virol. Methods* 60:161 (1996), Ehrlich *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 243:358 (1997), and Chadwick *et al.*, *J. Virol. Methods* 70:59 (1998)). Other standard methods  
30 are known to those of skill in the art.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

90

Mouse *Zcytor16* probes and primers can also be used to detect and to localize *Zcytor16* gene expression in tissue samples. Methods for such *in situ* hybridization are well-known to those of skill in the art (see, for example, Choo (ed.), *In Situ Hybridization Protocols* (Humana Press, Inc. 1994), Wu *et al.* (eds.), "Analysis of Cellular DNA or Abundance of mRNA by Radioactive *In Situ* Hybridization (RISH)," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 259-278 (CRC Press, Inc. 1997), and Wu *et al.* (eds.), "Localization of DNA or Abundance of mRNA by Fluorescence *In Situ* Hybridization (RISH)," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 279-289 (CRC Press, Inc. 1997)). Various additional diagnostic approaches are well-known to those of skill in the art (see, for example, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Coleman and Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Humana Press, Inc. 1996), and Elles, *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc., 1996)). Suitable test samples include blood, urine, saliva, tissue biopsy, and autopsy material.

#### 11. Use of Anti-mouse *Zcytor16* Antibodies to Detect *Zcytor16* or Antagonize *Zcytor16* Binding to IL-TIF

The present invention contemplates the use of anti-mouse *Zcytor16* antibodies to screen biological samples *in vitro* for the presence of *Zcytor16*. In one type of *in vitro* assay, anti-mouse *Zcytor16* antibodies are used in liquid phase. For example, the presence of mouse *Zcytor16* in a biological sample can be tested by mixing the biological sample with a trace amount of labeled mouse *Zcytor16* and an anti-mouse *Zcytor16* antibody under conditions that promote binding between mouse *Zcytor16* and its antibody. Complexes of mouse *Zcytor16* and anti-mouse *Zcytor16* in the sample can be separated from the reaction mixture by contacting the complex with an immobilized protein which binds with the antibody, such as an Fc antibody or *Staphylococcus* protein A. The concentration of mouse *Zcytor16* in the biological sample will be inversely proportional to the amount of labeled mouse *Zcytor16* bound to the antibody and directly related to the amount of free labeled mouse *Zcytor16*. Illustrative biological samples include blood, urine, saliva, tissue biopsy, and autopsy material.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

91

Alternatively, *in vitro* assays can be performed in which anti-mouse Zcytor16 antibody is bound to a solid-phase carrier. For example, antibody can be attached to a polymer, such as aminodextran, in order to link the antibody to an insoluble support such as a polymer-coated bead, a plate or a tube. Other suitable *in vitro* assays will be readily apparent to those of skill in the art.

In another approach, anti-mouse Zcytor16 antibodies can be used to detect Zcytor16 in tissue sections prepared from a biopsy specimen. Such immunochemical detection can be used to determine the relative abundance of mouse Zcytor16 and to determine the distribution of Zcytor16 in the examined tissue. General immunochemistry techniques are well established (see, for example, Ponder, "Cell Marking Techniques and Their Application," in *Mammalian Development: A Practical Approach*, Monk (ed.), pages 115-38 (IRL Press 1987), Coligan at pages 5.8.1-5.8.8, Ausubel (1995) at pages 14.6.1 to 14.6.13 (Wiley Interscience 1990), and Manson (ed.), *Methods In Molecular Biology, Vol. 10: Immunochemical Protocols* (The Humana Press, Inc. 1992)).

Immunochemical detection can be performed by contacting a biological sample with an anti-mouse Zcytor16 antibody, and then contacting the biological sample with a detectably labeled molecule which binds to the antibody. For example, the detectably labeled molecule can comprise an antibody moiety that binds to anti-mouse Zcytor16 antibody. Alternatively, the anti-mouse Zcytor16 antibody can be conjugated with avidin/streptavidin (or biotin) and the detectably labeled molecule can comprise biotin (or avidin/streptavidin). Numerous variations of this basic technique are well-known to those of skill in the art.

Alternatively, an anti-mouse Zcytor16 antibody can be conjugated with a detectable label to form an anti-mouse Zcytor16 immunoconjugate. Suitable detectable labels include, for example, a radioisotope, a fluorescent label, a chemiluminescent label, an enzyme label, a bioluminescent label or colloidal gold. Methods of making and detecting such detectably-labeled immunoconjugates are well-known to those of ordinary skill in the art, and are described in more detail below.

The detectable label can be a radioisotope that is detected by autoradiography. Isotopes that are particularly useful for the purpose of the present invention are  $^3\text{H}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  and  $^{14}\text{C}$ .

Anti-mouse Zcytor16 immunoconjugates can also be labeled with a fluorescent compound. The presence of a fluorescently-labeled antibody is determined by exposing the immunoconjugate to light of the proper wavelength and detecting the resultant fluorescence. Fluorescent labeling compounds include fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerytherin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthal-

Alternatively, anti-mouse Zcytor16 immunoconjugates can be detectably labeled by coupling an antibody component to a chemiluminescent compound. The presence of the chemiluminescent-tagged immunoconjugate is determined by detecting the presence of luminescence that arises during the course of a chemical reaction. Examples of chemiluminescent labeling compounds include luminol, isoluminol, an aromatic acridinium ester, an imidazole, an acridinium salt and an oxalate ester.

Similarly, a bioluminescent compound can be used to label anti-mouse Zcytor16 immunoconjugates of the present invention. Bioluminescence is a type of chemiluminescence found in biological systems in which a catalytic protein increases the efficiency of the chemiluminescent reaction. The presence of a bioluminescent protein is determined by detecting the presence of luminescence. Bioluminescent compounds that are useful for labeling include luciferin, luciferase and aequorin.

Alternatively, anti-mouse Zcytor16 immunoconjugates can be detectably labeled by linking an anti-mouse Zcytor16 antibody component to an enzyme. When the anti-mouse Zcytor16-enzyme conjugate is incubated in the presence of the appropriate substrate, the enzyme moiety reacts with the substrate to produce a chemical moiety which can be detected, for example, by spectrophotometric, fluorometric or visual means. Examples of enzymes that can be used to detectably label polyspecific immunoconjugates include  $\beta$ -galactosidase, glucose oxidase, peroxidase and alkaline phosphatase.

Those of skill in the art will know of other suitable labels which can be employed in accordance with the present invention. The binding of marker moieties to anti-mouse Zcytor16 antibodies can be accomplished using standard techniques known to the art. Typical methodology in this regard is described by Kennedy *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 70:1 (1976), Schurs *et al.*, *Clin. Chim. Acta* 81:1 (1977), Shih *et al.*, *Int'l J. Cancer* 46:1101 (1990), Stein *et al.*, *Cancer Res.* 50:1330 (1990), and Coligan, *supra*.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

93

Moreover, the convenience and versatility of immunochemical detection can be enhanced by using anti-mouse Zcytor16 antibodies that have been conjugated with avidin, streptavidin, and biotin (see, for example, Wilchek *et al.* (eds.), "Avidin-Biotin Technology," *Methods In Enzymology*, Vol. 184 (Academic Press 1990), and Bayer *et al.*,  
5 "Immunochemical Applications of Avidin-Biotin Technology," in *Methods In Molecular Biology*, Vol. 10, Manson (ed.), pages 149-162 (The Humana Press, Inc. 1992).

Methods for performing immunoassays are well-established. See, for example, Cook and Self, "Monoclonal Antibodies in Diagnostic Immunoassays," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering, and Clinical Application*, Ritter and  
10 Ladyman (eds.), pages 180-208, (Cambridge University Press, 1995), Perry, "The Role of Monoclonal Antibodies in the Advancement of Immunoassay Technology," in *Monoclonal Antibodies: Principles and Applications*, Birch and Lennox (eds.), pages 107-120 (Wiley-Liss, Inc. 1995), and Diamandis, *Immunoassay* (Academic Press, Inc. 1996).

15 The present invention also contemplates kits for performing an immunological diagnostic assay for Zcytor16 gene expression. Such kits comprise at least one container comprising an anti-mouse Zcytor16 antibody, or antibody fragment. A kit may also comprise a second container comprising one or more reagents capable of indicating the presence of mouse Zcytor16 antibody or antibody fragments. Examples  
20 of such indicator reagents include detectable labels such as a radioactive label, a fluorescent label, a chemiluminescent label, an enzyme label, a bioluminescent label, colloidal gold, and the like. A kit may also comprise a means for conveying to the user that mouse Zcytor16 antibodies or antibody fragments are used to detect Zcytor16 protein. For example, written instructions may state that the enclosed antibody or  
25 antibody fragment can be used to detect mouse Zcytor16. The written material can be applied directly to a container, or the written material can be provided in the form of a packaging insert.

Alternative techniques for generating or selecting antibodies useful herein include *in vitro* exposure of lymphocytes to soluble mouse Zcytor16 monomeric  
30 receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptides, and selection of antibody display libraries in phage or similar vectors (for

WO 02/070655

PCT/US02/06267

94

instance, through use of immobilized or labeled soluble mouse Zcytor16 monomeric receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptides). Genes encoding polypeptides having potential binding domains such as soluble mouse Zcytor16 monomeric receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptide can be obtained by screening random peptide libraries displayed on phage (phage display) or on bacteria, such as *E. coli*. Nucleotide sequences encoding the polypeptides can be obtained in a number of ways, such as through random mutagenesis and random polynucleotide synthesis. These random peptide display libraries can be used to screen for peptides which interact with a known target which can be a protein or polypeptide, such as a ligand or receptor, a biological or synthetic macromolecule, or organic or inorganic substances. Techniques for creating and screening such random peptide display libraries are known in the art (Ladner et al., US Patent NO. 5,223,409; Ladner et al., US Patent NO. 4,946,778; Ladner et al., US Patent NO. 5,403,484 and Ladner et al., US Patent NO. 5,571,698) and random peptide display libraries and kits for screening such libraries are available commercially, for instance from Clontech (Palo Alto, CA), Invitrogen Inc. (San Diego, CA), New England Biolabs, Inc. (Beverly, MA) and Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, NJ). Random peptide display libraries can be screened using the soluble mouse Zcytor16 monomeric receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptide sequences disclosed herein to identify proteins which bind to mouse Zcytor16-comprising receptor polypeptides. These "binding polypeptides," which interact with soluble mouse Zcytor16-comprising receptor polypeptides, can be used for tagging cells, for example, those in which Zcytor16 is expressed; for isolating homolog polypeptides by affinity purification; they can be directly or indirectly conjugated to drugs, toxins, radionuclides and the like. These binding polypeptides can also be used in analytical methods such as for screening expression libraries and neutralizing activity, e.g., for blocking interaction between IL-TIF ligand and receptor, or viral binding to a receptor. The binding polypeptides can also be used for diagnostic assays for determining circulating levels of soluble mouse Zcytor16-comprising receptor polypeptides; for detecting or quantitating soluble or non-soluble Zcytor16-comprising receptors as marker of underlying pathology or

WO 02/070655

PCT/US02/06267

95

disease. These binding polypeptides can also act as "antagonists" to block soluble or membrane-bound mouse Zcytor16 monomeric receptor or mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptide binding (e.g. to ligand) and signal transduction *in vitro* and *in vivo*. Again, these binding polypeptides serve as

5 anti-mouse Zcytor16 monomeric receptor or anti-mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptides and are useful for inhibiting IL-TIF activity, as well as receptor activity or protein-binding. Antibodies raised to the natural receptor complexes of the present invention may be preferred embodiments, as they may act more specifically against the IL-TIF, or more potently than antibodies raised to only one

10 subunit. Moreover, the antagonistic and binding activity of the antibodies of the present invention can be assayed in the IL-TIF proliferation, signal trap, luciferase or binding assays in the presence of IL-TIF and Zcytor16-comprising soluble receptors, and other biological or biochemical assays described herein.

Antibodies to monomeric mouse Zcytor16 receptor or mouse Zcytor16

15 homodimeric, heterodimeric or multimeric mouse Zcytor16-containing receptors may be used for tagging cells that express Zcytor16 receptors; for isolating soluble Zcytor16-comprising receptor polypeptides by affinity purification; for diagnostic assays for determining circulating levels of soluble Zcytor16-comprising receptor polypeptides; for detecting or quantitating soluble Zcytor16-comprising receptors as marker of

20 underlying pathology or disease; in analytical methods employing FACS; for screening expression libraries; for generating anti-idiotypic antibodies that can act as IL-TIF agonists; and as neutralizing antibodies or as antagonists to block Zcytor16 receptor function, or to block IL-TIF activity *in vitro* and *in vivo*. Suitable direct tags or labels include radionuclides, enzymes, substrates, cofactors, biotin, inhibitors, fluorescent

25 markers, chemiluminescent markers, magnetic particles and the like; indirect tags or labels may feature use of biotin-avidin or other complement/anti-complement pairs as intermediates. Antibodies herein may also be directly or indirectly conjugated to drugs, toxins, radionuclides and the like, and these conjugates used for *in vivo* diagnostic or therapeutic applications. Moreover, antibodies to soluble mouse Zcytor16-comprising

30 receptor polypeptides, or fragments thereof may be used *in vitro* to detect denatured or non-denatured mouse or orthologous Zcytor16-comprising receptor polypeptides or



WO 02/070655

PCT/US02/06267

96

fragments thereof in assays, for example, Western Blots or other assays known in the art.

Antibodies to soluble mouse Zcytor16 receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor polypeptides are useful for tagging cells that express the corresponding receptors and assaying their expression levels, for affinity purification, within diagnostic assays for determining circulating levels of receptor polypeptides, analytical methods employing fluorescence-activated cell sorting. Moreover, divalent antibodies, and anti-idiotypic antibodies may be used as agonists to mimic the effect of the Zcytor16 ligand, IL-TIF.

Antibodies herein can also be directly or indirectly conjugated to drugs, toxins, radionuclides and the like, and these conjugates used for *in vivo* diagnostic or therapeutic applications. For instance, antibodies or binding polypeptides which recognize soluble mouse Zcytor16 receptor or soluble mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor polypeptides of the present invention can be used to identify or treat tissues or organs that express a corresponding anti-complementary molecule (i.e., a mouse Zcytor16-comprising soluble or membrane-bound receptor). More specifically, antibodies to soluble mouse Zcytor16-comprising receptor polypeptides, or bioactive fragments or portions thereof, can be coupled to detectable or cytotoxic molecules and delivered to a mammal having cells, tissues or organs that express a Zcytor16-comprising receptor such as Zcytor16-expressing cancers, or certain disease states.

Suitable detectable molecules may be directly or indirectly attached to polypeptides that bind mouse Zcytor16-comprising receptor polypeptides, such as "binding polypeptides," (including binding peptides disclosed above), antibodies, or bioactive fragments or portions thereof. Suitable detectable molecules include radionuclides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescent markers, chemiluminescent markers, magnetic particles and the like. Suitable cytotoxic molecules may be directly or indirectly attached to the polypeptide or antibody, and include bacterial or plant toxins (for instance, diphtheria toxin, *Pseudomonas* exotoxin, ricin, abrin and the like), as well as therapeutic radionuclides, such as iodine-131, rhenium-188 or yttrium-90 (either directly attached to the polypeptide or antibody, or

WO 02/070655

PCT/US02/06267

97

indirectly attached through means of a chelating moiety, for instance). Binding polypeptides or antibodies may also be conjugated to cytotoxic drugs, such as adriamycin. For indirect attachment of a detectable or cytotoxic molecule, the detectable or cytotoxic molecule can be conjugated with a member of a complementary/

5    anticomplementary pair, where the other member is bound to the binding polypeptide or antibody portion. For these purposes, biotin/streptavidin is an exemplary complementary/ anticomplementary pair.

In another embodiment, binding polypeptide-toxin fusion proteins or antibody-toxin fusion proteins can be used for targeted cell or tissue inhibition or

10    ablation (for instance, to treat cancer cells or tissues). Alternatively, if the binding polypeptide has multiple functional domains (i.e., an activation domain or a ligand binding domain, plus a targeting domain), a fusion protein including only the targeting domain may be suitable for directing a detectable molecule, a cytotoxic molecule or a complementary molecule to a cell or tissue type of interest. In instances where the

15    fusion protein including only a single domain includes a complementary molecule, the anti-complementary molecule can be conjugated to a detectable or cytotoxic molecule. Such domain-complementary molecule fusion proteins thus represent a generic targeting vehicle for cell/tissue-specific delivery of generic anti-complementary-

detectable/ cytotoxic molecule conjugates.

In another embodiment, mouse Zcytor16 binding polypeptide-cytokine or antibody-cytokine fusion proteins can be used for enhancing *in vivo* killing of target

20    tissues (for example, spleen, pancreatic, blood, lymphoid, colon, and bone marrow cancers), if the binding polypeptide-cytokine or anti- mouse Zcytor16 receptor antibody targets the hyperproliferative cell (See, generally, Hornick et al., Blood 89:4437-47,

25    1997). The described fusion proteins enable targeting of a cytokine to a desired site of action, thereby providing an elevated local concentration of cytokine. Suitable anti-mouse Zcytor16 monomer, homodimer, heterodimer or multimer antibodies target an undesirable cell or tissue (i.e., a tumor or a leukemia), and the fused cytokine mediates improved target cell lysis by effector cells. Suitable cytokines for this purpose include

30    interleukin 2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), for instance.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

98

Alternatively, mouse Zcytor16 receptor binding polypeptides or antibody fusion proteins described herein can be used for enhancing *in vivo* killing of target tissues by directly stimulating a Zcytor16 receptor-modulated apoptotic pathway, resulting in cell death of hyperproliferative cells expressing Zcytor16-comprising receptors.

#### 12. Production of Transgenic Mice

Mice engineered to overexpress the mouse Zcytor16 gene, referred to as "transgenic mice," and mice that exhibit a complete absence of mouse Zcytor16 gene function, referred to as "knockout mice," may also be generated (Snouwaert et al., Science 257:1083, 1992; Lowell et al., Nature 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., Science 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. et al. Annu Rev Genet. 20: 465-499, 1986). For example, transgenic mice that over-express mouse Zcytor16, either ubiquitously or under a tissue-specific or tissue-restricted promoter can be used to ask whether over-expression causes a phenotype. For example, over-expression of a wild-type Zcytor16 polypeptide, polypeptide fragment or a mutant thereof may alter normal cellular processes, or repress function of the Zcytor16 ligand IL-TIF, resulting in a phenotype that identifies a tissue in which Zcytor16 expression is functionally relevant and may indicate a therapeutic target for the Zcytor16, its agonists or antagonists. For example, a preferred transgenic mouse to engineer is one that over-expresses the full length human Zcytor16 polypeptide (SEQ ID NO:2); or more preferably the full length mouse Zcytor16 polypeptide (SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48), or mature mouse polypeptide (Amino acids 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48). Preferred tissue-specific or tissue-restricted promoters include monocyte and lymphoid-restricted, epithelial-specific, lung-specific, ovary-specific and skin-restricted promoters. Moreover, such over-expression may result in a phenotype that shows similarity with human diseases, or that counteracts the effects of increased or administered IL-TIF (IL-TIF adenovirus in mice suggests that IL-TIF over-expression increases the level of neutrophils and platelets *in vivo*).

Similarly, knockout mouse Zcytor16 mice can be used to determine where Zcytor16 is absolutely required *in vivo*. Such knockout animals serve as models

WO 02/070655

PCT/US02/06267

99

to understand the requirements of Zcytor16 function in humans. A transgenic mouse that is a knockout mouse would not express residue 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, because they would exhibit a complete absence of endogenous Zcytor16 gene function. The phenotype of knockout mice is predictive of the *in vivo* effects of that a Zcytor16 antagonist, such as those described herein, may have. The murine Zcytor16 mRNA, and cDNA is isolated (SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47) and can be used to isolate mouse Zcytor16 genomic DNA, which are subsequently used to generate knockout mice. These transgenic and knockout mice may be employed to study the Zcytor16 gene and the protein encoded thereby in an *in vivo* system, and can be used as *in vivo* models for corresponding human or animal diseases (such as those in commercially viable animal populations). The mouse models of the present invention are particularly relevant as tumor models for the study of immune function, inflammatory disease, cancer biology and progression. Such models are useful in the development and efficacy of therapeutic molecules used in human cancers, immune and inflammatory diseases. For example, because increases in human Zcytor16 expression are associated with specific human cancers, such as ovarian cancer, both transgenic mice and knockout mice would serve as useful animal models for cancer. Moreover, because increases in human Zcytor16 expression are associated with specific monocyte cells, such as CD4+ T-cells and CD19+ B-cells, both mouse Zcytor16 transgenic mice and knockout mice would serve as useful animal models for immune function, inflammation, immune disorders, infection, anemia, hematopoietic and other cancers. Moreover, because Zcytor16 is a receptor for IL-TIF, use of mouse Zcytor16 transgenic and knockout mice in a mouse model employing IL-TIF (e.g., with and without IL-TIF) can serve as an additional animal model to study the development and efficacy of therapeutic molecules used in human cancers, immune and inflammatory diseases associated with IL-TIF, as well as assess the efficacy and usefulness of IL-TIF antagonists *in vivo*, such as the zcy16 soluble receptors discussed herein. Moreover, in a preferred embodiment, Zcytor16 transgenic mouse can serve as an animal model for specific tumors, particularly ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, rectal cancer, lung cancer and esophageal cancer; and as a model for IL-TIF-induced inflammation where Zcytor16 polypeptide is an antagonist. Such mouse

WO 02/070655

PCT/US02/06267

100

zcytor16 transgenic and knockout mouse models can also be used to assess the therapeutic aspects of IL-TIF, chemical therapeutics, anti-IL-TIF antibodies, anti-Zcytor16 antibodies, or Zcytor16 soluble receptors therein. Moreover, transgenic mice expression of mouse Zcytor16 antisense polynucleotides or ribozymes directed against mouse Zcytor16, described herein, can be used analogously to transgenic mice described above.

Transgenic mice can be engineered to over-express the mouse *Zcytor16* gene in all tissues or under the control of a tissue-specific or tissue-preferred regulatory element. These over-producers of mouse Zcytor16 can be used to characterize the phenotype that results from over-expression, and the transgenic animals can serve as models for human disease caused by excess mouse Zcytor16. Transgenic mice that over-express mouse Zcytor16 also provide model bioreactors for production of mouse Zcytor16, such as soluble mouse Zcytor16, in the milk or blood of larger animals. Methods for producing transgenic mice are well-known to those of skill in the art (see, for example, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice," in *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*, Jacob (ed.), pages 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), Monastersky and Robl (eds.), *Strategies in Transgenic Animal Science* (ASM Press 1995), and Abbud and Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice," in *Gene Expression Systems: Using Nature for the Art of Expression*, Fernandez and Hoeffler (eds.), pages 367-397 (Academic Press, Inc. 1999)).

For example, a method for producing a transgenic mouse that expresses a mouse *Zcytor16* gene can begin with adult, fertile males (studs) (B6C3f1, 2-8 months of age (Taconic Farms, Germantown, NY)), vasectomized males (duds) (B6D2f1, 2-8 months, (Taconic Farms)), prepubescent fertile females (donors) (B6C3f1, 4-5 weeks, (Taconic Farms)) and adult fertile females (recipients) (B6D2f1, 2-4 months, (Taconic Farms)). The donors are acclimated for one week and then injected with approximately 8 IU/mouse of Pregnant Mare's Serum gonadotrophin (Sigma Chemical Company; St. Louis, MO) I.P., and 46-47 hours later, 8 IU/mouse of human Chorionic Gonadotropin (hCG (Sigma)) I.P. to induce superovulation. Donors are mated with studs subsequent to hormone injections. Ovulation generally occurs within 13 hours of hCG injection.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

101

Copulation is confirmed by the presence of a vaginal plug the morning following mating.

Fertilized eggs are collected under a surgical scope. The oviducts are collected and eggs are released into urinalysis slides containing hyaluronidase (Sigma). Eggs are washed once in hyaluronidase, and twice in Whitten's W640 medium (described, for example, by Menino and O'Claray, *Biol. Reprod.* 77:159 (1986), and Dienhart and Downs, *Zygote* 4:129 (1996)) that has been incubated with 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, and 90% N<sub>2</sub> at 37°C. The eggs are then stored in a 37°C/5% CO<sub>2</sub> incubator until microinjection.

Ten to twenty micrograms of plasmid DNA containing a mouse *Zcytor16* encoding sequence is linearized, gel-purified, and resuspended in 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 0.25 mM EDTA (pH 8.0), at a final concentration of 5-10 nanograms per microliter for microinjection. For example, the mouse *Zcytor16* encoding sequences can encode a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

Plasmid DNA is microinjected into harvested eggs contained in a drop of W640 medium overlaid by warm, CO<sub>2</sub>-equilibrated mineral oil. The DNA is drawn into an injection needle (pulled from a 0.75mm ID, 1mm OD borosilicate glass capillary), and injected into individual eggs. Each egg is penetrated with the injection needle, into one or both of the haploid pronuclei.

Picoliters of DNA are injected into the pronuclei, and the injection needle withdrawn without coming into contact with the nucleoli. The procedure is repeated until all the eggs are injected. Successfully microinjected eggs are transferred into an organ tissue-culture dish with pre-gassed W640 medium for storage overnight in a 37°C/5% CO<sub>2</sub> incubator.

The following day, two-cell embryos are transferred into pseudopregnant recipients. The recipients are identified by the presence of copulation plugs, after copulating with vasectomized duds. Recipients are anesthetized and shaved on the dorsal left side and transferred to a surgical microscope. A small incision is made in the skin and through the muscle wall in the middle of the abdominal area outlined by the ribcage, the saddle, and the hind leg, midway between knee and spleen. The

WO 02/070655

PCT/US02/06267

102

reproductive organs are exteriorized onto a small surgical drape. The fat pad is stretched out over the surgical drape, and a baby serrefine (Roboz, Rockville, MD) is attached to the fat pad and left hanging over the back of the mouse, preventing the organs from sliding back in.

5 With a fine transfer pipette containing mineral oil followed by alternating W640 and air bubbles, 12-17 healthy two-cell embryos from the previous day's injection are transferred into the recipient. The swollen ampulla is located and holding the oviduct between the ampulla and the bursa, a nick in the oviduct is made with a 28 g needle close to the bursa, making sure not to tear the ampulla or the bursa.

10 The pipette is transferred into the nick in the oviduct, and the embryos are blown in, allowing the first air bubble to escape the pipette. The fat pad is gently pushed into the peritoneum, and the reproductive organs allowed to slide in. The peritoneal wall is closed with one suture and the skin closed with a wound clip. The mice recuperate on a 37°C slide warmer for a minimum of four hours.

15 The recipients are returned to cages in pairs, and allowed 19-21 days gestation. After birth, 19-21 days postpartum is allowed before weaning. The weanlings are sexed and placed into separate sex cages, and a 0.5 cm biopsy (used for genotyping) is snipped off the tail with clean scissors.

20 Genomic DNA is prepared from the tail snips using, for example, a QIAGEN DNEASY kit following the manufacturer's instructions. Genomic DNA is analyzed by PCR using primers designed to amplify a mouse *Zcytor16* gene or a selectable marker gene that was introduced in the same plasmid. After animals are confirmed to be transgenic, they are back-crossed into an inbred strain by placing a transgenic female with a wild-type male, or a transgenic male with one or two wild-type female(s). As pups are born and weaned, the sexes are separated, and their tails snipped for genotyping.

30 To check for expression of a transgene in a live animal, a partial hepatectomy is performed. A surgical prep is made of the upper abdomen directly below the zyphoid process. Using sterile technique, a small 1.5-2 cm incision is made below the sternum and the left lateral lobe of the liver exteriorized. Using 4-0 silk, a tie is made around the lower lobe securing it outside the body cavity. An atraumatic clamp

WO 02/070655

PCT/US02/06267

103

is used to hold the tie while a second loop of absorbable Dexon (American Cyanamid; Wayne, N.J.) is placed proximal to the first tie. A distal cut is made from the Dexon tie and approximately 100 mg of the excised liver tissue is placed in a sterile petri dish. The excised liver section is transferred to a 14 ml polypropylene round bottom tube and  
5 snap frozen in liquid nitrogen and then stored on dry ice. The surgical site is closed with suture and wound clips, and the animal's cage placed on a 37°C heating pad for 24 hours post operatively. The animal is checked daily post operatively and the wound clips removed 7-10 days after surgery. The expression level of mouse *Zcytor16* mRNA is examined for each transgenic mouse using an RNA solution hybridization assay or  
10 polymerase chain reaction.

In addition to producing transgenic mice that over-express mouse *Zcytor16*, it is useful to engineer transgenic mice with either abnormally low or no expression of the gene. Such transgenic mice provide useful models for diseases associated with a lack of mouse *Zcytor16*. As discussed above, mouse *Zcytor16* gene  
15 expression can be inhibited using anti-sense genes, ribozyme genes, or external guide sequence genes. To produce transgenic mice that under-express the mouse *Zcytor16* gene, such inhibitory sequences are targeted to mouse *Zcytor16* mRNA. Methods for producing transgenic mice that have abnormally low expression of a particular gene are known to those in the art (see, for example, Wu *et al.*, "Gene Underexpression in  
20 Cultured Cells and Animals by Antisense DNA and RNA Strategies," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 205-224 (CRC Press 1997)).

An alternative approach to producing transgenic mice that have little or no mouse *Zcytor16* gene expression is to generate mice having at least one normal mouse *Zcytor16* allele replaced by a nonfunctional mouse *Zcytor16* gene. One method  
25 of designing a nonfunctional mouse *Zcytor16* gene is to insert another gene, such as a selectable marker gene, within a nucleic acid molecule that encodes mouse *Zcytor16*. Standard methods for producing these so-called "knockout mice" are known to those skilled in the art (see, for example, Jacob, "Expression and Knockout of Interferons in Transgenic Mice," in *Overexpression and Knockout of Cytokines in Transgenic Mice*,  
30 Jacob (ed.), pages 111-124 (Academic Press, Ltd. 1994), and Wu *et al.*, "New



Strategies for Gene Knockout," in *Methods in Gene Biotechnology*, pages 339-365 (CRC Press 1997)).

13. *Therapeutic Uses of Polypeptides Having Zcytor16 Activity*

5 Amino acid sequences having mouse Zcytor16 activity can be used to modulate the immune system by binding Zcytor16 ligand, and thus, preventing the binding of Zcytor16 ligand with endogenous Zcytor16 receptor. Zcytor16 antagonists, such as anti-mouse Zcytor16 antibodies, can also be used to modulate the immune system by inhibiting the binding of Zcytor16 ligand with the endogenous Zcytor16  
10 receptor. Accordingly, the present invention includes the use of proteins, polypeptides, and peptides having mouse Zcytor16 activity (such as mouse Zcytor16 polypeptides, mouse Zcytor16 analogs (*e.g.*, anti-mouse Zcytor16 anti-idiotypic antibodies), and mouse Zcytor16 fusion proteins) to a subject which lacks an adequate amount of this polypeptide, or which produces an excess of Zcytor16 ligand. Mouse Zcytor16  
15 antagonists (*e.g.*, anti-mouse Zcytor16 antibodies) can be also used to treat a subject that produces an excess of either Zcytor16 ligand or Zcytor16 receptor. Suitable subjects include mammals, such as humans. In addition, human Zcytor16 and IL-TIF activity described herein emphasizes the usefulness of using mouse Zcytor16 in animal models, such as a mouse model described above for studying human inflammation,  
20 inflammatory diseases, immune function and diseases and cancer, or assessing therapeutic aspects of IL-TIF, chemical therapeutics, anti-IL-TIF antibodies, anti-Zcytor16 antibodies, or Zcytor16 soluble receptors therein.

Moreover, we have shown that the human Zcytor16 receptor binds a ligand called T-cell inducible Factor (IL-TIF) (SEQ ID NO:15); Dumoutier, L. et al.,  
25 *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 97:10144-10149, 2000; mouse IL-TIF sequence (SEQ ID NO:41) is shown in Dumontier et al., *J. Immunol.* 164:1814-1819, 2000). Moreover, commonly owned zcytor11 (US Patent No. 5,965,704) and CRF2-4 receptor also bind IL-TIF (See, WIPO publication WO 00/24758; Dumontier et al., *J. Immunol.* 164:1814-1819, 2000; Spencer, SD et al., *J. Exp. Med.* 187:571-578, 1998; Gibbs, VC and  
30 Pennica Gene 186:97-101, 1997 (CRF2-4 cDNA); Xie, MH et al., *J. Biol. Chem.* 275: 31335-31339, 2000; and Kotenko, SV et al., *J. Biol. Chem.* manuscript in press

M007837200). Moreover, IL-10 $\beta$  receptor may be involved as a receptor for IL-TIF, and it is believed to be synonymous with CRF2-4 (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000; Liu Y et al, J Immunol. 152: 1821-1829, 1994 (IL-10R cDNA). Within preferred embodiments, the soluble receptor form of mouse Zcytor16, residues 24-230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is a monomer, homodimer, heterodimer, or multimer that antagonizes the effects of IL-TIF *in vivo*. Antibodies and binding polypeptides to such mouse Zcytor16 monomer, homodimer, heterodimer, or multimers also serve as antagonists of Zcytor16 activity.

IL-TIF has been shown to be induced in the presence of IL-9, and is suspected to be involved in promoting Th1-type immune responses, and inflammation. IL-9 stimulates proliferation, activation, differentiation and/or induction of immune function in a variety of ways and is implicated in asthma, lung mastocytosis, and other diseases, as well as activates STAT pathways. Antagonists of IL-TIF or IL-9 function can have beneficial use against such human diseases. The present invention provides such novel antagonists of IL-TIF.

IL-TIF has been shown to be involved in up-regulate the production of acute phase reactants, such as serum amyloid A (SAA),  $\alpha$ 1-antichymotrypsin, and haptoglobin, and that IL-TIF expression is increased upon injection of lipopolysaccharide (LPS) *in vivo* suggesting that IL-TIF is involved in inflammatory response (Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 97:10144-10149, 2000). Production of acute phase proteins, such as SAA, is considered a short-term survival mechanism where inflammation is beneficial; however, maintenance of acute phase proteins for longer periods contributes to chronic inflammation and can be harmful to human health. For review, see Uhlar, CM and Whitehead, AS, Eur. J. Biochem. 265:501-523, 1999, and Baumann H. and Gauldie, J. Immunology Today 15:74-80, 1994. Moreover, the acute phase protein SAA is implicated in the pathogenesis of several chronic inflammatory diseases, is implicated in atherosclerosis and rheumatoid arthritis, and is the precursor to the amyloid A protein deposited in amyloidosis (Uhlar, CM and Whitehead, supra). Thus, as IL-TIF acts as a pro-inflammatory molecule and induces production of SAA, antagonists would be useful in treating inflammatory disease and other diseases associated with acute phase response proteins induced by IL-

WO 02/070655

PCT/US02/06267

106

TIF. Such antagonists are provided by the present invention. For example, method of reducing IL-TIF-induced or IL-9 induced inflammation comprises administering to a mammal with inflammation an amount of a composition of soluble mouse Zcytor16-comprising receptor sufficient to reduce inflammation. Moreover, a method of suppressing an inflammatory response in a mammal with inflammation can comprise: (1) determining a level of serum amyloid A protein; (2) administering a composition comprising a soluble mouse Zcytor16 cytokine receptor polypeptide as described herein in an acceptable pharmaceutical vehicle; (3) determining a post administration level of serum amyloid A protein; (4) comparing the level of serum amyloid A protein in step (1) to the level of serum amyloid A protein in step (3), wherein a lack of increase or a decrease in serum amyloid A protein level is indicative of suppressing an inflammatory response.

The receptors of the present invention include at least one mouse Zcytor16 receptor subunit. A second receptor polypeptide included in the heterodimeric soluble receptor belongs to the receptor subfamily that includes Interleukin-10 receptor, the interferons (e.g., interferon-gamma alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains), zcytor7, zcytor11, and CRF2-4. A second soluble receptor polypeptide included in a heterodimeric soluble receptor can also include a zcytor11 soluble receptor subunit, disclosed in the commonly owned US Patent No. 5,965,704; an IL-10R subunit, such as IL-10R $\alpha$ ; or a zcytor7 soluble receptor subunit, disclosed in the commonly owned US Patent No. 5,945,511. The zcytor11 receptor in conjunction with CRF2-4 and IL-10 Receptor was shown to signal JAK-STAT pathway in response to IL-TIF (Xie et al., *supra*; Kotenko et al., *supra*). According to the present invention, in addition to a monomeric or homodimeric mouse Zcytor16 receptor polypeptide, a heterodimeric soluble mouse Zcytor16 receptor, as exemplified by an embodiment comprising a soluble mouse Zcytor16 receptor + soluble CRF2-4 receptor heterodimer (mouse Zcytor16/ CRF2-4), can act as an antagonist of the IL-TIF. Other embodiments include soluble heterodimers comprising mouse Zcytor16/ IL-10R, mouse Zcytor16/IL-9R, mouse Zcytor16/zcytor11, mouse Zcytor16/zcytor7, and other class II receptor subunits, as

WO 02/070655

PCT/US02/06267

107

well as multimeric receptors including but not limited to mouse Zcytor16/CRF2-4/zcytor11 or mouse Zcytor16/CRF2-4/IL-10R.

Analysis of the tissue distribution of the mRNA corresponding mouse Zcytor16 cDNA was similar to human Zcytor16 tissue distribution (US Patent Application No. 09/728,911), and showed that mRNA was expressed in placenta and spleen, and the ligand to which Zcytor16 binds (IL-TIF) is implicated in inducing inflammatory response including induction of the acute-phase response (Dumoutier, L. et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci.* 97:10144-10149, 2000). Thus, particular embodiments of the present invention are directed toward use of soluble mouse Zcytor16 heterodimers as antagonists in inflammatory and immune diseases or conditions such as pancreatitis, type I diabetes (IDDM), pancreatic cancer, pancreatitis, Graves Disease, inflammatory bowel disease (IBD), Crohn's Disease, colon and intestinal cancer, diverticulosis, autoimmune disease, sepsis, organ or bone marrow transplant; inflammation due to trauma, surgery or infection; amyloidosis; splenomegaly; graft versus host disease; and where inhibition of inflammation, immune suppression, reduction of proliferation of hematopoietic, immune, inflammatory or lymphoid cells, macrophages, T-cells (including Th1 and Th2 cells), suppression of immune response to a pathogen or antigen, or other instances where inhibition of IL-TIF or IL-9 cytokine production is desired.

Moreover, antibodies or binding polypeptides that bind mouse Zcytor16 polypeptides, monomers, homodimers, heterodimers and multimers described herein and/or mouse Zcytor16 polypeptides, monomers, homodimers, heterodimers and multimers themselves are useful to:

1) Antagonize or block signaling via the IL-TIF receptors in the treatment of acute inflammation, inflammation as a result of trauma, tissue injury, surgery, sepsis or infection, and chronic inflammatory diseases such as asthma, inflammatory bowel disease (IBD), chronic colitis, splenomegaly, rheumatoid arthritis, recurrent acute inflammatory episodes (e.g., tuberculosis), and treatment of amyloidosis, and atherosclerosis, Castleman's Disease, asthma, and other diseases associated with the induction of acute-phase response.

2) Antagonize or block signaling via the IL-TIF receptors in the treatment of autoimmune diseases such as IDDM, multiple sclerosis (MS), systemic Lupus erythematosus (SLE), myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, and IBD to prevent or inhibit signaling in immune cells (e.g. lymphocytes, monocytes, leukocytes) via mouse Zcytor16 (Hughes C et al., *J. Immunol.* 153: 3319-3325, 1994). Alternatively, antibodies, such as monoclonal antibodies (MAb) to mouse Zcytor16-comprising receptors, can also be used as an antagonist to deplete unwanted immune cells to treat autoimmune disease. Asthma, allergy and other atopic disease may be treated with an MAb against, for example, soluble mouse Zcytor16 soluble receptors or mouse Zcytor16/CRF2-4 heterodimers, to inhibit the immune response or to deplete offending cells. Blocking or inhibiting signaling via Zcytor16, using the polypeptides and antibodies of the present invention, may also benefit diseases of the pancreas, kidney, pituitary and neuronal cells. IDDM, NIDDM, pancreatitis, and pancreatic carcinoma may benefit. Mouse Zcytor16 may serve as a target for MAb therapy of cancer where an antagonizing MAb inhibits cancer growth and targets immune-mediated killing. (Holliger P, and Hoogenboom, H: *Nature Biotech.* 16: 1015-1016, 1998). Mabs to soluble mouse Zcytor16 monomers, homodimers, heterodimers and multimers may also be useful to treat nephropathies such as glomerulosclerosis, membranous neuropathy, amyloidosis (which also affects the kidney among other tissues), renal arteriosclerosis, glomerulonephritis of various origins, fibroproliferative diseases of the kidney, as well as kidney dysfunction associated with SLE, IDDM, type II diabetes (NIDDM), renal tumors and other diseases.

3) Agonize or initiate signaling via the IL-TIF receptors in the treatment of autoimmune diseases such as IDDM, MS, SLE, myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, and IBD. Anti-soluble mouse Zcytor16, anti-soluble mouse Zcytor16/CRF2-4 heterodimers and multimer monoclonal antibodies may signal lymphocytes or other immune cells to differentiate, alter proliferation, or change production of cytokines or cell surface proteins that ameliorate autoimmunity. Specifically, modulation of a T-helper cell response to an alternate pattern of cytokine secretion may deviate an autoimmune response to ameliorate disease (Smith JA et al., *J. Immunol.* 160:4841-4849, 1998). Similarly, agonistic Anti-soluble mouse Zcytor16, anti-soluble mouse

WO 02/070655

PCT/US02/06267

109

Zcytor16/CRF2-4 heterodimers and multimer monoclonal antibodies may be used to signal, deplete and deviate immune cells involved in asthma, allergy and atopic disease. Signaling via mouse Zcytor16 may also benefit diseases of the pancreas, kidney, pituitary and neuronal cells. IDDM, NIDDM, pancreatitis, and pancreatic carcinoma may benefit. mouse Zcytor16 may serve as a target for MAb therapy of pancreatic cancer where a signaling MAb inhibits cancer growth and targets immune-mediated killing (Tutt, AL et al., *J Immunol.* **161**: 3175-3185, 1998). Similarly renal cell carcinoma may be treated with monoclonal antibodies to mouse Zcytor16-comprising soluble receptors of the present invention.

Soluble mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric polypeptides described herein can be used to neutralize/block IL-TIF activity in the treatment of autoimmune disease, atopic disease, NIDDM, pancreatitis and kidney dysfunction as described above. A soluble form of mouse Zcytor16 may be used to promote an antibody response mediated by Th cells and/or to promote the production of IL-4 or other cytokines by lymphocytes or other immune cells.

The soluble mouse Zcytor16-comprising receptors of the present invention are useful as antagonists of the IL-TIF cytokine. Such antagonistic effects can be achieved by direct neutralization or binding of the IL-TIF. In addition to antagonistic uses, the soluble receptors of the present invention can bind IL-TIF and act as carrier proteins for the IL-TIF cytokine, in order to transport the Ligand to different tissues, organs, and cells within the body. As such, the soluble receptors of the present invention can be fused or coupled to molecules, polypeptides or chemical moieties that direct the soluble-receptor-Ligand complex to a specific site, such as a tissue, specific immune cell, or tumor. For example, in acute infection or some cancers, benefit may result from induction of inflammation and local acute phase response proteins by the action of IL-TIF. Thus, the soluble receptors of the present invention can be used to specifically direct the action of the IL-TIF. See, Cosman, D. *Cytokine* **5**: 95-106, 1993; and Fernandez-Botran, R. *Exp. Opin. Invest. Drugs* **9**:497-513, 2000.

Moreover, the soluble receptors of the present invention can be used to stabilize the IL-TIF, to increase the bioavailability, therapeutic longevity, and/or efficacy of the Ligand by stabilizing the Ligand from degradation or clearance, or by

WO 02/070655

PCT/US02/06267

110

targeting the ligand to a site of action within the body. For example the naturally occurring IL-6/soluble IL-6R complex stabilizes IL-6 and can signal through the gp130 receptor. See, Cosman, D. supra., and Fernandez-Botran, R. supra. Moreover, mouse Zcytor16 may be combined with a cognate ligand such as IL-TIF to comprise a

5 ligand/soluble receptor complex. Such complexes may be used to stimulate responses from cells presenting a companion receptor subunit such as, for example, zcytor11 or CRF2-4. The cell specificity of mouse Zcytor16/ligand complexes may differ from that seen for the ligand administered alone. Furthermore the complexes may have distinct pharmacokinetic properties such as affecting half-life, dose/response and organ or tissue

10 specificity. ZcytoR16/IL-TIF complexes thus may have agonist activity to enhance an immune response or stimulate mesangial cells or to stimulate hepatic cells. Alternatively only tissues expressing a signaling subunit the heterodimerizes with the complex may be affected analogous to the response to IL6/IL6R complexes (Hirota H. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. 92:4862-4866, 1995; Hirano, T. in Thomason, A. (Ed.)

15 "The Cytokine Handbook", 3<sup>rd</sup> Ed., p. 208-209). Soluble receptor/cytokine complexes for IL12 and CNTF display similar activities.

Mouse Zcytor16 homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor polypeptides may also be used within diagnostic systems for the detection of circulating levels of IL-TIF ligand, and in the detection of IL-TIF associated with acute phase

20 inflammatory response. Within a related embodiment, antibodies or other agents that bind to mouse Zcytor16 soluble receptors of the present invention can be used to detect circulating receptor polypeptides; conversely, mouse Zcytor16 soluble receptors themselves can be used to detect circulating or locally-acting IL-TIF polypeptides. Elevated or depressed levels of ligand or receptor polypeptides may be indicative of

25 pathological conditions, including inflammation or cancer. IL-TIF is known to induce associated acute phase inflammatory response. Moreover, detection of acute phase proteins or molecules such as IL-TIF can be indicative of a chronic inflammatory condition in certain disease states (e.g., rheumatoid arthritis). Detection of such conditions serves to aid in disease diagnosis as well as help a physician in choosing

30 proper therapy.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

111

Moreover, soluble mouse Zcytor16 receptor polypeptides of the present invention can be used as a "ligand sink," i.e., antagonist, to bind ligand *in vivo* or *in vitro* in therapeutic or other applications where the presence of the ligand is not desired. For example, in chronic inflammatory conditions or cancers that are expressing large amounts of bioactive IL-TIF, soluble mouse Zcytor16 receptor or soluble mouse Zcytor16 heterodimeric and multimeric receptor polypeptides, such as soluble mouse Zcytor16/CRF2-4 can be used as a direct antagonist of the ligand *in vivo*, and may aid in reducing progression and symptoms associated with the disease, and can be used in conjunction with other therapies (e.g., steroid or chemotherapy) to enhance the effect of the therapy in reducing progression and symptoms, and preventing relapse. Moreover, soluble mouse Zcytor16 receptor polypeptides can be used to slow the progression of cancers that over-express Zcytor16 receptors, by binding ligand *in vivo* that could otherwise enhance proliferation of those cancers.

Moreover, soluble mouse Zcytor16 receptor polypeptides of the present invention can be used *in vivo* or in diagnostic applications to detect IL-TIF-expressing inflammation or cancers *in vivo* or in tissue samples. For example, the soluble mouse Zcytor16 receptors of the present invention can be conjugated to a radio-label or fluorescent label as described herein, and used to detect the presence of the IL-TIF in a tissue sample using an *in vitro* ligand-receptor type binding assay, or fluorescent imaging assay. Moreover, radiolabeled soluble mouse Zcytor16 receptors of the present invention could be administered *in vivo* to detect Ligand-expressing solid tumors through a radio-imaging method known in the art.

Generally, the dosage of administered mouse Zcytor16 (or mouse Zcytor16 analog or fusion protein) will vary depending upon such factors as the patient's age, weight, height, sex, general medical condition and previous medical history. Typically, it is desirable to provide the recipient with a dosage of mouse Zcytor16 polypeptide which is in the range of from about 1 pg/kg to 10 mg/kg (amount of agent/body weight of patient), although a lower or higher dosage also may be administered as circumstances dictate.

Administration of a mouse Zcytor16 polypeptide to a subject can be intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intrapleural,



WO 02/070655

PCT/US02/06267

112

intrathecal, by perfusion through a regional catheter, or by direct intralesional injection. When administering therapeutic proteins by injection, the administration may be by continuous infusion or by single or multiple boluses.

Additional routes of administration include oral, mucosal-membrane, pulmonary, and transcutaneous. Oral delivery is suitable for polyester microspheres, zein microspheres, proteinoid microspheres, polycyanoacrylate microspheres, and lipid-based systems (see, for example, DiBase and Morrel, "Oral Delivery of Microencapsulated Proteins," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 255-288 (Plenum Press 1997)). The feasibility of an intranasal delivery is exemplified by such a mode of insulin administration (see, for example, Hinchcliffe and Illum, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:199 (1999)). Dry or liquid particles comprising mouse Zcytor16 can be prepared and inhaled with the aid of dry-powder dispersers, liquid aerosol generators, or nebulizers (e.g., Pettit and Gombotz, *TIBTECH* 16:343 (1998); Patton *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 35:235 (1999)). This approach is illustrated by the AERX diabetes management system, which is a hand-held electronic inhaler that delivers aerosolized insulin into the lungs. Studies have shown that proteins as large as 48,000 kDa have been delivered across skin at therapeutic concentrations with the aid of low-frequency ultrasound, which illustrates the feasibility of transcutaneous administration (Mitragotri *et al.*, *Science* 269:850 (1995)). Transdermal delivery using electroporation provides another means to administer a molecule having mouse Zcytor16 binding activity (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

A pharmaceutical composition comprising a protein, polypeptide, or peptide having mouse Zcytor16 binding activity can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby the therapeutic proteins are combined in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier. A composition is said to be a "pharmaceutically acceptable carrier" if its administration can be tolerated by a recipient patient. Sterile phosphate-buffered saline is one example of a pharmaceutically acceptable carrier. Other suitable carriers are well-known to those in the art. See, for example, Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

113

For purposes of therapy, molecules having mouse Zcytor16 binding activity and a pharmaceutically acceptable carrier are administered to a patient in a therapeutically effective amount. A combination of a protein, polypeptide, or peptide having mouse Zcytor16 binding activity and a pharmaceutically acceptable carrier is said to be administered in a "therapeutically effective amount" if the amount administered is physiologically significant. An agent is physiologically significant if its presence results in a detectable change in the physiology of a recipient patient. For example, an agent used to treat inflammation is physiologically significant if its presence alleviates the inflammatory response.

A pharmaceutical composition comprising mouse Zcytor16 (or mouse Zcytor16 analog or fusion protein) can be furnished in liquid form, in an aerosol, or in solid form. Liquid forms, are illustrated by injectable solutions and oral suspensions. Exemplary solid forms include capsules, tablets, and controlled-release forms. The latter form is illustrated by miniosmotic pumps and implants (Bremer *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:239 (1997); Ranade, "Implants in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 95-123 (CRC Press 1995); Bremer *et al.*, "Protein Delivery with Infusion Pumps," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 239-254 (Plenum Press 1997); Yewey *et al.*, "Delivery of Proteins from a Controlled Release Injectable Implant," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 93-117 (Plenum Press 1997)).

Liposomes provide one means to deliver therapeutic polypeptides to a subject intravenously, intraperitoneally, intrathecally, intramuscularly, subcutaneously, or via oral administration, inhalation, or intranasal administration. Liposomes are microscopic vesicles that consist of one or more lipid bilayers surrounding aqueous compartments (see, generally, Bakker-Woudenberg *et al.*, *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 12 (Suppl. 1):S61 (1993), Kim, *Drugs* 46:618 (1993), and Ranade, "Site-Specific Drug Delivery Using Liposomes as Carriers," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)). Liposomes are similar in composition to cellular membranes and as a result, liposomes can be administered safely and are biodegradable. Depending on the method of preparation, liposomes may

WO 02/070655

PCT/US02/06267

114

be unilamellar or multilamellar, and liposomes can vary in size with diameters ranging from 0.02  $\mu\text{m}$  to greater than 10  $\mu\text{m}$ . A variety of agents can be encapsulated in liposomes: hydrophobic agents partition in the bilayers and hydrophilic agents partition within the inner aqueous space(s) (see, for example, Machy *et al.*, *Liposomes In Cell*  
5 *Biology And Pharmacology* (John Libbey 1987), and Ostro *et al.*, *American J. Hosp. Pharm.* 46:1576 (1989)). Moreover, it is possible to control the therapeutic availability of the encapsulated agent by varying liposome size, the number of bilayers, lipid composition, as well as the charge and surface characteristics of the liposomes.

Liposomes can adsorb to virtually any type of cell and then slowly  
10 release the encapsulated agent. Alternatively, an absorbed liposome may be endocytosed by cells that are phagocytic. Endocytosis is followed by intralysosomal degradation of liposomal lipids and release of the encapsulated agents (Scherphof *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 446:368 (1985)). After intravenous administration, small liposomes (0.1 to 1.0  $\mu\text{m}$ ) are typically taken up by cells of the reticuloendothelial  
15 system, located principally in the liver and spleen, whereas liposomes larger than 3.0  $\mu\text{m}$  are deposited in the lung. This preferential uptake of smaller liposomes by the cells of the reticuloendothelial system has been used to deliver chemotherapeutic agents to macrophages and to tumors of the liver.

The reticuloendothelial system can be circumvented by several methods  
20 including saturation with large doses of liposome particles, or selective macrophage inactivation by pharmacological means (Claassen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 802:428 (1984)). In addition, incorporation of glycolipid- or polyethylene glycol-derivatized phospholipids into liposome membranes has been shown to result in a significantly reduced uptake by the reticuloendothelial system (Allen *et al.*, *Biochim.*  
25 *Biophys. Acta* 1068:133 (1991); Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Liposomes can also be prepared to target particular cells or organs by varying phospholipid composition or by inserting receptors or ligands into the liposomes. For example, liposomes, prepared with a high content of a nonionic surfactant, have been used to target the liver (Hayakawa *et al.*, Japanese Patent 04-  
30 244,018; Kato *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). These formulations were prepared by mixing soybean phosphatidylcholine,  $\alpha$ -tocopherol, and ethoxylated

WO 02/070655

PCT/US02/06267

115

hydrogenated castor oil (HCO-60) in methanol, concentrating the mixture under vacuum, and then reconstituting the mixture with water. A liposomal formulation of dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC) with a soybean-derived sterylglucoside mixture (SG) and cholesterol (Ch) has also been shown to target the liver (Shimizu *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:881 (1997)).

Alternatively, various targeting ligands can be bound to the surface of the liposome, such as antibodies, antibody fragments, carbohydrates, vitamins, and transport proteins. For example, liposomes can be modified with branched type galactosyllipid derivatives to target asialoglycoprotein (galactose) receptors, which are exclusively expressed on the surface of liver cells (Kato and Sugiyama, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 14:287 (1997); Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Similarly, Wu *et al.*, *Hepatology* 27:772 (1998), have shown that labeling liposomes with asialofetuin led to a shortened liposome plasma half-life and greatly enhanced uptake of asialofetuin-labeled liposome by hepatocytes. On the other hand, hepatic accumulation of liposomes comprising branched type galactosyllipid derivatives can be inhibited by preinjection of asialofetuin (Murahashi *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 20:259 (1997)). Polyacetylated human serum albumin liposomes provide another approach for targeting liposomes to liver cells (Kamps *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 94:11681 (1997)). Moreover, Geho, *et al.* U.S. Patent No. 4,603,044, describe a hepatocyte-directed liposome vesicle delivery system, which has specificity for hepatobiliary receptors associated with the specialized metabolic cells of the liver.

In a more general approach to tissue targeting, target cells are prelabeled with biotinylated antibodies specific for a ligand expressed by the target cell (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)). After plasma elimination of free antibody, streptavidin-conjugated liposomes are administered. In another approach, targeting antibodies are directly attached to liposomes (Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998)).

Polypeptides having mouse Zcytor16 binding activity can be encapsulated within liposomes using standard techniques of protein microencapsulation (see, for example, Anderson *et al.*, *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Anderson *et al.*, *Cancer Res.* 50:1853 (1990), and Cohen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1063:95 (1991),

Alving *et al.* "Preparation and Use of Liposomes in Immunological Studies," in *Liposome Technology*, 2nd Edition, Vol. III, Gregoriadis (ed.), page 317 (CRC Press 1993), Wassef *et al.*, *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). As noted above, therapeutically useful liposomes may contain a variety of components. For example, liposomes may  
5 comprise lipid derivatives of poly(ethylene glycol) (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

Degradable polymer microspheres have been designed to maintain high systemic levels of therapeutic proteins. Microspheres are prepared from degradable polymers such as poly(lactide-co-glycolide) (PLG), polyanhydrides, poly (ortho esters), nonbiodegradable ethylvinyl acetate polymers, in which proteins are entrapped in the polymer (Gombotz and Pettit, *Bioconjugate Chem.* 6:332 (1995); Ranade, "Role of  
10 Polymers in Drug Delivery," in *Drug Delivery Systems*, Ranade and Hollinger (eds.), pages 51-93 (CRC Press 1995); Roskos and Maskiewicz, "Degradable Controlled Release Systems Useful for Protein Delivery," in *Protein Delivery: Physical Systems*, Sanders and Hendren (eds.), pages 45-92 (Plenum Press 1997); Bartus *et al.*, *Science* 281:1161 (1998); Putney and Burke, *Nature Biotechnology* 16:153 (1998); Putney, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:548 (1998)). Polyethylene glycol (PEG)-coated nanospheres can also provide carriers for intravenous administration of therapeutic proteins (see, for example, Gref *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:167 (1997)).

The present invention also contemplates chemically modified polypeptides having binding mouse Zcytor16 activity such as mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptors, and mouse Zcytor16 antagonists, for example anti-mouse Zcytor16 antibodies or binding polypeptides, which a polypeptide is linked with a polymer, as discussed above.

Other dosage forms can be devised by those skilled in the art, as shown, for example, by Ansel and Popovich, *Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems*, 5<sup>th</sup> Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19<sup>th</sup> Edition (Mack Publishing Company 1995), and by Ranade and Hollinger, *Drug Delivery Systems* (CRC Press 1996).

As an illustration, pharmaceutical compositions may be supplied as a kit comprising a container that comprises a polypeptide with a mouse Zcytor16

WO 02/070655

PCT/US02/06267

117

extracellular domain, e.g., mouse Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptors, or a mouse Zcytor16 antagonist (e.g., an antibody or antibody fragment that binds a mouse Zcytor16 polypeptide). Therapeutic polypeptides can be provided in the form of an injectable solution for single or multiple doses, or as a sterile powder that will be reconstituted before injection. Alternatively, such a kit can include a dry-powder disperser, liquid aerosol generator, or nebulizer for administration of a therapeutic polypeptide. Such a kit may further comprise written information on indications and usage of the pharmaceutical composition. Moreover, such information may include a statement that the mouse Zcytor16 composition is contraindicated in patients with known hypersensitivity to mouse Zcytor16.

Polynucleotides and polypeptides of the present invention will additionally find use as educational tools as a laboratory practicum kits for courses related to genetics and molecular biology, protein chemistry and antibody production and analysis. Due to its unique polynucleotide and polypeptide sequence molecules of mouse Zcytor16 can be used as standards or as "unknowns" for testing purposes. For example, mouse Zcytor16 polynucleotides can be used as an aid, such as, for example, to teach a student how to prepare expression constructs for bacterial, viral, and/or mammalian expression, including fusion constructs, wherein mouse Zcytor16 is the gene to be expressed; for determining the restriction endonuclease cleavage sites of the polynucleotides; determining mRNA and DNA localization of mouse Zcytor16 polynucleotides in tissues (i.e., by Northern and Southern blotting as well as polymerase chain reaction); and for identifying related polynucleotides and polypeptides by nucleic acid hybridization.

Mouse Zcytor16 polypeptides can be used educationally as an aid to teach preparation of antibodies; identifying proteins by Western blotting; protein purification; determining the weight of expressed mouse Zcytor16 polypeptides as a ratio to total protein expressed; identifying peptide cleavage sites; coupling amino and carboxyl terminal tags; amino acid sequence analysis, as well as, but not limited to monitoring biological activities of both the native and tagged protein (i.e., receptor binding, signal transduction, proliferation, and differentiation) *in vitro* and *in vivo*. mouse Zcytor16 polypeptides can also be used to teach analytical skills such as mass

WO 02/070655

PCT/US02/06267

118

spectrometry, circular dichroism to determine conformation, especially of the four alpha helices, x-ray crystallography to determine the three-dimensional structure in atomic detail, nuclear magnetic resonance spectroscopy to reveal the structure of proteins in solution. For example, a kit containing the mouse Zcytor16 can be given to the student  
5 to analyze. Since the amino acid sequence would be known by the professor, the specific protein can be given to the student as a test to determine the skills or develop the skills of the student, the teacher would then know whether or not the student has correctly analyzed the polypeptide. Since every polypeptide is unique, the educational utility of mouse Zcytor16 would be unique unto itself.

10 Moreover, since mouse Zcytor16 has a tissue-specific expression and is a polypeptide with a class II cytokine receptor structure and a distinct expression pattern, activity can be measured using proliferation assays; luciferase and binding assays described herein. Moreover, expression of mouse Zcytor16 polynucleotides and polypeptides in lymphoid and other tissues can be analyzed in order to train students in  
15 the use of diagnostic and tissue-specific identification and methods. Moreover mouse Zcytor16 polynucleotides can be used to train students on the use of chromosomal detection and diagnostic methods. Such assays are well known in the art, and can be used in an educational setting to teach students about cytokine receptor proteins and examine different properties, such as cellular effects on cells, enzyme kinetics, varying  
20 antibody binding affinities, tissue specificity, and the like, between mouse Zcytor16 and other cytokine receptor polypeptides in the art.

The antibodies which bind specifically to mouse Zcytor16 can be used as a teaching aid to instruct students how to prepare affinity chromatography columns to purify mouse Zcytor16, cloning and sequencing the polynucleotide that encodes an  
25 antibody and thus as a practicum for teaching a student how to design humanized antibodies. Moreover, antibodies which bind specifically to mouse Zcytor16 can be used as a teaching aid for use in detection e.g., of activated CD91+ cells, cell sorting, or ovarian cancer tissue using histological, and *in situ* methods amongst others known in the art. The mouse Zcytor16 gene, polypeptide or antibody would then be packaged by  
30 reagent companies and sold to universities and other educational entities so that the students gain skill in art of molecular biology. Because each gene and protein is unique,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

119

each gene and protein creates unique challenges and learning experiences for students in a lab practicum. Such educational kits containing the mouse Zcytor16 gene, polypeptide or antibody are considered within the scope of the present invention.

Within one aspect, the present invention provides an isolated polypeptide, comprising at least 15 contiguous amino acid residues of an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230; (b) amino acid residues 27 to 230; (c) amino acid residues 27 to 126; and (d) amino acid residues 131 to 230. In one embodiment, the isolated polypeptide disclosed above comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230; (b) amino acid residues 27 to 230; (c) amino acid residues 27 to 126; and (d) amino acid residues 131 to 230. In another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above consists of an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230; (b) amino acid residues 27 to 230; (c) amino acid residues 27 to 126; and (d) amino acid residues 131 to 230. In another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above comprises an amino acid sequence that is at least 90% identical to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230; (b) amino acid residues 27 to 230; (c) amino acid residues 27 to 126; and (d) amino acid residues 131 to 230. In another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 24 to 230; (b) amino acid residues 27 to 230; (c) amino acid residues 27 to 126; and (d) amino acid residues 131 to 230.

Within a second aspect, the present invention provides an isolated nucleic acid molecule, wherein the nucleic acid molecule is either (a) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49, or (b) a nucleic acid molecule that remains hybridized following stringent wash conditions to a nucleic acid molecule consisting of the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or the complement of



WO 02/070655

PCT/US02/06267

120

the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47. In one embodiment, the isolated nucleic acid molecule is as disclosed above, wherein any difference between the amino acid sequence encoded by the nucleic acid molecule and the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is due to a conservative amino acid substitution. In another embodiment, the isolated nucleic acid molecule disclosed above comprises the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47.

Within a third aspect, the present invention provides a vector, comprising the isolated nucleic acid molecule as disclosed above.

Within another aspect, the present invention provides an expression vector, comprising the isolated nucleic acid molecule as disclosed above, a transcription promoter, and a transcription terminator, wherein the promoter is operably linked with the nucleic acid molecule, and wherein the nucleic acid molecule is operably linked with the transcription terminator.

Within another aspect, the present invention provides a recombinant host cell comprising the expression vector as disclosed above, wherein the host cell is selected from the group consisting of bacterium, yeast cell, fungal cell, insect cell, mammalian cell, and plant cell.

Within another aspect, the present invention provides a method of producing mouse Zcytor16 protein, the method comprising culturing recombinant host cells that comprise the expression vector as disclosed above, and that produce the mouse Zcytor16 protein. In one embodiment, the method disclosed above further comprises isolating the mouse Zcytor16 protein from the cultured recombinant host cells.

Within another aspect, the present invention provides an antibody or antibody fragment that binds with the polypeptide as disclosed above. In one embodiment, the antibody disclosed above is selected from the group consisting of: (a) polyclonal antibody, (b) murine monoclonal antibody, (c) humanized antibody derived from (b), and (d) human monoclonal antibody.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

121

Within another aspect, the present invention provides an anti-idiotypic antibody that specifically binds with the antibody as disclosed above.

Within another aspect, the present invention provides a fusion protein, comprising the polypeptide as disclosed above. In one embodiment, the fusion protein  
5 disclosed above further comprises an immunoglobulin moiety.

Within another aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues that is at least 90% identical to the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or  
10 27 to 230; and wherein amino acid differences consist of conservative amino acid substitutions; and wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide sequence binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity. In one embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric,  
15 heterodimeric or multimeric receptor complex. In another embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor. In another  
20 embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble  
zytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

Within another aspect, the present invention provides an isolated  
25 polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric  
30 receptor complex. In one embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide further comprises a soluble Class I or Class II cytokine receptor. In

WO 02/070655

PCT/US02/06267

122

another embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34). In another embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further encodes an intracellular domain. In another embodiment, the isolated polynucleotide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further comprises an affinity tag.

Within another aspect, the present invention provides an expression vector comprising the following operably linked elements: (a) a transcription promoter; a first DNA segment encoding a soluble cytokine receptor polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; and a transcription terminator; and (b) a second transcription promoter; a second DNA segment encoding a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide; and a transcription terminator; and wherein the first and second DNA segments are contained within a single expression vector or are contained within independent expression vectors. In one embodiment, the expression vector disclosed above further comprises a secretory signal sequence operably linked to the first and second DNA segments. In another embodiment, the expression vector is as disclosed above, wherein the second DNA segment encodes a polypeptide comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

Within another aspect, the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector as disclosed above, wherein the cell expresses the polypeptides encoded by the DNA segments. In one embodiment, the cultured cell comprising an expression vector is as disclosed above, wherein the first and second DNA segments are located on independent expression vectors and are co-transfected into the cell, and cell expresses the polypeptides encoded by the DNA segments. In another embodiment, the cultured cell comprising an expression vector is as disclosed above, wherein the cell expresses a heterodimeric or multimeric soluble receptor

WO 02/070655

PCT/US02/06267

123

polypeptide encoded by the DNA segments. In another embodiment, the cell disclosed above secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex. In another embodiment, the cell disclosed above secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex that binds IL-TIF or  
5 antagonizes IL-TIF activity.

Within another aspect, the present invention provides a DNA construct encoding a fusion protein comprising: a first DNA segment encoding a polypeptide having a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; and at least one other DNA segment  
10 encoding a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide, wherein the first and other DNA segments are connected in-frame; and wherein the first and other DNA segments encode the fusion protein. In one embodiment, the DNA construct encoding a fusion protein is as disclosed above, wherein at least one other DNA segment encodes a polypeptide comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a  
15 soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zeytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

Within another aspect, the present invention provides an expression vector comprising the following operably linked elements: a transcription promoter; a DNA construct encoding a fusion protein as disclosed above; and a transcription  
20 terminator, wherein the promoter is operably linked to the DNA construct, and the DNA construct is operably linked to the transcription terminator.

Within another aspect, the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector as disclosed above, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA construct.

25 Within another aspect, the present invention provides a method of producing a fusion protein comprising: culturing a cell according as disclosed above; and isolating the polypeptide produced by the cell.

Within another aspect, the present invention provides an isolated soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues that is at  
30 least 90% identical to an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, and wherein the soluble cytokine

WO 02/070655

PCT/US02/06267

124

receptor polypeptide binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity. In one embodiment, the isolated polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex. In another embodiment, the isolated polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble  
5 cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor. In another embodiment, the isolated polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble  
10 IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

Within another aspect, the present invention provides an isolated soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, wherein  
15 the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex. In another embodiment, the isolated polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor. In another embodiment, the isolated polypeptide is as  
20 disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34). In another embodiment, the isolated polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor  
25 polypeptide further comprises an affinity tag, chemical moiety, toxin, or label.

Within another aspect, the present invention provides an isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex comprising soluble receptor subunits, wherein at least one of the soluble receptor subunits comprises a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown  
30 in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230. In one embodiment, the isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex

WO 02/070655

PCT/US02/06267

125

disclosed above further comprises a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide. In another embodiment, the isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex disclosed above further comprises a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or  
5 soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

Within another aspect, the present invention provides a method of producing a soluble cytokine receptor polypeptide that forms a heterodimeric or multimeric complex comprising: culturing a cell as disclosed above; and isolating the soluble receptor polypeptides produced by the cell.

10 Within another aspect, the present invention provides a method of producing an antibody to soluble cytokine receptor polypeptide comprising: inoculating an animal with a soluble cytokine receptor polypeptide selected from the group consisting of: (a) a polypeptide comprising a monomeric or homodimeric soluble cytokine receptor comprising a polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ  
15 ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; (b) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide; (c) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35);  
20 (d) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36); and wherein the polypeptide elicits an immune response in the animal to produce the antibody; and isolating the antibody from the animal.

25 Within another aspect, the present invention provides an antibody produced by the method as disclosed above, which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230. In one embodiment, the antibody disclosed above is a monoclonal antibody.

30 Within another aspect, the present invention provides an antibody which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex as disclosed above.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

126

Within another aspect, the present invention provides a method for inhibiting IL-TIF-induced proliferation or differentiation of hematopoietic cells and hematopoietic cell progenitors comprising culturing bone marrow or peripheral blood cells with a composition comprising an amount of soluble cytokine receptor polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, sufficient to reduce proliferation or differentiation of the hematopoietic cells in the bone marrow or peripheral blood cells as compared to bone marrow or peripheral blood cells cultured in the absence of soluble cytokine receptor. In one embodiment, the method is as disclosed above, wherein the hematopoietic cells and hematopoietic progenitor cells are lymphoid cells. In another embodiment, the method is as disclosed above, wherein the lymphoid cells are macrophages or T cells.

Within another aspect, the present invention provides a method of reducing IL-TIF-induced or IL-9 induced inflammation comprising administering to a mammal with inflammation an amount of a composition of a polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230 sufficient to reduce inflammation.

Within another aspect, the present invention provides a method of suppressing an inflammatory response in a mammal with inflammation comprising: (1) determining a level of serum amyloid A protein; (2) administering a composition comprising a soluble mouse Zcytor16 cytokine receptor polypeptide as disclosed above in an acceptable pharmaceutical vehicle; (3) determining a post administration level of serum amyloid A protein; (4) comparing the level of serum amyloid A protein in step (1) to the level of serum amyloid A protein in step (3), wherein a lack of increase or a decrease in serum amyloid A protein level is indicative of suppressing an inflammatory response.

Within another aspect, the present invention provides a method for detecting a cancer in a patient, comprising: obtaining a tissue or biological sample from a patient; incubating the tissue or biological sample with an antibody as disclosed above under conditions wherein the antibody binds to its complementary polypeptide in the tissue or biological sample; visualizing the antibody bound in the tissue or biological sample; and comparing levels of antibody bound in the tissue or biological sample from

WO 02/070655

PCT/US02/06267

127

the patient to a normal control tissue or biological sample, wherein an increase in the level of antibody bound to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

Within another aspect, the present invention provides a method for  
5 detecting a cancer in a patient, comprising: obtaining a tissue or biological sample from a patient; labeling a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 or the complement of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47; incubating the tissue or biological sample with under conditions wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence; visualizing  
10 the labeled polynucleotide in the tissue or biological sample; and comparing the level of labeled polynucleotide hybridization in the tissue or biological sample from the patient to a normal control tissue or biological sample, wherein an increase in the labeled polynucleotide hybridization to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

Within another aspect, the present invention provides a transgenic  
15 mouse, wherein the mouse over-expresses residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48. In one embodiment, the transgenic mouse is as disclosed above, wherein the expression of residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is expressed using a tissue-specific or tissue-restricted promoter. In another embodiment, the transgenic mouse is as disclosed  
20 above, wherein the expression of residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is expressed using an epithelial-specific, colon-specific, or ovary-specific promoter. In another embodiment, the transgenic mouse is as disclosed above, wherein the mouse does not express residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to  
25 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, relative to a normal mouse.

The invention is further illustrated by the following non-limiting examples.



WO 02/070655

PCT/US02/06267

128

## EXAMPLES

Example 1Cloning of mouse Zcytor16 and Construction of Mammalian Expression Vectors That

5        Express human and mouse Zcytor16 Soluble Receptors: Zcytor16CEE.

Zcytor16CFLG, Zcytor16CHIS and Zcytor16-Fc4A. Cloning of mouse Zcytor16 Extracellular domain

10        A mouse ortholog of human Zcytor16 (US Patent Application No. 09/728,911) was identified and designated "mouse Zcytor16." The polynucleotide sequence of the mouse Zcytor16 clone is shown in SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:47 and polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:38 and SEQ ID NO:48 respectively.

B. Mammalian Expression Construction of Soluble Zcytor16 receptor Zcytor16-Fc4Construction of mammalian expression vectors that express Zcytor16 soluble receptor Zcytor16sR/Fc4

15        An expression vector was prepared to express the soluble human Zcytor16 polypeptide (Zcytor16sR, i.e., from residue 22 (Thr) to residue 231 (Pro) of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:13) fused to a C-terminal Fc4 tag (SEQ ID NO:5).

20        A PCR generated Zcytor16 DNA fragment of about 630 bp was created using oligo ZC29,181 (SEQ ID NO:6) and oligo ZC29,182 (SEQ ID NO:7) as PCR primers to add BamHI and BglII restriction sites at 5' and 3' ends respectively, of the Zcytor16 DNA encoding the soluble receptor. A plasmid containing the Zcytor16 cDNA (SEQ ID NO:1) (Example 1A) was used as a template. PCR amplification of the Zcytor16 fragment was performed as follows: One cycle at 94°C for 1 minute; 25 cycles at 94°C for 30 seconds, 68°C for 90 seconds, followed by an additional 68°C incubation  
25        for 4 minutes, and hold at 10°C. The reaction was purified by chloroform/phenol extraction and isopropanol precipitation, and digested with BamHI and BglII (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). A band of approximately 630 bp, as visualized by 1% agarose gel electrophoresis, was excised and the DNA was purified using a QiaexII™ purification kit (Qiagen, Valencia, CA) according to the  
30        manufacturer's instruction.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

129

The Fc4/pzmp20 plasmid is a mammalian expression vector containing an expression cassette having the CMV promoter, human tPA leader peptide, multiple restriction sites for insertion of coding sequences, a Fc4 tag, and a human growth hormone terminator. The plasmid also has an *E. coli* origin of replication, a mammalian selecttable marker expression unit having an SV40 promoter, an enhancer and an origin of replication, as well as a DHFR gene, and SV40 terminator. The Zcytor16sR/Fc4/pzmp20 expression vector uses the human tPA leader peptide (SEQ ID NO:8 and SEQ ID NO:9) and attaches the Fc4 tag (SEQ ID NO:5) to the C-terminus of the extracellular portion of the Zcytor16 polypeptide sequence. Fc4 is the Fc region derived from human IgG, which contains a mutation so that it no longer binds the Fc receptor

About 30 ng of the restriction digested Zcytor16sR insert and about 10 ng of the digested vector (which had been cut with Bgl2) were ligated at 11°C overnight. One microliter of ligation reaction was electroporated into DH10B competent cells (Gibco BRL, Rockville, MD) according to manufacturer's direction and plated onto LB plates containing 50 mg/ml ampicillin, and incubated overnight. Colonies were screened by restriction analysis of DNA, which was prepared from 2 ml liquid cultures of individual colonies. The insert sequence of positive clones was verified by sequence analysis. A large-scale plasmid preparation was done using a Qiagen® Mega prep kit (Qiagen) according to manufacturer's instruction.

Similar methods are used to prepare mouse Zcytor16-Fc4 fusions, and Fc4 fusions of non-Zcytor16 subunits of heterodimeric and multimeric receptors, such as CRF2-4 and IL-10R tagged with Fc4.

#### C. Construction of Zcytor16 Mammalian Expression Vector containing Zcytor16CEE, Zcytor16CFLG and Zcytor16CHIS

An expression vector is prepared for the expression of the soluble, extracellular domain of the Zcytor16 polypeptide (e.g., amino acids 22-231 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:13; or amino acids 24-230 or SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48), pC4Zcytor16CEE, wherein the construct is designed to express a Zcytor16 polypeptide

WO 02/070655

PCT/US02/06267

130

comprised of the predicted initiating methionine and truncated adjacent to the predicted transmembrane domain, and with a C-terminal Glu-Glu tag (SEQ ID NO:10).

5 A Zcytor16 DNA fragment comprising the Zcytor16 extracellular cytokine binding domain is created using PCR, and purified. The excised DNA is subcloned into a plasmid expression vector that has a signal peptide, e.g., the native Zcytor16 signal peptide, tPA leader, and attaches a Glu-Glu tag (SEQ ID NO:10) to the C-terminus of the Zcytor16 polypeptide-encoding polynucleotide sequence. Such an expression vector mammalian expression vector contains an expression cassette having a mammalian promoter, multiple restriction sites for insertion of coding sequences, a stop codon and a mammalian terminator. The plasmid can also have an *E. coli* origin of replication, a mammalian selectable marker expression unit having an SV40 promoter, enhancer and origin of replication, a DHFR gene and the SV40 terminator.

10 Restriction digested Zcytor16 insert and previously digested vector are ligated using standard molecular biological techniques, and electroporated into competent cells such as DH10B competent cells (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) according to manufacturer's direction and plated onto LB plates containing 50 mg/ml ampicillin, and incubated overnight. Colonies are screened by restriction analysis of DNA prepared from individual colonies. The insert sequence of positive clones is verified by sequence analysis. A large-scale plasmid preparation is done using a

20 QIAGEN® Maxi prep kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

The same process is used to prepare mouse Zcytor16 soluble homodimeric, heterodimeric or multimeric receptors (including non-Zcytor16 soluble receptor subunits, such as, soluble CRF2-4 or IL-10R), or soluble receptors with a C-terminal HIS tag, composed of 6 His residues in a row (SEQ ID NO:12); and a C-terminal FLAG (SEQ ID NO:11) tag, Zcytor16CFLAG. To construct these constructs, the aforementioned vector has either the HIS or the FLAG® tag in place of the glu-glu tag (SEQ ID NO:10).

25

WO 02/070655

PCT/US02/06267

131

Example 2Transfection And Expression of Soluble Receptor Polypeptides

The day before the transfection, BHK 570 cells (ATCC No. CRL-10314; ATCC, Manassas, VA) were plated in a 10-cm plate with 50% confluence in normal BHK DMEM (Gibco/BRL High Glucose) media. The day of the transfection, the cells were washed once with Serum Free (SF) DMEM, followed by transfection with the Zcytor16sR/Fc4/pzmp20 expression plasmids. Sixteen micrograms of human Zcytor16sR-Fc4 DNA construct (Example 1B) were diluted into a total final volume of 640µl SF DMEM. A diluted LipofectAMINE™ (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) mixture (35µl LipofectAMINE™ in 605 µl SF media) was added to the DNA mix, and incubated for 30 minutes at room temperature. Five milliliters of SF media was added to the DNA/LipofectAMINE™ mixture, which was then added to BHK cells. The cells were incubated at 37°C/5% CO<sub>2</sub> for 5 hours, after which 6.4ml of BHK media with 10% FBS was added. The cells were incubated overnight at 37°C/5% CO<sub>2</sub>.

Approximately 24 hours post-transfection, the BHK cells were split into selection media with 1µM methotrexate (MTX). The cells were repeatedly split in this manner until stable Zcytor16sR-Fc4/BHK cell lines were identified. To detect the expression level of the Zcytor16 soluble receptor fusion proteins, the transfected BHK cells were washed with PBS and incubated in SF media for 72 hours. The SF condition media was collected and 20 µl of the sample was run on 10% SDS-PAGE gel under reduced conditions. The protein bands were transferred to nitrocellulose filter by Western blot, and the fusion proteins were detected using goat-anti-human IgG/HRP conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc, West Grove, PA). An expression vector containing a different soluble receptor fused to the Fc4 was used as a control. The expression level of the stable Zcytor16sR-Fc4/BHK cells was approximately 2 mg/L.

For protein purification, the transfected BHK cells were transferred into T-162 flasks. Once the cells reached about 80% confluence, they were washed with PBS and incubated in 100ml SF media for 72 hours, and then the condition media was collected for protein purification (Example 11).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

132

Using the above methods, mouse Zcytor16 soluble receptor fusion proteins are similarly expressed.

### Example 3

#### Expression of Zcytor16 Soluble Receptor in *E. coli*

#### 5 A. Construction of expression vector pCZR225 that expresses huZcytor16/MBP-6H fusion polypeptide

An expression plasmid containing a polynucleotide encoding a Zcytor16 soluble receptor fused C-terminally to maltose binding protein (MBP) is constructed via homologous recombination. The fusion polypeptide contains an N-terminal  
10 approximately 388 amino acid MBP portion fused to the human Zcytor16 soluble receptor (e.g., SEQ ID NO:13; or for the mouse Zcytor16, amino acids 24 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48). A fragment of Zcytor16 cDNA (SEQ ID NO:1; or SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47) is isolated using PCR as described herein. Two primers are used in the production of the Zcytor16 fragment in a standard PCR reaction:  
15 (1) one containing about 40 bp of the vector flanking sequence and about 25 bp corresponding to the amino terminus of the Zcytor16, and (2) another containing about 40 bp of the 3' end corresponding to the flanking vector sequence and about 25 bp corresponding to the carboxyl terminus of the Zcytor16. Two  $\mu$ l of the 100  $\mu$ l PCR reaction is run on a 1.0% agarose gel with 1 x TBE buffer for analysis, and the expected  
20 approximately fragment is seen. The remaining PCR reaction is combined with the second PCR tube and precipitated with 400  $\mu$ l of absolute ethanol. The precipitated DNA used for recombining into an appropriately restriction digested recipient vector pTAP98 to produce the construct encoding the MBP-Zcytor16 fusion, as described below.

25 Plasmid pTAP98 is derived from the plasmids pRS316 and pMAL-c2. The plasmid pRS316 is a *Saccharomyces cerevisiae* shuttle vector (Hieter P. and Sikorski, R., Genetics 122:19-27, 1989). pMAL-C2 (NEB) is an *E. coli* expression plasmid. It carries the tac promoter driving *MalE* (gene encoding MBP) followed by a His tag, a thrombin cleavage site, a cloning site, and the *rrnB* terminator. The vector  
30 pTAP98 is constructed using yeast homologous recombination. 100ng of EcoRI cut

WO 02/070655

PCT/US02/06267

133

pMAL-c2 is recombined with 1µg PvuI cut pRS316, 1µg linker, and 1µg ScaI/EcoRI cut pRS316 are combined in a PCR reaction. PCR products are concentrated via 100% ethanol precipitation.

Competent yeast cells (*S. cerevisiae*) are combined with about 10 µl of a mixture containing approximately 1 µg of the Zcytor16 receptor PCR product above, and 100 ng of digested pTAP98 vector, and electroporated using standard methods and plated onto URA-D plates and incubated at 30°C.

After about 48 hours, the Ura+ yeast transformants from a single plate are picked, DNA isolated, and transformed into electrocompetent *E. coli* cells (e.g., MC1061, Casadaban et. al. *J. Mol. Biol.* 138, 179-207), and plated on MM/CA +AMP 100 mg/L plates (Pryor and Leiting, *Protein Expression and Purification* 10:309-319, 1997), using standard procedures. Cells are grown in MM/CA with 100 µg/ml Ampicillin for two hours, shaking, at 37°C. 1ml of the culture is induced with 1mM IPTG. 2-4 hours later the 250 µl of each culture is mixed with 250 µl acid washed glass beads and 250 µl Thorner buffer with 5% βME and dye (8M urea, 100 mM Tris pH7.0, 10% glycerol, 2mM EDTA, 5% SDS). Samples are vortexed for one minute and heated to 65°C for 10 minutes. 20 µl are loaded per lane on a 4%-12% PAGE gel (NOVEX). Gels are run in 1XMES buffer. The positive clones are subjected to sequence analysis.

One microliter of sequencing DNA is used to transform strain BL21. The cells are electropulsed at 2.0 kV, 25 µF and 400 ohms. Following electroporation, 0.6 ml MM/CA with 100 mg/L Ampicillin. Cells are grown in MM/CA and induced with ITPG as described above. The positive clones are used to grow up for protein purification of the human or mouse Zcytor16/MBP-6H fusion protein using standard techniques.

25

#### Example 4

##### Mouse Zcytor16 Soluble Receptor Polyclonal Antibodies

Polyclonal antibodies are prepared by immunizing female New Zealand white rabbits with the purified mouse Zcytor16/MBP-6H polypeptide (Example 3), or the purified recombinant mouse Zcytor16CEE or mouse Zcytor16-Fc4 soluble receptor

30

WO 02/070655

PCT/US02/06267

134

(Example 1; Example 11). The rabbits are each given an initial intraperitoneal (IP) injection of about 200 mg of purified protein in Complete Freund's Adjuvant (Pierce, Rockford, IL) followed by booster IP injections of 100 mg purified protein in Incomplete Freund's Adjuvant every three weeks. Seven to ten days after the administration of the third booster injection, the animals are bled and the serum is collected. The rabbits are then boosted and bled every three weeks.

The mouse Zcytor16-specific polyclonal antibodies are affinity purified from the rabbit serum using an CNBr-SEPHAROSE 4B protein column (Pharmacia LKB) that is prepared using about 10 mg of the appropriate purified mouse Zcytor16 polypeptide per gram CNBr-SEPHAROSE, followed by 20X dialysis in PBS overnight. Zcytor16-specific antibodies are characterized by an ELISA titer check using 1 mg/ml of the appropriate protein antigen as an antibody target. The lower limit of detection (LLD) of the rabbit anti-Zcytor16 affinity purified antibodies is determined using standard methods.

#### Example 5

##### Mouse Zcytor16 Receptor Monoclonal Antibodies

Mouse Zcytor16 receptor Monoclonal antibodies are prepared by immunizing male BalbC mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) with the purified recombinant mouse Zcytor16 proteins described herein. The mice are each given an initial intraperitoneal (IP) injection of 20 mg of purified protein in Complete Freund's Adjuvant (Pierce, Rockford, IL) followed by booster IP injections of 10 mg purified protein in Incomplete Freund's Adjuvant every two weeks. Seven to ten days after the administration of the third booster injection, the animals are bled and the serum is collected, and antibody titer assessed.

Splenocytes are harvested from high-titer mice and fused to murine SP2/0 myeloma cells using PEG 1500 (Boehringer Mannheim, UK) in two separate fusion procedures using a 4:1 fusion ratio of splenocytes to myeloma cells (Antibodies: A Laboratory Manual, E. Harlow and D. Lane, Cold Spring Harbor Press). Following 10 days growth post-fusion, specific antibody-producing hybridomas are identified by ELISA using purified recombinant mouse Zcytor16 soluble receptor protein (Example

WO 02/070655

PCT/US02/06267

135

6C) as an antibody target and by FACS using Baf3 cells expressing the Zcytor16 sequence (Example 8) as an antibody target. The resulting hybridomas positive by both methods are cloned three times by limiting dilution.

5

#### Example 6

##### Assessing mouse Zcytor16 Receptor Heterodimerization Using ORIGIN Assay

Soluble mouse Zcytor16 receptor (Example 11), or gp130 (Hibi, M. et al., Cell 63:1149-1157, 1990) are biotinylated by reaction with a five-fold molar excess of sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce, Inc., Rockford, IL) according to the manufacturer's protocol. Soluble mouse Zcytor16 receptor and another soluble receptor subunit, for example, soluble IL-10R (sIL-10R) or CRF2-4 receptor (CRF2-4), soluble zcytor11 receptor (US Pat. No. 5,965,704) or soluble zcytor7 receptor (US patent No. 5,945,511) are labeled with a five fold molar excess of Ru-BPY-NHS (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) according to manufacturer's protocol. The biotinylated and Ru-BPY-NHS-labeled forms of the soluble mouse Zcytor16 receptor can be respectively designated Bio-Zcytor16 receptor and Ru-Zcytor16; the biotinylated and Ru-BPY-NHS-labeled forms of the other soluble receptor subunit can be similarly designated. Assays can be carried out using conditioned media from cells expressing a ligand, such as IL-TIF, that binds mouse Zcytor16 heterodimeric receptors, or using purified IL-TIF.

For initial receptor binding characterization a panel of cytokines or conditioned medium are tested to determine whether they can mediate homodimerization of mouse Zcytor16 receptor and if they can mediate the heterodimerization of mouse Zcytor16 receptor with the soluble receptor subunits described above. To do this, 50 µl of conditioned media or TBS-B containing purified cytokine, is combined with 50 µl of TBS-B (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7.2) containing e.g., 400 ng/ml of Ru-mZcytor16 receptor and Bio-mZcytor16, or 400 ng/ml of Ru-Zcytor16 receptor and e.g., Bio-gp130, or 400 ng/ml of e.g., Ru-CRF2-4 and Bio-mZcytor16. Following incubation for one hour at room temperature, 30 µg of streptavidin coated, 2.8 mm magnetic beads (Dyna, Inc., Oslo, Norway) are added and the reaction incubated an additional hour at room temperature.



WO 02/070655

PCT/US02/06267

136

200 µl ORIGIN assay buffer (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) is then added and the extent of receptor association measured using an M8 ORIGIN analyzer (Igen, Inc.).

#### Example 7

##### Construct for Generating a mouse Zcytor16 Receptor Heterodimer

A vector expressing a secreted mouse Zcytor16 heterodimer is constructed. In this construct, the extracellular cytokine-binding domain of Zcytor16 (e.g., amino acids 24 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48) is fused to the heavy chain of IgG gamma 1 (IgGγ1) while the extracellular portion of the heteromeric cytokine receptor subunit (e.g., an CRF2-4, IL-9, IL-10, zcytor7, zcytor11, IL-4 receptor component) is fused to a human kappa light chain (human κ light chain).

##### A. Construction of IgG gamma 1 and human κ light chain fusion vectors

The heavy chain of IgGγ1 can be cloned into the Zem229R mammalian expression vector (ATCC deposit No. 69447) such that any desired cytokine receptor extracellular domain having a 5' EcoRI and 3' NheI site can be cloned in resulting in an N-terminal extracellular domain-C-terminal IgGγ1 fusion. The IgGγ1 fragment used in this construct is made by using PCR to isolate the IgGγ1 sequence from a Clontech hFetal Liver cDNA library as a template. PCR products are purified using methods described herein and digested with MluI and EcoRI (Boehringer-Mannheim), ethanol precipitated and ligated with oligos which comprise an desired restriction site linker, into Zem229R previously digested with and EcoRI using standard molecular biology techniques disclosed herein.

The human κ light chain can be cloned in the Zem228R mammalian expression vector (ATCC deposit No. 69446) such that any desired cytokine receptor extracellular domain having a 5' EcoRI site and a 3' KpnI site can be cloned in resulting in a N-terminal cytokine extracellular domain-C-terminal human κ light chain fusion. As a KpnI site is located within the human κ light chain sequence, a special primer is designed to clone the 3' end of the desired extracellular domain of a cytokine receptor into this KpnI site: The primer is designed so that the resulting PCR product contains the desired cytokine receptor extracellular domain with a segment of the human κ light chain up to the KpnI site. This primer preferably comprises a portion of

WO 02/070655

PCT/US02/06267

137

at least 10 nucleotides of the 3' end of the desired cytokine receptor extracellular domain fused in frame 5' to fragment cleaved at the KpnI site. The human  $\kappa$  light chain fragment used in this construct is made by using PCR to isolate the human  $\kappa$  light chain sequence from the same Clontech human Fetal Liver cDNA library used above. PCR products are purified using methods described herein and digested with MluI and EcoRI (Boehringer-Mannheim), ethanol precipitated and ligated with the MluI/EcoRI linker described above, into Zem228R previously digested with and EcoRI using standard molecular biology techniques disclosed herein.

10 B. Insertion of Zcytor16 receptor or heterodimeric subunit extracellular domains into fusion vector constructs

Using the construction vectors above, a construct having mouse Zcytor16 fused to IgG $\gamma$ 1 is made. This construction is done by PCRing the extracellular cytokine-binding domain of the mouse Zcytor16 receptor (amino acids 24-230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48) from a placenta or other cDNA library (Clontech) or plasmid (Example 1A) using standard methods and oligos that provide EcoRI and NheI restriction sites. The resulting PCR product is digested with EcoRI and NheI, gel purified, as described herein, and ligated into a previously EcoRI and NheI digested and band-purified Zem229R/IgG $\gamma$ 1 described above. The resulting vector is sequenced to confirm that the Zcytor16/IgG gamma 1 fusion is correct.

A separate construct having a heterodimeric cytokine receptor subunit extracellular domain fused to  $\kappa$  light is also constructed as above. The CRF2-4/human  $\kappa$  light chain construction is performed as above by PCRing from, e.g., a lymphocyte cDNA library (Clontech) using standard methods, and oligos that provide EcoRI and KpnI restriction sites. The resulting PCR product is digested with EcoRI and KpnI and then ligating this product into a previously EcoRI and KpnI digested and band-purified Zem228R/human  $\kappa$  light chain vector described above. The resulting vector is sequenced to confirm that the cytokine receptor subunit/human  $\kappa$  light chain fusion is correct.

30

WO 02/070655

PCT/US02/06267

138

D. Co-expression of the mouse Zcytor16 and heterodimeric cytokine receptor subunit extracellular domain

Approximately 15 µg of each of vectors above, are co-transfected into mammalian cells, e.g., BHK-570 cells (ATCC No. CRL-10314) using  
 5 LipofectaminePlus™ reagent (Gibco/BRL), as per manufacturer's instructions. The transfected cells are selected for 10 days in DMEM + 5%FBS (Gibco/BRL) containing 1 µM of methotrexate (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) and 0.5 mg/ml G418 (Gibco/BRL) for 10 days. The resulting pool of transfectants is selected again in 10 µM of MTX and 0.5 mg/ml G418 for about 10 days.

10 The resulting pool of doubly selected cells is used to generate protein. Three Factories (Nunc, Denmark) of this pool are used to generate 10 L of serum free conditioned medium. This conditioned media is passed over a 1 ml protein-A column and eluted in about 10, 750 microliter fractions. The fractions having the highest protein concentration are pooled and dialyzed (10 kD MW cutoff) against PBS. Finally  
 15 the dialyzed material is submitted for amino acid analysis (AAA) using routine methods.

Example 8

Determination of Receptor Subunits That Heterodimerize or Multimerize With Mouse

Zcytor16 Receptor Using a Proliferation Assay

20 Using standard methods described herein, cells expressing a BaF3/mZcytor16-MPL chimera (wherein the extracellular domain of the mouse Zcytor16 (e.g., amino acids 24 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48) is fused in frame to the intracellular signaling domain of the mpl receptor) are tested for proliferative response in the presence of IL-TIF. Such cells serve as a bioassay cell line  
 25 to measure ligand binding of monomeric or homodimeric mouse Zcytor16 receptors. In addition, BaF3/mZcytor16-MPL chimera cells transfected with an additional heterodimeric cytokine receptor subunit can be assessed for proliferative response in the presence of IL-TIF. In the presence of IL-TIF, if the BaF3/mZcytor16-MPL cells signal, this would suggest that Zcytor16 receptor can homodimerize to signal.  
 30 Transfection of the BaF3/MPL-mZcytor16 cell line with and additional MPL-class II

WO 02/070655

PCT/US02/06267

139

cytokine receptor fusion that signals in the presence of the IL-TIF ligand, such as CRF2-4, determines which heterodimeric cytokine receptor subunits are required for mouse Zcytor16 receptor signaling. Use of MPL-receptor fusions for this purpose alleviates the requirement for the presence of an intracellular signaling domain for the mouse Zcytor16 receptor.

Each independent receptor complex cell line is then assayed in the presence of IL-TIF and proliferation measured using routine methods (e.g., Alamar Blue assay). The BaF3/MPL-mZcytor16 bioassay cell line serves as a control for the monomeric or homodimeric receptor activity, and is thus used as a baseline to compare signaling by the various receptor complex combinations. The untransfected bioassay cell line serves as a control for the background activity, and is thus used as a baseline to compare signaling by the various receptor complex combinations. A BaF3/MPL-mZcytor16 without ligand (IL-TIF) is also used as a control. The IL-TIF in the presence of the correct receptor complex, is expected to increase proliferation of the BaF3/mZcytor16-MPL receptor cell line approximately 5 fold over background or greater in the presence of IL-TIF. Cells expressing the components of Zcytor16 heterodimeric and multimeric receptors should proliferate in the presence of IL-TIF.

#### Example 9

##### Reconstitution of mouse Zcytor16 Receptor *in vitro*

To identify components involved in the Zcytor16-signaling complex, receptor reconstitution studies are performed as follows. BHK 570 cells (ATCC No. CRL-10314) transfected, using standard methods described herein, with a luciferase reporter mammalian expression vector plasmid serve as a bioassay cell line to measure signal transduction response from a transfected mouse Zcytor16 receptor complex to the luciferase reporter in the presence of IL-TIF. BHK cells do not endogenously express the mouse Zcytor16 receptor. An exemplary luciferase reporter mammalian expression vector is the KZI34 plasmid that was constructed with complementary oligonucleotides that contain STAT transcription factor binding elements from 4 genes. A modified c-fos *Sis* inducible element (m67SIE, or hSIE) (Sadowski, H. et al., *Science* 261:1739-1744, 1993), the p21 SIE1 from the p21 WAF1 gene (Chin, Y. et al., *Science*

WO 02/070655

PCT/US02/06267

140

272:719-722, 1996), the mammary gland response element of the  $\beta$ -casein gene (Schmitt-Ney, M. et al., *Mol. Cell. Biol.* 11:3745-3755, 1991), and a STAT inducible element of the Fc $\gamma$  R1 gene, (Seidel, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:3041-3045, 1995). These oligonucleotides contain Asp718-XhoI compatible ends and are ligated, using standard methods, into a recipient firefly luciferase reporter vector with a c-fos promoter (Poulsen, L.K. et al., *J. Biol. Chem.* 273:6229-6232, 1998) digested with the same enzymes and containing a neomycin selectable marker. The KZ134 plasmid is used to stably transfect BHK, or BaF3 cells, using standard transfection and selection methods, to make a BHK/KZ134 or BaF3/KZ134 cell line respectively.

The bioassay cell line is transfected with mZcytor16-mpl fusion receptor alone, or co-transfected along with one of a variety of other known receptor subunits. Receptor complexes include but are not limited to mZcytor16-mpl receptor only, various combinations of mZcytor16-mpl receptor with one or more of the CRF2-4, IL-9, IL-10, zcytor11, zcytor7 class II cytokine receptor subunits, or IL-4 receptor components, or the IL-2 receptor components (IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-2R $\gamma$ ); Zcytor16-mpl receptor with one or more of the IL-4/IL-13 receptor family receptor components (IL-4R $\alpha$ , IL-13R $\alpha$ , IL-13R $\alpha'$ ), as well as other Interleukin receptors (e.g., IL-15 R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , IL-9R $\alpha$ , IL-21R (Zcytor16)). Each independent receptor complex cell line is then assayed in the presence of cytokine-conditioned media or purified cytokines and luciferase activity measured using routine methods. The untransfected bioassay cell line serves as a control for the background luciferase activity, and is thus used as a baseline to compare signaling by the various receptor complex combinations. The conditioned medium or cytokine that binds the mousezcytor16 receptor in the presence of the correct receptor complex, is expected to give a luciferase readout of approximately 5 fold over background or greater.

As an alternative, a similar assay can be performed wherein BaF3/mZcytor16-mpl cell lines are co-transfected as described above and proliferation measured (Example 8).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

141

Example 10COS Cell Transfection and Secretion Trap

COS cell transfections were performed as follows: A mixture of 0.5 µg DNA and 5 µl lipofectamine (Gibco BRL) in 92µl serum free DMEM media (55 mg sodium pyruvate, 146 mg L-glutamine, 5 mg transferrin, 2.5mg insulin, 1µg selenium and 5 mg fetuin in 500ml DMEM) was incubated at room temperature for 30 minutes and then 400 µl serum free DMEM media added. A 500 µl mixture was added onto COS cells plated on 12-well tissue culture plate at  $1.5 \times 10^5$  COS cells/well and previously incubated for 5 hours at 37°C. An additional 500 µl 20% FBS DMEM media (100 ml FBS, 55 mg sodium pyruvate and 146 mg L-glutamine in 500 ml DMEM) was added and the plates were incubated overnight.

The secretion trap was performed as follows: Media was rinsed off cells with PBS and fixed for 15 minutes with 1.8% Formaldehyde in PBS. Cells were then washed with TNT (0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl, and 0.05% Tween-20 in H<sub>2</sub>O). Cells were permeated with 0.1% Triton-X in PBS for 15 minutes and washed again with TNT. Cells were blocked for 1 hour with TNB (0.1M Tris-HCl, 0.15M NaCl and 0.5% Blocking Reagent (NEN Renaissance TSA-Direct Kit; NEN) in H<sub>2</sub>O). Cells were again washed with TNT. Cells were then incubated for 1 hour with 1-3 µg/ml human Zcytor16 soluble receptor Fc4 fusion protein (Zcytor16sR-Fc4) (Example 11) in TNB. Cells were washed with TNT, and then incubated for another hour with 1:200 diluted goat-anti-human Ig-HRP (Fc specific; Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) in TNB. Cells were again washed with TNT. Antibodies positively binding to the human Zcytor16sR-Fc4 were detected with fluorescein tyramide reagent diluted 1:50 in dilution buffer (NEN kit) and incubated for 4-6 minutes. Cells were again washed with TNT. Cells were preserved with Vectashield Mounting Media (Vector Labs) diluted 1:5 in TNT. Cells were visualized using FITC filter on fluorescent microscope.

Since Zcytor16 is a Class II cytokine receptor, the binding of human Zcytor16sR/Fc4 fusion protein with known or orphan Class II cytokines was tested. The pZP7 expression vectors containing cDNAs of cytokines (including IL-TIF, interferon alpha, interferon beta, interferon gamma, IL-10, amongst others were transfected into COS cells, and the binding of Zcytor16sR/Fc4 to transfected COS cells

WO 02/070655

PCT/US02/06267

142

were carried out using the secretion trap assay described above. Human IL-TIF showed positive binding. Based on these data, human IL-TIF and human Zcytor16 is a potential ligand-receptor pair. Similar methods are used to show that mouse Zcytor16 is an orthologous class II receptor that binds IL-TIF.

5

#### Example 11

##### Purification of Zcytor16-Fc4 Polypeptide From Transfected BHK 570 Cells

Unless otherwise noted, all operations were carried out at 4°C. The following procedure was used for purifying human Zcytor16 polypeptide containing C-terminal fusion to human Fc4 (Zcytor16-Fc4; Example 1). About 16,500 ml of conditioned media from BHK 570 cells transfected with human Zcytor16-Fc4 (Example 2) was filtered through a 0.2 µm sterilizing filter and then supplemented with a solution of protease inhibitors, to final concentrations of, 0.001 mM leupeptin (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0.001 mM pepstatin (Boehringer-Mannheim) and 0.4 mM Pefabloc (Boehringer-Mannheim). A Poros protein A50 column (20 ml bed volume, Applied Biosystems) was packed and washed with 400 ml PBS (Gibco/BRL). The supplemented conditioned media was passed over the column with a flow rate of 15 ml/minute, followed by washing with 800 ml PBS (BRL/Gibco). Zcytor16-Fc4 was eluted from the column with 0.1 M Glycine pH 3.0 and 5 ml fractions were collected directly into 0.5 ml 2M Tris pH 7.8, to adjust the final pH to 7.4 in the fractions.

Column performance was characterized through western blotting of reducing SDS-PAGE gels of the starting media and column pass through. Western blotting used anti-human IgG HRP (Amersham) antibody, which showed an immunoreactive protein at 60,000 Da in the starting media, with nothing in the pass through, suggesting complete capture. The protein A50 eluted fractions were characterized by reducing SDS PAGE gel. This gel showed an intensely Coomassie stained band at 60,000 Da in fractions 3 to 11. Fractions 3 to 11 were pooled.

Protein A 50 elution pool was concentrated from 44 ml to 4 ml using a 30,000 Da Ultrafree Biomax centrifugal concentrator (15 ml volume, Millipore). A Sephacryl S-300 gel filtration column (175 ml bed volume; Pharmacia) was washed

30

WO 02/070655

PCT/US02/06267

143

with 350 ml PBS (BRL/Gibco). The concentrated pool was injected over the column with a flow rate of 1.5 ml/min, followed by washing with 225 ml PBS (BRL/Gibco). Eluted peaks were collected into 2 ml fractions.

Eluted fractions were characterized by reducing and non-reducing silver stained (Geno Technology) SDS PAGE gels. Reducing silver stained SDS PAGE gels showed an intensely stained band at 60,000 Da in fractions 14 – 31, while non-reducing silver stained SDS PAGE gels showed an intensely stained band at 160,000 Da in fractions 14 – 31. Fractions 1 – 13 showed many bands of various sizes. Fractions 14 – 31 were pooled, concentrated to 22 ml using 30,000 Da Ultrafree Biomax centrifugal concentrator (15 ml volume, Millipore). This concentrate was filtered through a 0.2 µm Acrodisc sterilizing filter (Pall Corporation).

The protein concentration of the concentrated pooled fractions was performed by BCA analysis (Pierce, Rockford, IL) and the material was aliquoted, and stored at -80°C according to our standard procedures. The concentration of the pooled fractions was 1.50 mg/ml.

This method is also used to purify the mouse Zcytor16-Fc4 and heterologous class II receptor Fc4 fusions.

#### Example 12

#### Human and Mouse Zcytor16 Tissue Distribution in Tissue Panels Using Northern Blot and PCR

##### A. Human Zcytor16 Tissue Distribution using Northern Blot and Dot Blot

Northern blot analysis was performed using Human Multiple Tissue Northern Blots I, II, III (Clontech) and an in house generated U-937 northern blot. U-937 is a human monoblastic promonocytic cell line. The cDNA probe was generated using oligos ZC25,963 (SEQ ID NO:16) and ZC28,354 (SEQ ID NO:17). The PCR conditions were as follows: 94° for 1 minute; 30 cycles of 94°, 15 seconds; 60°, 30 seconds; 72°, 30 seconds and a final extension for 5 minutes at 72°. The 364 bp product was gel purified by gel electrophoresis on a 1% TBE gel and the band was excised with a razor blade. The cDNA was extracted from the agarose using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). 94 ng of this fragment was radioactively



WO 02/070655

PCT/US02/06267

144

labeled with  $^{32}\text{P}$ -dCTP using Rediprime II (Amersham), a random prime labeling system, according to the manufacturer's specifications. Unincorporated radioactivity was removed using a Nuc-Trap column (Stratagene) according to manufacturer's instructions. Blots were prehybridized at  $65^\circ$  for 3 hours in ExpressHyb (Clontech) solution. Blots were hybridized overnight at  $65^\circ$  in Expresshyb solution containing  $1.0 \times 10^6$  cpm/ml of labeled probe, 0.1 mg/ml of salmon sperm DNA and 0.5  $\mu\text{g/ml}$  of human cot-1 DNA. Blots were washed in  $2 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS at room temperature with several solution changes then washed in  $0.1 \times \text{SSC}$ , 0.1% SDS at  $55^\circ$  for 30 minutes twice. Transcripts of approximately 1.6 kb and 3.0 kb size were detected in spleen and placenta, but not other tissues examined. The same sized transcripts plus an additional approximate 1.2 kb transcript was detected in U-937 cell line.

#### B. Tissue Distribution of human Zcytor16 in tissue cDNA panels using PCR

A panel of cDNAs from human tissues was screened for Zcytor16 expression using PCR. The panel was made in-house and contained 77 marathon cDNA and cDNA samples from various normal and cancerous human tissues and cell lines are shown in Table 5, below. The cDNAs came from in-house libraries or marathon cDNAs from in-house RNA preps, Clontech RNA, or Invitrogen RNA. The marathon cDNAs were made using the marathon-Ready<sup>TM</sup> kit (Clontech, Palo Alto, CA) and QC tested with clathrin primers ZC21195 (SEQ ID NO:18) and ZC21196 (SEQ ID NO:19) and then diluted based on the intensity of the clathrin band. To assure quality of the panel samples, three tests for quality control (QC) were run: (1) To assess the RNA quality used for the libraries, the in-house cDNAs were tested for average insert size by PCR with vector oligos that were specific for the vector sequences for an individual cDNA library; (2) Standardization of the concentration of the cDNA in panel samples was achieved using standard PCR methods to amplify full length alpha tubulin or G3PDH cDNA using a 5' vector oligo ZC14,063 (SEQ ID NO:20) and 3' alpha tubulin specific oligo primer ZC17,574 (SEQ ID NO:21) or 3' G3PDH specific oligo primer ZC17,600 (SEQ ID NO:22); and (3) a sample was sent to sequencing to check for possible ribosomal or mitochondrial DNA contamination. The panel was set up in a

WO 02/070655

PCT/US02/06267

145

96-well format that included a human genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA) positive control sample. Each well contained approximately 0.2-100 pg/ $\mu$ l of cDNA.

The PCR reactions were set up using oligos ZC25,963 (SEQ ID NO:30) and ZC25,964 (SEQ ID NO:31), Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech) and Reditload dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The amplification was carried out as follow: 1 cycle at 94°C for 1 minute, 38 cycles of 94°C for 10 seconds, 60°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by 1 cycle at 72°C for 5 minutes. The correct predicted DNA fragment size was observed in bone marrow, fetal heart, fetal kidney, fetal muscle, fetal skin, heart, mammary gland, placenta, salivary gland, skeletal muscle, small intestine, spinal cord, spleen, kidney, fetal brain, esophageal tumor, uterine tumor, stomach tumor, ovarian tumor, rectal tumor, lung tumor and RPMI-1788 (a B-lymphocyte cell line). Zcytor16 expression was not observed in the other tissues and cell lines tested in this panel. The expression pattern of Zcytor16 shows expression in certain tissue-specific tumors especially, e.g., ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, rectal cancer, lung cancer and esophageal cancer, where zcytor 16 is not expressed in normal tissue, but is expressed in the tumor tissue. One of skill in the art would recognize that the polynucleotides, polypeptides, antibodies, and binding partners of the present invention can be used as a diagnostic to detect cancer, or cancer tissue in a biopsy, tissue, or histologic sample, particularly e.g., ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, rectal cancer, lung cancer and esophageal cancer tissue. Such diagnostic uses for the molecules of the present invention are known in the art and described herein.

In addition, because the expression pattern of human Zcytor16, one of IL-TIF's receptors, shows expression in certain specific tissues as well as tissue-specific tumors, binding partners including the natural ligand, IL-TIF, can also be used as a diagnostic to detect specific tissues (normal or abnormal), cancer, or cancer tissue in a biopsy, tissue, or histologic sample, where IL-TIF receptors are expressed, and particularly e.g., ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, rectal cancer, lung cancer and esophageal cancer tissue. IL-TIF can also be used to target other tissues wherein its receptors, e.g., Zcytor16 and zcytor11 are expressed. Moreover, such binding partners could be conjugated to chemotherapeutic agents, toxic moieties and

WO 02/070655

PCT/US02/06267

146

the like to target therapy to the site of a tumor or diseased tissue. Such diagnostic and targeted therapy uses are known in the art and described herein.

A commercial 1st strand cDNA panel (Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA) was also assayed as above. The panel contained the following samples: mononuclear cells, activated mononuclear cells, resting CD4+ cells, activated CD4+ cells, resting CD8+ cells, activated CD8+ cells, resting CD14+ cells, resting CD19+ cells and activated CD19+ cells. Activated CD4+ cells and activated CD19+ cells showed Zcytor16 expression, whereas the other cells tested, including resting CD4+ cells and resting CD19+ cells, did not.

10

Table 5

| Tissue           | #samples | Tissue            | #samples |
|------------------|----------|-------------------|----------|
| adrenal gland    | 1        | bladder           | 1        |
| bone marrow      | 3        | brain             | 2        |
| cervix           | 1        | colon             | 1        |
| fetal brain      | 3        | fetal heart       | 2        |
| fetal kidney     | 1        | fetal liver       | 2        |
| fetal lung       | 1        | fetal skin        | 1        |
| heart            | 2        | fetal muscle      | 1        |
| kidney           | 2        | liver             | 1        |
| lung             | 1        | lymph node        | 1        |
| mammary gland    | 1        | melanoma          | 1        |
| ovary            | 1        | pancreas          | 1        |
| pituitary        | 2        | placenta          | 3        |
| prostate         | 3        | rectum            | 1        |
| salivary gland   | 2        | skeletal muscle   | 1        |
| small intestine  | 1        | spinal cord       | 2        |
| spleen           | 1        | uterus            | 1        |
| stomach          | 1        | adipocyte library | 1        |
| testis           | 5        | islet             | 1        |
| thymus           | 1        | prostate SMC      | 1        |
| thyroid          | 2        | RPMI 1788         | 1        |
| trachea          | 1        | WI38              | 1        |
| esophageal tumor | 1        | lung tumor        | 1        |
| liver tumor      | 1        | ovarian tumor     | 1        |
| rectal tumor     | 1        | stomach tumor     | 1        |
| uterine tumor    | 2        | CD3+ library      | 1        |
| HaCAT library    | 1        | HPV library       | 1        |
| HPVS library     | 1        | MG63 library      | 1        |
| K562             | 1        |                   |          |

C. Tissue Distribution of human Zcytor16 in Human Tissue and Cell Line RNA Panels Using RT-PCR

A panel of RNAs from human cell lines was screened for human Zcytor16 expression using RT-PCR. The panels were made in house and contained 84 RNAs from various normal and cancerous human tissues and cell lines as shown in Tables 6-9 below. The RNAs were made from in house or purchased tissues and cell lines using the RNeasy Midi or Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). The panel was set up in a 96-well format with 100 ngs of RNA per sample. The RT-PCR reactions were set up using oligos ZC25,963 (SEQ ID NO:30) and ZC25,964 (SEQ ID NO:31), Rediload dye and SUPERScript One Step RT-PCR System (Life Technologies, Gaithersburg, MD). The amplification was carried out as follows: one cycle at 55° for 30 minutes followed by 40 cycles of 94°, 15 seconds; 59°, 30 seconds; 72°, 30 seconds; then ended with a final extension at 72° for 5 minutes. 8 to 10 µls of the PCR reaction product was subjected to standard Agarose gel electrophoresis using a 4% agarose gel. The correct predicted cDNA fragment size of 184 bps was observed in cell lines U-937, HL-60, ARPE-19, HaCat#1, HaCat#2, HaCat#3, and HaCat#4; bladder, cancerous breast, normal breast adjacent to a cancer, bronchus, colon, ulcerative colitis colon, duodenum, endometrium, esophagus, gastro-esophageal, heart left ventricle, heart ventricle, ileum, kidney, lung, lymph node, lymphoma, mammary adenoma, mammary gland, cancerous ovary, pancreas, parotid and skin, spleen lymphoma and small bowel. Zcytor16 expression was not observed in the other tissues and cell lines tested in this panel.

Zcytor16 is detectably expressed by PCR in normal tissues: such as, the digestive system, e.g., esophagus, gastro-esophageal, pancreas, duodenum, ileum, colon, small bowel; the female reproductive system, e.g., mammary gland, endometrium, breast (adjacent to cancerous tissues); and others systems, e.g., lymph nodes, skin, parotid, bladder, bronchus, heart ventricles, and kidney. Moreover, Zcytor16 is detectably expressed by PCR in several human tumors: such as tumors associated with female reproductive tissues e.g., mammary adenoma, ovary cancer, uterine cancer, other breast cancers; and other tissues such as lymphoma, stomach

WO 02/070655

PCT/US02/06267

148

tumor, and lung tumor. The expression of Zcytor16 is found in normal tissues of female reproductive organs, and in some tumors associated with these organs. As such, Zcytor16 can serve as a marker for these tumors wherein the Zcytor16 may be over-expressed. Several cancers positive for Zcytor16 are associated with  
 5 ectodermal/epithelial origin (mammary adenoma, and other breast cancers). Hence, Zcytor16 can serve as a marker for epithelial tissue, such as epithelial tissues in the digestive system and female reproductive organs (e.g., endometrial tissue, columnar epithelium), as well as cancers involving epithelial tissues. Moreover, in a preferred  
 10 embodiment, Zcytor16 can serve as a marker for certain tissue-specific tumors especially, e.g., ovarian cancer, stomach cancer, uterine cancer, rectal cancer, lung cancer and esophageal cancer, where zcytor 16 is not expressed in normal tissue, but is expressed in the tumor tissue. Use of polynucleotides, polypeptides, and antibodies of the present invention for diagnostic purposes are known in the art, and disclosed herein.

Table 6

| Tissue                           | #samples | Tissue                | #samples |
|----------------------------------|----------|-----------------------|----------|
| adrenal gland                    | 6        | duodenum              | 1        |
| bladder                          | 3        | endometrium           | 5        |
| brain                            | 2        | cancerous endometrium | 1        |
| brain meningioma                 | 1        | gastric cancer        | 1        |
| breast                           | 1        | esophagus             | 7        |
| cancerous breast                 | 4        | gastro-esophageal     | 1        |
| normal breast adjacent to cancer | 5        | heart aorta           | 1        |
| bronchus                         | 3        | heart left ventricle  | 4        |
| colon                            | 15       | heart right ventricle | 2        |
| cancerous colon                  | 1        | heart ventricle       | 1        |
| normal colon adjacent to cancer  | 1        | ileum                 | 3        |
| ulcerative colitis colon         | 1        | kidney                | 15       |
|                                  |          | cancerous kidney      | 1        |

15

Table 7

| Tissue/Cell Line | #samples | Tissue/Cell Line | #samples |
|------------------|----------|------------------|----------|
| 293              | 1        | HBL-100          | 1        |
| C32              | 1        | Hs-294T          | 1        |
| HaCat#1          | 1        | Molt4            | 1        |
| HaCat#2          | 1        | RPMI             | 1        |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

149

|                           |   |            |   |
|---------------------------|---|------------|---|
| HaCat#3                   | 1 | U-937      | 1 |
| HaCat#4                   | 1 | A-375      | 1 |
| WI-38                     | 1 | HCT-15     | 1 |
| WI-38 + 2 um ionomycin #1 | 1 | HT-29      | 1 |
| WI-38 + 2 um ionomycin #2 | 1 | MRC-5      | 1 |
| WI-38 + 5 um ionomycin#1  | 1 | RPT-1      | 1 |
| WI-38 + 5 um ionomycin#2  | 1 | RPT-2      | 1 |
| Caco-2,                   | 1 | WM-115     | 1 |
| Caco-2,differentiated     | 1 | A-431      | 1 |
| DLD-1                     | 1 | WERI-Rb-1  | 1 |
| HRE                       | 1 | HEL-92.1.7 | 1 |
| HRCE                      | 1 | HuH-7      | 1 |
| MCF7                      | 1 | MV-4-11    | 1 |
| PC-3                      | 1 | U-138      | 1 |
| TF-1                      | 1 | CCRF-CEM   | 1 |
| 5637                      | 1 | Y-79       | 1 |
| 143B                      | 1 | A-549      | 1 |
| ME-180                    | 1 | EL-4       | 1 |
| prostate epithelia        | 1 | HeLa 229   | 1 |
| U-2 OS                    | 1 | HUT 78     | 1 |
| T-47D                     | 1 | NCI-H69    | 1 |
| Mg-63                     | 1 | SaOS2      | 1 |
| Raji                      | 1 | USMC       | 1 |
| U-373 MG                  | 1 | UASMC      | 2 |
| A-172                     | 1 | AoSMC      | 1 |
| CRL-1964                  | 1 | UtSMC      | 1 |
| CRL-1964 + butyric acid   | 1 | HepG2      | 1 |
| HUVEC                     | 1 | HepG2- IL6 | 1 |
| SK-Hep-1                  | 1 | NHEK#1     | 1 |
| SK-Lu-1                   | 1 | NHEK#2     | 1 |
| Sk-MEL-2                  | 1 | NHEK#3     | 1 |
| K562                      | 1 | NHEK#4     | 1 |
| BeWo                      | 1 | ARPE-19    | 1 |
| FHS74.Int                 | 1 | G-361      | 1 |
| HL-60                     | 1 | HISM       | 1 |
| Malme 3M                  | 1 | 3AsubE     | 1 |
| FHC                       | 1 | INT407     | 1 |
| HREC                      | 1 |            |   |

Table 8

| Tissue | #samples | Tissue | #samples |
|--------|----------|--------|----------|
|--------|----------|--------|----------|

WO 02/070655

PCT/US02/06267

150

|                    |    |                                |    |
|--------------------|----|--------------------------------|----|
| liver              | 10 | lung                           | 13 |
| lymph node         | 1  | cancerous lung                 | 2  |
| lymphoma           | 4  | normal lung adjacent to cancer | 1  |
| mammary adenoma    | 1  | muscle                         | 3  |
| mammary gland      | 3  | neuroblastoma                  | 1  |
| melinorioma        | 1  | omentum                        | 2  |
| osteogenic sarcoma | 2  | ovary                          | 6  |
| pancreas           | 4  | cancerous ovary                | 2  |
| skin               | 5  | parotid                        | 7  |
| sarcoma            | 2  | salivary gland                 | 4  |

Table 9

| Tissue          | #samples | Tissue         | #samples |
|-----------------|----------|----------------|----------|
| small bowel     | 10       | uterus         | 11       |
| spleen          | 3        | uterine cancer | 1        |
| spleen lymphoma | 1        | thyroid        | 9        |
| stomach         | 13       |                |          |
| stomach cancer  | 1        |                |          |

#### D. Tissue Distribution of mouse Zcytor16 in tissue panels using PCR

5 A panel of cDNAs from murine tissues was screened for mouse Zcytor16 expression using PCR. The panel was made in-house and contained 49 marathon cDNA and cDNA samples from various normal and cancerous murine tissues and cell lines are shown in Table 10, below. The cDNAs are either in-house cDNA libraries marathon cDNAs. The RNA used to create these cDNA's came from either in-house RNA preps, Clontech RNA, or Invitrogen RNA. The mouse marathon cDNAs

10 were made using the marathon-Ready<sup>TM</sup> kit (Clontech, Palo Alto, CA) and QC tested with mouse transferrin receptor primers ZC10,651 (SEQ ID NO:42) and ZC10,565 (SEQ ID NO:43) and then diluted based on the intensity of the transferrin band. The in-house libraries were diluted to provide 25ng per well of cDNA. To assure quality of the

15 amplified library samples in the panel, three tests for quality control (QC) were run: (1) To assess the RNA quality used for the libraries, the in-house cDNAs were tested for average insert size by PCR with vector oligos that were specific for the vector sequences for an individual cDNA library; (2) Standardization of the concentration of the cDNA in panel samples was achieved using standard PCR methods to amplify full

WO 02/070655

PCT/US02/06267

151

length alpha tubulin or G3PDH cDNA using a 5' vector oligo: ZC14,063 (SEQ ID NO:20) and 3' alpha tubulin specific oligo primer ZC17,574 (SEQ ID NO:21) or 3' G3PDH specific oligo primer ZC17,600 (SEQ ID NO:22); and (3) a sample was sent to sequencing to check for possible ribosomal or mitochondrial DNA contamination. The panel was set up in a 96-well format that included a mouse genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA) positive control sample. Each well contained approximately 0.2-100 pg/μl of cDNA. The PCR was set up using oligos ZC38,001 (SEQ ID NO:44) and ZC38,022 (SEQ ID NO:45), Advantage 2 Taq Polymerase (Clontech, Palo Alto, CA), and Rediload dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The amplification was carried out as follows: 1 cycle at 94°C for 2 minutes; 35 cycles of 94°C for 10 seconds, 60°C for 20 seconds and 68°C for 30 seconds, followed by 1 cycle at 68°C for 7 minutes. About 12.5 μl of the PCR reaction product was subjected to standard Agarose gel electrophoresis using a ~4% agarose gel.

The correct predicted DNA fragment size of 114 base pairs was observed in Lung, Pancreas, Placenta, Salivary Gland, Skeletal Muscle, Skin, Small Intestine, Smooth Muscle, Spleen, Stomach, and Testis cDNAs. These initial expression results for the mouse Zcytor16 corroborated the expression data seen for human Zcytor16 discussed herein, suggesting that the use of mouse Zcytor16 in an animal model, such as mouse, would reasonably reflect the *in vivo* expression and function of Zcytor16 seen in humans, and discussed herein.

Table 10

| Tissue/Cell line     | #samples | Tissue/Cell line           | #samples |
|----------------------|----------|----------------------------|----------|
| 229                  | 1        | Pancreas                   | 1        |
| 7F2                  | 1        | Placenta                   | 2        |
| Adipocytes-Amplified | 1        | Jakotay-Prostate Cell Line | 1        |
| aTC1.9               | 1        | Nelix-Prostate Cell Line   | 1        |
| Brain                | 4        | Paris-Prostate Cell Line   | 1        |
| CCC4                 | 1        | Torres-Prostate Cell Line  | 1        |
| CD90+ Amplified      | 1        | Tuvak-Prostate Cell Line   | 1        |
| OC10B                | 1        | Salivary Gland             | 2        |
| Dentritic            | 1        | Skeletal Muscle            | 1        |
| Embryo               | 1        | Skin                       | 2        |
| Heart                | 2        | Small Intestine            | 1        |



WO 02/070655

PCT/US02/06267

152

|        |   |               |   |
|--------|---|---------------|---|
| Kidney | 3 | Smooth Muscle | 2 |
| Liver  | 2 | Spleen        | 2 |
| Lung   | 2 | Stomach       | 1 |
| MEW#2  | 1 | Testis        | 3 |
| P388D1 | 1 | Thymus        | 1 |

Example 13Construction of Expression Vector Expressing Full-length zcytor11

5           The entire zcytor11 receptor (commonly owned US Patent No. 5,965,704) was isolated by digestion with EcoRI and XhoI from plasmid pZP7P, containing full-length zcytor11 receptor cDNA (SEQ ID NO:24; amino acid sequence in SEQ ID NO:25) and a puromycin resistance gene. The digest was run on a 1% low melting point agarose (Boehringer Mannheim) gel and the approximately 1.5 kb

10   zcytor11 cDNA was isolated using Qiaquick™ gel extraction kit (Qiagen) as per manufacturer's instructions. The purified zcytor11 cDNA was inserted into an expression vector as described below.

          Recipient expression vector pZP7Z was digested with EcoRI (BRL) and XhoI (Boehringer Mannheim) as per manufacturer's instructions, and gel purified as

15   described above. This vector fragment was combined with the EcoRI and XhoI cleaved zcytor11 fragment isolated above in a ligation reaction. The ligation was run using T4 Ligase (BRL) at 12°C overnight. A sample of the ligation was electroporated in to DH10B electroMAX™ electrocompetent *E. coli* cells (25μF, 200Ω, 1.8V). Transformants were plated on LB+Ampicillin plates, and single colonies were picked

20   into 2 ml LB+Ampicillin and grown overnight. Plasmid DNA was isolated using Wizard Minipreps (Promega), and each was digested with EcoRI and XhoI to confirm the presence of insert. The insert was approximately 1.5 kb, and was full-length. Digestion with SpeI and PstI was used to confirm the identity of the vector.

Example 14

Construction of BaF3 Cells Expressing the CRF2-4 Receptor (BaF3/CRF2-4 cells) and  
BaF3 Cells Expressing the CRF2-4 Receptor with the zcytor11 Receptor (BaF3/CRF2-  
4/zcytor11 cells)

5 BaF3 cells expressing the full-length CRF2-4 receptor were constructed, using 30µg of a CRF2-4 expression vector, described below. The BaF3 cells expressing the CRF2-4 receptor were designated as BaF3/CRF2-4. These cells were used as a control, and were further transfected with full-length zcytor11 receptor (US  
 10 Patent No. 5,965,704) and used to construct a screen for IL-TIF activity as described below.

A. Construction of BaF3 Cells Expressing the CRF2-4 receptor

The full-length cDNA sequence of CRF2-4 (Genbank Accession No.  
 15 Z17227) was isolated from a Daudi cell line cDNA library, and then cloned into an expression vector pZP7P.

BaF3, an interleukin-3 (IL-3) dependent pre-lymphoid cell line derived from murine bone marrow (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), was maintained in complete media (RPMI medium (JRH Bioscience Inc., Lenexa, KS) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum, 2 ng/ml murine IL-3 (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2  
 20 mM L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco BRL), and PSN antibiotics (GIBCO BRL)). Prior to electroporation, CRF2-4/pZP7P was prepared and purified using a Qiagen Maxi Prep kit (Qiagen) as per manufacturer's instructions. For  
 25 electroporation, BaF3 cells were washed once in serum-free RPMI media and then resuspended in serum-free RPMI media at a cell density of 10<sup>7</sup> cells/ml. One ml of resuspended BaF3 cells was mixed with 30 µg of the CRF2-4/pZP7P plasmid DNA and transferred to separate disposable electroporation chambers (GIBCO BRL). Following a 15-minute incubation at room temperature the cells were given two serial shocks (800  
 30 IFad/300 V.; 1180 IFad/300 V.) delivered by an electroporation apparatus (CELL-PORATOR™; GIBCO BRL). After a 5-minute recovery time, the electroporated cells

WO 02/070655

PCT/US02/06267

154

were transferred to 50 ml of complete media and placed in an incubator for 15-24 hours (37°C, 5% CO<sub>2</sub>). The cells were then spun down and resuspended in 50 ml of complete media containing 2 µg/ml puromycin in a T-162 flask to isolate the puromycin-resistant pool. Pools of the transfected BaF3 cells, hereinafter called BaF3/CRF2-4 cells, were assayed for signaling capability as described below. Moreover these cells were further transfected with zcytor11 receptor as described below.

#### B. Construction of BaF3 Cells Expressing CRF2-4 and zcytor11 receptors

BaF3/CRF2-4 cells expressing the full-length zcytor11 receptor were constructed as per Example 5A above, using 30µg of the zcytor11 expression vector, described in Example 6 above. Following recovery, transfectants were selected using 200µg/ml zeocin and 2µg/ml puromycin. The BaF3/CRF2-4 cells expressing the zcytor11 receptor were designated as BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells. These cells were used to screen for IL-TIF activity as well as Zcytor16 antagonist activity described in Example 15.

#### Example 15

##### Screening for IL-TIF antagonist activity using BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells using an

##### Alamar Blue Proliferation Assay

##### A. Screening for IL-TIF activity using BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells using an Alamar Blue Proliferation Assay

Purified human IL-TIF-CEE (Example 19) was used to test for the presence of proliferation activity as described below. Purified humsn Zcytor16-Fc4 (Example 11) was used to antagonize the proliferative response of the IL-TIF in this assay as described below.

BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells were spun down and washed in the complete media, described in Example 7A above, but without mIL-3 (hereinafter referred to as "mIL-3 free media"). The cells were spun and washed 3 times to ensure the removal of the mIL-3. Cells were then counted in a hemacytometer. Cells were

WO 02/070655

PCT/US02/06267

155

plated in a 96-well format at 5000 cells per well in a volume of 100  $\mu$ l per well using the mL-3 free media.

Proliferation of the BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells was assessed using IL-TIF-CEE protein diluted with mL-3 free media to 50, 10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06 ng/ml concentrations. 100  $\mu$ l of the diluted protein was added to the BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells. The total assay volume is 200  $\mu$ l. The assay plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 3 days at which time Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) was added at 20 $\mu$ l/well. Plates were again incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Alamar Blue gives a fluouometric readout based on number of live cells, and is thus a direct measurement of cell proliferation in comparison to a negative control. Plates were again incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> for 24 hours. Plates were read on the Fmax™ plate reader (Molecular Devices Sunnyvale, CA) using the SoftMax™ Pro program, at wavelengths 544 (Excitation) and 590 (Emmission). Results confirmed the dose-dependent proliferative response of the BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells to IL-TIF-CEE. The response, as measured, was approximately 15-fold over background at the high end of 50ng/ml down to a 2-fold induction at the low end of 0.06ng/ml. The BaF3 wild type cells, and BaF3/CRF2-4 cells did not proliferate in response to IL-TIF-CEE, showing that IL-TIF is specific for the CRF2-4/zcytor11 heterodimeric receptor.

In order to determine if Zcytor16 is capable of antagonizing IL-TIF activity, the assay described above was repeated using purified soluble human Zcytor16/Fc4. When IL-TIF was combined with Zcytor16 at 10 $\mu$ g/ml, the response to IL-TIF at all concentrations was brought down to background. That the presence of soluble human Zcytor16 ablated the proliferative effects of IL-TIF demonstrates that it is a potent antagonist of the IL-TIF ligand. This assay is also used to assess mouse Zcytor16 activity in antagonizing IL-TIF. Similar results are expected.

#### Example 16

##### IL-TIF activation of a reporter mini-gene in MES 13 cells and inhibition of activity by human Zcytor16-Fc4

MES 13 cells (ATCC No. CRL-1927) were plated at 10,000 cells/well in 96-well tissue culture clusters (Costar) in DMEM growth medium (Life Technologies)

WO 02/070655

PCT/US02/06267

156

supplemented with pyruvate and 10% serum (HyClone). Next day, the medium was switched to serum free DMEM medium by substituting 0.1% BSA (Fraction V; Sigma) for serum. This medium also contained the adenoviral construct KZ136 (below) that encodes a luciferase reporter mini-gene driven by SRE and STAT elements, at a 1000:1 multiplicity of infection (m.o.i.), i.e. 1000 adenoviral particles per cell. After allowing 24h for the incorporation of the adenoviral construct in the cells, the media were changed and replaced with serum-free media. Human recombinant IL-TIF with or without a recombinant Zcytor16-Fc4 fusion was added at the indicated final concentration in the well (as described in Table 11, below). Dilutions of both the IL-TIF and Zcytor16-Fc4 were performed in serum-free medium. 0.1% BSA was added for a basal assay control. 4h later, cells were lysed and luciferase activity, denoting activation of the reporter gene, was determined in the lysate using an Luciferase Assay System assay kit (Promega) and a Labsystems Luminoskan luminometer (Labsystems, Helsinki, Finland). Activity was expressed as luciferase units (LU) in the lysate. Results are shown in Table 11, below.

Table 11

| Level of IL-TIF (ng/ml) | LU w/o zcytoR16 | LU w/ 10µg/ml zcytoR16 |
|-------------------------|-----------------|------------------------|
| 0 (basal BSA control)   | 103±2           | 104±2                  |
| 0.03                    | 105±3           | 104±4                  |
| 0.3                     | 108±4           | 99±6                   |
| 3                       | 134±8           | 98±15                  |
| 30                      | 188±16          | 110±3                  |
| 300                     | 258±21          | 112±30                 |

These results demonstrate two things: First, that MES 13 cells respond to human recombinant IL-TIF and therefore possess endogenous functional receptors for the cytokine. Second, that the human zcytoR16-Fc4 receptor fusion acts as an antagonist that effectively blocks the response to IL-TIF, even at the highest dose that this cytokine was used. Therefore, zcyto16 is an effective antagonist of IL-TIF on cells (MES 13) that are intrinsically capable of responding to IL-TIF, i.e. cells that do not require exogenous expression of additional receptor components to respond to the cytokine. This assay is also used to assess mouse Zcytor16 activity in antagonizing IL-TIF. Similar results are expected.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

157

The construction of the adenoviral KZ136 vector was as follows. The original KZ136 vector is disclosed in Poulsen, LK et al. J. Biol. Chem. 273:6228-6232, 1998. The CMV promoter/enhancer and SV40 pA sequences were removed from pACCMV.pLpA (T.C. Becker et al., Meth. Immunology 43:161-189, 1994.) and replaced with a linker containing Asp718/KpnI and HindIII sites (oligos ZC13252 (SEQ ID NO:26) and ZC13453 (SEQ ID NO:27)). The STAT/SRE driven luciferase reporter cassette was excised from vector KZ136 (Poulsen, LK et al., supra.) as a Asp718/KpnI-HindIII fragment and inserted into the adapted pAC vector. Recombinant KZ136 Adenovirus was produced by transfection with JM17 Adenovirus into 293 cells as described in T.C. Becker et al. supra.). Plaque purified virus was amplified and used to infect cultured cells at 5-50 pfu/cell 12-48 hours before assay. Luciferase reporter assays were performed as described in 96 well microplates as per Poulsen, LK et al., supra.

15

#### Example 17

##### Construct for Generating CEE-tagged IL-TIF

Oligonucleotides were designed to generate a PCR fragment containing the Kozak sequence and the coding region for human IL-TIF, without its stop codon. These oligonucleotides were designed with a KpnI site at the 5' end and a BamHI site at the 3' end to facilitate cloning into pHZ200-CEE, our standard vector for mammalian expression of C-terminal Glu-Glu tagged (SEQ ID NO:10) proteins. The pHZ200 vector contains an MT-1 promoter.

PCR reactions were carried out using Turbo Pfu polymerase (Stratagene) to amplify a IL-TIF cDNA fragment. About 20 ng human IL-TIF polynucleotide template (SEQ ID NO:14), and oligonucleotides ZC28590 (SEQ ID NO:28) and ZC28580 (SEQ ID NO:29) were used in the PCR reaction. PCR reaction conditions were as follows: 95°C for 5 minutes; 30 cycles of 95°C for 60 seconds, 55°C for 60 seconds, and 72°C for 60 seconds; and 72°C for 10 minutes; followed by a 4°C hold. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using a QiaQuick™ (Qiagen) gel extraction kit. The isolated, approximately 600 bp, DNA

WO 02/070655

PCT/US02/06267

158

fragment was digested with KpnI and BamHI (Boehringer-Mannheim), gel purified as above and ligated into pHZ200-CEE that was previously digested with KpnI and BamHI.

About one microliter of the ligation reaction was electroporated into  
5 DH10B ElectroMax™ competent cells (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) according to manufacturer's direction and plated onto LB plates containing 100 µg/ml ampicillin, and incubated overnight. Colonies were picked and screened by PCR using oligonucleotides ZC28,590 (SEQ ID NO:28) and ZC28,580 (SEQ ID NO:29), with PCR conditions as described above. Clones containing inserts were then sequenced to  
10 confirm error-free IL-TIF inserts. Maxipreps of the correct pHZ200-IL-TIF-CEE construct, as verified by sequence analysis, were performed.

#### Example 18

##### Transfection And Expression Of IL-TIF Soluble Receptor Polypeptides

15 BHK 570 cells (ATCC No. CRL-10314), were plated at about  $1.2 \times 10^6$  cells/well (6-well plate) in 800 µl of serum free (SF) DMEM media (DMEM, Gibco/BRL High Glucose) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD). The cells were transfected with an expression plasmid containing IL-TIF-CEE described above (Example 17), using Lipofectin™ (Gibco BRL), in serum free (SF) DMEM according  
20 to manufacturer's instructions.

The cells were incubated at 37°C for approximately five hours, then transferred to separate 150 mm MAXI plates in a final volume of 30 ml DMEM/5% fetal bovine serum (FBS) (Hyclone, Logan, UT). The plates were incubated at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, overnight and the DNA: Lipofectin™ mixture was replaced with selection  
25 media (5% FBS/DMEM with 1 µM methotrexate (MTX)) the next day.

Approximately 10-12 days post-transfection, colonies were mechanically picked to 12-well plates in one ml of 5%FCS/DMEM with 5 µM MTX, then grown to confluence. Positive expressing clonal colonies Conditioned media samples were then tested for expression levels via SDS-PAGE and Western analysis. A high-expressing  
30 clone was picked and expanded for ample generation of conditioned media for purification of the IL-TIF-CEE expressed by the cells (Example 19).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

159

Example 19Purification of IL-TIF soluble receptors from BHK 570 cells

Unless otherwise noted, all operations were carried out at 4°C. The following procedure was used for purifying IL-TIF polypeptide containing C-terminal GluGlu (EE) tags (SEQ ID NO:10). Conditioned media from BHK cells expressing IL-TIF-CBE (Example 18) was concentrated with an Amicon S10Y3 spiral cartridge on a ProFlux A30. A Protease inhibitor solution was added to the concentrated conditioned media to final concentrations of 2.5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO), 0.003 mM leupeptin (Boehringer-Mannheim, Indianapolis, IN), 0.001 mM pepstatin (Boehringer-Mannheim) and 0.4 mM Pefabloc (Boehringer-Mannheim). Samples were removed for analysis and the bulk volume was frozen at -80°C until the purification was started. Total target protein concentrations of the concentrated conditioned media were determined via SDS-PAGE and Western blot analysis with the anti-EE HRP conjugated antibody.

About 100 ml column of anti-EE G-Sepharose (prepared as described below) was poured in a Waters AP-5, 5 cm x 10 cm glass column. The column was flow packed and equilibrated on a BioCad Sprint (PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) with phosphate buffered saline (PBS) pH 7.4. The concentrated conditioned media was thawed, 0.2 micron sterile filtered, pH adjusted to 7.4, then loaded on the column overnight with about 1 ml/minute flow rate. The column was washed with 10 column volumes (CVs) of phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4), then plug eluted with 200 ml of PBS (pH 6.0) containing 0.5 mg/ml EE peptide (Anaspec, San Jose, CA) at 5 ml/minute. The EE peptide used has the sequence EYMPME (SEQ ID NO:10). The column was washed for 10 CVs with PBS, then eluted with 5 CVs of 0.2M glycine, pH 3.0. The pH of the glycine-eluted column was adjusted to 7.0 with 2 CVs of 5X PBS, then equilibrated in PBS (pH 7.4). Five ml fractions were collected over the entire elution chromatography and absorbance at 280 and 215 nm were monitored; the pass through and wash pools were also saved and analyzed. The EE-polypeptide elution peak fractions were analyzed for the target protein via SDS-PAGE Silver staining and Western Blotting with the anti-EE HRP



WO 02/070655

PCT/US02/06267

160

conjugated antibody. The polypeptide elution fractions of interest were pooled and concentrated from 60 ml to 5.0 ml using a 10,000 Dalton molecular weight cutoff membrane spin concentrator (Millipore, Bedford, MA) according to the manufacturer's instructions.

5 To separate IL-TIF-CEE from other co-purifying proteins, the concentrated polypeptide elution pooled fractions were subjected to a POROS HQ-50 (strong anion exchange resin from PerSeptive BioSystems, Framingham, MA) at pH 8.0. A 1.0 x 6.0 cm column was poured and flow packed on a BioCad Sprint. The column was counter ion charged then equilibrated in 20mM TRIS pH 8.0 (Tris  
10 (Hydroxymethyl Aminomethane)). The sample was diluted 1:13 (to reduce the ionic strength of PBS) then loaded on the Poros HQ column at 5 ml/minute. The column was washed for 10 CVs with 20mM Tris pH 8.0 then eluted with a 40 CV gradient of 20 mM Tris/ 1 M sodium chloride (NaCl) at 10 ml/minute. 1.5 ml fractions were collected over the entire chromatography and absorbance at 280 and 215 nM were monitored.  
15 The elution peak fractions were analyzed via SDS-PAGE Silver staining. Fractions of interest were pooled and concentrated to 1.5-2 ml using a 10,000 Dalton molecular weight cutoff membrane spin concentrator (Millipore, Bedford, MA) according to the manufacturer's instructions.

To separate IL-TIF-CEE polypeptide from free EE peptide and any  
20 contaminating co-purifying proteins, the pooled concentrated fractions were subjected to size exclusion chromatography on a 1.5 x 90 cm Sephadex S200 (Pharmacia, Piscataway, NJ) column equilibrated and loaded in PBS at a flow rate of 1.0 ml/min using a BioCad Sprint. 1.5 ml fractions were collected across the entire chromatography and the absorbance at 280 and 215 nM were monitored. The peak  
25 fractions were characterized via SDS-PAGE Silver staining, and only the most pure fractions were pooled. This material represented purified IL-TIF-CEE polypeptide.

This purified material was finally subjected to a 4 ml ActiClean Etox (Sterogene) column to remove any remaining endotoxins. The sample was passed over the PBS equilibrated gravity column four times then the column was washed with a  
30 single 3 ml volume of PBS, which was pooled with the "cleaned" sample. The material was then 0.2 micron sterile filtered and stored at -80°C until it was aliquoted.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

161

On Western blotted, Coomassie Blue and Silver stained SDS-PAGE gels, the IL-TIF-CEE polypeptide was one major band. The protein concentration of the purified material was performed by BCA analysis (Pierce, Rockford, IL) and the protein was aliquoted, and stored at -80°C according to standard procedures.

5 To prepare anti-EE Sepharose, a 100 ml bed volume of protein G-Sepharose (Pharmacia, Piscataway, NJ) was washed 3 times with 100 ml of PBS containing 0.02% sodium azide using a 500 ml Nalgene 0.45 micron filter unit. The gel was washed with 6.0 volumes of 200 mM triethanolamine, pH 8.2 (TEA, Sigma, St. Louis, MO), and an equal volume of EE antibody solution containing 900 mg of  
10 antibody was added. After an overnight incubation at 4°C, unbound antibody was removed by washing the resin with 5 volumes of 200 mM TEA as described above. The resin was resuspended in 2 volumes of TEA, transferred to a suitable container, and dimethylpimilimide-2HCl (Pierce, Rockford, IL) dissolved in TEA, was added to a final concentration of 36 mg/ml of protein G-Sepharose gel. The gel was rocked at  
15 room temperature for 45 min and the liquid was removed using the filter unit as described above. Nonspecific sites on the gel were then blocked by incubating for 10 min. at room temperature with 5 volumes of 20 mM ethanolamine in 200 mM TEA. The gel was then washed with 5 volumes of PBS containing 0.02% sodium azide and stored in this solution at 4°C.

20

#### Example 20

##### Human zcytor11 Tissue Distribution in Tissue Panels Using Northern Blot and PCR

##### A. Human zcytor11 Tissue Distribution in tissue panels using PCR

25 A panel of cDNAs from human tissues was screened for zcytor11 expression using PCR. The panel was made in-house and contained 94 marathon cDNA and cDNA samples from various normal and cancerous human tissues and cell lines are shown in Table 6 above. Aside from the PCR reaction, the method used was as shown in Example12. The PCR reactions were set up using oligos ZC14,666 (SEQ ID NO: 32) and ZC14,742 (SEQ ID NO:33), Advantage 2 cDNA polymerase mix (Clontech,  
30 Palo Alto, CA), and Rediload dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The amplification was carried out as follows: 1 cycle at 94°C for 2 minutes, 40 cycles of

WO 02/070655

PCT/US02/06267

162

94°C for 15 seconds, 51°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, followed by 1 cycle at 72°C for 7 minutes. The correct predicted DNA fragment size was observed in bladder, brain, cervix, colon, fetal brain, fetal heart, fetal kidney, fetal liver, fetal lung, fetal skin, heart, kidney, liver, lung, melanoma, ovary, pancreas, placenta, prostate, rectum, salivary gland, small intestine, testis, thymus, trachea, spinal cord, thyroid, lung tumor, ovarian tumor, rectal tumor, and stomach tumor. Zcytor11 expression was not observed in the other tissues and cell lines tested in this panel.

A commercial 1st strand cDNA panel (Human Blood Fractions MTC Panel, Clontech, Palo Alto, CA) was also assayed as above. The panel contained the following samples: mononuclear cells, activated mononuclear cells, resting CD4+ cells, activated CD4+ cells, resting CD8+ cells, activated CD8+ cells, resting CD14+ cells, resting CD19+ cells and activated CD19+ cells. All samples except activated CD8+ and Activated CD19+ showed expression of zcytor11.

#### 15 B. Tissue Distribution of Zcytor11 in Human Cell Line and Tissue Panels Using RT-PCR

A panel of RNAs from human cell lines was screened for zcytor11 expression using RT-PCR. The panels were made in house and contained 84 RNAs from various normal and cancerous human tissues and cell lines as shown in Tables 7-10 above. The RNAs were made from in house or purchased tissues and cell lines using the RNeasy Midi or Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). The panel was set up in a 96-well format with 100 ngs of RNA per sample. The RT-PCR reactions were set up using oligos ZC14,666 (SEQ ID NO:32) and ZC14,742 (SEQ ID NO:33), Rediload dye and SUPERSCRIPRT One Step RT-PCR System(Life Technologies, Gaithersburg, MD). The amplification was carried out as follows: one cycle at 50° for 30 minutes followed by 45 cycles of 94°, 15 seconds; 52°, 30 seconds; 72°, 30 seconds; then ended with a final extension at 72° for 7 minutes. 8 to 10 uls of the PCR reaction product was subjected to standard Agarose gel electrophoresis using a 4% agarose gel. The correct predicted cDNA fragment size was observed in adrenal gland, bladder, breast, bronchus, normal colon, colon cancer, duodenum, endometrium, esophagus, gastric cancer, gastro-esophageal cancer, heart ventricle, ileum, normal kidney, kidney cancer, liver, lung, lymph node, pancreas, parotid, skin, small bowel, stomach, thyroid, and

WO 02/070655

PCT/US02/06267

163

uterus. Cell lines showing expression of zcytor11 were A-431, differentiated CaCO<sub>2</sub>, DLD-1, HBL-100, HCT-15, HepG2, HepG2+IL6, HuH7, and NHEK #1-4. Zcytor11 expression was not observed in the other tissues and cell lines tested in this panel.

In addition, because the expression pattern of zcytor11, one of IL-TIF's receptors, shows expression in certain specific tissues, binding partners including the natural ligand, IL-TIF, can also be used as a diagnostic to detect specific tissues (normal or abnormal), cancer, or cancer tissue in a biopsy, tissue, or histologic sample, particularly in tissues where IL-TIF receptors are expressed. IL-TIF can also be used to target other tissues wherein its receptors, e.g., Zcytor16 and zcytor11 are expressed. Moreover, such binding partners could be conjugated to chemotherapeutic agents, toxic moieties and the like to target therapy to the site of a tumor or diseased tissue. Such diagnostic and targeted therapy uses are known in the art and described herein.

The expression patterns of zcytor11 (above) and Zcytor16 (Example 12, and Example 21) indicated target tissues and cell types for the action of IL-TIF, and hence IL-TIF antagonists, such as Zcytor16. The zcytor11 expression generally overlapped with Zcytor16 expression in three physiologic systems: digestive system, female reproductive system, and immune system. Moreover, the expression pattern of the receptor (zcytor11) indicated that an IL-TIF antagonist such as Zcytor16 would have therapeutic application for human disease in two areas: inflammation (e.g., IBD, Chron's disease, pancreatitis) and cancer (e.g., ovary, colon). That is, the polynucleotides, polypeptides and antibodies of the present invention can be used to antagonize the inflammatory, and other cytokine-induced effects of IL-TIF interaction with the cells expressing the zcytor11 receptor.

Moreover, the expression of zcytor11 appeared to be downregulated or absent in an ulcerative colitis tissue, HepG2 liver cell line induced by IL-6, activated CD8+ T-cells and CD19+ B-cells. However, Zcytor16 appeared to be upregulated in activated CD19+ B-cells (Example 12), while zcytor11 is downregulated in activated CD19+ cells, as compared to the resting CD19+ cells (above). The expression of zcytor11 and Zcytor16 has a reciprocal correlation in this case. These RT-PCR experiments demonstrate that CD19+ peripheral blood cells, B lymphocytes, express receptors for IL-TIF, namely zcytoR11 and zcytoR16. Furthermore B cells display

WO 02/070655

PCT/US02/06267

164

regulated expression of zcytoR11 and zcytoR16. B-lymphocytes activated with mitogens decrease expression of zcytoR11 and increase expression of zcytoR16. This represents a classical feedback inhibition that would serve to dampen the activity of IL-TIF on B cells and other cells as well. Soluble zcytoR16 would act as an antagonist to neutralize the effects of IL-TIF on B cells. This would be beneficial in diseases where B cells are the key players: Autoimmune diseases including systemic lupus erythematosus (SLE), myasthenia gravis, immune complex disease, and B-cell cancers that are exacerbated by IL-TIF. Also autoimmune diseases where B cells contribute to the disease pathology would be targets for zcytoR16 therapy: Multiple sclerosis, inflammatory bowel disease (IBD) and rheumatoid arthritis are examples. ZcytoR16 therapy would be beneficial to dampen or inhibit B cells producing IgE in atopic diseases including asthma, allergy and atopic dermatitis where the production of IgE contributes to the pathogenesis of disease.

B cell malignancies may exhibit a loss of the "feedback inhibition" described above. Administration of zcytoR16 would restore control of IL-TIF signaling and inhibit B cell tumor growth. The administration of zcytoR16 following surgical resection or chemotherapy may be useful to treat minimal residual disease in patients with B cell malignancies. The loss of regulation may lead to sustain or increased expression of zcytoR11. Thus creating a target for therapeutic monoclonal antibodies targeting zcytoR11.

#### Example 21

##### Identification of cells expressing Zcytor16 using *in situ* hybridization

Specific human tissues were isolated and screened for human Zcytor16 expression by *in situ* hybridization. Various human tissues prepared, sectioned and subjected to *in situ* hybridization included cartilage, colon, appendix, intestine, fetal liver, lung, lymph node, lymphoma, ovary, pancreas, placenta, prostate, skin, spleen, and thymus. The tissues were fixed in 10% buffered formalin and blocked in paraffin using standard techniques. Tissues were sectioned at 4 to 8 microns. Tissues were prepared using a standard protocol ("Development of non-isotopic *in situ* hybridization" at The Laboratory of Experimental Pathology (LEP), NIEHS, Research

WO 02/070655

PCT/US02/06267

165

Triangle Park, NC; web address <http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.html>). Briefly, tissue sections were deparaffinized with HistoClear (National Diagnostics, Atlanta, GA) and then dehydrated with ethanol. Next they were digested with Proteinase K (50 µg/ml) (Boehringer Diagnostics, Indianapolis, IN) at 37°C for 2 to 7 minutes. This step was followed by acetylation and re-hydration of the tissues.

One *in situ* probe was designed against the human Zcytor16 sequence (nucleotide 1-693 of SEQ ID NO:1), and isolated from a plasmid containing SEQ ID NO:1 using standard methods. T3 RNA polymerase was used to generate an antisense probe. The probe was labeled with digoxigenin (Boehringer) using an *In Vitro* transcription System (Promega, Madison, WI) as per manufacturer's instruction.

*In situ* hybridization was performed with a digoxigenin-labeled Zcytor16 probe (above). The probe was added to the slides at a concentration of 1 to 5 pmol/ml for 12 to 16 hours at 62.5°C. Slides were subsequently washed in 2XSSC and 0.1XSSC at 55°C. The signals were amplified using tyramide signal amplification (TSA) (TSA, *in situ* indirect kit; NEN) and visualized with Vector Red substrate kit (Vector Lab) as per manufacturer's instructions. The slides were then counter-stained with hematoxylin (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

Signals were observed in several tissues tested: The lymph node, plasma cells and other mononuclear cells in peripheral tissues were strongly positive. Most cells in the lymphatic nodule were negative. In lymphoma samples, positive signals were seen in the mitotic and multinuclear cells. In spleen, positive signals were seen in scattered mononuclear cells at the periphery of follicles were positive. In thymus, positive signals were seen in scattered mononuclear cells in both cortex and medulla were positive. In fetal liver, a strong signal was observed in a mixed population of mononuclear cells in sinusoid spaces. A subset of hepatocytes might also have been positive. In the inflamed appendix, mononuclear cells in peyer's patch and infiltration sites were positive. In intestine, some plasma cells and ganglia nerve cells were positive. In normal lung, Zcytor16 was expressed in alveolar epithelium and mononuclear cells in interstitial tissue and circulation. In the lung carcinoma tissue, a strong signal was observed in mostly plasma cells and some other mononuclear cells in peripheral of lymphatic aggregates. In ovary carcinoma, epithelium cells were strongly

WO 02/070655

PCT/US02/06267

166

positive. Some interstitial cells, most likely the mononuclear cells, were also positive. There was no signal observed in the normal ovary. In both normal and pancreatitis pancreas samples, acinar cells and some mononuclear cells in the mesentery were positive. In the early term (8 weeks) placenta, signal was observed in trophoblasts. In skin, some mononuclear cells in the inflamed infiltrates in the superficial dermis were positive. Keratinocytes were also weakly positive. In prostate carcinoma, scattered mononuclear cells in interstitial tissues were positive. In articular cartilage, chondrocytes were positive. Other tissues tested including normal ovary and a colon adenocarcinoma were negative.

In summary, the *in situ* data was consistent with expression data described above for the Zcytor16. Zcytor16 expression was observed predominately in mononuclear cells, and a subset of epithelium was also positive. These results confirmed the presence of Zcytor16 expression in immune cells and point toward a role in inflammation, autoimmune disease, or other immune function, for example, in binding pro-inflammatory cytokines, including but not limited to IL-TIF. Moreover, detection of Zcytor16 expression can be used for example as an marker for mononuclear cells in histologic samples.

Zcytor16 is expressed in mononuclear cells, including normal tissues (lymph nodes, spleen, thymus, pancreas and fetal liver, lung), and abnormal tissues (inflamed appendix, lung carcinoma, ovary carcinoma, pancreatitis, inflamed skin, and prostate carcinoma). It is notable that plasma cells in the lymph node, intestine, and lung carcinoma are positive for Zcytor16. Plasma cells are immunologically activated lymphocytes responsible for antibody synthesis. In addition, IL-TIF, is expressed in activated T cells. In addition, the expression of Zcytor16 is detected only in activated (but not in resting) CD4+ and CD19+ cells (Example 12). Thus, Zcytor16 can be used as a marker for or as a target in isolating certain lymphocytes, such as mononuclear leucocytes and limited type of activated leucocytes, such as activated CD4+ and CD19+.

Furthermore, the presence of Zcytor16 expression in activated immune cells such as activated CD4+ and CD19+ cells showed that Zcytor16 may be involved in the body's immune defensive reactions against foreign invaders: such as

WO 02/070655

PCT/US02/06267

167

microorganisms and cell debris, and could play a role in immune responses during inflammation and cancer formation.

Moreover, as discussed herein, epithelium from several tissues was positive for Zcytor16 expression, such as hepatocytes (endoderm-derived epithelia), lung alveolar epithelium (endoderm-derived epithelia), and ovary carcinoma epithelium (mesoderm-derived epithelium). The epithelium expression of Zcytor16 could be altered in inflammatory responses and/or cancerous states in liver and lung. Thus, Zcyto16 could be used as marker to monitor changes in these tissues as a result of inflammation or cancer. Moreover, analysis of Zcytor16 *in situ* expression showed that normal ovary epithelium is negative for Zcytor16 expression, while it is strongly positive in ovary carcinoma epithelium providing further evidence that Zcytor16 polynucleotides, polypeptides and antibodies can be used as a diagnostic marker and/or therapeutic target for the diagnosis and treatment of ovarian cancers, and ovary carcinoma, as described herein.

Zcytor16 was also detected in other tissues, such as acinar cells in pancreas (normal and pancreatitis tissues), trophoblasts in placenta (ectoderm-derived), chondrocytes in cartilage (mesoderm-derived), and ganglia cells in intestine (ectoderm-derived). As such, Zcytor16 may be involved in differentiation and/or normal functions of corresponding cells in these organs. As such, potential utilities of Zcytor16 include maintenance of normal metabolism and pregnancy, bone formation/homeostasis, and physiological function of intestine, and the like.

Example 22  
*In vivo* affects of IL-TIF polypeptide

Mice (female, C57Bl, 8 weeks old; Charles River Labs, Kingston, NY) were divided into three groups. An adenovirus expressing an IL-TIF polypeptide (SEQ ID NO:15) was previously made using standard methods. On day 0, parental or IL-TIF adenovirus was administered to the first (n=8) and second (n=8) groups, respectively, via the tail vein, with each mouse receiving a dose of  $\sim 1 \times 10^{11}$  particles in  $\sim 0.1$  ml volume. The third group (n=8) received no treatment. On days 12, mice were weighed and blood was drawn from the mice. Samples were analyzed for complete blood count



WO 02/070655

PCT/US02/06267

168

(CBC) and serum chemistry. Statistically significant elevations in neutrophil and platelet counts were detected in the blood samples from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group. Also, lymphocyte and red blood cell counts were significantly reduced from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group. In addition, the IL-TIF adenovirus treated mice decreased in body weight, while parental adenovirus treated mice gained weight.

The results suggested that IL-TIF affects hematopoiesis, i.e., blood cell formation *in vivo*. As such, IL-TIF could have biological activities effecting different blood stem cells, thus resulting increase or decrease of certain differentiated blood cells in a specific lineage. For instance, IL-TIF appears to reduce lymphocytes, which is likely due to inhibition of the committed progenitor cells that give rise to lymphoid cells. IL-TIF also decreases red blood cells. This finding agrees with the inhibitory effects of IL-TIF on the proliferation and/or growth of myeloid stem cells (Example 23), supporting the notion that IL-TIF could play a role in anemia, infection, inflammation, and/or immune diseases by influencing blood cells involved in these processes. Antagonists against IL-TIF, such as antibodies or its soluble receptor Zcytor16, could be used as therapeutic reagents in these diseases.

Moreover, these experiments using IL-TIF adenovirus in mice suggest that IL-TIF over-expression increases the level of neutrophils and platelets *in vivo*. Although this may appear contradictory to the finding seen in K562 cells (Example 23), it is not uncommon to observe diverse activities of a particular protein *in vitro* versus *in vivo*. It is conceivable that there are other factors (such as cytokines and modifier genes) involved in the responses to IL-TIF in the whole animal system. Nevertheless, these data strongly support the involvement of IL-TIF in hematopoiesis. Thus, IL-TIF and its receptors are suitable reagents/targets for the diagnosis and treatment in variety of disorders, such as inflammation, immune disorders, infection, anemia, hematopoietic and other cancers, and the like.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

169

Example 23The IL-TIF polypeptide lyses K-562 cells in cytotoxicity assay

The K-562 cell line (CRL-243, ATCC) has attained widespread use as a highly sensitive *in vitro* target for cytotoxicity assays. K-562 blasts are multipotential, hematopoietic malignant cells that spontaneously differentiate into recognizable progenitors of the erythrocytic, granulocytic and monocytic series (Lozzio, BB et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 166: 546-550, 1981).

K562 cells were plated at 5,000 cells/well in 96-well tissue culture clusters (Costar) in DMEM phenol-free growth medium (Life Technologies) supplemented with pyruvate and 10% serum (HyClone). Next day, human recombinant IL-TIF (Example 19), BSA control or retinoic acid (known to be cytotoxic to K562 cells) were added. Seventy-two hours later, the vital stain MTT (Sigma, St Louis, MO), a widely used indicator of mitochondrial activity and cell growth, was added to the cells at a final concentration of 0.5 mg/ml. MMP is converted to a purple formazan derivative by mitochondrial dehydrogenases. Four hours later, converted MMP was solubilized by adding an equal volume of acidic isopropanol (0.04N HCl in absolute isopropanol) to the wells. Absorbance was measured at 570nm, with background subtraction at 650nm. In this experimental setting, absorbance reflects cell viability. Results shown in Table 12 are expressed as % cytotoxicity.

Table 12

| Agent         | Concentration | % Cytotoxicity |
|---------------|---------------|----------------|
| BSA Control   | 1ug/ml        | 1.3            |
| Retinoic acid | 100uM         | 62             |
| IL-TIF        | 100ng/ml      | 16.2           |
| IL-TIF        | 300ng/ml      | 32             |

The results indicate that IL-TIF may affect myeloid stem cells. Myeloid stem cells are daughter cells of the universal blood stem cells. They are progenitors of erythrocytes, platelets megakaryocytes, monocytes (or migrated macrophages), neutrophil and basophil, etc. Since K-562 blasts spontaneously differentiate into progenitors of the erythrocytic, granulocytic and monocytic series, it can be considered as myeloid stem cells. Thus, the results demonstrate that IL-TIF has an inhibitory

WO 02/070655

PCT/US02/06267

170

activity on the proliferation and/or growth of myeloid stem cells. Thus IL-TIF could play a role in anemia, infection, inflammation, and/or immune diseases. In addition, an antagonist against IL-TIF, such as antibodies or its soluble receptor Zcytor16, could be used to block IL-TIF's activity on myeloid stem cells, or as therapeutic reagents in diseases such as anemia, infection, inflammation, and/or immune diseases.

#### Example 24

##### IL-TIF-Expressing Transgenic Mice

###### A. Generation of transgenic mice expressing mouse IL-TIF

DNA fragments from a transgenic vector containing 5' and 3' flanking sequences of the lymphoid specific E $\mu$ LCK promoter, mouse IL-TIF (SEQ ID NO:40), the rat insulin II intron, IL-TIF cDNA and the human growth hormone poly A sequence were prepared using standard methods, and used for microinjection into fertilized B6C3f1 (Taconic, Germantown, NY) murine oocytes, using a standard microinjection protocol. See, Hogan, B. et al., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Twenty-five mice transgenic for mouse IL-TIF with the lymphoid-specific E $\mu$ LCK promoter were identified among 154 pups. Eleven of the transgenic pups died within hours of birth, 9 transgenic pups with a shiny appearance were necropsied the day of birth, and 2 grew to adulthood. Expression levels were low in one adult animal. Tissues from the necropsied pups were prepared and histologically examined as described below.

The shiny appearance of the neonate pups appeared to be associated with a stiffening of the skin, as if they were drying out, resulting in a reduction of proper nursing. Their movements became stiffened in general.

###### B. Genotypic and Expression analysis from transgenic mice

From the mouse IL-TIF transgenic line driven by the E $\mu$ Lck promoter, described above, newborn pups were observed for abnormalities on day one (day of birth) and sacrificed for tissue collection. All pups were given a unique ear tag number, and those designated as having a shiny skin phenotype at the time of sacrifice were

WO 02/070655

PCT/US02/06267

171

noted. Of the twelve pups, six were observed to have the shiny skin phenotype, with two designated as "severe" phenotypes. Severe phenotypes were defined as small pups with little mobility whose skin was especially shiny and very dry. Skin was collected from the left lateral side of each pup, and frozen in Tissue-Tek embedding medium.

5           Genotyping confirmed that shiny skin was a good indicator of transgenic status, although no expression data was collected. Frozen skin blocks were sectioned to 7 microns on a cryostat and stained to look for the presence of CD3, CD4, CD8, mouse macrophages, B-cells, CD80, and MHC class II. The staining protocol involved binding of commercially available antibodies to the tissue, detection with a peroxidase labeled  
10       secondary antibody, and DAB chromogen reaction to visualize staining.

          Transgenic animals were found to be higher in MHC class II and CD80, which stain for antigen-presenting cells and dendritic cells respectively. The macrophage marker also detected more cells in the severe and non-severe transgenics than in the wild type animals, although the distribution of these cells was very localized  
15       in the high dermis. Animals classified as severe phenotypes had the most robust staining with all three of these markers, showing a dramatic increase in cell intensity and number when compared to the wild type. This variability may be due to a difference in expression level of IL-TIF in these transgenic founder pups. The MHC class II positive cells were located in the lower dermis arranged in loose open clusters,  
20       while the CD80 positive cells were predominantly below the dermis either in or just above the muscle/fat layer. These two cell populations do not appear to overlap. All other markers were of equivalent staining in all animals. Toluidine blue staining for mast cells revealed slight to no difference between wild type and transgenic animals.

C. Microscopic evaluation of tissues from transgenic mice: IL-TIF TG with EuLck promoter has a neonatal lethal-histology  
25

          On the day of birth, pups from litters containing IL-TIF transgenics were humanely euthanized and the whole body immersion fixed in 10% buffered formalin. Six transgenic and two non-transgenic pups were submitted for further workup. Four of the six transgenics were noted to have shiny skin at the time of euthanasia. The fixed

WO 02/070655

PCT/US02/06267

172

tissues were trimmed into 5 sections (longitudinal section of the head and cross sections of the upper and lower thorax and upper and lower abdomen). The tissues were embedded in paraffin, routinely processed, sectioned at 5  $\mu$ m (Jung 2065 Supercut microtome, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) and stained with H&E. The stained tissues were evaluated under a light microscope (Nikon Eclipse E600, Nikon Inc., Melville, NY) by a board (ACVP) certified veterinary pathologist.

On microscopic examination, the epidermis of two of the transgenic pups was observed to be thicker than the epidermis of the other six mice including the controls. No other abnormalities were noted in the skin and other tissues of any of the mice. Representative areas of skin from corresponding regions of the thorax and abdomen were imaged with the 40X objective lens and with a CoolSnap digital camera (Roper Scientific, Inc., San Diego, CA) that was attached to the microscope. The thickness of the epidermis was then determined using histomorphometry software (Scion Image for Windows (NIH Image), Scion Corp., Frederick, MD, v. B4.0.2). The results were as follows:

| Genotype/phenotype    | Average thoracic skin thickness ( $\mu$ m) | Average abdominal skin thickness ( $\mu$ m) |
|-----------------------|--|---|
| Non-transgenic/normal | 5.2  | 5.4   |
| Transgenic/non-shiny  | 5.0  | 6.7   |
| Transgenic/shiny      | 8.2  | 7.4   |
| Transgenic/all        | 7.1  | 7.1   |

There were insufficient numbers of mice to determine statistical significance; however, the transgenics, especially those with shiny skin, tended to have a thicker epidermis than the non-shiny transgenics and non-transgenic controls. The shiny transgenics may have a higher expression level of IL-TIF than the non-shiny transgenics.; however, expression levels were not determined for these mice.

From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration,

WO 02/070655

PCT/US02/06267

173

various modifications may be made without deviating from the spirit and scope of the invention. Accordingly, the invention is not limited except as by the appended claims.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

174

## CLAIMS

I claim:

1. An isolated polypeptide, comprising at least 15 contiguous amino acid residues of an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from the group of:
  - (a) amino acid residues 24 to 230;
  - (b) amino acid residues 27 to 230;
  - (c) amino acid residues 27 to 126; and
  - (d) amino acid residues 131 to 230.
2. The isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from the group of:
  - (a) amino acid residues 24 to 230;
  - (b) amino acid residues 27 to 230;
  - (c) amino acid residues 27 to 126; and
  - (d) amino acid residues 131 to 230.
3. The isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide consists of an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from the group of:
  - (a) amino acid residues 24 to 230;
  - (b) amino acid residues 27 to 230;
  - (c) amino acid residues 27 to 126; and
  - (d) amino acid residues 131 to 230.
4. An isolated polypeptide, comprising an amino acid sequence that is at least 90% identical to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from the group of:
  - (a) amino acid residues 24 to 230;
  - (b) amino acid residues 27 to 230;

WO 02/070655

PCT/US02/06267

175

- (c) amino acid residues 27 to 126; and
- (d) amino acid residues 131 to 230.

5. The isolated polypeptide of claim 4, wherein the isolated polypeptide comprises an amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from the group of:

- (a) amino acid residues 24 to 230;
- (b) amino acid residues 27 to 230;
- (c) amino acid residues 27 to 126; and
- (d) amino acid residues 131 to 230.

6. An isolated nucleic acid molecule, wherein the nucleic acid molecule is either (a) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:39 or SEQ ID NO:49, or (b) a nucleic acid molecule that remains hybridized following stringent wash conditions to a nucleic acid molecule consisting of the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47, or the complement of the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47.

7. The isolated nucleic acid molecule of claim 6, wherein any difference between the amino acid sequence encoded by the nucleic acid molecule and the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is due to a conservative amino acid substitution.

8. The isolated nucleic acid molecule of claim 6, comprising the nucleotide sequence of nucleotides 8 to 697 or 77 to 697 or 86 to 697 of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47.

9. A vector, comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 8.

10. An expression vector, comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 8, a transcription promoter, and a transcription terminator, wherein the promoter is



WO 02/070655

PCT/US02/06267

176

operably linked with the nucleic acid molecule, and wherein the nucleic acid molecule is operably linked with the transcription terminator.

11. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 10, wherein the host cell is from the group of bacterium, yeast cell, fungal cell, insect cell, mammalian cell, and plant cell.

12. A method of producing mouse Zcytor16 protein, the method comprising culturing recombinant host cells that comprise the expression vector of claim 10, and that produce the mouse Zcytor16 protein.

13. The method of claim 12, further comprising isolating the mouse Zcytor16 protein from the cultured recombinant host cells.

14. An antibody or antibody fragment that binds with the polypeptide of claim 3.

15. The antibody of claim 14, wherein the antibody is from the group of: (a) polyclonal antibody, (b) murine monoclonal antibody, (c) humanized antibody derived from (b), and (d) human monoclonal antibody.

16. An anti-idiotypic antibody that specifically binds with the antibody of claim 14.

17. A fusion protein, comprising the polypeptide of claim 3.

18. The fusion protein of claim 17, wherein the fusion protein further comprises an immunoglobulin moiety.

19. An isolated polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues that is at least 90% identical to the

WO 02/070655

PCT/US02/06267

177

amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; and

wherein amino acid differences consist of conservative amino acid substitutions; and

wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide sequence binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

20. An isolated polynucleotide according to claim 19, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex.

21. An isolated polynucleotide according to claim 20, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

22. An isolated polynucleotide according to claim 20, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

23. An isolated polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex.

24. An isolated polynucleotide according to claim 23, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide further comprises a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

178

25. An isolated polynucleotide according to claim 23, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

26. An isolated polynucleotide according to claim 23, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further encodes an intracellular domain.

27. An isolated polynucleotide according to claim 23, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further comprises an affinity tag.

28. An expression vector comprising the following operably linked elements:

(a) a transcription promoter; a first DNA segment encoding a soluble cytokine receptor polypeptide having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; and a transcription terminator; and

(b) a second transcription promoter; a second DNA segment encoding a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide; and a transcription terminator; and

wherein the first and second DNA segments are contained within a single expression vector or are contained within independent expression vectors.

29. An expression vector according to claim 28, further comprising a secretory signal sequence operably linked to the first and second DNA segments.

30. An expression vector according to claim 28, wherein the second DNA segment encodes a polypeptide comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

WO 02/070655

PCT/US02/06267

179

31. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 28, wherein the cell expresses the polypeptides encoded by the DNA segments.

32. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 28, wherein the first and second DNA segments are located on independent expression vectors and are co-transfected into the cell, and cell expresses the polypeptides encoded by the DNA segments.

33. A cultured cell into which has been introduced an expression vector according to claim 28, wherein the cell expresses a heterodimeric or multimeric soluble receptor polypeptide encoded by the DNA segments.

34. A cell according to claim 31, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex.

35. A cell according to claim 31, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex that binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

36. A DNA construct encoding a fusion protein comprising:  
a first DNA segment encoding a polypeptide having a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230; and

at least one other DNA segment encoding a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide,

wherein the first and other DNA segments are connected in-frame; and

wherein the first and other DNA segments encode the fusion protein.

37. A DNA construct encoding a fusion protein according to claim 36, wherein at least one other DNA segment encodes a polypeptide comprising a soluble CRF2-4

WO 02/070655

PCT/US02/06267

180

receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

38. An expression vector comprising the following operably linked elements:

- a transcription promoter;
  - a DNA construct encoding a fusion protein according to claim 36; and
  - a transcription terminator,
- wherein the promoter is operably linked to the DNA construct, and the DNA construct is operably linked to the transcription terminator.

39. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 38, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA construct.

40. A method of producing a fusion protein comprising:
- culturing a cell according to claim 39; and
  - isolating the polypeptide produced by the cell.

41. An isolated soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues that is at least 90% identical to an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, and wherein the soluble cytokine receptor polypeptide binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

42. An isolated polypeptide according to claim 41, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex.

43. An isolated polypeptide according to claim 42, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

181

44. An isolated polypeptide according to claim 42, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

45. An isolated soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex.

46. An isolated polypeptide according to claim 45, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

47. An isolated polypeptide according to claim 45, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

48. An isolated polypeptide according to claim 45, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further comprises an affinity tag, chemical moiety, toxin, or label.

49. An isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex comprising soluble receptor subunits, wherein at least one of the soluble receptor subunits comprises a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

182

50. An isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex according to claim 49, further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide.

51. An isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex according to claim 49, further comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35), a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36), or soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

52. A method of producing a soluble cytokine receptor polypeptide that forms a heterodimeric or multimeric complex comprising:  
culturing a cell according to claim 31; and  
isolating the soluble receptor polypeptides produced by the cell.

53. A method of producing an antibody to soluble cytokine receptor polypeptide comprising:  
inoculating an animal with a soluble cytokine receptor polypeptide from the group of:

(a) a polypeptide comprising a monomeric or homodimeric soluble cytokine receptor comprising a polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230;

(b) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide;

(c) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble CRF2-4 receptor polypeptide (SEQ ID NO:35);

(d) a polypeptide of (a) further comprising a soluble cytokine receptor heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a soluble IL-10 receptor polypeptide (SEQ ID NO:36); and

WO 02/070655

PCT/US02/06267

183

wherein the polypeptide elicits an immune response in the animal to produce the antibody; and  
isolating the antibody from the animal.

54. An antibody produced by the method of claim 53, which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230.

55. The antibody of claim 54, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

56. An antibody which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex according to claim 49.

57. A method for inhibiting IL-TIF-induced proliferation or differentiation of hematopoietic cells and hematopoietic cell progenitors comprising culturing bone marrow or peripheral blood cells with a composition comprising an amount of soluble cytokine receptor polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230, sufficient to reduce proliferation or differentiation of the hematopoietic cells in the bone marrow or peripheral blood cells as compared to bone marrow or peripheral blood cells cultured in the absence of soluble cytokine receptor.

58. The method of claim 57, wherein the hematopoietic cells and hematopoietic progenitor cells are lymphoid cells.

59. The method of claim 58, wherein the lymphoid cells are macrophages or T cells.

60. A method of reducing IL-TIF-induced or IL-9 induced inflammation comprising administering to a mammal with inflammation an amount of a composition of a



WO 02/070655

PCT/US02/06267

184

polypeptide as shown in SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 from amino acid 24 to 230, or 27 to 230 sufficient to reduce inflammation.

61. A method of suppressing an inflammatory response in a mammal with inflammation comprising:

- (1) determining a level of serum amyloid A protein;
- (2) administering a composition comprising a soluble mouse Zcytor16 cytokine receptor polypeptide according to claim 41 in an acceptable pharmaceutical vehicle;
- (3) determining a post administration level of serum amyloid A protein;
- (4) comparing the level of serum amyloid A protein in step (1) to the level of serum amyloid A protein in step (3), wherein a lack of increase or a decrease in serum amyloid A protein level is indicative of suppressing an inflammatory response.

62. A method for detecting a cancer in a patient, comprising:

- obtaining a tissue or biological sample from a patient;
- incubating the tissue or biological sample with an antibody of claim 14 under conditions wherein the antibody binds to its complementary polypeptide in the tissue or biological sample;
- visualizing the antibody bound in the tissue or biological sample; and
- comparing levels of antibody bound in the tissue or biological sample from the patient to a normal control tissue or biological sample,
- wherein an increase in the level of antibody bound to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

63. A method for detecting a cancer in a patient, comprising:

- obtaining a tissue or biological sample from a patient;
- labeling a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47 or the complement of SEQ ID NO:37 or SEQ ID NO:47;
- incubating the tissue or biological sample with under conditions wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence;
- visualizing the labeled polynucleotide in the tissue or biological sample; and

WO 02/070655

PCT/US02/06267

185

comparing the level of labeled polynucleotide hybridization in the tissue or biological sample from the patient to a normal control tissue or biological sample,

wherein an increase in the labeled polynucleotide hybridization to the patient tissue or biological sample relative to the normal control tissue or biological sample is indicative of a cancer in the patient.

64. A transgenic mouse, wherein the mouse over-expresses residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48.

65. A transgenic mouse according to claim 64, wherein the expression of residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is expressed using a tissue-specific or tissue-restricted promoter.

66. A transgenic mouse according to claim 64, wherein the expression of residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48 is expressed using an epithelial-specific, colon-specific, or ovary-specific promoter.

67. A transgenic mouse according to claim 64, wherein the mouse does not express residues 1 to 230 or 24 to 230, or 27 to 230 of SEQ ID NO:38 or SEQ ID NO:48, relative to a normal mouse.

WO 02/070655

PCT/US02/06267

1/1

```

      10      20      30      40      50      60
hzcytor16  MMPKHCF LGFLISFFLTGVAGTQSTHESLKPQRVQFQSRNFHILQWQPGRALTGNSVY
           .....
mzcytor16  MMPKHCLLGLLI-ILLSSATEIQPARVSLTLQKVRFQSRNFHILHWQAGSSLPSNNSIY
           10      20      30      40      50

      70      80      90     100     110     120
hzcytor16  FVQYKIYGQRQWKNKEDCWGTQELSCDLTSETSDIQEPYGRVRAASAGSYSEWSMTPRF
           .....
mzcytor16  FVQYKMYGQSQWEDKVDGWTTALFCDLTNETLDPYELYYGRVMTACAGRHSWTRTPRF
           60      70      80      90     100     110

      130     140     150     160     170     180
hzcytor16  TPWWETKIDPPVMNITQVNGSLLVILHAPNLPYRYQKEKNVSIEDYYELLYRVFTINNSL
           .....
mzcytor16  TPWWETKLDPPVVTITRVNASLRVLLRPPELPNRNQSGKNASMETYYGLVYRVFTINNSL
           120     130     140     150     160     170

      190     200     210     220     230
hzcytor16  EKEQKVYEGAHRAVEIEALTPHSSYCVVAEIYQPMIDRRSQRSEERCVEIP
           .....
mzcytor16  EKEQKAYEGTQRAVEIEGLIPHSSYCVVAEMYQPMFDRRSPRSKERCVCQIP
           180     190     200     210     220     230
```

FIG. 1

WO 02/070655

PCT/US02/06267

1

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; ZymoGenetics, Inc.

&lt;120&gt; Mouse Cytokine Receptor

&lt;130&gt; 01-08

&lt;150&gt; US 60/273,035

&lt;151&gt; 2001-03-02

&lt;150&gt; US 60/279,232

&lt;151&gt; 2001-03-27

&lt;160&gt; 49

&lt;170&gt; FastSEQ for Windows Version 3.0

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2149

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)...(693)

&lt;400&gt; 1

|   |    |
|---|----|
| atg atg cct aaa cat tgc ttt cta ggc ttc etc atc agt ttc ttc ctt | 48 |
| Met Met Pro Lys His Cys Phe Leu Gly Phe Leu Ile Ser Phe Phe Leu |    |
| 1 5 10 15   |    |

|   |    |
|---|----|
| act ggt gta gca gga act cag tca acg cat gag tct ctg aag cct cag | 96 |
| Thr Gly Val Ala Gly Thr Gln Ser Thr His Glu Ser Leu Lys Pro Gln |    |
| 20 25 30  |    |

|   |     |
|---|-----|
| agg gta caa ttt cag tcc cga aat ttt cac aac att ttg caa tgg cag | 144 |
| Arg Val Gln Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu Gln Trp Gln |     |
| 35 40 45  |     |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

2

|   |     |
|---|-----|
| cct ggg agg gca ctt act ggc aac agc agt gtc tat ttt gtg cag tac | 192 |
| Pro Gly Arg Ala Leu Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr |     |
| 50 55 60  |     |
| aaa ata tat gga cag aga caa tgg aaa aat aaa gaa gac tgt tgg ggt | 240 |
| Lys Ile Tyr Gly Gln Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly |     |
| 65 70 75 80   |     |
| act caa gaa ctc tct tgt gac ctt acc agt gaa acc tca gac ata cag | 288 |
| Thr Gln Glu Leu Ser Cys Asp Leu Thr Ser Glu Thr Ser Asp Ile Gln |     |
| 85 90 95  |     |
| gaa cct tat tac ggg agg gtg agg gcg gcc tcg gct ggg agc tac tca | 336 |
| Glu Pro Tyr Tyr Gly Arg Val Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser |     |
| 100 105 110   |     |
| gaa tgg agc atg acg ccg cgg ttc act ccc tgg tgg gaa aca aaa ata | 384 |
| Glu Trp Ser Met Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile |     |
| 115 120 125   |     |
| gat cct cca gtc atg aat ata acc caa gtc aat ggc tct ttg ttg gta | 432 |
| Asp Pro Pro Val Met Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val |     |
| 130 135 140   |     |
| att ctc cat gct cca aat tta cca tat aga tac caa aag gaa aaa aat | 480 |
| Ile Leu His Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn |     |
| 145 150 155 160   |     |
| gta tct ata gaa gat tac tat gaa cta cta tac cga gtt ttt ata att | 528 |
| Val Ser Ile Glu Asp Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile |     |
| 165 170 175   |     |
| aac aat tca cta gaa aag gag caa aag gtt tat gaa ggg gct cac aga | 576 |
| Asn Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg |     |
| 180 185 190   |     |
| gcg gtt gaa att gaa gct cta aca cca cac tcc agc tac tgt gta gtg | 624 |
| Ala Val Glu Ile Glu Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val |     |
| 195 200 205   |     |
| gct gaa ata tat cag ccc atg tta gac aga aga agt cag aga agt gaa | 672 |
| Ala Glu Ile Tyr Gln Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser Glu |     |
| 210 215 220   |     |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

3

gag aga tgt gtg gaa att cca tgacttggtg aatttggcat tcagcaatgt 723  
 Glu Arg Cys Val Glu Ile Pro  
 225 230

ggaaattcta aagctccctg agaacaggat gactcgtgtt tgaaggatct tatttaaaat 783  
 tgtttttgta ttttcttaaa gcaatattca ctgttacacc ttggggactt ctttgtttat 843  
 ccattctttt atcctttata ttctatttta aactatattt gaacgacatt ccccccgaat 903  
 aattgeaatg taaagaigag gcagagaata aagtgttcta tgaattccag aactttatit 963  
 ctgaatgtaa catccctaact aacaaccttc attcttctaa tacagcaaaa taaaaattta 1023  
 acaaccaagg aatagtattt aagaaaatgt tgaataaatt tttttaaaat agcattacag 1083  
 actgaggcgg tcttgaagca atgggttttc actctcttat tgagccaatt aaattgacat 1143  
 tgcctttgaca atttaaaact tctataaagg tgaataattt tcatacattt ctattttata 1203  
 tgaatatact ttttatatat ttattattat taaatatctt tacttaatga atcaaaatit 1263  
 tgttttaag tctactttat gtaataaga acagggtttt gggaaaaaa tcttatgatt 1323  
 tctggattga tatctgaatt aaaactatca acaacaagga agtctactct gtacaattgt 1383  
 ccctcattta aagatatat taagcttttc ttttctgttt gtttttgttt tgttttagtt 1443  
 ttaatctgtt cttagaagaa cttatcttta ttctcaaaat taaatgtaat ttttttagtg 1503  
 acaagaagaa aaggaaacct cattactcaa tcttctggc caagagtgtc ttgcttggtg 1563  
 cgcttctctc atctctatat aggaggatcc catgaatgat ggtttatttg gaactgctgg 1623  
 ggtcgacccc atacagagaa ctcagcttga agctggaagc acacagtggg tagcaggaga 1683  
 aggaccgggt ttggtagggt cctacagaga ctatagagct agacaaagcc ctccaaactg 1743  
 gcccctctct ctcactgcct ctcttgagta gaaatctggt gacctaaagg tcagtgcggt 1803  
 caacagaaaag ctgccttctt cacttgaggc taagtcttca tatatgttta aggttgctct 1863  
 tctagtggag agalacatat cagagaacat ttgtacaatt ccccatgaaa attgctccaa 1923  
 agttgataac aatatagtcg gtgcttctag ttatatgcaa gtactcagt ataatggat 1983  
 taaaaaatat tcagaaaatgt attggggggg ggaggagaat aagaggcaga gcaagagcta 2043  
 gagaattggt ttccttgctt cctgttatgc tcagaaaaca ttgatttgag catagacgca 2103  
 gagactgaaa aaaaaaaaaa gctcgagcgg ccgcatatc cttggt 2149

<210> 2  
 <211> 231  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 2  
 Met Met Pro Lys His Cys Phe Leu Gly Phe Leu Ile Ser Phe Phe Leu  
 1 5 10 15  
 Thr Gly Val Ala Gly Thr Gln Ser Thr His Glu Ser Leu Lys Pro Gln  
 20 25 30  
 Arg Val Gln Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu Gln Trp Gln  
 35 40 45  
 Pro Gly Arg Ala Leu Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr

WO 02/070655

PCT/US02/06267

4

```

      50          55          60
Lys Ile Tyr Gly Gln Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly
65          70          75          80
Thr Gln Glu Leu Ser Cys Asp Leu Thr Ser Glu Thr Ser Asp Ile Gln
      85          90          95
Glu Pro Tyr Tyr Gly Arg Val Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser
100          105          110
Glu Trp Ser Met Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile
115          120          125
Asp Pro Pro Val Met Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val
130          135          140
Ile Leu His Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn
145          150          155          160
Val Ser Ile Glu Asp Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile
165          170          175
Asn Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg
180          185          190
Ala Val Glu Ile Glu Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val
195          200          205
Ala Glu Ile Tyr Gln Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser Glu
210          215          220
Glu Arg Cys Val Glu Ile Pro
225          230

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 693

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> This degenerate nucleotide sequence encodes the  
amino acid sequence of SEQ ID NO:2

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)...(693)

&lt;223&gt; n = A,T,C or G

&lt;400&gt; 3

```

atgatgccna arcaytytt yytnggntty ytnathwsnt tyttyytnac ngngtngcn      60
ggnacncarw snacncayga rwsnytnaar ccncarmng tncarttyca rwsnmgaay      120
ttycayaaya thytncartg gcarccnggn mgngcnytna cnggnaayws nwsngntay      180
tygtncart ayaarathta yggncarmgn cartggaara ayaargarga ytgytggggn      240
acncargary tnwsntgyga yytnacwnsn garacnwsng ayathcarga rccntaytay      300

```

WO 02/070655

PCT/US02/06267

5

```

ggnmgngtnm gngcngcnws ngcnggnwsn taywsngart ggwsnatgac nccnmghtty 360
acncntgggt gggaracnaa rathgayccn ccngtnatga ayathacna rgtnaayggn 420
wsnytnytn gtnathtnca ygcncnaay ytnccntaym gntaycaraa rgaraaraay 480
gtwnsnathg argaytayta ygarytnytn taymgngtnt tyathathaa yaaywsnytn 540
garaargarc araargtnta ygargngcn caymgngcng tngarathga rgcnynhacn 600
ccncaywsnw sntaytyggt ngtrngcngar athtaycanc cnatgytnga ymgngmgnwsn 660
carmgnwsng argarmngtg ygtngarath ccn 693

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 16

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Peptide linker.

&lt;400&gt; 4

```

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1           5           10          15

```

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 699

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 5

```

gagcccagat cttcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gccccagcacc tgaagccgag 60
ggggccaccgt cagtcttctt cttcccccca aaaccaaaagg acaccctcat gatctcccgg 120
acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 300
ggcaaggagt acaagtgcac ggtctccaac aaagccctcc catctccat cgagaaaacc 360
atctccaaag ccaaaggcca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 420
gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaggctt ctatcccagc 480
gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
ccgtgctgg actccgacgg ctctctcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaataaa 699

```

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence



WO 02/070655

PCT/US02/06267

6

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC29181  
  
<400> 6  
gcggatccac tcagtaacg catgagtctc tg 32  
  
<210> 7  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
  
<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC29182  
  
<400> 7  
gcagatcttg gaatttccac acatctctct tca 33  
  
<210> 8  
<211> 108  
<212> DNA  
<213> Homo sapiens  
  
<220>  
<221> CDS  
<222> (1)...(108)  
  
<400> 8  
atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg ctg tgt ggc 48  
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val Leu Leu Leu Cys Gly  
1 5 10 15  
  
gcc gtc ttc gtt tcg ctc agc cag gaa atc cat gcc gag ttg aga cgc 96  
Ala Val Phe Val Ser Leu Ser Gln Glu Ile His Ala Glu Leu Arg Arg  
20 25 30  
  
ttc cgt aga tcc 108  
Phe Arg Arg Ser  
35  
  
<210> 9  
<211> 36

WO 02/070655

PCT/US02/06267

7

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 9

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Asp | Ala | Met | Lys | Arg | Gly | Leu | Cys | Cys | Val | Leu | Leu | Leu | Cys | Gly |
| 1   |     |     | 5   |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |     |     |
| Ala | Val | Phe | Val | Ser | Leu | Ser | Gln | Glu | Ile | His | Ala | Glu | Leu | Arg | Arg |
|     |     |     | 20  |     |     | 25  |     |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| Phe | Arg | Arg | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Glu-Glu (CEE) Tag amino acid sequence

&lt;400&gt; 10

|     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Glu | Tyr | Met | Pro | Met | Glu |
| 1   |     |     | 5   |     |     |

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 8

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FLAG Tag amino acid sequence

&lt;400&gt; 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Tyr | Lys | Asp | Asp | Asp | Asp | Lys |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; His Tag amino acid sequence

WO 02/070655

PCT/US02/06267

8

<400> 12  
 His His His His His His  
 1 5

<210> 13  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 13  
 Thr Gln Ser Thr His Glu Ser Leu Lys Pro Gln Arg Val Gln Phe Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu Gln Trp Gln Pro Gly Arg Ala Leu  
 20 25 30  
 Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr Lys Ile Tyr Gly Gln  
 35 40 45  
 Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly Thr Gln Glu Leu Ser  
 50 55 60  
 Cys Asp Leu Thr Ser Glu Thr Ser Asp Ile Gln Glu Pro Tyr Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Arg Val Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser Glu Trp Ser Met Thr  
 85 90 95  
 Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile Asp Pro Pro Val Met  
 100 105 110  
 Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val Ile Leu His Ala Pro  
 115 120 125  
 Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn Val Ser Ile Glu Asp  
 130 135 140  
 Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile Asn Asn Ser Leu Glu  
 145 150 155 160  
 Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg Ala Val Glu Ile Glu  
 165 170 175  
 Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val Ala Glu Ile Tyr Gln  
 180 185 190  
 Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser Glu Glu Arg Cys Val Glu  
 195 200 205  
 Ile Pro  
 210

<210> 14  
 <211> 1116  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens

WO 02/070655

PCT/US02/06267

9

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (21)...(557)

&lt;400&gt; 14

|   |     |
|---|-----|
| tcgagttaga attgtctgca atg gcc gcc ctg cag aaa tct gtg agc tct ttc | 53  |
| Met Ala Ala Leu Gln Lys Ser Val Ser Ser Phe                       |     |
| 1 5 10  |     |
| ctt atg ggg acc ctg gcc acc agc tgc ctc ctt ctc ttg gcc ctc ttg   | 101 |
| Leu Met Gly Thr Leu Ala Thr Ser Cys Leu Leu Leu Ala Leu Leu       |     |
| 15 20 25  |     |
| gta cag gga gga gca gct gcg ccc atc agc tcc cac tgc agg ctt gac   | 149 |
| Val Gln Gly Gly Ala Ala Ala Pro Ile Ser Ser His Cys Arg Leu Asp   |     |
| 30 35 40  |     |
| aag tcc aac ttc cag cag ccc tat atc acc aac cgc acc ttc atg ctg   | 197 |
| Lys Ser Asn Phe Gln Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Arg Thr Phe Met Leu   |     |
| 45 50 55  |     |
| gct aag gag gct agc ttg gct gat aac aac aca gac gtt cgt ctc att   | 245 |
| Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile   |     |
| 60 65 70 75   |     |
| ggg gag aaa ctg ttc cac gga gtc agt atg agt gag cgc tgc tat ctg   | 293 |
| Gly Glu Lys Leu Phe His Gly Val Ser Met Ser Glu Arg Cys Tyr Leu   |     |
| 80 85 90  |     |
| atg aag cag gtg ctg aac ttc acc ctt gaa gaa gtg ctg ttc cct caa   | 341 |
| Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr Leu Glu Glu Val Leu Phe Pro Gln   |     |
| 95 100 105  |     |
| tct gat agg ttc cag cct tat atg cag gag gtg gtg ccc ttc ctg gcc   | 389 |
| Ser Asp Arg Phe Gln Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Ala   |     |
| 110 115 120   |     |
| agg ctc agc aac agg cta agc aca tgt cat att gaa ggt gat gac ctg   | 437 |
| Arg Leu Ser Asn Arg Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu   |     |
| 125 130 135   |     |
| cat atc cag agg aat gtg caa aag ctg aag gac aca gtg aaa aag ctt   | 485 |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

10

His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu  
 140 145 150 155

gga gag agt gga gag atc aaa gca att gga gaa ctg gat ttg ctg ttt 533  
 Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe  
 160 165 170

atg tct ctg aga aat gcc tgc att tgaccagagc aaagctgaaa aatgaataac 587  
 Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Ile  
 175

taacccccctt tccctgctag aaataacaat tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca 647  
 aaaggaagat gggaaagccaa actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt 707  
 tagttacaaa ggaaccaat gccacttttg tttataagac cagaaggtag actttctaag 767  
 catagatatt tattgataac atttcattgt aactgggtgt ctatacacag aaaacaattt 827  
 attttttaaa taattgtctt ttccataaaa aaagattact ttccattcct ttaggggaaa 887  
 aaacccctaa atagcttcat gtttccataa tcagtacttt atattataa atgtatttat 947  
 tattattata agactgcatt ttatttatat cattttatta atatggattt atttatagaa 1007  
 acatcattcg atattgctac ttgagtgtaa ggctaataat gatatttatg acaataatta 1067  
 tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatattccta 1116

<210> 15  
 <211> 179  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

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

WO 02/070655

PCT/US02/06267

11

Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn  
 130 135 140  
 Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
 165 170 175  
 Ala Cys Ile

<210> 16  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer ZC25963

<400> 16  
 agtcaacgca tgagtctctg aag 23

<210> 17  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer ZC28354

<400> 17  
 accaacaag agccattgac ttg 23

<210> 18  
 <211> 23  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer ZC21195

<400> 18  
 gaggagacca taacccccga cag 23

<210> 19

WO 02/070655

PCT/US02/06267

12

<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC21196.

<400> 19  
catagctccc accacacgat ttt 23

<210> 20  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC14063

<400> 20  
caccagacat aatagctgac agact 25

<210> 21  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC17574

<400> 21  
ggtrttgctc agcatgcaca c 21

<210> 22  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC17600

<400> 22  
catgtaggcc atgaggtcca ccac 24

PCT/US02/06267

<210> 23  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<223> Oligonucleotide primer ZC27659

<400> 23  
tcaagctgag ttctctgtat gg 22

```
<210> 24
<211> 2831
<212> DNA
<213> Homo sapiens
```

<220>  
<221> CDS  
<222> (34)...(1755)

<400> 24  
tagaggccaa gggagggctc tgtgccagcc ccg atg agg acg ctg ctg acc atc 54  
Met Arg Thr Leu Leu Thr Ile

1 5

ttg act gtg gga tcc ctg gct gct cac gcc cct gag gac ccc tcg gat 102  
Leu Thr Val Gly Ser Leu Ala Ala His Ala Pro Glu Asp Pro Ser Asp  
10 15 20

ctg ctc cag cac gtg aaa ttc cag tcc agc aac ttt gaa aac atc ctg 150  
Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser Asn Phe Glu Asn Ile Leu  
25 30 35

acg tgg gac agc ggg cca gag ggc acc cca gac acg gtc tac agc atc 198  
 Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro Asp Thr Val Tyr Ser Ile  
 40 45 50 55

gag tat aag acg tac gga gag agg gac tgg gtg gca aag aag ggc tgt 246  
Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp Val Ala Lys Lys Gly Cys  
60 65 70

cag cgg atc acc cgg aag tcc tgc aac ctg acg gtg gag acg ggc aac 294  
Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu Thr Val Glu Thr Gly Asn



WO 02/070655

PCT/US02/06267

14

| 75  | 80  | 85  |     |
|---|-----|-----|-----|
| ctc acg gag ctc tac tat gcc agg gtc acc gct gtc agt gcg gga ggc |     |     | 342 |
| Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly |     |     |     |
| 90  | 95  | 100 |     |
| cgg tca gcc acc aag atg act gac agg ttc agc tct ctg cag cac act |     |     | 390 |
| Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr |     |     |     |
| 105   | 110 | 115 |     |
| acc ctc aag cca cct gat gtg acc tgt atc tcc aaa gtg aga tcg att |     |     | 438 |
| Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile |     |     |     |
| 120   | 125 | 130 | 135 |
| cag atg att gtt cat cct acc ccc acg cca atc cgt gca ggc gat ggc |     |     | 486 |
| Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro Ile Arg Ala Gly Asp Gly |     |     |     |
| 140   | 145 | 150 |     |
| cac cgg cta acc ctg gaa gac atc ttc cat gac ctg ttc tac cac tta |     |     | 534 |
| His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu |     |     |     |
| 155   | 160 | 165 |     |
| gag ctc cag gtc aac cgc acc tac caa atg cac ctt gga ggg aag cag |     |     | 582 |
| Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln |     |     |     |
| 170   | 175 | 180 |     |
| aga gaa tat gag ttc ttc gcc ctg acc cct gac aca gag ttc ctt gcc |     |     | 630 |
| Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly |     |     |     |
| 185   | 190 | 195 |     |
| acc atc atg att tgc gtt ccc acc tgg gcc aag gag agt gcc ccc tac |     |     | 678 |
| Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr |     |     |     |
| 200   | 205 | 210 | 215 |
| atg tgc cga gtg aag aca ctg cca gac cgg aca tgg acc tac tcc ttc |     |     | 726 |
| Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe |     |     |     |
| 220   | 225 | 230 |     |
| tcc gga gcc ttc ctg ttc tcc atg gcc ttc ctc gtc gca gta ctc tgc |     |     | 774 |
| Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Ala Val Leu Cys |     |     |     |
| 235   | 240 | 245 |     |
| tac ctg agc tac aga tat gtc acc aag ccg cct gca cct ccc aac tcc |     |     | 822 |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

15

|   |      |
|---|------|
| Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser |      |
| 250 255 260   |      |
| ctg aac gtc cag cga gtc ctg act ttc cag ccg ctg cgc ttc atc cag | 870  |
| Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln |      |
| 265 270 275   |      |
| gag cac gtc ctg atc cct gtc ttt gac ctc agc ggc ccc agc agt ctg | 918  |
| Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu |      |
| 280 285 290 295   |      |
| gcc cag cct gtc cag tac tcc cag atc agg gtg tct gga ccc agg gag | 966  |
| Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu |      |
| 300 305 310   |      |
| ccc gca gga gct cca cag ccg cat agc ctg tcc gag atc acc tac tta | 1014 |
| Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu |      |
| 315 320 325   |      |
| ggg cag cca gac atc tcc atc ctc cag ccc tcc aac gtg cca cct ccc | 1062 |
| Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln Pro Ser Asn Val Pro Pro Pro |      |
| 330 335 340   |      |
| cag atc ctc tcc cca ctg tcc tat gcc cca aac gct gcc cct gag gtc | 1110 |
| Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val |      |
| 345 350 355   |      |
| ggg ccc cca tcc tat gca cct cag gtg acc ccc gaa gct caa ttc cca | 1158 |
| Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro |      |
| 360 365 370 375   |      |
| ttc tac gcc cca cag gcc atc tct aag gtc cag cct tcc tcc tat gcc | 1206 |
| Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala |      |
| 380 385 390   |      |
| cct caa gcc act ccg gac agc tgg cct ccc tcc tat ggg gta tgc atg | 1254 |
| Pro Gln Ala Thr Pro Asp Ser Trp Pro Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met |      |
| 395 400 405   |      |
| gaa ggt tct gcc aaa gac tcc ccc act ggg aca ctt tct agt cct aaa | 1302 |
| Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys |      |
| 410 415 420   |      |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

16

|  |                      |
|--|----------------------|
| cac ctt agg cct aaa ggt cag ctt cag aaa gag cca cca gct gga agc<br>His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser<br>425 430 435  | 1350                 |
| tgc atg tta ggt ggc ctt tct ctg cag gag gtg acc tcc ttg gct atg<br>Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln Glu Val Thr Ser Leu Ala Met<br>440 445 450 455  | 1398                 |
| gag gaa tcc caa gaa gca aaa tca ttg cac cag ccc ctg ggg att tgc<br>Glu Glu Ser Gln Glu Ala Lys Ser Leu His Gln Pro Leu Gly Ile Cys<br>460 465 470  | 1446                 |
| aca gac aga aca tct gac cca aat gtg cta cac agt ggg gag gaa ggg<br>Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val Leu His Ser Gly Glu Glu Gly<br>475 480 485  | 1494                 |
| aca cca cag tac cta aag ggc cag ctc ccc ctc ctc tcc tca gtc cag<br>Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln<br>490 495 500  | 1542                 |
| atc gag ggc cac ccc atg tcc ctc cct ttg caa cct cct tcc ggt cca<br>Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro Leu Gln Pro Pro Ser Gly Pro<br>505 510 515  | 1590                 |
| tgt tcc ccc tgg gac caa ggt cca agt ccc tgg ggc ctg ctg gag tcc<br>Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser<br>520 525 530 535  | 1638                 |
| ctt gtg tgt ccc aag gat gaa gcc aag agc cca gcc cct gag acc tca<br>Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser<br>540 545 550  | 1686                 |
| gac ctg gag cag ccc aca gaa ctg gat tct ctt ttc aga ggc ctg gcc<br>Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala<br>555 560 565  | 1734                 |
| ctg act gtg cag tgg gag tcc tgaggggaat gggaaaggct tggcgcttcc<br>Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser<br>570   | 1785                 |
| tcctgtgcc taccagtggt cacatccttg gctgtcaatc ccatgcctgc ccatgccaca<br>cactctgcga tctggcctca gacgggtgcc cttgagagaa gcagaggag tggcatgcag<br>ggccctgcc atgggtgcgc tcctcaccgg aacaaagcag catgataagg actgcagcgg | 1845<br>1905<br>1965 |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

17

```

gggagctctg gggagcagct tgtgtagaca agcgcgtgct cgtgagccc tgaaggcag 2025
aatgacagct gcaaggagga aatgcaggga aactcccgag gtccagagcc ccacctcta 2085
acaccatgga ttcaaatgac tcagggaatt tgctctctct tgcctcattc ctggccagtt 2145
tcacaatcta gctcgacaga gcatgaggcc cctgcctctt ctgtcattgt tcaaaagtgg 2205
gaagagagcc tggaaaagaa ccaggcctgg aaaagaacca gaaggaggct gggcagaacc 2265
agaacaacct gcacttctgc caaggccagg gccagcagga cggcaggact ctaggagggg 2325
gtgtggcctg cagctcattc ccagccaggg caactgcctg acgttgacg atttcagctt 2385
cattcctctg atagaacaaa gcgaaatgca ggtccaccag ggaggaggac acacaagcct 2445
tttctcagg caggagtttc agacctatc ctgagaatgg ggttgaaag gaaggtagg 2505
gctgtggccc ctggacgggt acaataacac actgtactga tgtcacaaact ttgcaagctc 2565
tgcttgggt tcagcccatc tgggctcaaa ttccagctc accactcaca agctgtgtga 2625
cttcaacaaa atgaaatcag tgcccagaac ctgggtttcc tcactctgaa tgtggggatc 2685
ataacaccta cctcatggag ttgtggtaga gatgaaatga agtcattgtc ttaaagtgtc 2745
taatagtgcc tggtagatgg gcagtgcaca ataaacgta gctatttaaa aaaaaaaaaa 2805
aaaaaaaaa atagcgccg cctcga 2831

```

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 574

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 25

```

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

```

WO 02/070655

PCT/US02/06267

18

```

165          170          175
Met His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr
180          185          190
Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp
195          200          205
Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp
210          215          220
Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly
225          230          235          240
Phe Leu Val Ala Val Leu Cys Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys
245          250          255
Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe
260          265          270
Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp
275          280          285
Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile
290          295          300
Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser
305          310          315          320
Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln
325          330          335
Pro Ser Asn Val Pro Pro Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala
340          345          350
Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val
355          360          365
Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys
370          375          380
Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala Pro Gln Ala Thr Pro Asp Ser Trp Pro
385          390          395          400
Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr
405          410          415
Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln
420          425          430
Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln
435          440          445
Glu Val Thr Ser Leu Ala Met Glu Glu Ser Gln Glu Ala Lys Ser Leu
450          455          460
His Gln Pro Leu Gly Ile Cys Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val
465          470          475          480
Leu His Ser Gly Glu Glu Gly Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu
485          490          495
Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro
500          505          510

```

WO 02/070655

PCT/US02/06267

19

Leu Gln Pro Pro Ser Gly Pro Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser  
           515                  520                  525  
 Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys  
           530                  535                  540  
 Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp  
           545                  550                  555                  560  
 Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser  
                   565                  570

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide linker ZC13252

&lt;400&gt; 26

ggcctgaaag ctctggataa tgaaggtacc tgtagaaa

39

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide linker ZC13453

&lt;400&gt; 27

ttaggatccg gcccttcccc agatact

27

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 36

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer ZC28590

&lt;400&gt; 28

ttgggtacct ctgcaatggc cgcctgcag aaatct

36

&lt;210&gt; 29

WO 02/070655

PCT/US02/06267

20

<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC28580

<400> 29  
ttgggaacca atgcaggcat ttctcagaga cat 33

<210> 30  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC25963

<400> 30  
agtcaacgca tgagtctctg aag 23

<210> 31  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC25964

<400> 31  
gttcttgagt accccaacag tct 23

<210> 32  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Oligonucleotide primer ZC14666

<400> 32  
agccaccaag atgactga 18

WO 02/070655

PCT/US02/06267

21

<210> 33  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer ZC14742

<400> 33  
 tgcatttggt aggtgcggtt ga

22

<210> 34  
 <211> 211  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 34  
 Pro Glu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Gln His Val Lys Phe Gln Ser Ser  
 1 5 10 15  
 Asn Phe Glu Asn Ile Leu Thr Trp Asp Ser Gly Pro Glu Gly Thr Pro  
 20 25 30  
 Asp Thr Val Tyr Ser Ile Glu Tyr Lys Thr Tyr Gly Glu Arg Asp Trp  
 35 40 45  
 Val Ala Lys Lys Gly Cys Gln Arg Ile Thr Arg Lys Ser Cys Asn Leu  
 50 55 60  
 Thr Val Glu Thr Gly Asn Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr  
 65 70 75 80  
 Ala Val Ser Ala Gly Gly Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe  
 85 90 95  
 Ser Ser Leu Gln His Thr Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile  
 100 105 110  
 Ser Lys Val Arg Ser Ile Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Pro  
 115 120 125  
 Ile Arg Ala Gly Asp Gly His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His  
 130 135 140  
 Asp Leu Phe Tyr His Leu Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met  
 145 150 155 160  
 His Leu Gly Gly Lys Gln Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro  
 165 170 175  
 Asp Thr Glu Phe Leu Gly Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala  
 180 185 190  
 Lys Glu Ser Ala Pro Tyr Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg  
 195 200 205



WO 02/070655

PCT/US02/06267

22

Thr Trp Thr  
210

<210> 35  
<211> 199  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 35  
Met Val Pro Pro Pro Glu Asn Val Arg Met Asn Ser Val Asn Phe Lys  
1 5 10 15  
Asn Ile Leu Gln Trp Glu Ser Pro Ala Phe Ala Lys Gly Asn Leu Thr  
20 25 30  
Phe Thr Ala Gln Tyr Leu Ser Tyr Arg Ile Phe Gln Asp Lys Cys Met  
35 40 45  
Asn Thr Thr Leu Thr Glu Cys Asp Phe Ser Ser Leu Ser Lys Tyr Gly  
50 55 60  
Asp His Thr Leu Arg Val Arg Ala Glu Phe Ala Asp Glu His Ser Asp  
65 70 75 80  
Trp Val Asn Ile Thr Phe Cys Pro Val Asp Thr Ile Ile Gly Pro  
85 90 95  
Pro Gly Met Gln Val Glu Val Leu Ala Asp Ser Leu His Met Arg Phe  
100 105 110  
Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr Met Lys Asn  
115 120 125  
Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys Asn Gly Thr  
130 135 140  
Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu Val Leu Arg  
145 150 155 160  
Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg Gly Phe Leu  
165 170 175  
Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val Cys Glu Gln  
180 185 190  
Thr Thr His Asp Glu Thr Val  
195

<210> 36  
<211> 211  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 36  
Ser Asp Ala His Gly Thr Glu Leu Pro Ser Pro Pro Ser Val Trp Phe

WO 02/070655

PCT/US02/06267

23

```

1         5         10        15
Glu Ala Glu Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn
20
Gln Ser Glu Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile
35
Glu Ser Trp Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp
50
Leu Thr Ala Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala
65
Arg Val Arg Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr Val Thr
85
Asn Thr Arg Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val
100
Asn Leu Glu Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro
115
Arg Pro Lys Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser
130
His Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe
145
Thr Phe Thr His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu Leu Thr
165
Ser Gly Glu Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala
180
Ser Arg Ser Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu
195
Thr Arg Gln
210

<210> 37
<211> 2464
<212> DNA
<213> Mus musculus

<220>
<221> CDS
<222> (8)...(697)

<400> 37
ggcaacc atg atg cct aag cat tgc ctt cta ggt ctc ctc atc ata ctc 49
Met Met Pro Lys His Cys Leu Leu Gly Leu Leu Ile Ile Leu
1         5         10

ttg agc agt gca aca gaa ata caa cca gct cgt gta tct ctg acg ctc 97

```

PCT/US02/06267

| Leu<br>15  | Ser        | Ala        | Thr        | Glu<br>20  | Ile        | Gln        | Pro        | Ala        | Arg<br>25  | Val        | Ser        | Leu        | Thr        | Leu<br>30  |            |     |
|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|-----|
| cag<br>Gln | aag<br>Lys | gtc<br>Val | cga<br>Arg | ttt<br>Phe | cag<br>Gln | tcc<br>Ser | aga<br>Arg | aat<br>Asn | ttc<br>Phe | cac<br>His | aat<br>Asn | att<br>Ile | ttg<br>Leu | cac<br>His | tgg<br>Trp | 145 |
|            |            |            |            | 35         |            |            |            |            | 40         |            |            |            | 45         |            |            |     |
| caa<br>Gln | gca<br>Ala | ggg<br>Gly | agc<br>Ser | tct<br>Ser | ctc<br>Leu | ccc<br>Pro | agc<br>Ser | aac<br>Asn | agc<br>Asn | atc<br>Ser | tac<br>Ile | ttt<br>Tyr | gtg<br>Phe | cag<br>Val |            | 193 |
|            |            |            |            | 50         |            |            |            | 55         |            |            |            |            | 60         |            |            |     |
| tac<br>Tyr | aag<br>Lys | atg<br>Met | tat<br>Tyr | gga<br>Gly | cag<br>Gln | agc<br>Ser | caa<br>Gln | tgg<br>Trp | gaa<br>Glu | gat<br>Asp | aaa<br>Lys | gtt<br>Val | gac<br>Asp | tgc<br>Cys | tgg<br>Trp | 241 |
|            |            |            |            | 65         |            |            |            | 70         |            |            |            |            | 75         |            |            |     |
| ggg<br>Gly | acc<br>Thr | acg<br>Thr | gcg<br>Ala | ctc<br>Leu | ttc<br>Phe | tgt<br>Cys | gac<br>Asp | ctg<br>Leu | acc<br>Thr | aat<br>Asn | gaa<br>Glu | acc<br>Thr | tta<br>Leu | gac<br>Asp | cca<br>Pro | 289 |
|            |            |            |            | 80         |            |            | 85         |            |            |            | 90         |            |            |            |            |     |
| tac<br>Tyr | gag<br>Glu | ctg<br>Leu | tat<br>Tyr | tac<br>Tyr | ggg<br>Gly | agg<br>Arg | gtg<br>Val | atg<br>Met | acg<br>Thr | gcc<br>Ala | tgt<br>Cys | gct<br>Ala | gga<br>Gly | cgc<br>Arg | cac<br>His | 337 |
|            |            |            |            | 95         |            | 100        |            |            |            | 105        |            |            |            |            | 110        |     |
| tct<br>Ser | gcc<br>Ala | tgg<br>Trp | acc<br>Thr | agg<br>Arg | aca<br>Thr | ccc<br>Pro | cgc<br>Arg | ttc<br>Phe | act<br>Thr | cca<br>Pro | tgg<br>Trp | tgg<br>Trp | gaa<br>Glu | aca<br>Thr | aaa<br>Lys | 385 |
|            |            |            |            |            | 115        |            |            |            | 120        |            |            |            |            | 125        |            |     |
| cta<br>Leu | gat<br>Asp | cct<br>Pro | ccg<br>Pro | gtc<br>Val | gtg<br>Val | act<br>Thr | ata<br>Ile | acc<br>Thr | cga<br>Arg | gtt<br>Val | aac<br>Asn | gca<br>Ala | tct<br>Ser | ttg<br>Leu | cgg<br>Arg | 433 |
|            |            |            |            | 130        |            |            |            | 135        |            |            |            |            | 140        |            |            |     |
| gtg<br>Val | ctt<br>Leu | ctc<br>Leu | cgt<br>Leu | cct<br>Pro | cca<br>Pro | gag<br>Glu | ttg<br>Glu | cca<br>Pro | aat<br>Asn | aga<br>Arg | aac<br>Asn | caa<br>Gln | agt<br>Ser | gga<br>Gly | aaa<br>Lys | 481 |
|            |            |            |            | 145        |            |            | 150        |            |            |            |            | 155        |            |            |            |     |
| aat<br>Asn | gca<br>Ala | tcc<br>Ser | atg<br>Met | gaa<br>Glu | act<br>Thr | tac<br>Tyr | ggc<br>Tyr | tta<br>Gly | gta<br>Leu | tac<br>Val | aga<br>Tyr | gtt<br>Arg | ttc<br>Val | aca<br>Phe |            | 529 |
|            |            |            |            | 160        |            |            | 165        |            |            |            | 170        |            |            |            |            |     |
| atc<br>Ile | aac<br>Asn | aat<br>Asn | tca<br>Ser | cta<br>Leu | gag<br>Glu | aag<br>Glu | gag<br>Glu | caa<br>Gln | aaa<br>Lys | gcc<br>Ala | tat<br>Tyr | gaa<br>Glu | gga<br>Gly | act<br>Thr | cag<br>Gln | 577 |
|            | 175        |            |            |            | 180        |            |            |            |            | 185        |            |            |            | 190        |            |     |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

25

aga gct gtt gaa att gaa ggt ctg ata cct cat tcc agc tac tgc gta 625  
 Arg Ala Val Glu Ile Glu Gly Leu Ile Pro His Ser Ser Tyr Cys Val  
 195 200 205

gtg gct gaa atg tac cag ccc atg ttt gac aga aga agc cca aga agc 673  
 Val Ala Glu Met Tyr Gln Pro Met Phe Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ser  
 210 215 220

aag gag aga tgt gtg cag att cca tgaactgggc tgaggcgcta aaaccggaag 727  
 Lys Glu Arg Cys Val Gln Ile Pro  
 225 230

catattgaga acaggatgtc ttctgcctag aacagcttac taaacttctg ttttgatttt 787  
 cttagagcaa tgtctacca cacttttcaa ggaattcttt gtcagtactt tcttttctgt 847  
 ttatttcagt tataaagtaa atttgaacag attcaaaaat agaattttaa gagaaggtaa 907  
 agaataaaga tcttgtggtt aggcacatct ttaatccag cattgaaagg cagaatcagt 967  
 cagatctctg acttttgggc caacctgggc tgcatagaga gttccagggt agccaggggc 1027  
 acacaatgag accatgcac aacatgataa gatgttaaga tagaaatggt ctataaaaaa 1087  
 tggaagctta tctgaatata tcaaccttaa caataatctt ttttctgggt taacctctaa 1147  
 ataagaalca ataatagta ggcatttaaat aaatgttgta ataagtttta aggtattata 1207  
 tatagaaaat cctgcaacaa taattttata ttctattaag ccttttattt tgccagagat 1267  
 atactgattt aatattttgt gtgaatgagt atacttctgt gcatttttat tttatattaa 1327  
 tgtctttttt atttcttata aggtatttct acttagtgaa ctatctctct aaaaaataac 1387  
 ttgtggctct gaattgatct ctagaataag attttcaata atagcatgta aatctgaag 1447  
 aaaatcttca taatgcaatt tcccatcact taacacataa tcttagtaag aatacccttt 1507  
 ctggttttgc ttttaatagt gccttagaat ttaacctatg ttgtctaaat gcagcatata 1567  
 tttttcagca gcaaagacag aagaacata taagccacag tgataactca gccattcagg 1627  
 caaagtggcc tctctgtcca cagaatgaga gttgggctgg agacactgga gtccatacag 1687  
 gaacctgtac ttgaagccaa aggcacacag tggatgctta aattatttct gagattataa 1747  
 ggaattcac agccctgtgg actacactgc atctcctgag caatgatcag gtggcctaag 1807  
 gctcaaaaag tgaccagctt ttctaagcct ttctctagct cttgagctta gactatcagc 1867  
 tactgaaat acatgtagga gagaacattt gtgatcttta tgaagatgc tccaaaatat 1927  
 aactctgaaa agtatagtcg gtacgtctgt ctcttactgt tttttaatgg taaatggta 1987  
 cagaccatta agaacataag agacatgtga aaagcaagag cattgtcctg cctgtcctgt 2047  
 gtgttcagaa aacactggcc ttcatcttta tttttgaatt attcaatttt tatttctitt 2107  
 gtggcttagt acctgcttgg gaattctttg ggtttttgt tcgtgttttg tttattttct 2167  
 attttgtact ttgggaaggg tgagatttga gaaggataac tctcttttgg gaatcaggac 2227  
 catgtgtggt cccagcattt aggttgtaag actcagtagt ctaattctct ataatacaaa 2287  
 aggcaattgt tggtttatga gtgtgtcag caatcagagt tttgctttga cttgttttgc 2347  
 ttgggttttc cctcacacaa gtataagatg ctttgaata tattacgatt ttcacattct 2407  
 ggaatcagtt aagaatatat tgtctaagta cttcaataaa tcttactttg tacttta 2464

&lt;210&gt; 38

WO 02/070655

PCT/US02/06267

26

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 38

```

Met Met Pro Lys His Cys Leu Leu Gly Leu Leu Ile Ile Leu Leu Ser
 1           5           10           15
Ser Ala Thr Glu Ile Gln Pro Ala Arg Val Ser Leu Thr Leu Gln Lys
 20           25           30
Val Arg Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu His Trp Gln Ala
 35           40           45
Gly Ser Ser Leu Pro Ser Asn Asn Ser Ile Tyr Phe Val Gln Tyr Lys
 50           55           60
Met Tyr Gly Gln Ser Gln Trp Glu Asp Lys Val Asp Cys Trp Gly Thr
 65           70           75           80
Thr Ala Leu Phe Cys Asp Leu Thr Asn Glu Thr Leu Asp Pro Tyr Glu
 85           90           95
Leu Tyr Tyr Gly Arg Val Met Thr Ala Cys Ala Gly Arg His Ser Ala
100           105           110
Trp Thr Arg Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Leu Asp
115           120           125
Pro Pro Val Val Thr Ile Thr Arg Val Asn Ala Ser Leu Arg Val Leu
130           135           140
Leu Arg Pro Pro Glu Leu Pro Asn Arg Asn Gln Ser Gly Lys Asn Ala
145           150           155           160
Ser Met Glu Thr Tyr Tyr Gly Leu Val Tyr Arg Val Phe Thr Ile Asn
165           170           175
Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Ala Tyr Glu Gly Thr Gln Arg Ala
180           185           190
Val Glu Ile Glu Gly Leu Ile Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val Ala
195           200           205
Glu Met Tyr Gln Pro Met Phe Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ser Lys Glu
210           215           220
Arg Cys Val Gln Ile Pro
225           230

```

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 690

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Degenerate polynucleotide sequence of SEQ ID NO:38

WO 02/070655

PCT/US02/06267

27

<221> misc\_feature  
 <222> (1)...(690)  
 <223> n = A,T,C or G

<400> 39  
 atgatgccna arcaytgyt nytnngnytn ytnathathy tnytnwsnws ngcnaengar 60  
 athcarccng cmngntnws nytnacnytn caraargtnm gnttycarws nmgnaytyt 120  
 cayaayathy tncaytggca rgcnggnwsn wsnytnccnw snaayaayws nathtaytyt 180  
 gtncartaya aratgtaygg ncarwsncar tgggargaya argtngaytg ytggggnacn 240  
 acngcnytn tytggyayyt nacnaaygar acnytngayc cntaygaryt ntaytayggn 300  
 mgngtnatga cngcrtgygc nggnmgncay wsgcngtga cmgnacncc nmgnityacn 360  
 cctgtgtggg aracnaaryt ngayccnccn gtngtnacna thacnmngt naaygcwnsn 420  
 ytnmgntny tnytnmgnc nccngarytn cnaaymgna aycarwsngg naaraaygcn 480  
 wsnatggara cntaytaygg nytngtntay mgngntntya cnathaayaa ywsnytngr 540  
 aargarcara argcntayga rgnacncar mgngcngtn arathgargg nytnathccn 600  
 caywsnwsnt aytgygtngt ngcngaratg taycarccna tgttygaymg nmgnwsnccn 660  
 mgnwsnaarg armgntgygt ncarathccn 690

<210> 40  
 <211> 1050  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus

<220>  
 <221> CDS  
 <222> (50)...(589)

<400> 40  
 aacaggctct cctctcactt atcaactttt gacacttggt cgatcggtg atg gct gtc 58  
 Met Ala Val  
 1  
 ctg cag aaa tct atg agt ttt tcc ctt atg ggg act ttg gcc gcc agc 106  
 Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu Ala Ala Ser  
 5 10 15  
 tgc ctg ctt ctc att gcc ctg tgg gcc cag gag gca aat gcg ctg ccc 154  
 Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn Ala Leu Pro  
 20 25 30 35  
 atc aac acc cgg tgc aag ctt gag gtg tcc aac ttc cag cag ccg tac 202  
 Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln Gln Pro Tyr

WO 02/070655

PCT/US02/06267

28

| 40  | 45  | 50  |     |
|---|-----|-----|-----|
| atc gtc aac cgc acc ttt atg ctg gcc aag gag gcc agc ctt gca gat   |     |     | 250 |
| Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu Ala Asp   |     |     |     |
| 55  | 60  | 65  |     |
| aac aac aca gac gtc cgg ctg atc ggg gag aaa ctg ttc cga gga gtc   |     |     | 298 |
| Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe Arg Gly Val   |     |     |     |
| 70  | 75  | 80  |     |
| agt gct aag gat cag tgc tac ctg atg aag cag gtg ctg aac ttc acc   |     |     | 346 |
| Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn Phe Thr   |     |     |     |
| 85  | 90  | 95  |     |
| ctg gaa gac att ctg ctg ccc cag tca gac agg ttc cgg ccc tac atg   |     |     | 394 |
| Leu Glu Asp Ile Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Arg Pro Tyr Met   |     |     |     |
| 100   | 105 | 110 | 115 |
| cag gag gtg gtg cct ttc ctg acc aaa ctg agc aat cag ctg agc tcc   |     |     | 442 |
| Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu Ser Ser   |     |     |     |
| 120   | 125 | 130 |     |
| tgt cac atc agt ggt gac gac cag aac atc cag aag aat gtc aga agg   |     |     | 490 |
| Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn Val Arg Arg   |     |     |     |
| 135   | 140 | 145 |     |
| ctg aag gag aca gtg aaa aag ctt gga gag agc gga gag atc aaa gcg   |     |     | 538 |
| Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile Lys Ala   |     |     |     |
| 150   | 155 | 160 |     |
| atc ggg gaa ctg gac ctg ctg ttt atg tct ctg aga aat gct tgc gtc   |     |     | 586 |
| Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala Cys Val   |     |     |     |
| 165   | 170 | 175 |     |
| tga gcgagaagaa gctagaaaac gaagaactgc tccttctgc cttctaaaaa         |     |     | 639 |
| *   |     |     |     |
| gaacaataag atccctgaat ggactttttt actaaaggaa agtgagaagc taacgtccac |     |     | 699 |
| catcattaga agatttcaca tgaacactgg ctcaattgaa agagaaaata gtgtcaagt  |     |     | 759 |
| gtccatgaga ccagaggtag acttgataac cacaagatt cattgacaat atttattgt   |     |     | 819 |
| cattgataat gcaacagaaa aagtatgtac tttaaaaaat tgtttgaaag gaggttacct |     |     | 879 |
| ctcattcctc tagaagaaaa gcctatgtaa cttcatttcc ataaccaata ctttatatat |     |     | 939 |

WO 02/070655

PCT/US02/06267

29

gtaagtttat ttattataag tatacatttt atttatgtca gtttattaat atggatttat 999  
 ttatagaaaa attatctgat gttgatattt gagtataaag caaataatat t 1050

<210> 41  
 <211> 179  
 <212> PRT  
 <213> Mus musculus

<400> 41  
 Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu  
 1 5 10 15  
 Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn  
 20 25 30  
 Ala Leu Pro Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln  
 35 40 45  
 Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser  
 50 55 60  
 Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe  
 65 70 75 80  
 Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu  
 85 90 95  
 Asn Phe Thr Leu Glu Asp Ile Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Arg  
 100 105 110  
 Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln  
 115 120 125  
 Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn  
 130 135 140  
 Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu  
 145 150 155 160  
 Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn  
 165 170 175  
 Ala Cys Val

<210> 42  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Oligonucleotide primer ZC10651  
 <400> 42



WO 02/070655

PCT/US02/06267

30

agcttttctg cagcagctct

20

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 23

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer ZC10565

&lt;400&gt; 43

tttgagaaa aggttgcaaa tgc

23

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer ZC38001

&lt;400&gt; 44

ccgttcgtga ctataaccg

20

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Oligonucleotide primer ZC38022

&lt;400&gt; 45

agccgtagta agtttccat

19

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 4

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; SXWS polypeptide motif

WO 02/070655

PCT/US02/06267

31

<221> VARIANT  
 <222> (1)...(4)  
 <223> Xaa = Any Amino Acid  
  
 <400> 46  
 Ser Xaa Trp Ser  
 1  
  
 <210> 47  
 <211> 707  
 <212> DNA  
 <213> Mus musculus  
  
 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (2)...(691)  
  
 <400> 47  
 c atg atg cct aag cat tgc ctt cta ggt ctc ctc atc ata ctc ttg agc 49  
 Met Met Pro Lys His Cys Leu Leu Gly Leu Leu Ile Ile Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
  
 agt gca aca gaa ata caa cca gct cgt gta tct ctg acg ccc cag aag 97  
 Ser Ala Thr Glu Ile Gln Pro Ala Arg Val Ser Leu Thr Pro Gln Lys  
 20 25 30  
  
 gtc cga ttt cag tcc aga aat ttc cac aat att ttg cac tgg caa gca 145  
 Val Arg Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu His Trp Gln Ala  
 35 40 45  
  
 ggg agc tct ctc ccc agc aac aac agc atc tac ttt gtg cag tac aag 193  
 Gly Ser Ser Leu Pro Ser Asn Asn Ser Ile Tyr Phe Val Gln Tyr Lys  
 50 55 60  
  
 atg tat gga cag agc caa tgg gaa gat aaa gtt gac tgc tgg ggg acc 241  
 Met Tyr Gly Gln Ser Gln Trp Glu Asp Lys Val Asp Cys Trp Gly Thr  
 65 70 75 80  
  
 acg gcg ctc ttc tgt gac ctg acc aat gaa acc tta gac cca tac gag 289  
 Thr Ala Leu Phe Cys Asp Leu Thr Asn Glu Thr Leu Asp Pro Tyr Glu  
 85 90 95  
  
 ctg tat tac ggg agg gtg atg acg gcc tgt gct gga cgc cac tct gcc 337

WO 02/070655

PCT/US02/06267

32

Leu Tyr Tyr Gly Arg Val Met Thr Ala Cys Ala Gly Arg His Ser Ala  
 100 105 110  
 tgg acc agg aca ccc cgc ttc act cca tgg tgg gaa aca aaa cta gat 385  
 Trp Thr Arg Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Leu Asp  
 115 120 125  
 cct cgg gtc gtg act ata acc cga gtt aac gca tct ttg cgg gtg ctt 433  
 Pro Pro Val Val Thr Ile Thr Arg Val Asn Ala Ser Leu Arg Val Leu  
 130 135 140  
 ctc cgt cct cca gag ttg cca aat aga aac caa agt gga aaa aat gca 481  
 Leu Arg Pro Pro Glu Leu Pro Asn Arg Asn Gln Ser Gly Lys Asn Ala  
 145 150 155 160  
 tcc atg gaa act tac tac ggc tta gta tac aga gtt ttc aca atc aac 529  
 Ser Met Glu Thr Tyr Tyr Gly Leu Val Tyr Arg Val Phe Thr Ile Asn  
 165 170 175  
 aat tca cta gag aag gag caa aaa gcc tat gaa gga act cag aga gct 577  
 Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Ala Tyr Glu Gly Thr Gln Arg Ala  
 180 185 190  
 gtt gaa att gaa ggt ctg ata cct cat tcc agc tac tgc gta gtg gct 625  
 Val Glu Ile Glu Gly Leu Ile Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val Ala  
 195 200 205  
 gaa atg tac cag ccc atg ttt gac aga aga agc cca aga agc aag gag 673  
 Glu Met Tyr Gln Pro Met Phe Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ser Lys Glu  
 210 215 220  
 aga tgt gtg cac att cca tgaactggtc tgaggc 707  
 Arg Cys Val His Ile Pro  
 225 230

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 230

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 48

Met Met Pro Lys His Cys Leu Leu Gly Leu Leu Ile Ile Leu Leu Ser

WO 02/070655

PCT/US02/06267

33

```

1           5           10           15
Ser Ala Thr Glu Ile Gln Pro Ala Arg Val Ser Leu Thr Pro Gln Lys
                20           25           30
Val Arg Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu His Trp Gln Ala
                35           40           45
Gly Ser Ser Leu Pro Ser Asn Asn Ser Ile Tyr Phe Val Gln Tyr Lys
                50           55           60
Met Tyr Gly Gln Ser Gln Trp Glu Asp Lys Val Asp Cys Trp Gly Thr
        65           70           75           80
Thr Ala Leu Phe Cys Asp Leu Thr Asn Glu Thr Leu Asp Pro Tyr Glu
                85           90           95
Leu Tyr Tyr Gly Arg Val Met Thr Ala Cys Ala Gly Arg His Ser Ala
                100           105           110
Trp Thr Arg Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Leu Asp
        115           120           125
Pro Pro Val Val Thr Ile Thr Arg Val Asn Ala Ser Leu Arg Val Leu
        130           135           140
Leu Arg Pro Pro Glu Leu Pro Asn Arg Asn Gln Ser Gly Lys Asn Ala
        145           150           155           160
Ser Met Glu Thr Tyr Tyr Gly Leu Val Tyr Arg Val Phe Thr Ile Asn
                165           170           175
Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Ala Tyr Glu Gly Thr Gln Arg Ala
                180           185           190
Val Glu Ile Glu Gly Leu Ile Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val Ala
        195           200           205
Glu Met Tyr Gln Pro Met Phe Asp Arg Arg Ser Pro Arg Ser Lys Glu
        210           215           220
Arg Cys Val His Ile Pro
        225           230

```

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 690

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Degenerate polynucleotide sequence of SEQ ID NO:48

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)...(690)

&lt;223&gt; n = A,T,C or G

&lt;400&gt; 49

WO 02/070655

PCT/US02/06267

34

|   |     |
|---|-----|
| atgatgccna arcaytgyyt nytnngnytn ytnathathy tnytnwsnws ngcnacngar | 60  |
| athcarccng cnmgngtnws nytnacnccn caraargtnm gnttycarws nmgnaaayty | 120 |
| cayaayathy tncaytgga rcnggnwns wsnytnccnw snaayaayws nathtayty    | 180 |
| gtncartaya aratgtaygg ncarwsncar tgggargaya argtngaytg ytggggnacn | 240 |
| acngcnytn tnytgyayyt nacnaaygar acnytngayc cntaygaryt ntaytayggn  | 300 |
| mgngtnatga cngcntgygc nggnmgncay wsngcntgga cnmgnaccc nmgnityacn  | 360 |
| ccntgggtgg aracnaaryt ngayccnccn gtngtnacna thacnmngt naaygcwns   | 420 |
| ytngmgntny tnytnmgnc ccngarytn ccnaaymgna aycarwsngg naaraaygcn   | 480 |
| wsnatggara cntaytaygg nytngtntay mgngntntya cnathaayaa ywsnytngar | 540 |
| aargarcara argcntayga rggnacncar mgngcngtng arathgargg nytnathccn | 600 |
| caywsnwsnt aytgygtngt ngcngaratg taycarccna tgtygaymg nmgnwsnccn  | 660 |
| mgwnsnaarg armngtygt ncayathccn                                   | 690 |

## 【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
12 September 2002 (12.09.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/070655 A3

- (51) International Patent Classification: C12P 21/06. A61K 38/00, C07K 16/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/06267
- (22) International Filing Date: 4 March 2002 (04.03.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/273,035 2 March 2001 (02.03.2001) US  
60/279,232 27 March 2001 (27.03.2001) US
- (71) Applicant: ZYMOGENETICS, INC. [US/US]; 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).
- (72) Inventors: PRESNELL, Scott, R.; 2902 N. Puget Sound Avenue, Tacoma, WA 98407 (US). XU, Wenfeng; 12432 54th Avenue West, Mukilteo, WA 98275 (US). KINDSVOGEL, Wayne; 6014 24th Avenue Northeast, Seattle, WA 98115 (US). CHEN, Zhi; 1321 Minor Avenue, Apartment B504, Seattle, WA 98101 (US).
- (74) Agent: JOHNSON, Jennifer, K.; ZymoGenetics, Inc., 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).
- (81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GR, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KR, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:  
with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 16 October 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/070655 A3

(54) Title: MOUSE CYTOKINE RECEPTOR

(57) Abstract: Cytokine and their receptors have proven usefulness in both basic research, animal models, and as therapeutics. The present invention provides a new cytokine receptor designated as "mouse Zcytor16," which can bind and antagonize the IL-TIF cytokine.

## 【 国際調査報告 】

| <b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>  |  | International application No.<br>PCT/US02/06267                       |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
|---|--|---|--|--|-----------------------|---|--|----------------------------|---|---|----------------------------|---|---|----------------------------|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>IPC(7) : C12P 21/06; A61K 38/00; C07K 16/00<br>US CL : 435/69.1; 514/2; 530/350<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |  |   |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>U.S. : 435/69.1; 514/2; 530/350<br><br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>NONE<br><br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)<br>AFS, CAS ONLINE   |  |   |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b> <table border="1" style="width: 100%;"> <thead> <tr> <th style="width: 10%;">Category *</th> <th style="width: 70%;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="width: 20%;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>BORK ET AL. Predicting functions from protein sequences where are the bottlenecks? Nature Genetics. 18 April 1998, Vol. 18, pp. 313-318.</td> <td>1-5, 17, 18, 41-51, and 53</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PEER BORK. Powers and Pitfalls in Sequence Analysis: The 70% Hurdle. Genome Research. 2000, Vol. 10, pages 398-400.</td> <td>1-5, 17, 18, 41-51, and 53</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PEER BORK. Go hunting in sequence databases but watch out for the traps. TIG. October 1996, Vol. 12, No. 10, pages 425-426.</td> <td>1-5, 17, 18, 41-51, and 53</td> </tr> </tbody> </table>  |  |   | Category *   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. | A | BORK ET AL. Predicting functions from protein sequences where are the bottlenecks? Nature Genetics. 18 April 1998, Vol. 18, pp. 313-318. | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53 | A | PEER BORK. Powers and Pitfalls in Sequence Analysis: The 70% Hurdle. Genome Research. 2000, Vol. 10, pages 398-400. | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53 | A | PEER BORK. Go hunting in sequence databases but watch out for the traps. TIG. October 1996, Vol. 12, No. 10, pages 425-426. | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53 |
| Category *  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| A   | BORK ET AL. Predicting functions from protein sequences where are the bottlenecks? Nature Genetics. 18 April 1998, Vol. 18, pp. 313-318.   | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53  |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| A   | PEER BORK. Powers and Pitfalls in Sequence Analysis: The 70% Hurdle. Genome Research. 2000, Vol. 10, pages 398-400.  | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53  |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| A   | PEER BORK. Go hunting in sequence databases but watch out for the traps. TIG. October 1996, Vol. 12, No. 10, pages 425-426.  | 1-5, 17, 18, 41-51, and 53  |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |   |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           * Special categories of cited documents:<br/>           "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br/>           "B" earlier application or patent published on or after the international filing date<br/>           "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br/>           "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br/>           "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed         </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">           "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br/>           "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br/>           "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br/>           "Z" document member of the same patent family         </td> </tr> </table> |  |   | * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"Z" document member of the same patent family |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"B" earlier application or patent published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed  | "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"Z" document member of the same patent family |   |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| Date of the actual completion of the international search<br>04 April 2003 (04.04.2003)   |  | Date of mailing of the international search report<br>17 APR 2003     |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |
| Name and mailing address of the ISA/US<br>Commissioner of Patents and Trademarks<br>Box PCT<br>Washington, D.C. 20531<br>Facsimile No. (703)305-3230  |  | Authorizing officer<br>David L. Higgins<br>Telephone No. 703-308-0196 |  |  |                       |   |  |                            |   |   |                            |   |   |                            |

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT   |                                     | International application No.<br>PCT/US02/06267   |
|---|-------------------------------------|---|
| <b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)</b>  |                                     |   |
| This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:   |                                     |   |
| 1.  | <input type="checkbox"/>            | Claim Nos.:<br>because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:   |
| 2.  | <input type="checkbox"/>            | Claim Nos.:<br>because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:            |
| 3.  | <input type="checkbox"/>            | Claim Nos.:<br>because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).  |
| <b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)</b>  |                                     |   |
| This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:<br>See The Invitation to pay Additional Fees mailed on March 7, 2003. |                                     |   |
| 1.  | <input type="checkbox"/>            | As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.  |
| 2.  | <input type="checkbox"/>            | As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.  |
| 3.  | <input type="checkbox"/>            | As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:                                    |
| 4.  | <input checked="" type="checkbox"/> | No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-5, 17, 18, 41-51, 53 |
| Remark on Protest   | <input type="checkbox"/>            | The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.   |
|   | <input type="checkbox"/>            | No protest accompanied the payment of additional search fees.   |



## フロントページの続き

| (51)Int.Cl. <sup>7</sup> | F I            | テーマコード(参考) |
|--------------------------|----------------|------------|
| A 6 1 K 38/00            | A 6 1 P 29/00  | 4 C 0 8 7  |
| A 6 1 P 29/00            | A 6 1 P 43/00  | 4 H 0 4 5  |
| A 6 1 P 43/00            | C 0 7 K 14/715 |            |
| C 0 7 K 14/715           | C 0 7 K 16/28  |            |
| C 0 7 K 16/28            | C 0 7 K 16/42  |            |
| C 0 7 K 16/42            | C 0 7 K 19/00  |            |
| C 0 7 K 19/00            | C 1 2 N 1/15   |            |
| C 1 2 N 1/15             | C 1 2 N 1/19   |            |
| C 1 2 N 1/19             | C 1 2 N 1/21   |            |
| C 1 2 N 1/21             | C 1 2 P 21/02  | C          |
| C 1 2 N 5/10             | C 1 2 P 21/08  |            |
| C 1 2 P 21/02            | C 1 2 Q 1/68   | A          |
| C 1 2 P 21/08            | G 0 1 N 33/574 | D          |
| C 1 2 Q 1/68             | G 0 1 N 33/574 | Z          |
| G 0 1 N 33/574           | C 1 2 N 5/00   | A          |
|                          | A 6 1 K 37/02  |            |

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

フロッピー

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 プレスネル, スコット アール.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 4 0 7, タコマ, ノース ピュジェット サウンド アベニュー  
2 9 0 2

(72)発明者 シュー, ウェンフェン

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, トゥエンティフィフス プレイス ノース  
イースト 8 8 0 9

(72)発明者 カインズボーゲル, ウェイン

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 1 5, シアトル, トゥエンティフォース アベニュー ノース  
イースト 6 0 1 4

(72)発明者 チェン, ジー

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 0 6, ベルビュー, サウスイースト シックスティファース  
ト プレイス 1 3 9 2 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 BA63 CA01 CA07 GA11 HA12 HA15

4B063 QA19 QQ02 QQ52 QQ79 QQ96 QR32 QR48 QR56 QS33 QS34  
QX01

4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA01 DA14

4B065 AA91Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA08 BA22 BA23 CA53 MA02 NA14

ZB11 ZB21

|       |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| 4C087 | AA01 | AA02 | AA03 | BB34 | BB43 | BB44 | MA02 | NA14 | ZB11 | ZB21 |
| 4H045 | AA10 | AA11 | BA10 | BA41 | CA40 | DA50 | DA76 | EA28 | EA51 | FA74 |