

(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2005-503765

(P2005-503765A)

(43) 公表日 平成17年2月10日(2005.2.10)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N 4 B O 6 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04	4 C O 8 4
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06	4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 425 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-576617 (P2002-576617)	(71) 出願人	500049831
(86) (22) 出願日	平成14年3月22日 (2002. 3. 22)		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26日 (2003. 9. 26)		イド
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/008811		アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 2
(87) 国際公開番号	W02002/077174		, 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10月3日 (2002. 10. 3)		イースト 1 2 0 1
(31) 優先権主張番号	60/279, 222	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成13年3月27日 (2001. 3. 27)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			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】 ヒト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、基本的研究において及び治療剤として有用であることが分かっている。本発明は、“Zcytor16”として命名された新規ヒトサイトカイン受容体を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) アミノ酸残基 28～127；
- (b) アミノ酸残基 132～231；
- (c) アミノ酸残基 28～231；
- (d) アミノ酸残基 23～230；
- (e) アミノ酸残基 23～231；及び
- (f) アミノ酸残基 22～230；

から成る群からの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 2】

前記ポリペプチドが、

- (a) アミノ酸残基 28～127；
- (b) アミノ酸残基 132～231；
- (c) アミノ酸残基 28～231；
- (d) アミノ酸残基 23～230；
- (e) アミノ酸残基 23～231；及び
- (f) アミノ酸残基 22～230；

から成る群から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。

【請求項 3】

前記単離されたポリペプチドが、配列番号 2 のいずれかのアミノ酸残基 28～231を含んで成る請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 4】

(a) 配列番号 3 のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、あるいは (b) 配列番号 1 のヌクレオチド 64、67、82もしくは 94～693のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子にストリンジェントな洗浄条件の後にハイブリダイズして残る核酸分子、又は配列番号 1 のヌクレオチド 64、67、82もしくは 94～694のヌクレオチド配列の相補体から成る核酸分子、あるいは (c) 配列番号 1 もしくは 37、又は配列番号 1 もしくは 37のヌクレオチド配列の相補体のいずれかである単離された核酸分子。

【請求項 5】

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 3 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 4 記載の単離された核酸分子。

【請求項 6】

配列番号 1 のヌクレオチド 64～693もしくは 82～693のヌクレオチド配列を含んで成る請求項 4 記載の単離された核酸分子。

【請求項 7】

請求項 6 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 8】

請求項 6 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作用可能に連結され、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 9】

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 8 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 10】

タンパク質の生成方法であって、請求項 8 記載の発現ベクターを含んで成り、そして前記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 11】

前記培養された組換え宿主細胞から前記タンパク質を単離することをさらに含んで成る請

10

20

30

40

50

求項10記載の方法。

【請求項12】

請求項2記載の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。

【請求項13】

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)前記(b)に由来するヒト型化抗体、(d)抗体フラグメント、及び(e)ヒトモノクローナル抗体から成る群からである請求項12記載の抗体。

【請求項14】

請求項12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15】

請求項2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16】

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15記載の融合タンパク質。

【請求項17】

アミノ酸28～231からの配列番号2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し、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と結合するか、又はIL-TIF活性と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18】

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17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項19】

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17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項20】

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17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項21】

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17記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項22】

次の作用可能に連結された要素：

(a) 転写プロモーター；アミノ酸28～231からの配列番号2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；並びに

(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。

【請求項23】

前記第1 及び第2 DNAセグメントに作用可能に連結された分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項22記載の発現ベクター。

【請求項24】

10

20

30

40

50

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22記載の発現ベクター。

【請求項25】

請求項22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。

【請求項26】

請求項22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。

10

【請求項27】

請求項22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する培養された細胞。

【請求項28】

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25記載の細胞。

【請求項29】

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25記載の細胞。

20

【請求項30】

下記成分：

アミノ酸28～231からの配列番号2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。

30

【請求項31】

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30記載のDNA構造体。

【請求項32】

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30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。

40

【請求項33】

請求項32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。

【請求項34】

融合タンパク質の生成方法であって、請求項33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35】

50

アミノ酸28～231からの配列番号2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し、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36】

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35記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項37】

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35記載の単離されたポリペプチド。

【請求項38】

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35記載の単離されたポリペプチド。

【請求項39】

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28～231からの配列番号2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40】

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39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41】

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zcytorII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39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42】

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25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43】

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28～231からの配列番号2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の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

50

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 44】

アミノ酸28～231からの配列番号2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43記載の方法により生成される抗体。

【請求項 45】

前記抗体がモノクローナル抗体である請求項44記載の抗体。

【請求項 46】

請求項39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 47】

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28～231からの配列番号2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 48】

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47記載の方法。

【請求項 49】

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48記載の方法。 20

【請求項 50】

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28～231からの配列番号2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 51】

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；

(2) 医薬的に許容できるピークル中、請求項35記載の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を投与し； 30

(3) 血清アミロイドAタンパク質の後一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 52】

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12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 53】

IL-TIF又は血清アミロイドAが役割を演じる炎症性疾患を有する哺乳類の処理方法であって、

炎症が減じられるよう、前記哺乳類にIL-TIF又は血清アミロイドAのアンタゴニストを投与することを含んで成り、ここで前記アンタゴニストが、 50

- (a) 配列番号2のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント；
- (b) 配列番号34のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメントを含んで成る可溶性受容体；
- (c) 配列番号2のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメントを特異的に結合する抗体；及び
- (d) IL-TIFのポリペプチド又はポリペプチドフラグメント（配列番号15）を特異的に結合する抗体又は結合ポリペプチドから成る群からである方法。

【請求項54】

前記疾患が慢性炎症性疾患である請求項53記載の方法。

【請求項55】

10

前記疾患が、

- (a) 炎症性腸疾患；
- (b) 潰瘍性大腸炎；
- (c) クローン病；
- (d) 関節炎；及び
- (e) 乾癬から成る群からの慢性炎症性疾患である請求項54記載の方法。

【請求項56】

前記疾患が急性炎症性疾患である請求項53記載の方法。

【請求項57】

20

前記疾患が、

- (a) 内毒素血症；
- (b) 敗血症；
- (c) 毒性ショック症候群；及び
- (d) 感染性疾患から成る群からの急性炎症性疾患である請求項56記載の方法。

【請求項58】

zcytor11のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント（配列番号34）を含んで成る前記アンタゴニスト可溶性受容体がさらに、CRF2-4のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント（配列番号35）を含んで成る請求項53記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

30

【0001】

本発明は一般的に、ヒト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、“Zcytor 16”と称する受容体をコードする新規遺伝子、及び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。

【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⁺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】

サイトカインと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と結合し、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

50

こ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。

【0004】

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】

【0005】

本発明は、“Zcytor 16”と称する新規受容体を提供する。本発明はまた、Zcytor 16ポリペプチド及びZcytor 16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法を提供する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0006】

1. 概観：

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及び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：

【0007】

【化1】

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

【0008】

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（配列番号38においても示される）での推定上のシグナル配列、及び配列番号2の残基23～231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。

【0009】

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、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。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。

【0010】

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）一様モチーフ；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。開始メチオニン（配列番号37のヌクレオチド237）の上流に、脊椎動物において翻訳に特有なコンセンサスKozak配列に包含される停止コドン（TGA）を含む5'側未翻訳領域（UTR）（配列番号37のヌクレオチド1～236）を含む、十分な長さのmRNA及び従ってcDNAが、配列番号37で示される。さらに、3'側UTR（配列番号37のヌクレオチド933～1610）は、mRNA安定性モチーフ（例えば、配列番号37のヌクレオチド1458～1465）及びポリA末端を含む。

10

【0011】

下記のように、本発明は、（a）アミノ酸残基28～127；（b）アミノ酸残基132～231；（c）アミノ酸残基28～231；（d）アミノ酸残基23～230；（e）アミノ酸残基23～231；及び（f）アミノ酸残基22～230；（g）アミノ酸残基22～231；及び（h）アミノ酸残基1～231から成る群から選択された、配列番号2の対照アミノ酸配列に対して少なくとも70%、少なくとも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し、ここで前記単離されたポリペプチドは、配列番号2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。

20

【0012】

例示的ポリペプチドは、配列番号2のアミノ酸残基22～231又は配列番号2のアミノ酸残基28～231のいずれかを含んで成るポリペプチドを包含する。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）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。

【0013】

本発明はまた、（a）アミノ酸残基28～127；（b）アミノ酸残基132～231；（c）アミノ酸残基28～231；（d）アミノ酸残基23～230；（e）アミノ酸残基23～231；及び（f）アミノ酸残基22～230；（g）アミノ酸残基22～231；及び（h）アミノ酸残基1～231から成る群から選択された、配列番号2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）～（h）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。

30

【0014】

本発明はまた、本発明はまた、変異体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2のアミノ酸残基22～231、又は28～231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2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。

40

【0015】

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型化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

50

ペプチド、又は抗体を含んで成る組成物を提供する。

【0016】

本発明はまた、(a) 配列番号3のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b) 配列番号2のアミノ酸残基22-231又は配列番号2のアミノ酸残基28-231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1のヌクレオチド64又は82-690又は693のヌクレオチド配列又は配列番号1のヌクレオチド64又は82-690又は693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、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。

【0017】

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2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1のヌクレオチド64、67、82、又は94-690又は693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。

【0018】

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。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Zcytor 16タンパク質を単離することによって、Zcytor 16ポリペプチドを調製するために使用され得る。

【0019】

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。

【0020】

本発明はまた、生物学的サンプルにおける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) 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1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1のヌクレオチド配列から成る：ヌクレオチド64、67、82又は94-690又は693；ヌクレオチド64、67、82又は94-369または381；394-690；及びヌクレオチド1-690又は693。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。

【0021】

本発明はさらに、生物学的サンプルにおける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2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

10

20

30

40

50

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。

【0022】

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1のヌクレオチド64、67、82、又は94～693のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、(b) 配列番号1のヌクレオチド配列のヌクレオチド64、67、82、又は94～693の補体を含んで成る核酸分子、(c) 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、及び(d) 少なくとも8個のヌクレオチドから成る(b)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、Zcytor 16タンパク質の検出のためのキットは、配列番号2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。

10

【0023】

本発明はまた、配列番号2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2のアミノ酸残基22～231、又は28～231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。

20

【0024】

本発明はさらに、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Zcytor 16分泌シグナル配列は、配列番号2の残基1～21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、エリトロポエチン、及びトロンプオエチンを包含する。さらに、本発明は、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Zcytor 16分泌シグナル配列は、配列番号2の残基1～21のアミノ酸配列を含んで成る。

30

【0025】

本発明はまた、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。

【0026】

本発明はまた、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) 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2のアミノ酸22～231、又は22～210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。

40

【0027】

本発明はまた、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)、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。

50

【0028】

本発明はまた、患者における遺伝子異常性を決定するための方法を提供し、ここで患者から遺伝子サンプルを得；配列番号1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1の補体を含んで成るポリヌクレオチドと共に、前記遺伝子サンプルを、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であろう条件下でインキュベートすることによって、第1反応生成物を生成し；前記第1反応生成物を可視化し；そして野生型患者からの対照反応生成物に、前記第1反応生成物を比較し、前記第1反応生成物と前記対照反応生成物との間の差異が患者における遺伝子異常性の表示である。

【0029】

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。

【0030】

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1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1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。

【0031】

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。

【0032】

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。

【0033】

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 α -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。

【0034】

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。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、例えばアザー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

10

20

30

40

50

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、ホスホロアニロチオエート、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。

【0035】

用語“核酸分子の相補体”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' CCGTGCAT 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。

【0036】

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ージャーRNA(mRNC)に転写される核酸分子を言及する。

【0037】

“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一本鎖又は二本鎖の核酸分子である。

【0038】

“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。

【0039】

“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。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、分化一特異的要素(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

10

20

30

40

50

オクタマー因子（一般的には、Watsonなど., eds., Molecular Biology of the Gene, 4th ed. (The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 1987), and Lemaigre and Roisseau, 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応答して上昇する。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。

【0040】

“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で検出できる活性を有しても又は有さなくても良い。

【0041】

“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“オルガネラー特異的”態様で発現される遺伝子に結合されている。

“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。

【0042】

“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）と組み合わされる限り、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。

【0043】

“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。

【0044】

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。

【0045】

“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

10

20

30

40

50

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。

【0046】

“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。

10

【0047】

“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。

【0048】

“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。

20

【0049】

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、 β -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、細胞外リガンドー結合ドメイン、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、細胞外リガンドー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。

30

【0050】

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。受容体ー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。

40

【0051】

“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ー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。多くの細胞ー表面受容体は、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

50

存在する可溶性カウンターパートを有する。

【0052】

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。

10

【0053】

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。

20

【0054】

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。

【0055】

“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。

30

【0056】

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。

40

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。

【0057】

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、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

50

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。

【0058】

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ー”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。

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。相補体／抗－相補体対の続く解離が所望される場合、その相補体／抗－相補体対は好ましくは、 $< 10^9 \text{M}^{-1}$ の結合親和性を有する。

10

【0059】

“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－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Zcytor 16のエピトープを模倣する。

20

“抗体フラグメント”は、抗体の一部、例えば $\text{F(ab}')_2$ 、 F(ab)_2 、 Fab' 、 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－Zcytor 16モノクローナル抗体フラグメントは、Zcytor 16のエピトープと結合する。

【0060】

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ン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。

30

“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。

“ヒト型化抗体”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。

【0061】

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。

“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。

40

【0062】

“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。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., EMBO 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

50

識 (Grussenmeyerなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7952-4, 1985), 物質P、すなわちFlagTM ペプチド (Hoppなど., Biotechnology 6: 1204-1210, 1988)、ストレプトタ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) から入手できる。

【0063】

“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型化抗体を包含する。 10

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。

【0064】

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、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。 20

【0065】

“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。 30

【0066】

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。

【0067】

“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“Zcytor 16アンチセンスオリゴヌクレオチド”は、(a) 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) 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。 40

“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。

【0068】

用語“変異体Zcytor 16遺伝子”は、配列番号2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Zcytor 16遺伝子、及び配列番号2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。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Zcytor 16遺伝子は、その遺伝子が配列番号1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。

【0069】

他方では、変異体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LASERGENE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。

10

【0070】

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, 2nd 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。

20

【0071】

変異体Zcytor 16遺伝子又は変異体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—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Zcytor 16遺伝子又は変異体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。

【0072】

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。

30

【0073】

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。

40

“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、 α -グロビン、 β -グロビン及びミオグロビンは、お互いパラ体である。

【0074】

本発明は、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、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—Zcytor 16抗体と少なくとも特異的に結合する、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、おおよその値であること

50

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、±10%で正確であると理解されるであろう。

【0075】

3. Zcytor 16ポリヌクレオチド又は遺伝子の生成：

ヒトZcytor 16遺伝子をコードする核酸分子は、配列番号1又は配列番号37に基づいてのポリヌクレオチドプローブを用いて、ヒト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。

【0076】

例示されるように、ヒト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、例えば扁桃組織から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、細胞を分解するための方法、RNAのRN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。

【0077】

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, 3rd 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）。

【0078】

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)⁺RNAが全RNA調製物から単離されるべきである。ポリ(A)⁺RNAは、オリゴ(dT)ー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）。

【0079】

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)⁺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。

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λgt10ベ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 λgt10 and λ11” in DNA Cloning: A Practical Approach Vol. I, Glover (ed.), page 49 (IRL Press, 1985); Wu (1997) at pages 47-52 を参照のこと。

【0080】

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。

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。

【0081】

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ンアーゼ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。

【0082】

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、及び適切がリ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）。

【0083】

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1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）。

【0084】

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、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 Methods and Applications. White (ed.), pages 317-337 (Humana Press, Inc. 1993) により記載される。

【0085】

下記のようにして生成された抗-Zcytor 16抗体はまた、cDNAライブラリーからの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λgt11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 λ expression libraries with untibody and Protein Probes” in DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover など (eds.) p. 1-14 (Oxford University Press 1995) を参照のこと）。

【0086】

他に、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 50

2:266 (1993), Dilfon など., “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), 及び Holowachuk など., *PCR Methods Appl.* 4: 299 (1995)。

【0087】

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。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。

10

【0088】

Zcytor 16cDNA又は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Zcytor 16ポリヌクレオチド配列はまた、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ーブ又はプライマーとして使用され得る。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扁桃組織又は、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。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

【0089】

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、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

【0090】

4. Zcytor 16遺伝子変異体の生成：

40

本発明は、本明細書に開示される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。当業者は、配列番号3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2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。

【0091】

さらに、本発明はまた、配列番号3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

50

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1のヌクレオチド1-693、及びそれらのRNA同等物を含んで成るZcytor 16ポリペプチド-コード核酸分子を企画する。

【0092】

表1は、縮重ヌクレオチド位置を示すために、配列番号3内に使用される1文字コードを示す。“決定”は、コード文字により示されるヌクレオチドである。“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。

【0093】

10

【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

20

30

【0094】

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3に使用される縮重コドンが表2に示される。

40

【0095】

【表2】

表 2

アミノ酸	1文字表記	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	CTA 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
いずれか	X		NNN

10

20

30

40

50

【0096】

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2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。

【0097】

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

【0098】

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、配列番号3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

【0099】

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、ハ虫類、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、例えばネズミ、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。ヒト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、cDNAは、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

【0100】

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Zcytor 16ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。

40

【0101】

当業者は、配列番号1又は配列番号37に開示される配列がヒトZcytor 16の単一の対立遺伝子を表し、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

50

であるタンパク質のように、本発明の範囲内である。

【0102】

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。

【0103】

上記で論じられた方法を用いて、当業者は、配列番号1、2、13、又は37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2のアミノ酸22～231又は28～231、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zcytor16受容体のリガンドー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。

【0104】

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1のヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、配列番号1のヌクレオチド64、67、82又は94～693のヌクレオチド配列から成る核酸分子、又は配列番号1に対して相補的なヌクレオチド配列を含んで成る核酸分子、又は配列番号1のヌクレオチド64、67、82又は94～693又はそのフラグメント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。

【0105】

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。

【0106】

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。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。

【0107】

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、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。

【0108】

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。

【0109】

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。

10

【0110】

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。

20

【0111】

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。

30

【0112】

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ジンは、デオキシシチジンより置換され得、そして5-ブロモデオキシウリジンは、デオキシシチジンにより置換され得、そして5-ブ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 に対する依存性を低めるためにグアノシンにより置換され得る。

40

【0113】

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を及ぼす。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

50

リン又はSDS、及び Na^+ 源、例えばSSC（ $1 \times \text{SSC} : 0.15 : \text{N}$ の NaCl 、 15mM のクエン酸ナトリウム）又はSSPE（ $1 \times \text{SSPE} : 1.8\text{M}$ の NaCl 、 10mM の NaH_2PO_4 、 1mM のEDTA、 $\text{pH}7.7$ ）を含む。典型的には、ハイブリダイゼーション緩衝液は、 $10\text{mM} \sim 1\text{M}$ の Na^+ 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_m 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。

【0114】

10

例示のように、変異体Zcytor 16ポリペプチドをコードする核酸分子が、配列番号1又は配列番号37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、 $5 \times \text{SSC}$ 、 50mM のリン酸ナトリウム（ $\text{pH}7.6$ ）、 $5 \times \text{Denhardt's}$ 溶液（ $100 \times \text{Denhardt's}$ 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 $20\mu\text{g/ml}$ の変性され、剪断されたサケ精子DNAを含んで成る溶液において、 42°C 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°C 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

【0115】

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 $0.5 \times \sim 2 \times \text{SSC}$ 溶液による $55 \sim 65^\circ\text{C}$ での洗浄を包含する。すなわち、変異体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1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、 $55 \sim 65^\circ\text{C}$ での、0.1%SDSを含む $0.5 \times \sim 2 \times \text{SSC}$ 溶液、例えば 55°C での、0.1%SDSを含む $0.5 \times \text{SSC}$ 溶液、又は 65°C での0.1%SDSを含む $2 \times \text{SSC}$ 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

【0116】

典型的な高い緊縮洗浄条件は、 $50 \sim 65^\circ\text{C}$ での0.1%ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）を含む $0.1 \times \sim 0.2 \times \text{SSC}$ の溶液による洗浄を包含する。例えば、変異体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1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、 $50 \sim 65^\circ\text{C}$ での、0.1%SDSを含む $0.1 \times \sim 0.2 \times \text{SSC}$ 溶液、例えば 50°C での、0.1%SDSを含む $0.1 \times \text{SSC}$ 溶液、又は 65°C での0.1%SDSを含む $0.2 \times \text{SSC}$ 溶液に等しい。

【0117】

本発明はまた、配列番号2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2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。

40

【0118】

本発明はまた、2種の次の基準を用いて同定され得るZcytor 16変異体核酸分子を企画する：配列番号2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Zcytor 16変異体は、（1） $55 \sim 65^\circ\text{C}$ での0.1%SDSを含む $0.5 \times \sim 2 \times \text{SSC}$ 溶液に等しい緊縮洗浄条件下で、配列番号1又は配列番号37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（

50

2) 配列番号2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。

【0119】

他方では、Zcytor16変異体は、(1) 50~65℃での0.1% SDSを含む0.1×~0.2×SSC溶液に等しい、高い緊縮洗浄条件下で、配列番号1又は配列番号37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2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。

【0120】

%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。手短かに言及するば、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“BLOSUM62”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：

【0121】

【数1】

[同一適合するものの合計数]

×100

[長い方の配列の長さ+2つの配列を整合するために長い方の配列に導入されるギャップの数]

【0122】

【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

【0123】

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。

30

【0124】

手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号2）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。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”。

40

【0125】

“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験される。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

50

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。

【0126】

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。

【0127】

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2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

10

20

【0128】

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)]。

30

【0129】

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。

【0130】

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。

40

【0131】

Zcytor 16遺伝子における保存性アミノ酸変化が、配列番号1のいずれか1つに列举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 Muta

50

genesis: A Practical Approach (IRL Press 1991) を参照のこと)。変異体 Zcytor 16 ポリペプチドが、抗-Zcytor 16 抗体を特異的に結合する能力により同定され得る。

【0132】

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、アロートレオニン、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。

10

【0133】

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プレッサー 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。

20

【0134】

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プレッサー 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)。

30

【0135】

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。

【0136】

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 Protein 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して、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。

40

50

【0137】

配列分析は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、Zcytor 16結合活性（例えば、リガンドIL-TIF又は抗-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。

【0138】

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。

【0139】

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, WIPO公開W0 92/06204号）、及び領域一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Zcytor 16は、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。

【0140】

開示される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WIPO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。

【0141】

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-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。

【0142】

本発明はまた、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。核酸分子の通常欠失分析は、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得る。例示されるように、配列番号1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

一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、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。

【0143】

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Treulter 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。

10

【0144】

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する。表4に示さない、本明細書に記載される追加のヒトZcytor16機能的変異体ドメインをコードするヌクレオチドは、配列番号1又は配列番号37に関して決定され得る。そのような機能的フラグメントは、例えば配列番号1の次のヌクレオチド配列：ヌクレオチド64, 67, 82又は94～690又は693；ヌクレオチド64, 67, 82又は94～369又は381；394～690又は693；及びヌクレオチド1～690又は693、及びそれらによりコードされるアミノ酸配列、例えばそれぞれ配列番号2に示されるそれらを包含する。

20

【0145】

【表4】

表4

30

Zcytor 16特徴	アミノ酸残基 (配列番号2)	ヌクレオチド (配列番号1)
第1Igドメイン	32-123	94-369
第2Igドメイン	132-230	394-690
両Igドメイン	32-230	94-690

40

【0146】

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Zcytor 16遺伝子の機能的フラグメントも企画する。変異体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1又は配列番号37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。

【0147】

本発明はまた、本明細書に記載されるZcytor 16ポリペプチドのエピトープー担持の部分

50

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ー担持のペプチドは、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）。

【0148】

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ー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。

10

【0149】

抗原性エピトープー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ー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、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）。

20

【0150】

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, Ritter 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。

30

【0151】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかの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1、2、及び3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。

40

【0152】

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。

【0153】

6. Zcytor 16ポリペプチドの生成：

50

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、リガンドー結合フラグメント）；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。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。

【0154】

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、Zcytor 16発現ベクターは、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。

【0155】

本発明の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。

【0156】

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。

【0157】

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。

【0158】

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）。

10

20

30

40

50

【0159】

一定の態様においては、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Zcytor16可溶性受容体、例えばC RF2-4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。

【0160】

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。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。

10

【0161】

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。

20

【0162】

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

【0163】

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

【0164】

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. Cell 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。

50

【0165】

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）。

【0166】

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・カリ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。

10

【0167】

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-BacTM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、Zcytor16リガンド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、pFastBacITM（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。

20

30

【0168】

さらに、トランスファーベクターは発現された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、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。

【0169】

例示的なPFASTBACベクターは、相当の程度まで修飾され得る。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. 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。

40

【0170】

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

50

ナル配列により天然の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Zcytor 16分泌シグナル配列を置換するために、構造体に使用され得る。

【0171】

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)。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、Sf900IITM (Life Technologies) 又はESF921TM (Expression Systems); 及びトリコプルシア・ニ細胞に関しては、Ex-cell0405TM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 又はExpress Five0TM (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2~5×10⁵個の細胞1~2×10⁶個の細胞の接種密度で触媒される。

【0172】

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 Cloning2: Expression Systems, 2nd 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。

【0173】

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Muray など., アメリカ特許第4,845,075号により開示される。

【0174】

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 (例えばロイシン) 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

10

20

30

40

50

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。

【0175】

他の酵素、例えばハンセヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・ポンベ (*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 guillemondii*)、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。

10

【0176】

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。ニューロスボラ (*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。

【0177】

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。

20

【0178】

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。

30

【0179】

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 1~40ms、最も好ましくは約 20ms の時定数 (t) 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。

40

【0180】

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ール-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.,

50

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。

【0181】

他方では、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λ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10の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λ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, 4th Ed. (Benjamin Cummins 1987), 及びAusubelなど. (1995) により再考されている。

【0182】

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）。20

【0183】

細菌、例えばE.コリにおいて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。30

【0184】

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*, 2nd 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: Principles and Practice*; Cleland など. (eds.), p101 (John Wiley & Sons, Inc. 1996) を参照のこと）。40

【0185】

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。

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.) 50

, 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, 2nd 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。

【0186】

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 ” (2nd 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）。

10

【0187】

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）。

20

【0188】

本発明のペプチド及びポリペプチドは、配列番号2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2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22～230又は231、アミノ酸残基23～230又は231、アミノ酸残基28～230又は231、又はアミノ酸残基32～230又は231；アミノ酸残基22、23、28又は32～127；アミノ酸残基22、23、28又は32～123、及びアミノ酸残基132～230又は231。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。

30

【0189】

さらに、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Zcytor16ポリペプチド（“ Zcytor16-含有受容体 ”、又は“ Zcytor16-含有受容体ポリペプチド ”）を含んで成る、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、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ンするために使用される。

40

【0190】

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

50

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。

【0191】

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、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依存性ネズミプレ-B細胞系であるBaF3 (Palacios and Steinmetz, Cell41: 727-734 (1985)) である。

【0192】

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、Zcytor16受容体、例えばIL-TIF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。

【0193】

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。

【0194】

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。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 (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。

【0195】

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。

【0196】

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、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。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、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。

10

【0197】

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）。

20

【0198】

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）。それらの細胞は、IL-TIFアンタゴニスト又は抗-炎症因子として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。

30

【0199】

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、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。

40

【0200】

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、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。

【0201】

50

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ドメインと共に、Zcytor16の細胞外（リガンド結合）ドメイン（配列番号2の残基22-231；配列番号13）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Zcytor11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。

【0202】

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。

10

【0203】

7. 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つの一般的種類の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Zcytor 16抗体の可変ドメインはZcytor 16を模倣するので、それらのドメインは、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）。

20

【0204】

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。

30

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、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。

【0205】

Zcytor 16の融合タンパク質は、組換え宿主においてZcytor 16を発現するために、そして発現された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Zcytor 16ポリペプチドを案内するペプチドを含んで成る。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、Zcytor 16発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列は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。

40

【0206】

分泌シグナル配列は、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

50

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）。

【0207】

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 α -因子（MF α 1遺伝子によりコードされる）、インバーターゼ（SUC2遺伝子によりコードされる）又は酸性ホスファターゼ（PH0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, 2nd Edition, Glover and Hames (eds.), p.123-167 (Oxford University Press 1995) を参照のこと。

10

【0208】

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13、配列番号2のアミノ酸22-210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。

20

【0209】

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、FlagTM 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-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。

【0210】

他のアプローチにおいては、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種の不变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Zcytor16、可溶性Zcytor16/CRF2-4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。

30

【0211】

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、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。

40

【0212】

50

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。

【0213】

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Zcytor16受容体又は可溶性Zcytor16ヘテロダイマーポリペプチド、例えば可溶性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。これに関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 γ 1及びヒト κ L鎖を包含する。免疫グロブリン-可溶性Zcytor16受容体又は免疫グロブリン-可溶性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Zcytor16/CRF2-4融合体は、種々のマルチマー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。

10

【0214】

補助ドメインは、可溶性Zcytor16受容体又は可溶性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。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。

20

【0215】

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Zcytor16融合タンパク質は、アミロース樹脂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。

30

【0216】

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*, 2nd 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。

40

【0217】

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

50

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-FLAG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。

【0218】

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Zcytor16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2のアミノ酸残基1～21又は1～22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。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。

10

【0219】

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-1 (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- α 、 β 、 γ 、 ω 、 δ 、 τ 及び ϵ)、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。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。

20

【0220】

もう1つの形の融合タンパク質は、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。ペプチドリンカーの例は、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。典型的なペプチドリンカーは、アミノ酸配列: GGSGG SGGGG SGGGG S (配列番号4) を有する。

30

【0221】

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 γ 鎖である。従って、本発明はZcytor16成分及びヒトFcフラグメントを含んで成るZcytor16融合タンパク質を企画し、ここで前記Zcytor16成分のC-末端は、ペプチドリンカー、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。Zcytor16成分は、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2のアミノ酸残基22～231又は28～231、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。

40

【0222】

もう1つの態様においては、Zcytor16融合タンパク質は、IgG配列、IgG Zcytor16のアミノ酸末端に共有結合されるZcytor16成分、及び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

50

：CH₂ドメイン及びCH₃ドメイン。従って、IgG配列はCH₁ドメインを欠いている。Zcytor16成分は、本明細書に記載されるように、Zcytor16活性、例えばZcytor16リガンド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など、ヨーロッパ特許第742830号（W095/21258号）により記載されている。

【0223】

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リガンドの存在は、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。

【0224】

抗体融合タンパク質の他の例は、抗原-結合ドメイン、及びZcytor16細胞外ドメインを含む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。

【0225】

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Zcytor16間で置換され得る。ポリペプチド融合体は、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。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。

【0226】

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。

【0227】

Zcytor16ポリペプチドは、Zcytor16リガンドを同定し、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。

【0228】

受容体リガンドとして、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CytosensorTM 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。

【0229】

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 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。

【0230】

例えば、マイクロフィジオメーターは、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、Zcytor16発現真核細胞の応答を測定するために使用され得る。Zcytor16調節刺激に対して応答性の適切な細胞は、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Zcytor16を発現する細胞を包含する。細胞外酸性化は、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、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。

10

【0231】

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、Zcytor16ポリペプチド又はZcytor16融合タンパク質、又は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。

20

【0232】

手短には、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。次ぎに、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ス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ー及びオフー速度の測定、及び結合の化学量論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。

30

【0233】

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。

【0234】

本発明はまた、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Zcytor16組成物を企画する。例示的な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2のアミノ酸残基22~231又は28~231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、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、又はモノー (C_1-C_{10}) アルコキシ、又はそれらのアリアルオキシ誘導体である (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

40

50

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Zcytor16接合体を生成するために使用され得る。

【0235】

治療のために使用され得る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、モノー (C_1-C_{10}) アルコキシ-PEG、アリアルオキシ-PEG、ポリー (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、ビスー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。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。

10

【0236】

Zcytor16接合体の1つの例は、Zcytor16成分、及び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、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。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 The rapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinetics 27: 290 (1994) 及びFrancis など., Int. J. Hematol. 68: 1 (1998) を参照のこと)。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、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、Karasiwiczなど., アメリカ特許第5,382,657号を参照のこと)。

20

【0237】

アシル化によるPEG化は典型的には、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、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) 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: Zcytor16の比が高いほど、ポリPEG化されたZcytor16生成物の%が高くなる。

30

【0238】

アシル化によるPEG化の生成物は典型的には、リシンε-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Zcytor16生成物である。典型的には、その得られるZcytor16は、少なくとも95%、モノー、ジマー又はトリマー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Zcytor16ポリペプチドから分離され得る。

40

【0239】

アルキル化によるPEG化は一般的に、還元剤の存在下で、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。

【0240】

50

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ε-アミノ基とタンパク質のN-末端残基のα-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、Zcytor16モノポリマー接合体の実質的な調製物を提供する。

【0241】

モノポリマー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) Zcytor16のアミノ末端でのα-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。

10

【0242】

モノポリマー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、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それらの条件である。そのような反応条件に、N-末端でのα-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α-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：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、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。

20

【0243】

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：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。

30

【0244】

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、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。

40

【0245】

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。

【0246】

8. Zcytor16ポリペプチドの単離：

50

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。

【0247】

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Zcytor16、合成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Zcytor16ポリペプチド及び融合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。PEI、DEAE、QAE及びQ誘導体が好ましい。

10

【0248】

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-Sephacrose FF(pharmacia), Toyopearl ブチル650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA)、オクチル-Sephacrose (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。

20

【0249】

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、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。

30

【0250】

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-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。

【0251】

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。

40

【0252】

50

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 (例えばマルトースー結合タンパク質、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、Zcytor16細胞外ドメインのリガンドー結合性質が、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開発され得る。

【0253】

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。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。

【0254】

9. Zcytor16タンパク質に対する抗体の生成：

Zcytor16に対する抗体は、例えば抗原として、Zcytor16発現ベクターの生成物又は天然源から単離されたZcytor16を用いて得られる。特に有用な抗-Zcytor16抗体は、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、Zcytor16に結合し、そして(2) 抗体が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。

【0255】

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

【0256】

抗-Zcytor16抗体は、抗原性Zcytor16エピトープー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ー担持ペプチド及びポリペプチドは、配列番号2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、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。

【0257】

例示のように、Zcytor16における可能性ある抗原性部位が、LASERGENE (DNASTAR; 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。

【0258】

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 $(0.6) = 1$ ）。

【0259】

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 $(0.2) = 1$ ）。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" 10, 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； β 領域限界値=105；Grnner-Robsonパラメーター： α 及び β 決定パラメーター=0）。

【0260】

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。 20

【0261】

この分析の結果は、配列番号2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24-42（“抗原性ペプチド1”）、アミノ酸24-33（“抗原ペプチド2”）、アミノ酸37-42（“抗原性ペプチド3”）、アミノ酸48-55（“抗原性ペプチド4”）、アミノ酸68-81（“抗原ペプチド5”）、アミノ酸88-97（“抗原性ペプチド6”）、アミノ酸126-132（“抗原ペプチド7”）、アミノ酸156-165（“抗原ペプチド8”）アミノ酸178-185（“抗原性ペプチド9”）、及びアミノ酸216-227（“抗原性ペプチド10”）。本発明は、Zcytor16に対する抗体を生成するために抗原性ペプチド1-10 30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1-10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。

【0262】

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Zcytor16/CRF2-4、Zcytor16/ Zcytor11、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、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Zcytor16ポリペプチドを包含する。

【0263】

組換えZcytor16タンパク質、又は天然源から単離されたZcytor16に対するポリクローナル 40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 (Manson, 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, 2nd Edition, Glover など、, (eds.), page 15 (Oxford University press 1995を参照のこと)。

【0264】

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Zcytor16又はその一部と 50

、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（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。

【0265】

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-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。 10

【0266】

他方では、モノクローナル抗-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 DNA Cloning 2: Expression Systems, 2nd Edition, Glover など. (eds.), page 93 (Oxford University Press 1995を参照のこと)。

【0267】

手短には、モノクローナル抗体は、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。 20

【0268】

さらに、本発明の抗-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、ヒト抗原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一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。 30

【0269】

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）。 40

【0270】

特定の用途に関しては、抗-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 50

得る。

【0271】

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。

【0272】

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）。

【0273】

Fvフラグメントは、ペプチドリンカーにより連結される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。

【0274】

例示のように、scFvは、インビトロで、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。

【0275】

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、Zcytor16に結合するタンパク質

10

20

30

40

50

を同定するために、本明細書に開示される Zcytor16 配列を用いてスクリーンされ得る。

【0276】

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

【0277】

他方では、抗-Zcytor16抗体は、“ヒト型化”モノクローナル抗体から誘導され得る。ヒト型化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。ヒト型化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。

【0278】

ヒト型化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。

【0279】

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-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 Ployclonal Antisera” in *Methods in Molecular Biology: Immunochemical Protocols*, Manson (ed.), P. 1-2 (Humana Press 1992) を参照のこと。また、Colligan, 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-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、ヒト型化抗-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。

【0280】

10. 遺伝子発現及び遺伝子構造を検出するためへの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1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1のヌクレオチド配列の補体、又はその一部を有する一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、Zcytor16遺伝子の領域と結合する。

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。

【0281】

さらに、Zcytor16は脾臓－特異的ポリヌクレオチドプローブ、抗-zcytor16抗体及び検出であるので、組織におけるZcytor16ポリペプチドの存在は、例えば、疾病又は癌性脾臓の切除を包含する手術の後、脾臓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ラベルされた抗体を包含する。

10

【0282】

さらに、抗-Zcytor16抗体及び結合フラグメントは、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+ T-細胞及びCD19+ 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", 3rd 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。

20

【0283】

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。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。

【0284】

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によって依存して、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。

30

【0285】

当業者は、本発明の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Zcytor16が発現される免疫細胞において特に適切である。

40

【0286】

さらに、Zcytor16ポリヌクレオチドプローブ、抗-Zcytor16抗体及び検出の使用は、組織における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。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、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、Zcytor16ポリペプチド又は抗-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

50

である。例えば、Zcytor16は胎盤において通常発現されるので、Zcytor16発現の不在は、異常胎盤機能の表示であり得る。

【0287】

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 ブ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³²P又は³⁵Sにより検出できるようラベルされ得る。他方では、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。

【0288】

Zcytor16オリゴヌクレオチドプローブはまた、インビボ診断のためにも有用である。例示として、¹⁶F-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）。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 Walauszyk (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）。

【0289】

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Zcytor16遺伝子の一部を増幅するよう企画される。

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。

【0290】

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。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。

【0291】

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Zcytor16プローブ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。

【0292】

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)。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。

【0293】

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)。

【0294】

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。

【0295】

Zcytor16遺伝子は、ヒト染色体6q23-q24に存在する (例2)。この領域は、種々の障害、例えばインスリン依存性糖尿病、網膜錐体ジストロフィー、乳癌及びパーキンソン病に関係している。同様に、Zcytor遺伝子座自体における欠陥は、本明細書において論じられるように遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。当業者は、サイトカイン受動態における欠陥がヒトにおいて特定の疾病を引き起こすことが知られていることを理解するであろう。例えば、サイトカイン受容体の多型現象は、肺胞タンパク症、家族性周期性熱及び赤白血病に関連している。

【0296】

さらに、成長ホルモン受容体突然変異は、小人症をもたらす (Amselem, Sなど., New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989)、IL-2受容体 γ 突然変異は重度の組合された免疫欠損 (SCID) をもたらす (Noguchi, Mなど., Cell 73: 147-157, 1993)、c-Mpl突然変異は血小板減少をもたらす (Ihara, Kなど., Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999)、そして重度のマイコバクテリア及びサルモネラ感染がインターロイキン-12受容体 α 欠失患者をもたらす (de Jong, Rなど., Science 280: 1435-1439, 1998)。従って、同様に、zcytor16における欠陥は、疾病状態、又は疾病又は感染に対する敏感性を引き起こすことができる。

【0297】

Zcytor16遺伝子は6q23-q24領域zcytor19 に位置するので、ポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾病、例えば炎症性疾患、慢性炎症、炎症応答の機能不全、免疫細胞癌、骨髄癌、脾臓癌、前立腺癌、甲状腺、上皮小体又は他の癌、又は免疫疾患に関連する、染色体6q23

-q24損失、トリソミー、重複又はトランスロケーションを検出するために使用され得る。さらに、本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、zcytor16遺伝子欠陥に関連する、検出、診断予防及び処理を助けるであろう。従って、Zcytor16ヌクレオチド配列は、種々の疾病についての連鎖に基づく試験において、及び対象の染色体がZcytor16遺伝子において突然変異を含むかどうかを決定するために使用され得る。

【0298】

Zcytor16遺伝子座での検出できる染色体異常は、異数体、遺伝子コピー数の変化、6q23-q24の異種性の損失、6q23-q24におけるトランスロケーション、挿入、欠失、制限部位変更及び転移を包含するが、但しそれらだけには限定されない。そのような検出できる転移に関連するヒト疾病は、当業界において知られている。例えば、OMIMTM, National Center for Biotechnology Information, National library of Medicine, Bethesda, MD 遺伝子地図、例えばトランスロケーション、LOH、トリソミー及び同様のものを参照のこと。Zcytor16遺伝子を不活性化する遺伝子変更、又はZcytor16遺伝子座における及びその周囲での全体的染色体変更が特に興味あるものである。

10

【0299】

同様に、Zcytor16遺伝子座自体における欠陥は、本明細書に論じられるような遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。さらに、当業者は、サイトカイン受容体の欠陥がヒトにおける疾病状態を引き起こすことが知られていることを理解するであろう。例えば、成長ホルモン受容体突然変異は、小人症をもたらす (Amselem, Sなど., New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989)、IL-2受容体 γ 突然変異は重度の組合された免疫欠損 (SCID) をもたらす (Noguchi, Mなど., Cell 73: 147-157, 1993)、c-Mpl突然変異は血小板減少をもたらす (Ihara, Kなど., Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999)、そして重度のマイコバクテリア及びサルモネラ感染がインターロイキン-12受容体 α 欠失患者をもたらす (de Jong, Rなど., Science 280: 1435-1439, 1998)。

20

【0300】

従って、同様に、zcytor16における欠陥は、疾病状態、又は疾病又は感染に対する感受性を引き起こすことができる。zcytor19は、癌に關与する異常型についての染色体領域内のサイトカイン受容体であり、そして卵巣癌において発現されることが示されているので、本発明の分子はまた、癌形成又は転移に直接的に包含され得る。zcytor19遺伝子は6q23-q24領域zcytor16に位置するので、ポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾病、例えば免疫細胞癌、神経芽腫、骨髄癌、甲状腺、上皮小体、前立腺癌、メラノーマ、又は他の癌、又は免疫疾患に関連する、染色体6q23-q24損失、異種性の損失 (LOH)、トリソミー、重複又はトランスロケーションを検出するために使用され得る。さらに、本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、zcytor16遺伝子欠陥に関連する、検出、診断予防及び処理を助けるであろう。

30

【0301】

診断は、疾病のタイプ及び適切な関連する治療の決定において医者を助けることができるか、又は遺伝的カウンセリングを助けることができる。それ自体、本発明の抗-zcytor16抗体、ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、zcytor16ポリペプチド、mRNA又は抗-zcytor16抗体の検出のために使用され、従って当業界において知られており、そして本明細書において記載される方法を用いて、本明細書に記載されるようにして、遺伝的疾患又は癌の検出のためのマーカーとして作用し、そしてそのために直接的に使用される。

40

【0302】

さらに、zcytor19ポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾病に関連する染色体6q23-q24欠失及びトランスロケーション、又は悪性又は他の癌における染色体転位に關与することが予測される、腫瘍の悪性進行又は他の6q23-q24突然変異に關与する他のトランスロケーションに関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。同様に、zcytor16ポリヌクレオチドプローブが、染色体6q23-q24三染色体性、及びヒト疾病に関連する染色体欠失に関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。従って、zcytor16ポリ

50

ヌクレオチドプローブは、それらの欠陥の関連する異常性又は遺伝子型を検出するために使用され得る。

【0303】

上記で論じられるように、zcytor16遺伝子自体における欠陥は、遺伝性ヒト疾病状態をもたらすことができる。例えば、zcytor16発現は、本明細書に記載されるように、いくつかの組織—特異的ヒト癌において高められる。本発明の分子、例えば本発明のポリペプチド、アンタゴニスト、アゴニスト、ポリヌクレオチド及び抗体は、zcytor16遺伝子欠陥に関連する疾病の検出、診断予防及び処理を助ける。さらに、zcytor16ポリペプチドプローブは、zcytor16染色体遺伝子座で、疾病又は非疾病の個人間での対立遺伝子差異を検出するために使用され得る。それ自体、zcytor16配列は、法的なDNAプロファイリングにおける診断として使用され得る。

10

【0304】

一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界において知られている。分析用プローブは一般的に、少なくとも20個の長さのntを有するが、但し幾分短いプローブも使用され得る（例えば、14-17nt）。PCRプライマーは、少なくとも5個の長さのnt、好ましくは15又はそれ以上の長さのnt、より好ましくは20-30個の長さのntである。遺伝子又は染色体DNAの全体的な分析のために、zcytor16ポリヌクレオチドプローブは、完全なエキソン又はそれ以上を含むことができる。エキソンは、zcytor16配列（配列番号1）とzcytor16についてのヒトゲノムDNA（Genbank受託番号AC002781号）とを比較することによって、容易に決定される。一般的に、患者における遺伝子異常性又は異常型を検出するために遺伝子連鎖分析に使用される診断方法は、当業界に知られている。

20

【0305】

ほとんどの診断方法は、（i）潜在的に疾病の患者、疾病の患者又は劣性疾病対立遺伝子の可能性ある非疾病キャリアーから遺伝子サンプルを得；（ii）zcytor16ポリヌクレオチドプローブと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより（ここで、前記ポリヌクレオチドは、RFIP分析においては、相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）、又は適切なPCR反応条件下でPCR反応において、センス及びアンチセンスプライマーと共に遺伝子サンプルをインキュベートすることにより、第1反応生成物を生成し；（iii）前記第1反応生成物を、電気泳動及び/又は他の既知方法により可視化し、例えば、前記第1反応生成物を、zcytor16ポリヌクレオチドプローブ（ここで、前記ポリヌクレオチドは第1反応の相補的ポリヌクレオチド配列にハイブリダイズするであろう）により可視化し、そして（iv）正常又は対照の個人からの遺伝子サンプルの第2対照反応生成物と、前記可視化された第1反応生成物とを比較する段階を含んで成る。

30

【0306】

第1反応生成物と対照反応生成物との間の差異は、疾病又は潜在的に疾病の患者における遺伝子異常性の、又は非疾病患者についてのヘテロ接合性劣性キャリアー表現型の存在の、又は疾病患者からの腫瘍における遺伝子欠陥の存在の、又は胎児又は移植前胚における遺伝子異常性の存在の表示である。例えば、制限フラグメントパターン、PCR生成物の長さ、zcytor16遺伝子座の反復性配列の長さ、及び同様のもの差異は、遺伝子異常性、遺伝子異常型、又は正常な対照に比較しての対立遺伝子差異の表示である。対照は、サンプルの試験及び利用性に依存して、影響されていないファミリーメンバー又は無関係の個人からであり得る。

40

【0307】

本発明内への使用のための遺伝子サンプルは、患者からのいずれかの組織又は他の生物学的サンプル、例えば血液、唾液、精子、胚細胞、羊水及び同様のもの（但し、それらだけには限定されない）から単離されたゲノムDNA、mRNA及びcDNAを包含する。ポリヌクレオチドプローブ又はプライマーは、RNA又はDNAであり得、そして配列番号1の一部、配列番号1の補体、又はそれらのRNA同等物を含んで成る。ヒト疾病表現型への遺伝子連鎖分析を示すそのような方法は、当業界において良く知られている。診断における、PCRに基づ

50

く方法の参照のためには、一般的、次の文献を参照のこと：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 Walaszek (eds.), Tumor Marker Protocols. (Humana Press, Inc. 1998). Lo (ed), Clinical Application of PCR (Humana Press, Inc. 1998), 及びMeltzer (ed), PCR in Bioanalysis (Humana Press. Inc. 1998))。

【0308】

Zcytor 16遺伝子座に関連する逸脱は、分子遺伝子技法、例えば制限フラグメント長さ他型現象 (RFLP) 分析、PCR技法を用いる短いタンデム反復体 (STR) 分析、増幅—不応性突然変異システム分析 (ARMS)、一本鎖コンホメーション多型現象 (SSCP) 検出、RNアーゼ切断方法、変性グラジエントゲル電気泳動、蛍光—助力のミスマッチ分析 (FAMA)、及び当業界において知られている他の遺伝子分析により、本発明の核酸分子を用いて検出され得る (例えば、Mathew (ed.), Protocols in Human Molecular Genetics (Humana Press. Inc. 1991), Marian, Chest 108: 255 (1995), Coleman and Tsongalis, Molecular Diagnostis (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) Molecular Diagnosis of Genetic Diseases (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Burren など. (eds.), Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli など. (eds.), Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998), 及びRichards and Ward, “Molecular Diagnostic Testing,” in Principles of Molecular Medicine, Pages 83-88 (Humana Press. Inc. 1998) を参照のこと)。

10

20

30

40

50

Inc. 1991), Marian, Chest 108: 255 (1995), Coleman and Tsongalis, Molecular Diagnostis (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) Molecular Diagnosis of Genetic Diseases (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), Laboratory Protocols for Mutation Detection (Oxford University Press 1996), Burren など. (eds.), Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli など. (eds.), Current Protocols in Human Genetics (John Wiley & Sons 1998), 及びRichards and Ward, “Molecular Diagnostic Testing,” in Principles of Molecular Medicine, Pages 83-88 (Humana Press. Inc. 1998) を参照のこと)。

【0309】

タンパク質切断試験はまた、翻訳—終結突然変異がコードされたタンパク質の一部のみを生成する、遺伝子の不活性化を検出するために有用である (例えば、Stoppa-Lynnet など., Blood 91: 3920 (1998) を参照のこと)。このアプローチによれば、RNAが生物学的サンプルから単離され、そしてcDNAを合成するために使用される。次に、PCRが、Zcytor 16標的物配列を増幅し、そしてRNAポリメラーゼプロモーター、翻訳開始配列及びインフレームATGトリプレットを導入するために使用される。PCR生成物が、RNAポリメラーゼを用いて転写され、そして転写体がT7—結合された網様体溶解物システムによりインビトロで翻訳される。次に、翻訳生成物が、その翻訳生成物の長さを決定するために、SDS—PAGEにより分別される。タンパク質切断試験は、例えば、Dracopoliなど. (eds.), Current Protocols in Human Genetics, p.9.11.1-9.11.18 (John Wiley & Sons 1998) により記載される。

【0310】

本発明はまた、Zcytor 16遺伝子発現のための診断アッセイを行うための又はZcytor 16遺伝子における突然変異を検出するためのキットも企画する。そのようなキットは、核酸プローブ、例えば配列番号1のヌクレオチド配列又はその一部を含んで成る二本鎖分子、及び配列番号1のヌクレオチド配列の補体又はその一部を有する一本鎖核酸分子を含んで成る。プローブ分子は、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド及び同様のものであり得る。キットは、PCRを行うための核酸プライマーを含んで成る。

【0311】

そのようなキットは、上記核酸診断アッセイを行うためのすべての必要な要素を含むことができる。キットは、Zcytor 16プローブ又はプライマーを含んで成る少なくとももう1つの容器を含むであろう。キットはまた、Zcytor 16配列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、蛍光色素、化学ルミネセント剤、及び同様のものを包含する。キットはまた、Zcytor 16プローブ及びプライマーがZcytor 16遺伝子発現を検出するために使用される、使用者に知られるための手段を含んで成る。例えば、文書の説明書は、封入されている核酸分子が、Zcytor 16をコードする核酸分子、又

はZcytor 16コードのヌクレオチド配列に対して相補的であるヌクレオチド配列を有する核酸分子のいずれかを検出するために使用され得ることを記載する。その文書の材料は、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。

【0312】

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-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-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-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Zcytor16の存在は、生物学的サンプルと、微量のラベルされたZcytor16及び抗-Zcytor16抗体とを、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。

10

【0313】

サンプルにおけるZcytor16及び抗-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Zcytor16の濃度は、抗体に結合されるラベルされたZcytor16の量に反比例し、そして遊離ラベルにされた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。

20

【0314】

他方では、抗-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。

【0315】

もう1つのアプローチにおいては、抗-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）。

30

【0316】

免疫化学的検出は、生物学的サンプルと抗-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-Zcytor16抗体に結合する抗体成分を含んで成る。他方では、抗-Zcytor16抗体は、アビジン/ストレプトアビジン（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/ストレプトアビジン）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。

40

【0317】

他方では、抗-Zcytor16抗体が、抗-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。

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

50

。本発明のために特に有用である同位体は、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 及び ^{14}C である。

【0318】

抗-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。

【0319】

他方では、抗-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。化学ルミネセンスー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。 10

【0320】

同様に、化学ルミネセンス化合物は、本発明の抗-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オリ 20

【0321】

他方では、抗-Zcytor16免疫接合体は、酵素に抗-Zcytor16抗体化合物を接合することによって検出できるようラベルされ得る。抗-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、 β -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。

【0322】

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-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。 30

【0323】

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-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）。 40

【0324】

イムノ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。 50

と。

【0325】

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-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、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、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、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。

10

【0326】

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Zcytor16モノマー受容体又は可溶性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Zcytor16モノマー受容体又は可溶性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Zcytor16モノマー受容体又は可溶性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。

20

【0327】

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ニングするために使用され得る。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。

30

【0328】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、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Zcytor16モノマー受容体又は可溶性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ニングされ得る。可溶性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。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ためにも使用され得る。

40

50

【0329】

結合ポリペプチドはまた、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Zcytor16モノマー受容体又は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。

【0330】

再び、それらの結合ポリペプチドは、抗-Zcytor16モノマー受容体又は抗-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。

【0331】

モノマー性Zcytor16受容体又はZcytor16ホモダイマー、ヘテロダイマー又はマルチマーZcytor16-含有受容体に対する抗体は、Zcytor16受容体を発現する細胞を標識するために；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として使用され得る。

【0332】

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。

【0333】

可溶性Zcytor16受容体又は可溶性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。

【0334】

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Zcytor16受容体又は可溶性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、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。

【0335】

適切な検出可能分子は、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。 10

【0336】

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。 20

【0337】

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。 30

【0338】

もう1つの態様においては、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-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、結腸及び骨髄癌）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。適切な抗-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。 40

【0339】

他方では、本明細書に記載される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-調節されたアポトシス経路を直接的に刺激することにより、標 50

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。

【0340】

12. Zcytor16活性を有するポリペプチドの治療使用：

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。

【0341】

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、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、Zcytor16ポリペプチド、Zcytor16類似体（例えば、抗-Zcytor16抗-イデオタイプ抗体）、及びZcytor16融合タンパク質）の使用を包含する。Zcytor16アンタゴニスト（例えば、抗-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。

【0342】

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）。

【0343】

さらに、IL-10 β 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））。好ましい状態においては、可溶性受容体形のZcytor16、すなわち配列番号2（配列番号13）の残基22～231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。

【0344】

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。

【0345】

IL-TIFは、急性相反応体、例えば血清アミロイドA（SAA）、 α 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、Uhlars, C

10

20

30

40

50

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。

【0346】

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 (Uhlar, 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。

【0347】

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。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) 許容できる医薬ビークル中、本明細書に記載されるような可溶性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。

【0348】

本発明の受容体は、少なくとも1つの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- γ 、 α 及び β 鎖、及びインターフェロン- α/β 受容体 α 及び β 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 α ；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。CRF2-4及びIL-10受容体と共にzcytor11受容体は、IL-TIFに応答して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)。

【0349】

本発明によれば、モノマー又はホモダイマーZcytor16受容体ポリペプチドの他に、可溶性Zcytor16受容体+可溶性CRF2-4受容体ヘテロダイマー(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、Zcytor16/IL-10R、Zcytor16/IL-9R、Zcytor16/zcytor11、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Zcytor16/CRF2-4/zcytor11又はZcytor16/CRF2-4/IL-10R(但し、それらだけには限定されない)を含むマルチマー受容体を包含する。

【0350】

mRNA対応のZcytor16 cDNAの組織分布の分析は、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Zcytor16ヘテロダイマーの使用に向けられる。

10

20

30

40

50

【0351】

さらに、本明細書に記載される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：

【0352】

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； 10

【0353】

2) 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Zcytor16受容体又はZcytor16/CRF2-4ヘテロダイマーに対するMAbにより処理され得る。 20

【0354】

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。Zcytor16は、拮抗性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、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有用であり； 30

【0355】

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Zcytor16、抗可溶性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）。 40

【0356】

同様にアゴニスト性抗-Zcytor16、抗可溶性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。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、膵癌のためにも有益であり得る。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 50

の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。

【0357】

本明細書に記載される可溶性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、肺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。

【0358】

本発明の可溶性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ー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. Drug 20 s 9: 497-513, 2000を参照のこと。

【0359】

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、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と共に組合せられ得る。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。 30

【0360】

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、Zcytor16/IL-TIF複合体は、免疫応答を増強し、又は糸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 Thamasan, A. (ED.) "The Cytokine Handbook", 3rd ED., p. 248-209)。IL12及びCNTFのため 40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。

【0361】

さらに、炎症は、侵入剤を受けとめるための生物による保護応答である。炎症は、多くの細胞及び体液メディエーターを包含する段階的に連続した現象である。他方では、炎症応答の制御は宿主を免疫無防備状態にするが、しかしながら、抑制されなければ、炎症は、慢性炎症性疾患（例えば、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患及び同様のもの）、敗血性ショック及び多発性器官不全を包含する重度の合併症を導くことができる。重要なことには、それらの種々の疾病状態は、共通する炎症性メディエーターを共有する。炎症により特徴づけられる集合的疾患は、ヒト罹病率及び死亡率に対して大きな衝撃を有する。従って、抗-炎症性タンパク質、例えばZcytor16が、ぜん息及び自己免疫性及び 50

敗血性ショックに対するアレルギーからの莫大な数のヒト及び動物疾病のための決定的治療可能性を有することが明白である。

【0362】

1. 関節炎：

変形性関節炎、リュウマチ様関節炎、損傷の結果としての関節炎性の関節、及び同様のものを包含する関節炎は、抗炎症性タンパク質、例えば本発明のzcytor16ポリペプチドの治療使用から利益を得る通常の状態である。例えば、リュウマチ様関節炎（RA）は、全身体に影響を及ぼす全身性疾患であり、そして最も通常の形の関節炎の1つである。それは、痛み、硬直、発熱、赤み及び膨潤を引き起こす、関節の内側をおおう膜の炎症によって特徴づけられる。炎症細胞は、骨及び軟骨を消化することができる酵素を開放する。リュウマチ様関節炎の結果として、炎症の関節内層、すなわち滑液が侵入し、そして骨及び軟骨に損傷を与え、他の生理学的効果の中で、関節変性及び重度の痛みを導く。その関連する関節は、その形状及び整合を失い、痛み及び運動の損傷をもたらす。

10

【0363】

リュウマチ様関節炎（RA）は、重度の疾病及び高められた死亡率を導く、炎症及び続く組織損傷により特に特徴づけられる免疫介在性疾患である。種々のサイトカインがリュウマチ様関節炎において局部的に生成される。多くの研究は、IL-1及びTNF- α （2種のプロトタイプのプロ炎症性サイトカイン）が滑膜炎及び進行性関節破壊に参与する機構において重要な役割を演じることを実証している。実際、RAを有する患者におけるTNF- α 及びIL-1インヒビターの投与は、炎症の臨床学的及び生物学的徴候の劇的な改良、及び骨侵食及び軟骨破壊の放射線学徴候の低下を誘導して来た。

20

【0364】

しかしながら、それらの有望な結果にもかかわらず、有用な%の患者がそれらの剤に対して応答せず、このことは、他のメディエーターがまた、関節炎の病理学にも関与することを示唆する（Gabay, Expert. Opin. Biol. Ther. 2(2): 135-149, 2002）。それらのメディエーターの1つは、IL-9又はIL-TIFであり、そしてIL-TIFを結合するか又は阻害するような分子として、zcytor16ポリペプチド、可溶性Zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又は抗IL-TIF抗体又は結合パートナーが、リュウマチ様関節炎及び他の関節炎患者における炎症を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。

30

【0365】

当業界において知られているリュウマチ様関節炎についてのいくつかの動物モデルが存在する。例えば、コラーゲン誘発された関節炎（CIA）モデルにおいては、マウスは、ヒトリウマチ様関節炎に密接に類似する慢性炎症性関節炎を進行する。CIAはRAと、類似する免疫学的及び病理学的特徴とを共有するので、これは、可能性あるヒト抗炎症性化合物をスクリーニングのための理想的モデルにする。このCIAモデルは、免疫応答及び炎症性応答の両者に依存する、マウスにおける良く知られているモデルである。免疫応答は、抗原として与えられ、そして抗-コラーゲン抗体の生成を導く、コラーゲンに反応してB細胞及びCD4+ T細胞の相互作用を包含する。

【0366】

炎症相は、マウスの生来のコラーゲンと交差反応し、そして補体カスケードを活性化するそれらのいくつかの抗体の結果として、炎症のメディエーターからの組織応答の結果である。CIAモデルを用いることの利点は、病因の基本的機構が知られていることである。タイプIIコラーゲン上の適切なT細胞及びB細胞エピトープは同定されており、そして免疫介在性関節炎に関係する、種々の免疫学的（例えば、遅延性型過敏症及び抗-コラーゲン抗体）及び炎症性（例えば、サイトカイン、ケモカイン及びマトリックス分解酵素）パートナーが決定されており、そして従って、CIAモデルにおける試験化合物の効率を評価するために使用され得る。（Wooley, Curr. Opin. Rheum. 3: 407-20, 1999; William eなど., Immunol. 89: 9784-788, 1992; Myersなど., Life Sci. 61: 1861-78, 1997; 及びWangなど., Immunol. 92: 8955-959, 1995）。

40

【0367】

50

可溶性zcytor16含有ポリペプチド、例えばzcytor16-Fc4又は他のzcytor16可溶性及び融合タンパク質のそれらのCIAモデルマウスへの投与は、症状を改善し、そして疾病の経路を変更するためへのzcytor16の使用を評価するために使用された。zcytor16のリガンド、すなわちIL-TIFは、リウマチ様関節炎の病因に関連するSAAの生成を誘発し、そしてzcytor16はインビトロ及びインビボでIL-TIF及びSAA活性を阻害することができることが示されているので、zcytor16包含ポリペプチド、例えばzcytor16-Fc4又は他のzcytor可溶性及び癒合タンパク質の全身性又は局部投与は、RAにおける炎症性応答を実質的に抑制することができる。10 μ gのzcytor16-Fcの注入（4週間、1週当たり3度）は疾病評点を有意に低めた（足の評点、炎症又は疾病の発生率）。他の可能性ある治療剤は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又は抗IL-TIF抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する。 10

【0368】

2. 内毒血症：

内毒血症は、感染剤、例えば細菌及び他の感染性疾病剤、敗血症、毒性ショック症候群に通常起因するか、又は日和見性感染及び同様のものにゆだねられた免疫無防備状態の患者における重症状態である。治療的に有用な抗炎症性タンパク質、例えば本発明のzcytor16ポリペプチドは、ヒト及び動物における内毒血症の予防及び処理を助ける。zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又は抗IL-TIF抗体又は結合パートナーは、内毒血症における炎症及び病理学的効果を低めるための価値ある治療剤として作用することができる。 20

【0369】

ポリ多糖類（LPS）誘発された内毒血症は、感染性疾病において病理学的効果を生成する多くのプロ炎症メディエーターと連動し、そして嚙歯動物におけるLPS誘発された内毒血症は、可能性あるプロ炎症又は免疫調節剤の薬理学的効果を研究するための広く使用され、そして許容できるモデルである。グラム陰性細菌において生成されるLPSは、敗血症性ショックの病因における主要原因剤である（Glausnerなど., Lancet 338: 732, 1991）。ショック様状態は実際、LPSの動物中への1回の注射入により実験的に誘発され得る。

【0370】

LPSに応答する細胞により生成される分子は、病原体を直接的に又は間接的に標的化することができる。それらの生物学的応答は侵入性病原体に対して宿主を保護するが、それらは損傷を引き起こすことができる。従って、重度のグラム陰性細菌感染の結果として生じる生来の免疫性の強力な刺激が、サイトカイン及び他の分子の過剰の生成、及び致命的症状、発熱により特徴づけられる敗血症性ショック症状、低血圧、散在性血管内凝固、及び多発性器官不全の進行を誘導する（Dumitruなど., Cell 103: 1071-1083, 2000）。 30

【0371】

LPSのそれらの毒性効果は、複数の炎症性メディエーターの導くマクロファージ活性化に最も関連している。それらのメディエーターの中で、TNFは、中和化抗-TNF抗体の投与によるLPS毒性の予防により示されるように、決定的な役割を演じるように見える（Beutlerなど., Science 229: 869, 1985）。C57B1/6マウス中へのE. コリLPS1 μ gの注射が、注射の約2時間後、循環性IL-6、TNF- α 、IL-1、及び急性相タンパク質（例えば、SAA 40）の有意な上昇をもたらすであろうことは、十分に確立されている。LPSの毒性は、それらのメディエーターに対する受動性免疫化が低められた致死性をもたらすので、それらのサイトカインにより介在されると思われる（Beutler など., Science 229: 869, 1985）。敗血症性ショックの予防及び/又は処理のための可能性ある免疫介入方法は、抗-TNF mAb, IL-1受動体アンタゴニスト、LIF、IL-10及びG-CSFを包含する。

【0372】

可溶性zcytor16含有ポリペプチド、例えばzcytor16-Fc4又は他のzcytor可溶性及び融合タンパク質のそれらのLPS-誘発されたモデルへの投与は、症状を改善し、そしてLPS-誘発された疾病の経路を変更するために、zcytor16の使用を評価するために使用された。そのモデルは、LPS注射によるIL-TIFの誘発、及びZcytor16ポリペプチドによる疾病の可能性 50

ある処理を示した。LPSは、プロ炎症性IL-TIF、SAA、又は内毒血症の病理学にたぶん寄与する他のプロ炎症因子の生成を誘発するので、IL-TIF活性、SAA又は他のプロ炎症因子のそのアンタゴニストzcytor16ポリペプチドによる中和は、例えば内毒性ショックに見られる内毒血液の症状を減じるために使用され得る。他の可能性ある治療剤は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又は抗IL-TIF抗体又は結合パートナー及び同様のものを包含する。

【0373】

3. 炎症性腸疾患、IBD:

アメリカ合衆国においては、約500,000人の人々が、結腸又は直腸のいずれか（潰瘍性大腸炎）、又は小及び大腸の両者（クローン病）に影響を及ぼすことができる炎症性腸疾患（IBD）を有する。それらの疾病の病因は不明であるが、しかしそれらは影響される組織の慢性炎症を包含する。zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド又は抗IL-TIF抗体又は結合パートナーは、IBD及び関連する疾病における炎症性及び病理学的効果を低めるための価値ある治療剤として作用する。 10

【0374】

潰瘍性大腸炎（UC）は、結腸の粘膜又は最も内部の内層の炎症及び潰瘍により特徴づけられた、通常結腸と呼ばれる大腸の炎症性疾患である。この炎症は、時折結腸を空にし、下痢をもたらす。症状は、下痢ぎみ及び関連する腸の痙攣、発熱及び体重の低下を包含する。UCの正確な原因は未知であるが、最近の研究は、身体の天然の防御が、身体が外来性に見なすタンパク質に対して作用する（“自己免疫反応”）ことを示唆する。たぶん、それらは腸における細菌タンパク質に類似するので、それらのタンパク質は、結腸の内層を破壊し始める炎症工程を生ぜしめるか又は刺激することができる。 20

【0375】

結腸の内層が破壊されるにつれて、潰瘍が開放性粘液、膿及び血液を形成する。その疾病は通常、直腸領域で始まり、そして最終的に、全大腸中に拡張する。炎症の反復された症状の発現は、癒痕組織を伴なって、腸及び直腸の壁の肥厚化を導く。結腸組織の死又は敗血症は、重度の疾病を生ぜしめる。潰瘍性大腸炎の症状は重症度において変化し、そしてそれらの開始は徐々であるか又は突然であり得る。攻撃は、多くの要因、例えば呼吸器感染又はストレスにより刺激され得る。

【0376】

現在、UCについての有益な治療は存在しないが、処理は、結腸内層における異常炎症工程の抑制に集中される。コルチコステロイド免疫抑制剤（例えば、アザチオプリン、メルカプトプリン及びメトトレキセート）及びアミノサリチレートを含む処理は、その疾病を処理するために入手できる。しかしながら、免疫抑制剤、例えばコルチコステロイド及びアザチオプリンの長期使用は、骨の微細化、白内障、感染、及び腎臓及び骨髄の効果を包含する重度の副作用をもたらすことができる。現在の治療が好都合でない患者においては、手術が任意である。手術は、全結腸及び直腸の除去を包含する。 30

【0377】

慢性潰瘍性大腸炎に部分的に類似するいくつかの動物モデルが存在する。最も広く使用されるモデルは、結腸において慢性炎症及び潰瘍を誘発する、2, 4, 6-トリニトロベンズルホン酸/エタノール（TNBS）誘発された大腸炎モデルである。TNBSが直腸内点滴を通して敏感なマウスの結腸中に導入される場合、それは、結腸粘膜において、T-細胞介在性免疫応答を誘発し、この場合、大腸の全壁じゅうへのT-細胞及びマクロファージの強い浸潤により特徴づけられた大量の粘膜浸潤を導く。さらに、この組織病理学的臨床像は、進行性体重の低下（消耗）、出血性下痢、直腸脱出及び大腸壁の肥厚化の臨床学的像を付随する（Neurathなど., Intern, Rev. Immunol. 19: 51-62, 2000）。 40

【0378】

もう1つの大腸炎モデルは、出血性下痢により明白な急性大腸炎、体重の低下、結腸の短縮、及び好中球浸潤を伴った粘膜性潰瘍を誘発する硫酸デキストランナトリウム（DSS）を使用する。DSS誘発された大腸炎は、リンパ過形成、病巣陰窩損傷及び上皮潰瘍を伴 50

なって、粘膜固有層中への炎症細胞の浸潤により組織学的に特徴づけられる。それらの変化は、上皮上へのDSSの毒性効果により、及び粘膜固有層細胞のファゴサイトーシス、及びTNF- α 及びIFN- γ の生成により進行すると思われる。その通常の使用にもかかわらず、ヒト疾病への関連性についてのDSSの機構に関するいくつかの問題点は未解決のままである。DSSは、それがT細胞欠失動物、例えばSCIDマウスにおいて観察されるので、T細胞-無関係モデルとして見なされる。

【0379】

可溶性zcytor16含有ポリペプチド、例えばzcytor16-Fc4又は他の可溶性zcytor6及び融合タンパク質のそれらのTNBS又はDSSモデルへの投与は、症状を改善し、そして胃腸病の経路を変更するためにzcytor16の使用を評価するために使用され得る。本発明者は、RT-PCRによるDSS-マウスの結腸組織におけるIL-TIFの高められた発現、及び腸細胞系に対するIL-TIF及びIL-1 β の相乗活性を観察した。それは、IL-TIFが大腸炎における炎症応答において役割を演じ、そしてzcytor16ポリペプチドを投与することによるIL-TIF活性の中和がIBDに関しての可能性ある治療アプローチであることを示す。他の可能性ある治療剤は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又はIL-TIF抗体又は結合パートナー、及び同様のものを包含する。

【0380】

4. 乾癬：

乾癬は、700万以上のアメリカ人に影響を及ぼす慢性皮膚状態である。乾癬は、新しい皮膚細胞が異常に増殖する場合に生じ、古い皮膚がすばやく十分に脱皮しない皮膚の赤く熱をもち、はれ上がった、鱗状の皮膚パッチをもたらす。最も通常の形であるプラーク乾癬は、銀色がかった白色鱗片を上部に有する皮膚の炎症性パッチ（“病変”）により特徴づけられる。乾癬は、少数のプラークに限定されるか、又は頭皮、膝、肘及び体幹上に最も通常には出現する、中位～強い皮膚領域を包含する。それは高く認識できるが、乾癬は感染性疾患ではない。疾患の病因は、影響された組織の慢性炎症を包含する。zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド又は抗-IL-TIF抗体又は結合パートナーは、乾癬、他の炎症性皮膚疾患、皮膚及び粘膜アレルギー及び関連する疾患における炎症及び病理学的効果を低めるために価値ある治療剤として作用することができる。

【0381】

乾癬は、相当な不快性を引き起こすことができる皮膚のT細胞介在性炎症障害である。それは、治癒せず、そしてすべての年齢の人々に影響を及ぼす疾患である。乾癬は、ヨーロッパ及び北アメリカの人口の約2%に影響する。軽い乾癬を有する個人はしばしば、局部剤によりそれらの疾患を制御することができるが、世界じゅうの10万人以上の患者は、紫外線又は全身性免疫抑制療法を必要とする。不運なことには、紫外線の不便性及び危険性、及び多くの治療の毒性が、それらの長期使用を制限する。さらに、患者は通常、乾癬の再発、及び多くの場合、免疫抑制療法の停止後すぐに、再発を有する。

【0382】

IL-20は、IL-20トランスジェニックマウスにおける異常上皮分化を包含する皮膚異常性を伴って、新生児致死性を引き起こす新規IL-10相同体である（Bluberg, H. など., Cell 104: 9-19, 2001）。IL-20受容体は、乾癬皮膚において劇的にアップレギュレートされる。IL-TIFは、IL-20受容体と受容体サブユニット（zcytor11）を共有し、そしてIL-TIFトランスジェニックマウスは類似する表現型を示すので、IL-TIFはまた、炎症性皮膚疾患、例えば乾癬に包含されることが可能である。zcytor16ポリペプチドの皮下又は局部投与は、炎症及び症状を潜在的に低めることができる。他の可能性ある治療剤は、Zcytor16ポリペプチド、可溶性zcytor11/CRF2-4受容体ポリペプチド、又は抗-IL-TIF抗体又は結合パートナー、及び同様のものを包含する。

【0383】

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Zcytor16可

10

20

30

40

50

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、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。

【0384】

さらに、本発明の可溶性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Zcytor16受容体又は可溶性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、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。

【0385】

さらに、可溶性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。

【0386】

一般的に、投与されるZcytor16（又は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のであろう。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。

Zcytor16ポリペプチ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ーラスによることができる。

【0387】

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）。

【0388】

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 Gombo

tz, 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、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))。

【0389】

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”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の1つの例である。他の適切なキャリアは、当業者に良く知られている。例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) を参照のこと。

【0390】

治療のためには、Zcytor16活性を有する分子及び医薬的に許容できるキャリアが、治療的に有効な量で患者に投与される。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。

【0391】

Zcytor16 (又は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包含する。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))。

【0392】

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)。

【0393】

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 μm ~ 10 μm 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、Mackay 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。

【0394】

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ーシス化され得る。エンドサイトーシスに続いて、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（0.1～1.0 μm ）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 μm 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。

【0395】

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)）。

【0396】

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、大豆ホスファチジルコリン、 α -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（HC0-60）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)）。

【0397】

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リ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—ラベルされたリ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。

【0398】

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 50

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。

【0399】

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))。

【0400】

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, 2nd Edition, Vol. III, Gregoria dis (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))。

10

【0401】

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 (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)。

20

【0402】

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Zcytor16活性、例えば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Zcytor16アンタゴニスト、例えば抗-Zcytor16抗体又は結合ポリペプチドを企画する。

30

【0403】

他の用量形は、例えば、Anset and Popovich. Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems. 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical sciences. 19th 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。

40

【0404】

例示のように、医薬組成物は、Zcytor16細胞外ドメイン、例えば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Zcytor16アンタゴニスト (例えば、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

50

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、液体エア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、Zcytor16組成物が、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。

【0405】

13. Zcytor16ヌクレオチド配列の治療的使用：

本発明は、Zcytor16を、そのような処理の必要な対象に供給するためへのZcytor16ヌクレオチド配列の使用を包含する。さらに、Zcytor16遺伝子発現を阻害する治療用発現ベクター、例えばアンチセンス分子、リボザイム又は外部案内配列分子が供給され得る。

10

【0406】

Zcytor16を発現する組換え宿主細胞の使用、Zcytor16をコードする裸の核酸の供給、Zcytor16をコードする核酸分子と共にカチオン性脂質キャリアーの使用、及びZcytor16を発現するウィルス、例えば組換えレトロウィルス、組換えアデノ関連ウィルス、組換えアデノウィルス、及び組換えヘルペス単純ウィルス（HSV）の使用を包含する、Zcytor16遺伝子を対象に導入するための多くのアプローチが存在する（例えば、Mulligan, Science 260: 926 (1993), Rosenberg など., Science 242: 1575 (1988), LaSalle など., Science 250: 988 (1993), Wolffなど., Science 247: 1465 (1990), Breakfield and Deluca, The New Biologist 3: 203 (1991) を参照のこと）。エクスピボアプローチにおいては、細胞が対象から単離され、Zcytor16遺伝子を発現するベクターによりトランスフェクトされ、そして次に、対象中に移植される。

20

【0407】

Zcytor16遺伝子の発現をもたらすために、Zcytor16遺伝子をコードするヌクレオチド配列が、遺伝子転写を制御するために、コアプロモーター及び任意には、調節要素に作用可能に連結される発現ベクターが構成される。発現ベクターの一般的な必要性は、上記に記載されている。

【0408】

他方では、Zcytor16遺伝子は、組換えウィルスベクター、例えばアデノウィルスベクター（例えば、Kass-Eister など., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90: 11498 (1993), Kolis など., proc. Nat'l Acad. Sci. USA 91: 215 (1994), Li など., Hum. Gene Ther. 4;4 03 (1993), Vincent など., Nat. Genet. 5:130 (1993), and Zabner など., Cell 75: 2 07 (1993))、アデノウィルスー関連ウィルスベクター（Flotteなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10613 (1993))、アルファウィルス、例えば“Semliki Forest ウィルス及びSindbis ウィルス（Hertz and Huang, J. Vir. 66: 857 (1992), Raju and Huang, J. vir. 65:2501 (1991), 及びXiongなど., Science 243: 1188 (1989))、ヘルペスウィルスベクター（Koeringなど., Hum. Gene. Therap. 5: 457 (1994))、

30

【0409】

ボックスウィルスベクター（Ozakiなど., Biochem. Biophys. Res. Comm. 193: 653 (1993), Panicali and Paoietti, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 4927 (1982))、ボックスウィルス、例えばカナリヤボックスウィルス又はワクシニアウィルス（Fisher-Hochなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 317 (1989) 及びFlexner など., Ann. N. Y. Acad. Sci. 569: 86 (1989))、及びレトロウィルス（Baba など., J. Neurosurg 79: 729 (1993), Ram など., Cancer Res. 53:83 (1993), Takamiyaなど., J. Neurosci. Res. 33: 493 (1992), Vile and Hart, Cancer Res. 53: 962 (1993), Vile and Hart, Cancer Res. 53: 3860 (1993) 及びAndersonなど., アメリカ特許第5,399,346号）を用いて供給され得る。種々の態様においては、ウィルスベクター自体又はウィルスベクターを含むウィルス粒子のいずれかが、下記に記載される方法及び組成物に使用され得る。

40

【0410】

1つシステムの例示として、アデノウィルス、すなわち二本鎖DNAウィルスは、異種核酸分子の供給のための十分に特徴づけられた遺伝子トランスファーベクターである（Becker

50

など., Meth. Cell Biol. 43:161 (1994); Douglas and Curiel, Science & Medicine 4: 44 (1997))。アデノウィルスシステムは、次のいくつかの利点を提供する：(i) 比較的大きなDNA挿入体を収容する能力、(ii) 高い力価に増殖する能力、(iii) 広範囲の哺乳類細胞型を感染する能力、及び(iv) 多くの異なったプロモーター、例えば遍在性で、組織特異的な、及び調節できるプロモーターと共に使用される能力。さらに、アデノウィルスは、そのウィルスが血流において安定しているので、静脈内注射により投与され得る。

【0411】

アデノウィルスゲノムの一部が欠失されているアデノウィルスベクターを用いて、挿入体は、直接的な連結により、又は同時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中に組み込まれる。典型的なシステムにおいては、必須E1遺伝子がウィルスベクターから欠失され、そしてウィルスは、E1遺伝子が宿主細胞により供給されない場合、複製しないであろう。損なわれていない動物に静脈内供給される場合、アデノウィルスは主に、肝臓を標的化する。E1遺伝子欠失を有するアデノウィルス供給システムが宿主細胞において複製しない場合、宿主の組織は、コードされた異種タンパク質を発現し、そしてプロセッシングするであろう。宿主細胞はまた、その対応する遺伝子が分泌シグナル配列を含む場合、異種タンパク質を分泌するであろう。分泌されたタンパク質は、異種遺伝子を発現する組織（例えば、高く血管化された肝臓）から循環に侵入するであろう。

10

【0412】

さらに、ウィルス遺伝子の種々の欠失を含むアデノウィルスベクターは、そのベクターに対する免疫応答を低めるか又は排除するために使用され得る。そのようなアデノウィルスは、E1-欠失され、そしてさらに、E2A又はE4の欠失を含む（Luskyなど., J. Virol. 72: 2022 (1998); Raper など., Human Gene Therapy 9: 671 (1998))。E2bの欠失はまた、免疫応答を低めることが報告されている（Amalfitanoなど., J. Virol. 72:926 (1998))。完全なアデノウィルスゲノムを欠失することによって、異種DNAの非常に大きな挿入体が収容され得る。すべてのウィルス遺伝子が欠失されている、いわゆる“不活性 (gutless)”アデノウィルスの生成は、異種DNAの大きな挿入体の挿入のために特に好都合である（Yeh and Perricaudet, FASEB J. 11: 615 (1997) を参照のこと）。

20

【0413】

治療用遺伝子を発現できる組換えウィルスの高い力価のストックが、標準方法を用いて、感染された哺乳類細胞から得られる。例えば、組換えHSVは、Vero細胞において、Brandt など., J. Gen. Virol. 72: 2043 (1991), Herold など., J. Gen. Virol. 75:1211 (1994), Visalli and Brandt, Virology 185:419 (1991), Grauなど., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 30: 2474 (1989), Brandiなど., J. Virol. Meth. 36:209 (1992), 及びBrawn and MacLean (eds.), HSV Virus Protocols (Human Press 1997) により記載のようにして、調製され得る。

30

【0414】

他方では、Zcytor16遺伝子を含んで成る発現ベクターは、リポソームを用いてのインビボリポフェクションにより、対象の細胞に導入され得る。合成カチオン脂質が、マーカーをコードする遺伝子のインビボトランスフェクションのためのリポソームを調製するために使用され得る（Felgner など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413-17, 1987; 及びMackey など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8027-31, 1988)。インビボで特定の器官中に外因遺伝子を導入するためへのリポフェクションの使用は、一定の実際的な利点を有する。特定細胞型へのトランスフェクションの方向づけが、細胞異質性を有する組織、例えば脾臓、肝臓、腎臓及び脳において特に好都合であることは明白である。脂質は、標的化のために他の分子に化学的に得られる。標的化されたペプチド（例えば、ホルモン又は神経伝達物質）、タンパク質、例えば抗体又は非ペプチド分子は、化学的にリポソームに結合され得る。

40

【0415】

50

エレクトロポレーションは、投与のもう1つの態様である。例えば、Aihara and Miyazaki, Nature Biotechnology 16: 867 (1998) は、筋肉中への遺伝子トランスファーのためへのインビポエレクトロポレーションの使用を示している。

遺伝子療法へのもう1つのアプローチにおいては、治療用遺伝子は、Zcytor16の発現を阻害するZcytor16アンチセンスRNAをコードすることができる。アンチセンス分子のための適切な配列は、本明細書に開示されるZcytor16のヌクレオチド配列から誘導され得る。

【0416】

他方では、調節要素がリボザイムをコードするヌクレオチド配列に作用可能に連結される発現ベクターが構成され得る。リボザイムは、mRNA分子における一定の標的配列に向けられるエンドヌクレアーゼ活性を発現するよう企画され得る（例えば、Draper and Macejak, アメリカ特許第5,496,698号、McSwiggen, アメリカ特許第5,525,468号、Chowrira and McSwiggen, アメリカ特許第5,631,369号及びRobertson and Goldberg, アメリカ特許第5,225,337号を参照のこと）。本発明においては、リボザイムはZcytor16 mRNAと結合するヌクレオチド配列を包含する。

【0417】

もう1つのアプローチにおいては、調節要素がZcytor16遺伝子をコードするmRNA分子のRNアーゼP-介在性切断を促進できるRNA転写体の生成を方向づける発現ベクターが構成され得る。このアプローチによれば、外部案内配列が、細胞リボザイムにより続いて切断される、特定種の細胞内mRNAに内因性リボザイム、すなわちRNアーゼPを向けるために構成され得る（例えば、Altmanなど., アメリカ特許第5,168,053号、Yuanなど., Science 263: 1269 (1994), Paceなど., W096/18733号、Georgeなど., W096/21731号及びWemerなど., W097/33991号を参照のこと）。好ましくは、前記外部案内配列は、Zcytor16 mRNAに対して相補的な10~15個のヌクレオチド配列、及び3'-NCCAヌクレオチド配列（ここで、Nは好ましくはプリンである）を含んで成る。外部案内配列転写体は、mRNAと相補的外部案内配列との間での塩基対の形成により、標的化されたmRNA種に結合し、従って、前記塩基対合された領域の5'側に位置するヌクレオチドでのRNアーゼPによるmRNAの切断を促進する。

【0418】

一般的に、Zcytor16ヌクレオチド酸配列を有する治療用ベクター、例えば組換えウィルスを含んで成る組成物の用量は、対照の年齢、体重、身長、性別、一般的な医学的状態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のであろう。治療用ベクターの適切な投与経路は、静脈内注射、動脈内注射、腹腔内注射、筋肉内注射、腫瘍内注射、及び腫瘍を含む腔中への注射を包含する。例示のように、Hortonなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 1553 (1999)は、インターフェロン- α をコードするプラスミドDNAの筋肉内注射がネズミモデルにおいて一次及び転移性腫瘍に対する可能性ある抗腫瘍効果を生成することを示す。

【0419】

本発明のウィルスベクター、非ウィルスベクター又はウィルス及び非ウィルスベクターの組み合わせを含んで成る組成物は、医薬的に有用な組成物を調製するための既知方法に従って配合され得、それによれば、ベクター又はウィルスは、医薬的に許容できるキャリアと共に混合される。上記で示されるように、組成物、例えばリン酸緩衝溶液は、その投与が受容体対象により許容され得る場合、“医薬的に許容できるキャリア”であると言われる。他の適切なキャリアは、当業者に良く知られている（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995), 及びGilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)を参照のこと）。

【0420】

治療のためには、治療用遺伝子ベクター、又はそのようなベクターを含んで成る組換えウィルス、及び医薬的に許容できるキャリアが、治療的有效量で対象に投与され得る。発現ベクター（又はウィルス）及び医薬的に許容できるキャリアの組み合わせは、投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的有效量”で投与されると言われる。剤は、

その存在が受容体対象の生理学において検出でき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。

【0421】

治療用遺伝子発現ベクター又は組換えウィルスにより処理される対象がヒトである場合、治療は好ましくは、体細胞遺伝子治療である。すなわち、治療用遺伝子発現ベクター又は組換えウィルスによるヒトの好ましい処理は、ヒト生殖細胞系の一部を形成し、そして次の世代に通され得る核酸分子を細胞中に導入すること（すなわち、ヒト生殖系遺伝子治療）を必要としない。

【0422】

14. 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は、すべての組織において、又は組織一特異的又は組織に好ましい調節要素の制御下で、Zcytor16遺伝子を過剰発現するよう構築され得る。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。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Zcytor16、例えば可溶性Zcytor16の生成のためのモデル生物反応体を提供する。

【0423】

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）。

【0424】

例えば、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（Taconic 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。

【0425】

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。

【0426】

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% CO₂、5% O₂ 及び90% N₂と共に37°C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°C/5% CO₂のインキュベーターに貯蔵する。

【0427】

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 (pH 7.4

10

20

30

40

50

), 0.25mMのEDTA (pH8.0) の溶液に再懸濁する。例えば、Zcytor16コード配列は、配列番号2のアミノ酸残基をコードすることができる。

プラスミドDNAを、暖かな、CO₂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(0.75mmのID, 1mm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。

【0428】

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%CO₂のインキュベーターにおいて一晩、貯蔵する。 10

【0429】

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。

【0430】

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。 20

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。

【0431】

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。 30

【0432】

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。 40

【0433】

生存動物におけるトランスジーン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。

【0434】

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 50

に配置する。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。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。

【0435】

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、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、Zcytor16遺伝子発現は、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。Zcytor16遺伝子を過剰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例えば配列番号37に示され、そして本明細書に記載されるように、フラグメント及び全5' UTR、コード領域、及び3' UTRを包含する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）。

10

20

【0436】

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Zcytor16遺伝子により置換された、少なくとも1つの正常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、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）。

30

【0437】

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、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、Zcytor16ポリヌクレオチドは、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。

40

【0438】

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。

50

【0439】

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 α 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、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、Zcytor16の教育的利用はそれ自体ユニークであろう 10

【0440】

さらに、Zcytor16は組織－特異的発現を有し、そしてクラスIサイトカイン受容体構造及び明白な染色体局在化、及び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。

【0441】

さらに、Zcytor16ポリヌクレオチドは、その遺伝子座が知られているので、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。さらに、学生は、ヒト染色体1について、及びより特定には、Zcytor16遺伝子が位置する遺伝子座6q23-q24について訓練され、そして教育され得る。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

【0442】

Zcytor16に対して特異的に結合する抗体は、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、ヒト型化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、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、又は卵巣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

【0443】

次に、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。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ると 40

【0444】

15. IL-TIFに結合するか、又はIL-TIFアンタゴニスト活性を有する、抗体又はポリペプチドの治療使用：

IL-TIFポリヌクレオチドは、T細胞、活性化されたT及びB細胞、及びリンパ組織において発現される。ヒトIL-TIFヌクレオチド配列は、配列番号14で表される。

【0445】

配列番号14の分析は、それから翻訳されたIL-TIFサイトカインポリペプチドのための2個の可能な開始メチオニン残基が存在することを示す。前記2個の推定されるIL-TIFポ 50

リペプチドアミノ酸配列は、配列番号15で示される（配列番号14におけるヌクレオチド21で開始Metを有する179個のアミノ酸ポリペプチド、配列番号14におけるヌクレオチド57で開始Metを有する167個のアミノ酸ポリペプチド）。それらの両配列はIL-TIFポリペプチドをコードするが、IL-10及び他のサイトカインへのIL-TIF配列の類似性及び強いシグナル配列の存在に基づいて、配列番号15のアミノ酸34（Ala）～179（Ile）は、十分に機能的な、分泌されたIL-TIFサイトカインポリペプチドをコードする。N末端配列分析は、成熟が配列番号15の残基34（Ala）で開始することを示す。

【0446】

一般的に、サイトカインは4- α ヘリックス構造を有することが予測され、そして前記第1及び第4ヘリックスはリガンド-受容体相互作用において最も重要である。前記第1及び第4ヘリックスは、ファミリーのメンバー間でより高く保存される。配列番号15で示されるヒトIL-TIFアミノ酸配列に関しては、ヒトIL-TIF、ヒトIL-10、ヒトzcytor10（WO US98/25288号）及びヒトHuman MDA7（Genbank受託番号Q13007号）アミノ酸配列の一例整理は、IL-TIFヘリックスAが配列番号15のアミノ酸残基53（Thr）～65（Leu）により定義され；ヘリックスBは配列番号15のアミノ酸残基92（Met）～103（Val）により定義され；ヘリックスCは配列番号15のアミノ酸残基115（Met）～128（Arg）により定義され；そしてヘリックスDは配列番号15のアミノ酸残基161（Ile）～174（Leu）により定義されることを示す。

10

【0447】

構造分析は、A/Bループが長く、B/Cループが短く、そしてC/Dループが長いことを示唆する。このループ構造は、アップ-アップ-ダウン-ダウンヘリカル機構をもたらす。4個のシステイン残基は、配列番号15のアミノ酸残基20、40、89及び132に対応する、IL-10とIL-TIFとの間に保存される。矛盾しないシステイン配置は、4-ヘリカル束構造のさらなる確認である。

20

【0448】

本明細書に記載されるIL-TIF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の対応するポリヌクレオチドは、配列番号1に示される通りである。さらに、本明細書に記載されるその対応するIL-TIFポリペプチド領域、ドメイン、モチーフ、残基及び配列はまた、配列番号15に示される通りである。

【0449】

4-ヘリカル束サイトカインはまた、それらの成分ヘリックスの長さにより分類される。“長い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、24～30個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-6、繊維好中球因子（CNTF）、白血病阻害因子（LIF）及びヒト成長ホルモン（hGH）を包含する。“短い-ヘリックス”形のサイトカインは一般的に、18～21個の残基のヘリックスから成り、そしてIL-2、IL-4及びGM-CSFを包含する。IL-TIFは、短い-ヘリックス形のサイトカイングループの新規メンバーであると思われる。CNTF及びIL-6を用いての研究は、CNTFヘリックスがIL-6における相当のヘリックスにより交換され得、キメラにCNTF-結合性質を付与することを示した。

30

【0450】

従って、4-ヘリカル束サイトカインの機能的ドメインが配列同一性に関係なく、構造的相同性に基づいて決定され、そしてキメラにおいて機能的に組み込みを維持することができると思われる（Kallenなど., J. Biol. Chem. 274: 11859-11867, 1999）。類似する方法を用いて、IL-TIFにおける受容体結合特異性を付与する推定上の領域は、残基65～72、残基97～103及び残基133～152を包含する、配列番号15の34（Ala）～179（Ile）のアミノ酸残基の領域を含んで成る。それらの領域は、受容体結合特異性を決定し、そして調節するために、他の短い-ヘリックス形のサイトカインを特に有するキメラ分子を調製するために有用であろう。

40

【0451】

本発明はまた、本明細書に記載されるIL-TIF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

50

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）。

【0452】

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。

10

【0453】

Hopp/Woods親水性プロフィールは、最も抗原性の可能性を有する領域を決定するために使用され得る（Hoppなど., 1981, 前記；及びHopp, 1986, 前記）。IL-TIFにおいては、それらの領域は、次のものを包含する：（1）配列番号15のアミノ酸番号41（Arg）～アミノ酸番号46（Asn）；（2）配列番号15のアミノ酸番号133（His）～アミノ酸番号138（Asp）；（3）配列番号15のアミノ酸番号146（Gln）～アミノ酸番号151（Thr）；（4）配列番号15のアミノ酸番号149（Lys）～アミノ酸番号154（Lys）；及び（5）配列番号15のアミノ酸番号157（Glu）～アミノ酸番号162（Lys）。

20

【0454】

さらに、例えばDNASTAR Proteanプログラム（DNASTAR, Inc., Madison, WI）を用いて、Jameson-Wolfプロットにより推定されるようなIL-TIF抗原性エピトープは、好ましい抗原として作用し、そして当業者により容易に決定される。そのような抗原は、次のものを包含する：（1）配列番号15のアミノ酸番号40（Cys）～アミノ酸番号47（Phe）；（2）配列番号15のアミノ酸番号64（Ser）又は67（Asp）～アミノ酸番号71（Asp）又は112（Gln）又は115（Met）；（3）配列番号15のアミノ酸番号106（Pro）又は104（Gln）～アミノ酸番号112（Gln）又は115（Met）；（4）配列番号15のアミノ酸番号125（Leu）～アミノ酸番号130（Ser）又は131（Thr）；（5）配列番号15のアミノ酸番号135（Glu）～アミノ酸番号138（Asp）又は140（His）；及び（6）配列番号15のアミノ酸番号146（Gln）又は156（Gly）～アミノ酸番号159（Gly）。

30

【0455】

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、配列番号15の34（Ala）～179（Ile）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14～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、IL-TIF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ェ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

【0456】

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, Ritter 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。

50

【0457】

IL-TIFポリペプチドはまた、IL-TIFエピトープ、ペプチド又はポリペプチドに特異的に結合する抗体を調製するためにも使用され得る。IL-TIFポリペプチド又はそのフラグメントは、動物を接種し、そして免疫応答を誘発するための剤(免疫原)として作用する。そのような抗体はプロ炎症性IL-TIFの生物学的作用を阻止するためにも使用され得、そして本明細書に記載されるような種々の疾病における抗炎症性治療剤として有用である。当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドがIL-TIFポリペプチド(例えば、配列番号15の34(Ala)~179(Ile))の少なくとも6、好ましくは少なくとも9及びより好ましくは少なくとも15~約30個の連続したアミノ酸残基を含むことを認識するであろう。IL-TIFポリペプチドの大きな部分、すなわち配列番号15のアミノ酸配列の30~100個の残基~その全体の長さの残基を含んでなるポリペプチドが含まれる。

【0458】

抗原又は免疫原エピトープはまた、本明細書に記載されるように、結合された標識、アジュバンド及びキャリアを含むことができる。適切な抗原は、配列番号15のアミノ酸番号34(Ala)~アミノ酸番号179(Ile)によりコードされるIL-TIFポリペプチド、又は連続した9~144個又は30~144このそのアミノ酸フラグメントを含む。他の適切な抗原は、本明細書に記載されるように、単離されたヘリックスを含んで成るポリペプチド及び4-ヘリカル束構造のフラグメントを包含する。

【0459】

抗原として使用するための好ましいペプチドは、親水性ペプチド、例えば本明細書に記載されるように、疎水性プロットから当業者により予測されるそれらのものである。さらに、例えばDNASTAR Proteanプログラム(DNASTAR, Inc., Madison, WI)を用いて、Jameson-Wolfプロットにより推定されるようなIL-TIF抗原性エピトープは、好ましい抗原として作用し、そして当業者により容易に決定される。

【0460】

それらの抗原(又は免疫原)による動物の接種により生成される免疫応答からの抗体は、本明細書に記載のようにして単離され、そして精製され得る。ポリクローナル及びモノクローナル抗体を調製し、そして単離するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、Current Protocols in Immunology, Cooligan, など., (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook など., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; 及びHurrell, J.G.R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982 を参照のこと。

【0461】

当業者に明らかなように、ポリクローナル抗体は、種々の温血動物、例えば馬、ウシ、ヤギ、羊、犬、鶏、ウサギ、マウス、及びラットを、IL-TIFポリペプチド又はそのフラグメントにより接種することにより生成され得る。IL-TIFポリペプチドの免疫性は、アジュバント、例えばミヨウバン(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により高められ得る。免疫化のために有用なポリペプチドはまた、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ポリペプチド、例えばIL-TIF又はその一部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、免疫化のために、高分子キャリア(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)に都合良く連結又は結合され得る。

【0462】

本明細書で使用される場合、用語“抗体”とは、ポリクローナル抗体、親和性精製されたポリクローナル抗体、モノクローナル抗体及び抗原結合フラグメント、例えばF(ab')₂及びFabタンパク質分解性フラグメントを包含する。遺伝子的に構築された損なわれていない抗体又はフラグメント、例えばキメラ抗体、Fvフラグメント、一本鎖抗体及び同様のもの、並びに合成抗原結合ペプチド及びポリペプチドもまた包含される。非ヒト抗体は、ヒ

ト骨格及び不変領域上に非ヒトCDRのみを移植することによって、又は完全な非ヒト可変ドメインを組み込むことによって（任意には、暴露された残基の置換によってヒト様表面によりそれらのドメインを“おお（cloaking）”ことによって；ここで結果物は“張り合わされた”抗体である）、ヒト適合され得る。多くの場合、ヒト型化抗体は、正しい結合特性を増強するために、ヒト可変領域骨格ドメイン内に非ヒト残基を保持することができる。

【0463】

ヒト適合化抗体を通して、生物学的半減期が高められ、そしてヒトへの投与に基づく有害な免疫反応の可能性が低められる。さらに、ヒト抗体は、WIPO公開W098/24893号に開示されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むよう構築されたトランスジェニック非ヒト動物において生成される。好ましくは、それらの動物における内因性免疫グロブリン遺伝子は、相同組換えにより不活性化されるか又は排除される。

10

【0464】

抗体は、1）それらが限界レベルの結合活性を示す場合、及び2）それらが関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しない場合、特異的に結合すると考えられる。限界レベルの結合は、本明細書における抗-IL-TIF抗体が対照（非-IL-TIF）ポリペプチドへの結合親和性よりも少なくとも10倍高い親和性を伴って、IL-TIFポリペプチド、ペプチド又はエピトープに結合するかどうか決定される。好ましくは、抗体は、 10^6 M^{-1} 又はそれ以上、好ましくは 10^7 M^{-1} 又はそれ以上、より好ましくは 10^8 M^{-1} 又はそれ以上、及び最も好ましくは 10^9 M^{-1} 又はそれ以上の結合親和性（ K_a ）を示す。抗体の結合親和性は、例えばScatchard分析（Scatchard, G., Ann. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949）を用いて、当業者によって容易に決定され得る。

20

【0465】

抗-IL-TIF抗体は関連するポリペプチド分子と有意に交差反応しないかどうかは、例えば、標準のウェスタンブロット分析を用いて、IL-TIFポリペプチドであるが、しかし知られていない関連するポリペプチドを検出する抗体により示される（Ausubel など., 前記）。既知の関連するポリペプチドの例は、従来技術に開示されているそれらのもの、例えば既知のオルト体及びパラ体、及びタンパク質ファミリーの類似する既知メンバーである。スクリーニングはまた、非ヒトIL-TIF及びIL-TIF変異体ポチペプチドを用いて行われ得る。さらに、抗体は、IL-TIFポリペプチドに対して特異的に結合する集団を単離するために、既知の関連するポリペプチドに“対してスクリーンされ得る”。例えば、IL-TIFに対して生ぜしめられた抗体は不溶性マトリックスに付着される関連するポリペプチドに吸着され；IL-TIFに対して特異的な抗体は適切な緩衝液条件下で前記マトリックスを通して流れるであろう。

30

【0466】

スクリーニングは、既知の溶接に関連するポリペプチドに対して交差反応しないポリクローナル及びモノクローナル抗体の単離を可能にする（Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, など. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995）。特異的抗体のスクリーニング及び単離は当業界において当業界において良く知られている。

40

【0467】

Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff など., Adv. in Immunol. 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J. W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin など., Ann. Rev. Immunol. 2: 67-101, 1984を参照のこと。特異的に結合する抗-IL-TIF抗体は、当業界において知られており、そして下記に開示される多くの方法により検出され得る。

【0468】

当業者に知られている種々のアッセイがIL-TIFタンパク質又はペプチドに特異的に結合する抗体を検出するために使用され得る。典型的なアッセイは、Antibodies: A Laborato

50

ry Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 に詳細に記載されている。そのようなアッセイの代表的な例は次のものを包含する: 同時免疫電気泳動、ラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ沈殿、酵素結合の免疫吸着アッセイ (ELISA)、ドットプロット又はウェスタンブロットアッセイ、阻害又は競争アッセイ。及びサンドイッチアッセイ。さらに、野生型対変異体の IL-TIF タンパク質又はペプチドに結合する抗体がスクリーンされ得る。

【0469】

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、IL-TIF タンパク質又は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 IL-TIF タンパク質又はペプチドの作用を通して) を包含する。可能性ある IL-TIF 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。

【0470】

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。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。

【0471】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、IL-TIF 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 IL-TIF 配列を用いてスクリーンされ得る。IL-TIF ポリペプチドと相互作用するそれらの“結合ポリペプチド”は、細胞を標識するために; 親和性精製によりパラ体及び相同体ポリペプチドを単離するために使用され得る; 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。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、例えばリガンドと受容体又は受容体に結合するウィルスとの間の相互作用を阻止しするためにも使用され得る。

【0472】

結合ポリペプチドはまた、IL-TIF 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 IL-TIF ポリペプチド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、IL-TIF 結合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、IL-TIF “アンタゴニスト”として使用することができる。それらの抗-IL-TIF 結合ポリペプチドは、IL-TIF 活性又はタンパク質を阻害するために有用である。そのような抗-IL-TIF 結合ポリペプチドは、プロ-炎症性 IL-TIF の生物学的作用を阻止するために使用され、そして本明細書に記載されるように種々の疾病における抗-炎症性治療剤として有用である。

【0473】

IL-TIF に対する抗体は、IL-TIF を発現する細胞を標識するために; アフィニティー精製

によりIL-TIFを単離するために；例えば、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IL-TIF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；抗-インディオタイプ抗体を生成するために；及びインビトロ及びインビボで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。

【0474】

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、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、IL-TIF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IL-TIF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

【0475】

本明細書における抗体又はポリペプチドはまた、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、インビボ診断又は治療用途のために使用される。例えば、本発明のポリペプチド又は抗体は、対応する抗-相補的分子（例えば、それぞれ受容体又は抗原）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、抗-IL-TIF抗体又はその生物活性フラグメントが、検出可能な又は細胞毒性の分子に連結され、そして抗-相補的分子を発現する細胞、組織又は器官を有する哺乳類に供給され得る。

20

【0476】

適切な検出可能分子は、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。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、ブ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間接的に結合される）を包含する。

30

【0477】

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/ストレプトアビジンが典型的な相補的/抗相補的対である。

【0478】

もう1つの態様においては、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、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細胞/組織-特異的供給のための一般的標的化ベクターを表す。そのようなサイトカイン毒素融合タンパク質は、標的組織のインビボ殺害のために使用され得る。

40

50

【0479】

もう1つの態様においては、IL-TIFサイトカイン融合タンパク質又は抗体-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zcytor10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、白血病、リンパ腫、肺癌、結腸癌、メラノーマ、膵臓癌、卵巣癌、血液及び骨髄癌、又はIL-TIF受容体が発現される他の癌）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）。

【0480】

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。適切なIL-TIFポリペプチド又は抗-IL-TIF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。

10

【0481】

さらにもう1つの態様においては、IL-TIFポリペプチド又は抗-IL-TIF抗体が血管細胞又は組織を標的化する場合、そのようなポリペプチド又は抗体は、再狭窄を低めるために、放射性核種、及び特に β -放出性放射性核種により接合され得る。そのような治療アプローチは、放射線治療法を行う臨床医に対して低い危険性を提供する。例えば、必要とされる放射線量が提供されるまで、患者のステント支持された血管中に配置されたイリジウム-192含浸されたりボンは、血管における低められた組織増殖、及びブラシーボリボンを受けた対照グループよりも大きな管腔直径を示した。さらに、再血管化及びステント血栓症は、処理グループにおいて有意に低かった。類似する結果が、本明細書に記載されるように、放射性各種を含む生活性接合体の標的化により予測される。

20

【0482】

本明細書に記載される生活性ポリペプチド又は抗体接合体は、静脈内、動脈内又は管内供給され得るか、又は作用の意図された部位で局部的に導入され得る。

【0483】

さらに、炎症は、侵入剤を受けとめるために生物による保護応答である。炎症は、多くの細胞及び体液メディエーターを包含するカスケード現象である。一方では、炎症応答の抑制は宿主を免疫無防備状態にすることができるが；しかしながら、抑制されていなければ、炎症は、重度の合併症、例えば慢性炎症性疾患（例えば、リウマチ様関節炎、多発性硬化症、炎症性腸疾患及び同様のもの）、敗血性ショック及び多発性器官不全を誘発する。

30

【0484】

重要なことには、それらの種々の疾病状態は、通常の炎症メディエーターを共有する。炎症により特徴づけられる集合的疾患は、ヒト罹病率及び死亡率に対して大きな衝撃を有する。従って、本明細書に記載される、抗-炎症性抗体及び結合ポリペプチド、例えば抗-IL-TIF抗体及び結合ポリペプチドは、ぜん息及び自己免疫性及び敗血症ショックに対してアレルギーからの莫大な数のヒト及び動物疾病のための可能性ある決定的な治療剤を有することは明白である。本明細書に記載される抗-炎症性抗IL-TIF抗体及び結合ポリペプチドの使用は、特に疾病、例えば関節炎、内毒血症、炎症性腸疾患、乾癬、関連疾病及び同様のものにおいて、本明細書に記載されるIL-TIFアンタゴニストとして治療的に使用され得る。

40

【0485】

1つの観点においては、本発明は、（a）アミノ酸残基28～127；（b）アミノ酸残基132～231；（c）アミノ酸残基28～231；（d）アミノ酸残基23～230；（e）アミノ酸残基23～231；（f）アミノ酸残基22～230；（g）アミノ酸残基22～231；及び（h）アミノ酸残基1～231から成る群から選択された配列番号2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。

【0486】

50

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28～127；(b) アミノ酸残基132～231；(c) アミノ酸残基28～231；(d) アミノ酸残基23～230；(e) アミノ酸残基23～231；(f) アミノ酸残基22～230；(g) アミノ酸残基22～231；及び(h) アミノ酸残基1～231から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成る。

【0487】

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28～127；(b) アミノ酸残基132～231；(c) アミノ酸残基28～231；(d) アミノ酸残基23～230；(e) アミノ酸残基23～231；(f) アミノ酸残基22～230；(g) アミノ酸残基22～231；及び(h) アミノ酸残基1～231から成る群から選択されたアミノ酸配列から成る。 10

【0488】

第2の観点においては、本発明は、(a) アミノ酸残基28～127；(b) アミノ酸残基132～231；(c) アミノ酸残基28～231；(d) アミノ酸残基23～230；(e) アミノ酸残基23～231；(f) アミノ酸残基22～230；(g) アミノ酸残基22～231；及び(h) アミノ酸残基1～231から成る群から選択された配列番号2の対照アミノ酸配列に対して少なくとも70%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。

【0489】

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、前記対照アミノ酸配列に対して少なくとも80%同一であるアミノ酸配列を有する。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ポリペプチドは、前記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有する。も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、配列番号2のアミノ酸残基22～231又は配列番号2のアミノ酸残基28～231のいずれかを含んで成る。 20

【0490】

第3の観点においては、本発明は、(a) 配列番号3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1のヌクレオチド64～693又は82～693のヌクレオチド配列、又は配列番号1のヌクレオチド64～693又は82～693のヌクレオチド配列の補体から成る核酸分子、又は(c) 配列番号1又は37、又は配列番号1又は37のヌクレオチド配列の補体のいずれかである単離された核酸分子を提供する。1つの態様においては、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3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ものである単離された核酸分子は上記に開示される通りである。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核酸分子は、配列番号1のヌクレオチド1～693のヌクレオチド配列を含んで成る。 30

【0491】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示される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。

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示される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核酸分子により作用可能に連結され、そして前記核酸分子は前記転写ターミネーターにより作用可能に連結される。 40

もう1つの観点においては、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組換え宿主細胞を提供し、ここで前記宿主細胞は細菌、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る。

【0492】

もう1つの観点においては、本発明は、マウスZcytor16タンパク質の生成方法を提供し、ここで上記に開示されるような発現ベクターを含んで成り、そして前記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。もう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。 50

【0493】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような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、(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)に由来するヒト型化抗体、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つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような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。

【0494】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に開示されるような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、上記に開示されるような融合タンパク質は、免疫グロブリン成分をさらに含んで成る。

もう1つの観点においては、本発明は、アミノ酸22~231又は28~231からの配列番号2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はIL-TIFを結合するか、又はIL-TIF活性を拮抗する。

【0495】

もう1つの観点においては、本発明は、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。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。

【0496】

もう1つの観点においては、本発明は、アミノ酸22~231又は28~231からの配列番号2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。

【0497】

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。

【0498】

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22～231又は28～231からの配列番号2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る発現ベクターを提供し、ここで前記第1 及び第2 DNA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。

【0499】

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。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2 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。 10

【0500】

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。

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。 20

【0501】

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導入されている培養された細胞を提供し、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。1つの態様においては、上記に開示される細胞が提供され、ここで前記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が提供され、ここで前記細胞は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。 30

【0502】

もう1の観点においては、本発明は、下記成分：アミノ酸22～231又は28～231からの配列番号2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。 40

【0503】

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。

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 50

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。

【0504】

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。

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸22～231又は28～231からの配列番号2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。

10

【0505】

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単離された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）

20

【0506】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸22～231又は28～231からの配列番号2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。

【0507】

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。

30

【0508】

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22～231又は28～231からの配列番号2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zcytorII受容体ポリペプチド（配列番号34）をさらに含んで成る。

40

【0509】

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

50

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。

【0510】

もう1の観点においては、本発明は、下記群：(a) アミノ酸22～231又は28～231からの配列番号2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

【0511】

(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。

【0512】

もう1の観点においては、本発明は、アミノ酸22～231又は28～231からの配列番号2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。

【0513】

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22～231又は28～231からの配列番号2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。

【0514】

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22～231又は28～231からの配列番号2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。

【0515】

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

10

20

30

40

50

る。

【0516】

もう1の観点においては、本発明は、患者における遺伝子異常性の検出方法を提供し、ここで患者から遺伝子サンプルを得；配列番号1又は配列番号1の補体又は配列番号37又は配列番号37の補体の少なくとも14個の連続ヌクレオチドを含んで成るポリヌクレオチドと共に前記遺伝子サンプルを、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であろう条件下でインキュベーションすることによって、第1反応生成物を生成し；前記第1反応生成物を可視化し；そして野生型患者からの対照反応生成物に対して前記第1反応生成物を比較することを含んで成り、ここで前記第1反応生成物と前記対照反応する生成物との間の差異が患者における遺伝子異常性の表示であることを特徴とする。 10

【0517】

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。 20

【0518】

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1又は配列番号1の補体又は配列番号37又は配列番号37の補体の少なくとも14個の連続したヌクレオチド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における癌の表示である。 30

【0519】

もう1の観点においては、本発明は、IL-TIF又は血清アミロイドAが役割を演じる炎症性疾患を有する哺乳類の処理方法を提供し、ここで炎症が減じられるよう、前記哺乳類にIL-TIF又は血清アミロイドAのアンタゴニストを投与することを含んで成り、ここで前記アンタゴニストが、配列番号2のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント；配列番号34のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメントを含んで成る可溶性受容体；配列番号2のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメントを特異的に結合する抗体；及びIL-TIFのポリペプチド又はポリペプチドフラグメント（配列番号15）を特異的に結合する抗体又は結合ポリペプチドから成る群から選択される。1つの態様においては、前記疾患は慢性炎症性疾患である。 40

【0520】

もう1つの態様においては、前記疾患が、炎症性腸疾患：潰瘍性大腸炎；クローン病；関節炎；及び乾癬から成る群からの慢性炎症性疾患である。もう1つの態様においては、前記疾患は急性炎症性疾患である。もう1つの態様においては、前記疾患が、内毒素血症；敗血症；毒性ショック症候群；及び感染性疾患から成る群からの急性炎症性疾患である。もう1つの態様においては、zcytor11のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント（配列番号34）を含んで成る前記アンタゴニスト可溶性受容体がさらに、CRF2-4のポリペプチド又はサイトカイン結合ドメインフラグメント（配列番号35）を含んで成 50

る。

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】

【0521】

例1. Zcytor16のクローニング、及び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. Zcytor16細胞外ドメインのクローニング：

翻訳されたヒトゲノムデータベースの走査は、zcytor16と称するクラスIIサイトカイン受容体の同定をもたらした。続いて、zcytor16についての配列により、自家由来の狭い扁桃ライブラリーからのクローンを同定した。その扁桃ライブラリークローンにおける挿入体を配列決定し、そしてzcytor16細胞外ドメインをコードすることを示した。Zcytor16クロンのポリヌクレオチド配列は配列番号1で示され、そしてポリペプチド配列は配列番号2で示される。

10

【0522】

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。

【0523】

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Bgl2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Bgl2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、QiaexIITM 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。

20

30

【0524】

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

【0525】

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（Bgl2により切断された）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

50

れたCRF2-4及びIL-10Rの非-Zcytor16サブユニットを調製した。

【0526】

C. Zcytor16CEE, Zcytor16CFLF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）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。

【0527】

Zcytor16細胞外サイトカイン結合ドメイン（例えば、配列番号13）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。

【0528】

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、そして一晚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。

【0529】

同じ方法を用いて、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Zcytor16CFLAGを有する、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）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。

【0530】

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Zcytor16sR-Fc4 DNA構造体（例1B）を、640 µlの合計最終体積のSF DMEM中に希釈した。希釈されたLipofectAMINETM（Gibco BRL, Gaithersburg, MD）混合物（605 µlの培地中、35 µlのLipofectAMINETM）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/LipofectAMINETM混合物に添加し、次に、これを、BHK細胞に添加した。細胞を、38°C/5% CO₂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°C/5% CO₂で一晚インキュベートした。

【0531】

トランスフェクションの約24時間後、BHK細胞を、1 µMのメトトレキサート（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

10

20

30

40

50

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 μ 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、ヤギー抗-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。

【0532】

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)。

【0533】

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、Zcytor16可溶性受容体 (例えば、配列番号13) 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) を、本明細書に記載のようなPCRを用いて単離する。

【0534】

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応答する配列約25bpを含む。100 μ lのPCR反応物2 μ 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 μ 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。

【0535】

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、pMAL-c2を、1 μ gのPvuI切断されたpRS316、1 μ gのリンカーと共に組合し、そして1 μ 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。

【0536】

コンピテント酵母細胞 (*S.セレビシアエ*) を、約1 μ 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 μ 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°Cでインキュベートする。

【0537】

約48時間後、単一プレートからUra⁺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 (Pryo

r and Leiting, Protein Ezpression and Purification. 10:309-319, 1997) 上にプレートする。細胞を、100 μ g/mlのアンピシリンと共に、MM/CAにおいて、2時間、37°C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 μ lを、酸により洗浄されたガラスビーズ250 μ 、及び5% β ME及び色素を含むThomer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 μ lと共に混合する。サンプルを1分間、振盪し、そして65°Cに10分間、加熱する。その20 μ lを、4%～12%PAGEゲル（NOVEX）上のラインあたりに負荷する。ゲルを、1 $\times$ MES緩衝液において試験する。陽性クローンを、pCZR225と命名し、そして配列決定分析にゆだねる。

【0538】

10

1 μ 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 μ F及び400 μ A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のアンピシリンを含む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、huzcytor16/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。

【0539】

例4. 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huzcytor16/MBP-6Hポリペプチド（例3）又は精製された組換えZcytor16CEE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 μ 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。

20

【0540】

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倍の透析を一晩、行う。Zcytor16-特異的抗体を、抗体標的物として適切な1 μ 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。

30

【0541】

例5. Zcytor16受容体モノクローナル抗体

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、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。

40

【0542】

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。

【0543】

50

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

可溶性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。

【0544】

可溶性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、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。

【0545】

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、50 μ l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) 50 μ lと組合す。室温での1時間のインキュベーションに続いて、30 μ gのストレプトタビジン被覆された、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、200 μ l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。

【0546】例 7 .zcytor17 受容体ヘテロダイマーを生成するための構造体

分泌されたヒト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13) を、IgG γ 1 (IgG γ 1) のH鎖に融合し、そしてヘテロマー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 α , IL-2R β , IL-2R γ)、IL-4/IL-13受容体ファミリー受容体成分 (IL-4R α , IL-BR α , IL-13R α '), 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 κ L鎖) に融合する。

【0547】A. IgG γ 1 及びヒト κ L鎖融合ベクターの構成：

IgG γ 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 γ 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 γ 1 フラグメントを、鋳型としてClontech hFetal Liver cDNAライブラリーからIgG γ 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MluI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。

【0548】

ヒト κ 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κL鎖融合体をもたらすことができる。KpnI部位はヒトκL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κL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。

【0549】

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κL鎖フラグメントを、上記で使用されるのと同じClontechヒト胎児肝臓cDNAライブラリーからヒトκL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。

【0550】

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、IgGγ 1に融合される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、扁桃 cDNAライブラリー (Clontech) 又はプラスミド (例1A) からのZcytor16受容体の細胞外サイトカイン-結合ドメイン (配列番号13) 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、そしてバンドー精製されたZem229R/IgGγ I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。

【0551】

κL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κL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して行う。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、そしてバンドー精製されたZem228R/ヒトκL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κL鎖融合体が正しいことを確認する。

【0552】

D. 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15μgの個々の上記ベクターを、LipofectaminePlusTM 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、1μM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、10μMのMTX及び0.5mg/mlのG418において再び選択する。

【0553】

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10,750μl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

A) のために提供する。

【0554】

例 8. 増殖アッセイを用いての 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

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、Zcytor16の細胞外ドメイン（例えば、配列番号13）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。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。

10

【0555】

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、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。

【0556】

20

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-Zcytor16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。

【0557】

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。

30

【0558】

例 9. インビトロでの 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、Zcytor16受容体を内因的に発現しない。

40

【0559】

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）、β-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Fcγ RI遺伝子のSTAT誘発性要素（Seidel, H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995）。

50

【0560】

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。

【0561】

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 α 、IL-2R β 、IL-2R γ) 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 α 、IL-13R α 、IL-13R α')、及び他のインターロイキン受容体 (例えば、IL-15R α 、IL-7R α 、IL-9R α 、IL-21R (Zcytor11; WIP0公開W0 00/17235; Parrish-Novak, J. など., Nature 408: 57-63, 2000)) 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。

【0562】

次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、サイトカインー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。

【0563】

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 μ 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 μ gのセレンウム及び5mgのフェテュイン) 中、0.5 μ gのDNA及び5 μ 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 μ lの混合物を、 1.5×10^5 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°C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 μ lの20% FBS DMEM培地 (500ml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。

【0564】

分泌トラップを次の通りに行なった：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 μ g/mlの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。

【0565】

細胞をTNTにより洗浄し、そして次に、TNB中に、1:200で希釈されたヤギー抗-ヒトIg

10

20

30

40

50

—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。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Vectas hield 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。

【0566】

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 α 、インターフェロン β 、インターフェロン γ 、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。

【0567】

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°Cで行った。次の方法を、Fc4に対するC-末端融合体を含むZcytor16ポリペプチド (Zcytor16-Fc4; 例1) を精製するために使用した。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 μ 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。

【0568】

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。

【0569】

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ブロット、及びカラム通過を通して特徴づけられた。ウェスターンブロットは、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60,000Da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。

【0570】

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。

【0571】

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、0.2 μ mのAcrodisc無菌フィルター (Pall Corporation) を通して濾過した。

【0572】

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°C で貯蔵した。プールされた画分の濃度は、 1.50mg/ml であった。

【0573】

例12. 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Zcytor16組織分布

A. ノザンブロット及びドットブロットを用いてのヒトZcytor16組織分布：

ノザンブロット分析を、Human Multiple Tissue Northern Blots I, II, III (Clontech) 及び自家生成されたU-937ノザンブ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°C で1分； 94°C で15秒（30サイクル）； 60°C で30秒； 72°C で30秒及び 72°C 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。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、 ^{32}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。

10

【0574】

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。ブロットを、ExpressHyb (Clontech) 溶液において 65°C で3時間、プレハイブリダイズした。ブロットを、 $1.0 \times 10^6 \text{cpm/ml}$ のラベルされたプローブ、 0.1mg/ml のサケ精子DNA及び $0.5 \mu\text{g/ml}$ のヒトcot-1 DNAを含むExpresshyb溶液において 65°C で一晩ハイブリダイズした。ブロットを、 $2 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDSにより室温で、 $0.1 \times \text{SSC}$ 、0.1% SDSにより 55°C 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。

20

【0575】

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-ReadyTM 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。

30

【0576】

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' α -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 α -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。

40

【0577】

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 $0.2 \sim 100\text{pg}/\mu\text{l}$ のcDNAを含んだ。PCR

50

反応を、オリゴZC25,963（配列番号16）及びZC27,695（配列番号23）、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。

【0578】

増幅を次の通りに行った：94℃で2分（1サイクル）、94℃で20秒、58℃で30秒及び72℃で1分（30サイクル）、続いて72℃で5分（1サイクル）。約10 µlのPCR反応生成物を、2%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。予測される正しいDNAフラグメントサイズは、いずれの組織又は細胞系にも観察されなかった。Zcytor16の発現を示す続く実験は、このパネルからの負の結果がたぶん、使用されるプライマーによることを示した。

10

【0579】

【表5】

表 5

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
副腎	1	骨髓	3
膀胱	1	胎児脳	3
骨髓	1	ランゲルハンス島	2
脳	1	前立腺	3
頸部	1	RPMI#1788 (ATCC#CCL-156)	2
結腸	1	精巣	4
胎児脳	1	甲状腺	2
胎児心臓	1	W138 (ATCC#CCL-75)	2
胎児腎臓	1	ARIP (ATCC#CRL-1674-rat)	1
胎児肝臓	1	HaCat-ヒトケラチノサイト	1
胎児肺	1	HPV (ATCC#CRL-2221)	1
胎児筋肉	1	副腎	1
胎児皮膚	1	前立腺SM	2
心臓	2	CD3+選択されたPBMC イノマイシン+PMA刺激された	1
K562 (ATCC#CCL-243)	1	HPVS (ATCC#CRL-2221)-選択された	1
腎臓	1	心臓	1
肝臓	1	下垂体	1
肺	1	胎盤	2
リンパ節	1	唾液腺	1
メラノーマ	1	HL60 (ATCC#CCL-240)	3
脾臓	1	血小板	1
下垂体	1	HBL-100	1
胎盤	1	腎系球体間質	1
前立腺	1	T-細胞	1
直腸	1	好中球	1
唾液腺	1	MPC	1
骨格筋	1	Hut-102 (ATCC#TIB-162)	1

10

20

30

40

【 0 5 8 0 】

【 表 6 】

表 6

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
小腸	1	内皮	1
脊椎	1	HepG2 (ATCC#HB-8065)	1
脾臓	1	線維芽細胞	1
胃	1	E. Histo	1
精巣	2		
胸腺	1		
甲状腺	1		
気管	1		
子宮	1		
食道	1		
胃腫瘍	1		
腎臓腫瘍	1		
肝臓腫瘍	1		
肺腫瘍	1		
卵巣腫瘍	1		
直腸腫瘍	1		
子宮腫瘍	1		

10

20

30

40

50

【0581】

ヒト組織からのcDNAの追加のパネルを、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6に示される。PCR反応の他に、アッセイを上記の通りに行った。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）。

【0582】

予測される正しいDNAフラグメントサイズを、骨髓、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。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。

【0583】

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。

【0584】

さらに、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。

10

【0585】

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。

【0586】

20

【表7】

表 7

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	RPM11788	1
気管支	1	W138	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		

10

20

30

40

50

【0587】

C. RT-PCRを用いてのヒト組織及び細胞系RNAパネルにおける組織分布：

ヒト細胞系からのRNAのパネルを、RT-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。

【0588】

増幅を次の通りに行行った：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。8～10μl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。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。

【0589】

10

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。

【0590】

20

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。

【0591】

【表8】

30

表 8

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 9 2 】

【 表 9 】

表 9

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 μ mのイノマイシン#1	1		HT-29	1
WI-38+2 μ mのイノマイシン#2	1		MRC-5	1
WI-38+5 μ mのイノマイシン#1	1		RPT-1	1
WI-38+5 μ 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

10

20

30

【 0 5 9 3 】

【 表 1 0 】

表10

組織/細胞系	サンプル#		組織/細胞系	サンプル#
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		H1SM	1
Malme 3M	1		3AsubE	1
FHC	1		INT407	1
HREC	1			

10

20

30

【 0 5 9 4 】

【 表 1 1 】

表11

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

20

【0595】

【表12】

表12

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

【0596】

例13. 十分な長さの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、十分な長さのzcyto
r16受容体cDNA（配列番号24）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（Boerhin
ger Mannheim）ゲル上で展開し、そして約1.5kbのzcytor11 cDNAを、QiaquickTM 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zcyt
or11 cDNAを下記のようにして、発現ベクター中に挿入した。

40

【0597】

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）

50

を用いて、12℃で一晩、行われた。連結のサンプルを、DH10B ElectroMAXTM 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 (Premega) 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。

【0598】

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

10

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。

【0599】

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、例6に記載のようにして、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。

20

【0600】

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) 依存性プレージンパ球細胞系 (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-1TM (Gibco BRL)、1mMのピ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。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。

【0601】

30

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10⁷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-PORATORTM; 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。

【0602】

5-10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% CO₂) 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。

40

【0603】

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30μg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、200μg/mlのゼオシン及び2μg/mlのプロマイシンを用いて選択した。zcyt

50

or11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。

【0604】

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。 10

【0605】

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 μ 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。

【0606】

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 μ 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 μ lである。アッセイプレートを、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂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 μ l/ウェルで添加した。プレートを再び、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂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。 20

【0607】

プレートを再び、37 $^{\circ}$ C、5%CO₂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、SoftMaxTM Proプログラムを用いて、FmaxTM 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に応答して増殖せず、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。 30

【0608】

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 μ 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。 40

【0609】

例16. MES13細胞におけるレポーターミニー遺伝子のIL-TIF活性化及び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（FractionV：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 50

ウィルス粒子で、SRE及びSTAT要素により駆動されるルシフェラーゼレポーターミニー遺伝子をコードするアデノウィルス構造体KZ136（下記）を含んだ。

【0610】

細胞におけるアデノウィルス構造体の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（Labsystems, 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13に示される。

10

【0611】

【表13】

表13

IL-TIFのレベル (ng/ml)	LU w/o zcytoR16	LU w/10 μ /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

20

【0612】

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、zcytor16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。

30

【0613】

アデノウィルス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、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。

40

【0614】

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アデノウィルスを、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。ブラン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、5~50pf

50

u/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。

【0615】

B. HCT-15及びHT-29細胞系に対するIL-TIFレポーター遺伝子アッセイ：

HCT-15（ヒト結腸腺癌、ATCC# CCL-225）及びHT-29（ヒト上皮結腸直腸腺癌、ATCC# HTB-38）細胞を、96ウェル不透明プレート（Costar）中、10%ウシ胎児血清、1% Glutamax及び1%ピルビン酸ナトリウムにより補充されたRPMIに、3000個の細胞/100 μ l/ウェルでプレートした。それらの細胞を、37°C、5% CO₂ インキュベーターにおいて24時間インキュベートした。

10

【0616】

次に、細胞を、ウェル当たり50 μ lの、1% ITS及び2% HEPES（血清フリー培地）により補充されたDMEM/F12培地（Life Technologies）中、上記に記載されるKZ136アデノウィルス（STAT/SRE/Lucif）により、5000のM.O.I. を用いて感染せしめた。細胞を24時間インキュベートした。

【0617】

アデノウィルスの除去の後、細胞サンプルを、Zcytor16-Fc4融合体可溶性受容体の存在又は不在下で、一連の濃度のIL-TIFを含む血清フリー培地により希釈し、そしてウェル当たり100 μ lの体積で96-ウェルプレートに希釈し、そして4時間インキュベートした。血清フリー培地のみを、バックグラウンド対照として使用した。次に、細胞を溶解し、そしてPromegaからの試薬及びプロトコルを用いて、製造業者の説明書に従って、ルシフェラーゼ基質に暴露した。プレートを、40 μ lの注射及び5秒の調整プロトコルを用いて、Berthold Microlumat Plus LB96V2R（Perkin-Elmer Life Science）上で読み取った。

20

【0618】

HCT-15細胞は、10ng/mlでのIL-TIFに対して、培地のみよりも2.5倍の誘発及び5ng/mlで2.2倍の誘発を示した。IL-TIF応答は、Zcytor16-Fc4融合体可溶性受容体が1 μ g/mlで添加される場合、バックグラウンドレベルに阻止した。

HT-29細胞は、10ng/mlで6.2倍の誘発から0.08ng/mlでの2倍の誘発まで、IL-TIFに対して良好な用量応答性を示した。このIL-TIF応答は、1 μ g/mlのZcytor16-Fc4融合体可溶性受容体が添加される場合、バックグラウンドレベルまで完全に阻止された。

30

【0619】

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、その停止コドンをも有さない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。

【0620】

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°Cで60秒、55°Cで60秒及び72°Cで60秒（30サイクル）；及び72°Cで10分；続いて4°C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QiaQuickTM（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。

40

【0621】

約1 μ lの連結反応物を、DH10B ElectroMaxTM コンピテント細胞（GIBCO BRL, Gaithersb

50

urg, 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。

【0622】

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 1.2×10^6 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、LipofectinTM (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。

細胞を、37°C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°C、5% CO₂ 下で一晩インキュベートし、そしてDNA:LipofectinTM 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。

【0623】

トランスフェクションの約10~12日後、コロニーを、5 µM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ば培地サンプルを、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ば培地のアンプル生成のために拡張した (例19)。

【0624】

例19. BHK570細胞からのIL-TIF-CEEの精製

特にことわらない限り、すべての操作は4°C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細胞からのならば培地を、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ば培地に添加し、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のパプスタチン (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°Cで凍結した。濃縮されたならば培地の合計の標的物タンパク質濃度を、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。

【0625】

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 × 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。濃縮されたならば培地を融解し、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。

【0626】

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、2 CVの5 × PBSにより7.0に調節し、次にPBS (pH24)

10

20

30

40

50

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。

【0627】

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。1.0×6.0cm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し、次に20mMのTRIS (pH 8.0) (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。 10

【0628】

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 20
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。

【0629】

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。 30

【0630】

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“洗浄された”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。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。 40

【0631】

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℃での一晚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。

【0632】

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 50

ミデートー2HCl (Pierce, Rockford, IL) を、プロテインG-Sepharoseゲルに添加し、36 mg/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PBS 5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。

【0633】

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。

【0634】

増幅を、次の通りに行なった：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。

【0635】

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。次のサンプルは、zcytor11の陽性発現を示した：単核細胞、静止CD8+及びCD19+細胞。

【0636】

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。

【0637】

増幅を次の通りに行なった：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)。8～10 µl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。

10

20

30

40

50

【0638】

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。

10

【0639】

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。

20

【0640】

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。

30

【0641】

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。

40

【0642】

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。

【0643】

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Zcytor16発現について

50

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、脾臓、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。

【0644】

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。

10

【0645】

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。

【0646】

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、チラミッドシグナル増幅 (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。

20

【0647】

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。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。

30

【0648】

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。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。

40

50

【0649】

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-ILF（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。

【0650】

Zcytor16は、単核細胞、例えば正常組織（リンパ節、脾臓、胸腺、膵臓、腎臓、肝臓及び肺）、及び異常組織（炎症虫垂、肺癌、卵巣癌、膵炎、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-TIF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（休止においてではない）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。

【0651】

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を示した。

【0652】

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現場発現の分析は、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。

【0653】

Zcytor16はまた、他の組織、例えば膵臓（正常及び膵炎組織）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。

【0654】

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 1×10^{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。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

10

20

30

40

50

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。

【0655】

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。また、血清zcytor18レベルは高められ、そしてグルコースレベルは3日目で低下した。要約すると、zcytor18アデノマウスは、他のプロ炎症性サイトカイン、例えばTNF- α 、IL-1 β 、及びgp130サイトカインによってまた開始され得る急性相応答を示した。

【0656】

その急性相応答は、パターン認識分子により開始される中位の炎症応答である。その急性相パターン質は、微生物に対して増強された保護を提供し、そして細胞トラフィック及びメディエーター開放に対する効果により炎症応答を調節する。例えば、SAAは、有能な白血球活性化機能、例えば走化性の誘発、内皮細胞への白血球付着の増強及び高められたファゴサイトーシスを有する。急性相応答の大きさ及び持続期間を開始し、そして変更する因子の理解は、感染性及び炎症性疾患のための新規治療剤の開発における重要な段階を表す。

【0657】

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。IL-TIFはまた、赤血球細胞を低め、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。

【0658】

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。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。

【0659】

例24. Zcytor16の染色体割り当て及び配置

公的に入手できるWWWサーバー（例えば、Stanford Human Genome Center, Stanford University, CAサーバー、<http://shgc-www.stanford.edu/>、及びNational Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/>）と共に、Stanford G3 Human/Hamster Radiation Hybrid (RH) Mapping Panel (Research genetics, Inc., Huntsville, AL) の市販バージョンを用いて、Zcytor16を、ポリメラーゼ鎖反応（PCR）により染色体6上で位置決定した。

【0660】

PCR反応を、Zcytor16特異的センス及びアンチセンスプライマーZC27,713（配列番号40）及びZC27,714（配列番号41）を用いて行った。それらは、3' UTRに226bpのアンプリコンを生成する。PCR反応のために、HotStarTaq DNAポリメラーゼ及び緩衝液（Qiagen Inc., Valencia, CA）を用いた。PCRサイクラー条件は次の通りであった：95°Cでの15分間の初期1サイクル、続いて95°Cでの1分間の変性、56°Cで1分間のアニーリング及び72°Cでの1分15秒の延長（35サイクル）、及び72°Cで7分間の最終延長（1サイクル）。反応を、2%アガロースゲル（EM Science, Gibbstown, NJ）上での電気泳動により分離し、そし

10

20

30

40

50

て臭化エチジウム染色により可視化した。Stanford G3RHマッピングパネルのために得られたデータベクターは次の通りであった：01000 00000 10000 00000 00000 00010 00000 00000 00000 00000 10000 00010 00010 10000 00010 10000 000。

【0661】

放射線ハイブリッド (RH) マッピングは、Stanford G3 RHマッピングパネル上での染色体6にZcytor16を連結する。RH結果は、Stanford G3 骨格マーカーSHGC-9657からのZcytor16 0 cR10000を定めた (LOD=12.38, 1 cR₁₀₀₀₀ = 約29kb)。SHGC-9657 (D6S1835) は、ヒトインターフェロン- γ 受容体 (IFN γ R1) のためのSTSゲノム性、配列標識された部位である。IFN γ R1は、現場ハイブリダイゼーションにより6q24.1-q24.2に位置決定されており (Papanicolaouなど., Cytogenet. Cell Genet. 76: 181-182, 1997)、そしてNCB I GeneMap '99上のD6S442 (158.5cM) - D6S1581 (165.0cM) 間隔に存在する。IFN γ R1へのZcytor16の密接した接近性のために、Zcytor16はまた、6q23-q24染色体領域に位置することが予測され得る。

【0662】

例25. 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 μ LCKプロモーター、マウスIL-TIF (配列番号42；配列番号43に示されるポリペプチド)、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。

【0663】

リンパ特異的E μ 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。

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。

【0664】

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 μ 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。

【0665】

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 μ 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。

10

20

30

40

50

【0666】

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。

【0667】

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。

10

【0668】

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 μ 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 μ 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。

20

【0669】

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：

30

【0670】

【表14】

表14

遺伝子型/表現型	平均胸郭皮膚の厚さ (μm)	平均腹部皮膚の厚さ (μm)
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

10

【0671】

統計学的有意性を決定するにはマウス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。

20

【0672】

例26. IL-TIFポリペプチドのインビボ効果

A. IL-TIFアデノウィルスにより感染されたマウスはSADの誘発を示す：

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 1×10^{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。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。研究の2日目、マウスを殺害し、体重を記録し、そして血液及び組織を分析のために集めた。

30

【0673】

すべての血液サンプルを、完全な血液計数（CBC）及び血清化学について分析した。12及び20日目、好中球及び血小板計数における統計学的に有意な上昇性を、親アデノウィルス処理されたグループに比較して、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した。また、リンパ球計数は、12日目で、親アデノウィルス処理されたグループに比較して、IL-TIFアデノウィルス投与されたグループからのサンプルにおいて有意に低められたが、しかし20日目で、反対の効果が観察された。さらに、IL-TIFアデノウィルス処理されたマウスは体重が減少したが、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。

40

【0674】

グルコースは、親アデノウィルス処理されたグループに比較して、IL-TIFアデノウィルス投与されたグループからの血清サンプルにおいて、両時点で有意に低下した。血清アルブミンはまた、両時点で有意に低められた。血液尿窒素レベルは、20日目で有意に低められた。血清グロブリンレベルは、両時点で、親アデノウィルス処理されたグループに比較して、IL-TIFアデノウィルス投与されたグループにおいて有意に高められた。顕微鏡的には、IL-TIFに寄与する1つの観察される組織形態学的変化は、腎臓における細尿管再生であった。マウスにおいては異常ではないが、この動物グループにおいては、高められ

50

た発生率及び重症性が存在した。ネフロパシーは、皮質細尿管上皮細胞の好塩基球増加の共焦領域として特徴づけられる。

【0675】

上記実験と企画において同一の追加の実験を、結果を確証し、そして追加のサンプルを集めるために行った。この研究においては、体重を3日ごとに記録し、血液を、アデノウィルス注射の3日後にマウスから集め、そしてマウスを、10日目（グループ当たりn=4）及び20日目（グループ当たりn=4）、血液及び組織収集のために殺害した。高められた好中球及び血小板計数が、親アデノウィルス処理されたグループを比較して、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再び検出された。この効果は、3日目までに好中球に関して明白であったが、しかし血小板計数は、10日目まで有意に異ならなかった。 10

【0676】

また、リンパ球計数は、3及び10日目で、親アデノウィルス処理されたグループに比較して、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が、しかしそれらはこれまでの研究におけるように、20日目に高められなかった。再び、IL-TIFアデノウィルス投与されたマウスは研究の間にわたって体重が低下したが、ところが対照ウィルス処理されたマウス及び処理されないマウスは体重が増加した。血清化学パラメーターは、これまでの研究と一致した。IL-TIFアデノウィルス処理に関連する腎臓における細尿管再生の組織学的発見がまた、この研究において確認された。これは、IL-TIFアデノウィルスを投与されたマウス（2日目）における中位のタンパク質尿の追加の発見と一致した。 20

【0677】

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、これは、IL-TIFがそれらの工程に包含される血液細胞に影響を与えることによって貧血、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見解を支持する。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、それらの疾病における治療用試薬として使用され得る。 30

【0678】

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。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。従って、IL-TIF、抗-IL-TIF抗体及びその受容体、例えばzcytor16及び可溶性zcytor11/CRF2-4は、種々の障害、例えば炎症、免疫疾患、感染、貧血、造血及び他の癌、及び同様のものにおける診断及び処理のための適切な試薬/標的物である。 40

【0679】

体重の低下、急性相タンパク質SAAの出現、及び低められたグルコース、アルブミン及び尿窒素により明示される代謝性混乱とIL-TIF発現との結合は、IL-TIFが一定の炎症応答において初期に作用するサイトカインであることを示唆する。IL-TIFアデノウィルスを投与されたマウスは、慢性炎症の状態、例えばIBD、潰瘍性大腸炎、関節炎、乾癬、喘息及び同様のものの状態を表すことができる。一定のゆがいた有害な慢性工程は、IL-TIFに対するアンタゴニスト、例えば抗-IL-TIF抗体、及びその受容体、例えばzcytor16及び可溶性zcytor11/CRF2-4及び同様のものにより阻害され得る。

【0680】

B. IL-TIFは、プロ炎症性サイトカインである：アデノ-TIFマウスにおけるSAAの血清 50

レベル：

ELISAを、Mouse SAA Immunoassay kit 及びProtocol (Biosource International, California, USA) を用いて、IL-TIF-アデノウィルスにおけるSAAのレベルを決定するために行った。希釈された標準及び未知のものを、抗-マウスSAA抗体により前もって被覆されたアッセイプレート中に、HRP-抗-マウスSAAと共にプレートした。プレートを、キットの説明書に従って、37℃で1時間インキュベートし、そして次に洗浄した。プレートを、TMBを用いて、室温で15分間、展開し、そして2 MのH₂SO₄により停止した。450nmでの吸光度を、Spectromax190 (Molecular Devices, California, USA) を用いて読み取った。得られるデータを、Softmax Pro (Molecular Devices, California, USA) 及びExcel (Microsoft Corp., Washington, USA) を用いて分析した。

10

IL-TIF-アデノウィルスにより感染されたマウスは、親アデノウィルス対照に比較して、10倍以上の非常に高められたレベルのmSAAを有した。

【0681】

C. IL-TIF-アデノウィルス感染されたマウスの流動細胞測定分析：

アデノウィルスによるインビボでのIL-TIF発現の効果を分析するために、感染の10及び20日目、IL-TIF-アデノウィルス感染されたC57BL/6のマウスから末梢血液、脾臓及び骨髓を単離した。約100 µlの血液を、ヘパリン処理された管に集め、次に低張溶解により赤血球細胞を消耗せしめた（細胞を、3.6% NaCl 1.5mlを添加する前、約5秒間、4.5mlの蒸留水に溶解した）。脾臓を、2枚の冷却されたガラススライド間に押しつぶし、そして放出される細胞を、Nytex膜（細胞濾過器）上に通し、そしてペレット化した。骨髓を、乳ばち及び乳棒において1つの大腿骨を押しつぶし、そして細胞濾過器（Falcon）にその細胞を通すことによって得た。細胞を、FACS洗浄緩衝液（WB=HBSS/1%BSA/10mMヘルペス）に再懸濁し、トリパンプルーにおいて計数し、そして1 × 10⁶個の個々のタイプの生存細胞を、5mlのポリスチレン管にアリコートした。

20

【0682】

細胞を洗浄し、そしてペレット化し、次に、特定の免疫細胞サブセットを同定するために使用される種々の細胞表面マーカーを認識する、蛍光ラベルされた（FITC、PE及びCyChrome）モノクローナル抗体（Pharmingen, San Diego, CA）のカクテルと共に氷上で20分間インキュベートした。それらのマーカーは次のものを包含する（試験される3種のグループに列挙される）。血液染色に関しては、CD3、Gr1及びB220；脾臓染色に関しては、CD62L、CD44及びCD3；CD21、CD23及びB220；IgD、IgM及びB220；CD11b、Gr1及びCD8；骨髓染色に関しては、CD11b、Gr1、CD3；IgD、IgM及びB220。細胞を、1.5mlのNBにより洗浄し、そしてペレット化し、次に、0.4mlのWBに再懸濁し、そしてCellQuestソフトウェア（Becton Dickinson, Mountain View, CA）を用いて、FACSscan上で分析した。

30

【0683】

本発明者は、IL-TIF-アデノ処理されたマウスの血液における好中球の画分が10日目で4～13倍及び20日目で2～3倍、高められたことを見出した。10日目で、この差異は、血液におけるリンパ球及び単球の画分の同時低下をもたらした。骨髓においては、本発明者は、B細胞の合計数が約1.5倍、低下し、ところが成熟した再循環B細胞の百分率及び未成熟B細胞の合計数は10日目でわずかに低下したことを見出した。20日目で、それらの差異の多くは消出したが、但し本発明者は、成熟した再循環B細胞の画分のわずかな上昇を見出した。脾臓においては、B細胞の合計数は試験された両日でわずかに（1.5～2倍）低下したが、ところが20日目に、境界領域のB細胞（CD21+CD23-B220+）画分は2倍、上昇し、そして小胞B細胞（CD21+CD23+B220+）の数は2倍、低下した。

40

【0684】

境界領域のB細胞は、それらがより通常の小胞B細胞よりもB細胞マイトゲン（例えば、LPS）に対してより感染性であるので、病原体に対する最初の防御系であると思われ、そしてそれらがそれらの同起源の抗原と遭遇する場合、それらは抗体分泌細胞に非常にすばやく分化する。IL-TIFは小胞細胞の環境領域B細胞への転換を増強することが可能であり、又はそれは低成熟性小胞細胞を選択的に消耗することが可能である。骨髓に見られるB細胞

50

数の変化は、プレ/プロ及び/又は未成熟B細胞の増強された分化、又は血液／脾臓からの再循環B細胞の高められた流入、及びたぶん、未成熟B細胞の末梢への輸送の同時上昇に影響を及ぼすことができる。成熟BM B細胞の実数の数は上昇せず、その結果、IL-TIFはそれらの増殖を増強することができない。他方では、IL-TIFは、未成熟B細胞野分化を阻止し、そしてそれにより、成熟B細胞の相対的表示を高めることができる。

【0685】

D. zcytor16/Fc4はインビボIL-TIFを中和する：IL-TIFにより誘発されるSAA発現を示すSAA ELISAはzcytor16-Fc4注射により阻止される：

zcytor16がIL-TIFによるSAA誘発を阻害するかどうかを評価するために、マウス（雌、C3H/HEJ、生後8週；Jackson Labs, Bar Harbor, ME）を、下記表15に示されるように、それぞれ3匹の動物から成る5つのグループに分け、そしてタンパク質のIP注射により処理した。

10

【0686】

【表15】

表15

グループ#	IL-TIF	Zcytor16
グループ1：	-	-
グループ2：	-	100 μ g
グループ3：	3 μ g	-
グループ4：	3 μ g	20 μ g
グループ5：	3 μ g	100 μ g

20

【0687】

zcytor16注射の15分後までにIL-TIF注射を行った。両タンパク質注射は、非経口路により行われた。血液サンプルを、処理の前、次に処理の2及び6時間後、個々のマウスから採取した。血清を、SAA及びIL-TIFの測定のために個々のサンプルから調製した。

30

【0688】

IL-TIF、及びIL-TIFのための可溶性受容体、すなわち本明細書に記載されるzcytor16-Fc4により処理されるマウスにおけるSAAのレベルを決定するために、ELISAを、これまでに記載のようにして行った。20～100 μ gの濃度でのzcytor16-Fc4と共に3 μ gのIL-TIFにより処理されたマウスは、IL-TIFのみにより誘発されたSAAのレベルにおいてバックグラウンドレベルへの低下を示し、このことは、zcytor16がインビボでのIL-TIFのSAA誘発活性を阻害したことを示した。

40

【0689】

例27. 炎症性腸疾患マウスモデルにおけるIL-TIFの発現

炎症性腸疾患（IBD）は、2種のタイプ、すなわち、潰瘍性大腸炎（UC）及びクローン病（CD）に分けられる多種多様性疾病である。それらの疾病の病因は現在、未知であり、そして臨床学的表示は異なる。UCは結腸に制限され、そして症状は出血性下痢、体重の低下及び腹部痛を包含する。UCの肉眼での特徴は、断続的な潰瘍及び短くされた結腸を包含する。対照的に、クローン病はまた、腸の他の部分に影響を及ぼすことができる。症状は、下痢（UCに見られるよりもより低い程度の出血である）、低い発熱及び痛みを包含する。肉眼による特徴は、狭窄、深い潰瘍、裂及びフィステルを伴っての線維性腸を包含する。

【0690】

50

それらのヒト疾病を模倣するいくつかの動物モデルが入手できる。新規薬剤スクリーニングのための3種の通常使用される大腸炎モデルは、2, 4, 6-トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) により誘発されたラットモデル、マウスT-細胞トランスファーモデル、及びデキストラン硫酸ナトリウム又はDSS-誘発されたマウスモデルである。DSSモデルは疾病活性指数評点システム (S. N. S. Murthy, Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin, Digestive Diseases and Sciences, Vol. 38, No. 9 (September 1993), pp. 1722-1734) を用いて、Dr. S. Murthyによるモデルから誘発された。

【0691】

現在の研究においては、急性大腸炎は、マウスが飲料水にDSSを6日間、供給される場合に生じた。動物は、UC患者の病状に類似する、体重の低下及び出血性下痢を示した。DSS損傷の機構は、十分には特徴づけられていないが、しかしそれは非特異的炎症性免疫応答を誘発し、そして腸に対する環境的效果を模倣すると思われる。細胞に対して毒性である H_2S がたぶん生成される。さらに、発光性細菌群における変化が生じた。活性化された単球、マクロファージ及び肥満細胞が結腸において示されている。すべての3種の動物モデルのためのメディエーターは、炎症性プロスタグランジン、リユーコトリエン代謝物及びサイトカインを包含する。

【0692】

A. 方法:

大腸炎を、Charles River Laboratories からのSwiss Webster 雌マウスにおいてDSS摂取により誘発した。マウスは、研究の開始で、生後10及び11週目であった。マウスは、飲料水中、4%DSSを6週間、与えられるか(処理されたマウス)、又は通常の飲料水のみを与えられた(対照マウス)。便性質、不自然血液及び体重の低下を包含する測定のコマンドを含んで成る、疾病活性指数臨床学的評点(DAI)を使用した。DAIは、DSS処理の1日目から開始して、個々のマウスについて毎日得られた。

【0693】

6日後、DSSを、処理されたマウスの飲料水から除去した。すべてのマウスは、研究の開始から2, 7又は10日目で殺されるまで、DAI臨床学的評価によりモニターされた。2及び7日目、4匹のDSS処理されたマウス及び1匹の対照マウスを殺した。10日目、4匹のDSS処理されたマウス及び2匹の対照マウスを殺した。殺害の後、すべての動物について、結腸の長さを測定した。結腸切片を、組織学的分析のために10%中性緩衝化ホルマリンに固定するか、又はmRNA抽出のために凍結した。

【0694】

B. 組織学的評点及び疾病活性化指数(DAI)評点:

組織学的指数評点を、引例1における方法に従って得た。一般的に、結腸切片は、陰窩、過形成上皮、陰窩歪曲及び炎症について病理学者により盲検評価された。毎日、個々のマウスは、体重の低下、便の硬さ及び腸出血に基づいての臨床学的評点に関して分類される。より高い評点は、体重の低下、下痢及び出血の量の上昇に割り当てられた。個々のマウスについての毎日の評点は、3種の結果/観察から得られた平均等級であった。

【0695】

C. 結果:

DSS処理されたマウスについての結腸の長さは、処理されていない対照よりも、7及び10日目、幾分短かったが、しかしその結果は有意ではなかった(統計学的適用により調べられなかった)。臨床学的DAI評価は、このモデルを用いての過去の研究に見られる疾病症状に類似する、DSS処理されたマウスにおける疾病症状の上昇に影響を及ぼした。非自然的な血液は約4及び5日目で最大であり、そしてゆるい便は、6及び7日でより一般的であった。組織病理学的結果は、疾病評点がすべての殺害の日、特に7(ピーク)及び10日目で対照とは異なったことを示す。それらの組織病理学的スクリーニング評点は次の通りであった: 対照=0.5、2日目でのDSS処理されたマウス=8.8、7日目でのDSS処理され

たマウス = 21、10日目でのDSS処理されたマウス = 18。臨床学的及び組織病理学的評価は、DSS処理されたマウスが、処理されていない対照に比較して、有意な結腸疾病を有したことを示す。凍結された組織サンプルを、下記の通りにmRNA決定のために使用した。

【0696】

D. RT-PCRを用いてのネズミIBD結腸サンプルにおけるIL-TIF RNAの組織発現：

炎症性腸疾患モデルにおけるマウスIL-TIF RNA（配列番号42）の相対的発現を決定するために、DSS処理されたマウスの遠位結腸を集め、そしてすぐに液体窒素において凍結した。この実験においては、マウスはDSSにより処理され、そしてサンプルが処理後2、7及び10日目で取られた。正常な処理されていないマウスからのサンプルを同様に集めた。次に、RNAを、標準のRNeasy MidiprepTM キット（Qiagen, Valencia, CA）を用いて、製造業者の説明書に従って、サンプルから単離した。

10

【0697】

RT-PCR反応は、“Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq”（Life Technologies, Gaithersburg, MD）を使用した。個々の25µlの反応は次のものから成った：12.5µlの2×反応緩衝液、0.5µl（20pモル/µl）のZC39,289（配列番号44）、0.5µl（20pモル/µl）のZC39,290（配列番号45）、0.4µlのRT/Taqポリメラーゼ混合物、10µlのRNアーゼフリーの水、1.0µlの全RNA（100ng/µl）。増幅を通常の通りに行った：50℃で30分（1サイクル）、続いて94℃で30秒、58℃で30秒、72℃で60秒（35サイクル）、次に72℃で7分間の最終延長。8～10µlのPCR反応生成物を、2%アガロースを用いての標準アガロースゲルの電気泳動にゆだねた。

20

【0698】

予測される正しいcDNAフラグメントサイズを、次の通りにして観察した：2日目の両サンプルに弱いバンドが存在した。3種の7日目のサンプルのうち2種のサンプルが強いバンドを生成し、そして3日目の7種のサンプルが非常に強いバンドを生成した。3種の10日目のサンプルは強いバンドを生成した。最終的に、2種の“正常”な対照サンプルはいずれのバンドも生成しなかった。それらの結果は、結腸における一定タイプの炎症応答、例えばIBD、UC及びCDに関するそれらの応答においてIL-TIFのアップレギュレーションが存在することを示唆する。データは下記表13に要約されており、ここで相対的発現は次の通りに評点を付けられている：0＝が存在しない；1＝弱いバンド；2＝強いバンド；3＝非常に強いバンド。

30

【0699】

【表16】

表16

組織	相対的発現 (0-3)
正常な結腸	0
正常な結腸	0
処理後2日目	1
処理後2日目	1
処理後7日目	3
処理後7日目	2
処理後7日目	2
処理後10日目	2
処理後10日目	2
処理後10日目	2

10

20

【0700】

例28. hzcytor11/hCRF2-4ヘテロダイマーを生成するための構成体

分泌されたhzcytor11/hCRF2-4ヘテロダイマーを発現する細胞系を構成した。この構成においては、hzcytor11の細胞外ドメイン（配列番号46）を、そのC末端でGlu-Glu標識（配列番号59）を有するIgGγ（Fc4）（配列番号5）のH鎖に融合し、そしてCRF2-4の細胞外ドメイン（配列番号47）を、このC末端でHis標識（配列番号60）を有するFc4に融合した。前記ヘテロダイマーの両hzcytor11及びhCRF2-4アームのために、8個のアミノ酸のGlu-Serスペーサー（配列番号48）を、前記受容体とFc4のN-末端との間に構築した。さらに、トロニン分解部位を、標識の可能性あるタンパク質分解除去を可能にするために、Fc4ドメインとC-末端標識との間に構築した。

30

【0701】

前記ヘテロダイマーのhzcytor11/Fc4-CEE部分の構成のために、hzcytor11の細胞外部分を、次のような条件下で、それぞれ5'及び3'末端で構築されたEcoRI及びBamHI制限部位を有するオリゴZC39335（配列番号49）及びZC39434（配列番号50）と共にFc4（hzcytor11/IgG）に融合されたヒトzytor11を含むベクターからPCR処理した：94℃で60秒、57℃で60秒及び72℃で120秒（25サイクル）；及び72℃で7分。PCR生成物を、QIAquick PCR精製キット（Qiagen）を用いて精製し、EcoRI及びBamHI（Buerhinger-Mannheim）により消化し、ゲル電気泳動処理し、そしてQIAquickゲル抽出キット（Qiagen）を用いて精製した。

40

【0702】

Hzytor11 EcoRI/BamHIフラグメントを、EcoRI及びBamHIにより消化されたpZP-9 hzytor7/Fc4-TCS-CEE中に連結した。このベクターは、CEE標識（配列番号10）と共にFc4（配列番号5）に融合されたhzcytor7の細胞外部分（アメリカ特許第5,945,511号）を有し、そしてEcoRI及びBamHIによる消化はhzcytor7の細胞外部分を除去し、そしてhzcytor11の置換を可能にする。得られる連結のミニ調製物を、正しいサイズのEcoRI/BamHI挿入についてスクリーンし、そして正しいミニ調製物を配列決定し、PCR反応の精度を確認した。hzytor11/Fc4-CEE融合ポリペプチドのポリペプチドの配列は、配列番号61に示される。

【0703】

前記ヘテロダイマーのhCRF2-4/Fc4-CHIS部分の構成のために、hCRF2-4の細胞外部分を、次のような条件下でオリゴZC39,319（配列番号51）及びZC39,325（配列番号52）を含むp

50

ZP-9CRFからPCR処理した：94℃で60秒、57℃で60秒、及び72℃で120秒（30サイクル）；及び72℃で7分。PCR生成物を上記のようにして精製し、そして次に、EcoRI及びBamHIにより消化した。PCR生成物は内部EcoRI部位を有しているので、次の2種のバンドを消化に基づいて得た：0.101kBのEcoRI/EcoRIフラグメント及び0.574kBのEcoRI/BamHIフラグメント。0.574EcoRI/BamHIフラグメントを、EcoRI及びBamHIにより消化されたベクターpHZ-1DR1/Fc4-TCS-cHIS中に連結した。

【0704】

このベクターは、C-HIS標識（配列番号12）と共にFc4に融合されたhDR-1の細胞外部分を有し、そしてEcoRI及びBamHIによる消化はhDR-1の細胞外部分を除去し、そしてhCRF2-4の置換を可能にする。得られる連結のミニ調製物を、正しいサイズのEcoRI/BamHI挿入体についてスクリーンし、そして陽性ミニ調製物をEcoRI消化し、そしてバンドを、さらなる構成のために精製した。0.101kBのEcoRI/EcoRIフラグメントを、EcoRI処理されたミニ調製物中に連結し、そしてクローンを、KpnI/NatI制限消化により挿入の正しい配向についてスクリーンした。正しいサイズの挿入を有するクローンを、DNA決定するために提供し、PCR反応の精度を確認した。hzcytor11/Fc4-CEE融合ポリペプチドのポリペプチド配列は、配列番号62で示される。

10

【0705】

約16µgの個々のhzcytor11/Fc4-CEE及びhCRF2-4/Fc-4-cHISを、Lipofectamine (Gibco/BRL) を用いて、その製造業者の説明書に従って、BHK-570 (ATCC No. CRL-10314) 細胞中に同時トランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞を、1µMのメトトレキサート (MTX) (Sima, 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、選択した。得られるトランスフェクトのプールを、10µMのMTX及び0.4mg/mlのG418において10日間、再び選択した。

20

【0706】

例29. zcytor11/CRF2-4ヘテロダイマー受容体の精製

ならし培養培地のzcytor11/CRF2-4ヘテロダイマーを、0.2µmのフィルターを通して濾過し、そして0.02% (w/v) のアジ化ナトリウムを添加した。前記ならし培地を、Poros Protein A 50 Columnに10~20ml/分で直接的に負荷した。負荷に続いて、カラムをPBSにより洗浄し、そして結合されたタンパク質を0.1Mのグリシン (pH3.0) により溶出した。タンパク質を含むその溶出された画分をpH7.2に調節し、そしてYM30 Stirred Cell Membrane (Millipore) を用いて、80ml以下に濃縮した。

30

【0707】

Protein Aカラムの溶出物80mlを、318mlのSuperdex 200 HiLoad 26/60 Column (Pharmacia) 上に負荷した。カラムを、PBS (pH7.2) により、3ml/分で溶出した。タンパク質を含む画分をプールし、凝集物を排除した。Superdex 200プールを、個体NaCl及びイミダゾールを用いて、0.5MのNaCl、10mMのイミダゾールに調節し、そしてそのpHを、NaOHにより7.5に調節した。調節されたタンパク質溶液を、200mlのNiNTAカラム (Qiagen) 上に2CV/時で負荷した。結合されたタンパク質を、イミダゾールの次の5種の濃縮段階：40mM, 100mM, 150mM, 250mM, 500mMを伴って、カラムのPBS洗浄に続いて溶出した。

【0708】

個々のイミダゾール段階で溶出された画分をプールし、そしてN-末端配列決定により分析した。配列決定により決定されたヘテロダイマーを含む画分をプールし、そしてYM30 Stirred Cell Membrane (Millipore) を用いて、50mlに濃縮した。NiNTAカラムからの溶出物50mlを、318mlのSuperdex 200 HiLoad 20/60 Column (Pharmacia) 上に負荷した。カラムを、PBS (pH7.2) により3ml/分で溶出した。タンパク質を含む画分を、SEC MALS分析により決定されるようにして、凝集物を排除するためにプールした。精製されたタンパク質を、N-末端配列決定、アミノ酸分析、及びSEC-MALSにより分析した。結合親和性及び生物学的活性を決定した。

40

【0709】

例30. Alamarブルー精製アッセイにおいてBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を用いてのZcytor16

50

-Fc4活性とCRF2-4/Zcytor11-Fc4活性との比較

本明細書に記載されるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を回転沈降せしめ、そしてPBSにより2度、洗浄し、mIL-3の除去を確かめ、そして次に、回転せしめ、そしてmIL-3を有さない完全培地（RPMI1640, 10%FBS, 1% GlutaMAX, 1%ピルビン酸ナトリウム）（この後、“mIL-3フリー培地”として言及される）に再懸濁した。次に、細胞を血球測定器により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100μlの体積において、5000個の細胞／ウェルで96ウェルにプレートした。

【0710】

IL-TIFタンパク質（配列番号15）を、mIL-3フリー培地において200pg/mlに希釈した。Zcytor16-Fc4融合タンパク質（本明細書に記載される）を、プレートの上部列上でmIL-3フリー/IL-TIF培地により1μg/mlに希釈し、そして次に、96ウェルプレート上の残りの7つの列を、個々のウェルにおいて100μlの体積を残しながら、1：2の比で連続的に希釈した。次に、これを、すべてのウェルにおける100pg/mlの最終IL-TIF濃度、及び200μlの合計アッセイ体積において約1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.31, 0.016及び0.008μg/mlの最終Zcytor16-Fc4の濃度のために、100μlの細胞に添加した。CRF2-4/zcytor11-Fc4を、プレートの上部列でmIL-3フリー/IL-TIF培地により8μl/mlに希釈し、そして次に、残りの7つの列を、個々のウェルにおいて100μlの体積を維持しながら、1：2の比で連続的に希釈した。

【0711】

次に、これを、すべてのウェルにおける100pg/mlの最終IL-TIF濃度、及び200μlの合計アッセイ体積において約8, 4, 2, 1, 0.05, 0.25, 0.125及び0.063μl/mlの最終CRF2-4/zcytor11-Fc4濃度のために、100μlの細胞に添加した。アッセイプレートを、37℃で、5%CO₂下で4日間インキュベートし、この時点で、Almarブルー（Accumed, Chicago, IL）を、20μl/ウェルで添加した。プレートを、37℃で、5%CO₂下で16時間、再びインキュベートした。Alamarブルーは、生存細胞の数に基づいて蛍光測定読み取りを付与し、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的測定である。プレートを、波長530（励起）及び590（発光）で、Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter（Wallac, Turku, Finland）上で読み取った。

【0712】

結果は、Zcytor16-Fc4によるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞に対するIL-TIFの増殖効果の強い用量依存性阻害を示した。CRF2-4/zcytor11-Fc4は、IL-TIFのより弱い阻害性を示した。IL-TIFは、細胞をバックグラウンドよりも13倍、単独で刺激した。Zcytor16は、0.025～1μg/mlの濃度で増殖を完全に阻害し、そして8ng/ml以下の残るすべての濃度で増殖を部分的に阻害した。CRF2-4/zcytor11-Fc4は8μg/mlの最高の濃度で増殖を完全に阻害することができ、それは0.125～4μg/mlで増殖を部分的に阻害し、そして阻害は63ng/mlの最低濃度でかろうじて検出できた。

【0713】

例31. Zcytor16はマウスコラーゲン誘発された関節炎（CIA）においてIL-6及びSAAレベルを低める

A. マウスコラーゲン誘発された関節炎（CIA）モデル：

生後10週目の雄DBA/1Jマウス（Jackson Labs）を、グループ当たり13匹のマウスの3つのグループに分けた。21日目、動物は、完全にフロントアジュバンド配合された1mg/mlのニワトリ第II型コラーゲン（Chondrex, Redmond, WAにより調製された）50～100μlの皮下注射を与えられ、そして3週間後、0日目、それらは凍結乾燥されたアリコートから250μg/mlとして調製された、E. コリ0111:B4からのLPS（Sigma, St. Louis, MO）100μg（25μg）の注射を与えられた。Zcytor16を、0日目～25日目までの4週間、週当たり3度、腹腔内注射として投与した。

【0714】

最初の2つのグループは、動物当たり100又は10μlのzcytor16を受け、そして第3グループは、ビークル対照、すなわちPBS（Life Technologies, Rockville, MD）を受けた。動

10

20

30

40

50

物は、LPS注射に続いて関節炎の症状を示し始め、そしてほとんどの動物は2～3週以内に炎症を進行せしめた。疾病の程度を、足の密性を測定するためにカリパスを用いることによって、及び次のように個々の足に臨床学的に評点（0～3）を割り当てることによって、個々の足において評価した：0＝正常、0.5＝つま先の炎症、1＝軽い足の炎症、2＝中位の足の炎症、及び3＝下記に詳細されるような重度の足の炎症。

【0715】

疾病のモニターリング：

動物は、第2コラーゲン注射の後すぐに炎症の症状を示し始め、そして何匹かの動物は第2コラーゲン注射の前、つま先の炎症の症状を有し始める。ほとんどの動物は、追加注射の2～3週間以内に関節炎を進行したが、しかし何匹かはより長い時間を要した。このモデル上における疾病の発生率は典型的には95～100%であり、そして0～2つの非応答体（6週間の観察の後に決定された）が典型的には、40匹の動物を用いての研究において見出される。炎症が始まるにつれて、種々の低い程度の足又はつま先の炎症の一時的な発生が存在することを注目すること。この理由のために、動物は、著しい永続的な足の膨張が進行するまで、確立された疾病を有するものとして考慮されない。

10

【0716】

すべての動物は、個々の足に定性的臨床学的評点を割り当てることによって行われる、それらの足における疾病の状態を評価するために毎日、観察された。毎日、個々の動物は、臨床学的疾病のその状態に従って評点を付けられるその4本の足を有する。臨床学的評点を決定するために、足は次の3種の領域、すなわちつま先、足自体（手根又は足根）及び手首又は足首関節を有するものとして考慮され得る。それらの領域に関する炎症の程度及び重傷度は、いずれかの関節膨張、引き裂かれた爪又は赤みについてのすべてのつま先の観察、いずれかの足における水腫又は赤みのいずれかの表示、及び腱又は骨の微妙な解剖学的境界のいずれかの損失の表示、並びに脚まで近位的に拡張する場合の表示により示される。1，2又は3の評価の足は、第1に、全体的な重傷度の痕跡、及び第2に、いかに多くの領域が包含されるかに基づかれた。臨床学的評価のために使用される標準は下記に示される。

20

【0717】

臨床学的評点：

0＝正常。

30

0.5＝1又は複数のつま先が包含されるが、しかしそれらのつま先のみが炎症を起こしている。

1＝足（1つの領域）、及びつま先を包含する軽い炎症。

2＝足における中位の炎症、及びいくつかのつま先及び/又は手首/足首（2種の領域）を包含する。

3＝足、手首/足首、及びいくつかの又はすべてのつま先（3種の領域）における重度の炎症。

【0718】

確立された疾病は、一晚（速読的に2日）、持続する、2又はそれ以上の等級の足炎症の定性的評価として定義する。確立された疾病が存在するとすぐに、データが記録され、そして“確立された疾病”を有する動物の最初の日として企画される。

40

【0719】

血液を実験を通して集め、抗コラーゲン抗体の血清レベルをモニターした。動物を21日目に安楽死せしめ、そして血液を血清及びCBCのために集めた。個々の動物から、1つの影響された足を、組織学のために10%NBFに集め、そして1つを液体窒素において凍結し、そしてmRNA分析のために－80℃で貯蔵した。また、1/2脾臓、1/2腸間膜リンパ節、1つの肝臓葉及び左腎臓を、RNA分析のためにRNAlaterに集め、そして1/2脾臓、1/2胸腺、1/2腸間膜リンパ節、残りの肝臓及び右腎臓を、組織学的のために10%NBFに集めた。血清を集め、そして免疫グロブリン及びサイトカインアッセイのために－80℃で凍結した。

【0720】

50

足の評点及び測定データが分析される場合、グループ間に統計学的に有意な差異は見出されなかったが、但しzcytor16を受ける1つの処理グループが足の炎症の開始及び進行において遅延を有したことについての示唆が存在した。体重、CBCパラメーター又は抗-コラーゲン抗体レベルにおける変化に関して、グループ間に有意な差異は存在しなかった。それらの初期結果は、zcytor16が体重、赤又は白血球細胞、又は抗体生成に悪影響を与えないが、しかし炎症を低めることができることを示す。投与、作用の機構及び効率についてのさらなる調査が手段下にある。

【0721】

B. マウスCLAモデルにおける抗-コラーゲンELISAデータ：

血清サンプルを、コラーゲン誘発された関節炎のネズミモデル（上記例31A）から、LPS攻撃の日（0日目）に対して0, 7, 14, 21及び28日目に集めた。血清サンプルを、抗-コラーゲン抗体力価についてELISAによりスクリーンした。PBS対照と比較して、抗-コラーゲン抗体のレベルに対する100 μ g又は10 μ g処理グループにおけるzcytor16処理の統計学的に有意な効果は存在しなかった。抗-コラーゲンELISA方法及び材料の記載は下記の通りである。

【0722】

抗-コラーゲンELISAのために使用される試薬は、Maxisorp96-ウェルマイクロタイタープレート（NUNC, Ruchester, NY）、ニワトリ第II型コラーゲン（Chondrex, Redmond, WA）、Super Block（Pierce, Rockford, IL）、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）-接合されたヤギ抗-マウスIgG+A+M（H+L）（Zymed, South San Francisco, CA）及びo-フェニレンジアミンジヒドロクロリド基質（Pierce, Rockford, IL）であった。すべてのアッセイに使用される緩衝液は、ELISA B希釈緩衝液（PBS+0.1% BSA+0.05% Tween（Sigma, St. Louis, MO）、ELISA C洗浄緩衝液（PBS+0.05% Tween）及びNovoD展開緩衝液（0.063Mのクエン酸ナトリウム、0.037Mのクエン酸）、H₂O₂（Sigma）及び1NのH₂SO₄（VWR, Tukwill, WA）であった。

【0723】

約100 μ lの末梢血液を、逆-眼窩出血により、血清分離器管（Becton Dickinson）中に集めた。血清を遠心分離（2～3分、16,000 $\times$ g, 4～6℃）により集め、そして分析まで、-20℃で貯蔵した。抗-コラーゲンIg抗体レベルを決定するために、NUNCプレートを、10 μ g/mlのニワトリ第II型コラーゲン（Chondrex, Redmond, WA）により被覆し、そして4℃で一晩インキュベートした。プレートをELISA Cにより洗浄し、Super Block（Pierce, Rockford, IL）により阻止し（5分、室温）、そしてELISA Cにより洗浄した。希釈された血清サンプル（5倍のELISA Bにおいて、1：5000から1：625,000に希釈された）を、ELISAプレートに三重反復して添加し、そしてプレートを4℃で一晩インキュベートした。

【0724】

インキュベーションの後、プレートをELISA Cにより洗浄し、そしてペルオキシダーゼラベルされたヤギ抗-マウスIg Fc（Zymed, ELISA Bにおいて1：2000）を添加した。プレートをインキュベートし（室温、90分）、ELISA Cを用いて再びすすぎ、そしてHRP活性を、o-フェニレンジアミンジヒドロクロリド基質（10mlのNovoD+1錠剤OPD+10 μ lのH₂O₂, Pierce）を用いて進行せしめた。反応を1NのH₂SO₄により停止した。1：25,000の希釈での血清サンプルの相対的光学密度測定を、Spectra MAX 190を用いて、490nmで取り、そしてデータを、SoftMax Proソフトウェア（Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA）を用いて分析した。

【0725】

C. マウスCIAモデルにおけるIL-6及びSAA分析：

0日目の血清サンプルを、25 μ gのLPSの腹腔内投与後4時間でCIAマウス（上記例31A）から収穫した。サンプルを、Biosource International（Camarillo, CA）から購入された市販のELISAキットにより、その製造業者の説明書に従って、IL-6及び血清アミロイドA（SAA）濃度についてのスクリーンした。

IL-6レベルは、それぞれ、100 μ gの zcytor16, 10 μ gの zcytor16及びPBS対照にゆだねられたマウスグループにおいて、 9651 ± 1563 pg/ml, $10,865 \pm 1478$ pg/ml及び $15,000 \pm 2,099$ pg/mlであった。100 μ gの用量の zcytor16に暴露されたCIAマウスのグループにおけるIL-6濃度は、 $p=0.0351$ を伴って、PBS対照マウスに比較して有意に低かった。統計学的有意性を、5%の有意性レベルを伴って、Fisher's PLSDを用いて計算した (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA)。

【0726】

さらに、SAA濃度は、それぞれ、100 μ gの zcytor16, 10 μ gの zcytor16及びPBS対照グループにゆだねられたマウスグループにおいて、 381 ± 40 μ g/ml, 348 ± 37 μ g/ml及び 490 ± 50 μ g/mlであった。10 μ gの用量の zcytor16に暴露されたマウスCIAマウスのグループにおけるSAA濃度は、 $p=0.0257$ を伴って、PBS対照マウスに比較して有意に低かった。統計学的有意性を、5%の有意性レベルを伴って、Fisher's PLSDを用いて計算した (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA)。

【0727】

例32. DSSマウスモデルにおけるIL-TIF受容体、Zcytor11の発現

定量的RT-PCRを行い、DSS-誘発されたIBD (例27) を有するマウスの結腸におけるマウス zcytor11の発現レベルを測定した。RNAを、2, 7及び10日目、正常なマウスの結腸、及び処理からのDSS-処理されたマウスの遠位結腸から単離した。RT-PCRを、Applied Biosystems 7700 TaqMan装置及びプロトコルを用いて行った。手短には、“Primer Express”ソフトウェアを用いて、Applied Biosystemsガイドラインに従って、マウス zcytor11配列 (ZC39776 (配列番号53) 及びZC39777 (配列番号54)) 及びFAM/TAMRAラベルされたTaqManプローブ (ZC38752 (配列番号55)) に対するプライマーを企画した。

【0728】

25ngのRNAを、PE/Applied Biosystems TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents及び上記に言及されるプライマー及びプローブと共に、個々の反応に添加した。RT-PCR反応を、次の条件下で二重反復して行った：50°Cで2分、60°Cで30分、95°Cで5分；94°Cで20秒及び60°Cで1分 (40サイクル)。発現値を、既知数の合成マウス zcytor11 RNA転写体の分子の標準曲線に比較し、そして発現を、反応当たりのマウス zcytor11の分子の絶対数として報告する。予備データは、マウス zcytor11発現が、正常マウス結腸における発現レベルに比較される場合、DSS-誘発されたIBDを有する。7日目及び10日目のマウスの遠位結腸においてわずかにダウンレギュレーションされ得ることを示唆する。

【0729】

例33. 軽い内毒素血症モデル、すなわちLPS-誘発された内毒素血症マウスモデルにおけるIL-TIF及び前炎症インジケーター

A. LPS-誘発された内毒素血症マウスモデル：LPS-誘発された内毒素血症マウスモデルにおける前炎症性サイトカイン及び体温の評価：

インビボ実験を企画し、軽い内毒素血症のマウスLPSモデルにおける zcytor16の効果を実験した。前記モデルを最初に評価するために、前炎症性サイトカイン及び体温を測定し、前記モデルのための対照データを集めた。

【0730】

手短には、生後6ヶ月のBalb/c (CRL) 雌マウスを、無菌PBS中、25 μ gのLPS (Sigma) により腹腔内 (IP) 注射した。血清サンプルを、個々の時点のために8匹のグループから、0, 1, 4, 8, 16, 24, 48, 及び72時間で集めた。血清サンプルを、炎症性サイトカインレベルについてアッセイした。IL-1b, IL-6, TNFa, IL-10及び血清アミロイドAタンパク質 (SAA) レベルを、Biosource International (Camarillo, CA) から購入した市販のELISAキットを用いて測定した。

【0731】

TNFaレベルは4000pg/mlでピークに達し、そしてIL-10レベルは、LPS注射の1時間後、341 pg/mlであった。LPS注射の4時間後で、IL-6, IL-1b及びIL-10はそれぞれ、6,100pg/ml, 299pg/ml及び229pg/mlであった。血清におけるSAAレベルは、LPS注射4時間後までに、0.

10

20

30

40

50

405mg/mlであった。血清におけるSAA濃度は、LPS注射の24時間後までに3.9mg/mlに上昇し続けたが、しかしながら、血清における1～2mg/mlよりも高いSAAレベルは、SAAと他の血清成分との間の相互作用のために、存在するELISAキットにより正確に又は再生可能的に測定することは困難である。それらの結果は、IL-TIF（例33B）の他に、前炎症性サイトカインが実際、このモデルにおいて生成されたことを示唆した。従って、次の基準が、軽い内毒素血症のLPSモデルのための生物学的マーカーとして確立された：LPS注射の1時間後のTNF α 血清レベル、LPS注射の4時間後のIL-6血清レベル及びLPS注射の4及び8時間後のSAA血清レベル。

【0732】

別々の動物のグループにおける体温を、72時間の実験の間、手術により移植された遠隔計測装置によりモニターした。マウスにおける体温は、LPS注射の30分後、37.07℃から34.98℃に2℃最大に低下した。

LPS注射の30分前、100 μ gのzcytor16-Fc融合タンパク質の注入は、4及び8時間点で、SAA誘発の約50%を有意に低めたが、ところが10 μ gのzxytor16-Fcは有意な効果を有さなかった。TNF- α 及びIL-6レベルには有意な変化は存在しない。zcytor16注射は、1時間の点で循環における好中球の数を低めた。それは、zcytor16-Fcの投与がSAA誘発に関してzcytor18活性を中和できることを示した。

【0733】

B. Alamarブルー増殖アッセイにおけるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を用いてのLPS-誘発された内毒素血症マウスモデルからのマウス血清におけるIL-TIF活性の検出：

本明細書に記載されるBaF3/CRF2-4/zcytor11細胞を回転沈降せしめ、そしてPBSにより2度、洗浄し、mIL-3の除去を確かめ、そして次に、回転せしめ、そしてmIL-3を有さない完全培地（RPMI1640, 10%FBS, 1% GlutaMAX, 1%ピルビン酸ナトリウム）（この後、“mIL-3フリー培地”として言及される）に再懸濁した。次に、細胞を血球測定器により計数した。細胞を、mIL-3フリー培地を用いて、ウェル当たり100 μ lの体積において、5000個の細胞／ウェルで96ウェルにプレートした。

【0734】

例33Aに記載される実験からのLPS-誘発された内毒素血症マウスからの血清を、プレートの上部列上でmIL-3フリー培地により2%に希釈し、そして次に、96ウェルプレート上の残りの7つの列を、個々のウェルにおいて100 μ lの体積を残しながら、1：2の比で連続的に希釈した。次に、これを、200 μ lの合計アッセイ体積において約1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.031, 0.016及び0.008%の最終血清濃度のために、100 μ lの細胞に添加した。プレートを、37℃で、5%CO₂下で16時間、再びインキュベートした。Alamarブルーは、生存細胞の数に基づいて蛍光測定読み取りを付与し、そして従って、負の対照に比較しての細胞増殖の直接的測定である。プレートを、波長530（励起）及び590（発光）で、Wallac Victor2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland) 上で読み取った。結果は、0, 1, 8及び16時間の点でバックグラウンドレベル以上の有意な増殖を示さなかった。4時間の時点からの血清サンプルは、バックグラウンドよりも4～10倍以上の増殖の増強を示し、これは、それらのサンプルにおけるIL-TIFの存在を示唆する。

【0735】

C. LPS-誘発された内毒素血症マウスモデル：zcytor16の効果を評価するための実験：

マウスにおいて1回の25 μ gのLPSのIP投与により誘発された前炎症性インディケーターをもたらすzcytor16処理の能力を試験した。すべてのサンプルを、SAA、IL-TIF及び循環性好中球数について分析した。個々のグループからのサブセットを、特定のサイトカインレベルについて分析した（1時間のサンプルをTNF α についてスクリーンし、4時間のサンプルをIL-6について分析した）。動物を下記表14における示される時点で殺害し、そして全血液及び血清を集め、そして分析のためにアリコートした。

【0736】

72匹のB1/6雌マウス（CRL）が、下記表に記載のようにして、zcytor16の1回のIP投与を与えられた。対照マウスは、C57B1/6（CRL）であった。

10

20

30

40

50

30分後、それらは、内毒素血症カスケードを開始するために、100 μ l中、25 μ gのLPS (Sigma) のもう1回のIP注射を受けた。個々のグループにおけるマウスを、表17に示されるように、対応する時点で殺害し、50 μ lの全血液を集め、循環好中球の合計数を測定し、そして残りを血清のために回転せしめ、そして本明細書に記載される種々のアッセイのためにアリコートした。

【0737】

【表17】

表17

グループ	番号	処理	LPS	殺害	サンプル
A	8	100 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	1 時間	血清アリコート CBCのための血液
B	8	10 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	1 時間	血清アリコート CBCのための血液
C	8	200 μ gのPBS IP	25 μ g IP tx後30分	1 時間	血清アリコート CBCのための血液
D	8	100 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	4 時間	血清アリコート CBCのための血液
E	8	10 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	4 時間	血清アリコート CBCのための血液
F	8	200 μ gのPBS IP	25 μ g IP tx後30分	4 時間	血清アリコート CBCのための血液
G	8	100 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	8 時間	血清アリコート CBCのための血液
H	8	10 μ gのzcytor16 IP	25 μ g IP tx後30分	8 時間	血清アリコート CBCのための血液
J	8	200 μ gのPBS IP	25 μ g IP tx後30分	8 時間	血清アリコート CBCのための血液
K	5	対照	なし	プレLPS	血清アリコート CBCのための血液

【0738】

D. Zcytor16/Fc4はインビボでSAA誘発を中和する：LPS—誘発された内毒素血症マウスモデルにおいてLPSにより誘発されたSAA発現を示すSAA ELISAはzcytor16-Fc4注射により阻害される：

zcytor16がLPS—誘発された内毒素血症マウスモデルにおいてSAA誘発を阻害することができかどうかを評価するために、マウスは、上記例33Cにおける表14に示されるように、LPS注射の30分前、Zcytor16を注射された。

【0739】

4及び8時間のサンプルにおけるSAAレベルを決定するためにELISAを、Mouse SAA Immuno assay Kit (BioSource International, California) を用いて、その製造業者の説明書に従って行った。4時間の時点で、100 μ g又は10 μ gのZcytor16により処理されたマウスは、PBS注射されたマウスに比較して、SAAレベルにおいて、用量依存性の、統計学的に有意な低下を示した。8時間の時点で、100 μ gのZcytor16により処理されたマウスは、PBS

10

20

30

40

50

注射されたマウスに比較して、SAAレベルにおいて統計学的に有意な低下を示し続けた。これは、zcytor16の存在がインビボでLPSによるSAAの誘発を阻害することを示唆する。

【0740】

例34. FlagTBXzCytol16のパキユロウィルス発現

発現ベクター、すなわちpzBV37L: egtNF(tbx)sCytol16を、上流の6個のアミノ酸のトロンビン切断部位及び酵素切断部位の上流のN-末端Flagエピトープ標識を有するzCytol16ポリペプチドを発現するために企画した。この構造体は、シグナルペプチドが切断された後、可溶性受容体配列の直接的に上流の酵素プロセッシング部位を有するFlag標識されたzCytol16を発現するために使用され得る。

【0741】

A. pzBV37LegtNF(tbx)sCytol16の構成：

それぞれ5'及び3'末端上にBspeI及びXbaI制限部位を含む、698bpのFlagTbxzCytol16フラグメントを、zCytol16 cDNA含有の鋳型から2回のPCR増幅により生成した。プライマーZC40,094 (配列番号58) 及びZC40,943 (配列番号57) を、第2回目に使用した。第1回目のPCRに関しては、反応条件は次の通りであった：100 µlの体積の反応のためにはExpand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) を使用した；94℃で2分（1サイクル）；94℃で15秒、50℃で30秒及び72℃で60秒（35サイクル）；72℃で5分（1サイクル）；続いて4℃でのソーキング。5 µlの第1回の反応混合物を、ゲル電気泳動（1% NuSieveアガロース）により可視化した。

【0742】

正しいサイズのPCR生成物の存在が確かめられると、第2回のPCRを、鋳型として第1回目の反応物1 µlを用いて設定した。第2回目の反応の条件は、第1回目と同じであった。第2回目のPCR生成物5 µlを、ゲル電気泳動（1% Nusieveアガロース）により可視化した。反応混合物の残りを、Qiagen PCR精製キットにより、その製造業者の説明書に従って精製し、そして水30 µlに溶出した。cDNAを、37℃で適切な緩衝条件下でBspeI及びXbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) を用いて消化した。その消化されたPCR生成物バンドを、1%アガロースTAEゲルに通し、切除し、そしてQIAquickTM Gel Extraction kit (Qiagen, カタログ番号28704) を用いて抽出し、そして30 µlの水に溶出した。消化されたFlagTBXzCytol16 PCRを、BspeI及びXbaI部位でベクターpZBV37LのMCS中に連結した。

【0743】

pZBV37Lベクターは、多面体プロモーターが除去され、そして後期活性化基礎タンパク質プロモーター、及びMCSの上流のEGTリーダーシグナル配列により置換されている、pFastBac1TM (Life Technologies) 発現ベクターの修飾体である。5 µlの制限酵素消化されたFlagTBXzCytol16 PCRフラグメント及び約50ngのその対応するpZBV37Lベクターを、適切な緩衝条件下で20 µlの体積において16℃で一晩、連結した。5 µlの連結混合物を用いて、2mmのギャップの電極ポレーションキュベットにおいて、400オーム、2V及び25 µFでの電極ポレーションにより、50 µlのElectoMACTM DH12sTM 細胞 (Life Technologies, カタログ番号18312-017) を形質転換した。形質転換された細胞を、350 µlのSOC培地（2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10ml の1MのNaCl, 1.5mMのKCl, 10mMのMgCl₂, 10mMのMgSO₄及び20mMのグルコース）に希釈し、37℃で1時間、増殖し、そして50 µlの前記希釈溶液を、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た。

【0744】

クローンをPCRにより分析し、そして陽性クローンを選択し、プレートし、そして配列決定のために提出した。正しい配列が確かめられると、25ngの陽性クローンDNAを用いて、42℃の熱ブロックにおいて45秒間の熱ショックにより、100 µlのDH10BacTM Efficiency (商標) コンピテント細胞 (GIBCO-BRL, カタログ番号10361-012) を形質転換した。37℃で1時間、増殖された前記形質転換されたDH10BacTM 細胞を、900 µlのSOC培地（2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10ml の1MのNaCl, 1.5mMのKCl, 10mMのMgCl₂, 10mMのMgSO₄及び20mMのグルコース）に希釈し、そしてその溶液100 µlを、50 µg/mlの

10

20

30

40

50

カナマイシン、7 $\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシン、10 $\mu\text{g/ml}$ のテトラサイクリン、40 $\mu\text{g/ml}$ のIPTG及び200 $\mu\text{g/ml}$ のBlue Galを含むLuria Agarプレート上にプレートした。

【0745】

前記プレートを、37°Cで48時間インキュベートした。色彩選択を用いて、トランスポーズされたウィルスDNA (“bacmid” として言及される) を有するそれらの細胞を同定した。白色であるそれらのコロニーを、分析のために採取した。コロニーをPCRにより分析し、そして陽性コロニー (所望するbacmidを含む) を、増殖するために選択した。クローンを、プライマーZC447 (配列番号34) 及びZC976 (配列番号7) を用いてのPCRを通して、bacmidにおけるトランスポーズ可能な要素に対するプライマーを用いて、DNAを増殖することによって、正しい分子量の挿入体についてスクリーンした。PCR反応条件は次の通りであった: 94°Cで2分 (1サイクル); 94°Cで10秒、50°Cで30秒、及び72°Cで120秒 (25サイクル); 72°Cで5分 (1サイクル); 続いて4°Cでのソーキング。PCR生成物を1%アガロースゲル上で展開し、挿入体サイズを調べた。正しいサイズの挿入体を有するそれらを増殖し、そしてbacmid DNAを単離し、そして精製した。このbacmid DNAを用いて、スポドプテラ・フルギペルダ (*Spodoptera frugiperda*) (Sf9) 細胞をトランスフェクトした。

10

【0746】

B. トランスフェクション

Sf9細胞を、6-ウェルプレートに 1×10^6 個の細胞/プレートで接種し、そして27°Cで1時間、結合せしめた。約5 μg のbacmid DNAを、100 μl のSf-900 II SFM (Life Technologies) により希釈した。20 μl のLipofectamineTM 試薬 (Life Technologies, カタログ番号18324-012) を、100 μl のSf-900 II SFMにより希釈した。bacmid DNA及び脂質溶液を軽く混合し、そして室温で45分間インキュベートした。800 μl のSf-900 II SFMを、前記脂質-DNA混合物に添加した。細胞を27°Cで一晩インキュベートした。DNA-脂質混合物を吸出し、そして2mlのSf-900 II培地を個々のプレートに添加した。プレートを、27°C、90%の湿度で約7日間インキュベートし、この後、ウィルスを収穫した。

20

【0747】

C. 増幅:

Sf9細胞を、2mlのSF-900 IIを含む6-ウェルプレートに 1×10^6 個の細胞/プレートで接種した。トランスフェクションプレートからのウィルス500 μl をウェルに配置し、プレートを、27°C、90%の湿度で96時間インキュベートし、この後、ウィルスを収穫した (一次増幅)。

30

第2回目の増幅を次の通りに進行せしめた: Sf9細胞を、2mlのSF-900 IIを含む6-ウェルプレートに、 1×10^6 個の細胞/プレートで接種した。一次増幅プレートからのウィルス100 μl を、ウェルに配置し、そしてプレートを、27°C、90%の湿度で144時間インキュベートし、この後、ウィルスを収穫した (二次増幅)。

【0748】

追加の増幅を行った (三次増幅)。Sf9細胞を、250mlの振盪フラスコにおいて、50mlのSF-900 II SFM中で約 1×10^6 個の細胞/mlの密度に増幅した。次に、それらを、上記プレートからのウィルスストック1mlにより感染せしめ、そして27°Cで4日間インキュベートし、この後、ウィルスを収穫した。

40

このウィルスストックを、増殖阻害曲線により滴定し、そして1のMOIを示す力価培養物を合計48時間、進行せしめた。上清液を、N-末端Flagエピトープに対して特異的なモノクローナル抗体及びHRP接合されたGt及びMu二次抗体を用いて、ウェスタンブロットにより分析した。結果は、約30kDaのバンドを示した。上清液をまた、活性分析のために提供した。

【0749】

次に、多量のウィルスストックを次の方法により生成した: Sf9細胞を、2800mlのフラスコにおいて、1LのSF-900 II SFM中において、約 1×10^6 個の細胞/mlの密度まで増殖した。次に、それらを、三次増幅からのウィルスストック5mlにより感染せしめ、そして27°Cで96時間インキュベートし、この後、ウィルスを収穫した。

50

大規模感染を完結し、下流の精製のために材料を提供した。

前述から、本発明の特定の態様が例示目的のために本明細書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。

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077174 A2

(51) International Patent Classification: C12N
(21) International Application Number: PCT/US02/08811
(22) International Filing Date: 22 March 2002 (22.03.2002)
(25) Filing Language: English
(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/279,222 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 North Puget Sound Avenue, Tacoma, WA 98407 (US); XU, Wen-feng; 12432 54th Avenue W, 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); HUGHES, Steven, D.; 3610 NE 65th Street, Seattle, WA 98115 (US).

(74) Agent: JOHNSON, Jennifer, K.; ZymoGenetics, Inc., 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, 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, 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, KI, 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, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NI, 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 "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/077174 A2

(54) Title: HUMAN CYTOKINE RECEPTOR

(57) Abstract: Cytokines and their receptors have proven usefulness in both basic research and as therapeutics. The present invention provides a new human cytokine receptor designated as "Zeytor16".

WO 02/077174

PCT/US02/08811

HUMAN CYTOKINE RECEPTOR

5

TECHNICAL FIELD

The present invention relates generally to a new protein expressed by human cells. In particular, the present invention relates to a novel gene that encodes a receptor, designated as "Zcytor16," and to nucleic acid molecules encoding Zcytor16 polypeptides, and antibodies to the polypeptide.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Cytokines are soluble, small proteins that mediate a variety of biological 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 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)).

15

20

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 chains responsible for binding and/or transducing the effect of interferons are members of the class II cytokine receptor family, based upon a characteristic 200 residue extracellular domain.

25

30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

2

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.

5 BRIEF SUMMARY OF THE INVENTION

The present invention provides a novel receptor, designated "Zcytor16." The present invention also provides Zcytor16 polypeptides and 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.

10

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

1. Overview

An illustrative nucleotide sequence that encodes Zcytor16 is provided by SEQ ID NO:1, and SEQ ID NO:37. The encoded polypeptide has the following amino
 15 acid sequence: MMPKHCFLGF LISFFLTGVA GTQSTHESLK PQRVQFQSRN
 FHNILQWQPG RALTGNSSVY FVQYKIYGQR QWKNKEDCWG TQELSCDLTS
 ETSDIQEPYY GRVRAASAGS YSEWSMTPRF TPWWETKIDP PVMNITQVNG
 SLLVILHAPN LPYRYQKEKN VSIEDYYELL YRVFIINNSL EKEQKVYEGA
 HRAVEIEALT PHSSYCVVAE IYQPMLDRRS QRSEERCVEI P (SEQ ID NO:2).
 20 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 (also shown in SEQ ID NO:38), and a mature soluble receptor
 polypeptide from residues 23 to 231 or 23 to 231 of SEQ ID NO:2. The receptor has
 25 two fibronectin III domains, also called 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
 30 polypeptides that include a cytokine binding domain comprising amino acids 32 to 230
 of SEQ ID NO:2. Moreover, additional variants of the zcytor16 polypeptide include

WO 02/077174

PCT/US02/08811

3

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 residues 124-131, or 128-131 of SEQ ID NO:2). Thus

5 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:39) motif from residue 220-223 of SEQ ID NO:2; conserved Tryptophan residues at residues 47, 72, and 114 of SEQ ID NO:2; and

10 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 full-length mRNA, and consequently the cDNA, is shown in SEQ ID NO:37 that, upstream of the initiating methionine (nucleotide 237 of SEQ ID NO:37), includes a 5' untranslated region (UTR)

15 (nucleotides 1-236 of SEQ ID NO:37) that includes a stop codon (TGA) embedded in a consensus Kozak sequence typical of translation in vertebrates. Moreover, the 3' UTR (nucleotides 933-1610 of SEQ ID NO:37) contains an mRNA stability motif (*e.g.*, nucleotides 1458-1465 of SEQ ID NO:37) and a polyA tail.

As described below, the present invention provides isolated polypeptides

20 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:2 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to 231; (d) amino acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231;

25 and (h) amino acid residues 1 to 231, wherein the isolated polypeptide specifically binds with an antibody that specifically binds with a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Illustrative polypeptides include polypeptides comprising either amino acid residues 22 to 231 of SEQ ID NO:2 or amino acid residues 28 to 231 of SEQ ID NO:2. Moreover, the present invention also provides

30 isolated polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF (*e.g.*, human IL-TIF polypeptide sequence as shown in SEQ ID NO:15). The human IL-TIF polynucleotide

WO 02/077174

PCT/US02/08811

4

sequence is shown in SEQ ID NO:14. The mouse IL-TIF polynucleotide sequence is shown in SEQ ID NO:42, and corresponding polypeptide is shown in SEQ ID NO:43.

The present invention also provides isolated polypeptides comprising at least 15 contiguous amino acid residues of an amino acid sequence of SEQ ID NO:2 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to 231; (d) amino acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231; and (h) amino acid residues 1 to 231. Illustrative polypeptides include polypeptides that either comprise, or consist of, amino acid residues (a) to (h). Moreover, the present invention also provides isolated polypeptides as disclosed above that bind IL-TIF.

The present invention also includes variant Zcytor16 polypeptides, wherein the amino acid sequence of the variant polypeptide shares an identity with amino acid residues 22 to 231, or 28 to 231 of SEQ ID NO:2 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:2 is due to one 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')₂, F(ab)₂, 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 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:3, (b) a nucleic acid molecule encoding an amino acid sequence that

WO 02/077174

PCT/US02/08811

5

comprises either amino acid residues 22 to 231 of SEQ ID NO:2 or amino acid residues 28 to 231 of SEQ ID NO:2, and (c) a nucleic acid molecule that remains hybridized following stringent wash conditions to a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of nucleotides 64 or 82, to 690 or 693 of SEQ ID NO:1, or the
5 complement of the nucleotide sequence of nucleotides 64 or 82, to 690 or 693 of SEQ ID NO:1. 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:2 is due to a conservative amino acid substitution. The present invention further contemplates isolated nucleic acid
10 molecules that comprise nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 690 or 693 of SEQ ID NO:1. 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
15 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 expression vectors. Illustrative host cells include bacterial, yeast, fungal, insect,
20 mammalian, and plant cells. Recombinant host cells comprising such expression vectors can be used to produce Zcytor16 polypeptides by culturing such recombinant host cells that comprise the expression vector and that produce the Zcytor16 protein, and, optionally, isolating the Zcytor16 protein from the cultured recombinant host cells.

In addition, the present invention provides pharmaceutical compositions
25 comprising a pharmaceutically acceptable carrier and at least one of such an expression vector or recombinant virus comprising such expression vectors. The present invention further includes pharmaceutical compositions, comprising a pharmaceutically acceptable carrier and a polypeptide described herein.

The present invention also contemplates methods for detecting the
30 presence of *Zcytor16* RNA in a biological sample, comprising the steps of (a) contacting a *Zcytor16* nucleic acid probe under hybridizing conditions with either (i)

WO 02/077174

PCT/US02/08811

6

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:1, or its complement, and (b) detecting the formation of hybrids of the nucleic acid probe and
5 either the test RNA molecules or the synthesized nucleic acid molecules, wherein the presence of the hybrids indicates the presence of *Zcytor16* RNA in the biological sample. For example, suitable probes consist of the following nucleotide sequences of SEQ ID NO:1: nucleotides 64, 67, 82 or 94 to 690 or 693; nucleotides 64, 67, 82 or 94 to 369 or 381; 394 to 690 or 693; and nucleotides 1 to 690 or 693. Other suitable
10 probes consist of the complement 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 *Zcytor16* polypeptide in a biological sample, comprising the steps of: (a) contacting the biological sample with an antibody or an antibody fragment that
15 specifically binds with a polypeptide consisting of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2, wherein the contacting is performed under conditions that 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
20 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
25 selected from the group consisting of (a) a nucleic acid molecule comprising the nucleotide sequence of nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 693 of SEQ ID NO:1, (b) a nucleic acid molecule comprising the complement of nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 693 of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, (c) a nucleic acid molecule that is a fragment of (a) consisting of at least eight nucleotides, and (d) a nucleic acid molecule
30 that is a fragment of (b) consisting of at least eight nucleotides. Such a kit may also comprise a second container that comprises one or more reagents capable of indicating

WO 02/077174

PCT/US02/08811

7

the presence of the nucleic acid molecule. On the other hand, a kit for detection of 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:2.

5 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:2. An exemplary anti-idiotypic antibody binds with an antibody that specifically binds a polypeptide consisting of amino acid residues 22 to 231, or 28 to 231 of SEQ ID NO:2.

10 The present invention also provides isolated nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence that encodes a Zcytor16 secretion signal sequence and a nucleotide sequence that encodes a biologically active polypeptide, wherein the Zcytor16 secretion signal sequence comprises an amino acid sequence of residues 1 to 21, of SEQ ID NO:2. 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. Moreover, the present invention provides fusion proteins comprising a Zcytor16 secretion signal sequence and a polypeptide, wherein the

20 Zcytor16 secretion signal sequence comprises an amino acid sequence of residues 1 to 21, of SEQ ID NO:2.

The present invention also provides fusion proteins, comprising a 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_C fragment. The present invention further includes isolated nucleic acid molecules that encode such fusion proteins.

The present invention also provides monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors comprising a 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). In a preferred embodiment, such receptors are soluble receptors comprising at least one zcytor16

30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

8

extracellular domain polypeptide comprising amino acids 22-231, or 22-210 of SEQ ID NO:2. The present invention further includes isolated nucleic acid molecules that encode such receptor polypeptides.

The present invention also provides polyclonal and monoclonal
5 antibodies to monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors comprising a zcytor16 extracellular domain such as those described above. Moreover, such antibodies can be used antagonize the binding to the zcytor16 ligand, IL-TIF (SEQ ID NO:15), to the zcytor16 receptor.

The present invention also provides a method for detecting a genetic
10 abnormality in a patient, comprising: obtaining a genetic sample from a patient; producing a first reaction product by incubating the genetic sample with a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or the complement of SEQ ID NO:1, under conditions wherein said polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence; visualizing the first reaction
15 product; and comparing said first reaction product to a control reaction product from a wild type patient, wherein a difference between said first reaction product and said control reaction product is indicative of a genetic abnormality 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; incubating
20 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 to a normal control tissue or biological sample, wherein an increase in the level of
25 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:1 or the
30 complement of SEQ ID NO:1; incubating the tissue or biological sample with under conditions wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide

WO 02/077174

PCT/US02/08811

9

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.

10

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.*, α -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, 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 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,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

10

phosphoroselenoate, phosphorodiselenoate, phosphoroanilothioate, phosphoranilidate, phosphoramidate, and the like. The term "nucleic acid molecule" also includes so-called "peptide nucleic acids," which comprise naturally-occurring or modified nucleic acid bases attached to a polyamide backbone. Nucleic acids can be either single
5 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 compared to a reference nucleotide sequence. For example, the sequence 5' ATGCACGGG 3' is complementary to 5' CCCGTGCAT 3'.

10 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 either in their entirety or along a partial stretch of the nucleic acid molecule.

The term "degenerate nucleotide sequence" denotes a sequence of
15 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 triplets each encode Asp).

The term "structural gene" refers to a nucleic acid molecule that is
20 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 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
25 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.

A "nucleic acid molecule construct" is a nucleic acid molecule, either
30 single- or double-stranded, that has been modified through human intervention to

WO 02/077174

PCT/US02/08811

11

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 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 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.

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; McGehee *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.

WO 02/07174

PCT/US02/08811

12

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.

5 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,"
10 "tissue-specific," or "organelle-specific" manner.

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
15 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
20 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.

25 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
30 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

13

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.

A peptide or polypeptide encoded by a non-host DNA molecule is a
5 "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 elements are most commonly derived from linearized plasmids that are introduced into
10 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
15 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 tetracycline resistance or ampicillin resistance.

An "expression vector" is a nucleic acid molecule encoding a gene that is
20 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
25 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 Zcytor16 from an expression vector. In contrast, Zcytor16 can be produced by a cell that is a "natural source" of
30 Zcytor16, and that lacks an expression vector.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

14

"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 genes. For example, a fusion protein can comprise at least part of a Zcytor16 polypeptide fused with a polypeptide that binds an affinity matrix. Such a fusion protein provides a means to isolate large quantities of Zcytor16 using affinity chromatography.

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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

15

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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

16

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
5 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 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
10 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
15 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
20 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
25 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
30 pairs include receptor/ligand pairs, antibody/antigen (or hapten or epitope) pairs, sense/antisense polynucleotide pairs, and the like. Where subsequent dissociation of

WO 02/077174

PCT/US02/08811

17

the complement/anti-complement pair is desirable, the complement/anti-complement pair preferably has a binding affinity of less than 10^9 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
5 binds with the variable region of an anti-Zcytor16 antibody, and thus, an anti-idiotypic antibody mimics an epitope of Zcytor16.

An "antibody fragment" is a portion of an antibody such as F(ab')_2 , F(ab)_2 , 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-Zcytor16
10 monoclonal antibody fragment binds with an epitope of Zcytor16.

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
15 and heavy variable regions are connected by a peptide linker ("scFv proteins"), and 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
20 the remainder of the antibody molecule is derived from a human antibody.

"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
25 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
30 an antibody moiety to produce a molecule useful for diagnosis. Examples of detectable

WO 02/077174

PCT/US02/08811

18

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 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-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* 10 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.*, 15 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 Zcytor16 polypeptide component. Examples of an antibody fusion protein include a protein that 25 comprises a 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 30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

19

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
5 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 appropriate major histocompatibility complex molecule and inducing a cytotoxic T cells response, such as cell lysis or specific cytokine release against the target cell
10 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 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
15 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 "anti-sense gene." Anti-sense RNA molecules are capable of binding to mRNA molecules, resulting in an inhibition of mRNA translation.

20 An "anti-sense oligonucleotide specific for *Zcytor16*" or a "Zcytor16 anti-sense oligonucleotide" is an oligonucleotide having a sequence (a) capable of forming a stable triplex with a portion of the *Zcytor16* gene, or (b) capable of forming a stable duplex with a portion of an mRNA transcript of the *Zcytor16* gene.

A "ribozyme" is a nucleic acid molecule that contains a catalytic center.
25 The term includes RNA enzymes, self-splicing RNAs, self-cleaving RNAs, and nucleic 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
30 in the cleavage of the mRNA by RNase P. A nucleic acid molecule that encodes an external guide sequence is termed an "external guide sequence gene."

WO 02/077174

PCT/US02/08811

20

The term "variant *Zcytor16* gene" refers to nucleic acid molecules that encode a polypeptide having an amino acid sequence that is a modification of SEQ ID NO:2. Such variants include naturally-occurring polymorphisms of *Zcytor16* genes, as well as synthetic genes that contain conservative amino acid substitutions of the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Additional variant forms of *Zcytor16* genes are nucleic acid molecules that contain insertions or deletions of the nucleotide sequences described herein. A variant *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:1, or its complement, under stringent conditions.

Alternatively, variant *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 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 (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)). Particular methods for determining sequence identity are described below.

Regardless of the particular method used to identify a variant *Zcytor16* gene or variant *Zcytor16* polypeptide, a variant gene or polypeptide encoded by a variant gene may be functionally characterized the ability to bind specifically to an anti-*Zcytor16* antibody. A variant *Zcytor16* gene or variant *Zcytor16* polypeptide may also be functionally characterized the ability to bind to its ligand, IL-TIF, using a biological or biochemical assay described herein.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

21

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 populations. Gene mutations can be silent (no change in the encoded polypeptide) or
5 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.

10 "Paralogs" are distinct but structurally related proteins made by an organism. Paralogs are believed to arise through gene duplication. For example, α -globin, β -globin, and myoglobin are paralogs of each other.

The present invention includes functional fragments of *Zcytor16* genes. Within the context of this invention, a "functional fragment" of a *Zcytor16* gene refers
15 to a nucleic acid molecule that encodes a portion of a *Zcytor16* polypeptide which is a domain described herein or at least specifically binds with an anti-*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
20 understood to be accurate to $\pm 10\%$.

3. *Production of Zcytor16 Polynucleotides or Genes*

Nucleic acid molecules encoding a human *Zcytor16* gene can be obtained by screening a human cDNA or genomic library using polynucleotide probes
25 based upon SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37. These techniques are standard and well-established.

As an illustration, a nucleic acid molecule that encodes a human *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 tonsil tissue, using
30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

22

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 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*, 3rd 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)⁺ RNA must be isolated from a total RNA preparation. Poly(A)⁺ 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)⁺ 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 λ gt10 vector. See, for example, Huynh *et al.*, "Constructing and Screening cDNA Libraries in λ gt10 and λ 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

23

LAMDA GEM-4 (Promega Corp.) or other commercially available vectors. Suitable 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:1, using standard methods (see, for example, Ausubel (1995) at pages 6-1 to 6-11).

Nucleic acid molecules that encode a human *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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

24

Zcytor16 gene, as described herein. General methods for screening libraries with PCR 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-*Zcytor16* antibodies, produced as described below, can also be used to isolate DNA sequences that encode human *Zcytor16* genes from cDNA libraries. For example, the antibodies can be used to screen λ 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 λ 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 *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 02/077174

PCT/US02/08811

25

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, 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).

The sequence of a *Zcytor16* cDNA or *Zcytor16* genomic fragment can be determined using standard methods. *Zcytor16* polynucleotide sequences disclosed herein can also be used as probes or primers to clone 5' non-coding regions of a *Zcytor16* gene. Promoter elements from a *Zcytor16* gene can be used to direct the expression of heterologous genes in, for example, tonsil tissue of transgenic animals or patients treated with gene therapy. The identification of genomic fragments containing a *Zcytor16* promoter or regulatory element can be achieved using well-established techniques, such as deletion analysis (see, generally, Ausubel (1995)).

Cloning of 5' flanking sequences also facilitates production of *Zcytor16* proteins by "gene activation," as disclosed in U.S. Patent No. 5,641,670. Briefly, expression of an endogenous *Zcytor16* gene in a cell is altered by introducing into the *Zcytor16* locus a DNA construct comprising at least a targeting sequence, a regulatory sequence, an exon, and an unpaired splice donor site. The targeting sequence is a *Zcytor16* 5' non-coding sequence that permits homologous recombination of the construct with the endogenous *Zcytor16* locus, whereby the sequences within the construct become operably linked with the endogenous *Zcytor16* coding sequence. In this way, an endogenous *Zcytor16* promoter can be replaced or supplemented with other regulatory sequences to provide enhanced, tissue-specific, or otherwise regulated expression.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

26

4. *Production of Zcytor16 Gene Variants*

The present invention provides a variety of nucleic acid molecules, including DNA and RNA molecules, that encode the 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 Zcytor16 polypeptide of SEQ ID NO:2. Those skilled in the art will recognize that the degenerate sequence of SEQ ID NO:3 also provides all RNA sequences encoding SEQ ID NO:2, 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 zcytor16 receptor subunit that is substantially homologous to the receptor polypeptide of SEQ ID NO:3. Thus, the present invention contemplates Zcytor16 polypeptide-encoding nucleic acid molecules comprising nucleotide 1 to nucleotide 693 of SEQ ID NO:1, and their RNA equivalents.

Table 1 sets forth the one-letter codes used within SEQ ID NO:3 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 02/077174

PCT/US02/08811

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:3, encompassing all possible
5 codons for a given amino acid, are set forth in Table 2.

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	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
Any	X		NNN

WO 02/077174

PCT/US02/08811

29

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:2. 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 Malassi, *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 02/077174

PCT/US02/08811

30

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* polypeptides from other mammalian species, including mouse, porcine, ovine, bovine, canine, feline, equine, and other primate polypeptides. Orthologs of human *Zcytor16* can be cloned using information and compositions provided by the present invention in combination with conventional cloning techniques. For example, a *Zcytor16* cDNA can be cloned using mRNA obtained from a tissue or cell type that expresses *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 human cDNA or with one or more sets of degenerate probes based on the disclosed sequences. A cDNA can also be cloned using the polymerase chain reaction with primers designed from the representative human *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 *Zcytor16* polypeptide.

Those skilled in the art will recognize that the sequence disclosed in SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37 represents a single allele of human *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 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 *Zcytor16* polypeptide are included within the scope 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 or

WO 02/077174

PCT/US02/08811

31

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:1 or SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:13, or SEQ ID NO:37 amino acids 22 to 231 or 28-231 of SEQ ID NO:2, or allelic variants thereof and retain the ligand-binding properties of the wild-type 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:1, to nucleic acid molecules consisting of the nucleotide sequence of nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 693 of SEQ ID NO:1, or to nucleic acid molecules comprising a nucleotide sequence complementary to SEQ ID NO:1 or to nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 693 of SEQ ID NO:1, 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

32

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 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,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

33

>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.

5 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
10 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.

15 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
20 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 .

25 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 (1x SSC: 0.15 M sodium chloride, 15 mM sodium citrate) or SSPE (1x SSPE: 1.8 M
30 NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, pH 7.7). Typically, hybridization buffers contain from between 10 mM - 1 M Na^+ . The addition of destabilizing or denaturing

WO 02/077174

PCT/US02/08811

34

agents such as formamide, tetralkylammonium salts, guanidinium cations or thiocyanate cations to the hybridization solution will alter the T_m 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 Zcytor16 polypeptide can be hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:37 (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 Zcytor16 polypeptide remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 (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.

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 Zcytor16 polypeptide remain

WO 02/077174

PCT/US02/08811

35

hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 (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.

5 The present invention also provides isolated *Zcytor16* polypeptides that have a substantially similar sequence identity to the polypeptides of SEQ ID NO:2, 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:2, or their
10 orthologs.

The present invention also contemplates *Zcytor16* 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:2, and a hybridization assay, as described above. Such *Zcytor16* variants include nucleic acid
15 molecules (1) that remain hybridized with a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37 (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
20 the amino acid sequence of SEQ ID NO:2. Alternatively, *Zcytor16* 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:1 or SEQ ID NO:37 (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
25 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:2.

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
30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

36

Henikoff (*ibid.*) as shown in Table 3 (amino acids are indicated by the standard one-letter codes). The percent identity is then calculated as: $(\text{Total number of identical matches}) / (\text{length of the longer sequence plus the number of gaps introduced into the longer sequence in order to align the two sequences}) (100)$.

5

WO 02/077174

PCT/US02/08811

37

Table 3

	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	P	P	S	T	W	Y	V
	A	4																		
	R	-1	5																	
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												
10	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							
15	M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	1	2	-1	5						
	P	-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	-2	-1	1	5			
20	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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

38

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 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:2) 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 02/077174

PCT/US02/08811

39

sequence disclosed herein. For example, variants can be obtained that contain one or more amino acid substitutions of SEQ ID NO:2, in which an alkyl amino acid is substituted for an alkyl amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, an aromatic amino acid is substituted for an aromatic amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, a sulfur-containing amino acid is substituted for a sulfur-containing amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, a hydroxy-containing amino acid is substituted for a hydroxy-containing amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, an acidic amino acid is substituted for an acidic amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, a basic amino acid is substituted for a basic amino acid in a Zcytor16 amino acid sequence, or a dibasic monocarboxylic amino acid is substituted for a dibasic monocarboxylic amino acid in a 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 02/077174

PCT/US02/08811

40

Particular variants of 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:2), wherein the variation in amino acid sequence is due to one or more conservative amino acid substitutions.

5 Conservative amino acid changes in a *Zcytor16* gene can be introduced, for example, by substituting nucleotides for the nucleotides recited in SEQ ID NO:1. 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.),
10 *Directed Mutagenesis: A Practical Approach* (IRL Press 1991)). A variant Zcytor16 polypeptide can be identified by the ability to specifically bind anti-Zcytor16 antibodies.

The proteins of the present invention can also comprise non-naturally occurring amino acid residues. Non-naturally occurring amino acids include, without
15 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-
20 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
25 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).
30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

41

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 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 Zcytor16 binding activity (such as binding of zcytor16 to ligand IL-TIF, or to an anti-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 acids. See, for

WO 02/077174

PCT/US02/08811

42

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, Zcytor16 labeled with biotin or FITC can be used for expression cloning of Zcytor16 ligands.

Variants of the disclosed 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-Zcytor16 antibodies, can be recovered from the host cells and rapidly sequenced using modern equipment. These methods

WO 02/077174

PCT/US02/08811

43

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 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 Zcytor16 polypeptide. As an illustration, DNA molecules having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 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-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 *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. The nucleotides encoding additional human zcytor16 functional variant domains described herein, not shown in Table 4, can be determined with reference to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37. Such functional fragments include for example, the following nucleotide sequences of SEQ

WO 02/077174

PCT/US02/08811

44

ID NO:1: nucleotides 64, 67, 82 or 94 to 690 or 693; nucleotides 64, 67, 82 or 94 to 369 or 381; 394 to 690 or 693; and nucleotides 1 to 690 or 693, and amino acid sequences encoded thereby, e.g., such as those shown in SEQ ID NO:2 respectively.

5

Table 4

Zcytor16 Feature	Amino acid residues (SEQ ID NO:2)	Nucleotides (SEQ ID NO:1)
First Ig Domain	32-123	94-369
Second Ig Domain	132-230	394-690
Both Ig Domains	32-230	94-690

The present invention also contemplates functional fragments of a *Zcytor16* gene that have amino acid changes, compared with an amino acid sequence disclosed herein. A variant *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 *Zcytor16* gene can hybridize to a nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence, such as SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37.

The present invention also provides polypeptide fragments or peptides comprising an epitope-bearing portion of a *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,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

45

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
5 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 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.*
10 *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 (The Humana Press, Inc. 1992), Price, "Production and Characterization of Synthetic
15 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).

For any Zcytor16 polypeptide, including variants and fusion proteins,
20 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 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
25 structure that provides at least one of the following sequences: SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2, and SEQ ID NO:3. Suitable forms of computer-readable media include 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
30 compact discs (*e.g.*, CD-read only memory (ROM), CD-rewritable (RW), and CD-

WO 02/077174

PCT/US02/08811

46

recordable), and digital versatile/video discs (DVD) (e.g., DVD-ROM, DVD-RAM, and DVD+RW).

6. *Production of Zcytor16 Polypeptides*

5 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 *Zcytor16* gene, a nucleic acid molecule
10 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.

15 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
20 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 *Zcytor16* expression vector may comprise a *Zcytor16* gene and a secretory sequence derived from any secreted gene.

25 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-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
30 hamster ovary cells (CHO-K1; ATCC CCL61; CHO DG44 (Chasin *et al.*, *Som. Cell. Molec. Genet.* 12:555, 1986)), rat pituitary cells (GHI; ATCC CCL82), HeLa S3 cells

WO 02/077174

PCT/US02/08811

47

(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 (Foccking *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 *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 *Zcytor16* monomeric or homodimeric soluble receptor polypeptide, or a DNA sequence encoding an additional subunit of a heterodimeric or multimeric *Zcytor16* soluble 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 in the art will

WO 02/077174

PCT/US02/08811

48

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.

5 Many such elements are described in the literature and are 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.

10 An expression vector can be introduced into host cells using a variety of 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
15 introducing vectors into eukaryotic cells and techniques for selecting such stable 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
20 resistance to the antibiotic neomycin. In this case, selection is carried out in the 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
25 selective agent to select for cells that produce high levels of the products of the introduced genes. A suitable amplifiable selectable marker is dihydrofolate reductase, which confers resistance to methotrexate. Other drug resistance genes (*e.g.*, hygromycin resistance, multi-drug resistance, puromycin acetyltransferase) can also be used. Alternatively, markers that introduce an altered phenotype, such as green
30 fluorescent protein, or cell surface proteins such as CD4, CD8, Class I MHC, placental

WO 02/077174

PCT/US02/08811

49

alkaline phosphatase may be used to sort transfected cells from untransfected cells by such means as FACS sorting or magnetic bead separation technology.

Zcytor16 polypeptides can also be produced by cultured mammalian cells using a viral delivery system. Exemplary viruses for this purpose include
5 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
10 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
15 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
20 cell density to produce significant amounts of protein (see Gamier *et al.*, *Cytotechnol.* 15:145 (1994)).

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 Zcytor16 genes into insect cells. Suitable expression vectors
25 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, baculovirus *p10* promoter, and the *Drosophila metallothionein* promoter. A second method of making recombinant
30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

50

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 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 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 *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 *Pcor*, 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 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 Zcytor16 secretory signal sequence.

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).

WO 02/077174

PCT/US02/08811

51

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 x 10⁵ cells to a density of 1-2 x 10⁶ 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 *GALI* (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 YIp-based vectors, such as YIp5, YRp vectors, such as YRp17, YEpl3 and YCp vectors, such as YCp19. Methods for transforming *S. cerevisiae* cells with exogenous DNA and 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 determined by the selectable marker, commonly drug resistance or the ability to grow in

WO 02/077174

PCT/US02/08811

52

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 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 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, 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 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

53

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
 5 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. methanolicus* cells. *P. methanolicus* 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)
 10 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,
 15 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, *Zcytor16* genes can be expressed in prokaryotic host cells. Suitable promoters that can be used to express *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
 20 of *Bacillus*, *Streptomyces* promoters, the *int* promoter of bacteriophage lambda, the *bla* promoter of pBR322, and the CAT promoter of the chloramphenicol acetyl transferase 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).

30 Suitable prokaryotic hosts include *E. coli* and *Bacillus subtilis*. Suitable strains of *E. coli* include BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, BL21(DE3)pLysE, DH1,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

54

DH4L, 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 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," 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).

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*

WO 02/077174

PCT/US02/08811

55

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, 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).

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, 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)).

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:2. 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:2: amino acid residues 22 to 230 or 231, amino acid residues 23 to 230 or 231, amino acid residues 28 to 230 or 231, or amino acids 32 to 230 or 231; amino acid residues 22, 23, 28 or 32 to 127; amino acid residues 22, 23, 28 or 32 to 123, and amino acid residues 132 to 230 or 231. Within certain embodiments of the invention, the polypeptides comprise 20, 30, 40, 50, 100, or more contiguous

WO 02/077174

PCT/US02/08811

56

residues of these amino acid sequences. Nucleic acid molecules encoding such peptides and polypeptides are useful as polymerase chain reaction primers and probes.

Moreover, zcytor16 polypeptides can be expressed as monomers, homodimers, heterodimers, or multimers within higher eukaryotic cells. Such cells can be used to produce zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptor polypeptides that comprise at least one zcytor16 polypeptide ("zcytor16-comprising receptors" or "zcytor16-comprising 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 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 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 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.

Mammalian cells suitable for use in expressing Zcytor16 receptors and transducing a receptor-mediated signal include cells that express other receptor subunits that may form a functional complex with Zcytor16. These 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

57

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 human 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 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, 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

58

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 Zcytor16 receptor can also be identified by mutagenizing a cell line expressing the full-length receptor or receptor fusion (e.g., comprising the 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 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.

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.* 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) (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 (ATCC No. CRL-1424) (human melanoma); and Caki-1 (ATCC No. HTB-46) (human

WO 02/077174

PCT/US02/08811

59

renal carcinoma). These cells can be used in assays to assess the functionality of zcytor16 as an IL-TIF antagonist or anti-inflammatory factor.

An additional screening approach provided by the present invention includes the use of hybrid receptor polypeptides. These hybrid polypeptides fall into two general classes. Within the first class, the intracellular domain of 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 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 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 Zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors of the present invention.

A second class of hybrid receptor polypeptides comprise the extracellular (ligand-binding) domain of Zcytor16 (approximately residues 23 to 231 of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:13) with an intracellular domain of 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 Zcytor16 Fusion Proteins and Conjugates

One general class of Zcytor16 analogs are variants having an amino acid sequence that is a mutation of the amino acid sequence disclosed herein. Another general class of 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 Zcytor16 antibodies mimic Zcytor16, these domains can provide Zcytor16 binding activity. 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 Avasle *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.

Zcytor16 polypeptides have both *in vivo* and *in vitro* uses. As an illustration, a soluble form of Zcytor16 can be added to cell culture medium to inhibit the effects of the Zcytor16 ligand produced by the cultured cells.

Fusion proteins of Zcytor16 can be used to express Zcytor16 in a recombinant host, and to isolate the produced Zcytor16. As described below, particular Zcytor16 fusion proteins also have uses in diagnosis and therapy. One type of fusion protein comprises a peptide that guides a Zcytor16 polypeptide from a recombinant host cell. To direct a 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 Zcytor16 expression vector. While the secretory signal sequence may be derived from 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 Zcytor16-encoding sequence such that

WO 02/077174

PCT/US02/08811

61

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 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 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 α -factor (encoded by the *MF α 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*, 2nd Edition, Glover and Hames (eds.), pages 123-167 (Oxford University Press 1995).

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 SEQ ID NO:13, amino acids 22-210 of SEQ ID NO:2, or the corresponding region of a non-human 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, FlagTM 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-zcytor16 subunit extracellular cytokine binding domains are also prepared as above.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

62

In an alternative approach, a receptor extracellular domain of 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_C fragment, which contains two constant region domains and a hinge region but lacks the variable region (See, 5 Sledziewski, AZ et al., US Patent No. 6,018,026 and 5,750,375). The soluble zcytor16, soluble 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 10 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 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 15 near-physiological 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 20 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 25 ligand and are cleared from circulation by normal physiological processes. For use in assays, the chimeras are bound to a support via the F_C region and used in an ELISA format.

The present invention further provides a variety of other polypeptide fusions and related multimeric proteins comprising one or more polypeptide fusions. 30 For example, a soluble zcytor16 receptor or soluble zcytor16 heterodimeric polypeptide, such as soluble zcytor16/CRF2-4, can be prepared as a fusion to a

WO 02/077174

PCT/US02/08811

63

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 κ light chain. Immunoglobulin-soluble zcytor16 receptor or immunoglobulin-soluble zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptide, such as immunoglobulin-soluble zcytor16/CRF2-4 fusions can be expressed in genetically engineered cells to produce a variety of multimeric zcytor16 receptor analogs. Auxiliary domains can be fused to soluble zcytor16 receptor or soluble zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptides, such as soluble zcytor16/CRF2-4 to target them to specific cells, tissues, or macromolecules (e.g., collagen, or cells expressing the zcytor16 ligand, IL-TIF). A 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.

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, *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 *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*, 2nd 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 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 21, or 1 to 22, of SEQ ID NO:2 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- α , - β , - γ , - ω , - δ , and - τ), the stem cell growth factor designated "S1 factor," erythropoietin, and thrombopoietin. The 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

65

additional peptide into the secretory pathway. Fusion proteins comprising a Zcytor16 secretory signal sequence can be constructed using standard techniques.

Another form of fusion protein comprises a Zcytor16 polypeptide and an immunoglobulin heavy chain constant region, typically an F_C fragment, which contains
5 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
10 inert sequence, which is immunologically inert. An exemplary peptide linker has the amino acid sequence: GSGGG SGGGG SGGGG S (SEQ ID NO:4). In this fusion protein, an illustrative Fc moiety is a human γ 4 chain, which is stable in solution and has little or no complement activating activity. Accordingly, the present invention contemplates a Zcytor16 fusion protein that comprises a Zcytor16 moiety and a human
15 Fc fragment, wherein the C-terminus of the 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 Zcytor16 moiety can be a Zcytor16 molecule or a fragment thereof. For example, a fusion protein can comprise amino acid residues 22 to 231, or 28 to 231 of SEQ ID NO:2 and an Fc fragment (*e.g.*, a human Fc
20 fragment).

In another variation, a Zcytor16 fusion protein comprises an IgG sequence, a 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 Zcytor16 moiety, wherein the IgG sequence consists of the following elements in the
25 following order: a hinge region, a CH₂ domain, and a CH₃ domain. Accordingly, the IgG sequence lacks a CH₁ domain. The Zcytor16 moiety displays a Zcytor16 activity, as described herein, such as the ability to bind with a Zcytor16 ligand. 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).

30 Fusion proteins comprising a Zcytor16 moiety and an Fc moiety can be used, for example, as an *in vitro* assay tool. For example, the presence of a Zcytor16

WO 02/077174

PCT/US02/08811

66

ligand in a biological sample can be detected using a Zcytor16-immunoglobulin fusion protein, in which the 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 ligand to its receptor.

Other examples of antibody fusion proteins include polypeptides that comprise an antigen-binding domain and a Zcytor16 fragment that contains a 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 swapped between 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 Zcytor16 fusion analogs. A 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.

Zcytor16 polypeptides can be used to identify and to isolate Zcytor16 ligands. 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, zcytor16 polypeptides of the present

WO 02/077174

PCT/US02/08811

67

invention can be used to identify and isolate IL-TIF for either diagnostic, or production purposes.

The activity of a 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.* 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 Zcytor16.

For example, the microphysiometer is used to measure responses of an Zcytor16-expressing eukaryotic cell, compared to a control eukaryotic cell that does not express Zcytor16 polypeptide. Suitable cells responsive to Zcytor16-modulating stimuli include recombinant host cells comprising a Zcytor16 expression vector, and cells that naturally express Zcytor16. Extracellular acidification provides one measure for a Zcytor16-modulated cellular response. In addition, this approach can be used to identify ligands, agonists, and antagonists of Zcytor16 ligand, IL-TIF. For example, a molecule can be identified as an agonist of Zcytor16 ligand by providing cells that express a 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 Zcytor16 polypeptide or Zcytor16 fusion protein, or zcytor16 monomeric, homodimeric,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

68

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).

5 In brief, a Zcytor16 polypeptide or fusion protein is covalently attached, using amine or sulphydryl 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 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.

15 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 (1992), and Wlodaver *et al.*, *FEBS Lett.* 309:59 (1992).

20 The present invention also contemplates chemically modified Zcytor16 compositions, in which a Zcytor16 polypeptide is linked with a polymer. Illustrative Zcytor16 polypeptides are soluble polypeptides that lack a functional transmembrane domain, such as a polypeptide consisting of amino acid residues 22 to 231, or 28 to 231 of SEQ ID NO:2. Typically, the polymer is water soluble so that the 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

69

polymer may be branched or unbranched. Moreover, a mixture of polymers can be used to produce Zcytor16 conjugates.

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 homopolymers, a polypropylene oxide/ethylene oxide co-polymer, polyoxyethylated polyols (e.g., glycerol), polyvinyl alcohol, dextran, cellulose, or other carbohydrate-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 Zcytor16 conjugate can also comprise a mixture of such water-soluble polymers.

One example of a Zcytor16 conjugate comprises a Zcytor16 moiety and a polyalkyl oxide moiety attached to the N-terminus of the Zcytor16 moiety. PEG is one suitable polyalkyl oxide. As an illustration, Zcytor16 can be modified with PEG, a process known as "PEGylation." PEGylation of 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, 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 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 Zcytor16 and a water soluble polymer: amide, carbamate, urethane, and the like. Methods for preparing PEGylated Zcytor16 by acylation will typically comprise the steps of (a) reacting a Zcytor16 polypeptide with PEG (such as a reactive ester of an aldehyde derivative of PEG) under conditions

WO 02/077174

PCT/US02/08811

70

whereby one or more PEG groups attach to 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:Zcytor16, the greater the percentage of polyPEGylated Zcytor16 product.

The product of PEGylation by acylation is typically a polyPEGylated Zcytor16 product, wherein the lysine ϵ -amino groups are PEGylated via an acyl linking group. An example of a connecting linkage is an amide. Typically, the resulting 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 Zcytor16 polypeptides using standard purification methods, such as dialysis, ultrafiltration, ion exchange chromatography, affinity chromatography, and the like.

PEGylation by alkylation generally involves reacting a terminal aldehyde derivative of PEG with Zcytor16 in the presence of a reducing agent. PEG groups can be attached to the polypeptide via a $-\text{CH}_2\text{-NH}$ group.

Derivatization via reductive alkylation to produce a monoPEGylated 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 ϵ -amino groups of the lysine residues and the α -amino group of the *N*-terminal residue of the protein. By such selective derivatization, attachment of a water-soluble polymer that contains a reactive 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 Zcytor16 monopolymer conjugates.

Reductive alkylation to produce a substantially homogenous population of monopolymer Zcytor16 conjugate molecule can comprise the steps of: (a) reacting a Zcytor16 polypeptide with a reactive PEG under reductive alkylation conditions at a pH suitable to permit selective modification of the α -amino group at the amino terminus of

WO 02/077174

PCT/US02/08811

71

the Zcytor16, and (b) obtaining the reaction product(s). The 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.

For a substantially homogenous population of monopolymer 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 Zcytor16. Such reaction conditions generally provide for pKa differences between the lysine amino groups and the α -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 α -group, the more polymer is needed to achieve optimal conditions. If the pH is higher, the polymer: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 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 Zcytor16 will generally be in the range of 1:1 to 100:1. Typically, the molar ratio of water-soluble polymer to 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 zcytor16-comprising homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptor conjugates.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

72

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.

8. *Isolation of 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 Zcytor16 purified from natural sources (*e.g.*, tonsil tissue), synthetic Zcytor16 polypeptides, and recombinant Zcytor16 polypeptides and fusion 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

73

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 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 Zcytor16 isolation and purification can be devised by those of skill in the art. For example, anti-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.* 3:1 (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 zcytor16 extracellular domain can be exploited for purification, for example, of zcytor16-comprising soluble receptors; for example, by using affinity chromatography wherein IL-TIF ligand is bound to a column and the

WO 02/077174

PCT/US02/08811

74

zcytor16-comprising receptor is bound and subsequently eluted using standard chromatography methods.

Zcytor16 polypeptides or fragments thereof may also be prepared through chemical synthesis, as described above. Zcytor16 polypeptides may be
5 monomers or multimers; glycosylated or non-glycosylated; PEGylated or non-PEGylated; and may or may not include an initial methionine amino acid residue.

9. *Production of Antibodies to Zcytor16 Proteins*

Antibodies to Zcytor16 can be obtained, for example, using the product
10 of a Zcytor16 expression vector or Zcytor16 isolated from a natural source as an antigen. Particularly useful anti-Zcytor16 antibodies "bind specifically" with Zcytor16. Antibodies are considered to be specifically binding if the antibodies exhibit at least one of the following two properties: (1) antibodies bind to Zcytor16 with a threshold level of binding activity, and (2) antibodies do not significantly cross-react with
15 polypeptides related to Zcytor16.

With regard to the first characteristic, antibodies specifically bind if they bind to a Zcytor16 polypeptide, peptide or epitope with a binding affinity (K_d) 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
20 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 Zcytor16, but not presently known polypeptides using a standard Western blot analysis. Examples of known related polypeptides
25 include known cytokine receptors.

Anti-Zcytor16 antibodies can be produced using antigenic 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:2 or another amino acid
30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

. 75

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 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.

As an illustration, potential antigenic sites in 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.

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.*, *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 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; α region threshold = 103; β region threshold = 105; Garnier-Robson parameters: α and β 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

76

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:2 would provide suitable antigenic peptides: amino acids 24 to 42 ("antigenic peptide 1"), amino acids 24 to 33 ("antigenic peptide 2"), 37 to 42 ("antigenic peptide 3"), amino acids 48 to 55 ("antigenic peptide 4"), amino acids 68 to 81 ("antigenic peptide 5"), amino acids 88 to 97 ("antigenic peptide 6"), amino acids 126 to 132 ("antigenic peptide 7"), amino acids 156 to 165 ("antigenic peptide 8"), amino acids 178 to 185 ("antigenic peptide 9"), and amino acids 216 to 227 ("antigenic peptide 10"). The present invention contemplates the use of any one of antigenic peptides 1 to 10 to generate antibodies to Zcytor16. The present invention also contemplates polypeptides comprising at least one of antigenic peptides 1 to 10.

Moreover, suitable antigens also include the zcytor16 polypeptides comprising a 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 zcytor16 heterodimeric or multimeric polypeptides, such as soluble zcytor16/CRF2-4, zcytor16/zcytor11, zcytor16/zcytor7, and the like.

Polyclonal antibodies to recombinant Zcytor16 protein or to 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 Zcytor16 polypeptide can be increased through 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 Zcytor16 or a portion thereof with an immunoglobulin polypeptide or with maltose binding protein. The polypeptide immunogen may be a full-length molecule or a portion thereof. If the polypeptide portion is "hapten-like," such portion may be

WO 02/077174

PCT/US02/08811

77

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 horses, cows, dogs, chicken, rats, mice, rabbits, guinea pigs, goats, or sheep, an anti-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. Cancer* 46:310 (1990).

Alternatively, monoclonal anti-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 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 composition comprising a 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 antibodies from the hybridoma cultures.

In addition, an anti-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 specific for human antigens, and the mice can be used to produce human antibody-secreting hybridomas. Methods for

WO 02/077174

PCT/US02/08811

78

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-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')₂. 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.

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_H and V_L 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

79

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_H and V_L 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_H and V_L 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 Zcytor16 polypeptide *in vitro*, and selecting antibody display libraries in phage or similar vectors (for instance, through use of immobilized or labeled Zcytor16 protein or peptide). Genes encoding polypeptides having potential 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 (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 Zcytor16 sequences disclosed herein to identify proteins which bind to 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, Larick *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-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 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-Zcytor16 antibodies or antibody fragments, using standard techniques.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

81

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-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 Zcytor16 Nucleotide Sequences to Detect Gene Expression and Gene Structure

Nucleic acid molecules can be used to detect the expression of a Zcytor16 gene in a biological sample. Suitable probe molecules include double-stranded nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, as well as single-stranded nucleic acid molecules having the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, 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 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 Zcytor16 RNA species. After separating unbound probe from hybridized molecules, the amount of hybrids is detected.

In addition, as zcytor16 is spleen-specific, polynucleotide probes, anti-zcytor16 antibodies, and detection the presence of zcytor16 polypeptides in tissue can be used to assess whether spleen tissue is present, for example, after surgery involving the excision of a diseased or cancerous spleen. As such, the polynucleotides,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

82

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
5 embodiments include fluorescent, radiolabeled, or calorimetrically labeled antibodies, that can be used *in situ*.

Moreover, anti-zcytor16 antibodies and binding fragments can be used for tagging and sorting cells that specifically-express Zcytor16, such as mononuclear cells, lymphoid cells, e.g., activated CD4+ T-cells and CD19+ B-cells, and other
10 described herein. Such methods of cell tagging and sorting are well known in the art (see, e.g., "Molecular Biology of the Cell", 3rd 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
15 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
20 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 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
25 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 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
30 Zcytor16 polypeptides of the present invention are useful, because not all tissue types express the Zcytor16 receptor and because it is important that biologists be able to

WO 02/077174

PCT/US02/08811

83

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 zcytor16 is expressed.

Moreover, use of Zcytor16 polynucleotide probes, anti-zcytor16 antibodies, and detection the presence of zcytor16 polypeptides in tissue can be used in the diagnosis and/or prevention of spontaneous abortions, or to monitor placental health and function. Since 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, zcytor16 could be essential for the function of the placenta, thus maturation of embryos. Therefore, a supplement of Zcytor16 polypeptide, or anti-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 zcytor16 is normally expressed in placenta, the absence of zcytor16 expression may be indicative of abnormal placenta function.

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)). Nucleic acid probes can be detectably labeled with radioisotopes such as ³²P or ³⁵S. Alternatively, 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. Illustrative nonradioactive moieties include biotin, fluorescein, and digoxigenin.

Zcytor16 oligonucleotide probes are also useful for *in vivo* diagnosis. As an illustration, ¹⁸F-labeled oligonucleotides can be administered to a subject and visualized by positron emission tomography (Tavitian *et al.*, *Nature Medicine* 4:467 (1998)).

Numerous diagnostic procedures take advantage of the polymerase chain reaction (PCR) to increase sensitivity of detection methods. Standard techniques for

WO 02/077174

PCT/US02/08811

84

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 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 *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 *Zcytor16* primers (see, for example, Wu *et al.* (eds.), "Rapid Isolation of Specific cDNAs or Genes by 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 guanidinium-thiocyanate cell lysis procedure described above. 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 *Zcytor16* anti-sense oligomers. Oligo-dT primers offer the advantage that various mRNA nucleotide sequences are amplified that can provide control target sequences. *Zcytor16* sequences are 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 be transferred to a membrane, hybridized with a detectably-labeled *Zcytor16* probe, and examined by autoradiography. Additional alternative approaches include the use of

WO 02/077174

PCT/US02/08811

85

digoxigenin-labeled deoxyribonucleic acid triphosphates to provide chemiluminescence detection, and the C-TRAK colorimetric assay.

Another approach for detection of *Zcytor16* expression is cycling 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 *Zcytor16* sequences can utilize 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), Ehricht *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 243:358 (1997), and Chadwick *et al.*, *J. Virol. Methods* 70:59 (1998)). Other standard methods are known to those of skill in the art.

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.

The *Zcytor16* gene resides in human chromosome 6q23-q24 (e.g., Example 24). This region is associated with various disorders, including insulin dependent diabetes mellitus, retinal cone dystrophy, breast cancer, and Parkinson

WO 02/077174

PCT/US02/08811

86

disease. Moreover, defects in the *zcytor16* locus itself may result in a heritable human disease states as discussed herein. One of skill in the art would appreciate that defects in cytokine receptors are known to cause particular diseases in humans. For example, polymorphisms of cytokine receptors are associated with pulmonary alveolar proteinosis, familial periodic fever, and erythroleukemia. Moreover, growth hormone receptor mutation results in dwarfism (Amselem, S et al., New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989), IL-2 receptor gamma mutation results in severe combined immunodeficiency (SCID) (Noguchi, M et al., Cell 73: 147-157, 1993), c-Mpl mutation results in thrombocytopenia (Ihara, K et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999), and severe mycobacterial and Salmonella infections result in interleukin-12 receptor-deficient patients (de Jong, R et al., Science 280: 1435-1438, 1998), amongst others. Thus, similarly, defects in *zcytor16* can cause a disease state or susceptibility to disease or infection. As the *Zcytor16* gene is located at 6q23-q24, *zcytor16* polynucleotide probes can be used to detect chromosome 6q23-q24 loss, trisomy, duplication or translocation associated with human diseases, such as inflammatory diseases, chronic inflammation, dysfunction of inflammatory response, immune cell cancers, bone marrow cancers, spleen cancers, prostate cancer, thyroid, parathyroid or other cancers, or immune diseases. Moreover, molecules of the present invention, such as the polypeptides, antagonists, agonists, polynucleotides and antibodies of the present invention would aid in the detection, diagnosis prevention, and treatment associated with a *zcytor16* genetic defect. Thus, *Zcytor16* nucleotide sequences can be used in linkage-based testing for various diseases, and to determine whether a subject's chromosomes contain a mutation in the *Zcytor16* gene. Detectable chromosomal aberrations at the *Zcytor16* gene locus include, but are not limited to, aneuploidy, gene copy number changes, loss of heterogeneity of 6q23-q24, translocation in 6q23-q24, insertions, deletions, restriction site changes and rearrangements. Human diseases associated with such detectable rearrangements are known in the art, for example see, OMIM™, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD gene map, e.g., translocations, LOH, trisomy, and the like. Of particular interest are genetic alterations that inactivate a *Zcytor16* gene, or gross chromosomal alterations in and around the *zcytor16* locus.

Similarly, defects in the *Zcytor16* gene itself may result in a heritable human disease state. Moreover, one of skill in the art would appreciate that defects in cytokine receptors are known to cause disease states in humans. For example, growth hormone receptor mutation results in dwarfism (Amselem, S et al., New Eng. J. Med. 321: 989-995, 1989), IL-2 receptor gamma mutation results in severe combined immunodeficiency (SCID) (Noguchi, M et al., Cell 73: 147-157, 1993), c-Mpl mutation results in thrombocytopenia (Ihara, K et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 96: 3132-3136, 1999), and severe mycobacterial and Salmonella infections result in interleukin-12 receptor-deficient patients (de Jong, R et al., Science 280: 1435-1438, 1998), amongst others. Thus, similarly, defects in *zcytor16* can cause a disease state or susceptibility to disease or infection. As, *zcytor16* is a cytokine receptor within a chromosomal region where aberrations may be involved in cancer, and is shown to be expressed in ovarian cancer, the molecules of the present invention could also be directly involved in cancer formation or metastasis. As the *Zcytor16* gene is located at the 6q23-q24 region *zcytor16*, polynucleotide probes can be used to detect chromosome 6q23-q24 loss, loss of heterogeneity (LOH), trisomy, duplication or translocation associated with human diseases, such as immune cell cancers, neuroblastoma, bone marrow cancers, thyroid, parathyroid, prostate, melanoma, or other cancers, or immune diseases. Moreover, molecules of the present invention, such as the polypeptides, antagonists, agonists, polynucleotides and antibodies of the present invention would aid in the detection, diagnosis prevention, and treatment associated with a *Zcytor16* genetic defect.

A diagnostic could assist physicians in determining the type of disease and appropriate associated therapy, or assistance in genetic counseling. As such, the inventive anti-*zcytor16* antibodies, polynucleotides, and polypeptides can be used for the detection of *zcytor16* polypeptide, mRNA or anti-*zcytor16* antibodies, thus serving as markers and be directly used for detecting or genetic diseases or cancers, as described herein, using methods known in the art and described herein. Further, *zcytor16* polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with chromosome 6q23-q24 deletions and translocations associated with human diseases, other translocations involved with malignant progression of tumors or other 6q23-q24 mutations, which are expected to be involved in chromosome

WO 02/077174

PCT/US02/08811

88

rearrangements in malignancy; or in other cancers, or in spontaneous abortion. Similarly, *zcytor16* polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with chromosome 6q23-q24 trisomy and chromosome loss associated with human diseases. Thus, *zcytor16* polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with these defects.

As discussed above, defects in the *Zcytor16* gene itself may result in a heritable human disease state. For example, *zcytor16* expression is elevated in several tissue-specific human cancers, as described herein. Molecules of the present invention, such as the polypeptides, antagonists, agonists, polynucleotides and antibodies of the present invention would aid in the detection, diagnosis prevention, and treatment associated with a *zcytor16* genetic defect. In addition, *zcytor16* polynucleotide probes can be used to detect allelic differences between diseased or non-diseased individuals at the *zcytor16* chromosomal locus. As such, the *zcytor16* sequences can be used as diagnostics in forensic DNA profiling.

In general, the diagnostic methods used in genetic linkage analysis, to detect a genetic abnormality or aberration in a patient, are known in the art. Analytical probes will be generally at least 20 nt in length, although somewhat shorter probes can be used (e.g., 14-17 nt). PCR primers are at least 5 nt in length, preferably 15 or more, more preferably 20-30 nt. For gross analysis of genes, or chromosomal DNA, a *zcytor16* polynucleotide probe may comprise an entire exon or more. Exons are readily determined by one of skill in the art by comparing *zcytor16* sequences (SEQ ID NO:1) with the human genomic DNA for *zcytor16*. In general, the diagnostic methods used in genetic linkage analysis, to detect a genetic abnormality or aberration in a patient, are known in the art. Most diagnostic methods comprise the steps of (a) obtaining a genetic sample from a potentially diseased patient, diseased patient or potential non-diseased carrier of a recessive disease allele; (b) producing a first reaction product by incubating the genetic sample with a *zcytor16* polynucleotide probe wherein the polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence, such as in RFLP analysis or by incubating the genetic sample with sense and antisense primers in a PCR reaction under appropriate PCR reaction conditions; (iii) Visualizing the first reaction product by gel electrophoresis and/or other known method such as visualizing the first reaction

product with a zcytor16 polynucleotide probe wherein the polynucleotide will hybridize to the complementary polynucleotide sequence of the first reaction; and (iv) comparing the visualized first reaction product to a second control reaction product of a genetic sample from wild type patient. A difference between the first reaction product and the control reaction product is indicative of a genetic abnormality in the diseased or potentially diseased patient, or the presence of a heterozygous recessive carrier phenotype for a non-diseased patient, or the presence of a genetic defect in a tumor from a diseased patient, or the presence of a genetic abnormality in a fetus or pre-implantation embryo. For example, a difference in restriction fragment pattern, length of PCR products, length of repetitive sequences at the zcytor16 genetic locus, and the like, are indicative of a genetic abnormality, genetic aberration, or allelic difference in comparison to the normal wild type control. Controls can be from unaffected family members, or unrelated individuals, depending on the test and availability of samples. Genetic samples for use within the present invention include genomic DNA, mRNA, and cDNA isolated from any tissue or other biological sample from a patient, such as but not limited to, blood, saliva, semen, embryonic cells, amniotic fluid, and the like. The polynucleotide probe or primer can be RNA or DNA, and will comprise a portion of SEQ ID NO:1, the complement of SEQ ID NO:1, or an RNA equivalent thereof. Such methods of showing genetic linkage analysis to human disease phenotypes are well known in the art. For reference to PCR based methods in diagnostics 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 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)).

Aberrations associated with the *Zcytor16* locus can be detected using nucleic acid molecules of the present invention by employing molecular genetic techniques, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, short tandem repeat (STR) analysis employing PCR techniques, amplification-refractory mutation system analysis (ARMS), single-strand conformation polymorphism (SSCP)

WO 02/077174

PCT/US02/08811

90

detection, RNase cleavage methods, denaturing gradient gel electrophoresis, fluorescence-assisted mismatch analysis (FAMA), and other genetic analysis techniques known in the art (see, for example, Mathew (ed.), *Protocols in Human Molecular Genetics* (Humana Press, Inc. 1991), Marian, *Chest* 108:255 (1995), Coleman and
5 Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation Detection* (Oxford University Press 1996), Birren *et al.* (eds.), *Genome Analysis, Vol. 2: Detecting Genes* (Cold Spring Harbor Laboratory Press 1998), Dracopoli *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics* (John Wiley &
10 Sons 1998), and Richards and Ward, "Molecular Diagnostic Testing," in *Principles of Molecular Medicine*, pages 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)).

The protein truncation test is also useful for detecting the inactivation of a gene in which translation-terminating mutations produce only portions of the encoded protein (see, for example, Stoppa-Lyonnet *et al.*, *Blood* 91:3920 (1998)). According to
15 this approach, RNA is isolated from a biological sample, and used to synthesize cDNA. PCR is then used to amplify the *Zcytor16* target sequence and to introduce an RNA polymerase promoter, a translation initiation sequence, and an in-frame ATG triplet. PCR products are transcribed using an RNA polymerase, and the transcripts are translated *in vitro* with a T7-coupled reticulocyte lysate system. The translation
20 products are then fractionated by SDS-PAGE to determine the lengths of the translation products. The protein truncation test is described, for example, by Dracopoli *et al.* (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, pages 9.11.1 - 9.11.18 (John Wiley & Sons 1998).

The present invention also contemplates kits for performing a diagnostic
25 assay for *Zcytor16* gene expression or to detect mutations in the *Zcytor16* gene. Such kits comprise nucleic acid probes, such as double-stranded nucleic acid molecules comprising the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof, as well as single-stranded nucleic acid molecules having the complement of the nucleotide
30 sequence of SEQ ID NO:1, or a portion thereof. Probe molecules may be DNA, RNA, oligonucleotides, and the like. Kits may comprise nucleic acid primers for performing PCR.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

91

Such kits can contain all the necessary elements to perform a nucleic acid diagnostic assay described above. A kit will comprise at least one container comprising a *Zcytor16* probe or primer. The kit may also comprise a second container comprising one or more reagents capable of indicating the presence of *Zcytor16* sequences. Examples of such indicator reagents include detectable labels such as radioactive labels, fluorochromes, chemiluminescent agents, and the like. A kit may also comprise a means for conveying to the user that the *Zcytor16* probes and primers are used to detect *Zcytor16* gene expression. For example, written instructions may state that the enclosed nucleic acid molecules can be used to detect either a nucleic acid molecule that encodes *Zcytor16*, or a nucleic acid molecule having a nucleotide sequence that is complementary to a *Zcytor16*-encoding nucleotide sequence. The written material can be applied directly to a container, or the written material can be provided in the form of a packaging insert.

11. *Use of Anti-Zcytor16 Antibodies to Detect Zcytor16 or Antagonize Zcytor16 Binding to IL-2/IFN*

The present invention contemplates the use of anti-Zcytor16 antibodies to screen biological samples *in vitro* for the presence of Zcytor16. In one type of *in vitro* assay, anti-Zcytor16 antibodies are used in liquid phase. For example, the presence of Zcytor16 in a biological sample can be tested by mixing the biological sample with a trace amount of labeled Zcytor16 and an anti-Zcytor16 antibody under conditions that promote binding between Zcytor16 and its antibody. Complexes of Zcytor16 and anti-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 Zcytor16 in the biological sample will be inversely proportional to the amount of labeled Zcytor16 bound to the antibody and directly related to the amount of free labeled Zcytor16. Illustrative biological samples include blood, urine, saliva, tissue biopsy, and autopsy material.

Alternatively, *in vitro* assays can be performed in which anti-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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

92

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-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 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-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-Zcytor16 antibody. Alternatively, the anti-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-Zcytor16 antibody can be conjugated with a detectable label to form an anti-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 ^3H , ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S and ^{14}C .

Anti-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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

93

fluorescence. Fluorescent labeling compounds include fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine.

Alternatively, anti-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-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-Zcytor16 immunoconjugates can be detectably labeled by linking an anti-Zcytor16 antibody component to an enzyme. When the anti-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 β -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-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*.

Moreover, the convenience and versatility of immunochemical detection can be enhanced by using anti-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.*,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

94

"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
5 *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.
10 1996).

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-Zcytor16 antibody, or antibody fragment. A kit may also comprise a second container comprising one or more reagents capable of
15 indicating the presence of Zcytor16 antibody or antibody fragments. Examples 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 Zcytor16 antibodies or antibody fragments are used to detect Zcytor16 protein. For example,
20 written instructions may state that the enclosed antibody or antibody fragment can be used to detect 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 zcytor16 monomeric
25 receptor or soluble zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptides, and selection of antibody display libraries in phage or similar vectors (for instance, through use of immobilized or labeled soluble zcytor16 monomeric receptor or soluble zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptides). Genes encoding polypeptides having potential binding domains such as soluble zcytor16 monomeric
30 receptor or soluble zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptide can be obtained by screening random peptide libraries displayed on phage (phage display)

WO 02/077174

PCT/US02/08811

95

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 zcytor16 monomeric receptor or soluble zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric polypeptide sequences disclosed herein to identify proteins which bind to zcytor16-comprising receptor polypeptides. These "binding polypeptides," which interact with soluble zcytor16-comprising receptor polypeptides, can be used for tagging cells; 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 zcytor16-comprising receptor polypeptides; for detecting or quantitating soluble or non-soluble zcytor16-comprising receptors as marker of underlying pathology or disease. These binding polypeptides can also act as "antagonists" to block soluble or membrane-bound zcytor16 monomeric receptor or 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 anti-zcytor16 monomeric receptor or anti-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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

96

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 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 zcytor16 receptor or zcytor16 homodimeric, heterodimeric or multimeric 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 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 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 zcytor16-comprising receptor polypeptides, or fragments thereof may be used *in vitro* to detect denatured or non-denatured zcytor16-comprising receptor polypeptides or fragments thereof in assays, for example, Western Blots or other assays known in the art.

Antibodies to soluble zcytor16 receptor or soluble 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

97

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 zcytor16 receptor or soluble 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 zcytor16-comprising soluble or membrane-bound receptor). More specifically, antibodies to soluble 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 the 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 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 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/ 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

98

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 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, zcytor16 binding polypeptide-cytokine or antibody-cytokine fusion proteins can be used for enhancing *in vivo* killing of target tissues (for example, spleen, pancreatic, blood, lymphoid, colon, and bone marrow cancers), if the binding polypeptide-cytokine or anti- zcytor16 receptor antibody targets the hyperproliferative cell (See, generally, Hornick et al., Blood 89:4437-47, 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-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 interleukin 2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), for instance.

Alternatively, 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. Therapeutic Uses of Polypeptides Having Zcytor16 Activity

Amino acid sequences having 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-Zcytor16 antibodies, can also be used to modulate the immune system by inhibiting

WO 02/077174

PCT/US02/08811

99

the binding of Zcytor16 ligand with the endogenous Zcytor16 receptor. Accordingly, the present invention includes the use of proteins, polypeptides, and peptides having Zcytor16 activity (such as Zcytor16 polypeptides, Zcytor16 analogs (*e.g.*, anti-Zcytor16 anti-idiotypic antibodies), and Zcytor16 fusion proteins) to a subject which lacks an adequate amount of this polypeptide, or which produces an excess of Zcytor16 ligand. Zcytor16 antagonists (*e.g.*, anti-Zcytor16 antibodies) can be also used to treat a subject which produces an excess of either Zcytor16 ligand or Zcytor16. Suitable subjects include mammals, such as humans.

Moreover, we have shown that the zcytor16 receptor binds a ligand called T-cell inducible Factor (IL-TIF) (SEQ ID NO:15; Dumoutier, L. et al., Proc. Nat'l. Acad. Sci. **97**:10144-10149, 2000; mouse IL-TIF sequence is shown in Dumoutier 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; Dumoutier et al., J. Immunol. **164**:1814-1819, 2000; Spencer, SD et al., J. Exp. Med. **187**:571-578, 1998; Gibbs, VC and 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 β 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 zcytor16, residues 22-231 of SEQ ID NO:2, (SEQ ID NO:13) is a monomer, homodimer, heterodimer, or multimer that antagonizes the effects of IL-TIF *in vivo*. Antibodies and binding polypeptides to such 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

100

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), α 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-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 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 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

101

The receptors of the present invention include at least one 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 α ; 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 zcytor16 receptor polypeptide, a heterodimeric soluble zcytor16 receptor, as exemplified by an embodiment comprising a soluble zcytor16 receptor + soluble CRF2-4 receptor heterodimer (zcytor16/ CRF2-4), can act as an antagonist of the IL-TIF. Other embodiments include soluble heterodimers comprising zcytor16/ IL-10R, zcytor16/IL-9R, zcytor16/zcytor11, zcytor16/zcytor7, and other class II receptor subunits, as well as multimeric receptors including but not limited to zcytor16/CRF2-4/zcytor11 or zcytor16/CRF2-4/IL-10R.

Analysis of the tissue distribution of the mRNA corresponding zcytor16 cDNA showed that mRNA level was highest 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 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,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

102

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 zcytor16 polypeptides, monomers, homodimers, heterodimers and multimers described herein and/or 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 zcytor16 (Hughes C et al., J. Immunol 153: 3319-3325, 1994). Alternatively antibodies, such as monoclonal antibodies (MAb) to 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 zcytor16 soluble receptors or 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. 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 zcytor16 monomers, homodimers, heterodimers and multimers may also be useful to treat nephropathies such as

WO 02/077174

PCT/US02/08811

103

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 zcytor16, anti-soluble 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 zcytor16, anti-soluble 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 zcytor16 may also benefit diseases of the pancreas, kidney, pituitary and neuronal cells. IDDM, NIDDM, pancreatitis, and pancreatic carcinoma may benefit. 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 zcytor16-comprising soluble receptors of the present invention.

Soluble 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 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 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 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, Zcytor16 may be combined with a cognate ligand such as IL-TIF to comprise a 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 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 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.) "The Cytokine Handbook", 3rd Ed., p. 208-209). Soluble receptor/cytokine complexes for IL12 and CNTF display similar activities.

Moreover Inflammation is a protective response by an organism to fend off an invading agent. Inflammation is a cascading event that involves many cellular

and humoral mediators. On one hand, suppression of inflammatory responses can leave a host immunocompromised; however, if left unchecked, inflammation can lead to serious complications including chronic inflammatory diseases (e.g., rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and the like), septic shock and multiple organ failure. Importantly, these diverse disease states share common inflammatory mediators. The collective diseases that are characterized by inflammation have a large impact on human morbidity and mortality. Therefore it is clear that anti-inflammatory proteins, such as zcytor16, could have crucial therapeutic potential for a vast number of human and animal diseases, from asthma and allergy to autoimmunity and septic shock.

I. Arthritis

Arthritis, including osteoarthritis, rheumatoid arthritis, arthritic joints as a result of injury, and the like, are common inflammatory conditions which would benefit from the therapeutic use of anti-inflammatory proteins, such as zcytor16 polypeptides of the present invention. For Example, rheumatoid arthritis (RA) is a systemic disease that affects the entire body and is one of the most common forms of arthritis. It is characterized by the inflammation of the membrane lining the joint, which causes pain, stiffness, warmth, redness and swelling. Inflammatory cells release enzymes that may digest bone and cartilage. As a result of rheumatoid arthritis, the inflamed joint lining, the synovium, can invade and damage bone and cartilage leading to joint deterioration and severe pain amongst other physiologic effects. The involved joint can lose its shape and alignment, resulting in pain and loss of movement.

Rheumatoid arthritis (RA) is an immune-mediated disease particularly characterized by inflammation and subsequent tissue damage leading to severe disability and increased mortality. A variety of cytokines are produced locally in the rheumatoid joints. Numerous studies have demonstrated that IL-1 and TNF-alpha, two prototypic pro-inflammatory cytokines, play an important role in the mechanisms involved in synovial inflammation and in progressive joint destruction. Indeed, the administration of TNF-alpha and IL-1 inhibitors in patients with RA has led to a dramatic improvement of clinical and biological signs of inflammation and a reduction of radiological signs of bone erosion and cartilage destruction. However, despite these

WO 02/077174

PCT/US02/08811

106

encouraging results, a significant percentage of patients do not respond to these agents, suggesting that other mediators are also involved in the pathophysiology of arthritis (Gabay, *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2(2):135-149, 2002). One of those mediators could be IL-9 or IL-TIF, and as such a molecule that binds or inhibits IL-TIF, such as zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, could serve as a valuable therapeutic to reduce inflammation in rheumatoid arthritis, and other arthritic diseases.

There are several animal models for rheumatoid arthritis known in the art. For example, in the collagen-induced arthritis (CIA) model, mice develop chronic inflammatory arthritis that closely resembles human rheumatoid arthritis. Since CIA shares similar immunological and pathological features with RA, this makes it an ideal model for screening potential human anti-inflammatory compounds. The CIA model is a well-known model in mice that depends on both an immune response, and an inflammatory response, in order to occur. The immune response comprises the interaction of B-cells and CD4+ T-cells in response to collagen, which is given as antigen, and leads to the production of anti-collagen antibodies. The inflammatory phase is the result of tissue responses from mediators of inflammation, as a consequence of some of these antibodies cross-reacting to the mouse's native collagen and activating the complement cascade. An advantage in using the CIA model is that the basic mechanisms of pathogenesis are known. The relevant T-cell and B-cell epitopes on type II collagen have been identified, and various immunological (e.g., delayed-type hypersensitivity and anti-collagen antibody) and inflammatory (e.g., cytokines, chemokines, and matrix-degrading enzymes) parameters relating to immune-mediated arthritis have been determined, and can thus be used to assess test compound efficacy in the CIA model (Wooley, *Curr. Opin. Rheum.* 3:407-20, 1999; Williams et al., *Immunol.* 82:9784-788, 1992; Myers et al., *Life Sci.* 61:1861-78, 1997; and Wang et al., *Immunol.* 92:8955-959, 1995).

The administration of soluble zcytor16 comprising polypeptides, such as zcytor16-Fc4 or other zcytor16 soluble and fusion proteins to these CIA model mice was used to evaluate the use of zcytor16 to ameliorate symptoms and alter the course of disease. Since the ligand of zcytor16, IL-TIF, induces production of SAA, which is

WO 02/077174

PCT/US02/08811

107

implicated in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and zcytor16 was demonstrated to be able to inhibit IL-TIF and SAA activity *in vitro* and *in vivo*, the systemic or local administration of zcytor16 comprising polypeptides, such as zcytor16-Fc4 or other zcytor16 soluble and fusion proteins can potentially suppress the inflammatory response in RA. The injection of 10 ug zcytor16-Fc (three times a week for 4 weeks) significantly reduced the disease score (paw score, incident of inflammation or disease). Other potential therapeutics include Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, and the like.

2. Endotoxemia

Endotoxemia is a severe condition commonly resulting from infectious agents such as bacteria and other infectious disease agents, sepsis, toxic shock syndrome, or in immunocompromised patients subjected to opportunistic infections, and the like. Therapeutically useful of anti-inflammatory proteins, such as zcytor16 polypeptides of the present invention, could aid in preventing and treating endotoxemia in humans and animals. Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, could serve as a valuable therapeutic to reduce inflammation and pathological effects in endotoxemia.

Lipopolysaccharide (LPS) induced endotoxemia engages many of the proinflammatory mediators that produce pathological effects in the infectious diseases and LPS induced endotoxemia in rodents is a widely used and acceptable model for studying the pharmacological effects of potential pro-inflammatory or immunomodulating agents. LPS, produced in gram-negative bacteria, is a major causative agent in the pathogenesis of septic shock (Glausner et al., Lancet 338:732, 1991). A shock-like state can indeed be induced experimentally by a single injection of LPS into animals. Molecules produced by cells responding to LPS can target pathogens directly or indirectly. Although these biological responses protect the host against invading pathogens, they may also cause harm. Thus, massive stimulation of innate immunity, occurring as a result of severe Gram-negative bacterial infection, leads to excess production of cytokines and other molecules, and the development of a fatal syndrome, septic shock syndrome, which is characterized by fever, hypotension,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

108

disseminated intravascular coagulation, and multiple organ failure (Dumitru et al. Cell 103:1071-1083, 2000).

These toxic effects of LPS are mostly related to macrophage activation leading to the release of multiple inflammatory mediators. Among these mediators, 5 TNF appears to play a crucial role, as indicated by the prevention of LPS toxicity by the administration of neutralizing anti-TNF antibodies (Beutler et al., Science 229:869, 1985). It is well established that 1ug injection of *E. coli* LPS into a C57Bl/6 mouse will result in significant increases in circulating IL-6, TNF-alpha, IL-1, and acute phase proteins (for example, SAA) approximately 2 hours post injection. The toxicity of LPS 10 appears to be mediated by these cytokines as passive immunization against these mediators can result in decreased mortality (Beutler et al., Science 229:869, 1985). The potential immunointervention strategies for the prevention and/or treatment of septic shock include anti-TNF mAb, IL-1 receptor antagonist, LIF, IL-10, and G-CSF.

The administration of soluble zcytor16 comprising polypeptides, such as 15 zcytor16-Fc4 or other zcytor16 soluble and fusion proteins to these LPS-induced model was used to evaluate the use of zcytor16 to ameliorate symptoms and alter the course of LPS-induced disease. The model showed induction of IL-TIF by LPS injection and the potential treatment of disease by zcytor16 polypeptides. Since LPS induces the production of pro-inflammatory IL-TIF, SAA or other pro-inflammatory factors 20 possibly contributing to the pathology of endotoxemia, the neutralization of IL-TIF activity, SAA or other pro-inflammatory factors by its antagonist zcytor16 polypeptide can be used to reduce the symptoms of endotoxemia, such as seen in endotoxic shock. Other potential therapeutics include Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, 25 and the like.

3 Inflammatory Bowel Disease. IBD

In the United States approximately 500,000 people suffer from Inflammatory Bowel Disease (IBD) which can affect either colon and rectum (Ulcerative colitis) or both, small and large intestine (Crohn's Disease). The 30 pathogenesis of these diseases is unclear, but they involve chronic inflammation of the affected tissues. Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor

WO 02/077174

PCT/US02/08811

109

polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, could serve as a valuable therapeutic to reduce inflammation and pathological effects in IBD and related diseases.

Ulcerative colitis (UC) is an inflammatory disease of the large intestine, commonly called the colon, characterized by inflammation and ulceration of the mucosa or innermost lining of the colon. This inflammation causes the colon to empty frequently, resulting in diarrhea. Symptoms include loosening of the stool and associated abdominal cramping, fever and weight loss. Although the exact cause of UC is unknown, recent research suggests that the body's natural defenses are operating against proteins in the body which the body thinks are foreign (an "autoimmune reaction"). Perhaps because they resemble bacterial proteins in the gut, these proteins may either instigate or stimulate the inflammatory process that begins to destroy the lining of the colon. As the lining of the colon is destroyed, ulcers form releasing mucus, pus and blood. The disease usually begins in the rectal area and may eventually extend through the entire large bowel. Repeated episodes of inflammation lead to thickening of the wall of the intestine and rectum with scar tissue. Death of colon tissue or sepsis may occur with severe disease. The symptoms of ulcerative colitis vary in severity and their onset may be gradual or sudden. Attacks may be provoked by many factors, including respiratory infections or stress.

Although there is currently no cure for UC available, treatments are focused on suppressing the abnormal inflammatory process in the colon lining. Treatments including corticosteroids immunosuppressives (eg. azathioprine, mercaptopurine, and methotrexate) and aminosalicylates are available to treat the disease. However, the long-term use of immunosuppressives such as corticosteroids and azathioprine can result in serious side effects including thinning of bones, cataracts, infection, and liver and bone marrow effects. In the patients in whom current therapies are not successful, surgery is an option. The surgery involves the removal of the entire colon and the rectum.

There are several animal models that can partially mimic chronic ulcerative colitis. The most widely used model is the 2,4,6-trinitrobenesulfonic acid/ethanol (TNBS) induced colitis model, which induces chronic inflammation and ulceration in the colon. When TNBS is introduced into the colon of susceptible mice

WO 02/077174

PCT/US02/08811

110

via intra-rectal instillation, it induces T-cell mediated immune response in the colonic mucosa, in this case leading to a massive mucosal inflammation characterized by the dense infiltration of T-cells and macrophages throughout the entire wall of the large bowel. Moreover, this histopathologic picture is accompanied by the clinical picture of progressive weight loss (wasting), bloody diarrhea, rectal prolapse, and large bowel wall thickening (Neurath et al. *Intern. Rev. Immunol.* 19:51-62, 2000).

Another colitis model uses dextran sulfate sodium (DSS), which induces an acute colitis manifested by bloody diarrhea, weight loss, shortening of the colon and mucosal ulceration with neutrophil infiltration. DSS-induced colitis is characterized histologically by infiltration of inflammatory cells into the lamina propria, with lymphoid hyperplasia, focal crypt damage, and epithelial ulceration. These changes are thought to develop due to a toxic effect of DSS on the epithelium and by phagocytosis of lamina propria cells and production of TNF-alpha and IFN-gamma. Despite its common use, several issues regarding the mechanisms of DSS about the relevance to the human disease remain unresolved. DSS is regarded as a T cell-independent model because it is observed in T cell-deficient animals such as SCID mice.

The administration of soluble zcytor16 comprising polypeptides, such as zcytor16-Fc4 or other zcytor16 soluble and fusion proteins to these TNBS or DSS models can be used to evaluate the use of zcytor16 to ameliorate symptoms and alter the course of gastrointestinal disease. We observed the increased expression of IL-TIF in colon tissues of DSS-mice by RT-PCR, and the synergistic activity of IL-TIF with IL-1beta on intestinal cell lines. It indicates IL-TIF may play a role in the inflammatory response in colitis, and the neutralization of IL-TIF activity by administering zcytor16 polypeptides is a potential therapeutic approach for IBD. Other potential therapeutics include Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, and the like.

4. Psoriasis

Psoriasis is a chronic skin condition that affects more than seven million Americans. Psoriasis occurs when new skin cells grow abnormally, resulting in inflamed, swollen, and scaly patches of skin where the old skin has not shed quickly enough. Plaque psoriasis, the most common form, is characterized by inflamed patches

WO 02/077174

PCT/US02/08811

111

of skin ("lesions") topped with silvery white scales. Psoriasis may be limited to a few plaques or involve moderate to extensive areas of skin, appearing most commonly on the scalp, knees, elbows and trunk. Although it is highly visible, psoriasis is not a contagious disease. The pathogenesis of the diseases involves chronic inflammation of the affected tissues. Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, could serve as a valuable therapeutic to reduce inflammation and pathological effects in psoriasis, other inflammatory skin diseases, skin and mucosal allergies, and related diseases.

Psoriasis is a T-cell mediated inflammatory disorder of the skin that can cause considerable discomfort. It is a disease for which there is no cure and affects people of all ages. Psoriasis affects approximately two percent of the populations of European and North America. Although individuals with mild psoriasis can often control their disease with topical agents, more than one million patients worldwide require ultraviolet or systemic immunosuppressive therapy. Unfortunately, the inconvenience and risks of ultraviolet radiation and the toxicities of many therapies limit their long-term use. Moreover, patients usually have recurrence of psoriasis, and in some cases rebound, shortly after stopping immunosuppressive therapy.

IL-20 is a novel IL-10 homologue that causes neonatal lethality with skin abnormalities including aberrant epidermal differentiation in IL-20 transgenic mice (Blumberg H et al., *Cell* 104:9-19, 2001) IL-20 receptor is dramatically upregulated in psoriatic skin. Since IL-TIF shares a receptor subunit (zcytor11) with IL-20 receptor, and IL-TIF transgenic mice display a similar phenotype, it is possible that IL-TIF is also involved in the inflammatory skin diseases such as psoriasis. The administration of zcytor16 polypeptide, either subcutaneous or topically, may potential reduce the inflammation and symptom. Other potential therapeutics include Zcytor16 polypeptides, soluble zcytor11/CRF2-4 receptor polypeptides, or anti IL-TIF antibodies or binding partners, and the like.

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 inflammatory response. Within a related embodiment, antibodies or other agents that

WO 02/077174

PCT/US02/08811

112

specifically bind to Zcytor16 soluble receptors of the present invention can be used to detect circulating receptor polypeptides; conversely, 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 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 proper therapy.

Moreover, soluble 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 zcytor16 receptor or soluble zcytor16 heterodimeric and multimeric receptor polypeptides, such as soluble 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 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 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 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 zcytor16 receptors of the present invention could be

WO 02/077174

PCT/US02/08811

113

administered *in vivo* to detect Ligand-expressing solid tumors through a radio-imaging method known in the art.

Generally, the dosage of administered Zcytor16 (or 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 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 Zcytor16 polypeptide to a subject can be intravenous, intraarterial, intraperitoneal, intramuscular, subcutaneous, intrapleural, 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 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 Zcytor16 binding activity (Potts *et al.*, *Pharm. Biotechnol.* 10:213 (1997)).

A pharmaceutical composition comprising a protein, polypeptide, or peptide having 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).

For purposes of therapy, molecules having 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 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 Zcytor16 (or 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 be unilamellar or multilamellar, and liposomes can vary in size with diameters ranging from 0.02 μm to greater than 10 μm . 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 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 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 μm) are typically taken up by cells of the reticuloendothelial system, located principally in the liver and spleen, whereas liposomes larger than 3.0 μm 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

116

significantly reduced uptake by the reticuloendothelial system (Allen *et al.*, *Biochim. 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 04-244,018; Kato *et al.*, *Biol. Pharm. Bull.* 16:960 (1993)). These formulations were prepared by mixing soybean phosphatidylcholine, α -tocopherol, and ethoxylated 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 galactosylipid 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 galactosylipid 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

117

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)).

5 Polypeptides having 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),
10 Wassef *et al.*, *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987)). As noted above, therapeutically useful liposomes may contain a variety of components. For example, liposomes may comprise lipid derivatives of poly(ethylene glycol) (Allen *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta* 1150:9 (1993)).

15 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
20 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,
25 *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 Zcytor16 activity such as zcytor16 monomeric,
30 homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptors, and Zcytor16 antagonists,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

118

for example anti-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*, 5th Edition (Lea & Febiger 1990), Gennaro (ed.), *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19th 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 Zcytor16 extracellular domain, e.g., zcytor16 monomeric, homodimeric, heterodimeric or multimeric soluble receptors, or a Zcytor16 antagonist (e.g., an antibody or antibody fragment that binds a 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 Zcytor16 composition is contraindicated in patients with known hypersensitivity to Zcytor16.

13. Therapeutic Uses of Zcytor16 Nucleotide Sequences

The present invention includes the use of *Zcytor16* nucleotide sequences to provide Zcytor16 to a subject in need of such treatment. In addition, a therapeutic expression vector can be provided that inhibits *Zcytor16* gene expression, such as an anti-sense molecule, a ribozyme, or an external guide sequence molecule.

There are numerous approaches to introduce a *Zcytor16* gene to a subject, including the use of recombinant host cells that express *Zcytor16*, delivery of naked nucleic acid encoding Zcytor16, use of a cationic lipid carrier with a nucleic acid molecule that encodes Zcytor16, and the use of viruses that express *Zcytor16*, such as recombinant retroviruses, recombinant adeno-associated viruses, recombinant adenoviruses, and recombinant Herpes simplex viruses (see, for example, Mulligan,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

119

Science 260:926 (1993), Rosenberg *et al.*, *Science* 242:1575 (1988), LaSalle *et al.*, *Science* 259:988 (1993), Wolff *et al.*, *Science* 247:1465 (1990), Breakfield and Deluca, *The New Biologist* 3:203 (1991)). In an *ex vivo* approach, for example, cells are isolated from a subject, transfected with a vector that expresses a *Zcytor16* gene, and then transplanted into the subject.

In order to effect expression of a *Zcytor16* gene, an expression vector is constructed in which a nucleotide sequence encoding a *Zcytor16* gene is operably linked to a core promoter, and optionally a regulatory element, to control gene transcription. The general requirements of an expression vector are described above.

Alternatively, a *Zcytor16* gene can be delivered using recombinant viral vectors, including for example, adenoviral vectors (*e.g.*, Kass-Eisler *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:11498 (1993), Kolls *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:215 (1994), Li *et al.*, *Hum. Gene Ther.* 4:403 (1993), Vincent *et al.*, *Nat. Genet.* 5:130 (1993), and Zabner *et al.*, *Cell* 75:207 (1993)), adenovirus-associated viral vectors (Flotte *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 90:10613 (1993)), alphaviruses such as Semliki Forest Virus and Sindbis Virus (Hertz and Huang, *J. Vir.* 66:857 (1992), Raju and Huang, *J. Vir.* 65:2501 (1991), and Xiong *et al.*, *Science* 243:1188 (1989)), herpes viral vectors (*e.g.*, U.S. Patent Nos. 4,769,331, 4,859,587, 5,288,641 and 5,328,688), parvovirus vectors (Koering *et al.*, *Hum. Gene Therap.* 5:457 (1994)), pox virus vectors (Ozaki *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 193:653 (1993), Panicali and Paoletti, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 79:4927 (1982)), pox viruses, such as canary pox virus or vaccinia virus (Fisher-Hoch *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86:317 (1989), and Flexner *et al.*, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 569:86 (1989)), and retroviruses (*e.g.*, Baba *et al.*, *J. Neurosurg* 79:729 (1993), Ram *et al.*, *Cancer Res.* 53:83 (1993), Takamiya *et al.*, *J. Neurosci. Res* 33:493 (1992), Vile and Hart, *Cancer Res.* 53:962 (1993), Vile and Hart, *Cancer Res.* 53:3860 (1993), and Anderson *et al.*, U.S. Patent No. 5,399,346). Within various embodiments, either the viral vector itself, or a viral particle which contains the viral vector may be utilized in the methods and compositions described below.

As an illustration of one system, adenovirus, a double-stranded DNA virus, is a well-characterized gene transfer vector for delivery of a heterologous nucleic acid molecule (for a review, see Becker *et al.*, *Meth. Cell Biol.* 43:161 (1994); Douglas

WO 02/077174

PCT/US02/08811

120

and Curiel, *Science & Medicine* 4:44 (1997)). The adenovirus system offers several advantages including: (i) the ability to accommodate relatively large DNA inserts, (ii) the ability to be grown to high-titer, (iii) the ability to infect a broad range of mammalian cell types, and (iv) the ability to be used with many different promoters including ubiquitous, tissue specific, and regulatable promoters. In addition, adenoviruses can be administered by intravenous injection, because the viruses are stable in the bloodstream.

Using adenovirus vectors where portions of the adenovirus genome are deleted, inserts are incorporated into the viral DNA by direct ligation or by homologous recombination with a co-transfected plasmid. In an exemplary system, the essential E1 gene is deleted from the viral vector, and the virus will not replicate unless the E1 gene is provided by the host cell. When intravenously administered to intact animals, adenovirus primarily targets the liver. Although an adenoviral delivery system with an E1 gene deletion cannot replicate in the host cells, the host's tissue will express and process an encoded heterologous protein. Host cells will also secrete the heterologous protein if the corresponding gene includes a secretory signal sequence. Secreted proteins will enter the circulation from tissue that expresses the heterologous gene (*e.g.*, the highly vascularized liver).

Moreover, adenoviral vectors containing various deletions of viral genes can be used to reduce or eliminate immune responses to the vector. Such adenoviruses are E1-deleted, and in addition, contain deletions of E2A or E4 (Lusky *et al.*, *J. Virol.* 72:2022 (1998); Raper *et al.*, *Human Gene Therapy* 9:671 (1998)). The deletion of E2b has also been reported to reduce immune responses (Amalfitano *et al.*, *J. Virol.* 72:926 (1998)). By deleting the entire adenovirus genome, very large inserts of heterologous DNA can be accommodated. Generation of so called "gutless" adenoviruses, where all viral genes are deleted, are particularly advantageous for insertion of large inserts of heterologous DNA (for a review, see Yeh. and Perricaudet, *FASEB J.* 11:615 (1997)).

High titer stocks of recombinant viruses capable of expressing a therapeutic gene can be obtained from infected mammalian cells using standard methods. For example, recombinant herpes simplex virus can be prepared in Vero cells, as described by Brandt *et al.*, *J. Gen. Virol.* 72:2043 (1991), Herold *et al.*, *J. Gen.*

WO 02/077174

PCT/US02/08811

121

Viol. 75:1211 (1994), Visalli and Brandt, *Virology* 185:419 (1991), Grau *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 30:2474 (1989), Brandt *et al.*, *J. Virol. Meth.* 36:209 (1992), and by Brown and MacLean (eds.), *HSV Virus Protocols* (Humana Press 1997).

Alternatively, an expression vector comprising a *Zcytor16* gene can be introduced into a subject's cells by lipofection *in vivo* using liposomes. Synthetic cationic lipids can be used to prepare liposomes for *in vivo* transfection of a gene encoding a marker (Felgner *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 84:7413 (1987); Mackey *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 85:8027 (1988)). The use of lipofection to introduce exogenous genes into specific organs *in vivo* has certain practical advantages. Liposomes can be used to direct transfection to particular cell types, which is particularly advantageous in a tissue with cellular heterogeneity, such as the pancreas, liver, kidney, and brain. Lipids may be chemically coupled to other molecules for the purpose of targeting. Targeted peptides (*e.g.*, hormones or neurotransmitters), proteins such as antibodies, or non-peptide molecules can be coupled to liposomes chemically.

Electroporation is another alternative mode of administration. For example, Aihara and Miyazaki, *Nature Biotechnology* 16:867 (1998), have demonstrated the use of *in vivo* electroporation for gene transfer into muscle.

In an alternative approach to gene therapy, a therapeutic gene may encode a *Zcytor16* anti-sense RNA that inhibits the expression of *Zcytor16*. Suitable sequences for anti-sense molecules can be derived from the nucleotide sequences of *Zcytor16* disclosed herein.

Alternatively, an expression vector can be constructed in which a regulatory element is operably linked to a nucleotide sequence that encodes a ribozyme. Ribozymes can be designed to express endonuclease activity that is directed to a certain target sequence in a mRNA molecule (see, for example, Draper and Macejak, U.S. Patent No. 5,496,698, McSwiggen, U.S. Patent No. 5,525,468, Chowrira and McSwiggen, U.S. Patent No. 5,631,359, and Robertson and Goldberg, U.S. Patent No. 5,225,337). In the context of the present invention, ribozymes include nucleotide sequences that bind with *Zcytor16* mRNA.

In another approach, expression vectors can be constructed in which a regulatory element directs the production of RNA transcripts capable of promoting RNase

WO 02/077174

PCT/US02/08811

122

P-mediated cleavage of mRNA molecules that encode a *Zcytor16* gene. According to this approach, an external guide sequence can be constructed for directing the endogenous ribozyme, RNase P, to a particular species of intracellular mRNA, which is subsequently cleaved by the cellular ribozyme (see, for example, Altman *et al.*, U.S. Patent No. 5,168,053, Yuan *et al.*, *Science* 263:1269 (1994), Pace *et al.*, international publication No. WO 96/18733, George *et al.*, international publication No. WO 96/21731, and Werner *et al.*, international publication No. WO 97/33991). For example, the external guide sequence can comprise a ten to fifteen nucleotide sequence complementary to *Zcytor16* mRNA, and a 3'-NCCA nucleotide sequence, wherein N is preferably a purine.

The external guide sequence transcripts bind to the targeted mRNA species by the formation of base pairs between the mRNA and the complementary external guide sequences, thus promoting cleavage of mRNA by RNase P at the nucleotide located at the 5'-side of the base-paired region.

In general, the dosage of a composition comprising a therapeutic vector having a *Zcytor16* nucleotide sequence, such as a recombinant virus, will vary depending upon such factors as the subject's age, weight, height, sex, general medical condition and previous medical history. Suitable routes of administration of therapeutic vectors include intravenous injection, intraarterial injection, intraperitoneal injection, intramuscular injection, intratumoral injection, and injection into a cavity that contains a tumor. As an illustration, Horton *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 96:1553 (1999), demonstrated that intramuscular injection of plasmid DNA encoding interferon- α produces potent antitumor effects on primary and metastatic tumors in a murine model.

A composition comprising viral vectors, non-viral vectors, or a combination of viral and non-viral vectors of the present invention can be formulated according to known methods to prepare pharmaceutically useful compositions, whereby vectors or viruses are combined in a mixture with a pharmaceutically acceptable carrier. As noted above, a composition, such as phosphate-buffered saline is said to be a "pharmaceutically acceptable carrier" if its administration can be tolerated by a recipient subject. Other suitable carriers are well-known to those in the art (see, for example, Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 19th Ed. (Mack Publishing Co. 1995),

WO 02/077174

PCT/US02/08811

123

and Gilman's *the Pharmacological Basis of Therapeutics*, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985)).

For purposes of therapy, a therapeutic gene expression vector, or a recombinant virus comprising such a vector, and a pharmaceutically acceptable carrier are administered to a subject in a therapeutically effective amount. A combination of an expression vector (or virus) 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 subject. For example, an agent used to treat inflammation is physiologically significant if its presence alleviates the inflammatory response.

When the subject treated with a therapeutic gene expression vector or a recombinant virus is a human, then the therapy is preferably somatic cell gene therapy. That is, the preferred treatment of a human with a therapeutic gene expression vector or a recombinant virus does not entail introducing into cells a nucleic acid molecule that can form part of a human germ line and be passed onto successive generations (*i.e.*, human germ line gene therapy).

14. Production of Transgenic Mice

Transgenic mice can be engineered to over-express the *Zcytor16* gene in all tissues or under the control of a tissue-specific or tissue-preferred regulatory element. These over-producers of 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 Zcytor16. Transgenic mice that over-express Zcytor16 also provide model bioreactors for production of Zcytor16, such as soluble 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), Monastorsky and Robl (eds.), *Strategies in Transgenic Animal Science* (ASM Press 1995), and Abbud and Nilson, "Recombinant Protein Expression in Transgenic Mice,"

WO 02/077174

PCT/US02/08811

124

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 *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. 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% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 37°C. The eggs are then stored in a 37°C/5% CO₂ incubator until microinjection.

Ten to twenty micrograms of plasmid DNA containing a *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 *Zcytor16* encoding sequences can encode a polypeptide comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

Plasmid DNA is microinjected into harvested eggs contained in a drop of W640 medium overlaid by warm, CO₂-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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

125

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% CO₂ 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 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.

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.

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.

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.

Genomic DNA is prepared from the tail snips using, for example, a QIAGEN DNEASY kit following the manufacturer's instructions. Genomic DNA is

WO 02/077174

PCT/US02/08811

126

analyzed by PCR using primers designed to amplify a *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
5 pups are born and weaned, the sexes are separated, and their tails snipped for genotyping.

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
10 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 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.
15 The excised liver section is transferred to a 14 ml polypropylene round bottom tube and 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 *Zcytor16* mRNA is
20 examined for each transgenic mouse using an RNA solution hybridization assay or polymerase chain reaction.

In addition to producing transgenic mice that over-express *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
25 of *Zcytor16*. As discussed above, *Zcytor16* gene expression can be inhibited using anti-sense genes, ribozyme genes, or external guide sequence genes. To produce transgenic mice that under-express the *Zcytor16* gene, such inhibitory sequences are targeted to *Zcytor16* mRNA, including the fragments or the entire 5' UTR, coding region, and 3' UTR, e.g., as shown in SEQ ID NO:37 and described herein. Methods for producing
30 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 Cultured Cells

WO 02/077174

PCT/US02/08811

127

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 *Zcytor16* gene expression is to generate mice having at least one normal *Zcytor16* allele replaced by a nonfunctional *Zcytor16* gene. One method of designing a nonfunctional *Zcytor16* gene is to insert another gene, such as a selectable marker gene, within a nucleic acid molecule that encodes *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*, 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)).

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 *zcytor16* can be used as standards or as "unknowns" for testing purposes. For example, *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 *zcytor16* is the gene to be expressed; for determining the restriction endonuclease cleavage sites of the polynucleotides; determining mRNA and DNA localization of *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.

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 *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*. *Zcytor16*

WO 02/077174

PCT/US02/08811

128

polypeptides can also be used to teach analytical skills such as mass 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 zcytor16 can be given to the student 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 zcytor16 would be unique unto itself.

Moreover, since zcytor16 has a tissue-specific expression and is a polypeptide with a class II cytokine receptor structure and a distinct chromosomal localization, and expressin pattern, activity can be measured using proliferation assays; luciferase and binding assays described herein. Moreover, expression of zcytor16 polynucleotides and polypeptides in lymphoid and other tissues can be analyzed in order to train students in the use of diagnostic and tissue-specific identification and methods. Moreover zcytor16 polynucleotides can be used to train students on the use of chromosomal detection and diagnostic methods, since it's locus is known. Moreover, students can be specifically trained and educated about human chromosome I, and more specifically the locus 6q23-q24 wherein the zcytor16 gene is localized. 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 antibody binding affinities, tissue specificity, and the like, between zcytor16 and other cytokine receptor polypeptides in the art.

The antibodies which bind specifically to zcytor16 can be used as a teaching aid to instruct students how to prepare affinity chromatography columns to purify zcytor16, cloning and sequencing the polynucleotide that encodes an antibody and thus as a practicum for teaching a student how to design humanized antibodies. Moreover, antibodies which bind specifically to zcytor16 can be used as a teaching aid for use in detection e.g., of activated CD91+ cells, cell sorting, or ovarian cancer tissue

WO 02/077174

PCT/US02/08811

129

using histological, and *in situ* methods amongst others known in the art. The zcytor16 gene, polypeptide or antibody would then be packaged by 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, each gene and protein creates unique challenges and learning experiences for students in a lab practicum. Such educational kits containing the zcytor16 gene, polypeptide or antibody are considered within the scope of the present invention.

15. *Therapeutic Uses of Antibodies or Polypeptides that bind to IL-TIF or have IL-TIF antagonizing Activity*

IL-TIF polynucleotides are expressed in T-cells, activated T- and B-cells, and lymphoid tissue. The human IL-TIF nucleotide sequence is represented in SEQ ID NO:14.

Analysis of SEQ ID NO:14 reveals that there are two possible initiation Methionine residues for a IL-TIF cytokine polypeptide translated therefrom. The two deduced IL-TIF polypeptide amino acid sequences are shown in SEQ ID NO:15 (a 179 amino acid polypeptide having the initiating Met at nucleotide 21 in SEQ ID NO:14 a 167 amino acid polypeptide having the initiating Met at nucleotide 57 in SEQ ID NO:14). Although both of these sequences encode a IL-TIF polypeptide, based on similarity of the IL-TIF sequence to IL-10 and other cytokines, and the presence of a strong signal sequence, amino acid 34 (Ala) to 179 (Ile) of SEQ ID NO:15 encodes a fully functional secreted IL-TIF cytokine polypeptide. N-terminal sequence analysis shows that the mature start at residue 34 (Ala) of SEQ ID NO:15.

In general, cytokines are predicted to have a four-alpha helix structure, with the 1st and 4th helices being most important in ligand-receptor interactions. The 1st and 4th helices are more highly conserved among members of the family. Referring to the human IL-TIF amino acid sequence shown in SEQ ID NO:15, alignment of human IL-TIF, human IL-10, human zcyto10 (WO US98/25228), and human Human MDA7 (Genbank Accession No. Q13007) amino acid sequences suggests that IL-TIF helix A is defined by amino acid residues 53 (Thr) to 65 (Leu) of SEQ ID NO:15 ; helix B by amino acid residues 92 (Met) to 103 (Val) of SEQ ID NO:15 ; helix C by amino

WO 02/077174

PCT/US02/08811

130

acid residues 115 (Met) to 128 (Arg) of SEQ ID NO:15 ; and helix D by amino acid residues 161 (Ile) to 174 (Leu) of SEQ ID NO:15 . Structural analysis suggests that the A/B loop is long, the B/C loop is short and the C/D loop is long. This loop structure results in an up-up-down-down helical organization. Four cysteine residues are conserved between IL-10 and IL-TIF corresponding to amino acid residues 20, 40, 89 and 132 of SEQ ID NO:15 . Consistent cysteine placement is further confirmation of the four-helical-bundle structure.

The corresponding polynucleotides encoding the IL-TIF polypeptide regions, domains, motifs, residues and sequences described herein are as shown in SEQ ID NO:1. Moreover, the corresponding IL-TIF polypeptide regions, domains, motifs, residues and sequences described herein are also as shown in SEQ ID NO:15.

Four-helical bundle cytokines are also grouped by the length of their component helices. "Long-helix" form cytokines generally consist of between 24-30 residue helices and include IL-6, ciliary neurotrophic factor (CNTF), leukemia inhibitory factor (LIF) and human growth hormone (hGH). "Short-helix" form cytokines generally consist of between 18-21 residue helices and include IL-2, IL-4 and GM-CSF. IL-TIF is believed to be a new member of the short-helix form cytokine group. Studies using CNTF and IL-6 demonstrated that a CNTF helix can be exchanged for the equivalent helix in IL-6, conferring CTNF-binding properties to the chimera. Thus, it appears that functional domains of four-helical cytokines determined on the basis of structural homology, irrespective of sequence identity, and can maintain functional integrity in a chimera (Kallen et al., *J. Biol. Chem.*, 274:11859-11867, 1999). Using similar methods, putative regions conferring receptor binding specificity in IL-TIF comprise the regions of amino acid residues of 34 (Ala) to 179 (Ile) of SEQ ID NO:15 that include: residues 65-72, residues 97-103, and residues 133-152. These regions will be useful for preparing chimeric molecules, particularly with other short-helix form cytokines to determine and modulate receptor binding specificity.

The present invention also provides polypeptide fragments or peptides comprising an epitope-bearing portion of a IL-TIF 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

131

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. Hopp/Woods hydrophilicity profiles can be used to determine regions that have the most antigenic potential (Hopp et al., 1981, *ibid.* and Hopp, 1986, *ibid.*). In IL-TIF these regions include: (1) amino acid number 41 (Arg) to amino acid number 46 (Asn) of SEQ ID NO:15 ; (2) amino acid number 133 (His) to amino acid number 138 (Asp) of SEQ ID NO:15 ; (3) amino acid number 146 (Gln) to amino acid number 151 (Thr) of SEQ ID NO:15 ; (4) amino acid number 149 (Lys) to amino acid number 154 (Lys) of SEQ ID NO:15 ; and (5) amino acid number 157 (Glu) to amino acid number 162 (Lys) of SEQ ID NO:15. Moreover, IL-TIF antigenic epitopes as predicted by a Jameson-Wolf plot, e.g., using DNASTAR Protean program (DNASTAR, Inc., Madison, WI) serve as preferred antigens, and are readily determined by one of skill in the art. Such antigens include (1) amino acid number 40 (Cys) to amino acid number 47 (Phe) of SEQ ID NO:15; (2) amino acid number 64 (Ser) or 67 (Asp) to amino acid number 71 (Asp) or 74 (Leu) of SEQ ID NO:15; (3) amino acid number 106 (Pro) or 107 (Gln) to amino acid number 112 (Gln) or 115 (Met) of SEQ ID NO:15 ; (4) amino acid number 125 (Leu) to amino acid number 130 (Ser) or 131 (Thr) of SEQ ID NO:15 ; (5) amino acid number 135 (Glu) to amino acid number 138 (Asp) or 140 (His) of SEQ ID NO:15; and (6) amino acid number 146 (Gln) or 156 (Gly) to amino acid number 159 (Gly) of SEQ ID NO:15.

Antigenic epitope-bearing peptides and polypeptides preferably contain at least four to ten amino acids, at least ten to fifteen amino acids, or about 15 to about 30 amino acids of 34 (Ala) to 179 (Ile) of SEQ ID NO:15 . Such epitope-bearing

WO 02/077174

PCT/US02/08811

132

peptides and polypeptides can be produced by fragmenting a IL-TIF 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 (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).

IL-TIF polypeptides can also be used to prepare antibodies that bind to IL-TIF epitopes, peptides or polypeptides. The IL-TIF polypeptide or a fragment thereof serves as an antigen (immunogen) to inoculate an animal and elicit an immune response. Such antibodies can be used to block the biological action of pro-inflammatory IL-TIF and are useful as anti-inflammatory therapeutics in a variety of diseases as described herein. One of skill in the art would recognize that antigenic, epitope-bearing polypeptides contain a sequence of at least 6, preferably at least 9, and more preferably at least 15 to about 30 contiguous amino acid residues of a IL-TIF polypeptide (e.g., from 34 (Ala) to 179 (Ile) of SEQ ID NO:15). Polypeptides comprising a larger portion of a IL-TIF polypeptide, i.e., from 30 to 100 residues up to the entire length of the amino acid sequence of SEQ ID NO:15 are included. Antigens or immunogenic epitopes can also include attached tags, adjuvants and carriers, as described herein. Suitable antigens include the IL-TIF polypeptide encoded by 34 (Ala) to 179 (Ile) of SEQ ID NO:15 from amino acid number 34 to amino acid number 179, or a contiguous 9 to 144, or 30 to 144 amino acid fragment thereof. Other suitable antigens include polypeptides comprising isolated helices and fragments of the four-helical-bundle structure, as described herein. Preferred peptides to use as antigens are hydrophilic peptides such as those predicted by one of skill in the art from a

WO 02/077174

PCT/US02/08811

133

hydrophobicity plot, as described herein. Moreover, IL-TIF antigenic epitopes as predicted by a Jameson-Wolf plot, e.g., using DNASTAR Protean program (DNASTAR, Inc., Madison, WI) serve as preferred antigens, and are readily determined by one of skill in the art, and described herein.

5 Antibodies from an immune response generated by inoculation of an animal with these antigens (or immunogens) can be isolated and purified as described herein. Methods for preparing and isolating polyclonal and monoclonal antibodies are well known in the art. See, for example, Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995; Sambrook
10 et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, NY, 1989; and Hurrell, J. G. R., Ed., Monoclonal Hybridoma Antibodies: Techniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982.

 As would be evident to one of ordinary skill in the art, polyclonal antibodies can be generated from inoculating a variety of warm-blooded animals such
15 as horses, cows, goats, sheep, dogs, chickens, rabbits, mice, and rats with a IL-TIF polypeptide or a fragment thereof. The immunogenicity of a IL-TIF polypeptide may be increased through 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 IL-TIF or a portion thereof with an
20 immunoglobulin polypeptide or with maltose binding protein. The polypeptide immunogen may be a full-length molecule or a portion thereof. If the polypeptide portion is "hapten-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.

25 As used herein, the term "antibodies" includes polyclonal antibodies, affinity-purified polyclonal antibodies, monoclonal antibodies, and antigen-binding fragments, such as F(ab')₂ and Fab proteolytic fragments. Genetically engineered intact antibodies or fragments, such as chimeric antibodies, Fv fragments, single chain antibodies and the like, as well as synthetic antigen-binding peptides and polypeptides,
30 are also included. Non-human antibodies may be humanized by grafting non-human CDRs onto human framework and constant regions, or by incorporating the entire non-

WO 02/077174

PCT/US02/08811

134

human variable domains (optionally "cloaking" them with a human-like surface by replacement of exposed residues, wherein the result is a "veneered" antibody). In some instances, humanized antibodies may retain non-human residues within the human variable region framework domains to enhance proper binding characteristics. Through
5 humanizing antibodies, biological half-life may be increased, and the potential for adverse immune reactions upon administration to humans is reduced. Moreover, human antibodies can be produced in transgenic, non-human animals that have been engineered to contain human immunoglobulin genes as disclosed in WIPO Publication WO 98/24893. It is preferred that the endogenous immunoglobulin genes in these
10 animals be inactivated or eliminated, such as by homologous recombination.

Antibodies are considered to be specifically binding if: 1) they exhibit a threshold level of binding activity, and 2) they do not significantly cross-react with related polypeptide molecules. A threshold level of binding is determined if anti-IL-TIF antibodies herein bind to a IL-TIF polypeptide, peptide or epitope with an affinity
15 at least 10-fold greater than the binding affinity to control (non-IL-TIF) polypeptide. It is preferred that the antibodies exhibit a binding affinity (K_d) 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, G., Ann.
20 NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Whether anti-IL-TIF antibodies do not significantly cross-react with related polypeptide molecules is shown, for example, by the antibody detecting IL-TIF polypeptide but not known related polypeptides using a standard Western blot analysis (Ausubel et al., ibid.). Examples of known related polypeptides are those disclosed in
25 the prior art, such as known orthologs, and paralogs, and similar known members of a protein family. Screening can also be done using non-human IL-TIF, and IL-TIF mutant polypeptides. Moreover, antibodies can be "screened against" known related polypeptides, to isolate a population that specifically binds to the IL-TIF polypeptides. For example, antibodies raised to IL-TIF are adsorbed to related polypeptides adhered
30 to insoluble matrix; antibodies specific to IL-TIF will flow through the matrix under the

WO 02/077174

PCT/US02/08811

135

proper buffer conditions. Screening allows isolation of polyclonal and monoclonal antibodies non-crossreactive to known closely related polypeptides (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988; Current Protocols in Immunology, Cooligan, et al. (eds.), National Institutes of Health, John Wiley and Sons, Inc., 1995). Screening and isolation of specific antibodies is well known in the art. See, Fundamental Immunology, Paul (eds.), Raven Press, 1993; Getzoff et al., *Adv. in Immunol.* 43: 1-98, 1988; Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Goding, J.W. (eds.), Academic Press Ltd., 1996; Benjamin et al., *Ann. Rev. Immunol.* 2: 67-101, 1984. Specifically binding anti-IL-TIF antibodies can be detected by a number of methods in the art, and disclosed below.

A variety of assays known to those skilled in the art can be utilized to detect antibodies which bind to IL-TIF proteins or polypeptides. Exemplary assays are described in detail in Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Lane (Eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988. Representative examples of such assays include: concurrent immunoelectrophoresis, radioimmunoassay, radioimmuno-precipitation, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), dot blot or Western blot assay, inhibition or competition assay, and sandwich assay. In addition, antibodies can be screened for binding to wild-type versus mutant IL-TIF protein or polypeptide.

Alternative techniques for generating or selecting antibodies useful herein include *in vitro* exposure of lymphocytes to IL-TIF protein or peptide, and selection of antibody display libraries in phage or similar vectors (for instance, through use of immobilized or labeled IL-TIF protein or peptide). Genes encoding polypeptides having potential IL-TIF 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 (Ladner et al., US Patent NO. 5,223,409; Ladner et al., US Patent NO.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

136

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 IL-TIF sequences disclosed herein to identify proteins which bind to IL-TIF. These "binding polypeptides" which interact with IL-TIF polypeptides can be used for tagging cells; 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 ligand and receptor, or viral binding to a receptor. The binding polypeptides can also be used for diagnostic assays for determining circulating levels of IL-TIF polypeptides; for detecting or quantitating soluble IL-TIF polypeptides as marker of underlying pathology or disease. These binding polypeptides can also act as IL-TIF "antagonists" to block IL-TIF binding and signal transduction *in vitro* and *in vivo*. These anti-IL-TIF binding polypeptides would be useful for inhibiting IL-TIF activity or protein-binding. Such anti-IL-TIF binding polypeptides can be used to block the biological action of pro-inflammatory IL-TIF and are useful as anti-inflammatory therapeutics in a variety of diseases as described herein.

Antibodies to IL-TIF may be used for tagging cells that express IL-TIF; for isolating IL-TIF by affinity purification; for diagnostic assays for determining circulating levels of IL-TIF polypeptides; for detecting or quantitating soluble IL-TIF as a marker of underlying pathology or disease; in analytical methods employing FACS; for screening expression libraries; for generating anti-idiotypic antibodies; and as neutralizing antibodies or as antagonists to block IL-TIF activity *in vitro* and *in vivo*. Suitable direct tags or labels include radionuclides, enzymes, substrates, cofactors, inhibitors, fluorescent 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*

WO 02/077174

PCT/US02/08811

137

vivo diagnostic or therapeutic applications. Moreover, antibodies to IL-TIF or fragments thereof may be used *in vitro* to detect denatured IL-TIF or fragments thereof in assays, for example, Western Blots or other assays known in the art.

Antibodies or polypeptides herein can also be directly or indirectly
5 conjugated to drugs, toxins, radionuclides and the like, and these conjugates used for *in vivo* diagnostic or therapeutic applications. For instance, polypeptides or antibodies of the present invention can be used to identify or treat tissues or organs that express a corresponding anti-complementary molecule (receptor or antigen, respectively, for instance). More specifically, anti-IL-TIF antibodies, or bioactive fragments or portions
10 thereof, can be coupled to detectable or cytotoxic molecules and delivered to a mammal having cells, tissues or organs that express the anti-complementary molecule.

Suitable detectable molecules may be directly or indirectly attached to the polypeptide or antibody, and 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
15 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 indirectly attached through means of a chelating moiety, for instance). Polypeptides or antibodies may also be conjugated to cytotoxic
20 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/ anticomplementary pair, where the other member is bound to the polypeptide or antibody portion. For these purposes, biotin/streptavidin is an
25 exemplary complementary/ anticomplementary pair.

In another embodiment, polypeptide-toxin fusion proteins or antibody-toxin fusion proteins can be used for targeted cell or tissue inhibition or ablation (for instance, to treat cancer cells or tissues). Alternatively, if the polypeptide has multiple functional domains (i.e., an activation domain or a receptor binding domain, plus a
30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

138

to a cell or tissue type of interest. In instances where the domain only fusion protein 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. Such cytokine toxin fusion proteins can be used for *in vivo* killing of target tissues.

In another embodiment, IL-TIF cytokine fusion proteins or antibody-cytokine fusion proteins can be used for *in vivo* killing of target tissues (for example, leukemia, lymphoma, lung cancer, colon cancer, melanoma, pancreatic cancer, ovarian cancer, blood and bone marrow cancers, or other cancers wherein IL-TIF receptors are expressed) (See, generally, Hornick et al., Blood 89:4437-47, 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 IL-TIF polypeptides or anti-IL-TIF antibodies target an undesirable cell or tissue (i.e., a tumor or a leukemia), and the fused cytokine mediated improved target cell lysis by effector cells. Suitable cytokines for this purpose include interleukin 2 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), for instance.

In yet another embodiment, if the IL-TIF polypeptide or anti-IL-TIF antibody targets vascular cells or tissues, such polypeptide or antibody may be conjugated with a radionuclide, and particularly with a beta-emitting radionuclide, to reduce restenosis. Such therapeutic approaches pose less danger to clinicians who administer the radioactive therapy. For instance, iridium-192 impregnated ribbons placed into stented vessels of patients until the required radiation dose was delivered showed decreased tissue growth in the vessel and greater luminal diameter than the control group, which received placebo ribbons. Further, revascularisation and stent thrombosis were significantly lower in the treatment group. Similar results are predicted with targeting of a bioactive conjugate containing a radionuclide, as described herein.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

139

The bioactive polypeptide or antibody conjugates described herein can be delivered intravenously, intraarterially or intraductally, or may be introduced locally at the intended site of action.

Moreover, Inflammation is a protective response by an organism to fend
5 off an invading agent. Inflammation is a cascading event that involves many cellular and humoral mediators. On one hand, suppression of inflammatory responses can leave a host immunocompromised; however, if left unchecked, inflammation can lead to serious complications including chronic inflammatory diseases (e.g., rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease and the like), septic shock and
10 multiple organ failure. Importantly, these diverse disease states share common inflammatory mediators. The collective diseases that are characterized by inflammation have a large impact on human morbidity and mortality. Therefore it is clear that anti-inflammatory antibodies and binding polypeptides, such as anti-IL-TIF antibodies and binding polypeptides described herein, could have crucial therapeutic potential for a
15 vast number of human and animal diseases, from asthma and allergy to autoimmunity and septic shock. As such, use of anti-inflammatory anti IL-TIF antibodies and binding polypeptides described herein can be used therapeutically as IL-TIF antagonists described herein, particularly in diseases such as arthritis, endotoxemia, inflammatory bowel disease, psoriasis, related disease and the like.

20

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:2 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to
25 231; (d) amino acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231; and (h) amino acid residues 1 to 231. In one embodiment, the isolated polypeptide disclosed above comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to 231; (d) amino
30 acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231; and (h) amino acid residues 1 to 231. In

WO 02/077174

PCT/US02/08811

140

another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above consists of an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to 231; (d) amino acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231; and (h) amino acid residues 1 to 231.

Within a second aspect the present invention provides an isolated polypeptide, comprising an amino acid sequence that is at least 70% identical to a reference amino acid sequence of SEQ ID NO:2 selected from the group consisting of: (a) amino acid residues 28 to 127; (b) amino acid residues 132 to 231; (c) amino acid residues 28 to 231; (d) amino acid residues 23 to 230; (e) amino acid residues 23 to 231; (f) amino acid residues 22 to 230; (g) amino acid residues 22 to 231; and (h) amino acid residues 1 to 231. In one embodiment, the isolated polypeptide disclosed above has an amino acid sequence that is at least 80% identical to the reference amino acid sequence. In another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above has an amino acid sequence that is at least 90% identical to the reference amino acid sequence. In another embodiment, the isolated polypeptide disclosed above comprises either amino acid residues 22 to 231 of SEQ ID NO:2 or amino acid residues 28 to 231 of SEQ ID NO:2.

Within a third 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:3, 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 64 to 693, or 82 to 693 of SEQ ID NO:1, or the complement of the nucleotide sequence of nucleotides 64 to 693, or 82 to 693 of SEQ ID NO:1; or (c) SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37, or the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37. 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:2 is due to a conservative amino acid substitution. In another embodiment, the isolated nucleic acid molecule disclosed above comprises the nucleotide sequence of nucleotides 1 to 693 of SEQ ID NO:1.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

141

Within another 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 Zcytor16 protein, the method comprising culturing recombinant host cells that comprise the expression vector as disclosed above, and that produce the Zcytor16 protein. In one embodiment, the method disclosed above, further comprises isolating the Zcytor16 protein from the cultured recombinant host cells.

Within another aspect the present invention provides an antibody or antibody fragment that specifically 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.

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 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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231, and

WO 02/077174

PCT/US02/08811

142

wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide sequence binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

Within another aspect the present invention provides an isolated polynucleotide as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex. In one 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 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).

Within another aspect the present invention provides an isolated polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric 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 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

143

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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231; 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 comprising 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.

Within another aspect the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector 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.

Within another aspect the present invention provides a cultured cell into which has been introduced an expression vector as disclosed above, wherein the cell expresses a heterodimeric or multimeric soluble receptor polypeptide encoded by the DNA segments. In one embodiment is provided a cell as disclosed above, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex. In another embodiment is provided a cell as disclosed above, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex that binds IL-TIF or 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

144

having a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231; 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. 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 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 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 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.

Within another aspect the present invention provides a method of producing a fusion protein comprising: culturing a cell 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 least 90% identical to an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231, and wherein the soluble cytokine receptor polypeptide binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

Within another aspect the present invention provides an isolated polypeptide as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex. In one 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

145

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 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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex. In one embodiment, the isolated soluble cytokine receptor 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 soluble cytokine receptor polypeptide is as 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 soluble cytokine receptor polypeptide is as disclosed above, wherein the soluble cytokine receptor 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 in SEQ ID NO:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231. In one embodiment, the isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex 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 soluble zcytor11 receptor polypeptide (SEQ ID NO:34).

WO 02/077174

PCT/US02/08811

146

Within another aspect the present invention provides a method of producing a soluble cytokine receptor polypeptide that form a heterodimeric or multimeric complex comprising: culturing a cell as disclosed above, and isolating the soluble receptor polypeptides produced by the cell.

- 5 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:2 from
10 amino acid 22 to 231 or 28 to 231; (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
15 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.

- 20 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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231. In one embodiment, the antibody disclosed above is a monoclonal antibody.

- 25 Within another aspect the present invention provides an antibody which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex as disclosed above.

- 30 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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

147

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:2 from amino acid 22 to 231 or 28 to 231 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 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 genetic abnormality in a patient, comprising: obtaining a genetic sample from a patient; producing a first reaction product by incubating the genetic sample with a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1 or the complement of SEQ ID NO:1 or of SEQ ID NO:37 or the complement of SEQ ID NO:37, under conditions wherein said polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence; visualizing the first reaction product; and comparing said first reaction product to a control reaction product from a wild type patient, wherein a difference between said first reaction product and said control reaction product is indicative of a genetic abnormality in the patient.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

148

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 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 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:1 or the complement of SEQ ID NO:1 or of SEQ ID NO:37 or the complement of SEQ ID NO:37; 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.

Within another aspect the present invention provides a method of treating a mammal afflicted with an inflammatory disease in which IL-TIF or serum amyloid A plays a role, comprising: administering an antagonist of IL-TIF or serum amyloid A to the mammal such that the inflammation is reduced, wherein the antagonist is selected from the group consisting of: a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:2; a soluble receptor comprising a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:34; an antibody that specifically binds a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:2; and an antibody or binding polypeptide that specifically binds a polypeptide or polypeptide fragment of IL-TIF (SEQ ID NO:15). In one embodiment is provided the method

WO 02/077174

PCT/US02/08811

149

described above, wherein the disease is a chronic inflammatory disease. In another embodiment is provided the method described above, wherein the disease is a chronic inflammatory disease selected from the group consisting of: inflammatory bowel disease; ulcerative colitis; Crohn's disease; arthritis; and psoriasis. In another embodiment is provided the method described above,, wherein the disease is an acute inflammatory disease. In another embodiment is provided the method described above, wherein the disease is an acute inflammatory disease selected from the group consisting of: endotoxemia; septicemia; toxic shock syndrome; and infectious disease. In another embodiment is provided the method described above, wherein the antagonist soluble receptor comprising a polypeptide or cytokine binding domain fragment of zcytor11 (SEQ ID NO:34) further comprises a polypeptide or cytokine binding domain fragment of CRF2-4 (SEQ ID NO:35).

The invention is further illustrated by the following non-limiting examples.

EXAMPLES

Example 1

Cloning of zcytor16 and Construction of Mammalian Expression Vectors That Express zcytor16 Soluble Receptors: zcytor16CEE, zcytor16CFLG, zcytor16CHIS and zcytor16-Fc4

A. Cloning of Zcytor16 Extracellular domain

Scanning of a translated human genomic database resulted in identification of a class II cytokine receptor named zcytor16. The sequence for zcytor16 was subsequently identified a clone from an in-house derived shallow tonsil library. The insert in the tonsil library clone was sequenced, and shown to encode the zcytor16 extracellular domain. The polynucleotide sequence of the zcytor16 clone is shown in SEQ ID NO:1 and polypeptide sequence shown in SEQ ID NO:2.

B. Mammalian Expression Construction of Soluble zcytor16 receptor zcytor16-Fc4

WO 02/077174

PCT/US02/08811

150

Construction of mammalian expression vectors that express zcytor16 soluble receptor zcytor16sR/Fc4

An expression vector was prepared to express the soluble 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).

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 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 manufacturer's instruction.

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 selectable 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 BglII) were ligated at 11°C

WO 02/077174

PCT/US02/08811

151

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 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), pC4zcytor16CEE, wherein the construct is designed to express a zcytor16 polypeptide 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).

A zcytor16 DNA fragment comprising the zcytor16 extracellular cytokine binding domain (e.g., SEQ ID NO:13) 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.

Restriction digested zcytor16 insert and previously digested vector are ligated using standard molecular biological techniques, and electroporated into

WO 02/077174

PCT/US02/08811

152

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

The same process is used to prepare the zcytor16 soluble homodimeric, heterodimeric or multimeric receptors (including non-zcytor16 soluble receptor subunits, such as, soluble CRF2-4 or IL-10R) 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).

Example 2

15 Transfection 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

20 zcytor16sR/Fc4/pzmp20 expression plasmids. Sixteen micrograms of 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

25 DNA/LipofectAMINE™ mixture, which was then added to BHK cells. The cells were incubated at 37°C/5% CO₂ for 5 hours, after which 6.4ml of BHK media with 10% FBS was added. The cells were incubated overnight at 37°C/5% CO₂.

Approximately 24 hours post-transfection, the BHK cells were split into selection media with 1µM methotrexate (MTX). The cells were repeatedly split in this

30 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

153

cells were washed with PBS and incubated in SF media for 72 hours. The SF condition media was collected and 20 μ l 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).

Example 3

Expression of zcytor16 Soluble Receptor in *E. coli*

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 approximately 388 amino acid MBP portion fused to the zcytor16 soluble receptor (e.g., SEQ ID NO:13). A fragment of zcytor16 cDNA (SEQ ID NO:1) is isolated using PCR as described herein. Two primers are used in the production of the zcytor16 fragment in a standard PCR reaction: (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 μ l of the 100 μ l PCR reaction is run on a 1.0% agarose gel with 1 x TBE buffer for analysis, and the expected approximately fragment is seen. The remaining PCR reaction is combined with the second PCR tube and precipitated with 400 μ l of absolute ethanol. The precipitated DNA used for recombining into an appropriately restriction

WO 02/077174

PCT/US02/08811

154

digested recipient vector pTAP98 to produce the construct encoding the MBP-zcytor16 fusion, as described below.

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 pTAP98 is constructed using yeast homologous recombination. 100ng of EcoR1 cut pMAL-c2 is recombined with 1µg Pvu1 cut pRS316, 1µg linker, and 1µg Sca1/EcoR1 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 designated pCZR225 and 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

155

with ITPG as described above. The positive clones are used to grow up for protein purification of the huzcytor16/MBP-6H fusion protein using standard techniques.

Example 4

Zcytor16 Soluble Receptor Polyclonal Antibodies

5 Polyclonal antibodies are prepared by immunizing female New Zealand white rabbits with the purified huzcytor16/MBP-6H polypeptide (Example 3), or the purified recombinant zcytor16CEE soluble receptor (Example 1; Example 11). The rabbits are each given an initial intraperitoneal (IP) injection of about 200 mg of
10 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.

15 The 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 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
20 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

Zcytor16 Receptor Monoclonal Antibodies

25 Zcytor16 receptor Monoclonal antibodies are prepared by immunizing male BalbC mice (Harlan Sprague Dawley, Indianapolis, IN) with the purified recombinant 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
30 protein in Incomplete Freund's Adjuvant every two weeks. Seven to ten days after the

WO 02/077174

PCT/US02/08811

156

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 zcytor16 soluble receptor protein (Example 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.

Example 6

Assessing Zcytor16 Receptor Heterodimerization Using ORIGEN Assay

Soluble 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 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 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 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 zcytor16 receptor and if they can mediate the heterodimerization of zcytor16 receptor with the soluble receptor subunits described above. To do this, 50

WO 02/077174

PCT/US02/08811

157

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-zcytor16 receptor and Bio-zcytor16, 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-zcytor16. Following incubation for one hour at room temperature, 30 μg of streptavidin coated, 2.8 mm magnetic beads (Dyna1, Inc., Oslo, Norway) are added and the reaction incubated an additional hour at room temperature. 200 μl ORIGEN assay buffer (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) is then added and the extent of receptor association measured using an M8 ORIGEN analyzer (Igen, Inc.).

Example 7

Construct for Generating a zcytor16 Receptor Heterodimer

A vector expressing a secreted human zcytor16 heterodimer is constructed. In this construct, the extracellular cytokine-binding domain of zcytor16 (e.g., SEQ ID NO:13) 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

158

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 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 κ light chain fragment used in this construct is made by using PCR to isolate the human κ 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.

B. Insertion of zcytor16 receptor or heterodimeric subunit extracellular domains into fusion vector constructs

Using the construction vectors above, a construct having zcytor16 fused to IgG γ 1 is made. This construction is done by PCRing the extracellular cytokine-binding domain of zcytor16 receptor (SEQ ID NO:13) from a tonsil 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 γ 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 κ light is also constructed as above. The CRF2-4/human κ 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

159

then ligating this product into a previously EcoRI and KpnI digested and band-purified Zem228R/human κ light chain vector described above. The resulting vector is sequenced to confirm that the cytokine receptor subunit/human κ light chain fusion is correct.

5

D. Co-expression of the zcytor16 and heterodimeric cytokine receptor subunit extracellular domain

Approximately 15 μ g of each of vectors above, are co-transfected into mammalian cells, e.g., BHK-570 cells (ATCC No. CRL-10314) using 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 μ M 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 μ M of MTX and 0.5 mg/ml G418 for about 10 days.

15

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 the dialyzed material is submitted for amino acid analysis (AAA) using routine methods.

20

Example 8

Determination of Receptor Subunits That Heterodimerize or Multimerize With zcytor16 Receptor Using a Proliferation Assay

25

Using standard methods described herein, cells expressing a BaF3/zcytor16-MPL chimera (wherein the extracellular domain of the zcytor16 (e.g., SEQ ID NO:13) 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 to measure ligand binding of monomeric or homodimeric zcytor16 receptors. In addition, BaF3/zcytor16-MPL chimera cells transfected with an

30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

160

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/zcytor16-MPL cells signal, this would suggest that zcytor16 receptor can homodimerize to signal. Transfection of the BaF3/MPL-zcytor16 cell line with an additional MPL-class II 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 zcytor16 receptor signaling. Use of MPL-receptor fusions for this purpose alleviates the requirement for the presence of an intracellular signaling domain for the 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-zcytor16 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-zcytor16 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/zcytor16-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 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 zcytor16 receptor complex to the luciferase reporter in the presence of IL-TIF. BHK cells do not endogenously express the zcytor16 receptor. An exemplary luciferase reporter mammalian expression vector

WO 02/077174

PCT/US02/08811

161

is the KZ134 plasmid which 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* **272**:719-722, 1996), the mammary gland response element of the β -casein gene (Schmitt-Ney, M. et al., *Mol. Cell. Biol.* **11**:3745-3755, 1991), and a STAT inducible element of the Fcg RI gene, (Seidel, H. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**:3041-3045, 1995). These oligonucleotides contain Asp718-XhoI compatible ends and were 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 zcytor16-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 zcytor16-mpl receptor only, various combinations of zcytor16-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 α , IL-2R β , IL-2R γ); zcytor16-mpl receptor with one or more of the IL-4/IL-13 receptor family receptor components (IL-4R α , IL-13R α , IL-13R α'), as well as other Interleukin receptors (e.g., IL-15 R α , IL-7R α , IL-9R α , IL-21R (zalphal1; WIPO publication WO 00/17235; Parrish-Novak, J et al., *Nature* **408**:57-63, 2000)). 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 zcytor16 receptor in the presence of the correct receptor complex, is expected to give a luciferase readout of approximately 5 fold over background or greater.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

162

As an alternative, a similar assay can be performed wherein Baf3/zcytor16-mpl cell lines are co-transfected as described above and proliferation measured (Example 8).

5

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 1.5×10^5 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 H₂O). 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 H₂O. Cells were again washed with TNT. Cells were then incubated for 1 hour with 1-3 µg/ml 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 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

163

Since zcytor16 is a Class II cytokine receptor, the binding of zcytor16sR/Fc4 fusion protein with known or orphan Class II cytokines was tested. The pZP7 expression vectors containing cDNAs of cytokines (including human 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 were carried out using the secretion trap assay described above. Human IL-TIF showed positive binding. Based on these data, human IL-TIF and zcytor16 is a potential ligand-receptor pair.

10

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 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 zcytor16-Fc4 (Example 2) was filtered through a 0.2 um 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.

25

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.

30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

164

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 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.

20 Example 12

Human 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 02/077174

PCT/US02/08811

165

labeled with ^{32}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° for 3 hours in ExpressHyb (Clontech) solution. Blots were hybridized overnight at 65° in Expresshyb solution containing 1.0×10^6 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° 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 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 94 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-ReadyTM 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 96-well format that included a human genomic DNA (Clontech, Palo Alto, CA)

WO 02/077174

PCT/US02/08811

166

positive control sample. Each well contained approximately 0.2-100 pg/ μ l of cDNA. The PCR reactions were set up using oligos ZC25,963 (SEQ ID NO:16) and ZC27,659 (SEQ ID NO:23), Advantage 2 DNA Polymerase Mix (Clontech) and Redilead dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The amplification was carried out as follow:

5 1 cycle at 94°C for 2 minutes, 30 cycles of 94°C for 20 seconds, 58°C for 30 seconds and 72°C for 1 minute, followed by 1 cycle at 72°C for 5 minutes. About 10 μ l of the PCR reaction product was subjected to standard Agarose gel electrophoresis using a 2% agarose gel. The correct predicted DNA fragment size was not observed in any tissue or cell line. Subsequent experiments showing expression of zcytor16 indicated that the

10 negative results from this panel were likely due to the primers used.

WO 02/07174

PCT/US02/08811

167

Table 5

Tissue/Cell line	#samples	Tissue/Cell line	#samples
Adrenal gland	1	Bone marrow	3
Bladder	1	Fetal brain	3
Bone Marrow	1	Islet	2
Brain	1	Prostate	3
Cervix	1	RPMJ #1788 (ATCC # CCL-156)	2
Colon	1	Testis	4
Fetal brain	1	Thyroid	2
Fetal heart	1	WI38 (ATCC # CCL-75)	2
Fetal kidney	1	ARIP (ATCC # CRL-1674 - rat)	1
Fetal liver	1	HaCat - human keratinocytes	1
Fetal lung	1	HPV (ATCC # CRL-2221)	1
Fetal muscle	1	Adrenal gland	1
Fetal skin	1	Prostate SM	2
Heart	2	CD3+ selected PBMC's Ionomycin + PMA stimulated	1
K562 (ATCC # CCL-243)	1	HPVS (ATCC # CRL-2221) - selected	1
Kidney	1	Heart	1
Liver	1	Pituitary	1
Lung	1	Placenta	2
Lymph node	1	Salivary gland	1
Melanoma	1	HL60 (ATCC # CCL-240)	3
Pancreas	1	Platelet	1
Pituitary	1	HBL-100	1
Placenta	1	Renal mesangial	1
Prostate	1	T-cell	1
Rectum	1	Neutrophil	1
Salivary Gland	1	MPC	1
Skeletal muscle	1	Hut-102 (ATCC # TIB-162)	1
Small intestine	1	Endothelial	1
Spinal cord	1	HepG2 (ATCC # HB-8065)	1
Spleen	1	Fibroblast	1
Stomach	1	E. Histo	1
Testis	2		
Thymus	1		
Thyroid	1		
Trachea	1		
Uterus	1		
Esophagus tumor	1		
Gastric tumor	1		
Kidney tumor	1		

WO 02/077174

PCT/US02/08811

168

Liver tumor	1		
Lung tumor	1		
Ovarian tumor	1		
Rectal tumor	1		
Uterus tumor	1		

An additional panel of cDNAs from human tissues was screened for zcytor16 expression using PCR. This 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 6, below. Aside from the PCR reaction, the assay was carried out as per above. 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 Rediload 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

169

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 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.

Table 6

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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

170

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 in Human Tissue and Cell Line RNA Panels Using RT-PCR

A panel of RNAs from human cell lines was screened for 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 7-10 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

171

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 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 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 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 7

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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

172

Table 8

Tissue/Cell Line	#samples	Tissue/Cell Line	#samples
293	1	HL-100	1
C32	1	Hs-294T	1
HaCat#1	1	Molt4	1
HaCat#2	1	RPMI	1
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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

173

FHC	1	INT407	1
HREC	1		

Table 9

Tissue	#samples	Tissue	#samples
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 10

Tissue	#samples	Tissue	#samples
small bowel	10	uterus	11
spleen	3	uterine cancer	1
spleen lymphoma	1	thyroid	9
stomach	13		
stomach cancer	1		

Example 13

Construction of Expression Vector Expressing Full-length zcytor11

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) 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 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 described above. This vector fragment was combined with the EcoRI and XhoI cleaved

WO 02/077174

PCT/US02/08811

174

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 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)

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 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. Z17227) was isolated from a Daudi cell line cDNA library, and then cloned into an expression vector pZP7P, as described in Example 6.

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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

175

purified using a Qiagen Maxi Prep kit (Qiagen) as per manufacturer's instructions. For electroporation, BaF3 cells were washed once in serum-free RPMI media and then resuspended in serum-free RPMI media at a cell density of 10^7 cells/ml. One ml of resuspended BaF3 cells was mixed with 30 μ g 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 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 were transferred to 50 ml of complete media and placed in an incubator for 15-24 hours (37°C, 5% CO₂). The cells were then spun down and resuspended in 50 ml of complete media containing 2 μ g/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 30 μ g of the zcytor11 expression vector, described in Example 6 above. Following recovery, transfectants were selected using 200 μ g/ml zeocin and 2 μ g/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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

176

Purified IL-TIF-CEE (Example 19) was used to test for the presence of proliferation activity as described below. Purified 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 plated in a 96-well format at 5000 cells per well in a volume of 100 μ l per well using the mIL-3 free media.

Proliferation of the BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells was assessed using IL-TIF-CEE protein diluted with mIL-3 free media to 50, 10, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.13, 0.06 ng/ml concentrations. 100 μ l of the diluted protein was added to the BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells. The total assay volume is 200 μ l. The assay plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 3 days at which time Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) was added at 20 μ l/well. Plates were again incubated at 37°C, 5% CO₂ for 24 hours. Alamar Blue gives a fluourometric 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% CO₂ 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 zcytor16/Fc4. When IL-TIF was combined with zcytor16 at 10 μ g/ml, the response to IL-TIF at all concentrations was brought down to background. That the presence of soluble zcytor16 ablated the proliferative effects of IL-TIF demonstrates that it is a potent antagonist of the IL-TIF ligand.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

177

Example 16IL-TIF activation of a reporter mini-gene in MES 13 cells and inhibition of activity by zcytor16-Fc4

5 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) 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

10 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

15 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,

20 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 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.

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.*

B. IL-TIF Reporter Gene Assay on HCT-15 and HT-29 Cell Lines

HCT-15 (human colon adenocarcinoma, ATCC #CCL-225) and HT-29 (human epithelial colorectal adenocarcinoma, ATCC #HTB-38) cells were plated at 3000 cells/100ul/well in RPMI (Life Technologies) supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% Glutamax, and 1% Na pyruvate into 96 well opaque plates (Costar). These cells were incubated 24 hours in a 37° C , 5% CO2 incubator.

Cells were then infected with KZ136 adenovirus (STAT/SRE/Lucif) described above in 50 µl/well DMEM/F12 media (Life Technologies) supplemented

WO 02/077174

PCT/US02/08811

179

with 1% ITS and 2% HEPES (Serum Free Media) using an M.O.I. of 5000. Cells were incubated for 24 hours.

After removal of the adenovirus, cell samples were diluted in serum free media with serial concentrations of IL-TIF in the presence or absence of Zcytor16-Fc4 fusion soluble receptor, and added to a 96-well plate in a volume of 100 µl/well, and incubated for 4 hours. Serum-free medium alone was used as a background control. Cells were then lysed and exposed to luciferase substrate using reagents and protocols from Promega as per manufacturer's instructions. Plates were read on the Berthold MicroLumat Plus LB96V2R (Perkin-Elmer Life Sciences) using a 40 µl injection and 5 second integration protocol.

HCT-15 cells showed a 2.5 fold induction over media alone to the IL-TIF at 10ng/ml and a 2.2 fold induction at 5 ng/ml. This IL-TIF response was blocked to background levels when Zcytor16-Fc4 fusion soluble receptor was added in at 1µg/ml.

HT-29 cells showed a nice dose response to IL-TIF starting with a 6.2 fold induction at 10 ng/ml titering down to a 2 fold induction at 0.08 ng/ml. This IL-TIF response was completely blocked down to background levels when 1µg/ml Zcytor16-Fc4 fusion soluble receptor was added in.

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 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-I 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

180

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 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 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 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

BHK 570 cells (ATCC No. CRL-10314), were plated at about 1.2×10^6 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 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% CO₂, overnight and the DNA: Lipofectin™ mixture was replaced with selection 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

181

confluence. Positive expressing clonal colonies Conditioned media samples were then tested for expression levels via SDS-PAGE and Western analysis. A high-expressing clone was picked and expanded for ample generation of conditioned media for purification of the IL-TIF-CEE expressed by the cells (Example 19).

5

Example 19

Purification of IL-TIF-CEE 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-CEE (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

30

WO 02/077174

PCT/US02/08811

182

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 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.

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 (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. 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 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 fractions were characterized via SDS-PAGE Silver staining, and only the most pure fractions were pooled. This material represented purified IL-TIF-CEE polypeptide.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

183

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 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.

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.

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 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 dimethylpimilimidate-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 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.

Example 20

Human zcytor11 Tissue Distribution in Tissue Panels Using Northern Blot and PCR

A. Human zcytor11 Tissue Distribution in tissue panels using PCR

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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

184

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 Example 12. 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, 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 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. The following samples showed positive expression of zcytor11: mononuclear cells, resting CD8+ and resting CD19+ cells.

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 SUPERScript One Step RT-PCR System (Life Technologies, Gaithersburg, MD). The amplification was carried out as follows: one cycle at 50° for 30 minutes followed

WO 02/077174

PCT/US02/08811

185

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 μ l 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 uterus. Cell lines showing expression of zcytor11 were A-431, differentiated CaCO2, 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

187

Specific human tissues were isolated and screened for 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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

188

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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

189

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 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

190

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 ~ 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 (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. Also the serum zcyto18 level was increased and the glucose level decreased at day 3. In summary, zcyto18 adeno-mice displayed acute phase response that can also be initiated by other pro-inflammatory cytokines such as TNF-alpha, IL-1beta, and gp130 cytokines. The acute phase response is the set of immediate inflammatory responses initiated by pattern recognition molecules. The acute phase proteins provide enhanced protection against microorganisms and modify inflammatory responses by effects on cell trafficking and mediator release. For example, SAA has potent leukocyte activating function including induction of chemotaxis, enhancement of leukocyte adhesion to endothelial cells, and increased phagocytosis. Understanding the factors that initiate and alter the magnitude and duration of the acute phase response represents an important step in the development of new therapies for infectious and inflammatory diseases.

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

WO 02/07174

PCT/US02/08811

191

cells. IL-TIF also decreases red blood cells, 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 process. Antagnists against IL-TIF, such as antibodies or its soluble receptor zcytor16, could be used as therapeutic reagents in these diseases.

5 Moreover, these experiments using IL-TIF adenovirus in mice suggest that IL-TIF over-expression increases the level of neutrophils and platelets *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
10 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.

Example 24

15 Chromosomal Assignment and Placement of Zcytor16

Zcytor16 was mapped to chromosome 6 by polymerase chain reaction (PCR) using the commercially available version of the Stanford G3 Human/Hamster Radiation Hybrid (RH) Mapping Panel (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) in conjunction with publicly available WWW servers (e.g, Stanford Human Genome
20 Center, Stanford University, CA server, <http://shgc-www.stanford.edu/>; and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genemap99/>).

The PCR reactions were carried out using Zcytor16 specific sense and antisense primers ZC27,713 (SEQ ID NO:40), and ZC27,714 (SEQ ID NO:41). These
25 yield a 226-bp amplicon in the 3' UTR. For the PCR reactions, HotStarTaq DNA polymerase and buffer (Qiagen Inc., Valencia, CA) were used. The PCR cyclor conditions were as follows: an initial 1 cycle 15 min denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of a 1 min denaturation at 95°C, 1 min annealing at 56°C and 1 min and 15 s extension at 72°C, and a final 1 cycle extension of 7 min at 72°C. The reactions were
30 separated by electrophoresis on a 2% agarose gel (EM Science, Gibbstown, NJ) and visualized with ethidium bromide staining. The data vector obtained for the Stanford

WO 02/077174

PCT/US02/08811

192

G3 RH mapping panel was: 01000 00000 10000 00000 00000 00010 00000 00000
00000 00000 10000 00010 00010 10000 00010 10000 000.

The radiation hybrid (RH) mapping linked Zcytor16 to chromosome 6 on the Stanford G3 RH mapping panel. The RH results placed Zcytor16 0 cR₁₀₀₀₀ from the Stanford G3 framework marker SHGC-9657 (LOD = 12.38, 1 cR₁₀₀₀₀ = ~29kb). SHGC-9657 (D6S1835) is a STS genomic, sequence tagged site for the human interferon-gamma receptor (IFN γ R1). IFN γ R1 has been mapped to 6q24.1-q24.2 by *in situ* hybridization (Papanicolaou et al., *Cytogenet. Cell Genet.* 76:181-182, 1997) and is in the D6S442 (158.5 cM) – D6S1581 (165.0 cM) interval on the NCBI GeneMap '99. Due to the close proximity of Zcytor16 to IFN γ R1, it can be assumed that Zcytor16 is also located in the 6q23-q24 chromosomal region.

Example 25

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 μ LCK promoter, mouse IL-TIF (SEQ ID NO:42; polypeptide shown in SEQ ID NO:43), 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 μ 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

193

B. Genotypic and Expression analysis from transgenic mice

From the mouse IL-TIF transgenic line driven by the E μ 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 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.

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 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 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, 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

194

C. Microscopic evaluation of tissues from transgenic mice: IL-TIF TG with EuLck promoter has a neonatal lethal-histology

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 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 μ 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 (μ m)	Average abdominal skin thickness (μ 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

WO 02/077174

PCT/US02/08811

195

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.

5

Example 26*In vivo* affects of IL-TIF polypeptideA. Mice infected with IL-TIF Adenovirus show induction of SAA

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 ~ 0.1 ml volume. The third group (n=8) received no treatment. On day 12, mice were weighed and blood was drawn from the mice. On day 20 of the study, mice were sacrificed, body weight was recorded, and blood and tissues were collected for analysis.

All blood samples were analyzed for complete blood count (CBC) and serum chemistry. At both day 12 and 20, 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 counts were significantly reduced from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group at day 12, but at day 20 the opposite effect was observed. In addition, the IL-TIF adenovirus treated mice decreased in body weight, while parental adenovirus treated mice gained weight. Glucose was significantly reduced at both time points in the serum samples from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group. Serum albumin was also significantly reduced at both time points. Blood urea nitrogen levels were significantly reduced at day 20. Serum globulin levels were significantly increased the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group at both time points. Microscopically, one observed histomorphological change attributed to IL-TIF was tubular regeneration in the kidney. While not uncommon in mice, there was an increased incidence and severity in this group of

WO 02/077174

PCT/US02/08811

196

animals. Nephropathy is characterized as multifocal areas of basophilia of cortical tubular epithelial cells.

An additional experiment, identical in design to the one described above, was carried out in order to verify results and collect additional samples. In this study, body weight was recorded every three days, blood was collected from the mice 3 days following adenovirus injection, and mice were sacrificed for blood and tissue collection on day 10 (n=4 per group) and day 20 (n=4 per group). Elevated neutrophil and platelet counts were again detected in blood samples from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group. This effect was evident for neutrophils by day 3, but platelet count was not significantly different until day 10. Also, lymphocyte counts were significantly reduced from the IL-TIF adenovirus administered group relative to the parental adenovirus treated group at 3 and 10, but they were not elevated on day 20 as in the previous study. Again, mice given IL-TIF adenovirus lost weight over the course of the study, while control virus treated and untreated mice gained weight. Serum chemistry parameters were consistent with the previous study. Histological findings of tubular regeneration in the kidney associated with IL-TIF adenovirus treatment were also confirmed in this study. This was consistent with the additional finding of moderate proteinuria in mice given IL-TIF adenovirus (day 20).

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 in an 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, 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*. It is conceivable that there are other factors (such as cytokines and modifier genes)

WO 02/077174

PCT/US02/08811

197

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, anti-IL-TIF antibodies, and its receptors, such as zcytor16 and soluble zcytor11/CRF2-4, 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.

Association of IL-TIF expression with weight loss, appearance of acute phase protein SAA, and metabolic perturbations evidenced by decreased serum glucose, albumin and urea nitrogen suggest that IL-TIF is a cytokine which acts early in certain inflammatory responses. Mice given IL-TIF adenovirus may represent a state of chronic inflammation, such as that observed in IBD, ulcerative colitis, arthritis, psoriasis, asthma, and the like. Certain detrimental inflammatory processes might be inhibited by use of an antagonist to IL-TIF, such as anti-IL-TIF antibodies, and its receptors, such as zcytor16 and soluble zcytor11/CRF2-4, and the like.

B. IL-TIF is a pro-inflammatory cytokine: Serum Level of SAA in Adeno-IL-TIF mice:

An ELISA was performed to determine the level of SAA in IL-TIF-Adeno mice, using a Mouse SAA Immunoassay Kit and protocol (Biosource International, California, USA). Diluted standards and unknowns were plated along with HRP-anti-mouse SAA into assay plates pre-coated with anti-mouse SAA antibody. Plates were incubated for one hour at 37 degrees C and then washed according to kit instructions. Plates were developed for 15 minutes at room temperature using TMB and stopped with 2M H₂SO₄. The absorbance at 450 nm was read using a Spectromax 190 (Molecular Devices, California, USA). The resulting data was analyzed using Softmax Pro (Molecular Devices, California, USA) and Excel (Microsoft Corp., Washington, USA).

Mice infected with IL-TIF-Adenovirus had highly elevated levels of mSAA, over 10-fold, relative to the Parental-Adenovirus control.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

198

C. Flow cytometry analysis of IL-TIF-adenovirus infected mice

To analyze the effects of IL-TIF expression *in vivo* by adenovirus, we isolated peripheral blood, spleen, and bone marrow from IL-TIF-adenovirus infected C57BL/6 mice, at day 10 and day 20 after infection. Approximately 100 μ l of blood was collected in heparinized tubes, then depleted of red blood cells by hypotonic lysis (cells were lysed in 4.5 ml dH₂O for ~5 seconds before adding 1.5 ml 3.6% NaCl). Spleens were crushed between two frosted glass slides, and the cells released were passed over a Nytex membrane (cell strainer) and pelleted. Bone marrow was obtained by crushing one femur in a mortar and pestle and passing the cells over a cell strainer (Falcon). Cells were resuspended in FACS wash buffer (WB = HBSS/1%BSA/10 mM hepes), counted in trypan blue, and 1x10⁶ viable cells of each type were aliquoted into 5 ml polystyrene tubes. Cells were washed and pelleted, then incubated for 20 min on ice with cocktails of fluorescently-labeled (FITC, PE, and CyChrome) monoclonal antibodies (PharMingen, San Diego, CA) recognizing various cell surface markers used to identify particular immune cell subsets. These markers include the following (listed in the groups of 3 we tested). For blood staining: CD3, Gr1, and B220; for spleen staining: CD62L, CD44, and CD3; CD21, CD23, and B220; IgD, IgM, and B220; CD11b, Gr1, and CD8; for bone marrow staining: CD11b, Gr1, CD3; IgD, IgM, and B220. Cells were washed with 1.5 ml WB and pelleted, then resuspended in 0.4 ml of WB and analyzed on a FACScan using CellQuest software (Becton Dickinson, Mountain View, CA).

We found that the fraction of neutrophils in the blood of IL-TIF-adenovirus-treated mice was elevated 4-13 fold at Day 10 and 2-3-fold at Day 20. At Day 10, this difference resulted in a concomitant decrease in the fraction of lymphocytes and monocytes in the blood. In the bone marrow, we found that the total number of B cells decreased ~1.5-fold while the percentage of mature recirculating B cells increased and the total number of immature B cells dropped slightly at Day 10. At Day 20, many of these differences were not apparent, though we did find a slight increase in the fraction of mature recirculating B cells. In the spleen, the total number of B cells decreased slightly (1.5-2-fold) on both days tested, while on Day 20, the fraction of marginal zone B cells (CD21+CD23-B220+) increased by 2-fold and the number of follicular B cells

WO 02/077174

PCT/US02/08811

199

(CD21+CD23+B220+) dropped 2-fold. Marginal zone B cells are considered to be the first line of defense against pathogens, as they are more sensitive to B cell mitogens (e.g. LPS) than the more common follicular B cells, and when they encounter their cognate antigen they differentiate very quickly into antibody-secreting cells. It is possible that IL-TIF either enhances the conversion of follicular to marginal zone B cells, or that it selectively depletes the less mature follicular cells. The changes in B cell numbers found in the bone marrow may reflect an enhanced differentiation of pre/pro and/or immature B cells, or an increased influx of recirculating B cells from the blood/spleen, and perhaps a coincident increase in export of immature B cells to the periphery. The actual number of mature BM B cells does not increase, so IL-TIF may not enhance their proliferation. Alternatively, IL-TIF may block differentiation of immature B cells and thereby increase the relative representation of mature B cells.

D. Zcytor16/Fc4 neutralizes IL-TIF activity in vivo: SAA ELISA showing SAA Expression induced by IL-TIF is inhibited by zcytor16-Fc4 injection:

To assess whether zcytor16 could inhibit the SAA induction by IL-TIF mice (female, C3H/HEJ, 8 weeks old; Jackson Labs, Bar Harbor, ME) were divided into five groups of three animals each and treated by IP injection of proteins as shown in Table 12 below:

Table 12

Group #	IL-TIF	Zcytor16
Group 1:	-	-
Group 2:	-	100 µg
Group 3:	3 µg	-
Group 4:	3 µg	20 µg
Group 5:	3 µg	100 µg

The zcytor16 injections preceded the IL-TIF injection by 15 minutes. Both protein injections were given by the intraperitoneal route. A blood sample was taken from each mouse prior to treatment, then at 2 and 6 hours after treatment. Serum was prepared from each of the samples for measurement of SAA and IL-TIF.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

200

An ELISA was performed as described previously to determine the level of SAA in mice treated with IL-TIF and a soluble receptor for IL-TIF, zcytor16-Fc4 described herein. Mice treated with 3 µg IL-TIF in conjunction with zcytor16-Fc4 at concentrations between 20-100ug showed a reduction in the level of SAA induced by IL-TIF alone to background levels, demonstrating that zcytor16 inhibited the SAA induction activity of IL-TIF in vivo.

Example 27

Expression of IL-TIF in Inflammatory Bowel Disease mouse model

Inflammatory Bowel disease (IBD) is a multifactorial disease, divided into two types, ulcerative colitis (UC) and Crohn's Disease (CD). The etiology of these diseases is currently not known and clinical manifestations differ. UC is restricted to the colon, and symptoms include bloody diarrhea, weight loss and abdominal pain. Macroscopic features of UC include punctuated ulcers and a shortened colon. In contrast, Crohn's Disease can also affect other parts of the bowel. Symptoms include diarrhea (which is less often bloody than seen in UC), a low-grade fever and pain. Macroscopic features include fibrotic and stenotic bowel with strictures, deep ulcers, fissures and fistulas.

Several animal models are available that mimic these human diseases. Three commonly used models of colitis for new drug screening are the 2,4,6-trinitrobenzene sulphonic acid (TNBS) induced rat model, the mouse T-cell transfer model, and the dextran sodium sulfate, or DSS-induced mouse model. The DSS model was derived from a model by Dr. S. Murthy, using a disease activity index scoring system (S.N.S. Murthy, Treatment of Dextran Sulfate Sodium-Induced Murine Colitis by Intracolonic Cyclosporin, Digestive Diseases and Sciences, Vol. 38, No. 9 (September 1993), pp.1722-1734).

In the present study, an acute colitis resulted when mice were fed DSS in their drinking water for 6 days. The animals exhibited weight loss and bloody diarrhea, mimicking the condition of UC patients. The mechanism of the DSS injury is not well characterized, but it is thought that it induces a nonspecific inflammatory immune response and mimics environmental effects on the bowel. It is possible that H₂S is

WO 02/077174

PCT/US02/08811

201

produced, which could be toxic to cells. In addition, changes in luminal bacterial flora occur. Activated monocytes, macrophages and mast cells have been demonstrated in the colon. Mediators for all three animal models include inflammatory prostaglandins, leukotriene metabolites and cytokines.

5 A. Method

Colitis was induced by DSS ingestion in Swiss Webster female mice from Charles River Laboratories. The mice were 10 and 11 weeks old at the start of the study. Mice were given 4% DSS in the drinking water for a period of 6 days (treated mice), or were given only normal drinking water (control mice). A Disease Activity Index clinical score (DAI) was used, which comprises a combination of measurements including stool quality, occult blood and weight loss. DAI was obtained daily for each mouse beginning one day after DSS treatment. After 6 days, DSS was removed from the drinking water of the treated mice. All mice were monitored by DAI clinical score until sacrifice at either 2, 7 or 10 days from the start of the study. On each of days 2 and 15 7, four DSS-treated mice and one control mouse were sacrificed. On day 10, four DSS-treated mice and two control mice were sacrificed. For all animals after sacrifice, the colon length was measured. Colon sections were fixed in 10% neutral buffered formalin for histologic analysis or frozen for mRNA extraction.

B. Histologic scoring and Disease Activity Index (DAI) scoring

20 Histologic index scores were obtained following the method in reference 1. Generally, the colon sections were scored blinded by a pathologist for crypt scores, hyperplastic epithelium, crypt distortion and inflammation.

25 Daily, each mouse was graded as to a clinical score based on weight loss, stool consistence and intestinal bleeding. Higher scores were assigned for increasing amounts of weight loss, diarrhea and bleeding. The daily score for each mouse was the mean grade obtained from the three results/observations.

C. Results

30 The colon lengths for DSS-treated mice were somewhat shorter on days 7 and 10 than non-treated controls, but the results may not have been significant (not

WO 02/077174

PCT/US02/08811

202

checked by a statistical application). The clinical DAI scores reflected a rise in disease symptoms in the DSS-treated mice similar to that seen in past studies using this model. Occult blood was greatest on approximately days 4 and 5, while loose stools were more prevalent on days 6 and 7. Histopathology results show that disease scores were different from the controls on all sacrifice days, especially days 7 (peak) and 10. The histopathology screening scores were: controls=0.5, day 2 DSS-treated mice=8.8, day 7 DSS-treated mice=21, day 10 DSS-treated mice=18. Clinical and histopathology scores show that the DSS-treated mice had significant colon disease relative to the non-treated controls. The frozen tissue samples were used later for mRNA determinations as described below.

D. Tissue Expression of IL-TIF RNA in Murine IBD Colon Samples using RT-PCR:

To determine the relative expression of mouse IL-TIF RNA (SEQ ID NO:42) in an inflammatory bowel disease model, the distal colons of DSS-treated mice were collected and snap frozen in liquid nitrogen. In this experiment mice were treated with DSS and samples were taken on days 2, 7 and 10 post-treatment. Samples from normal untreated mice were collected as well. RNA was then isolated from the samples using the standard RNeasy Midiprep™ Kit (Qiagen, Valencia, CA) as per manufacturer's instructions.

The RT-PCR reactions used the 'Superscript One-Step RT-PCR System with Platinum Taq.' (Life Technologies, Gaithersburg, MD). Each 25 µl reaction consisted of the following: 12.5 µl of 2X Reaction Buffer, 0.5ul (20pmol/µl) ZC39,289 (SEQ ID NO:44), 0.5 µl (20pmol/ul) ZC39,290 (SEQ ID NO:45), 0.4 µl RT/Taq polymerase mix, 10ul RNase-free water, 1.0 µl total RNA (100ng/µl). The amplification was carried out as follows: one cycle at 50° for 30 minutes followed by 35 cycles of 94°, 30 seconds; 58°, 30 seconds; 72°, 60 seconds; then ended with a final extension at 72° for 7 minutes. 8 to 10 µl of the PCR reaction product was subjected to standard agarose gel electrophoresis using a 2% agarose gel. The correct predicted cDNA fragment size was observed as follows: There was a faint band in both day 2 samples. Two of three day 7 samples generated a strong band while the third day 7 sample generated a very strong band. The three day 10 samples generated a strong

WO 02/077174

PCT/US02/08811

203

band. Finally, the two 'normal' control samples didn't generate any band. These results suggest that there may be an upregulation of IL-TIF in certain types of inflammatory responses in the colon, including those associated with IBD, UC, and CD. The data is summarized in Table 13 below where Relative Expression was scored as follows: 0 = No band, 1 = faint band, 2 = strong band, 3 = very strong band.

Table 13

Tissue	Relative Expression (0-3)
Normal Colon	0
Normal Colon	0
Day 2 Post Treatment	1
Day 2 Post Treatment	1
Day 7 Post Treatment	3
Day 7 Post Treatment	2
Day 7 Post Treatment	2
Day 10 Post Treatment	2
Day 10 Post Treatment	2
Day 10 Post Treatment	2

10

Example 28Construct for generating hzcytor11/hCRF2-4 heterodimer

A cell line expressing a secreted hzcytor11/hCRF2-4 heterodimer was constructed. In this construct, the extracellular domain of hzcytor11 (SEQ ID NO:46) was fused to the heavy chain of IgG gamma1 (Fc4) (SEQ ID NO:5) with a Glu-Glu tag (SEQ ID NO:59) at the C-terminus, while the extracellular domain of CRF2-4 (SEQ ID NO:47) was fused to Fc4 with a His tag (SEQ ID NO:60) at the C-terminus. For both of the hzcytor11 and hCRF2-4 arms of the heterodimer, a Gly-Ser spacer of 8 amino acids (SEQ ID NO:48) was engineered between the extracellular portion of the receptor and the n-terminus of Fc4. In addition, a thrombin cleavage site was engineered between the Fc4 domain and the c-terminal tag to enable possible proteolytic removal of the tag.

For construction of the hzcytor11/Fc4-CEE portion of the heterodimer, the extracellular portion of hzcytor11 was PCR'd from a vector containing human zcytor11 fused to Fc4 (hzcytor11/IgG) with oligos ZC39335 (SEQ ID NO:49) and ZC39434 (SEQ ID NO:50) with EcoRI and BamHI restriction sites engineered at the 5' and 3' ends, respectively, under conditions as follows: 25 cycles of 94°C for 60 sec., 57 °C for 60 sec., and 72 °C for 120 sec.; and 72°C for 7 min. PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen), digested with EcoRI and BamHI (Boehringer-Mannheim), separated by gel electrophoresis and purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen). The hzcytor11 EcoRI/BamHI fragment was ligated into pZP-9 hzcytor7/Fc4-TCS-CEE that had been digested with EcoRI and BamHI. This vector has the extracellular portion of hzcytor7 (US Patent No. 5,945,511) fused to Fc4 (SEQ ID NO:5) with a CEE tag (SEQ ID NO:10), and digesting with EcoRI and BamHI removes the extracellular portion of hzcytor7 and allows substitution of hzcytor11. Minipreps of the resulting ligation were screened for an EcoRI/BamHI insert of the correct size and positive minipreps were sequenced to confirm accuracy of the PCR reaction. The polypeptide sequence of the hzcytor11/Fc4-CEE fusion polypeptide is shown in SEQ ID NO:61.

For construction of the hCRF2-4/Fc4-cHIS portion of the heterodimer, the extracellular portion of hCRF2-4 was PCR'd from pZP-9 CRF with oligos ZC39319 (SEQ ID NO:51) and ZC39325 (SEQ ID NO:52) under conditions as follows: 30 cycles of 94°C for 60 sec., 57 °C for 60 sec., and 72 °C for 120 sec; and 72°C for 7 min. PCR product were purified as described above and then digested with EcoRI and BamHI. Because the PCR product had an internal EcoRI site two bands were obtained upon digestion; a 0.101kB EcoRI/EcoRI fragment and a 0.574 kB EcoRI/BamHI fragment. The 0.574 EcoRI/BamHI fragment was ligated into vector pHZ-1 DR1/Fc4-TCS-cHIS that had been digested with EcoRI and BamHI. This vector has the extracellular portion of hDR-1 fused to Fc4 with a C-HIS tag (SEQ ID NO:12), and digesting with EcoRI and BamHI removes the extracellular portion of hDR-1 and allows substitution of hCRF2-4. Minipreps of the resulting ligation were screened for an EcoRI/BamHI insert of the correct size, and positive minipreps, were EcoRI digested and band purified for further construction. The 0.101kB EcoRI/EcoRI fragment was

WO 02/077174

PCT/US02/08811

205

ligated into the EcoRI digested minipreps and clones were screened for proper orientation of insertion by KpnI/NdeI restriction digestion. Clones with the correct size insertion were submitted for DNA sequencing to confirm the accuracy of the PCR reaction. The polypeptide sequence of the hzcytor11/Fc4-CEE fusion polypeptide is shown in SEQ ID NO:62.

5 About 16 µg each of the hzcytor11/Fc4-CEE and hCRF2-4/Fc-4-cHIS were co-transfected into BHK-570 (ATCC No. CRL-10314) cells using Lipofectamine (Gibco/BRL), as per manufacturer's instructions. The transfected cells were selected for 10 days in DMEM + 5%FBS (Gibco/BRL) containing 1 µM methotrexate (MTX) (Sigma, St. Louis, MO) and 0.5 mg/ml G418 (Gibco/BRL) for 10 days. The resulting pool of transfectants was selected again in 10 µM MTX and 0.5mg./ml G418 for 10 days.

Example 29

15 Purification of zcytor11/CRF2-4 heterodimer receptor

Conditioned culture media zcytor11/CRF2-4 heterodimer was filtered through 0.2 µm filter and 0.02% (w/v) Sodium Azide was added. The conditioned media was directly loaded a Poros Protein A 50 Column at 10 – 20 ml/min. Following load the column was washed with PBS and the bound protein eluted with 0.1M Glycine pH 3.0. The eluted fractions containing protein were adjusted to pH 7.2 and Concentrated to <80ml using YM30 Stirred Cell Membrane (Millipore).

The 80 ml eluate from the Protein A column was loaded onto a 318ml Superdex 200 HiLoad 26/60 Column (Pharmacia). The column was eluted with PBS pH 7.2 at 3 ml/ min.. Protein containing fractions were pooled to eliminate aggregates. 25 The Superdex 200 pool was adjusted to 0.5M NaCl, 10mM Imidazole using solid NaCl and Imidazole and the pH was adjusted to 7.5 with NaOH. The adjusted protein solution was loaded onto a 200 ml NiNTA column (Qiagen) at 2 CV/hr. The bound protein was eluted, following PBS wash of the column, with five concentration steps of Imidazole : 40mM, 100mM, 150mM, 250mM, 500mM. The fractions eluted at each 30 step of imidazole were pooled and analyzed by N-terminal sequencing. Pools containing

WO 02/077174

PCT/US02/08811

206

heterodimer, determined by sequencing were pooled and concentrated to 50 ml using a YM30 Stirred Cell Membrane (Millipore). The 50 ml eluate from the NiNTA column was loaded onto a 318 ml Superdex 200 HiLoad 26/60 Column (Pharmacia). The column was eluted with PBS pH 7.2 at 3 ml/ min.. Protein containing fractions were

5 pooled to eliminate aggregates, as determined by SEC MALS analysis.

Purified proteins were analyzed by N-terminal sequencing, amino acid analysis, and SEC-MALS. Binding affinities and biological activities were determined.

Example 30

10 Comparison of Zcytor16-Fc4 activity with CRF2-4/Zcytor11-Fc4 activity using

BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells in an Alamar Blue Proliferation Assay

BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells described herein were spun down and washed in PBS 2 times to ensure the removal of the mIL-3, and then spun a third time and re-suspended in the complete media (RPMI 1640, 10%FBS, 1% GlutaMAX, 1% Sodium Pyruvate), but without mIL-3 (hereinafter referred to as "mIL-3 free media").

15 Cells were then counted in a hemocytometer. Cells were plated in a 96-well format at 5000 cells per well in a volume of 100 μ l per well using the mIL-3 free media.

IL-TIF protein (SEQ ID NO:15) was diluted to 200 pg/ml in mIL-3 free media. Zcytor16-Fc4 fusion protein (described herein) was diluted to 1 μ g/ml in the mIL-3 free/IL-TIF media on the top row of the plate, and then diluted serially 1:2 down

20 the remaining 7 rows on the 96-well plate, leaving a volume of 100 μ l in each well. This was then added to the 100 μ l of cells, for a final IL-TIF concentration of 100 pg/ml in all wells, and final Zcytor16-Fc4 concentrations of approximately 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.063, 0.31, 0.016, and 0.008 μ g/ml in a total assay volume of 200 μ l. CRF2-

25 4/zcytor11-Fc4 was diluted to 8 μ g/ml in the mIL-3 free/IL-TIF media on the top row of the plate, and then diluted serially 1:2 down the remaining 7 rows on the 96-well plate, leaving a volume of 100 μ l in each well. This was then added to the 100 μ l of cells, for a final IL-TIF concentration of 100 pg/ml in all wells, and final CRF2-4/zcytor11-Fc4 concentrations of approximately 8, 4, 2, 1, .05, 0.25, 0.125 and 0.063 μ g/ml, in a total

30 assay volume of 200 μ l. The assay plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 4 days at which time Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) was added at 20 μ l/well. Plates

WO 02/077174

PCT/US02/08811

207

were again incubated at 37°C, 5% CO₂ for 16 hours. Alamar Blue gives a fluorometric readout based on number of live cells, and is thus a direct measurement of cell proliferation in comparison to a negative control. Plates were read on the Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland) at wavelengths 530 (Excitation) and 590 (Emmssion). Results showed a strong dose-dependant inhibition of the proliferative effect of IL-TIF on BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells by Zcytor16-Fc4. CRF2-4/zcytor11-Fc4 showed a much weaker inhibition of IL-TIF. IL-TIF alone stimulated the cells 13-fold over background. Zcytor16 completely inhibited that proliferation at concentrations from 0.025-1 µg/ml, and partially inhibited proliferation at all the remaining concentrations down to 8 ng/ml. CRF2-4/zcytor11-Fc4 was only able to completely inhibit proliferation at the highest concentration of 8 µg/ml, it partially inhibited proliferation at 0.125-4 µg/ml, and inhibition was barely detectable at the lowest concentration of 63 ng/ml.

Example 31

Zcytor16 Decreases IL-6 and SAA Levels in Mouse Collagen Induced Arthritis (CIA)

Model

A. Mouse Collagen Induced Arthritis (CIA) Model

Ten week old male DBA/1J mice (Jackson Labs) were divided into 3 groups of 13 mice/group. On day-21, animals were given a subcutaneous injection of 50-100 µl of 1mg/ml chick Type II collagen formulated in Complete Freund's Adjuvant (prepared by Chondrex, Redmond, WA), and three weeks later on Day 0 they were given a 100 µl (25µg) injection of LPS from E. coli 0111:B4, prepared as 250 µg/ml from a lyophilized aliquot (Sigma, St. Louis, MO). Zcytor16 was administered as an intraperitoneal injection 3 times a week for 4 weeks, from Day 0 to Day 25. The first two groups received either 100 or 10 µg of zcytor16 per animal per dose, and the third group received the vehicle control, PBS (Life Technologies, Rockville, MD). Animals began to show symptoms of arthritis following the LPS injection, with most animals developing inflammation within 2-3 weeks. The extent of disease was evaluated in each paw by using a caliper to measure paw thickness, and by assigning a clinical score

WO 02/077174

PCT/US02/08811

208

(0-3) to each paw: 0=Normal, 0.5=Toe(s) inflamed, 1=Mild paw inflammation, 2=Moderate paw inflammation, and 3=Severe paw inflammation as detailed below.

Monitoring Disease:

Animals can begin to show signs of paw inflammation soon after the second collagen injection, and some animals may even begin to have signs of toe inflammation prior to the second collagen injection. Most animals develop arthritis within 2-3 weeks of the boost injection, but some may require a longer period of time. Incidence of disease in this model is typically 95-100%, and 0-2 non-responders (determined after 6 weeks of observation) are typically seen in a study using 40 animals. Note that as inflammation begins, a common transient occurrence of variable low-grade paw or toe inflammation can occur. For this reason, an animal is not considered to have established disease until marked, persistent paw swelling has developed.

All animals were observed daily to assess the status of the disease in their paws, which was done by assigning a qualitative clinical score to each of the paws. Every day, each animal has its 4 paws scored according to its state of clinical disease. To determine the clinical score, the paw can be thought of as having 3 zones, the toes, the paw itself (manus or pes), and the wrist or ankle joint. The extent and severity of the inflammation relative to these zones was noted including observation all the toes for any joint swelling, torn nails, or redness, notation of any evidence of edema or redness in any of the paws, and notation any loss of fine anatomic demarcation of tendons or bones, and evaluation the wrist or ankle for any edema or redness, and notation if the inflammation extends proximally up the leg. A paw a score of 1, 2, or 3 was based first on the overall impression of severity, and second on how many zones were involved. The scale used for clinical scoring is shown below.

Clinical Score:

0 = Normal

0.5 = One or more toes involved, but only the toes are inflamed

1 = mild inflammation involving the paw (1 zone), and may include a

30 toe or toes

WO 02/077174

PCT/US02/08811

209

2 = moderate inflammation in the paw & may include some of the toes and/or the wrist/ankle (2 zones)

3 = severe inflammation in the paw, wrist/ankle, and some or all of the toes (3 zones)

5 Established disease is defined as a qualitative score of paw inflammation ranking 2 or more, that persists overnight (two days in a row). Once established disease is present, the date is recorded and designated as that animal's first day with "established disease".

10 Blood was collected throughout the experiment to monitor serum levels of anti-collagen antibodies. Animals were euthanized on Day 21, and blood was collected for serum and for CBC's. From each animal, one affected paw was collected in 10%NBF for histology and one was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C for mRNA analysis. Also, 1/2 spleen, 1/2 thymus, 1/2 mesenteric lymph node, one liver lobe and the left kidney were collected in RNAlater for RNA analysis, and 1/2 spleen, 15 1/2 thymus, 1/2 mesenteric lymph node, the remaining liver, and the right kidney were collected in 10% NBF for histology. Serum was collected and frozen at -80°C for immunoglobulin and cytokine assays.

 No statistically significant differences were found between the groups when the paw scores and measurements data were analyzed, although there was a suggestion that one treatment group receiving zcytor16 may have had a delay in the onset and progression of paw inflammation. There were no significant differences between the groups for changes in body weight, CBC parameters, or anti-collagen antibody levels. These early results indicate that zcytor16 does not adversely effect body weight, red or white blood cells, or antibody production, but may be able to 25 reduce inflammation. Further investigations into dosing, mechanism of action, and efficacy are under way.

B. Anti-collagen ELISA data in mouse CIA model

30 Serum samples were collected on days 0, 7, 14, 21 and 28 relative to date of LPS challenge (day 0) from the murine model of collagen induced arthritis (Example 31A above). The serum samples were screened by ELISA for anti-collagen

WO 02/077174

PCT/US02/08811

210

antibody titers. There were no statistically significant effects of zcytor16 treatment in 100 µg or 10 µg treatment groups on levels of anti-collagen antibodies compared with PBS controls. Below is a description of anti-collagen ELISA methods and materials.

Reagents used for anti-collagen ELISAs were Maxisorp 96-well
5 microtiter plates (NUNC, Rochester, NY), chick type-II collagen (Chondrex, Redmond, WA), Super Block (Pierce, Rockford, IL), horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-mouse IgG+A+M (H+L) (Zymed, South San Francisco, CA) and o-phenylenediamine dihydrochloride substrate (Pierce, Rockford, IL). Buffers used in all assays were ELISA B diluent buffer (PBS + 0.1% BSA + 0.05% Tween (Sigma, St.
10 Louis, MO)), ELISA C wash buffer (PBS + 0.05% Tween) and NovoD developing buffer (0.063M sodium citrate, 0.037M citric acid), H₂O₂ (Sigma) and 1N H₂SO₄ (VWR, Tukwilla, WA).

Approximately 100 µL of peripheral blood was collected by retro-orbital bleed into serum separator tubes (Becton Dickinson). Serum was collected by
15 centrifugation (2-3 min, 16,000 x g, 4-6°C) and stored at -20°C until analyzed. To determine anti-collagen Ig antibody levels, NUNC plates were coated with 10 µg/mL chick type-II collagen (Chondrex, Redmond WA) and incubated overnight at 4°C. Plates were washed with ELISA C, blocked (5 minutes, room temperature) with Super Block (Pierce, Rockford, IL), and washed with ELISA C. Diluted serum samples
20 (diluted in ELISA B 5-fold from 1:5000 to 1:625,000) were added to ELISA plates in triplicate and the plates were incubated overnight at 4°C. After incubation, the plates were washed with ELISA C, and peroxidase-labeled goat anti-mouse Ig Fc (Zymed, 1:2000 in ELISA B) was added. The plates were incubated (room temperature, 90 minutes), rinsed again using ELISA C, and HRP activity was developed using o-
25 phenylenediamine dihydrochloride substrate (10 mL NovoD + 1 tablet OPD + 10 µL H₂O₂, Pierce). The reaction was stopped with 1N H₂SO₄. Relative optical density measurements of serum samples at 1:25,000 dilution were taken at 490 nm using a Spectra MAX 190, and data were analyzed using SoftMax Pro software (Molecular Devices Corporation, Palo Alto, CA).

WO 02/077174

PCT/US02/08811

211

C. IL-6 and SAA analysis in mouse CIA model

Day 0 serum samples were harvested from CIA mice (Example 31A above) 4 hr post administration of 25 µg LPS intraperitoneally. Samples were screened for IL-6 and serum amyloid A (SAA) concentrations by commercial ELISA kits purchased for Biosource International (Camarillo, CA) as per manufacturer's instructions.

The IL-6 levels were 9651 +/- 1563 pg/ml, 10,865 +/- 1478 pg/ml and 15,006 +/- 2,099 pg/ml in the mice groups subjected to 100 µg zcytor16, 10 µg zcytor16 and PBS control, respectively. The IL-6 concentration in the group of CIA mice exposed to the 100 µg dose of zcytor16 was significantly lower compared to PBS control mice with $p = 0.0351$. Statistical significance was calculated using Fisher's PLSD with a significance level of 5% (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA).

In addition, SAA concentrations were 381 +/- 40 µg/ml, 348 +/- 37 µg/ml and 490 +/- 50 µg/ml in the mice groups subjected to 100 µg zcytor16, 10 µg zcytor16 and PBS control groups, respectively. The SAA concentration in the group of CIA mice exposed to the 10 µg dose of zcytor16 was significantly lower compared with PBS control mice with $p = 0.0257$. Statistical significance was calculated using Fisher's PLSD with a significance level of 5% (ABACUS Concepts, INC, Berkeley, CA).

Example 32Expression of IL-1/TIF receptor, Zcytor11, in the DSS mouse model

Quantitative RT-PCR was performed to measure expression levels of mouse zcytor11 in the colons of mice with DSS-induced IBD (Example 27). RNA was isolated from normal mouse colon and from the distal colons of DSS-treated mice from treatment days 2, 7 and 10. RT-PCR was performed using Applied Biosystems 7700 TaqMan instrument and protocols. Briefly, "Primer Express" software was used to designed primers against the mouse zcytor11 sequence (ZC39776 (SEQ ID NO:53) and ZC39777 (SEQ ID NO:54)) and a FAM/TAMRA labeled TaqMan probe (ZC38752 (SEQ ID NO:55)) according to Applied Biosystems guidelines. 25ng of RNA was added to each reaction, along with PE/Applied Biosystems TaqMan EZ RT-PCR Core Reagents and the above mentioned primers and probe. RT-PCR reactions were run in duplicate under the following conditions: 50°C for 2 minutes, 60°C for 30 minutes,

WO 02/077174

PCT/US02/08811

212

95°C for 5 minutes, 40 cycles of 94°C for 20 seconds and 60°C for 1 minute. Expression values were compared to a standard curve of known numbers of molecules of a synthetic mouse zcytor11 RNA transcript, and expression is reported as absolute number of molecules of mouse zcytor11 per reaction. Preliminary data suggests that mouse zcytor11 expression may be slightly down-regulated in the distal colons of day 7 and day 10 mice with DSS-induced IBD when compared to expression levels in normal mouse colon.

Example 33

- 10 IL-TIF and Proinflammatory Indicators in mild endotoxemia model: LPS-induced endotoxemia mouse model
- A. LPS-induced endotoxemia mouse model: Assessment proinflammatory cytokines and body temperature in the LPS-induced endotoxemia mouse model
- 15 An *in vivo* experiment was designed to examine the effect of zcytor16 in a mouse LPS model of mild endotoxemia. To initially assess the model, we measured proinflammatory cytokines and body temperature to collect reference data for the model.
- Briefly, six month Balb/c (CRL) female mice were injected with 25 µg LPS (Sigma) in sterile PBS intraperitoneally (IP). Serum samples were collected at 0, 1, 20 4, 8, 16, 24, 48 and 72 hr from groups of 8 mice for each time point. Serum samples were assayed for inflammatory cytokine levels. IL-1b, IL-6, TNFa, IL-10 and serum amyloid A protein (SAA) levels were measured using commercial ELISA kits purchased from Biosource International (Camarillo, CA).
- 25 TNFa levels peaked to 4000pg/ml and IL-10 levels were 341 pg/ml at 1 hr post LPS injection. At 4 hr post LPS injection, IL-6, IL-1b and IL-10 were 6,100 pg/ml, 299 pg/ml and 229 pg/ml, respectively. The SAA levels in serum were 0.405 mg/ml by 4 hr post LPS injection. SAA concentrations in serum continued to increase to 3.9 mg/ml by 24 hr post LPS, however SAA levels greater than 1 to 2 mg/ml in serum are difficult to measure accurately or reproducibly with the existing ELISA kit
- 30 due to interactions between SAA and other serum components. These results indicated that proinflammatory cytokines, in addition to IL-TIF (Example 33B), were indeed

WO 02/077174

PCT/US02/08811

213

produced in this model. Thus the following criteria were established as biological markers for the LPS model of mild endotoxemia: TNF α serum levels 1 hr post LPS, IL-6 serum levels 4 hr post LPS and SAA serum levels 4 and 8 hr post LPS.

5 Body temperatures in a separate group of animals were monitored by surgically implanted telemetry devices over the course of the 72 hr experiment. Body temperatures in mice dropped maximally by 2°C from 37.07 °C to 34.98 °C 30 minutes after LPS injection.

10 Injection of 100 ug zcytor16-Fc fusion protein 30 minutes prior to the LPS injection significantly reduced about 50% of the SAA induction at 4hr and 8hr time point, while 10 ug zcytor16-Fc did not have significant effect. There is no significant change to the TNF-alpha and IL-6 level. Zcytor16-Fc injection reduced neutrophil count in circulation at 1hr time point. It showed the administration of zcytor16-Fc can neutralize zcyto18 activity in terms of SAA induction.

15 B. Detection of IL-TIF Activity in Mouse Serum from LPS-induced endotoxemia mouse model using BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells in an Alamar Blue Proliferation Assay

20 BaF3/CRF2-4/zcytor11 cells, described herein, were spun down and washed in PBS 2 times to ensure the removal of the mIL-3, and then spun a third time and re-suspended in the complete media (RPMI 1640, 10%FBS, 1% GlutaMAX, 1% Sodium Pyruvate), but without mIL-3 (hereinafter referred to as "mIL-3 free media"). Cells were then counted in a hemocytometer. Cells were plated in a 96-well format at 5000 cells per well in a volume of 100 μ l per well using the mIL-3 free media.

25 Serum from the LPS-induced endotoxemia mice from the experiment described in Example 33A above, was diluted to 2% in mIL-3 free media on the top row of the plate and then diluted serially 1:2 down the remaining 7 rows on the 96-well plate, leaving a volume of 100 μ l in each well. This was then added to the 100 μ l of cells, for final serum concentrations of 1%, 0.5%, 0.25%, 0.125%, 0.063%, 0.031%, 0.016%, and 0.018% in a total assay volume of 200 μ l. The assay plates were incubated at 37°C, 5% CO₂ for 4 days at which time Alamar Blue (Accumed, Chicago, IL) was
30 added at 20 μ l/well. Plates were again incubated at 37°C, 5% CO₂ for 16 hours. Alamar Blue gives a fluourometric readout based on number of live cells, and is thus a

WO 02/077174

PCT/US02/08811

214

direct measurement of cell proliferation in comparison to a negative control. Plates were read on the Wallac Victor 2 1420 Multilabel Counter (Wallac, Turku, Finland) at wavelengths 530 (Excitation) and 590 (Emmssion).

Results showed no significant proliferation above background levels in the 0 hour, 1 hour, 8 hour, and 16 hour time points. Serum samples from the 4 hour time point showed 4-fold to greater than 10-fold increases in proliferation above background, indicating the presence of IL-TIF in those samples.

C. LPS-induced endotoxemia mouse model: Experiment to assess effects of zcytor16

The ability of zcytor16 treatment to effect proinflammatory indicators induced with a single 25 µg LPS dose IP in mice was tested. All samples were analyzed for SAA, IL-TIF and circulating neutrophil counts. Subsets from each group were analyzed for particular cytokine levels (1 hour samples were screened for TNF alpha, 4 hour samples were analyzed for IL-6). Animals were sacrificed at indicated time points in Table 14 below and whole blood and serum were collected and aliquoted for analysis.

72 Bl/6 female mice (CRL) were given a single IP dose of zcytor16 as described in Table 14, below. Control mice were C57Bl/6 (CRL).

30 minutes later, they received another IP injection of 25 µg LPS (Sigma) in 100 µl, to initiate an endotoxemia cascade. Mice in each group were sacrificed at corresponding time points as indicated in Table 14, 50 µl whole blood were collected to measure total numbers of circulating neutrophils and the rest were spun for serum and aliquoted for various assays described herein.

Table 14

Group	No	Treatment	LPS	Sacrifice	Samples

WO 02/077174

PCT/US02/08811

215

A	8	100µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	1 hour	Serum aliquots Blood for CBC
B	8	10µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	1 hour	Serum aliquots Blood for CBC
C	8	200µl PBS IP	25µg IP 30min post tx	1 hour	Serum aliquots Blood for CBC
D	8	100µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	4 hours	Serum aliquots Blood for CBC
E	8	10µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	4 hours	Serum aliquots Blood for CBC
F	8	200µl PBS IP	25µg IP 30min post tx	4 hours	Serum aliquots Blood for CBC
G	8	100µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	8 hours	Serum aliquots Blood for CBC
H	8	10µg zcytor16 IP	25µg IP 30min post tx	8 hours	Serum aliquots Blood for CBC
J	8	200µl PBS IP	25µg IP 30min post tx	8 hours	Serum aliquots Blood for CBC
K	5	controls	none	Pre LPS	Serum aliquots Blood for CBC

D. Zcytor16/Fc4 neutralizes SAA induction *in vivo*: SAA ELISA showing SAA Expression induced by LPS in LPS-induced endotoxemia mouse model is inhibited by zcytor16-Fc4 injection:

To assess whether zcytor16 could inhibit the SAA induction in the LPS-induced endotoxemia mouse model, mice were injected with Zcytor16, 30 minutes prior to LPS injection, as shown in Table 14 in Example 33C above.

An ELISA to determine SAA levels in the 4 hour and 8 hour samples was performed using the Mouse SAA Immunoassay Kit (BioSource International, California) following the manufacturer's directions. At the 4 hour time point, mice treated with 100µg or 10µg of Zcytor16 showed a dose-dependant, statistically significant reduction in SAA levels relative to the PBS injected mice. At the 8 hour time point, mice treated with 100µg, continued to show a statistically significant reduction in SAA levels relative to the PBS injected mice. This indicates that the presence of Zcytor16 is able to inhibit the induction of SAA by LPS *in vivo*.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

216

Example 34Baculovirus Expression of FlagTBXzCyt16

An expression vector, pzBV37L:egtNF(tbx)sCyt16, was designed and prepared to express FlagTBXzCyt16 polypeptides in insect cells.

5 Expression of FlagTBXzCyt16

An expression vector, pzBV37L:egtNF(tbx)sCyt16 was designed to express zCyt16 polypeptide with an upstream 6 amino acid thrombin cleavage site and an n-terminal Flag epitope tag upstream of the enzyme cleavage site. This construct can be used to express a flag tagged zCyt16 with an enzyme processing site directly
10 upstream of the soluble receptor sequence, after the signal peptide has been cleaved off.

A. Construction of pzBV37L:egtNF(tbx)sCyt16

A 698 bp, FlagTBXzCyt16 sequence fragment containing BspEI and XbaI restriction sites on the 5' and 3' ends, respectively, was generated by two rounds of PCR amplification from a zCyt16 cDNA containing template. Primers ZC40,940
15 (SEQ ID NO:56) and ZC40,943 (SEQ ID NO:57) were used in the first round and primers ZC40942 (SEQ ID NO:58) and ZC40,943 (SEQ ID NO:57) in the second round. For the first round of PCR, reaction conditions were as follows: utilized the Expand High Fidelity PCR System (Boehringer Mannheim) for a 100ul vol. reaction. 1 cycle at 94°C for 2 minutes; 35 cycles of 94°C for 15 seconds, 50°C for 30 seconds,
20 and 72°C for 60 seconds; 1 cycle at 72°C for 5 min; followed by 4°C soak. 5ul of the first round reaction mix was visualized by gel electrophoresis (1% NuSieve agarose). Once the presence of a correct size PCR product was confirmed, the second round of PCR was set up using 1ul of the first round reaction as template. Conditions of the second reaction were the same as the first. 5ul of the second round PCR was visualized
25 by gel electrophoresis (1% NuSieve agarose). The remainder of the reaction mix was purified via Qiagen PCR purification kit as per manufacturers instructions and eluted in 30ul water. The cDNA was digested in a 35 ul vol. using BspEI and XbaI (New England Biolabs, Beverly, MA) in appropriate buffer conditions at 37 degrees C. The digested PCR product band was run through a 1% agarose TAE gel, excised and
30 extracted using a QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen, Cat. No. 28704) and eluted in

WO 02/077174

PCT/US02/08811

217

30ul of water . The digested FlagTBXzCytol16 PCR was ligated into the MCS of vector pZBV37L at the Bspel and XbaI sites. The pZBV37L vector is a modification of the pFastBac1™ (Life Technologies) expression vector, where the polyhedron promoter has been removed and replaced with the late activating Basic Protein

5 Promoter and the EGT leader signal sequence upstream of the MCS. 5ul of the restriction enzyme digested FlagTBXzCytol16 PCR fragment and apx. 50 ng of the corresponding pZBV37L vector were ligated overnight at 16°C in a 20 ul vol. in appropriate buffer conditions. 5 ul of the ligation mix was transformed into 50 ul of ElectroMAX™ DH12s™ cells (Life Technologies, Cat. No. 18312-017) by

10 electroporation at 400 Ohms, 2V and 25 μF in a 2mm gap electroporation cuvette (BTX, Model No. 620). The transformed cells were diluted in 350μl of SOC media (2% Bacto Tryptone, 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ and 20 mM glucose) outgrown for 1hr at 37 degrees C and 50 μl of the dilution were plated onto LB plates containing 100 μg/ml ampicillin. Clones

15 were analyzed by PCR and positive clones were selected, plated and submitted for sequencing. Once proper sequence was confirmed, 25 ngs of positive clone DNA was transformed into 100 μl DH10Bac™ Max Efficiency® competent cells (GIBCO-BRL Cat. No. 10361-012) by heat shock for 45 seconds in a 42°C heat block. The transformed DH10Bac™ cells were diluted in 900 μl SOC media (2% Bacto Tryptone,

20 0.5% Bacto Yeast Extract, 10 ml 1M NaCl, 1.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ and 20 mM glucose) outgrown for 1hr at 37 degrees C and 100μl were plated onto Luria Agar plates containing 50 μg/ml kanamycin, 7 μg/ml gentamicin, 10 μg/ml tetracycline, 40 μg/mL IPTG and 200 μg/mL Blueo Gal. The plates were incubated for 48 hours at 37°C. A color selection was used to identify those cells having transposed

25 viral DNA (referred to as a "bacmid"). Those colonies, which were white in color, were picked for analysis. Colonies were analyzed by PCR and positive colonies (containing desired bacmid) were selected for outgrow. Clones were screened for the correct M.W. insert by amplifying DNA using primers to the transposable element in the bacmid via PCR using primers ZC447 (SEQ ID NO:34) and ZC976 (SEQ ID NO:7). The PCR

30 reaction conditions were as follows: 1 cycle at 94°C for 2 minutes; 25 cycles of 94°C for 10 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 120 seconds; 1 cycle at 72°C for 5

WO 02/077174

PCT/US02/08811

218

min; followed by 4°C soak. The PCR product was run on a 1% agarose gel to check the insert size. Those having the correct size insert were outgrown and the bacmid DNA isolated and purified. This bacmid DNA was used to transfect *Spodoptera Frugiperda* (Sf9) cells.

5 B. Transfection

Sf9 cells were seeded at 1×10^6 cells per well in a 6-well plate and allowed to attach for 1 hour at 27°C. Approximately five µg. of bacmid DNA were diluted with 100 µl Sf-900 II SFM (Life Technologies). Twenty µl of Lipofectamine™ Reagent (Life Technologies, Cat. No. 18324-012) were diluted with 100 µl Sf-900 II SFM. The bacmid DNA and lipid solutions were gently mixed and incubated 45 minutes at room temperature. Eight hundred microliters of Sf-900 II SFM was added to the lipid-DNA mixture. The media was aspirated from the well and the 1 ml of DNA-lipid mix added to the cells. The cells were incubated at 27°C overnight. The DNA-lipid mix was aspirated and 2 ml of Sf-900 II media was added to each plate. The plates were incubated at 27°C, 90% humidity, for approximately 7 days after which the virus was harvested.

C. Amplification

Sf9 cells were seeded at 1×10^6 cells per well in a 6-well plate in 2mls SF-900II. 500 µl of virus from the transfection plate were placed in the well and the plate was incubated at 27°C, 90% humidity, for 96 hours after which the virus was harvested (primary amplification).

A second round of amplification proceeded as follows: Sf9 cells were seeded at 1×10^6 cells per well in a 6-well plate in 2mls SF-900II. 100 µl of virus from the primary amplification plate were placed in the well and the plate was incubated at 27°C, 90% humidity, for 144 hours after which the virus was harvested (Secondary amplification).

An additional round of amplification was performed (3rd round amp.) Sf9 cells were grown in 50 ml Sf-900 II SFM in a 250 ml shake flask to an approximate density of 1×10^6 cells/ml. They were then infected with 1mL of the viral stock from the above plate and incubated at 27°C for 4 days after which time the virus was harvested.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

219

This viral stock was titered by a growth inhibition curve and the titer culture that indicated a MOI of 1 was allowed to proceed for a total of 48hrs. The supernatant was analyzed via Western blot using a primary monoclonal antibody specific for the n-terminal Flag epitope and a HRP conjugated Gt anti Mu secondary antibody. Results indicated a band of apx. 30 kDa. Supernatant was also provided for activity analysis.

A large viral stock was then generated by the following method: Sf9 cells were grown in 1L Sf-900 II SFM in a 2800 ml shake flask to an approximate density of 1×10^6 cells/ml. They were then infected with 5 mls of the viral stock from the 3rd round amp. and incubated at 27°C for 96hrs after which time the virus was harvested.

Larger scale infections were completed to provide material for downstream purification.

From the foregoing, it will be appreciated that, although specific embodiments of the invention have been described herein for purposes of illustration, 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 02/077174

PCT/US02/08811

220

CLAIMS

I claim:

1. An isolated polypeptide comprising an amino acid sequence from the group of:
 - (a) amino acid residues 28 to 127;
 - (b) amino acid residues 132 to 231;
 - (c) amino acid residues 28 to 231;
 - (d) amino acid residues 23 to 230;
 - (e) amino acid residues 23 to 231; and
 - (f) amino acid residues 22 to 230;.
2. The isolated polypeptide of claim 1, wherein the polypeptide consists of an amino acid sequence from the group of:
 - (a) amino acid residues 28 to 127;
 - (b) amino acid residues 132 to 231;
 - (c) amino acid residues 28 to 231;
 - (d) amino acid residues 23 to 230;
 - (e) amino acid residues 23 to 231; and
 - (f) amino acid residues 22 to 230.
3. The isolated polypeptide of claim 1, wherein the isolated polypeptide comprises either amino acid residues amino acid residues 28 to 231 of SEQ ID NO:2.
4. 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:3, 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 64, 67, 82, or 94 to 693 of SEQ ID NO:1, or the complement of the nucleotide sequence of nucleotides 64, 67, 82, or 94 to 693 of SEQ ID NO:1; or (c) SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37, or the complement of the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:37.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

221

5. The isolated nucleic acid molecule of claim 4, wherein any difference between the amino acid sequence encoded by the nucleic acid molecule and the corresponding amino acid sequence of SEQ ID NO:3 is due to a conservative amino acid substitution.

6. The isolated nucleic acid molecule of claim 4, comprising the nucleotide sequence of nucleotides 64 to 693, or 82 to 693 of SEQ ID NO:1.

7. A vector, comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 6.

8. An expression vector, comprising the isolated nucleic acid molecule of claim 6, 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.

9. A recombinant host cell comprising the expression vector of claim 8, wherein the host cell is from the group of bacterium, yeast cell, fungal cell, insect cell, mammalian cell, and plant cell.

10. A method of producing a protein, the method comprising culturing recombinant host cells that comprise the expression vector of claim 8, and that produce the protein.

11. The method of claim 10, further comprising isolating the protein from the cultured recombinant host cells.

12. An antibody or antibody fragment that specifically binds with the polypeptide of claim 2.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

222

13. The antibody of claim 12, wherein the antibody is from the group of: (a) polyclonal antibody, (b) murine monoclonal antibody, (c) humanized antibody derived from (b), (d) an antibody fragment, and (e) human monoclonal antibody.

14. An anti-idiotypic antibody that specifically binds with the antibody of claim 12.

15. A fusion protein, comprising the polypeptide of claim 2.

16. The fusion protein of claim 15, wherein the fusion protein further comprises an immunoglobulin moiety.

17. An isolated polynucleotide that encodes a soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 28 to 231, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex; and wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide sequence binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

18. An isolated polynucleotide according to claim 17, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide further comprises a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

19. An isolated polynucleotide according to claim 17, 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).

20. An isolated polynucleotide according to claim 17, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further encodes an intracellular domain.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

223

21. An isolated polynucleotide according to claim 17, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further comprises an affinity tag.

22. 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:2 from amino acid 28 to 231; 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.

23. An expression vector according to claim 22, further comprising a secretory signal sequence operably linked to the first and second DNA segments.

24. An expression vector according to claim 22, 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).

25. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 22, wherein the cell expresses the polypeptides encoded by the DNA segments.

26. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 22, 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

224

27. A cultured cell into which has been introduced an expression vector according to claim 22, wherein the cell expresses a heterodimeric or multimeric soluble receptor polypeptide encoded by the DNA segments.

28. A cell according to claim 25, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex.

29. A cell according to claim 25, wherein the cell secretes a soluble cytokine receptor polypeptide heterodimer or multimeric complex that binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

30. 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:2 from amino acid 28 to 231; 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.

31. A DNA construct encoding a fusion protein according to claim 30, wherein at least one other 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).

32. An expression vector comprising the following operably linked elements:

a transcription promoter;

a DNA construct encoding a fusion protein according to claim 30; 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.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

225

33. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 32, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA construct.

34. A method of producing a fusion protein comprising:
culturing a cell according to claim 33; and
isolating the polypeptide produced by the cell.

35. An isolated soluble cytokine receptor polypeptide comprising a sequence of amino acid residues as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 28 to 231, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex; and wherein the soluble cytokine receptor polypeptide encoded by the polynucleotide sequence binds IL-TIF or antagonizes IL-TIF activity.

36. An isolated polypeptide according to claim 35, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide forms a heterodimeric or multimeric receptor complex further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor.

37. An isolated polypeptide according to claim 35, 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).

38. An isolated polypeptide according to claim 35, wherein the soluble cytokine receptor polypeptide further comprises an affinity tag, chemical moiety, toxin, or label.

39. 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:2 from amino acid 28 to 231.

WO 02/077174

PCT/US02/08811

226

40. An isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex according to claim 39, further comprising a soluble Class I or Class II cytokine receptor polypeptide.

41. An isolated heterodimeric or multimeric soluble receptor complex according to claim 39, 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).

42. A method of producing a soluble cytokine receptor polypeptide that form a heterodimeric or multimeric complex comprising:
culturing a cell according to claim 25; and
isolating the soluble receptor polypeptides produced by the cell.

43. 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:2 from amino acid 28 to 231;

(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 02/077174

PCT/US02/08811

227

wherein the polypeptide elicits an immune response in the animal to produce the antibody; and

isolating the antibody from the animal.

44. An antibody produced by the method of claim 43, which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex comprising a polypeptide as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 28 to 231.

45. The antibody of claim 44, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

46. An antibody which specifically binds to a homodimeric, heterodimeric or multimeric receptor complex according to claim 39.

47. 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:2 from amino acid 28 to 231, 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.

48. The method of claim 47, wherein the hematopoietic cells and hematopoietic progenitor cells are lymphoid cells.

49. The method of claim 48, wherein the lymphoid cells are macrophages or T cells.

50. 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 02/077174

PCT/US02/08811

228

polypeptide as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid 28 to 231 sufficient to reduce inflammation.

51. 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 cytokine receptor polypeptide according to claim 35 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.

52. 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 12 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.

53. A method of treating a mammal afflicted with an inflammatory disease in which IL-TIF or serum amyloid A plays a role, comprising:

- administering an antagonist of IL-TIF or serum amyloid A to the mammal such that the inflammation is reduced, wherein the antagonist is from the group of:
- (a) a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:2;

WO 02/077174

PCT/US02/08811

229

- (b) a soluble receptor comprising a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:34;
- (c) an antibody that specifically binds a polypeptide or cytokine binding domain fragment of SEQ ID NO:2; and
- (d) an antibody or binding polypeptide that specifically binds a polypeptide or polypeptide fragment of IL-TIF (SEQ ID NO:15).

54. A method of claim 53, wherein the disease is a chronic inflammatory disease.

55. A method of claim 54, wherein the disease is a chronic inflammatory disease from the group of:

- (a) inflammatory bowel disease;
- (b) ulcerative colitis;
- (c) Crohn's disease;
- (d) arthritis; and
- (e) psoriasis.

56. A method of claim 53, wherein the disease is an acute inflammatory disease.

57. A method of claim 56, wherein the disease is an acute inflammatory disease from the group of:

- (a) endotoxemia;
- (b) septicemia;
- (c) toxic shock syndrome; and
- (d) infectious disease.

58. A method of claim 53, wherein the antagonist soluble receptor comprising a polypeptide or cytokine binding domain fragment of zcytor11 (SEQ ID NO:34) further comprises a polypeptide or cytokine binding domain fragment of CRF2-4 (SEQ ID NO:35).

WO 02/077174

1/38

PCT/US02/08811

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> Human Cytokine Receptor

<130> 01-12

<150> US 60/279,222

<151> 2001-03-27

<160> 62

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 2149

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(693)

<400> 1

atg atg cct aaa cat tgc ttt cta ggc ttc ctc 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	
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	

WO 02/077174

2/38

PCT/US02/08811

```

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

gag aga tgt gtg gaa att cca tgacttgtg aatttgcat tcagcaatgt      723
Glu Arg Cys Val Glu Ile Pro
225             230

```

WO 02/077174

3/38

PCT/US02/08811

```

ggaaattcta aagctccctg agaacaggat gactcgtgtt tgaaggatct tatttaaaat 783
tggttttgta tttctttaa gcaatattca ctgttacacc ttggggactt ctttgtttat 843
ccattctttt atcctttata tttcatttta aactatattt gaacgacatt cccccgaaa 903
aattgaaatg taaagatgag gcagagaata aagtgttcta tgaatttcag aactttatft 963
ctgaatgtaa catccctaat aacaaccttc attcttctaa tacagcaaaa taaaaattta 1023
acaaccaagg aatagtattt aagaaaaatg tgaataaatt tttttaaatt agcattacag 1083
actgaggcgg tcctgaagca atgggttttc actctcttat tgagccaatt aaattgacat 1143
tgctttgaca atttaaaact tctataaagg tgaatatttt tcatacattt ctattttata 1203
tgaatatact ttttatatat ttattattat taaatatctt tacttaatga atcaaaattt 1263
tggttttaag tctactttat gtaataaaga acagggtttt gggaaaaaaa tcttatgatt 1323
tctggattga tatctgaatt aaaactatca acaaccaagg agtctactct gtacaattgt 1383
ccctcattta aaagatatat taagcttttc ttttctgttt gtttttgatt tgtttagttt 1443
ttaatcctgt cttagaagaa cttatcttta ttctcaaaat taaatgtaat ttttttagtg 1503
acaaagaaga aaggaaaact cattactcaa tcctctgggc caagagtgtc ttgcttggtg 1563
cgcttctctc atctctatat agggagatcc catgaatgat ggtttattgg gaactgctgg 1623
ggctgacccc atacagagaa ctgagcttga agctggaagc acacagtggg tagcaggaga 1683
aggaccggtg ttggtagggt cctacagaga ctatagagct agacaaagcc ctccaaactg 1743
gccccctctg ctactgacct ctcttgagta gaaatctggt gacctaaagg tcagtgcggt 1803
caacagaaag ctgcttctt cacttgaggc taagtcttca tatatgtta aggttgcttt 1863
tctagtgagg agatacatat cagagaacat ttgtacaatt ccccatgaaa attgctccaa 1923
agtgataaac aatatagtcg gtgcttctag ttatatgcaa gtactcagtg ataaatggat 1983
taaaaaatat tcagaaatgt attggggggt ggaggagaat aagaggcaga gcaagagcta 2043
gagaattggt ttcttggctt ccctgtatgc tcagaaaaca ttgatttgag catagacgca 2103
gagactgaaa aaaaaaaat gctcgagcgg ccgccatata ctgggt 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
 50            55            60
Lys Ile Tyr Gly Gln Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly
 65            70            75            80

```

WO 02/077174

4/38

PCT/US02/08811

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

<210> 3

<211> 693

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> This degenerate nucleotide sequence encodes the
amino acid sequence of SEQ ID NO:2.

<221> misc_feature

<222> (1)...(693)

<223> n = A,T,C or G

<400> 3

atgatgccna arcaytgytt yytnggntty ytnathwsnt tyttyytnac ngngngtngcn	60
ggnaacncarw snacncayga rwsnytnaar cncarmng tncarttyca rwsnmgnaay	120
ttycayaaya thytncartg gcarccnggn mgngcnytna cnggnaayws nwsngntay	180
tygtncart ayaarathta yggncarmgn cartggaara ayaargarga ytytggggn	240
acncargary twnstgyga yytnacnwsn garacnwsng ayathcarga rccntaytay	300
ggnmgngtnm gngcngcnws ngcnggnwsn taywsngant ggwsnatgac nccnmgntty	360
acncntggt gggaracnaa rathgayccn cngtnatga ayathacna rgtnaayggn	420
wsnytytng tnathtnca ygcncnaay ytnccntaym gntaycaraa rgaraaraay	480

WO 02/077174

5/38

PCT/US02/08811

gtwnsnathg argaytayta ygarytnytn taymgngtnt tyathathaa yaaywsnytn 540
 garaargarc araargtnnta ygargngngcn caymgngcng tngarathga rgnnytnacn 600
 cncaywsnw snhtaytygt ngtnngngar athtaycarg cnatgytnga ymgngnwnsn 660
 carmgngwnsg argarmngtg ygtngarath ccn 693

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Peptide linker.

<400> 4

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 5

<211> 699

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

gagcccagat cttcagacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaagccgag 60
 ggggcaccgt cagttcttct cttcccccca aaaccaagg acaccctcat gatctcccg 120
 acccttgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 180
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 240
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccctcc tgcaccagga ctggtggaat 300
 ggcaaggagt acaagtgcga ggtctccaac aaagccctcc catctccat cgagaaaaac 360
 atctccaaag ccaaaggcca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc ccatcccg 420
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgectgg tcaaagctt ctatccagc 480
 gacatgcgcg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 540
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 600
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 660
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaataa 699

<210> 6

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC29181

WO 02/077174

6/38

PCT/US02/08811

<400> 6
gcggatccac tcatgcaacg catgagtctc tg 32

<210> 7
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC29182

<400> 7
gcagatcttg gaatttcac 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
<212> PRT
<213> Homo sapiens

WO 02/07174

7/38

PCT/US02/08811

<400> 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

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Glu-Glu (CEE) Tag amino acid sequence

<400> 10
Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> FLAG Tag amino acid sequence

<400> 11
Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys
1 5

<210> 12
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> His Tag amino acid sequence

<400> 12
His His His His His His
1 5

WO 02/077174

8/38

PCT/US02/08811

<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

<220>

WO 02/077174

9/38

PCT/US02/08811

<221> CDS

<222> (21)...(557)

<400> 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
His Ile Gln Arg Asn Val Gln Lys Leu Lys Asp Thr Val Lys Lys Leu
    140              145              150              155

```

WO 02/077174

10/38

PCT/US02/08811

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
 taacccctt tccctgctag aaataacaat tagatgcccc aaagcgattt tttttaacca 647
 aaaggaagat ggaagccaa actccatcat gatgggtgga ttccaaatga acccctgcgt 707
 tagttacaaa gaaaccaat gccacttttg ttataagac cagaaggtag actttctaag 767
 catagatatt tattgataac atttcattgt aactgggtgt ctatacacag aaaacaattt 827
 attttttaa taattgtctt ttccataaa aaagattact ttccattcct ttaggggaaa 887
 aaaccctaa atagcttcat gttccataa tcagtacttt atatttataa atgtatttat 947
 tattattata agactgcatt ttatttatat cattttatta atatggattt atttatagaa 1007
 acatcattcg atattgtac ttgagtgtaa ggctaattat gatatttatg acaataatta 1067
 tagagctata acatgtttat ttgacctcaa taaacacttg gatataccta 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 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 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
 Leu Ser Thr Cys His Ile Glu Gly Asp Asp Leu His Ile Gln Arg Asn
 130 135 140

WO 02/077174

11/38

PCT/US02/08811

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
accaacaaaag 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
<211> 23
<212> DNA

WO 02/077174

12/38

PCT/US02/08811

<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

<210> 23

<211> 22

WO 02/07174

13/38

PCT/US02/08811

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<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 gggagggtc 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
 75 80 85

WO 02/07174

14/38

PCT/US02/08811

ctc acg gag ctc tac tat gcc agg gtc acc gct gtc agt gcg gga ggc Leu Thr Glu Leu Tyr Tyr Ala Arg Val Thr Ala Val Ser Ala Gly Gly 90 95 100	342
cgg tca gcc acc aag atg act gac agg ttc agc tct ctg cag cac act Arg Ser Ala Thr Lys Met Thr Asp Arg Phe Ser Ser Leu Gln His Thr 105 110 115	390
acc ctc aag cca cct gat gtg acc tgt atc tcc aaa gtg aga tcg att Thr Leu Lys Pro Pro Asp Val Thr Cys Ile Ser Lys Val Arg Ser Ile 120 125 130 135	438
cag atg att gtt cat cct acc ccc acg cca atc cgt gca ggc gat ggc Gln Met Ile Val His Pro Thr Pro Thr Ile Arg Ala Gly Asp Gly 140 145 150	486
cac cgg cta acc ctg gaa gac atc ttc cat gac ctg ttc tac cac tta His Arg Leu Thr Leu Glu Asp Ile Phe His Asp Leu Phe Tyr His Leu 155 160 165	534
gag ctc cag gtc aac cgc acc tac caa atg cac ctt gga ggg aag cag Glu Leu Gln Val Asn Arg Thr Tyr Gln Met His Leu Gly Gly Lys Gln 170 175 180	582
aga gaa tat gag ttc ttc ggc ctg acc cct gac aca gag ttc ctt ggc Arg Glu Tyr Glu Phe Phe Gly Leu Thr Pro Asp Thr Glu Phe Leu Gly 185 190 195	630
acc atc atg att tgc gtt ccc acc tgg gcc aag gag agt gcc ccc tac Thr Ile Met Ile Cys Val Pro Thr Trp Ala Lys Glu Ser Ala Pro Tyr 200 205 210 215	678
atg tgc cga gtg aag aca ctg cca gac cgg aca tgg acc tac tcc ttc Met Cys Arg Val Lys Thr Leu Pro Asp Arg Thr Trp Thr Tyr Ser Phe 220 225 230	726
tcc gga gcc ttc ctg ttc tcc atg ggc ttc ctc gtc gca gta ctc tgc Ser Gly Ala Phe Leu Phe Ser Met Gly Phe Leu Val Ala Val Leu Cys 235 240 245	774
tac ctg agc tac aga tat gtc acc aag ccg cct gca cct ccc aac tcc Tyr Leu Ser Tyr Arg Tyr Val Thr Lys Pro Pro Ala Pro Pro Asn Ser 250 255 260	822

WO 02/077174

15/38

PCT/US02/08811

ctg aac gtc cag cga gtc ctg act ttc cag ccg ctg cgc ttc atc cag Leu Asn Val Gln Arg Val Leu Thr Phe Gln Pro Leu Arg Phe Ile Gln 265 270 275	870
gag cac gtc ctg atc cct gtc ttt gac ctc agc ggc ccc agc agt ctg Glu His Val Leu Ile Pro Val Phe Asp Leu Ser Gly Pro Ser Ser Leu 280 285 290 295	918
gcc cag cct gtc cag tac tcc cag atc agg gtg tct gga ccc agg gag Ala Gln Pro Val Gln Tyr Ser Gln Ile Arg Val Ser Gly Pro Arg Glu 300 305 310	966
ccc gca gga gct cca cag cgg cat agc ctg tcc gag atc acc tac tta Pro Ala Gly Ala Pro Gln Arg His Ser Leu Ser Glu Ile Thr Tyr Leu 315 320 325	1014
ggg cag cca gac atc tcc atc ctc cag ccc tcc aac gtg cca cct ccc Gly Gln Pro Asp Ile Ser Ile Leu Gln Pro Ser Asn Val Pro Pro Pro 330 335 340	1062
cag atc ctc tcc cca ctg tcc tat gcc cca aac gct gcc cct gag gtc Gln Ile Leu Ser Pro Leu Ser Tyr Ala Pro Asn Ala Ala Pro Glu Val 345 350 355	1110
ggg ccc cca tcc tat gca cct cag gtg acc ccc gaa gct caa ttc cca Gly Pro Pro Ser Tyr Ala Pro Gln Val Thr Pro Glu Ala Gln Phe Pro 360 365 370 375	1158
ttc tac gcc cca cag gcc atc tct aag gtc cag cct tcc tcc tat gcc Phe Tyr Ala Pro Gln Ala Ile Ser Lys Val Gln Pro Ser Ser Tyr Ala 380 385 390	1206
cct caa gcc act ccg gac agc tgg cct ccc tcc tat ggg gta tgc atg Pro Gln Ala Thr Pro Asp Ser Trp Pro Pro Ser Tyr Gly Val Cys Met 395 400 405	1254
gaa ggt tct ggc aaa gac tcc ccc act ggg aca ctt tct agt cct aaa Glu Gly Ser Gly Lys Asp Ser Pro Thr Gly Thr Leu Ser Ser Pro Lys 410 415 420	1302
cac ctt agg cct aaa ggt cag ctt cag aaa gag cca cca gct gga agc	1350

WO 02/077174

16/38

PCT/US02/08811

His Leu Arg Pro Lys Gly Gln Leu Gln Lys Glu Pro Pro Ala Gly Ser	
425 430 435	
tgc atg tta ggt ggc ctt tct ctg cag gag gtg acc tcc ttg gct atg	1398
Cys Met Leu Gly Gly Leu Ser Leu Gln Glu Val Thr Ser Leu Ala Met	
440 445 450 455	
gag gaa tcc caa gaa gca aaa tca ttg cac cag ccc ctg ggg att tgc	1446
Glu Glu Ser Gln Glu Ala Lys Ser Leu His Gln Pro Leu Gly Ile Cys	
460 465 470	
aca gac aga aca tct gac cca aat gtg cta cac agt ggg gag gaa ggg	1494
Thr Asp Arg Thr Ser Asp Pro Asn Val Leu His Ser Gly Glu Glu Gly	
475 480 485	
aca cca cag tac cta aag ggc cag ctc ccc ctc ctc tcc tca gtc cag	1542
Thr Pro Gln Tyr Leu Lys Gly Gln Leu Pro Leu Leu Ser Ser Val Gln	
490 495 500	
atc gag ggc cac ccc atg tcc ctc cct ttg caa cct cct tcc ggt cca	1590
Ile Glu Gly His Pro Met Ser Leu Pro Leu Gln Pro Pro Ser Gly Pro	
505 510 515	
tgt tcc ccc tcg gac caa ggt cca agt ccc tgg ggc ctg ctg gag tcc	1638
Cys Ser Pro Ser Asp Gln Gly Pro Ser Pro Trp Gly Leu Leu Glu Ser	
520 525 530 535	
ctt gtg tgt ccc aag gat gaa gcc aag agc cca gcc cct gag acc tca	1686
Leu Val Cys Pro Lys Asp Glu Ala Lys Ser Pro Ala Pro Glu Thr Ser	
540 545 550	
gac ctg gag cag ccc aca gaa ctg gat tct ctt ttc aga ggc ctg gcc	1734
Asp Leu Glu Gln Pro Thr Glu Leu Asp Ser Leu Phe Arg Gly Leu Ala	
555 560 565	
ctg act gtg cag tgg gag tcc tgaggggaat gggaaaggct tgggtcttcc	1785
Leu Thr Val Gln Trp Glu Ser	
570	
tcctgtccc taccagtggt cacatccttg gctgtcaatc ccatgcctgc ccatgccaca	1845
cactctgcga tctggcctca gacgggtgcc cttgagagaa gcagagggag tggcatgcag	1905
ggcccttgcc atgggtgccc tcctcaccgg aacaaagcag catgataagg actgcagcgg	1965
gggagctctg gggagcagct tgtgtagaca agcgcgtgct cgctgagccc tgcaaggcag	2025

WO 02/077174

17/38

PCT/US02/08811

```

aatgacagt gcaaggagga aatgcaggga aactcccgag gtccagagcc ccacctccta 2085
acaccatgga ttcaaagtcg tcagggaatt tgctctctct tgcccattc ctggccagtt 2145
tcacaatcta gctcgacaga gcatgaggcc cctgctctct ctgtcattgt tcaaagtggt 2205
gaagagagcc tggaaaagaa ccaggcctgg aaagaacca gaaggaggct gggcagaacc 2265
agaacaacct gcacttctgc caaggccagg gccagcagga cggcaggact ctagggaggg 2325
gtgtggcctg cagctcattc ccagccaggg caactgctg acgttgccg atttcagctt 2385
cattctctg atagaacaaa gcgaaatgca ggtccaccag ggaggagag acacaagcct 2445
tttctgcagg caggagtctt agaccctatc ctgagaatgg ggtttgaaag gaaggtgagg 2505
gctgtggccc ctggacgggt acaataaac acgtgtactg tgtcacaact ttgcaagctc 2565
tgcttgggt tcagcccatc tgggctcaaa ttccagctc accactcaca agctgtgtga 2625
cttcaacaaa atgaatcag tgcccagaac ctcggtttcc tcattgttaa tgtggggatc 2685
ataacacctt cctcatggag ttgtgtgaa gatgaatga agtcattgtc ttaaagtgtc 2745
taatagtccc tggtagatgg gcagtgcaca ataaccgta gctattttaa aaaaaaaaaa 2805
aaaaaaaaa atagcgccg cctcga 2831

```

<210> 25

<211> 574

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 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
165         170         175

```

WO 02/077174

18/38

PCT/US02/08811

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 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 02/077174

19/38

PCT/US02/08811

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

<210> 26
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide linker ZC13252

<400> 26
ggcctgaaag cttcggataa tgaaggtacc tgtagaaa 39

<210> 27
<211> 27
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide linker ZC13453

<400> 27
ttaggatccg gcccttcccc agatact 27

<210> 28
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC28590

<400> 28
ttgggtacct ctgcaatggc cgcctgcag aaatct 36

<210> 29

WO 02/077174

20/38

PCT/US02/08811

<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC28580

<400> 29
ttgggatcca 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 02/077174

21/38

PCT/US02/08811

<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 02/077174

22/38

PCT/US02/08811

Thr Trp Thr
210

<210> 35
<211> 199
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 35

Met Val 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 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
1 5 10 15

WO 02/077174

23/38

PCT/US02/08811

Glu Ala Glu Phe Phe His His Ile Leu His Trp Thr Pro Ile Pro Asn
 20 25 30
 Gln Ser Glu Ser Thr Cys Tyr Glu Val Ala Leu Leu Arg Tyr Gly Ile
 35 40 45
 Glu Ser Trp Asn Ser Ile Ser Asn Cys Ser Gln Thr Leu Ser Tyr Asp
 50 55 60
 Leu Thr Ala Val Thr Leu Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Tyr Arg Ala
 65 70 75 80
 Arg Val Arg Ala Val Asp Gly Ser Arg His Ser Asn Trp Thr Val Thr
 85 90 95
 Asn Thr Arg Phe Ser Val Asp Glu Val Thr Leu Thr Val Gly Ser Val
 100 105 110
 Asn Leu Glu Ile His Asn Gly Phe Ile Leu Gly Lys Ile Gln Leu Pro
 115 120 125
 Arg Pro Lys Met Ala Pro Ala Asn Asp Thr Tyr Glu Ser Ile Phe Ser
 130 135 140
 His Phe Arg Glu Tyr Glu Ile Ala Ile Arg Lys Val Pro Gly Asn Phe
 145 150 155 160
 Thr Phe Thr His Lys Lys Val Lys His Glu Asn Phe Ser Leu Leu Thr
 165 170 175
 Ser Gly Glu Val Gly Glu Phe Cys Val Gln Val Lys Pro Ser Val Ala
 180 185 190
 Ser Arg Ser Asn Lys Gly Met Trp Ser Lys Glu Glu Cys Ile Ser Leu
 195 200 205
 Thr Arg Gln
 210

<210> 37

<211> 1618

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (237)...(932)

<400> 37

agtttcttca tctgtaacat caaatgaata ataataccaa tctcctagac ttcataagag 60
 gattaacaaa gacaaaatat gggaaaaaca taacatgggtg tcccataatt attagatctt 120
 attattgaca ctaaaatggc attaaaatta ccaaaaggaa gacagcatct gtttcctctt 180
 tggctctgag ctgggttaaaa ggaacactgg ttgcctgaac agtcacactt gcaacc atg 239
 Met

1

WO 02/077174

24/38

PCT/US02/08811

atg cct aaa cat tgc ttt cta ggc ttc ctc atc agt ttc ttc ctt act	287
Met Pro Lys His Cys Phe Leu Gly Phe Leu Ile Ser Phe Phe Leu Thr	
5 10 15	
ggg gta gca gga act cag tca acg cat gag tct ctg aag cct cag agg	335
Gly Val Ala Gly Thr Gln Ser Thr His Glu Ser Leu Lys Pro Gln Arg	
20 25 30	
gta caa ttt cag tcc cga aat ttt cac aac att ttg caa tgg cag cct	383
Val Gln Phe Gln Ser Arg Asn Phe His Asn Ile Leu Gln Trp Gln Pro	
35 40 45	
ggg agg gca ctt act ggc aac agc agt gtc tat ttt gtg cag tac aaa	431
Gly Arg Ala Leu Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr Lys	
50 55 60 65	
ata tat gga cag aga caa tgg aaa aat aaa gaa gac tgt tgg ggt act	479
Ile Tyr Gly Gln Arg Gln Trp Lys Asn Lys Glu Asp Cys Trp Gly Thr	
70 75 80	
caa gaa ctc tct tgt gac ctt acc agt gaa acc tca gac ata cag gaa	527
Gln Glu Leu Ser Cys Asp Leu Thr Ser Glu Thr Ser Asp Ile Gln Glu	
85 90 95	
cct tat tac ggg agg gtg agg gcg gcc tcg gct ggg agc tac tca gaa	575
Pro Tyr Tyr Gly Arg Val Arg Ala Ala Ser Ala Gly Ser Tyr Ser Glu	
100 105 110	
tgg agc atg acg ccg cgg ttc act ccc tgg tgg gaa aca aaa ata gat	623
Trp Ser Met Thr Pro Arg Phe Thr Pro Trp Trp Glu Thr Lys Ile Asp	
115 120 125	
cct cca gtc atg aat ata acc caa gtc aat ggc tct ttg ttg gta att	671
Pro Pro Val Met Asn Ile Thr Gln Val Asn Gly Ser Leu Leu Val Ile	
130 135 140 145	
ctc cat gct cca aat tta cca tat aga tac caa aag gaa aaa aat gta	719
Leu His Ala Pro Asn Leu Pro Tyr Arg Tyr Gln Lys Glu Lys Asn Val	
150 155 160	
tct ata gaa gat tac tat gaa cta cta tac cga gtt ttt ata att aac	767

WO 02/077174

25/38

PCT/US02/08811

Ser Ile Glu Asp Tyr Tyr Glu Leu Leu Tyr Arg Val Phe Ile Ile Asn
 165 170 175
 aat tca cta gaa aag gag caa aag gtt tat gaa ggg gct cac aga gcg 815
 Asn Ser Leu Glu Lys Glu Gln Lys Val Tyr Glu Gly Ala His Arg Ala
 180 185 190
 gtt gaa att gaa gct cta aca cca cac tcc agc tac tgt gta gtg gct 863
 Val Glu Ile Glu Ala Leu Thr Pro His Ser Ser Tyr Cys Val Val Ala
 195 200 205
 gaa ata tat cag ccc atg tta gac aga aga agt cag aga agt gaa gag 911
 Glu Ile Tyr Gln Pro Met Leu Asp Arg Arg Ser Gln Arg Ser Glu Glu
 210 215 220 225
 aga tgt gtg gaa att cca tga cttgtggaat ttggcattca gcaatgtgga 962
 Arg Cys Val Glu Ile Pro *
 230
 aattctaaag ctccctgaga acaggatgac tcgtgtttga aggatcttat ttaaaattgt 1022
 ttttgtattt tcttaaagca atattcactg ttacaccttg gggacttctt tgtttatcca 1082
 ttcttttatt ctttatattt catttgtaaa ctatatitga acgacattcc ccccgaaaaa 1142
 ttgaaatgta aagatgaggc agagaataaa gtgttctatg aaattcagaa ctttatttct 1202
 gaatgtaaca tccctaataa caaccttcac tcttctaata cagcaaaaata aaaatttaac 1262
 aaccaaggaa tagtatttaa gaaaatgttg aaataatttt tttaaaatag cattacagac 1322
 tgaggcggtc ctgaagcaat gggtttttcac tctcttattg agccaattaa attgacattg 1382
 ctttgacaat ttaaaacttc tataaagggtg aatatatttc atacatttct attttatatg 1442
 aatatacttt ttatatattt attattatta aatatittcta cttaatgaat caaaattttg 1502
 ttttaaagtc tactttatgt aaataagaac aggttttggg gaaaaaaac ttatgatttc 1562
 tggattgata tctgaattaa aactatcaac aacaaggaaa aaaaaaaaaa aaaaaa 1618
 <210> 38
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 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

WO 02/077174

26/38

PCT/US02/08811

Pro Gly Arg Ala Leu Thr Gly Asn Ser Ser Val Tyr Phe Val Gln Tyr
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

<210> 39

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> SXWS polypeptide motif

<221> VARIANT

<222> (1)...(4)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 39

Ser Xaa Trp Ser
1

<210> 40

<211> 18

WO 02/077174

27/38

PCT/US02/08811

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC27713

<400> 40

agctgccttc ttcacttg

18

<210> 41

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC27714

<400> 41

ttgctctgcc tcttattc

18

<210> 42

<211> 1050

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (5)...(589)

<400> 42

aaca ggc tct cct ctc act tat caa ctt ttg aca ctt gtg cga tgc gtg 49
 Gly Ser Pro Leu Thr Tyr Gln Leu Leu Thr Leu Val Arg Ser Val
 1 5 10 15

atg gct gtc ctg cag aaa tct atg agt ttt tcc ctt atg ggg act ttg 97
 Met Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu
 20 25 30

gcc gcc agc tgc ctg ctt ctc att gcc ctg tgg gcc cag gag gca aat 145
 Ala Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn
 35 40 45

gcg ctg ccc atc aac acc cgg tgc aag ctt gag gtg tcc aac ttc cag 193

WO 02/077174

28/38

PCT/US02/08811

Ala Leu Pro Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln
 50 55 60

cag ccg tac atc gtc aac cgc acc ttt atg ctg gcc aag gag gcc agc 241
 Gln Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser
 65 70 75

ctt gca gat aac aac aca gac gtc cgg ctc atc ggg gag aaa ctg ttc 289
 Leu Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe
 80 85 90 95

cga gga gtc agt gct aag gat cag tgc tac ctg atg aag cag gtg ctc 337
 Arg Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu
 100 105 110

aac ttc acc ctg gaa gac att ctg ctc ccc cag tca gac agg ttc cgg 385
 Asn Phe Thr Leu Glu Asp Ile Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Arg
 115 120 125

ccc tac atg cag gag gtg gtg cct ttc ctg acc aaa ctc agc aat cag 433
 Pro Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln
 130 135 140

ctc agc tcc tgt cac atc agt ggt gac gac cag aac atc cag aag aat 481
 Leu Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn
 145 150 155

gtc aga agg ctg aag gag aca gtg aaa aag ctt gga gag agc gga gag 529
 Val Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu
 160 165 170 175

atc aaa gcg atc ggg gaa ctg gac ctg ctg ttt atg tct ctg aga aat 577
 Ile Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn
 180 185 190

gct tgc gtc tga gcgagaagaa gctagaaaac gaagaactgc tccttcctgc 629
 Ala Cys Val *

ctcttaaaaa gaacaataag atccctgaat ggactttttt actaaaggaa agtgagaagc 689
 taacgtccac catcattaga agatttcaca tgaacctgg ctcagttgaa agagaaaata 749
 gtgtcaagtt gtccatgaga ccagaggtag acttgataac cacaagatt cattgacaat 809
 attttattgt cattgataat gcaacagaaa aagtatgtac tttaaaaat tgtttgaaag 869

WO 02/077174

29/38

PCT/US02/08811

```
gaggttacct ctcattcctc tagaagaaaa gcctatgtaa cttcatttcc ataaccaata 929
ctttatatat gtaagtttat ttattataag tatacatattt atttaigtca gtttattaat 989
atggatttat ttatagaaaa attatctgat gtgataattt gagtataaag caaataatat 1049
t 1050
```

<210> 43

<211> 194

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 43

```
Gly Ser Pro Leu Thr Tyr Gln Leu Leu Thr Leu Val Arg Ser Val Met
1      5      10      15
Ala Val Leu Gln Lys Ser Met Ser Phe Ser Leu Met Gly Thr Leu Ala
20     25     30
Ala Ser Cys Leu Leu Leu Ile Ala Leu Trp Ala Gln Glu Ala Asn Ala
35     40     45
Leu Pro Ile Asn Thr Arg Cys Lys Leu Glu Val Ser Asn Phe Gln Gln
50     55     60
Pro Tyr Ile Val Asn Arg Thr Phe Met Leu Ala Lys Glu Ala Ser Leu
65     70     75     80
Ala Asp Asn Asn Thr Asp Val Arg Leu Ile Gly Glu Lys Leu Phe Arg
85     90     95
Gly Val Ser Ala Lys Asp Gln Cys Tyr Leu Met Lys Gln Val Leu Asn
100    105    110
Phe Thr Leu Glu Asp Ile Leu Leu Pro Gln Ser Asp Arg Phe Arg Pro
115    120    125
Tyr Met Gln Glu Val Val Pro Phe Leu Thr Lys Leu Ser Asn Gln Leu
130    135    140
Ser Ser Cys His Ile Ser Gly Asp Asp Gln Asn Ile Gln Lys Asn Val
145    150    155    160
Arg Arg Leu Lys Glu Thr Val Lys Lys Leu Gly Glu Ser Gly Glu Ile
165    170    175
Lys Ala Ile Gly Glu Leu Asp Leu Leu Phe Met Ser Leu Arg Asn Ala
180    185    190
Cys Val
```

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/077174

30/38

PCT/US02/08811

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC39289

<400> 44

tccgaggagt caatgctaag 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC39280

<400> 45

tccaagcttt ttactgtct 20

<210> 46

<211> 684

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 46

```

atgaggacgc tgetgacat ctgactgtg ggatccctgg ctgctcacgc cctgaggac 60
ccctcggatc tgetccagca cgtgaaatc cagtcagca acctgaaa catcctgacg 120
tggaagacgc ggccagagg caccacagac acggtctaca gcacgagta taagacgtac 180
ggagagaggg actgggtggc aaagaagggc tgtcagcga tcaccggaa gtctgtcaac 240
ctgacggtgg agacgggcaa cctcacggag ctctactatg ccagggtcac cgtgtcagt 300
gcggggaggcc ggtcagccac caagatgact gacaggttca gctctctgca gcacactacc 360
ctcaagccac ctgatgtgac ctgtatctcc aaagttagat cgattcagat gattgttcat 420
cctaccacca cgccaatccg tgcagcgcgt gccaccggc taaccctgga agacattctc 480
catgacctgt tctaccactt agagctccag gtcaaccgca cctacaaat gcaccttggg 540
gggaagcaga gagaataiga gttcttcggc ctgacctctg acacagagtt ccttggcacc 600
atcatgattt gcgttccac ctgggccaag gagagtgcc cctacatgtg ccgagtgaag 660
acactgccag accggacatg gacc 684

```

<210> 47

<211> 660

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 47

atggcgtgga gtctggggag ctggctgggt ggctgcctgc tgggtgcagc attgggaatg 60

WO 02/077174

31/38

PCT/US02/08811

```

gtaccacctc ccgaaaatgt cagaatgaat tctgttaatt tcaagaacat tctacagtgg 120
gagtcacctg cttttgccaa agggaacctg actttcacag ctcagtacct aagttatagg 180
atatccaag ataaatgcat gaatactacc ttgacggaat gtgatttctc aagtctttcc 240
aagtatggtg accacacctt gagagtcagg gctgaatttg cagatgagca ttcagactgg 300
gtaaacatca ccttctgtcc tgtggtgac accattattg gacccccctg aatgcaagta 360
gaagtacttg atgattcttt acatatgctt ttcttagccc ctaaaattga gaatgaatac 420
gaaacttgga ctatgaagaa tgtgtataac tcatggactt ataattgca atactggaaa 480
aacggtactg atgaaaagtt tcaaattact cccagtatg actttgaggt cctcagaaac 540
ctggagccat ggacaactta ttgtgttcaa gtgcgagggt ttcttcctga tcggaacaaa 600
gctgggggaat ggagtgaacc tgtctgtgag caaacacccc atgacgaaac ggtccctccc 660

```

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Gly-Ser spacer peptide

<400> 48

```

Gly Ser Gly Ser Gly Ser Gly Ser
1           5

```

<210> 49

<211> 70

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC39335

<400> 49

```

atcggaattc gcagaagcca tgaggacgct gctgaccatc ttgactgtgg ggtccctggc 60
tgctcacgcc                                     70

```

<210> 50

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC39434

WO 02/077174

32/38

PCT/US02/08811

<400> 50
cagtggatcc tggcagtgctc ttcactcggc a 31

<210> 51
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer ZC39319

<400> 51
atcgggaattc gcagaagcca tggcgtggag ccttggg 37

<210> 52
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer ZC39325

<400> 52
cagtggatcc ggaggggacc gtttcgctc 28

<210> 53
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide Primer ZC39776

<400> 53
gggcccgcta gcacct 16

<210> 54
<211> 16
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/077174

33/38

PCT/US02/08811

<223> Oligonucleotide Primer ZC39777

<400> 54

gggtgatccg ctggca

16

<210> 55

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC38752

<400> 55

ccagccactt tctctctcg tatttcttat attcca

36

<210> 56

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC40940

<400> 56

ttggtccctc gtggaagcac tcagtcaacg catgagtct

39

<210> 57

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC40943

<400> 57

atgcattcta gatcatggaa ttccacaca tctctcttc

39

<210> 58

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

WO 02/077174

34/38

PCT/US02/08811

<220>

<223> Oligonucleotide Primer ZC40942

<400> 58

atgcattccg gagattataa ggatgatgat gataagttgg tccctcgtgg aagcact 57

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Glu-Glu (CEE) Tag amino acid sequence with spacer

<400> 59

Gly Ser Gly Gly Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5 10

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> C-terminal HIS tag, with spacer

<400> 60

Gly Ser Gly Gly His His His His His
1 5 10

<210> 61

<211> 484

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human zcytor11/Fc4-CEE fusion polypeptide

<400> 61

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

WO 02/077174

35/38

PCT/US02/08811

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

WO 02/077174

36/38

PCT/US02/08811

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 370 375 380
 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 385 390 395 400
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 405 410 415
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 420 425 430
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 435 440 445
 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 450 455 460
 Ser Pro Gly Lys Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Ser Gly Gly Glu Tyr
 465 470 475 480
 Met Pro Met Glu

<210> 62

<211> 476

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> human CRF2-4/Fc4-CHIS fusion polypeptide

<400> 62

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

WO 02/077174

37/38

PCT/US02/08811

Met Arg Phe Leu Ala Pro Lys Ile Glu Asn Glu Tyr Glu Thr Trp Thr
 130 135 140
 Met Lys Asn Val Tyr Asn Ser Trp Thr Tyr Asn Val Gln Tyr Trp Lys
 145 150 155 160
 Asn Gly Thr Asp Glu Lys Phe Gln Ile Thr Pro Gln Tyr Asp Phe Glu
 165 170 175
 Val Leu Arg Asn Leu Glu Pro Trp Thr Thr Tyr Cys Val Gln Val Arg
 180 185 190
 Gly Phe Leu Pro Asp Arg Asn Lys Ala Gly Glu Trp Ser Glu Pro Val
 195 200 205
 Cys Glu Gln Thr Thr His Asp Glu Thr Val Pro Ser Gly Ser Gly Ser
 210 215 220
 Gly Ser Gly Ser Glu Pro Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 225 230 235 240
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe
 245 250 255
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 260 265 270
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 275 280 285
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 290 295 300
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 305 310 315 320
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 325 330 335
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 340 345 350
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 355 360 365
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 370 375 380
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 385 390 395 400
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 405 410 415
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 420 425 430
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 435 440 445
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys Leu Val Pro Arg
 450 455 460

WO 02/077174

38/38

PCT/US02/08811

Gly Ser Gly Ser Gly Gly His His His His His His
465 470 475

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
3 October 2002 (03.10.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/077174 A3(51) International Patent Classification: C12N 15/12,
5/10, 15/63, C12P 21/02, C07K 14/47, 16/00

(21) International Application Number: PCT/US02/08811

(22) International Filing Date: 22 March 2002 (22.03.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 60/279,222 27 March 2001 (27.03.2001) US

(71) Applicant: ZYMOGENETICS, INC. [US/US]; 1201
Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).(81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KL, 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, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments(88) Date of publication of the international search report:
18 September 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.(72) Inventors: PRESNELL, Scott, R.; 2902 North Puget
Sound Avenue, Tacoma, WA 98407 (US); XU, Wen-
feng; 12432 54th Avenue W, Mukilteo, WA 98275 (US);
KINDVOGEL, Wayne; 6014 24th Avenue Northeast,
Seattle, WA 98115 (US); CHEN, Zhi; 1321 Minor Avenue,
Apartment B504, Seattle, WA 98101 (US); HUGHES,
Steven, D.; 3610 NE 65th Street, Seattle, WA 98115 (US).(74) Agent: JOHNSON, Jennifer, K.; ZymoGenetics, Inc.,
1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).

WO 02/077174 A3

(54) Title: HUMAN CYTOKINE RECEPTOR

(57) Abstract: Cytokines and their receptors have proven usefulness in both basic research and as therapeutics. The present inven-
tion provides a new human cytokine receptor designated as "Zcytor16".

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/08811
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(Int.) : C12N 15/12, 5/10, 15/63; C12P 21/02; C07K 14/47, 16/00 US CL : 435/69.1, 71.1, 320.1, 471, 325, 252.3; 530/350, 387.3, 387.7, 387.9; 536/23.5 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/69.1, 71.1, 320.1, 471, 325, 252.3; 530/350, 387.3, 387.7, 387.9; 536/23.5 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,965,704 A (LOK et al) 12 October 1999 (12.10.99), see entire document.	3-11, 17-42
A	LJU et al. Expression Cloning and Characterization of a Human IL-10 Receptor. Journal of Immunology, February 1994, Vol.152, pages 1821-1829, see entire document.	17-42
A	WO 98/02542 A1 (UNIVERSITY OF MEDICINE AND DENTISTRY OF NEW JERSEY) 22 January 1998 (22.01.98), see entire document.	17-42
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 June 2003 (30.06.2003)		Date of mailing of the international search report 22 JUL 2003
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer Gary Kuntz Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/08811
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)		
This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:		
1.	☐	Claim Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2.	☒	Claim Nos.: 1,2,15 and 16 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: Please See Continuation Sheet
3.	☐	Claim Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)		
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: Please See Continuation Sheet		
1.	☐	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.	☐	As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.	☐	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.	☒	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.: 3-11, 17-42
Remark on Protest		
☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.		
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US02/08811

Continuation of Box I Reason 2:

Claims 1 and 2 recite numerous amino acid fragments, however the claims fail to identify the SEQ ID NO. from which these fragments come. Claims 15 and 16 depend on claim 2, however they also fail to identify a SEQ ID NO.

BOX II. OBSERVATIONS WHERE UNITY OF INVENTION IS LACKING

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be searched, the appropriate additional search fees must be paid.

Group I, claims 3-11, 17-42, drawn to an isolated polypeptide, the nucleic acid encoding it, a vector, a host cell, a method of producing the encoded polypeptide, and a fusion protein comprising said polypeptide and another soluble receptor.

Group II, claim 12-14 and 43-46, drawn to an isolated antibody.

Group III, claims 47-49, drawn to a method for inhibiting IL-T1F induced proliferation.

Group IV, claim 50, drawn to a method reducing IL-T1F induced or IL-9 induced inflammation by administering a composition comprising a polypeptide.

Group V, claim 51, drawn to a method of suppressing inflammatory response in mammal.

Group VI, claim 52, drawn to a method for detecting a cancer in a patient.

Group VII, claims 53-58, drawn to a method of treating a mammal with inflammatory disease by administering an antagonist of IL-T1F.

The inventions listed as Groups I-VIII do not relate to a single inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons: Pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that where multiple products and processes are claimed, the main invention shall consist of the first invention of the category first mentioned in the claims and the first recited invention of each of the other categories related thereto. Accordingly, the main invention (Group I) comprises the first-recited product, the isolated polypeptide and the nucleic acid molecule encoding it, a vector comprising said nucleic acid molecule, a host cell and a method of producing the encoded polypeptide. Further pursuant to 37 C.F.R. § 1.475 (d), the ISA/US considers that any feature which the subsequently recited products and methods share with the main invention does not constitute a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2 and that each of such products and methods accordingly defines a separate invention.

Claims 1 and 2 and 15 and 16 are unsearchable since no SEQ ID NO. is identified.

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

West/US patent full, STN via medline, biosis, embase, caplus: Search terms, Class two cytokine receptors, Zcytor16, zcytor11, IL-10R, CRF2-4. SEQ ID NOs: 1, 2, 3, 37, 34, 35 and 36 were searched.

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 19/02	4 H 0 4 5
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 39/02	A 6 1 P 39/02	
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 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 N 5/10	C 1 2 P 21/02	
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/02	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/574	G 0 1 N 33/574	Z
	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 ピュージェット サウンド アベニ
ュ 2 9 0 2

(72)発明者 シュ, 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, ツァイ

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

(72)発明者 ヒューズ, スティーブン ディー.

アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 0 2 8, シアトル, ノースイースト ワンハンドレッドエイ
ティセブンス ストリート 5 5 3 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA44 BA63 BA80 CA04 CA07 DA02 EA04 GA03

GA11 HA01 HA12 HA15

4B064 AG20 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA93Y AB01 AC14 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA02 AA06 AA07 BA01 BA22 CA53 DA45 ZA662 ZA682 ZA892
ZA962 ZB112 ZB352 ZC372
4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63 DD88
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA01 DA50 DA76
DA86 EA20 EA22 EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	人细胞因子受体		
公开(公告)号	JP2005503765A	公开(公告)日	2005-02-10
申请号	JP2002576617	申请日	2002-03-22
[标]申请(专利权)人(译)	津莫吉尼蒂克斯公司		
申请(专利权)人(译)	ZymoGenetics公司，股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	プレスネルスコットアール シュウエンフェン カインズボーゲルウェイン チェンツアイ ヒューズスティーブンディー		
发明人	プレスネル,スコット アール. シュ,ウエンフェン カインズボーゲル,ウェイン チェン,ツアイ ヒューズ,スティーブン ディー.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K38/00 A61K39/395 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P39/02 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/715		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.N A61P1/04 A61P17/06 A61P19/02 A61P29/00 A61P31/04 A61P39/02 C07K14/715 C07K16/28 C07K19/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/574.Z C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA44 4B024/BA63 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA12 4B024/HA15 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/BA01 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DA45 4C084/ZA662 4C084/ZA682 4C084/ZA892 4C084/ZA962 4C084/ZB112 4C084/ZB352 4C084/ZC372 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/DD88 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA01 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	60/279222 2001-03-27 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

细胞因子及其受体已被证明在基础研究和治疗中都是有用的。本发明提供了称为“Zcytor16”的新的人细胞因子受体。

特表2005-503765 (P2005-503765A)			
(43) 公表日 平成17年2月10日 (2005. 2. 10)			
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395	D	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	N	4 B O 6 5
A 6 1 P 1/04	A 6 1 P 1/04		4 C O 8 4
A 6 1 P 17/06	A 6 1 P 17/06		4 C O 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 425 頁) 最終頁に続く			
(21) 出願番号 特願2002-576617 (P2002-576617)	(71) 出願人 500049831	サイモジェネティクス、インコーポレイテ ィド アメリカ合衆国、ワシントン 9 8 1 0 2 、シアトル、イーストレイク アベニュー イースト 1 2 0 1	
(86) (22) 出願日 平成14年3月22日 (2002. 3. 22)			
(85) 翻訳文提出日 平成15年9月26日 (2003. 9. 26)			
(86) 国際出願番号 PCT/US2002/008811			
(87) 国際公開番号 W02002/077174			
(87) 国際公開日 平成14年10月3日 (2002. 10. 3)	(74) 代理人 100099759	弁理士 青木 篤 100077517 弁理士 石田 敬 100087871 弁理士 福本 慎 100087413 弁理士 古賀 哲次	
(31) 優先権主張番号 60/279, 222			
(32) 優先日 平成13年3月27日 (2001. 3. 27)			
(33) 優先権主張国 米国 (US)			
最終頁に続く			
(54) 【発明の名称】 ヒトサイトカイン受容体			