

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-532611

(P2004-532611A)

(43) 公表日 平成16年10月28日(2004.10.28)

(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
C O 7 K 14/715	C O 7 K 14/715	4 B O 6 3
C O 7 K 16/28	C O 7 K 16/28	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有		(全 321 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-546578 (P2002-546578)	(71) 出願人	500049831
(86) (22) 出願日	平成13年11月28日 (2001.11.28)		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5月27日 (2003.5.27)		ィド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044808		アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 2
(87) 国際公開番号	W02002/044209		, 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6月6日 (2002.6.6)		イースト 1 2 0 1
(31) 優先権主張番号	60/253, 561	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000.11.28)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/267, 211		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年2月7日 (2001.2.7)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サイトカイン受容体 ZCYTOR19

(57) 【要約】

新規ポリペプチド、そのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、及び関連する組成物及び方法が、z c y t o r 1 9、すなわち新規クラス I I サイトカイン受容体に関して開示される。前記ポリペプチドは、インビトロ及びインビボで、造血、リンパ及び骨髓細胞の増殖及び／又は進化を刺激するリガンドを検出するための方法内に使用され得る。リガンドー結合受容体ポリペプチドはまた、インビトロ及びインビボでリガンド活性を阻止するためにも使用され得る。z c y t o r 1 9 をコードするポリヌクレオチドは、染色体 1 p 3 6 . 1 1 に位置し、そしてヒト疾病状態に関連するゲノムの領域を同定するために使用され得る。本発明はまた、タンパク質の生成方法、その使用方法及びそれに対する抗体を包含する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- (a) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 223 (P r o) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (b) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 226 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (c) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 249 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (d) アミノ酸番号 250 (L y s) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (e) アミノ酸番号 250 (L y s) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；
- (f) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (g) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；
- (h) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；
- (i) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；
- (j) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 163 (T r p) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；
- (k) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；及び
- (l) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸配列を含んで成る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。

【請求項 2】

- (a) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 669 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (b) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 678 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (c) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 747 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (d) ヌクレオチド 748 ~ ヌクレオチド 1473 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (e) ヌクレオチド 748 ~ ヌクレオチド 1560 の配列番号 18 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (f) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 1473 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (g) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 1560 の配列番号 18 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (h) ヌクレオチド 1 ~ ヌクレオチド 1473 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (i) ヌクレオチド 1 ~ ヌクレオチド 1560 の配列番号 18 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (j) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 489 の配列番号 20 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；
- (k) ヌクレオチド 61 ~ ヌクレオチド 633 の配列番号 20 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；及び

(1) ヌクレオチド1～ヌクレオチド633の配列番号20に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチドの群からのポリヌクレオチド配列を含んで成る単離されたポリヌクレオチド。

【請求項3】

前記ポリヌクレオチドがさらに、配列番号2の残基227 (T r p)～249 (T r p) から成るトランスメンブランドメインを含んで成るポリペプチドをコードする請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項4】

前記ポリヌクレオチドがさらに、配列番号2の残基250 (L y s)～491 (A r g) 又は配列番号19の残基250 (L y s)～520 (A r g) から成る細胞内ドメインを含んで成るポリペプチドをコードする請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。 10

【請求項5】

前記ポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドが、細胞増殖、レポーター遺伝子の転写の活性化により測定されるような活性を有し、又はさらに、抗体に結合し、ここで前記抗体が、

(a) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号223 (P r o)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号226 (A s n)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号249 (T r p)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列； 20

(d) アミノ酸番号250 (L y s)～アミノ酸番号491 (A r g)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(e) アミノ酸番号250 (L y s)～アミノ酸番号520 (A r g)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(f) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号491 (A r g)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(g) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号520 (A r g)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(h) アミノ酸番号1 (M e t)～アミノ酸番号491 (A r g)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列； 30

(i) アミノ酸番号1 (M e t)～アミノ酸番号520 (A r g)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(j) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号163 (T r p)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；

(k) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号211 (S e r)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；及び

(l) アミノ酸番号1 (M e t)～アミノ酸番号211 (S e r)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸の配列を含んで成るポリペプチドに対して生ぜしめられ、そして 40

前記単離されたポリペプチドへの前記抗体の結合が、生物学的又は生化学的アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ-沈殿、ウェスタンブロット又は酵素連結されたイムノソルベントアッセイにより測定される請求項1記載の単離されたポリヌクレオチド。

【請求項6】

次の作用可能に連結された要素：

転写プロモーター；

(a) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号223 (P r o)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号21 (A r g)～アミノ酸番号226 (A s n)の配列番号2に示さ 50

れるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 249 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(d) アミノ酸番号 250 (L y s) ～アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(e) アミノ酸番号 250 (L y s) ～アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；

(f) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(g) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列； 10

(h) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(i) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；

(j) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 163 (T r p) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；

(k) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；及び

(l) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのポリペプチドをコードする DNA セグメント； 20
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 DNA セグメントに作用可能に連結され、そして前記 DNA セグメントが前記転写ターミネーターに作用可能に連結されることを特徴とする発現ベクター。

【請求項 7】

前記 DNA セグメントに作用可能に連結される分泌シグナル配列をさらに含んで成る請求項 6 記載の発現ベクター。

【請求項 8】

請求項 7 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細胞。 30

【請求項 9】

前記ポリペプチドがさらに、配列番号 2 の残基 227 (T r p) ～249 (T r p) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項 6 記載の発現ベクター。

【請求項 10】

前記ポリペプチドがさらに、配列番号 2 の残基 250 (L y s) ～491 (A r g)、又は配列番号 19 の残基 250 (L y s) ～520 (A r g) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項 6 記載の発現ベクター。

【請求項 11】

次の作用可能に連結された要素： 40

転写プロモーター；

(a) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 223 (P r o) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 226 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 249 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；

(d) アミノ酸番号 21 (A r g) ～アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのポリペプチドをコードする DNA セグメント 50

；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DNAセグメントに作用可能に連結され、そして前記DNAセグメントが転写ターミネーターに作用可能に連結される請求項6記載の発現ベクター。

【請求項12】

請求項11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可溶性受容体ポリペプチドを発現する細胞。

【請求項13】

融合タンパク質をコードするDNA構造体であって、

(a) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号20 (Gly)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列； 10

(b) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号223 (Pro)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号226 (Asn)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(d) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号249 (Trp)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(e) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(f) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列； 20

(g) アミノ酸番号227 (Trp)～アミノ酸番号249 (Trp)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(h) アミノ酸番号227 (Trp)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(i) アミノ酸番号227 (Trp)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(j) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(k) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列； 30

(l) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(m) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(n) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号163 (Trp)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；

(o) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号211 (Ser)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；及び

(p) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号211 (Ser)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドをコードする第1DNAセグメント；及び 40

追加の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り、ここで前記第1及び他のDNAセグメントが読み取り柄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。

【請求項14】

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13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り、

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

【請求項15】

請求項14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16】

融合タンパク質の生成方法であって、

請求項15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。

10

【請求項17】

(a) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号223 (Pro)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号226 (Asn)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号249 (Trp)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(d) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(e) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(f) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(g) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(h) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(i) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(j) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号163 (Trp)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；

(k) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号211 (Ser)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；及び

(l) アミノ酸番号1 (Met)～アミノ酸番号211 (Ser)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る単離されたポリペプチド。

【請求項18】

前記ポリペプチドが、

(a) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号223 (Pro)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号226 (Asn)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(c) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号249 (Trp)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(d) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

(e) アミノ酸番号250 (Lys)～アミノ酸番号520 (Arg)の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；

(f) アミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号491 (Arg)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；

40

50

(g) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列;

(h) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

(i) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列;

(j) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 163 (T r p) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列;

(k) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列; 及び

(l) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列から成る請求項 17 記載の単離されたポリペプチド。

10

【請求項 19】

前記ポリペプチドがさらに、配列番号 2 の残基 227 (T r p) ~ 249 (T r p) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る請求項 17 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 20】

前記ポリペプチドがさらに、配列番号 2 の残基 250 (L y s) ~ 491 (A r g) 又は配列番号 19 の残基 250 (L y s) ~ 520 (A r g) から成る細胞内ドメインを含んで成る請求項 1 記載の単離されたポリペプチド。

20

【請求項 21】

前記ポリペプチドが、細胞増殖、レポーター遺伝子の転写の活性化により測定されるような活性を有し、又はさらに、抗体に結合し、ここで前記抗体が、

(a) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 223 (P r o) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

(b) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 226 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

(c) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 249 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

30

(d) アミノ酸番号 250 (L y s) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

(e) アミノ酸番号 250 (L y s) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列;

(f) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

(g) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列;

(h) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 491 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列;

40

(i) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 520 (A r g) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列;

(j) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 163 (T r p) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列;

(k) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列; 及び

(l) アミノ酸番号 1 (M e t) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸の配列を含んで成るポリペプチドに対して生ぜしめられ、そして

50

前記単離されたポリペプチドへの前記抗体の結合が、生物学的又は生化学的アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ沈殿、ウェスタンブロット又は酵素連結されたイムノソルベントアッセイにより測定される請求項 17 記載の単離されたポリペプチド。

【請求項 22】

ポリペプチドの生成方法であって、
請求項 8 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 23】

(a) アミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 226 (Asn) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； 10
(b) 配列番号 4 に示されるようなアミノ酸配列；
(c) アミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列； 及び
(d) (a)、(b) 又は (c) に対して少なくとも 90% 同一である配列の群からのアミノ酸セグメントを含んで成り、造血受容体により通常会合されるトランスメンブタン及び細胞内ドメインを実質的に有さないことを特徴とする単離されたポリペプチド。

【請求項 24】

ポリペプチドの生成方法であって、
請求項 12 記載の細胞を培養し；そして 20
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 25】

ポリペプチドに対する抗体の生成方法であって、
(a) アミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50～471 個のアミノ酸から成るポリペプチド；
(b) アミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50～500 個のアミノ酸から成るポリペプチド；
(c) アミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 19 におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50～191 個のアミノ酸から成るポリペプチド 30
(d) 請求項 18 記載のポリペプチド；
(e) 配列番号 2 のアミノ酸番号 21 (Arg)～アミノ酸番号 119 (Tyr) を含んで成るポリペプチド；
(f) 配列番号 2 のアミノ酸番号 125 (Pro)～アミノ酸番号 223 (Pro) を含んで成るポリペプチド；
(g) 埋もれた G、S 及び T、及び暴露された H、Y 及び W 残基が無視される、スライド性 6-残基窓に基づいて、Hopp/Woods 親水性プロフィールを用いて、疎水性プロットから予測されるような、配列番号 2 の親水性ペプチドを含んで成るポリペプチドの群からの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 40
ために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 26】

配列番号 2、19 又は 21 のポリペプチドに対して特異的に結合する請求項 25 記載の方法により生成される抗体。

【請求項 27】

前記抗体が、モノクローナル抗体である請求項 26 記載の抗体。

【請求項 28】

請求項 17 記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

【請求項 29】

請求項 18 記載のポリペプチドに対して特異的に結合する抗体。

【請求項 30】

サイトカイン受容体タンパク質のモジュレーターの存在を、試験サンプルにおいて検出する方法であって、

請求項 6 記載の発現ベクターを導入されている細胞を培養し、ここで前記細胞が試験サンプルの存在及び不在下で DNA セグメントによりコードされるタンパク質を発現し；

生物学的又は生化学的アッセイにより、試験サンプルの存在及び不在下でのタンパク質の活性のレベルを比較し；そして

試験サンプルにおけるサイトカインタンパク質活性のモジュレーターの存在を、前記比較から決定することを含んで成る方法。

10

【請求項 31】

試験サンプル内のサイトカイン受容体リガンドの検出方法であって、

(a) 配列番号 4 に示されるようなアミノ酸配列；

(b) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 226 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；及び

(c) アミノ酸番号 21 (A r g) ~ アミノ酸番号 211 (S e r) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸配列を含んで成るサイトカイン受容体ポリペプチドと試験サンプルとを接触せしめ；そして

前記サンプルにおけるリガンドへの前記サイトカイン受容体ポリペプチドの結合を検出することを含んで成る方法。

20

【請求項 32】

前記サイトカイン受容体ポリペプチドが、培養された細胞内に膜結合され、そして前記検出段階が培養された細胞における生物学的応答を測定することを含んで成る請求項 31 記載の方法。

【請求項 33】

前記生物学的応答が、細胞増殖又はレポーター遺伝子の転写の活性化である請求項 32 記載の方法。

【請求項 34】

患者における遺伝子異常性の検出方法であって、

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方法。

30

【請求項 35】

患者における癌の検出方法であって、

患者からの組織又は生物学的サンプルを得；

請求項 29 記載の抗体と共に前記組織又は生物学的サンプルを、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対して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ける結合される抗体を可視化し；そして

正常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結合される抗体のレベルを比較することを含んで成り、ここで前記正常対照組織又は生物学的サンプルに対して、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ことを特徴とする方法。

40

【請求項 36】

50

患者における癌の検出方法であって、

患者から組織又は生物学的サンプルを得；

配列番号 1， 18 又は 20、又はそれら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であろう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ラベルされたポリヌクレオチドを可視化し；そして

正常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こと
を含んで成り、ここで前記正常対照組織又は生物学的サンプルに対して、前記患者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上昇が前記患者における癌の表示であることを特徴とする方法。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景：

ホルモン及びポリペプチド増殖因子は、多細胞生物の細胞の増殖及び分化を制御する。それらの拡散性分子は、細胞のお互いの連絡を可能し、そして細胞、及び器官の形成、そして損傷された組織の修復に関して作用する。ホルモン及び成長因子の例は、ステロイドホルモン（例えば、テストステロン）、副甲状腺ホルモン、卵胞刺激ホルモン、インターロイキン、血小板由来の成長因子（PDGF）、上皮成長因子（EGF）、顆粒球－マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、エリトロポエチン（EPO）及びカルシトニンを包含する。 20

【0002】

ホルモン及び成長因子は、受容体に結合することによって細胞代謝に影響を及ぼす。受容体は、細胞内のシグナル化経路、例えば第2メッセンジャーシステムに結合される内在性膜タンパク質であり得る。他の種類の受容体は、可溶性分子、例えば転写因子である。サイトカイン、すなわち細胞の増殖及び／又は分化を促進する分子のための受容体が、特に興味の対象である。サイトカインの例は、赤血球細胞の成長を刺激するエリトロポエチン（EPO）；巨核球系の細胞の成長を刺激する trombopoietin（TPO）；及び好中球の成長を刺激する顆粒球－刺激因子（G-CSF）を包含する。それらのサイトカインは、貧血、血小板減少症及び好中球減少症を有する患者における正常な血液細胞レベルの回復、又は癌のための化学療法の受容において有用である。 30

【0003】

それらのサイトカインファミリーの例示されたインビボ活性は、他のサイトカイン、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莫大な臨床学的可能性及びそれらの必要性を示す。本発明は、新規造血サイトカイン受容体、及び関連する組成物及び方法を提供することにより、それらの必要性と取り組む。

本発明は、当業者に明らかであるそれらの及び他の使用のために、そのようなポリペプチドを提供する。本発明のそれらの及び他の観点は、本発明の次の詳細な記載の基づいて明らかに成るであろう。 40

【0004】

発明の記載：

本発明のそれらの及び他の観点は、次の本発明の特定の記載に基づいて明らかに成るであろう。

1つの観点においては、本発明は、（a）アミノ酸番号21（Arg）～アミノ酸番号223（Pro）の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；（b）アミノ酸番号21（Arg）～アミノ酸番号226（Asn）の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；（c）アミノ酸番号21（Arg）～アミノ酸番号249（Trp）の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；（d）アミノ酸番号250（Lys）～アミノ酸番号491（ 50

A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(e) アミノ酸番号 2 5 0 (L y s) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列；(f) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(g) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列；(h) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(i) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列；(j) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 1 6 3 (T r p) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列；(k) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 1 1 (S e r) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列；及び (l) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 2 1 1 (S e r) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸配列を含んで成る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する。

10

【0005】

1 つの観点においては、上記単離されたポリヌクレオチドは、(a) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 6 6 9 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(b) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 6 7 8 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(c) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 7 4 7 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(d) ヌクレオチド 7 4 8 ～ヌクレオチド 1 4 7 3 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(e) ヌクレオチド 7 4 8 ～ヌクレオチド 1 5 6 0 の配列番号 1 8 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(f) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 1 4 7 3 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(g) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 1 5 6 0 の配列番号 1 8 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(h) ヌクレオチド 1 ～ヌクレオチド 1 4 7 3 の配列番号 1 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(i) ヌクレオチド 1 ～ヌクレオチド 1 5 6 0 の配列番号 1 8 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(j) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 4 8 9 の配列番号 2 0 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；(k) ヌクレオチド 6 1 ～ヌクレオチド 6 3 3 の配列番号 2 0 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチド；及び (l) ヌクレオチド 1 ～ヌクレオチド 6 3 3 の配列番号 2 0 に示されるようなヌクレオチド配列を含んで成るポリヌクレオチドの群からのポリヌクレオチド配列を含んで成る。

20

30

【0006】

もう 1 つの態様においては、上記に記載されるような単離されたポリヌクレオチドがさらに、配列番号 2 の残基 2 2 7 (T r p) ～2 4 9 (T r p) から成るトランスメンブランドメインを含んで成るポリペプチドをコードする。

もう 1 つの態様においては、上記に記載されるような単離されたポリヌクレオチドがさらに、配列番号 2 の残基 2 5 0 (L y s) ～4 9 1 (A r g) 又は配列番号 1 9 の残基 2 5 0 (L y s) ～5 2 0 (A r g) から成る細胞内ドメインを含んで成るポリペプチドをコードする。

40

【0007】

もう 1 つの態様においては、上記に記載されるような単離されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドは、細胞増殖、レポーター遺伝子の転写の活性化により測定されるような活性を有し、又はさらに、抗体に結合し、ここで前記抗体が、(a) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 2 3 (P r o) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 2 6 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(c) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 4 9 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(d) アミノ酸番号 2 5 0 (L y s) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配

50

列；(e) アミノ酸番号 250 (Lys) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(f) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(g) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(h) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(i) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(j) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 163 (Trp) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；(k) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；及び (l) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸の配列を含んで成るポリペプチドに対して生ぜしめられ、そして前記単離されたポリペプチドへの前記抗体の結合が、生物学的又は生化学的アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ-沈殿、ウェスタンブロット又は酵素連結されたイムノソルベントアッセイにより測定される。

10

【0008】

第2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；(a) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 223 (Pro) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 226 (Asn) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(c) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 249 (Trp) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(d) アミノ酸番号 250 (Lys) ～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(e) アミノ酸番号 250 (Lys) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(f) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(g) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(h) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 491 (Arg) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(i) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 520 (Arg) の配列番号 19 に示されるようなアミノ酸配列；(j) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 163 (Trp) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；(k) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列；及び (l) アミノ酸番号 1 (Met) ～アミノ酸番号 211 (Ser) の配列番号 21 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのポリペプチドをコードする DNA セグメント；及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記プロモーターが前記 DNA セグメントに作用可能に連結され、そして前記 DNA セグメント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を提供する。1つの態様においては、上記に記載される前記発現ベクターは、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。

20

30

【0009】

第3の観点においては、本発明は、上記に記載される発現ベクターを含んで成る、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細胞を提供する。もう1つの態様においては、前記ポリペプチドはさらに、配列番号 2 の残基 227 (Trp) ～249 (Trp) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る。もう1つの態様においては、上記ポリペプチドはさらに、配列番号 2 の残基 250 (Lys) ～491 (Arg)、又は配列番号 19 の残基 250 (Lys) ～520 (Arg) から成る細胞内ドメインを含んで成る。

40

【0010】

もう1つの態様においては、上記発現ベクターは、次の作用可能に連結された要素：転写プロモーター；(a) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸番号 223 (Pro) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号 21 (Arg) ～アミノ酸

50

番号 2 2 6 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (c) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 4 9 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (d) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 1 1 (S e r) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのポリペプチドをコードする D N A セグメント；及び転写ターミネーターを含んで成り、ここで前記プロモーターが D N A セグメントに作用可能に連結され、そして前記 D N A セグメントが転写ターミネーターに作用可能に連結される。

【0011】

もう 1 つの観点においては、本発明は、上記に記載される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 D N A セグメントによりコードされる可溶性受容体ポリペプチドを発現する。

10

【0012】

もう 1 つの観点においては、本発明は、 (a) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 2 0 (G l y) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (b) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 2 3 (P r o) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (c) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 2 6 (A s n) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (d) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 4 9 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (e) アミノ酸番号 2 5 0 (L y s) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (f) アミノ酸番号 2 5 0 (L y s) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列； (g) アミノ酸番号 2 2 7 (T r p) ～アミノ酸番号 2 4 9 (T r p) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (h) アミノ酸番号 2 2 7 (T r p) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (i) アミノ酸番号 2 2 7 (T r p) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列； (j) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (k) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列； (l) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 4 9 1 (A r g) の配列番号 2 に示されるようなアミノ酸配列； (m) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 5 2 0 (A r g) の配列番号 1 9 に示されるようなアミノ酸配列； (n) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 1 6 3 (T r p) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列； (o) アミノ酸番号 2 1 (A r g) ～アミノ酸番号 2 1 1 (S e r) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列；及び (p) アミノ酸番号 1 (M e t) ～アミノ酸番号 2 1 1 (S e r) の配列番号 2 1 に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成るポリペプチドをコードする第 1 D N A セグメント；及び追加のポリペプチドをコードする少なくとも 1 つの他の D N A セグメントを含んで成り、ここで前記第 1 及び他の D N A セグメントが読み取り柄を整合して連結され；そして前記第 1 及び他の D N A 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融合タンパク質をコードする D N A 構造体を提供する。

20

30

【0013】

もう 1 つの観点においては、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；上記に記載される融合タンパク質をコードする D N A 構造体；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 D N A 構造体に作用可能に連結され、そして前記 D N A 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を提供する。

40

もう 1 つの観点においては、本発明は、上記に記載される発現ベクターを含んで成る、前記 D N A 構造体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を提供する。もう 1 つの観点においては、本発明は、上記に記載される細胞を培養し；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。

50

【0014】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号223 (Pro) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号226 (Asn) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(c) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号249 (Trp) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(d) アミノ酸番号250 (Lys) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(e) アミノ酸番号250 (Lys) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(f) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(g) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(h) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(i) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(j) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号163 (Trp) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；(k) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号211 (Ser) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；及び(l) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号211 (Ser) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列を含んで成る単離されたポリペプチドを提供する。

【0015】

1つの観点においては、上記のような前記単離されたポリペプチドは、(a) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号223 (Pro) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号226 (Asn) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(c) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号249 (Trp) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(d) アミノ酸番号250 (Lys) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(e) アミノ酸番号250 (Lys) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(f) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(g) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(h) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号491 (Arg) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(i) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号520 (Arg) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列；(j) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号163 (Trp) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；(k) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号211 (Ser) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列；及び(l) アミノ酸番号1 (Met) ~ アミノ酸番号211 (Ser) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列の群からのアミノ酸残基の配列から成る。

【0016】

もう1つの態様においては、上記に記載される単離されたポリペプチドはさらに、配列番号2の残基227 (Trp) ~ 249 (Trp) から成るトランスメンブランドメインを含んで成る。もう1つの態様においては、上記に記載される単離されたポリペプチドはさらに、配列番号2の残基250 (Lys) ~ 491 (Arg) 又は配列番号19の残基250 (Lys) ~ 520 (Arg) から成る細胞内ドメインを含んで成る。

【0017】

もう1つの態様においては、上記に記載される単離されたポリペプチドは、細胞増殖、レポーター遺伝子の転写の活性化により測定されるような活性を有し、又はさらに、抗体に結合し、ここで前記抗体が、(a) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号223 (Pro) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(b) アミノ酸番号21 (Arg) ~ アミノ酸番号226 (Asn) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；(c)

アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号249 (T r p) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列; (d) アミノ酸番号250 (L y s) ~アミノ酸番号491 (A r g) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列; (e) アミノ酸番号250 (L y s) ~アミノ酸番号520 (A r g) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列; (f) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号491 (A r g) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列; (g) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号520 (A r g) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列; (h) アミノ酸番号1 (M e t) ~アミノ酸番号491 (A r g) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列; (i) アミノ酸番号1 (M e t) ~アミノ酸番号520 (A r g) の配列番号19に示されるようなアミノ酸配列; (j) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号163 (T r p) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列; (k) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号211 (S e r) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列; 及び (l) アミノ酸番号1 (M e t) ~アミノ酸番号211 (S e r) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸の配列を含んで成るポリペプチドに対して生ぜしめられ、そして前記単離されたポリペプチドへの前記抗体の結合が、生物学的又は生化学的アッセイ、例えばラジオイムノアッセイ、ラジオイムノ-沈殿、ウェスタンブロット又は酵素連結されたイムノソルベントアッセイにより測定される。

10

【0018】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に記載される細胞を培養し;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、ポリペプチドの生成方法を提供する。

20

【0019】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号226 (A s n) の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列; (b) 配列番号4に示されるようなアミノ酸配列; (c) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号211 (S e r) の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列; 及び (d) (a)、(b) 又は (c) に対して少なくとも90%同一である配列の群からのアミノ酸セグメントを含んで成り、造血受容体により通常会合されるトランスメンブラン及び細胞内ドメインを実質的に有さないことを特徴とする単離されたポリペプチドを提供する。

【0020】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に記載される細胞を培養し;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、ポリペプチドの生成方法を提供する。

30

【0021】

もう1つの観点においては、本発明は、(a) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号491 (A r g) の配列番号2におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50~471個のアミノ酸から成るポリペプチド; (b) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号520 (A r g) の配列番号19におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50~500個のアミノ酸から成るポリペプチド; (c) アミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号211 (S e r) の配列番号19におけるアミノ酸の連続配列を含んで成る、50~191個のアミノ酸から成るポリペプチド; (d) 請求項18記載のポリペプチド; (e) 配列番号2のアミノ酸番号21 (A r g) ~アミノ酸番号119 (T y r) を含んで成るポリペプチド; (f) 配列番号2のアミノ酸番号125 (P r o) ~アミノ酸番号223 (P r o) を含んで成るポリペプチド; (g) 埋もれたG、S及びT、及び暴露されたH、Y及びW残基が無視される、スライド性6-残基窓に基づいて、H o p p / W o o d s 親水性プロフィルを用いて、疎水性プロットから予測されるような、配列番号2の親水性ペプチドを含んで成るポリペプチドの群からの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、ポリペプチドに対する抗体の生成方法を提供する。

40

50

【0022】

もう1つの観点においては、本発明は、配列番号2、19又は21のポリペプチドに対して特異的に結合する、上記に記載される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、前記抗体は、モノクローナル抗体である。

もう1つの観点においては、本発明は、上記に記載されるポリペプチドに対して特異的に結合する抗体を提供する。

【0023】

もう1つの観点においては、本発明は、上記に記載される発現ベクターを導入されている細胞を培養し、ここで前記細胞が試験サンプルの存在及び不在下でDNAセグメントによりコードされるタンパク質を発現し；生物学的又は生化学的アッセイにより、試験サンプルの存在及び不在下でのタンパク質の活性のレベルを比較し；そして試験サンプルにおけるサイトカインタンパク質活性のモジュレーターの存在を、前記比較から決定することを含んで成る、サイトカイン受容体タンパク質のモジュレーターの存在を、試験サンプルにおいて検出する方法を提供する。

10

【0024】

もう1つの観点においては、本発明は、(a)配列番号4に示されるようなアミノ酸配列；(b)アミノ酸番号21(Arg)～アミノ酸番号226(Asn)の配列番号2に示されるようなアミノ酸配列；及び(c)アミノ酸番号21(Arg)～アミノ酸番号211(Ser)の配列番号21に示されるようなアミノ酸配列から成る群からのアミノ酸配列を含んで成るサイトカイン受容体ポリペプチドと試験サンプルとを接触せしめ；そして前記サンプルにおけるリガンドへの前記サイトカイン受容体ポリペプチドの結合を検出することを含んで成る、試験サンプル内のサイトカイン受容体リガンドの検出方法を提供する。

20

【0025】

1つの態様においては、前記サイトカイン受容体ポリペプチドが、培養された細胞内に膜結合され、そして前記検出段階が培養された細胞における生物学的応答を測定することを含んで成る、試験サンプル内のサイトカイン受容体リガンドの検出方法が開示される。もう1つの態様においては、前記生物学的応答が、細胞増殖又はレポーター遺伝子の転写の活性化である、サイトカイン受容体リガンドの検出方法が開示される。

【0026】

もう1つの観点においては、本発明は、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、患者における遺伝子異常性の検出方法を提供する。

30

【0027】

もう1つの観点においては、本発明は、患者からの組織又は生物学的サンプルを得；上記に記載される抗体と共に前記組織又は生物学的サンプルを、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対して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ける結合される抗体を可視化し；そして正常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結合される抗体のレベルを比較することを含んで成り、ここで前記正常対照組織又は生物学的サンプルに対して、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ことを特徴とする、患者における癌の検出方法を提供する。

40

【0028】

もう1つの観点においては、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

50

号1, 18又は20、又はそれら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であろう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ラベルされたポリヌクレオチドを可視化し；そして正常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ことを含んで成り、ここで前記正常対照組織又は生物学的サンプルに対して、前記患者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上昇が前記患者における癌の表示であることを特徴とする、患者における癌の検出方法を提供する。

10

【0029】

本発明を詳細に記載する前、次の用語を定義することで本発明の理解を助けることができる：

【0030】

“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DNA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。

20

30

【0031】

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いて変化がない)、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。

40

【0032】

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、その対象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。

【0033】

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 (又はストレプトタビジン

50

）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。

【0034】

用語“ポリヌクレオチド分子の相補体”とは、相補的塩基配列、及び対照配列に比較して逆の配向を有するポリペプチド分子である。例えば、配列 5' A T G C A C G G G 3' は、5' C C C G T G C A T 3' に対して相補的である。

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、G A U 及び G A C トリプレットはそれぞれ A s p をコードする）。 10

【0035】

用語“発現ベクター”とは、その転写を提供する追加のセグメントに作用可能に連結される興味あるポリペプチドをコードするセグメントを含んで成る線状又は環状 D N A 分子を示すために使用される。そのような追加のセグメントは、プロモーター及びターミネーター配列及び複製の1又は複数の起点、1又は複数の選択マーカー、エンハンサー、ポリアダニル化シグナル、及び同様のものを包含する。発現ベクターは一般的に、プラスミド又はウィルス D N A から誘導され、又は両者の要素を含むことができる。 20

【0036】

用語“単離された”とは、ポリヌクレオチドに適用される場合、ポリヌクレオチドがその天然の遺伝的環境から除去され、そして従って、他の無関係な又は所望しないコード配列を有さず、そして遺伝子的に構築されたタンパク質生成システム内での使用のために適切な形で存在することを示す。そのような単離された分子は、それらの天然の環境から分離され、そして c D N A 及びゲノム クローンを含む分子である。本発明の単離された D N A 分子は、通常関係しない他の遺伝子を含まないが、しかし天然において存在する 5' 及び 3' 未翻訳領域、例えばプロモーター及びターミネーターを含むことができる。関連する領域の同定は、当業者に明らかであろう（例えば、D y n a n a n d T i j a n , N a t u r e 316: 774-78, 1985を参照のこと）。 30

【0037】

“単離された”ポリペプチド又はタンパク質は、その生来の環境以外の条件、例えば血液及び動物組織とは別の条件下で見出されるポリペプチド又はタンパク質である。好ましい形においては、単離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含まない。高く精製された形、すなわち95%以上の純度、より好ましくは99%以上の純度でポリペプチドを供給することが好ましい。この状況下で使用される場合、用語“単離された”とは、他の物理的形、例えばダイマー形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。

【0038】

“作用可能に連結された”とは、D N A セグメントに適用される場合、前記セグメントが、それらの意図された目的のために協力して機能し、例えば転写がプロモーターにおいて開始し、そしてコードセグメントを通してターミネーターに進行するよう配列されることを示す。 40

用語“オルト体（o r t h o l o g y）”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。

【0039】

“パラ体（p a r a l o g s）”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られると思われる。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。 50

【0040】

“ポリヌクレオチド”は、5'末端から3'末端に読み取られるデオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチド塩基の一本鎖又は二本鎖ポリマーである。ポリヌクレオチドは、RNA及びDNAを包含し、そして天然源から単離され、インビトロで合成され、又は天然及び合成分子の組み合わせから調製され得る。ポリヌクレオチドのサイズは、塩基対（略語“bp”）、ヌクレオチド（“nt”）、又はキロ塩基（“kb”）として表される。ここで、後者の2つの用語は、一本鎖又は二本鎖であるポリヌクレオチドを記載する。この用語が二本鎖分子に適用される場合、それは全体の長さを示すために使用され、そして用語、“塩基対”に等しいことが理解されるであろう。二本鎖ポリヌクレオチドの二本の鎖は長さにおいてわずかに異なり、そしてその末端が酵素分解の結果として異なることは、当業者により理解されており；従って、二本鎖ポリヌクレオチド分子内のすべてのヌクレオチドは一对に成り得ない。

10

【0041】

“ポリペプチド”は、天然において生成されても又は合成的に生成されてもいずれにせよ、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個以下のアミノ酸残基のポリペプチドが、通常“ポリペプチド”として言及される。

【0042】

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

20

30

【0043】

用語“プロモーター”とは、RNAポリメラーゼの結合及び転写の開始を提供するDNA配列を含む遺伝子の部分を示すために本明細書において使用される。プロモーター配列は通常、遺伝子の5'非コード領域に見出されるが、しかし必ずしもそうではない。

【0044】

用語“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。

40

【0045】

用語“受容体”は、生物活性分子（すなわち“リガンド”）に結合し、そして細胞上のリガンドの効果を仲介する細胞関連タンパク質、又はそのようなタンパク質のポリペプチドサブユニットを示す。受容体へのリガンドの結合は、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におけるコンホメーション変化（及び多くの場合、受容体多重化、すなわち同一油又は異なった受容体サブユニットの会合）をもたらす。この相互作用は、細胞の代謝の変更を誘導する。受容体ーリガンド相互作用に連

50

結される代謝現象は、遺伝子転写、リン酸化、脱リン酸化、細胞増殖、cAMP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。細胞－表面サイトカイン受容体は、下記により詳細に記載されるように、多ドメイン構造により特徴づけられる。それらの受容体は、正に荷電された残基（Lys又はArg）を通常、端に有する、疎水性アミノ酸残基（典型的には、約21－25個の残基）の配列により特徴づけられるトランスメンブランドメインに固定され得る。一般的に、受容体は、膜結合され、シトソール性又は核性であり；モノマー（例えば甲状腺刺激ホルモン受容体、 β -アドレナリン性受容体）、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、エリトロポイエチン受容体及びIL-6受容体）であり得る。用語“受容体ポリペプチド”とは、受容体ポリペプチド鎖及びその一部、例えば単離された機能的ドメイン（例えば、リガンドー結合ドメイン）を表すために使用される。

10

【0046】

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ポリペプチド（“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。

【0047】

“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し、又は基質へのポリペプチドの結合のための部位、又は免疫グロブリン不変領域配列を提供する親和性標識を含んで成る。多くの細胞－表面受容体は、タンパク質加水分解により、又は交互にスプライシングされたmRNAから翻訳される天然に存在する可溶性相対物を有する。受容体ポリペプチドは、それがそれぞれ、膜固定化又はシグナルトランスダクションを提供するために、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。

20

【0048】

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

【0049】

不正確な分析方法（例えば、ゲル電気泳動）により決定されるポリマーの分子量及び長さは、おおよその値であることが理解されるであろう。そのような値が“約”X又は“おおよそ”Xとして表される場合、その言及されたXの値は、正確には $\pm 10\%$ であることが理解されるであろう。

40

本明細書に引用されるすべての文献はそれらのすべてを引用により組み込まれる。

【0050】

サイトカイン受容体サブユニットは、リガンドー結合ドメイン、典型的には、シグナルトランスダクションに関与するエフェクタードメインを含んで成る多重ドメイン構造により特徴づけられる。マルチマーサイトカイン受容体は、ホモダイマー（例えば、PDGF受容体 $\alpha\alpha$ 及び $\beta\beta$ イソフォーム、エリトロポイエチン受容体、MPL（トロンボポイエチン受容体）及びG-CSF受容体）、サブユニットがそれぞれリガンドー結合及びエフェクタードメインを有するヘテロダイマー（例えば、PDGF受容体 $\alpha\beta$ イソフォーム）、

50

及び種々の機能を有する成分サブユニットを有するマルチマー（例えば、IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7及びGM-CSF受容体）を包含する。いくつかの受容体サブユニットは、多くの受容体に共通する。

【0051】

例えば、単独ではリガンドを結合できないが、しかし細胞内シグナルトランスダクションドメインを包含するAIC2Bサブユニットは、IL-3, GM-CSF及びIL-5受容体の成分である。多くのサイトカイン受容体は、その構造及び機能に基づいて、4種の関連するファミリーの1つに配置され得る。例えば、クラスI造血受容体は、保存されたシステイン残基及びWSXWSモチーフ（配列番号5）を含むドメインの存在により特徴づけられる。タンパク質キナーゼドメイン；フィブロネクチン第III型ドメイン；及びジスルフィド結合されたループにより特徴づけられる免疫グロブリンドメインを包含する追加のドメインは、一定の造血受容体に存在する。

10

【0052】

サイトカイン受容体構造は、Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26: 221-228, 1991及びCosman, Cytokine 5: 95-106, 1993により再考されている。新規生物学的機能を生物が獲得するための選択的圧力下で、新規のファミリーメンバーは、多重遺伝子ファミリーの存在を導く存在する受容体遺伝子の重複から、たぶん生まれると思われる。従って、ファミリーメンバーは、祖先遺伝子の痕跡を含み、そしてそれらの特徴は、追加のファミリーメンバーの単離及び同定において利用され得る。

20

【0053】

細胞表面サイトカイン受容体はさらに、追加のドメインの存在により特徴づけられる。それらの受容体は、正に荷電された残基（Lys又はArg）を通常、両端に有する疎水性アミノ酸残基（典型的には、約21~25個の残基）の配列に特徴づけられるトランスメンブランドメインにより細胞膜に固定される。細胞外ドメインからの、及びそれからトランスメンブランにより分離されるタンパク質の反対側の末端に、細胞内ドメインが存在する。

【0054】

zcytor19受容体は、クラスIIサイトカイン受容体である。それらの受容体は通常、4-ヘリックス-束サイトカインに結合する。インターロイキン-10及びインターフェロンは、このクラスに受容体を有する（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）。クラスIIサイトカイン受容体は、それらのドメインに1又は複数のサイトカイン受容体モジュール（CRM）の存在により特徴づけられる。他のクラスIIサイトカイン受容体は、zcytor11（通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の）、CRF2-4（Genbank受託番号Z17227号）、IL-10R（Genbank受託番号U00672号及びNM_001558号）、DIRS1、zcytor7（通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の）、zcytor16、組織因子及び同様のものを包含する。クラスIIサイトカイン受容体のCRMは、クラスIサイトカイン受容体のより知られているCRMとは幾分異なる。クラスII CRMは2種のIII型フィブロネクチン様ドメインを含むが、それらは構成的に異なる。

30

40

【0055】

インターフェロン- α/β 受容体 α 鎖を除いて、すべての既知のクラスII受容体と同様にzcytor19は、その細胞外ドメインに単一のクラスII CRMのみを有する。zcytor19は、インターフェロン/IL-10クラスのヘリカルサイトカインのための受容体である。上記に言及されたように、zcytor19は、他のクラスIIサイトカイン受容体、例えばzcytor11及びzcytor16に類似する。Zcytor19（配列番号1）をコードするヒトcDNAクローンの分析は、分泌シグナル配列（配列番号2の残基1（Met）~20（Gly））及び成熟zcytor19サイトカイン受容体ポリペプチド（配列番号2の残基21（Arg）~491（Arg））を含ん

50

で成る491個のアミノ酸（配列番号2）をコードする読み取り枠、約206個のアミノ酸残基（配列番号2の残基21（A r g）～226（A s n））の細胞外リガンドー結合ドメイン、約23個のアミノ酸残基（配列番号2の残基227（T r p）～249（T r p））のトランスメンブランドメイン、及び約242個のアミノ酸残基（配列番号2の残基250（L y s）～491（A r g））の細胞内ドメインを表した。

【0056】

細胞外リガンドー結合ドメインにおいては、2種のフィブロネクチンIII型ドメイン及びリンカー領域が存在する。前記第1フィブロネクチンIII型ドメインは配列番号2の残基21（A r g）～119（T y r）を含んで成り、リンカーは配列番号2の残基120（L e u）～124（G l u）を含んで成り、そして第2フィブロネクチンIII型ドメインは、配列番号2の残基125（P r o）～223（P r o）を含んで成る。従って、配列番号2のアミノ酸21（A r g）～223（P r o）を含んで成るポリペプチド（配列番号4）が、リガンド結合フラグメントと思われる。さらに、典型的には、クラスII受容体に保存されるように、配列番号2に示されるような残基43（T r p）及び68（T r p）を含んで成る保存されたトリプトファン残基及び、配列番号2の位置74，82，195，217での保存されたシステイン残基が存在する。

【0057】

さらに、本発明は、ポリペプチド（配列番号2に関する）の細胞内ドメインに約30個のアミノ酸挿入体を包含するz c y t o r 1 9受容体の変異体を包含する。Z c y t o r 1 9（配列番号18）をコードするヒトcDNAクローンの分析は、分泌シグナル配列（配列番号19の残基1（M e t）～20（G l y））及び成熟z c y t o r 1 9サイトカイン受容体ポリペプチド（配列番号19の残基21（A r g）～520（A r g））を含んで成る520個のアミノ酸（配列番号19）をコードする読み取り枠、約206個のアミノ酸残基（配列番号19の残基21（A r g）～226（A s n））の細胞外リガンドー結合ドメイン、約23個のアミノ酸残基（配列番号19の残基227（T r p）～249（T r p））のトランスメンブランドメイン、及び約271個のアミノ酸残基（配列番号19の残基250（L y s）～520（A r g））の細胞内ドメインを表した。

【0058】

細胞外リガンドー結合ドメインにおいては、2種のフィブロネクチンIII型ドメイン及びリンカー領域が存在する。前記第1フィブロネクチンIII型ドメインは配列番号19の残基21（A r g）～119（T y r）を含んで成り、リンカーは配列番号19の残基120（L e u）～124（G l u）を含んで成り、そして第2フィブロネクチンIII型ドメインは、配列番号19の残基125（P r o）～223（P r o）を含んで成る。従って、配列番号19のアミノ酸21（A r g）～223（P r o）を含んで成るポリペプチド（配列番号4）が、リガンド結合フラグメントと思われる。さらに、典型的には、クラスII受容体に保存されるように、配列番号19に示されるような残基43（T r p）及び68（T r p）を含んで成る保存されたトリプトファン残基及び、配列番号19の位置74，82，195，217での保存されたシステイン残基が存在する。

【0059】

さらに、z c y t o r 1 9受容体ポリペプチドの切断された可溶性形が天然において発現されると思われる。Z c y t o r 1 9（配列番号20）をコードするヒトcDNAクローンの分析は、分泌シグナル配列（配列番号21の残基1（M e t）～20（G l y））及び成熟z c y t o r 1 9サイトカイン受容体ポリペプチド（配列番号21の残基21（A r g）～211（A r g））を含んで成る211個のアミノ酸（配列番号21）をコードする読み取り枠、約143個のアミノ酸残基（配列番号21の残基21（A r g）～163（T r p））の切断された細胞外リガンドー結合ドメインを表し、トランスメンブランドメインは存在しないが、しかし約48個のアミノ酸残基（配列番号21の残基164（L y s）～211（S e r））の追加のドメインを表した。

【0060】

切断された細胞外リガンドー結合ドメインにおいては、2種のフィブロネクチンIII型

10

20

30

40

50

ドメイン及びリンカー領域が存在する。前記第1フィブロネクチンIII型ドメインは配列番号21の残基21 (Arg) ~ 119 (Tyr) を含んで成り、リンカーは配列番号21の残基120 (Leu) ~ 124 (Glu) を含んで成り、そして第2フィブロネクチンIII型ドメインは、配列番号21の残基125 (Pro) ~ 163 (Trp) を含んで成る。従って、配列番号21のアミノ酸21 (Arg) ~ 163 (Trp) を含んで成るポリペプチドが、リガンド結合フラグメントと思われる。さらに、典型的には、クラスII受容体に保存されるように、配列番号21に示されるような残基43 (Trp) 及び68 (Trp) を含んで成る保存されたトリプトファン残基が存在し、そして、この切断された可溶性形の zcytor19 受容体における保存されたシステイン残基は配列番号21の位置74及び82で存在する。

10

【0061】

さらに、本発明の zcytor19 ポリペプチドは天然において発現され得、ここで細胞外リガンド結合ドメインは、上記のように、成熟ポリペプチドのN-末端で追加の5~15個のアミノ酸残基、又は細胞外サイトカイン結合ドメイン又はサイトカイン結合フラグメントを含んで成る。

【0062】

当業者は、それらのドメイン境界がおおよそであり、そして既知のタンパク質との一列整列、及びタンパク質折りたたみの予測に基づかれることを認識するであろう。ドメインの末端からの残基の欠失は可能である。さらに、配列番号2に関しての上記の領域、ドメイン及びモチーフはまた、配列番号1に示される通りであり；配列番号19に関しての上記のドメイン及びモチーフはまた、配列番号18に示される通りであり；そして配列番号21に関しての上記のドメイン及びモチーフはまた、配列番号20に示される通りである。

20

【0063】

トランスメンブラン領域、及び保存され、そして低い変動性のモチーフの存在は一般的に、タンパク質における重要な構造領域と相互関係するか、又はその領域を定義する。低い変動性の領域（例えば、疎水性クラスター）は、一般的に、構造的に重要な領域に存在する (Sheppard, P. など, Gene, 150: 163-167, 1994)。低い変動性のそのような領域はしばしば、まれな又は数少ないアミノ酸、例えばトリプトファンを含む。そのような保存され且つ低い変動性のモチーフを端に有し、そしてそのモチーフ間の領域は、より変動性であるが、しかし、それらは重要な構造及び活性、例えば結合ドメイン、生物学的及び酵素学的活性、シグナルトランスダクション、細胞-細胞相互作用、組織極性ドメイン及び同様のものに関連し、又はそれらを明確にすることができるので、しばしば機能的に有意である。

30

【0064】

上記の zcytor19 における保存されたアミノ酸残基の領域は、新規ファミリーメンバーを同定するための手段として使用され得る。例えば、逆転写-ポリメラーゼ鎖反応 (RT-PCR) は、種々の組織源又は細胞系から得られるRNAからの保存された領域をコードする配列を増幅するために使用され得る。特に、zcytor19 配列から企画された高い変性プライマーがこの目的のために有用である。そのような変性プライマーの企画及び使用は、当業者により容易に実施され得る。

40

【0065】

本発明はまた、ポリヌクレオチド分子、例えば本明細書に開示される zcytor19 ポリペプチドをコードする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、配列番号2の zcytor19 ポリペプチドをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列であり；配列番号28は、配列番号19の zcytor19 ポリペプチドをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列であり；そして配列番号29は、配列番号21の zcytor19 ポリペプチドをコードするすべてのDNAを包含する縮重DNA配列である。

【0066】

50

当業者はまた、配列番号 3、28 及び 29 の縮重配列が U と T とを置換することによって、それぞれ、配列番号 2、19 及び 21 をコードするすべての RNA 配列も供給することを理解するであろう。従って、配列番号 3 のヌクレオチド 1-1473、配列番号 28 のヌクレオチド 1-1560 及び配列番号 29 のヌクレオチド 1-633 を含んで成る zcytor19 ポリペプチド-コードのポリヌクレオチド及びそれらの RNA 相当物は、本発明により包含される。さらに、本明細書に記載されるように、それらの縮重配列のサブフラグメント、例えば成熟形のポリペプチド、細胞外サイトカイン結合ドメイン、細胞内ドメイン及び同様のものが本発明に包含される。

【0067】

配列番号 2、19 及び 21、及びそのサブフラグメントに関して、当業者は、それらのサブフラグメントをコードする、配列番号 3、28 又は 29 におけるそれぞれのヌクレオチドを容易に決定することができる。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。

10

【0068】

【表 1】

表 1

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

10

20

30

【 0 0 6 9 】

与えられたアミノ酸のため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。

【 0 0 7 0 】

【 表 2 】

40

表 2

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

10

20

30

40

50

【0071】

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、19 及び／又は 21 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。

【0072】

当業者はまた、異なった種が“選択的コドン使用法”を示すことも理解するであろう。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 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 3 を参照のこと）。 10

【0073】

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鑄型として作用する。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

【0074】

本発明の好ましい態様においては、単離されたポリヌクレオチドは、配列番号 1、18 又は 20、又はそれに対して相補的な配列の類似するサイズの領域に対して、緊縮条件下でハイブリダイズするであろう。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 °C 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。 30

【0075】

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）。 40

【0076】

配列分析ソフトウェア、例えば OLIGO 6.0 (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 50

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。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。

【0077】

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。低い温度でのより高い程度の緊縮性は、緩衝溶液における個々の1%ホルムアミドに関して、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。適切な緊縮ハイブリダイゼーション条件は、約40～50%のホルムアミド、約6×までのSSC、約5×のDenhardt's溶液、0～約10%のデキストラン硫酸及び約10～20μg/mlの変性された市販のキャリアDNAを含んで成る溶液において約42℃での5時間～一晚インキュベーションに等しい。一般的に、そのような緊縮条件は、20～70℃の温度及び6×までのSSC及び0～50%のホルムアミドを含むハイブリダイゼーション緩衝液を包含し；次にハイブリダイゼーションに続いて、約2×までのSSCによるフィルターの洗浄を伴う。

【0078】

例えば、適切な洗浄緊縮性は、0.1×のSSC～2×のSSC、0.1%のSDS、55℃～65℃の温度に等しい。異なった程度の緊縮性が、標的配列に対する最大の特異的結合を達成するためには、ハイブリダイゼーション及び洗浄の間に使用され得る。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対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、高い程度の緊縮性で行われる。緊縮ハイブリダイゼーション及び洗浄条件は、プローブの長さに依存し、T_m、ハイブリダイゼーション及び使用される洗浄溶液において影響され、そして通常当業者により実験的に決定される。

【0079】

前で示されたように、本発明の単離されたポリヌクレオチドは、DNA及びRNAを包含する。DNA及びRNAを調製するための方法は、当業界において良く知られている。一般的には、RNAは、多量のzytor19 RNAを生成する組織又は細胞から単離される。そのような組織及び細胞は、ノザンブロット(Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 5201, 1980)により同定され、そしてPBL、脾臓、胸腺、骨髄、前立腺、リンパ組織、ヒト赤白血球細胞系、急性単球白血球細胞系、B-細胞及びT-細胞白血球組織及び細胞形、他のリンパ球及び造血細胞系、及び同様のものを包含する。

【0080】

前記活性、又はRNA生成細胞又は組織が同定されると、全RNAは、グアニジウムHCl抽出、続くCsClグラジエントにおける遠心分離による単離により調製され得る(Chirgwinなど, Biochemistry 18: 52-94, 1979)。ポリ(A)⁺ RNAは、Aviv and Leder(Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69: 1408-1412, 1972)の方法を用いて全RNAから調製される。相補的DNA(cDNA)は、既知の方法を用いて、ポリ(A)⁺ RNAから調製される。他方では、ゲノムDNAが単離され得る。次に、zytor19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが、例えばハイブリダイゼーション又はポリメラーゼ鎖反応(PCR)により同定され、そして単離される(Mullis, アメリカ特許第4, 683, 202号)。

【0081】

zytor19をコードする十分な長さのクローンは、従来のクローニング方法により得られる。相補的DNA(cDNA)クローンが好ましいが、但し、いくつかの用途(例えば、トランスジェニック動物における発現)に関しては、ゲノムクローンを使用し、又

10

20

30

40

50

は少なくとも1つのゲノムイントロンを含むようcDNAクローンを修飾することが好ましい。cDNA及びゲノムクローンを調製するための方法は、よく知られており、そして当業者のレベルの範囲内であり、そしてライブラリーをプローブし又は感作するために、本明細書に開示される配列又はその一部の使用を包含する。発現ライブラリーは、zcytor19、受容体フラグメント、又は他の特定の結合パートナーに対する抗体によりプローブされ得る。

【0082】

本発明のポリヌクレオチドはまた、DNA合成機械を用いても合成され得る。現在、好ましい方法は、ホスホラミジット方法である。化学的に合成された二本鎖DNAが遺伝子又は遺伝子フラグメントの合成のために必要とされる場合、個々の相補的鎖が、別々に製造される。短い遺伝子(60~80bp)の生成は技術的に直接的であり、そして相補的鎖の合成及び続いて、それらのアニーリングにより達成され得る。しかしながら、より長いポリヌクレオチド(300bp以上)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%でないので、特定の工程が通常使用される。この問題を解決するために、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調整形でアセンブルされる。

10

【0083】

十分な長さの遺伝子を調製するための他の手段は、特定組みのオーバーラップするオリゴヌクレオチド(40~100個のヌクレオチド)を合成することである。3'及び5'の短いオーバーラップする相補的領域(6~10個のヌクレオチド)がアニーリングされた後、大きなギャップが残存するが、しかし短い塩基対合された領域は、その構造体を一緒に維持するのに十分に長く且つ十分に安定性である。ギャップが満たされ、そしてDNA複合体がE. コリDNAポリメラーゼIによる酵素DNA合成により完結される。酵素合成の完結の後、ニックがT4 DNAリガーゼにより密閉される。

20

【0084】

二本鎖構造体は、DNA配列分析により確かめられる完全な遺伝子配列を形成するために、お互い連続的に連結される。Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, (ASM Press, Washington, D. C. 1994); Itakura など., Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984及びClimie など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 633-7, 1990を参照のこと。さらに、転写及び翻訳の正しい開始及び停止のためのシグナルを含む他の配列が一般的に付加される。

30

【0085】

本発明はさらに、他の種(オルト体)からの相対物リガンド及びポリヌクレオチドを供給する。これらの種は、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、馬及び他の霊長類ポリペプチドからのzcytor19ポリペプチドである。ヒトzcytor19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、zcytor19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 ブロットをプローブすることによって同定され得る。

40

【0086】

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。次に、オルト体のzcytor19コードのcDNAが種々の方法、例えば完全な又は部分的なヒト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ヒ

50

ト z c y t o r 1 9 配列から企画されたプライマーを用いて、P C R (M u l l i s , 前記)を用いてもクローン化され得る。さらなる方法においては、c D N A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 c D N A の発現が z c y t o r 9 ポリペプチドに対する抗体により検出され得る。類似する技法がまた、ゲノム クローンの単離に適用され得る。

【0087】

サイトカイン受容体サブユニットは、細胞外ドメイン、細胞膜にポリペプチドを固定するトランスメンブランドメイン、及び細胞内ドメインを含んで成る多重ドメイン構造により特徴づけられる。細胞外ドメインはリガンド結合ドメインであり得、そして細胞内ドメインはシグナルトランスダクションに包含されるエフェクタードメインであり得るが、但しリガンド結合及びエフェクター機能は、マルチマー受容体の別々のサブユニット上に存在する。マルチマー受容体は、ホモダイマー（例えば、P D G F 受容体 $\alpha \alpha$ 及び $\beta \beta$ イソフォーム、エリトロポエチン受容体、M P L 及び G - C S F 受容体）、サブユニットがそれぞれリガンド結合及びエフェクタードメインを有するヘテロダイマー（例えば、P D G F 受容体 $\alpha \beta$ イソフォーム）、及び種々の機能を有する成分サブユニットを有するマルチマー（例えば、I L - 2 , I L - 3 , I L - 4 , I L - 5 , I L - 6 , I L - 7 及び G M - C S F 受容体）を包含する。

10

【0088】

いくつかの受容体サブユニットは、多くの受容体に共通する。例えば、単独ではリガンドを結合できないが、しかし細胞内シグナルトランスダクションドメインを包含する A I C 2 B サブユニットは、I L - 3 及び G M - C S F 受容体の成分である。多くのサイトカイン受容体は、その構造及び機能に基づいて、4 種の関連するファミリーの 1 つに配置され得る。例えば、造血受容体は、保存されたシステイン残基及び W S X W S モチーフ（配列番号 5）を含むドメインの存在により特徴づけられる。サイトカイン受容体構造は、U r d a l , A n n . R e p o r t s M e d . C h e m . 2 6 : 2 2 1 - 2 2 8 , 1 9 9 1 及び C o s m a n , C y t o k i n e 5 : 9 5 - 1 0 6 , 1 9 9 3 により再考されている。

20

【0089】

新規生物学的機能を生物が獲得するための選択的圧力下で、新規のファミリーメンバーは、多重遺伝子ファミリーの存在を導く存在する受容体遺伝子の重複から、たぶん生まれる。従って、ファミリーメンバーは、祖先遺伝子の痕跡を含み、そしてそれらの特徴は、追加のファミリーメンバーの単離及び同定において利用され得る。従って、サイトカイン受容体スーパーファミリーは、いくつかのファミリー、例えば免疫グロブリンファミリー（例えば、C S F - 1 , M G F , I L - 1 及び P D G F 受容体）；ヘマトポイエチンファミリー（例えば、I L - 2 受容体 β -サブユニット、G M - C S F 受容体の α -サブユニット、G M - C S F 受容体 β -サブユニット、及び G - C S F , E P O , I L - 3 , I L - 5 , I L - 6 , I L - 7 及び I L - 9 受容体）；T N F 受容体ファミリー（例えば、T N F (p 8 0) T N F (p 6 0) 受容体、C D 2 7 , C D 3 0 , C D 4 0 , F a s 及び N G F 受容体）に再分割される。

30

【0090】

z c y t o r 1 9 配列の分析は、クラス I I サイトカイン受容体、例えばインターフェロニン γ 、 α 及び β 鎖及びインターフェロニン α / β 受容体 α 及び β 鎖、z c y t o r 1 1（通常、アメリカ特許第 5, 9 6 5, 7 0 4 号所有の）、C R F 2 - 3（G e n b a n k 受託番号 Z 1 7 2 2 7）、D I R S 1、z c y t o r 7（通常、アメリカ特許第 5, 9 4 5, 5 1 1 号所有の）受容体と同じ受容体ファミリーのメンバーであることを示唆する。このサブファミリーにおける受容体は、シグナルを形質導入するホモダイマーを形成するために包含することができる。サブファミリーのいくつかのメンバー（例えば、インターフェロン、I L - 1 0 , I L - 1 9 及び I L - T I F を結合する受容体は）、リガンドを結合し、そしてシグナルを形質導入するために、第 2 サブユニット（ β -サブユニットと称する）と結合する。特定の β -サブユニットは、多くの特定のサイトカイン受容体サ

40

50

ブユニットと会合する。

【0091】

例えば、クラスIIサイトカイン受容体に関して、*zcytor11*（通常アメリカ特許第5,965,704号所有の）及びCRF2-4受容体は、サイトカインIL-TIFを結合するためにホモダイマー化する（WIPO公開WO00/24758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）。 10

【0092】

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））。クラスII受容体複合体は、ヘテロダイマー又はマルチマーであり得る。従って、*zcytor19*サブユニットを含んで成る、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が本発明により包含される。 20

【0093】

当業者は、配列番号1、18又は20に開示される配列がヒト*zcytor19*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。この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。配列番号1、18又は20に示されるDNA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、配列番号2、19又は21の対立遺伝子変異体であるタンパク質と同じように、本発明の範囲内である。

【0094】

*zcytor19*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。 30

【0095】

本発明はまた、配列番号2、19又は21のポリペプチド、及びそれらのオルト体に対して実質的に類似する単離された*zcytor19*ポリペプチドも提供する。用語“実質的に類似する”とは、配列番号2、19又は21に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%、及びより好ましくは少なくとも80%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。そのようなポリペプチドは、より好ましくは、配列番号2、19又は21、又はそのオルト体に対して、少なくとも90%、及び最も好ましくは95%又はそれ以上同一であろう。 40

【0096】

%配列同一性は、従来の方法により決定される。例えば、Altschulなど., Bull. Math. Bio. 48: 603-616, 1986及びHenikoff and Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915-10919, 1992を参照のこと。手短に言及するば、2種のアミノ酸配列が、10のギャップ開始ペナルティー、1のギャップ拡張ペナルティー、及び表 50

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“blossum 62” 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：

【0097】

【数1】

〔同一適合の合計数〕

× 100

〔長い方の配列の長さ+2種の配列を整合させる
ために長い方の配列に導入されるギャップの数〕

10

【0098】

【表3】

表3

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

10

20

30

40

50

【0099】

ポリヌクレオチド分子の配列同一性は、上記に開示されるような割合を用いて、類似する方法により決定される。

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、本明細書に開示されるアミノ酸配列及び推定上の変異体 zcytor 19のアミノ酸配列により共有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。

【0100】

手短には、FASTAがまず、問題の配列（例えば、配列番号2、19又は21）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（k t u p 変数が1である場合）又は対の同一性（k t u p = 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”。

【0101】

“カットオフ”値（配列の長さ及びk t u p 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）の変法を用いて整列される。FASTA 分析のための例示的なパラメーターは次のものである：k t u p = 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 = B L O S U M 6 2。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。

【0102】

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、k t u p 値は、誤りとして設定される他のFASTA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。

【0103】

B L O S U M 6 2 表（表3）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)]。従って、B L O S U M 6 2 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。化学的性質に基づいてのみアミノ酸置換を企画することが可能であるが（上記のように）、用語“保存性アミノ酸置換”とは、-1よりも大きなB L O S U M 6 2 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B L O S U M 6 2 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B L O S U M 6 2 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B L O S U M 6 2 値により特徴づけられる。

【0104】

変異体z c y t o r 1 9 ポリペプチド又は実質的に相同のz c y t o r 1 9 ポリペプチドは、1又は複数のアミノ酸置換、欠失又は付加を有するものとして特徴づけられる。それらの変化は、好ましくは、保存性アミノ酸置換（表4を参照のこと）及びタンパク質及びポリペプチドの折りたたみ又は活性に実質的に影響を及ぼさない他の置換；小さな欠失、典型的には1～約30個のアミノ酸の欠失；及び小さなアミノ-又はカルボキシル末端の延長、例えばアミノ-末端メチオニン残基、約20～25個までの残基の小さなリンカーペプチドの延長、又は親和性標識の延長である。

【0105】

従って、本発明は、配列番号2、19又は21のその対応する領域（標識、延長、リンカー配列及び同様のものを除く）に対して80%、好ましくは少なくとも90%、及びより

10

20

30

40

50

好ましくは95%又はそれ以上の同一性を有する配列を含んで成るポリペプチドを包含する。親和性標識を含んで成るポリペプチドはさらに、zcytor19ポリペプチドと親和性標識との間にタンパク質分解部位を含む。好ましいそのような部位は、トロンビン分解部位及び第Xa因子分解部位を含む。

【0106】

【表4】

表4

保存性アミノ酸置換

塩基性：	アルギニン	10
	リシン	
	ヒスチジン	
酸性：	グルタミン酸	20
	アスパラギン酸	
極性：	グルタミン	20
	アスパラギン	
疎水性：	ロイシン	30
	イソロイシン	
	バリン	
芳香族：	フェニルアラニン	30
	トリプトファン	
	チロシン	
小さな：	グリシン	40
	アラニン	
	セリン	
	トレオニン	
	メチオニン	40

【0107】

本発明はさらに、種々の他のポリペプチド融合体、及び1又は複数のポリペプチド融合体を含んで成る関連するマルチマータンパク質を提供する。例えば、zcytor19ポリペプチドは、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なダイマータンパク質への融合として調製され得る。それに関しての好ましいダイマータンパク質は、免疫グロブリン不変領域ドメインを包含する。免疫グロブリンーz

cytor19ポリペプチド融合体は、種々のマルチマーzcytor19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。補助ドメインは、特定の細胞、組織又は高分子（例えば、コラーゲン）に対してそれらを標的化するためにzcytor19ポリペプチドに融合され得る。zcytor19ポリペプチドは、複数の成分、例えば精製のため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。

【0108】

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。

【0109】

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

【0110】

第2の方法においては、翻訳は、突然変異誘発されたmRNA及び化学的にアミノアミル化されたサブレッサーtRNAのマイクロインジェクションによりアフリカツメガエル卵母細胞において行われる (Turcatti など., *J. Biol. Chem.* 271: 1991-98, 1996)。第3の方法においては、E. コリ細胞が、置換される予定である天然のアミノ酸（例えば、フェニルアラニン）の不在下で及び所望する天然に存在しないアミノ酸（例えば、2-アザフェニルアラニン、3-アザフェニルアラニン、4-アザフェニルアラニン又は4-フルオロフェニルアラニン）の存在下で培養される。

【0111】

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。Koidé 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)。

【0112】

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、zcytor19アミノ酸により置換され得る。

10

20

30

40

50

【0113】

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)。後者の技法においては、単一のアラニン突然変異が分子中のあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、前記分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるように、生物学的活性 (例えば、リガンド結合及びシグナルトランスダクション) について試験される。

【0114】

また、Hiltonなど., J. Biol. Chem. 271: 4699-5708, 1996を参照のこと。リガンド-受容体相互作用の部位はまた、推定上の接触部位アミノ酸の突然変異に関して、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得る。例えば、de Vosなど., Science 255: 306-312, 1992; Smithなど., J. Mol. Biol. 224: 899-904, 1992; Wlodaverなど., FEBS Lett. 309: 59-64, 1992を参照のこと。必須アミノ酸の同一性は、関連する受容体による相同体の分析からも推定され得る。

【0115】

構造統合性の維持に対して決定的である領域又はドメイン内に存在するアミノ酸残基の決定が行われ得る。それらの領域内で、多かれ少なかれ、変化に耐性であり、そして分子の全体的な三次構造を維持するであろう特定の残基を決定することができる。配列構造を分析するための方法は、高いアミノ酸又はヌクレオチド同一性を有する複数配列の一系列整列、及び利用できるソフトウェア (例えば、the Insight II (商標) viewer and homology modeling tools; MSI, San Diego, CA)、二次構造性質、二元パターン、相補的パッケージング及び埋もれた極性相互作用を用いてのコンピューター分析を包含するが、但しそれらだけには限定されない (Barton, Current Opin. Struct. Biol. 5: 372-376, 1995及びCordesなど., Current Opin. Struct. Biol. 6: 3-10, 1996)。一般的に、分子への修飾を企画するか又は特定のフラグメントを同定する場合、構造の決定は、修飾された分子の活性を評価することによって付随されるであろう。

【0116】

アミノ酸配列の変更が、生物学的活性に対して必須である高次構造体の破壊を最少にするために zcytor19ポリペプチドにおいて行われる。例えば、zcytor19ポリペプチドが1又は複数の構造ドメイン、例えばフィブロネクチンIII型ドメインを含む場合、アミノ酸残基の変更が、分子のドメイン構造及び幾何学的及び他の成分を破壊しないよう行われ、ここでコンホメーションの変化が、いくらかの決定的な機能、例えば分子の、その結合パートナー、例えばA及びDヘリックス、すなわち配列番号2の残基44, 47及び135への結合を妨害する。アミノ酸配列の変更の効果は、例えば上記に開示されるようなコンピューターモデルにより予測され得、又は結晶構造の分析により決定され得る (例えば、Lapthornなど., Nat. Struct. Biol. 2: 266-268, 1995)。

【0117】

当業界において良く知られている他の技法は、標準の分子 (例えば、生来のタンパク質) と変異体タンパク質の折りたたみを比較する。例えば、変異体及び標準の分子におけるシステインパターンの比較が行われ得る。質量分光及び還元及びアルキル化を用いての化学的修飾は、ジスルフィド結合に関連するか又はそのような関連を有さないシステイン残基を決定するための方法を提供する (Beanなど., Anal. Biochem. 201: 216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2: 17

10

20

30

40

50

32-1748, 1993: 及び Patterson など., Anal. Chem. 66: 3727-3732, 1994)。

【0118】

一般的に、修飾された分子が標準の分子と同じジスルフィド結合パターンを有さない場合、折りたたみが影響を及ぼされると思われる。折りたたみを測定するためのもう1つの良く知られており、且つ許容できる方法は、円二色性(CD)である。修飾された分子及び標準の分子により生成されるCDスペクトルの測定及び比較は、通常のことである(Johnson, Protein 7: 205-214, 1990)。結晶学は、折りたたみ及び構造を分析するためのもう1つの良く知られた方法である。核磁気共鳴(NMR)、消化ペプチドマッピング及びエピトープマッピングはまた、タンパク質とポリペプチドとの間の折りたたみ及び構造的類似性を分析するための既知方法でもある(Schaan 10
an など., Science 257: 961-964, 1992)。

【0119】

配列番号2、19又は21に示されるような zcytor19 タンパク質配列の Hopp/Woods 親水性プロファイルが生成され得る(Hopp など., Proc Natl. Acad. Sci. 78: 3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88: 1-18, 1986 及び Triquier など., Protein Engineering 11: 153-169, 1998)。前記プロファイルは、スライドする6-残基窓(sliding six-residue window)に基づか 20
れている。埋もれたG, S及びT残基及び暴露されたH, Y及びW残基は無視された。例えば、zcytor19ポリペプチドにおいては、親水性領域は、配列番号2のアミノ酸残基295~300; 配列番号2のアミノ酸残基451~456; 配列番号2のアミノ酸残基301~306; 配列番号2のアミノ酸残基244~299; 及び配列番号2のアミノ酸残基65~70を包含する。さらに、当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドを包含するzcytor19親水性領域がDNASTARタンパク質プログラム(DNASTAR, INC., Madison, WI)を用いて、Jameson-Wolfプロットにより予測され得ることを認識するであろう。

【0120】

当業者は、親水性又は疎水性が、全体的な構造及び生物学的プロファイルを破壊しないよう、zcytor19ポリペプチドのアミノ酸配列における修飾を企画する場合、考慮され 30
るであろうことを認識するであろう。Val, Leu及びIleから成る群、又はMet, Gly, Ser, Ala, Tyr及びTrpから成る群から選択された疎水性残基の置換が特に興味の対象である。例えば、置換に耐性の残基は、配列番号2に示されるような残基を包含する。しかしながら、配列番号2又は19の位置74、82、195及び217でのシステイン残基及び配列番号4における対応するCys残基は、置換に対して比較的耐性であろう。さらに、配列番号21の位置74、82でのシステイン残基は置換に対して比較的不耐性である。

【0121】

必須アミノ酸の正体はまた、zcytor19ポリペプチドとの、クラスIIサイトカイン受容体ファミリーメンバー間の配列類似性の分析から推定され得る。前に記載された“FASTA”分析のような方法を用いて、高い類似性の領域が、タンパク質ファミリー内に同定され、そして保存された領域のためのアミノ酸配列を分析するために使用される。構造に基づいて変異体ポリヌクレオチドを同定するためのもう1つのアプローチは、可能性ある変異体zcytor19ポリヌクレオチドをコードする核酸分子が、上記で論じられたように、配列番号1、18又は20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できるかどうかを決定することである。 40

【0122】

本発明のポリペプチドにおける必須アミノ酸を同定する他の方法は、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である(Cunningham and Wells. Science 244: 1081 (198 50

9) ; Bass など. , Pro. Nat. Acad. Sci. USA 88 : 4498 (1991) ; Coombs and Gorey, “ Site-Directed Mutagenesis and Protein Engineering ”, in Proteins. Aualysis and Design, Angeletti (ed.), P. 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におけるあらゆる残基で導入され、そして得られる変異体分子が、分子の活性に対して決定的であるアミノ酸残基を同定するために、下記に開示されるように、生物学的又は生化学的活性について試験される。また、Hilton など. , J. Biol. Chem. 271 : 4699 (1996) を参照のこと。

10

【0123】

本発明はまた、本明細書において定義されるような zcytor19 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核酸分子を包含する。本明細書において定義されるような、“機能的” zcytor19 又はそのフラグメントは、その増殖又は分化活性により、特殊化された細胞機能を誘発し、又は阻害するその能力により、又は可溶性又は固定された抗-zcytor19 抗体、zcytor19 リガンドに特異的に結合するその能力により特徴づけられる。さらに、機能的フラグメントはまた、シグナルペプチド、細胞内シグナルドメイン、及び同様のものを包含する。前に本明細書において記載されたように、zcytor19 は、クラス I サイトカイン受容体構造により特徴づけられる。

20

【0124】

従って、本発明はさらに、(a) 本明細書に記載される細胞外ドメイン、サイトカイン-結合ドメイン、又は細胞内ドメインを含んで成るポリペプチド分子；及び (b) 1 又は複数のそれらのドメインを含んで成る機能的フラグメントを包含する融合タンパク質を提供する。融合タンパク質の他のポリペプチド部分は、もう 1 つのクラス II サイトカイン受容体、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、zcytor11 (通常、アメリカ特許第 5,965,704 号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7 (通常、アメリカ特許第 5,945,511 号所有の) 及び同様のものにより、又は融合タンパク質の分泌を促進する非生来の及び/又は関連のない分泌シグナルペプチドにより寄与され得る。

30

【0125】

核酸分子の通常欠失分析は、zcytor19 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、18 又は 20 のヌクレオチド配列又はそのフラグメントを有する DNA 分子は、一連の欠失を得るために Bal31 ヌクレアーゼにより消化され得る。次に、それらの DNA 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 zcytor19 活性について、又は抗-zcytor19 抗体又は zcytor19 受容体を結合する能力について試験される。エキソヌクレアーゼ消化のための 1 つの方法は、欠失を導入するためにオリゴヌクレオチド-指図された突然変異誘発を使用し、又は所望する zcytor19 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、zcytor19 ポリヌクレオチド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。

40

【0126】

機能的ドメインを同定するための標準の方法は、当業者に良く知られている。例えば、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が、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

50

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), Counaillleau 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

【0127】

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. USA 86: 2152-2156, 1989) により開示される方法を用いて行われ、そして試験される。手短に言及すれば、それらの著者は、ポリペプチドにおける複数の位置を同時ランダム化し、機能的ポリペプチドをスクリーンし、そして次に個々の位置での可能な置換の範囲を決定するために、突然変異誘発されたポリペプチドを配列決定するための方法を開示する。使用され得る他の方法は、ファージ表示 (例えば、Lowman など., Biochem. 30: 10832-10837, 1991; Ladner など., アメリカ特許第5, 223, 409号; Huse, WIPO公開WO 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。 20

【0128】

開示される zcytor19 DNA 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WI 97/20078 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す、親DNAのランダム断片化、続く、PCRを用いてのアセンブリーによるインビトロ相同組換えにより生成される。この技法は、前記工程中に追加の変動性を導入するために、親DNAのファミリー、例えば異なった種からの対立遺伝子変異体又はDNAを用いて改良され得る。所望する活性の選択又はスクリーニング、突然変異誘発及びアッセイの続くさらなる相互作用が、有害な変化に対して同時に選択しながら、所望する突然変異について選択することによって、配列の急速な“進化”を提供する。 30

【0129】

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 zcytor19 受容体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。これに関する好ましいアッセイは、下記に記載される、細胞増殖アッセイ及びバイオセンサーに基づくリガンドー結合アッセイを包含する。活性受容体又はその一部 (例えば、又はリガンドー結合フラグメント、シグナル化ドメイン及び同様のもの) 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する。 40

【0130】

さらに、本発明のタンパク質 (又はそのポリペプチドフラグメント) は、多機能分子を供 50

給するために、他の生物活性分子、特に他のサイトカインに連結され得る。例えば、z c y t o r 1 9 可溶性受容体からの1又は複数のヘリックスが、それらの生物学的性質又は生成の効率を高めるために、他のサイトカイン可溶性受容体に連結され得る。

【0131】

従って、本発明は、1又は複数のz c y t o r 1 9 のドメインを含んで成るセグメントが他のポリペプチドに融合されている一連の新規ハイブリッド分子を提供する。融合は好ましくは、組換え生成システムにおけるキメラ分子の発現を可能にするためにDNAレベルをスプライシングすることにより行われる。次に、その得られる分子は、改良された溶解性、改良された安定性、延長されたクリアランス半減期、改良された発現及び分泌レベル、及び薬物力学についてアッセイされる。そのようなハイブリッド分子はさらに、成分タンパク質又はポリペプチド間に追加のアミノ酸残基（例えば、ポリペプチドリinker）を含んで成る。

10

【0132】

本明細書に論議される方法を用いて、当業者は、シグナルトランスダクション又はリガンド結合活性を保持する、配列番号2又は19の種々のポリペプチドフラグメント又は変異体を同定し、そして／又は調製することができる。例えば、サイトカインー結合ドメイン（配列番号2又は19の残基21（A r g）～226（A s n））、サイトカインー結合ドメイン（配列番号2又は19の残基21（A r g）～223（P r o））、又はその対立遺伝子変異体又は種オルト体に対して実質的に相同であり、そして野生型z c y t o r 1 9 タンパク質のリガンドー結合活性を保持する種々のポリペプチドを調製することによって、z c y t o r 1 9 を、“可溶性受容体”にすることができる。そのようなポリペプチドは、トランスメンブラン及び細胞内ドメインの一部又はすべてからの追加のアミノ酸を包含することができる。そのようなポリペプチドはまた、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、例えばラベル、親和性標識及び同様のものも包含することができる。

20

【0133】

変異体及び融合タンパク質を包含するいずれかのz c y t o r 1 6 ポリペプチド、例えば変異体、可溶性受容体及び融合ポリペプチド又はタンパク質に関しては、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用意に生成することができる。

30

【0134】

本発明のz c y t o r 1 9 ポリペプチド、例えば十分な長さのポリペプチド、生物学的に活性のフラグメント及び融合ポリペプチドは、従来技法に従って、遺伝的に構築された宿主細胞において生成され得る。適切な宿主細胞は、外因性DNAにより形質転換又はトランスフェクトされ得、そして培養において増殖され得るそれらの細胞型であり、そして細菌、菌類細胞、及び培養された高等真核細胞を包含する。真核細胞、特に多細胞生物の培養された細胞が好ましい。クローン化されたDNA分子を操作し、そして種々の宿主細胞中に外因性DNAを導入するための技法は次の文献に開示される：Sambrookなど、Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, 及びAusubelなど、eds., Current Protocol in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987。

40

【0135】

一般的に、本発明のz c y t o r 1 9 ポリペプチドをコードするDNA配列は、その発現のために必要とされる他の遺伝子的要素、例えば一般的に、発現ベクター内の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。ベクターはまた、通常、1又は複数の選択マーカー及び1又は複数の複製の起点を含むであろうが、しかし当業者は、一定のシステム内で、選択マーカーが別のベクター上に供給され得、そして外因性DNAの複製

50

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、ベクター及び要素の選択は、当業者のレベルの範囲内の通常のことである。多くのそのような要素は文献に記載されており、そして商業的供給者を通して入手できる。

【0136】

zcytor19ポリペプチドを、宿主細胞の分泌路中に方向づけるためには、分泌シグナル配列（又は、シグナル配列、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、発現ベクターに供給される。分泌シグナル配列は、zcytor19の配列であり得、又はもう1つの分泌されたタンパク質（例えばt-PA）に由来し、又は新たに合成され得る。分泌シグナル配列は、zcytor19 DNA配列に作用可能に連結され、すなわち2つの配列は正しく読み取り枠を整合して連結され、そして宿主細胞の分泌経路中に新しく合成されたポリヌクレオチドを方向づけるように配置される。分泌シグナル配列は通常、興味あるポリペプチドをコードするDNA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DNA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）。

10

【0137】

他方では、本発明のポリペプチドに含まれる分泌シグナル配列は、分泌路中に他のポリペプチドを方向づけるために使用される。本発明はそのような融合ポリペプチドを提供する。シグナル融合ポリペプチドが製造され得、ここで配列番号2又は19のアミノ酸1（Met）～アミノ酸20（Gly）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いる方法及び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ている。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、分泌路中い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。

20

【0138】

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ポリペプチドフラグメント又は活性成分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。さらに、そのような融合構造体は、本明細書に記載されるように、動物を接種し、そして抗体を生成するために使用され得るzcytor19ポリペプチドフラグメントの発現、分泌及び精製を可能にする。

30

【0139】

培養された哺乳類細胞または、本発明内の適切な宿主である。外因性DNAを、哺乳類宿主細胞中に導入するための方法は、リン酸カルシウム-仲介トランスフェクション（Wiglerなど、Cell 14: 725, 1978；Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7: 603, 1981；Grahamなど、Virology 52: 456, 1973）、エレクトロポレーション（Neumannなど、EMBO J. 1: 841-845, 1982）；DEAE-デキストラン仲介トランスフェクション（Ausubelなど、前記）、及びリポソーム-仲介トランスフェクション（Hawley-Nelsonなど、Focus 15: 73, 1993；Ciccaroneなど、Focus 15: 80, 1993）を包含する。

40

【0140】

培養された哺乳類細胞における組換えポリペプチドの生成は、例えばlevinsonなど、アメリカ特許第4,713,339号；Hagenなど、アメリカ特許第4,784,950号；Palmiterなど、アメリカ特許第4,579,821号；及びRingold, アメリカ特許第4,656,134号により開示される。培養された適切な哺乳類細胞は、COS-1（ATCC No. CRL 165

50

)、COS-7 (ATCC No. CRL 1651)、BHK (ATCC No. CRL 1632)、BHK 570 (ATCC No. CRL 10314)、293 (ATCC No. CRL 1573; Graham など、J. Gen. Virol. 36: 59-72, 1977)、及びチャイニーズ ハムスター卵巣 (例えば CHO-K1; ATCC No. CCL61) 細胞系を包含する。

【0141】

追加の適切な細胞系は当業界において知られており、そして公的な寄託所、例えば American Type Culture Collection, Manassas, VA から入手できる。一般的に、強い転写プロモーター、例えばSV-40 又はサイトメガロウィルスからのプロモーターが好ましい。例えば、アメリカ特許第4, 956, 288 号を参照のこと。他の適切なプロモーターは、メタロチオネイン遺伝子からのプロモーター (アメリカ特許 4, 579, 821 号及び第 4, 601, 978 号)、アデノウィルス主要後期プロモーターを包含する。 10

【0142】

薬物選択は一般的に、外来性DNAが挿入されている、培養された哺乳類細胞を選択するために使用される。そのような細胞は通常、“トランスフェクタント”として言及される。選択剤の存在下で培養され、そしてそれらの子孫に興味ある遺伝子を伝達することができる細胞は、“適切なトランスフェクタント”として言及される。好ましい選択マーカーは、抗生物質ネオマイシンに対する耐性をコードする遺伝子である。選択は、ネオマイシン型薬物、例えばG-418又は同様のもの存在下で実施される。“増幅”として言及される方法である選択システムは、興味ある遺伝子の発現レベルを高めるためにも使用される。 20

【0143】

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。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。 30

【0144】

他の高等真核細胞、例えば昆虫細胞、植物細胞及び鳥類細胞もまた、宿主として使用され得る。植物細胞において遺伝子を発現するためのベクターとしてのアグロバクテリウム・リゾゲネス (*Agrobacterium rhizogenes*) の使用は、Sinkar など、J. Biosci. (Bangalore) 11: 47-58, 1987 により再考されている。昆虫細胞の形質転換、及びそこにおける外来性ポリペプチドの生成は、Guarino など、アメリカ特許第5, 162, 222号; 及びW IPO公開WO94/06463号により公開される。 40

【0145】

昆虫細胞は、オートグラファ・カリホルニカ (*Autographa californica*) 核多角体病ウィルス (AcNPV) に通常由来する組換えバキュロウィルスにより感染され得る。King, L. A. and Possee, R. D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide, London, Chapman & Hall; O'Reilly, D. R., Baculovirus Expression Vector: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; 及びRichardson, C. D., Ed., 50

Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995を参照のこと。

【0146】

組換えzcyltor17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、zcyltor19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、pFastBac1TM (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。

【0147】

さらに、トランスファーベクターは発現されたzcyltor19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., Peoc. 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、zcyltor19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、そしてスポドプテラ・フルギベルダ (Spodoptera frugiperda) 細胞、例えばSf9細胞をトランスフェクトするために使用される。zcyltor19を発現する組換えウィルスが結果的に生成される。組換えウィルス ストックは、当業者において通常使用される方法により製造される。

【0148】

組換えウィルスは、宿主細胞、典型的には、アワヨトウの幼虫、スポドプテラ・フルギベルダに由来する細胞系を感染せしめるために使用される。一般的には、Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Application of Recombinant DNA, ASM Prss, Washington, D. C., 1994を参照のこと。もう1つの適切な細胞系は、トリコプルシア・ニ (Trichoplusia ni) に由来するHigh FiveOTM細胞系 (Invitrogen) である (アメリカ特許第5, 300, 435号)。

【0149】

市販の血清フリー培地が、細胞を増殖し、そして維持するために使用される。適切な培地は、Sf9細胞のためには、SF900IITM (Life Technologies), 又はEST 921TM (Expression Systems); 及びT. ni細胞のためには、Ex-Cell 405TM (JRH Biosciences, Lenza, KS) 又はExpress FiveOTM (Life Technologies) である。使用される方法は一般的に、入手できる実験用マニュアルに記載されている (King, L. A. and Possee, R. D., 前記; O'Reilly, D. R. など., 前記; Richardson, C. D., 前記)。上清液からのzcyltor19ポリペプチドの続く精製は、本明細書に記載される方法を

用いて達成され得る。

【0150】

菌類細胞、例えば酵母細胞はまた、本発明内で使用され得る。これに関して、特に興味ある酵母種は、サッカロミセス・セレビスシアエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 及びピチア・メタノリカ (*Pichia methanolic*) を包含する。外因性DNAによりS・セレビスシアエ細胞を形質転換し、そしてそれから組換えポリペプチドを生成するための方法は、例えばKawasaki, アメリカ特許第4, 599, 311号; Kawasaki など., アメリカ特許第4, 931, 373号; Brake, アメリカ特許第4, 870, 008号; Welchなど., アメリカ特許第5, 037, 743号; 及びMurray など., アメリカ特許第4, 845, 075号により開示される。

10

【0151】

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

20

【0152】

他の酵素、例えばハンセンラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*)、シゾサッカロミセス・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 methanolic*)、ピチア・グイレルモンジ (*Pichia guilliermondii*)、及びカンジタ・マルトサ (*Candida maltosa*) のための形質転換システムは、当業界において知られている。例えば、Gleeson など., J. Gen. Microbiol. 132: 3459-3465, 1986 及びCregg, アメリカ特許第4, 882, 279号を参照のこと。アスペルギラス細胞は、McKnight など., アメリカ特許第4, 935, 349号の方法に従って使用され得る。アクレモニウム・クリソゲナム (*Acremonium chrysogenum*) を形質転換するための方法は、Sumino., アメリカ特許第5, 162, 228号により開示される。ニューロスポラ (*Neurospora*) を形質転換するための方法は、Lambowitz, アメリカ特許第4, 486, 533号により開示される。

30

40

【0153】

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、WIPO公開WO97/17450, WO97/17451, WO98/02536及びWO98/02565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。

50

【0154】

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。

【0155】

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. 5 kV/cm, 好ましくは約3. 75 kV/cmの電場の強さ、及び1~40 m秒、最も好ましくは約20 m秒の時定数(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。

【0156】

原核宿主細胞、例えば細菌E. コリ、バシラス及び他の属の菌株はまた、本発明において有用な宿主細胞である。それらの宿主を形質転換し、そしてそこにクローン化される外来性DNA配列を発現するための技法は、当業界において良く知られている(例えば、Sambrookなど, 前記を参照のこと)。細菌、例えばE. コリにおいてzytOR19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。

【0157】

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。

【0158】

形質転換され又はトランスフェクトされた宿主細胞は、選択された宿主細胞の増殖のために必要とされる栄養物及び他の成分を含む培養培地において、従来の方法に従って培養される。種々の適切な培地、例えば定義された培地及び複合培地は、当業界において知られており、そして一般的には、炭素源、窒素源、必須アミノ酸、ビタミン及び鉱物を含む。培地はまた、必要とされる場合、成長因子又は血清のような成分も含むことができる。

【0159】

増殖培地は一般的に、外因的に付加されたDNAを含む細胞を、例えば発現ベクター上に担持される選択マーカーにより補足され、又は宿主細胞中に同時トランスフェクトされる必須栄養物における薬物選択又は栄養欠乏により選択するであろう。P. メタノリカ細胞は適切な炭素源、窒素源及び微量栄養物を含んでなる培地において、約25℃~35℃の温度で培養される。液体培養物は、従来手段、例えば小さなフラスコの振盪又は発酵器のスパーキングにより十分なエアレーションを提供される。P. メタノリカのための好ましい培養培地は、YEPD(2% D-グルコース、2%のBactoTM ペプトン(Difco Laboratories, Detroit, MI), 1%のBactoTM 酵母抽出物(Difco Laboratories), 0.004%のアデニン及び0.006%のL-ロイシン)である。

【0160】

本発明の1つの観点においては、zcytor19サイトカイン受容体（例えば、トランスメンブラン及び細胞内ドメイン）は、培養された細胞により生成され、そして細胞は、受容体のためのリガンド、例えば天然のリガンド、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。このアプローチを要約すると、受容体をコードするcDNA又は遺伝子と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）と組合され、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。

【0161】

本発明の新規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、 β -サブユニット、例えばクラスIIサイトカイン受容体サブユニット、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、zcytor11（通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の）、CRF2-4、DIRS1、zcytor7（通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の）受容体を発現する細胞を包含する。そのようなサブユニットは、天然において細胞において発現され得るか、又はzcytor19受容体により同時トランスフェクトされ得る。クラスIサイトカイン受容体のための典型的な細胞系は、gp130を発現する細胞、及びgp130及びLIF受容体を同時発現する細胞を包含する（Gearringなど., EMBO. J. 10:2839-2848, 1991; Gearringなど., アメリカ特許第5,284,755号）。 10 20

【0162】

これに関して、同じサブファミリーにおける受容体、例えばIL-6又はLIFに結合する他のサイトカインに対して応答性である細胞を使用することが一般的に好ましい。なぜならば、そのような細胞は必要なシグナルトランスダクション経路を含むであろうからである。このタイプの好ましい細胞は、ヒトTF-1細胞系（ATCC番号CRL-2003）及びDA-1細胞系を包含する（Branchなど., Blood 69:1782, 1987; Broudyなど., Blood 75:1622-1626, 1990）。他方では、適切な宿主細胞は、所望する細胞応答のために必要とされる β -サブユニット又は他の細胞成分を生成するために構築され得る。

【0163】

例えば、ネズミ細胞系BaF3（Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevotなど., Mol. Cell. Biol. 6:4133-4135, 1986）、子供ハムスター腎臓（BHK）細胞系、又はCTL-2細胞系（ATTC TIB-214）が、個々のクラスIIサブユニット、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、zcytor11（通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の）、CRF2-4、DIRS1、zcytor7（通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の）受容体を、zcytor19の他に発現するためにトランスフェクトされ得る。 30 40

【0164】

同じ種からの宿主細胞及び受容体を使用することが一般的に好ましいが、しかしながら、このアプローチは、いずれかの種からの多数の受容体サブユニットを発現するための細胞系の構築を可能にし、それにより、種特異性から生じる可能性ある制限を克服する。他方では、マウス受容体cDNAの種相同体、例えばBaF3細胞系におけるマウスcDNAが、同じ種からの細胞系内でクローン化され、そしてその細胞内で使用され得る。従って、1つの造血成長因子、例えばIL-3に依存する細胞系が、zcytor19リガンド、又は抗-zcytor19抗体に依存性になるように構築され得る。

【0165】

機能的zcytor19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 50

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Allymar BlueTM (AccuMed, Chicago, IL) 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) (Mossman, 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。

【0166】

他のアッセイ型は、レポーター遺伝子を発現するよう、さらに構築される細胞を用いる。レポーター遺伝子は、レポーター-連結経路、例えばJAK/STAT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: 19094-19101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41: 11, 1993)。

【0167】

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。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-又は組織-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。

【0168】

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。他方では、トランスフェクトされた細胞からの培地サンプルが、アッセイされ得、そしてリガンドcDNAを発現する細菌クローンを単離するために、つづくプールの分割、再トランスフェクション及び再アッセイが伴なう。腎臓、肝臓、脾臓、胸腺、他のリンパ組織、B-細胞、T-細胞又は白血病細胞系により条件付けされた培地サンプルが、スクリーニング方法への使用のためのリガンドの好ましい源である。

【0169】

zcytor19のための天然のリガンドはまた、zcytor19を発現するサイトカイン-依存性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について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WO95/21930号を参照のこと。典型的な方法においては、zcytor19を発現する細胞が、例えばEMSにより突然変異誘発される。次に、細胞が、必要とされるサイトカインの存在下で回収され、次に、サイトカインを欠いている培養培地にトランスファーされる。

【0170】

生存細胞は、リガンドに対して競争するために、可溶性受容体ポリペプチドを、本明細書に記載されるzcytor19細胞外サイトカイン-結合ドメイン又はサイトカイン-結合フラグメントを含んで成る培養培地に添加することにより、又はzcytor19受容体を発現するトランスフェクトされた細胞に比較して、野生型細胞に基づくならし培地をアッセイすることにより、zcytor19のためのリガンドの生成についてスクリーンされる。この方法に使用するための好ましい細胞系は、gp130又は、IF受容体と組

10

20

30

40

50

合して gp130 を発現するためにトランスフェクトされる細胞を包含する。好ましいそのような宿主細胞系は、トランスフェクトされた CTL-2 細胞 (Gillis and Smith, Nature 268: 154-156, 1977) 及びトランスフェクトされた BaF3 細胞を包含する。

【0171】

さらに、zcytor19 可溶性受容体ポリペプチドを使用する分泌トラップ方法は、zcytor19 リガンドを単離するために使用され得る (Aldrich, など, Cell 87: 1161-1169, 1996)。既知の又は疑わしいリガンド源から調製された cDNA 発現ライブラリーが、COS-7 細胞中にトランスフェクトされる。cDNA ライブラリーベクターは一般的に、COS-7 細胞における増殖のための SV40 起点、及び高い発現のための CMV プロモーターを有する。トランスフェクトされた COS-7 細胞は、単層において増殖され、そして次に固定され、そして浸透せしめられる。次に、本明細書に記載される、標的化されているか、又はビオチンラベルされた zcytor19 可溶性受容体が、細胞像と接触して配置され、そして抗-相補的分子、すなわち zcytor19 リガンドを発現する、単層における細胞の結合を可能にされる。従って、リガンドを発現する細胞が、受容体分子により結合されるであろう。

【0172】

ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) により接合される抗-標的抗体 (Ig 融合体のための抗-Ig、FLAG-標的化された融合体のための M2 又は抗-FLAG、ストレプタビジン及び同様のもの) は、標的化されているか、又はビオチンラベルされた zcytor19 可溶性受容体が結合しているそれらの細胞を可視化するために使用される。HRP は、チラミド試薬、例えばチラミド-FITC の付着を触媒する。市販のキットが、この検出のために使用され得る (Renaissance TSA-DirectTM Kit; NEN Life Science Products, Boston, MA)。zcytor17 受容体リガンドを発現する細胞は、緑色の細胞として蛍光顕微鏡下で同定され、そして Aldrich, など, 前記に概略されるように、プラスミド救助のための方法を用いてのリガンドの続くクローニング、クローンが同定されるまでの続くラウンドの分泌トラップアッセイのために採取されるであろう。

【0173】

受容体として、zcytor19 ポリペプチドの活性は、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基材のバイオセンサー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 device, Sunnyvale, CA により製造される CytosensorTM Microphysiometer である。種々の細胞応答、たとえば細胞増殖、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。例えば、McConnell, H. M. など, Science 257: 1905-1912, 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。

【0174】

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。時間にわたって細胞培地における細胞外酸性化の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、例えば zcytor19 ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストに対する細胞応答を直接的に測定する。好ましくは、マイクロフィジオメーターは、zcytor19 ポリペプチドを発現しない対照の真核細胞に比較して、zcytor17-発現性真核細胞の応答を測定するために使用される。zcytor19-発現性真核細胞は、zcytor19-調整刺激に対して応答性である細胞を創造するか、又は天然において発現性の zcytor19 細胞、例えばリンパ球

、脾臓、胸腺組織、又はPBLに由来するzcytor19-発現性細胞である細胞を創造する、本明細書に記載されるように、アデノウィルスベクターを通して、zcytor19がトランスフェクトされているか、又は感染されている細胞を包含する。

【0175】

対照に比較して、zcytor19を発現する細胞の応答における細胞外酸性化の上昇又は低下により測定される差異が、zcytor19-調節された細胞応答の直接的に測定である。さらに、そのようなzcytor19-調節された応答は、種々の刺激下でアッセイされ得る。また、マイクロフィジオメーターを用いれば、zcytor19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、そして前記細胞の第1部分に比較して、前記細胞の第2部分の細胞応答の上昇又は低下の変化を検出することを含んでなる、zcytor19ポリペプチドのアゴニスト及びアンタゴニストを同定するための方法が提供される。zcytor19ポリペプチドのためのアンタゴニスト及びアゴニストは、この方法を用いて急速に同定され得る。

10

【0176】

本発明により提供される追加のアッセイは、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種の一般的なクラスに分けられる。第1のクラスにおいては、配列番号2の残基250(Lys)~491(Arg)、又は配列番号19の残基250(Lys)~520(Arg)を含んで成るzcytor19の細胞内ドメインは、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、Cell 63: 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であろう。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。

20

【0177】

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、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、zcytor19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zcytor19により形質導入されたシグナルに応答できるかどうかを決定するためにも使用され得る。

30

【0178】

第2クラスのハイブリッド受容体ポリペプチドは、第2受容体、好ましくはサイトカイン受容体の細胞質ドメイン及びトランスメンブランドメインと共に、zcytor19の細胞外(リガンド結合)サイトカイン-結合ドメイン(配列番号2又は19の残基21(Arg)~226(Asn))、又はサイトカイン-結合フラグメント(例えば、配列番号2又は19の残基21(Arg)~223(Pro))を含んで成る。トランスメンブランドメインは、いずれかの受容体に由来することができる。この第2クラスのハイブリッド受容体は、第2受容体により形質導入されるシグナルに応答することが知らされている細胞において発現される。それらの2種のハイブリッド受容体は、受容体に基づいてアッセイシステム内での広範囲の細胞型の使用を可能にする。

40

【0179】

次に、zcytor19のためのリガンドを発現することが見出された細胞が、リガンド-コードのcDNAが上記に開示されるように単離され得るcDNAライブラリーを調製するために使用される。従って、本発明は、新規受容体ポリペプチドの他に、受容体のためのポリペプチドリガンドをクローニングするための方法を提供する。

【0180】

zcytor19構造及び組織発現は、初期造血又は胸腺細胞発生及び免疫応答調節において役割を演じることができる。それらの工程は、1又は複数のサイトカインのそれらの同種受容体への結合に応答しての細胞増殖及び分化の刺激を包含する。この受容体に関して観察される組織分布の観点から、アゴニスト(天然のリガンドを包含する)及びアンタ

50

ゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。受容体アゴニストに同定される化合物は、インビトロ及びインビボで、標的細胞の増殖及び進化を刺激するために有用である。

【0181】

例えば、アゴニスト化合物又は抗-z c y t o r 1 9抗体は、定義された細胞培養培地の成分として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。従って、アゴニストは、T-細胞、B-細胞、及びリンパ球及び骨髄性系の他の細胞、及び培養における造血細胞の増殖及び／又は進化を特別に促進することにおいて有用である。

【0182】

z c y t o r 1 9又は抗-z c y t o r 1 9抗体のためのアゴニストリガンドは、細胞-介在性免疫性の刺激において、及びリンパ球増殖の刺激のために、例えば免疫抑制に關与する感染、例えば一定のウィルス感染の処理の研究への使用において有用である。追加の使用は、悪性形質転換が抗原性である腫瘍細胞をもたらす、腫瘍抑制のためのマウスモデルへの使用を包含する。アゴニストリガンド又は抗-z c y t o r 1 9抗体は、エフェクター細胞、例えばT-細胞、NK（天然のキラー）細胞又はLAK（リンパ性の活性化されたキラー）細胞の活性化を通して介在され得るか、又はアポプトシス経路を通して直接的に誘発され得る、細胞毒性を誘発するために使用され得る。例えば、z c y t o r 1 9抗体は、z c y t o r 1 9-担持の癌細胞に対する細胞毒性又はADCCを刺激するために使用され得る。アゴニストリガンドはまた、影響された細胞型のレベルを高めることによって白血球減少の処理において、及び骨髄移植の後、T-細胞レパートリーの再生の増強への使用のために有用である。

10

20

【0183】

アンタゴニストリガンド、化合物、可溶性z c y t o r 1 9受容体又は抗-z c y t o r 1 9抗体は、免疫型の抑制、例えば自己免疫疾患、例えばリュウマチ様関節炎、多発性硬化症、真性糖尿病、炎症性腫疾患、クローン病、等の処理に使用され得る。免疫抑制はまた、組織又は器官移植片及び移植片の拒絶を低めるために、及び影響された細胞型の増殖を阻害することによってT-細胞特異的白血病又はリンパ腫を処理するためにも使用され得る。

【0184】

本発明は、上記で論じられたように、裸抗-z c y t o r 1 9抗体（又はその裸抗体フラグメント）の使用、及び種々の疾病、例えばB-細胞悪性疾患、及びz c y t o r 1 9が発現される、本明細書の記載される他の癌の処理をもたらすためへの免疫接合体の使用に關する。そのような免疫接合体及び抗-z c y t o r 1 9抗体は、z c y t o r 1 9-担持の癌細胞に対する細胞毒性又はADCCを刺激するために使用され得る。免疫接合体は、標準技法を用いて調製され得る。例えば、免疫接合体は、抗体成分に治療剤を間接的に接合することによって生成され得る（例えば、Shihなど., Int. J. Cancer 41: 832-839 (1988); Shihなど., Int. J. Cancer 46: 1101-1106 (1990); 及びShihなど., アメリカ特許第5, 057, 313号を参照のこと。

30

40

【0185】

手短には、1つの標準アプローチは、酸化された炭水化物部分を有する抗体成分と、少なくとも1つの遊離アミン機能を有し、そして多くの薬剤、トキシン、キレート化剤、硼素付加物又は他の治療材を負荷されているキャリアポリマーとを反応せしめることを包含する。この反応は、最終接合体を形成するために第二アミンへの還元により安定化され得る初期シェフ塩基（イミン）連結をもたらす。

【0186】

前記キャリアポリマーは、他の実質的に同等のポリマーキャリアがまた使用され得るが、少なくとも50個のアミノ酸残基のアミノデキストラン又はポリペプチドであり得る。好ましくは、最終免疫接合体は、投与の容易性及び治療への使用のためへの効果的標的

50

化のために、水溶液、及び哺乳類血清に可溶性である。従って、キャリアポリマー上の安定化官能基は、最終免疫接合体の血清溶解を増強するであろう。

【0187】

ポリペプチド治療剤を含んで成る免疫接合体を生成するための他のアプローチにおいては、治療剤は、グルタアルデヒド縮合により、又はポリペプチド上の活性化されたカルボキシ基とアミノデキストラン上のアミンとの反応によりアミノデキストランに結合される。キレート化剤は、放射性金属又は磁気共鳴エンハンサーを含んで成る免疫接合体を調製するために抗体成分に結合され得る。例示的キレート化剤は、エチレンジアミン四酢酸及びジエチレントリアミン五酢酸の誘導体を包含する。硼素付加物、例えばカルボランは従来の方法により抗体成分に結合され得る。

10

【0188】

免疫接合体はまた、治療剤と抗体成分とを直接的に接合することによって調製され得る。その一般的な方法は、間接的接合方法に類似し、但し治療剤は酸化された抗体成分に直接的に結合されている。

【0189】

さらなる例示として、治療剤は、ジスルフィド結合形成を通して、還元された抗体成分のヒンジ領域で結合され得る。例えば、テタヌストキシンペプチドは、抗体成分にペプチドを結合するために使用される単一のシステイン残基により構成され得る。他の手段として、そのようなペプチドは、ヘテロ二官能価架橋剤、例えばN-スクシニル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオーネートを用いて、抗体成分に結合され得る。

20

【0190】

そのような接合についての一般的技法は、当業界において知られている。例えば、Wong, Chemistry of Protein Conjugation and Cross-Linking (CRC Press 1991); Upeslakisなど, "Modification of Antibodies by Chemical Methods" in Monoclonal Antibodies: Principles and Applications, Birchなど. (eds.), page 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies" in Monoclonal Antibodies: Production, Engineering and Clinical Application, Ritterなど. (eds.), Pages 60-84 (Cambridge University Press 1995) を参照のこと。

30

【0191】

上記のように、抗体のFc領域における炭水化物成分は、治療剤を接合するために使用され得る。しかしながら、Fc領域は、抗体フラグメントが免疫接合体の抗体成分として使用され得る場合、不在である。それにもかかわらず、抗体又は抗体フラグメントのL鎖可変領域中に炭水化物成分を導入することが可能である。例えば、Leungなど, J. Immunol. 154: 5919 (1996); Hansen など, アメリカ特許第5,443,953号(1995)を参照のこと。次に、構築された炭水化物成分が、治療剤を結合するために使用される。

40

【0192】

さらに、当業者は、接合方法の多くの可能性ある変法を認識するであろう。例えば、炭水化物成分は、血液、リンパ又は他の細胞外流体における損なわれていない抗体又はその抗原-結合フラグメントの半減期を拡張するために、ポリエチレングリコールを結合するために使用され得る。さらに、炭水化物成分又は遊離スルフヒドリル基に治療剤を結合することによって、二価の免疫接合体を構成することが可能である。そのような遊離スルフヒドリル基は、抗体成分のヒンジ領域に位置することができる。

【0193】

50

1つのタイプの免疫接合体は抗体成分及びポリペプチド細胞毒素を含んで成る。適切なポリペプチド細胞毒素の例は、リボソーム不活性化タンパク質である。I型リボソーム不活性化タンパク質は一本鎖タンパク質であり、そしてII型リボソーム不活性化タンパク質は、ジスルフィド結合により連結される非同一のサブユニット（A及びB鎖）から成る（再考のためには、Soriaなど., Targeted Diagn. Ther. 7: 193 (1992) を参照のこと）。

【0194】

有用なI型リボソーム不活性化タンパク質は、次のものを包含する：サポナリア・オフィシナリス (*Saponaria officinalis*)（例えば、サポリンー1、サポリンー2、サポリンー3、サポリンー6）、モモルジカ・カラントア (*Momordica charantia*)（例えば、モモルジン）、ビロニア・ジオイカ (*Byronia dioica*)（例えば、ブリオジン、ブリオジンー2）、トリコサンテス・キリロウイ (*Trichosanthes kirilowii*)（例えば、トリコサンチン、トリコキリン）、ゲロニウム・ムルチフロラム (*Gelonium multiflorum*)（例えば、ゲロニン）、フィトロカ・アメリカナ (*Phytolacca americana*)（例えば、ヤマゴボウ抗ウィルスタンパク質、アマゴボウ抗ウィルスタンパク質ーII、抗ウィルスタンパク質）、及び同様のものからのポリペプチド。リボソーム不活性化タンパク質は、例えばアメリカ特許5,635,386号 (Walshなど.,) により記載される。

【0195】

適切なII型リボソーム不活性化タンパク質は、リシナス・コムニス (*Ricinus communis*)（例えば、リシン）、アブラス・プレカトリウム (*Abrus precatorius*)（例えば、アブリン）、アデニア・ディジタタ (*Adenia digitata*)（例えば、モデシン）、及び同様のものからのポリペプチドを包含する。II型リボソーム不活性化タンパク質は、ガラクトシドを結合するB鎖、及びアデニンを浄化する毒性A鎖を包含するので、II型リボソーム不活性化タンパク質接合体はA鎖を包含するべきである。

【0196】

追加の有用なリボソーム不活性化タンパク質は、ボウガニン (bougainin)、クラブイン、トウモロコシリボソーム不活性化タンパク質、バカリア・ピラミダタ (*Vaccaria pyramidata*) リボソーム不活性化タンパク質、ニグリンb、塩基性ニグリン1、エブリン、ラセモシンb、ルフインーa、ルフインーb、ルフインーS及び当業者に知られている他のリボソーム不活性化タンパク質を包含する。例えば、Bolognesi and Stripeによる国際公開番号WO98/55623号、Colnaghiなどによる国際出願番号WO97/49726号、Heyなどによるアメリカ特許第5,635,384号、Bolognesi and Stripeによる国際公開番号WO95/07297号、Ariasなどによる国際公開番号WO94/20540号、Watanabeなど., J. Biochem. 106: 6977 (1989); Islam など., Agric. Biol. Chem. 55: 229 (1991), 及びGaoなど., FEBS Lett. 347: 257 (1994) を参照のこと。

【0197】

天然に存在するリボソーム不活性化タンパク質はまた、本明細書に記載される標的化組成物のためにも適切であり、そしてそのようなタンパク質は当業者に知られている。リボソーム不活性化タンパク質は、公的に入手できるアミノ酸及びヌクレオチド配列を用いて生成され得る。例示のように、サポリンー6をコードするヌクレオチド配列は、Lorenzettiなど., アメリカ特許第5,529,932号により開示され、そしてWalshなど., アメリカ特許第5,635,384号は、トウモロコシ及び大麦リボソーム不活性化タンパク質ヌクレオチド及びアミノ酸配列を記載する。さらに、リボソーム不活性化タンパク質はまた市販されている。

10

20

30

40

50

【0198】

追加のポリペプチド細胞毒素は、リボヌクレアーゼ、DNアーゼI、ブドウ球菌エンテロトキシン-A、ジフテリア毒素、シュードモナスエキソトキシン及びシュードモナスエンドトキシンを包含する。例えば、Pastanなど., Cell 47: 641 (1986), 及びGoldenberg, CAA Cancer Journal for Clinicians 44: 43 (1994) を参照のこと。他の適切なトキシンは、当業者に知られている。

【0199】

もう1つの一般的なタイプの有用な細胞毒素は、チロシンキナーゼインヒビターである。チロシンキナーゼによる増殖の活性化は腫瘍の進行及び経過において役割を演じることが示されているので、この活性化は、チロシンキナーゼインヒビターを供給するzcytor19抗体成分により阻害され得る。適切なチロシンキナーゼインヒビターは、イソフラボン、例えばゲニステイン(5, 7, 4'-トリヒドロキシイソフラボン)、ダイゼン(7, 4'-ジヒドロキシイソフラボン)及びビオカニンA(4-メトキシゲニステイン)及び同様のものを包含する。成長因子にチロシンインヒビターを接合する方法は、例えばアメリカ特許第5, 911, 995号(Uckun)により記載される。

【0200】

もう1つのグループの有用なポリペプチド細胞毒素は、免疫モジュレーターを包含する。本明細書に使用される場合、“免疫モジュレーター”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、造血因子及び同様のもの、並びにそれらの分子の合成類似体を包含する。免疫モジュレーターの例は、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-2~IL-21)、コロニー刺激因子(例えば、顆粒球-コロニー刺激因子及び顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子)、インターフェロン(例えば、インターフェロン- α 、 β 、 γ 、 ω 及び τ)、“S1因子”と称する幹細胞成長因子、エリトロポエチン及びトロンプオエチンを包含する。例示的な免疫モジュレーター成分は、IL-2、IL-6、IL-10、インターフェロン- γ 、TNF- α 及び同様のものを包含する。

【0201】

免疫モジュレーターを含む免疫接合体は、免疫モジュレーターを標的細胞に供給するための手段を提供し、そして腫瘍細胞に対して特に有用である。免疫モジュレーターの細胞毒性効果は、当業者に良く知られている。例えば、Klegermanなど、“Lymphokines and Monokines”, in Biotechnology and pharmacy, Pessutoなど. (eds.), pages 53-70 (Chapman & Hall 1993) を参照のこと。例示のように、インターフェロンは、種々の細胞の表面上でのクラスI組織適合性抗原の高められた発現を誘発することによって細胞増殖を阻害し、そして従って、細胞毒性Tリンパ球による細胞の破壊速度を増強する。さらに、腫瘍壊死因子、例えば腫瘍壊死因子- α は、DNA断片化を誘発することによって、細胞毒性効果を生成すると思われる。

【0202】

本発明はまた、細胞毒素をコードする核酸分子を含んで成る免疫接合体を包含する。このアプローチの例として、Hogansonなど., Human Gene Ther. 9: 2565 (1998) は、サポリン遺伝子を含んで成る発現ベクターにより縮合されたFGF-2-ポリリシン接合体を生成することによって、サポリン遺伝子のFGF-2介在性供給を記載する。

【0203】

他の適切な毒素は、当業者に知られている。細胞毒性ポリペプチド及び抗体成分の接合体は、ポリペプチドを接合するための標準の技法を用いて調製され得る。例えば、Lam and Kelleher, アメリカ特許第5, 055, 291号は、ジフテリア毒素フラグメントA又はリシン毒素のいずれかにより接合される抗体の生成を記載する。一般的なアプローチはまた、Lappiなど., 50

Biochem. Biophys. Res. Commun. 160: 917 (1989), Soria など., Targeted Diagn. Ther. 7: 193 (1992), Buechler など., Eur. J. Biochem. 234: 706 (1995), Behar-Cohen など., Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 36: 2434 (1995), Lappi and Baird, アメリカ特許第5,191,067号、Calabresi など., アメリカ特許第5,478,804号、及びLappi and Baird, アメリカ特許第5,576,288号により記載されるように、サポリンによる線維芽細胞成長因子の接合方法により例示される。

【0204】

また、Ghetie and Vitteta, "Chemical Construction of Immunotoxin", in Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications, Francis and Delgado (Eds.), pages 1-26 (Humana Press, Inc. 2000), Hall (Ed.), Immunotoxin Methods and Protocols (Humana Press, Inc. 2000), 及びNewton and Rybak, "Construction of Ribonuclease-Antibody Conjugates for Selective Cytotoxicity", in Drug Targeting: Strategies, principles and Applications, Francis and Delgade (Eds.), pages 27-35 (Humana Press, Inc. 2000) を参照のこと。

【0205】

一方では、抗体成分及び細胞毒素ポリペプチドを含んで成る融合タンパク質は、標準の方法を用いて生成され得る。細胞毒素ポリペプチド成分を含んで成る融合タンパク質を調製するための方法は、抗体-毒素融合タンパク質生成の業界において良く知られている。例えば、インターロイキン-2成分を含んで成る抗体融合タンパク質は、Boleti など., Ann. Oncol. 6: 945 (1995), Nicolet など., Cancer Gene Ther. 2: 161 (1995), Becker など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7826 (1996), Hank など., Clin. Cancer Res. 2: 1951 (1996), 及びHu など., Cancer Res. 56: 4998 (1996) により記載されている。さらに、Yang など., Hum. Antibodies Hybridomas 6: 129 (1995) は、F(ab')₂ フラグメント及び腫瘍壊死因子- α 成分を含む融合タンパク質を記載する。

【0206】

抗体-シュードモナスエキソトキシンA融合タンパク質は、Chaudhary など., Nature 339: 394 (1989)、Brinkmann など., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 8616 (1991), Batra など., proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5867 (1992), Friedman など., J. Immunol. 150: 3054 (1993), Wells など., Int. J. Can. 60: 137 (1995), Fominaya など., J. Biol. Chem. 271: 10560 (1996), Kuan など., Biochemistry 35: 2872 (1996), 及びSchmidt など., Int. J. Can. 65: 538 (1996) により記載されている。ジフテリア毒素成分を含む抗体-毒素融合タンパク質は、Kreitman など., leukemia 7: 553 (1993), Micholls など., J. Biol. Chem. 268: 5302 (1993), Thompson など., J. Biol. Chem. 270: 28038 (1995), 及びVallera など., Blood 88: 2342 (1996) により記載されて

10

20

30

40

50

いる。

【0207】

Deonaraínなど., Tumor Targetting 1: 177 (1995) はRNアーゼ成分を有する抗体-毒素融合タンパク質を記載しており、そしてLinardouなど., Cell Biophys. 24-25: 243 (1994) は、DNアーゼI成分を含んで成る抗体-毒素融合タンパク質を生成した。ゲロニンは、Betterなど., J. Biol. Chem. 270: 14951 (1995) の抗体-毒素融合タンパク質における毒素成分として使用された。さらなる例として、Dohlstenなど., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 8945 (1994) は、ブドウ球菌エンテロトキシン-Aを含んで成る抗体-毒素融合タンパク質を報告している。また、Newton and Rybak, "Preparation of Recombinant RNase Single-Chain Antibody Fusion Proteins", in Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications, Francis and Delgado (Eds.), pages 77-95 (Humana press, Inc. 2000) を参照のこと。

【0208】

ポリペプチド細胞毒性に代わるものとして、免疫接合体は、細胞毒素成分として放射性同位体を含むことができる。例えば、免疫接合体は、抗-zcytor19成分及びα-放射性同位体、β-放射性同位体、γ-放射性同位体、Auger電子エミッター、α-粒子を放射する中性子捕獲剤、及び電子保護により崩壊する放射性同位体を含むことができる。適切な放射性同位体は次のものを包含する： ^{198}Au , ^{199}Au , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{47}Sc , ^{103}Pb , ^{109}Pd , ^{212}Pb , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{105}Rh , ^{113}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , $^{193\text{M}}\text{Pt}$, ^{197}Hg 及び同様のもの。

【0209】

放射性同位体は、抗体成分に、キレート化剤を通して直接的に、又は間接的に接合され得る。例えば、β-粒子及びγ-線を供給する放射性同位体であると思われる ^{67}Cu は、キレート化剤、すなわちp-ブロモアセトアミド-ベンジルーテトラエチルアミノ四酢酸を用いて、抗体成分に接合され得る。(Chase and Shapiro, "Medical Applications of Radioisotopes", in Jenner (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition, p. 943-865 (Mack Publishing Company 1995))。他のものとして、エネルギーの高いβ-粒子を放射する ^{90}Y はジエチレントリアミン五酢酸を用いて、抗体成分に結合され得る。さらに、 ^{131}I による抗体成分の直接的な放射性ラベリングのための典型的な適切な方法は、Steinなど., Antibody Immunoconj. Radiopharm. 4: 703 (1991) により記載される。他方では、硼素添加物、例えばカルボランが、標準技法を用いて、抗体成分に結合され得る。

【0210】

免疫接合体の調製のためのもう1つの型の適切な細胞毒素は、化学療法薬物である。例示的な化学療法薬物は、窒素マスタード、アルキルスルホネート、ニトロソウレア、トリアゼン、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体、抗生物質、エピポドフィロトキシン、白金配位錯体、及び同様のものを包含する。化学療法薬物の特定の例は、メトトレキサート、ドキソルビシン、ダウノルビシン、シトシンアラビノシド、シスープラチン、ビンデシン、マイトマイシン、ブレオマイシン、メルファラン、クロラムブシル、マイタンシノイド、カリケアマイシン、タキサノール及び同様のものを包含する。適切な化学療法剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 1

9th Ed. (Mark Publishing Co. 1995), 及び Goodman and Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics, 7th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1985) に記載される。他の適切な化学治療剤は、当業者に知られている。

【0211】

もう1つのアプローチにおいては、免疫接合体は、抗体成分に光活性剤又は色素を接合することにより調製される。蛍光及び他の色原体、又は例えば可視光に対して敏感なポルフィリンは、病変に対して適切な光を向けることによって、病変を検出し、そして処理するために使用されて来た。このタイプの“光放射線”、“光治療”又は“光力学”療法は、例えば Mew など., J. Immunol. 130: 1473 (1983), Jori など. (eds.), Photodynamic Therapy of Tumors and Other Diseases (Libreria Progetto 1985), Moseroff など., proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8744 (1986), van den Bergh, Chem. Britain 22: 430 (1988), Hasan など., prog. Clin. Biol. Res. 288: 471 (1989), Tatsuta など., Laser Surg. Med. 9: 422 (1989), 及び Pelegri など., Cancer 67: 2529 (1991) により記載される。

【0212】

上記アプローチはまた、免疫接合体を含んで成る多特異的抗体組成物を調製するためにも使用され得る。

抗-zcytor19抗体及び多特異的抗体組成物は、内因性 zcytor19 受容体により zcytor19 リガンド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。そのような抗体は、処理の必要ないずれかの対象に投与され、そして本発明は、家畜及びヒトの両者の治療使用を企画する。例示的对象は、哺乳類対象例えば、農業用動物、家畜動物及びヒト患者を包含する。

【0213】

zcytor19 を結合する多特異的抗体組成物及び二重反応性抗体は、自己免疫疾患、B細胞癌、免疫調節、及び他の病理学（例えば、ITCP、T細胞一介在性疾病、catleman's 病、自己免疫疾患、脊髓形成異常症候群及び同様のもの）、腎疾患、移植片拒絶及び対宿主性移植片病の処理のために使用され得る。本発明の抗体は、免疫応答の間、B細胞応答を特異的に調節するよう標的化され得る。さらに、本発明の抗体は、B細胞増殖、B細胞による抗原提供、抗体生成及びサイトカイン生成を調節するために使用され得る。

【0214】

拮抗性抗-zcytor19抗体は、B細胞リンパ種及び白血病、慢性又は急性リンパ性白血病、骨髓腫、例えば多発性骨髓腫、血漿細胞腫及びリンパ腫、例えば非-Hodgkins リンパ腫（zcytor19 リガンドポリペプチドの上昇が関連するか、又は zcytor19 リガンドが生存因子又は成長因子である）を処理するために zcytor19 リガンドの効果を中和するために有用であり得る。抗-zcytor19抗体はまた、免疫無防備状態の患者（例えば、AIDS 又は器官移植）において発生する Epstein Barr ウィルス関連リンパ腫を処理するためにも使用され得る。

【0215】

zcytor19 と結合することによってシグナルを誘発する抗-zcytor19抗体は、増殖阻害、細胞周期の阻止、アポトシス又は腫瘍細胞死を導くシグナルの誘発を通して直接的に、リンパ腫及び白血病細胞の増殖を阻害することができる。シグナルを開始する zcytor19 抗体は、癌細胞を直接的に阻害するか又は殺害するための好ましい抗体である。さらに、拮抗性抗-zcytor19モノクローナル抗体は、正常B細胞を活性化し、そして抗癌免疫応答を促進することができる。抗-zcytor19抗体は、

白血病、リンパ腫、及び多発生骨髄腫の増殖を直接的に阻害することができ、そしてその抗体は免疫エフェクター機能を誘発することができる。抗-*z c y t o r 1 9*モノクローナル抗体は、抗体-依存性細胞毒性、補体-依存性細胞毒性及びファゴサイトーシスを可能にすることができる。

【0216】

*z c y t o r 1 9*リガンドは、好中球、単球、樹状突起細胞及び活性化された単球において発現され得る。自己免疫疾患（例えば、重症筋無力症及びリウマチ様関節炎）においては、B細胞は、*z c y t o r 1 9*リガンドによる活性化の後、自己免疫性を悪化する。B-リンパ球の作用を選択的に阻止する免疫抑制タンパク質は、疾病の処理に使用される。自己抗体生成は、いくつかの自己免疫疾患に共通し、そして組織破壊及び疾病の悪化に寄与する。自己抗体はまた、免疫複合体付着合併症の発生を導くことができ、そして全身性エリテマトーデスの多くの症状、例えば腎不全、神経痛症状及び死を導く。

【0217】

細胞応答に無関係な抗体生成の調節はまた、多くの疾病状態において有益である。B細胞はまた、リウマチ様関節炎における関節炎原性免疫グロブリンの分泌において役割を演じることが示されている。*z c y t o r 1 9*リガンド抗体生成の阻害は、自己免疫疾患、例えば重症性筋無力症及びリウマチ様関節炎の処理において有益である。免疫抑制治療剤、例えばB-リンパ球の作用を選択的に阻止するか、又は中和する抗-*z c y t o r 1 9*抗体は、そのような目的のために有用である。

【0218】

本発明は、自己免疫患者に関するか又は関連しない、最終段階の腎疾患に関するB細胞の作用を選択的に阻止するか又は中和するための抗-*z c y t o r 1 9*抗体又は多特異的抗体組成物の使用方法を提供する。そのような方法はまた、免疫学的な腎疾患を処理するためにも有用である。そのような方法は、疾病、例えば膜ネフロパシー、IgAネフロパシー又はBerger's病、IgMネフロパシー、Goodpasture's病、後-感染症糸球体腎炎、糸球体間質増殖、慢性リンパ性白血病、微少変化ネフローゼ症候群に関連する糸球体腎炎の処理のために有用である。そのような方法はまた、狼瘡、多発生関節炎、Henoch-Schonlein、硬皮症、HIV-関連疾病、アミロイド症又は溶血性尿毒症症候群を処理するための治療用途として作用する。本発明の方法はまた、慢性腎盂炎に関する間質腎炎又は腎盂炎、鎮痛薬乱用、腎石灰、他の剤により引き起こされるネフロパシー、腎石症、又は慢性又は急性間質性腎炎を処理するための治療用途の一部として有用である。

【0219】

本発明はまた、腎又は泌尿器性新生物、多発生骨髄腫、リンパ腫、白血病、L鎖ニューロパシー、又はアミロイド症の処理方法も提供する。

本発明はまた、ぜん息及び他の慢性気道疾患、例えば気管支炎及び気腫の処理のために、抗-*z c y t o r 1 9*抗体又は多特異的抗体組成物を用いて、活性化されたB細胞を阻止するか又は阻害するための方法を提供する。

【0220】

免疫抑制、特に対宿主性移植片病及び移植片拒絶に関してのそのような治療使用のために、抗-*z c y t o r 1 9*抗体又は多特異的抗体組成物を用いて、T細胞応答を阻害するか又は中和するための方法がまた提供される。さらに、抗-*z c y t o r 1 9*抗体又は多特異的抗体組成物は、自己免疫疾患、例えばインスリン依存性糖尿病（IDDM）、多発生硬化症、リウマチ様関節炎、全身性エリテマトーデス、炎症性腸疾患（IBD）及びクローン病の処理のための治療プロトコールにおいて有用である。本発明の方法は、炎症性疾患を処理するために、特に関節痛、腫脹、貧血及び他の関連する症状を緩和するために、及び敗血性ショックを処理するために追加の治療価値を有する。

【0221】

B細胞応答は、感染性疾患、例えば細菌、ウィルス、原生動物及び寄生虫感染の攻撃において重要である。感染性微生物に対する抗体は、抗原への結合により、続いて補体介在性

溶菌又は細胞介在性攻撃により病原体を固定することができる。拮抗性又はシグナル化抗- γ cyt or 19抗体は、体液性応答を高めるように作用し、そして感染疾病の危険性での個人のための有用な治療剤であり、又はワクチン接種のためのサプリメントとして有用である。

【0222】

十分に確立された動物モデルが、一定の疾病状態における本発明の抗- γ cyt or 19抗体又は多特異的抗体組成物のインビボ効能を試験するために入手できる。例示のように、抗- γ cyt or 19抗体は、多くの自己免疫疾患の動物モデル、例えばSLE（全身性エリテマトーデス）のモデルとして作用するMR L-1pr/1pr又はNZB×NZW F1コンジェニックマウス株において試験され得る。そのような動物は、当業界にお

10

【0223】

New Zealand Black (NZB) マウスとNew Zealand White (NZW) マウスとの間の交雑の子孫が、ヒトにおけるSLEに密接に類似するSLEの自発形を成長せしめる。NZBWとして知られているそれらの子孫マウスは、生後1ヶ月でT細胞に対してIgM自己抗体を成長し始め、そして生後5～7ヶ月までに、Ig抗-DNA自己抗体は優性免疫グロブリンである。ポリクローナルB細胞過活性は、自己抗体の過生成を導く。それらの自己抗体、特に一本鎖のDNAに対して向けられたそれらの抗体の沈着は、タンパク尿、窒素血症及び腎不全からの死亡として臨床学的に明白である糸球体腎炎の進行に関連している。

20

【0224】

腎不全は、自発性SLEにより影響されるマウスにおいて死の腫瘍原因であり、そしてNZBW株においては、この工程は慢性及び閉塞性である。前記疾病は雄よりも雌においてより急速且つ重症であり、そして平均生存日は雄の406日に比較して、雌はわずか245日である。雌マウスの多くは、生後7～9ヶ月まで症候性（タンパク尿性）であるが、それらの何匹かは、それらが徴候を進行する場合、より若い又は年をとっている。NZBWマウスに見られる致命的な腎炎は、ヒトSLEにおいて見られる糸球体腎炎に非常に類似し、この自発的ネズミモデルを、可能性あるSLE治療の試験のために非常に魅力的にする。

【0225】

実験用アレルギー性脳脊髄炎についてのネズミモデルが、免疫介在性疾病の機構、及び可能性ある治療介入方法の両者を調べるための手段として使用されて来た。このモデルはヒト多発性硬化症に類似し、そして神経タンパク質、例えばミエリン基本タンパク質又はタンパク脂質タンパク質へのT細胞活性化の結果として脱髄を生成する。抗原による接種は、CD4+、クラスII MHC-制限されたT細胞(Th1)の誘発を導く。実験用アレルギー性脳脊髄炎についてのプロトコールの変化は、モデルの急性、慢性一再発性又は受動性-トランスファー変異体を生成することができる。

30

【0226】

コラーゲン-誘発された関節炎モデルにおいては、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。コラーゲン-誘発された関節炎はリウマチ様関節炎と、免疫学的及び病理学的特徴を共有するので、これは、可溶性あるヒト抗炎症性化合物をスクリーニングするための理想的モデルにする。コラーゲン-誘発された関節炎モデルを用いることのもう1つの利点は、病因の機構が知られていることである。II型コラーゲン上のT及びB細胞エピトープは同定されており、そして免疫-介在性関節炎に関連する、種々の免疫学的（遅延された型の過每性及び抗-コラーゲン抗体）及び炎症性（サイトカイン、ケモカイン及びマトリックス-分解性酵素）パラメーターは決定されており、そしてモデルにおける試験化合物効能を評価するために使用され得る。

40

【0227】

重症筋無力症は、ネズミモデルが利用できるもう1つの自己免疫疾患である。重症筋無力症は、ニコチン様アセチルコリン受容体に対して向けられた自己抗体の生成を包含する、

50

神経筋肉伝達の障害である。重症筋無力症は、運動に対する異常な虚弱及び疲労を包含する臨床学的特徴を獲得するか、又は受け継がれる。重症筋無力症のマウスモデルは確立されている。実験の自己免疫重症筋無力症は、アセチルコリン受容体に対する抗体の存在により特徴づけられる抗体介在性疾病である。

【0228】

それらの抗体は、筋肉の虚弱さをもたらす、欠陥性神経筋肉電氣的衝撃を導く受容体を破壊する。実験の自己免疫重症筋無力症モデルにおいては、マウスがニコチン様アセチルコリン受容体により免疫化される。重傷筋無力症の臨床学的徴候は、二次免疫化の後、数週で明らかになる。実験の自己免疫重症筋無力症は、ラジオイムノアッセイによるアセチルコリン受容体抗体の血清レベルの測定、筋肉アセチルコリン受容体の測定を包含するいくつかの方法、又は筋電図検査により評価される。

【0229】

一般的に、投与される抗-*zcytor19*抗体又は多特異的抗体組成物の用量は、患者の年齢、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であろう。例示のように、抗-*zcytor19*抗体又は多特異的抗体組成物は、1度に、又は反復して、低いタンパク質用量、例えば用量当たり20～100mgのタンパク質で投与され得る。他方では、抗-*zcytor19*抗体又は多特異的抗体組成物は、用量当たり30～90mgのタンパク質、又は用量当たり40～80mgのタンパク質、又は用量当たり50～70mgのタンパク質の用量で投与され得るが、但しそれよりも低いか又は高い容量が環境に応じて投与され得る。

【0230】

抗体成分の対象への投与は、局部カテーテルを通しての灌流によるか又は直接的な病変内注入による、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、胸膜内、鞘内投与であり得る。注射により治療用タンパク質を投与する場合、投与は連続的注入によるか、又は一回又は複数回のボラスによることができる。投与の追加経路は、経口、粘膜、肺及び経皮を包含する。

【0231】

抗-*zcytor19*抗体又は二特異的抗体成分を含んで成る医薬組成物は、医薬的に有用な組成物を調製する既知の方法に従って配合され得、それによれば、治療用タンパク質が医薬的に許容できるキャリアーと共に混合される。組成物は、その投与が受容体患者により許容され得る場合、“医薬的に許容できるキャリアー”であると言われる。無菌リン酸緩衝溶液は、医薬的に許容できるキャリアーの1つの例である。他の適切なキャリアーは、当業者に良く知られている。例えば、Gennaro (ed.), Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Edition (Mack Publishing Company 1995) を参照のこと。

【0232】

治療のためには、抗-*zcytor19*抗体又は二特異的抗体成分及び医薬的に許容できるキャリアーが、治療的に有効な量で患者に投与される。抗-*zcytor19*抗体又は二特異的抗体成分、及び医薬的に許容できキャリアーの組み合わせは、その投与される量が生理学的に有意である場合、“治療的に有効な量”で投与されると言われる。剤は、その存在が受容体患者の生理学において検出される変化をもたらす場合、生理学的に有意である。例えば、炎症を処理するために使用される剤は、その存在が炎症応答を緩和する場合、生理学的に有意である。もう1つの例として、腫瘍細胞の増殖を阻害するために使用される剤は、その剤の投与が腫瘍細胞の数の低下、低められた転位、固形腫瘍のサイズの低下、又は腫瘍の高められた壊死をもたらす場合、生理学的に有意である。

【0233】

抗-*zcytor19*抗体又は二特異的抗体成分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)). 10

【0234】

当業者は標準技法を用いて種々の医薬組成物を考案することができる。例えば次の文献を参照のこと: Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1989), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 2, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1990), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 3, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1990), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage forms: Disperse Systems, Vol. 1, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1996), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 2, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1996), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 3, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1998), Avis など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1991), Lieberman など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 2, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1992), and Avis など., (Eds.), Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 3, 2nd Edition (Marcel Dekker, Inc. 1993)。 20 30 40

【0235】

もう1つの例として、リポソームは、抗-*zcytor19*抗体又は二特異的抗体成分を、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 組生Hollinger (eds.), pages 3-24 (CRC Press 1995)を参照のこと)。 50

【0236】

リポソームは、組成において細胞膜に類似し、そして結果として、リポソームは安全に投与され、そして生分解性である。調製方法に依存して、リポソームは、単層又は多層性であり得、そしてリポソームは $0.02\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ 以上の範囲の直径でサイズの变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。 10

【0237】

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（ $0.1\sim 1.0\mu\text{m}$ ）は、典型的には、肝臓及び脾臓に主として位置する網内細胞系の細胞により摂取されるが、ところが $3.0\mu\text{m}$ よりも大きなリポソームは肺に沈着される。網内細胞系の細胞による小さなリポソームのこの好ましい摂取は、マクロファージ及び肝臓の腫瘍に化学治療剤を供給するために使用されて来た。 20

【0238】

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)）。 30

【0239】

抗-zcytor19抗体成分を含んで成るリポソームを投与する他の手段として、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-zcytor19抗体によりプレラベルされる。遊離抗体の血漿排除の後、ストレプタビジン—接合されたリポソームが投与される。この一般的なアプローチは、例えばHarasymなど., *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 32: 99 (1998)により記載される。そのようなアプローチはまた、多特異的抗体組成物を調製するために使用され得る。

【0240】

抗-zcytor19抗体又は二特異的抗体成分を含んで成るポリペプチドは、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か、又はリポソームの外部に結合され得る（例えばAndersonなど., *Infect. Immun.* 31: 1099 (1981), Wassef など., *Meth. Enzymol.* 149: 124 (1987)、Andersonなど., *Cancer Res.* 50: 1853 (1990), 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, Gregoriadis (ed.), page 40 50

317 (CRC Press 1993), 及び Ansell など., “Antibody Conjugation Methods for Active targeting of Liposomes”, in Drug Targeting, Strategies, Principles, and Applications, Francis and Delgado (Ed.), page 51-68 (Humana Press, Inc. 2000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))。

【0241】

10

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

20

【0242】

30

本発明はまた抗体成分がポリマーにより連結される、化学的に修飾された抗体成分を企画する。典型的には、前記ポリマーは、抗体成分が水性環境、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抗体成分を生成するために使用され得る。

40

【0243】

適切な水溶性ポリマーは、ポリエチレングリコール(PEG)、モノメトキシー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-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。抗体成分はまた、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。

50

【0244】

例示のように、酸化ポリアルキル成分は、抗体成分のN-末端に結合される。PEGは、1つの適切な酸化ポリアルキルである。例示として、抗体成分は、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。抗体成分のPEG化は、当業界において知られているPEG化反応のいずれかにより行われ得る（例えば、ヨーロッパ特許第0154316号、Delgadoなど., Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 9: 249 (1992), Duncan and Spreafico, Clin. Pharmacokinet. 27: 290 (1994) 及びFrancis など., Int. J. Hematol. 68: 1 (1998) を参照のこと）。例えば、PEG化は反応性 10
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、抗体成分接合体は、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）。

【0245】

アシル化によるPEG化は典型的には、抗体成分と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、抗体成分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 20
タン及び同様のもの。アシル化によるPEG化されたZtnfr12の調製方法は、典型的には、(a) 抗体成分と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基が抗体成分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：抗体成分の比が高いほど、ポリPEG化された抗体成分生成物の%が高くなる。

【0246】

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化された抗体成分生成物である。典型的には、その得られる抗体成分は、少なくとも95%、モノー、ジー又はトリペルギレートされるが、但し高 30
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、接合されていない抗体成分から分離され得る。

【0247】

アルキル化によるPEG化は一般的に、還元剤の存在下で抗体成分と、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、-CH₂-NH基を通してポリペプチドに結合される。

【0248】

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、 40
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。

【0249】

モノポリマー抗体成分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) 抗体成分のアミノ末端での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と抗体成分とを反応せしめ、そして 50

(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 S c h i f f 塩基のみを還元できるべきである。好ましくは還元剤は、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ビリジンボランを包含する。

【0250】

モノポリマー抗体成分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、抗体成分の 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 p K a 差異を提供する。p H 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、p H 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。p H が高い場合、ポリマー：抗体成分は、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、p H は、3 ~ 9 又は 3 ~ 6 の範囲内であろう。

10

【0251】

ポリペプチド細胞毒素はまた、抗体成分への接合の前又は後、上記方法を用いて、適切なポリマーにより接合され得る。可溶性ポリマーはまた、抗体融合タンパク質により接合され得る。

【0252】

裸抗-z c y t o r 1 9 抗体又は抗体フラグメントは、免疫接合体又は抗体融合タンパク質投与により補充され得る。1つの変法においては、裸抗-z c y t o r 1 9 抗体（又は裸抗体フラグメント）は、低用量の放射性ラベルされた抗-z c y t o r 1 9 抗体又は抗体フラグメントと共に投与される。第2の変法として、裸抗-z c y t o r 1 9 抗体（又は抗体フラグメント）は、低用量の放射性ラベルされた抗-z c y t o r 1 9 抗体-サイトカイン免疫接合体と共に投与される。第3の変法として、裸抗-z c y t o r 1 9 抗体（又は抗体フラグメント）は、放射性ラベルされていない抗-z c y t o r 1 9-サイトカイン免疫接合体と共に投与される。“低用量”の¹³¹I-ラベルされた免疫接合体に関しては、好ましい用量は、15 ~ 40 m C i であり、そして最も好ましい範囲は20 ~ 30 m C i である。対照的に、好ましい用量の⁹⁰Y-ラベルされた免疫接合体は10 ~ 30 m C i であり、そして最も好ましい範囲は10 ~ 20 m C i である。同様に、二特異的抗体成分は、免疫接合体又は抗体融合タンパク質投与により補充される。

20

30

【0253】

熱中性子活性化治療のための硼素添加された一負荷キャリアーを有する免疫接合体は通常、類似する手段でもたらされるであろう。しかしながら、中性子照射が行われる前、標的化されていない免疫接合体がクリアランスになるまで待つことが好都合である。クリアランスは、免疫接合体に結合する抗体を用いて促進され得る。この一般的原理の記載については、アメリカ特許第4,624,846号を参照のこと。

【0254】

本発明はまた、免疫モジュレーターが、正常細胞及び特に造血細胞の放射線一誘発された、又は薬剤一誘発された毒性を妨げるか、移動せしめるか又は逆転するために投与される処理方法にも関する。付加的免疫モジュレーター療法は、受容体哺乳類の高められた耐性のために、より高い用量の細胞毒性剤の投与を可能にする。さらに、付加的免疫モジュレーター療法は、用量制限の骨髄毒性を妨げるか、軽減するか又は逆転することができる。付加的療法のための適切な免疫モジュレーターの例は、顆粒球-コロニー刺激因子、顆粒球マクロファージ-コロニー刺激因子、トロンプオイエチン、I L-1、I L-3、I L-12 及び同様のものを包含する。付加的免疫モジュレーター治療方法は、アメリカ特許第5,120,525号 (G o l d e n b e r g) により開示される。

40

【0255】

抗-z c y t o r 1 9 抗体療法の効能は、本明細書に記載される免疫接合体及び他の形の

50

10

20

20

20

20

20

20

20

20

20

20

照のこと。

【0261】

医薬組成物は、抗-zcytor19抗体成分又は二特異的抗体成分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。治療分子は、単一又は複数回用量のための注射用溶液の形で、又は注射の前、再構成される無菌粉末として提供され得る。他方では、そのようなキットは、抗-zcytor19抗体成分の投与のための乾燥-粉末分散器、液体エアロゾル発生器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、医薬組成物の表示及び使用法についての文章情報を含んで成る。さらに、そのような情報は、前記組成物が外因性抗体に対して既知の過敏性を有する患者において禁忌を示される言明を包含することができる。

10

【0262】

zcytor19ポリペプチド、例えば可溶性zcytor19受容体はまた、循環レベルのリガンドの検出のための診断システムに使用され得る。関連する態様においては、zcytor19受容体ポリペプチドに対して特異的に結合する抗体又は他の剤が、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る。高められたレベルか又は低められたレベルのリガンド又は受容体ポリペプチドは、病理学的状態、例えば癌の表示であり得る。

【0263】

そのような受容体ポリペプチドは、病理学的工程に寄与し、そして基礎をなす疫病の間接的マーカーであり得る。例えば、ヒト血清における高められたレベルの可溶性IL-2は、広範囲の炎症及び腫瘍性状態、例えば心筋梗塞、ぜん息、重症筋無力症、リウマチ様関節炎、急性T-細胞白血病、B-細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、結腸癌、乳癌及び卵巣癌に関連している(Heaneyなど、Blood 87:847-857, 1996)。同様に、zcytor19は、B-細胞白血病細胞において発現され、そしてzcytor19発現の上昇は、根本的な疾病、例えば白血病のマーカーとして作用することができる。

20

【0264】

zcytor19受容体又は“可溶性受容体”のリガンド-結合ポリペプチドは、細胞外サイトカイン結合ドメイン(配列番号19の残基21(Arg)~226(Asn)、サイトカイン結合フラグメント(例えば、配列番号2又は19の残基21(Arg)~223(Pro);配列番号4)、zcytor19の可溶性バージョン、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、細胞外ドメインは、トランスメンブタ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。

30

【0265】

さらに、上記zcytor19サイトカイン結合ドメイン内のリガンド-結合ポリペプチドフラグメントはまた、本明細書に記載される使用のためのzcytor19可溶性受容体として作用することができる。宿主細胞化らの受容体ポリペプチドの輸送を方向づけるためには、受容体DNAは、分泌ペプチド、例えばt-PA分泌ペプチド又はzcytor19分泌ペプチドをコードする第2DNAセグメントに結合される。分泌された受容体ポリペプチドの精製を促進するためには、C-末端延長、例えばポリ-ヒスチジン標識、Glu-Glu標識ペプチド、物質P、FlagTMペプチド(Hoppなど、Bio/Technology 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定の結合剤が利用できるもう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。

40

【0266】

もう1つのアプローチにおいては、受容体細胞外ドメインは、2種の不変領域ドメインを含み、そして可変領域を欠いている、免疫グロブリン、H鎖不変領域、典型的には、Fcフラグメントとの融合体として発現され得る。そのような融合体は典型的には、マルチマ

50

一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に接近して整列されている。このタイプの融合体は、溶液から同種リガンドを親和性精製するために、インビトロアッセイ手段として、リガンドを特異的に滴定することによってインビボでシグナルを阻止するために、及び循環リガンドを結合し、そしてそれを循環から洗浄するために、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使用され得る。

【0267】

リガンドを精製するためには、zcytor19-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、生理学的に近い温度、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）上に固定されているタンパク質Aを用いて、混合物により分離される。次に、リガンドは、従来の化学的技法、例えば塩又はpHグラジエントを用いて溶出される。他方では、キメラ自体は、固体支持体に結合され、そして結合及び溶出は上記のようにして行われる。集められた画分は、所望する純度に達するまで、再分別され得る。

【0268】

さらに、zcytor19可溶性受容体は、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zcytor19リガンドを発現する癌においては、zcytor19可溶性受容体は、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る。さらに、zcytor19可溶性受容体は、zcytor19受容体を過剰発現する癌の進行を、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遅延するために使用され得る。zcytor19可溶性受容体のための類似するインビトロ用途が、例えば、zcytor19リガンドの不在下で増殖する細胞系を選択するために負の選択として使用され得る。

【0269】

さらに、zcytor19可溶性受容体は、インビボで、又は組織サンプルにおいて、zcytor19リガンド—発現性癌を検出するために、インビボで又は診断用途において使用され得る。例えば、zcytor19可溶性受容体は、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。

【0270】

さらに、放射性ラベルされたzcytor19可溶性受容体は、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。同様に、zcytor19ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗—zcytor19抗体又はペプチド結合フラグメントは、zcytor19受容体発現性癌を検出するために使用され得る。好ましい態様においては、zcytor19ポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗—zcytor19抗体又はペプチド結合フラグメントは、白血病、より好ましくは、B—細胞白血病、及び最も好ましくは、プレーB—細胞急性リンパ芽球性白血病を検出するために使用され得る。

【0271】

分化は進行性で且つ動的な工程であり、多能性幹細胞で始まり、そして最終的に分化された細胞で終結する。拘束なしに系統に再生することができる多能性幹細胞は、細胞系統への拘束が行われる場合、失われる一組の分化マーカーを発現する。前駆体細胞は、細胞が成熟に向かって細胞系統路を進行する場合に、発現され続けることができても又はできなくとも良い一組の分化マーカーを発現する。成熟細胞により独占的に発現される分化マーカーは通常、機能的性質のもの、例えば細胞生成物、細胞生成物を生成するための酵素、及び受容体である。

10

20

30

40

50

【0272】

細胞集団の分化の段階は、細胞集団に存在するマーカーの同定によりモニターされる。筋細胞、骨芽細胞、脂肪細胞、クロンドロサイト、腺維芽細胞及び網様細胞は、通常の間葉幹細胞に起因すると思われる（Owenなど., Ciba Fdn. Symp. 136: 42-46, 1988）。間葉幹細胞のためのマーカーはまだ十分には同定されておらず（Owenなど., J. of Cell Sci. 87: 731-738, 1987）、その結果、同定は、通常、前駆体及び成熟細胞段階で行われる。本発明の新規ポリペプチドは、間葉幹細胞及び単球又は他の前駆体細胞を、インビボ及びエクスビボの両方で単離するための研究のために有用である。

【0273】

最終分化又は脱分化の方の経路に特定細胞型を刺激する因子が、通常の前駆体又は幹細胞に起因する全細胞集団に影響を及ぼすことを示唆する証拠が存在する。従って、本発明は、リンパ細胞、造血細胞、及び内皮細胞の増殖の刺激または阻害を包含する。従って、本発明の分子、例えば、可溶性 zcytor19 受容体、サイトカイン-結合フラグメント、抗-zcytor19 抗体、センス及びアンチセンスポリヌクレオチドは、腫瘍細胞、及び特にリンパ球、造血、前立腺、内皮及び甲状腺細胞の阻害に使用できる。

【0274】

分化を測定するアッセイは例えば、組織、酵素活性、機能的活性又は形態学的変化の段階-特異的発現に関連する細胞-マーカーを測定することに包含する（Watt, FASEB, 5: 281-284, 1991; Francis, Differentiation 57: 63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses, 161-171, 1989; すべては引用により本明細書に組み込まれる）。他方では、zcytor19 ポリペプチド自体は、組織の段階-特異的発現に関連する追加の細胞表面又は分泌されたマーカーとして作用することができる。zcytor19 ポリペプチドの直接的な測定、又はそれが分化するにつれての組織における発現のその損失は、たとえば前立腺組織又は単球細胞の同定又は分化のためのマーカーとして作用することができる。さらに、zcytor19 は、上記のように、プレーB細胞急性リンパ芽球性白血病細胞及びいくつかの他の癌において特異的に発現される。当業者は、本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体がそれらの癌のためのマーカーとして使用され得ることを認識するであろう。

【0275】

同様に、zcytor19 ポリペプチドの直接的な測定、又は組織における発現のその損失が、それらが腫瘍の進行を受けるにつれて、組織又は細胞において決定され得る。前癌又は癌状態における細胞の侵襲性及び運動性の上昇、又はzcytor19 の発現の獲得又は損失が、正常な組織に比較して、腫瘍進行における形質転換、侵襲性及び転移についての診断として作用することができる。進行又は転移の腫瘍段階の知識は、所定の個々の癌患者のために、最も適切な治療又は処理の攻撃性を選択する上で医薬を助けるであろう。発現（mRNA又はタンパク質のいずれかの）の獲得及び損失を測定する方法は、当業界において良く知られており、そして本明細書に記載されており、そしてzcytor19 発現に適用され得る。

【0276】

例えば、細胞運動性を調節するポリペプチドの出現又は消出が、前立腺癌の診断及び予後を助けるために使用され得る（Banyard, J. and Zetter, B. R., Cancer and Metast. Rev. 17: 449-458, 1999）。細胞運動性、又はB-細胞腫瘍-特異的マーカーのエフェクターとして、発現のzcytor19 獲得又は損失がリンパ球、B-細胞、内皮、造血、及び他の癌についての診断分析として作用することができる。さらに、前立腺特異的抗原（PSA）に類似する、天然において発現される組織特異的マーカーとして、正常な対照に比較して、患者におけるzcytor19 ポリペプチド又は抗-zcytor19 抗体の高められたレベルは、zcytor19 が発現される正常組織における疾病の表示であり得る（例えば、Mu

10

20

30

40

50

lders, IMT、など., Eur. J. Surgical Oncol. 16: 37-41, 1990を参照のこと)。

【0277】

さらに、zcytor19発現が特定の正常なヒト組織に制限されると思われる場合、それらの組織におけるzcytor19発現の欠失、又は非特異的組織における強いzcytor19発現は、細胞又は組織型における異常性の診断、非癌組織への癌組織の侵入又は転移の診断として作用し、そしてさらなる試験又は調査の指図において医者を助け、又は治療の指図を助けることができる。zcytor19は食道、肝臓、卵巣、胃及び子宮腫瘍、及びメラノーマにおいて発現されるので、診断プローブは、それらの癌からの組織の診断及び同定に使用される。

10

【0278】

さらに、zcytor19は組織特異的、ポリヌクレオチドプローブ、抗-zcytor19抗体及び検出であるので、組織におけるzcytor19ポリペプチドの存在は、特定の組織が例えば、zcytor19が発現される、疾病又は癌性組織の切除を包含する手術の後の評価において、存在するかどうかを評価するために使用され得る。本発明のポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体は、すべての組織が、手術の後、例えば癌についての手術の後、切除される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にし、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は特に重要である。好ましい態様は、組織学的に又は現場使用され得る。蛍光性、放射性ラベルされた、又は比色的にラベルされた抗-zcytor19抗体及びzcytor19ポリペプチド結合パートナーを包含する。zcytor19が発現される特定の組織が本明細書において開示される。

20

【0279】

さらに、腫瘍進行及び転移に対するzcytor19の活性及び効果が、インビボで測定され得る。いくつかの同系マウスモデルが、腫瘍進行に対するポリペプチド、化合物又は他の処理の影響を研究するために開発されて来た。それらのモデルにおいては、培養継代された腫瘍細胞が、腫瘍ドナーと同じ株のマウス中に移植される。細胞は、受容体マウスにおいて類似する特徴を有する腫瘍中に増殖し、そして転移がまた、そのモデルのいくつかにおいて生じるであろう。本発明者の研究のための適切な腫瘍モデルは、中でも、Lewis肺癌(ATCC No. CRL-1642)及びB16黒色腫(ATCC No. CRL-6323)を包含する。それらは、インビトロで容易に培養され、そして操作される、C57BL6マウスと同種の通常使用される腫瘍系である。

30

【0280】

それらの細胞系のいずれかの移植に起因する腫瘍は、C57BL6マウスの肺に転移することができる。Lewis肺癌モデルが最近、脈管形成のインヒビターを同定するためにマウスに使用されている(O'Reilly MS, など. Cell 79: 315-328, 1994)。C57BL6/Jマウスが、組換えタンパク質、アゴニスト又はアンタゴニストの毎日の注入、又は組換えアデノウィルスの1回の注入を通して、実験剤により処理される。この処理に続いて3日で、 $10^5 \sim 10^6$ 個の細胞が背面の皮膚下に移植される。他方では、細胞自体が、タンパク質が全身的によりもむしろ腫瘍部位で又は細胞内で合成されるよう、移植の前、組換えアデノウィルス、例えばzcytor19を発現するアデノウィルスにより感染され得る。

40

【0281】

マウスは、通常5日以内に眼に見える腫瘍を進行する。腫瘍が3週間までの間、増殖され、この間、それらは対照の処理グループにおいて $1500 \sim 1800 \text{ mm}^3$ のサイズに達することができる。腫瘍サイズ及び体重が、その実験を通して注意してモニターされる。殺害の時点で、腫瘍が、肺及び肝臓と共に除去され、そして計量される。肺の重量が、転移性腫瘍負荷量と相互関係することが示された。さらなる測定として、肺表面転移が計数される。切除された腫瘍、肺及び肝臓が、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方法を用いて、組織学的試験、免疫組織化学及び現場ハイブリダイゼーショ

50

ンのために調製される。

【0282】

従って血管構造を回復し、そして転移を受ける腫瘍の能力に対する、問題の発現されたポリペプチド、例えば z c y t o r 1 9 の影響が評価され得る。さらに、アデノウィルスとは別に、移植された細胞が z c y t o r 1 7 により一時的にトランスフェクトされ得る。安定した z c y t o r 1 9 トランスフェクトの使用、及びインビボでの z c y t o r 1 9 発現を活性化する誘発性プロモーターの使用は、当業界において知られており、そして転移の z c y t o r 1 9 誘発を評価するためにこのシステムに使用され得る。さらに、精製された z c y t o r 1 9 又は z c y t o r 1 9 ならし培地が、このマウスモデルに直接的に注入され、そして従って、このシステムに使用される。一般的な文献については、O' 10
Reilly MS, など. Cell 79: 315-328, 1994, 及び Rusciano D, など. Murine Models of Liver Metastasis, Invasion Metastasis 14: 349-361, 1995 を参照のこと。

【0283】

ヒト血液学的悪性に由来する腫瘍細胞の増殖及び散在に対する z c y t o r 1 9 及びその誘導体（接合体）の活性がまた、マウスの異種移植モデルにおいてインビボで測定され得る。ヒト腫瘍細胞が、集合的には、異種移植モデルとして言及される、ヒト腫瘍細胞が免疫欠損マウス中に移植されているいくつかのマウスモデルが開発されている。Cattan, 20
AR and Douglas, E Leuk. Res. 18: 513-22, 1994; 及び Flavell, DJ. Hematological Oncology 14: 67-82, 1996 を参照のこと。疾病モデルの特徴は、マウスに供給される細胞の型及び量により変化する。

【0284】

典型的には、腫瘍細胞は、急速に増殖し、そして血液において循環し、そして多くの器官系に存在することが見出され得る。そのようなモデルにおいて試験するための適切な治療方法は、抗体誘発性毒性、リガンド-毒素接合体又は細胞に基づく治療を包含する。養子免疫療法として通常言及される後者の方法は、ヒト免疫系の成分（すなわち、リンパ球、NK細胞）による動物の処理を包含し、そして z c y t o r 1 9 又は他の免疫調節剤と細胞とのエキスピインキュベーションを包含することができる。 30

【0285】

この新規DNAに対応するmRNAは、プレーB細胞急性リンパ芽球白血病を包含するリンパ組織、骨髓における発現を示し、そして、脾臓、リンパ節及び末梢血液リンパ球において発現され得る。それらのデータは、免疫細胞の白血病、例えばB-細胞白血病における増殖、分化及び／又は活性化における z c y t o r 1 9 受容体のための役割を示し、そして免疫応答の進行及び調節における役割を示唆する。このデータはまた、 z c y t o r 1 9 とそのリガンドとの相互作用が骨髓性細胞の増殖及び進化を刺激し、そして I L - 2 , I L - 6 , L I F , I L - 1 1 及び O S M のように (Baumann など. , J. B 40
iol. Chem. 268: 8414-8417, 1993)、肝細胞における急性相タンパク質合成を誘発することができる。

【0286】

本発明のポリペプチドを80%以上の純度、より好ましくは90%以上の純度、さらに好ましくは95%以上の純度に精製することが好ましく、そして汚染性高分子、特に他のタンパク質及び核酸に対して、99.9%以上の純度であり、そして感染性及び発熱性剤を有さない医薬的に純粋な状態が特に好ましい。好ましくは、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。

【0287】

発現された組換え体 z c y t o r 1 9 ポリペプチド（又は z c y t o r 1 9 キメラ又は融合ポリペプチド）は、分別及び／又は従来の精製方法及び媒体を用いて精製され得る。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 50

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、F P L C 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。P E I、D E A E、Q A E 及び Q 誘導体が好ましい。

【0288】

典型的なクロマトグラフィー用媒体は、フェニル、ブチル又はオクチル基により誘導体化されたもの、例えばフェニル-Sepharose FF (pharmacia), T o y o p e a r l ブチル650 (T o s o H a a s, M o n t g o m e r y v i l l e, P A)、オクチル-Sepharose (Pharmacia) 及び同様のもの；又はポリアクリル樹脂、例えばAmberchrom CG71 (T o s o H a a s) 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。

【0289】

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。支持媒体にリガンド又は受容体ポリペプチドを結合するための方法は当業界において良く知られている。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を参照のこと。

【0290】

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 (I M A C) 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)。

【0291】

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。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 (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp. 529-39)。本発明のさらなる態様においては、興味あるポリペプチド、及び親和性標識 (例えばマルトース-結合タンパク質、FLAG標識、Glu-Gku標識、免疫グロブリンドメイン) の融合体が、精製を促進するために構成され得る。

【0292】

さらに、当業界において記載される方法を用いて、ポリペプチド融合体又はハイブリッド z c y t o r 19 タンパク質が、他のマウス又はヒトサイトカイン受容体ファミリータンパク質、又は異種タンパク質と組合して、本発明の z c y t o r 19 の領域又はドメイン

を用いて構成される (Sambrook など., 前記; Altschul など., 前記; Picard, Cur. Opin. Biology, 5: 511-5, 1994 及びそれらにおける引例)。それらの方法は、興味あるポリペプチドにおける大きなドメイン又は領域の生物学的重要性の決定を可能にする。そのようなハイブリッドは、反応運動学、結合を変更し、基質特異性を抑制し、又は拡張し、又はポリペプチドの組織及び細胞局在性を変更し、そして未知の構造のポリペプチドに適用される。

【0293】

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1又は複数の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。例えば、生物学的功能を付与するドメインの一部又はすべてが、本発明の zcytor19 と、もう1つのサイトカインファミリーメンバーからのその機能的に同等のドメインとの間で交換され得る。

10

【0294】

そのようなドメインは次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：分泌シグナル配列、細胞外サイトカイン結合ドメイン、フィブロネクチン第IIIドメイン、トランスメンブランドメイン、及び細胞内シグナル化ドメイン、Box I 及び Box II 部位。そのような融合タンパク質は、構成される融合体に依存して、本発明のポリペプチド又は他の既知のファミリータンパク質と同じか又は類似する生物学的功能プロフィールを有することが予測される。さらに、そのような融合タンパク質は、本明細書に開示されるように、他の性質も示すことができる。

20

【0295】

標準の分子生物学及びクローニング技法が、zcytor19 ポリペプチドと、それらが融合されるそれらのポリペプチドとの間の同等のドメインを交換するために使用され得る。一般的に、興味あるドメイン、例えば本明細書に記載される zcytor19 ドメインをコードする DNA セグメントが、追加のポリペプチド (例えば、もう1つのサイトカイン受容体、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、zcytor11 (通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7 (通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の) 又は他のクラスII サイトカイン受容体) をコードする少なくとも1つの他の DNA セグメントに読み取り枠を接合して作用可能に結合され、そして本明細書に記載されるように、適切な発現ベクター中に挿入される。

30

【0296】

一般的に、DNA 構造体は、ポリペプチドのその対応する領域をコードするいくつかの DNA セグメントが、完全な融合タンパク質又はその機能的部分をコードする単一の構造体を製造するために読み取り枠を整合して、作用可能に連結されるように、製造される。例えば DNA 構造体は、N-末端から C-末端側に、単一のポリペプチドを含んで成る融合タンパク質、続いて、サイトカイン結合ドメイン、続いてトランスメンブランドメイン、続いて細胞内シグナル化ドメインをコードする。そのような融合タンパク質は、本明細書に記載されるように、発現され、単離され、そして活性についてアッセイされ得る。さらに、そのような融合タンパク質は、本明細書に記載のような抗-zcytor19 抗体を生成するために動物を接種するのに使用されるべき zcytor19 ポリペプチドのフラグメントを発現し、そして分泌するために使用され得る。

40

【0297】

例えば、分泌シグナル配列は、本明細書に開示されるような、細胞外サイトカイン結合ドメイン、サイトカイン結合フラグメント、個々のフィブロネクチンIII型ドメイン、トランスメンブランドメイン、及び細胞内シグナル化ドメイン、又はそれらの組合せ (例えば、リンカーに結合されるフィブロネクチンIIIを含んで成る作用可能に連結されるポリペプチド、又は本明細書に記載される zcytor19 ポリペプチドフラグメント) に

50

作用可能に連結され、本明細書に記載のようにして精製され得、そして本明細書に記載のようにして、抗-z c y t o r 1 9抗体を生成するために動物に接種されるべき抗原として作用することができるz c y t o r 1 9ポリペプチドのフラグメントが分泌される。

【0298】

z c y t o r 1 9ポリペプチド又はそのフラグメントはまた、化学的合成を通して調製され得る。z c y t o r 1 9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；ペルギレート化されても又はペルギレートされなくても良く；そして開始メチオニンアミノ酸残基を含んでも又は含まなくても良い。

【0299】

本発明のポリペプチドはまた、排除固相合成、部分固相合成、フラグメント縮重又は従来の溶液合成により合成され得る。ポリペプチドを合成するための方法は、当業界において良く知られている。例えば、M e r r i f i e l d, J. A m. C h e m. S o c. 85: 2149, 1963; K a i s e rなど., A n a l. B i o c h e m. 34: 585, 1970を参照のこと。固体支持体上での所望するペプチドの完全な合成の後、ペプチド樹脂は、その樹脂からポリペプチドを分解する試薬と共に存在し、そしてほとんどの側鎖保護基を除去する。そのような方法は、当業界において十分に確立されている。

本発明の分子の活性は、細胞の分化及び増殖を側定する種々のアッセイを用いて測定され得る。そのようなアッセイは、当業界において良く知られている。

【0300】

本発明のタンパク質は、例えば、リンパ性、免疫性、炎症性、脾臓性、血液又は骨疾患の処理及び診断において有用であり、そして培養された細胞を用いてインビトロで、又は適切な動物モデルに本発明の分子を投与することによってインビボで測定され得る。例えば、z c y t o r 1 9可溶性受容体ポリペプチドを発現する宿主細胞は、アルギン酸塩環境下で包埋され、そして受容体動物中に注入（移植）され得る。アルギネートポリリーリシン微小封入、透過性膜封入及び拡散チャンバーは、トランスフェクトされた哺乳類細胞又は一次哺乳類細胞を捕獲するための手段として記載されている。

【0301】

それらのタイプの非免疫原性“封入”は、微小環境への栄養物ノトランスファーを可能にしそして又は、捕獲された細胞により分泌され又は開放されるタンパク質及び他の高分子の受容体動物への拡散を可能にする。最も重要なことには、カプセル又は微小環境は、受容体動物の免疫応答から外来性の包埋された細胞をマスクし、そして遮断する。そのような微小環境は、注入される細胞の寿命を、数時間又は数日（裸細胞）から数週間（包埋された細胞）まで拡張することができる。アルギン酸塩系は、包埋された細胞を生成するための単純且つ迅速な手段を提供する。

【0302】

アルギン酸塩系を生成するために必要とされる材料は、当業者に知られている。製造されると、そのアルギン酸塩系は、インビトロで、及びその系を用いて得られるデータに基づいて、インビボで、比較的強く且つ耐久性がある。そのアルギン酸塩系は容易に操作でき、そしてその方法論は多くの調製のために評価できる。典型的な方法においては、3%のアルギン酸塩が、無菌水において調製され、そして滅菌濾過される。アルギン酸塩系の調製の直前、アルギン酸塩溶液が再び濾過される。約50%の細胞懸濁液（1ml当たり約 5×10^5 個～約 5×10^7 個の細胞を含む）が3%アルギン酸塩溶液と共に混合される。1mlのアルギン酸塩／細胞懸濁液が、約15分間にわたって、100mMの滅菌濾過されたC a c l₂ 溶液中に押し出され、“糸（Thread）”が形成される。

【0303】

次に、押し出された糸は、50mMのC a c l₂ の溶液に移され、そして次に25mMのC a c l₂ の溶液に移される。次に、糸が、脱イオン水によりすすがれ、その後、ポリリーリシンの0.01%溶液においてインキュベートすることによって糸を被覆する。最

10

20

30

40

50

後に、糸は乳酸塩化されたリンガー溶液によりすすがれ、そして注射器（針のない）中に溶液から抜き取られる。次に大きな孔の針がその注射器につけられ、そして糸が最少量の乳酸塩化されたリンガー溶液において受容体中の腹腔内注入される。

【0304】

本発明のタンパク質をアッセイするためのインビボアプローチは、ウィルス供給システムを包含する。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、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、異種拡散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（T. C. Becker など., Meth. Cell Bio. 43: 161-89, 1994; 及びJ. T. Douglas and D. T. Curriel, Science & Medicine 4: 44-53, 1997 を参照のこと）。アデノウィルスシステムは次のいくつかの利点を付与する：（i）アデノウィルスは比較的大きなDNA挿入体を適応せしめることができ；（ii）高い力価に増殖され得；（iii）広範囲の哺乳類細胞型を感染せしめ；そして（iv）多数の異なったプロモーター、例えば偏在する、組織特異的、及び調節可能なプロモーターと共に使用され得る。また、アデノウィルスは血流において安定しているので、それらは静脈内注射により投与され得る。

【0305】

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を用いて、直接的な結合により又は同時トランスフェクトされたプラスミドとの相同組換えにより、ウィルスDNA中に組み込まれ得る。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（ヒト293細胞系が典型である）により供給されなければ、複製しないであろう。損なわれていない動物に静脈内投与される場合、アデノウィルスは主に、肝臓を標的化する。アデノウィルス供給システムがE1遺伝子欠失を有する場合、ウィルスは宿主細胞において複製することができない。しかしながら、宿主の組織（例えば、肝臓）は、異種タンパク質を発現し、そしてプロセッシングするのである（そして、分泌シグナル配列が存在する場合、分泌する）。分泌されたタンパク質は高く血管化された肝臓において循環に入り、そして感染された動物に対する効果が決定され得る。

【0306】

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（Lusk y など., J. Virol. 72: 2022 (1998); Raper など., Human Gene Therapy 9: 671 (1998)）。さらに、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)）。さらに、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 Perri caudet, FASEB J. 11: 615 (1997) を参照のこと）。

【0307】

アデノウィルスシステムはまた、インビトロでのタンパク質生成のためにも使用され得る。アデノウィルス感染された非-293細胞を、その細胞が急速に分裂しないような条件下で培養することによって、前記細胞は長時間、タンパク質を生成することができる。例えば、BHK細胞は、細胞工場において集密性まで増殖され、次に興味ある分泌されたタンパク質をコードするアデノウィルスベクターに暴露される。次に、細胞が、有意な細胞分裂を伴わないで、感染された細胞の数週間の生存を可能にする血清フリー条件下で増殖せしめられる。

【0308】

他方では、アデノウィルスベクター感染された293S細胞が、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、又は懸濁培養において増殖せしめられ得る（Garnier など., Cytotechnol. 15: 145-55, 1994 を参照のこと）。いずれかのプロトコールにより、発現され、分泌された異種タンパク質が、細胞における発現されたタンパク質の素因に依存して、細胞培養物上清液、溶解物又は、膜画分から反復して単離され得る。感染された293S細胞生成プロトコールにおいては、分泌されていないタンパク質が効果的に得られる。

【0309】

zcytor19に関して観察される組織分布の観点においては、アゴニスト（天然のリガンド／基質／補因子／等を包含する）及びアンタゴニストは、インビトロ及びインビボ用途において莫大な可能性を有する。zcytor19アゴニストとして同定される化合物は、インビオロ及びインビボで、免疫及び造血細胞の増殖の刺激において有用である。例えば、zcytor19可溶性受容体及びアゴニスト化合物は、定義された細胞培養培地の化合物として有用であり、そして細胞培養において通常使用される血清を置換するために、単独で又は他のサイトカイン及びホルモンと組合して使用され得る。従って、アンタゴニストは、培養物におけるT細胞、B細胞、及びリンパ性及び骨髄系の増殖及び／又は進化を特異的に促進することにおいて有用である。さらに、zcytor19可溶性受容体、アゴニスト又はアンタゴニストは、単離された一次骨髄培養物からのコロニー形成の刺激を測定するためにも有用である。そのようなアッセイは、当業界において良く知られている。

10

20

【0310】

アンタゴニストはまた、リガンドー受容体の部位を特徴づけるための研究試薬としても有用である。Zcytor19活性（zcytor19アンタゴニスト）の阻害は、抗-zcytor19抗体及び可溶性zcytor19受容体、並びに他のペプチド及び非ペプチド剤（例えば、リボザイム）を包含する。

【0311】

zcytor19はまた、その活性のインヒビター（アンタゴニスト）を同定するためにも使用され得る。試験化合物は、zcytor19の活性を阻害する化合物を同定するために、本明細書に開示されるアッセイに添加される。本明細書に開示されるそれらのアッセイの他に、サンプルは、zcytor19結合、オリゴマー化、又はzcytor19一依存性細胞応答の刺激／阻害を測定するよう企画された種々のアッセイにより、zcytor19活性の阻害について試験され得る。例えばzcytor19一発現性細胞系は、zcytor17一刺激された細胞経路に応答するレポーター遺伝子構造体によりトランスフェクトされ得る。

30

【0312】

このタイプのレポーター遺伝子構造体は、当業界において知られており、そして一般的に、アッセイ検出可能タンパク質、例えばルシフェラーゼをコードする遺伝子に作用可能に連結されるzcytor19-DNA応答要素を含むであろう。DNA応答要素は、サイクリックAMP応答要素（CRE）、ホルモン応答要素（HRE）、インスリン応答要素（IRE）（Nasrin など., Proc. Natl. Acad. Sci. US A 87: 5273-7, 1990）及び血清応答要素（SRE）（Shaw など., Cell 56: 563-72, 1989）を包含するが、但しそれらだけには限定されない。サイクリックAMP応答要素は、Roestler など., J. Biol. Chem. 263 (19): 9063-6, 1988及びHabener, Molec. Endocrinol. 4 (8): 1087-94, 1990に再考される。

40

【0313】

ホルモン応答要素は、Beato, Cell 56: 335-441, 1989に再考される。候補体化合物、溶液、混合物又は抽出物、又は種々の細胞型からのならし培地は、レポーター遺伝子発現のzcytor19刺激の上昇により明らかなように、zcyt

50

o r 1 9 受容体の活性を増強する能力について試験される。このタイプのアッセイは、受容体の結合を通して、又はシグナルカスケードの一部の刺激により、z c y t o r 1 9 シグナルトランスダクション活性を直接的に刺激する化合物を検出するであろう。

【0314】

それ自体、z c y t o r 1 9 ポリペプチドに応答する細胞を供給し、試験化合物の不在下で細胞の第1部分を培養し、試験化合物の存在下で前記細胞の第2部分を培養し、そして前記細胞の第1部分に比較して、前記細胞の第2部分の細胞応答における上昇性を検出することを含んで成る、z c y t o r 1 9 ポリペプチドのアゴニストを同定するための方法が提供される。さらに、上記のレポーター遺伝子構造体を含むが、しかしz c y t o r 1 9 受容体を発現しない第3細胞は、前記レポーターの非一特異的な、又は非-z c y t o r 1 9 一介在性刺激を評価するための対照細胞として使用され得る。従って、アゴニスト、例えば天然のリガンドは、z c y t o r 1 9 ポリペプチド機能を刺激し、又は増強するために有用である。

10

【0315】

z c y t o r 1 9 リガンドー結合ポリペプチド、例えば本明細書に記載される細胞外ドメイン又はサイトカインドメインはまた、リガンドの精製のためにも使用される。前記ポリペプチドは、固体支持体、例えばアガロース、架橋されたアガロース、ガラス、セルロース樹脂、シリカ基材の樹脂、ポリスチレン、架橋されたポリアクリルアミド又は使用の条件下で安定している同様の材料のビーズ上に固定される。

【0316】

固体支持体にポリペプチドを結合するための方法は、当業界において知られており、そしてアミン化学、臭化シアノゲン活性化、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及びヒドラジド活性化を包含する。得られる媒体は一般的に、カラムの形で形状化され、そしてリガンドを含む流体が、受容体ポリペプチドへのリガンドの結合を可能にするために、カラムに1又は複数回、通される。次に、リガンドが、塩濃度の変化、カオトロピック剤（グアニジンHCl）、又はリガンドー受容体結合を破壊するpHを用いて溶出される。

20

【0317】

リガンドー結合受容体（又は抗体、補体／抗補体対の1つのメンバー）、又はその結合フラグメント、及び市販のバイオセンサー装置を用いるアッセイシステムが、好都合には、使用され得る（例えば、B I A c o r e , P h a r m a c i a B i o s e n s o r , P i s c a t a w a y , N J ; 又は S E L D I ^{T M} t e c h n o l o g y , C i p h e r g e n , I n c . P a l o A l t o , C A) 。そのような受容体、抗体、補体／抗補体対のメンバー、又はフラグメントは、受容体チップの表面上に固定される。この装置の使用は、K a r l s s o n , J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 4 5 : 2 2 9 - 4 0 , 1 9 9 1 及び C u n n i n g h a m a n d W e l l s , J . M o l . B i o l . 2 3 4 : 5 5 4 - 6 3 , 1 9 9 3 により開示される。

30

【0318】

受容体、抗体、メンバー又はフラグメントは、アミン又はスルフヒドリル化学を用いて、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共有結合される。試験サンプルが細胞に通される。リガンド、エピトープ又は補体／抗補体対の反対のメンバーがサンプルに存在する場合、それは、それぞれ固定された受容体、抗体又はメンバーに結合し、金フィルムの表面のプラズモン共鳴の変化として検出される、媒体の屈折率の変化を引き起こす。このシステムは、オンー及びオフー速度の決定を可能にし、これから、結合親和性が計算され、そして結合の化学量の評価が可能にされる。

40

【0319】

リガンドー結合受容体ポリペプチドはまた当業界において知られている他のアッセイシステム内でも使用され得る。そのようなシステムは、結合親和性の決定のためのスカチャード分析（S c a t c h a r d , A n n . N Y . A c a d . S c i . 5 1 : 6 6 0 - 7 2 , 1 9 4 9 ）及び熱量測定アッセイ（C u n n i n g h a m など , S c i e n

50

ce 253: 545-48, 1991; Cunningham など., Science 245: 821-25, 1991) を包含する。

【0320】

zcytor19ポリペプチドはまた、zcytor19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。zcytor19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。当業者は、抗原性エピトープ担持のポリペプチドがzcytor19ポリペプチド（例えば、配列番号2、19又は21）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。zcytor19ポリペプチドの大きな部分、すなわちアミノ酸配列の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。

10

【0321】

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2のアミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号491 (Arg)、又は連続した9～471個のそのアミノ酸フラグメントによりコードされるzcytor19ポリペプチドを含む。適切な抗原はまた、配列番号19のアミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号520 (Arg)、又は連続した9～500個のそのアミノ酸フラグメントによりコードされるzcytor19ポリペプチド；及び配列番号21のアミノ酸番号21 (Arg)～アミノ酸番号211 (Ser)、又は連続した9～191個のそのアミノ酸フラグメントによりコードされる切断された可溶性zcytor19ポリペプチドを含む。

20

【0322】

抗原として使用するための好ましいペプチドは、細胞外サイトカイン結合ドメイン、サイトカイン結合フラグメント、フィブロネクチン第III型ドメイン、細胞内シグナル化ドメイン、又は本明細書に開示される他のドメイン及びモチーフ、又はそれらの組み合わせ；及びzcytor19親水性ペプチド、例えば埋もれたG、S及びT、及び暴露されたH、Y及びW残基が無視される、スライド性6-残基窓に基づいて、Hopp/Woods親水性プロフィルから決定される、疎水性プロットから当業者により推定されるそれらのペプチドである。

30

【0323】

zcytor19親水性ペプチドは、(1) 配列番号2のアミノ酸残基295～300；(2) 配列番号2のアミノ酸残基451～456；(3) 配列番号2のアミノ酸残基301～306；(4) 配列番号2のアミノ酸残基291～299；及び(5) 配列番号2のアミノ酸残基65～70から成る群から選択されたアミノ酸配列を含んで成るペプチドを包含する。さらに、例えばDNASTAR Protean プログラム (DNASTAR, INC., Madison, WI) を用いて、Jameson-Wolfplot Jameson-Wolfplot から推定される親水性ペプチドはまた、適切な抗原である。さらに、保存されたモチーフ、及びzcytor19の保存されたモチーフ間の可変領域が適切な抗原である。この免疫応答から生成される抗体は、本明細書に記載のよう

40

【0324】

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: Te

50

chniques and Applications, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, 1982 を参照のこと。

【0325】

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、zcytor19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。zcytor19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zcytor19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、高分子キャリアー（例えば、カサガイヘモシアニン（KLH）、ウシ血清アルブミン（BSA）又は破傷風トキソイド）に都合良く連結又は結合され得る。

10

【0326】

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“おおう（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。

20

【0327】

多くの場合、ヒト適合された抗体は、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。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WO98/24893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。

30

【0328】

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、zcytor19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zcytor19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zcytor19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。

40

【0329】

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

50

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。

【0330】

ランダムペプチド表示ライブラリーは、zcytor19 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 zcytor19 配列を用いてスクリーンされ得る。zcytor19 ポリペプチドと相互作用するそれらの“結合ペプチド”は、細胞、例えば zcytor19 を特異的に発現される細胞を標識するために；親和性精製により相同体ポリペプチドを単離するために使用され得；それらは薬物、トキシン、放射性核種及び同様のものに直接的にまたは間接的に接合され得る。それらの結合ペプチドはまた、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も使用され得る。

【0331】

結合ペプチドはまた、zcytor19 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 zcytor19 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。それらの結合ペプチドはまた、zcytor19 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、zcytor19 “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-zcytor19 結合ペプチドは、zcytor19 と結合するリガンドの作用を阻害するために有用である。

【0332】

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-zcytor19 抗体が対照 (非-zcytor19) 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、zcytor19 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 (Ka) 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。

【0333】

抗-zcytor19 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、zcytor19 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 (例えば、クラス II サイトカイン受容体、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、zcytor11 (通常、アメリカ特許第 5, 965, 704 号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7 (通常、アメリカ特許第 5, 945, 511 号所有の) 受容体) である。

【0334】

スクリーニングはまた、非ヒト zcytor19 及び zcytor19 変異体ポリペプチドを用いて行われ得る。さらに、抗体は、zcytor19 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、z c y t o r 1 9 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；z c y t o r 1 9 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。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)。

10

【0335】

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。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-z c y t o r 1 9 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。

20

【0336】

当業者に知られている種々のアッセイがz c y t o r 1 9 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 Laboratory Manual, Harlow and lane (Eds.), Cold Speing 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)、ドットブ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z c y t o r 1 9 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。

30

【0337】

z c y t o r 1 9 に対する抗体は、z c y t o r 1 9 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z c y t o r 1 9 を単離するために；z c y t o r 1 9 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z c y t o r 1 9 を検出し又は定量化するために；基本となる病理学又は疾病のマーカーとして組織学、生検又は組織サンプルz c y t o r 1 9 受容体における検出又は定量化のために；z c y t o r 1 9 -ライブラリーに対する細胞毒性又はADC Cを刺激するために；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；及びインビトロでz c y t o r 1 9 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。

40

【0338】

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、z c y t o r 1 9 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z c y t o r 1 9 又はそのフラグメントを検出するため

50

にインビトロで使用され得る。

【0339】

zcytor19に対する抗体は、受容体を発現する細胞を標識し、そしてzcytor19発現レベルをアッセイするために、可溶性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。二価抗体は、zcytor19リガンドの効果を模倣するアゴニストとして使用され得る。

【0340】

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zcytor19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、zcytor19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。

10

【0341】

より特定には、抗-zcytor19抗体又はその生物活性フラグメント又は一部が、検出可能な又は細胞毒性の分子に連結され、そしてzcytor19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。そのような接合された抗体の好ましい使用は、zcytor19受容体を発現する癌に対する薬剤を標的化することである。例えば、そのような抗体は、リンパ、B-細胞及びプレーB細胞急性リンパ芽球性白血病、及び食道、肝臓、卵巣、直腸、胃及び子宮腫瘍、及びメラノーマを標的化するために使用され得る。

20

【0342】

適切な検出可能分子は、zcytor19（上記に開示される結合ペプチドを包含する“結合ポリペプチド”、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。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。

30

【0343】

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。

【0344】

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、例えばzcytor19が発現される特定の組織及び腫瘍を処理するために）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。

40

【0345】

50

同様に、もう1つの態様においては、z c y t o r 1 9-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-z c y t o r 1 9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、血液、リンパ球、結腸及び骨髄癌、又はz c y t o r 1 9が発現される本明細書に記載される他の癌）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、H o r n i c k など、, B l o o d 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-z c y t o r 1 9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（G M - C S M）を包含する。 10

【0346】

他方では、本明細書に記載されるz c y t o r 1 9結合ポリペプチド又は抗体融合タンパク質は、z c y t o r 1 9-調節されたアポプトシス経路を直接的に刺激することにより、標的組織のインビボ殺害の増強のために使用され、z c y t o r 1 9を発現する高増殖性細胞の細胞死がもたらされる。

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

【0347】

さらに、抗-z c y t o r 1 9抗体及び結合フラグメントは、z c y t o r 1 9を特異的に発現する細胞、例えば本明細書に記載される、骨髄及び甲状腺細胞、及び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、"M o l e c u l a r B i o l o g y o f t h e C e l l", 3^{r d} E d., A l b e r t, B. など、(G a r l a n d P u b l i s h i n g, L o n d o n & N e w Y o r k, 1994を参照のこと)。当業者は、細胞を研究するための細胞組織型の分離の重要性及び特定の細胞組織型の分離のためへの抗体の使用を認識するであろう。基本的には、細胞型の表面に結合する抗体は、抗体により認識される細胞のみが付着するであろう親和性表面を形成するために、種々のマトリックス、例えばコラーゲン、多糖ビーズ又はプラスチックにカップリングされる。 30

【0348】

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（F A C S）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、F A C S機械によりラベルされていない細胞から分離される。F A C S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。

【0349】

わずかにさらなる下流の小滴（ほとんどは、1つの細胞を含むか又はまったく含まない）が、振動ノズルにより形成される。単一の細胞を含むその小滴は、それらが含む細胞が蛍光であるかどうか依存して、形成の瞬間で、正又は負の電荷を自動的に付与され、そして次に、強い電界により適切な容器中に偏向される。そのような機械は、1000の細胞のうち1つを選択し、そして1秒当たり約5000個の細胞を分類できる。これは、細胞培養物について均等な細胞集団を生成する。 40

【0350】

当業者は、本発明のz c y t o r 1 9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z c y t o r 1 9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z c y t o r 1 9が発現される免疫細胞において 50

特に適切である。

【0351】

サイトカイン受容体に結合する4-ヘリックス束サイトカイン、及び活性化されたリンパ球により生成される他のタンパク質は、身体を通して細胞の分化、活性化、レクルートメント及び恒常性において重要な生物学的役割を演じる。治療有用性は、免疫調節を必要とする疾病、例えば自己免疫疾患、例えばリウマチ様関節炎、多発性硬化症、重症筋無力症、全身性エリテマトーデス及び糖尿病の処理を包含する。zcytor19受容体アンタゴニスト又はアゴニスト、例えばzcytor19可溶性受容体、抗-受容体抗体及び天然リガンドは、炎症の調節において重要であり、そして従って、リウマチ様関節炎、ぜん息、潰瘍性大腸炎、炎症性腸疾患、クローン症、膵炎及び敗血症の処理において有用である。 10

【0352】

腫瘍細胞殺害の仲介においてzcytor19アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば可溶性受容体、抗-受容体抗体及び天然リガンドの役割が存在し、そして従って、癌の処理において有用である。zcytor19アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば可溶性受容体、抗-受容体抗体及び天然リガンドは、移植片拒絶を低めるために、又は対宿主性移植片病の予防において重要である免疫系の抑制において有効的な治療剤である。

【0353】

他方では、zcytor19アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば可溶性受容体、抗-zcytor19受容体抗体及び天然リガンドは、感染性疾病に対する免疫性を高めることにおいて、免疫無防備状態の患者、例えばHIV+患者の処理において、又はワクチンを改良することにおいて重要である免疫系を活性化することができる。特に、zcytor19アンタゴニスト又はアゴニスト、例えば可溶性受容体、抗-受容体抗体及び天然リガンドは、NK細胞又はそれらの前駆体を、調節し、刺激又は拡張し、そしてウィルス感染の処理において治療的価値を、及び抗-腫瘍因子として提供する。NK細胞は転移性腫瘍細胞の排除において重要な役割を演じると思われ、そして転移及び固形腫瘍を有する患者は、低められたレベルのNK細胞活性を有する(Whitesideなど, Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230: 221-244, 1998)。 20

【0354】

zcytor19ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、zcytor19活性を高め、又は阻害することが所望される遺伝子治療用途内で有用である。哺乳類が突然変異誘発されたzcytor19遺伝子を有するか、又はそれを欠いている場合、zcytor19遺伝子が哺乳類の細胞中に導入され得る。1つの態様においては、zcytor19ポリペプチドをコードする遺伝子がウィルスベクターにおいてインビボで導入される。そのようなベクターは、弱毒化された又は欠陥DNAウィルス、例えばヘルペス単純ウィルス(HSV)、乳頭種ウィルス、エプスタイン-バーウィルス(EBV)、アデノウィルス、アデノ関連ウィルス(AAV)及び同様のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない。 30

【0355】

ウィルス遺伝子を完全に又はほとんど完全に欠いている欠陥ウィルスが好ましい。欠陥ウィルスは、細胞中への導入の後、感染性ではない。欠陥ウィルスベクターの使用は、ベクターが他の細胞を感染することを心配しないで、特定の局在化された領域における細胞への投与を可能にする。特定のベクターの例は、次のものを包含するが、但しそれらだけには限定されない：欠陥ヘルペスウィルス1(HSV1)ベクター(Kaplitなど, Mol. Cell. Neurosci. 2: 320-30, 1991)、弱毒化されたアデノウィルスベクター、例えばStratford-Perricaudatなど(J. Clin. Invest. 90: 626-30, 1992)により記載されるベクター、及び欠陥アデノ-関連ウィルスベクター(Samulskiなど, J. Virol. 61: 3096-101, 1987; Samulski 40 50

など., J. Virol. 63: 3822-28, 1989)。

【0356】

もう1つの態様においては、zcytor19遺伝子は、次の文献に記載のようにして、レトロウィルスベクターに導入され得る：Anderson など., アメリカ特許第5, 399, 346号；Mann など., Cell 33: 153, 1983；Temin など., アメリカ特許第4, 650, 764号；Temin など., アメリカ特許第4, 980, 289号；Markowitz など., J. Virol. 62: 1120, 1988；Temin など., アメリカ特許第5, 124, 263号；Dougherty など., WIPO Publication WO95/07358号；及びkuo など., Blood 82: 845-52, 1993。

10

【0357】

他方では、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。

【0358】

特定細胞へのリポソームの分子標的化は、1つの領域の利点を表す。より特定には、特定細胞へのトランスフェクションの方向づけは、1つの有益な分野を提供する。例えば、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科学的に得られる。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、及びタンパク質、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。

20

【0359】

身体から細胞を除去し、そして裸DNAプラスミドとしてベクターを導入し、そして次に、身体中に形質転換された細胞を再移植することは可能である。遺伝子治療のための裸DNAベクターは、所望する宿主細胞中に、当業界において知られている方法、例えばトランスフェクション、エレクトロポレーション、マイクロインジェクション、トランスダクション、細胞融合、DEAEデキストラン、リン酸カルシウム沈殿、遺伝子ガンの使用、又はDNAベクタートランスポーターの使用により導入され得る（例えば、Wu など., J. Biol. Chem. 267: 963-7, 1992；Wu など., J. Biol. Chem. 263: 14621-24, 1988）。

30

【0360】

アンチセンス方法は、zcytor19遺伝子転写を阻害するために、例えばインビボでの細胞増殖を阻害するために使用され得る。Zcytor19コードのポリヌクレオチドのセグメントに対して相補的であるポリヌクレオチド（例えば、配列番号1、18又は20に示されるようなポリヌクレオチド）は、zcytor19コードのmRNAに結合し、そしてそのようなmRNAの翻訳を阻害するよう企画される。そのようなアンチセンスポリヌクレオチドは、細胞培養物、又は対象において、zcytor19ポリペプチドコードの遺伝子の発現を阻害するために使用される。

40

【0361】

さらに、細胞表面分子として、zcytor19ポリペプチドは、細胞中に遺伝子療法を導入するための標的物として使用され得る。この用途は、zcytor19が通常発現される細胞、例えばリンパ組織、骨髄、前立腺、甲状腺、及びPBL、又はzcytor19ポリペプチドを発現できる癌細胞中に治療遺伝子を導入するために、特に適切である。例えば、上記のようなウィルス遺伝子療法は、ウィルス受容体よりもむしろ細胞受容体、例えばzcytor19ポリペプチドを発現する特定の細胞型に標的化され得る。抗体、

50

又は標的細胞表面上の *zcytor19* 分子を認識する他の分子が、ウィルスの感染を方向づけ、そして標的細胞に遺伝子治療材料を投与するために使用され得る。

【0362】

WOO, S. L. C. *Nature Biotech.*, 14: 1538, 1996; Wickham, T. J. など., *Nature Biotech.* 14: 1570-1573, 1996; Douglas, J. T. など., *Nature Biotech.* 14: 1574-1578, 1996; Rihova, B., *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 149-169, 1997; 及びVile, R. G. など., *Mol. Med. Today* 4: 84-92, 1998を参照のこと。例えば、*zcytor19*-特異的抗体に結合されるウィルス-中和性Fabフラグメントを含む二特異的抗体が、*zcytor19* 受容体を発現する細胞にウィルスを方向づけ、そして遺伝子要素を含むウィルスの細胞中への効果的侵入を可能にするために使用され得る。例えば、Wickham, T. J. など., *J. Virol.* 71: 7663-7669, 1997; 及びWickham, T. J., など., *J. Virol.* 70: 6831-6838, 1996 を参照のこと。

【0363】

本発明はまた、診断用途に使用される試薬を提供する。例えば、*zcytor19* 遺伝子、すなわち *zcytor19* DNA又はRNA又はその副配列を含んで成るプローブは、*zcytor19* 遺伝子が染色体1上に存在するかどうか、又は突然変異が生じたかどうかを決定するために使用され得る。*zcytor19* は染色体1の1p36.11領域に存在する。*zcytor19* 遺伝子座での検出できる染色体異常型は、異数性、遺伝子コピー数変化、挿入、欠失、制限部位変更及び転位を包含するが、但しそれらだけには限定されない。

【0364】

それらの異常性は、コード配列内、イントロン内、又は上流のプロモーター及び調節領域を包含するフランキング配列内で発生することができ、そしてコード配列内での物理的変更、又は遺伝子発現レベルでの変化として明らかである。そのような異常性は、分子遺伝学的技法、例えば制限フラグメント長さ多型現象 (RELP) 分析、蛍光現場ハイブリダイゼーション、PCR技法を用いる短いタンDEM反復体 (STR) 分析、及び当業界において知られている他の遺伝子連鎖分析技法を用いることによって、本発明のポリヌクレオチドを用いて検出され得る (Sambrookなど., 前記; Ausubel など., 前記; Marian, Chest 108: 255-65, 1995)。

【0365】

遺伝子位置の正確な知識は、次のような多くの目的のために有用である: 1) 配列が存在するコンティグの一部であるかどうかの決定及び種々の形、例えばYAC, BAC又はcDNAクローンにおける追加の周囲遺伝子配列の獲得; 2) 同じ染色体領域への結合を示す遺伝的な疾病についての可能な候補体遺伝子の提供; 及び3) 特定遺伝子が有する機能の決定を助けるモデル生物、例えばマウスの相互参照。

【0366】

zcytor19 遺伝子は、染色体の1p36.11領域に位置する。当業者は、1p36領域における及びその回りにおける染色体異常型がいくつかの癌、例えば神経芽腫、メラノーマ、乳癌、前立腺癌及び他の癌に包含されることを理解するであろう。そのような異常型は、1p36における及びその回りにおける全体的染色体異常、例えばトランスロケーション、異種性の損失 (LOH) 及び同様のものを包含する。従って、例えば、本発明のポリヌクレオチドにより提供される1p36.11遺伝子座におけるマーカーは、癌に存在するこの染色体領域を包含する、トランスロケーション、異数性、転位、LOH、他の染色体異常の検出のために有用である。

【0367】

例えば、*zcytor19* ポリヌクレオチドプローブは、神経芽腫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、ここで1p36.1と1p36.3との間のLO

Hが有力であり、そして1 p 3 6 . 1での分解点が明白である。少なくとも70%の神経芽腫は、1 pにおいて細胞遺伝子学的に見える染色体異常型、例えばトランスロケーション及び欠失を有し、そしてその異常性はたぶん、複雑なトランスロケーション及び欠失機構のためである。例えば、R i t k e , M Kなど. , C y t o g e n e t . C e l l G e n e t . 50 : 84-90, 1989 ; 及びW e i t h , Aなど. , G e n e s C h r o m o s o m e s C a n c e r 1 : 159-166, 1989を参照のこと。

【0368】

z c y t o r 1 9は1 p 3 6 . 11に局在し、そして異常型が神経芽腫において有力である領域内に直接的に分類されるので、当業者は、本発明のポリヌクレオチドが神経芽腫についての診断剤、及び神経芽腫を生ぜしめるトランスロケーション及び欠失機構の誘発の助剤として作用することを理解するであろう。 10

【0369】

さらに、1 p 3 6でのLOHは、メラノーマ(D r a c o p o l i , N Cなど. , A m . J . H u m . G e n e t . 45 (s u p p l .) : A19, 1989 ; D r a c o p o l i , N Cなど. , P r o c . N a t . A c a d . S c i . 86 : 4614-4618, 1989 ; G o l d s t e i n , A Mなど. , A m . J . H u m . G e n e t . 52 : 537-550, 1993) ; 前立腺及び脳癌の両者の病歴を有する家族における前立腺癌(1 p 3 6 , L O H)(G i b b s , Mなど. , A m . J . H u m . G e n e t . 64 : 776-787, 1999) ; 及び染色体1の欠失及び重複が乳癌において最も共通する異常型である乳癌(1 p 3 6)(K o v a c s , G . I n t . J . C a n c e r 21 : 688-694, 1978 ; R o d g e r s , C 20など. , C a n c e r G e n e t . C y t o g e n e t . 13 : 95-119, 1984 ; 及びG e n u a r d i , Mなど. , A m . J . H u m . G e n e t . 45 : 73-82, 1989) において明白である。ヒト染色体1のこの領域におけるトランスロケーション、LOH及び他の異常型は、ヒト癌において有力であり、そしてz c y t o r 1 9遺伝子が1 p 3 6 . 11に特異的に位置するので、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるように、ヒト疾病に明確に関連するそのような異常型の検出に使用される。

【0370】

さらに、z c y t o r 1 9が位置し、そしてポリヌクレオチドプローブが関連する異常型又は遺伝子型を検出するために使用され得る1 p 3 6領域における突然変異に起因する癌についての証拠が存在する：P 7 3、すなわち神経芽腫及び他の癌において時折欠失される1 p 3 6領域の可能性ある腫瘍サプレッサー地図(K a g h a d , Mなど. , C e l l 90 : 809-819, 1997) ; 染色体13上のF K H R遺伝子と染色体1からのP A X 7遺伝子との融合に起因する、染色体1の1 p 3 6 . 2-p 3 6 . 12領域でのトランスロケーションを包含する横数筋肉腫；種々の型の白血病の細胞において高められる白血病-関連のタンパク質(L A P (1 p 3 6 . 1-p 3 5)) ; 腫瘍に関連し、そしてトランスロケーションが見られるヘパリンスルフェートプロテオグリカン(P e r l e c a n)(1 p 3 6 . 1) ; 及び結腸癌(1 p 3 6-p 3 5)。 40

【0371】

さらに、z c y t o r 1 9ポリヌクレオチドプローブが、染色体1 p 3 6 . 11欠失に関連する異常性又は遺伝子型、及びヒト疾病、及び好ましくは癌に関連する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、他の遺伝子座の中で、C 1 q補体成分(C 1 Q A , B , 及びG)(1 p 3 6 . 3-p 3 4 . 1) ; 欠読証(1 p 3 6-p 3 4) ; リンパ活性化抗原C D 3 0(1 p 3 6) ; ナトリウムチャンネル非電圧ゲート1型(1 p 3 6 . 3-p 3 6 . 2) ; z c y t o r 1 9がサイトカイン受容体である腫瘍壊死因子受容体(T N F R S F 1 b及びT N F R S 1 2)(1 p 3 6 . 3-p 3 6 . 2) ; ホスホリパーゼA 2(P L A 2)(1 p 3 5) ; 硬性脊椎筋ジストロフィー(1 p 3 6-p 3 5) についてのそれらの遺伝子座は、すべてヒト疾病状態において明白であり、そしてヒト 50

ゲノムのこの領域に位置する。

【0372】

WWWサーバー (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omim/getmap?chr=1p36>)。上の染色体1のこの領域について、Online Mendelian Inheritance of Man (OMIMTM, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD 遺伝子地図を参照のこと。それらのすべては、zcytor19遺伝子と同じ染色体領域への連鎖を示す遺伝性疾患についての可能性ある候補体遺伝子として作用する。従って、zcytor19ポリヌクレオチドプローブは、それらの欠陥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。

【0373】

同様に、zcytor19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患状態をもたらすことができる。zcytor19遺伝子 (1p36.11) は、もう1つのクラスII受容体、すなわちzcytor19サイトカイン受容体遺伝子 (1p35.1) (通常アメリカ特許第5,965,704号所有の) 及びTNF受容体 (1p36.3-p36.2) 近くに位置し、このことは、この染色体領域が通常、免疫機能のために調節され、そして/又は重要であることを示唆する。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患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。

【0374】

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-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、zcytor19における欠陥は、疾患状態、又は疾患又は感染に対する感受性を引き起こすことができる。

【0375】

zcytor19は、多くの癌に関与する異常型についての染色体ホットスポットにおけるサイトカイン受容体であり、そしてプレーB-細胞急性白血病細胞及び本明細書に記載される他の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1p36.11領域zcytor19に位置するので、ポリヌクレオチドプローブは、ヒト疾患、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、又は他の癌、又は免疫疾患に関連する、染色体1p36.11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、zcytor19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。

【0376】

診断は、疾患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-zcytor19抗体、ポリヌクレオチド及びポリペプチドは、zcytor19ポリペプチド、mRNA又は抗-zcytor19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。

10

20

30

40

50

【0377】

さらに、z c y t o r 1 9 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 1 p 3 6 . 1 1 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与することが予測される、腫瘍の悪性進行又は他の 1 p 3 6 . 1 1 突然変異に関連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、z c y t o r 1 9 ポリヌクレオチドプローブが、染色体 1 p 3 6 . 1 1 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、z c y t o r 1 9 ポリ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。

【0378】

上記で論じられるように、z c y t o r 1 9 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。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、z c y t o r 1 9 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、z c y t o r 1 9 ポリペプチドプローブは、z c y t o r 1 9 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、z c y t o r 1 9 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。

【0379】

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 n t 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、14-17 n t）。PCR プライマーは、少なくとも 5 個の長さの n t、好ましくは 15 又はそれ以上の長さの n t、より好ましくは 20-30 個の長さの n t である。遺伝子又は染色体 DNA の全体的な分析のために、z c y t o r 1 7 ポリヌクレオチドプローブは、完全なエクソン又はそれ以上を含むことができる。エクソンは、z c y t o r 1 9 配列（配列番号 1、18 又は 20）と z c y t o r 1 9 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。

【0380】

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) z c y t o r 1 9 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、z c y t o r 1 9 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。

【0381】

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、z c y t o r 1 9 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

10

20

30

40

50

係の個人からであり得る。

【0382】

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、18又は20の一部、配列番号1、18又は20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。

【0383】

診断における、PCRに基づ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)。

【0384】

zcytor19遺伝子座に関連する突然変異は、直接的な突然変異分析のための標準の方法、例えば制限フラグメント長さ他型現象分析、PCR技法を用いる短いタンDEM反復体分析、増幅-不応性突然変異システム分析、一本鎖コンホメーション多型現象検出、RNA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、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 Diagnostics* (Humana 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。

【0385】

突然変異についてのzcytor19遺伝子の直接的な分析は、対象のゲノムDNAを用いて行われ得る。末梢血液リンパ球から得られるゲノムDNAを増幅するための方法は、当業者に良く知られている（例えば、Dracopoli など. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, at page 7

10

20

30

40

50

1.6 to 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998) を参照のこと)。

【0386】

“トランスジェニックマウス”として言及される、*zcytor19* 遺伝子を発現するように構築されたマウス、及び“ノックアウトマウス”として言及される、*zcytor19* 遺伝子機能の完全な不在を示すマウスがまた、生成され得る (Snouwaert など., *Science* 257: 1083, 1992; Lowell など., *Nature* 366: 740-742, 1993; Capecchi, *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter など., *Annu. Rev. Genet.* 20: 465-499, 1986)。例えば、偏在的に、又は組織—10
特異的又は組織—制限されたプロモーター下で *zcytor19* を過剰発現するトランスジェニックマウスは、過剰発現が表現型を引き起こすかどうかを決定するために使用され得る。

【0387】

例えば、野生型 *zcytor19* ポリペプチド、そのポリペプチドフラグメント又は変異体の過剰発現は、正常な細胞工程を変更することができ、*zcytor19* 発現が機能的に適切であり、そして *zcytor19*、そのアゴニスト又はアンタゴニストのための治療標的物を示すことができる組織を同定する表現型をもたらす。例えば、構築する好ましいトランスジェニックマウスは、“優性—陰性”表現型を発現するマウス、例えば結合されるトランスメンブランドメインと共に細胞外サイトカイン結合ドメインを含んで成る *z* 20
cytor19 ポリペプチド (トランスメンブランドメインに整合して結合される配列番号 2 又は 19 のアミノ酸 21 (Arg) ~ 249 (Trp) ; 配列番号 4) を過剰発現するマウスである。

【0388】

もう 1 つの好ましいトランスジェニックマウスは、*zcytor19* 可溶性受容体、例えば本明細書に開示されるそれらの受容体を過剰発現するマウスである。さらに、そのような過剰発現は、ヒト疾病との類似性を示す表現型をもたらすことができる。同様に、ノックアウト *zcytor19* マウスは、*zcytor19* がインビボで絶対的に必要とされる場所を決定するために使用され得る。ノックアウトマウスの表現型は、*zcytor19* 20
アンタゴニスト、例えば本明細書に記載されるそれらのもののインビボ効果を予測することができる。マウス又はヒト *zcytor19* cRNA は、ネズミ *zcytor19* mRNA、cDNA 及びゲノム DNA を単離するために使用され得、これはノックアウトマウスを生成するために使用される。

【0389】

それらのトランスジェニック及びノックアウトマウスは、*zcytor19* 遺伝子及びそれによりコードされるタンパク質をインビボシステムにおいて研究するために使用され得、そして対応するヒト又は動物疾病 (例えば、市販の生存動物集団におけるそれらの疾病) のためのインビボモデルとして使用され得る。本発明のマウスモデルは、癌生物学及び30
進行の研究のための腫瘍モデルとして特に適切である。そのようなモデルは、ヒト癌に使用される治療分子の開発及び効力において有用である。*zcytor19* 発現の上昇、及び *zcytor19* 発現の下降が、特定のヒト癌に関連するので、トランスジェニックマウス及びノックアウトマウスの両者は、癌のための有用な動物モデルとして作用する。40

【0390】

さらに、好ましい態様においては、*zcytor19* トランスジェニックマウスは、特定の腫瘍、特に食道、肝臓、卵巣、直腸、胃、及び子宮腫瘍、及びメラノーマ、B—細胞白血病及び他のリンパ癌のための動物モデルとして作用することができる。さらに、本明細書に記載される、*zcytor17* に対して向けられた、*zcytor19* アンチセンスポリヌクレオチド又はリボザイムのトランスジェニックマウス発現がまた、上記トランスジェニックマウスと同じようにして使用され得る。

【0391】

医薬使用のためには、本発明の可溶性受容体ポリペプチドは、従来の方法に従って、非経口、特に静脈内又は皮下供給のために配合される。静脈内投与は、1～数時間の典型的な期間、ボーラス注射又は注入により行われるであろう。一般的に、医薬製剤は、zcytor19可溶性受容体ポリペプチドを、医薬的に許容できるビークル、例えば塩溶液、緩衝溶液、水中、5%デキストロース、又は同様のものと共にを含むであろう。製剤はさらに、1又は複数の賦形剤、保存剤、溶解剤、緩衝剤、バイアル表面上のタンパク質損失を妨げるためのアルブミン、等を含むことができる。

【0392】

配合方法は、当業界において良く知られており、そして例えば、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995に開示される。治療用量は、一般的に、0.1～100 µg/kg患者の体重/日、好ましくは0.5～20 mg/kg/日の範囲であり、そして正確な用量は処理される病状の性質及び重症度、患者の特徴、等を考慮して、許容できる標準に従って、臨床医により決定される。用量の決定は、当業者のレベル内である。タンパク質は、急性処理のために、1週間又はそれ以下にわたって、しばしば1～3日間にわたって投与され得、又は慢性処理のためには、数ヶ月～数年にわたって使用され得る。一般的に、zcytor19可溶性受容体ポリペプチドの治療的有効量は、臨床学的に有意な効果を生成するのに十分な量である。

【0393】

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、zcytor19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、zcytor19ポリヌクレオチドは、zcytor19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zcytor19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。

【0394】

zcytor19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zcytor19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。

【0395】

zcytor19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、zcytor19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、zcytor19の教育的利用はそれ自体ユニークであろう。

【0396】

さらに、z c y t o r 1 9 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 z c y t o r 1 9 ポリヌクレオチド及びポリペプチドの発現は、診断及び組織－特異的同定及び方法の使用において学生を訓練するために分析され得る。さらに、z c y t o r 1 9 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。

【0397】

さらに、学生は、ヒト染色体 1 について、及びより特定には、z c y t o r 1 9 遺伝子が位置する遺伝子座 1 p 3 6 . 1 1 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 z c y t o r 1 9 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。

【0398】

z c y t o r 1 9 に対して特異的に結合する抗体は、z c y t o r 1 9 を精製し、抗体をコードするポリヌクレオチドをクローニングし、そして配列決定するために、親和性クロマトグラフィーカラムをいかにして調製するかを学生に教授するための教授援助として、及び従って、ヒト適合された抗体をいかにして企画するかを学生に教授するための実習課目として使用され得る。さらに、z c y t o r 1 9 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、B－細胞組織、食道、肝臓、卵巣、直腸、胃及び子宮腫瘍、及びメラノーマ、プレー B－細胞リンパ芽球生白血病、及び他のリンパ癌の検出への使用のための教授助剤として使用され得る。

【0399】

次に、z c y t o r 1 9 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。z c y t o r 1 9 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思われる。

【0400】

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

例 1. 十分な長さのヒト z c y t o r 1 9 c D N A の同定及び単離

z c y t o r 1 9 を、ヒトゲノム DNA からの予測される十分な長さの c D N A として同定した。その予測される十分な長さの z c y t o r 1 9 ポリヌクレオチドの配列は、配列番号 1 に示され、そして対応するポリペプチドは、配列番号 2 に示される。十分な長さの変異 z c y t o r 1 9 c D N A 配列を同定し、そして配列番号 1 8 として示し、そしてその対応するポリヌクレオチドを、配列番号 1 9 として示す。さらに、切断された可溶性形の z c y t o r 1 9 c D N A 配列番号を同定し、そして配列番号 2 0 として示し、そしてその対応するポリヌクレオチドを配列番号 2 1 として示す。

【0401】

例 2. ノザンブロット及び P C R を用いての組織パネルにおける組織分布A. ノザンブロットを用いてのヒト z c y t o r 1 9 組織分布：

Human multiple Tissue Northern Blots (Human 12-lane MTN Blot I and II, 及び Human Immune System MTN Blot II) (Clontech) を、プローブし、ヒト z c y t o r 1 9 発現の組織分布を決定した。配列番号 1 又は 1 8 に対してハイブリダイズす

10

20

30

40

50

るPCR由来のプローブを、標準PCR増幅方法を用いて増幅する。典型的なPCR増幅を次の通りに行った：94℃で1分、65℃で1分及び72℃で1分（30サイクル）；続いて72℃で7分（1サイクル）。PCR生成物をアガロースゲル電気泳動により可視化し、そして約500bpのPCR生成物を、本明細書に記載のようにしてゲル精製した。プローブを、PRIME IT ITM Random Primer Labeling Kit（Stratagene）を用いて、その製造業者の説明書に従って、放射性ラベルした。

【0402】

プローブを、NUCTRAPTM プッシュカラム（Stratagene）を用いて精製した。EXPRESSHYBTM（Clontech）溶液を、プレハイブリダイゼーションのために、及びノザンプロットのためのハイブリダイゼーション溶液として使用した。プレハイブリダイゼーションは、68℃で2時間、行われた。ハイブリダイゼーションは、約 1.5×10^6 cpm/mlのラベルされたプローブにより68℃で一晩を要した。プローブを、室温で2×SSC、0.05%のSDSにより3度、続いて、2×SSC、0.1% SDSにより50℃で10分間、1度、洗浄した。X線フィルムへの暴露の後、配列番号1、18又は20の長さ、又は配列番号2、19又は21をコードするmRNAの長さに対応する転写体が、zcytor19を特異的に発現する組織に見出されることが予測されるが、しかし他の組織においては見出されない。

【0403】

ノザン分析をまた、ヒト癌細胞系MTNTM（Clontech）を用いて行う。PCR及びプロービング条件は上記の通りである。癌系における強いシグナルは、zcytor19が、活性化された細胞において発現され、そして／又は癌性疾患状態を、示すことを示唆された細胞において発現され、そして／又は癌性疾患状態を示すことを示唆する。さらに、当業界において知られている方法を用いての、活性化されたリンパ球細胞のノザンプロット又はPCR分析はまた、zcytor19が活性化された免疫細胞において発現されるかどうかを示すことができる。電子ノザン情報に基づけば、zcytor19は、プレーB細胞急性リンパ芽球性白血病細胞において特異的に発現することが示された。

【0404】

B. PCRを用いての組織パネルにおける組織分布：

ヒト組織からのcDNAのパネルを、PCRを用いて、zcytor19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6）及びZC21, 196（配列番号7）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。

【0405】

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8）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9）又は3'G3PDH特異的オリゴプライマーZC17, 600（配列番号10）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。

【0406】

パネルを、ヒトゲノムのDNA (Clontech, Palo, Alto, CA) 陽性対照サンプルを含む96-ウェル形式において組み立てた。個々のウェルは約0.2~100pg/μlのcDNAを含んだ。PCR反応を、オリゴZC37685 (配列番号26) 及びZC37681 (配列番号27)、Takara Ex TaqTM (TAKARA Shuzo Co. LTD, Biomedicals Group, Japan), 及びRadiload 色素 (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL) を用いて組み立てた。増幅を次の通りに行った: 94℃で2分 (1サイクル)、94℃で30秒、70℃で30秒 (5サイクル)、94℃で30秒、64℃で30秒及び72℃で30秒 (35サイクル)、続いて72℃で5分 (1サイクル)。約10μlのPCR反応生成物を、4%アガロースゲルを用いての標準のアガロースゲル電気泳動にゆだねた。

【0407】

正しい推定されるDNAフラグメントサイズを、副腎、膀胱、頸部、結腸、胎児心臓、胎児皮膚、肝臓、肺、メラノーマ、卵巣、唾液腺、小腸、胃、脳、胎児肝臓、腎臓、前立腺、脊椎、甲状腺、胎盤、精巣、食道癌、肝臓癌、卵巣癌、直腸癌、胃癌、子宮癌、骨髄、CD3+ライブラリー、HaCATライブラリー、HPVライブラリー、及びHPVSライブラリーにおいて観察した。このプライマー対はイントロンに及ばないので、ゲノムDNA又はプロセッシングされていないmRNA情報により汚染されているいくつかの組織がこのアッセイにおいて誤った陽性を創造する危険性が存在する。

【0408】

従って、イントロンに及ぶ種々のプライマー対ZC38481 (配列番号47) 及びZC38626 (配列番号48) を、上記方法を用いて、組織分布を再評価するために使用した。予測される正しいDNAフラグメントサイズ (256bp) を、結腸、胎児心臓、胎児肝臓、腎臓、肝臓、肺、乳腺、前立腺、唾液腺、小腸、脂肪細胞ライブラリー、脳ライブラリー、ランゲルハンス島ライブラリー、及び前立腺ライブラリー、RPMI 1788 (B-細胞系)、脊椎、胎盤ライブラリー、精巣、食道癌、卵巣癌、直腸癌、胃癌、HaCATライブラリー、HPVライブラリー、及びHPVSライブラリーにおいて観察した。

【0409】

マウス組織パネルをまた、上記方法を用いて、もう1つの組のプライマー対: (1) ZC3870b (配列番号49) 及びZC38711 (配列番号50) (800bpの生成物) により試験した。このパネルは、マウスzyt19についての次の制限された組織分布を示した: マウス前立腺細胞系、唾液腺ライブラリー及び皮膚。

【0410】

【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	骨髄	3
膀胱	1	胎児脳	3
骨髄	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	WI38(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	

10

20

30

【0411】

【表6】

表6

組織/細胞系	サンプル#	組織/細胞系	サンプル#
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
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

【0412】

例3. zcytor19 遺伝子のPCRに基づく染色体マッピング

zcytor19を、市販のGenebridge 4 Radiation Hybrid (RH) Mapping Panel (Research Genetics, Inc. Huntsville, AL)を用いて、染色体1にマッピングした。そのGene Bridge 4 RH Panelは、93の放射線ハイブリッドクロンの個々からのPCR可能DNA、及び2種の対照DNA (HFLドナー及びA23受容体)を含む。公開されているWWWサーバー (<http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl>)は、Gene Bridge 4 Radiation Hybrid Panelにより構成されたヒトゲノムの Whitehead Institute/MT Center for Genome Research's 放射線ハイブリッド地図 ("WICGR" 放射線ハイブリッド地図) に関してのマッピングを可能にする。

【0413】

Gene Bridge 4 RH Panelによるzcytor19のマッピングのために、20 μ lの反応体をPCRのために適合する96-ウェルマイクロタイタープレート (Stratagene, La Jolla, CA)に提供し、そして"RoboCycler Gradient 96" 熱サイクラー (Stratagene)において使用した。個々の95のPCR反応体は、2 μ lの10 $\times$ KlenTaq PCR反応緩衝液 (Clontech Laboratories, Inc. Palo Alto, CA

）、1.6 μ l の dNTP 混合物（それぞれ 2.5 mM、PERKIN-ELMER, Foster City, CA）、1 μ l のセンスプライマー、ZC27, 895（配列番号 14）、11 μ l のアンチセンスプライマー、ZC27, 899（配列番号 24）、2 μ l の RediLoad（Research Genetics, Inc. Huntsville, AL）、0.4 μ l の 50 $\times$ Advantage KlenTaq ポリメラーゼ混合物（Clontech Laboratories, Inc.）、25 ng の個々のハイブリッドクローン又は対照からの DNA、及び 20 μ l の合計体積のための ddH₂O から構成された。

【0414】

反応を同量の鉱油により被覆し、そして密封した。PCR サイクル条件は次の通りであった：94℃で5分間の変性、初期の1サイクル、94℃で45秒間の変性、54℃で45秒間のアニーリング及び72℃で1.25分間の延長、35サイクル、続いて72℃で7分間の延長、最終の1サイクル。反応を、2%アガロースゲル上で電気泳動により分離し（EM Science, Gibbstown, NJ）、そして臭化エチジウムによる染色により可視化した。その結果は、zcytor19が1p36.11染色体領域における染色体1 WICGR放射線ハイブリッド地図上に位置することを示した。

【0415】

例4. 次のzcytor19可溶性受容体を発現する哺乳類発現ベクターの構成：zcytor19 CEE, zcytor19 CFLG, zcytor19 CHIS及びzcytor19-Fc4

A. zcytor19 CEE, zcytor19 CFLG及びzcytor19 CHISを含むzcytor19哺乳類発現ベクターの構成

発現ベクター、すなわちpZp9zcytor19CEEを、zcytor19ポリペプチドの可溶性、細胞外ドメイン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11）を有するzcytor19ポリペプチドを発現するよう企画されている。

【0416】

本明細書に記載されるzcytor19細胞外又はサイトカイン結合ドメインを含んで成るzcytor19 DNAフラグメントを、PCRを用いて創造し、そして標準方法を用いて精製する。切除されたDNAを、シグナルペプチド、例えば生来のzcytor19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zcytor19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11）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。

【0417】

制限消化されたzcytor19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 μ g/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）Maxiprepキット（Qiagen）を用いて、製造業者の説明書に従って行った。

【0418】

同じ方法を用いて、一列に並んでの6個のHis残基から成るC-末端his標識及びC-末端フラッグ（配列番号12）標識、すなわちzcytor19 CF1. AGを有す

る *zcytor19* 可溶性受容体を調製した。それらの構造体を調製するためには、前記ベクターは、*glu-glu* 標識（配列番号 11）の代わりに *HIS* 又は *FLAG*（商標）標識のいずれかを有する。

【0419】

B. 可溶性ヒト *zcytor19* 受容体、すなわち *zcytor19-Fc4* の哺乳類発現構成

発現ベクター、*zcytor19/Fc4/pzmp20* を調製し、BHK細胞において *zcytor19* の C 末端 *Fc4* 標識された可溶性型（ヒト *zcytor19-Fc4*）を発現した。*zcytor19* 受容体の細胞外ドメインからのポリヌクレオチド配列を含む、*zcytor19* cDNA のフラグメントを、*Fc4* ポリヌクレオチド配列（配列番号 13）に整合して融合し、*zcytor19-Fc4* 融合体（配列番号 22 及び 23）を生成した。*Pzmp20* ベクターは、*Fc4* ポリヌクレオチド配列、及び標準の分子生物学技法を用いて C-末端 *Fc4* 融合体の急速な構成を可能にするクローニング部位を含む哺乳類発現ベクターである。

【0420】

ヒト *zcytor19* の細胞外ドメイン、及びそれぞれ、5' 及び 3' 末端上にコードされる *BamHI* 及び *Bgl2* 部位と共にを含む、630 塩基対のフラグメントを PCR により生成した。この PCR フラグメントを、ヒト脳 cDNA ライブラリーからの増幅により、プライマー *ZC37967*（配列番号 24）及び *ZC37972*（配列番号 25）を用いて生成した。PCR 反応条件は次の通りであった：94℃で 20 秒及び 68℃で 2 分；（30 サイクル）；68℃で 4 分（1 サイクル）；続いて 10℃でのソーキング。フラグメントを、*BamHI* 及び *Bgl2* 制限エンドヌクレアーゼにより消化し、そして続いて、1%ゲル電気泳動、及び *QiaQuick* ゲル抽出キット（*Qiagen*）を用いてのバンド精製により精製した。得られる精製された DNA を、*BamHI* 及び *Bgl2* 部位の *Fc4* 3' を含む、*BamHI* 及び *Bgl2* により前もって消化された *pzmp* ベクター中に、室温で 5 時間、連結した。

【0421】

1 µl の連結混合物を、37 µl の DH10B エレクトロコンピテント E. コリ（*Gibco*）において、製造業者の説明書に従ってエレクトロポレートした。形質転換された細胞を、400 µl の LB 培地に希釈し、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た。クローンを制限消化により分析し、そして陽性クローンを DNA 配列決定のために送り、融合構造体の配列を確かめた。

【0422】

例 5. *zcytor19* 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

A. 哺乳類発現ヒト *zcytor19* 可溶性受容体：*zcytor19-Fc4*

BHK 570 細胞（ATCC No: CRL-10314）を、T-75 組織培養フラスコにプレートし、そして DMEM/FBS 培地（DMEM、*Gibco/BRL High Glucose*, (*Gibco BRL*, *Gaithersburg*, MD)、5%ウシ胎児血清、1 mM の L-グルタミン（*JRH Biosciences*, *Lenexa*, KS）、1 mM のピルビン酸ナトリウム（*Gibco BRL*））において、37℃で 5% CO₂ において、約 50~70% の集密性まで増殖した。次に、細胞を、血清フリー（SF）培地配合物（DMEM、10 mg/ml のトランスフェリン、5 mg/ml のインスリン、2 mg/ml のフェチン、1% の L-グルタミン及び 1% のピルビン酸ナトリウム）において、*Lipofectamine*TM（*Gibco BRL*）を用いて、*zcytor19-Fc4/pzmp20*（例 4 B）を含むプラスミドによりトランスフェクトした。

【0423】

10 µg のプラスミド DNA *zcytor19-Fc4/pzmp20*（例 4 B）を、15 ml の管中に希釈し、SF 培地により 500 µl の最終合計体積にした。50 µl の *Lipofectamine* を、450 µl の SF 培地と共に混合した。その *LipoF*

electamine 混合物を、DNA 混合物に添加し、そして室温で約 30 分間インキュベートした。4 ml の SF 培地を、DNA : Lipofectamine 混合物に添加した。細胞を 5 ml の SF 培地により 1 度すすぎ、吸引し、そして DNA : Lipofectamine 混合物を添加した。細胞を 37℃ で 5 時間インキュベートし、そして次に、5 ml の DMEM / 10 % FBS 培地を添加した。

【0424】

フラスコを 37℃ で一晩インキュベートし、この後、細胞を、1 : 2、1 : 10 及び 1 : 50 で、150 mm のプレートに 1 μ M のメトトレキセート又は 10 μ M のメトトレキセート (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) を含む上記からの選択培地 (DMEM / PBS 培地) 中に分けた。トランスフェクションの約 10 日後、1 μ M のメトトレキセート耐性コロニーの 1 つの 150 mm プレートを、トリプシン処理し、細胞をプールし、そして細胞の半分を 10 μ M のメトトレキセートに再プレートし、zcytor19 / Fc4 タンパク質の発現をさらに増殖した。この増幅された細胞のプールからのならし培地サンプルを、SDS-PAGE 及びウェスタン分析を用いて、発現レベルについて試験した。

【0425】

可溶性受容体を発現する単一のクローンを、単離し、スクリーンし、そして細胞培養培地において増殖し、そして標準技法を用いて精製した。さらに、CHO 細胞はまた、そのような目的のための適切な細胞である。

【0426】

例 6. ORIGEN アッセイを用いての zcytor19 受容体ヘテロダイマー化の評価
可溶性 zcytor19 受容体 zcytor19 CFLAG (例 4 及び 5)、又は gp130 (Hibi, M. など., Cell 63: 1149-1157, 1990) を、5 倍モル過剰のスルホ-NHS-LC-ビオチン (Piece, 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 zcytor19 受容体及び他の可溶性受容体サブユニット、例えば可溶性クラス II サイトカイン受容体、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、zcytor11 (通常、アメリカ特許第 5, 965, 704 号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7 (通常、アメリカ特許第 5, 945, 511 号所有の) 可溶性受容体を、ラベルする。このサブファミリーにおける受容体は会合し、シグナルを形質導入するホモダイマーを形成する。

【0427】

それらの可溶性受容体を、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。可溶性 zcytor19 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-zcytor19 受容体及び Ru-zcytor19 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、zcytor19 ヘテロダイマー受容体を結合するリガンドを発現する細胞からのならし培地を用いて、又は精製されたリガンドを用いて行うことができる。好ましいリガンドは、クラス I ヘテロダイマーサイトカイン受容体、例えば IL-10、IL-9、IL-TIF、インターフェロン、TSLP (Levine, SD など., 前記; Isaksen, DE など., 前記; Ray, RJ など., 前記; Friend, SL など., 前記) 及び同様のものを結合することができるそれらのリガンドである。

【0428】

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 zcytor19 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 zcytor19 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 400 ng / ml の Ru-クラス II サブユニッ

ト及びBio-zcytor19、又は400ng/mlのRu-zcytor19受容体及びBio-gp130、又は400ng/mlのRu-IL2R γ 及びBio-zcytor19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。

【0429】

室温での1時間のインキュベーションに続いて、30 μ gのストレプトアビジン被覆された、2.8mmの磁気ビーズ(Dynal, Inc., Oslo, Norway)を添加し、そしてその反応を、室温でさらに1時間インキュベートする。次に、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。 10

【0430】

例7. zcytor19 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zcytor19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、zcytor19の細胞外サイトカイン結合ドメインを、IgGガンマ1(IgG γ 1)(配列番号14及び15)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、クラスIIサイトカイン受容体、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、zcytor11(通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7(通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の)受容体)の細胞外部分を、ヒトカップL鎖(ヒト κ L鎖)(配列番号16及び17)に融合する。 20

【0431】

A. IgG γ 1及びヒト κ L鎖融合ベクターの構成:

IgG γ 1(配列番号14)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。この構造体を使用される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Zem229中にMluI/EcoRIリンカーを含んで成る、オリゴと共に連結する。 30

【0432】

ヒト κ L鎖(配列番号16)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 κ L鎖融合体をもたらすことができる。KpnI部位はヒト κ L鎖配列(配列番号16におけるヌクレオチド62の後を、KpnI酸素により分解される)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しよう企画される。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 κ L鎖(配列番号16)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。 40

【0433】

このプライマーは好ましくは、配列番号16に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。この構造体を使用されるヒト κ L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 κ L鎖配列を単離するために、P 50

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。

【0434】

B. 融合ベクター構造体中へのzcytor19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、IgGγ1に融合されるzcytor19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、前立腺cDNAライブラリー (Clontech) 又は活性化されたリンパ球cDNAライブラリーからの本明細書に記載されるzcytor19受容体の細胞外サイトカイン結合ドメインを、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/IgGγ1中に連結する。得られるベクターを、配列決定し、zcytor19/IgGガンマ1融合体 (zcytor19/Ch1 IgG) が正しいことを確認する。

【0435】

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。サイトカイン受容体/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。

【0436】

D. zcytor19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、Lipofectamine PlusTM 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のメトトレキサート (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。

【0437】

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 (AAA) のために提供する。

【0438】

例8. インビトロでのzcytor19受容体の再構成

zcytor19-シグナル化複合体に包含される成分を同定するために、受容体再構成の研究を、次の通りにして行う。例えば、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、zcytor19リガンド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zcytor19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、BHK細胞がzcytor19受容体を内因的に発現しない場合において使用され得る。他の細胞系も使用され得る。

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 SIE誘発性要素(m67SIE又はhSIE)(Sadowski, H. など., Science 261: 1739-1744, 1993)、p21WAF1遺伝子からのp21SIE1(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Fc γ RI遺伝子のSTAT誘発性要素(Seidel, H. など., Proc. Natl. Acad. Sci. 92: 3041-3045, 1995)。

10

【0439】

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。

20

【0440】

バイオアッセイ細胞を、zcytor19受容体のみによりトランスフェクトし、zcytor19受容体及び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、zcytor19受容体のみ、クラスIIサイトカイン受容体、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、zcytor11(通常、アメリカ特許第5,965,704号所有の)、CRF2-4、DIRS1、zcytor7(通常、アメリカ特許第5,945,511号所有の)受容体と、zcytor19受容体との種々の組み合わせを包含するが、但しそれらだけには限定されない。次に、個々の独立した受容体複合体細胞系を、サイトカインならし培地又は精製されたサイトカインの存在下でアッセイし、そしてルシフェラーゼ活性を通常の方法を用いて測定する。

30

【0441】

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zcytor19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。

40

他方では、BaF3/zcytor19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、既知アッセイ、例えば標準Alamar Blue増殖アッセイを用いて、測定される類似するアッセイを行うことができる。

【0442】

例9. COS細胞トランスフェクション及び分泌トラップ

分泌トラップアッセイを用いて、zcytor19受容体リガンドを同定することができる。zcytor29はクラスIIサイトカイン受容体であるので、既知の又は孤児サイトカインとzcytor19sR/Fc4融合タンパク質との結合を試験した。サイトカイン(ヒト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

50

γ 、IL-10を包含する)のcDNAを含むpZPT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zcytor19sR/Fc4の結合を、下記に記載される分泌トラップアッセイを用いて行う。このアッセイにおける陽性結合は、可能性あるzcytor19受容体ーリガンド対を示す。

【0443】

A. COS細胞トランスフェクション

COS細胞トランスフェクションを次の通りに行った：5 μ lのLipofectamineTM及び45 μ lの血清フリーDMEM培地と共に、50 μ lの血清フリーDMEM培地（500mgのDMEM（Gibco BRL）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のフェチニン）中、0.75 μ gのサイトカインDNAを混合する。室温で30分間インキュベートし、そして次に、400 μ lの血清フリーDMEM培地を添加する。この500 μ lの混合物を、12-ウェル組織培養プレート上にプレートされる1.5 $\times$ 10⁵個のCOS細胞上に添加し、そして37℃で5時間インキュベートする。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、そして一晩インキュベートする。

【0444】

B. 分泌トラップアッセイ

分泌トラップを次の通りに行なった：培地上の細胞を、PBSによりすすぎ、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2度、洗浄し、そしてPBS中、0.1%Triton-Xにより15分間、透過せしめ、そしてTNTにより3度、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、TNB中、1 μ g/ml、0.5 μ g/ml又は0.25 μ g/mlのzcytor19-Fc4可溶性受容体融合タンパク質（例10）と共に1時間インキュベートした。次に、細胞をTNTにより3度、洗浄し、そしてTNB中に、1:1000で希釈されたヤギー抗-ヒトIgG-HRP（Fc4特異的）（Jackson Immuno Research）によりさらに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。

【0445】

正の結合を、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4.5分間インキュベートし、そしてTNTにより洗浄した。細胞を、TNT中、1.5に希釈されたVectashield Mounting Media（Vector Labs Burlingame, CA）により保存した。細胞を蛍光顕微鏡上でFTTCフィルターを用いて可視化した。

【0446】

zcytor19はクラスIIサイトカイン受容体であるので、既知の又は孤児のサイトカインとのzcytor19sR/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、ヒト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zcytor19sR/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。このアッセイにおける正の結合は、可能性あるzcytor19受容体ーリガンド対を示す。

【0447】

例10. E. コリにおけるヒトzcytor19の発現

A. zcytor19-MBP融合発現ベクターpTAP170/zcytor19の構成：

マルトース結合タンパク質（MBP）のN末端に融合されるヒトzcytor19の一部

をコードするポリヌクレオチドを含む発現プラスミドを、相同組換えを通して構成した。ヒト *zcytor19* cDNA (配列番号1) のフラグメントを、PCRを用いて、単離した。次の2種のプライマーを、PCR反応におけるヒト *zcytor19* フラグメントの生成に使用した：(1) ベクターフランキング配列40bp及びヒト *zcytor19* のアミノ酸末端に対応する24bpを含むプライマーZC39204 (配列番号30)、及び(2) フランキングベクター配列に対応する3'末端側の40bp及びヒト *zcytor19* のカルボキシル末端に対応する24bpを含むプライマーZC39205 (配列番号31)。

【0448】

PCR反応条件は次の通りであった：94℃で1分(1サイクル)；次に、94℃で30秒、60℃で30秒、及び68℃で1.5分(20サイクル)；続いて4℃でのソーキング(二重反復して行われる)。個々の100µlのPCR反応の5µlを、分析のために1×TBE緩衝液と共に1.0%アガロースゲル上で試験し、そして約700bpのフラグメントの予測されるバンドを見出した。残りの95µlのPCR反応を、400µlの絶対エタノールにより沈殿された第2のPCR管と共に組合し、そして下記のように、MBP-ヒト *zcytor19* 融合体をコードする構造体を生成するために、SmaIにより切断された受容体ベクターpTAP170中に組合すために使用される水10µlに再懸濁した。

【0449】

プラスミドpTAP170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(Hietter 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pTAP170を、酵母相同組換えを用いて構成する。

【0450】

100ngのEcoRI切断された、pMAL-c2を、1µgのPvuI切断されたpRS316、1µgのリンカーと共に組合し、そして1µgのScaI/EcoRI切断されたpRS316を、PCR反応において組合す。オリゴzc19, 372 (100pモル)：zc19, 351 (1pモル)：zc19, 352 (1pモル)及びzc19, 371 (100pモル)から成るリンカーを、PCR反応において組合した。条件は次の通りであった：94℃で30秒、50℃で30秒、及び72℃で30秒(10サイクル)；続いて4℃でのソーキング。PCR生成物を、100%エタノール沈殿を通して濃縮した。

【0451】

100µlのコンピテント酵母細胞(S. セレビシアエ)を、約1µgのヒト *zcytor19* 挿入体及び100ngのSmaI消化されたpTAP170ベクターを含む混合物10µlと共に組合し、そして0.2cmのエレクトロポレーションキューベットに移した。その酵母/DNA混合物を、0.75kV (5kV/cm)、無限オーム、25µFで電気パルスした。個々のキューベットに、1.2Mのソルビトール600µlを添加した。次に、酵母を、2-URADプレート上に2つの300µlのアリコートでプレートし、そして30℃でインキュベートした。

【0452】

約48時間後、単一のプレートからUra⁺酵母形質転換体を、1mlの水に再懸濁し、そして少々時間、回転せしめ、酵母細胞をペレット化した。その細胞ペレットを、1mlの溶解緩衝液(2% Triton X-100, 1% SDS、100mMのNaCl、10mMのトリス、pH8.0、1mMのEDTA)に再懸濁した。500µlの溶解混合物を、300µlの酸洗浄されたガラスビーズ及び500µlのフェノールクロロホル

ムを含むEppendorf管に添加し、1分間隔で2又は3度、回転せしめ、続いて6分後までに、Eppendorf遠心分離機において最大速度で回転せしめた。300 μ lの水相を、新しい管に移し、そしてDNAを600 μ lのエタノール(EtOH)により沈殿し、続いて、4℃で10分間、遠心分離した。DNAペレットを、100 μ lの水に再懸濁した。

【0453】

エレクトロコンピテントE. コリ細胞(MC1061, Casadabanなど., J. Mol. Biol. 138, 179-207)の形質転換を、1 μ lの酵母DNA調製物及び40 μ lのMC106細胞により行った。細胞を、2.0kV, 25 μ F及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションに続いて、0.6mlのSOC(2%のBactol Trypton(Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物(Difco), 10mMのNaCl, 2.5mMのKCl, 10mMのMgSO₄, 20mMのグルコース)を、細胞に添加した。37℃で1時間のインキュベーションの後、細胞を、LK Kanプレート(LBブイオン(Lenox), 1.8%のBacto^TM Agar(Difco), 30mg/lのカナマイシン)上に、1アリコートでプレートとした。

【0454】

ヒトzcytor19のための正しい発現構造体を有する個々のクローンを発現により同定した。細胞を、30 μ g/mlのカナマイシンと共に、Superbroth II(Becton Dickinson)において一晩、増殖した。その一晩の培養物50 μ lを用いて、2mlの新しいSuperbroth II+30 μ g/mlのカナマイシンを接種した。培養物を、37℃で2時間、振盪しながら増殖した。

【0455】

1mlの培養物を、1mMのIPTGにより誘発した。2~4時間後、個々の培養物250 μ lを、5%の β ME及び色素を含むThorneer緩衝液(8Mのウレア、100mMのトリス、pH7.0、10%グルセロール、2mMのEDTA、5%SDS)250mlと共に混合した。サンプルを5~10分間、煮沸した。その20 μ lを、4%-12%のPAGEゲル(NOVEX)上のレーンあたりに負荷した。ゲルを1 $\times$ ME S緩衝液において展開した。陽性クローンを、pTAP317と命名し、そして配列分析にゆだねた。pTAP317内のMBP-zcytor19融合体のポリヌクレオチド配列を、配列番号32として示し、そしてMBP-zcytor19融合体のその対応するポリペプチド配列を、配列番号33として示す。

【0456】

B. ヒトzcytor19の細菌発現:

10 μ lの配列決定DNAを、次の反応においてNot I(NEB)により消化し、CEN-ARSを除去した: 37℃で1時間、10 μ lのDNA、3 μ lの緩衝液3(NEB)、15 μ lの水、及び2 μ lのNot I(10U/ μ l NEB)。次に、消化物7 μ lを、2 μ lの5 $\times$ 緩衝液及びT4 DNAリガーゼ(1U/ μ l BRL)と共に混合した。反応を室温で1時間インキュベートした。反応体1 μ lを用いて、E. コリ株W3110(ATCC)を形質転換した。細胞を、2.0kV, 25 μ F及び400オームで電気パルスした。細胞を、2.0kV, 25 μ F及び400オームで電気パルスした。エレクトロポレーションに続いて、0.6mlのSOC(2%のBactol Trypton(Difco, Detroit, MI), 0.5%酵母抽出物(Difco), 10mMのNaCl, 2.5mMのKCl, 10mMのMgSO₄, 20mMのグルコース)を、細胞に添加した。37℃で1時間のインキュベーションの後、細胞を、LK Kanプレート(LBブイオン(Lenox), 1.8%のBacto^TM Agar(Difco), 30mg/lのカナマイシン)上に、1アリコートでプレートとした。個々のクローンを、酵母マーカー及び複製配列の不在について診断消化物により分析した。

【0457】

陽性クローンを用いて、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のカナマイシンを含む、Superbroth II (Becton Dickinson) の一晚の開始培養物を接触した。その開始培養物を用いて、 $500\mu\text{l}$ のSuperbroth II+Kanによりそれぞれ充填された4個の2L-そらせ板付きフラスコを接種した。OD₆₀₀が4.1に達するまで、培養物を 37°C で 2500rpm で振盪した。この点で、培養物を、 1mM のIPTGにより誘発した。培養物を、 37°C で、 250rpm でさらに2時間、増殖し、この点で、 2ml を分析するために保存し、そして残りを遠心分離により収穫した。ペレットを、タンパク質精製のために移行するまで、 -80°C で保存した。

【0458】

例11. zcytor19-Fc4融合体についての精製スキーム

10

すべての工程は、特にことわらない限り、 4°C で行った。ならし培地を、まず20倍に、Amico/Millipore Spiral 遠心分離機 10kD MWCO (周囲温度)を用いて濃縮した。次に、その濃縮された培地を、適切なサイズのPOROS 50A (プロテインAを結合された) カラムに、最適な捕獲流速で適用した。カラムを、 10 カラム体積(CV)の平衡化緩衝液により洗浄し、次に、 3CV の 0.1M のグリシン(pH3)により急速に溶出した。集められた画分は、pHを約7.2に中和するために、溶出の前、予測される体積の 2M のTRIS (pH8.0)を有した。

【0459】

Brilliant Blue (Sigma) により染色されたNuPAGEゲルを展開し、溶出液を分析した。興味ある画分をプールし、そして 30kD MWCO 遠心分離濃縮機を用いて、呼称体積まで濃縮した。濃縮されたプロテインAプールを、適切なサイズのPharmacia Sephacryl 200カラム上に注入し、凝集物を除去し、そしてタンパク質をPBS (pH7.3)中に交換した。再び、Brilliant Blue (Sigma) により染色されたNuPAGEゲルを用いて、溶出液を分析した。画分をプールした。Western及びBrilliant Blue (Sigma) により染色されたNuPAGEゲルを展開し、純度及び含有率を確かめた。さらなる分析のために、タンパク質をAAA及びN-末端配列決定のために提出した。AAA分析及びN-末端配列決定はzcytor19-Fcポリペプチドを確かめ；N-末端アミノ酸配列は、予測されるSRPRL APQX VTLLS QNF SV (配列番号34)の通りであった。

20

30

【0460】

例12. 複数組織及び血液画分第1鎖cDNAパネルのRT-PCR分析に基づいてのヒトzcytor19発現

zcytor19の遺伝子発現を、市販の標準化された複数組織第1鎖cDNAパネル (Origene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA)を用いて試験した。それらは、Origene's Human Tissue Rapid-ScanTM Panel (24種の異なった組織を含む) 及び次のBD Biosciences Clontech Multiple Tissue cDNA (MTCTM) Panelsを含んだ: Human MTC Panel 1 (8種の異なった成人組織を含む)、Human MTC Panel II (8種の異なった成人組織を含む)、Human Fetal MTC Panel (8種の異なった胎児組織を含む)、Human Tumor MTC Panel (7種の異なった器官から癌を含む)、Human Blood Fraction MTC Panel (9種の異なった血液画分を含む) 及びHuman Immune System MTC Panel (6種の異なった器官及び末端血液リンパ球を含む)。

40

【0461】

PCR反応を、 426bp の生成物を生成するzcytor19特異的オリゴプライマーZC40285 (配列番号35) 及びZC40286 (配列番号36)、Qiagen HotStarTaq DNAポリメラーゼ (Qiagen, Inc., Valenc

50

ia, CA) 及び Redi LoadTM 色素 (Research Genetics, Inc., Huntville, AL) を組み立てた。PCR サイクル条件は次の通りであった: 95℃で15分の初期変性 (1 サイクル)、95℃で45秒の変性、63℃で1分のアニーリング及び72℃で1分15秒の延長 (35 サイクル)、続いて72℃で7分の最終延長 (1 サイクル)。反応物を、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、そして臭化エチジウムによる染色により可視化した。

【0462】

正しいサイズのDNAフラグメントを、次のヒト成人組織において観察した: 副腎、骨髓、結腸、心臓、肝臓、肺、リンパ節、筋肉、卵巣、膵臓、胎盤、前立腺、唾液腺、小腸、膵臓、胃、精巣、甲状腺及び扁桃。正しいサイズのDNAフラグメントを、次のヒト胎児組織において観察した: 心臓、肝臓、肺、腎臓、骨格筋、脾臓、及び胸腺。正しいサイズのDNAフラグメントを次のヒト血液画分において観察した: 末梢血液リンパ球、単核細胞 (B-細胞、T-細胞及び単球)、休止CD8⁺細胞 (T-サプレッサー/細胞性)、休止CD19⁺細胞 (B-細胞)、活性化された単核細胞及び活性化されたCD4⁺細胞。正しいサイズのDNAフラグメントを次の腫瘍組織において観察した: 乳癌、結腸腺癌、肺癌、卵巣癌、膵臓腺癌及び前立腺性腺癌。

10

【0463】

zcytor19 はそれらの特定の腫瘍組織において発現されるので、zcytor19 ポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体は、本明細書に開示されるように、腫瘍マーカーとして使用され得る。さらに、zcytor19 に対する抗体は、抗-腫瘍活性、及び抗体の毒素-接合体、サイトカイン接合体又は他の接合体、又はzcytor19 受容体リガンド自体を有する。zcytor19 リガンドのアンタゴニスト、例えば抗-zcytor19 抗体又は可溶性受容体がまた、抗-腫瘍試薬として作用することができる。

20

【0464】

例13. zcytor19 KOマウスの生成及び分析

A. マウスzcytor19 遺伝子に関して陽性のBACクロンの同定

マウスzcytor19 遺伝子に関して陽性の1つのBACクロンを、Incyte Genomic's (St. Louis, Missouri) Easy-to-Screen DNA Pools, BAC Mouse ES (Release I) を用いて、製造業者の説明書に従って同定した。オリゴヌクレオチドを、部分的エキソン6、完全なイントロン6及び部分的エキソン7配列を含むPCRフラグメントを生成するよう企画した。

30

【0465】

PCR反応を、1.75単位のAdvantage2ポリメラーゼ (Clontech) を用いて、25µlで行った。2µl又は10µlのBACライブラリーDNAを、67mMのトリス、pH8.8、16.6mMの(NH₄)₂SO₄、6.7mMのMgCl₂、6mMの2-メルカプトエタノール、100µg/mlのゼラチン、10%ジメチルスルホキシド、1mMのデオキシヌクレオチド、140nMの前方向プライマーZC39128 (配列番号37) 及び140nMの逆方向プライマーZC39129 (配列番号38) を含む緩衝液において、鋳型として使用した。PCR条件は次の通りであった: 95℃で1分; 95℃で15秒、55℃で30秒及び68℃で30秒 (30 サイクル); 及び68℃で2分; 続いて4℃での維持。PCR生成物を、アガロースゲル電気泳動により分析した。陽性PCR生成物は、1.149bpであることが見出された。

40

【0466】

マウスzcytor19 遺伝子に関して陽性の4種の追加のBACクロンを、Incyte's BAC Mouse Filter Set (Release II) を用いて、製造業者の説明書に従って同定した。オリゴヌクレオチドを、マウスcDNA鋳型からの部分エキソン6及び部分エキソン7配列を含むPCRフラグメントを生成するよう企画した。

50

【0467】

PCR反応を、1.75単位のAdvantage2ポリメラーゼ(Clontech)を用いて、25 μ lで行った。2 μ lのNeonatal Mouse皮膚cDNAライブラリー(JAK 062700B)を、67mMのトリス、pH8.8、16.6mMの(NH₄)₂SO₄、6.7mMのMgCl₂、6mMの2-メルカプトエタノール、100 μ g/mlのゼラチン、10%ジメチルスルホキシド、1mMのデオキシスクレオチド、140nMの前方向プライマーZC39128(配列番号37)及び140nMの逆方向プライマーZC39129(配列番号38)を含む緩衝液において、鋳型として使用した。PCR条件は上記と同じであった。PCR生成物を、アガロースゲル電気泳動により分離し、そしてQiaquick(Qiagen)ゲル抽出キットを用いて精製した。陽性PCR生成物は、1.149bpであることが見出された。単離された約400bpのDNAフラグメントを、Prime-It II(Stratagene) Random Primer ラベリングキットを用いてラベルし、そしてMicroSpin S-200HRカラム(Amersham Pharmacia)を用いて精製した。 10

【0468】

ラベルされたプローブを用いて、Incyteの7個のフィルターBACライブラリー組をスクリーンした。ハイブリダイゼーションを、ExpressHyb(Clontech)を用いて、55℃で一晩、行った。次に、フィルターを、0.1 $\times$ SSC、0.1% SDSにより50℃で30分間、3度洗浄し、一晩オートラジオグラフィー処理し、そして陽性クローンを同定するために、製造業者のグリッドパターンに比較した。 20

【0469】

B. zcytor19マウス陽性BACの特徴化

129/SvJ胚幹細胞ライブラリー(Release I及びII)からの5種のzcytor19マウス陽性BACクローンを、Incyte Genomicsから得た。BACクローンを、液体培地において、E. コリ宿主株内で増殖し、そしてBAC大プラスミド精製キットMKB-500(Incyte Genomics)を用いて、製造業者の説明書に従って抽出した。5種のBACのうち4種は、PCRにより決定されるように、少なくとも2,000bpの5'未翻訳領域、エキソン1及びエキソン5を含むことが見出された。

【0470】

100ngの個々のBAC DNAを、次の条件を用いて、鋳型として使用した：PCR反応を、67mMのトリス、pH8.8、16.6mMの(NH₄)₂SO₄、6.7mMのMgCl₂、5mMの2-メルカプトエタノール、100 μ g/mlのゼラチン、10%ジメチルスルホキシド、1mMのデオキシスクレオチド、140nMの前方向及び140nMの逆方向プライマーを含む緩衝液中、1.75単位のAdvantage2ポリメラーゼ(Clontech)を用いて、25 μ lで行った。PCR条件は次の通りであった：95℃で1分；95℃で15秒、55℃で30秒及び68℃で30秒(30サイクル)；及び68℃で2分；続いて4℃での維持。 30

【0471】

PCR生成物をアガロースゲル電気泳動により分析した。前方向プライマーZC40784(配列番号39)及び逆方向プライマーZC40785(配列番号40)部分5'UTRを用いて増幅し、そして957bpであることが見出された。前方向プライマーZC40786(配列番号41)及び逆方向プライマーZC40787(配列番号42)部分5'UTR、完全エキソン1及び部分イントロン1を用いて増幅し、そして約950bpであることが見出された。前方向プライマーZC39128(配列番号37)、及び部分エキソン6、完全イントロン6及び部分エキソン7を含む前方向はプライマーZC39129(配列番号38)を用いて、増幅し、そして1,149bpであることが見出された。 40

【0472】

5種のBACクローンのうち4種は、サザン分析によれば、少なくとも3,796bpの5'UTR及び少なくとも6,922bpの3'UTRを含むことが見出された。オリゴ 50

ヌクレオチド Z C 4 0 7 8 4 (配列番号 3 9) 及び Z C 3 9 1 2 9 (配列番号 3 8) を、T 4 ポリヌクレオチドキナーゼ (R o c h e) を用いて末端ラベリングし、そして制限エンドヌクレアーゼ E c o R I (L i f e T e c h n o l o g i e s) 及び X b a I (N e w E n g l a n d B i o l a b s) により消化された 5 種の B A C 候補体を含むサブクローニングベクターをプローブするために使用した。結果は、5 種の B A C のうち 4 種が少なくとも 3, 7 9 6 b p の 5' UTR を含み、そして 5 種の B A C のうち 5 種が少なくとも 6, 9 2 2 b p の 3' UTR を含むことを示した。

【0473】

C. z c y t o r 1 9 マウスイントロン 6 配列の決定

オリゴヌクレオチドを、部分エキソン 6、完全イントロン 6 及び部分エキソン 7 配列を含む PCR フラグメントを生成するよう企画した。 10

PCR 反応を、1. 75 単位の Advantage 2 ポリメラーゼ (C l o n t e c h) を用いて、25 μ l で行った。100 ng の 129/Sv マウスゲノム DNA を、67 mM のトリス、pH 8.8, 16.6 mM の (NH₄)₂SO₄, 6.7 mM の MgCl₂, 5 mM の 2-メルカプトエタノール、100 μ g/mg のゼラチン、10% ジメチルスルホキシド、1 mM のデオキシヌクレオチド、140 nM の前方向プライマー Z C 3 9 1 2 8 (配列番号 3 7) 及び 140 nM の逆方向プライマー Z C 3 9 1 2 9 (配列番号 3 8) を含む緩衝液において鋳型として使用した。PCR 条件は上記の通りであった。PCR 生成物を、アガロースゲル電気泳動により分析し、そして 1.149 bp であることが見出された。次に、PCR 生成物を、Q i a q u i c k (Q i a g e n) PCR 精製キットを用いて精製した。イントロン 6 配列の決定は、オリゴ Z C 2 9 1 2 8 (配列番号 3 7) 及び Z C 3 9 1 2 9 (配列番号 3 8) を用いて、配列分析により行われた。 20

【0474】

D. z c y t o r 1 9 マウスイントロン 5 配列の決定

オリゴヌクレオチドを、部分エキソン 5、完全イントロン 5 及び部分エキソン 6 配列を含む PCR フラグメントを生成するよう企画した。PCR 反応を、1. 75 単位の Advantage 2 ポリメラーゼ (C l o n t e c h) を用いて、25 μ l で行った。100 ng の 129/Sv マウスゲノム DNA を、67 mM のトリス、pH 8.8, 16.6 mM の (NH₄)₂SO₄, 6.7 mM の MgCl₂, 5 mM の 2-メルカプトエタノール、100 μ g/mg のゼラチン、10% ジメチルスルホキシド、1 mM のデオキシヌクレオチド、140 nM の前方向プライマー Z C 3 9 4 0 8 (配列番号 4 3) 及び 140 nM の逆方向プライマー Z C 3 9 4 0 9 (配列番号 4 4) を含む緩衝液において鋳型として使用した。 30

【0475】

PCR 条件は次の通りであった：95 $^{\circ}$ C で 1 分；95 $^{\circ}$ C で 15 秒、55 $^{\circ}$ C で 30 秒及び 68 $^{\circ}$ C で 30 秒 (30 サイクル)；及び 68 $^{\circ}$ C で 2 分；続いて 4 $^{\circ}$ C での維持。PCR 生成物を、アガロースゲル電気泳動により分析し、そして 356 bp であることが見出された。次に、PCR 生成物を、Q i a q u i c k (Q i a g e n) PCR 精製キットを用いて精製した。イントロン 6 配列の決定は、オリゴ Z C 3 9 4 0 8 (配列番号 4 3) 及び Z C 3 9 4 0 9 (配列番号 4 4) を用いて、配列分析により行われた。 40

【0476】

E. マウス z c y t o r 1 9 遺伝子の KO 構成体の生成のためのオリゴヌクレオチドの企画

Z c y t o r 1 9 遺伝子の生物学的機能を調べるために、ノックアウトマウスモデルを、胚幹 (E S) 細胞において相同組換え技法により生成する。このモデルにおいて、コードするエキソン 1, 2 及び 3 を欠失し、z c y t o r 1 9 遺伝子のヌル突然変異を創造する。この欠失は、z c y t o r 1 9 タンパク質の翻訳開始コドン、シグナルドメイン、及び細胞ドメインの一部を除去し、従って z c y t o r 1 9 遺伝子を不活性化する。

【0477】

ET クローニング技法を用いて、KO ベクター (S t e w a r t など., N u c l. A 50

c i d s Res. 27: 6, 1999) を生成する。まず、カナマイシン耐性カセットを用いて、z c y t o r 19マウス遺伝子のイントロン1, 2及び3を置換する。前方向オリゴヌクレオチド(配列番号45)を、z c y t o r 19mの5' UTRに対して相同の52bp部分、S f i I, F s e I, B a m H I及びH i n d I I I制限部位を有する42bpのリンカー、及びカナマイシン耐性カセットの5'末端に対して相同の27bpの部分に有する、長さ121個のヌクレオチドであるよう企画する。

【0478】

逆方向ノックアウトオリゴヌクレオチド(配列番号46)を、z c y t o r 19mの5' UTRに対して相同の52bp部分、S f i I, F s e I, B a m H I及びH i n d I I I制限部位を有する42bpのリンカー、及びカナマイシン耐性カセットの5'末端に対して相同の27bpの部分に有する、長さ121個のヌクレオチドであるよう企画する。上記オリゴヌクレオチドを用いて、z c y t o r 19マウスの5' UTRに対して相同性を有する最初の52bp部分及びイントロン3に対して相同性を有する少なくとも50bpの部分と共に、完全なカナマイシン耐性カセットを含む、長さ1073bpのPCRフラグメントを合成することができる。

【0479】

次に、前記フラグメントを用いて、ETクローニングによりノックアウトベクターを構成し、ここでz c y t o rマウス陽性BAC細胞宿主がグリセロールによる処理によりコンピテントにされ、次にプラスミドp B A D a l p h a / b e t a / g a m m a (A m p)によりトランスフェクトされる。クロラムフェニコール及びアンピシリンに対する耐性が形質転換された細胞を選択する。次に、細胞を、相同アームを含むカナマイシンPCRフラグメントにより再形質転換するp B A D a l p h a / b e t a / g a m m a (A m p)のβ及びγ組換えタンパク質を、R e d a遺伝子の活性化を通して、増殖培地へのアラビノースの添加により誘発する。

【0480】

組換えBACを、カナマイシン及びアンピシリンに対する耐性により選択し、次にPCRによりスクリーンする。組換えBACが同定されると、カナマイシン耐性カセット挿入の上流の少なくとも1, 800bpの配列、及び下流の少なくとも6, 000bpの配列を含むフラグメントを、p G E M 7由来のベクター中にサブクローン化する。次に、カナマイシン耐性カセットを、I R E S / L a c Z / N e o - M C 1カセットにより、標準の連結クローニングにより置換する。I R E Sは、脳心筋炎由来の内部リボソーム侵入配列である。それを、レポーターl a c Z遺伝子に整合して融合し、ポリAシグナルに連結する。

【0481】

I R E S / L a c Zレポーター遺伝子の下流のMC1プロモーターは、G 4 1 8耐性選択マーカーN e o遺伝子の発現を駆動する。選択マーカーカセットは、すべての3種の読み取り枠における停止コドンを含む。従って、薬物耐性遺伝子N e oは、胚幹(ES)細胞において、相同組換え現象の選択のために使用される。I R E S / L a c Zレポーター遺伝子は、相同組換えの後、置換された遺伝子の発現をモニターするために使用されるであろう。ES細胞におけるノックアウトベクター及び標的遺伝子座の相同組換えが、長さ約5, 200bpであるI R E S / L a c Z / N e o - M C 1カセットによる、野生型遺伝子座の完全エキソン1, 2及び3を含む合成17, 980bpの部分の置換を誘導する。

【0482】

F. z c y t o r 19 KOマウスの生成

上記KOベクターを、P m e I消化により線状化し、そしてES細胞中にエレクトロポレートする。相同組換え現象を、PCRスクリーニング技法により同定し、そして標準のKOプロトコルを用いて、サザンブロット分析により確かめる。A. L. J o y n e r, G e n e T a r g e t i n g A P r a c t i c a A p p r o a c h, I R L P r e s s 1993を参照のこと。

【0483】

相同組換え現象が同定されると、ES細胞を拡張し、そして未分化胚芽細胞中に注入し、キメラを生成する。キメラ性雄を用いて、C57black雌を交雑し、ヌル突然変異の生殖系伝達を達成する。Hogan, B. など., *Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994を参照のこと。ヘテロ接合性KO動物を交雑し、*zcytor19*遺伝子の生物学的機能を試験する。生成される子孫の1/4は野生型であり、1/2はヘテロ接合性であり、そして1/2はホモ接合性であるべきである。ホモ接合体を下記のようにして詳細に分析する。

【0484】

G. *zcytor19*ホモ接合性動物からの組織の顕微鏡的評価

10

*zcytor19*は次の組織において発現されるので、それらの組織を注意して試験する：結腸、卵巣、胎盤、下垂体、リンパ節、小腸、唾液腺、直腸、前立腺、精巣、脳、肺、腎臓、甲状腺、脊椎、骨髄、及び頸部。

【0485】

脾臓、胸腺及び腸間膜リンパ節を、*zcytor19*を発現するトランスジェニック動物から集め、そして組織学的試験のために調製する。通常収獲された他の組織は次のものである：脾臓、胸腺、腸間膜リンパ節、腎臓、皮膚、乳腺、膵臓、胃、小腸及び大腸、脳、唾液腺、気管支、食道、副腎、下垂体、生殖管、アクセサリー男性腺、骨格筋、例えば末梢神経、及び骨髄を含む大腿骨。組織を、ホモ接合性動物及び野生型対照から収獲する。サンプルを10%緩衝されたホルマリンに固定し、通常通りに進行せしめ、パラフィンに包埋し、5ミクロンで断片化し、そしてヘマトキシリン及びエオシンにより染色する。スライドを、組織学的及び病理学的変化、例えば炎症反応、及び一定の細胞型の低増殖性について試験する。

20

【0486】

H. *zcytor19*を欠くホモ接合性マウス変異体からの組織の流動細胞計測分析

*zcytor19*遺伝子を欠いているホモ接合性動物を殺し、末梢血液、胸腺、リンパ節、骨髄及び脾臓の流動動物計測分析する。

【0487】

細胞懸濁液を、氷冷却培養培地(500mlのRPMI1640培地(JRH Biosciences, Lenexa, KS); 5mlの100倍L-グルタミン(Gibco BRL, Grand Island, NY); 5mlの100倍ピルビン酸ナトリウム(Gibco BRL); 5mlの100倍ペニシリン、ストレプトマイシン、ネオマイシン(PSN)(Gibco BRL))において、鉗子により器官を取り出し、そして次に、細胞ストレーナー(Falcon, VWR Seattle, WA)に細胞を軽く通すことによって、脾臓、胸腺及びリンパ節から製造する。

30

【0488】

末梢血液(200ml)を、ヘパリン処理された管に集め、そして10Uのヘパリン/mlを含むHBSSにより10mlに希釈する。赤血球を脾臓及び末梢血液調製物から低張溶解により除去する。骨髄細胞懸濁液を、氷冷却された培養培地により大腿骨から骨髄をフラッシングすることにより製造する。細胞を計数し、そしてトリパンプルー(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD)を用いて生存性について試験する。細胞を、氷冷却された染色培地(HBSS, 1%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム)に 1×10^7 /mlの再懸濁する。Fc受容体の阻止、及び細胞への抗体の非特異的結合の阻止を、前記細胞懸濁液に、10%正常ヤギ血清及びFc Block(PharMinger, La Jolla, CA)を添加することによって達成した。

40

【0489】

細胞懸濁液を、等体積の蛍光色素によりラベルされたモノクローナル抗体(PhorMingen)と共に混合し、氷上で60分間インキュベートし、そして次に、氷冷却された洗浄緩衝液(PBS, 1%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム)により2度、洗浄し、その後、1mg/mlの7-AAD(Molecular Probes, Eug

50

ene, OR)を含む洗浄緩衝液400mlに再懸濁する。流動データが、FACSCalibur流動細胞計測計(BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA)上で得られた。獲得及び分析の両者を、Cellquestソフトウェア(BD Immunocytometry Systems)を用いて行った)。

すべてのリンパ器官における細胞集団を分析し、T細胞、B細胞又は他のリンパ細胞の特定系統における異常性、及びそれらの器官における細胞性を検出する。

【0490】

例14. 現場ハイブリダイゼーションを用いてのzcytor19を発現する細胞の同定
 頸部癌、正常及び癌性結腸、十二指腸、子宮内膜癌、正常及び癌性卵巣、子宮、心臓、肝臓、肺、筋肉腫、及び正常及び癌性皮膚からのヒト組織を、現場ハイブリダイゼーションにより、zcytor19発現についてスクリーンした。組織を、10%の緩衝されたホルマリンに固定し、そして標準を用いてパラフィンにおいて阻止した。組織を5ミクロンで断片化した。組織を標準のプロトコルを用いて調製した。(http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/ish.htmlでの“非等張現場ハイブリダイゼーションの進行”)。手短には、組織断片を、Histoclear(National Diagnostic, Atlanta, GA)によりパラフィン除去し、そして次に、エタノールにより脱水した。次に、それらを、プロティナーゼK(50µg/ml)(Boehringer Diagnostics, Indianapolis, NJ)により、23℃で4-15分間、消化した。この段階に続いて、組織をアセチル化し、そして再水和化した。

【0491】

1つの現場プローブを、ヒトzcytor19配列に対して企画した。プラスミドDNA100933を、3'UTRの末端から0.7kbまで及ぶ、制限酵素HindIIIにより消化した。T-7 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。プローブを、インビトロ転写システム(Promega, Madison, WI)を用いて、製造業者の説明書に従って、ジゴキシゲニン(Boehringer)によりラベルした。

【0492】

現場ハイブリダイゼーションを、ジゴキシゲニン-又はビオチン-ラベルされたzcytor19プローブ(上記)により行った。プローブを、スライドに、1~5pモル/mlの濃度で60℃で12~16時間、添加した。スライドを、2×SSC及び0.1×SSCにより55℃で連続的に洗浄した。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。

【0493】

陽性シグナルを、癌サンプルのほとんどにおいて観察した。頸部癌においては、癌上皮細胞が陽性であった。リンパ小胞におけるリンパ球のサブセットにおいていくつかのシグナルが存在した。同様に、癌及びいくつかの免疫細胞は、結腸癌サンプルにおいて陽性であり、そして正常結腸サンプルは陰性であった。弱い染色が子宮内膜癌及び卵巣にも存在し、そして正常卵巣及び子宮は陰性であった。筋肉腫サンプルの癌領域に弱い染色が存在した。ケラチノサイドは、皮膚癌及びカポシ肉腫サンプルにおいて陽性であり、そして正常皮膚においては染色は観察されなかった。

【0494】

心臓及び肝臓においては、WBCをたぶん循環する細胞のサブセットは、zcytor19に関して陽性であった。いくつかの血管における内皮細胞がまた、陽性であると思われる。肺においては、タイプII肺胞細胞及びマクロファージ様細胞は陽性であった。気管支上皮及び内皮はまた、いくつかの肺検体において陽性であった。要約すれば、zcyt

or 19は癌細胞においてアップレギュレートされるように思える。リンパ球及び内皮細胞のサブセットにおいて、低レベルの z c y t o r 1 9 m R N A が存在する。

【0495】

Z c y t o r 1 9 はそれらの特定の腫瘍組織において発現されるので、z c y t o r 1 9 ポリヌクレオチド、ポリペプチド及び抗体が、本明細書に開示されるように、腫瘍マーカーとして使用され得る。さらに、z c y t o r 1 9 に対する抗体は、抗体のトキシナー接合体、サイトカイン接合体又は他の接合体、又は z c y t o r 1 9 受容体リガンド自体と同じように、抗腫瘍活性を有する。z c y t o r 1 9 リガンドのアнтаゴニスト、例えば抗-z c t y o r 1 9 抗体又は可溶性受容体はまた、抗腫瘍試薬として作用することができる。

10

【0496】

例 15. プロマイシン耐性及びゼオマイシン耐性ベクターによる z c y t o r 1 9 受容体を発現する B a F 3 細胞 (B a F 3 Z c y t o r 1 9 細胞) の構成

十分な長さの z c y t o r 1 9 受容体を発現する 2 種の型の B a F 3 細胞 (1 つは、プロマイシン耐性であり、他の 1 つはゼオマイシン耐性である) を、30 μ g の z c y t o r 1 9 発現ベクターを用いて構成した。プロマイシン耐性を有する、z c y t o r 1 9 受容体 m R N A を発現する B a F 3 細胞を、B a F 3 / z c y t o r 1 9 - p と命名した。ゼオマイシン耐性を有する、z c y t o r 1 9 受容体 m R N A を発現する B a F 3 細胞を、B a F 3 / z c y t o r 1 9 - z と命名した。

【0497】

A. z c y t o r 1 9 受容体を発現する B a F 3 細胞の構成

B a F 3、すなわちネズミ骨髄に由来するインターロイキン-3 (I L - 3) 依存性ブレイリンパ球細胞系 (P a l a c i o s a n d S t e i n m e t z , C e l l 41 : 727-734, 1985; M a t h e y - P r e v o t など, M o l . C e l l . B i o l . 6 : 4133-4135, 1986) を、10% 熱不活性化されたウシ胎児血清、2 ng/ml のネズミ I L - 3 (m I L - 3) (R & D , M i n n e a p o l i s , M N) 、2 mM の L - g l u t a M a x - 1 ^{T M} (G i b c o B R L) 、1 mM のピルビン酸ナトリウム (G i b c o B R L) 及び P S N 抗生物質 (G i b c o B R L) により補充された完全培地 (R P M I 培地 (J R H B i o s c i e n c e I n c . , L e n e x a , K S)) において維持した。エレクトロポレーションの前、p Z P - 5 N / C R F 2 - 4 を調製し、そして Q i a g e n M a x i P r e p キット (Q i a g e n) を用いて、製造業者の説明書に従って精製した。

20

30

【0498】

エレクトロポレーションのための B a F 3 細胞を、R P M I 培地により 2 度洗浄し、そして次に、R P M I 培地に 10⁷ 個の細胞/ml の細胞密度で再懸濁した。1 ml の再懸濁された B a F 3 細胞を、30 μ g の p Z P - 7 p / z c y t o r 1 9 プラスミド DNA 又は 30 μ g の p Z P - 7 z / z c y t o r 1 9 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 (G I B C O B R L) に移した。細胞に、エレクトロポレーション装置 (C E L L - P O R A T O R ^{T M} ; G I B C O B R L) により供給される 2 回の連続したショック (800 1 F a d / 300 V ; 118 0 1 F a d / 300 V) (シロックの間は 1 分の休止を置く) を与えた。

40

【0499】

5 分の回復時間の後、エレクトロポレートされた細胞を、50 ml の完全培地に移し、そしてインキュベーター (37 $^{\circ}$ C、5% C O ₂) に 15 ~ 24 時間、配置した。次に、細胞を回転沈降せしめ、そして p Z P - 7 p / z c y t o r 1 9 によりトランスフェクトされた細胞のためのプロマイシン (C l o n t e c h) 選択 (2 μ g/ml) 、又は p Z P - 7 z / z c y t o r 1 9 によりトランスフェクトされた細胞のためのゼオシン選択 (1 : 150 - 1 : 333) を含む完全培地 50 ml に再懸濁し、そして T - 162 フラスコに配置し、抗生物質耐性プールを単離した。この後、トランスフェクトされた B a F 3 細胞のプールを、B a F 3 / z c y t o r 1 9 - p u r o 及び B a F 3 / z c y t o r 1 9 -

50

z e o細胞と命名し、それらのプールを、R T - P C Rによりz c y t o r 1 9の発現についてアッセイした。

【0500】

B. R T - P C Rによるz c y t o r 1 9発現の確認

B a F 3 / z c y t o r 1 9 - p u r o及びB a F 3 / z c y t o r 1 9 - z e o細胞を、DNAのために収穫し、これを、次に逆転写反応にゆだね、そして続いて、z c y t o r 1 9の存在についてP C Rにより試験した。

【0501】

フラスコ中の細胞を、集密性まで増殖し、次に、その10mlを取り出し、そして回転沈降し、細胞ペレットを得た。RNAを、R N e a s y T o t a l R N A P u r i f i c a t i o nキットを、追加のRNアーゼフリーのDNアーゼ組 (Q i a g e n) と共に用いて、製造業者の説明書に従って、前記ペレットから精製した。次に、逆転写を、S t r a t a S c r i p t T R - P C Rキット (S t r a t a g e n e) を用いて、製造業者のプロトコールに従って、R T反応の完結を通してサンプルに対して行った。次に、P C Rを、0.2pモルの個々のプライマーZ C 4 0 2 7 9及びZ C 3 7 8 6 3、等量の個々のヌクレオチドを含む0.2mMのdNTP混合物 (R o c h e) 、5μlの10×cDNA P C R R e a c t i o n B u f f e r (C l o n e t e c h) 、R T反応からの3μlのDNA、0.5μlのA d v a n t a g e 2 P o l y m e r a s e (C l o n e t e c h) を混合することによって行った (水の添加により50μlの最終体積にした) 。

【0502】

反応を、P e r k i n E l m e r G e n e A m p P C R S y s t e m 2 4 0 0上で次の通りに行った：95℃で5分；次に、95℃で30秒、60℃で30秒、72℃で1分 (30サイクル) ；次に72℃で7分及び4℃でのソーキング。サンプルを、3mlの色素と共に混合し、そしてその25mlを、1%O m n i P u r A g a r o s e (M e r c k) ゲル上で展開した。z c y t o r 1 9バンドを、B a F 3 / z c y t o r 1 9 - p u r o及びB a F 3 / z c y t o r 1 9 - z e oの両者についてゲル上で検出し、このことは、それらの細胞が前記遺伝子を発現することを示唆する。

前述から、本発明の特定の態様が例示目的のために記載されてきたが、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。

10

20

30

【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
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/44209 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/705

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

(21) International Application Number: PCT/US01/44808

(22) International Filing Date:
28 November 2001 (28.11.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/253,561 28 November 2000 (28.11.2000) US
60/267,211 7 February 2001 (07.02.2001) US(71) Applicant: ZYMOGENETICS, INC. [US/US]; 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, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU,
ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent
(BF, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NE, SN, TD, TG).(72) Inventors: PRESNELL, Scott, R.; 2902 North Puget
Sound Avenue, Tacoma, WA 98407 (US); XU, Wenfeng;
12432 54th Avenue West, Mukilteo, WA 98275 (US);
NOVAK, Julia, E.; 10699 Battle Point Drive Northeast,
Bainbridge Island, WA 98110 (US); WHITMORE,
Theodore, E.; 6916 152nd Avenue Northeast, Redmond,
WA 98052 (US); GRANT, Francis, J.; 7714 37th North-
east, Seattle, WA 98115 (US).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that reportFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/44209 A2

(54) Title: CYTOKINE RECEPTOR ZCYTOR19

(57) Abstract: Novel polypeptide4s, polynucleotides encoding the polypeptides, and related compositions and methods are disclosed for zcytor19, a novel class II cytokine receptor. The polypeptides may be used within methods for detecting ligands that stimulate the proliferation and/or development of hematopoietic, lymphoid and myeloid cells *in vitro* and *in vivo*. Ligand-binding receptor polypeptides can also be used to block ligand activity *in vitro* and *in vivo*. The polynucleotides encoding zcytor19, are located on chromosome 1p36.11, and can be used to identify a region of the genome associated with human disease states. The present invention also includes methods, for producing the protein, uses therefor and antibodies thereto.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

Description

5 CYTOKINE RECEPTOR ZCYTOR19

REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application is related to Provisional Application 60/253,561, filed on November 28, 2000. This application is also related to Provisional Application US 10 60/267,211, filed on February 7, 2001. Under 35 U.S.C. § 119(e)(1), this application claims benefit of said Provisional Applications.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Hormones and polypeptide growth factors control proliferation and 15 differentiation of cells of multicellular organisms. These diffusable molecules allow cells to communicate with each other and act in concert to form cells and organs, and to repair damaged tissue. Examples of hormones and growth factors include the steroid hormones (e.g. estrogen, testosterone), parathyroid hormone, follicle stimulating hormone, the interleukins, platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth 20 factor (EGF), granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), erythropoietin (EPO) and calcitonin.

Hormones and growth factors influence cellular metabolism by binding to receptors. Receptors may be integral membrane proteins that are linked to signaling pathways within the cell, such as second messenger systems. Other classes of receptors 25 are soluble molecules, such as the transcription factors. Of particular interest are receptors for cytokines, molecules that promote the proliferation and/or differentiation of cells. Examples of cytokines include erythropoietin (EPO), which stimulates the development of red blood cells; thrombopoietin (TPO), which stimulates development of cells of the megakaryocyte lineage; and granulocyte-colony stimulating factor (G- 30 CSF), which stimulates development of neutrophils. These cytokines are useful in

WO 02/44209

PCT/US01/44808

2

restoring normal blood cell levels in patients suffering from anemia, thrombocytopenia, and neutropenia or receiving chemotherapy for cancer.

The demonstrated *in vivo* activities of these cytokines illustrate the enormous clinical potential of, and need for, other cytokines, cytokine agonists, and cytokine antagonists. The present invention addresses these needs by providing new a hematopoietic cytokine receptor, as well as related compositions and methods.

The present invention provides such polypeptides for these and other uses that should be apparent to those skilled in the art from the teachings herein.

10 DESCRIPTION OF THE INVENTION

These and other aspects of the invention will become evident upon reference to the following detailed description of the invention.

Within one aspect, the present invention provides an isolated polynucleotide that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence selected from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid

WO 02/44209

PCT/US01/44808

3

number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser). In one embodiment, the isolated polynucleotide described above comprises a polynucleotide sequence selected from the group consisting of: (a) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 669; (b) a polynucleotide

5 comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to 678; (c) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 747; (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 748 to nucleotide 1473; (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from

10 nucleotide 748 to nucleotide 1560; (f) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 1473; (g) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from nucleotide 61 to nucleotide 1560; (h) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 1 to nucleotide 1473; (i) a

15 polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from nucleotide 1 to nucleotide 1560; (j) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:20 from nucleotide 61 to nucleotide 489; (k) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:20 from nucleotide 61 to nucleotide 633; and (l) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in

20 SEQ ID NO:20 from nucleotide 1 to nucleotide 633. In another embodiment, the isolated polynucleotide is as described above, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide that further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2. In another embodiment, the isolated polynucleotide is as described above, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide

25 that further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2, or 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19. In another embodiment, the isolated polynucleotide is as described above, wherein the polypeptide encoded by the polynucleotide has activity as measured by cell proliferation, activation of transcription of a reporter gene, or wherein the polypeptide encoded by the

30 polynucleotide further binds to an antibody, wherein the antibody is raised to a polypeptide comprising a sequence of amino acids from the group consisting of: (a) the

WO 02/44209

PCT/US01/44808

4

amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and wherein the binding of the antibody to the isolated polypeptide is measured by a biological or biochemical assay including radioimmunoassay, radioimmuno-precipitation, Western blot, or enzyme-linked immunosorbent assay.

Within a second aspect, the present invention provides an expression vector comprising the following operably linked elements: a transcription promoter; a DNA segment encoding a polypeptide from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid

WO 02/44209

PCT/US01/44808

5

number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and a transcription terminator, wherein the promoter is operably linked to the DNA segment, and the DNA segment is operably linked to the transcription terminator. In one embodiment, the expression vector described above further comprises a secretory signal sequence operably linked to the DNA segment.

Within a third aspect, the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector according to claim 7, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA segment. In another embodiment, the expression vector is as described above, wherein the polypeptide further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2. In another embodiment, the expression vector is as described above, wherein the polypeptide further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2 or 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19. In another embodiment, the expression vector is as described above, comprising the following operably linked elements: a transcription promoter; a DNA segment encoding a polypeptide from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and a transcription terminator, wherein the promoter is operably

WO 02/44209

PCT/US01/44808

6

linked to the DNA segment, and the DNA segment is operably linked to the transcription terminator.

Within another aspect, the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector according to claim 7, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA segment. cultured cell into which has been introduced an expression vector according to claim 11, wherein the cell expresses a soluble receptor polypeptide encoded by the DNA segment.

Within another aspect, the present invention provides a DNA construct encoding a fusion protein, the DNA construct comprising: a first DNA segment encoding a polypeptide comprising a sequence of amino acid residues selected from the group consisting of: (a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met), to amino acid number 20 (Gly); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 520 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 249 (Trp); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); and (m) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (n) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (o) the amino acid sequence as shown in SEQ ID

WO 02/44209

PCT/US01/44808

7

NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (p) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and at least one other DNA segment encoding an additional polypeptide, wherein the first and other DNA segments are connected in-
5 frame; and wherein the first and other DNA segments encode the fusion protein.

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 according to claim 13; and a transcription terminator, wherein the promoter is operably linked to the DNA construct, and the
10 DNA construct is operably linked to the transcription terminator.

Within another aspect, the present invention provides a cultured cell comprising an expression vector according to claim 14, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA construct.

Within another aspect, the present invention provides a method of
15 producing a fusion protein comprising: culturing a cell according to claim 15; and isolating the polypeptide produced by the cell.

Within another aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising a sequence of amino acid residues selected from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as
20 shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e)
25 the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number
30 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the

WO 02/44209

PCT/US01/44808

8

amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser). In one embodiment, the isolated polypeptide is as described above, wherein the polypeptide consists of a sequence of amino acid residues that is selected from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser). In another embodiment, the isolated polypeptide is as described above, wherein the polypeptide further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2. In another embodiment, the isolated polypeptide is as described above, wherein the polypeptide further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg) of SEQ ID NO:2, or 250 (Lys) to amino acid number 520 (Arg) of SEQ ID NO:19. In another embodiment, the isolated polypeptide is as described above, wherein the polypeptide has activity as measured by

WO 02/44209

PCT/US01/44808

9

cell proliferation, activation of transcription of a reporter gene, or wherein the polypeptide encoded by the polynucleotide further binds to an antibody, wherein the antibody is raised to a polypeptide comprising a sequence of amino acids from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp); (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg); (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg); (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg); (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg); (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg); (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp); (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and wherein the binding of the antibody to the isolated polypeptide is measured by a biological or biochemical assay including radioimmunoassay, radioimmuno-precipitation, Western blot, or enzyme-linked immunosorbent assay.

Within another aspect, the present invention provides a method of producing a polypeptide comprising: culturing a cell according to claim 8; and isolating the polypeptide produced by the cell.

Within another aspect, the present invention provides an isolated polypeptide comprising an amino acid segment selected from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); (b) the amino acid sequence as shown in SEQ

WO 02/44209

PCT/US01/44808

10

ID NO:4; (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and (e) sequences that are at least 90% identical to (a), (b) or (c), wherein the polypeptide is substantially free of transmembrane and intracellular domains ordinarily associated with hematopoietic
5 receptors.

Within another aspect, the present invention provides a method of producing a polypeptide comprising: culturing a cell according to claim 12; and isolating the polypeptide produced by the cell.

Within another aspect, the present invention provides a method of
10 producing an antibody to a polypeptide comprising: inoculating an animal with a polypeptide selected from the group consisting of: (a) a polypeptide consisting of 50 to 471 amino acids, wherein the polypeptide comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 491 (Arg); (b) a polypeptide consisting of 50 to 500 amino acids, wherein the polypeptide
15 comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 520 (Arg); (c) a polypeptide consisting of 50 to 191 amino acids, wherein the polypeptide comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 211 (Ser); (d) a polypeptide according to claim 18; (e) a polypeptide comprising amino acid
20 number 21 (Arg) to 119 (Tyr) of SEQ ID NO:2; (f) a polypeptide comprising amino acid number 125 (Pro) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2; (g) a polypeptide comprising a hydrophilic peptide of SEQ ID NO:2 as predicted from a hydrophobicity plot using a Hopp/Woods hydrophilicity profile based on a sliding six-residue window, with buried G, S, and T residues and exposed H, Y, and W residues ignored; and wherein the
25 polypeptide elicits an immune response in the animal to produce the antibody; and isolating the antibody from the animal.

Within another aspect, the present invention provides an antibody produced by the method of claim 25, which specifically binds to a polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21. In one embodiment, the antibody
30 described above is a monoclonal antibody.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

11

Within another aspect, the present invention provides an antibody that specifically binds to a polypeptide as disclosed above.

Within another aspect, the present invention provides a method of detecting, in a test sample, the presence of a modulator of the activity of a cytokine receptor protein comprising: culturing a cell into which has been introduced an expression vector according to claim 6, wherein the cell expresses the protein encoded by the DNA segment in the presence and absence of a test sample; and comparing levels of activity of the protein in the presence and absence of a test sample, by a biological or biochemical assay; and determining from the comparison, the presence of modulator the cytokine receptor protein activity in the test sample.

Within another aspect, the present invention provides a method for detecting a cytokine receptor ligand within a test sample, comprising: contacting a test sample with a cytokine receptor polypeptide comprising an amino acid sequence from the group consisting of: (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:4; (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); and (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and detecting the binding of the cytokine receptor polypeptide to a ligand in the sample. In one embodiment, the method for detecting a cytokine receptor ligand is as disclosed above, wherein the cytokine receptor polypeptide is membrane bound within a cultured cell, and the detecting step comprises measuring a biological response in the cultured cell. In another embodiment, the method for detecting a cytokine receptor ligand is as disclosed above, wherein the biological response is cell proliferation or activation of transcription of a reporter gene.

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, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20 or the complement of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20, under conditions wherein said polynucleotide will hybridize to complementary polynucleotide sequence; visualizing the first reaction product; and

WO 02/44209

PCT/US01/44808

12

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.

Within another aspect, the present invention provides a method for
5 detecting a cancer in a patient, comprising: obtaining a tissue or biological sample from a patient; incubating the tissue or biological sample with an antibody of claim 29 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
10 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
15 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, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20 or the complement of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20;
20 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
25 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.

30 Prior to setting forth the invention in detail, it may be helpful to the understanding thereof to define the following terms:

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
5 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 67:31, 1988), Glu-Glu affinity tag (Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985), substance P, Flag™ peptide (Hopp et al., Biotechnology 6:1204-10, 1988),
10 streptavidin binding peptide, or other antigenic epitope or binding domain. See, in general, Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991. DNAs encoding affinity tags are available from commercial suppliers (e.g., Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ).

The term "allelic variant" is used herein to denote any of two or more
15 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 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.

20 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 reference sequence within a polypeptide is located proximal to the carboxyl terminus of
25 the reference sequence, but is not necessarily at the carboxyl terminus of the complete polypeptide.

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
30 complement/anti-complement pair. Other exemplary complement/anti-complement pairs include receptor/ligand pairs, antibody/antigen (or hapten or epitope) pairs,

WO 02/44209

PCT/US01/44808

14

sense/antisense polynucleotide pairs, and the like. Where subsequent dissociation of the complement/anti-complement pair is desirable, the complement/anti-complement pair preferably has a binding affinity of $<10^9 \text{ M}^{-1}$.

The term "complements of a polynucleotide molecule" is a
5 polynucleotide molecule having a complementary base sequence and reverse orientation as compared to a reference sequence. For example, the sequence 5' ATGCACGGG 3' is complementary to 3' CCCGTGCAT 3'.

The term "degenerate nucleotide sequence" denotes a sequence of
nucleotides that includes one or more degenerate codons (as compared to a reference
10 polynucleotide 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 "expression vector" is used to denote a DNA molecule, linear
or circular, that comprises a segment encoding a polypeptide of interest operably linked
15 to additional segments that provide for its transcription. Such additional segments include promoter and terminator sequences, and may also include one or more origins of replication, one or more selectable markers, an enhancer, a polyadenylation signal, etc. Expression vectors are generally derived from plasmid or viral DNA, or may contain elements of both.

The term "isolated", when applied to a polynucleotide, denotes that the
polynucleotide has been removed from its natural genetic milieu and is thus free of
other extraneous or unwanted coding sequences, and is in a form suitable for use within
genetically engineered protein production systems. Such isolated molecules are those
that are separated from their natural environment and include cDNA and genomic
25 clones. Isolated DNA molecules of the present invention are free of other genes with which they are ordinarily associated, but may include naturally occurring 5' and 3' untranslated regions such as promoters and terminators. The identification of associated regions will be evident to one of ordinary skill in the art (see for example, Dynan and Tijan, *Nature* 316:774-78, 1985).

An "isolated" polypeptide or protein is a polypeptide or protein that is
30 found in a condition other than its native environment, such as apart from blood and

WO 02/44209

PCT/US01/44808

15

animal tissue. In a preferred form, the isolated polypeptide is substantially free of other polypeptides, particularly other polypeptides of animal origin. It is preferred to provide the polypeptides in a highly purified form, i.e. greater than 95% pure, more preferably greater than 99% pure. When used in this context, the term "isolated" does not exclude
5 the presence of the same polypeptide in alternative physical forms, such as dimers, multimers, or alternatively glycosylated or derivatized forms.

The term "operably linked", when referring to DNA segments, indicates that the segments are arranged so that they function in concert for their intended purposes, e.g., transcription initiates in the promoter and proceeds through the coding
10 segment to the terminator.

The term "ortholog" denotes a polypeptide or protein obtained from one species that is the functional counterpart of a polypeptide or protein from a different species. Sequence differences among orthologs are the result of speciation.

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

A "polynucleotide" is a single- or double-stranded polymer of deoxyribonucleotide or ribonucleotide bases read from the 5' to the 3' end. Polynucleotides include RNA and DNA, and may be isolated from natural sources,
20 synthesized *in vitro*, or prepared from a combination of natural and synthetic molecules. Sizes of polynucleotides are expressed as base pairs (abbreviated "bp"), nucleotides ("nt"), or kilobases ("kb"). Where the context allows, the latter two terms may describe polynucleotides that are single-stranded or double-stranded. When the term is applied to double-stranded molecules it is used to denote overall length and will be understood
25 to be equivalent to the term "base pairs". It will be recognized by those skilled in the art that the two strands of a double-stranded polynucleotide may differ slightly in length and that the ends thereof may be staggered as a result of enzymatic cleavage; thus all nucleotides within a double-stranded polynucleotide molecule may not be paired.

A "polypeptide" is a polymer of amino acid residues joined by peptide
30 bonds, whether produced naturally or synthetically. Polypeptides of less than about 10 amino acid residues are commonly referred to as "peptides".

WO 02/44209

PCT/US01/44808

16

"Probes and/or primers" as used herein can be RNA or DNA. DNA can be either cDNA or genomic DNA. Polynucleotide probes and primers are single or double-stranded DNA or RNA, generally synthetic oligonucleotides, but may be generated from cloned cDNA or genomic sequences or its complements. Analytical probes will generally be at least 20 nucleotides in length, although somewhat shorter probes (14-17 nucleotides) can be used. PCR primers are at least 5 nucleotides in length, preferably 15 or more nt, more preferably 20-30 nt. Short polynucleotides can be used when a small region of the gene is targeted for analysis. For gross analysis of genes, a polynucleotide probe may comprise an entire exon or more. Probes can be labeled to provide a detectable signal, such as with an enzyme, biotin, a radionuclide, fluorophore, chemiluminescer, paramagnetic particle and the like, which are commercially available from many sources, such as Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, and Amersham Corp., Arlington Heights, IL, using techniques that are well known in the art.

The term "promoter" is used herein for its art-recognized meaning to denote a portion of a gene containing DNA sequences that provide for the binding of RNA polymerase and initiation of transcription. Promoter sequences are commonly, but not always, found in the 5' non-coding regions of genes.

A "protein" is a macromolecule comprising one or more polypeptide chains. A protein may also comprise non-peptidic components, such as carbohydrate groups. Carbohydrates and other non-peptidic substituents may be added to a protein by the cell in which the protein is produced, and will vary with the type of cell. Proteins are defined herein in terms of their amino acid backbone structures; substituents such as carbohydrate groups are generally not specified, but may be present nonetheless.

The term "receptor" is used herein to denote a cell-associated protein, or a polypeptide subunit of such a protein, that binds to a bioactive molecule (the "ligand") and mediates the effect of the ligand on the cell. Binding of ligand to receptor results in a conformational change in the receptor (and, in some cases, receptor multimerization, i.e., association of identical or different receptor subunits) that causes interactions between the effector domain(s) and other molecule(s) in the cell. These interactions in

turn lead to alterations in the metabolism of the cell. Metabolic events that are linked to receptor-ligand interactions include gene transcription, phosphorylation, dephosphorylation, cell proliferation, increases in cyclic AMP production, mobilization of cellular calcium, mobilization of membrane lipids, cell adhesion, hydrolysis of inositol lipids and hydrolysis of phospholipids. Cell-surface cytokine receptors are characterized by a multi-domain structure as discussed in more detail below. These receptors are anchored in the cell membrane by a transmembrane domain characterized by a sequence of hydrophobic amino acid residues (typically about 21-25 residues), which is commonly flanked by positively charged residues (Lys or Arg). In general, 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). The term "receptor polypeptide" is used to denote complete receptor polypeptide chains and portions thereof, including isolated functional domains (e.g., ligand-binding domains). The terms "ligand-binding domain(s)" and "cytokine-binding domain(s)" can be used interchangeably.

A "secretory signal sequence" is a DNA sequence that encodes a polypeptide (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 peptide is commonly cleaved to remove the secretory peptide during transit through the secretory pathway.

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. Soluble receptors can comprise additional amino acid residues, such as affinity tags that provide for purification of the polypeptide or provide sites for attachment of the polypeptide to a substrate, or immunoglobulin constant region sequences. Many cell-surface receptors have naturally occurring, soluble counterparts that are produced by proteolysis. Soluble 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.

The term "splice variant" is used herein to denote alternative forms of RNA transcribed from a gene. Splice variation arises naturally through use of alternative splicing sites within a transcribed RNA molecule, or less commonly between separately transcribed RNA molecules, and may result in several mRNAs transcribed from the same gene. Splice variants may encode polypeptides having altered amino acid sequence. The term splice variant is also used herein to denote a protein encoded by a splice variant of an mRNA transcribed from a gene.

Molecular weights and lengths of polymers determined by imprecise analytical methods (e.g., gel electrophoresis) will be understood to be approximate values. When such a value is expressed as "about" X or "approximately" X, the stated value of X will be understood to be accurate to $\pm 10\%$.

All references cited herein are incorporated by reference in their entirety.

Cytokine receptor subunits are characterized by a multi-domain structure comprising a ligand-binding domain and an effector domain that is typically involved in signal transduction. Multimeric cytokine receptors include homodimers (e.g., PDGF receptor $\alpha\alpha$ and $\beta\beta$ isoforms, erythropoietin receptor, MPL (thrombopoietin receptor), and G-CSF receptor); heterodimers whose subunits each have ligand-binding and effector domains (e.g., PDGF receptor $\alpha\beta$ isoform); and multimers having component subunits with disparate functions (e.g., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, and GM-CSF receptors). Some receptor subunits are common to a plurality of receptors. For example, the AIC2B subunit, which cannot bind ligand on its own but includes an intracellular signal transduction domain, is a component of IL-3 and GM-CSF receptors. Many cytokine receptors can be placed into one of four related families on the basis of their structures and functions. Class I hematopoietic receptors, for example, are characterized by the presence of a domain containing conserved cysteine residues and the WSXWS motif (SEQ ID NO:5). Additional domains, including protein kinase domains; fibronectin type III domains; and immunoglobulin domains, which are characterized by disulfide-bonded loops, are present in certain hematopoietic receptors. Cytokine receptor structure has been reviewed by Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26:221-228, 1991 and Cosman, Cytokine 5:95-106, 1993. It is generally believed that

under selective pressure for organisms to acquire new biological functions, new receptor family members arose from duplication of existing receptor genes leading to the existence of multi-gene families. Family members thus contain vestiges of the ancestral gene, and these characteristic features can be exploited in the isolation and
5 identification of additional family members.

Cell-surface cytokine receptors are further characterized by the presence of additional domains. These receptors are anchored in the cell membrane by a transmembrane domain characterized by a sequence of hydrophobic amino acid residues (typically about 21-25 residues), which is commonly flanked by positively
10 charged residues (Lys or Arg). On the opposite end of the protein from the extracellular domain and separated from it by the transmembrane domain is an intracellular domain.

The Zcytor19 receptor of the present invention is a class II cytokine receptor. These receptors usually bind to four-helix-bundle cytokines. Interleukin-10 and the interferons have receptors in this class (e.g., interferon-gamma, alpha and beta
15 chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains). Class II cytokine receptors are characterized by the presence of one or more cytokine receptor modules (CRM) in their extracellular domains. Other class II cytokine receptors include zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4 (Genbank Accession No. Z17227), IL-10R (Genbank Accession No.s U00672 and NM_001558), DIRS1,
20 zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511), zcytor16, tissue factor, and the like. The CRMs of class II cytokine receptors are somewhat different than the better-known CRMs of class I cytokine receptors. While the class II CRMs contain two type-III fibronectin-like domains, they differ in organization.

Zcytor19, like all known class II receptors except interferon-alpha/beta
25 receptor alpha chain, has only a single class II CRM in its extracellular domain. Zcytor19 is a receptor for a helical cytokine of the interferon/IL-10 class. As was stated above, Zcytor19 is similar to other Class II cytokine receptors such as zcytor11 and zcytor16. Analysis of a human cDNA clone encoding Zcytor19 (SEQ ID NO:1) revealed an open reading frame encoding 491 amino acids (SEQ ID NO:2) comprising
30 a secretory signal sequence (residues 1 (Met) to 20 (Gly) of SEQ ID NO:2) and a mature zcytor19 cytokine receptor polypeptide (residues 21 (Arg) to 491 (Arg) of SEQ ID

WO 02/44209

PCT/US01/44808

20

NO:2) an extracellular ligand-binding domain of approximately 206 amino acid residues (residues 21 (Arg) to 226 (Asn) of SEQ ID NO:2), a transmembrane domain of approximately 23 amino acid residues (residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2), and an intracellular domain of approximately 242 amino acid residues (residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2). Within the extracellular ligand-binding domain, there are two fibronectin type III domains and a linker region. The first fibronectin type III domain comprises residues 21 (Arg) to 119 (Tyr) of SEQ ID NO:2, the linker comprises residues 120 (Leu) to 124 (Glu) of SEQ ID NO:2, and the second fibronectin type III domain is short, and comprises residues 125 (Pro) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2. Thus, a polypeptide comprising amino acids 21 (Arg) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2 (SEQ ID NO:4) is considered a ligand binding fragment. In addition as typically conserved in class II receptors, there are conserved Tryptophan residues comprising residues 43 (Trp) and 68 (Trp) as shown in SEQ ID NO:2, and conserved Cysteine residues at positions 74, 82, 195, 217 of SEQ ID NO:2.

In addition, the present invention includes a variant of zcytor19 receptor that includes an approximately 30 amino acid insertion in the intracellular domain of the polypeptide (in reference to SEQ ID NO:2). Analysis of a human cDNA clone encoding Zcytor19 (SEQ ID NO:18) revealed an open reading frame encoding 520 amino acids (SEQ ID NO:19) comprising a secretory signal sequence (residues 1 (Met) to 20 (Gly) of SEQ ID NO:19) and a mature zcytor19 cytokine receptor polypeptide (residues 21 (Arg) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19) an extracellular ligand-binding domain of approximately 206 amino acid residues (residues 21 (Arg) to 226 (Asn) of SEQ ID NO:19), a transmembrane domain of approximately 23 amino acid residues (residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:19), and an intracellular domain of approximately 271 amino acid residues (residues 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19). Within the extracellular ligand-binding domain, there are two fibronectin type III domains and a linker region. The first fibronectin type III domain comprises residues 21 (Arg) to 119 (Tyr) of SEQ ID NO:19, the linker comprises residues 120 (Leu) to 124 (Glu) of SEQ ID NO:19, and the second fibronectin type III domain comprises residues 125 (Pro) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:19. Thus, a polypeptide comprising amino acids 21 (Arg) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:19 (SEQ ID NO:4) is

WO 02/44209

PCT/US01/44808

21

considered a ligand binding fragment. In addition as typically conserved in class II receptors, there are conserved Tryptophan residues comprising residues 43 (Trp) and 68 (Trp) as shown in SEQ ID NO:19, and conserved Cysteine residues at positions 74, 82, 195, 217 of SEQ ID NO:19.

Moreover, a truncated soluble form of the zcytor19 receptor polypeptide appears to be naturally expressed. Analysis of a human cDNA clone encoding the truncated soluble Zcytor19 (SEQ ID NO:20) revealed an open reading frame encoding 211 amino acids (SEQ ID NO:21) comprising a secretory signal sequence (residues 1 (Met) to 20 (Gly) of SEQ ID NO:21) and a mature truncated soluble zcytor19 receptor polypeptide (residues 21 (Arg) to 211 (Ser) of SEQ ID NO:21) a truncated extracellular ligand-binding domain of approximately 143 amino acid residues (residues 21 (Arg) to 163 (Trp) of SEQ ID NO:21), no transmembrane domain, but an additional domain of approximately 48 amino acid residues (residues 164 (Lys) to 211 (Ser) of SEQ ID NO:21). Within the truncated extracellular ligand-binding domain, there are two fibronectin type III domains and a linker region. The first fibronectin type III domain comprises residues 21 (Arg) to 119 (Tyr) of SEQ ID NO:21, the linker comprises residues 120 (Leu) to 124 (Glu) of SEQ ID NO:21, and the second fibronectin type III domain comprises residues 125 (Pro) to 163 (Trp) of SEQ ID NO:21. Thus, a polypeptide comprising amino acids 21 (Arg) to 163 (Trp) of SEQ ID NO:21 is considered a ligand binding fragment. In addition as typically conserved in class II receptors, there are conserved Tryptophan residues comprising residues 43 (Trp) and 68 (Trp) as shown in SEQ ID NO:21, and conserved Cysteine residues in this truncated soluble form of the zcytor19 receptor are at positions 74, and 82 of SEQ ID NO:21.

Moreover, the zcytor19 polypeptide of the present invention can be naturally expressed wherein the extracellular ligand binding domain comprises an additional 5-15 amino acid residues at the N-terminus of the mature polypeptide, or extracellular cytokine binding domain or cytokine binding fragment, as described above.

Those skilled in the art will recognize that these domain boundaries are approximate and are based on alignments with known proteins and predictions of protein folding. Deletion of residues from the ends of the domains is possible.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

22

Moreover the regions, domains and motifs described above in reference to SEQ ID NO:2 are also as shown in SEQ ID NO:1; domains and motifs described above in reference to SEQ ID NO:19 are also as shown in SEQ ID NO:18; and domains and motifs described above in reference to SEQ ID NO:21 are also as shown in SEQ ID NO:20.

The presence of transmembrane regions, and conserved and low variance motifs generally correlates with or defines important structural regions in proteins. Regions of low variance (e.g., hydrophobic clusters) are generally present in regions of structural importance (Sheppard, P. et al., Gene 150:163-167, 1994). Such regions of low variance often contain rare or infrequent amino acids, such as Tryptophan. The regions flanking and between such conserved and low variance motifs may be more variable, but are often functionally significant because they may relate to or define important structures and activities such as binding domains, biological and enzymatic activity, signal transduction, cell-cell interaction, tissue localization domains and the like.

The regions of conserved amino acid residues in zcytor19, described above, can be used as tools to identify new family members. For instance, reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) can be used to amplify sequences encoding the conserved regions from RNA obtained from a variety of tissue sources or cell lines. In particular, highly degenerate primers designed from the zcytor19 sequences are useful for this purpose. Designing and using such degenerate primers may be readily performed by one of skill in the art.

The present invention provides polynucleotide molecules, including DNA and RNA molecules that encode the zcytor19 polypeptides disclosed herein. Those skilled in the art will 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 DNA sequence that encompass all DNAs that encode the zcytor19 polypeptide of SEQ ID NO:2; SEQ ID NO:28 is a degenerate DNA sequence that encompass all DNAs that encode the zcytor19 polypeptide of SEQ ID NO:19; and SEQ ID NO:29 is a degenerate DNA sequence that encompass all DNAs that encode the zcytor19 polypeptide of SEQ ID NO:21. Those skilled in the art will

WO 02/44209

PCT/US01/44808

23

recognize that the degenerate sequences of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:28, and SEQ ID NO:29 also provide all RNA sequences encoding SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19, and SEQ ID NO:21 by substituting U for T. Thus, zcytor19 polypeptide-encoding polynucleotides comprising nucleotide 1 to nucleotide 1473 of SEQ ID NO:3, 1 to nucleotide 1560 of SEQ ID NO:28, 1 to nucleotide 633 of SEQ ID NO:29, and their RNA equivalents are contemplated by the present invention. Moreover, subfragments of these degenerate sequences such as the mature forms of the polypeptides, extracellular, cytokine binding domains, intracellular domains, and the like, as described herein are included in the present invention. One of skill in the art upon reference to SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 and SEQ ID NO:21 and the subfragments thereof described herein could readily determine the respective nucleotides in SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:28 or SEQ ID NO:29, that encode those subfragments. 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 02/44209

PCT/US01/44808

24

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.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

25

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

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 each 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 sequence of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19, and/or SEQ ID NO:21.

10 Variant sequences can be readily tested for functionality as described herein.

One of ordinary skill in the art will also appreciate that different species can exhibit "preferential codon usage." In general, see, Grantham, et al., Nuc. Acids Res. 8:1893-912, 1980; Haas, et al. Curr. Biol. 6:315-24, 1996; Wain-Hobson, et al., Gene 13:355-64, 1981; Grosjean and Fiers, Gene 18:199-209, 1982; Holm, Nuc. Acids Res. 14:3075-87, 1986; Ikemura, J. Mol. Biol. 158:573-97, 1982. 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 sequence disclosed in SEQ ID NO:3 serves as templates for optimizing expression of zcytor19 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.

Within preferred embodiments of the invention the isolated polynucleotides will hybridize to similar sized regions of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20, or a sequence complementary thereto, under stringent conditions. 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. 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 (e.g., >50 base pairs) is performed at temperatures of about 20-25°C below the calculated T_m . For smaller probes (e.g., <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. Higher degrees of stringency at lower temperatures can be achieved with the addition of formamide which reduces the T_m of the hybrid about 1°C for each 1% formamide in the buffer solution. Suitable stringent hybridization conditions are equivalent to about a 5 h to overnight incubation at about 42°C in a solution comprising: about 40-50% formamide, up to about 6X SSC, about 5X Denhardt's solution, zero up to about 10% dextran sulfate, and about 10-20 µg/ml denatured commercially-available carrier DNA. Generally, such stringent conditions include temperatures of 20-70°C and a hybridization buffer containing up to 6x SSC and 0-50% formamide; hybridization is then followed by washing filters in up to about

WO 02/44209

PCT/US01/44808

28

2X SSC. For example, a suitable wash stringency is equivalent to 0.1X SSC to 2X SSC, 0.1% SDS, at 55°C to 65°C. 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. Stringent hybridization and wash conditions depend on the length of the probe, reflected in the T_m , hybridization and wash solutions used, and are routinely determined empirically by one of skill in the art.

As previously noted, the isolated polynucleotides of the present invention include DNA and RNA. Methods for preparing DNA and RNA are well known in the art. In general, RNA is isolated from a tissue or cell that produces large amounts of zcytor19 RNA. Such tissues and cells are identified by Northern blotting (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:5201, 1980), and include PBLs, spleen, thymus, bone marrow, and lymph tissues, human erythroleukemia cell lines, acute monocytic leukemia cell lines, B-cell and T-cell leukemia tissue or cell lines, other lymphoid and hematopoietic cell lines, and the like. Total RNA can be prepared using guanidinium isothiocyanate extraction followed by isolation by centrifugation in a CsCl gradient (Chirgwin et al., Biochemistry 18:52-94, 1979). Poly (A)⁺ RNA is prepared from total RNA using the method of Aviv and Leder (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69:1408-12, 1972). Complementary DNA (cDNA) is prepared from poly(A)⁺ RNA using known methods. In the alternative, genomic DNA can be isolated. Polynucleotides encoding zcytor19 polypeptides are then identified and isolated by, for example, hybridization or polymerase chain reaction (PCR) (Mullis, U.S. Patent No. 4,683,202).

A full-length clone encoding zcytor19 can be obtained by conventional cloning procedures. Complementary DNA (cDNA) clones are preferred, although for some applications (e.g., expression in transgenic animals) it may be preferable to use a genomic clone, or to modify a cDNA clone to include at least one genomic intron. Methods for preparing cDNA and genomic clones are well known and within the level of ordinary skill in the art, and include the use of the sequence disclosed herein, or parts

WO 02/44209

PCT/US01/44808

29

thereof, for probing or priming a library. Expression libraries can be probed with antibodies to zcytor19, receptor fragments, or other specific binding partners.

The polynucleotides of the present invention can also be synthesized using DNA synthesis machines. Currently the method of choice is 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 polynucleotides (60 to 80 bp) is technically straightforward and can be accomplished by synthesizing the complementary strands and then annealing them. However, for producing longer polynucleotides (>300 bp), special strategies are usually employed, 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.

An alternative way to prepare a full-length gene is to synthesize a specified set of overlapping oligonucleotides (40 to 100 nucleotides). After the 3' and 5' short overlapping complementary regions (6 to 10 nucleotides) are annealed, large gaps still remain, but the short base-paired regions are both long enough and stable enough to hold the structure together. The gaps are filled and the DNA duplex is completed via enzymatic DNA synthesis by *E. coli* DNA polymerase I. After the enzymatic synthesis is completed, the nicks are sealed with T4 DNA ligase. Double-stranded constructs are sequentially linked to one another to form the entire gene sequence which is verified by DNA sequence analysis. See Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology, Principles & Applications of Recombinant DNA, (ASM Press, Washington, D.C. 1994); Itakura et al., Annu. Rev. Biochem. 53: 323-56, 1984 and Climie et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:633-7, 1990. Moreover, other sequences are generally added that contain signals for proper initiation and termination of transcription and translation.

The present invention further provides counterpart polypeptides and polynucleotides 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 zcytor19 polypeptides from other mammalian species, including murine, porcine, ovine, bovine, canine, feline, equine,

WO 02/44209

PCT/US01/44808

30

and other primate polypeptides. Orthologs of human zcytor19 can be cloned using information and compositions provided by the present invention in combination with conventional cloning techniques. For example, a cDNA can be cloned using mRNA obtained from a tissue or cell type that expresses zcytor19 as disclosed herein. Suitable
5 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 zcytor19-encoding cDNA can then 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
10 also be cloned using PCR (Mullis, supra), using primers designed from the representative human zcytor19 sequence disclosed herein. Within an additional method, the 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 zcytor19 polypeptide. Similar techniques can also be applied to the isolation of genomic clones.

15 Cytokine receptor subunits are characterized by a multi-domain structure comprising an extracellular domain, a transmembrane domain that anchors the polypeptide in the cell membrane, and an intracellular domain. The extracellular domain is typically a ligand-binding domain, and the intracellular domain is typically an effector domain involved in signal transduction, although ligand-binding and effector
20 functions may reside on separate subunits of a multimeric receptor. The ligand-binding domain may itself be a multi-domain structure. Multimeric receptors include homodimers (e.g., PDGF receptor $\alpha\alpha$ and $\beta\beta$ isoforms, erythropoietin receptor, MPL, and G-CSF receptor), heterodimers whose subunits each have ligand-binding and effector domains (e.g., PDGF receptor $\alpha\beta$ isoform), and multimers having component
25 subunits with disparate functions (e.g., IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, and GM-CSF receptors). Some receptor subunits are common to a plurality of receptors. For example, the AIC2B subunit, which cannot bind ligand on its own but includes an intracellular signal transduction domain, is a component of IL-3 and GM-CSF receptors. Many cytokine receptors can be placed into one of four related families on
30 the basis of the structure and function. Hematopoietic receptors, for example, are characterized by the presence of a domain containing conserved cysteine residues and

WO 02/44209

PCT/US01/44808

31

the WSXWS motif (SEQ ID NO:5). Cytokine receptor structure has been reviewed by Urdal, Ann. Reports Med. Chem. 26:221-228, 1991 and Cosman, Cytokine 5:95-106, 1993. Under selective pressure for organisms to acquire new biological functions, new receptor family members likely arise from duplication of existing receptor genes

5 leading to the existence of multi-gene families. Family members thus contain vestiges of the ancestral gene, and these characteristic features can be exploited in the isolation and identification of additional family members. Thus, the cytokine receptor superfamily is subdivided into several families, for example, the immunoglobulin family (including CSF-1, MGF, IL-1, and PDGF receptors); the hematopoietin family

10 (including IL-2 receptor β -subunit, GM-CSF receptor α -subunit, GM-CSF receptor β -subunit; and G-CSF, EPO, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, and IL-9 receptors); TNF receptor family (including TNF (p80) TNF (p60) receptors, CD27, CD30, CD40, Fas, and NGF receptor).

Analysis of the zcytor19 sequence suggests that it is a member of the

15 same receptor subfamily as the class II cytokine receptors, for example, interferon- γ , alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4 (Genbank Accession No. Z17227), DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors. Receptors in this subfamily may associate to form homodimers that

20 transduce a signal. Several members of the subfamily (e.g., receptors that bind interferon, IL-10, IL-19, and IL-TIF) combine with a second subunit (termed a β -subunit) to bind ligand and transduce a signal. Specific β -subunits associate with a plurality of specific cytokine receptor subunits. For example, with class II cytokine receptors commonly owned zcytor11 (US Patent No. 5,965,704) and CRF2-4 receptor

25 heterodimerize to bind the cytokine IL-TIF (See, WIPO publication WO 00/24758; Dumontier et al., J. Immunol. 164:1814-1819, 2000; Spencer, SD et al., J. Exp. Med. 187:571-578, 1998; Gibbs, VC and 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

30 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:

WO 02/44209

PCT/US01/44808

32

1821-1829, 1994 (IL-10R cDNA). As such, class II receptor complexes can be heterodimeric, or multimeric. Thus, monomeric, homodimeric, heterodimeric and multimeric receptors comprising a zcytor19 subunit are encompassed by the present invention.

5 Those skilled in the art will recognize that the sequence disclosed in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20 represents one allele of human zcytor19 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 DNA
10 sequence shown in SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20 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 SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21. cDNAs generated from alternatively spliced mRNAs, which retain the properties of the zcytor19 polypeptide
15 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 genomic libraries from different individuals or tissues according to standard procedures known in the art.

The present invention also provides isolated zcytor19 polypeptides that
20 are substantially similar to the polypeptides of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 and their orthologs. The term "substantially similar" is used herein to denote polypeptides having at least 70%, more preferably at least 80%, sequence identity to the sequences shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 or their orthologs. Such polypeptides will more preferably be at least 90% identical, and most
25 preferably 95% or more identical to SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 or its orthologs.) Percent sequence identity is determined by conventional methods. See, for example, Altschul et al., *Bull. Math. Bio.* 48: 603-616, 1986 and Henikoff and Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915-10919, 1992. Briefly, two amino acid sequences are aligned to optimize the alignment scores using a gap opening penalty of
30 10, a gap extension penalty of 1, and the "blosum 62" scoring matrix of Henikoff and

WO 02/44209

PCT/US01/44808

33

Henikoff (ibid.) as shown in Table 3 (amino acids are indicated by the standard one-letter codes). The percent identity is then calculated as:

$$5 \quad \frac{\text{Total number of identical matches}}{[\text{length of the longer sequence plus the number of gaps introduced into the longer sequence in order to align the two sequences}]} \times 100$$

Table 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 -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
 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

WO 02/44209

PCT/US01/44808

33

Sequence identity of polynucleotide molecules is determined by similar methods using a ratio as disclosed above.

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 variant zcytor19. 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, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21) 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. Preferred parameters for FASTA analysis are: ktup=1, gap opening penalty=10, gap extension penalty=1, and substitution matrix=BLOSUM62, with other parameters set as default. 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 FASTA program parameters set as default.

The BLOSUM62 table (Table 3) 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 below), 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).

Variant zcytor19 polypeptides or substantially homologous zcytor19 polypeptides are characterized as having one or more amino acid substitutions, deletions or additions. These changes are preferably of a minor nature, that is conservative amino acid substitutions (see Table 4) and other substitutions that do not significantly affect the folding or activity of the polypeptide; small deletions, typically of one to about 30 amino acids; and small amino- or carboxyl-terminal extensions, such as an amino-terminal methionine residue, a small linker peptide of up to about 20-25 residues, or an affinity tag. The present invention thus includes polypeptides that comprise a sequence that is at least 80%, preferably at least 90%, and more preferably 95% or more identical to the corresponding region of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21, excluding the tags, extension, linker sequences and the like. Polypeptides comprising affinity tags can further comprise a proteolytic cleavage site between the zcytor19 polypeptide and the affinity tag. Suitable sites include thrombin cleavage sites and factor Xa cleavage sites.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

37

Table 4

Conservative amino acid substitutions

5	Basic:	arginine
		lysine
		histidine
	Acidic:	glutamic acid
		aspartic acid
10	Polar:	glutamine
		asparagine
	Hydrophobic:	leucine
		isoleucine
15		valine
	Aromatic:	phenylalanine
		tryptophan
		tyrosine
	Small:	glycine
20		alanine
		serine
		threonine
		methionine
25	The present invention further provides a variety of other polypeptide fusions and related multimeric proteins comprising one or more polypeptide fusions. For example, a zcytor19 polypeptide can be prepared as a fusion to a dimerizing protein as disclosed in U.S. Patents Nos. 5,155,027 and 5,567,584. Preferred dimerizing proteins in this regard include immunoglobulin constant region domains.	
30	Immunoglobulin-zcytor19 polypeptide fusions can be expressed in genetically engineered cells to produce a variety of multimeric zcytor19 analogs. Auxiliary domains can be fused to zcytor19 polypeptides to target them to specific cells, tissues, or macromolecules (e.g., collagen). A zcytor19 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.

The proteins of the present invention can also comprise non-naturally occurring amino acid residues. Non-naturally occurring amino acids include, without limitation, *trans*-3-methylproline, 2,4-methanoproline, *cis*-4-hydroxyproline, *trans*-4-hydroxyproline, *N*-methylglycine, *allo*-threonine, methylthreonine, hydroxyethylcysteine, hydroxyethylhomocysteine, nitroglutamine, homoglutamine, pipercolic acid, thiazolidine carboxylic acid, dehydropyrolidine, 3- and 4-methylproline, 3,3-dimethylproline, *tert*-leucine, norvaline, 2-azaphenylalanine, 3-azaphenylalanine, 4-azaphenylalanine, and 4-fluorophenylalanine. Several methods are known in the art for incorporating non-naturally occurring amino acid residues into proteins. For example, an *in vitro* system can be employed wherein nonsense mutations are suppressed using chemically aminoacylated suppressor tRNAs. Methods for synthesizing amino acids and aminoacylating tRNA are known in the art. Transcription and translation of plasmids containing nonsense mutations is 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 259:806-9, 1993; and Chung et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:10145-9, 1993). 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. 271:19991-8, 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. 33:7470-7476, 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.* 2:395-403, 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 zcytor19 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: 1081-5, 1989; Bass et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4498-502, 1991). 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 (e.g. ligand binding and signal transduction) as disclosed below to identify amino acid residues that are critical to the activity of the molecule. See also, Hilton et al., *J. Biol. Chem.* 271:4699-4708, 1996. Sites of ligand-receptor, protein-protein or other biological interaction 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 example, de Vos et al., *Science* 255:306-312, 1992; Smith et al., *J. Mol. Biol.* 224:899-904, 1992; Wlodaver et al., *FEBS Lett.* 309:59-64, 1992. The identities of essential amino acids can also be inferred from analysis of homologies with related receptors.

Determination of amino acid residues that are within regions or domains that are critical to maintaining structural integrity can be determined. Within these regions one can determine specific residues that will be more or less tolerant of change and maintain the overall tertiary structure of the molecule. Methods for analyzing sequence structure include, but are not limited to, alignment of multiple sequences with high amino acid or nucleotide identity and computer analysis using available software (e.g., the Insight II® viewer and homology modeling tools; MSI, San Diego, CA), secondary structure propensities, binary patterns, complementary packing and buried polar interactions (Barton, *Current Opin. Struct. Biol.* 5:372-376, 1995 and Cordes et al., *Current Opin. Struct. Biol.* 6:3-10, 1996). In general, when designing modifications

to molecules or identifying specific fragments determination of structure will be accompanied by evaluating activity of modified molecules.

Amino acid sequence changes are made in zcytor19 polypeptides so as to minimize disruption of higher order structure essential to biological activity. For example, when the zcytor19 polypeptide comprises one or more structural domains, such as Fibronectin Type III domains, changes in amino acid residues will be made so as not to disrupt the domain structure and geometry and other components of the molecule where changes in conformation ablate some critical function, for example, binding of the molecule to its binding partners. The effects of amino acid sequence changes can be predicted by, for example, computer modeling as disclosed above or determined by analysis of crystal structure (see, e.g., Lapthorn et al., Nat. Struct. Biol. 2:266-268, 1995). Other techniques that are well known in the art compare folding of a variant protein to a standard molecule (e.g., the native protein). For example, comparison of the cysteine pattern in a variant and standard molecules can be made. Mass spectrometry and chemical modification using reduction and alkylation provide methods for determining cysteine residues which are associated with disulfide bonds or are free of such associations (Bean et al., Anal. Biochem. 201:216-226, 1992; Gray, Protein Sci. 2:1732-1748, 1993; and Patterson et al., Anal. Chem. 66:3727-3732, 1994). It is generally believed that if a modified molecule does not have the same disulfide bonding pattern as the standard molecule folding would be affected. Another well known and accepted method for measuring folding is circular dichroism (CD). Measuring and comparing the CD spectra generated by a modified molecule and standard molecule is routine (Johnson, Proteins 7:205-214, 1990). Crystallography is another well known method for analyzing folding and structure. Nuclear magnetic resonance (NMR), digestive peptide mapping and epitope mapping are also known methods for analyzing folding and structural similarities between proteins and polypeptides (Schaanan et al., Science 257:961-964, 1992).

A Hopp/Woods hydrophilicity profile of the zcytor19 protein sequence as shown in SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 can be generated (Hopp et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 78:3824-3828, 1981; Hopp, J. Immun. Meth. 88:1-18, 1986 and Triquier et al., Protein Engineering 11:153-169, 1998). The profile is based on a

sliding six-residue window. Buried G, S, and T residues and exposed H, Y, and W residues were ignored. For example, in zcytor19, hydrophilic regions include amino acid residues 295 through 300 of SEQ ID NO:2; 451 through 456 of SEQ ID NO:2; 301 through 306 of SEQ ID NO:2; 244 through 299 of SEQ ID NO:2; and 65 through 70 of SEQ ID NO:2. Moreover, one of skill in the art would recognize that zcytor19 hydrophilic regions including antigenic epitope-bearing polypeptides can be predicted by a Jameson-Wolf plot, e.g., using DNASTAR Protean program (DNASTAR, Inc., Madison, WI).

Those skilled in the art will recognize that hydrophilicity or hydrophobicity will be taken into account when designing modifications in the amino acid sequence of a zcytor19 polypeptide, so as not to disrupt the overall structural and biological profile. Of particular interest for replacement are hydrophobic residues selected from the group consisting of Val, Leu and Ile or the group consisting of Met, Gly, Ser, Ala, Tyr and Trp. For example, residues tolerant of substitution could include such residues as shown in SEQ ID NO:2. However, Cysteine residues at positions 74, 82, 195, and 217 of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19, and corresponding Cys residues in SEQ ID NO:4 are relatively intolerant of substitution. Moreover, Cysteine residues at positions 74, 82, of SEQ ID NO:21 are relatively intolerant of substitution.

The identities of essential amino acids can also be inferred from analysis of sequence similarity between class II cytokine receptor family members with zcytor19. Using methods such as "FASTA" analysis described previously, regions of high similarity are identified within a family of proteins and used to analyze amino acid sequence for conserved regions. An alternative approach to identifying a variant zcytor19 polynucleotide on the basis of structure is to determine whether a nucleic acid molecule encoding a potential variant zcytor19 polynucleotide can hybridize to a nucleic acid molecule having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20 as discussed above.

Other methods of identifying essential amino acids in the polypeptides of the present invention are 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. Natl 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 as disclosed below to
5 identify amino acid residues that are critical to the activity of the molecule. Such mutagenesis and screening methods are routine in the art. See also, Hilton *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:4699 (1996).

The present invention also includes functional fragments of zcytor19 polypeptides and nucleic acid molecules encoding such functional fragments. A
10 "functional" zcytor19 or fragment thereof defined herein is characterized by its proliferative or differentiating activity, by its ability to induce or inhibit specialized cell functions, or by its ability to bind specifically to an anti-zcytor19 antibody or zcytor19 ligand (either soluble or immobilized). Moreover, functional fragments also include the signal peptide, intracellular signaling domain, and the like. As previously described
15 herein, zcytor19 is characterized by a class II cytokine receptor structure. Thus, the present invention further provides fusion proteins encompassing: (a) polypeptide molecules comprising an extracellular domain, cytokine-binding domain, or intracellular domain described herein; and (b) functional fragments comprising one or more of these domains. The other polypeptide portion of the fusion protein may be
20 contributed by another class II cytokine receptor, for example, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511), and the like, or by a non-native and/or an unrelated secretory signal peptide that facilitates secretion of the fusion protein.

Routine deletion analyses of nucleic acid molecules can be performed to
25 obtain functional fragments of a nucleic acid molecule that encodes a zcytor19 polypeptide. As an illustration, DNA molecules having the nucleotide sequence of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20 or fragments thereof, can be digested with *Bal31* nuclease to obtain a series of nested deletions. These DNA fragments are
30 then inserted into expression vectors in proper reading frame, and the expressed polypeptides are isolated and tested for zcytor19 activity, or for the ability to bind anti-

zcyc19 antibodies or zcyc19 ligand. One alternative to exonuclease digestion is to use oligonucleotide-directed mutagenesis to introduce deletions or stop codons to specify production of a desired zcyc19 fragment. Alternatively, particular fragments of a zcyc19 polynucleotide can be synthesized using the polymerase chain reaction.

5 Standard methods for identifying functional domains are well-known to those of skill in the art. For example, 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
10 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 1, Boynton et al., (eds.) pages 169-199 (Academic Press 1985); Courmilleau et al., J. Biol. Chem. 270:29270 (1995); Fukunaga et al., J. Biol. Chem. 270:25291 (1995); Yamaguchi et al.,
15 Biochem. Pharmacol. 50:1295 (1995); and Meisel et al., Plant Molec. Biol. 30:1 (1996).

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 241:53-57, 1988) or Bowie and Sauer (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2152-2156, 1989). Briefly, these authors disclose methods for simultaneously
20 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. 30:10832-10837, 1991; Ladner et al., U.S. Patent No. 5,223,409; Huse, WIPO Publication WO 92/062045) and region-
25 directed mutagenesis (Derbyshire et al., Gene 46:145, 1986; Ner et al., DNA 7:127, 1988).

Variants of the disclosed zcyc19 DNA and polypeptide sequences can be generated through DNA shuffling as disclosed by Stemmer, Nature 370:389-91,
30 1994, Stemmer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:10747-51, 1994 and WIPO Publication WO 97/20078. Briefly, variant DNAs 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 DNAs, such as allelic variants or DNAs from different species, to introduce additional variability into the process. Selection or
5 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
10 zcytor19 receptor polypeptides in host cells. Preferred assays in this regard include cell proliferation assays and biosensor-based ligand-binding assays, which are described below. Mutagenized DNA molecules that encode active receptors or portions thereof (e.g., ligand-binding fragments, signaling domains, and the like) can be recovered from the host cells and rapidly sequenced using modern equipment. These methods allow
15 the routine and rapid determination of the importance of individual amino acid residues in a polypeptide of interest.

In addition, the proteins of the present invention (or polypeptide fragments thereof) can be joined to other bioactive molecules, particularly cytokine receptors, to provide multi-functional molecules. For example, one or more domains
20 from zcytor19 soluble receptor can be joined to other cytokine soluble receptors to enhance their biological properties or efficiency of production.

The present invention thus provides a series of novel, hybrid molecules in which a segment comprising one or more of the domains of zcytor19 is fused to another polypeptide. Fusion is preferably done by splicing at the DNA level to allow
25 expression of chimeric molecules in recombinant production systems. The resultant molecules are then assayed for such properties as improved solubility, improved stability, prolonged clearance half-life, improved expression and secretion levels, and pharmacodynamics. Such hybrid molecules may further comprise additional amino acid residues (e.g. a polypeptide linker) between the component proteins or
30 polypeptides.

Using the methods discussed herein, one of ordinary skill in the art can identify and/or prepare a variety of polypeptide fragments or variants of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19 that retain the signal transduction or ligand binding activity. For example, one can make a zcytor19 "soluble receptor" by preparing a variety of polypeptides that are substantially homologous to the extracellular cytokine-binding domain (residues 21 (Arg) to 226 (Asn) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19), a cytokine-binding fragment (e.g., residues 21 (Arg) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:4) or allelic variants or species orthologs thereof and retain ligand-binding activity of the wild-type zcytor19 protein. Moreover, variant zcytor19 soluble receptors can be isolated. Such polypeptides may include additional amino acids from, for example, part or all of the transmembrane and intracellular domains. Such polypeptides may also include additional polypeptide segments as generally disclosed herein such as labels, affinity tags, and the like.

For any zcytor19 polypeptide, including variants, soluble receptors, and fusion polypeptides or proteins, one of ordinary skill in the art can readily generate a fully degenerate polynucleotide sequence encoding that variant using the information set forth in Tables 1 and 2 above.

The zcytor19 polypeptides of the present invention, including full-length polypeptides, biologically active fragments, and fusion polypeptides, can be produced in genetically engineered host cells according to conventional techniques. Suitable host cells are those cell types that can be transformed or transfected with exogenous DNA and grown in culture, and include bacteria, fungal cells, and cultured higher eukaryotic cells. Eukaryotic cells, particularly cultured cells of multicellular organisms, are preferred. Techniques for manipulating cloned DNA molecules and introducing exogenous DNA into a variety of host cells are disclosed by Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989, and Ausubel et al., eds., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, Inc., NY, 1987.

In general, a DNA sequence encoding a zcytor19 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 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
5 of promoters, terminators, selectable markers, vectors and other elements is a matter of routine design within the level of ordinary skill in the art. Many such elements are described in the literature and are available through commercial suppliers.

To direct a zcytor19 polypeptide into the secretory pathway of a host
cell, a secretory signal sequence (also known as a leader sequence, prepro sequence or
10 pre sequence) is provided in the expression vector. The secretory signal sequence may be that of zcytor19, or may be derived from another secreted protein (e.g., t-PA) or synthesized *de novo*. The secretory signal sequence is operably linked to the zcytor19 DNA sequence, i.e., the two sequences are joined in the correct reading frame and positioned to direct the newly synthesized polypeptide into the secretory pathway of the
15 host cell. Secretory signal sequences are commonly positioned 5' to the DNA sequence encoding the polypeptide of interest, although certain secretory signal sequences may be positioned elsewhere in the DNA 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).

Alternatively, the secretory signal sequence contained in the
20 polypeptides of the present invention is used to direct other polypeptides into the secretory pathway. The present invention provides for such fusion polypeptides. A signal fusion polypeptide can be made wherein a secretory signal sequence derived from amino acid 1 (Met) to amino acid 20 (Gly) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19 is operably linked to another polypeptide using methods known in the art and disclosed
25 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 a polypeptide fragment or an active
30 component of a normally non-secreted protein. Such fusions may be used *in vivo* or *in vitro* to direct peptides through the secretory pathway. Moreover, such fusion

constructs allow for the expression, secretion, and purification of zcytor19 polypeptide fragments that can be used to inoculate an animal and generate antibodies, as described herein.

5 Cultured mammalian cells are suitable hosts within the present invention. Methods for introducing exogenous DNA into mammalian host cells include calcium phosphate-mediated transfection (Wigler et al., Cell 14:725, 1978; Corsaro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7:603, 1981; Graham and Van der Eb, Virology 52:456, 1973), electroporation (Neumann et al., EMBO J. 1:841-845, 1982), DEAE-dextran mediated transfection (Ausubel et al., ibid.), and liposome-mediated transfection 10 (Hawley-Nelson et al., Focus 15:73, 1993; Ciccarone et al., Focus 15:80, 1993, and viral vectors (Miller and Rosman, BioTechniques 7:980-90, 1989; Wang and Finer, Nature Med. 2:714-716, 1996). The production of recombinant polypeptides in cultured mammalian cells is disclosed, for example, by Levinson et al., U.S. Patent No. 4,713,339; Hagen et al., U.S. Patent No. 4,784,950; Palmiter et al., U.S. Patent No. 15 4,579,821; and Ringold, U.S. Patent No. 4,656,134. Suitable cultured mammalian cells include the COS-1 (ATCC No. CRL 1650), COS-7 (ATCC No. CRL 1651), BHK (ATCC No. CRL 1632), BHK 570 (ATCC No. CRL 10314), 293 (ATCC No. CRL 1573; Graham et al., J. Gen. Virol. 36:59-72, 1977) and Chinese hamster ovary (e.g. CHO-K1; ATCC No. CCL 61) cell lines. Additional suitable cell lines are known in 20 the art and available from public depositories such as the American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland. In general, strong transcription promoters are preferred, such as promoters from SV-40 or cytomegalovirus. See, e.g., U.S. Patent No. 4,956,288. Other suitable promoters include those from metallothionein genes (U.S. Patent Nos. 4,579,821 and 4,601,978) and the adenovirus major late promoter.

25 Drug selection is generally used to select for cultured mammalian cells into which foreign DNA has been inserted. Such cells are commonly referred to as "transfectants". Cells that have been cultured in the presence of the selective agent and are able to pass the gene of interest to their progeny are referred to as "stable transfectants." A preferred selectable marker is a gene encoding resistance to the 30 antibiotic neomycin. 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 selective agent to select for cells that produce high levels of the products of the introduced genes. A preferred amplifiable selectable
 5 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. Alternative markers that introduce an altered phenotype, such as green fluorescent protein, or cell surface proteins such as CD4, CD8, Class I MHC, placental alkaline phosphatase may be used to sort transfected cells
 10 from untransfected cells by such means as FACS sorting or magnetic bead separation technology.

Other higher eukaryotic cells can also be used as hosts, including plant cells, insect cells and avian cells. The use of *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for expressing genes in plant cells has been reviewed by Sinkar et al., J. Biosci. (Bangalore)
 15 11:47-58, 1987. Transformation of insect cells and production of foreign polypeptides therein is disclosed by Guarino et al., U.S. Patent No. 5,162,222 and WIPO publication WO 94/06463. Insect cells can be infected with recombinant baculovirus, commonly derived from *Autographa californica nuclear polyhedrosis virus* (AcNPV). See, King, L.A. and Possee, R.D., The Baculovirus Expression System: A Laboratory Guide,
 20 London, Chapman & Hall; O'Reilly, D.R. et al., Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York, Oxford University Press., 1994; and, Richardson, C. D., Ed., Baculovirus Expression Protocols. Methods in Molecular Biology, Totowa, NJ, Humana Press, 1995. A second method of making recombinant zcytor19 baculovirus utilizes a transposon-based system described by Luckow (Luckow, V.A., et al., J Virol
 25 67:4566-79, 1993). This system, which utilizes transfer vectors, is sold in the Bac-to-Bac™ kit (Life Technologies, Rockville, MD). This system utilizes a transfer vector, pFastBac1™ (Life Technologies) containing a Tn7 transposon to move the DNA encoding the zcytor19 polypeptide into a baculovirus genome maintained in *E. coli* as a large plasmid called a "bacmid." See, Hill-Perkins, M.S. and Possee, R.D., J Gen Virol
 30 71:971-6, 1990; Bonning, B.C. et al., J Gen Virol 75:1551-6, 1994; and, Chazenbalk, G.D., and Rapoport, B., J Biol Chem 270:1543-9, 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 zcytor19 polypeptide, for example, a Glu-Glu epitope tag (Grussenmeyer, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 82:7952-4, 1985). Using a technique known in the art, a transfer vector containing zcytor19 is transformed into *E. coli*, and

5 screened for bacmids which contain an interrupted lacZ gene indicative of recombinant baculovirus. The bacmid DNA containing the recombinant baculovirus genome is isolated, using common techniques, and used to transfect *Spodoptera frugiperda* cells, e.g. Sf9 cells. Recombinant virus that expresses zcytor19 is subsequently produced. Recombinant viral stocks are made by methods commonly used in the art.

10 The recombinant virus is used to infect host cells, typically a cell line derived from the fall armyworm, *Spodoptera frugiperda*. See, in general, Glick and Pasternak, Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA, ASM Press, Washington, D.C., 1994. Another suitable cell line is the High FiveTM cell line (Invitrogen) derived from *Trichoplusia ni* (U.S. Patent No.

15 5,300,435). Commercially available serum-free media are used to grow and maintain the cells. Suitable media are Sf900 IITM (Life Technologies) or ESF 921TM (Expression Systems) for the Sf9 cells; and Ex-cellTM (JRH Biosciences, Lenexa, KS) or Express FiveTM (Life Technologies) for the *T. ni* cells. Procedures used are generally described in available laboratory manuals (King, L. A. and Possee, R.D., ibid.; O'Reilly, D.R. et al., ibid.; Richardson, C. D., ibid.). Subsequent purification of the zcytor19 polypeptide from the supernatant can be achieved using methods described herein.

20

Fungal cells, including yeast cells, can also be used within the present invention. Yeast species of particular interest in this regard include *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, and *Pichia methanolica*. Methods for transforming *S.*

25 *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,

30 commonly drug resistance or the ability to grow in the absence of a particular nutrient (e.g., leucine). A preferred 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. 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.* 132:3459-3465, 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.

The use of *Pichia methanolica* as host for the production of recombinant proteins is disclosed in WIPO Publications 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*, it is preferred that the promoter and terminator in the plasmid 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 preferred selectable marker for use in *Pichia methanolica* is a *P. methanolica ADE2* gene, which encodes phosphoribosyl-5-aminoimidazole carboxylase (AIRC; EC 4.1.1.21), 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, it is preferred to use host cells in which both methanol utilization genes (*AUG1* and *AUG2*) are deleted. For production

of secreted proteins, host cells deficient in vacuolar protease genes (*PEP4* and *PRB1*) are preferred. Electroporation is used to facilitate the introduction of a plasmid containing DNA encoding a polypeptide of interest into *P. methanolicus* cells. It is preferred to transform *P. methanolicus* cells by electroporation using an exponentially
5 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 (τ) of from 1 to 40 milliseconds, most preferably about 20 milliseconds.

Prokaryotic host cells, including strains of the bacteria *Escherichia coli*, *Bacillus* and other genera are also useful host cells within the present invention.
10 Techniques for transforming these hosts and expressing foreign DNA sequences cloned therein are well known in the art (see, e.g., Sambrook et al., *ibid.*). When expressing a zcytor19 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
15 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
20 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.

Transformed or transfected host cells are cultured according to conventional procedures in a culture medium containing nutrients and other
25 components required for the growth of the chosen host cells. A variety of suitable media, including defined media and complex media, are known in the art and generally include a carbon source, a nitrogen source, essential amino acids, vitamins and minerals. Media may also contain such components as growth factors or serum, as required. The growth medium will generally select for cells containing the exogenously
30 added DNA by, for example, drug selection or deficiency in an essential nutrient which is complemented by the selectable marker carried on the expression vector or co-

transfected into the host cell. *P. methanolic*a cells are cultured in a medium comprising adequate sources of carbon, nitrogen and trace nutrients at a temperature of about 25°C to 35°C. Liquid cultures are provided with sufficient aeration by conventional means, such as shaking of small flasks or sparging of fermentors. A preferred culture medium
5 for *P. methanolic*a is YEPD (2% D-glucose, 2% Bacto™ Peptone (Difco Laboratories, Detroit, MI), 1% Bacto™ yeast extract (Difco Laboratories), 0.004% adenine and 0.006% L-leucine).

Within one aspect of the present invention, a zcytor19 cytokine receptor (including transmembrane and intracellular domains) is produced by a cultured cell, and
10 the cell is used to screen for ligands for the receptor, including the natural ligand, 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
15 are selected and used within a variety of screening systems.

Mammalian cells suitable for use in expressing the novel receptors of the present invention and transducing a receptor-mediated signal include cells that express a β -subunit, such as a class II cytokine receptor subunit, for example, interferon- γ , alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta
20 chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors. Such subunits can either naturally be expressed in the cells, or be co-transfected with zcytor19 receptor. An exemplary cell system for class I cytokine receptors is to use cells that express gp130, and cells that co-express gp130 and LIF receptor (Gearing et al., EMBO J.
25 10:2839-2848, 1991; Gearing et al., U.S. Patent No. 5,284,755). In this regard it is generally preferred to employ a cell that is responsive to other cytokines that bind to receptors in the same subfamily, such as IL-6 or LIF, because such cells will contain the requisite signal transduction pathway(s). Preferred cells of this type include BaF3 cells (Palacios and Steinmetz, Cell 41: 727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol.
30 6: 4133-4135, 1986), the human TF-1 cell line (ATCC number CRL-2003) and the DA-1 cell line (Branch et al., Blood 69:1782, 1987; Broudy et al., Blood 75:1622-1626,

1990). In the alternative, suitable host cells can be engineered to produce a β -subunit or other cellular component needed for the desired cellular response. For example, the murine cell line BaF3 (Palacios and Steinmetz, Cell 41:727-734, 1985; Mathey-Prevot et al., Mol. Cell. Biol. 6: 4133-4135, 1986), a baby hamster kidney (BHK) cell line, or the CTLL-2 cell line (ATCC TIB-214) can be transfected to express individual class II subunits such as, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors in addition to zcytor19. It is generally preferred to use a host cell and receptor(s) from the same species, however this approach allows cell lines to be engineered to express multiple receptor subunits from any species, thereby overcoming potential limitations arising from species specificity. In the alternative, species homologs 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 IL-3, can thus be engineered to become dependent upon a zcytor19 ligand or anti-zcytor19 antibody.

Cells expressing functional zcytor19 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 the 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 reduction or metabolic breakdown of Alamar BlueTM (AccuMed, Chicago, IL) or 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, e.g. JAK/STAT pathway, and the assay detects activation of transcription of the reporter gene. A preferred promoter element in this regard is a serum response element, SRE (see, for example, 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. 269:19094-29101, 1994; Schenborn and Goiffin, Promega Notes 41:11, 1993). Luciferase 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- or tissue-conditioned media samples can be assayed on a target cell to identify cells that produce ligand. Positive cells are then used to produce a cDNA library in a mammalian cell 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, retransfection, subculturing, and re-assay of positive cells to isolate a clonal cell line expressing the ligand. Alternatively, media samples from the transfected cells can be assayed, with subsequent division of pools, retransfection, and re-assay to isolate a bacterial clone expressing the ligand cDNA. Media samples conditioned by kidney, liver, spleen, thymus, other lymphoid tissues, B-cells, T-cells, or leukemia cell lines are preferred sources of ligand for use in screening procedures.

A natural ligand for zcytor19 can also be identified by mutagenizing a cytokine-dependent cell line expressing zcytor19 and culturing it under conditions that select for autocrine growth. See WIPO publication WO 95/21930. Within a typical procedure, cells expressing zcytor19 are mutagenized, such as with EMS. The cells are then allowed to recover in the presence of the required cytokine, then transferred to a culture medium lacking the cytokine. Surviving cells are screened for the production of a ligand for zcytor19, such as by adding soluble receptor polypeptide comprising the zcytor19 extracellular cytokine-binding domain, or cytokine-binding fragment described herein to the culture medium to compete against the ligand or by assaying conditioned media on wild-type cells compared to transfected cells expressing the zcytor19 receptor. Preferred cell lines for use within this method include cells that are transfected to express gp130 or gp130 in combination with LIF receptor. Preferred such host cell lines include transfected CTLL-2 cells (Gillis and Smith, Nature 268:154-156, 1977) and transfected BaF3 cells.

Moreover, a secretion trap method employing zcytor19 soluble receptor polypeptide can be used to isolate a zcytor19 ligand (Aldrich, et al, Cell 87: 1161-1169,

1996). A cDNA expression library prepared from a known or suspected ligand source is transfected into COS-7 cells. The cDNA library vector generally has an SV40 origin for amplification in COS-7 cells, and a CMV promoter for high expression. The transfected COS-7 cells are grown in a monolayer and then fixed and permeabilized.

5 Tagged or biotin-labeled zcytor19 soluble receptor, described herein, is then placed in contact with the cell layer and allowed to bind cells in the monolayer that express an anti-complementary molecule, i.e., a zcytor19 ligand. A cell expressing a ligand will thus be bound with receptor molecules. An anti-tag antibody (anti-Ig for Ig fusions, M2 or anti-FLAG for FLAG-tagged fusions, streptavidin, anti-Glu-Glu tag, and the like)

10 which is conjugated with horseradish peroxidase (HRP) is used to visualize these cells to which the tagged or biotin-labeled zcytor19 soluble receptor has bound. The HRP catalyzes deposition of a tyramide reagent, for example, tyramide-FTTC. A commercially-available kit can be used for this detection (for example, Renaissance TSA-Direct™ Kit; NEN Life Science Products, Boston, MA). Cells which express

15 zcytor19 receptor ligand will be identified under fluorescence microscopy as green cells and picked for subsequent cloning of the ligand using procedures for plasmid rescue as outlined in Aldrich, et al, supra, followed by subsequent rounds of secretion trap assay, or conventional screening of cDNA library pools, until single clones are identified.

As a receptor, the activity of zcytor19 polypeptide can be measured by a

20 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,

25 inflammatory response, regulatory and receptor activation, and the like, can be measured by this method. See, for example, McConnell, H.M. et al., Science 257:1906-1912, 1992; Pitchford, S. et al., Meth. Enzymol. 228:84-108, 1997; Arimilli, S. et al., J. Immunol. Meth. 212:49-59, 1998; Van Liefde, I. Et al., Eur. J. Pharmacol. 346:87-95, 1998. The microphysiometer can be used for assaying eukaryotic,

30 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 the zcytor19 polypeptide. Preferably, the microphysiometer is used to measure responses of a zcytor19-expressing eukaryotic cell, compared to a control eukaryotic cell that does not express zcytor19 polypeptide. Zcytor19-expressing eukaryotic cells comprise cells into which zcytor19 has been transfected or infected via adenovirus vector, and the like, as described herein, creating a cell that is responsive to zcytor19-modulating stimuli, or are cells naturally expressing zcytor19, such as zcytor19-expressing cells derived from lymphoid, spleen, thymus tissue or PBLs. Differences, measured by an increase or decrease in extracellular acidification, in the response of cells expressing zcytor19, relative to a control, are a direct measurement of zcytor19-modulated cellular responses. Moreover, such zcytor19-modulated responses can be assayed under a variety of stimuli. Also, using the microphysiometer, there is provided a method of identifying agonists and antagonists of zcytor19 polypeptide, comprising providing cells expressing a zcytor19 polypeptide, culturing a first portion of the cells in the absence of a test compound, culturing a second portion of the cells in the presence of a test compound, and detecting an increase or a decrease in a cellular response of the second portion of the cells as compared to the first portion of the cells. Antagonists and agonists, including the natural ligand for zcytor19 polypeptide, can be rapidly identified using this method.

Additional assays provided by the present invention include the use of hybrid receptor polypeptides. These hybrid polypeptides fall into two general classes. Within the first class, the intracellular domain of zcytor19, comprising approximately residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2 or residues 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19, 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 and assayed for a response. This system provides a means for analyzing signal transduction mediated by zcytor19 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 zcytor19. A second class of hybrid receptor polypeptides comprise the extracellular (ligand-binding) cytokine-binding domain (residues 21 (Arg) to 226 (Asn) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19), or cytokine-binding fragment (e.g., residues 21 (Arg) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:4) with a cytoplasmic domain of a second receptor, preferably a cytokine receptor, and a transmembrane domain. The transmembrane domain may be derived from either receptor. Hybrid 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 use of a broad spectrum of cell types within receptor-based assay systems.

Cells found to express a ligand for zcytor19 are then used to prepare a cDNA library from which the ligand-encoding cDNA may be isolated as disclosed above. The present invention thus provides, in addition to novel receptor polypeptides, methods for cloning polypeptide ligands for the receptors.

The zcytor19 structure and tissue expression suggests a role in early hematopoietic or thymocyte development and immune response regulation. These processes involve stimulation of cell proliferation and differentiation in response to the binding of one or more cytokines to their cognate receptors. In view of the tissue distribution observed for this receptor, agonists (including the natural ligand) and antagonists have enormous potential in both *in vitro* and *in vivo* applications. Compounds identified as receptor agonists are useful for stimulating proliferation and development of target cells *in vitro* and *in vivo*. For example, agonist compounds or anti-zcytor19 antibodies, are useful as components of defined cell culture media, and may be used alone or in combination with other cytokines and hormones to replace serum that is commonly used in cell culture. Agonists are thus useful in specifically promoting the growth and/or development of T-cells, B-cells, and other cells of the lymphoid and myeloid lineages, and hematopoietic cells in culture.

Agonist ligands for zcytor19, or anti-zcytor19 antibodies, may be useful in stimulating cell-mediated immunity and for stimulating lymphocyte proliferation, such as in the treatment of infections involving immunosuppression, including certain

viral infections. Additional uses include tumor suppression, where malignant transformation results in tumor cells that are antigenic. Agonist ligands or anti-zcytor19 antibodies could be used to induce cytotoxicity, which may be mediated through activation of effector cells such as T-cells, NK (natural killer) cells, or LAK (lymphoid activated killer) cells, or induced directly through apoptotic pathways. For example, zcytor19 antibodies could be used for stimulating cytotoxicity or ADCC on zcytor19-bearing cancer cells. Agonist ligands may also be useful in treating leukopenias by increasing the levels of the affected cell type, and for enhancing the regeneration of the T-cell repertoire after bone marrow transplantation.

Antagonist ligands, compounds, soluble zcytor19 receptors, or anti-zcytor19 antibodies may find utility in the suppression of the immune system, such as in the treatment of autoimmune diseases, including rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, diabetes mellitus, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, etc. Immune suppression can also be used to reduce rejection of tissue or organ transplants and grafts and to treat T-cell specific leukemias or lymphomas by inhibiting proliferation of the affected cell type.

The present invention contemplates the use of naked anti-zcytor19 antibodies (or naked antibody fragments thereof), as well as the use of immunoconjugates to effect treatment of various disorders, including B-cell malignancies and other cancers described herein wherein zcytor19 is expressed. Such immunoconjugates as well as anti-zcytor19 antibodies can be used for stimulating cytotoxicity or ADCC on zcytor19-bearing cancer cells. Immunoconjugates can be prepared using standard techniques. For example, immunoconjugates can be produced by indirectly conjugating a therapeutic agent to an antibody component (see, for example, Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 41:832-839 (1988); Shih *et al.*, *Int. J. Cancer* 46:1101-1106 (1990); and Shih *et al.*, U.S. patent No. 5,057,313). Briefly, one standard approach involves reacting an antibody component having an oxidized carbohydrate portion with a carrier polymer that has at least one free amine function and that is loaded with a plurality of drug, toxin, chelator, boron addends, or other therapeutic agent. This reaction results in an initial Schiff base (imine) linkage, which can be stabilized by reduction to a secondary amine to form the final conjugate.

The carrier polymer can be an aminodextran or polypeptide of at least 50 amino acid residues, although other substantially equivalent polymer carriers can also be used. Preferably, the final immunoconjugate is soluble in an aqueous solution, such

as mammalian serum, for ease of administration and effective targeting for use in therapy. Thus, solubilizing functions on the carrier polymer will enhance the serum solubility of the final immunoconjugate.

5 In an alternative approach for producing immunoconjugates comprising a polypeptide therapeutic agent, the therapeutic agent is coupled to aminodextran by glutaraldehyde, condensation or by reaction of activated carboxyl groups on the polypeptide with amines on the aminodextran. Chelators can be attached to an antibody component to prepare immunoconjugates comprising radiometals or magnetic resonance enhancers. Illustrative chelators include derivatives of
10 ethylenediaminetetraacetic acid and diethylenetriaminepentaacetic acid. Boron addends, such as carboranes, can be attached to antibody components by conventional methods.

Immunoconjugates can also be prepared by directly conjugating an antibody component with a therapeutic agent. The general procedure is analogous to the indirect method of conjugation except that a therapeutic agent is directly attached to
15 an oxidized antibody component.

As a further illustration, a therapeutic agent can be attached at the hinge region of a reduced antibody component via disulfide bond formation. For example, the tetanus toxoid peptides can be constructed with a single cysteine residue that is used
20 to attach the peptide to an antibody component. As an alternative, such peptides can be attached to the antibody component using a heterobifunctional cross-linker, such as *N*-succinyl 3-(2-pyridyldithio)propionate. Yu *et al.*, *Int. J. Cancer* 56:244 (1994). General techniques for such conjugation are well-known in the art. See, for example, Wong, *Chemistry Of Protein Conjugation And Cross-Linking* (CRC Press 1991);
25 Upeslakis *et al.*, "Modification of Antibodies by Chemical Methods," in *Monoclonal Antibodies: Principles And Applications*, Birch *et al.* (eds.), pages 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," in *Monoclonal Antibodies: Production, Engineering And Clinical Application*, Ritter *et al.* (eds.), pages 60-84 (Cambridge University Press 1995).

30 As described above, carbohydrate moieties in the Fc region of an antibody can be used to conjugate a therapeutic agent. However, the Fc region is absent if an antibody fragment is used as the antibody component of the immunoconjugate. Nevertheless, it is possible to introduce a carbohydrate moiety into the light chain variable region of an antibody or antibody fragment. See, for example, Leung *et al.*, *J. Immunol.* 154:5919 (1995); Hansen *et al.*, U.S. patent No. 5,443,953 (1995). The
35 engineered carbohydrate moiety is then used to attach a therapeutic agent.

In addition, those of skill in the art will recognize numerous possible variations of the conjugation methods. For example, the carbohydrate moiety can be used to attach polyethyleneglycol in order to extend the half-life of an intact antibody, or antigen-binding fragment thereof, in blood, lymph, or other extracellular fluids. Moreover, it is possible to construct a divalent immunoconjugate by attaching therapeutic agents to a carbohydrate moiety and to a free sulfhydryl group. Such a free sulfhydryl group may be located in the hinge region of the antibody component.

One type of immunoconjugate comprises an antibody component and a polypeptide cytotoxin. An example of a suitable polypeptide cytotoxin is a ribosome-inactivating protein. Type I ribosome-inactivating proteins are single-chain proteins, while type II ribosome-inactivating proteins consist of two nonidentical subunits (A and B chains) joined by a disulfide bond (for a review, see Soria *et al.*, *Targeted Diagn. Ther.* 7:193 (1992)). Useful type I ribosome-inactivating proteins include polypeptides from *Saponaria officinalis* (e.g., saporin-1, saporin-2, saporin-3, saporin-6), *Momordica charantia* (e.g., momordin), *Byronia dioica* (e.g., bryodin, bryodin-2), *Trichosanthes kirilowii* (e.g., trichosanthin, trichokirin), *Gelonium multiflorum* (e.g., gelonin), *Phytolacca americana* (e.g., pokeweed antiviral protein, pokeweed antiviral protein-II, pokeweed antiviral protein-S), *Phytolacca dodecandra* (e.g., dodecandrin, *Mirabilis* antiviral protein), and the like. Ribosome-inactivating proteins are described, for example, by Walsh *et al.*, U.S. Patent No. 5,635,384.

Suitable type II ribosome-inactivating proteins include polypeptides from *Ricinus communis* (e.g., ricin), *Abrus precatorius* (e.g., abrin), *Adenia digitata* (e.g., modeccin), and the like. Since type II ribosome-inactivating proteins include a B chain that binds galactosides and a toxic A chain that depurinates adenosine, type II ribosome-inactivating protein conjugates should include the A chain. Additional useful ribosome-inactivating proteins include bouganin, clavin, maize ribosome-inactivating proteins, *Vaccaria pyramidata* ribosome-inactivating proteins, nigrine b, basic nigrine I, ebulline, racemosine b, luffin-a, luffin-b, luffin-S, and other ribosome-inactivating proteins known to those of skill in the art. See, for example, Bolognesi and Stirpe, international publication No. WO98/55623, Colnaghi *et al.*, international publication No. WO97/49726, Hey *et al.*, U.S. Patent No. 5,635,384, Bolognesi and Stirpe, international publication No. WO95/07297, Arias *et al.*, international publication No. WO94/20540, Watanabe *et al.*, *J. Biochem.* 106:6 977 (1989); Islam *et al.*, *Agric. Biol. Chem.* 55:229 (1991), and Gao *et al.*, *FEBS Lett.* 347:257 (1994).

Analogous and variants of naturally-occurring ribosome-inactivating proteins are also suitable for the targeting compositions described herein, and such proteins are known to those of skill in the art. Ribosome-inactivating proteins can be

produced using publicly available amino acid and nucleotide sequences. As an illustration, a nucleotide sequence encoding saporin-6 is disclosed by Lorenzetti *et al.*, U.S. Patent No. 5,529,932, while Walsh *et al.*, U.S. Patent No. 5,635,384, describe maize and barley ribosome-inactivating protein nucleotide and amino acid sequences.

5 Moreover, ribosome-inactivating proteins are also commercially available.

Additional polypeptide cytotoxins include ribonuclease, DNase I, *Staphylococcal* enterotoxin-A, diphtheria toxin, *Pseudomonas* exotoxin, and *Pseudomonas* endotoxin. See, for example, Pastan *et al.*, *Cell* 47:641 (1986), and Goldenberg, *CA - A Cancer Journal for Clinicians* 44:43 (1994).

10 Another general type of useful cytotoxin is a tyrosine kinase inhibitor. Since the activation of proliferation by tyrosine kinases has been suggested to play a role in the development and progression of tumors, this activation can be inhibited by anti-zytor19 antibody components that deliver tyrosine kinase inhibitors. Suitable tyrosine kinase inhibitors include isoflavones, such as genistein (5, 7, 4'-trihydroxyisoflavone), daidzein (7,4'-dihydroxyisoflavone), and biochanin A (4-methoxygenistein), and the like. Methods of conjugating tyrosine inhibitors to a growth factor are described, for example, by Uckun; U.S. Patent No. 5,911,995.

Another group of useful polypeptide cytotoxins includes immunomodulators. As used herein, the term "immunomodulator" includes cytokines, stem cell growth factors, lymphotoxins, co-stimulatory molecules, hematopoietic factors, and the like, as well as synthetic analogs of these molecules. Examples of immunomodulators include 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, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, and IL-20), colony stimulating factors (*e.g.*, granulocyte-colony stimulating factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor), interferons (*e.g.*, interferons- α , - β , - γ , - ω , - ϵ , and - τ), the stem cell growth factor designated "S1 factor," erythropoietin, and thrombopoietin. Illustrative immunomodulator moieties include IL-2, IL-6, IL-10, interferon- γ , TNF- α , and the like.

Immunconjugates that include an immunomodulator provide a means to deliver an immunomodulator to a target cell, and are particularly useful against tumor cells. The cytotoxic effects of immunomodulators are well known to those of skill in the art. See, for example, Klegerman *et al.*, "Lymphokines and Monokines," in *Biotechnology And Pharmacy*, Pessuto *et al.* (eds.), pages 53-70 (Chapman & Hall 1993). As an illustration, interferons can inhibit cell proliferation by inducing increased expression of class I histocompatibility antigens on the surface of various cells and thus, enhance the rate of destruction of cells by cytotoxic T lymphocytes. Furthermore,

tumor necrosis factors, such as tumor necrosis factor- α , are believed to produce cytotoxic effects by inducing DNA fragmentation.

The present invention also includes immunoconjugates that comprise a nucleic acid molecule encoding a cytotoxin. As an example of this approach, Hoganson *et al.*, *Human Gene Ther.* 9:2565 (1998), describe FGF-2 mediated delivery of a saporin gene by producing an FGF-2-polylysine conjugate which was condensed with an expression vector comprising a saporin gene.

Other suitable toxins are known to those of skill in the art.

Conjugates of cytotoxic polypeptides and antibody components can be prepared using standard techniques for conjugating polypeptides. For example, Lam and Kelleher, U.S. Patent No. 5,055,291, describe the production of antibodies conjugated with either diphtheria toxin fragment A or ricin toxin. The general approach is also illustrated by methods of conjugating fibroblast growth factor with saporin, as described by Lappi *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:917 (1989), Soria *et al.*, *Targeted Diagn. Ther.* 7:193 (1992), Buechler *et al.*, *Eur. J. Biochem.* 234:706 (1995), Behar-Cohen *et al.*, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 36:2434 (1995), Lappi and Baird, U.S. Patent No. 5,191,067, Calabresi *et al.*, U.S. Patent No. 5,478,804, and Lappi and Baird, U.S. Patent No. 5,576,288. Also see, Ghetie and Vitteta, "Chemical Construction of Immunotoxins," in *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications*, Francis and Delgado (Eds.), pages 1-26 (Humana Press, Inc. 2000), Hall (Ed.), *Immunotoxin Methods and Protocols* (Humana Press, Inc. 2000), and Newton and Rybak, "Construction of Ribonuclease-Antibody Conjugates for Selective Cytotoxicity," in *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications*, Francis and Delgado (Eds.), pages 27-35 (Humana Press, Inc. 2000).

Alternatively, fusion proteins comprising an antibody component and a cytotoxic polypeptide can be produced using standard methods. Methods of preparing fusion proteins comprising a cytotoxic polypeptide moiety are well-known in the art of antibody-toxin fusion protein production. For example, antibody fusion proteins comprising an interleukin-2 moiety are described by Boleti *et al.*, *Ann. Oncol.* 6:945 (1995), Nicolet *et al.*, *Cancer Gene Ther.* 2:161 (1995), Becker *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 93:7826 (1996), Hank *et al.*, *Clin. Cancer Res.* 2:1951 (1996), and Hu *et al.*, *Cancer Res.* 56:4998 (1996). In addition, Yang *et al.*, *Hum. Antibodies Hybridomas* 6:129 (1995), describe a fusion protein that includes an F(ab')₂ fragment and a tumor necrosis factor alpha moiety. Antibody-*Pseudomonas* exotoxin A fusion proteins have been described by Chaudhary *et al.*, *Nature* 339:394 (1989), Brinkmann *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 88:8616 (1991), Batra *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89:5867 (1992), Friedman *et al.*, *J. Immunol.* 150:3054 (1993), Wels *et al.*, *Int. J. Can.* 60:137

(1995), Fominaya *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271:10560 (1996), Kuan *et al.*, *Biochemistry* 35:2872 (1996), and Schmidt *et al.*, *Int. J. Can.* 65:538 (1996). Antibody-toxin fusion proteins containing a diphtheria toxin moiety have been described by Kreitman *et al.*, *Leukemia* 7:553 (1993), Nicholls *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268:5302 (1993), Thompson *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:28037 (1995), and Valleria *et al.*, *Blood* 88:2342 (1996).
 5 Deonarain *et al.*, *Tumor Targeting* 1:177 (1995), have described an antibody-toxin fusion protein having an RNase moiety, while Linardou *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:243 (1994), produced an antibody-toxin fusion protein comprising a DNase I component. Gelonin was used as the toxin moiety in the antibody-toxin fusion protein of Better *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:14951 (1995). As a further example, Dohlsten *et al.*, *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 91:8945 (1994), reported an antibody-toxin fusion protein comprising *Staphylococcal* enterotoxin-A. Also see, Newton and Rybak, "Preparation of Recombinant RNase Single-Chain Antibody Fusion Proteins," in *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications*, Francis and Delgado (Eds.), pages 77-95
 10 (Humana Press, Inc. 2000).

As an alternative to a polypeptide cytotoxin, immunoconjugates can comprise a radioisotope as the cytotoxic moiety. For example, an immunoconjugate can comprise an anti-zytor19 antibody component and an α -emitting radioisotope, a β -emitting radioisotope, a γ -emitting radioisotope, an Auger electron emitter, a neutron capturing agent that emits α -particles or a radioisotope that decays by electron capture. Suitable radioisotopes include ^{198}Au , ^{199}Au , ^{32}P , ^{33}P , ^{125}I , ^{131}I , ^{123}I , ^{90}Y , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{67}Cu , ^{211}At , ^{47}Sc , ^{103}Pb , ^{109}Pd , ^{212}Pb , ^{71}Ge , ^{77}As , ^{105}Rb , ^{113}Ag , ^{119}Sb , ^{121}Sn , ^{131}Cs , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{177}Lu , ^{191}Os , ^{193}Pt , ^{197}Hg , and the like.

A radioisotope can be attached to an antibody component directly or indirectly, via a chelating agent. For example, ^{67}Cu , which provides β -particles and γ -rays, can be conjugated to an antibody component using the chelating agent, p-bromoacetamido-benzyl-tetraethylaminetetraacetic acid. Chase and Shapiro, "Medical Applications of Radioisotopes," in Gennaro (Ed.), *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, pages 843-865 (Mack Publishing Company 1995).
 25 As an alternative, ^{90}Y , which emits an energetic β -particle, can be coupled to an antibody component using diethylenetriaminepentaacetic acid. Moreover, an exemplary suitable method for the direct radiolabeling of an antibody component with ^{131}I is described by Stein *et al.*, *Antibody Immunoconj. Radiopharm.* 4:703 (1991).
 30 Alternatively, boron addends such as carboranes can be attached to antibody components, using standard techniques.

Another type of suitable cytotoxin for the preparation of immunoconjugates is a chemotherapeutic drug. Illustrative chemotherapeutic drugs

include nitrogen mustards, alkyl sulfonates, nitrosoureas, triazenes, folic acid analogs, pyrimidine analogs, purine analogs, antibiotics, epipodophyllotoxins, platinum coordination complexes, and the like. Specific examples of chemotherapeutic drugs include methotrexate, doxorubicin, daunorubicin, cytosinarabioside, *cis*-platin, vindesine, mitomycin, bleomycin, melphalan, chlorambucil, maytansinoids, calicheamicin, taxol, and the like. Suitable chemotherapeutic agents are described in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition (Mack Publishing Co. 1995), and in *Goodman And Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 9th Ed. (MacMillan Publishing Co. 1995). Other suitable chemotherapeutic agents are known to those of skill in the art.

In another approach, immunoconjugates are prepared by conjugating photoactive agents or dyes to an antibody component. Fluorescent and other chromogens, or dyes, such as porphyrins sensitive to visible light, have been used to detect and to treat lesions by directing the suitable light to the lesion. This type of "photoradiation," "phototherapy," or "photodynamic" therapy is described, for example, by Mew *et al.*, *J. Immunol.* 130:1473 (1983), Jori *et al.* (eds.), *Photodynamic Therapy Of Tumors And Other Diseases* (Libreria Progetto 1985), Oseroff *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8744 (1986), van den Bergh, *Chem. Britain* 22:430 (1986), Hasan *et al.*, *Prog. Clin. Biol. Res.* 288:471 (1989), Tatsuta *et al.*, *Lasers Surg. Med.* 9:422 (1989), and Pelegrin *et al.*, *Cancer* 67:2529 (1991).

The approaches described above can also be used to prepare multispecific antibody compositions that comprise an immunoconjugate.

Anti-zcytor19 antibodies and multispecific antibody compositions can be used to modulate the immune system by preventing the binding of zcytor19 ligands with endogenous zcytor19 receptors. Such antibodies can be administered to any subject in need of treatment, and the present invention contemplates both veterinary and human therapeutic uses. Illustrative subjects include mammalian subjects, such as farm animals, domestic animals, and human patients.

Multispecific antibody compositions and dual reactive antibodies that bind zcytor19 can be used for the treatment of autoimmune diseases, B cell cancers, immunomodulation, and other pathologies (*e.g.*, ITCP, T cell-mediated diseases, cattleman's disease, autoimmune disease, myelodysplastic syndrome, and the like), renal diseases, graft rejection, and graft versus host disease. The antibodies of the present invention can be targeted to specifically regulate B cell responses during the immune response. Additionally, the antibodies of the present invention can be used to

modulate B cell development, antigen presentation by B cells, antibody production, and cytokine production.

Antagonistic anti-zcytor19 antibodies can be useful to neutralize the effects of zcytor19 ligands for treating B cell lymphomas and leukemias, chronic or acute lymphocytic leukemia, myelomas such as multiple myeloma, plasma cytomas, and lymphomas such as non-Hodgkins lymphoma, for which an increase in zcytor19 ligand polypeptides is associated, or where zcytor19 ligand is a survival factor or growth factor. Anti-zcytor19 antibodies can also be used to treat Epstein Barr virus-associated lymphomas arising in immunocompromised patients (*e.g.*, AIDS or organ transplant).

Anti-zcytor19 antibodies that induce a signal by binding with zcytor19 may inhibit the growth of lymphoma and leukemia cells directly via induction of signals that lead to growth inhibition, cell cycle arrest, apoptosis, or tumor cell death. Zcytor19 antibodies that initiate a signal are preferred antibodies to directly inhibit or kill cancer cells. In addition, agonistic anti-zcytor19 monoclonal antibodies may activate normal B cells and promote an anticancer immune response. Anti-zcytor19 antibodies may directly inhibit the growth of leukemias, lymphomas, and multiple myelomas, and the antibodies may engage immune effector functions. Anti-zcytor19 monoclonal antibodies may enable antibody-dependent cellular cytotoxicity, complement dependent cytotoxicity, and phagocytosis.

zcytor19 ligand may be expressed in neutrophils, monocytes, dendritic cells, and activated monocytes. In certain autoimmune disorders (*e.g.*, myasthenia gravis, and rheumatoid arthritis), B cells might exacerbate autoimmunity after activation by zcytor19 ligand. Immunosuppressant proteins that selectively block the action of B-lymphocytes would be of use in treating disease. Autoantibody production is common to several autoimmune diseases and contributes to tissue destruction and exacerbation of disease. Autoantibodies can also lead to the occurrence of immune complex deposition complications and lead to many symptoms of systemic lupus erythematosus, including kidney failure, neuralgic symptoms and death. Modulating antibody production independent of cellular response would also be beneficial in many disease states. B cells have also been shown to play a role in the secretion of

arthritisogenic immunoglobulins in rheumatoid arthritis. As such, inhibition of zcytor19 ligand antibody production would be beneficial in treatment of autoimmune diseases such as myasthenia gravis and rheumatoid arthritis. Immunosuppressant therapeutics such as anti-zcytor19 antibodies that selectively block or neutralize the action of B-lymphocytes would be useful for such purposes.

The invention provides methods employing anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, for selectively blocking or neutralizing the actions of B-cells in association with end stage renal diseases, which may or may not be associated with autoimmune diseases. Such methods would also be useful for treating immunologic renal diseases. Such methods would be useful for treating glomerulonephritis associated with diseases such as membranous nephropathy, IgA nephropathy or Berger's Disease, IgM nephropathy, Goodpasture's Disease, post-infectious glomerulonephritis, mesangioproliferative disease, chronic lymphocytic leukemia, minimal-change nephrotic syndrome. Such methods would also serve as therapeutic applications for treating secondary glomerulonephritis or vasculitis associated with such diseases as lupus, polyarteritis, Henoch-Schonlein, Scleroderma, HIV-related diseases, amyloidosis or hemolytic uremic syndrome. The methods of the present invention would also be useful as part of a therapeutic application for treating interstitial nephritis or pyelonephritis associated with chronic pyelonephritis, analgesic abuse, nephrocalcinosis, nephropathy caused by other agents, nephrolithiasis, or chronic or acute interstitial nephritis.

The present invention also provides methods for treatment of renal or urological neoplasms, multiple myelomas, lymphomas, leukemias, light chain neuropathy, or amyloidosis.

The invention also provides methods for blocking or inhibiting activated B cells using anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, for the treatment of asthma and other chronic airway diseases such as bronchitis and emphysema.

Also provided are methods for inhibiting or neutralizing a T cell response using anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, for immunosuppression, in particular for such therapeutic use as for graft-versus-host

disease and graft rejection. Moreover, anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, would be useful in therapeutic protocols for treatment of such autoimmune diseases as insulin dependent diabetes mellitus (IDDM), multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, inflammatory bowel disease (IBD), and Crohn's Disease. Methods of the present invention would have additional therapeutic value for treating chronic inflammatory diseases, in particular to lessen joint pain, swelling, anemia and other associated symptoms as well as treating septic shock.

B cell responses are important in fighting infectious diseases including bacterial, viral, protozoan and parasitic infections. Antibodies against infectious microorganisms can immobilize the pathogen by binding to antigen followed by complement mediated lysis or cell mediated attack. Agonistic, or signaling, anti-zcytor19 antibodies may serve to boost the humoral response and would be a useful therapeutic for individuals at risk for an infectious disease or as a supplement to vaccination.

Well established animal models are available to test *in vivo* efficacy of anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, of the present invention in certain disease states. As an illustration, anti-zcytor19 antibodies can be tested *in vivo* in a number of animal models of autoimmune disease, such as MRL-*lpr/lpr* or NZB x NZW F1 congenic mouse strains which serve as a model of systemic lupus erythematosus. Such animal models are known in the art.

Offspring of a cross between New Zealand Black (NZB) and New Zealand White (NZW) mice develop a spontaneous form of systemic lupus erythematosus that closely resembles systemic lupus erythematosus in humans. The offspring mice, known as NZBW begin to develop IgM autoantibodies against T-cells at one month of age, and by 5-7 months of age, Ig anti-DNA autoantibodies are the dominant immunoglobulin. Polyclonal B-cell hyperactivity leads to overproduction of autoantibodies. The deposition of these autoantibodies, particularly ones directed against single stranded DNA is associated with the development of glomerulonephritis, which manifests clinically as proteinuria, azotemia, and death from renal failure. Kidney failure is the leading cause of death in mice affected with spontaneous systemic lupus erythematosus, and in the NZBW strain, this process is chronic and obliterative.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

68

The disease is more rapid and severe in females than males, with mean survival of only 245 days as compared to 406 days for the males. While many of the female mice will be symptomatic (proteinuria) by 7-9 months of age, some can be much younger or older when they develop symptoms. The fatal immune nephritis seen in the NZBW mice is very similar to the glomerulonephritis seen in human systemic lupus erythematosus, making this spontaneous murine model useful for testing of potential systemic lupus erythematosus therapeutics.

Murine models of experimental allergic encephalomyelitis have been used as tools to investigate both the mechanisms of immune-mediated disease, and methods of potential therapeutic intervention. The model resembles human multiple sclerosis, and produces demyelination as a result of T-cell activation to neural proteins such as myelin basic protein, or proteolipid protein. Inoculation with antigen leads to induction of CD4+, class II MHC-restricted T-cells. Changes in the protocol for experimental allergic encephalomyelitis can produce acute, chronic-relapsing, or passive-transfer variants of the model.

In the collagen-induced arthritis model, mice develop chronic inflammatory arthritis, which closely resembles human rheumatoid arthritis. Since collagen-induced arthritis shares similar immunological and pathological features with rheumatoid arthritis, this makes it an ideal model for screening potential human anti-inflammatory compounds. Another advantage in using the collagen-induced arthritis model is that the mechanisms of pathogenesis are known. The T and B cell epitopes on type II collagen have been identified, and various immunological (delayed-type hypersensitivity and anti-collagen antibody) and inflammatory (cytokines, chemokines, and matrix-degrading enzymes) parameters relating to immune-mediating arthritis have been determined, and can be used to assess test compound efficacy in the models.

Myasthenia gravis is another autoimmune disease for which murine models are available. Myasthenia gravis is a disorder of neuromuscular transmission involving the production of autoantibodies directed against the nicotinic acetylcholine receptor. Myasthenia gravis is acquired or inherited with clinical features including abnormal weakness and fatigue on exertion. A mouse model of myasthenia gravis have been established. Experimental autoimmune myasthenia gravis is an antibody mediated

disease characterized by the presence of antibodies to acetylcholine receptor. These antibodies destroy the receptor leading to defective neuromuscular electrical impulses, resulting in muscle weakness. In the experimental autoimmune myasthenia gravis model, mice are immunized with the nicotinic acetylcholine receptor. Clinical signs of myasthenia gravis become evident weeks after the second immunization. Experimental autoimmune myasthenia gravis is evaluated by several methods including measuring serum levels of acetylcholine receptor antibodies by radioimmunoassay, measuring muscle acetylcholine receptor, or electromyography.

Generally, the dosage of administered anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, will vary depending upon such factors as the subject's age, weight, height, sex, general medical condition and previous medical history. As an illustration, anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, can be administered at low protein doses, such as 20 to 100 milligrams protein per dose, given once, or repeatedly. Alternatively, anti-zcytor19 antibodies, or multispecific antibody compositions, can be administered in doses of 30 to 90 milligrams protein per dose, or 40 to 80 milligrams protein per dose, or 50 to 70 milligrams protein per dose, although a lower or higher dosage also may be administered as circumstances dictate.

Administration of antibody components 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.

A pharmaceutical composition comprising an anti-zcytor19 antibody, or bispecific antibody components, 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, anti-zcytor19 antibodies, or bispecific antibody components, and a pharmaceutically acceptable carrier are administered to a patient in a

therapeutically effective amount. A combination of anti-zcytor19 antibodies, or bispecific antibody components, 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. As another example, an agent used to inhibit the growth of tumor cells is physiologically significant if the administration of the agent results in a decrease in the number of tumor cells, decreased metastasis, a decrease in the size of a solid tumor, or increased necrosis of a tumor.

A pharmaceutical composition comprising anti-zcytor19 antibodies, or bispecific antibody components, 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)).

Those of skill in the art can devise various pharmaceutical compositions using standard techniques. See, for example, Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 1, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1989), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 2, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1990), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Vol. 3, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1990), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 1, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1996), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 2, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1996), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Vol. 3, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1998), Avis *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 1, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1991), Lieberman *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 2, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1992), and Avis *et al.*, (Eds.), *Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Vol. 3, 2nd Edition* (Marcel Dekker, Inc. 1993).

As another example, liposomes provide a means to deliver anti-zytor19 antibodies, or bispecific antibody components, 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 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)).

As an alternative to administering liposomes that comprise an anti-zcytor19 antibody component, target cells can be prelabeled with biotinylated anti-zcytor19 antibodies. After plasma elimination of free antibody, streptavidin-conjugated liposomes are administered. This general approach is described, for example, by
5 Harasym *et al.*, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 32:99 (1998). Such an approach can also be used to prepare multispecific antibody compositions.

Polypeptides comprising an anti-zcytor19 antibody component, or bispecific antibody components, can be encapsulated within liposomes, or attached to the exterior of liposomes, using standard techniques (see, for example, Anderson *et al.*,
10 *Infect. Immun.* 31:1099 (1981), Wassef *et al.*, *Meth. Enzymol.* 149:124 (1987), Anderson *et al.*, *Cancer Res.* 50:1853 (1990), 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), and Ansell *et al.*, "Antibody Conjugation Methods for Active
15 Targeting of Liposomes," in *Drug Targeting: Strategies, Principles, and Applications*, Francis and Delgado (Eds.), pages 51-68 (Humana Press, Inc. 2000)). 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)).

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
25 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,
30 *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 antibody components, in which an antibody component is linked with a polymer. Typically, the polymer is water soluble so that an antibody component does not precipitate in an aqueous environment, such as a physiological environment. An example of a suitable
35 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 polymer may be branched or unbranched. Moreover, a mixture of polymers can be used to produce conjugates with antibody components.

Suitable water-soluble polymers include polyethylene glycol (PEG), monomethoxy-PEG, mono-(C₁-C₁₀)alkoxy-PEG, aryloxy-PEG, poly-(N-vinyl pyrrolidone)PEG, tressyl 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 conjugate can also comprise a mixture of such water-soluble polymers.

As an illustration, a polyalkyl oxide moiety can be attached to the *N*-terminus of antibody component. PEG is one suitable polyalkyl oxide. As an illustration, an antibody component can be modified with PEG, a process known as "PEGylation." PEGylation of an antibody component 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, antibody component 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 an antibody component. 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 an antibody component and a water soluble polymer: amide, carbamate, urethane, and the like. Methods for preparing PEGylated anti-zcytor19 antibody components by acylation will typically comprise the steps of (a) reacting an antibody component with PEG (such as a reactive ester of an aldehyde derivative of PEG) under conditions whereby one or more PEG groups attach to the antibody component, 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:antibody component, the greater the percentage of polyPEGylated antibody component product.

The product of PEGylation by acylation is typically a polyPEGylated antibody component 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 antibody component 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 antibody component 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 antibody component 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.

Reductive alkylation to produce a substantially homogenous population of monopolymer antibody component conjugate molecule can comprise the steps of: (a) reacting an antibody component 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 the antibody component, and (b) obtaining the reaction product(s). The reducing agent used for reductive alkylation should be stable in aqueous solution and preferably be able to reduce only the Schiff base formed in the initial process of reductive alkylation. Preferred reducing agents include sodium borohydride, sodium cyanoborohydride, dimethylamine borane, trimethylamine borane, and pyridine borane.

For a substantially homogenous population of monopolymer antibody component conjugates, the reductive alkylation reaction conditions are those which permit the selective attachment of the water soluble polymer moiety to the *N*-terminus of the antibody component. 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:antibody component 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.

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).

Polypeptide cytotoxins can also be conjugated with a soluble polymer using the above methods either before or after conjugation to an antibody component. Soluble polymers can also be conjugated with antibody fusion proteins.

Naked anti-zcytor19 antibodies, or antibody fragments, can be supplemented with immunoconjugate or antibody fusion protein administration. In one variation, naked anti-zcytor19 antibodies (or naked antibody fragments) are administered with low-dose radiolabeled anti-zcytor19 antibodies or antibody fragments. As a second alternative, naked anti-zcytor19 antibodies (or antibody fragments) are administered with low-dose radiolabeled anti-zcytor19 antibodies-cytokine immunoconjugates. As a third alternative, naked anti-zcytor19 antibodies (or antibody fragments) are administered with anti-zcytor19-cytokine immunoconjugates that are not radiolabeled. With regard to "low doses" of ^{131}I -labeled immunoconjugates, a preferable dosage is in the range of 15 to 40 mCi, while the most preferable range is 20 to 30 mCi. In contrast, a preferred dosage of ^{90}Y -labeled immunoconjugates is in the range from 10 to 30 mCi, while the most preferable range is 10 to 20 mCi. Similarly, bispecific antibody components can be supplemented with immunoconjugate or antibody fusion protein administration.

Immunoconjugates having a boron addend-loaded carrier for thermal neutron activation therapy will normally be effected in similar ways. However, it will be advantageous to wait until non-targeted immunoconjugate clears before neutron irradiation is performed. Clearance can be accelerated using an antibody that binds to the immunoconjugate. See U.S. Pat. No. 4,624,846 for a description of this general principle.

The present invention also contemplates a method of treatment in which immunomodulators are administered to prevent, mitigate or reverse radiation-induced or drug-induced toxicity of normal cells, and especially hematopoietic cells. Adjunct immunomodulator therapy allows the administration of higher doses of cytotoxic agents

due to increased tolerance of the recipient mammal. Moreover, adjunct immunomodulator therapy can prevent, palliate, or reverse dose-limiting marrow toxicity. Examples of suitable immunomodulators for adjunct therapy include granulocyte-colony stimulating factor, granulocyte macrophage-colony stimulating factor, thrombopoietin, IL-1, IL-3, IL-12, and the like. The method of adjunct immunomodulator therapy is disclosed by Goldenberg, U.S. Pat. No. 5,120,525.

The efficacy of anti-zcytor19 antibody therapy can be enhanced by supplementing naked antibody components with immunoconjugates and other forms of supplemental therapy described herein. In such multimodal regimens, the supplemental therapeutic compositions can be administered before, concurrently or after administration of naked anti-zcytor19 antibodies. Multimodal therapies of the present invention further include immunotherapy with naked anti-zcytor19 antibody components supplemented with administration of anti-zcytor19 immunoconjugates. In another form of multimodal therapy, subjects receive naked anti-zcytor19 antibodies and standard cancer chemotherapy.

The antibodies, immunoconjugates, and antibody fusion proteins described herein can also be advantageously supplemented with antibody components (*e.g.*, naked antibodies, naked antibody fragments, immunoconjugates, antibody fusion proteins, *etc.*) that bind the so-called "stalk region" of the TACI receptor, which resides between the second cysteine-rich region and the transmembrane domain. Studies indicate that, to an extent, TACI proteins are cleaved and shed by cells, leaving a small extracellular peptide, or stalk on the cell surface. A murine monoclonal antibody was found to be therapeutically useful in a lymphoma murine model. Epitope mapping indicates that the antibody binds with a fragment of the TACI extracellular domain, represented by amino acid residues 110 to 118 of SEQ ID NO:4. Antibodies can be generated against a polypeptide representing the region between the second cysteine-rich domain and the transmembrane domain (amino acid residues 105 to 166 of SEQ ID NO:4), or to a fragment thereof (*e.g.*, amino acid residues 110 to 118 of SEQ ID NO:4). Such antibodies are particularly useful for treatment of TACI-bearing tumor cells, such as B-lymphoma cells, myeloma cells, and the like.

The antibodies and antibody fragments of the present invention can be used as vaccines to treat the various disorders and diseases described above. As an example, an antibody component of a dual reactive TACI/BCMA monoclonal antibody can provide a suitable basis for a vaccine. Cysteine-rich regions of zcytor19 receptors can also provide useful components for a vaccine. For example, a vaccine can comprise at least one of the following polypeptides: a polypeptide comprising amino acid residues 8 to 41 of SEQ ID NO:2, a polypeptide comprising amino acid residues

34 to 66 of SEQ ID NO:4, and a polypeptide comprising amino acid residues 71 to 104 of SEQ ID NO:4.

The efficacy of an antibody component as a vaccine can be enhanced by conjugating the antibody component to a soluble immunogenic carrier protein. Suitable carrier proteins include tetanus toxin/toxoid, NTHi high molecular weight protein, diphtheria toxin/toxoid, detoxified *P. aeruginosa* toxin A, cholera toxin/toxoid, pertussis toxin/toxoid, *Clostridium perfringens* exotoxins/toxoid, hepatitis B surface antigen, hepatitis B core antigen, rotavirus VP 7 protein, respiratory syncytial virus F and G protein, and the like. Methods of preparing conjugated vaccines are known to those of skill in the art. See, for example, Cruse and Lewis (Eds.), *Conjugate Vaccines* (S. Karger Publishing 1989), and O'Hagan (Ed.), *Vaccine Adjuvants* (Humana Press, Inc. 2000). A vaccination composition can also include an adjuvant. Examples of suitable adjuvants include aluminum hydroxide and lipid. Methods of formulating vaccine compositions are well-known to those of ordinary skill in the art. See, for example, Rola, "Immunizing Agents and Diagnostic Skin Antigens," in *Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, 19th Edition, Gennaro (Ed.), pages 1417-1433 (Mack Publishing Company 1995).

Pharmaceutical compositions may be supplied as a kit comprising a container that comprises anti-zcytor19 antibody components, or bispecific antibody components. Therapeutic molecules 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 an anti-zcytor19 antibody component. 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 composition is contraindicated in patients with known hypersensitivity to exogenous antibodies.

Zcytor19 polypeptides, such as soluble zcytor19 receptors, may also be used within diagnostic systems for the detection of circulating levels of ligand. Within a related embodiment, antibodies or other agents that specifically bind to zcytor19 receptor polypeptides can be used to detect circulating receptor polypeptides. Elevated or depressed levels of ligand or receptor polypeptides may be indicative of pathological conditions, including cancer. Soluble receptor polypeptides may contribute to pathologic processes and can be an indirect marker of an underlying disease. For

example, elevated levels of soluble IL-2 receptor in human serum have been associated with a wide variety of inflammatory and neoplastic conditions, such as myocardial infarction, asthma, myasthenia gravis, rheumatoid arthritis, acute T-cell leukemia, B-cell lymphomas, chronic lymphocytic leukemia, colon cancer, breast cancer, and ovarian cancer (Heaney et al., Blood 87:847-857, 1996). Similarly, as zcytor19 is expressed in B-cell leukemia cells, an increase of zcytor19 expression can even serve as a marker of an underlying disease, such as leukemia.

A ligand-binding polypeptide of a zcytor19 receptor, or "soluble receptor," can be prepared by expressing a truncated DNA encoding the zcytor19 extracellular cytokine-binding domain (residues 21 (Arg) to 226 (Asn) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19), cytokine-binding fragment (e.g., residues 21 (Arg) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19; SEQ ID NO:4), the soluble version of zcytor19 variant, or the corresponding region of a non-human receptor. It is preferred that the extracellular domain be prepared in a form substantially free of transmembrane and intracellular polypeptide segments. Moreover, ligand-binding polypeptide fragments within the zcytor19 cytokine-binding domain, described above, can also serve as zcytor19 soluble receptors for uses described herein. To direct the export of a receptor polypeptide 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 or a zcytor19 secretory peptide. To facilitate purification of the secreted receptor polypeptide, a C-terminal extension, such as a poly-histidine tag, Glu-Glu tag peptide, substance P, Flag™ peptide (Hopp et al., Bio/Technology 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.

In an alternative approach, a receptor extracellular domain can be expressed as a fusion with immunoglobulin heavy chain constant regions, typically an F_C fragment, which contains two constant region domains and lacks the variable region. 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 close 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

WO 02/44209

PCT/US01/44808

79

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 zcytor19-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
5 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 itself can be bound to a solid support, with binding and elution carried out as above.
10 Collected fractions can be re-fractionated until the desired level of purity is reached.

Moreover, zcytor19 soluble receptors 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 cancers that are expressing large amount of bioactive zcytor19 ligand, zcytor19 soluble receptors can be used as a
15 direct antagonist of the ligand *in vivo*, and may aid in reducing progression and symptoms associated with the disease. Moreover, zcytor19 soluble receptor can be used to slow the progression of cancers that over-express zcytor19 receptors, by binding ligand *in vivo* that would otherwise enhance proliferation of those cancers. Similar *in vitro* applications for a zcytor19 soluble receptor can be used, for instance, as a negative
20 selection to select cell lines that grow in the absence of zcytor19 ligand.

Moreover, zcytor19 soluble receptor can be used *in vivo* or in diagnostic applications to detect zcytor19 ligand-expressing cancers *in vivo* or in tissue samples. For example, the zcytor19 soluble receptor can be conjugated to a radio-label or fluorescent label as described herein, and used to detect the presence of the ligand in a
25 tissue sample using an *in vitro* ligand-receptor type binding assay, or fluorescent imaging assay. Moreover, a radiolabeled zcytor19 soluble receptor could be administered *in vivo* to detect ligand-expressing solid tumors through a radio-imaging method known in the art. Similarly, zcytor19 polynucleotides, polypeptides, anti-zcytor19 antibodies, or peptide binding fragments can be used to detect zcytor19
30 receptor expressing cancers. In a preferred embodiment zcytor19 polynucleotides, polypeptides, anti-zcytor19 antibodies, or peptide binding fragments can be used to

detect leukemias, more preferably B-cell leukemias, and most preferably pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia.

Differentiation is a progressive and dynamic process, beginning with pluripotent stem cells and ending with terminally differentiated cells. Pluripotent stem cells that can regenerate without commitment to a lineage express a set of differentiation markers that are lost when commitment to a cell lineage is made. Progenitor cells express a set of differentiation markers that may or may not continue to be expressed as the cells progress down the cell lineage pathway toward maturation. Differentiation markers that are expressed exclusively by mature cells are usually functional properties such as cell products, enzymes to produce cell products, and receptors. The stage of a cell population's differentiation is monitored by identification of markers present in the cell population. Myocytes, osteoblasts, adipocytes, chondrocytes, fibroblasts and reticular cells are believed to originate from a common mesenchymal stem cell (Owen et al., Ciba Fdn. Symp. 136:42-46, 1988). Markers for mesenchymal stem cells have not been well identified (Owen et al., J. of Cell Sci. 87:731-738, 1987), so identification is usually made at the progenitor and mature cell stages. The novel polypeptides of the present invention may be useful for studies to isolate mesenchymal stem cells and myocyte or other progenitor cells, both *in vivo* and *ex vivo*.

There is evidence to suggest that factors that stimulate specific cell types down a pathway towards terminal differentiation or dedifferentiation affect the entire cell population originating from a common precursor or stem cell. Thus, the present invention includes stimulating or inhibiting the proliferation of lymphoid cells, hematopoietic cells and endothelial cells. Thus molecules of the present invention, such as soluble zcytor19 receptors, cytokine-binding fragments, anti-zcytor19 antibodies, sense and antisense polynucleotides may have use in inhibiting tumor cells, and particularly lymphoid, hematopoietic, prostate, endothelial, and thyroid tumor cells.

Assays measuring differentiation include, for example, measuring cell markers associated with stage-specific expression of a tissue, enzymatic activity, functional activity or morphological changes (Watt, FASEB, 5:281-284, 1991; Francis, Differentiation 57:63-75, 1994; Raes, Adv. Anim. Cell Biol. Technol. Bioprocesses,

161-171, 1989; all incorporated herein by reference). Alternatively, zcytor19 polypeptide itself can serve as an additional cell-surface or secreted marker associated with stage-specific expression of a tissue. As such, direct measurement of zcytor19 polypeptide, or its loss of expression in a tissue as it differentiates, can serve as a marker for differentiation of tissues. Moreover, since zcytor19 is specifically-expressed in pre-B cell acute lymphoblastic leukemia cells, as well as several other cancers as described herein. As such, one of skill in the art would recognize that the polynucleotides, polypeptides and antibodies of the present invention can be used as a marker for these cancers.

Similarly, direct measurement of zcytor19 polypeptide, or its loss of expression in a tissue can be determined in a tissue or cells as they undergo tumor progression. Increases in invasiveness and motility of cells, or the gain or loss of expression of zcytor19 in a pre-cancerous or cancerous condition, in comparison to normal tissue, can serve as a diagnostic for transformation, invasion and metastasis in tumor progression. As such, knowledge of a tumor's stage of progression or metastasis will aid the physician in choosing the most proper therapy, or aggressiveness of treatment, for a given individual cancer patient. Methods of measuring gain and loss of expression (of either mRNA or protein) are well known in the art and described herein and can be applied to zcytor19 expression. For example, appearance or disappearance of polypeptides that regulate cell motility can be used to aid diagnosis and prognosis of prostate cancer (Banyard, J. and Zetter, B.R., *Cancer and Metast. Rev.* 17:449-458, 1999). As an effector of cell motility, or as a B-cell tumor-specific marker, zcytor19 gain or loss of expression may serve as a diagnostic for lymphoid, B-cell, endothelial, hematopoietic and other cancers. Moreover, analogous to the prostate specific antigen (PSA), as a naturally-expressed tissue-specific marker, increased levels of zcytor19 polypeptides, or anti-zcytor19 antibodies in a patient, relative to a normal control can be indicative of disease in normal tissues where zcytor19 is expressed (See, e.g., Mulders, TMT, et al., *Eur. J. Surgical Oncol.* 16:37-41, 1990). Moreover, where zcytor19 expression appears to be restricted to specific normal human tissues, lack of zcytor19 expression in those tissues or strong zcytor19 expression in non-specific tissues would serve as a diagnostic of an abnormality in the cell or tissue type, of invasion or

metastasis of cancerous tissues into non-cancerous tissue, and could aid a physician in directing further testing or investigation, or aid in directing therapy. As zcytor19 is expressed in esophagus, liver, ovary, rectum, stomach, and uterus tumors, and melanoma, diagnostic probes have particular use in diagnosing and identifying tissues from these cancers.

In addition, as zcytor19 is tissue-specific, polynucleotide probes, anti-zcytor19 antibodies, and detection the presence of zcytor19 polypeptides in tissue can be used to assess whether a specific tissue is present, for example, after surgery involving the excision of a diseased or cancerous tissues in which zcytor19 is expressed. As such, the polynucleotides, polypeptides, and antibodies of the present invention can be used as an aid to determine whether all tissue is excised after surgery, for example, after surgery for cancer. In such instances, it is especially important to remove all potentially diseased tissue to maximize recovery from the cancer, and to minimize recurrence. Preferred embodiments include fluorescent, radiolabeled, or calorimetrically labeled anti-zcytor19 antibodies and zcytor19 polypeptide binding partners, that can be used histologically or *in situ*. Specific tissues in which zcytor19 is expressed are disclosed herein.

Moreover, the activity and effect of zcytor19 on tumor progression and metastasis can be measured *in vivo*. Several syngeneic mouse models have been developed to study the influence of polypeptides, compounds or other treatments on tumor progression. In these models, tumor cells passaged in culture are implanted into mice of the same strain as the tumor donor. The cells will develop into tumors having similar characteristics in the recipient mice, and metastasis will also occur in some of the models. Appropriate tumor models for our studies include the Lewis lung carcinoma (ATCC No. CRL-1642) and B16 melanoma (ATCC No. CRL-6323), amongst others. These are both commonly used tumor lines, syngeneic to the C57BL6 mouse, that are readily cultured and manipulated *in vitro*. Tumors resulting from implantation of either of these cell lines are capable of metastasis to the lung in C57BL6 mice. The Lewis lung carcinoma model has recently been used in mice to identify an inhibitor of angiogenesis (O'Reilly MS, et al. *Cell* 79: 315-328,1994). C57BL6/J mice are treated with an experimental agent either through daily injection of

recombinant protein, agonist or antagonist or a one time injection of recombinant adenovirus. Three days following this treatment, 10^5 to 10^6 cells are implanted under the dorsal skin. Alternatively, the cells themselves may be infected with recombinant adenovirus, such as one expressing zcytor19, before implantation so that the protein is synthesized at the tumor site or intracellularly, rather than systemically. The mice normally develop visible tumors within 5 days. The tumors are allowed to grow for a period of up to 3 weeks, during which time they may reach a size of 1500 - 1800 mm³ in the control treated group. Tumor size and body weight are carefully monitored throughout the experiment. At the time of sacrifice, the tumor is removed and weighed along with the lungs and the liver. The lung weight has been shown to correlate well with metastatic tumor burden. As an additional measure, lung surface metastases are counted. The resected tumor, lungs and liver are prepared for histopathological examination, immunohistochemistry, and *in situ* hybridization, using methods known in the art and described herein. The influence of the expressed polypeptide in question, e.g., zcytor19, on the ability of the tumor to recruit vasculature and undergo metastasis can thus be assessed. In addition, aside from using adenovirus, the implanted cells can be transiently transfected with zcytor19. Use of stable zcytor19 transfectants as well as use of inducible promoters to activate zcytor19 expression *in vivo* are known in the art and can be used in this system to assess zcytor19 induction of metastasis. Moreover, purified zcytor19 or zcytor19 conditioned media can be directly injected in to this mouse model, and hence be used in this system. For general reference see, O'Reilly MS, et al. Cell 79:315-328, 1994; and Rusciano D, et al. Murine Models of Liver Metastasis. Invasion Metastasis 14:349-361, 1995.

The activity of zcytor19 and its derivatives (conjugates) on growth and dissemination of tumor cells derived from human hematologic malignancies can also be measured *in vivo* in a mouse Xenograft model. Several mouse models have been developed in which human tumor cells are implanted into immunodeficient mice, collectively referred to as xenograft models. See Cattani, AR and Douglas, E Leuk. Res. 18:513-22, 1994; and Flavell, DJ, Hematological Oncology 14:67-82, 1996. The characteristics of the disease model vary with the type and quantity of cells delivered to the mouse. Typically, the tumor cells will proliferate rapidly and can be found

circulating in the blood and populating numerous organ systems. Therapeutic strategies appropriate for testing in such a model include antibody induced toxicity, ligand-toxin conjugates or cell-based therapies. The latter method, commonly referred to adoptive immunotherapy, involves treatment of the animal with components of the human immune system (i.e. lymphocytes, NK cells) and may include *ex vivo* incubation of cells with zcytor19 or other immunomodulatory agents.

The mRNA corresponding to this novel DNA shows expression in lymphoid tissues, including pre-B cell acute lymphoblastic leukemia, bone marrow, and may be expressed in spleen, lymph nodes, and peripheral blood leukocytes. These data indicate a role for the zcytor19 receptor in leukemia, including B-cell leukemia, proliferation, differentiation, and/or activation of immune cells, and suggest a role in development and regulation of immune responses. The data also suggest that the interaction of zcytor19 with its ligand may stimulate proliferation and development of myeloid cells and may, like cytokine receptors IL-2, IL-6, LIF, IL-11 and OSM (Baumann et al., J. Biol. Chem. 268:8414-8417, 1993), induce acute-phase protein synthesis in hepatocytes.

It is preferred to purify the polypeptides of the present invention to $\geq 80\%$ purity, more preferably to $\geq 90\%$ purity, even more preferably $\geq 95\%$ purity, and particularly preferred is a pharmaceutically pure state, that is greater than 99.9% pure with respect to contaminating macromolecules, particularly other proteins and nucleic acids, and free of infectious and pyrogenic agents. Preferably, a purified polypeptide is substantially free of other polypeptides, particularly other polypeptides of animal origin.

Expressed recombinant zcytor19 polypeptides (or zcytor19 chimeric or fusion polypeptides) can be purified using fractionation and/or conventional purification methods and media. 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 preferred. Exemplary chromatographic media include those media derivatized with phenyl, butyl, or octyl groups, such as Phenyl-

Sepharose FF (Pharmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Pharmacia) and the like; or polyacrylic resins, such as Amberchrom CG 71 (Toso Haas) and the like. Suitable solid supports include glass beads, silica-based resins, cellulosic resins, agarose beads, cross-linked agarose beads, polystyrene beads, cross-linked polyacrylamide resins and the like that are insoluble under the conditions in which they are to be used. These supports may be modified with reactive groups that allow attachment of proteins by amino groups, carboxyl groups, sulfhydryl groups, hydroxyl groups and/or carbohydrate moieties. Examples of coupling chemistries include cyanogen bromide activation, N-hydroxysuccinimide activation, epoxide activation, sulfhydryl activation, hydrazide activation, and carboxyl and amino derivatives for carbodiimide coupling chemistries. These and other solid media are well known and widely used in the art, and are available from commercial suppliers. Methods for binding receptor polypeptides to support media are well known in the art. Selection of a particular method 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; Uppsala, Sweden, 1988.

The polypeptides of the present invention can be isolated by exploitation of their biochemical, structural, and biological 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. 3:1-7, 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 (Methods in Enzymol., Vol. 182, "Guide to Protein Purification", M. Deutscher, (ed.), Acad. Press, San Diego, 1990, pp.529-39). 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, using methods described in the art, polypeptide fusions, or hybrid zcytor19 proteins, are constructed using regions or domains of the inventive zcytor19 in combination with those of other human cytokine receptor family proteins, or heterologous proteins (Sambrook et al., ibid., Altschul et al., ibid., Picard, Cur. Opin. Biology, 5:511-5, 1994, and references therein). These methods allow the determination of the biological importance of larger domains or regions in a polypeptide of interest. Such hybrids may alter reaction kinetics, binding, constrict or expand the substrate specificity, or alter tissue and cellular localization of a polypeptide, and can be applied to polypeptides of unknown structure.

Fusion polypeptides or 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 one or more components of the fusion protein in the proper reading frame can be generated using known techniques and expressed by the methods described herein. For example, part or all of a domain(s) conferring a biological function may be swapped between zcytor19 of the present invention with the functionally equivalent domain(s) from another cytokine family member. Such domains include, but are not limited to, the secretory signal sequence, extracellular cytokine binding domain, cytokine binding fragment, fibronectin type III domains, transmembrane domain, and intracellular signaling domain, as disclosed herein. Such fusion proteins would be expected to have a biological functional profile that is the same or similar to polypeptides of the present invention or other known family proteins, depending on the fusion constructed. Moreover, such fusion proteins may exhibit other properties as disclosed herein.

Standard molecular biological and cloning techniques can be used to swap the equivalent domains between the zcytor19 polypeptide and those polypeptides to which they are fused. Generally, a DNA segment that encodes a domain of interest, e.g., a zcytor19 domain described herein, is operably linked in frame to at least one other DNA segment encoding an additional polypeptide (for instance a domain or region from another cytokine receptor, such as, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly

owned US Patent No. 5,945,511), or other class II cytokine receptor), and inserted into an appropriate expression vector, as described herein. Generally DNA constructs are made such that the several DNA segments that encode the corresponding regions of a polypeptide are operably linked in frame to make a single construct that encodes the entire fusion protein, or a functional portion thereof. For example, a DNA construct would encode from N-terminus to C-terminus a fusion protein comprising a signal polypeptide followed by a cytokine binding domain, followed by a transmembrane domain, followed by an intracellular signaling domain. Such fusion proteins can be expressed, isolated, and assayed for activity as described herein. Moreover, such fusion proteins can be used to express and secrete fragments of the zcytor19 polypeptide, to be used, for example to inoculate an animal to generate anti-zcytor19 antibodies as described herein. For example a secretory signal sequence can be operably linked to extracellular cytokine binding domain, cytokine binding fragment, individual fibronectin type III domains, transmembrane domain, and intracellular signaling domain, as disclosed herein, or a combination thereof (e.g., operably linked polypeptides comprising a fibronectin III domain attached to a linker, or zcytor19 polypeptide fragments described herein), to secrete a fragment of zcytor19 polypeptide that can be purified as described herein and serve as an antigen to be inoculated into an animal to produce anti-zcytor19 antibodies, as described herein.

Zcytor19 polypeptides or fragments thereof may also be prepared through chemical synthesis. Zcytor19 polypeptides may be monomers or multimers; glycosylated or non-glycosylated; pegylated or non-pegylated; and may or may not include an initial methionine amino acid residue.

Polypeptides of the present invention can also be synthesized by exclusive solid phase synthesis, partial solid phase methods, fragment condensation or classical solution synthesis. Methods for synthesizing polypeptides are well known in the art. See, for example, Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* 85:2149, 1963; Kaiser et al., *Anal. Biochem.* 34:595, 1970. After the entire synthesis of the desired peptide on a solid support, the peptide-resin is with a reagent which cleaves the polypeptide from the resin and removes most of the side-chain protecting groups. Such methods are well established in the art.

The activity of molecules of the present invention can be measured using a variety of assays that measure cell differentiation and proliferation. Such assays are well known in the art and described herein.

Proteins of the present invention are useful for example, in treating lymphoid, immune, inflammatory, splenic, blood or bone disorders, and can be measured *in vitro* using cultured cells or *in vivo* by administering molecules of the present invention to the appropriate animal model. For instance, host cells expressing a zcytor19 soluble receptor polypeptide can be embedded in an alginate environment and injected (implanted) into recipient animals. Alginate-poly-L-lysine microencapsulation, permselective membrane encapsulation and diffusion chambers are a means to entrap transfected mammalian cells or primary mammalian cells. These types of non-immunogenic "encapsulations" permit the diffusion of proteins and other macromolecules secreted or released by the captured cells to the recipient animal. Most importantly, the capsules mask and shield the foreign, embedded cells from the recipient animal's immune response. Such encapsulations can extend the life of the injected cells from a few hours or days (naked cells) to several weeks (embedded cells). Alginate threads provide a simple and quick means for generating embedded cells.

The materials needed to generate the alginate threads are known in the art. In an exemplary procedure, 3% alginate is prepared in sterile H₂O, and sterile filtered. Just prior to preparation of alginate threads, the alginate solution is again filtered. An approximately 50% cell suspension (containing about 5×10^5 to about 5×10^7 cells/ml) is mixed with the 3% alginate solution. One ml of the alginate/cell suspension is extruded into a 100 mM sterile filtered CaCl₂ solution over a time period of ~15 min, forming a "thread". The extruded thread is then transferred into a solution of 50 mM CaCl₂, and then into a solution of 25 mM CaCl₂. The thread is then rinsed with deionized water before coating the thread by incubating in a 0.01% solution of poly-L-lysine. Finally, the thread is rinsed with Lactated Ringer's Solution and drawn from solution into a syringe barrel (without needle). A large bore needle is then attached to the syringe, and the thread is intraperitoneally injected into a recipient in a minimal volume of the Lactated Ringer's Solution.

An *in vivo* approach for assaying proteins of the present invention involves viral delivery systems. Exemplary viruses for this purpose include adenovirus, herpesvirus, retroviruses, vaccinia virus, and adeno-associated virus (AAV). Adenovirus, a double-stranded DNA virus, is currently the best studied gene transfer
5 vector for delivery of heterologous nucleic acid (for review, see T.C. Becker et al., Meth. Cell Biol. 43:161-89, 1994; and J.T. Douglas and D.T. Curiel, Science & Medicine 4:44-53, 1997). The adenovirus system offers several advantages: (i) adenovirus can accommodate relatively large DNA inserts; (ii) can be grown to high-titer; (iii) infect a broad range of mammalian cell types; and (iv) can be used with a
10 large number of different promoters including ubiquitous, tissue specific, and regulatable promoters. Also, because adenoviruses are stable in the bloodstream, they can be administered by intravenous injection.

Using adenovirus vectors where portions of the adenovirus genome are deleted, inserts are incorporated into the viral DNA by direct ligation or by homologous
15 recombination with a co-transfected plasmid. In an exemplary system, the essential E1 gene has been deleted from the viral vector, and the virus will not replicate unless the E1 gene is provided by the host cell (the human 293 cell line is exemplary). When intravenously administered to intact animals, adenovirus primarily targets the liver. If the adenoviral delivery system has an E1 gene deletion, the virus cannot replicate in the
20 host cells. However, the host's tissue (e.g., liver) will express and process (and, if a secretory signal sequence is present, secrete) the heterologous protein. Secreted proteins will enter the circulation in the highly vascularized liver, and effects on the infected animal can be determined.

Moreover, adenoviral vectors containing various deletions of viral genes
25 can be used in an attempt to reduce or eliminate immune responses to the vector. Such adenoviruses are E1 deleted, and in addition contain deletions of E2A or E4 (Lusky, M. et al., J. Virol. 72:2022-2032, 1998; Raper, S.E. et al., Human Gene Therapy 9:671-679, 1998). In addition, deletion of E2b is reported to reduce immune responses (Amalfitano, A. et al., J. Virol. 72:926-933, 1998). Moreover, by deleting the entire
30 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 review, see Yeh, P. and Perricaudet, M., FASEB J., 11:615-623, 1997.

The adenovirus system can also be used for protein production *in vitro*. By culturing adenovirus-infected non-293 cells under conditions where the cells are not rapidly dividing, the cells can produce proteins for extended periods of time. For instance, BHK cells are grown to confluence in cell factories, then exposed to the adenoviral vector encoding the secreted protein of interest. The cells are then grown under serum-free conditions, which allows infected cells to survive for several weeks without significant cell division. Alternatively, adenovirus vector infected 293 cells can be grown as adherent cells or in suspension culture at relatively high cell density to produce significant amounts of protein (See Garnier et al., Cytotechnol., 15:145-55, 1994). With either protocol, an expressed, secreted heterologous protein can be repeatedly isolated from the cell culture supernatant, lysate, or membrane fractions depending on the disposition of the expressed protein in the cell. Within the infected 293 cell production protocol, non-secreted proteins may also be effectively obtained.

In view of the tissue distribution observed for zcytor19, agonists (including the natural ligand/ substrate/ cofactor/ etc.) and antagonists have enormous potential in both *in vitro* and *in vivo* applications. Compounds identified as zcytor19 agonists are useful for stimulating growth of immune and hematopoietic cells *in vitro* and *in vivo*. For example, zcytor19 soluble receptors, and agonist compounds are useful as components of defined cell culture media, and may be used alone or in combination with other cytokines and hormones to replace serum that is commonly used in cell culture. Agonists are thus useful in specifically promoting the growth and/or development of T-cells, B-cells, and other cells of the lymphoid and myeloid lineages in culture. Moreover, zcytor19 soluble receptor, agonist, or antagonist may be used *in vitro* in an assay to measure stimulation of colony formation from isolated primary bone marrow cultures. Such assays are well known in the art.

Antagonists are also useful as research reagents for characterizing sites of ligand-receptor interaction. Inhibitors of zcytor19 activity (zcytor19 antagonists) include anti-zcytor19 antibodies and soluble zcytor19 receptors, as well as other peptidic and non-peptidic agents (including ribozymes).

Zcytor19 can also be used to identify modulators (e.g. antagonists) of its activity. Test compounds are added to the assays disclosed herein to identify compounds that inhibit the activity of zcytor19. In addition to those assays disclosed herein, samples can be tested for inhibition of zcytor19 activity within a variety of

5 assays designed to measure zcytor19 binding, oligomerization, or the stimulation/inhibition of zcytor19-dependent cellular responses. For example, zcytor19-expressing cell lines can be transfected with a reporter gene construct that is responsive to a zcytor19-stimulated cellular pathway. Reporter gene constructs of this type are known in the art, and will generally comprise a zcytor19-DNA response

10 element operably linked to a gene encoding an assay detectable protein, such as luciferase. DNA response elements can include, but are not limited to, cyclic AMP response elements (CRE), hormone response elements (HRE) insulin response element (IRE) (Nasrin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:5273-7, 1990) and serum response elements (SRE) (Shaw et al. Cell 56: 563-72, 1989). Cyclic AMP response elements

15 are reviewed in Roestler et al., J. Biol. Chem. 263 (19):9063-6; 1988 and Habener, Molec. Endocrinol. 4 (8):1087-94; 1990. Hormone response elements are reviewed in Beato, Cell 56:335-44; 1989. Candidate compounds, solutions, mixtures or extracts or conditioned media from various cell types are tested for the ability to enhance the activity of zcytor19 receptor as evidenced by a increase in zcytor19 stimulation of

20 reporter gene expression. Assays of this type will detect compounds that directly stimulate zcytor19 signal transduction activity through binding the receptor or by otherwise stimulating part of the signal cascade. As such, there is provided a method of identifying agonists of zcytor19 polypeptide, comprising providing cells responsive to a zcytor19 polypeptide, culturing a first portion of the cells in the absence of a test

25 compound, culturing a second portion of the cells in the presence of a test compound, and detecting a increase in a cellular response of the second portion of the cells as compared to the first portion of the cells. Moreover a third cell, containing the reporter gene construct described above, but not expressing zcytor19 receptor, can be used as a control cell to assess non-specific, or non-zcytor19-mediated, stimulation of the reporter. Agonists, including the natural ligand, are therefore useful to stimulate or

30 increase zcytor19 polypeptide function.

A zcytor19 ligand-binding polypeptide, such as the extracellular domain or cytokine binding domain disclosed herein, can also be used for purification of ligand. The polypeptide is immobilized on a solid support, such as beads of agarose, cross-linked agarose, glass, cellulosic resins, silica-based resins, polystyrene, cross-linked polyacrylamide, or like materials that are stable under the conditions of use. Methods for linking polypeptides to solid supports are known in the art, and include amine chemistry, cyanogen bromide activation, N-hydroxysuccinimide activation, epoxide activation, sulfhydryl activation, and hydrazide activation. The resulting medium will generally be configured in the form of a column, and fluids containing ligand are passed through the column one or more times to allow ligand to bind to the receptor polypeptide. The ligand is then eluted using changes in salt concentration, chaotropic agents (guanidine HCl), or pH to disrupt ligand-receptor binding.

An assay system that uses a ligand-binding receptor (or an antibody, one member of a complement/ anti-complement pair) or a binding fragment thereof, and a commercially available biosensor instrument may be advantageously employed (e.g., BIAcore™, Pharmacia Biosensor, Piscataway, NJ; or SELDI™ technology, Ciphergen, Inc., Palo Alto, CA). Such receptor, antibody, member of a complement/anti-complement pair or fragment is immobilized onto the surface of a receptor chip. Use of this instrument is disclosed by Karlsson, *J. Immunol. Methods* 145:229-240, 1991 and Cunningham and Wells, *J. Mol. Biol.* 234:554-63, 1993. A receptor, antibody, member or fragment is covalently attached, using amine or sulfhydryl chemistry, to dextran fibers that are attached to gold film within the flow cell. A test sample is passed through the cell. If a ligand, epitope, or opposite member of the complement/anti-complement pair is present in the sample, it will bind to the immobilized receptor, antibody or member, respectively, 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.

Ligand-binding receptor polypeptides can also be used within other assay systems known in the art. Such systems include Scatchard analysis for determination of binding affinity (see Scatchard, *Ann. NY Acad. Sci.* 51: 660-672,

1949) and calorimetric assays (Cunningham et al., *Science* 253:545-48, 1991; Cunningham et al., *Science* 245:821-25, 1991).

Zcytor19 polypeptides can also be used to prepare antibodies that bind to zcytor19 epitopes, peptides or polypeptides. The zcytor19 polypeptide or a fragment thereof serves as an antigen (immunogen) to inoculate an animal and elicit an immune response. 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 zcytor19 polypeptide (e.g., SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21). Polypeptides comprising a larger portion of a zcytor19 polypeptide, i.e., from 30 to 100 residues up to the entire length of the amino acid sequence are included. Antigens or immunogenic epitopes can also include attached tags, adjuvants and carriers, as described herein. Suitable antigens include the zcytor19 polypeptide encoded by SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg), or a contiguous 9 to 471 amino acid fragment thereof. Suitable antigens also include the zcytor19 polypeptide encoded by SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg), or a contiguous 9 to 500 amino acid fragment thereof; and the truncated soluble zcytor19 polypeptide encoded by SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser), or a contiguous 9 to 191 amino acid fragment thereof.

Preferred peptides to use as antigens are the extracellular cytokine binding domain, cytokine binding fragment, fibronectin type III domains, intracellular signaling domain, or other domains and motifs disclosed herein, or a combination thereof; and zcytor19 hydrophilic peptides such as those predicted by one of skill in the art from a hydrophobicity plot, determined for example, from a Hopp/Woods hydrophilicity profile based on a sliding six-residue window, with buried G, S, and T residues and exposed H, Y, and W residues ignored. Zcytor19 hydrophilic peptides include peptides comprising amino acid sequences selected from the group consisting of: (1) residues 295 through 300 of SEQ ID NO:2; (2) residues 451 through 456 of SEQ ID NO:2; (3) residues 301 through 306 of SEQ ID NO:2; (4) residues 294 through 299 of SEQ ID NO:2; and (5) residues 65 through 70 of SEQ ID NO:2. In addition, zcytor19 antigenic epitopes as predicted by a Jameson-Wolf plot, e.g., using DNASTAR Protean program

(DNASTAR, Inc., Madison, WI) are suitable antigens. In addition, conserved motifs, and variable regions between conserved motifs of zcytor19 are suitable antigens. Antibodies generated from this immune response 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 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 as horses, cows, goats, sheep, dogs, chickens, rabbits, mice, and rats with a zcytor19 polypeptide or a fragment thereof. The immunogenicity of a zcytor19 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 zcytor19 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 advantageously joined or linked to a macromolecular carrier (such as keyhole limpet hemocyanin (KLH), bovine serum albumin (BSA) or tetanus toxoid) for immunization.

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, 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-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 humanizing antibodies, biological half-life may be increased, and the potential for adverse immune reactions upon administration to humans is reduced. Moreover, 5 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 animals be inactivated or eliminated, such as by homologous recombination.

Alternative techniques for generating or selecting antibodies useful 10 herein include *in vitro* exposure of lymphocytes to zcytor19 protein or peptide, and selection of antibody display libraries in phage or similar vectors (for instance, through use of immobilized or labeled zcytor19 protein or peptide). Genes encoding polypeptides having potential zcytor19 polypeptide binding domains can be obtained by screening random peptide libraries displayed on phage (phage display) or on bacteria, 15 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 20 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), 25 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 zcytor19 sequences disclosed herein to identify proteins which bind to zcytor19. These "binding peptides" which interact with zcytor19 polypeptides can be used for tagging cells, e.g., such as those in which zcytor19 is specifically expressed; for isolating homolog polypeptides by affinity purification; they 30 can be directly or indirectly conjugated to drugs, toxins, radionuclides and the like.

These binding peptides can also be used in analytical methods such as for screening expression libraries and neutralizing activity. The binding peptides can also be used for diagnostic assays for determining circulating levels of zcytor19 polypeptides; for detecting or quantitating soluble zcytor19 polypeptides as marker of underlying pathology or disease. These binding peptides can also act as zcytor19 "antagonists" to block zcytor19 binding and signal transduction *in vitro* and *in vivo*. These anti-zcytor19 binding peptides would be useful for inhibiting the action of a ligand that binds with zcytor19.

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-zcytor19 antibodies herein bind to a zcytor19 polypeptide, peptide or epitope with an affinity at least 10-fold greater than the binding affinity to control (non-zcytor19) 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. NY Acad. Sci. 51: 660-672, 1949).

Whether anti-zcytor19 antibodies do not significantly cross-react with related polypeptide molecules is shown, for example, by the antibody detecting zcytor19 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 the prior art, such as known orthologs, and paralogs, and similar known members of a protein family (e.g., class II cytokine receptors, for example, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors). Screening can also be done using non-human zcytor19, and zcytor19 mutant polypeptides. Moreover, using routine methods, antibodies can be "screened against" known related polypeptides, to isolate a population that specifically binds to the zcytor19 polypeptides. For example,

antibodies raised to zcytor19 are adsorbed to related polypeptides adhered to insoluble matrix; antibodies specific to zcytor19 will flow through the matrix under the 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-zcytor19 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 specifically bind to zcytor19 proteins or peptides. 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 zcytor19 protein or polypeptide.

Antibodies to zcytor19 may be used for tagging cells that express zcytor19; for isolating zcytor19 by affinity purification; for diagnostic assays for determining circulating levels of zcytor19 polypeptides; for detecting or quantitating soluble zcytor19 as marker of underlying pathology or disease; for detecting or quantitating in a histologic, biopsy, or tissue sample zcytor19 receptor as marker of underlying pathology or disease; for stimulating cytotoxicity or ADCC on zcytor19-bearing cancer cells; in analytical methods employing FACS; for screening expression libraries; for generating anti-idiotypic antibodies; and as neutralizing antibodies or as antagonists to block zcytor19 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 vivo* diagnostic or therapeutic applications. Moreover, antibodies to zcytor19 or fragments thereof may be used *in vitro* to detect denatured zcytor19 or fragments thereof in assays, for example, Western Blots or other assays known in the art.

Antibodies to zcytor19 are useful for tagging cells that express the receptor and assaying Zcytor19 expression levels, for affinity purification, within diagnostic assays for determining circulating levels of soluble receptor polypeptides, analytical methods employing fluorescence-activated cell sorting. Divalent antibodies may be used as agonists to mimic the effect of a zcytor19 ligand.

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 zcytor19 of the present invention can be used to identify or treat tissues or organs that express a corresponding anti-complementary molecule (i.e., a zcytor19 receptor). More specifically, anti-zcytor19 antibodies, 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 zcytor19 molecule. A preferred use of such conjugated antibodies is to target the drug to cancers that express the zcytor19 receptor. For example, such antibodies can be used to target lymphoid, B-cell, and pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia cancers, and esophagus, liver, ovary, rectum, stomach, and uterus tumors, and melanoma,

Suitable detectable molecules may be directly or indirectly attached to polypeptides that bind zcytor19 ("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 ablation (for instance, to treat cancer cells or tissues, e.g., such as those specific tissues and tumors wherein zcytor19 is expressed). 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.

Similarly, in another embodiment, zcytor19 binding polypeptide-cytokine or antibody-cytokine fusion proteins can be used for enhancing *in vivo* killing of target tissues (for example, blood, lymphoid, colon, and bone marrow cancers, or other cancers described herein wherein zcytor19 is expressed), if the binding polypeptide-cytokine or anti-zcytor19 antibody targets the hyperproliferative cell (See, generally, Hornick et al., Blood 89:4437-47, 1997). They described fusion proteins enable targeting of a cytokine to a desired site of action, thereby providing an elevated local concentration of cytokine. Suitable anti-zcytor19 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, zcytor19 binding polypeptide or antibody fusion proteins described herein can be used for enhancing *in vivo* killing of target tissues by directly stimulating a zcytor19-modulated apoptotic pathway, resulting in cell death of hyperproliferative cells expressing zcytor19.

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

Moreover, anti-zcytor19 antibodies and binding fragments can be used for tagging and sorting cells that specifically-express Zcytor19, such as bone marrow and thyroid cells, and other cells, 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 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 flow cytometry, or using a fluorescence-activated cell sorter (FACS). In this technique one labels cells with antibodies that are coupled to a fluorescent dye. The labeled cells are then separated from unlabeled cells in a FACS machine. In FACS sorting individual cells traveling in single file pass through a laser beam and the fluorescence of each cell is measured. Slightly further down-stream, tiny droplets, most containing either one or no cells, are formed by a vibrating nozzle. The droplets containing a single cell are automatically give a positive or negative charge at the moment of formation, depending on whether the cell they contain is fluorescent, and then deflected by a strong electric field into an appropriate container. Such machines can select 1 cell in 1000 and sort 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 Zcytor19 polypeptides of the present invention are useful, because not all tissue types express the Zcytor19 receptor and because it is important that biologists be able to separate specific cell types for further study and/or therapeutic re-implantation into the body. This is particularly relevant in cells such as immune cells, wherein zcytor19 is expressed.

Four-helix bundle cytokines that bind to cytokine receptors as well as other proteins produced by activated lymphocytes play an important biological role in cell differentiation, activation, recruitment and homeostasis of cells throughout the body. Therapeutic utility includes treatment of diseases which require immune regulation including autoimmune diseases, such as, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis, myasthenia gravis, systemic lupus erythematosis and diabetes. Zcytor19 receptor antagonists or agonists, including zcytor19 soluble receptors, anti-receptor antibodies, and the natural ligand, may be important in the regulation of inflammation, and therefore would be useful in treating rheumatoid arthritis, asthma, ulcerative colitis, inflammatory bowel disease, Crohn's disease, and sepsis. There may be a role of zcytor19 antagonists or agonists, including soluble receptors, anti-receptor antibodies and the natural ligand, in mediating tumorigenesis, and therefore would be useful in the treatment of cancer. Zcytor19 antagonists or agonists, including soluble receptors anti-receptor antibodies and the natural ligand, may be a potential therapeutic in suppressing the immune system which would be important for reducing graft rejection or in prevention of graft vs. host disease.

Alternatively, zcytor19 antagonists or agonists, including soluble receptors, anti- zcytor19 receptor antibodies and the natural ligand may activate the immune system which would be important in boosting immunity to infectious diseases, treating immunocompromised patients, such as HIV+ patient, or in improving vaccines. In particular, zcytor19 antagonists or agonists, including soluble receptors, anti-receptor antibodies, and the natural ligand can modulate, stimulate or expand NK cells, or their progenitors, and would provide therapeutic value in treatment of viral infection, and as an anti-neoplastic factor. NK cells are thought to play a major role in elimination of metastatic tumor cells and patients with both metastases and solid tumors have

decreased levels of NK cell activity (Whiteside et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 230:221-244, 1998).

Polynucleotides encoding zcytor19 polypeptides are useful within gene therapy applications where it is desired to increase or inhibit zcytor19 activity. If a mammal has a mutated or absent zcytor19 gene, the zcytor19 gene can be introduced into the cells of the mammal. In one embodiment, a gene encoding a zcytor19 polypeptide is introduced *in vivo* in a viral vector. Such vectors include an attenuated or defective DNA virus, such as, but not limited to, herpes simplex virus (HSV), papillomavirus, Epstein Barr virus (EBV), adenovirus, adeno-associated virus (AAV), and the like. Defective viruses, which entirely or almost entirely lack viral genes, are preferred. A defective virus is not infective after introduction into a cell. Use of defective viral vectors allows for administration to cells in a specific, localized area, without concern that the vector can infect other cells. Examples of particular vectors include, but are not limited to, a defective herpes simplex virus 1 (HSV1) vector (Kaplit et al., Molec. Cell. Neurosci. 2:320-30, 1991); an attenuated adenovirus vector, such as the vector described by Stratford-Perricaudet et al., J. Clin. Invest. 90:626-30, 1992; and a defective adeno-associated virus vector (Samulski et al., J. Virol. 61:3096-101, 1987; Samulski et al., J. Virol. 63:3822-8, 1989).

In another embodiment, a zcytor19 gene can be introduced in a retroviral vector, e.g., as described in Anderson et al., U.S. Patent No. 5,399,346; Mann et al. Cell 33:153, 1983; Temin et al., U.S. Patent No. 4,650,764; Temin et al., U.S. Patent No. 4,980,289; Markowitz et al., J. Virol. 62:1120, 1988; Temin et al., U.S. Patent No. 5,124,263; International Patent Publication No. WO 95/07358, published March 16, 1995 by Dougherty et al.; and Kuo et al., Blood 82:845, 1993. Alternatively, the vector can be introduced 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. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7, 1987; Mackey et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8027-31, 1988). The use of lipofection to introduce exogenous genes into specific organs *in vivo* has certain practical advantages. Molecular targeting of liposomes to specific cells represents one area of benefit. More particularly, directing transfection to particular cells represents one area of benefit. For instance,

directing transfection to particular cell types would be 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.

It is possible to remove the target cells from the body; to introduce the vector as a naked DNA plasmid; and then to re-implant the transformed cells into the body. Naked DNA vectors for gene therapy can be introduced into the desired host cells by methods known in the art, e.g., transfection, electroporation, microinjection, transduction, cell fusion, DEAE dextran, calcium phosphate precipitation, use of a gene gun or use of a DNA vector transporter. See, e.g., Wu et al., *J. Biol. Chem.* 267:963-7, 1992; Wu et al., *J. Biol. Chem.* 263:14621-4, 1988.

Antisense methodology can be used to inhibit zcytor19 gene transcription, such as to inhibit cell proliferation in vivo. Polynucleotides that are complementary to a segment of a zcytor19-encoding polynucleotide (e.g., a polynucleotide as set forth in SEQ ID NO:1 SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20) are designed to bind to zcytor19-encoding mRNA and to inhibit translation of such mRNA. Such antisense polynucleotides are used to inhibit expression of zcytor19 polypeptide-encoding genes in cell culture or in a subject.

In addition, as a cell surface molecule, zcytor19 polypeptides can be used as a target to introduce gene therapy into a cell. This application would be particularly appropriate for introducing therapeutic genes into cells in which zcytor19 is normally expressed, such as lymphoid tissue, bone marrow, prostate, thyroid, and PBLs, or cancer cells which express zcytor19 polypeptide. For example, viral gene therapy, such as described above, can be targeted to specific cell types in which express a cellular receptor, such as zcytor19 polypeptide, rather than the viral receptor. Antibodies, or other molecules that recognize zcytor19 molecules on the target cell's surface can be used to direct the virus to infect and administer gene therapeutic material to that target cell. See, Woo, S.L.C, *Nature Biotech.* 14:1538, 1996; Wickham, T.J. et al, *Nature Biotech.* 14:1570-1573, 1996; Douglas, J.T et al., *Nature Biotech.* 14:1574-1578, 1996; Rihova, B., *Crit. Rev. Biotechnol.* 17:149-169, 1997; and Vile, R.G. et al.,

Mol. Med. Today 4:84-92, 1998. For example, a bispecific antibody containing a virus-neutralizing Fab fragment coupled to a zcytor19-specific antibody can be used to direct the virus to cells expressing the zcytor19 receptor and allow efficient entry of the virus containing a genetic element into the cells. See, for example, Wickham, T.J., et al., J. Virol. 71:7663-7669, 1997; and Wickham, T.J., et al., J. Virol. 70:6831-6838, 1996.

The present invention also provides reagents which will find use in diagnostic applications. For example, the zcytor19 gene, a probe comprising zcytor19 DNA or RNA or a subsequence thereof can be used to determine if the zcytor19 gene is present on chromosome 1 or if a mutation has occurred. Zcytor19 is located at the 1p36.11 region of chromosome 1. Detectable chromosomal aberrations at the zcytor19 gene locus include, but are not limited to, aneuploidy, gene copy number changes, insertions, deletions, restriction site changes and rearrangements. Such aberrations can be detected using polynucleotides of the present invention by employing molecular genetic techniques, such as restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis, fluorescence *in situ* hybridization methods, short tandem repeat (STR) analysis employing PCR techniques, and other genetic linkage analysis techniques known in the art (Sambrook et al., ibid.; Ausubel et. al., ibid.; Marian, Chest 108:255-65, 1995).

The precise knowledge of a gene's position can be useful for a number of purposes, including: 1) determining if a sequence is part of an existing contig and obtaining additional surrounding genetic sequences in various forms, such as YACs, BACs or cDNA clones; 2) providing a possible candidate gene for an inheritable disease which shows linkage to the same chromosomal region; and 3) cross-referencing model organisms, such as mouse, which may aid in determining what function a particular gene might have.

The zcytor19 gene is located at the 1p36.11 region of chromosome 1. One of skill in the art would recognize that chromosomal aberrations in and around the 1p36 region are involved in several cancers including neuroblastoma, melanoma, breast, colon, prostate and other cancers. Such aberrations include gross chromosomal abnormalities such as translocations, loss of heterogeneity (LOH) and the like in and around 1p36. Thus, a marker in the 1p36.11 locus, such as provided by the

polynucleotides of the present invention, would be useful in detecting translocations, aneuploidy, rearrangements, LOH other chromosomal abnormalities involving this chromosomal region that are present in cancers. For example, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with neuroblastoma, wherein LOH between 1p36.1 and 1p36.3 is prevalent, and a breakpoint at 1p36.1 is evident. At least 70% of neuroblastomas have cytogenetically visible chromosomal aberrations in 1p, including translocation and deletion, and that the abnormality is most likely due to complex translocation and deletion mechanisms. See, for example Ritke, MK et al., Cytogenet. Cell Genet. 50:84-90, 1989; and Weith, A et al., Genes Chromosomes Cancer 1:159-166, 1989). As zcytor19 is localized to 1p36.11, and falls directly within the region wherein aberrations are prevalent in neuroblastoma, one of skill in the art would appreciate that the polynucleotides of the present invention could serve as a diagnostic for neuroblastoma, as well as aid in the elucidation of translocation and deletion mechanisms that give rise to neuroblastoma. In addition, LOH at 1p36 is evident in melanoma (Dracopoli, NC et al., Am. J. Hum. Genet. 45 (suppl.):A19, 1989; Dracopoli, NC et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 86:4614-4618, 1989; Goldstein, AM et al., Am. J. Hum. Genet. 52:537-550, 1993); as well as prostate cancer in families with a history of both prostate and brain cancer (1p36, LOH) (Gibbs, M et al., Am. J. Hum. Genet. 64:776-787, 1999); and breast cancer, wherein deletions and duplications of chromosome 1 are the most common aberrations in breast carcinoma (1p36) (Kovacs, G. Int. J. Cancer 21:688-694, 1978; Rodgers, C et al., Cancer Genet. Cytogenet. 13:95-119, 1984; and Genuardi, M et al., Am. J. Hum. Genet. 45:73-82, 1989). Since translocation, LOH and other aberrations in this region of human chromosome 1 are so prevalent in human cancers, and the zcytor19 gene is specifically localized to 1p36.11, the polynucleotides of the present invention have use in detecting such aberrations that are clearly associated with human disease, as described herein.

Moreover, there is further evidence for cancer resulting from mutations in the 1p36 region wherein zcytor19 is located, and polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated therewith: P73, a potential tumor suppressor maps to 1p36 a region frequently deleted in neuroblastoma and other cancers (Kaghad, M et al., Cell 90:809-819, 1997); rhabdomyosarcoma, which involves a

translocation at the 1p36.2-p36.12 region of chromosome 1 that results in a fusion of the PAX7 gene from chromosome 1 with FKHR gene on chromosome 13; Leukemia-associated Protein (LAP) (1p36.1-p35) is increased in the cells of various types of leukemia; heparin sulfate proteoglycan (Perlecan) (1p36.1) associated with tumors, and wherein translocations are seen; and colon cancer (1p36-p35). Further, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with chromosome 1p36.11 deletions and translocations associated with human diseases, and preferably cancers, as described above. Moreover, amongst other genetic loci, those for C1q complement components (C1QA, B, and G) (1p36.3-p34.1); dyslexia (1p36-p34); lymphoid activation antigen CD30 (1p36); sodium channel non-voltage-gated type 1 (1p36.3-p36.2); tumor necrosis factor receptors (TNFRSF1b and TNFRSF12) (1p36.3-p36.2) which like zcytor19 are cytokine receptors; phospholipase A2 (PLA2) (1p35); rigid spine muscular dystrophy (1p36-p35) all manifest themselves in human disease states as well as map to this region of the human genome. See the Online Mendelian Inheritance of Man (OMIMTM, National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine, Bethesda, MD) gene map, and references therein, for this region of human chromosome 1 on a publicly available world wide web server (<http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Omin/getmap?chromosome=1p36>). All of these serve as possible candidate genes for an inheritable disease which show linkage to the same chromosomal region as the zcytor19 gene. Thus, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with these defects.

Similarly, defects in the zcytor19 gene itself may result in a heritable human disease state. The zcytor19 gene (1p36.11) is located near another class II receptor, the zcytor11 cytokine receptor gene (1p35.1) (commonly owned US Patent No. 5,965,704), as well as TNF receptors (1p36.3-p36.2), suggesting that this chromosomal region is commonly regulated, and/or important for immune function. 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.

5 Thus, similarly, defects in zcytor19 can cause a disease state or susceptibility to disease or infection. As, zcytor19 is a cytokine receptor in a chromosomal hot spot for aberrations involved in numerous cancers and is shown to be expressed in pre-B-cell acute leukemia cells, and other cancers described herein, the molecules of the present invention could also be directly involved in cancer formation or metastasis. As the

10 zcytor19 gene is located at the 1p36.11 region zcytor19, polynucleotide probes can be used to detect chromosome 1p36.11 loss, 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,

15 antagonists, agonists, polynucleotides and antibodies of the present invention would aid in the detection, diagnosis prevention, and treatment associated with a zcytor19 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

20 inventive anti-zcytor19 antibodies, polynucleotides, and polypeptides can be used for the detection of zcytor19 polypeptide, mRNA or anti-zcytor19 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, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes

25 associated with chromosome 1p36.11 deletions and translocations associated with human diseases, other translocations involved with malignant progression of tumors or other 1p36.11 mutations, which are expected to be involved in chromosome rearrangements in malignancy; or in other cancers, or in spontaneous abortion. Similarly, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or

30 genotypes associated with chromosome 1p36.11 trisomy and chromosome loss

associated with human diseases. Thus, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect abnormalities or genotypes associated with these defects.

As discussed above, defects in the zcytor19 gene itself may result in a heritable human disease state. 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 zcytor19 genetic defect. In addition, zcytor19 polynucleotide probes can be used to detect allelic differences between diseased or non-diseased individuals at the zcytor19 chromosomal locus. As such, the zcytor19 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 zcytor19 polynucleotide probe may comprise an entire exon or more. Exons are readily determined by one of skill in the art by comparing zcytor19 sequences (SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20) with the human genomic DNA for zcytor19 (Genbank Accession No. AL358412). 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 zcytor19 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 zcytor19 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 zcytor19 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, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20, the complement of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20 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)).

Mutations associated with the zcytor19 locus can be detected using nucleic acid molecules of the present invention by employing standard methods for direct mutation analysis, such as restriction fragment length polymorphism analysis, short tandem repeat analysis employing PCR techniques, amplification-refractory mutation system analysis, single-strand conformation polymorphism detection, RNase cleavage methods, denaturing gradient gel electrophoresis, fluorescence-assisted mismatch analysis, 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 Tsongalis, *Molecular Diagnostics* (Human Press, Inc. 1996), Elles (ed.) *Molecular Diagnosis of Genetic Diseases* (Humana Press, Inc. 1996), Landegren (ed.), *Laboratory Protocols for Mutation*
 5 *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 & Sons 1998), and Richards and Ward, "Molecular Diagnostic Testing," in *Principles of Molecular Medicine*, pages 83-88 (Humana Press, Inc. 1998)). Direct analysis of an zcytor19 gene for a mutation can
 10 be performed using a subject's genomic DNA. Methods for amplifying genomic DNA, obtained for example from peripheral blood lymphocytes, are well-known to those of skill in the art (see, for example, Dracopoli et al. (eds.), *Current Protocols in Human Genetics*, at pages 7.1.6 to 7.1.7 (John Wiley & Sons 1998)).

Mice engineered to express the zcytor19 gene, referred to as "transgenic
 15 mice," and mice that exhibit a complete absence of zcytor19 gene function, referred to as "knockout mice," may also be generated (Snouwaert et al., *Science* 257:1083, 1992; Lowell et al., *Nature* 366:740-42, 1993; Capecchi, M.R., *Science* 244: 1288-1292, 1989; Palmiter, R.D. et al. *Annu Rev Genet.* 20: 465-499, 1986). For example, transgenic mice that over-express zcytor19, either ubiquitously or under a tissue-
 20 specific or tissue-restricted promoter can be used to ask whether over-expression causes a phenotype. For example, over-expression of a wild-type zcytor19 polypeptide, polypeptide fragment or a mutant thereof may alter normal cellular processes, resulting in a phenotype that identifies a tissue in which zcytor19 expression is functionally relevant and may indicate a therapeutic target for the zcytor19, its agonists or
 25 antagonists. For example, a preferred transgenic mouse to engineer is one that expresses a "dominant-negative" phenotype, such as one that over-expresses the zcytor19 polypeptide comprising an extracellular cytokine binding domain with the transmembrane domain attached (approximately amino acids 21 (Arg) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2 or SEQ ID NO:19; or SEQ ID NO:4 attached in frame to a
 30 transmembrane domain). Another preferred transgenic mouse is one that over-expresses zcytor19 soluble receptors, such as those disclosed herein. Moreover, such

over-expression may result in a phenotype that shows similarity with human diseases. Similarly, knockout zcytor19 mice can be used to determine where zcytor19 is absolutely required *in vivo*. The phenotype of knockout mice is predictive of the *in vivo* effects of a zcytor19 antagonist, such as those described herein, may have. The mouse
5 or the human zcytor19 cDNA can be used to isolate murine zcytor19 mRNA, cDNA and genomic DNA, which are subsequently used to generate knockout mice. These transgenic and knockout mice may be employed to study the zcytor19 gene and the protein encoded thereby in an *in vivo* system, and can be used as *in vivo* models for corresponding human or animal diseases (such as those in commercially viable animal
10 populations). The mouse models of the present invention are particularly relevant as tumor models for the study of cancer biology and progression. Such models are useful in the development and efficacy of therapeutic molecules used in human cancers. Because increases in zcytor19 expression, as well as decreases in zcytor19 expression are associated with specific human cancers, both transgenic mice and knockout mice
15 would serve as useful animal models for cancer. Moreover, in a preferred embodiment, zcytor19 transgenic mouse can serve as an animal model for specific tumors, particularly esophagus, liver, ovary, rectum, stomach, and uterus tumors, and melanoma, B-cell leukemia and other lymphoid cancers. Moreover, transgenic mice expression of zcytor19 antisense polynucleotides or ribozymes directed against
20 zcytor19, described herein, can be used analogously to transgenic mice described above.

For pharmaceutical use, the soluble receptor polypeptides of the present invention are formulated for parenteral, particularly intravenous or subcutaneous, delivery according to conventional methods. Intravenous administration will be by
25 bolus injection or infusion over a typical period of one to several hours. In general, pharmaceutical formulations will include a zcytor19 soluble receptor polypeptide in combination with a pharmaceutically acceptable vehicle, such as saline, buffered saline, 5% dextrose in water or the like. Formulations may further include one or more excipients, preservatives, solubilizers, buffering agents, albumin to prevent protein loss
30 on vial surfaces, etc. Methods of formulation are well known in the art and are disclosed, for example, in Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Gennaro,

ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 19th ed., 1995. Therapeutic doses will generally be in the range of 0.1 to 100 µg/kg of patient weight per day, preferably 0.5-20 mg/kg per day, with the exact dose determined by the clinician according to accepted standards, taking into account the nature and severity of the condition to be treated, patient traits, etc. Determination of dose is within the level of ordinary skill in the art. The proteins may be administered for acute treatment, over one week or less, often over a period of one to three days or may be used in chronic treatment, over several months or years. In general, a therapeutically effective amount of zcytor19 soluble receptor polypeptide is an amount sufficient to produce a clinically significant effect.

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 zcytor19 can be used as standards or as "unknowns" for testing purposes. For example, zcytor19 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 zcytor19 is the gene to be expressed; for determining the restriction endonuclease cleavage sites of the polynucleotides; determining mRNA and DNA localization of zcytor19 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.

Zcytor19 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 zcytor19 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*. Zcytor19 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 zcytor19 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 zcytor19 would be unique unto itself.

Moreover, since zcytor19 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 zcytor19 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 zcytor19 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 1, and more specifically the locus 1p36.11 wherein the zcytor19 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 zcytor19 and other cytokine receptor polypeptides in the art.

The antibodies which bind specifically to zcytor19 can be used as a teaching aid to instruct students how to prepare affinity chromatography columns to purify zcytor19, 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 zcytor19 can be used as a teaching aid for use in detection of B-cell tumor tissue, esophagus, liver, ovary, rectum, stomach, and uterus tumors, and melanoma, pre-B-cell lymphoblastic leukemia and other lymphoid cancers using histological, and *in situ* methods amongst others known in the art. The zcytor19 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 zcytor19 gene, polypeptide or antibody are considered within the scope of the present invention.

The invention is further illustrated by the following non-limiting examples.

10 EXAMPLES

Example 1

Identification and Isolation of Full-length Human zcytor19 cDNA

Zcytor19 was identified as a predicted full-length cDNA from human genomic DNA AL358412 (Genbank). The sequence of the predicted full length zcytor19 polynucleotide is shown in SEQ ID NO:1 and the corresponding polypeptide is shown in SEQ ID NO:2. A variant full-length zcytor19 cDNA sequence was identified and is shown in SEQ ID NO:18 and the corresponding polynucleotides shown in SEQ ID NO:19. Moreover, a truncated soluble form of zcytor19 cDNA sequence was identified and is shown in SEQ ID NO:20 and the corresponding polynucleotides shown in SEQ ID NO:21.

Example 2

Tissue Distribution in Tissue Panels Using Northern Blot and PCR

A. Human zcytor19 Tissue Distribution using Northern Blot

Human Multiple Tissue Northern Blots (Human 12-lane MTN Blot I and II, and Human Immune System MTN Blot II) (Clontech) are probed to determine the tissue distribution of human zcytor19 expression. A PCR derived probe that hybridizes to SEQ ID NO:1 or SEQ ID NO:18 is amplified using standard PCR amplification methods. An exemplary PCR reaction is carried out as follows using primers designed to hybridize to SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or its complement: 30 cycles of 94°C for 1 minute, 65°C for 1 minute, and 72°C for 1 minute; followed by 1 cycle at 72°C for 7

minutes. The PCR product is visualized by agarose gel electrophoresis and the PCR product is gel purified as described herein. The probe is radioactively labeled using, e.g., the PRIME IT II™ Random Primer Labeling Kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The probe is purified using, e.g., a NUCTRAP™ push column (Stratagene). EXPRESSHYB™ (Clontech) solution is used for the prehybridization and as a hybridizing solution for the Northern blots. Prehybridization is carried out, for example, at 68°C for 2 hours. Hybridization takes place overnight at about 68°C with about 1.5×10^6 cpm/ml of labeled probe. The blots are washed three times at room temperature in 2X SSC, 0.05% SDS, followed by 1 wash for 10 minutes in 2X SSC, 0.1% SDS at 50°C. After exposure to X-ray film, a transcript corresponding to the length of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18, or SEQ ID NO:20 or of an mRNA encoding SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21 is expected to be seen in tissues that specifically express zcytor19, but not other tissues.

Northern analysis is also performed using Human Cancer Cell Line MTN™ (Clontech). PCR and probing conditions are as described above. A strong signal in a cancer line suggests that zcytor19 expression may be expressed in activated cells and/or may indicate a cancerous disease state. Moreover, using methods known in the art, Northern blots or PCR analysis of activated lymphocyte cells can also show whether zcytor19 is expressed in activated immune cells. Based on electronic Northern information zcytor19 was shown to be expressed specifically in pre-B cell acute lymphoblastic leukemia cells.

B. Tissue Distribution in tissue panels using PCR

A panel of cDNAs from human tissues was screened for zcytor19 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-Ready™ kit (Clontech, Palo Alto, CA) and QC tested with clathrin primers ZC21195 (SEQ ID NO:6) and ZC21196 (SEQ ID NO:7) 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:8) and 3' alpha tubulin specific oligo primer ZC17,574 (SEQ ID NO:9) or 3' G3PDH specific oligo primer ZC17,600 (SEQ ID NO:10); 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) positive control sample. Each well contained approximately 0.2-100 pg/ μ l of cDNA. The PCR was set up using oligos ZC37685 (SEQ ID NO:26) and ZC37681 (SEQ ID NO:27), TaKaRa Ex TaqTM (TAKARA Shuzo Co LTD, Biomedicals Group, Japan), and Rediload dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The amplification was carried out as follows: 1 cycle at 94°C for 2 minutes, 5 cycles of 94°C for 30 seconds, 70°C for 30 seconds, 35 cycles of 94°C for 30 seconds, 64°C for 30 seconds and 72°C for 30 seconds, 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 4% agarose gel. The correct predicted DNA fragment size was observed in adrenal gland, bladder, cervix, colon, fetal heart, fetal skin, liver, lung, melanoma, ovary, salivary gland, small intestine, stomach, brain, fetal liver, kidney, prostate, spinal cord, thyroid, placenta, testis, tumor esophagus, tumor liver, tumor ovary, tumor rectum, tumor stomach, tumor uterus, bone marrow, CD3+ library, HaCAT library, HPV library and HPVS library. As this primer pair does not span an intron, there may be risk that some tissues that are contaminated with genomic DNA or unprocessed mRNA messages would create a false positive in this assay.

Therefore, a different primer pair ZC38481 (SEQ ID NO:47) and ZC38626 (SEQ ID NO:48) that span introns were used using the methods described above, to re-evaluate the tissue distribution. The correct predicted DNA fragment size (256 bp) was observed in colon, fetal heart, fetal liver, kidney, liver, lung, mammary gland, prostate, salivary gland, small intestine, adipocyte library, brain library, islet

WO 02/44209

PCT/US01/44808

117

library, and prostate library, RPMI 1788 (B-cell line), spinal cord, placenta library, testis, tumor esophagus, tumor ovary, tumor rectum, tumor stomach, HaCAT library, HPV library and HPVS library.

- Mouse tissue panels were also examined using another set of primer pairs: (1) ZC38706 (SEQ ID NO:49) and ZC38711 (SEQ ID NO:50) (800 bp product) using the methods described above. This panel showed a limited tissue distribution for mouse zcytor19: mouse prostate cell lines, salivary gland library, and skin.

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	RPMI #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	1
K562 (ATCC # CCL-243)	1	Ionomycin + PMA stimulated	
Kidney	1	HPVS (ATCC # CRL-2221) - selected	1
Liver	1	Heart	1
Lung	1	Pituitary	1
Lymph node	1	Placenta	2
Melanoma	1	Salivary gland	1
Pancreas	1	HL60 (ATCC # CCL-240)	3
Pituitary	1	Platelet	1
Placenta	1	HBL-100	1
Prostate	1	Renal mesangial	1
Rectum	1	T-cell	1
Salivary Gland	1	Neutrophil	1
Skeletal muscle	1	MPC	1
Small intestine	1	Hut-102 (ATCC # TIB-162)	1
		Endothelial	1

WO 02/44209

PCT/US01/44808

118

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		
Liver tumor	1		
Lung tumor	1		
Ovarian tumor	1		
Rectal tumor	1		
Uterus tumor	1		

Example 3**PCR-Based Chromosomal Mapping of the zcytor19 Gene**

Zcytor19 is mapped to chromosome 1 using the commercially available
 5 "GeneBridge 4 Radiation Hybrid (RH) Mapping Panel" (Research Genetics, Inc.,
 Huntsville, AL). The GeneBridge 4 RH panel contains DNA from each of 93 radiation
 hybrid clones, plus two control DNAs (the HFL donor and the A23 recipient). A
 publicly available WWW server ([http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl)
 10 [bin/contig/rhmapper.pl](http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/contig/rhmapper.pl)) allows mapping relative to the Whitehead Institute/MIT Center
 for Genome Research's radiation hybrid map of the human genome (the "WICGR"
 radiation hybrid map) which is constructed with the GeneBridge 4 RH panel.

For the mapping of Zcytor19 with the GeneBridge 4 RH panel, 20 µl
 reactions are set up in a 96-well microtiter plate compatible for PCR (Stratagene, La
 Jolla, CA) and used in a "RoboCycler Gradient 96" thermal cycler (Stratagene). Each of
 15 the 95 PCR reactions consisted of 2 µl 10X KlenTaq PCR reaction buffer (CLONTECH
 Laboratories, Inc., Palo Alto, CA), 1.6 µl dNTPs mix (2.5 mM each, PERKIN-ELMER,
 Foster City, CA), 1 µl sense primer, ZC27,895 (SEQ ID NO:14), 1 µl antisense primer,
 ZC27,899 (SEQ ID NO:24), 2 µl "RediLoad" (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL),
 0.4 µl 50X Advantage KlenTaq Polymerase Mix (Clontech Laboratories, Inc.), 25 ng of
 20 DNA from an individual hybrid clone or control and distilled water for a total volume of

WO 02/44209

PCT/US01/44808

119

20 μ l. The reactions are overlaid with an equal amount of mineral oil and sealed. The PCR cyclor conditions are as follows: an initial 1 cycle 5 minute denaturation at 94°C, 35 cycles of a 45 seconds denaturation at 94°C, 45 seconds annealing at 54°C and 1 minute AND 15 seconds extension at 72°C, followed by a final 1 cycle extension of 7 minutes at 72°C. The reactions are separated by electrophoresis on a 2% agarose gel (EM Science, Gibbstown, NJ) and visualized by staining with ethidium bromide. The results show that Zcytor19 maps on the chromosome 1 WICGR radiation hybrid map in the 1p36.11 chromosomal region.

10

Example 4Construction of Mammalian Expression Vectors That Express zcytor19 SolubleReceptors: zcytor19CEE, zcytor19CFLG, zcytor19CHIS and zcytor19-Fc4A. Construction of zcytor19 Mammalian Expression Vector containing zcytor19CEE, zcytor19CFLG and zcytor19CHIS

15

An expression vector is prepared for the expression of the soluble, extracellular domain of the zcytor19 polypeptide, pC4zcytor19CEE, wherein the construct is designed to express a zcytor19 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:11).

20

A zcytor19 DNA fragment comprising the zcytor19 extracellular or cytokine binding domain of zcytor19 described herein, is created using PCR, and purified using standard methods. The excised DNA is subcloned into a plasmid expression vector that has a signal peptide, e.g., the native zcytor19 signal peptide, and attaches a Glu-Glu tag (SEQ ID NO:11) to the C-terminus of the zcytor19 polypeptide-

25

encoding polynucleotide sequence. Such a 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.

30

Restriction digested zcytor19 insert and previously digested vector are ligated using standard molecular biological techniques, and electroporated into competent cells such as DH10B competent cells (GIBCO BRL, Gaithersburg, MD) according to manufacturer's direction and plated onto LB plates containing 50 mg/ml ampicillin, and incubated overnight. Colonies are screened by restriction analysis of DNA prepared from individual colonies. The insert sequence of positive clones is verified by sequence analysis. A large scale plasmid preparation is done using a QIAGEN® Maxi prep kit (Qiagen) according to manufacturer's instructions.

The same process is used to prepare the zcytor19 soluble receptors with a C-terminal his tag, composed of 6 His residues in a row; and a C-terminal FLAG® tag (SEQ ID NO:12), zcytor19CFLAG. To construct these constructs, the aforementioned vector has either the CHIS or the FLAG® tag in place of the glu-glu tag (SEQ ID NO:11).

B. Mammalian Expression Construction of Soluble human zcytor19 receptor: zcytor19-Fc4

An expression vector, zcytor19/Fc4/pzmp20, was prepared to express a C-terminally Fc4 tagged soluble version of zcytor19 (human zcytor19-Fc4) in BHK cells. A fragment of zcytor19 cDNA that includes the polynucleotide sequence from extracellular domain of the zcytor19 receptor was fused in frame to the Fc4 polynucleotide sequence (SEQ ID NO:13) to generate a zcytor19-Fc4 fusion (SEQ ID NO:22 and SEQ ID NO:23). The pzmp20 vector is a mammalian expression vector that contains the Fc4 polynucleotide sequence and a cloning site that allows rapid construction of C-terminal Fc4 fusions using standard molecular biology techniques.

A 630 base pair fragment was generated by PCR, containing the extracellular domain of human zcytor19 with BamHI and BglII sites coded on the 5' and 3' ends, respectively. This PCR fragment was generated using primers ZC37967 (SEQ ID NO:24) and ZC37972 (SEQ ID NO:25) by amplification from human brain cDNA library. The PCR reaction conditions were as follows: 30 cycles of 94°C for 20 seconds, and 68°C for 2 minutes; 1 cycle at 68°C for 4 minutes; followed by a 10°C soak. The fragment was digested with BamHI and BglII restriction endonucleases and

subsequently purified by 1% gel electrophoresis and band purification using QiaQuick gel extraction kit (Qiagen). The resulting purified DNA was ligated for 5 hours at room temperature into a pzmp20 vector previously digested with Bgl2 containing Fc4 3' of the Bgl2 sites.

5 One μ l of the ligation mix was electroporated in 37 μ l DH10B electrocompetent *E. coli* (Gibco) according to the manufacturer's directions. The transformed cells were diluted in 400 μ l of LB media and plated onto LB plates containing 100 μ g/ml ampicillin. Clones were analyzed by restriction digests and positive clones were sent for DNA sequencing to confirm the sequence of the fusion
10 construct.

Example 5

Transfection And Expression Of Zcytor19 Soluble Receptor Polypeptides

A. Mammalian expression human zcytor19 soluble receptor: zcytor19/Fc4

15 BHK 570 cells (ATCC NO: CRL-10314) were plated in T-75 tissue culture flasks and allowed to grow to approximately 50 to 70% confluence at 37°C, 5% CO₂, in DMEM/FBS media (DMEM, Gibco/BRL High Glucose, (Gibco BRL, Gaithersburg, MD), 5% fetal bovine serum, 1 mM L-glutamine (JRH Biosciences, Leno, KS), 1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL)). The cells were then transfected
20 with the plasmid zcytor19/Fc4/pzmp20 (Example 4B) using LipofectamineTM (Gibco BRL), in serum free (SF) media formulation (DMEM, 10 mg/ml transferrin, 5 mg/ml insulin, 2 mg/ml fetuin, 1% L-glutamine and 1% sodium pyruvate). Ten μ g of the plasmid DNA zcytor19/Fc4/pzmp20 (Example 4B) was diluted into a 15ml tube to a total final volume of 500 μ l with SF media. 50 μ l of Lipofectamine was mixed with
25 450 μ l of SF medium. The Lipofectamine mix was added to the DNA mix and allowed to incubate approximately 30 minutes at room temperature. Four ml of SF media was added to the DNA:Lipofectamine mixture. The cells were rinsed once with 5 ml of SF media, aspirated, and the DNA:Lipofectamine mixture was added. The cells were incubated at 37°C for five hours, and then 5 ml of DMEM/10%FBS media was added.
30 The flask was incubated at 37°C overnight after which time the cells were split into the selection media (DMEM/FBS media from above with the addition of 1 μ M

methotrexate (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.) in 150 mm plates at 1:2, 1:10, and 1:50. Approximately 10 days post-transfection, one 150 mm plate of 1 μ M methotrexate resistant colonies was trypsinized, the cells were pooled, and one-half of the cells were replated in 10 μ M methotrexate; to further amplify expression of the zcytor19/Fc4 protein. A conditioned-media sample from this pool of amplified cells was tested for expression levels using SDS-PAGE and Western analysis.

Single clones expressing the soluble receptors can also isolated, screened and grown up in cell culture media, and purified using standard techniques. Moreover, CHO cells are also suitable cells for such purposes.

Example 6

Assessing Zcytor19 Receptor Heterodimerization Using ORIGEN Assay

Soluble zcytor19 receptor zcytor19CFLAG (Example 4 and Example 5), 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 zcytor19 receptor and another soluble receptor subunit, for example, soluble class II cytokine receptors, for example, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) soluble receptors. Receptors in this subfamily may associate to form homodimers that transduce a signal. These soluble receptors 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 zcytor19 receptor can be respectively designated Bio-zcytor19 receptor and Ru-zcytor19; 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 that binds zcytor19 heterodimeric receptors, or using purified ligands. Preferred ligands are those that can bind class II heterodimeric cytokine receptors such as, IL-10, IL-9, IL-TIF, interferons, TSLP (Levine, SD et al., *ibid.*; Isaksen, DE et al., *ibid.*; Ray, RJ et al., *ibid.*; Friend, SL et al., *ibid.*), and the like.

For initial receptor binding characterization a panel of cytokines or conditioned medium are tested to determine whether they can mediate homodimerization of zcytor19 receptor and if they can mediate the heterodimerization of zcytor19 receptor with the soluble receptor subunits described above. To do this, 50 μ l of conditioned media or TBS-B containing purified cytokine, is combined with 50 μ l of TBS-B (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mg/ml BSA, pH 7.2) containing e.g., 400 ng/ml of Ru-zcytor19 receptor and Bio-zcytor19, or 400 ng/ml of Ru-zcytor19 receptor and e.g., Bio-gp130, or 400 ng/ml of e.g., Ru-classIIsubunit and Bio-zcytor19. Following incubation for one hour at room temperature, 30 μ g of streptavidin coated, 2.8 mm magnetic beads (Dyna, Inc., Oslo, Norway) are added and the reaction incubated an additional hour at room temperature. 200 μ l ORIGEN assay buffer (Igen, Inc., Gaithersburg, MD) is then added and the extent of receptor association measured using an M8 ORIGEN analyzer (Igen, Inc.).

15 Example 7

Construct for Generating a zcytor19 Receptor Heterodimer

A vector expressing a secreted human zcytor19 heterodimer is constructed. In this construct, the extracellular cytokine-binding domain of zcytor19 is fused to the heavy chain of IgG gamma 1 (IgG γ 1) (SEQ ID NO:14 and SEQ ID NO:15), while the extracellular portion of the heteromeric cytokine receptor subunit (E.g., class II cytokine receptors, for example, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors)) is fused to a human kappa light chain (human κ light chain) (SEQ ID NO:16 and SEQ ID NO:17).

A. Construction of IgG gamma 1 and human κ light chain fusion vectors

The heavy chain of IgG γ 1 (SEQ ID NO:14) is cloned into the Zcm229R 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 IgG γ 1 fusion. The IgG γ 1 fragment used in this construct is made by using PCR to isolate the IgG γ 1

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 that comprise an MluI/EcoRI linker, into Zem229R previously digested with and EcoRI using standard molecular biology techniques disclosed herein.

The human κ light chain (SEQ ID NO:16) is cloned in the Zem228R mammalian expression vector (ATCC deposit No. 69446) such that any desired cytokine receptor extracellular domain having a 5' EcoRI site and a 3' KpnI site can be cloned in resulting in a N-terminal cytokine extracellular domain-C-terminal human κ light chain fusion. As a KpnI site is located within the human κ light chain sequence (cleaved by the KpnI enzyme after nucleotide 62 in SEQ ID NO:16), 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 (SEQ ID NO:16). 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 SEQ ID NO:16. 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 zcytor19 receptor or heterodimeric subunit extracellular domains into fusion vector constructs

Using the construction vectors above, a construct having zcytor19 fused to IgG γ 1 is made. This construction is done by PCRing the extracellular domain or cytokine-binding domain of zcytor19 receptor described herein from a prostate cDNA library (Clontech) or activated lymphocyte cDNA library 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 zcytor19/IgG gamma 1 fusion (zcytor19/Ch1 IgG) is correct.

5 A separate construct having a heterodimeric cytokine receptor subunit extracellular domain fused to κ light is also constructed as above. The cytokine receptor/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
10 and KpnI and 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.

15 D. Co-expression of the zcytor19 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 LipofectaminePlusTM reagent (Gibco/BRL), as per manufacturer's instructions. The
20 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 10 days.

The resulting pool of doubly selected cells is used to generate protein.
25 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
30 methods.

Example 8Reconstitution of zcytor19 Receptor *in vitro*

To identify components involved in the zcytor19-signaling complex, receptor reconstitution studies are performed as follows. For example, 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 zcytor19 receptor complex to the luciferase reporter in the presence of zcytor19 Ligand. BHK cells would be used in the event that BHK cells do not endogenously express the zcytor19 receptor. Other cell lines can be used. An exemplary luciferase reporter mammalian expression vector is the KZ134 plasmid which is 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 are ligated, using standard methods, into a recipient firefly luciferase reporter vector with a c-Fos promoter (Poulsen, L.K. et al., *J. Biol. Chem.* 273:6229-6232, 1998) digested with the same enzymes and containing a neomycin selectable marker. The KZ134 plasmid is used to stably transfect BHK, or BaF3 cells, using standard transfection and selection methods, to make a BHK/KZ134 or BaF3/KZ134 cell line respectively.

The bioassay cell line is transfected with zcytor19 receptor alone, or co-transfected with zcytor19 receptor along with one of a variety of other known receptor subunits. Receptor complexes include but are not limited to zcytor19 receptor only, various combinations of zcytor19 receptor with class II cytokine receptors, for example, interferon-gamma, alpha and beta chains and the interferon-alpha/beta receptor alpha and beta chains, zcytor11 (commonly owned US Patent No. 5,965,704), CRF2-4, DIRS1, zcytor7 (commonly owned US Patent No. 5,945,511) receptors. Each independent receptor complex cell line is then assayed in the presence of cytokine-

WO 02/44209

PCT/US01/44808

127

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 zcytor19 receptor in the presence of the correct receptor complex, is expected to give a luciferase readout of approximately 5 fold over background or greater.

As an alternative, a similar assay can be performed wherein the a Baf3/zcytor19 cell line is co-transfected as described herein and proliferation is measured, using a known assay such as a standard Alamar Blue proliferation assay.

Example 9

COS Cell Transfection and Secretion Trap

A secretion trap assay can be used to identify the zcytor19 receptor ligand. Since zcytor19 is a Class II cytokine receptor, the binding of zcytor19sR/Fc4 fusion protein with known or orphan 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) are transfected into COS cells, and the binding of zcytor19sR/Fc4 to transfected COS cells are carried out using the secretion trap assay described below. Positive binding in this assay shows potential zcytor19 receptor-ligand pairs.

A. COS Cell Transfections

The COS cell transfection was performed as follows: Mix 0.75 μ g cytokine DNA in 50 μ l serum free DMEM media (55mg sodium pyruvate, 146mg L-glutamine, 5mg transferrin, 2.5mg insulin, 1 μ g selenium and 5mg fetuin in 500ml DMEM (Gibco BRL)), with 5 μ l LipofectamineTM and 45 μ l serum free DMEM media. Incubate at room temperature for 30 minutes and then add 400 μ l serum free DMEM media. Add this 500 μ l mixture onto 1.5x10⁵ COS cells/well plated on 12-well tissue culture plate and incubate for 5 hours at 37°C. Add 500 μ l 20% FBS DMEM media (100 ml FBS, 55mg sodium pyruvate and 146mg L-glutamine in 500ml DMEM) and incubate overnight.

B. Secretion Trap Assay

WO 02/44209

PCT/US01/44808

128

The secretion trap was performed as follows: Media was rinsed off cells with PBS and then fixed for 15 minutes with 1.8% Formaldehyde in PBS. Cells were then washed 2 times with TNT (0.1M Tris-HCL, 0.15M NaCl, and 0.05% Tween-20 in H₂O), and permeabilized with 0.1% Triton-X in PBS for 15 minutes, and washed 3 times 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) in H₂O. The cells were incubated for 1 hour with 1µg/ml, 0.5µg/ml, or 0.25µg/ml zcytor19-Fc4 soluble receptor fusion protein (Example 10) in TNB. Cells were then washed 3 times with TNT and were incubated for another hour with 1:1000 diluted goat-anti-human Ig-HRP (Fc specific) (Jackson Immuno Research) in TNB. Again cells were washed with TNT.

Positive binding was detected with fluorescein tyramide reagent diluted 1:50 in dilution buffer (NEN kit) and incubated for 4.5 minutes, and washed with TNT. Cells were preserved with Vectashield Mounting Media (Vector Labs Burlingame, CA) diluted 1:5 in TNT. Cells were visualized using a FITC filter on fluorescent microscope.

Since zcytor19 is a Class II cytokine receptor, the binding of zcytor19sR/Fc4 fusion protein with known or orphan cytokines is tested. The pZP7 expression vectors containing cDNAs of cytokines (including human IL-TIF, interferon alpha, interferon beta, interferon gamma, IL-10, amongst others are transfected into COS cells, and the binding of zcytor19sR/Fc4 to transfected COS cells are carried out using the secretion trap assay described above. Positive binding in this assay shows potential zcytor19 receptor-ligand pairs.

25

Example 10

Expression of human zcytor19 in E. coli

A. Construction of zcytor19-MBP fusion expression vector pTAP170/zcytor19

An expression plasmid containing a polynucleotide encoding part of the human zcytor19 fused N-terminally to maltose binding protein (MBP) was constructed via homologous recombination. A fragment of human zcytor19 cDNA (SEQ ID NO:1)

30

was isolated using PCR. Two primers were used in the production of the human zcytor19 fragment in a PCR reaction: (1) Primer ZC39204 (SEQ ID NO:30), containing 40 bp of the vector flanking sequence and 24 bp corresponding to the amino terminus of the human zcytor19, and (2) primer ZC39205 (SEQ ID NO:31), containing 40 bp of the 3' end corresponding to the flanking vector sequence and 24 bp corresponding to the carboxyl terminus of the human zcytor19. The PCR reaction conditions were as follows: 1 cycle of 94°C for 1 minute. Then 20 cycles of 94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, and 68°C for 1.5 minutes; followed by 4°C soak, run in duplicate. Five µl of each 100 µl PCR reaction were run on a 1.0% agarose gel with 1 x TBE buffer for analysis, and the expected band of approximately 700 bp fragment was seen. The remaining 95 µl of PCR reaction was combined with the second PCR tube precipitated with 400 µl of absolute ethanol and resuspended in 10µl of water to be used for recombining into the SmaI cut recipient vector pTAP170 to produce the construct encoding the MBP-human zcytor19 fusion, as described below.

Plasmid pTAP170 was 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 pTAP170 was constructed using yeast homologous recombination. 100ng of EcoRI cut pMAL-c2 was recombined with 1µg PvuI cut pRS316, 1µg linker, and 1µg ScaI/EcoRI cut pRS316. The linker consisted of oligos zc19,372 (100pmole): zc19,351 (1pmole): zc19,352 (1pmole), and zc19,371 (100pmole) combined in a PCR reaction. Conditions were as follows: 10 cycles of 94°C for 30 seconds, 50°C for 30 seconds, and 72°C for 30 seconds; followed by 4°C soak. PCR products were concentrated via 100% ethanol precipitation.

One hundred microliters of competent yeast cells (*S. cerevisiae*) were combined with 10 µl of a mixture containing approximately 1 µg of the human zcytor19 insert, and 100 ng of SmaI digested pTAP170 vector, and transferred to a 0.2 cm electroporation cuvette. The yeast/DNA mixture was electropulsed at 0.75 kV (5

WO 02/44209

PCT/US01/44808

130

kV/cm), infinite ohms, 25 μ F. To each cuvette was added 600 μ l of 1.2 M sorbitol. The yeast was then plated in two 300 μ l aliquots onto two -URA D plates and incubated at 30°C.

After about 48 hours, the Ura⁺ yeast transformants from a single plate were resuspended in 1 ml H₂O and spun briefly to pellet the yeast cells. The cell pellet was resuspended in 1 ml of lysis buffer (2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA). Five hundred microliters of the lysis mixture was added to an Eppendorf tube containing 300 μ l acid washed glass beads and 500 μ l phenol-chloroform, vortexed for 1 minute intervals two or three times, followed by a 5 minute spin in a Eppendorf centrifuge at maximum speed. Three hundred microliters of the aqueous phase was transferred to a fresh tube, and the DNA precipitated with 600 μ l ethanol (EtOH), followed by centrifugation for 10 minutes at 4°C. The DNA pellet was resuspended in 100 μ l H₂O.

Transformation of electrocompetent *E. coli* cells (MC1061, Casadaban et. al. *J. Mol. Biol.* 138, 179-207) was done with 1 μ l yeast DNA prep and 40 μ l of MC1061 cells. The cells were electropulsed at 2.0 kV, 25 μ F and 400 ohms. Following electroporation, 0.6 ml SOC (2% Bacto[®] Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0.5% yeast extract (Difco), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) was added to the cells. After incubation for one hour at 37°C, the cells were plated in one aliquot on LB Kan plates (LB broth (Lennox), 1.8% Bacto[™] Agar (Difco), 30 mg/L kanamycin).

Individual clones harboring the correct expression construct for human zcytor19 were identified by expression. Cells were grown in Superbroth II (Becton Dickinson) with 30 μ g/ml of kanamycin overnight. 50 μ l of the overnight culture was used to inoculate 2 ml of fresh Superbroth II +30 μ g/ml kanamycin. Cultures were grown at 37°C, shaking for 2 hours. 1ml of the culture was induced with 1mM IPTG. 2-4 hours later the 250 μ l of each culture was mixed 250 μ l Thorner buffer with 5% β ME and dye (8M urea, 100 mM Tris pH7.0, 10% glycerol, 2mM EDTA, 5% SDS). Samples were boiled for 5-10 minutes. 20 μ l were loaded per lane on a 4%-12% PAGE gel (NOVEX). Gels were run in 1X MES buffer. The positive clones were designated pTAP317 and subjected to sequence analysis. The polynucleotide sequence of MBP-

WO 02/44209

PCT/US01/44808

131

zcyltor19 fusion within pTAP317 is shown in SEQ ID NO:32, and the corresponding polypeptide sequence of the MBP-zcyltor19 fusion is shown in SEQ ID NO:33.

B. Bacterial Expression of human zcyltor19.

5 Ten microliters of sequencing DNA was digested with NotI (NEB) in the following reaction to remove the CEN-ARS: 10µl DNA, 3µl buffer3 (NEB), 15µl water, and 2µl NotI (10U/µl NEB) at 37°C for one hour. Then 7µl of the digest was mixed with 2µl of 5X buffer and T4DNA ligase (1u/µl BRL). Reaction was incubated at room temperature for one hour. One microliter of the reaction was transformed into 10 the E.coli strain W3110 (ATCC). The cells were electropulsed at 2.0 kV, 25 µF and 400 ohms. Following electroporation, 0.6 ml SOC (2% Bacto™ Tryptone (Difco, Detroit, MI), 0.5% yeast extract (Difco), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glucose) was added to the cells. After a one hour incubation at 37°C, the cells were plated in one aliquot on LB Kan plates (LB broth (Lennox), 1.8% Bacto™ 15 Agar (Difco), 30 mg/L Kanamycin). Individual clones were analyzed by diagnostic digests for the absence of yeast marker and replication sequence.

A positive clone was used to inoculate an overnight starter culture of Superbroth II (Becton Dickinson) with 30 µg/ml of kanamycin. The starter culture was used to inoculate 4 2L-baffled flasks each filled with 500ml of Superbroth II+Kan. 20 Cultures shook at 37°C at 250rpm until the OD₆₀₀ reached 4.1. At this point, the cultures were induced with 1mMIPTG. Cultures grew for two more hours at 37°C, 250rpm at which point 2ml was saved for analysis and the rest was harvested via centrifugation. Pellet was saved at -80°C until transferred to protein purification.

25

Example 11

Purification scheme for zcyltor19-FC4 fusion

All procedures performed at 4C, unless otherwise noted. The conditioned media was concentrated first 20 times by using an Amicon/ Millipore Spiral cartridge, 10 kD MWCO. (at ambient temperature) The concentrated media was then applied to an appropriately sized POROS 50 A (coupled protein A) column at an 30 optimal capture flow rate. The column was washed with 10 column volumes (CV) of

WO 02/44209

PCT/US01/44808

132

equilibration buffer, then rapidly eluted with 3 CV of 0.1 M Glycine pH 3. The collected fractions had a predetermined volume of 2M TRIS pH 8.0 added prior to the elution to neutralize the pH to about 7.2.

Brilliant Blue (Sigma) stained NuPAGE gels were ran to analyze the elution. Fractions of interested were pooled and concentrated using a 30 kD MWCO centrifugal concentrator to a nominal volume. The concentrated Protein A pool was injected onto an appropriately sized Pharmacia Sephacryl 200 column to remove aggregates and to buffer exchange the protein into PBS pH 7.3. Brilliant Blue (Sigma) stained NuPAGE gels were again used to analyze the elution. Fractions were pooled. Western and Brilliant Blue (Sigma) stained NuPAGE gels were ran to confirm purity and content. For further analysis, the protein was submitted for AAA, and N-terminal sequencing. AAA analysis and N-terminal sequencing verified the zcytor19-Fc polypeptide; the N-terminal amino acid sequence was as expected SRPRL APPQX VTLLS QNFSV (SEQ ID NO:34).

Example 12

Human Zcytor19 Expression Based on RT-PCR Analysis of Multiple Tissue and Blood

Fraction First-Strand cDNA Panels

Gene expression of zcytor19 was examined using commercially available normalized multiple tissue first-strand cDNA panels (OriGene Technologies, Inc. Rockville, MD; BD Biosciences Clontech, Palo Alto, CA). These included OriGene's Human Tissue Rapid-Scan™ Panel (containing 24 different tissues) and the following BD Biosciences Clontech Multiple Tissue cDNA (MTC™) Panels: Human MTC Panel I (containing 8 different adult tissues), Human MTC Panel II (containing 8 different adult tissues), Human Fetal MTC Panel (containing 8 different fetal tissues), Human Tumor MTC Panel (containing carcinomas from 7 different organs), Human Blood Fractions MTC Panel (containing 9 different blood fractions), and Human Immune System MTC Panel (containing 6 different organs and peripheral blood leukocyte).

PCR reactions were set up using zcytor19 specific oligo primers ZC40285 (SEQ ID NO:35) and ZC40286 (SEQ ID NO:36) which yield a 426 bp

product, Qiagen HotStarTaq DNA Polymerase (Qiagen, Inc., Valencia, CA) and RediLoad™ dye (Research Genetics, Inc., Huntsville, AL). The PCR cycling conditions were as follows: an initial 1 cycle 15 minute denaturation at 95°C, 35 cycles of a 45 second denaturation at 95°C, 1 minute annealing at 63°C and 1 minute and 15 seconds extension at 72°C, followed by a final 1 cycle extension of 7 minutes at 72°C. The reactions were separated by electrophoresis on a 2% agarose gel (EM Science, Gibbstown, NJ) and visualized by staining with ethidium bromide.

A DNA fragment of the correct size was observed in the following human adult tissues: adrenal gland, bone marrow, colon, heart, liver, lung, lymph node, muscle, ovary, pancreas, placenta, prostate, salivary gland, small intestine, spleen, stomach, testis, thyroid, and tonsil. A DNA fragment of the correct size was observed in the following human fetal tissues: heart, liver, lung, kidney, skeletal muscle, spleen, and thymus. A DNA fragment of the correct size was observed in the following human blood fractions: peripheral blood leukocyte, mononuclear cells (B-cells, T-cells, and monocytes), resting CD8+ cells (T-suppressor/cytotoxic), resting CD19+ cells (B-cells), activated CD19+ cells, activated mononuclear cells, and activated CD4+ cells. A DNA fragment of the correct size was observed in the following tumor tissues: breast carcinoma, colon adenocarcinoma, lung carcinoma, ovarian carcinoma, pancreatic adenocarcinoma, and prostatic adenocarcinoma.

Because zcytor19 is expressed in these specific tumor tissues, zcytor19 polynucleotides, polypeptides and antibodies can be used as a tumor marker as disclosed herein. Moreover, an antibody to zcytor19 could have anti-tumor activity, as well as toxin-conjugates, cytokine conjugates or other conjugates of an antibody, or the zcytor19 receptor ligand itself. The antagonist of zcytor19 ligand, such as anti-zcytor19 antibodies or soluble receptors can also act as anti-tumor reagents.

Example 13

Generation and Analysis of zcytor19 KO mice

A. Identification of BAC clones positive for mouse zcytor19 gene

One BAC clone positive for mouse zcytor19 gene was identified using Incyte Genomic's (St. Louis, Missouri) Easy-to-Screen DNA Pools, BAC Mouse ES

(Release I) following Manufacturer's instructions. Oligonucleotides were designed to generate a PCR fragment containing partial exon 6, complete intron 6 and partial exon 7 sequences.

5 PCR reactions were carried out in 25 μ l using 1.75 units of Advantage 2 polymerase (Clontech). Either 2 μ l or 10 μ l of BAC library DNA was used as template in buffer containing 67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.7 mM MgCl_2

5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 μ g/ml gelatin, 10% Dimethyl Sulfoxide, 1 mM deoxynucleotides, 140 nM forward primer ZC39128 (SEQ ID NO:37) and 140 nM reverse primer ZC39129 (SEQ ID NO:38). PCR conditions were as follows 95°C for 1 min.; 30 cycles of 95°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, and 68°C for 30 seconds; and 68°C for 2 minutes; followed by a 4°C hold. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Positive PCR products were found to be 1,149 bp.

15 Four additional BAC clones positive for mouse zcytor19 gene were identified using Incyte's BAC Mouse Filter Set (Release II) following Manufacturer's instructions. Oligonucleotides were designed to generate a PCR fragment containing partial exon 6, and partial exon 7 sequences from mouse cDNA template.

20 PCR reactions were carried out in 25 μ l using 1.75 units of Advantage 2 polymerase (Clontech). 2 μ l of Neonatal Mouse skin cDNA library (JAK 062700B) was used as template in buffer containing 67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.7 mM MgCl_2

5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 μ g/ml gelatin, 10% Dimethyl Sulfoxide, 1 mM deoxynucleotides, 140 nM forward primer ZC39128 (SEQ ID NO:37) and 140 nM reverse primer ZC39129 (SEQ ID NO:38). PCR conditions were as described above. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and purified using Qiaquick (Qiagen) gel extraction kit. The isolated, approximately 400 bp, DNA fragment was labeled using Prime-It II (Stratagene) Random Primer labeling kit and purified using MicroSpin S-200HR columns (AmershamPharmacia).

25 The labeled probe was used to screen Incyte's 7 filter BAC library set.
30 Hybridizations were carried out at 55°C overnight using ExpressHyb (Clontech).

Filters were then washed 3 times for 30 minutes at 50°C with 0.1 XSSC, 0.1%SDS, autoradiographed overnight and compared to manufacturer's grid patterns to identify positive clones.

5 B. Characterization of zcytor19 mouse positive BACs.

Five zcytor19 mouse positive BAC clones from 129/SvJ Embryonic Stem Cell libraries (Release I and II) were obtained from Incyte Genomics. BAC clones were grown within *Escherichia coli* host strain DH10B in liquid media and extracted using BAC large plasmid purification kit MKB-500 (Incyte Genomics) according to manufacturer's instructions. 4 of 5 BACs were found to contain at least 2,000 bp of 5' untranslated region, exon1, and exon 5 as determined by PCR. 100 ng of each BAC DNA was used as template using the following conditions: PCR reactions were carried out in 25 µl using 1.75 units of Advantage 2 polymerase (Clontech) in buffer containing 67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM (NH₄)₂SO₄, 6.7 mM MgCl₂, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 µg/ml gelatin, 10% Dimethyl Sulfoxide, 1 mM deoxynucleotides, 140 nM forward and 140 nM reverse primer. PCR conditions were as follows 95°C for 1 min.; 30 cycles of 95°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, and 68°C for 30 seconds; and 68°C for 2 minutes; followed by a 4°C hold. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Using forward primer ZC40784 (SEQ ID NO:39) and reverse primer ZC40785 (SEQ ID NO:40) partial 5' UTR was amplified and found to be 957 bp. Using forward primer ZC40786 (SEQ ID NO:41) and reverse primer ZC40787 (SEQ ID NO:42) partial 5' UTR, complete exon 1 and partial intron 1 was amplified and found to be approximately 950 bp. Using forward primer ZC39128 (SEQ ID NO:37) and forward primer ZC39129 (SEQ ID NO:38) containing partial exon 6, complete intron 6 and partial exon 7 sequence was amplified and found to be 1,149 bp.

Four of the 5 BAC clones were found to contain at least 3,796 bp of 5' UTR and at 6,922 bp of 3' UTR by Southern Blot analysis. Oligonucleotides ZC40784 (SEQ ID NO:39) and ZC39129 (SEQ ID NO:38) were end labeled using T4 polynucleotide kinase (Roche) and used to probe Southern Blots containing 5 BAC candidates digested with restriction endonucleases EcoRI (Life Technologies) and XbaI

WO 02/44209

PCT/US01/44808

136

(New England Biolabs). Results indicated 4 of 5 BACs contained at least 3,796 bp of 5' UTR and 5 of 5 BACs contained at least 6,922 bp of 3' UTR.

C. Determination of zcytor19 mouse intron 6 sequence.

5 Oligonucleotides were designed to generate a PCR fragment containing partial exon 6, complete intron 6 and partial exon 7 sequences.

PCR reactions were carried out in 25 μ l using 1.75 units of Advantage 2 polymerase (Clontech). 100 ng of 129/Sv mouse genomic DNA was used as template in buffer containing 67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.7 mM MgCl_2 , 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 μ g/ml gelatin, 10% Dimethyl Sulfoxide, 1 mM deoxynucleotides, 140 nM forward primer ZC39128 (SEQ ID NO:37) and 140 nM reverse primer ZC39129 (SEQ ID NO:38). PCR conditions were as described above. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and found to be 1,149 bp. PCR products were then purified using Qiaquick (Qiagen) PCR purification kit.

15 Determination of intron 6 sequence was made by sequence analysis using oligos ZC39128 (SEQ ID NO:37) and ZC 39129 (SEQ ID NO:38).

D. Determination of zcytor19 mouse intron 5 sequence

Oligonucleotides were designed to generate a PCR fragment containing partial exon5, complete intron5 and partial exon6. PCR reactions were carried out in 25 μ l using 1.75 units of Advantage 2 polymerase (Clontech). 100 ng of 129/Sv mouse genomic DNA was used as template in buffer containing 67 mM Tris pH 8.8, 16.6 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 6.7 mM MgCl_2 , 5 mM 2-Mercaptoethanol, 100 μ g/ml gelatin, 10% Dimethyl Sulfoxide, 1 mM deoxynucleotides, 140 nM forward primer ZC39408 (SEQ ID NO:43) and 140 nM reverse primer ZC39409 (SEQ ID NO:44). PCR conditions were as follows 95°C for 1 min.; 30 cycles of 95°C for 15 seconds, 55°C for 30 seconds, and 68°C for 30 seconds; and 68°C for 2 minutes; followed by a 4°C hold. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and found to be 356 bp. PCR products were then purified using Qiaquick (Qiagen) PCR purification kit.

25

30 Determination of intron 6 sequence was made by sequence analysis using oligos ZC39408 (SEQ ID NO:43) and ZC 39409 (SEQ ID NO:44).

E. Design of oligonucleotides for generating of KO constructs of the mouse zcytor19 gene

5 To investigate biological function of zcytor19 gene, a knockout mouse model is being generated by homologous recombination technology in embryonic stem (ES) cells. In this model, the coding exon 1, 2 and 3 are deleted to create a null mutation of the zcytor19 gene. This deletion removes the translation initiation codon, the signal domain and part of the extracellular domain of the zcytor19 protein, thus inactivating the zcytor19 gene.

10 ET cloning technique will be used to generate the KO vector (Stewart et al, Nucl. Acids Res. 27:6, 1999) First, Kanomycin resistance cassette is used to replace introns 1, 2 and 3 of zcytor19 mouse gene. A forward knockout oligonucleotide (SEQ ID NO:45) was designed to be 121 nucleotides in length, having 52 bp of homology to the 5'UTR of zcytor19m a 42 bp linker having *SfiI*, *FseI*, *BamHI* and *HindIII* restriction sites and 27 bp of homology to the 5' end of the Kanomycin resistance cassette. A reverse knockout oligonucleotide (SEQ ID NO:46) was designed to be 125 nucleotides in length, having 50 bp of homology to intron 3 of zcytor19 mouse, a 48 bp linker having *SfiI*, *AscI*, *BamHI* and *HindIII* restriction sites and 27 bp of homology to the 3' end of the Kanomycin resistance cassette. The above oligonucleotides can be used to synthesize a PCR fragment 1073 bp in length containing the entire Kanomycin resistance cassette with the first 52 bp having homology to the 5' UTR of zcytor19 mouse and the last 50 bp having homology to intron 3.

20 The fragment will then be used to construct a Knockout vector through ET Cloning, in which cytor19 mouse positive BAC cell hosts are made competent through treatment with glycerol then transfected with the plasmid pBADalpha/beta/gamma(Amp). Resistance to chloramphenical and ampicillin selects for transformed cell. Cells are then re-transformed with the Kanomycin PCR fragment containing homology arms. The Beta and gamma recombination proteins of pBADalpha/beta/gamma(Amp) are induced by the addition of arabinose to the growth media through the activation of the Red alpha gene. Recombinant BACs are selected for by resistance to kanomycin and ampicillin then screened by PCR. Once a

recombinant BAC is identified a fragment is subcloned containing at least 1,800 bp of sequence upstream of kanomycin resistance cassette insertion and at least 6,000 bp of sequence downstream into a pGEM7 derived vector. The Kanomycin resistance cassette is then replaced by standard ligation cloning with a IRES/LacZ/Neo-MC1 cassette. The IRES is an internal ribosome entry sequence derived from encephalomyocarditis virus. It is fused in-frame to the reporter lacZ gene, linked to a polyA signal. Downstream of the IRES/LacZ reporter gene, MC1 promoter drives the expression of a G418 resistance selectable marker *Neo* gene. The selectable maker cassette contains termination codons in all three reading frames. Thus, the drug resistance gene Neo is used for selection of homologous recombination events in embryonic stem (ES) cells. IRES/LacZ reporter gene will be used to monitor the expression of the replaced gene after homologous recombination. Homologous recombination of the knockout vector and the target locus in ES cells leads to the replacement of a total 17,980 bp, including complete exons 1, 2 and 3, of the wild type locus with the IRES/LacZ/Neo-MC1 cassette, which is about 5,200 bp in length.

F. Generation of zCyt19 KO mice

The KO vector, described above, is linearized by PmeI digestion, and electroporated into ES cells. Homologous recombination events are identified by PCR screening strategy, and confirmed by Southern Blot Analysis, using a standard KO protocol. See, A. L. Joyner, Gene Targeting. A Practical Approach, IRL Press 1993.

Once homologous recombination events are identified, ES cells will be expanded, and injected into blastocysts to generate chimeras. Chimeric males will be used to breed to C57black females to achieve germ line transmission of the null mutation, according to standard procedures. See Hogan, B. et al., Manipulating the Mouse Embryo. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994.

Heterozygous KO animals will be bred to test biological functions of the zcytor19 gene. Of offspring produced, $\frac{1}{4}$ should be wild type, $\frac{1}{2}$ should be heterozygous, and $\frac{1}{4}$ should be homozygous. Homozygous will be analyzed in details as described below.

G. Microscopic evaluation of tissues from zcytor19 homozygous animals.

Since zcytor19 is expressed in following tissues, we will examine these tissues carefully: colon, ovary placenta, pituitary, lymph node, small intestine, salivary gland, rectum, prostate, testis, brain, lung, kidney, thyroid, spinal cord, bone marrow, and cervix.

Spleen, thymus, and mesenteric lymph nodes are collected and prepared for histologic examination from transgenic animals expressing zcytor19. Other tissues which are routinely harvested included the following: Liver, heart, lung, spleen, thymus, mesenteric lymph nodes, kidney, skin, mammary gland, pancreas, stomach, small and large intestine, brain, salivary gland, trachea, esophagus, adrenal, pituitary, reproductive tract, accessory male sex glands, skeletal muscle including peripheral nerve, and femur with bone marrow. The tissues are harvested from homozygous animals as well as wild type controls. Samples are fixed in 10% buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, sectioned at 5 microns, and stained with hematoxylin and eosin. The slides are examined for histological, and pathological changes, such as inflammatory reactions, and hypo-proliferation of certain cell types.

H. Flow cytometric analysis of tissues from homozygous mouse mutants missing zcytor19.

Homozygous animals missing zcytor19 gene are to be sacrificed for flow cytometric analysis of peripheral blood, thymus, lymph node, bone marrow, and spleen.

Cell suspensions are made from spleen, thymus and lymph nodes by teasing the organ apart with forceps in ice cold culture media (500 ml RPMI 1640 Medium (JRH Biosciences, Lenexa, KS); 5 ml 100x L-glutamine (Gibco BRL, Grand Island, NY); 5 ml 100x Na Pyruvate (Gibco BRL); 5 ml 100X Penicillin, Streptomycin, Neomycin (PSN) (Gibco BRL) and then gently pressing the cells through a cell strainer (Falcon, VWR Seattle, WA). Peripheral blood (200 ml) is collected in heparinized tubes and diluted to 10mls with HBSS containing 10U Heparin/ml. Erythrocytes are removed from spleen and peripheral blood preparations by hypotonic lysis. Bone marrow cell suspensions are made by flushing marrow from femurs with ice-cold culture media. Cells are counted and tested for viability using Trypan Blue (GIBCO

WO 02/44209

PCT/US01/44808

140

BRL, Gaithersburg, MD). Cells are resuspended in ice cold staining media (HBSS, 1% fetal bovine serum, 0.1% sodium azide) at a concentration of ten million per milliliter. Blocking of Fc receptor and non-specific binding of antibodies to the cells was achieved by adding 10% normal goat sera and Fc Block (PharMingen, La Jolla, CA) to the cell suspension.

Cell suspensions are mixed with equal volumes of fluorochrome labeled monoclonal antibodies (PharMingen), incubated on ice for 60 minutes and then washed twice with ice cold wash buffer (PBS, 1% fetal bovine serum, 0.1% sodium azide) prior to resuspending in 400 ml wash buffer containing 1mg/ml 7-AAD (Molecular Probes, Eugene, OR) as a viability marker in some samples. Flow data was acquired on a FACSCalibur flow cytometer (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA). Both acquisition and analysis were performed using CellQuest software (BD Immunocytometry Systems).

The cell populations in all lymphoid organs will be analyzed to detect abnormalities in specific lineages of T cell, B cell, or other lymphocytes, and cellularity in these organs.

Example 14

Identification of cells expressing zcytor19 using *in situ* hybridization

Human tissues from cervical carcinoma, normal and carcinoma colon, duodenum, endometrial carcinoma, normal and carcinoma ovary, uterus, heart, liver, lung, muscle sarcoma, and normal and carcinoma skin were screened for zcytor19 expression by *in situ* hybridization. The tissues were fixed in 10% buffered formalin and blocked in paraffin using standard techniques. Tissues were sectioned at 5 microns. Tissues were prepared using a standard protocol ("Development of non-isotopic *in situ* hybridization" at <http://dir.niehs.nih.gov/dirlep/fish.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 23°C for 4-15 minutes. This step was followed by acetylation and re-hydration of the tissues.

One *in situ* probe was designed against the human zcytor19 sequence. Plasmid DNA 100933 was digested with restriction enzyme HindIII, which covers 0.7kb from the end of 3'UTR. The T-7 RNA polymerase was used to generate an antisense probe. The probe was labeled with digoxigenin (Boehringer) using an *In* 5 *Vitro* transcription System (Promega, Madison, WI) as per manufacturer's instruction.

In situ hybridization was performed with a digoxigenin- or biotin-labeled zcytor19 probe (above). The probe was added to the slides at a concentration of 1 to 5 pmol/ml for 12 to 16 hours at 60°C. Slides were subsequently washed in 2XSSC and 0.1XSSC at 55°C. The signals were amplified using tyramide signal 10 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).

Positive signal were observed in most of carcinoma samples. In cervical carcinoma, carcinoma epithelial cells were positive. There were also some signals in a 15 subset of lymphocytes in the lymphoid follicles. Similarly, both carcinoma and some immune cells were positive in the colon carcinoma samples, while normal colon samples were negative. Weak staining was also in the endometrial carcinoma and ovarian carcinoma, while normal ovary and uterus were negative. There was weak staining in the cancer area of the muscle sarcoma sample. Keratinocytes were positive 20 in the skin carcinoma and Kaposi's sarcoma samples, while no staining was observed in the normal skin. In heart and liver, a subset of cells possibly circulating WBC, were positive for zcytor19. It appears endothelial cells in some vessels may also be positive. In lung, type II pneumocytes and macrophage-like cells were positive. Bronchial epithelium and endothelium were also positive in some lung specimens. In summary, 25 zcytor19 appears to be up-regulated in carcinoma cells. There is low level of zcytor19 mRNA in a subset of lymphocytes and endothelial cells.

Because zcytor19 is expressed in these specific tumor tissues, zcytor19 polynucleotides, polypeptides and antibodies can be used as a tumor marker as disclosed herein. Moreover, an antibody to zcytor19 could have anti-tumor activity, as 30 well as toxin-conjugates, cytokine conjugates or other conjugates of an antibody, or the

zcyc19 receptor ligand itself. The antagonist of zcyc19 ligand, such as anti-zcyc19 antibodies or soluble receptors can also act as anti-tumor reagents.

Example 15

5 Construction of BaF3 Cells Expressing the zcyc19 receptor (BaF3 Zcyc19 cells) with puromycin resistant and zeomycin resistant vectors.

Two types of BaF3 cells expressing the full-length zcyc19 receptor were constructed using 30µg of zcyc19 expression vectors, one resistant to puromycin, one resistant to zeomycin described below. The BaF3 cells expressing the zcyc19 receptor mRNA with puromycin resistance were designated as BaF3/zcyc19-
 10 p. The BaF3 cells expressing the zcyc19 receptor mRNA with zeomycin resistance were designated as BaF3/zcyc19-z

A. Construction of BaF3 Cells Expressing the zcyc19 receptor

BaF3, an interleukin-3 (IL-3) dependent pre-lymphoid cell line derived
 15 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, 2ng/ml murine IL-3 (mIL-3) (R & D, Minneapolis, MN), 2mM L-glutaMax-1™ (Gibco BRL), 1 mM Sodium Pyruvate (Gibco BRL). Prior to
 20 electroporation, pZP-5N/CRF2-4 was prepared and purified using a Qiagen Maxi Prep kit (Qiagen) as per manufacturer's instructions. BaF3 cells for electroporation were washed twice in PBS (Gibco BRL) and then resuspended in RPMI media at a cell density of 10⁷ cells/ml. One ml of resuspended BaF3 cells was mixed with 30 µg of the pZP-7p/zcyc19 plasmid DNA, or 30 µg of the pZP-7z/zcyc19 plasmid DNA, and
 25 transferred to separate disposable electroporation chambers (GIBCO BRL). The cells were given two serial shocks (800 IFad/300 V.; 1180 IFad/300 V.) delivered by an electroporation apparatus (CELL-PORATOR™; GIBCO BRL), with a 1 minute rest between the shocks. 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
 30 (37°C, 5% CO₂). The cells were then spun down and resuspended in 50 ml of complete media containing Puromycin (Clontech) selection (2 µg/ml) for the cells

WO 02/44209

PCT/US01/44808

143

transfected with pZP-7p/zcytor19, or Zeocin selection (1:150-1:333) for the cells transfected with pZP-7z/zcytor19, and placed in a T-162 flask to isolate the antibiotic-resistant pools. Pools of the transfected BaF3 cells, hereinafter called BaF3/zcytor19-puro and BaF3/zcytor19-zeo cells, were assayed for expression of zcytor19 by RT-PCR

5 B. Confirmation of zcytor19 expression by RT-PCR

The BaF3/zcytor19-puro and BaF3/zcytor19-zeo cells were harvested for RNA, which was then put into a reverse transcriptase reaction, and subsequently tested by PCR for the presence of zcytor19.

10 Flasks of cells were grown to confluence, then 10ml were removed and spun down to obtain a cell pellet. RNA was purified from the pellet using the RNeasy Total RNA Purification kit, with the additional RNase-free DNase set (Qiagen), following the manufacturer's protocol. Reverse transcription was then done on the samples using the StrataScript RT-PCR kit (Stratagene), following the manufacturer's protocol through the completion of the RT reaction. PCR was then done by mixing 0.2pmol each of
 15 primers ZC40279 and ZC37863, 0.2mM of dNTP mix (Roche) containing equal amounts of each nucleotide, 5 μ l of 10x cDNA PCR Reaction Buffer (Clontech), 3 μ l DNA from the RT reaction, 0.5 μ l Advantage2 Polymerase (Clontech), made to a final volume of 50 μ l with water. The reaction ran for 95°C, 5 min, then 30 cycles of 95°C 30 sec, 60°C 30 sec, 72°C 1 min, then 72°C 7min and a 4°C soak, on a Perkin
 20 Elmer GeneAmp PCR System 2400. The samples were mixed with 3ml loading dye, and 25ml was run on a 1% OmniPur Agarose (Merck) gel. Zcytor19 bands were detected on the gel for both BaF3/zcytor19-puro and BaF3/zcytor19-zeo, indicating that those cells are expressing the gene.

25 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 02/44209

PCT/US01/44808

144

CLAIMS

What is claimed is:

1. An isolated polynucleotide that encodes a polypeptide comprising an amino acid sequence from the group of:
 - (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);
 - (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);
 - (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);
 - (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);
 - (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);
 - (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);
 - (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);
 - (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);
 - (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);
 - (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);
 - (k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and
 - (l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser).

WO 02/44209

PCT/US01/44808

145

2. An isolated polynucleotide comprising a polynucleotide sequence from the group of:

- (a) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 669;
- (b) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to 678;
- (c) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 747;
- (d) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 748 to nucleotide 1473;
- (e) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from nucleotide 748 to nucleotide 1560;
- (f) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 61 to nucleotide 1473;
- (g) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from nucleotide 61 to nucleotide 1560;
- (h) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:1 from nucleotide 1 to nucleotide 1473;
- (i) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:18 from nucleotide 1 to nucleotide 1560;
- (j) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:20 from nucleotide 61 to nucleotide 489;
- (k) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:20 from nucleotide 61 to nucleotide 633; and
- (l) a polynucleotide comprising a nucleotide sequence as shown in SEQ ID NO:20 from nucleotide 1 to nucleotide 633.

3. An isolated polynucleotide according to claim 1, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide that further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2.

4. An isolated polynucleotide according to claim 1, wherein the polynucleotide encodes a polypeptide that further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2, or 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19.

5. An isolated polynucleotide according to claim 1, wherein the polypeptide encoded by the polynucleotide has activity as measured by cell proliferation, activation of transcription of a reporter gene, or wherein the polypeptide encoded by the polynucleotide further binds to an antibody,

wherein the antibody is raised to a polypeptide comprising a sequence of amino acids from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);
- (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);
- (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);
- (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);
- (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);
- (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);
- (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);
- (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);
- (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);
- (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

147

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and

wherein the binding of the antibody to the isolated polypeptide is measured by a biological or biochemical assay including radioimmunoassay, radioimmuno-precipitation, Western blot, or enzyme-linked immunosorbent assay.

6. An expression vector comprising the following operably linked elements:

a transcription promoter;

a DNA segment encoding a polypeptide from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);

(d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);

(e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);

(f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);

(g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);

(h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);

(i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

148

(j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and

a transcription terminator,

wherein the promoter is operably linked to the DNA segment, and the DNA segment is operably linked to the transcription terminator.

7. An expression vector according to claim 6, further comprising a secretory signal sequence operably linked to the DNA segment.

8. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 7, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA segment.

9. An expression vector according to claim 6, wherein the polypeptide further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2.

10. An expression vector according to claim 6, wherein the polypeptide further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to 491 (Arg) of SEQ ID NO:2 or 250 (Lys) to 520 (Arg) of SEQ ID NO:19.

11. An expression vector according to claim 6, comprising the following operably linked elements:

a transcription promoter;

a DNA segment encoding a polypeptide from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

149

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);

(d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

a transcription terminator,

wherein the promoter is operably linked to the DNA segment, and the DNA segment is operably linked to the transcription terminator.

12. A cultured cell into which has been introduced an expression vector according to claim 11, wherein the cell expresses a soluble receptor polypeptide encoded by the DNA segment.

13. A DNA construct encoding a fusion protein, the DNA construct comprising:

a first DNA segment encoding a polypeptide comprising a sequence of amino acid residues from the group of:

(a) the amino acid sequence of SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met), to amino acid number 20 (Gly);

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);

(d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);

(e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);

(f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 520 (Arg);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

150

(g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 249 (Trp);

(h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 491 (Arg);

(i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 227 (Trp) to amino acid number 520 (Arg);

(j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg); and

(m) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);

(n) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

(o) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(p) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and

at least one other DNA segment encoding an additional polypeptide,
wherein the first and other DNA segments are connected in-frame; and
wherein the first and other DNA segments encode the fusion protein.

14. An expression vector comprising the following operably linked elements:

a transcription promoter;

a DNA construct encoding a fusion protein according to claim 13; 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 02/44209

PCT/US01/44808

151

15. A cultured cell comprising an expression vector according to claim 14, wherein the cell expresses a polypeptide encoded by the DNA construct.

16. A method of producing a fusion protein comprising:
culturing a cell according to claim 15; and
isolating the polypeptide produced by the cell.

17. An isolated polypeptide comprising a sequence of amino acid residues from the group of:

- (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);
- (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);
- (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);
- (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);
- (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);
- (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);
- (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);
- (h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);
- (i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);
- (j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

152

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser).

18. An isolated polypeptide according to claim 17, wherein the polypeptide consists of a sequence of amino acid residues that is from the group of:

(a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);

(d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);

(e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);

(f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);

(g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);

(h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);

(i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);

(j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser).

19. An isolated polypeptide according to claim 17, wherein the polypeptide further comprises a transmembrane domain consisting of residues 227 (Trp) to 249 (Trp) of SEQ ID NO:2.

20. An isolated polypeptide according to claim 17, wherein the polypeptide further comprises an intracellular domain consisting of residues 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg) of SEQ ID NO:2, or 250 (Lys) to amino acid number 520 (Arg) of SEQ ID NO:19.

21. An isolated polynucleotide according to claim 17, wherein the polypeptide has activity as measured by cell proliferation, activation of transcription of a reporter gene, or wherein the polypeptide encoded by the polynucleotide further binds to an antibody,

wherein the antibody is raised to a polypeptide comprising a sequence of amino acids from the group consisting of:

- (a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 223 (Pro);
- (b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);
- (c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 249 (Trp);
- (d) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 250 (Lys) to amino acid number 491 (Arg);
- (e) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 250 (Lys) to 520 (Arg);
- (f) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 491 (Arg);
- (g) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 520 (Arg);

WO 02/44209

PCT/US01/44808

154

(h) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 491 (Arg);

(i) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:19 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 520 (Arg);

(j) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 163 (Trp);

(k) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(l) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 1 (Met) to amino acid number 211 (Ser); and

wherein the binding of the antibody to the isolated polypeptide is measured by a biological or biochemical assay including radioimmunoassay, radioimmuno-precipitation, Western blot, or enzyme-linked immunosorbent assay.

22. A method of producing a polypeptide comprising:
culturing a cell according to claim 8; and
isolating the polypeptide produced by the cell.

23. An isolated polypeptide comprising an amino acid segment from the group of:

(a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn);

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:4;

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

(c) sequences that are at least 90% identical to (a), (b) or (c),

wherein the polypeptide is substantially free of transmembrane and intracellular domains ordinarily associated with hematopoietic receptors.

24. A method of producing a polypeptide comprising:
culturing a cell according to claim 12; and

WO 02/44209

PCT/US01/44808

155

isolating the polypeptide produced by the cell.

25. A method of producing an antibody to a polypeptide comprising:
inoculating an animal with a polypeptide from the group of:

(a) a polypeptide consisting of 50 to 471 amino acids, wherein the polypeptide comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 491 (Arg);

(b) a polypeptide consisting of 50 to 500 amino acids, wherein the polypeptide comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 520 (Arg);

(c) a polypeptide consisting of 50 to 191 amino acids, wherein the polypeptide comprises a contiguous sequence of amino acids in SEQ ID NO:19 from amino acid number 21 (Arg), to amino acid number 211 (Ser);

(c) a polypeptide according to claim 18;

(d) a polypeptide comprising amino acid number 21 (Arg) to 119 (Tyr) of SEQ ID NO:2;

(e) a polypeptide comprising amino acid number 125 (Pro) to 223 (Pro) of SEQ ID NO:2;

(f) a polypeptide comprising a hydrophilic peptide of SEQ ID NO:2 as predicted from a hydrophobicity plot using a Hopp/Woods hydrophilicity profile based on a sliding six-residue window, with buried G, S, and T residues and exposed H, Y, and W residues ignored; and

wherein the polypeptide elicits an immune response in the animal to produce the antibody; and

isolating the antibody from the animal.

26. An antibody produced by the method of claim 25, which specifically binds to a polypeptide of SEQ ID NO:2, SEQ ID NO:19 or SEQ ID NO:21.

27. The antibody of claim 26, wherein the antibody is a monoclonal antibody.

28. An antibody that specifically binds to a polypeptide of claim 17.

29. An antibody that specifically binds to a polypeptide of claim 18.

30. A method of detecting, in a test sample, the presence of a modulator of the activity of a cytokine receptor protein comprising:

culturing a cell into which has been introduced an expression vector according to claim 6, wherein the cell expresses the protein encoded by the DNA segment in the presence and absence of a test sample; and

comparing levels of activity of the protein in the presence and absence of a test sample, by a biological or biochemical assay; and

determining from the comparison, the presence of modulator the cytokine receptor protein activity in the test sample.

31. A method for detecting a cytokine receptor ligand within a test sample, comprising:

contacting a test sample with a cytokine receptor polypeptide comprising an amino acid sequence from the group consisting of:

(a) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:4;

(b) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:2 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 226 (Asn); and

(c) the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO:21 from amino acid number 21 (Arg) to amino acid number 211 (Ser); and

detecting the binding of the cytokine receptor polypeptide to a ligand in the sample.

32. A method for detecting a cytokine receptor ligand according to claim 31, wherein the cytokine receptor polypeptide is membrane bound within a cultured cell, and the detecting step comprises measuring a biological response in the cultured cell.

33. A method for detecting a cytokine receptor ligand according to claim 32, wherein the biological response is cell proliferation or activation of transcription of a reporter gene.

34. 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, 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.

35. 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 29 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.

36. A method for detecting a cancer in a patient, comprising:
obtaining a tissue or biological sample from a patient;

WO 02/44209

PCT/US01/44808

158

labeling a polynucleotide comprising at least 14 contiguous nucleotides of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20 or the complement of SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:18 or SEQ ID NO:20;

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.

WO 02/44209

PCT/US01/44808

1

SEQUENCE LISTING

<110> ZymoGenetics, Inc.

<120> CYTOKINE RECEPTOR ZCYTOR19

<130> 00-108

<150> US 60/253,561

<151> 2000-11-28

<150> US 60/267,211

<151> 2001-02-07

<160> 50

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 1476

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(1473)

<400> 1

atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag	48
Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Cys Leu Leu Gln	
1 5 10 15	
gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg	96
Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu	
20 25 30	
ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc	144
Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly	
35 40 45	
aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc	192

WO 02/44209

PCT/US01/44808

2

Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr	
50 55 60	
cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg	240
Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc	288
Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe	
85 90 95	
aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg	336
Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val	
100 105 110	
gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag cgg gcc cca cct	384
Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro	
115 120 125	
gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg	432
Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr	
130 135 140	
tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg ttt ctg aag tat gag gtg	480
Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Val	
145 150 155 160	
gca ttt tgg ggg ggg ggg gcc gga acc aag acc cta ttt cca gtc act	528
Ala Phe Trp Gly Gly Gly Ala Gly Thr Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr	
165 170 175	
ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc gaa	576
Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu	
180 185 190	
cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc ccg aaa	624
His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys	
195 200 205	
tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca gaa	672
Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu	
210 215 220	

WO 02/44209

PCT/US01/44808

3

gcc aac tgg gct ttc ctg gtg ctg cca tcg ctt ctg ata ctg ctg tta Ala Asn Trp Ala Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu 225 230 235 240	720
gta att gcc gca ggg ggt gtg atc tgg aag acc ctc atg ggg aac ccc Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro 245 250 255	768
tgg ttt cag cgg gca aag atg cca cgg gcc ctg gaa ctg acc aga ggg Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Glu Leu Thr Arg Gly 260 265 270	816
gtc agg ccg acg cct cga gtc agg gcc cca gcc acc caa cag aca aga Val Arg Pro Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg 275 280 285	864
tgg aag aag gac ctt gca gag gac gaa gag gag gat gag gag gac Trp Lys Lys Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp 290 295 300	912
aca gaa gat ggc gtc agc ttc cag ccc tac att gaa cca cct tct ttc Thr Glu Asp Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe 305 310 315 320	960
ctg ggg caa gag cac cag gct cca ggg cac tcg gag gct ggt ggg gtg Leu Gly Gln Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val 325 330 335	1008
gac tca ggg agg ccc agg gct cct ctg gtc cca agc gaa ggc tcc tct Asp Ser Gly Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser 340 345 350	1056
gct tgg gat tct tca gac aga agc tgg gcc agc act gtg gac tcc tcc Ala Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser 355 360 365	1104
tgg gac agg gct ggg tcc tct ggc tat ttg gct gag aag ggg cca ggc Trp Asp Arg Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly 370 375 380	1152
caa ggg ccg ggt ggg gat ggg cac caa gaa tct ctc cca cca cct gaa Gln Gly Pro Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu 385 390 395 400	1200

WO 02/44209

PCT/US01/44808

4

ttc tcc aag gac tcg ggt ttc ctg gaa gag ctc cca gaa gat aac ctc 1248
 Phe Ser Lys Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu
 405 410 415

tcc tcc tgg gcc acc tgg ggc acc tta cca ccg gag ccg aat ctg gtc 1296
 Ser Ser Trp Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val
 420 425 430

cct ggg gga ccc cca gtt tct ctt cag aca ctg acc ttc tgc tgg gaa 1344
 Pro Gly Gly Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu
 435 440 445

agc agc cct gag gag gaa gag gag gcg agg gaa tca gaa att gag gac 1392
 Ser Ser Pro Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp
 450 455 460

agc gat gcg ggc agc tgg ggg gct gag agc acc cag agg acc gag gac 1440
 Ser Asp Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp
 465 470 475 480

agg ggc cgg aca ttg ggg cat tac atg gcc agg tga 1476
 Arg Gly Arg Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg
 485 490

<210> 2
 <211> 491
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30
 Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45

Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 50 55 60
 Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 65 70 75 80

WO 02/44209

PCT/US01/44808

5

Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
 85 90 95
 Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
 100 105 110
 Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
 115 120 125
 Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Val
 145 150 155 160
 Ala Phe Trp Gly Gly Gly Ala Gly Thr Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr
 165 170 175
 Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
 180 185 190
 His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys
 195 200 205
 Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu
 210 215 220
 Ala Asn Trp Ala Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro
 245 250 255
 Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Glu Leu Thr Arg Gly
 260 265 270
 Val Arg Pro Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg
 275 280 285
 Trp Lys Lys Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp
 290 295 300
 Thr Glu Asp Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe
 305 310 315 320
 Leu Gly Gln Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val
 325 330 335
 Asp Ser Gly Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser
 340 345 350
 Ala Trp Asp Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser
 355 360 365
 Trp Asp Arg Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly
 370 375 380

 Gln Gly Pro Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu
 385 390 395 400
 Phe Ser Lys Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu
 405 410 415

WO 02/44209

PCT/US01/44808

6

Ser Ser Trp Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val
 420 425 430
 Pro Gly Gly Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu
 435 440 445
 Ser Ser Pro Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp
 450 455 460
 Ser Asp Ala Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp
 465 470 475 480
 Arg Gly Arg Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg
 485 490

<210> 3
 <211> 1473
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate polynucleotide sequence of SEQ ID NO:2

<221> misc_feature
 <222> (1)...(1473)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 3
 atggcnggnc cngarmntg gggncnctn ytnytnctgy tnytnccarg ncncncnggn 60
 mgncnmgny tngcncncnc ncaraaygt acnytnytnw snccaraayt ywsngntay 120
 ytnacntggy tncncngny nggnaayccn cngaygtna cntaytygt ncntaycar 180
 wsnwsncna cmgngmgng ntggmgngar gtngargart gygcnggnac naargarytn 240
 ytnytwysna tgatgtgyt naaraarcar gayytnaya ayaarttyaa rggngmgntn 300
 mgncngtnw snccnwsnws naarwsnccn tgggtngarw sngartayt ngaytayyt 360
 ttygargtn arcncncnc ncngtnytn gtntytnacn aracngarga rathytnwsn 420
 gcnaygcna cntaycaryt ncncncntgy atgccncny tnttytnaa rtaygargtn 480
 gcnttytggg gngngnggc nggnacnaar acnytnntyc cngtnacnc ncayggncar 540
 cngtnacna thacnytnca rcncngncn wsnargcayc aytgytnws ngcnmgncn 600
 athtayacnt tywsngtncc naartaywsn aarttywsna arcncnctg ytttytnytn 660
 gangtnccng argcnaaytg ggcnttytn gtntytnccw snytnytnat hytnytnytn 720
 gtnathgcn cngngngngt nathtggaar acnytnatgg gnaayccntg gtycarmgn 780
 gcnaratgc cmgngcnct ngarytnacn mgngngntnm gncnacnc ncngngtnmgn 840
 gcnccngcna cncarcarac nmngntggaar aargayytn cngargayga ngargargar 900
 gaygargarg ayacngarga yggngtnwsn ttycarcnc ayathgarcc nccnwsntty 960
 ytnngncarg arcaycarg ncncngncay wsnargcng gngngntga ywsngngmgn 1020
 ccmngngcnc cnytnctnc nwsngarggn wsnwsngcnc gggaywsnws ngaymgnwsn 1080
 tgggcnwsna cngtnayws nwsntggay mgngcnggnw snwsngnta yytnngcngar 1140

WO 02/44209

PCT/US01/44808

7

aargnccng gncargncc ngngngngay gncaycarg arwsnytncc nccnccngar 1200
 ttywsnaarg aywsnggntt yytngargar ytnccngarg ayaaytnws nwsntgggcn 1260
 acntgggna cnytnccncc ngarccnaay ytngtncng gngnccncc ngtnwsnytn 1320
 caracnytna cnttytgytg ggarwsnwsn cngargarg argargargc nmngargarwn 1380
 garathgarg aywsngaygc nggrwsntgg gngcngarw snacncarmg nacngargay 1440
 mngngnmgna cnytnngnca ytaytggn ngn 1473

<210> 4
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu Leu Ser Gln Asn
 1 5 10 15
 Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly Asn Pro Gln Asp
 20 25 30
 Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr Arg Arg Arg Trp
 35 40 45
 Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu Leu Cys Ser Met
 50 55 60
 Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe Lys Gly Arg Val
 65 70 75 80
 Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val Glu Ser Glu Tyr
 85 90 95
 Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro Val Leu Val Leu
 100 105 110
 Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr Tyr Gln Leu Pro
 115 120 125
 Pro Cys Met Pro Pro Leu Phe Leu Lys Tyr Glu Val Ala Phe Trp Gly
 130 135 140
 Gly Gly Ala Gly Thr Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr Pro His Gly Gln
 145 150 155 160
 Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu His His Cys Leu
 165 170 175
 Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys Tyr Ser Lys Phe
 180 185 190
 Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro
 195 200

<210> 5
 <211> 5
 <212> PRT

WO 02/44209

PCT/US01/44808

8

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> WSXWS motif

<221> VARIANT

<222> (1)...(5)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 5

Trp Ser Xaa Trp Ser

1

5

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC21195

<400> 6

gaggagacca taacccccga cag

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC21196

<400> 7

catagctccc accacacgat ttt

23

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC14063

WO 02/44209

PCT/US01/44808

9

<400> 8
caccagacat aatagctgac agact 25
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC17574
<400> 9
ggtrttgctc agcatgcaca c 21
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC17600
<400> 10
catgtaggcc atgaggtcca ccac 24
<210> 11
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Glu-Glu peptide tag
<400> 11
Glu Tyr Met Pro Met Glu
1 5
<210> 12
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>

WO 02/44209

PCT/US01/44808

10

<223> FLAG peptide tag

<400> 12

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

1 5

<210> 13

<211> 699

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

gagccacagat	cttcagacaa	aactcacaca	tgcccaccgt	gcccagcacc	tgaagccgag	60
ggggcacagt	cagtcttcct	cttccccca	aaaccaagg	acacctcat	gatctccgg	120
accctgagg	tcacatgcgt	ggtggtggac	gtgagccacg	aagaccctga	ggtcaagttc	180
aactggtacg	tgacggcgt	ggaggtgcat	aatgccaaga	caaagccgcg	ggaggagcag	240
tacaacagca	cgtaccgtgt	ggtcagcgtc	ctcaccgtcc	tgcaccagga	ctggctgaat	300
ggcaaggagt	acaagtgcaa	ggtctccaac	aaagccctcc	catctccat	cgagaaaacc	360
atctccaaag	ccaagggca	gccccgagaa	ccacaggtgt	acacctgcc	ccatccccgg	420
gatgagctga	ccaagaacca	ggtcagcctg	acctgcctgg	tcaaaggctt	ctatccccagc	480
gacatcgccg	tggagtggga	gagcaatggg	cagccggaga	acaactacaa	gaccacgcct	540
ccgtgctgg	actccgacgg	ctcttcttc	ctctacagca	agctcaccgt	ggacaagagc	600
aggtggcagc	aggggaacgt	cttctcatgc	tccgtgatgc	atgaggctct	gcacaaccac	660
tacacgcaga	agagcctctc	cctgtctcgg	ggtaaataa			699

<210> 14

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)...(990)

<400> 14

gct	agc	acc	aag	ggc	cca	tcg	gtc	ttc	ccc	ctg	gca	ccc	tcc	tcc	aag	48
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1				5				10					15			

agc	acc	tct	ggg	ggc	aca	gcg	gcc	ctg	ggc	tcg	ctg	gtc	aag	gac	tac	96
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20				25				30					

WO 02/44209

PCT/US01/44808

11

ttc ccc gaa ccg gtg acg gtg tcg tgg aac tca ggc gcc ctg acc agc Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	144
35 40 45	
ggc gtg cac acc ttc ccg gct gtc cta cag tcc tca gga ctc tac tcc Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	192
50 55 60	
ctc agc agc gtg gtg acc gtg ccc tcc agc agc ttg ggc acc cag acc Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr	240
65 70 75 80	
tac atc tgc aac gtg aat cac aag ccc agc aac acc aag gtg gac aag Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	288
85 90 95	
aaa gtt gag ccc aaa tct tgt gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys	336
100 105 110	
cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro	384
115 120 125	
aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys	432
130 135 140	
gtg gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	480
145 150 155 160	
tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	528
165 170 175	
gag cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	576
180 185 190	
cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	624
195 200 205	

WO 02/44209

PCT/US01/44808

12

```

aaa gcc ctc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg      672
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
  210                215                220

cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag      720
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
  225                230                235                240

ctg acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat      768
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
  245                250                255

ccc agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac      816
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
  260                265                270

aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc      864
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
  275                280                285

ctc tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac      912
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
  290                295                300

gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg      960
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
  305                310                315                320

cag aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa      990
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
  325                330

```

<210> 15
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

WO 02/44209

PCT/US01/44808

13

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
 225 230 235 240
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 16

<211> 321

WO 02/44209

PCT/US01/44808

14

<212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(321)

<400> 16
 act gtg gct gca cca tct gtc ttc atc ttc ccg cca tct gat gag cag 48
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 1 5 10 15
 ttg aaa tct ggt acc gcc tct gtt gtg tgc ctg ctg aat aac ttc tat 96
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 20 25 30
 ccc aga gag gcc aaa gta cag tgg aag gtg gat aac gcc ctc.caa tcg 144
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 35 40 45
 ggt aac tcc cag gag agt gtc aca gag cag gac agc aag gac agc acc 192
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 50 55 60
 tac agc ctc agc agc acc ctg acg ctg agc aaa gca gac tac gag aaa 240
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 65 70 75 80
 cac aaa gtc tac gcc tgc gaa gtc acc cat cag ggc ctg agc tcg ccc 288
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 85 90 95
 gtc aca aag agc ttc aac agg gga gag tgt tag 321
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys *
 100 105

<210> 17
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 17

WO 02/44209

PCT/US01/44808

15

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

<210> 18
 <211> 1563
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(1563)

<400> 18
 atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag 48
 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg 96
 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30
 ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg.ctt ggc 144
 Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45
 aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc 192
 Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 50 55 60
 cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg 240

WO 02/44209

PCT/US01/44808

16

Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu	
65 70 75 80	
cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc	288
Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe	
85 90 95	
aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg	336
Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val	
100 105 110	
gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca cct	384
Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro	
115 120 125	
gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg	432
Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr	
130 135 140	
tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag gtg	480
Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val	
145 150 155 160	
gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag acc cta ttt cca gtc act	528
Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr	
165 170 175	
ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc gaa	576
Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu	
180 185 190	
cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc ccg aaa	624
His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys	
195 200 205	
tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca gaa	672
Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu	
210 215 220	
gcc aac tgg gct ttc ctg gtg ctg cca tcg ctt ctg ata ctg ctg tta	720
Ala Asn Trp Ala Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu	
225 230 235 240	

WO 02/44209

PCT/US01/44808

17

gta att gcc gca ggg ggt gtg atc tgg aag acc ctc atg ggg aac ccc Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro 245 250 255	768
tgg ttt cag cgg gca aag atg cca cgg gcc ctg gac ttt tct gga cac Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly His 260 265 270	816
aca cac cct gtg gca acc ttt cag ccc agc aga cca gag tcc gtg aat Thr His Pro Val Ala Thr Phe Gln Pro Ser Arg Pro Glu Ser Val Asn 275 280 285	864
gac ttg ttc ctc tgt ccc caa aag gaa ctg acc aga ggg gtc agg ccg Asp Leu Phe Leu Cys Pro Gln Lys Glu Leu Thr Arg Gly Val Arg Pro 290 295 300	912
acg cct cga gtc agg gcc cca gcc acc caa cag aca aga tgg aag aag Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg Trp Lys Lys 305 310 315 320	960
gac ctt gca gag gac gaa gag gag gag gat gag gag gac aca gaa gat Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Thr Glu Asp 325 330 335	1008
ggc gtc agc ttc cag ccc tac att gaa cca cct tct ttc ctg ggg caa Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe Leu Gly Gln 340 345 350	1056
gag cac cag gct cca ggg cac tcg gag gct ggt ggg gtg gac tca ggg Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val Asp Ser Gly 355 360 365	1104
agg ccc agg gct cct ctg gtc cca agc gaa ggc tcc tct gct tgg gat Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp 370 375 380	1152
tct tca gac aga agc tgg gcc agc act gtg gac tcc tcc tgg gac agg Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg 385 390 395 400	1200
gct ggg tcc tct ggc tat ttg gct gag aag ggg cca ggc caa ggg ccg	1248

WO 02/44209

PCT/US01/44808

18

Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly Gln Gly Pro
 405 410 415

ggg ggg gat ggg cac caa gaa tct ctc cca cca cct gaa ttc tcc aag 1296
 Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Pro Glu Phe Ser Lys
 420 425 430

gac tcg ggt ttc ctg gaa gag ctc cca gaa gat aac ctc tcc tcc tgg 1344
 Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu Ser Ser Trp
 435 440 445

ggc acc tgg ggc acc tta cca ccg gag ccg aat ctg gtc cct ggg gga 1392
 Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val Pro Gly Gly
 450 455 460

ccc cca gtt tct ctt cag aca ctg acc ttc tgc tgg gaa agc agc cct 1440
 Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu Ser Ser Pro
 465 470 475 480

gag gag gaa gag gag gcg agg gaa tca gaa att gag gac agc gat gcg 1488
 Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp Ser Asp Ala
 485 490 495

ggc agc tgg ggg gct gag agc acc cag agg acc gag gac agg ggc cgg 1536
 Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp Arg Gly Arg
 500 505 510

aca ttg ggg cat tac atg gcc agg tga 1563
 Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg *
 515 520

<210> 19
 <211> 520
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30

WO 02/44209

PCT/US01/44808

19

Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45
 Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 50 55 60
 Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
 85 90 95
 Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
 100 105 110
 Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
 115 120 125
 Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val
 145 150 155 160
 Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr
 165 170 175
 Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
 180 185 190
 His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys
 195 200 205
 Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu
 210 215 220
 Ala Asn Trp Ala Phe Leu Val Leu Pro Ser Leu Leu Ile Leu Leu Leu
 225 230 235 240
 Val Ile Ala Ala Gly Gly Val Ile Trp Lys Thr Leu Met Gly Asn Pro
 245 250 255
 Trp Phe Gln Arg Ala Lys Met Pro Arg Ala Leu Asp Phe Ser Gly His
 260 265 270
 Thr His Pro Val Ala Thr Phe Gln Pro Ser Arg Pro Glu Ser Val Asn
 275 280 285
 Asp Leu Phe Leu Cys Pro Gln Lys Glu Leu Thr Arg Gly Val Arg Pro
 290 295 300
 Thr Pro Arg Val Arg Ala Pro Ala Thr Gln Gln Thr Arg Trp Lys Lys
 305 310 315 320
 Asp Leu Ala Glu Asp Glu Glu Glu Glu Asp Glu Glu Asp Thr Glu Asp
 325 330 335
 Gly Val Ser Phe Gln Pro Tyr Ile Glu Pro Pro Ser Phe Leu Gly Gln
 340 345 350
 Glu His Gln Ala Pro Gly His Ser Glu Ala Gly Gly Val Asp Ser Gly
 355 360 365

WO 02/44209

PCT/US01/44808

20

Arg Pro Arg Ala Pro Leu Val Pro Ser Glu Gly Ser Ser Ala Trp Asp
 370 375 380
 Ser Ser Asp Arg Ser Trp Ala Ser Thr Val Asp Ser Ser Trp Asp Arg
 385 390 395 400
 Ala Gly Ser Ser Gly Tyr Leu Ala Glu Lys Gly Pro Gly Gln Gly Pro
 405 410 415
 Gly Gly Asp Gly His Gln Glu Ser Leu Pro Pro Glu Phe Ser Lys
 420 425 430
 Asp Ser Gly Phe Leu Glu Glu Leu Pro Glu Asp Asn Leu Ser Ser Trp
 435 440 445
 Ala Thr Trp Gly Thr Leu Pro Pro Glu Pro Asn Leu Val Pro Gly Gly
 450 455 460
 Pro Pro Val Ser Leu Gln Thr Leu Thr Phe Cys Trp Glu Ser Ser Pro
 465 470 475 480
 Glu Glu Glu Glu Glu Ala Arg Glu Ser Glu Ile Glu Asp Ser Asp Ala
 485 490 495
 Gly Ser Trp Gly Ala Glu Ser Thr Gln Arg Thr Glu Asp Arg Gly Arg
 500 505 510
 Thr Leu Gly His Tyr Met Ala Arg
 515 520

<210> 20
 <211> 674
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)...(633)

<400> 20
 atg gcg ggg ccc gag cgc tgg ggc ccc ctg ctc ctg tgc ctg ctg cag 48
 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 gcc gct cca ggg agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg 96
 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30
 ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc 144
 Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45

WO 02/44209

PCT/US01/44808

21

aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr 50' 55 60	192
cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu 65 70 75 80	240
cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe 85 90 95	288
aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val 100 105 110	336
gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca cct Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro 115 120 125	384
gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr 130 135 140	432
tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag gtg Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val 145 150 155 160	480
gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag gtg gga agc tcc ttt cct Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Val Gly Ser Ser Phe Pro 165 170 175	528
gcc ccc agg cta ggc cgg ctc ctc cac ccc ttc tta ctc agg ttc ttc Ala Pro Arg Leu Gly Pro Leu Leu His Pro Phe Leu Leu Arg Phe Phe 180 185 190	576
tca ccc tcc cag cct gct cct gca ccc ctc ctc cag gaa gtc ttc cct Ser Pro Ser Gln Pro Ala Pro Ala Pro Leu Leu Gln Glu Val Phe Pro 195 200 205	624
gta cac tcc tgacttctgg cagtcagccc taataaaatc tgatcaaagt Val His Ser 210	673

WO 02/44209

PCT/US01/44808

22

a

674

<210> 21
 <211> 211
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21
 Met Ala Gly Pro Glu Arg Trp Gly Pro Leu Leu Cys Leu Leu Gln
 1 5 10 15
 Ala Ala Pro Gly Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 20 25 30
 Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 35 40 45
 Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 50 55 60
 Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
 85 90 95
 Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
 100 105 110
 Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
 115 120 125
 Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
 130 135 140
 Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val
 145 150 155 160
 Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Val Gly Ser Ser Phe Pro
 165 170 175
 Ala Pro Arg Leu Gly Pro Leu Leu His Pro Phe Leu Leu Arg Phe Phe
 180 185 190
 Ser Pro Ser Gln Pro Ala Pro Ala Pro Leu Leu Gln Glu Val Phe Pro
 195 200 205
 Val His Ser
 210

<210> 22
 <211> 1422
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

WO 02/44209

PCT/US01/44808

23

<220>

<223> Zcytor17-Fc4 fusion protein

<221> CDS

<222> (1)...(1422)

<400> 22

atg gat gca atg aag aga ggg ctc tgc tgt gtg ctg ctg tgt ggc	48
Met Asp Ala Met Lys Arg Gly Leu Cys Cys Val 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 agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg ctg	144
Phe Arg Arg Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu	
35 40 45	
ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt ggc	192
Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly	
50 55 60	
aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc acc	240
Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr	
65 70 75 80	
cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag ctg	288
Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu	
85 90 95	
cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag ttc	336
Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe	
100 105 110	
aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg gtg	384
Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val	
115 120 125	
gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca cct	432
Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro	
130 135 140	

WO 02/44209

PCT/US01/44808

24

gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc acg Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr 145 150 155 160	480
tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag gtg Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val 165 170 175	528
gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag acc cta ttt cca gtc act Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr 180 185 190	576
ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc gaa Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu 195 200 205	624
cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc cgg aaa His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys 210 215 220	672
tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca gaa Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu 225 230 235 240	720
gcc aac tgg aga tct tca gac aaa act cac aca tgc cca ccg tgc cca Ala Asn Trp Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro 245 250 255	768
gca cct gaa gcc gag ggg gca ccg tca gtc ttc ctc ttc ccc cca aaa Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 260 265 270	816
ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct gag gtc aca tgc gtg Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val 275 280 285	864
gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc aag ttc aac tgg tac Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 290 295 300	912
gtg gac gcc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca aag ccg cgg gag gag Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 305 310 315 320	960

WO 02/44209

PCT/US01/44808

25

cag tac aac agc acg tac cgt gtg gtc agc gtc ctc acc gtc ctg cac Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 325 330 335	1008
cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc aag gtc tcc aac aaa Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 340 345 350	1056
gcc ctc cca tcc tcc atc gag aaa acc atc tcc aaa gcc aaa ggg cag Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 355 360 365	1104
ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca tcc cgg gat gag ctg Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 370 375 380	1152
acc aag aac cag gtc agc ctg acc tgc ctg gtc aaa ggc ttc tat ccc Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 385 390 395 400	1200
agc gac atc gcc gtg gag tgg gag agc aat ggg cag ccg gag aac aac Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 405 410 415	1248
tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac ggc tcc ttc ttc ctc Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 420 425 430	1296
tac agc aag ctc acc gtg gac aag agc agg tgg cag cag ggg aac gtc Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 435 440 445	1344
ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac aac cac tac acg cag Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 450 455 460	1392
aag agc ctc tcc ctg tct ccg ggt aaa taa Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys *	1422
465 470	

<210> 23

WO 02/44209

PCT/US01/44808

26

<211> 473

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<400> 23

```

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 Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 35           40           45
Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 50           55           60
Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 65           70           75           80
Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 85           90           95
Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
100           105           110
Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
115           120           125
Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
130           135           140
Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
145           150           155           160
Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val
165           170           175
Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr
180           185           190
Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
195           200           205
His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys
210           215           220
Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu
225           230           235           240
Ala Asn Trp Arg Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
245           250           255
Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
260           265           270
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
275           280           285
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
290           295           300

```

WO 02/44209

PCT/US01/44808

27

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 305 310 315 320
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 325 330 335
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 340 345 350
 Ala Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 355 360 365
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 370 375 380
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 385 390 395 400
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 405 410 415
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 420 425 430
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 435 440 445
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 450 455 460
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC37967

<400> 24

gcggtccag gcccgctctg gcccttc

28

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC37972

<400> 25

WO 02/44209

PCT/US01/44808

28

gcagatctcc agttggcttc tgggacctcc 30

<210> 26
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC37685

<400> 26
 ccagccctac attgaaccac ctt 23

<210> 27
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide primer ZC37681

<400> 27
 cctcgctcc tcttcctct ca 22

<210> 28
 <211> 1560
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Degenerate Polynucleotide sequence of SEQ ID
 NO:19

<221> misc_feature
 <222> (1)...(1560)
 <223> n = A,T,C or G

<400> 28
 atggcngnc cngarmntg gggncnytn ytnytntgy tnytnccgc ngcncnggn 60
 mgnccrmgny tngcncncc ncaraaygt acnytnytnw snccaraaytt ywsngntay 120
 ytnacntggy tncnggnytn nggnaayccn cargaygtna cntayttygt ngcntaycar 180
 wsnwsncna cmgmngmng ntggmngar gtnargart gygcnggnac naargarytn 240
 ytntgywsna tgatgtgyt naaraarcar gayytnaya ayaarttyaa rggmngntn 300

WO 02/44209

PCT/US01/44808

29

```

mgnacngtnw snccnwsnws naarsnccn tgggtngarw sngartayt ngaytaytn 360
ttygargtn arccngcncc nccngtnytn gtnytnacnc aracngarga rathytnwsn 420
gcnaygcna cntaycaryt nccncntgy atgccncny tngayytnaa rtaygargtn 480
gcnttytga argargngc nggnaayaar acnytnntyc cngtnacnc ncayggncar 540
ccngtncara thacnytnca rccngcngcn wsnargarcayc aytyytnws ngcnmgnacn 600
athtayacnt tywsngtncc naartaywsn aarttywsna arccnacntg ytyytnytn 660
gargtnccng argcnaaytg gcnttyytn gtnytnccnw snytnytnat hytnytnytn 720
gtcnathgcn cngngngngt nathtggaar acnytnatgg gnaaycctg gttycarmgn 780
gcnaaratgc cmngngcnyt ngaytywsn ggncayacnc ayccngtngc nacttycar 840
ccnwsnmgnc cngarwsngt naaygayytn tyytnntgyc cncaraarga rytnacnmgn 900
ggngtnmgnc cnacnccnmg ngtnmgngcn ccngcnacnc arcaracnmg ntggaaraar 960
gayytnngcn argaygarga rgargargay gargargaya cngargaygg ngtnwsntty 1020
carcntaya thgarccncc nwsnttyytn ggncargarc aycargcncc ngncaywsn 1080
gargcngngn gngtngayws nggnmgnccn mgngcncny tngtnccnws ngarggnwsn 1140
wsngcntggg aywsnwsnga ymgnwsntgg gcwnsnacng tngaywsnws ntgggaymgn 1200
gcnrgnwsnw sngntayyt ngcngaraar ggncnggnc arggncngg ngngayygn 1260
caycargarw snytnccncc nccngartty wsnaargayw snggnttyt ngargarytn 1320
cngargaya aytnwsnws ntgggcnacn tggggnacny tnccnccnga rccnaaytn 1380
gtncnngngn gncncngt nwsnytnar acnytnacnt tytytgga rwsnwsnccn 1440
gargargarg argargcmg ngarwsngar athgargayw sngaycngg nwsntggggn 1500
cngarwsna cncarmgnac ngargaymgn ggngmgnacny tnggncayta yatggcnmgn 1560

```

<210> 29

<211> 633

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate polynucleotide sequence of SEQ ID NO:21

<221> misc_feature

<222> (1)...(633)

<223> n = A,T,C or G

<400> 29

```

atggcnggnc cngarmntg gggncnytn ytnytnngy tnytnarcg ngcncnggn 60
mgncnmngny tngcncncc ncaraaygn acnytnytnw snaraaytt ywsngntay 120
ytnacntggg tnccngnyt nggnaayccn cargaygtna cntaytygt ngcntaycar 180
wsnwsnccna cmngmngmng ntggmngar gtnargart gygcnggnac naargarytn 240
ytntywsna tgatgtgyt naaraarcar gayytnaya ayaarttyaa rggnmngtn 300
mgnacngtnw snccnwsnws naarsnccn tgggtngarw sngartayt ngaytaytn 360
ttygargtn arccngcncc nccngtnytn gtnytnacnc aracngarga rathytnwsn 420
gcnaygcna cntaycaryt nccncntgy atgccncny tngayytnaa rtaygargtn 480

```

WO 02/44209

PCT/US01/44808

30

gcnttytgga argarggngc nggnaayaar gtnggnwsnw snttyccngc ncnmgnytn 540
 ggncnnytn tncayccttt yytnytnmgn ttyttywsc cnwsncarcc ngcnccngcn 600
 ccnytnytn argargtntt ycnngtncay wsn 633

<210> 30
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide Primer ZC39204

<400> 30
 tcaccacgag aattcggtac cgctggttc gcgtggatcc aggcccgctc tggccctcc 60
 ccag 64

<210> 31
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Oligonucleotide Primer ZC39205

<400> 31
 tctgtatcag gctgaaaatc ttatctcacc cgccaaaaca ccagttggct tctgggacct 60
 ccag 64

<210> 32
 <211> 1922
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> MBP-human zcytoR19 fusion protein polynucleotide
 sequence

<221> CDS
 <222> (123)...(1922)

<400> 32
 ttgacaatta atcatcggt cgtataatgt gtggaattgt gagcggataa caatttcaca 60
 caggaaacag ccagtcggt tagtggttt cagagcact tcaccaacaa ggaccataga 120

WO 02/44209

PCT/US01/44808

31

tt atg aaa act gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg att aac ggc gat	167
Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp	
1 5 10 15	
aaa ggc tat aac ggt ctc gct gaa gtc ggt aag aaa ttc gag aaa gat	215
Lys Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp	
20 25 30	
acc gga att aaa gtc acc gtt gag cat ccg gat aaa ctg gaa gag aaa	263
Thr Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys	
35 40 45	
ttc cca cag gtt gcg gca act ggc gat ggc cct gac att atc ttc tgg	311
Phe Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp	
50 55 60	
gca cac gac cgc ttt ggt ggc tac gct caa tct ggc ctg ttg gct gaa	359
Ala His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu	
65 70 75	
atc acc ccg gac aaa gcg ttc cag gac aag ctg tat ccg ttt acc tgg	407
Ile Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp	
80 85 90 95	
gat gcc gta cgt tac aac ggc aag ctg att gct tac ccg atc gct gtt	455
Asp Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val	
100 105 110	
gaa gcg tta tcg ctg att tat aac aaa gat ctg ctg ccg aac ccg cca	503
Glu Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro	
115 120 125	
aaa acc tgg gaa gag atc ccg gcg ctg gat aaa gaa ctg aaa gcg aaa	551
Lys Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys	
130 135 140	
ggt aag agc gcg ctg atg ttc aac ctg caa gaa ccg tac ttc acc tgg	599
Gly Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp	
145 150 155	
ccg ctg att gct gct gac ggg ggt tat gcg ttc aag tat gaa aac ggc	647
Pro Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly	
160 165 170 175	

WO 02/44209

PCT/US01/44808

32

```

aag tac gac att aaa gac gtg ggc gtg gat aac gct ggc gcg aaa gcg      695
Lys Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala
      180              185              190

ggt ctg acc ttc ctg gtt gac ctg att aaa aac aaa cac atg aat gca      743
Gly Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala
      195              200              205

gac acc gat tac tcc atc gca gaa gct gcc ttt aat aaa ggc gaa aca      791
Asp Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr
      210              215              220

gcg atg acc atc aac ggc ccg tgg gca tgg tcc aac atc gac acc agc      839
Ala Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser
      225              230              235

aaa gtg aat tat ggt gta acg gta ctg ccg acc ttc aag ggt caa cca      887
Lys Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro
      240              245              250              255

tcc aaa ccg ttc gtt ggc gtg ctg agc gca ggt att aac gcc gcc agt      935
Ser Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser
      260              265              270

ccg aac aaa gag ctg gca aaa gag ttc ctc gaa aac tat ctg ctg act      983
Pro Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr
      275              280              285

gat gaa ggt ctg gaa gcg gtt aat aaa gac aaa ccg ctg ggt gcc gta      1031
Asp Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val
      290              295              300

gcg ctg aag tct tac gag gaa gag ttg gcg aaa gat cca cgt att gcc      1079
Ala Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala
      305              310              315

gcc acc atg gaa aac gcc cag aaa ggt gaa atc atg ccg aac atc ccg      1127
Ala Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro
      320              325              330              335

cag atg tcc gct ttc tgg tat gcc gtg cgt act gcg gtg atc aac gcc      1175

```

WO 02/44209

PCT/US01/44808

33

Gln Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala
 340 345 350

gcc agc ggt cgt cag act gtc gat gaa gcc ctg aaa gac gcg cag act 1223
 Ala Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr
 355 360 365

aat tcg agc tcc cac cat cac cat cac gcc aat tcg gta ccg ctg 1271
 Asn Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu
 370 375 380

gtt ccg cgt gga tcc agg ccc cgt ctg gcc cct ccc cag aat gtg acg 1319
 Val Pro Arg Gly Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr
 385 390 395

ctg ctc tcc cag aac ttc agc gtg tac ctg aca tgg ctc cca ggg ctt 1367
 Leu Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu
 400 405 410 415

ggc aac ccc cag gat gtg acc tat ttt gtg gcc tat cag agc tct ccc 1415
 Gly Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro
 420 425 430

acc cgt aga cgg tgg cgc gaa gtg gaa gag tgt gcg gga acc aag gag 1463
 Thr Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu
 435 440 445

ctg cta tgt tct atg atg tgc ctg aag aaa cag gac ctg tac aac aag 1511
 Leu Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys
 450 455 460

ttc aag gga cgc gtg cgg acg gtt tct ccc agc tcc aag tcc ccc tgg 1559
 Phe Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp
 465 470 475

gtg gag tcc gaa tac ctg gat tac ctt ttt gaa gtg gag ccg gcc cca 1607
 Val Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro
 480 485 490 495

cct gtc ctg gtg ctc acc cag acg gag gag atc ctg agt gcc aat gcc 1655
 Pro Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala
 500 505 510

WO 02/44209

PCT/US01/44808

34

```

acg tac cag ctg ccc ccc tgc atg ccc cca ctg gat ctg aag tat gag 1703
Thr Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu
515 520 525

gtg gca ttc tgg aag gag ggg gcc gga aac aag acc cta ttt cca gtc 1751
Val Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val
530 535 540

act ccc cat ggc cag cca gtc cag atc act ctc cag cca gct gcc agc 1799
Thr Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser
545 550 555

gaa cac cac tgc ctc agt gcc aga acc atc tac acg ttc agt gtc ccg 1847
Glu His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro
560 565 570 575

aaa tac agc aag ttc tct aag ccc acc tgc ttc ttg ctg gag gtc cca 1895
Lys Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro
580 585 590

gaa gcc aac tgg tgt ttt ggc gga tga 1922
Glu Ala Asn Trp Cys Phe Gly Gly *
595

```

<210> 33

<211> 599

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> MBP-human zcytoR19 fusion protein polypeptide sequence

<400> 33

```

Met Lys Thr Glu Glu Gly Lys Leu Val Ile Trp Ile Asn Gly Asp Lys
1 5 10 15
Gly Tyr Asn Gly Leu Ala Glu Val Gly Lys Lys Phe Glu Lys Asp Thr
20 25 30
Gly Ile Lys Val Thr Val Glu His Pro Asp Lys Leu Glu Glu Lys Phe
35 40 45
Pro Gln Val Ala Ala Thr Gly Asp Gly Pro Asp Ile Ile Phe Trp Ala
50 55 60

```

WO 02/44209

PCT/US01/44808

35

His Asp Arg Phe Gly Gly Tyr Ala Gln Ser Gly Leu Leu Ala Glu Ile
 65 70 75 80
 Thr Pro Asp Lys Ala Phe Gln Asp Lys Leu Tyr Pro Phe Thr Trp Asp
 85 90 95
 Ala Val Arg Tyr Asn Gly Lys Leu Ile Ala Tyr Pro Ile Ala Val Glu
 100 105 110
 Ala Leu Ser Leu Ile Tyr Asn Lys Asp Leu Leu Pro Asn Pro Pro Lys
 115 120 125
 Thr Trp Glu Glu Ile Pro Ala Leu Asp Lys Glu Leu Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Lys Ser Ala Leu Met Phe Asn Leu Gln Glu Pro Tyr Phe Thr Trp Pro
 145 150 155 160
 Leu Ile Ala Ala Asp Gly Gly Tyr Ala Phe Lys Tyr Glu Asn Gly Lys
 165 170 175
 Tyr Asp Ile Lys Asp Val Gly Val Asp Asn Ala Gly Ala Lys Ala Gly
 180 185 190
 Leu Thr Phe Leu Val Asp Leu Ile Lys Asn Lys His Met Asn Ala Asp
 195 200 205
 Thr Asp Tyr Ser Ile Ala Glu Ala Ala Phe Asn Lys Gly Glu Thr Ala
 210 215 220
 Met Thr Ile Asn Gly Pro Trp Ala Trp Ser Asn Ile Asp Thr Ser Lys
 225 230 235 240
 Val Asn Tyr Gly Val Thr Val Leu Pro Thr Phe Lys Gly Gln Pro Ser
 245 250 255
 Lys Pro Phe Val Gly Val Leu Ser Ala Gly Ile Asn Ala Ala Ser Pro
 260 265 270
 Asn Lys Glu Leu Ala Lys Glu Phe Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Thr Asp
 275 280 285
 Glu Gly Leu Glu Ala Val Asn Lys Asp Lys Pro Leu Gly Ala Val Ala
 290 295 300
 Leu Lys Ser Tyr Glu Glu Glu Leu Ala Lys Asp Pro Arg Ile Ala Ala
 305 310 315 320
 Thr Met Glu Asn Ala Gln Lys Gly Glu Ile Met Pro Asn Ile Pro Gln
 325 330 335
 Met Ser Ala Phe Trp Tyr Ala Val Arg Thr Ala Val Ile Asn Ala Ala
 340 345 350
 Ser Gly Arg Gln Thr Val Asp Glu Ala Leu Lys Asp Ala Gln Thr Asn
 355 360 365
 Ser Ser Ser His His His His His His Ala Asn Ser Val Pro Leu Val
 370 375 380
 Pro Arg Gly Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Asn Val Thr Leu
 385 390 395 400

WO 02/44209

PCT/US01/44808

36

Leu Ser Gln Asn Phe Ser Val Tyr Leu Thr Trp Leu Pro Gly Leu Gly
 405 410 415
 Asn Pro Gln Asp Val Thr Tyr Phe Val Ala Tyr Gln Ser Ser Pro Thr
 420 425 430
 Arg Arg Arg Trp Arg Glu Val Glu Glu Cys Ala Gly Thr Lys Glu Leu
 435 440 445
 Leu Cys Ser Met Met Cys Leu Lys Lys Gln Asp Leu Tyr Asn Lys Phe
 450 455 460
 Lys Gly Arg Val Arg Thr Val Ser Pro Ser Ser Lys Ser Pro Trp Val
 465 470 475 480
 Glu Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Leu Phe Glu Val Glu Pro Ala Pro Pro
 485 490 495
 Val Leu Val Leu Thr Gln Thr Glu Glu Ile Leu Ser Ala Asn Ala Thr
 500 505 510
 Tyr Gln Leu Pro Pro Cys Met Pro Pro Leu Asp Leu Lys Tyr Glu Val
 515 520 525
 Ala Phe Trp Lys Glu Gly Ala Gly Asn Lys Thr Leu Phe Pro Val Thr
 530 535 540
 Pro His Gly Gln Pro Val Gln Ile Thr Leu Gln Pro Ala Ala Ser Glu
 545 550 555 560
 His His Cys Leu Ser Ala Arg Thr Ile Tyr Thr Phe Ser Val Pro Lys
 565 570 575
 Tyr Ser Lys Phe Ser Lys Pro Thr Cys Phe Leu Leu Glu Val Pro Glu
 580 585 590
 Ala Asn Trp Cys Phe Gly Gly
 595

<210> 34

<211> 20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> VARIANT

<222> (1)...(20)

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 34

Ser Arg Pro Arg Leu Ala Pro Pro Gln Xaa Val Thr Leu Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 Asn Phe Ser Val
 20

WO 02/44209

PCT/US01/44808

37

<210> 35
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40285

<400> 35
gccccagcca cccaacagac aaga 24

<210> 36
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40286

<400> 36
ccaggtggcc caggaggaga ggtt 24

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC39128

<400> 37
ggcatggaag ataatgaaag gaaa 24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC39129

<400> 38
gccgtcactc ccaactgggg atgt 24

WO 02/44209

PCT/US01/44808

38

<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40784

<400> 39
ggatagtggt ttgagtttct gtgga 25

<210> 40
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40785

<400> 40
accaggagtt caaggtaac ctgg 25

<210> 41
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40786

<400> 41
gggaattcct gcagaaactc agta 24

<210> 42
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC40787

<400> 42

WO 02/44209

PCT/US01/44808

39

cccttctgc tcctttgact gcgt 24

<210> 43
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC39408

<400> 43
gccacagctgc atcttcctag aggc 24

<210> 44
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Oligonucleotide primer ZC39409

<400> 44
gggcattgcc aggacagctc ttttg 25

<210> 45
<211> 121
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward zcytor19 knockout oligonucleotide

<400> 45
cactgccc ccaggggcct tgcggcggc gccggggacc ccagggaccg aaggccatag 60
cggccggccc ctaggatccg aattctagaa gctttgtgc tcaaaatctc tgatgttaca 120
t 121

<210> 46
<211> 125
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

WO 02/44209

PCT/US01/44808

40

<223> reverse zcytor19 knockout oligonucleotide

<400> 46

ggctgggtccc	ctgcaagagt	agcaagcgct	tcttcagcat	cgggacttac	ggcctcgctg	60
gccggcgcg	ctaggaattc	tctagaggat	ccaagctttt	agaaaaactc	atcgagcatc	120
aaatg						125

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC38481

<400> 47

cctccttcca	gaatgccacc	tc	22

<210> 48

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC38626

<400> 48

ctgctatgtt	ctatgatgtg	cctga	25

<210> 49

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC38706

<400> 49

ggaagataat	gaaaggaaac	cc	22

<210> 50

<211> 21

<212> DNA

WO 02/44209

PCT/US01/44808

41

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Oligonucleotide primer ZC38711

<400> 50

tatgaggagt ccctgtgct g

21

【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
6 June 2002 (06.06.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/044209 A3

- (51) International Patent Classification: C12N 15/12, C07K 14/715, C12N 15/62, C07K 16/28, G01N 33/68, C12Q 1/68, C12N 5/10, 1/21
- (21) International Application Number: PCT/US01/44808
- (22) International Filing Date: 28 November 2001 (28.11.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/253,561 28 November 2000 (28.11.2000) US
60/267,211 7 February 2001 (07.02.2001) 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, Wenfeng; 12432 54th Avenue West, Mukilteo, WA 98275 (US); NOVAK, Julia, E.; 10699 Battle Point Drive Northeast, Bainbridge Island, WA 98110 (US); WHITMORE, Theodore, E.; 6916 152nd Avenue Northeast, Redmond, WA 98052 (US); GRANT, Francis, J.; 7714 37th North-east, Seattle, WA 98115 (US).
- (74) Agent: JOHNSON, Jennifer, K.; ZymoGenetics, Inc., 1201 Eastlake Avenue East, Seattle, WA 98102 (US).
- (81) Designated States (national): AL, 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, GI, 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, 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, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 21 August 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/044209 A3

(54) Title: CYTOKINE RECEPTOR ZCYTOR19

(57) Abstract: Novel polypeptide4s, polynucleotides encoding the polypeptides, and related compositions and methods are disclosed for zcytor19, a novel class II cytokine receptor. The polypeptides may be used within methods for detecting ligands that stimulate the proliferation and/or development of hematopoietic, lymphoid and myeloid cells *in vitro* and *in vivo*. Ligand-binding receptor polypeptides can also be used to block ligand activity *in vitro* and *in vivo*. The polynucleotides encoding zcytor19, are located on chromosome 1p36.11, and can be used to identify a region of the genome associated with human disease states. The present invention also includes methods, for producing the protein, uses therefor and antibodies thereto.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/44808
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N15/12 C07K14/715 C12N15/62 C07K16/28 G01N33/68 C12Q1/68 C12N5/10 C12N1/21		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N C07K C12Q G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, EMBL, SEQUENCE SEARCH, PAJ, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 98 37193 A (ZYMOGENETICS INC) 27 August 1998 (1998-08-27) the whole document	1-36
A	DATABASE EMBL 'Online! 20 July 2000 (2000-07-20) Y. WEI ET AL: "TCBAP1D2669 Pediatric pre-b cell acute lymphoblastic leukemia Baylor-HGSC project=TCBA Homo sapiens cDNA clone TCBAP2669, mRNA sequence" retrieved from EBI, HINXTON, UK Database accession no. BE244935 XP00224171 abstract & UNPUBLISHED, --- -/-	1-5
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 16 May 2003		Date of mailing of the international search report 02/06/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Le Cornec, N

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International PCT/US 01/44808	Application No
C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	
A	WO 99 07848 A (ZYMOGENETICS INC) 18 February 1999 (1999-02-18) the whole document	1-36	
E	WO 02 86087 A (ZYMOGENETICS) 31 October 2002 (2002-10-31) sequences ID no. 23-29 page 13 -page 14 claims	1-36	
E	WO 02 20569 A (SCHERING CORP) 14 March 2002 (2002-03-14) sequence ID no. 2 claims	1-36	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International Application No.
PCT/US 01/44808

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9837193	A	27-08-1998	US 5945511 A
			31-08-1999
			AU 6535098 A
			09-09-1998
			EP 1009825 A1
			21-06-2000
			JP 2001514493 T
			11-09-2001
			WO 9837193 A1
			27-08-1998
			US 2003019505 A1
			30-01-2003
WO 9907848	A	18-02-1999	US 5965704 A
			12-10-1999
			AU 8673798 A
			01-03-1999
			EP 1003863 A1
			31-05-2000
			JP 2001512680 T
			28-08-2001
			WO 9907848 A1
			18-02-1999
WO 0286087	A	31-10-2002	US 2002039763 A1
			04-04-2002
			WO 02086087 A2
			31-10-2002
			AU 7178601 A
			14-01-2002
			EP 1294888 A2
			26-03-2003
			WO 0202627 A2
			10-01-2002
WO 0220569	A	14-03-2002	AU 9454101 A
			22-03-2002
			WO 0220569 A2
			14-03-2002
			US 2002142292 A1
			03-10-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/02	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/02	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/574	A
G 0 1 N 33/574	C 1 2 N 5/00	A
// A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	C
A 6 1 K 45/00	A 6 1 K 39/395	G
A 6 1 P 1/00	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 3/10	A 6 1 K 39/395	U
A 6 1 P 11/06	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 P 13/12	A 6 1 P 1/00	
A 6 1 P 19/02	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/04	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 29/00	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 31/04	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 31/12	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 31/18	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 33/00	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P 37/02	A 6 1 P 31/12	
A 6 1 P 43/00	A 6 1 P 31/18	
	A 6 1 P 33/00	
	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/02	
	A 6 1 P 43/00	1 1 1

(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,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(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 98407, タコマ, ノース ピュージェット サウンド アベニュー 2902

(72)発明者 シュウ, ウェンフェン

アメリカ合衆国, ワシントン 98275, ムキルテオ, フィフティーフォース アベニュー ウェスト 12432

(72)発明者 ノバク, ジュリア イー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98110, ベインブリッジ アイランド, バトル ポイント ドライブ ノースイースト 10699

(72)発明者 ホイットモア, セオドア イー.

アメリカ合衆国, ワシントン 98052, レッドモンド, ワンハンドレッドフィフティーセカン
ド アベニュー ノースイースト 6916

(72)発明者 グラント, フランシス ジェイ.

アメリカ合衆国, ワシントン 98115, シアトル, サーティーセブンス ノースイースト 7
714

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA63 CA01 GA11 HA12 HA15 HA20
4B063 QA19 QA20 QQ02 QQ42 QQ79 QQ91 QQ96 QR32 QR48 QR55
QS33 QS34 QX01
4B064 AG20 AG27 CA19 CC24 DA05 DA13
4B065 AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA07 AA17 BA44 DA45 DA58 MA13 MA17 MA22
MA23 MA24 MA35 MA37 MA38 MA52 MA56 MA59 MA63 MA65
MA66 NA14 ZA022 ZA592 ZA662 ZA812 ZA942 ZA962 ZB022 ZB072
ZB112 ZB152 ZB262 ZB272 ZB332 ZB352 ZB372 ZC352 ZC412 ZC422
4C085 AA13 AA14 AA22 AA25 BB11
4H045 AA10 AA11 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	细胞因子受体ZCYTOR 19		
公开(公告)号	JP2004532611A	公开(公告)日	2004-10-28
申请号	JP2002546578	申请日	2001-11-28
[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 シュウウェンフェン ノバクジュリアイー ホイットモアセオドアイー グラントフランシスジェイ		
发明人	プレスネル,スコット アール. シュウ,ウェンフェン ノバク,ジュリア イー. ホイットモア,セオドア イー. グラント,フランシス ジェイ.		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61K45/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00 C07K14/715 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 C12Q1/68 G01N33/566 G01N33/574		
CPC分类号	A61P1/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 C07K14/47 C07K14/715 C07K2319/00 Y10T436/143333		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/715 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C C12P21/08 C12Q1/68.A G01N33/53.D G01N33/566 G01N33/574.A C12N5/00.A A61K39/395.C A61K39/395.G A61K39/395.L A61K39/395.U A61K45/00 A61P1/00 A61P3/10 A61P11/06 A61P13/12 A61P19/02 A61P21/04 A61P25/00 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P31/04 A61P31/12 A61P31/18 A61P33/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA12 4B024/BA63 4B024/CA01 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA20 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ02 4B063/QQ42 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QQ96 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QX01 4B064/AG20 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA13 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA07 4C084/AA17 4C084/BA44 4C084/DA45 4C084/DA58 4C084/MA13 4C084/MA17 4C084/MA22 4C084/MA23 4C084/MA24 4C084/MA35 4C084/MA37 4C084/MA38 4C084/MA52 4C084/MA56 4C084/MA59 4C084/MA63 4C084/MA65 4C084/MA66 4C084/NA14 4C084/ZA022 4C084/ZA592 4C084/ZA662 4C084/ZA812 4C084/ZA942 4C084/ZA962 4C084/ZB022 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB152 4C084/ZB262 4C084/ZB272 4C084/ZB332 4C084/ZB352 4C084/ZB372 4C084/ZC352 4C084/ZC412 4C084/ZC422 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA22 4C085/AA25 4C085/BB11 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 西山雅也		
优先权	60/253561 2000-11-28 US 60/267211 2001-02-07 US		

摘要(译)

新的多肽，编码多肽的多核苷酸，以及相关的组合物和方法公开了 zcytor19，一种新的II类细胞因子受体。多肽可用于检测在体外和体内刺激造血细胞，淋巴细胞和骨髓细胞的增殖和/或发育的配体的方法中。配体结合受体多肽也可用于在体外和体内阻断配体活性。编码zcytor19的多核苷酸位于染色体1p36.11上，并且可用于鉴定与人类疾病状态相关的基因组区域。本发明还包括产生蛋白质的方法，其用途及其抗体。

(P2004-532611)			
(43) 公表日 平成16年10月28日 (2004. 10. 28)			
(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 0 2 4
C 0 7 K 14/715	C 0 7 K 14/715		4 B 0 6 3
C 0 7 K 16/28	C 0 7 K 16/28		4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/15	C 1 2 N 1/15		4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/19	C 1 2 N 1/19		4 C 0 8 4
審査請求		未請求	予備審査請求 有 (全 321 頁) 最終頁に続
(21) 出願番号	特願2002-546578 (P2002-546578)	(71) 出願人	500049831
(86) (22) 出願日	平成13年11月28日 (2001. 11. 28)		サイモジエネティクス, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成15年5月27日 (2003. 5. 27)		イド
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/044808		アメリカ合衆国, ワシントン 9 8 1 0 2
(87) 国際公開番号	W02002/044209		, 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6月6日 (2002. 6. 6)		イースト 1 2 0 1
(31) 優先権主張番号	60/253, 561	(74) 代理人	100099759
(32) 優先日	平成12年11月28日 (2000. 11. 28)		弁理士 青木 篤
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100077517
(31) 優先権主張番号	60/267, 211		弁理士 石田 敬
(32) 優先日	平成13年2月7日 (2001. 2. 7)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 橋本 慎
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次
最終頁に続く			