

(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2004-532386

(P2004-532386A)

(43) 公表日 平成16年10月21日(2004. 10. 21)

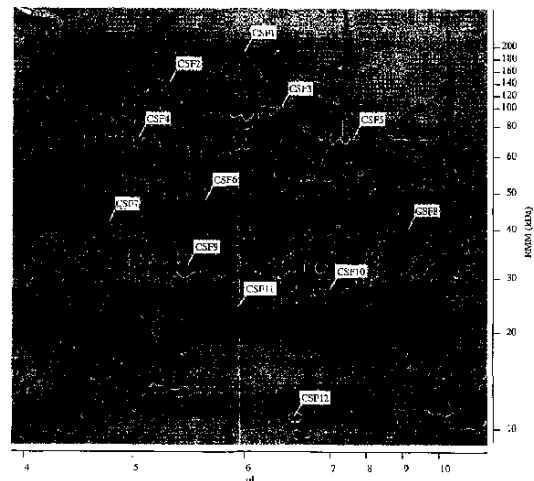
(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53 Z N A D	2 G O 4 5
A 6 1 K 31/7088	A 6 1 K 31/7088	4 B O 2 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 D	4 B O 6 3
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 271 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-559670 (P2002-559670)	(71) 出願人	500483530
(86) (22) 出願日	平成14年1月25日 (2002. 1. 25)		オックスフォード グリコサイエンス (
(85) 翻訳文提出日	平成15年7月25日 (2003. 7. 25)		ユーケー) リミテッド
(86) 国際出願番号	PCT/GB2002/000330		イギリス国, オーエックス14 4アール
(87) 国際公開番号	W02002/059604		ワイ, オックスフォードシャー, アビンド
(87) 国際公開日	平成14年8月1日 (2002. 8. 1)		ン, ミルトン パーク 86, ザ フォー
(31) 優先権主張番号	60/264, 404		ラム
(32) 優先日	平成13年1月26日 (2001. 1. 26)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 高木 千嘉
(31) 優先権主張番号	60/331, 647	(74) 代理人	100080355
(32) 優先日	平成13年11月20日 (2001. 11. 20)		弁理士 西村 公佑
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 多発性硬化症を診断および治療するためのタンパク質、遺伝子、およびこれらの使用

(57) 【要約】

本発明は、多発性硬化症の診断および予後をスクリーニングするため、多発性硬化症の治療の有効性を調べるため、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、および薬剤開発のための方法および組成物を提供する。体液、たとえば脳脊髄液の2次元電気泳動によって検出可能な多発性硬化症関連の特徴点 (MS F) を記載する。さらに本発明は、体液たとえば脳脊髄液中で検出可能な多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (MS P I)、単離MS P Iを含む調製物、MS P Iに関して免疫特異的な抗体、および前述のものを含むキットを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体の多発性硬化症の段階または重度を決定するため、多発性硬化症を発症する危険がある被験体を識別するため、または多発性硬化症を有する被験体に施された治療の影響を調べるための、被験体の多発性硬化症をスクリーニングまたは診断する方法であって、

(a) 2次元電気泳動によって被験体からの体液の試験試料を分析して、特徴点の2次元アレイを生成させることであって、該アレイが1つまたは複数の以下の多発性硬化症関連の特徴点(M S F) : MSF-1, MSF-2, MSF-3, MSF-4, MSF-5, MSF-6, MSF-7, MSF-8, MSF-9, MSF-10, MSF-11, MSF-12, MSF-13, MSF-14, MSF-15, MSF-16, MSF-17, MSF-18, MSF-20, MSF-21, MSF-22, MSF-23, MSF-24, MSF-25, MSF-26, MSF-27, MSF-28, MSF-29, MSF-30, MSF-31, MSF-32, MSF-33, MSF-34, MSF-35, MSF-36, MSF-37, MSF-38, MSF-39, MSF-40, MSF-41, MSF-42, MSF-43, MSF-44, MSF-45, MSF-46, MSF-47, MSF-48, MSF-49, MSF-50, MSF-51, MSF-52, MSF-52, MSF-53, MSF-54, MSF-55, MSF-56, MSF-57, MSF-58, MSF-59, MSF-60, MSF-61, MSF-62, MSF-63, MSF-64, MSF-65, MSF-66, MSF-67, MSF-69, MSF-70, MSF-71, MSF-72, MSF-73, MSF-75, MSF-76, MSF-77, MSF-78, MSF-79, MSF-80, MSF-81, MSF-82, MSF-83, MSF-84, MSF-85, MSF-86, MSF-87, MSF-88, MSF-89, MSF-90, MSF-91, MSF-92, MSF-93, MSF-94, MSF-95, MSF-96, MSF-97, MSF-98, MSF-99, MSF-100, MSF-101, MSF-102, MSF-104, MSF-105, MSF-106, MSF-107, MSF-108, MSF-109, MSF-110, MSF-111, MSF-112, MSF-113, MSF-114, MSF-115, MSF-116, MSF-117, MSF-119, MSF-120, MSF-121, MSF-122, MSF-123, MSF-125, MSF-126, MSF-127, MSF-128, MSF-130, MSF-131, MSF-132, MSF-133, MSF-134, MSF-135, MSF-136, MSF-137, MSF-139, MSF-140, MSF-141, MSF-142, MSF-143, MSF-144, MSF-145, MSF-147, MSF-148, MSF-149, MSF-150, MSF-151, MSF-152, MSF-153, MSF-154, MSF-155, MSF-156, MSF-157, MSF-158, MSF-159, MSF-160, MSF-161, MSF-163, MSF-165, MSF-167, MSF-168, MSF-169, MSF-170, MSF-171, MSF-172, MSF-173, MSF-174, MSF-175, MSF-176, MSF-177, MSF-178, MSF-179, MSF-180, MSF-181, MSF-182, MSF-183, MSF-184, MSF-185, MSF-186, MSF-187, MSF-188, MSF-189, MSF-190, MSF-191, MSF-192, MSF-193, MSF-194, MSF-195, MSF-196, MSF-197, MSF-198, MSF-199, MSF-200, MSF-201, MSF-202, MSF-203, MSF-204, MSF-205, MSF-206, MSF-207, MSF-208, MSF-209, MSF-210, MSF-211, MSF-212, MSF-213, MSF-215, MSF-216, MSF-217, MSF-218, MSF-219, MSF-220, MSF-221, MSF-222, MSF-223, MSF-224, MSF-225, MSF-226, MSF-227, MSF-228, MSF-229, MSF-230, MSF-231, MSF-232, MSF-233, MSF-234, MSF-235, MSF-236, MSF-237, MSF-238, MSF-239, MSF-240, MSF-241, MSF-242, MSF-243, MSF-244, MSF-245, MSF-246, MSF-247, MSF-248, MSF-250, MSF-251, MSF-252, MSF-253, MSF-254, MSF-257, MSF-259, MSF-260, MSF-261, MSF-262, MSF-263, MSF-264, MSF-265, MSF-266, MSF-267, MSF-268, MSF-269, MSF-270, MSF-271, MSF-273, MSF-274, MSF-276, MSF-277, MSF-278, MSF-279, MSF-280, MSF-281, MSF-282, MSF-283, MSF-284, MSF-285, MSF-287, MSF-289, MSF-290, MSF-291, MSF-292, MSF-294, MSF-295, MSF-296, MSF-298, MSF-299, MSF-300, MSF-301, MSF-302, MSF-303, MSF-305, MSF-306, MSF-307, MSF-308, MSF-310, MSF-311, MSF-312, MSF-313, MSF-314, MSF-316, MSF-318, MSF-319, MSF-320, MSF-321, MSF-322, MSF-323, MSF-324, MSF-325 を含むこと、および

(b) 試験試料中の1つまたは複数のM S Fの存在量を、多発性硬化症を有していない1つまたは複数の被験体からの体液試料中の1つまたは複数のM S Fの存在量、または多発性硬化症を有していない被験体中の上記特徴点に関して所定の基準範囲、または試験試料中の少なくとも1つの発現基準特徴点(E R F)の存在量と比較することを含む方法。

【請求項 2】

被験体の多発性硬化症の段階または重度を決定するため、多発性硬化症を発症する危険がある被験体を識別するため、または多発性硬化症を有する被験体に施された治療の影響を調べるための、被験体の多発性硬化症をスクリーニングまたは診断する方法であって、被験体からの体液の試験試料中の、1つまたは複数の以下の多発性硬化症関連タンパク質

アイソフォーム (MSPI) : MSPI-1, MSPI-2, MSPI-3, MSPI-4, MSPI-5.1, MSPI-6, MSPI-7, MSPI-8.1, MSPI-8.2, MSPI-9, MSPI-10, MSPI-11, MSPI-12.1, MSPI-12.2, MSPI-13, MSPI-14, MSPI-15, MSPI-16, MSPI-18, MSPI-20, MSPI-21, MSPI-22, MSPI-24, MSPI-25, MSPI-27, MSPI-28, MSPI-29, MSPI-30, MSPI-31, MSPI-32, MSPI-33.1, MSPI-33.2, MSPI-34, MSPI-36, MSPI-37, MSPI-39.1, MSPI-39.2, MSPI-40, MSPI-42.2, MSPI-43, MSPI-44, MSPI-47, MSPI-48.1, MSPI-48.2, MSPI-48.3, MSPI-49.1, MSPI-49.2, MSPI-51.1, MSPI-52.1, MSPI-52.2, MSPI-54, MSPI-55, MSPI-56, MSPI-58, MSPI-60, MSPI-62.2, MSPI-63, MSPI-64.1, MSPI-64.3, MSPI-65, MSPI-66, MSPI-67.1, MSPI-67.2, MSPI-69, MSPI-70, MSPI-72, MSPI-73, MSPI-75, MSPI-76, MSPI-77.2, MSPI-78.1, MSPI-78.2, MSPI-79, MSPI-80.1, MSPI-81, MSPI-82, MSPI-83, MSPI-84.1, MSPI-84.2, MSPI-86, MSPI-87, MSPI-89.1, MSPI-90, MSPI-91.1, MSPI-92, MSPI-93.1, MSPI-93.2, MSPI-94, MSPI-95, MSPI-96, MSPI-97, MSPI-98, MSPI-99, MSPI-102.1, MSPI-102.2, MSPI-102.3, MSPI-104, MSPI-105.1, MSPI-105.2, MSPI-106, MSPI-107, MSPI-108, MSPI-110, MSPI-111, MSPI-112, MSPI-113, MSPI-114, MSPI-116, MSPI-117, MSPI-119, MSPI-120, MSPI-122, MSPI-123.1, MSPI-125.1, MSPI-125.2, MSPI-126.1, MSPI-126.2, MSPI-127.1, MSPI-128, MSPI-130, MSPI-131, MSPI-132, MSPI-133, MSPI-134, MSPI-135, MSPI-136, MSPI-137, MSPI-139, MSPI-140, MSPI-141.1, MSPI-141.2, MSPI-142, MSPI-143.1, MSPI-144, MSPI-145.2, MSPI-147.2, MSPI-148, MSPI-149, MSPI-150, MSPI-151, MSPI-152, MSPI-154.1, MSPI-154.2, MSPI-154.3, MSPI-155.1, MSPI-155.2, MSPI-155.3, MSPI-156.2, MSPI-158.2, MSPI-159, MSPI-160, MSPI-161, MSPI-163, MSPI-165.1, MSPI-165.2, MSPI-167, MSPI-168, MSPI-169.1, MSPI-169.2, MSPI-170, MSPI-171, MSPI-172, MSPI-173.2, MSPI-175, MSPI-176.1, MSPI-176.2, MSPI-177, MSPI-178, MSPI-179.1, MSPI-179.2, MSPI-180, MSPI-181.1, MSPI-181.2, MSPI-182, MSPI-183, MSPI-184, MSPI-185, MSPI-186, MSPI-187.1, MSPI-187.2, MSPI-188.2, MSPI-189, MSPI-191, MSPI-192.1, MSPI-192.2, MSPI-193, MSPI-194.1, MSPI-194.2, MSPI-195.1, MSPI-196, MSPI-197, MSPI-198, MSPI-199.1, MSPI-199.2, MSPI-200, MSPI-201, MSPI-202.1, MSPI-202.2, MSPI-203, MSPI-205, MSPI-206, MSPI-207, MSPI-208, MSPI-209, MSPI-210, MSPI-211, MSPI-212.2, MSPI-213, MSPI-215, MSPI-216, MSPI-217.3, MSPI-218, MSPI-219, MSPI-220, MSPI-221.1, MSPI-222.1, MSPI-222.2, MSPI-223.1, MSPI-223.2, MSPI-224.1, MSPI-225, MSPI-226, MSPI-228.1, MSPI-228.2, MSPI-229.1, MSPI-229.2, MSPI-230, MSPI-231, MSPI-232, MSPI-233.1, MSPI-233.2, MSPI-234, MSPI-235, MSPI-236.1, MSPI-236.2, MSPI-237, MSPI-238, MSPI-239.1, MSPI-239.2, MSPI-240.1, MSPI-240.2, MSPI-241.1, MSPI-241.2, MSPI-242.1, MSPI-242.2, MSPI-243, MSPI-244, MSPI-245, MSPI-246.1, MSPI-246.2, MSPI-248, MSPI-250.2, MSPI-251, MSPI-254.1, MSPI-257.1, MSPI-257.2, MSPI-257.3, MSPI-260.1, MSPI-260.2, MSPI-261, MSPI-262.2, MSPI-265, MSPI-266, MSPI-267, MSPI-268.1, MSPI-270, MSPI-271, MSPI-273, MSPI-274, MSPI-276, MSPI-277, MSPI-279, MSPI-280.1, MSPI-280.2, MSPI-283.1, MSPI-283.2, MSPI-284.1, MSPI-284.2, MSPI-285, MSPI-289, MSPI-290, MSPI-291.1, MSPI-291.2, MSPI-292, MSPI-295, MSPI-298.1, MSPI-298.2, MSPI-299, MSPI-300, MSPI-301, MSPI-302, MSPI-303.2, MSPI-305, MSPI-306, MSPI-307, MSPI-308, MSPI-311.1, MSPI-311.2, MSPI-311.3, MSPI-313, MSPI-314, MSPI-316, MSPI-318, MSPI-319, MSPI-320, MSPI-322, MSPI-323.1, MSPI-323.2, MSPI-324, MSPI-325.1, MSPI-325.2 を定量的に検出することを含む方法。

【請求項 3】

体液が脳脊髄液 (CSF) である、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

試験試料中の 1 つまたは複数の MSPI の存在量を、多発性硬化症を有していない 1 または複数の被験体からの試料中の 1 つまたは複数の MSPI の存在量、または多発性硬化症を有していない被験体中の前記特徴点に関して所定の基準範囲、または試験試料中の少なくとも 1 つの発現基準特徴点 (ERF) の存在量と比較する、請求項 2 または 3 に記載の方法。

【請求項 5】

定量的に検出するステップが第 1 の試料の少なくとも 1 つのアリコートを試験することを含み、この試験するステップは、

- (a) M S P I に対して免疫特異的である抗体とそのアリコートを接触させること、
- (b) 抗体と M S P I の結合を定量的に測定すること、および
- (c) ステップ (b) の結果と所定の基準範囲を比較すること

を含む、請求項 2 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6】

定量的に検出するステップが、複数の予め選択した M S P I と同系の複数の抗体を用いて複数のアリコートを試験することを含む、請求項 5 に記載の方法。

10

【請求項 7】

請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I)、または M S P I をコードする核酸、および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 8】

多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I) が組換え形である、請求項 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I) に、免疫特異的に結合することができる抗体。

【請求項 10】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法または請求項 9 に記載の抗体。

20

【請求項 11】

抗体がキメラ抗体である、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法または請求項 9 もしくは 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

抗体が二重特異性抗体である、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法または請求項 9 もしくは 10 に記載の抗体。

【請求項 13】

抗体がヒト化抗体である、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法または請求項 9 もしくは 10 に記載の抗体。

30

【請求項 14】

抗体が他のアイソフォームの M S P I よりも高い親和性で M S P I に結合する、請求項 5 もしくは 6 に記載の方法または請求項 9 ～ 13 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

請求項 9 ～ 14 のいずれか一項に記載の 1 つまたは複数の抗体および／または請求項 2 で定義した 1 つまたは複数の M S P I、他の試薬および使用教示書を含むキット。

【請求項 16】

被験体の多発性硬化症の段階または重度を決定するため、多発性硬化症を発症する危険がある被験体を識別するため、または多発性硬化症を有する被験体に施された治療の影響を調べるために、被験体の多発性硬化症のスクリーニングまたは診断に使用するための、請求項 15 に記載のキット。

40

【請求項 17】

請求項 9 ～ 14 のいずれか一項に記載の複数の抗体および／または請求項 2 で定義した複数の M S P I を含む、請求項 15 または 16 に記載のキット。

【請求項 18】

治療上有効量の請求項 9 ～ 14 のいずれか一項に記載の抗体、または抗体の断片もしくは誘導体、および医薬として許容される担体を含む医薬組成物。

【請求項 19】

治療を必要とする被験体に、治療上有効量の請求項 9 ～ 14 のいずれか一項に記載の抗体

50

を投与することを含む、多発性硬化症を治療または予防する方法。

【請求項 20】

治療または予防を必要とする被験体に、治療上有効量の 1 つまたは複数の請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I) および／または該 M S P I をコードする核酸を投与することを含む、多発性硬化症を治療または予防する方法。

【請求項 21】

治療または予防を必要とする被験体に、1 つまたは複数の請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I) の機能を阻害する核酸を治療上有効量投与することを含む、多発性硬化症を治療または予防する方法。

【請求項 22】

核酸が M S P I アンチセンス核酸またはリボザイムである、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

1 つまたは複数の請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I)、M S P I の断片 (M S P I 断片)、M S P I と関連があるポリペプチド (M S P I 関連ポリペプチド)、または M S P I 融合タンパク質と相互作用する作用剤をスクリーニングする方法であって、

(a) M S P I、M S P I の断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質を候補物質と接触させること、および

(b) 候補物質が M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質と相互作用するかどうかを決定することを含む方法。

【請求項 24】

候補物質と M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質の間の相互作用の決定が、候補物質と M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質の結合を定量的に検出することを含む、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

1 つまたは複数の請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I)、M S P I の断片 (M S P I 断片)、M S P I と関連があるポリペプチド (M S P I 関連ポリペプチド)、または M S P I 融合タンパク質の発現または活性を調節する作用剤を、スクリーニングまたは同定する方法であって、

(a) M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質を発現する第 1 集団の細胞と候補物質を接触させること、

(b) 上記 M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質を発現する第 2 集団の細胞と対照物質を接触させること、および

(c) 第 1 および第 2 集団の細胞中の前記 M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質、あるいは該 M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質をコードする m R N A のレベルを比較すること、あるいは第 1 および第 2 集団の細胞中の下流エフェクターの誘導レベルを比較することを含む方法。

【請求項 26】

1 つまたは複数の請求項 2 で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (M S P I)、M S P I の断片 (M S P I 断片)、M S P I と関連があるポリペプチド (M S P I 関連ポリペプチド)、または M S P I 融合タンパク質の発現または活性を調節する作用剤を、スクリーニングまたは同定する方法であって、

(a) 候補物質を第 1 の哺乳動物または哺乳動物群に投与すること、

(b) 対照物質を第 2 の哺乳動物または哺乳動物群に投与すること、および

(c) 第 1 および第 2 集団中の M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、または M S P I 融合タンパク質、あるいは該 M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペ

10

20

30

40

50

プチド、またはMSP I 融合タンパク質をコードするmRNAの発現のレベルを比較すること、あるいは第1および第2集団中の下流エフェクターの誘導レベルを比較することを含む方法。

【請求項27】

哺乳動物が多発性硬化症に関する動物モデルである、請求項26に記載の方法。

【請求項28】

候補物質の投与によって、第2集団の細胞または哺乳動物と比べて、第1集団の細胞または哺乳動物中で、MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質、あるいは該MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質をコードするmRNA、あるいは下流エフェクターのレベルの増大がもたらされる、請求項25～27のいずれか一項に記載の方法。 10

【請求項29】

候補物質の投与によって、第2集団の細胞または哺乳動物と比べて、第1集団の細胞または哺乳動物中で、MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質、あるいは該MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質をコードするmRNA、あるいは下流エフェクターのレベルの低下がもたらされる、請求項25～27のいずれか一項に記載の方法。

【請求項30】

MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質、あるいは該MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質をコードするmRNA、あるいは下流エフェクターの第1および第2集団中のレベルを、正常な対照哺乳動物中の該MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質、あるいは該MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質をコードするmRNAのレベルとさらに比較する、請求項25または27に記載の方法。 20

【請求項31】

哺乳動物が多発性硬化症を有するヒト被験体である、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

1つまたは複数の請求項2で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム(MSP I)、MSP Iの断片(MSP I 断片)、MSP Iと関連があるポリペプチド(MSP I 関連ポリペプチド)、またはMSP I 融合タンパク質の活性を調節する作用剤を、スクリーニングまたは同定する方法であって、 30

(a) 第1のアリコート中で、候補物質とMSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質を接触させること、および

(b) 候補物質を加えた後の第1のアリコート中のMSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質の活性を決定し、対照のアリコート中のMSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質の活性、あるいは所定の基準範囲と比較すること

を含む方法。

【請求項33】

MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質が組換えタンパク質である、請求項20または23～32のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項34】

MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質を固相上に固定する、請求項23、24または32のいずれか一項に記載の方法。

【請求項35】

被験体の多発性硬化症をスクリーニングまたは診断するため、あるいは抗多発性硬化症薬剤または被験体に施された治療の効果を調べるための方法であって、

(a) 請求項2で定義したMSP Iをコードするヌクレオチド配列と相補的な10個以上の連続したヌクレオチドを含む、少なくとも1つのオリゴヌクレオチド・プローブを、 50

被験体からの生物試料から得たRNA、またはこのRNAからコピーしたcDNAと接触させることであって、存在する場合はプローブとヌクレオチド配列のハイブリダイゼーションを可能にする条件下で接触を行うこと、

(b) 存在する場合は、プローブとヌクレオチド配列の間のハイブリダイゼーションを検出すること、および

(c) 存在する場合は、ステップ(b)で検出したハイブリダイゼーションを、対照試料中で検出したハイブリダイゼーション、または所定の基準範囲と比較することを含む方法。

【請求項36】

ステップ(a)がヌクレオチド配列とDNAアレイをハイブリダイズさせるステップを含み、かつアレイの1つまたは複数のメンバーが、異なるMSPIをコードする複数のヌクレオチド配列と相補的なプローブである、請求項35に記載の方法。 10

【請求項37】

1つまたは複数の請求項2で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォームの活性を調節する方法であって、請求項23～34のいずれか一項によって同定した作用剤を被験体に投与することを含む方法。

【請求項38】

治療または予防を必要とする被験体に、1つまたは複数の請求項2で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォームの活性を調節する作用剤を治療上有効用量投与することを含み、それによって多発性硬化症の症状が改善される、多発性硬化症を治療または予防する方法。 20

【請求項39】

多発性硬化症を治療により調節するための標的を同定するための方法であって、1つまたは複数の請求項2で定義した多発性硬化症関連タンパク質アイソフォームの活性を、候補標的が多発性硬化症を調節するのに有効であるかどうかを判定するための手段として使用する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、多発性硬化症並びにその発症および進行と関係がある、ポリペプチド、タンパク質およびタンパク質アイソフォーム、これらをコードしている遺伝子の同定と、たとえば臨床スクリーニング、診断、予後、療法および予防法のため、ならびに薬剤スクリーニング並びに薬剤開発のためのこれらの使用に関する。 30

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症(MS)は、軸索が保たれている炎症性の脱髄傷害であり、若い成人の神経障害の最も一般的な原因であるとみなされている。MSの発症の平均年齢は30才であるが、2つの主要な年齢群が存在する。大部分の患者は発症が21才と25才の間であり、わずかなパーセンテージの患者では41～45才の年齢である。西側の世界では、100,000当たり80を超える個体数が影響を受けている(Kurtzke, J. F. (1980) Neurology (N. Y.), 7: 261～279)。カナダおよび英国でのいくつかの双子に関する研究によって、共に罹患する率は、二卵性双生児および同胞では2%であるのに比べて、一卵性双生児では約30%であることが明らかになっており(Ebers, G. C. 他(1986) New Engl J Med, 315: 1638～42; Mumford, C. J. 他 The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. (1994) Neurology, 1004: 44, 11～15)、現在の証拠は、多数の遺伝子が相互作用して、MSに対する罹患性を高めている可能性があることを示唆している(Nosworthy (1999) Nature 399: suppl. A40～A47)。 40

【0003】

遺伝学および遺伝子型の決定は、MSに関する遺伝性のリスクを定義するためには有用であるが、MSの診断、予後および治療におけるその有用性はかなり低下する。MSが単一疾患であるかどうか、およびそれが視神経脊髄炎、横断脊髄炎、バロー同心円性硬化症、急性MSのマーブルグ変種、および急性播種性脳脊髄炎を含めた、あまり一般的ではない炎症性の脱髄中枢神経系（CNS）症候群とどのように関連があるのかは、依然として知られていない（Noseworthy, Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. (1999) Nature 399: suppl. A40~A47）。さらに、正常な状況下では、生きている患者のいかなる遺伝子発現分析に必要なCNS組織も得ることはできない。プロテオミクス手法は、CNS中のこのような疾患の表現型の分子分析に最も適しているようである。ヒト由来の一次物質のmRNA発現に基づく有意義な分析のために、全CNSを得ることはおおむね難しい。なぜなら、一次ヒト脳組織の死後の遅延は、タンパク質よりも敏速にmRNAに影響を与えるからである（Edgar 他、Molecular Psychiatry 1999、4、173~17）。脳脊髄液（CSF）が脳を浸していると考え、そのタンパク質組成の変化によって、原因としてあるいは診断上疾患と関連がある、CNSのタンパク質の発現パターンの変化が明らかになる可能性がある。適当な量の疾患特異的タンパク質（DSP）が、疾患の発症時および／または疾患の進行中に、生きている患者の疾患組織から体液中に分泌または放出される。多くの場合、DSPのこれらの変化は、個体の遺伝的構成とは無関係であり、むしろ病原性表現型に寄与する1組の分子性および細胞性変化と、直接関係があると思われる（Carpenter J Psychiatr Res 1998 32、191~5）。

【0004】

MS患者の検死解剖によって、脱髄、軸索が比較的保たれていること、ならびにグリオースおよび異なる程度の炎症によって特徴付けられる、CNS中の多数の病巣（プラーク）の存在が明らかになった。視神経、脊髄、および周室部を含めた、いくつかの好発部位が存在するが、脳または脊髄の任意の部分が影響を受ける可能性がある（Lumsden, C. E. (1970) In Vinken P. J. Bruyn, GW, eds., Handbook of Clinical Neurology. Vol. 9 Amsterdam, North Holland, P. P. 217~309）。MSのような大部分の炎症性神経障害では、細胞および／または分子レベルでの変化と、神経系の構造および機能の間の関連についてはほとんど知られていない。

【0005】

診断は、依然として臨床的なものである。診断には、病巣が時間的および空間的に播種性であることを実証すること、および同じ臨床的病像を生み出す可能性がある他の条件を排除することが必要である。Poser規準として知られるMSの臨床的分類項目には、誘発反応および磁気共鳴映像法（MRI）の異常性とCSF中の免疫学的な異常性がある（Poser, C. M. 他 (1983) Ann Neurol 13: 227~231）。現れるMSの症状は研究する個体群の間で変わるが、感覚的な症状の患者24%、眼の神経炎の患者31%、肢部が弱った患者17%、脳幹および小脳に症状がある患者25%を含む（Thompson, A. J. 他 (1986) Q. J. Med. 225: 69~80）。したがってMSには、広範囲の臨床所見および過程があり、任意の所与の患者の臨床過程は予測不能である。大部分のMS患者では、MSは再発および寛解過程で始まり、神経機能不全の症状の発現は数週間続く。疾患の過程を通じて、寛解が不完全となる傾向を示し、患者は進行期（2次進行）に入る。疾患のこの時期の間に、患者に重度の不可逆的障害が進行する。約3分の1の患者は、二次的な進行が進まない良性的MSを有している。約10%の患者では、再発および寛解を伴わずに、発症から進行性の傷害が進行する（1次進行性MS）。MSにおける生化学的変化はほとんど同定されていない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

したがって、原因となる細胞性および／または分子性欠陥を同定し、特徴付けること、および神経病理学が、神経障害のより良い治療のために必要である。悪化または再発の可能性があるために、迅速な診断が、特に以下のように患者を分類するために、非常に有益であると思われる。

【0007】

1. 良性MSと進行性MS
 2. 一次進行性MSと2次進行性MS
 3. 一次進行性MSおよび2次進行性MSの特異的病理生理学的サブタイプ
- 治療戦略には3つの目的がある：1、疾患の過程を変えること、2、再発の重度および期間に影響を与えること、3、対症療法および神経のリハビリテーション。 10

【0008】

現在MSには、生きている患者の診断および予後に有用である、客観的な生化学的マーカーがない。MS患者のCSF中のDSPを同定することによって、疾患病理への重要な洞察とより良い診断および治療戦略のための機会をもたらすことができる。MS患者からのCSFの等電点電気泳動によって、MSである患者の95%で、オリゴクロナル・バンドの存在が明らかになった(McLean他、(1990) Brain、113：1269～89)。しかしながら、MRIと同様に、この発見がMS患者に特異的であるわけではなく、ギラン・バレー症候群、サルコイドーシスおよび慢性髄膜炎を含めた、他の神経障害においても検出することができる。したがって、個々の神経障害ならびに急性および慢性CNS疾患を区別する、特異性および感受性には、個々のタンパク質ではなくDSPのレパートリーを選択することが必要であると思われる。 20

【0009】

既存の非常に不十分な試験の時間浪費性およびその出費のために、CSFまたは他の体液（たとえば尿、血液、血清）の試料中の1つまたは複数の物質を測定することが非常に望ましく、このことがMSの明確な診断をもたらすか、あるいは鑑別診断からMSを排除するのに役立つと思われる。

【0010】

したがって、生きている被験体のMSを診断するための、感受性があり特異的であるバイオマーカーとして、MS関連タンパク質を同定する必要性が存在する。さらに、迅速に、強力に、特異的に働き副作用がほとんど無い、MS用の新しい治療剤が明らかに必要である。 30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明は、MSの臨床スクリーニング、診断および治療のため、多発性硬化症の治療の有効性を調べるため、臨床試験の参加者を選択するため、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、およびMSの治療用の薬剤をスクリーニングおよび開発するための方法および組成物を提供する。

【0012】

本発明の第1の態様は、2次元電気泳動によってCSFの試料を分析して、少なくとも1つの多発性硬化症関連の特徴(MSF)、たとえば本明細書で開示する1つまたは複数のMSFまたはこれらの任意の組合せの存在またはレベルを検出することを含む、MSを診断するための方法を提供する。これらの方法は、臨床スクリーニング、予後、療法の結果の調査、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者の識別、薬剤のスクリーニングおよび開発、並びに薬剤治療の新しい標的の同定にも適している。 40

【0013】

本発明の第2の態様は、CSFの試料中の、少なくとも1つの多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム(MSPI)、たとえば本明細書で開示する1つまたは複数のMSPIまたはこれらの任意の組合せの存在またはレベルを検出することを含む、MSを診断するための方法を提供する。これらの方法は、臨床スクリーニング、予後、療法の結果の調査 50

、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者の識別、薬剤のスクリーニングおよび開発、並びに薬剤治療の新しい標的の同定にも適している。

【0014】

本発明の第3の態様は、抗体、たとえばMSPI、たとえば本明細書で開示するMSPIに免疫特異的に結合することができる、モノクローナルおよびポリクローナル、キメラおよびヒト化抗体を提供する。

【0015】

本発明の第4の態様は、単離MSPI、すなわちMSPIと著しく異なる等電点または著しく異なる見かけの分子量を有する、ポリペプチド、タンパク質またはタンパク質アイソフォームを含んでいないMSPIを含む、調製物を提供する。

10

【0016】

本発明の第5の態様は、前に列挙した方法で使用することができ、1つまたは複数の調製物、または抗体、および他の試薬、標識、基質、および必要な場合は使用説明書を含んでよいキットを提供する。このキットは疾患の診断用に使用することができ、あるいは新しい診断および／または治療剤を同定するためのアッセイ品であってよい。

【0017】

本発明の第6の態様は、MSを治療する方法であって、MSを有する被験体においてMSPIの発現または活性（たとえば酵素活性または結合活性）、あるいはこの両方を調節（たとえば上方制御または下方制御）する、治療上有効量の作用剤を被験体に投与して、MSの発症または進行を妨げるかあるいは遅らせる、MSの進行を妨げるかあるいは遅らせる、あるいはMSの症状を改善することを含む方法を提供する。

20

【0018】

本発明の第7の態様は、たとえばMSF、MSPI、MSPI類似体、またはMSPI関連ポリペプチドの発現またはその酵素活性もしくは結合活性の特性を調節（たとえば上方制御または下方制御）する作用剤を、スクリーニングする方法を提供する。

【0019】

〔発明の詳述〕

1. 以下に詳細に記載する本発明は、哺乳動物被験体の多発性硬化症を臨床スクリーニングおよび診断するため、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、多発性硬化症の治療の結果を調べるため、薬剤をスクリーニングし薬剤を開発するための、方法および組成物を提供する。本発明は、治療用組成物を哺乳動物被験体に投与して、多発性硬化症を治療または予防することを含む。哺乳動物被験体はヒト以外の哺乳動物であってよいが、ヒトであることが好ましく、ヒト成人、すなわち少なくとも21才のヒト被験体であることがより好ましい。制限するためではなく、本開示を明らかにするために、本発明をCSF試料の分析に関して記載する。しかしながら、当業者に理解されるように、以下に記載するアッセイおよび技法は、体液（たとえば血液、血清、血漿、唾液または尿があるがこれらだけには限られない）、MSを有しているかMSが進行している危険がある被験体からの組織試料（たとえば脳生検などの生検）またはそのホモジェネートを含めた、他のタイプの試料に適用することができる。本発明の方法および組成物は、生きている被験体のスクリーニングおよび診断に有用であるが、たとえば同じ疾患が進行するリスクがある被験体の家族のメンバーを識別するために、被験体の死後の診断に使用することもできる。

30

40

【0020】

本開示の概説に助力するために、以下の定義を与える。

【0021】

1. 1 定義

「特徴点」とは、2Dゲル中で同定されるスポットのことであり、「多発性硬化症関連特徴点」（MSF）という語は、MSを有していない被験体からの第2の試料または試料セットと比べて、MSを有する被験体からの第1の試料または試料セット中に差別的に存在する特徴点のことである。2Dゲル中で同定される特徴点すなわちスポットは、2Dゲル

50

電気泳動によって、特に本明細書に記載する好ましい技術を使用することによって決定される、等電点 (p I) およびみかけの分子量 (MW) によって特徴付けられる。本明細書で使用するように、前記特徴点を検出するための方法 (たとえば 2 D 電気泳動) が第 1 および第 2 の試料または試料セットに施され、異なるシグナルを与えるとき、第 2 の試料または試料セットに対して、第 1 の試料または試料セット中に特徴点が「差別的に存在する」。検出法によって、MSF または MSP I が第 2 の試料または試料セット中よりも第 1 の試料または試料セット中に豊富に存在することが示される場合、あるいは MSF または MSP I が第 1 の試料または試料セット中で検出可能であり、第 2 の試料または試料セット中では実質的に検出不能である場合、第 2 の試料または試料セットに対して、第 1 の試料または試料セット中で、MSF (またはタンパク質アイソフォーム、すなわち以下で定義するような MSP I) が「増大」している。逆に、検出法によって、MSF または MSP I が第 2 の試料または試料セット中に第 1 の試料または試料セット中よりも豊富に存在することが示される場合、あるいは MSF または MSP I が第 1 の試料または試料セット中で検出不能であり、第 2 の試料または試料セット中では検出可能である場合、第 2 の試料または試料セットに対して、第 1 の試料または試料セット中で、MSF または MSP I が「減少」している。

10

20

30

40

50

【0022】

特に、2 つの試料または試料セット中の特徴点の相対的な存在量は、その標準シグナルを参照して 2 ステップで決定される。最初に、第 1 の試料または試料セット中の特徴点の検出において得られたシグナルを、適切な背景パラメータ、たとえば (a) 分析する試料中の総タンパク質 (たとえばゲルに載せる総タンパク質)、(b) 発現の基準の特徴点 (ERF)、すなわち、好ましい技術の変数の制限内で、調べる被験体の個体群、たとえば表 III に開示した ERF 中で、その存在量が実質的に不変である特徴点、または (c) より好ましくは試料中のすべてのタンパク質それぞれの合計として検出される総シグナルを参照することによって標準化する。

【0023】

第 2 に、第 1 の試料または試料セット中の特徴点に関する標準シグナルを、第 2 の試料または試料セット中の同じ特徴点に関する標準シグナルと比較して、第 2 の試料または試料セットに対して、第 1 の試料または試料セット中に「差別的に存在する」特徴点を識別する。

【0024】

「折りたたみの変化」は、「折りたたみの増大」および「折りたたみの減少」を含み、これは第 2 の試料または試料セットと比べた、第 1 の試料または試料セット中での MSF の存在量の相対的な増大または減少、あるいはポリペプチド (たとえば以下で定義するような MSP I) の発現または活性の相対的な増大または減少のことである。MSF またはポリペプチドの折りたたみの変化は、当業者に知られている任意の技法によって測定することができる。ただし、観察される増大または減少は、使用する技法に応じて変化するであろう。好ましくは、折りたたみの変化は、以下の実施例に記載するように本明細書では決定される。

【0025】

「多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム (MSP I)」とは、MS を有していない被験体からの第 2 の試料または試料セットと比べて、MS を有する被験体からの第 1 の試料または試料セット中に差別的に存在するポリペプチドのことである。本明細書で使用するように、前記特徴点を検出するための方法 (たとえば 2 D 電気泳動またはイムノアッセイ) が第 1 および第 2 の試料または試料セットに施され (MSF に関して前に記載したように)、異なるシグナルを与えるとき、第 2 の試料または試料セットに対して、第 1 の試料または試料セット中に MSP I が「差別的に存在する」。MSP I は、それが含んでいる 1 つまたは複数のペプチド配列によって、さらに好ましくは 2 D 電気泳動によって、特に本明細書に記載する好ましい技術を使用して決定される p I および MW によって特徴付けられる。典型的には MSP I は、MSF のアミノ酸配列決定によって同定または特徴付

けされる（図2）。

【0026】

MSP Iは、そのp IおよびMWと結び付く特定のペプチド配列として、あるいはこれによって特徴付けられる。本明細書に示すように、MSFは、好ましい技術を使用しても区別不能なp IおよびMWを有するが異なるペプチド配列を有する、1つまたは複数のMSP Iを含み得る。MSP Iのペプチド配列を利用して、このようなペプチド配列を含む以前に同定されたタンパク質に関する、データベースを検索することができる。いくつかの場合、以前に同定されたタンパク質および／またはその変異体を認識することができる市販の抗体が、存在するかどうかを確かめることができる。MSP Iは、以前に同定されたタンパク質に対応するか、以前に同定されたタンパク質の変異体であることが好ましい。 10

【0027】

本明細書で使用する「変異体」とは、1つの遺伝子によってコードされているポリペプチドファミリーのメンバーであるか、あるいは関連遺伝子のファミリー内の遺伝子配列からの、p IまたはMWまたはこの両方が異なる、ポリペプチドのことである。このような変異体は、そのアミノ酸組成が異なっている可能性があり（たとえば選択的mRNAまたはプレmRNAプロセッシング、たとえば選択的スプライシングまたは制限的なタンパク質分解の結果として）、さらに、あるいは選択的プロセッシングでは、該変異体は差別的な翻訳後の改変（たとえばグリコシル化、アシル化、リン酸化）により生じる可能性がある。

【0028】

MSF、MSP I、またはMSP I関連ポリペプチドの発現または活性に関する「調節」とは、任意の変化、たとえばMSF、MSP I、またはMSP I関連ポリペプチドの発現または活性の上方制御または下方制御、増大または減少のことである。当業者は、本発明の開示に基づいて、当業者に知られるアッセイによって、このような調節を決定できることを理解するであろう。 20

【0029】

「MSP I類似体」とは、MSP Iと類似または同一の機能を有するが、MSP Iのアミノ酸配列と類似または同一であるアミノ酸配列は必ずしも含む必要がない、あるいはMSP Iの構造と類似または同一である構造を有する、ポリペプチドのことである。本明細書で使用するように、ポリペプチドのアミノ酸配列は、それが以下の規準の少なくとも1つを満たす場合、MSP Iのアミノ酸配列と「類似」である：（a）ポリペプチドが、MSP Iのアミノ酸配列と少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%）同一であるアミノ酸配列を有する；（b）ポリペプチドが、厳しい条件下で、MSP Iの少なくとも5個のアミノ酸残基（より好ましくは、少なくとも10個のアミノ酸残基、少なくとも15個のアミノ酸残基、少なくとも20個のアミノ酸残基、少なくとも25個のアミノ酸残基、少なくとも40個のアミノ酸残基、少なくとも50個のアミノ酸残基、少なくとも60個のアミノ酸残基、少なくとも70個のアミノ酸残基、少なくとも80個のアミノ酸残基、少なくとも90個のアミノ酸残基、少なくとも100個のアミノ酸残基、少なくとも125個のアミノ酸残基、または少なくとも150個のアミノ酸残基）をコードしているヌクレオチド配列にハイブリダイズする、ヌクレオチド配列によってコードされている；または（c）ポリペプチドが、MSP Iをコードしているヌクレオチド配列と少なくとも30%（より好ましくは、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%または少なくとも99%）同一であるヌクレオチド配列によってコードされている。本明細書で使用するように、MSP Iの構造と「類似の構造」を有するポリペプチドとは、MSP Iの構造と類似の二次、三次または四次構造を有するポリペプチド 40 50

のことである。ポリペプチドの構造は、X線結晶解析、核磁気共鳴法、および結晶電子顕微鏡だけには限られないがこれらを含めた、当業者に知られる方法によって決定することができる。

【0030】

「MSP I 融合タンパク質」とは、(i) MSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチドまたは MSP I 関連ポリペプチド断片のアミノ酸配列と、(ii) 異種のポリペプチド（すなわち非 MSP I、非 MSP I 断片、または非 MSP I 関連ポリペプチド）のアミノ酸配列とを含むポリペプチドのことである。

【0031】

「MSP I 相同体」とは、MSP I のアミノ酸配列と類似のアミノ酸配列を含むが、MSP I と類似または同一の機能は必ずしも有していない、ポリペプチドのことである。 10

【0032】

「MSP I オルソログ」とは、(i) MSP I のアミノ酸配列と類似のアミノ酸配列を含み、かつ (ii) MSP I の機能と類似または同一の機能を有する、ヒト以外のポリペプチドのことである。

【0033】

「MSP I 関連ポリペプチド」とは、MSP I 相同体、MSP I 類似体、MSP I の変異体、MSP I オルソログ、またはこれらの任意の組合せのことである。

【0034】

「キメラ抗体」とは、異なる部分が異なる動物種に由来する分子、ヒト免疫グロブリンの定常領域およびネズミ mAb 由来の可変領域を有する分子などのことである（たとえば参照によってその全容を本明細書に取り込んである、Cabilly 他の特許第 4,816,567 号、および Boss 他の特許第 4,816,397 号を参照のこと）。たとえば、抗体の一部分を免疫グロブリン (IgA、IgE、IgG、IgM) の定常ドメイン、またはその一部分 (CH1、CH2、CH3、またはこれらの任意の組合せまたはその一部分) と融合させることができ、その結果キメラ抗体が生じる。 20

【0035】

「ヒト化抗体」とは、ヒト以外の種からの 1 つまたは複数の相補性決定領域 (CDR)、およびヒト免疫グロブリン分子からの骨格領域を有する、ヒト以外の種からの分子のことである。 30

【0036】

「誘導体」とは、少なくとも 1 つのアミノ酸残基の置換、欠失および付加の導入によって変化した、第 2 のポリペプチドのアミノ酸配列を含むポリペプチドのことである。誘導体ポリペプチドは、第 2 のポリペプチドと類似または同一の機能を有する。

【0037】

「断片」とは、第 2 のポリペプチドのアミノ酸配列の、少なくとも 5 個のアミノ酸残基（好ましくは、少なくとも 10 個のアミノ酸残基、少なくとも 15 個のアミノ酸残基、少なくとも 20 個のアミノ酸残基、少なくとも 25 個のアミノ酸残基、少なくとも 40 個のアミノ酸残基、少なくとも 50 個のアミノ酸残基、少なくとも 60 個のアミノ酸残基、少なくとも 70 個のアミノ酸残基、少なくとも 80 個のアミノ酸残基、少なくとも 90 個のアミノ酸残基、少なくとも 100 個のアミノ酸残基、少なくとも 125 個のアミノ酸残基、少なくとも 150 個のアミノ酸残基、少なくとも 175 個のアミノ酸残基、少なくとも 200 個のアミノ酸残基、または少なくとも 250 個のアミノ酸残基）のアミノ酸配列を含む、ペプチドまたはポリペプチドのことである。MSP I の断片は、MSP I の機能的活性を有していることが好ましい。 40

【0038】

2 つのアミノ酸配列または 2 つの核酸配列の「同一性パーセント」は、最適な比較目的のために配列を整列させ（たとえば、比較する配列との最良のアラインメントのために、いずれかの配列にギャップを導入することができる）、アミノ酸残基またはヌクレオチドを対応する位置で比較することによって決定することができる、すなわち一般には決定され 50

る。「最良のアラインメント」とは、最高の同一性パーセントをもたらす2つの配列のアラインメントである。同一性パーセントは、比較する配列中の同一であるアミノ酸残基またはヌクレオチドの数によって決定される（すなわち、同一性%＝同一である位置の数／位置の総数×100）。

【0039】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、当業者に知られている数学的アルゴリズムを使用して行うことができる。2つの配列を比較するための数学的アルゴリズムの一例は、KarlinおよびAltschul（1990）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264～2268（それを修飾したKarlinおよびAltschul（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873～5877と同様に変更された）のアルゴリズムである。Altschul他（1990）J. Mol. Biol. 215:403～410のNBLASTおよびXBLASTプログラムは、このようなアルゴリズムを取り込んでいる。BLASTによるヌクレオチド検索は、NBLASTプログラムをスコア＝100、語長＝12で行うことにより、本発明の核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTによるタンパク質検索は、XBLASTプログラムをスコア＝50、語長＝3で行うことにより、本発明のタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較目的用のギャップを入れたアラインメントを得るために、Gapped BLASTを、Altschul他（1997）Nucleic Acids Res. 25:3389～3402に記載されているように利用することができる。あるいは、PSI-Blastを使用して、反復検索を行うことができ、これによって分子間の距離関係が検出される（同上文献）。BLAST、Gapped BLAST、PSI-Blastプログラムを使用するときは、それぞれのプログラム（たとえばXBLASTおよびNBLAST）のデフォルト・パラメータを使用することができる。

【0040】

配列を比較するために使用される数学的アルゴリズムの他の例は、MyersおよびMiller、CABIOS（1989）のアルゴリズムである。GCG配列整列用ソフトウェアのパッケージの一部である、ALIGNプログラム（版2.0）は、このようなアルゴリズムを取り込んでいる。当分野で知られている配列分析用の他のアルゴリズムには、TorellisおよびRobotti（1994）Comput. Appl. Biosci.、10:3～5中に記載されるようなADVANCEおよびADAM、PearsonおよびLipman（1988）Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444～8中に記載されるFASTAがある。FASTA中では、ktup値は、検索の感度および速度を設定する制御オプションである。

【0041】

「診断」とは、診断、予後、調査、特徴付け、臨床試験の参加者を含めた患者の選択、および特定の障害の危険性があるかもしくは特定の障害を有している患者、または特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別すること、あるいは特定の治療処置に対する患者の応答を評価または調査することである。

【0042】

「治療」とは、療法、予防および予防法のことであり、特に予防法（予防）のため、あるいは患者が苦しんでいる場合は疾患または慢性病を治すために、患者に対して薬品を投与すること、または医学的処置を行うことである。

【0043】

「作用剤」とは、医薬組成物および診断用組成物を調製するために使用することができる、あるいは化合物、アゴニスト、アンタゴニスト、核酸、ポリペプチド、断片、アイソフォーム、変異体、またはこのような目的用に独立に使用することができる他の物質であってよいすべて物質のことであり、これらはすべて本発明に従うものである。

【0044】

「非常に厳しい条件」とは、65℃における0.5MのNaHPO₄、7%ドデシル硫酸ナ

10

20

30

40

50

トリウム (SDS)、1 mM の EDTA 中でのフィルターに結合した DNA へのハイブリダイゼーション、および 68 °C における 0.1 × SSC / 0.1 % SDS 中での洗浄のことである (Ausubel F. M. 他、eds.、1989、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. 1、Green Publishing Associates, Inc.、and John Wiley & Sons, Inc.、New York、p. 2. 10. 3、参照によってその全容は本明細書に取り込まれる)。

【0045】

いくつかの適用例に関しては、二重らせんの形成のために、あまり厳しくない条件が必要とされる。本明細書で使用するように、「適度に厳しい条件」とは、42 °C における 0.2 × SSC / 0.1 % SDS 中での洗浄のことである (Ausubel 他、1989、上記)。

10

【0046】

「脳脊髄液 (CSF)」とは、Physiological Basis of Medical Practice (J. B. West、ed.、Williams and Wilkins、Baltimore、MD 1985) に記載されたように、CNS の塊を囲んでいる体液のことである。CSF には、心室 CSF および腰部 CSF がある。

【0047】

「血清」とは、血液試料の凝固および遠心沈殿によって生成される、上澄み液のことである。

20

【0048】

「血漿」とは、血液試料の凝固の阻害 (たとえばクエン酸塩または EDTA による) および遠心沈殿によって生成される、上澄み液のことである。

【0049】

本明細書で使用する「血液」は、血清および血漿を含む。

【0050】

「2次元電気泳動」(2D電気泳動)は、等電点電気泳動、次に変性電気泳動を含む技法を意味し、2次元電気泳動によって、複数の分離タンパク質を含む2次元ゲル(2Dゲル)が生成される。

【0051】

30

1. 2 好ましい技術

変性電気泳動のステップは、ドデシル硫酸ナトリウムの存在下で、ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) を使用することが好ましい。特に好ましいのは、それぞれ参照によって、特に WO 98 / 23950 の 23 ~ 35 ページのプロトコルを参照してその全容を本明細書に取り込んである、WO 98 / 23950 中および米国特許第 6,064,654 号および第 6,278,794 号中に記載された、非常に正確な自動式の方法および装置 (「好ましい技術」) である。簡潔には、好ましい技術によって、生物試料中の生体分子 (たとえば糖タンパク質を含めたタンパク質) を同定、選択および特徴付けするための、効率の良いコンピュータ支援の方法および装置が与えられる。分子の電気泳動における移動性および等電点に従い、2次元ゲル上で生体分子を分離させることによって、2次元アレイが作製される。2次元アレイ中で検出された複数の生体分子の同一性、みかけの分子量、等電点、および相対的な存在量を表す、アレイのコンピュータ合成したデジタル・プロファイルを作製し、これによって多数の生物試料からのプロファイルのコンピュータ仲介の比較、ならびに当該の分離タンパク質のコンピュータ支援の切り出しが可能である。

40

【0052】

蛍光標識されたタンパク質を検出するための好ましいスキャナは、それぞれ参照によってその中身を本明細書に取り込んである、WO 96 / 36882 中、および「Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Op

50

t i c s a n d P h a s e - s e n s i t i v e D e t e c t i o n (T o t a l
I n t e r n a l R e f l e c t i o n , E l e c t r o p h o r e s i s) 」 とい
う表題の、David A. Basi ji の Ph. D 論文、University of
Washington (1997)、Volume 58 / 12 - B of Dis se
r t a t i o n A b s t r a c t s I n t e r n a t i o n a l 、6686 ページ中
に記載されている。これらの文書には、高速での自動化された統合的な操作のために特異
的に設計された、イメージ・スキャナが記載されている。このスキャナ、および保存蛍光
スクリーンは、蛍光染料または銀染色で染色されたゲルを映し出すことができる。Bas
i j i の論文は、レーザーの散乱によるベースライン・ノイズ、または均質な蛍光から、
変調された蛍光を識別するための位相－感光検出システムを与えているが、スキャナは非
位相－感光方式で操作することもできる。この位相－感光の能力は、従来の蛍光画像シ
ステムと比べて、ほぼ同程度あるいはそれ以上に、機器の感度を増大させると思われる。感
度が増大することによって、上流の機器に対しての試料調製物の負荷量が減少すると思わ
れ、一方、画質の向上は、プロセスの下流の画像分析を簡単にする。

10

20

30

40

50

【0053】

さらに一層好ましいスキャナは、前に記載したスキャナの改変版である。この好ましいス
キャナでは、正確なリード・スクリュース式のドライブ・システム上のスキャナを通して、
ゲルが運ばれる。このことは、Basi ji の論文に記載されているベルト駆動型シス
テム上に、ガラス・プレートを載せるためには好ましい。なぜならこのことによって、画
像レンズを通過するゲルを正確に運ぶ、再現性のある手段が与えられるからである。

【0054】

好ましいスキャナでは、知られている位置にガラス・プレートをしっかりと保持する3つ
のアラインメント・ストップに対して、ゲルが固定される。これを行うことによって、前
述の正確な運搬システムに関して、ゲルの絶対的な位置を予測し記録することができる。
これによって、ゲル上のそれぞれの特徴点の座標をより正確に決定することができ、望む
ならば、特徴点を切り出すための切断ロボットに伝えることができることが確実になる。
好ましいスキャナでは、ゲルを保持する担体は、画像の形状を正すために使用する4つの
完全な蛍光マーカーを有している。これらのマーカーは、スキャニングが正しく行われた
ことを確認する、品質コントロール特徴点である。

【0055】

Basi ji の論文に記載されているスキャナと比べて、好ましいスキャナの光学部品
は逆さにされている。好ましいスキャナでは、レーザー、ミラー、導波管および他の光学
部品が、スキャニングされるガラス・プレートの上にある。Basi ji の論文に記載
されているスキャナは、下側にこれらの部品を有している。好ましいスキャナでは、ガラ
ス・プレートはスキャナ上にゲル側を下にして装着されており、したがって光の進路はガ
ラス・プレートを通過することには変わらない。これを行うことによって、ガラス・プレ
ートから剥離する可能性があるゲルのいかなる小片も、機械の構成部分中ではなく機器の
底部に落ちるであろう。このことがシステムの機能に影響を与えることはないが、その信
頼性を増大させる。

【0056】

さらに一層好ましいのは、シグナルの出力が、いかなるピーク飽和もなく、あるいはシグ
ナルを暗号化する平方根もなく、完全な16ビットのデータにデジタル化される、好まし
いスキャナの改変版である。走査ビームの進路に沿った検出感度のあらゆる変化を補正す
るために、補正アルゴリズムも適用されている。この変化は、機械構成部分の異常および
導波管のいたる所で異なる収集効率によるものである。蛍光の通過が均一であるパースペ
ックス・プレートを使用して、検量を行う。このプレートのスキャンから得るデータを使
用して、それぞれの画素レベルから標的レベルにシグナルを増大させるのに必要な増倍率
を決定する。次いでこれらの増倍率を、後のゲルのスキャンで使用して、あらゆる内部の
光学的変化を取り除く。

【0057】

1. 3 多発性硬化症関連の特徴点 (MSF)

本発明の一態様では、2次元電気泳動を使用し、被験体、好ましくは生きている被験体からのCSFを分析して、MSをスクリーニング、予防または診断するために、1つまたは複数の多発性硬化症関連の特徴点 (MSF) の発現を検出または定量化し、MSを有する被験体の予後を決定し、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、あるいは薬剤開発のためにMSの進行を調査し、MS療法の有効性を調査する。

【0058】

たとえば、制限的にではなく、好ましい技術を使用して、MSを有する被験体からのいくつかの試料と、MSを有していない被験体からの試料を2次元電気泳動によって分離させ、得られたゲルの蛍光デジタル画像を、選択した代表的な主マスターゲル画像と整合させる。このプロセスによって、そのpIおよびMWによって特徴付けられる任意のゲルの特徴点を同定し、研究対象の任意のゲルを調べることができる。特に、所与の特徴点中に存在するタンパク質の量を、それぞれのゲルにおいて測定することができる。この特徴点の存在量は、類似の試料からのゲル（たとえばMSを有する被験体からの試料によるゲル）の間で平均化することができる。最後に、このようにして作成した試料セットに統計学的な分析を行って、2つまたはそれ以上の試料のセットを互いに比較することができる。

10

【0059】

本明細書で開示するMSFは、MSを有する被験体からのCSF試料を、MSを有していない被験体からのCSF試料に対して比較することによって同定されている。MSを有していない被験体は、知られている疾患または病状が無い被験体（正常な被験体）、およびMS以外の疾患を有する被験体を含む。

20

【0060】

MSFの2つのグループが、好ましい技術の方法および装置によって同定されている。第1のグループは、MSを有していない被験体のCSFと比べてMSを有する被験体のCSF中で減少している、差別的な存在が顕著なMSFからなる。これらのMSFは、表Iに与えるようにみかけの分子量 (MW) および等電点 (pI) によって記載することができる。

【0061】

【表1】

表 I MSを有する被験体のCSF中で減少しているMSF

MSF#	pI	MW (Da)	減少倍数
MSF-1	8.75	21021	>100
MSF-2	5.62	34394	>100
MSF-3	9.75	11627	>100
MSF-4	6.24	102603	>100
MSF-5	6.18	105482	>100
MSF-6	5.91	21888	>100
MSF-7	5.52	56560	>100
MSF-8	5.49	34394	>100
MSF-9	6.01	184426	>100
MSF-10	6.06	184426	86.63
MSF-11	5.96	185225	83.95
MSF-12	5.41	51566	79.92
MSF-13	5.92	185225	74.98
MSF-14	6.80	32080	65.52
MSF-15	5.88	186027	53.51
MSF-16	6.14	186027	49.41
MSF-17	5.51	12598	46.66
MSF-18	5.79	186832	43.72
MSF-20	5.50	20607	39.71
MSF-21	4.70	43626	39.47
MSF-22	5.75	186832	35.45
MSF-23	5.67	178932	35.06
MSF-24	6.18	187641	34.05
MSF-25	6.23	48975	32.70
MSF-26	6.18	178932	29.18
MSF-27	6.11	126160	26.38
MSF-28	6.23	186832	25.16
MSF-29	6.10	184426	23.38
MSF-30	7.82	31104	22.71
MSF-31	5.84	186832	22.09
MSF-32	6.03	135312	21.97
MSF-33	4.89	52993	21.83
MSF-34	5.59	21103	21.54
MSF-35	6.24	74941	20.84
MSF-36	5.93	49874	20.74
MSF-37	5.30	179707	20.61
MSF-38	6.28	87995	20.13
MSF-39	4.82	98505	19.20
MSF-40	5.35	11955	17.97
MSF-41	5.79	22491	17.70
MSF-42	5.98	64540	17.13
MSF-43	5.54	37852	16.38
MSF-44	6.28	27735	16.05
MSF-45	4.70	64736	15.87

10

20

30

40

【 0 0 6 2 】

【 表 2 】

MSF#	pI	MW (Da)	減少倍数
MSF-46	6.13	178161	14.86
MSF-47	5.49	64150	13.99
MSF-48	4.77	99610	12.90
MSF-49	4.54	74941	12.85
MSF-50	5.83	111485	12.58
MSF-51	7.48	11668	12.15
MSF-52	5.72	146050	11.63
MSF-53	4.99	40463	11.59
MSF-54	8.64	20604	11.51
MSF-55	5.65	150534	10.77
MSF-56	5.49	158545	10.52
MSF-57	9.92	29162	10.44
MSF-58	5.66	186832	10.26
MSF-59	6.23	178932	10.26
MSF-60	5.60	150534	10.25
MSF-61	6.35	164223	9.93
MSF-62	6.52	175109	9.70
MSF-63	5.00	171366	9.60
MSF-64	6.32	178932	9.40
MSF-65	6.18	136566	9.21
MSF-66	5.49	98505	9.01
MSF-67	5.16	53159	8.86
MSF-69	4.51	126852	8.79
MSF-70	6.15	89080	8.73
MSF-71	5.56	85203	8.73
MSF-72	5.09	156672	8.58
MSF-73	7.26	33226	8.46
MSF-75	10.06	11587	8.39
MSF-76	5.72	151186	8.30
MSF-77	6.38	177393	8.14
MSF-78	6.25	33313	8.09
MSF-79	5.48	85680	8.08
MSF-80	6.06	60926	7.60
MSF-81	5.94	42899	7.16
MSF-82	5.72	100168	6.73
MSF-83	5.51	44365	6.71
MSF-84	5.53	99610	6.70
MSF-85	5.39	38741	6.34
MSF-86	4.54	27735	6.23
MSF-87	5.29	125687	5.86
MSF-88	5.57	80579	5.62
MSF-89	5.58	63762	5.61
MSF-90	6.08	93159	5.38
MSF-91	6.26	21818	5.34
MSF-92	5.54	150534	5.13
MSF-93	5.70	34998	5.12
MSF-94	5.63	178161	5.08

10

20

30

40

【 0 0 6 3 】

【 表 3 】

MSF#	pI	MW (Da)	減少倍数
MSF-95	5.28	52673	5.01
MSF-96	5.80	91613	4.99
MSF-97	5.71	91103	4.86
MSF-98	5.54	48679	4.80
MSF-99	5.43	112518	4.62
MSF-100	5.99	67749	4.54
MSF-101	5.59	178161	4.54
MSF-102	5.95	34494	4.49
MSF-104	6.29	100168	4.40
MSF-105	4.84	25658	4.37
MSF-106	8.13	68368	4.33
MSF-107	4.95	52196	4.33
MSF-108	6.05	47450	4.25
MSF-109	5.32	35100	4.15
MSF-110	6.17	93159	4.14
MSF-111	5.67	48092	4.06
MSF-112	5.48	55124	4.06
MSF-113	6.12	101661	3.96
MSF-114	5.28	154488	3.91
MSF-115	5.85	29583	3.88
MSF-116	5.39	142313	3.85
MSF-117	5.00	132839	3.85
MSF-119	6.00	49723	3.84
MSF-120	5.78	72071	3.83
MSF-121	4.97	18472	3.79
MSF-122	5.03	17230	3.76
MSF-123	5.89	91613	3.76
MSF-125	4.46	29058	3.66
MSF-126	5.86	17929	3.63
MSF-127	5.62	54294	3.63
MSF-128	5.57	142313	3.61
MSF-130	4.88	95795	3.56
MSF-131	5.03	50944	3.55
MSF-132	5.16	41028	3.51
MSF-133	5.87	67575	3.51
MSF-134	5.98	90092	3.50
MSF-135	5.18	180485	3.45
MSF-136	4.70	37742	3.44
MSF-137	5.97	56994	3.43
MSF-139	6.06	28850	3.42
MSF-140	6.95	19478	3.39
MSF-141	5.77	52354	3.35
MSF-142	5.77	54791	3.35
MSF-143	5.95	19673	3.30
MSF-144	5.48	46191	3.29
MSF-145	5.40	151841	3.29
MSF-147	7.10	73878	3.26

10

20

30

40

【 0 0 6 4 】

【 表 4 】

MSF#	pI	MW (Da)	減少倍数
MSF-148	5.07	131619	3.23
MSF-149	6.21	101661	3.22
MSF-150	5.50	151186	3.20
MSF-151	9.39	11427	3.18
MSF-152	5.55	60192	3.16
MSF-153	5.79	20456	3.15
MSF-154	5.28	142929	3.14
MSF-155	6.33	49273	3.13
MSF-156	5.85	48238	3.10
MSF-157	5.83	27935	3.09
MSF-158	5.88	64150	3.06
MSF-159	6.37	101661	3.03
MSF-160	5.54	47450	3.02
MSF-161	6.25	55124	3.01
MSF-163	5.32	142929	2.99
MSF-165	5.77	50178	2.95
MSF-167	6.17	48679	2.94
MSF-168	5.36	98505	2.93
MSF-169	5.12	139109	2.82
MSF-170	5.31	156503	2.82
MSF-171	4.99	15072	2.73
MSF-172	5.56	54294	2.72
MSF-173	5.85	62512	2.65
MSF-174	5.95	36556	2.63
MSF-175	4.98	100168	2.63
MSF-176	5.43	48238	2.63
MSF-177	7.67	68368	2.63
MSF-178	8.47	22644	2.60
MSF-179	5.60	46036	2.54
MSF-180	6.21	36134	2.47
MSF-181	5.13	21638	2.46
MSF-182	5.62	52038	2.46
MSF-183	8.76	18350	2.44
MSF-184	6.30	50790	2.43
MSF-185	4.81	18657	2.42
MSF-186	6.81	48827	2.38
MSF-187	6.01	29689	2.37
MSF-188	5.59	100168	2.37
MSF-189	5.74	65725	2.34
MSF-190	5.92	16835	2.33
MSF-191	6.24	87097	2.33
MSF-192	5.49	19869	2.33
MSF-193	5.90	23795	2.32
MSF-194	6.91	116746	2.29
MSF-195	5.45	66932	2.28
MSF-196	8.22	51254	2.26
MSF-197	5.11	50790	2.23

10

20

30

40

【 0 0 6 5 】

【 表 5 】

MSF#	pI	MW (Da)	減少倍数
MSF-198	5.59	20201	2.17
MSF-199	5.43	49573	2.16
MSF-200	7.14	116746	2.15
MSF-201	6.65	12463	2.14
MSF-202	4.93	81483	2.14
MSF-203	6.00	38405	2.13
MSF-204	5.82	67210	2.10
MSF-205	5.28	72474	2.09
MSF-206	6.47	28747	2.07
MSF-207	4.94	134070	2.06
MSF-208	5.37	123390	2.02
MSF-209	5.49	24374	1.96
MSF-210	5.66	50026	1.95
MSF-211	5.19	50178	1.94
MSF-212	5.79	64150	1.89
MSF-213	5.83	13375	1.87
MSF-215	5.11	35613	1.86
MSF-216	9.43	68368	1.82
MSF-217	9.04	11790	1.81
MSF-218	5.08	91613	1.81
MSF-219	7.01	117828	1.74
MSF-220	4.56	46503	1.74
MSF-221	5.55	66125	1.70
MSF-222	5.54	49573	1.69
MSF-223	5.62	50026	1.65
MSF-224	5.07	65130	1.64
MSF-225	4.64	122257	1.61
MSF-226	4.81	50178	1.60
MSF-227	7.46	118510	1.59
MSF-228	4.95	44515	1.57
MSF-229	6.07	79685	1.54
MSF-230	6.98	97467	1.53
MSF-231	5.30	49423	1.53
MSF-232	7.27	27636	1.52
MSF-233	7.35	36450	1.46
MSF-234	5.37	24470	1.43
MSF-235	5.36	20134	1.42
MSF-236	5.20	72071	1.38

10

20

30

40

【0066】

第2のグループは、MSを有していない被験体のCSFと比べてMSを有する被験体のCSF中で増大している、差別的な存在が顕著なMSFからなる。これらのMSFは、表IIに与えるようにMWおよびpIによって記載することができる。

【0067】

【表6】

表Ⅱ MSを有する被験体のCSF中で増大しているMSF

MSF#	pI	MW (Da)	増大倍数
MSF-237	10.15	11421	>100
MSF-238	8.26	11328	>100
MSF-239	6.65	14399	68.46
MSF-239	6.65	14399	68.46
MSF-240	7.73	27538	64.71
MSF-241	6.10	86456	41.27
MSF-242	7.30	25465	25.21
MSF-243	6.01	12948	22.91
MSF-244	5.27	11037	16.46
MSF-245	6.21	80579	16.40
MSF-246	8.78	15019	15.96
MSF-247	6.28	27245	15.02
MSF-248	7.19	30921	14.98
MSF-250	4.33	42755	12.76
MSF-251	7.60	81385	12.75
MSF-252	5.62	26380	11.74
MSF-253	6.30	17837	11.68
MSF-254	4.28	11270	11.29
MSF-257	4.64	13792	10.95
MSF-259	5.25	27594	10.73
MSF-260	6.06	78111	10.45
MSF-261	4.86	44065	10.19
MSF-262	4.40	60275	10.15
MSF-263	7.50	45269	10.12
MSF-264	7.93	66125	10.06
MSF-265	6.56	20744	9.93
MSF-266	6.54	13783	9.64
MSF-267	5.54	21908	9.63
MSF-268	8.85	13625	9.38
MSF-269	5.49	28193	9.27
MSF-270	5.74	32454	9.23
MSF-271	6.43	45269	8.92
MSF-273	4.94	16019	8.81
MSF-274	9.80	23795	8.15
MSF-276	7.32	13812	7.85
MSF-277	6.29	80131	7.59
MSF-278	4.90	82867	7.48
MSF-279	6.69	24664	7.36
MSF-280	6.06	33713	7.36
MSF-281	6.37	80131	7.23
MSF-282	6.28	27116	7.14
MSF-283	4.78	43626	7.03
MSF-284	6.43	26066	6.88
MSF-285	5.75	27835	6.83
MSF-287	6.65	17872	6.72

10

20

30

40

MSF#	pI	MW (Da)	増大倍数
MSF-289	6.74	54791	6.39
MSF-290	4.36	20951	6.36
MSF-291	4.33	105354	6.33
MSF-292	5.76	13128	6.31
MSF-294	8.76	15213	6.29
MSF-295	4.32	36134	6.23
MSF-296	4.94	20403	6.22
MSF-298	7.51	24762	6.09
MSF-299	8.12	54806	6.03
MSF-300	4.37	40820	5.84
MSF-301	5.58	32266	5.75
MSF-302	4.28	21301	3.96
MSF-303	7.84	65034	3.75
MSF-305	9.04	21021	3.49
MSF-306	6.86	50636	3.47
MSF-307	7.48	59646	3.38
MSF-308	7.78	55797	3.32
MSF-310	5.01	13359	2.69
MSF-311	5.41	58040	2.67
MSF-312	7.39	40510	2.66
MSF-313	5.58	24087	2.49
MSF-314	4.84	26797	2.33
MSF-316	5.51	31894	2.13
MSF-318	4.57	13499	2.00
MSF-319	6.72	59646	1.94
MSF-320	8.16	24182	1.91
MSF-321	6.37	21021	1.84
MSF-322	5.21	22551	1.75
MSF-323	5.21	31216	1.73
MSF-324	7.10	23117	1.60
MSF-325	4.05	43334	1.44

10

20

30

40

50

【0069】

任意の所与のMSFについて、MSを有していない被験体からのCSFを分析することによって得られるシグナルに対して、MSを有する被験体からのCSFを分析することによって得られるシグナルは、使用する個々の分析プロトコルおよび検出技法に依存するであろう。したがって本発明は、それぞれの研究室が、本発明の記載に基づいて、診断の分野では慣習的であるように、使用されている分析プロトコルおよび検出技法に従い、MSを有していない被験体のそれぞれのMSFに関する基準範囲を確立することを企図する。MSを有することが判っている被験体からの少なくとも1つの対照陽性CSF試料、またはMSを有していないことが判っている被験体からの少なくとも1つの対照陰性CSF試料（より好ましくは陽性および陰性対照試料の両方）が、分析する試験試料のそれぞれのバッチ中に含まれることが好ましい。一実施形態では、特徴点の発現のレベルを背景値に対して決定し、これは（a）領域中で問題の特定の特徴点に相当し、かつ（b）識別可能なタンパク質の特徴点を含まない、画像の隣接領域から得られるシグナルのレベルとして定義される。

【0070】

好ましい実施形態では、被験体（たとえばMSを有している疑いがあるか有していることが判っている被験体）のCSF中のMSFと関連があるシグナルを、同じ2Dゲル中で検出される1つまたは複数のERFを参照しながら正常化する。当業者には明らかであるよ

うに、このような E R F は、好ましい技術を使用して異なる試料を比較することによって、容易に決定することができる。適切な E R F には、表 III に記載した E R F がある（ただしこれらだけには限られない）。

【0071】

【表 8】

表 III 発現の基準の特徴点

ERF#	pI	MW (Da)
ERF-1	5.28	57515
ERF-2	5.25	20268
ERF-3	8.76	16126

10

【0072】

当業者が容易に理解するように、所与の特徴点またはタンパク質アイソフォームのみかけの MW および p I は、2 D 電気泳動のそれぞれのステップ用、境界標識の整合用（以下のセクション 2. 1. 8 に記載するように）に使用する厳密なプロトコルに応じて、ある程度変わるであろう。本明細書で使用するように、「MW」および「p I」という語は、以下のセクション 6 で識別される参照プロトコルに正確に従って測定される、特徴点またはタンパク質アイソフォームのみかけの分子量およびみかけの等電点を意味するとして、それぞれ定義する。この参照プロトコルに従うとき、および試料の泳動が 2 回繰り返される、または何回も再現されるとき、M S F または M S P I の測定される平均 p I の変化は典型的には 3 % 未満であり、M S F または M S P I の測定される平均 MW の変化は典型的には 5 % 未満である。当業者が参照プロトコルから逸脱することを望む場合は、検量実験を行って、（a）参照プロトコルによって、かつ（b）逸脱プロトコルによって検出される、それぞれの M S F またはタンパク質アイソフォームの MW および p I を比較しなければならない。

20

【0073】

M S F は、M S を検出、診断もしくは調査するため、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、または薬剤開発のために使用することができる。本発明の一実施形態では、被験体（たとえば M S を有している疑いがある被験体）からの体液の第 1 の試料を、表 I で定義した 1 つまたは複数の M S F を定量的に検出するために、2 D 電気泳動によって分析する。M S を有していない 1 つまたは複数の被験体からの第 2 の試料（たとえば対照試料または前に決定された基準範囲）に対しての、被験体からの第 1 の試料中の前記 1 つまたは複数のこれらの M S F の存在量の減少は、M S の存在を示す。

30

【0074】

本発明の他の実施形態では、被験体からの体液の第 1 の試料を、表 II で定義した 1 つまたは複数の M S F を定量的に検出するために、2 D 電気泳動によって分析する。M S を有していない 1 つまたは複数の被験体からの第 2 の試料（たとえば対照試料、または前に決定された基準範囲）に対しての、被験体からの第 1 の試料中の前記 1 つまたは複数の M S F の存在量の増大は、M S の存在を示す。

40

【0075】

他の実施形態では、被験体からの体液の第 1 の試料を、（a）その存在量の減少が M S、すなわち表 I で定義した M S F の存在を示す、1 つまたは複数の M S F または任意のこれらの組合せ、および（b）その存在量の増大が M S、すなわち表 II で定義した M S F の存在を示す、1 つまたは複数の M S F または任意のこれらの組合せを定量的に検出するために、2 D 電気泳動によって分析する。

【0076】

50

本発明の他の実施形態では、被験体からの体液の第1の試料を、表Iまたは表IIで定義した1つまたは複数のMSFを定量的に検出するために、2D電気泳動によって分析し、1つまたは複数のMSFと発現の基準の特徴点(ERF)の比が、MSが存在するかどうかを示す。特定の実施形態では、第2の試料または基準範囲中のMSFとERFの比に対しての、第1の試料中の1つまたは複数のMSFとERFの比の減少は、MSの存在を示す。すなわち、表Iで定義したMSFは、この目的に適したMSFである。他の特定の実施形態では、第2の試料または基準範囲中のMSFとERFの比に対しての、第1の試料中の1つまたは複数のMSFとERFの比の増大は、MSの存在を示す。表IIで定義したMSFは、この目的に適したMSFである。

【0077】

10

本発明の他の実施形態では、被験体からの体液の第1の試料を、(a)その第2の試料中のMSFとERFの比に対しての第1の試料中のMSFとERFの比の減少がMS、すなわち表Iで定義したMSFの存在を示す、1つまたは複数のMSFまたは任意のこれらの組合せ、および(b)その第2の試料中のMSFとERFの比に対しての第1の試料中のMSFとERFの比の増大がMS、すなわち表IIで定義したMSFの存在を示す、1つまたは複数のMSFまたは任意のこれらの組合せを定量的に検出するために、2D電気泳動によって分析する。

【0078】

好ましい実施形態では、被験体からのCSFを、複数のMSFを定量的に検出するために分析する。

20

【0079】

1. 4 多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム(MSPI)

本発明の他の態様では、被験体、好ましくは生きている被験体からの体液の試料を、1つまたは複数の多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム(MSPI)を定量的に検出するため、MSをスクリーニングまたは診断してMS療法の有効性を調査するため、特定の治療処置に応答する可能性が最も高い患者を識別するため、あるいは薬剤開発のために分析する。当分野でよく知られているように、所与のタンパク質は変異体として発現することができ、これは(たとえば選択的mRNAまたはプレmRNAプロセッシング、たとえば選択的スプライシングまたは制限的なタンパク質分解の結果として)、または差別的な翻訳後の改変(たとえばグリコシル化、リン酸化、アシル化)の結果として、あるいはこの両方のためにそのアミノ酸組成が異なっており、したがって同一のアミノ酸配列のタンパク質が、そのpIまたはMW、またはこの両方において異なる可能性がある。要するにタンパク質アイソフォームの差別的な存在には、問題のタンパク質をコードしている遺伝子の差別的な発現は必要ではないということになる。本明細書で使用するように、「多発性硬化症関連タンパク質アイソフォーム」という語は、MSを有していない被験体からの第2の試料と比べて、MSを有している被験体からの体液の第1の試料中に差別的に存在するポリペプチドのことである。

30

【0080】

MSPIの2つのグループが、MSFのアミノ酸配列決定によって同定されている。MSPIを単離し、タンパク質分解させ、好ましい技術の方法および装置を使用して質量分析法によって分析した。当業者は、さまざまなスペクトル分析法およびデータベース検索ツールを使用し、質量分析法および/またはタンデム質量分析法によって分析したタンパク質から、配列情報を識別することができる。いくつかのこれらの方法およびツールの例は、Swiss Institute of Bioinformaticsのウェブ・サイト<http://www.expasy.com/>、およびEuropean Molecular Biology Laboratoryのウェブ・サイト<http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>で見ることができる。MSPIの同定は、SEQUEST検索プログラム(Eng他、1994、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989)およびPCT/G

40

50

B01/04034中に記載された方法を主に使用して行われた。第1のグループは、MSを有していない被験体のCSFと比べてMSを有する被験体のCSF中で減少している、差別的な存在が顕著なMSPIからなる。以下の実施例に記載したようなタンデム質量分析法およびデータベース検索によって同定した、これらのMSPIのトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列、さらにこれらのMSPIのpIおよびMWを、表IVに列挙する。

【0081】

【表9】

表IV MSを有する被験体のCSF中で減少しているMSPI

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列	配列番号
MSF-1	MSPI-1	8.75	21021	APEAQVSVQPNFQODK TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 311
MSF-2	MSPI-2	5.62	34394	FMETVAEK ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 110 SEQ ID NO.: 83
MSF-3	MSPI-3	9.75	11627	LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-4	MSPI-4	6.24	102603	AASGTQNNVLR EQTMSCEAGALR	SEQ ID NO.: 3 SEQ ID NO.: 94
MSF-5	MSPI-5.1	6.18	105482	AASGTQNNVLR GCPTEEGCGER	SEQ ID NO.: 3 SEQ ID NO.: 120
MSF-6	MSPI-6	5.91	21888	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-7	MSPI-7	5.52	56560	VLSALQAVQGLLVAQGR FMQAVTGWK LQAILGVPWK DPTFIPAPIQAK SLDFTELDVAEEK ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22
MSF-8	MSPI-8.1	5.49	34394	ASSIIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
MSF-8	MSPI-8.2	5.49	34394	LEEQAQQIR QOTEWQSGQR LGPLVEQGR GEVQAMLGOSTEELR	SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 251 SEQ ID NO.: 192 SEQ ID NO.: 123
				SELEEQLTPVAEETR	SEQ ID NO.: 267
MSF-9	MSPI-9	6.01	184426	VGFYESDVMGR LPPNVVEESAR VTAAPQSVCALR LVHVEEPHTETVR	SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 202 SEQ ID NO.: 346 SEQ ID NO.: 212
MSF-10	MSPI-10	6.06	184426	VGFYESDVMGR LPPNVVEESAR AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 202 SEQ ID NO.: 17
MSF-11	MSPI-11	5.96	185225	VGFYESDVMGR VTAAPQSVCALR AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 346 SEQ ID NO.: 17
MSF-12	MSPI-12.1	5.41	51566	LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312
MSF-12	MSPI-12.2	5.41	51566	YEAAPDPDR TALASGGVLDASGDYR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 89
MSF-13	MSPI-13	5.92	185225	LPPNVVEESAR AIGYLNTGYQR HYDGSYSTFGER	SEQ ID NO.: 202 SEQ ID NO.: 17 SEQ ID NO.: 150

【0082】

【表 10】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-14	MSPI-14	6.80	32080	VVEEQESR VHYTVCIWR CSVFYGA PSK ITQVLHFTK VEYGFQVK FACYYP R GLQDEDGYR	SEQ ID NO.: 349 SEQ ID NO.: 334 SEQ ID NO.: 47 SEQ ID NO.: 165 SEQ ID NO.: 329 SEQ ID NO.: 102 SEQ ID NO.: 133
MSF-15	MSPI-15	5.88	186027	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-16	MSPI-16	6.14	186027	VG FYESDVMGR LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 202
MSF-18	MSPI-18	5.79	186832	LPPNVVEESAR VG FYESDVMGR AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 202 SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 17
MSF-20	MSPI-20	5.50	20607	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-21	MSPI-21	4.70	43626	AYLEEECPATLR	SEQ ID NO.: 35
MSF-22	MSPI-22	5.75	186832	LPPNVVEESAR AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 202 SEQ ID NO.: 17
MSF-24	MSPI-24	6.18	187641	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-25	MSPI-25	6.23	48975	YDSVSVFNGAVSDDSR GVS YLLMGQVEENR	SEQ ID NO.: 365 SEQ ID NO.: 142
MSF-27	MSPI-27	6.11	126160	TLNICEVGTIR QLEWGLER	SEQ ID NO.: 309 SEQ ID NO.: 247
MSF-28	MSPI-28	6.23	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-29	MSPI-29	6.10	184426	AIGYLNTGYQR LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 17 SEQ ID NO.: 202
MSF-30	MSPI-30	7.82	31104	GLQDEDGYR	SEQ ID NO.: 133
MSF-31	MSPI-31	5.84	186832	VG FYESDVMGR AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 333 SEQ ID NO.: 17
MSF-32	MSPI-32	6.03	135312	HEGSFIQGA EK TLNICEVGTIR QLEWGLER	SEQ ID NO.: 145 SEQ ID NO.: 309 SEQ ID NO.: 247
MSF-33	MSPI-33.1	4.89	52993	YEA AVDPDR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 89
MSF-33	MSPI-33.2	4.89	52993	SGNENGEFYLR	SEQ ID NO.: 269
MSF-34	MSPI-34	5.59	21103	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-36	MSPI-36	5.93	49874	YEA AVDPDR EPGEFALLR TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 287
MSF-37	MSPI-37	5.30	179707	QSEDSTFYLG ER NNEGTYYS PNYNPQSR GAYPLSIEPIGVR	SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 232 SEQ ID NO.: 119
MSF-39	MSPI-39.1	4.82	98505	TGYYFDGISR CLAFECPENYR IIEVEEQEDPYLNDR	SEQ ID NO.: 301 SEQ ID NO.: 42 SEQ ID NO.: 159

10

20

30

40

【0083】

【表 11】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-39	MSPI-39.2	4.82	98505	SILFVPTSAPR FAFQAEVNR LGVIEDHSNR NLLHVTDGTGVGMTR EEEAIQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 274 SEQ ID NO.: 103 SEQ ID NO.: 193 SEQ ID NO.: 230 SEQ ID NO.: 71
MSF-40	MSPI-40	5.35	11955	LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-42	MSPI-42.2	5.98	64540	VWVYPPEK NFPSPVDAAFR GECQAEGVLFFQGDR DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 67
MSF-43	MSPI-43	5.54	37852	IDVHWTR AYLEEECPATLR AGEVQPELR DYIEFNK AREDIFMETLK WEAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 153 SEQ ID NO.: 35 SEQ ID NO.: 16 SEQ ID NO.: 68 SEQ ID NO.: 27 SEQ ID NO.: 354
MSF-44	MSPI-44	6.28	27735	AVVVHAGEDDLGR GGNQASVENGNAGR VTEIWQEVQR	SEQ ID NO.: 34 SEQ ID NO.: 126 SEQ ID NO.: 347
MSF-47	MSPI-47	5.49	64150	VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR NFPSPVDAAFR DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 67
MSF-48	MSPI-48.1	4.77	99610	TGYYFDGISR CLAFECPENYR IIEVEEEQEDPYLNDR	SEQ ID NO.: 301 SEQ ID NO.: 42 SEQ ID NO.: 159
MSF-48	MSPI-48.2	4.77	99610	SILFVPTSAPR FAFQAEVNR LGVIEDHSNR NLLHVTDGTGVGMTR EEEAIQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 274 SEQ ID NO.: 103 SEQ ID NO.: 193 SEQ ID NO.: 230 SEQ ID NO.: 71
MSF-48	MSPI-48.3	4.77	99610	SILFVPTSAPR FAFQAEVNR EEEAIQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 274 SEQ ID NO.: 103 SEQ ID NO.: 71
MSF-49	MSPI-49.1	4.54	74941	MNPLEQYER VIALINDQR	SEQ ID NO.: 217 SEQ ID NO.: 335
MSF-49	MSPI-49.2	4.54	74941	SGNENGIFYLR	SEQ ID NO.: 269
MSF-51	MSPI-51.1	7.48	11668	LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-52	MSPI-52.1	5.72	146050	GYTQQLAFR	SEQ ID NO.: 144
				AVLYNYR SGSDEVQVGQQR AGDFLEANYMNLQR	SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 14
MSF-52	MSPI-52.2	5.72	146050	GYTQQLAFR AVLYNYR SGSDEVQVGQQR	SEQ ID NO.: 144 SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270
MSF-54	MSPI-54	8.64	20604	AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLQPAAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311

10

20

30

40

【 0 0 8 4 】

【 表 1 2 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-55	MSPI-55	5.65	150534	VQVTSQEYSAR	SEQ ID NO.: 342
MSF-56	MSPI-56	5.49	158545	GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLG NNEGTYSPNYPQSR	SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 232
MSF-58	MSPI-58	5.66	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-60	MSPI-60	5.60	150534	IVESYQIR NDGGIYTCFAENNR TILSDDWK FIPLPLPER	SEQ ID NO.: 167 SEQ ID NO.: 222 SEQ ID NO.: 305 SEQ ID NO.: 106
MSF-62	MSPI-62.2	6.52	175109	NGFYATR EIMENYNIALR	SEQ ID NO.: 226 SEQ ID NO.: 79
MSF-63	MSPI-63	5.00	171366	VEEVKPLEGR SMEQNGPGLEYR VEEVKPLEGR SMEQNGPGLEYR	SEQ ID NO.: 325 SEQ ID NO.: 277 SEQ ID NO.: 325 SEQ ID NO.: 277
MSF-64	MSPI-64.1	6.32	178932	TGDEITYQCR NGFYATR	SEQ ID NO.: 300 SEQ ID NO.: 226
MSF-65	MSPI-65	6.18	136566	QLEWGLER GFVVAGPSR	SEQ ID NO.: 247 SEQ ID NO.: 125
MSF-66	MSPI-66	5.49	98505	QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 244
MSF-67	MSPI-67.1	5.16	53159	TALASGGVLDASGDYR WVNLPEESLLR	SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 363
MSF-67	MSPI-67.2	5.16	53159	LAAAVSNFGYDLR KTSLEDFYLDEER TSLEDFYLDEER ALYYDLISSPDHGT	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 173 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 24
MSF-69	MSPI-69	4.51	126852	GLGEISAASEFK	SEQ ID NO.: 131
MSF-70	MSPI-70	6.15	89080	QDACQGDGGVFAVR	SEQ ID NO.: 238
MSF-72	MSPI-72	5.09	156672	ALYLQYTDETFR NNEGTYSPNYPQSR QSEDSTFYLG GAYPLSIEPIGVR YTVNQCR	SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 232 SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 375
MSF-73	MSPI-73	7.26	33226	DNLAIQTR ITVVDALHEIPVK TELLPGDR	SEQ ID NO.: 61 SEQ ID NO.: 166 SEQ ID NO.: 294
MSF-75	MSPI-75	10.06	11587	LVGGPMDASVEEEGVR ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 211 SEQ ID NO.: 19
MSF-76	MSPI-76	5.72	151186	GYTQQLAFR AVLYNYR SGSDEVQVGQOR AGDFLEANYMNLQR	SEQ ID NO.: 144 SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 14
MSF-77	MSPI-77.2	6.38	177393	IDVHLVPDR	SEQ ID NO.: 152
				EYHFGQAVR	SEQ ID NO.: 100
MSF-78	MSPI-78.1	6.25	33313	ASSIIDELFQDR TLLSNLEEAK	SEQ ID NO.: 28 SEQ ID NO.: 307
MSF-78	MSPI-78.2	6.25	33313	APEAQVSVQPNFQQDK TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 311

10

20

30

40

【 0 0 8 5 】

【 表 1 3 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-79	MSPI-79	5.48	85680	NDGGIYTCFAENNR	SEQ ID NO.: 222
MSF-80	MSPI-80.1	6.06	60926	TFTCTAAYPESK QEPSQGTTFVAVTSILR WLQGSQELPR	SEQ ID NO.: 297 SEQ ID NO.: 240 SEQ ID NO.: 359
MSF-81	MSPI-81	5.94	42899	GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-82	MSPI-82	5.72	100168	MILEIAPTSNDNDFGR LTIYNANIEDAGIYR IEIFQTLFVR	SEQ ID NO.: 216 SEQ ID NO.: 210 SEQ ID NO.: 156
MSF-83	MSPI-83	5.51	44365	IVFLEEASQOEK FQNIDFAEEVYTR FLYLGDDE	SEQ ID NO.: 168 SEQ ID NO.: 114 SEQ ID NO.: 109
MSF-84	MSPI-84.1	5.53	99610	QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 244
MSF-84	MSPI-84.2	5.53	99610	IEIFQTLFV NIINSDGGPYVCR	SEQ ID NO.: 155 SEQ ID NO.: 228
MSF-86	MSPI-86	4.54	27735	LSELIQPLPLER KPNLQVFLGK GLVSWGNIPCGSK YTNWIKK	SEQ ID NO.: 205 SEQ ID NO.: 171 SEQ ID NO.: 135 SEQ ID NO.: 374
MSF-87	MSPI-87	5.29	125687	AFLFQDTPR	SEQ ID NO.: 10
MSF-89	MSPI-89.1	5.58	63762	VWVYPPEK NFPSPVDAAFR DYFMPCPGR RLWWLDLK GECQAEGVLFFQGR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 122
MSF-90	MSPI-90	6.08	93159	EPGLQIWR HVVVNEVVVQR	SEQ ID NO.: 90 SEQ ID NO.: 149
MSF-91	MSPI-91.1	6.26	21818	VSFLSALEEYTK DEPPQSPWDR WQEEEMELR AKPALEDLR LSPLGEEMR DYVSQFEGSALGK THLAPYSDEL ATEHLSTLSEK VQPYLDDFQK QGILLPVLESFK THLAPYSDEL	SEQ ID NO.: 344 SEQ ID NO.: 56 SEQ ID NO.: 360 SEQ ID NO.: 18 SEQ ID NO.: 206 SEQ ID NO.: 69 SEQ ID NO.: 302 SEQ ID NO.: 29 SEQ ID NO.: 341 SEQ ID NO.: 243 SEQ ID NO.: 302
MSF-92	MSPI-92	5.54	150534	NDGGIYTCFAENNR TILSDDWK IVESYQIR FIPLIPER	SEQ ID NO.: 222 SEQ ID NO.: 305 SEQ ID NO.: 167 SEQ ID NO.: 105
MSF-93	MSPI-93.1	5.70	34998	GEVOAMLGQSTEELR AATVGSAGQPLQER SELEEQLTPVAEETR LEEQAQIR LGPLVEQGR	SEQ ID NO.: 123 SEQ ID NO.: 4 SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 192
MSF-93	MSPI-93.2	5.70	34998	ASSIIDELFQDR ELDESQVAER	SEQ ID NO.: 28 SEQ ID NO.: 83

10

20

30

40

【 0 0 8 6 】

【 表 1 4 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-94	MSPI-94	5.63	178161	CTSTGWIPAPR	SEQ ID NO.: 48
MSF-95	MSPI-95	5.28	52673	IPIEDGSGEVVLSR VLLDGVQNPR TIYTPGSTVLYR QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 337 SEQ ID NO.: 306 SEQ ID NO.: 239
MSF-96	MSPI-96	5.80	91613	TGAQELLR HVVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 299 SEQ ID NO.: 149
MSF-97	MSPI-97	5.71	91103	VELEDWNGR YLQEIYNSNNQK	SEQ ID NO.: 326 SEQ ID NO.: 371
MSF-98	MSPI-98	5.54	48679	IGAENVYHNLK LAQANGWGVMSHR VNOIGSVTESIQACK VVIGMDVAASEFFR	SEQ ID NO.: 158 SEQ ID NO.: 178 SEQ ID NO.: 340 SEQ ID NO.: 350
MSF-99	MSPI-99	5.43	112518	TYFEGER NNAHGYFK CVTDPCQADTIR HNGQIWVLENDR YLELESSGHR TCPTCNDFHGLVQK AFLFQESPR LDQCYCER	SEQ ID NO.: 317 SEQ ID NO.: 231 SEQ ID NO.: 50 SEQ ID NO.: 146 SEQ ID NO.: 369 SEQ ID NO.: 291 SEQ ID NO.: 11 SEQ ID NO.: 179
MSF-102	MSPI-102.1	5.95	34494	SWFEPLVEDMQR SELEEQLTPVAEETR KVEQAVETEPEPELR LEEQAQQIR LGPLVEQGR GEVQAMLGQSTEELR	SEQ ID NO.: 285 SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 174 SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 192 SEQ ID NO.: 123
MSF-102	MSPI-102.2	5.95	34494	TLLSNLEEAK ASSIIDELFQDR	SEQ ID NO.: 307 SEQ ID NO.: 28
MSF-102	MSPI-102.3	5.95	34494	LIAPVAEEEATVPNNK LKDDEVAQLK SLADELALVDVLEDK IVVVTAGVR SADTLWDIQK MVVESAYEVIK GLTSVINQK	SEQ ID NO.: 194 SEQ ID NO.: 196 SEQ ID NO.: 275 SEQ ID NO.: 169 SEQ ID NO.: 263 SEQ ID NO.: 219 SEQ ID NO.: 134
MSF-104	MSPI-104	6.29	100168	FLCTGGVSPYADPNTCR GDSGGPLIVHK ALFVSEEEK QLNEINYEDHK LEDVSVTYHCSR	SEQ ID NO.: 107 SEQ ID NO.: 121 SEQ ID NO.: 20 SEQ ID NO.: 248 SEQ ID NO.: 182
MSF-105	MSPI-105.1	4.84	25658	TMLLOPAGSLGSYSYR AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 311 SEQ ID NO.: 26
MSF-105	MSPI-105.2	4.84	25658	TGAQELLR	SEQ ID NO.: 299
MSF-106	MSPI-106	8.13	68368	IPIEDGSGEVVLSR AELQCPQPAAR KQELSEAEQATR QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 7 SEQ ID NO.: 172 SEQ ID NO.: 239

10

20

30

40

【 0 0 8 7 】

【 表 1 5 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-107	MSPI-107	4.95	52196	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-108	MSPI-108	6.05	47450	ELLDTVTAPQK TVQAVLTVPK SSFVAPLEK LSYEGETVK TSLEDFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR DTDTGALLFIGK	SEQ ID NO.: 84 SEQ ID NO.: 316 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 65
MSF-110	MSPI-110	6.17	93159	AGALNSNDAFVLK YIETDPANR HVVVPNEVVQR EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 13 SEQ ID NO.: 368 SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 90
MSF-111	MSPI-111	5.67	48092	LAAAVSNFGYDLYR SSFVAPLEK TSLEDFYLDEER	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 312
MSF-112	MSPI-112	5.48	55124	ATVVYQGER EHSSLAFWK	SEQ ID NO.: 30 SEQ ID NO.: 77
MSF-113	MSPI-113	6.12	101661	LPPTTTCQQQK GDSGGPLIVHK	SEQ ID NO.: 203 SEQ ID NO.: 121
MSF-114	MSPI-114	5.28	154488	ALYLOYTDETFR GAYPLSIEPIGVR YTVNQCR QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 375 SEQ ID NO.: 252
MSF-116	MSPI-116	5.39	142313	AETYEGVYQCTAR GKPPPSFSWTR ERPPTFLTPEGNASNK IDGDTIIFSNVQER NALGAIHHTISVR NEVHLEIK QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 9 SEQ ID NO.: 128 SEQ ID NO.: 95 SEQ ID NO.: 151 SEQ ID NO.: 220 SEQ ID NO.: 223 SEQ ID NO.: 250
MSF-117	MSPI-117	5.00	132839	LICSELNGR EGLDLQVLEDSGR GNLAGLTR	SEQ ID NO.: 195 SEQ ID NO.: 75 SEQ ID NO.: 137
MSF-119	MSPI-119	6.00	49723	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-120	MSPI-120	5.78	72071	HVVVPNEVVQR TGAQELLR	SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 299
MSF-122	MSPI-122	5.03	17230	MPCAELVR LEGEACGVYTPR EPGCGCCSVCAR	SEQ ID NO.: 218 SEQ ID NO.: 184 SEQ ID NO.: 88
MSF-123	MSPI-123.1	5.89	91613	EVQGFESATFLGYFK HVVVPNEVVQR RTPITVVK EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 98 SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 260 SEQ ID NO.: 90
MSF-125	MSPI-125.1	4.46	29058	AVVVHAGEDDLGR	SEQ ID NO.: 34
MSF-125	MSPI-125.2	4.46	29058	GATADPLCAPAR TALAVDGEAR LGERPPALLGSQGLR	SEQ ID NO.: 118 SEQ ID NO.: 288 SEQ ID NO.: 191
MSF-126	MSPI-126.1	5.86	17929	GLEEELQFSLGSK	SEQ ID NO.: 129

10

20

30

40

【 0 0 8 8 】

【 表 1 6 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-126	MSPI-126.2	5.86	17929	EVAGLWIK EGTYSLPK	SEQ ID NO.: 96 SEQ ID NO.: 76
MSF-127	MSPI-127.1	5.62	54294	VLSALQAVQGLLVAQGR DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 62
				SLDFTELDVAAEK ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22
MSF-128	MSPI-128	5.57	142313	GYTQQLAFR AVLYNYR SGSDEVQVGQQR SNLDEDIAEENIVSR	SEQ ID NO.: 144 SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 279
MSF-130	MSPI-130	4.88	95795	GYHLNEEGTR CLAFECPENYR TGYYFDGISR	SEQ ID NO.: 143 SEQ ID NO.: 42 SEQ ID NO.: 301
MSF-131	MSPI-131	5.03	50944	GTQEQDFYVTSETVVR EDQYHYLLDR TLYLADTFPTNFR	SEQ ID NO.: 141 SEQ ID NO.: 70 SEQ ID NO.: 310
MSF-132	MSPI-132	5.16	41028	ITCTEEGWSPTPK INHGILYDEEK EIMENYNIALR	SEQ ID NO.: 164 SEQ ID NO.: 161 SEQ ID NO.: 79
MSF-133	MSPI-133	5.87	67575	AADDTWEPFASGK GSPAINVAHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-134	MSPI-134	5.98	90092	HVVPNEVVVQR EPGLQIWR YIETDPANR	SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 90 SEQ ID NO.: 368
MSF-135	MSPI-135	5.18	180485	VIAVNEVGR	SEQ ID NO.: 336
MSF-136	MSPI-136	4.70	37742	IETALTSLHQR WTFEACR FQLTFPLR LENLEQYSR	SEQ ID NO.: 157 SEQ ID NO.: 362 SEQ ID NO.: 113 SEQ ID NO.: 186
MSF-137	MSPI-137	5.97	56994	SLDFTELDVAAEK ALQDQLVLVAAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR LQAILGVPWK DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 62
MSF-139	MSPI-139	6.06	28850	VTEIWQEVQR	SEQ ID NO.: 347
MSF-140	MSPI-140	6.95	19478	EQQALQTVCLK TFHEASEDCISR NWETEITAQPDGGK	SEQ ID NO.: 92 SEQ ID NO.: 296 SEQ ID NO.: 235
MSF-141	MSPI-141.1	5.77	52354	YTFELSR	SEQ ID NO.: 373
MSF-141	MSPI-141.2	5.77	52354	EPGEFALLR VAMHLVCPSR TALASGGVLDASGDYR YEA AVDPDR	SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 366

10

20

30

40

【 0 0 8 9 】

【 表 1 7 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-142	MSPI-142	5.77	54791	DPTFIPAPIQAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR ALQDQLVLVAAK SLDFTELDVAAEK LQAILGVPWK	SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 204
MSF-143	MSPI-143.1	5.95	19673	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-144	MSPI-144	5.48	46191	YVGGQEHFAHLLILR EQLGEFYEALDCLR TLMFGSYLDDEK NWGLSVYADKPETTK	SEQ ID NO.: 376 SEQ ID NO.: 91 SEQ ID NO.: 308 SEQ ID NO.: 236
				TEDTIFLR TYMLAFDVNDEK WFYIASAFR	SEQ ID NO.: 292 SEQ ID NO.: 318 SEQ ID NO.: 358
MSF-145	MSPI-145.2	5.40	151841	ALYLQYTDETR IYHSHIDAPK DLYSGLIGPLIVCR GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 170 SEQ ID NO.: 59 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252
MSF-147	MSPI-147.2	7.10	73878	QELSEAEQATR IPIEDGSGEVLSR	SEQ ID NO.: 239 SEQ ID NO.: 162
MSF-148	MSPI-148	5.07	131619	SPEQQETVLDGNLIIR ILDDLSPR LALDNGGLAR	SEQ ID NO.: 281 SEQ ID NO.: 160 SEQ ID NO.: 177
MSF-149	MSPI-149	6.21	101661	LEDSTVYHCSR GDSGGPLIVHK LPPTTTCQQQK CLVNLIEK DAQYAPGYDK	SEQ ID NO.: 182 SEQ ID NO.: 121 SEQ ID NO.: 203 SEQ ID NO.: 45 SEQ ID NO.: 51
MSF-150	MSPI-150	5.50	151186	VQVTSQEYSAR	SEQ ID NO.: 342
MSF-151	MSPI-151	9.39	11427	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGV	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-152	MSPI-152	5.55	60192	WLOGSQELPR DASGVTFTWPSTSGK TFTCTAAYPESK	SEQ ID NO.: 359 SEQ ID NO.: 52 SEQ ID NO.: 297
MSF-154	MSPI-154.1	5.28	142929	QSEDSTFYLGFR ALYLQYTDETR GAYPLSIEPIGVR NNEGTYYSNPYNPQSR	SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 232
MSF-154	MSPI-154.2	5.28	142929	QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 250
MSF-154	MSPI-154.3	5.28	142929	AFLFQDTPR	SEQ ID NO.: 10
MSF-155	MSPI-155.1	6.33	49273	YLQEIYNSNNQK DTVQIHDITGK DNCCILDER LTIGEGQQHHLGGAK VELEDWNGR YEASILTHDSSIR	SEQ ID NO.: 371 SEQ ID NO.: 66 SEQ ID NO.: 60 SEQ ID NO.: 209 SEQ ID NO.: 326 SEQ ID NO.: 367

10

20

30

40

【 0 0 9 0 】

【 表 1 8 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-155	MSPI-155.2	6.33	49273	TSLEDFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176
MSF-155	MSPI-155.3	6.33	49273	EPGEFALLR YEAAVPDPR TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 287
MSF-156	MSPI-156.2	5.85	48238	ELLDTVTAPQK TVQAVLTVPK LSYEGETVK SSFVAPLEK TSLEDFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR DTDGTGALLFIGK	SEQ ID NO.: 84 SEQ ID NO.: 316 SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 65
MSF-158	MSPI-158.2	5.88	64150	YYCFQGNQFLR GECQAEGVLFFQGDR VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 380 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 351
				DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR RLWWDLK	SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 258
MSF-159	MSPI-159	6.37	101661	LPPTTTCQQOK LEDSVTYHCSR QLNEINYEDHK CLVNLIEK VASYGVKPR ALFVSEEEK GDSGGPLIVHK	SEQ ID NO.: 203 SEQ ID NO.: 182 SEQ ID NO.: 248 SEQ ID NO.: 45 SEQ ID NO.: 321 SEQ ID NO.: 20 SEQ ID NO.: 121
MSF-160	MSPI-160	5.54	47450	LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 284
MSF-161	MSPI-161	6.25	55124	LQAILGVPWK DPTFIPAPIQAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR ALQDQLVLVAAK SLDFTELDVAEEK	SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 276
MSF-163	MSPI-163	5.32	142929	QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 250
MSF-165	MSPI-165.1	5.77	50178	DNCCILDER VELEDWNGR	SEQ ID NO.: 60 SEQ ID NO.: 326
MSF-165	MSPI-165.2	5.77	50178	YEAAVPDPR VAMHLVCPSR EPGEFALLR TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 287
MSF-167	MSPI-167	6.17	48679	VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 67
MSF-168	MSPI-168	5.36	98505	SHALQLNNR QGSFQGGFR EELVYELNPLDHR	SEQ ID NO.: 272 SEQ ID NO.: 244 SEQ ID NO.: 72

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

【 表 1 9 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-169	MSPI-169.1	5.12	139109	ILDDLSPR VRPQQLVK FAHTVVTSR LALDNGGLAR	SEQ ID NO.: 160 SEQ ID NO.: 343 SEQ ID NO.: 104 SEQ ID NO.: 177
MSF-169	MSPI-169.2	5.12	139109	EYTDASFTNR QYTDSTFR YTVNQCR GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLGER	SEQ ID NO.: 101 SEQ ID NO.: 256 SEQ ID NO.: 375 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252
MSF-170	MSPI-170	5.31	156503	NNEGTYYSNPYNPQSR QSEDSTFYLGER GAYPLSIEPIGVR ALYLQYTDETFR IYHSHIDAPK	SEQ ID NO.: 232 SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 170
MSF-171	MSPI-171	4.99	15072	SELEEQLTPVAEETR GEVQAMLGOSTEELR KVEQAVETEPEPELR	SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 123 SEQ ID NO.: 174
MSF-172	MSPI-172	5.56	54294	IPIEDGSGEVVLSR SGIPIVTSPYQIHFTK	SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 268
				TVMVNENPEGIPVK QELSEAEQATR VLLDGVQNPR GLEVTITAR FYYIYNEK TIYTPGSTVLYR	SEQ ID NO.: 315 SEQ ID NO.: 239 SEQ ID NO.: 337 SEQ ID NO.: 130 SEQ ID NO.: 117 SEQ ID NO.: 306
MSF-173	MSPI-173.2	5.85	62512	GECQAEGVLFFQGDR NFPSPVDAAFR VWVYPPEK DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 67
MSF-175	MSPI-175	4.98	100168	TGYYFDGISR IIEVEEEQEDPYLNDR	SEQ ID NO.: 301 SEQ ID NO.: 159
MSF-176	MSPI-176.1	5.43	48238	LSYEGEVTK SSFVAPLEK LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER ELLDTVTAPOK	SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 84
MSF-176	MSPI-176.2	5.43	48238	QTVPAQILLHLYR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 253 SEQ ID NO.: 89
MSF-177	MSPI-177	7.67	68368	SGIPIVTSPYQIHFTK EVVADSVWADVR GLEVTITAR YYTYLIMNK TIYTPGSTVLYR FYYIYNEK IPIEDGSGEVVLSR VLLDGVQNPR	SEQ ID NO.: 268 SEQ ID NO.: 99 SEQ ID NO.: 130 SEQ ID NO.: 381 SEQ ID NO.: 306 SEQ ID NO.: 117 SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 337

10

20

30

40

【 0 0 9 2 】

【 表 2 0 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-178	MSPI-178	8.47	22644	APEAQVSVQPNFQQDK AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLOPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-179	MSPI-179.1	5.60	46036	SAVQGPPER QEPSQGTTFFAVTSILR WLQGSQELPR YLTWASR DASGVTFWTWPSSGK	SEQ ID NO.: 264 SEQ ID NO.: 240 SEQ ID NO.: 359 SEQ ID NO.: 372 SEQ ID NO.: 53
MSF-179	MSPI-179.2	5.60	46036	DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122
MSF-180	MSPI-180	6.21	36134	DCSGVSLHLTR CVFTGEGR	SEQ ID NO.: 54 SEQ ID NO.: 49
MSF-181	MSPI-181.1	5.13	21638	EVAGLWIK EGTYSLPK	SEQ ID NO.: 96 SEQ ID NO.: 76
MSF-181	MSPI-181.2	5.13	21638	AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLOPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-182	MSPI-182	5.62	52038	LQAILGVPWK FMQAVTGWK ALQDQLVLVAAK VLSALQAVQGLLVAQGR SLDFTELDVAEEK DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 62
MSF-183	MSPI-183	8.76	18350	TMLLOPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-184	MSPI-184	6.30	50790	TSLEDIFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176
MSF-185	MSPI-185	4.81	18657	VFSNGADLSGVTEEAPLK FLENEDR	SEQ ID NO.: 331 SEQ ID NO.: 108
MSF-186	MSPI-186	6.81	48827	VAMHLVCPGR WVNLPEESLLR TALASGGVLDASGDYR YEAAPDPGR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 363 SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 89
MSF-187	MSPI-187.1	6.01	29689	ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
MSF-187	MSPI-187.2	6.01	29689	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-188	MSPI-188.2	5.59	100168	QGEDAEVVCR SNPPASIHWR	SEQ ID NO.: 242 SEQ ID NO.: 280
MSF-189	MSPI-189	5.74	65725	GECQAEGVLFFQGDR VWVYPPEK DYFMPCPGR RLWWLDLK NFPSPVDAAFR YYCFQGNQFLR	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 380

10

20

30

40

【 0 0 9 3 】

【 表 2 1 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-191	MSPI-191	6.24	87097	EPGLQIWR HVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 90 SEQ ID NO.: 149
MSF-192	MSPI-192.1	5.49	19869	TENCAVLGAANGK LDTLAQEVALLK NWETEITAQPDGGK TFHEASEDCISR NWETEITAQPDGGK CFLAFTQTK EQQALQTVCLK	SEQ ID NO.: 295 SEQ ID NO.: 180 SEQ ID NO.: 235 SEQ ID NO.: 296 SEQ ID NO.: 235 SEQ ID NO.: 41 SEQ ID NO.: 92
MSF-192	MSPI-192.2	5.49	19869	RVIMERDTYPR LDTSQWPLLLK	SEQ ID NO.: 261 SEQ ID NO.: 181
MSF-193	MSPI-193	5.90	23795	APEAQVSVQPNFQODK AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLQPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-194	MSPI-194.1	6.91	116746	HSIFTPETNPR CEEDEEFTCR	SEQ ID NO.: 148 SEQ ID NO.: 37
MSF-194	MSPI-194.2	6.91	116746	CFFQGDHGFNDK IEDIHLVER CFELQEAGPPDCR	SEQ ID NO.: 40 SEQ ID NO.: 154 SEQ ID NO.: 39
MSF-195	MSPI-195.1	5.45	66932	GECQAEGVLFFQGDR VWVYPPEK DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225
MSF-196	MSPI-196	8.22	51254	DPTFIPAPIQAK ALQDQLVLVAAK FMQAVTGWK SLDFTELDVAEEK VLSALQAVQGLLVAAQGR LQAILGVPWK	SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 204
MSF-197	MSPI-197	5.11	50790	LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312
MSF-198	MSPI-198	5.59	20201	EQQALQTVCLK LDTLAQEVALLK CFLAFTQTK NWETEITAQPDGGK TFHEASEDCISR	SEQ ID NO.: 92 SEQ ID NO.: 180 SEQ ID NO.: 41 SEQ ID NO.: 235 SEQ ID NO.: 296
MSF-199	MSPI-199.1	5.43	49573	ELLDVTVPQK TVQAVLTVPK ALYYDLISSPDHGTYS DTDTGALLFIGK LAAAVSNFGYDLYR SSFVAPLEK TSLEDFYLDEER LSYEGEVTK	SEQ ID NO.: 84 SEQ ID NO.: 316 SEQ ID NO.: 24 SEQ ID NO.: 65 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 208
MSF-199	MSPI-199.2	5.43	49573	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287

10

20

30

40

【 0 0 9 4 】

【 表 2 2 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-200	MSPI-200	7.14	116746	EQQCVIMAENR NLDENYCR HSIFTPETNPR WELCDIPR WSSTSPHRPR CEEDEEFTCR	SEQ ID NO.: 93 SEQ ID NO.: 229 SEQ ID NO.: 148 SEQ ID NO.: 355 SEQ ID NO.: 361 SEQ ID NO.: 37
MSF-201	MSPI-201	6.65	12463	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-202	MSPI-202.1	4.93	81483	SPQELLCGASLISDR ELLESYIDGR TATSEYQTFNPR	SEQ ID NO.: 282 SEQ ID NO.: 85 SEQ ID NO.: 289
MSF-202	MSPI-202.2	4.93	81483	WEPDPQR VIALINDQR	SEQ ID NO.: 356 SEQ ID NO.: 335
MSF-203	MSPI-203	6.00	38405	AYLEEECPATLR WEAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 35 SEQ ID NO.: 354
MSF-205	MSPI-205	5.28	72474	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-206	MSPI-206	6.47	28747	NPNLPPETVDSLK IPTTFENGR	SEQ ID NO.: 233 SEQ ID NO.: 163
MSF-207	MSPI-207	4.94	134070	EGLDLQVLEDSGR GNLAGLTR QFPTPGIR	SEQ ID NO.: 75 SEQ ID NO.: 137 SEQ ID NO.: 241
MSF-208	MSPI-208	5.37	123390	HNGQIWWLENDR AFLFQESPR YLELESSGHR LDQCYCER NNAHGYFK CVTDPCQADTIR TCPTCNDFHGLVQK	SEQ ID NO.: 146 SEQ ID NO.: 11 SEQ ID NO.: 369 SEQ ID NO.: 179 SEQ ID NO.: 231 SEQ ID NO.: 50 SEQ ID NO.: 291
MSF-209	MSPI-209	5.49	24374	TMLLQPAGSLGSYSYR AQGTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 311 SEQ ID NO.: 26
MSF-210	MSPI-210	5.66	50026	TVQAVLTVPK LSYEGETVK SSFVAPLEK TSLEDFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 316 SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176
MSF-211	MSPI-211	5.19	50178	SNAQGIDLNR NFPDLDR	SEQ ID NO.: 278 SEQ ID NO.: 224
MSF-212	MSPI-212.2	5.79	64150	YYCFQGNQFLR RLWWLDLK VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR NFPSPVDAAFR DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 380 SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 67
MSF-213	MSPI-213	5.83	13375	GGTSYGTGSETESPR ADSGEGDFLAEGGGVR GLIDEVNQDFTNR	SEQ ID NO.: 127 SEQ ID NO.: 5 SEQ ID NO.: 132

10

20

30

40

【 0 0 9 5 】

【 表 2 3 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-215	MSPI-215	5.11	35613	ELDESLQVAER ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 83 SEQ ID NO.: 28
MSF-216	MSPI-216	9.43	68368	VDFTLSSER AEFQDALEK SCGLHQLLR TTNIQGGINLLFSSR VGDTLNLNLR LNMGITDLQGLR	SEQ ID NO.: 322 SEQ ID NO.: 6 SEQ ID NO.: 265 SEQ ID NO.: 313 SEQ ID NO.: 332 SEQ ID NO.: 199
MSF-217	MSPI-217.3	9.04	11790	LVGGPMDASVEEEGVR ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 211 SEQ ID NO.: 19
MSF-218	MSPI-218	5.08	91613	GYHLNEEGTR	SEQ ID NO.: 143
MSF-219	MSPI-219	7.01	117828	CEEDEEFTCR FVTWIEGVMR HSIFTPETNPR EQQCVIMAENR NLDENYCR WEYCNLK	SEQ ID NO.: 37 SEQ ID NO.: 116 SEQ ID NO.: 148 SEQ ID NO.: 93 SEQ ID NO.: 229 SEQ ID NO.: 357
MSF-220	MSPI-220	4.56	46503	TSLEDFYLDEER SSFVAPLEK LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 176
MSF-221	MSPI-221.1	5.55	66125	GECQAEGVLFFQGDR DYFMPCPGR VWVYPPEK NFPSPVDAAFR YYCFQGNQFLR RLWWLDLK LTIGEGQQHHLGGAK VELEDWNGR RLDGSVDFK YLQEIYNSNNQK	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 380 SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 209 SEQ ID NO.: 326 SEQ ID NO.: 257 SEQ ID NO.: 371
MSF-222	MSPI-222.2	5.54	49573	LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312
MSF-223	MSPI-223.1	5.62	50026	TSLEDFYLDEER	SEQ ID NO.: 312
MSF-223	MSPI-223.2	5.62	50026	IETALTS LHQR LENLEQYSR FQLTFPLR LPFVINDGK	SEQ ID NO.: 157 SEQ ID NO.: 186 SEQ ID NO.: 113 SEQ ID NO.: 201
MSF-224	MSPI-224.1	5.07	65130	VEESELAR SIEVFGQFNGK CLCACPFK	SEQ ID NO.: 324 SEQ ID NO.: 273 SEQ ID NO.: 44
				TEHYEEQIEAFK DGNTLTYYR DRDGNTLTYYR RPWNVASLIYETK	SEQ ID NO.: 293 SEQ ID NO.: 57 SEQ ID NO.: 64 SEQ ID NO.: 259
MSF-225	MSPI-225	4.64	122257	NAPTPQEFR AGEQDATIHLK GLGEISAASEFK DIQVIVNVPPTIQAR	SEQ ID NO.: 221 SEQ ID NO.: 15 SEQ ID NO.: 131 SEQ ID NO.: 58

10

20

30

40

【 0 0 9 6 】

【 表 2 4 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-226	MSPI-226	4.81	50178	VEQATQAIPMER QMYPELQIAR	SEQ ID NO.: 327 SEQ ID NO.: 249
MSF-228	MSPI-228.1	4.95	44515	GECQAEGVLFFQGDR DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225
MSF-228	MSPI-228.2	4.95	44515	NGVAQEPVHLDSPAIK CLAPLEGAR CEGPIPDVTFELLR HQFLLTGDTQGR ATWSGAVLAGR	SEQ ID NO.: 227 SEQ ID NO.: 43 SEQ ID NO.: 38 SEQ ID NO.: 147 SEQ ID NO.: 31
MSF-229	MSPI-229.1	6.07	79685	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-229	MSPI-229.2	6.07	79685	QIQVSWLR VSVFVPPR YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 245 SEQ ID NO.: 345 SEQ ID NO.: 377
MSF-230	MSPI-230	6.98	97467	EPGLOIWR HVPVNEVVQR TGAQELLR	SEQ ID NO.: 90 SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 299
MSF-231	MSPI-231	5.30	49423	VAMHLVCPSR WVNLPEESLLR TALASGGVLDASGDYR YEAAPDPR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 363 SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 89
MSF-232	MSPI-232	7.27	27636	IPTTFENGR	SEQ ID NO.: 163
MSF-233	MSPI-233.1	7.35	36450	KYNELLK ASSIIDELFQDR EILSVDCSTNNPSQAK ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 175 SEQ ID NO.: 28 SEQ ID NO.: 78 SEQ ID NO.: 83
MSF-233	MSPI-233.2	7.35	36450	LGADMEDVCGR QWAGLVEK QOTEWQSGQR SWFEPLVEDMQR AATVGSLAGOPLQR GEVQAMLGQSTEELR SELEEQLTPVAEETR LEEQAQQIR LGPLVEQGR TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 190 SEQ ID NO.: 255 SEQ ID NO.: 251 SEQ ID NO.: 285 SEQ ID NO.: 4 SEQ ID NO.: 123 SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 192 SEQ ID NO.: 311
MSF-234	MSPI-234	5.37	24470		
MSF-235	MSPI-235	5.36	20134	EVDSGNDIYGNPIK SDGSCAWYR	SEQ ID NO.: 97 SEQ ID NO.: 266
MSF-236	MSPI-236.1	5.20	72071	LETPDFQLFK CLAPLEGAR LELHVDGPPRPQLR CEGPIPDVTFELLR	SEQ ID NO.: 187 SEQ ID NO.: 43 SEQ ID NO.: 185 SEQ ID NO.: 38
				NGVAQEPVHLDSPAIK ATWSGAVLAGR HQFLLTGDTQGR	SEQ ID NO.: 227 SEQ ID NO.: 31 SEQ ID NO.: 147
MSF-236	MSPI-236.2	5.20	72071	VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122

10

20

30

40

【 0 0 9 7 】

第 2 のグループは、MS を有していない被験体の CSF と比べて MS を有する被験体の C 50

S F 中で増大している、差別的な存在が顕著な M S P I を含む。タンデム質量分析法およびデータベース検索によって同定した、これらの M S P I のトリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列、さらにこれらの M S P I の p I および M W を、表 V に列挙する。

【 0 0 9 8 】

【 表 2 5 】

表V MSを有する被験体のCSF中で増大しているMSPI

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-237	MSPI-237	10.15	11421	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-238	MSPI-238	8.26	11328	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-239	MSPI-239.1	6.65	14399	AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLQPAGSLGYSYSYR	SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-239	MSPI-239.2	6.65	14399	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-240	MSPI-240.1	7.73	27538	GFQALGDAADIR	SEQ ID NO.: 124
MSF-240	MSPI-240.2	7.73	27538	YAASSYLSLTPEQWK AAPSVTLFPPSSEELQANK	SEQ ID NO.: 364 SEQ ID NO.: 2
MSF-241	MSPI-241.1	6.10	86456	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-241	MSPI-241.2	6.10	86456	QIQVSWLR VSVFVPPR YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 245 SEQ ID NO.: 345 SEQ ID NO.: 377
MSF-242	MSPI-242.1	7.30	25465	AAPSVTLFPPSSEELQANK YAASSYLSLTPEQWK	SEQ ID NO.: 2 SEQ ID NO.: 364
MSF-242	MSPI-242.2	7.30	25465	AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLQPAGSLGYSYSYR	SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-243	MSPI-243	6.01	12948	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
MSF-244	MSPI-244	5.27	11037	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-245	MSPI-245	6.21	80579	VSVFVPPR YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 345 SEQ ID NO.: 377
MSF-246	MSPI-246.1	8.78	15019	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-246	MSPI-246.2	8.78	15019	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-248	MSPI-248	7.19	30921	CSVFYGAPSK VEYGFQVK GLQDEDGYR ITQVLHFTK	SEQ ID NO.: 47 SEQ ID NO.: 329 SEQ ID NO.: 133 SEQ ID NO.: 165
MSF-250	MSPI-250.2	4.33	42755	TEDTIFLR	SEQ ID NO.: 292
MSF-251	MSPI-251	7.60	81385	TIYTPGSTVLRYR	SEQ ID NO.: 306
				QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 239
MSF-254	MSPI-254.1	4.28	11270	DQDGEILLPR	SEQ ID NO.: 63
MSF-257	MSPI-257.1	4.64	13792	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-257	MSPI-257.2	4.64	13792	SELEEQLTPVAEETR	SEQ ID NO.: 267
MSF-257	MSPI-257.3	4.64	13792	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-260	MSPI-260.1	6.06	78111	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-260	MSPI-260.2	6.06	78111	QIQVSWLR VSVFVPPR YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 245 SEQ ID NO.: 345 SEQ ID NO.: 377

10

20

30

40

【 0 0 9 9 】

【 表 2 6 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-261	MSPI-261	4.86	44065	WEAEPVYVQR IDVHWTR AGEVQPELR AREDIFMETLK	SEQ ID NO.: 354 SEQ ID NO.: 153 SEQ ID NO.: 16 SEQ ID NO.: 27
MSF-262	MSPI-262.2	4.40	60275	EFEGEEYLEILGITR VTVNYPPTITESK	SEQ ID NO.: 74 SEQ ID NO.: 348
MSF-265	MSPI-265	6.56	20744	SDGSCAWYR EVDSGNDIYGNIPIK	SEQ ID NO.: 266 SEQ ID NO.: 97
MSF-266	MSPI-266	6.54	13783	LEEQAQQR	SEQ ID NO.: 183
MSF-267	MSPI-267	5.54	21908	PPYTVVYFPVR FQDGLTLYQSNTILR EEVTVETWQEGSLK	SEQ ID NO.: 237 SEQ ID NO.: 112 SEQ ID NO.: 73
MSF-268	MSPI-268.1	8.85	13625	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-270	MSPI-270	5.74	32454	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-271	MSPI-271	6.43	45269	TIEAEAAGHTVTR	SEQ ID NO.: 304
MSF-273	MSPI-273	4.94	16019	LGPLVEQGR AATVGS LAGQPLQER LEEQAQQR	SEQ ID NO.: 192 SEQ ID NO.: 4 SEQ ID NO.: 183
MSF-274	MSPI-274	9.80	23795	GFQALGDAADIR	SEQ ID NO.: 124
MSF-276	MSPI-276	7.32	13812	LYTLVLTPDAPSR YVWLVEQDR GNDISSGTVLSDYVSGPPK NRPTSISWDGLDSGK YVWLVEQDRPLK	SEQ ID NO.: 214 SEQ ID NO.: 378 SEQ ID NO.: 136 SEQ ID NO.: 234 SEQ ID NO.: 379
MSF-277	MSPI-277	6.29	80131	VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
MSF-279	MSPI-279	6.69	24664	APEAQVSVQPNFQQDK AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-280	MSPI-280.1	6.06	33713	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-280	MSPI-280.2	6.06	33713	ELDESLQVAER LFDSDPITVTPVEVSR	SEQ ID NO.: 83 SEQ ID NO.: 189
MSF-283	MSPI-283.1	4.78	43626	WEAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 354
MSF-283	MSPI-283.2	4.78	43626	CAEENCFIQK ENEGFTVTAEGK VYAYYNLEESCTR SGSDEVQVGQQR GQGTLVVVTMYHAK	SEQ ID NO.: 36 SEQ ID NO.: 87 SEQ ID NO.: 353 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 138
MSF-284	MSPI-284.1	6.43	26066	TMLLPAGSLGSSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-284	MSPI-284.2	6.43	26066	TVAAPSVFIFPPSDEQLK LLIYDASTR SGTASVVCLLNNFYPR EIVMTQSPATLSVSPGER	SEQ ID NO.: 314 SEQ ID NO.: 198 SEQ ID NO.: 271 SEQ ID NO.: 81
MSF-285	MSPI-285	5.75	27835	SYSCQVTHEGSTVEK	SEQ ID NO.: 286

10

20

30

40

【 0 1 0 0 】

【 表 2 7 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-289	MSPI-289	6.74	54791	VLSALQAVQGLLVAQGR SLDFTELDVAEEK ALQDQLVLVAAK LQAILGVPWK FMQAVTGWK DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 62
MSF-290	MSPI-290	4.36	20951	TMLLQPAGSLGSYSYR AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 311 SEQ ID NO.: 26
MSF-291	MSPI-291.1	4.33	105354	LLDSLPSDTR	SEQ ID NO.: 197
MSF-291	MSPI-291.2	4.33	105354	THPHFVIPYR SQVMTHLR VESLEQEAANER AVIQHFQEK VEAMLNDR	SEQ ID NO.: 303 SEQ ID NO.: 283 SEQ ID NO.: 328 SEQ ID NO.: 32 SEQ ID NO.: 323
MSF-292	MSPI-292	5.76	13128	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-295	MSPI-295	4.32	36134	IPTTFENGR	SEQ ID NO.: 163
MSF-298	MSPI-298.1	7.51	24762	EIVLTQSPATLSLSPGER FSGSGSGTDFTLTISR VYACEVTHQGLSSPVTK	SEQ ID NO.: 80 SEQ ID NO.: 115 SEQ ID NO.: 352
MSF-298	MSPI-298.2	7.51	24762	TMLLQPAGSLGSYSYR AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 311 SEQ ID NO.: 26
MSF-299	MSPI-299	8.12	54806	QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 239
MSF-300	MSPI-300	4.37	40820	VFQEPLFYEAPR MIELHNQEYR LYGMNEEGWR QVMNGFQNR	SEQ ID NO.: 330 SEQ ID NO.: 215 SEQ ID NO.: 213 SEQ ID NO.: 254
MSF-301	MSPI-301	5.58	32266	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR CPLMVKVLDAVR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140 SEQ ID NO.: 46
MSF-302	MSPI-302	4.28	21301	APEAQVSVQPNFQQDK TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 311
MSF-303	MSPI-303.2	7.84	65034	VWVYPPEK DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR RLWWLDLK GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 122
MSF-305	MSPI-305	9.04	21021	APEAQVSVQPNFQQDK TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 311
MSF-306	MSPI-306	6.86	50636	RLWWLDLK DYFMPCPGR YYCFQGNQFLR VWVYPPEK GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 258 SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 380 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122
MSF-307	MSPI-307	7.48	59646	EMSGSPASGIPVK LNMGITDLQGLR GOIVFMNR	SEQ ID NO.: 86 SEQ ID NO.: 199 SEQ ID NO.: 139

10

20

30

40

【 0 1 0 1 】

【 表 2 8 】

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	トリプシン消化ペプチドの アミノ酸配列	配列番号
MSF-308	MSPI-308	7.78	55797	TCPKPDLLPFSTVVPLK TFYEPGEEITYSCK ATVVYQGER EHSSLAFWK	SEQ ID NO.: 290 SEQ ID NO.: 298 SEQ ID NO.: 30 SEQ ID NO.: 77
MSF-311	MSPI-311.1	5.41	58040	RVWELSK DDLIVSDAFHK	SEQ ID NO.: 262 SEQ ID NO.: 55
MSF-311	MSPI-311.2	5.41	58040	WLQGSQELPR	SEQ ID NO.: 359
MSF-311	MSPI-311.3	5.41	58040	ALQDQLVLVAAK VLSALQAVQGLLVAQGR DPTFIPAPIQAK SLDFTELDVAEEK FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 111
MSF-313	MSPI-313	5.58	24087	TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-314	MSPI-314	4.84	26797	EKPGVYTNVCR LSELIQPLPLER YTNWIK GLVSWGNIPCGSK	SEQ ID NO.: 82 SEQ ID NO.: 205 SEQ ID NO.: 374 SEQ ID NO.: 135
MSF-316	MSPI-316	5.51	31894	ASSIIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
MSF-318	MSPI-318	4.57	13499	GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-319	MSPI-319	6.72	59646	LNVTIVGPR LFAYPDTHR AFYVNVLNNEQR LSQEDPDYGIR	SEQ ID NO.: 200 SEQ ID NO.: 188 SEQ ID NO.: 12 SEQ ID NO.: 207
MSF-320	MSPI-320	8.16	24182	APEAQVSVQPNFQODK AQGFTEDTIVFLPQTDK TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-322	MSPI-322	5.21	22551	TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-323	MSPI-323.1	5.21	31216	EILSVDCSTNNPSQAK	SEQ ID NO.: 78
MSF-323	MSPI-323.2	5.21	31216	GSPAINVAVHVFR AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 140 SEQ ID NO.: 1
MSF-324	MSPI-324	7.10	23117	TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-325	MSPI-325.1	4.05	43334	VLSLAQEQVGGSPK QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 339 SEQ ID NO.: 244
MSF-325	MSPI-325.2	4.05	43334	ALGHLDLSGMR VAAGAFQGL YLFLNGNK	SEQ ID NO.: 21 SEQ ID NO.: 319 SEQ ID NO.: 370

10

20

30

【0102】

当業者には明らかであるように、本発明の記載に基づいて、表IVまたはV中のそのMSPIに関して与えられたデータに従って、所与のMSPIを記載することができる。MSPIは、そのMSPIに関して記載されたペプチド配列を含むポリペプチドであり（好ましくは、そのMSPIに関して記載された複数のペプチド配列を含み、より好ましくは全ての該ペプチド配列を含む）、そのMSPIに関して述べられた値とほぼ同じpIを有し（述べられた値の、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内、さらに好ましくは1%以内）、そのMSPIに関して述べられた値とほぼ同じMWを有する（述べられた値の、好ましくは10%以内、より好ましくは5%以内、さらに好ましくは1%以内）。

40

【0103】

一実施形態では、被験体からの体液の第1の試料を、1つまたは複数の表IVで定義したMSPI、または任意のこれらの組合せを定量的に検出するために分析し、MSを有していない1つまたは複数の被験体からの第2の試料（たとえば対照試料、または前に決定され

50

た基準範囲) に対しての、被験体からの第 1 の試料中の 1 つまたは複数の M S P I (または任意のこれらの組合せ) の存在量の減少は、M S の存在を示す。

【0104】

本発明の他の実施形態では、被験体からの体液の第 1 の試料を、1 つまたは複数の表 V で定義した M S P I、または任意のこれらの組合せを定量的に検出するために分析し、M S を有していない 1 つまたは複数の被験体からの第 2 の試料 (たとえば対照試料、または前に決定された基準範囲) に対しての、被験体からの第 1 の試料中の 1 つまたは複数の M S P I (または任意のこれらの組合せ) の存在量の増大は、M S の存在を示す。

【0105】

他の実施形態では、被験体からの体液の第 1 の試料を、(a) その存在量の減少が M S、すなわち表 IV で定義した M S P I の存在を示す、1 つまたは複数の M S P I または任意のこれらの組合せ、および (b) その存在量の増大が M S、すなわち表 V で定義した M S P I の存在を示す、1 つまたは複数の M S P I または任意のこれらの組合せを定量的に検出するために分析する。 10

【0106】

他の実施形態では、被験体からの体液の第 1 の試料を、1 つまたは複数の M S P I、および 1 つまたは複数の以前に知られている M S のバイオマーカー (たとえば、過敏性血小板グルタミン酸受容体などの候補マーカー (Berk 他、Int Clin Psychopharmacol 1999 14、199~122)) を定量的に検出するために分析する。この実施形態に従うと、対照または基準範囲に対しての、それぞれの M S P I および知られているバイオマーカーの存在量によって、被験体が M S を有しているかどうか 20 が示される。

【0107】

M S P I の存在量は、発現の基準のタンパク質アイソフォーム (E R P I) に対して正常化されることが好ましい。好ましい技術の方法および装置を使用して、前に記載した E R F の部分的なアミノ酸配列決定によって、E R P I を同定することができる。E R P I、およびそれと相同であると知られているタンパク質の部分的なアミノ酸配列を、表 VI に示す。

【0108】

【表 29】

表 VI 発現基準タンパク質アイソフォーム

ERF#	ERPI#	トリプシン消化ペプチドのアミノ酸配列
ERF-1	ERPI-1.1	RVWELSK, FATTFYQHLADSK, VAEGTQVLELPPK, GDDITMVLILPKPEK, LPGIVAEGR, DDLTVSDAFHK, EVPLNTIIFMGR
ERF-1	ERPI-1.2	YTFELSR, RTHLPEVFLSK
ERF-2	ERPI-2	FSGTWYAMAK, YWGVASFLQK, QEELCLAR, LIVHNGYCDGR
ERF-3	ERPI-3	SVVAPATDGGGLNLTSTFLR, TMLLPAGSLGSYSYR

10

20

【0109】

本明細書に記載するMSP Iは、既知のタンパク質のアイソフォームを含み、このアイソフォームがMSと関連があることは以前は知られていなかった。それぞれのMSP Iに関して、本発明は更に(a)前記MSP I、前記断片、または前記MSP Iと前記断片の両方に結合する抗体を与える。MSP Iは単離された形であることが好ましく、本明細書で使用するようにMSP Iが実質的に夾雑タンパク質を含まない調製物、すなわち夾雑タンパク質が、存在する全タンパク質の10%未満(好ましくは5%未満、より好ましくは1%未満)である調製物中に存在するときに、MSP Iは「単離されている」。夾雑タンパク質は、2D電気泳動によって決定される、単離したMSP IのpIまたはMWと著しく異なるpIまたはMWを有する、タンパク質またはタンパク質アイソフォームである。本明細書で使用するように、「著しく異なる」pIまたはMWとは、参照プロトコルに従って行われる2D電気泳動上の、MSP Iから除かれる夾雑タンパク質を容認するpIまたはMWである。

30

【0110】

一実施形態では、単離したポリペプチドを提供し、前記ポリペプチドは表IVまたはVでMSP Iに関して同定されたアミノ酸配列を有するペプチドを含み、前記ポリペプチドは表IVまたはVでMSP Iに関して同定された値の10%以内(好ましくは5%以内、より好ましくは1%以内)のpIおよびMWを有する。

40

【0111】

本発明のMSP Iは、本明細書に記載する好ましい技術、キナーゼ・アッセイ、酵素アッセイ、結合アッセイおよび他の機能アッセイ、イムノアッセイ、およびウエスタン・ブロット法だけには限らないがこれらを含めた、当業者に知られている任意の方法によって、定性的あるいは定量的に検出することができる。一実施形態では、MSP IのMWおよびpIの効力によって2Dゲル上でMSP Iを分離させ、ゲルを染色することによって視覚化する。一実施形態では、MSP Iを蛍光染料で染色し、蛍光スキャナによって画像化する。Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene

50

、Oregon) は、この目的に適した染料である。好ましい蛍光染料は、ピリジニウム、4-[2-[4-(ジベンチルアミノ)-2-トリフルオロメチルフェニル]エテニル]-1-(スルホブチル)-、分子内塩である。参照によってその全容を本明細書に取り込んである、1999年10月5日に出願された米国出願No. 09/412,168を参照のこと。

【0112】

あるいは、イムノアッセイにおいてMSPIを検出することができる。一実施形態では、イムノアッセイを、MSPIが存在する場合は免疫特異的結合が起こることが可能な条件下で、試験する被験体からの第1の試料を捕獲試薬（たとえば抗体）と接触させること、および捕獲試薬による任意の免疫特異的結合の量を検出または測定することによって行う。抗MSPI抗体は、本明細書に教示する方法および技法によって生成することができ、当分野で知られているこのような抗体の例を表VIIに述べる。表VIIに示すこれらの抗体は、MSPIそのものがファミリー・メンバーであるタンパク質に結合することが既に知られている。抗MSPI抗体は、同じタンパク質の他のアイソフォームよりも、MSPIに優先的に結合することが好ましい。好ましい実施形態では、抗MSPI抗体は、前記同じタンパク質の他のアイソフォームよりも、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらに好ましくは少なくとも10倍大きな親和性でMSPIに結合する。

【0113】

MSPIはゲルから適切な膜（たとえばPVDF膜）に移すことができ、ウエスタン・ブロット法、および本明細書に記載するような抗MSPI抗体、たとえば当該のMSPIに対して提示される抗体を使用する「サンドイッチ」イムノアッセイなどの技法を使用する競合および非競合アッセイ・システムを非制限的に含む適切なアッセイで、その後調べることができる。イムノブロット法を使用して、同じ遺伝子によってコードされている他のアイソフォームとMSPIを免疫特異的に区別するために必要とされる選択性を示す、抗MSPI抗体を同定することができる。

【0114】

【表30】

表 VII MSPI もしくは MSPI 関連ポリペプチド、または MSPI がメンバーであるタンパク質ファミリーを認識する既知の抗体

MSPI番号	抗 体	製造者	カタログ番号
MSPI-1	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-2	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-3	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-4	C7 補体、ヤギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G34
MSPI-5.1	C7 補体、ヤギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G34
MSPI-6	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-7	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-8.1	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-8.2	アポリポタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-9	ウサギ抗ヒト α -2- マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-10	ウサギ抗ヒト α -2- マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-11	ウサギ抗ヒト α -2- マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-12.1	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン10F12.2抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-12.2	ヤギ抗ビルピン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140

10

20

30

40

MSPI番号	抗 体	製造者	カタログ番号
MSPI-13	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-14	C4補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-15	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-16	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-18	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-22	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-24	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-27	C6補体、ヤギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G33
MSPI-28	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-29	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-30	C4補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-31	ウサギ抗ヒト α -2-マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-32	C6補体、ヤギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G33
MSPI-33.1	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-36	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-37	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031

10

20

30

40

【 0 1 1 6 】

【 表 3 2 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-39.1	ヤギ抗ヒト・フィブリン-1 (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-40	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-42.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-47	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-48.1	ヤギ抗ヒト・フィブリン-1 (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-51.1	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-52.1	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-52.2	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-54	抗 γ ° α スタグラジン D シンターセ / γ ° α スタグラジン H2-D イソマーセ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-55	抗ヒト・コンタクチン、 マウス・モノクローナル抗体	BD Biosciences	610579
MSPI-56	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-58	ウサギ抗ヒト α 2 マクログロブリン抗体	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-60	抗ヒト・コンタクチン、 マウス・モノクローナル抗体	BD Biosciences	610579

10

20

30

40

【 0 1 1 7 】

【 表 3 3 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-65	C6 補体、ヤギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G33
MSPI-67.1	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-67.2	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-70	C1r 補体、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YSRT- AHC002
MSPI-72	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-75	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-76	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-78.1	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-78.2	抗 α ロスタグラーシジン D シンターゼ/ α ロスタグラーシジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-79	抗ヒト・コンタクチン、 マウス・モノクローナル抗体	BD Biosciences	610579
MSPI-80.1	モノクローナル・マウス 抗ヒトIgA1抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-81	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-84.1	C4 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-89.1	ヘモペキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX

10

20

30

40

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-90	ゲルゾリン、血漿＋細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-91.1	アポリポタンパク質 A1 (HDL)、 ヒツジ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20075AP
MSPI-92	抗ヒト・コンタクチン、 マウス・モノクローナル抗体	BD Biosciences	610579
MSPI-93.1	アポリポタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-93.2	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-95	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-96	ゲルゾリン、血漿＋細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-98	モノクローナル 抗ニューロン特異的 エノラーゼ抗体	BIODESIGN INTERNATIONAL	M37403M
MSPI-102.1	アポリポタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-102.2	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-102.3	乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) (H-サブユニット) クローン: HH-17、Mab 抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6019-1
MSPI-104	補体因子 B、C3 プロアクチベーター、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-105.1	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イメラゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-105.2	ゲルゾリン、血漿＋細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210

10

20

30

40

【 0 1 1 9 】

【 表 3 5 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-106	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-107	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-108	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-110	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-111	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-113	補体因子 B、C3 プロアクチベーター、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-114	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-119	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-120	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-122	ウサギ抗ヒト・インスリン様 成長因子結合タンパク質 2 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-IGFBP2abr
MSPI-123.1	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-127.1	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579

10

20

30

40

【 0 1 2 0 】

【 表 3 6 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-128	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-130	ヤギ抗ヒト・フィブリン-1 (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-132	因子 H(補体)、 ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-066-02
MSPI-133	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-134	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-137	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-140	テトラネクチン、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-141.2	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-142	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-145.2	ウサギ・ポリクローナル抗ヒト抗体 セルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031

10

20

30

40

【 0 1 2 1 】

【 表 3 7 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-147.2	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-149	補体因子 B、C3 プロアクチベーター、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-150	抗ヒト・コンタクチン、 マウス・モノクローナル抗体	BD Biosciences	610579
MSPI-151	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-152	モノクローナル・マウス 抗ヒト IgA1 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-154.1	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-155.2	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-155.3	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-156.2	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-158.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-159	補体因子 B、C3 プロアクチベーター、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-160	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-161	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579

10

20

30

40

【 0 1 2 2 】

【 表 3 8 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-165.2	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-167	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-169.2	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-170	ウサギ・ポリクローナル 抗ヒトセルロプラスミン抗体	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-171	アポリボタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-172	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-173.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-175	ヤギ抗ヒト・フィブリン-1 (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-176.1	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-176.2	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-177	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-178	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01

10

20

30

40

【 0 1 2 3 】

【 表 3 9 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-179.1	モノクローナル・マウス 抗ヒト IgA1 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-179.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-181.2	抗 γ^0 ロスタグランジン D シンターゼ/ γ^0 ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-182	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-183	抗 γ^0 ロスタグランジン D シンターゼ/ γ^0 ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-184	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-186	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-187.1	ヤギ抗クラステリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-187.2	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-189	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-191	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-192.1	テトラネクチン、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-193	抗 γ^0 ロスタグランジン D シンターゼ/ γ^0 ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01

10

20

30

40

【 0 1 2 4 】

【 表 4 0 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-194.1	モノクローナル・マウス 抗ヒト・プラスミノゲン抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11- 4D2
MSPI-195.1	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-196	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-197	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-198	テトラネクチン、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-199.1	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-199.2	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-200	モノクローナル・マウス 抗ヒト・プラスミノゲン抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11- 4D2
MSPI-201	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-202.1	プロトロンビン、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 448/2
MSPI-205	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-206	アポリポタンパク質 D、 クローン: 36C6、Mab 抗ヒト、 パラフィン処理、IH/WB 抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457

10

20

30

40

【 0 1 2 5 】

【 表 4 1 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-209	抗7°ロスタグラチンDシターゼ/ 7°ロスタグラチンH2-Dイソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-210	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-212.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-213	モノクローナル抗ヒト・ ファイブリノーゲン抗体	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
MSPI-215	ヤギ抗クラスリン(ヒト)抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-216	C4 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-217.3	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-218	ヤギ抗ヒト・フィブリン-1 (ポリクローナル)抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-219	モノクローナル・マウス 抗ヒト・プラスミノゲン抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11- 4D2
MSPI-220	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-221.1	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-222.2	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-223.1	マウス抗ヒト色素上皮由来因子 (PEDF)(モノクローナル) クローン 10F12.2 抗体	Chemicon International	MAB1059
MSPI-224.1	マウス抗ヒト補体成分 C9 (モノクローナル)抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- COMPC9abm-A6

10

20

30

40

【 0 1 2 6 】

【 表 4 2 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-228.1	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-228.2	α -1-酸性糖タンパク質、 クローン: AGP-47、 Mab 抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6189-1
MSPI-229.2	ヒト mu 鎖に対するマウス IgG1 抗体	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-230	ゲルゾリン、血漿+細胞質、 ヒツジ抗抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-231	ヤギ抗ビルビン酸キナーゼ (ポリクローナル) 抗体	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-232	アポリポタンパク質 D、 クローン: 36C6、Mab 抗ヒト、 パラフィン処理、IH/WB 抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
MSPI-233.1	ヤギ抗クラスτεリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-233.2	アポリポタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-234	抗 α 1-ミセリノゲン D シンターゼ / α 1-ミセリノゲン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-235	マトリックス・メタロプロテイナーゼ 2 (TIMP2) の組織阻害剤 (TIMP1 を含まない)、 クローン: 3A4、Mab 抗ヒト、 パラフィン処理、IH 抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA498
MSPI-236.1	α -1-酸性糖タンパク質、 クローン: AGP-47、 Mab 抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6189-1
MSPI-236.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-237	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574

10

20

30

40

【 0 1 2 7 】

【 表 4 3 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-238	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-239.1	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-239.2	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-240.1	マトリックス・メタロプロテイナーゼ 1 (TIMP1)の組織阻害剤 (TIMP2を含まない)、 クローン2A5、Mab 抗ヒト、 パラフィン処理、IH 抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA497
MSPI-240.2	ヒトのラムダ軽鎖に対する モノクローナル抗体	Diatec.com	1020
MSPI-241.2	ヒト mu 鎖に対するニトリ・ポリクローナル抗体	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-242.2	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-243	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-244	抗 α ロスタグランジン D シンターゼ/ α ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-245	ヒト mu 鎖に対するニトリ・ポリクローナル抗体	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-246.1	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-246.2	シスタチン C、 ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-248	C4 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-251	C3 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-257.2	アポリポタンパク質 E、LDL、 VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、 凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029

10

20

30

40

【 0 1 2 8 】

【 表 4 4 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-257.3	トランスチレチン、プレアルブミン、55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-260.2	ヒト mu 鎖に対するマウリ・ポリクローナル抗体	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-265	マトリックス・メタロプロテイナーゼ2 (TIMP2)の組織阻害剤 (TIMP1を含まない)、クローン:3A4、Mab 抗ヒト、パラフィン処理、IH抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA498
MSPI-266	アポリポタンパク質 E、LDL、VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-268.1	シスタチンC、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-270	トランスチレチン、プレアルブミン、55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-273	アポリポタンパク質 E、LDL、VLDL、クローン: 3D12、Mab 抗ヒト、凍結/パラフィン処理抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-274	マトリックス・メタロプロテイナーゼ1 (TIMP1)の組織阻害剤 (TIMP2を含まない)、クローン2A5、Mab 抗ヒト、パラフィン処理、IH抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA497
MSPI-277	ヒト mu 鎖に対するマウリ・ポリクローナル抗体	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-279	抗7°ロスタグランジン D シンターゼ / 7°ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-280.2	ヤギ抗クラスレリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-283.2	C3 補体、マウリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-284.1	抗7°ロスタグランジン D シンターゼ / 7°ロスタグランジン H2-D イソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-289	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579

10

20

30

40

【 0 1 2 9 】

【 表 4 5 】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-290	抗7°ロスタグランジンDシターゼ/ 7°ロスタグランジンH2-Dイソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-291.2	抗アルツハイマー前駆体 タンパク質A4抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- ALZHPA4abm
MSPI-292	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-295	アポリポタンパク質D、 クローン: 36C6、Mab抗ヒト、 パラフィン処理、IH/WB抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
MSPI-298.2	抗7°ロスタグランジンDシターゼ/ 7°ロスタグランジンH2-Dイソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-299	C3補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-301	トランスチレチン、プレアルブミン、 55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-302	抗7°ロスタグランジンDシターゼ/ 7°ロスタグランジンH2-Dイソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-303.2	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-305	抗7°ロスタグランジンDシターゼ/ 7°ロスタグランジンH2-Dイソメラーゼ抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-306	ヘモベキシン、 β -1、 ウサギ抗ヒト、沈降抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-307	C4補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-311.1	アンチトロンビンIII、 クローン: BL-ATIII/3、 Mab抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 9009-1
MSPI-311.2	モノクローナル・マウス 抗ヒトIgA1抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5

10

20

30

40

【0130】

【表46】

MSPI番号	抗体	製造者	カタログ番号
MSPI-311.3	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-313	抗 α -ロスタクランジン D シンターゼ / α -ロスタクランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-316	ヤギ抗クラスレリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-318	トランスチレチン、プレアルブミン、55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-319	ウサギ抗カタラーゼ (ホリックローバル) 抗体	Abcam Ltd.	ab6572
MSPI-320	抗 α -ロスタクランジン D シンターゼ / α -ロスタクランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-322	抗 α -ロスタクランジン D シンターゼ / α -ロスタクランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-323.1	ヤギ抗クラスレリン (ヒト) 抗体	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-323.2	トランスチレチン、プレアルブミン、55kD、ウサギ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-324	抗 α -ロスタクランジン D シンターゼ / α -ロスタクランジン H2-D イソメラーゼ 抗体	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-325.1	C C4 補体、ニワトリ抗ヒト抗体	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02

* これらの抗体に関する他の情報は、ACCURATE CHEMICAL and SCIENTIFIC CORPORATION の販売用資料から得ることができる。

<http://www accuratchemical.com/>; BIODESIGN INTERNATIONAL -

<http://www biodesign.com/>; RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC -

<http://www researchd.com/>; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - <http://www scbt.com/>.

【0131】

本明細書で使用するように、「異常レベル」は、MSを有していない被験体からの第2の試料のレベルまたは参照レベルと比べて、第1の試料が増大または減少しているレベルを意味する。一実施形態では、組織切片中での抗体の結合を使用して、異常なMSPI局在化または1つまたは複数のMSPIの異常レベルを検出することができる。特定の実施形態では、MSPIに対する抗体を使用して、被験体からの第1の組織試料（たとえば脳の生検）をMSPIのレベルに関してアッセイすることができ、ここでMSPIの異常レベルはMSを示す。

【0132】

ウェスタン・ブロット法（ラジオイムノアッセイ、ELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降素反応、ゲル拡散沈降

10

20

30

40

50

素反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、免疫放射定量アッセイ、蛍光イムノアッセイおよびプロテインAイムノアッセイなどの技法を使用する競合および非競合アッセイ・システムを非制限的に含めた、任意の適切なイムノアッセイを使用することができる。

【0133】

たとえば、2ステップのサンドイッチ・アッセイによって、体液試料（たとえばCSF、血液、尿または組織ホモジェネート）中でMSPIを検出することができる。第1のステップでは、捕獲試薬（たとえば抗MSPI抗体）を使用して、MSPIを捕獲する。当分野で知られているこのような抗体の例は、表VIIに示されている。捕獲試薬は、固相上の場合によっては固定することができる。第2のステップでは、直接的または間接的に標識された検出試薬を使用して、捕獲したMSPIを検出する。一実施形態では、検出試薬はレクチンである。この目的のために、MSPIと同じコア・タンパク質を有する他のアイソフォームよりも、または抗体によって認識される抗原決定基を共有している他のポリペプチドよりも優先的にMSPIに結合する、任意のレクチンを使用することができる。好ましい実施形態では、選択したレクチンが、前記MSPIと同じコア・タンパク質を有する他のアイソフォーム、または前記抗体によって認識される抗原決定基を共有している他のポリペプチドよりも、少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらに好ましくは少なくとも10倍大きな親和性でMSPIに結合する。本発明の記載に基づいて、当分野でよく知られている方法、たとえばSumar他、Lectin as Indicators of Disease-Associated Glycoforms、In: Gabius H-J & Gabius S (eds.)、1993、Lectins and Glycobiology、158~174ページ（参照によってその全容を本明細書に取り込んである）の158~159ページの表Iに列挙された、1つまたは複数のレクチンを試験することによって、所与のMSPIを検出するのに適したレクチンを容易に同定することができる。所望のオリゴ糖特異性を有するレクチンは、たとえば2Dゲル中、ニトロセルロース膜などの適切な固体支持体への転写を受けての2Dゲルの複製中でMSPIを検出するそれらの能力によって、あるいは捕獲試薬による捕獲後の2ステップアッセイにおいて同定することができる。代替実施形態では、検出試薬は抗体、たとえばリン酸化されたアミノ酸に免疫特異的に結合する抗体のような翻訳後の改変を免疫特異的に検出する抗体である。このような抗体の例には、ホスホチロシンに結合する抗体（BD Transduction Laboratories、2002、カタログ番号P11120; P39020）、ホスホセリンに結合する抗体（Zymed Laboratories Inc. 2002、South San Francisco、CA、カタログ番号61-8100）、およびホスホスレオニンに結合する抗体（Zymed Laboratories Inc. 2002、South San Francisco、CA、カタログ番号71-8200、13-9200）がある。

【0134】

望むならば、MSPIをコードする遺伝子、関連遺伝子、または相補配列を含めた関連核酸配列またはサブ配列を、ハイブリダイゼーション・アッセイで使用することもできる。MSPIをコードするヌクレオチド、または少なくとも8個のヌクレオチド、好ましくは少なくとも12個のヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも15個のヌクレオチドを含むそのサブ配列を、ハイブリダイゼーション・プローブとして使用することができる。ハイブリダイゼーション・アッセイは、MSPIをコードする遺伝子の異常な発現と関連がある状態、障害、または疾患状態の検出、予後、診断、または調査のため、あるいはMSを示唆する徴候または症状がある被験体を差別的に診断するために使用することができる。特に、このようなハイブリダイゼーション・アッセイは、核酸を含む被験体の試料とMSPIをコードするDNAまたはRNAにハイブリダイズすることができる核酸プローブを、このようなハイブリダイゼーションが起こることが可能な条件下で接触させること、および任意の生じたハイブリダイゼーションを検出または測定することを含む方法によっ

て行うことができる。以下に記載するように、ヌクレオチドはMSを有する被験体の治療に使用することができる。

【0135】

本発明は、抗MSPI抗体を含む診断キットも提供する。さらに、このようなキットは、1つまたは複数の以下のものを場合によっては含んでよい。(1) 診断、予後、治療的調査またはこれらの用途の任意の組合せ用に、抗MSPI抗体を使用するための教示書、(2) 抗体に対する標識された結合パートナー、(3) その上に抗MSPI抗体が固定される固相(試薬ストリップなど)、および(4) 診断、予後、または治療的使用または任意のこれらの組合せに関して、規制上の承認が示されている標識または挿入体。抗体に対する標識された結合パートナーが与えられない場合は、検出可能なマーカー、たとえば化学発光、酵素、蛍光、または放射性成分で、抗MSPI抗体自体を標識することができる。

10

【0136】

本発明は、MSPIをコードするRNAにハイブリダイズすることができる核酸プローブを含む、キットも提供する。特定の実施形態では、キットは1つまたは複数の容器中に、適切な反応条件下において、ポリメラーゼ連鎖反応(たとえばInnis他、1990、PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CAを参照のこと)、リガーゼ連鎖反応(EP320, 308を参照のこと)、Qレプリカーゼを使用すること、環状プローブの反応、または当分野で知られている他の方法などによって、MSPIをコードする核酸の少なくとも一部分をプライマー増幅させることができる、一対のプライマー(たとえば、それぞれ大きさの範囲がヌクレオチド6

20

【0137】

複数のMSPIまたはそれぞれがMSPIをコードする複数の核酸の検出を可能にする、キットも提供する。キットは、所定量の単離MSPIタンパク質またはMSPIをコードする核酸を、たとえば標準または対照として使用するために、場合によってはさらに含むことができる。

【0138】

1.5 MSFおよびMSF群を同定するための統計的技法

折りたたみの変化、ウィルコクソンの順位和検定およびt-検定などの一変量の示差分析ツールは、MSと診断上関連がある個々のMSFまたはMSPIの同定、あるいは疾患プロセスを制御する個々のMSPIの同定において有用である。しかしながら多くの場合、疾患プロセスは、単離された個々のMSFおよびMSPIよりも、MSFまたはMSPIの組合せと関連がある(かつMSPIの組合せによって制御されている)ことを当業者は理解している。このようなMSFおよびMSPIの組合せを発見するための方法は、個々のMSFおよびMSPIを発見するための方法とは異なる。このような場合、それぞれ個々のMSFおよびMSPIは1つの変数としてみなすことができ、疾患はこれらの変数の相互作用によって引き起こされる多変量の連合効果とみなすことができる。

30

【0139】

以下のステップを使用して、好ましい技術によって生じたデータからマーカーを同定することができる。

40

【0140】

第1のステップは、MSにおいて著しい異常な発現をそれぞれ示す、MSFまたはMSPIの収集物を同定することである。同定されたMSFまたはMSPIとMSの間の関連が、個々のMSFまたはMSPIが診断用のものとして使用されるときに望まれるほど、非常に有意である必要はない。前に論じた任意の検定(折りたたみの変化の検定、ウィルコクソンの順位和検定など)を、この段階で使用することができる。ひとたびMSFまたはMSPIの適切な収集物を同定した後に、群を同定することができる精巧な多変量の分析を次いで使用して、MSとの有意な多変量の関連を評価することができる。

【0141】

50

線形判別分析 (LDA) は、1つのこのような手順であり、これを使用して、変数 (すなわち MSF または MSP I) の群と MS の間の有意な関連を検出することができる。LDA を行う際には、1組の重みをそれぞれの変数 (すなわち MSF または MSP I) と関連付け、したがって重みと変数の測定値の線形の組合せにより、MS を有している被験体と MS を有していない被験体を区別することによって、疾患状態を同定することができる。LDA を改良することによって、変数を段階的に包含 (または除去) して、モデルの判別能力を最適化することができる。したがって LDA の結果は、診断、予後、療法または薬剤開発用に非制限的に使用することができる、MSF または MSP I の群である。変動性判別分析などの LDA の他の改良版は、疾患状態と正常の状態を区別するために、変数の非線形の組合せを使用することができる。判別分析の結果は、多重比較検定によって、あるいは分類樹などの代替的な技法を使用する分析を繰り返すことによって確認することができる。 10

【0142】

他のカテゴリーの MSF または MSP I は、第1の試料または試料セット (たとえば病状の被験体からの試料) 中の MSF または MSP I の特徴点の存在パーセンテージと、第2の試料または試料セット (たとえば対照の被験体からの試料) 中の MSF または MSP I の特徴点の存在パーセンテージを比較することによる定性測定によって同定することができる。MSF または MSP I の「特徴点の存在パーセンテージ」は、選択した検出法によって試料セット中の MSF または MSP I が検出可能である該セット中における試料のパーセンテージである。たとえば、病状の被験体からの95パーセントの試料中で MSF が検出可能である場合、その試料セット中のその MSF の特徴点の存在パーセンテージは95パーセントである。無病の被験体からのわずか5パーセントの試料が検出可能であるレベルの同じ MSF を有している場合、被験体の試料中の MSF を検出することによって、その被験体が MS に罹患している可能性があることが示唆されると思われる。 20

【0143】

1. 6 臨床研究における使用

本発明の診断法および組成物は、たとえば MS の治療用の薬剤を評価するための、臨床研究をモニターするのに役立つ可能性がある。一実施形態では、候補分子を、MS を有する被験体の MSF または MSP I レベルを、MS を有していない被験体、または治療を受けた被験体 (たとえばインターフェロン β -1b (Betaseron (商標)、Bet interferon (商標))、インターフェロン β -1a (Avonex (商標)、Rebif (商標))、酢酸グラチラマー (Copaxone (商標))、静脈内注射用免疫グロブリンを含めたこれらによる再発寛解 MS の治療、急性再発の発生の治療、コルチコステロイドを用いた治療 (Nosworthy (1999) Nature 399:suppl. A40-A47) 後に) で見られるレベルまで回復させ、MSF または MSP I レベルを非 MS 値に、またはその付近に保つ、それらの能力に関して試験する。1つまたは複数の MSF または MSP I のレベルを、アッセイすることができる。 30

【0144】

他の実施形態では、本発明の方法および組成物を使用して、臨床研究の候補をスクリーニングし、MS を有する個体を識別する。次いでこのような個体を研究から除外するか、または研究に含めることができ、あるいは治療または分析用に別のコホート中に置くことができる。望むならば、候補を同時にスクリーニングして、MS を有する個体を識別することができる。これらのスクリーニングに関する手順は、当分野ではよく知られている。 40

【0145】

1. 7 MSP I の精製

特定の態様では、本発明は、単離された哺乳動物の MSP I、好ましくはヒトの MSP I、および抗原決定基 (すなわち抗体によって認識することができる) を含み、またはそれ以外の場合は機能的に活性である MSP I の断片、および前述のものをコードする核酸配列を提供する。本明細書で使用する「機能的に活性である」とは、完全長 (野生型) MS P I と関連がある1つまたは複数の機能的活性、たとえば MSP I 基質または MSP I 結 50

合パートナーへの結合、抗原性（抗MSP I抗体への結合）、免疫原性、酵素活性などを示す物質のことである。

【0146】

特定の実施形態では、本発明は、少なくとも5個のアミノ酸、少なくとも10個のアミノ酸、少なくとも50個のアミノ酸、または少なくとも75個のアミノ酸を含む、MSP Iの断片を提供する。MSP Iの領域の一部または全てが欠けている断片、このような断片を含むポリペプチド（たとえば融合タンパク質）も提供する。前述のものをコードする核酸を提供する。

【0147】

ひとたびMSP I、MSP I断片、またはMSP Iの前駆体をコードする組換え核酸を同定した後に、遺伝子産物を分析することができる。このことは、ゲル電気泳動、イムノアッセイなどによる分析後に生成物を放射性標識することを含めた、生成物の物理的または機能的性質に基づくアッセイによって行われる。

【0148】

本明細書で同定したMSP Iは、クロマトグラフィー（たとえばイオン交換、親和性、およびサイジング・カラム・クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の差を含めた標準的な方法によって、またはタンパク質を精製するための任意の他の標準的な技法によって、単離および精製することができる。

【0149】

あるいは、MSP Iをコードする組換え核酸をひとたび同定した後に、MSP Iの完全なアミノ酸配列を、組換え核酸中に含まれる領域をコードする遺伝子のヌクレオチド配列から推定することができる。結果として、当分野で知られている標準的な化学法によって、タンパク質を合成することができる（たとえばHunkapiller他、1984、Nature 310:105~111を参照のこと）。

【0150】

他の代替実施形態では、前に記載した方法などの標準的な方法（たとえば免疫親和性による精製）によって、本来のMSP Iを天然源から精製することができる。

【0151】

好ましい実施形態では、上に記載した好ましい技術によって、MSP Iを単離する。調製規模の単離実施のためにWestermeyer、1993、Electrophoresis in Practice (VCH, Weinheim, Germany)、197~209ページ（参照によってその全容を本明細書に取り込んである）中に記載された方法に従って、2 pH単位以下のpH範囲を有する狭い範囲の「ズーム・ゲル」が、等電点段階には好ましい。この改変によって、より多量の標的タンパク質をゲル上に載せることができ、これによってゲルから回収することができる単離MSP Iの量が増大する。このようにして調製規模の実施に使用するとき、好ましい技術によって、1回の実施で典型的には単離MSP Iが100 ngまで得られ、1000 ngまで得ることができる。当業者であれば、ゲル等電点電気泳動を使用する任意の分離方法において、ズーム・ゲルが使用できることを認識するであろう。

【0152】

したがって本発明は、MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質を提供し、前述のいずれのものも、組換えDNA技法によって、または化学合成法によって生成することができる。

【0153】

1.8 MSP IをコードするDNAの単離
MSP Iをコードする遺伝子をクローン化するための特定の実施形態を、例によって以下に示すが、これらは制限的なものではない。

【0154】

DNAおよびRNAを含み、MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質をコードする配列を含む、本発明のヌクレオチド配列は、当分野

10

20

30

40

50

で知られている方法を使用して、従来の化学的手法またはポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による増幅を使用するなどして、合成することができる。本発明のヌクレオチド配列によって、たとえばcDNAライブラリー、ゲノム・ライブラリーまたは発現ライブラリーのスクリーニングを用いることを含めて、MSP I 相同体またはMSP I オルソログをコードする遺伝子を同定およびクローン化することもできる。

【0155】

たとえば、PCR技法によってMSP I をコードする遺伝子をクローン化するために、アンカー型縮重オリゴヌクレオチド（または1組の最も可能性のあるオリゴヌクレオチド）を、同じタンパク質の一部分として同定されたMSP I ペプチド断片すべてに関して設計することができる。さまざまな条件下でのPCR反応を、1種または複数種からの関連cDNAおよびゲノムDNA（たとえばCSFから、または免疫系の細胞からのもの）に関して行うことができる。ベクトレット反応も、前述のオリゴヌクレオチド（入れ子状態（nested）であることが好ましい）を使用して、任意の入手可能なcDNAおよびゲノムDNAに行うことができる。ベクトレットPCRは、ただ1つのプライマーの配列が知られている状況において、特定のDNA断片を増幅させることができる方法である。したがって、これによって、配列情報が一端のみ入手可能であるようなDNAを伸張させるための、PCRの用途が広がる（Arnold C、1991、PCR Methods Appl. 1（1）：39～42；Dyer KD、Biotechniques、1995、19（4）：550～2）。ベクトレットPCRは、ゲノム・ライブラリーまたはcDNAライブラリー・プールを鋳型として使用し、たとえばMSP I ペプチド断片をコードするアンカー型縮重オリゴヌクレオチド（または最も可能性のあるオリゴヌクレオチド）であるプローブを用いて、行うことができる。

10

20

【0156】

アンカー型縮重オリゴヌクレオチド（および最も可能性のあるオリゴヌクレオチド）は、MSP I ペプチド断片すべてに関して設計することができる。これらのオリゴヌクレオチドを標識し、cDNAおよびゲノムDNAライブラリーを含むフィルターにハイブリダイズさせることができる。同じタンパク質からの異なるペプチド用のオリゴヌクレオチドによって、ライブラリーの同じメンバーが同定されることが多いと思われる。cDNAおよびゲノムDNAライブラリーは、任意の適切すなわち所望の哺乳動物種から、たとえばヒトから得ることができる。

30

【0157】

本発明のMSP I、MSP I 断片、MSP I 関連ポリペプチドまたはMSP I 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列は、他のタンパク質をコードする遺伝子の相補的な伸張体と選択的にハイブリダイズする、その能力に関して有用である。用途に応じて、さまざまなハイブリダイゼーション条件を使用して、MSP I をコードするヌクレオチドの配列と、少なくとも30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%同一、または100%同一なヌクレオチド配列を得ることができる。

【0158】

高度の選択性のために、低塩または高温条件などの比較的厳しい条件を使用して、二重らせんを形成する。ハイブリダイゼーション条件は、多量のホルムアミドを加えてハイブリッド二重らせんを不安定化させることによって、さらに厳しくすることもできる。したがって、個々のハイブリダイゼーション条件は容易に操作することができ、一般には所望の結果に応じて選択されると思われる。一般に、50%ホルムアミドの存在下での好都合なハイブリダイゼーション温度は、MSP I をコードする遺伝子の断片と95～100%同一であるプローブに関しては42℃であり、90～95%同一であるプローブに関しては37℃であり、70～90%同一であるプローブに関しては32℃である。

40

【0159】

ゲノム・ライブラリーの作製では、DNA断片が生成され、そのうちのいくつかはMSP I の一部または全部をコードしていると思われる。DNA断片を作製するための任意の適

50

切な方法を、本発明では使用することができる。たとえば、さまざまな制限酵素を使用して、特定の部位でDNAを開裂させることができる。あるいは、マンガンの存在下でDNAアーゼを使用して、DNAを断片化することができ、あるいはたとえば超音波処理によって、DNAを物理的にせん断することができる。次いでDNA断片は、アガロースおよびポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、カラム・クロマトグラフィーおよびショ糖密度勾配遠心法だけには限られないがこれらを含めた標準的な技法によって、大きさに従って分離することができる。次いでDNA断片は、プラスミド、コスミド、バクテリオファージ・ラムダまたはT4、および酵母人工染色体(YAC)だけには限られないがこれらを含めた、適切なベクターに挿入することができる(たとえばSambrook他、1989、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、2d Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York; Glover, D. M. (ed.)、1985、DNA Cloning: A Practical Approach、MRL Press, Ltd.、Oxford、U. K. Vol. I、II; Ausubel F. M. 他、eds.、1989、Current Protocols in Molecular Biology、Vol. I、Green Publishing Associates, Inc. and John Wiley & sons, Inc.、New Yorkを参照のこと)。標識されたプローブへの核酸のハイブリダイゼーションによって、ゲノム・ライブラリーをスクリーニングすることができる(Benton and Davis、1977、Science 196:180; Grunstein and Hogness、1975、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 72:3961)。

【0160】

本発明の記載に基づいて、当分野でよく知られている最適な手法を使用して、MSP Iの任意のペプチドのアミノ酸配列に対応する標識された縮重オリゴヌクレオチド・プローブを用いて、ゲノム・ライブラリーをスクリーニングすることができる。使用する任意のプローブは少なくとも10個のヌクレオチド、少なくとも15個のヌクレオチド、少なくとも20個のヌクレオチド、少なくとも25個のヌクレオチド、少なくとも30個のヌクレオチド、少なくとも40個のヌクレオチド、少なくとも50個のヌクレオチド、少なくとも60個のヌクレオチド、少なくとも70個のヌクレオチド、少なくとも80個のヌクレオチド、または少なくとも100個のヌクレオチドである。

【0161】

前の表IVおよびVにおいて、本明細書で開示したいくつかのMSP Iが、その配列が公に知られている遺伝子によってコードされている以前に同定されたタンパク質のアイソフォームに対応することが見出された(MSP Iの配列分析およびタンパク質の同定は、セクション6.1.14に記載した方法を使用して行った)。このような遺伝子をスクリーニングするために、遺伝子またはその相補体と相補的な、任意のプローブを使用することができ、プローブは10ヌクレオチド以上の長さであることが好ましく、15ヌクレオチド以上の長さであることがより好ましい。SWISS-PROTおよびtrEMBLデータベース(Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)およびEuropean Bioinformatics Institute (EBI)によって保持されており、<http://www.expasy.com/>において利用可能である)、およびGenBankデータベース(National Institute of Health (NIH)によって保持されており、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>において利用可能である)によって、表IVおよびVに列挙したMSP Iのタンパク質配列が以下の受託番号で与えられ、それぞれの配列は参照によって本明細書に取り込んである。

【0162】

【表47】

表 VIII MSPI、MSPI 関連タンパク質または ERPI を
コードするヌクレオチド配列

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-1	MSPI-1	P41222
MSF-2	MSPI-2	P10909
MSF-3	MSPI-3	P01034
MSF-4	MSPI-4	P10643
MSF-5	MSPI-5.1	P10643
MSF-6	MSPI-6	P41222
MSF-7	MSPI-7	P01019
MSF-8	MSPI-8.1	P10909
MSF-8	MSPI-8.2	P02649
MSF-9	MSPI-9	P01023
MSF-10	MSPI-10	P01023
MSF-11	MSPI-11	P01023
MSF-12	MSPI-12.1	P36955
MSF-12	MSPI-12.2	2745741
MSF-13	MSPI-13	P01023
MSF-14	MSPI-14	P01028
MSF-15	MSPI-15	P01023
MSF-16	MSPI-16	P01023
MSF-18	MSPI-18	P01023
MSF-20	MSPI-20	Q06830
MSF-21	MSPI-21	P25311
MSF-22	MSPI-22	P01023
MSF-24	MSPI-24	P01023
MSF-25	MSPI-25	Q15113
MSF-27	MSPI-27	P13671
MSF-28	MSPI-28	P01023
MSF-29	MSPI-29	P01023
MSF-30	MSPI-30	P01028
MSF-31	MSPI-31	P01023
MSF-32	MSPI-32	P13671
MSF-33	MSPI-33.1	2745741
MSF-33	MSPI-33.2	Q12805
MSF-34	MSPI-34	P32119
MSF-36	MSPI-36	2745741
MSF-37	MSPI-37	P00450
MSF-39	MSPI-39.1	P23142
MSF-39	MSPI-39.2	P14625
MSF-40	MSPI-40	P01034
MSF-42	MSPI-42.2	P02790
MSF-43	MSPI-43	P25311
MSF-44	MSPI-44	P08294
MSF-47	MSPI-47	P02790
MSF-48	MSPI-48.1	P23142
MSF-48	MSPI-48.2	P14625
MSF-48	MSPI-48.3	P14625

10

20

30

40

50

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-49	MSPI-49.1	P51693
MSF-49	MSPI-49.2	Q12805
MSF-51	MSPI-51.1	P01034
MSF-52	MSPI-52.1	P01024
MSF-52	MSPI-52.2	P01024
MSF-54	MSPI-54	P41222
MSF-55	MSPI-55	Q12860
MSF-56	MSPI-56	P00450
MSF-58	MSPI-58	P01023
MSF-60	MSPI-60	Q12860
MSF-62	MSPI-62.2	P08603
MSF-63	MSPI-63	2190958
MSF-64	MSPI-64.1	P08603
MSF-65	MSPI-65	P13671
MSF-66	MSPI-66	179674
MSF-67	MSPI-67.1	2745741
MSF-67	MSPI-67.2	P36955
MSF-69	MSPI-69	P13591
MSF-70	MSPI-70	P00736
MSF-72	MSPI-72	P00450
MSF-73	MSPI-73	861521
MSF-75	MSPI-75	P01034
MSF-76	MSPI-76	P01024
MSF-77	MSPI-77.2	P08603
MSF-78	MSPI-78.1	P10909
MSF-78	MSPI-78.2	P41222
MSF-79	MSPI-79	Q12860
MSF-80	MSPI-80.1	P01876
MSF-81	MSPI-81	P02766
MSF-82	MSPI-82	O15394
MSF-83	MSPI-83	Q9Y2T3
MSF-84	MSPI-84.1	P01028
MSF-84	MSPI-84.2	O15394
MSF-86	MSPI-86	Q92876
MSF-87	MSPI-87	Q99435
MSF-89	MSPI-89.1	P02790
MSF-90	MSPI-90	P06396
MSF-91	MSPI-91.1	P02647
MSF-92	MSPI-92	Q12860
MSF-93	MSPI-93.1	P02649
MSF-93	MSPI-93.2	P10909
MSF-94	MSPI-94	P08603
MSF-95	MSPI-95	P01024
MSF-96	MSPI-96	P06396
MSF-97	MSPI-97	P02679
MSF-98	MSPI-98	P06733
MSF-99	MSPI-99	Q99435
MSF-102	MSPI-102.1	P02649

10

20

30

40

50

【 0 1 6 4 】

【 表 4 9 】

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-102	MSPI-102.2	P10909
MSF-102	MSPI-102.3	P07195
MSF-104	MSPI-104	P00751
MSF-105	MSPI-105.1	P41222
MSF-105	MSPI-105.2	P06396
MSF-106	MSPI-106	P01024
MSF-107	MSPI-107	2745741
MSF-108	MSPI-108	P36955
MSF-110	MSPI-110	P06396
MSF-111	MSPI-111	P36955
MSF-112	MSPI-112	P02749
MSF-113	MSPI-113	P00751
MSF-114	MSPI-114	P00450
MSF-116	MSPI-116	2511666
MSF-117	MSPI-117	7662374
MSF-119	MSPI-119	2745741
MSF-120	MSPI-120	P06396
MSF-122	MSPI-122	P18065
MSF-123	MSPI-123.1	P06396
MSF-125	MSPI-125.1	P08294
MSF-125	MSPI-125.2	7416827
MSF-126	MSPI-126.1	179674
MSF-126	MSPI-126.2	P17900
MSF-127	MSPI-127.1	P01019
MSF-128	MSPI-128	P01024
MSF-130	MSPI-130	P23142
MSF-131	MSPI-131	P05154
MSF-132	MSPI-132	Q03591
MSF-133	MSPI-133	P02766
MSF-134	MSPI-134	P06396
MSF-135	MSPI-135	2190958
MSF-136	MSPI-136	Q15818
MSF-137	MSPI-137	P01019
MSF-139	MSPI-139	P08294
MSF-140	MSPI-140	P05452
MSF-141	MSPI-141.1	P02774
MSF-141	MSPI-141.2	2745741
MSF-142	MSPI-142	P01019
MSF-143	MSPI-143.1	X82321.1
MSF-144	MSPI-144	P02763
MSF-145	MSPI-145.2	P00450
MSF-147	MSPI-147.2	P01024
MSF-148	MSPI-148	Q14624
MSF-149	MSPI-149	P00751
MSF-150	MSPI-150	Q12860
MSF-151	MSPI-151	P01034
MSF-152	MSPI-152	P01876
MSF-154	MSPI-154.1	P00450

10

20

30

40

【 0 1 6 5 】

【 表 5 0 】

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-154	MSPI-154.2	2511666
MSF-154	MSPI-154.3	Q99435
MSF-155	MSPI-155.1	P02679
MSF-155	MSPI-155.2	P36955
MSF-155	MSPI-155.3	2745741
MSF-156	MSPI-156.2	P36955
MSF-158	MSPI-158.2	P02790
MSF-159	MSPI-159	P00751
MSF-160	MSPI-160	P36955
MSF-161	MSPI-161	P01019
MSF-163	MSPI-163	2511666
MSF-165	MSPI-165.1	P02679
MSF-165	MSPI-165.2	2745741
MSF-167	MSPI-167	P02790
MSF-168	MSPI-168	179674
MSF-169	MSPI-169.1	Q14624
MSF-169	MSPI-169.2	P00450
MSF-170	MSPI-170	P00450
MSF-171	MSPI-171	P02649
MSF-172	MSPI-172	P01024
MSF-173	MSPI-173.2	P02790
MSF-175	MSPI-175	P23142
MSF-176	MSPI-176.1	P36955
MSF-176	MSPI-176.2	2745741
MSF-177	MSPI-177	P01024
MSF-178	MSPI-178	P41222
MSF-179	MSPI-179.1	P01876
MSF-179	MSPI-179.2	P02790
MSF-180	MSPI-180	P19021
MSF-181	MSPI-181.1	P17900
MSF-181	MSPI-181.2	P41222
MSF-182	MSPI-182	P01019
MSF-183	MSPI-183	P41222
MSF-184	MSPI-184	P36955
MSF-185	MSPI-185	P01009
MSF-186	MSPI-186	2745741
MSF-187	MSPI-187.1	P10909
MSF-187	MSPI-187.2	P02766
MSF-188	MSPI-188.2	O15394
MSF-189	MSPI-189	P02790
MSF-191	MSPI-191	P06396
MSF-192	MSPI-192.1	P05452
MSF-192	MSPI-192.2	O60832
MSF-193	MSPI-193	P41222
MSF-194	MSPI-194.1	P00747
MSF-194	MSPI-194.2	1160616
MSF-195	MSPI-195.1	P02790
MSF-196	MSPI-196	P01019

10

20

30

40

50

【 0 1 6 6 】

【 表 5 1 】

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-197	MSPI-197	P36955
MSF-198	MSPI-198	P05452
MSF-199	MSPI-199.1	P36955
MSF-199	MSPI-199.2	2745741
MSF-200	MSPI-200	P00747
MSF-201	MSPI-201	P02766
MSF-202	MSPI-202.1	P00734
MSF-202	MSPI-202.2	P51693
MSF-203	MSPI-203	P25311
MSF-205	MSPI-205	P02766
MSF-206	MSPI-206	P05090
MSF-207	MSPI-207	7662374
MSF-208	MSPI-208	Q99435
MSF-209	MSPI-209	P41222
MSF-210	MSPI-210	P36955
MSF-211	MSPI-211	P16870
MSF-212	MSPI-212.2	P02790
MSF-213	MSPI-213	P02671
MSF-215	MSPI-215	P10909
MSF-216	MSPI-216	P01028
MSF-217	MSPI-217.3	P01034
MSF-218	MSPI-218	P23142
MSF-219	MSPI-219	P00747
MSF-220	MSPI-220	P36955
MSF-221	MSPI-221.1	P02790
MSF-222	MSPI-222.1	P02679
MSF-222	MSPI-222.2	P36955
MSF-223	MSPI-223.1	P36955
MSF-223	MSPI-223.2	Q15818
MSF-224	MSPI-224.1	P02748
MSF-225	MSPI-225	P13591
MSF-226	MSPI-226	P51693
MSF-228	MSPI-228.1	P02790
MSF-228	MSPI-228.2	P04217
MSF-229	MSPI-229.1	179674
MSF-229	MSPI-229.2	P01871
MSF-230	MSPI-230	P06396
MSF-231	MSPI-231	2745741
MSF-232	MSPI-232	P05090
MSF-233	MSPI-233.1	P10909
MSF-233	MSPI-233.2	P02649
MSF-234	MSPI-234	P41222
MSF-235	MSPI-235	P16035
MSF-236	MSPI-236.1	P04217
MSF-236	MSPI-236.2	P02790
MSF-237	MSPI-237	P01034
MSF-238	MSPI-238	P01034
MSF-239	MSPI-239.1	P41222

10

20

30

40

【 0 1 6 7 】

【 表 5 2 】

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-239	MSPI-239.2	P01034
MSF-240	MSPI-240.1	P01033
MSF-240	MSPI-240.2	X57822.1
MSF-241	MSPI-241.1	179674
MSF-241	MSPI-241.2	P01871
MSF-242	MSPI-242.1	3659942
MSF-242	MSPI-242.2	P41222
MSF-243	MSPI-243	P02766
MSF-244	MSPI-244	P41222
MSF-245	MSPI-245	P01871
MSF-246	MSPI-246.1	P02766
MSF-246	MSPI-246.2	P01034
MSF-248	MSPI-248	P01028
MSF-250	MSPI-250.2	P19652
MSF-251	MSPI-251	P01024
MSF-254	MSPI-254.1	8918224
MSF-257	MSPI-257.1	1181953
MSF-257	MSPI-257.2	P02649
MSF-257	MSPI-257.3	P02766
MSF-260	MSPI-260.1	179674
MSF-260	MSPI-260.2	P01871
MSF-261	MSPI-261	P25311
MSF-262	MSPI-262.2	Q13449
MSF-265	MSPI-265	P16035
MSF-266	MSPI-266	P02649
MSF-267	MSPI-267	P09211
MSF-268	MSPI-268.1	P01034
MSF-270	MSPI-270	P02766
MSF-271	MSPI-271	U52144.1
MSF-273	MSPI-273	P02649
MSF-274	MSPI-274	P01033
MSF-276	MSPI-276	P30086
MSF-277	MSPI-277	P01871
MSF-279	MSPI-279	P41222
MSF-280	MSPI-280.1	1181953
MSF-280	MSPI-280.2	P10909
MSF-283	MSPI-283.1	P25311
MSF-283	MSPI-283.2	P01024
MSF-284	MSPI-284.1	P41222
MSF-284	MSPI-284.2	7438712
MSF-285	MSPI-285	106647
MSF-289	MSPI-289	P01019
MSF-290	MSPI-290	P41222
MSF-291	MSPI-291.1	P05155
MSF-291	MSPI-291.2	P05067
MSF-292	MSPI-292	P02766
MSF-295	MSPI-295	P05090
MSF-298	MSPI-298.1	10835792

10

20

30

40

MSF#	MSPI#	受託番号
MSF-298	MSPI-298.2	P41222
MSF-299	MSPI-299	P01024
MSF-300	MSPI-300	P07711
MSF-301	MSPI-301	P02766
MSF-302	MSPI-302	P41222
MSF-303	MSPI-303.2	P02790
MSF-305	MSPI-305	P41222
MSF-306	MSPI-306	P02790
MSF-307	MSPI-307	P01028
MSF-308	MSPI-308	P02749
MSF-311	MSPI-311.1	P01008
MSF-311	MSPI-311.2	P01876
MSF-311	MSPI-311.3	P01019
MSF-313	MSPI-313	P41222
MSF-314	MSPI-314	Q92876
MSF-316	MSPI-316	P10909
MSF-318	MSPI-318	P02766
MSF-319	MSPI-319	P04040
MSF-320	MSPI-320	P41222
MSF-322	MSPI-322	P41222
MSF-323	MSPI-323.1	P10909
MSF-323	MSPI-323.2	P02766
MSF-324	MSPI-324	P41222
MSF-325	MSPI-325.1	P01028
MSF-325	MSPI-325.2	P02750

10

20

30

40

50

【0169】

任意のMSPIに関して、縮重プローブ、または受託番号によって前に記載した配列から採取したプローブを、スクリーニング用を使用することができる。縮重プローブの場合、これらは、MSPIのトリプシン消化ペプチドのタンデム質量スペクトルから得られた、部分的なアミノ配列情報から構築することができる。このような遺伝子をスクリーニングするために、遺伝子またはその相補体と相補的な、任意のプローブを使用することができる。プローブは10ヌクレオチド以上の長さであり、15ヌクレオチド以上の長さであることが好ましい。ライブラリーをスクリーニングするときは、MSPIまたはその断片をコードする挿入DNAを有するクローンは、縮重オリゴヌクレオチド・プローブ（またはその相補体）の対応する組の、1つまたは複数のメンバーにハイブリダイズすると思われる。このようなオリゴヌクレオチド・プローブのゲノム・ライブラリーへのハイブリダイゼーションは、当分野で知られている方法を使用して行われる。たとえば、前述のオリゴヌクレオチド・プローブ、またはその相補体の縮重組の1つとの（またはこのような組の任意のメンバー、またはその相補体との）ハイブリダイゼーションは、上で定義した非常に厳しい条件下または適度に厳しい条件下で行うことができ、あるいは50℃において2×SSC、1.0%SDS中で行い、非常に厳しいハイブリダイゼーションまたは適度に厳しいハイブリダイゼーションに関して上に記載した洗浄条件を使用して洗浄することができる。

【0170】

本発明の他の態様では、MSPI、MSPI断片、MSPI関連ポリペプチドまたはMSPI融合タンパク質、前述の任意のものをコードするヌクレオチド配列を含むクローンを、発現ライブラリーをスクリーニングすることによって得ることもできる。たとえば、関連のある源からのDNAを単離し、ランダムな断片を作製し、ベクターに挿入される配列が、ベクターが次いで導入される宿主細胞によって発現されるように、発現

ベクター（たとえばバクテリオファージ、プラスミド、ファージミドまたはコスミド）に連結させる。次に、さまざまなスクリーニング・アッセイを使用して、発現するMSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質を選択することができる。一実施形態では、当分野で知られている方法を使用し、本発明のさまざまな抗MSP I抗体を使用して、所望のクローンを同定することができる。たとえばHarlow and Lane、1988、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、Appendix IVを参照のこと。ライブラリーからのコロニーまたはプラークを抗体と接触させて、抗体に結合するクローンを同定する。

10

【0171】

一実施形態では、MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質をコードするDNAを含むコロニーまたはプラークを、参照によって本明細書に取り込んであるOlsvick他、29th ICAAC、Houston、Tex、1989に従いDYNA Beadsを使用して、検出することができる。抗MSP I抗体をトシル化DYNA Beads M280に架橋させ、次いでこれらの抗体を含むビーズを、組換えポリペプチドを発現するコロニーまたはプラークと接触させる。MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質を発現するコロニーまたはプラークは、ビーズに結合する任意のコロニーまたはプラークとして同定する。

20

【0172】

あるいは、抗MSP I抗体を、シリカまたはCelite 7樹脂などの適切な担体に、非特異的に固定させることができる。次いで、この物質を使用して、本明細書に記載するMSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質を発現する細菌コロニーに吸着させる。

【0173】

他の態様では、PCR増幅法を使用して、完全なMSP Iまたはその一部をコードする実質的に純粋なDNA（すなわち、夾雑核酸を実質的に含まないDNA）を、ゲノムDNAから単離することができる。このようなDNAは少なくとも95%純粋であることが好ましく、少なくとも99%純粋であることがより好ましい。本明細書で開示するMSP Iのペプチド配列に対応する、オリゴヌクレオチド配列、縮重あるいはそれ以外を、プライマーとして使用することができる。

30

【0174】

たとえばPerkin-Elmer Cetusサーマル・サイクラーおよびTaqポリメラーゼ（Gene Amp（商標）またはAmpliTaq（商標）DNAポリメラーゼ）を使用することによって、PCRを行うことができる。PCR反応において使用するためのいくつかの異なる縮重プライマーを合成するために、選択を行うことができる。PCR反応を引き起こす際に使用するハイブリダイゼーション条件の厳密度を変えて、縮重プライマーとDNA中の対応する配列の間の高度または低度のヌクレオチド配列の類似性を与えることもできる。MSP Iをコードする配列のセグメントを首尾よく増幅させた後、そのセグメントを分子的にクローン化および配列決定し、プローブとして利用して完全なゲノム・クローンを単離することができる。したがってこれによって、以下に記載するように、遺伝子の完全なヌクレオチド配列の決定、その発現の分析、および機能分析用のそのタンパク質産物の生成が可能であると思われる。

40

【0175】

MSP Iをコードする遺伝子を、核酸のハイブリダイゼーション、次にin vitroでの翻訳によってmRNAを選択することにより、同定することもできる。この手順では、ハイブリダイゼーションによって、断片を使用して相補的mRNAを単離する。このようなDNA断片は、他種（たとえばマウス、ヒト）のMSP Iをコードする入手可能な精製されたDNAであってよい。単離mRNAの単離した生成物のin vitro翻訳産

50

物の、免疫沈降分析または機能的アッセイ（たとえば *in vitro* での凝集能力、受容体への結合）によって、mRNA、したがって所望の配列を含む相補的DNA断片が同定される。さらに、細胞から単離したポリソームを、MSP Iを特異的に認識する固定された抗体に吸着させることによって、特異的なmRNAを選択することができる。選択したmRNA（吸着したポリソームからの）を鋳型として使用し、MSP Iをコードする放射性標識されたcDNAを合成することができる。次いで、放射性標識されたmRNAまたはcDNAをプローブとして使用して、MSP IをコードするDNA断片と他のゲノムDNA断片を識別することができる。

【0176】

MSP IをコードするゲノムDNAを単離する代替法には、知られている配列から遺伝子配列自体を化学的に合成すること、またはMSP IをコードするmRNAに対するcDNAを作製することがあるが、これらだけには限られない。たとえば、MSP Iをコードする遺伝子のcDNAクローン化用のRNAは、MSP Iを発現する細胞から単離することができる。当業者は本発明の記載から、他の方法を使用することができ、それらが本発明の範囲内にあることを理解するであろう。 10

【0177】

任意の適切な真核細胞が、MSP Iをコードする遺伝子の分子的クローン化用の、核酸源として働くことができる。MSP Iをコードする核酸配列は、脊椎動物、哺乳動物、霊長類、ヒト、ブタ、ウシ、ネコ、鳥類、ウマ、イヌまたはネズミの源から単離することができる。DNAは、クローン化されたDNA（たとえば「DNA」ライブラリー）から当分野で知られている標準的な手順によって、化学合成によって、cDNAのクローン化によって、あるいは所望の細胞から精製されたゲノムDNA、またはその断片のクローン化によって得ることができる（たとえばSambrook他、1989、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、2d Ed.、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York；Glover, D. M. (ed.)、1985、DNA Cloning: A Practical Approach、MRL Press, Ltd.、Oxford、U. K. Vol. I、IIを参照のこと）。ゲノムDNAに由来するクローンは、制御およびイントロンDNA領域、さらにコード領域を含む可能性があり、cDNAに由来するクローンは、エクソン配列のみを含むと思われる。 20 30

【0178】

次いで、同定および単離した遺伝子またはcDNAを、任意の適切なクローニング・ベクターに挿入することができる。当分野で知られている多数のベクター宿主系を、使用することができる。当業者が理解するように、唯一の制約は、選択するベクター系が使用する宿主細胞と適合性がなければならないことである。このようなベクターには、ラムダ誘導体などのバクテリオファージ、PBR322またはpUCプラスミド誘導体などのプラスミド、またはBluescript（商標）ベクター（Stratagene）またはアデノウイルス、アデノ関連ウイルスまたはレトロウイルスなどの改変ウイルスがあるが、これらだけには限られない。クローニング・ベクターへの挿入は、たとえばDNA断片を相補的な粘着末端を有するクローニング・ベクターに連結させることによって行うことができる。しかしながら、DNAを断片化するために使用する相補的な制限部位がクローニング・ベクター中に存在しない場合は、DNA分子の末端を酵素によって改変することができる。あるいは、ヌクレオチド配列（リンカー）をDNA末端に連結させることによって、任意の所望の部位を生成することができる。これらの連結したリンカーは、制限エンドヌクレアーゼ認識配列をコードする、特定の化学合成されたオリゴヌクレオチドを含むことができる。代替法では、開裂したベクターおよびMSP Iをコードする遺伝子を、ホモポリマーのテーリングによって改変することができる。組換え分子を、形質転換、トランスフェクション、感染、エレクトロポレーションなどによって宿主細胞に導入することができ、その結果、遺伝子配列の多くのコピーが生成される。 40

【0179】

特定の実施形態では、M S P I をコードする単離遺伝子を取り込んでいる組換え D N A 分子、c D N A、または合成 D N A 配列を用いた、宿主細胞の形質転換によって、遺伝子の多数のコピーを生成することができる。したがって、形質転換体を増殖させること、形質転換体から組換え D N A 分子を単離すること、および必要なときは、単離した組換え D N A から挿入した遺伝子を検索することによって、遺伝子を多量に得ることができる。

【0180】

本発明のヌクレオチド配列には、本来の M S P I と実質的に同じアミノ酸配列を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、機能的に均等であるアミノ酸を有するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチドまたは M S P I 融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列がある。

10

【0181】

特定の実施形態では、M S P I 関連ポリペプチドをコードする単離核酸分子は、1つまたは複数のヌクレオチドの置換体、付加体、または欠失体を、1つまたは複数のアミノ酸の置換体、付加体、または欠失体がコードされているタンパク質中に導入されるように、M S P I のヌクレオチド配列に導入することによって作製することができる。たとえば位置指定突然変異導入法および P C R 仲介の突然変異誘発を含めた、当業者に知られている標準的な技法を使用して、変異を導入することができる。1つまたは複数の予想される非必須アミノ酸残基で、保存アミノ酸の置換体が作製されることが好ましい。「保存アミノ酸の置換体」とは、アミノ酸残基が類似の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基で置換された置換体である。類似の電荷の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当分野で定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖を有するアミノ酸（たとえばリシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（たとえばアスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷極性側鎖を有するアミノ酸（たとえばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（たとえばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（たとえばトレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖を有するアミノ酸（たとえばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）がある。あるいは、飽和突然変異誘発などによって、突然変異体をコード配列の全体または一部にランダムに導入することができ、生成した突然変異体を生物学的活性に関してスクリーニングして、活性を保持している突然変異体を同定することができる。突然変異誘発に続いて、コードされたタンパク質を発現させることができ、タンパク質の活性を決定することができる。

20

30

【0182】

1. 9 M S P I をコードする D N A の発現

M S P I、M S P I 断片、または M S P I 関連ポリペプチド、または任意の前述のものの他の誘導体をコードするヌクレオチド配列を、適切な発現ベクター、すなわち挿入するタンパク質コード配列の転写および翻訳に必要な要素を含むベクターに、挿入することができる。必要な転写および翻訳シグナルを、M S P I またはそのフランキング領域をコードする元の遺伝子、または M S P I 関連ポリペプチドまたはそのフランキング領域をコードする元の遺伝子によって供給することもできる。本発明では、さまざまな宿主ベクター系を利用して、タンパク質コード配列を発現させることができる。これらの宿主ベクター系には、ウイルス（たとえばワクシニアウイルス、アデノウイルスなど）に感染した哺乳動物細胞系、ウイルス（たとえばバキュロ・ウイルス）に感染した昆虫細胞系、酵母菌ベクターを含む酵母菌などの微生物、またはバクテリオファージ、D N A、プラスミド D N A、またはコスミド D N A を用いて形質転換した細菌があるが、これらだけには限られない。ベクターの発現要素は、その強度および特異性が異なる。利用する宿主ベクター系に応じて、いくつかの適切な転写および翻訳要素のいずれか1つを利用することができる。特定の実施形態では、ヒト遺伝子をコードするヌクレオチド配列（またはヒト M S P I の機能的に活性がある部分をコードするヌクレオチド配列）を発現させる。他の実施形態では、M S P I のドメインを含む M S P I の断片を発現させる。

40

50

【0183】

DNA断片をベクターに挿入するための、前に記載した任意の方法を使用して、適切な転写および翻訳調節シグナルおよびタンパク質コード配列からなるキメラ遺伝子を含む、発現ベクターを構築することができる。これらの方法は、*in vitro*でのDNAの組換えおよび合成技法、および*in vivo*での組換え（遺伝的組換え）を含んでよい。MSPIまたはその断片をコードする核酸配列の発現は、MSPIまたは断片が組換えDNA分子を用いて形質転換した宿主中で発現するように、第2の核酸配列によって制御することができる。たとえばMSPIの発現は、当分野で知られている任意のプロモーターまたはエンハンサー要素によって調節することができる。MSPIまたはMSPI関連ポリペプチドをコードする遺伝子の発現を調節するために、使用することができるプロモーターには、SV40初期プロモーター領域（Bernois and Chambon、1981、Nature 290:304~310）、ラウス肉腫ウイルスの3'長末端の繰り返し中に含まれるプロモーター（Yamamoto他、1980、Cell 22:787~797）、ヘルペス・チミジンキナーゼ・プロモーター（Wagner他、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 78:1441~1445）、メタロチオネイン遺伝子の制御配列（Brinster他、1982、Nature 296:39~42）、テトラサイクリン（Tet）プロモーター（Gossen他、1995、Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547~5551）、b-ラクタマーゼ・プロモーターなどの原核生物の発現ベクター（Villal-Kamaroff他、1978、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 75:3727~3731）、またはtacプロモーター（DeBoer他、1983、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 80:21~25; Scientific American、1980、242:74~94の「Useful proteins from recombinant bacteria」も参照のこと）；ノパリン合成酵素プロモーター領域を含む植物の発現ベクター（Herrera-Estrella他、Nature 303:209~213）またはカリフラワー・モザイク・ウイルス35S RNAプロモーター（Gardner他、1981、Nucl. Acids Res. 9:2871）、および光合成酵素リブローズ二リン酸カルボキシラーゼのプロモーター（Herrera-Estrella他、1984、Nature 310:115~120）；Gal4プロモーター、ADC（アルコール脱水素酵素）プロモーター、PGK（グリセロールリン酸キナーゼ）プロモーター、アルカリホスファターゼ・プロモーターなどの酵母菌または他の真菌からのプロモーター要素、および組織特異性を示しトランスジェニック動物に利用されている、以下の動物の転写調節領域：脾臓の胞状細胞中で活性があるエラスターゼIの遺伝子調節領域（Swift他、1984、Cell 138:639~646；Ornitz他、1986、Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399~409；MacDonald他、1987、Hepatology 7:425~515）；脾臓のβ細胞中で活性があるインシュリンの遺伝子調節領域（Hanahan、1985、Nature 315:115~122）、リンパ球細胞中で活性がある免疫グロブリンの遺伝子調節領域（Grosschedl他、1984、Cell 138:647~658；Adames他、1985、Nature 318:533~538；Alexander他、1987、Mol. Cell. Biol. 7:1436~1444）、精巣、胸部、リンパ球および肥満細胞中で活性があるマウス乳癌ウイルスの調節領域（Leder他、1986、Cell 45:485~495）、肝臓中で活性があるアルブミンの遺伝子調節領域（Pinkerth他、1987、Genes and Devel. 1:268~276）、肝臓中で活性があるα-フェトプロテインの遺伝子調節領域（Krumlauf他、1985、Mol. Cell. Biol. 5:1639~1648；Hammer他、1987、Science 235:53~58；肝臓中で活性があるα1-抗トリプシンの遺伝子調節領域（Kelsey他、1987、Genes and Devel. 1:161~171）、骨髄細胞中で活性があるβ-グロブリンの遺伝子調節領域（Mogram他、1985

、Nature 315:338~340; Kollias 他、1986、Cell 46:89~94; 脳の希突起膠細胞中で活性があるミエリン塩基性タンパク質の遺伝子調節領域 (Readhead 他、1987、Cell 48:703~712); 骨格筋中で活性があるミオシン軽鎖-2の遺伝子調節領域 (Sani、1985、Nature 314:283~286); ニューロン細胞中で活性があるニューロン特異的エノラーゼ (NSE) (Morelli 他、1999、Gen. Virol. 80:571~83); ニューロン細胞中で活性がある脳由来神経栄養因子 (BDNF) の遺伝子調節領域 (Tabuchi 他、1998、Biochem. Biophys. Res. Com. 253:818~823)、星状細胞中で活性があるグリア線維酸性タンパク質 (GFAP) プロモーター (Gomes 他、1999、Braz J Med Biol Res 32(5):619~631; Morelli 他、1999、Gen. Virol. 80:571~83) および視床下部中で活性がある性腺刺激ホルモン放出ホルモンの遺伝子調節領域 (Mason 他、1986、Science 234:1372~1378) があるが、これらだけには限られない。

【0184】

特定の実施形態では、MSP I をコードする核酸に動作可能に連結するプロモーター、1つまたは複数の複製起点、場合によっては1つまたは複数の選択マーカー (たとえば抗生物質耐性遺伝子) を含む、ベクターを使用する。

【0185】

特定の実施形態では、MSP I、MSP I 断片、または MSP I 関連ポリペプチド・コード配列を、3つの pGEX ベクター (グルタチオン S-トランスフェラーゼ発現ベクター; Smith and Johnson、1988、Gene 7:31~40) のそれぞれの EcoRI 制限部位にサブクローン化することによって、発現構築体を作製する。これによって、MSP I 産物または MSP I 関連ポリペプチドが、サブクローンから正しい読み枠で発現することができる。

【0186】

哺乳動物の宿主細胞では、いくつかのウイルス系の発現系を使用することができる。アデノウイルスを発現ベクターとして使用する場合、MSP I コード配列または MSP I 関連ポリペプチド・コード配列を、アデノウイルスの転写/翻訳調節複合体、たとえば後期プロモーターおよびトリプレット・リーダー配列に連結させることができる。次いでこのキメラ遺伝子を、in vitro および in vivo での組換えによって、アデノウイルス・ゲノムに挿入することができる。ウイルス・ゲノムの非必須領域 (たとえば領域 E1 または E3) 中への挿入によって、生命力があり感染した宿主中で抗体分子を発現することができる組換えウイルスが生成すると思われる (たとえば Logan and Shenk、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355~359 を参照のこと)。挿入された抗体のコード配列を効率よく翻訳するために、特異的な開始シグナルが必要とされる可能性もある。これらのシグナルは、ATG 開始コドンおよび隣接する配列を含む。さらに開始コドンは、挿入体全体の翻訳を確実にするために、所望のコード配列の読み枠と同調しなければならない。これらの外因性の翻訳調節シグナルおよび開始コドンは、さまざまな起源のもの、天然および合成のものであってよい。発現の効率は、適切な転写のエンハンサー要素、転写終結信号などを封入することによって高めることができる (Bittner 他、1987、Methods in Enzymol. 153:51~544 を参照のこと)。

【0187】

MSP I、MSP I 断片、または MSP I 関連ポリペプチドをコードする遺伝子の挿入体を含む発現ベクターは、3つの一般的な手法: (a) 核酸ハイブリダイゼーション、(b) 「マーカー」遺伝子機能の有無、(c) 挿入配列の発現によって同定することができる。第1の手法では、発現ベクター中に挿入された MSP I をコードする遺伝子の存在は、MSP I をコードする挿入遺伝子と相同である配列を含むプローブを使用して、核酸ハイブリダイゼーションによって検出することができる。第2の手法では、組換えベクター/

宿主系を、M S P I をコードする遺伝子をベクターに挿入することによって引き起こされる、ある「マーカー」遺伝子機能（たとえばチミジンキナーゼ活性、抗生物質に対する耐性、表現型の転換、バキュロ・ウイルス中での閉塞体の形成など）の有無に基づいて、同定および選択することができる。たとえば、M S P I をコードする遺伝子をベクターのマーカー遺伝子配列内に挿入する場合、M S P I 挿入体をコードする遺伝子を含む組換え体を、マーカー遺伝子機能の不在によって同定することができる。第3の手法では、組換え発現ベクターを、組換え体によって発現された遺伝子産物（すなわちM S P I）をアッセイすることによって同定することができる。このようなアッセイは、たとえば *in vitro* アッセイ系でのM S P I の物理的または機能的性質、たとえば抗M S P I 抗体との結合に基づくものであってよい。

10

【0188】

さらに、所望の特異的な方式で挿入配列の発現を調節する、あるいは遺伝子産物を改変およびプロセッシングする、宿主細胞株を選択することができる。あるプロモーターからの発現は、ある誘導物質の存在下で高めることができる。したがって、遺伝子工学的に処理したM S P I またはM S P I 関連ポリペプチドの発現を調節することができる。さらに、異なる宿主細胞は、翻訳並びに翻訳後のプロセッシングおよび改変（たとえばタンパク質のグリコシル化、リン酸化）に関する、特徴的で特異的な機構を有している。適切な細胞株または宿主系を選択して、発現される外来性タンパク質の所望の改変およびプロセッシングを確実にすることができる。たとえば、細菌系での発現によって非グリコシル化産物が生成され、酵母菌中での発現によってグリコシル化産物が生成されるであろう。一次転写物の正確なプロセッシング、遺伝子産物のグリコシル化、リン酸化のための細胞機構を有する真核宿主細胞を使用することができる。このような哺乳動物宿主細胞には、CHO、VER Y、BHK、HeLa、COS、MDCK、HEK293、3T3、WI38、および特にニューロン細胞株、たとえばSK-N-AS、SK-N-FI、SK-N-DZヒト神経芽細胞種（Sugimoto他、1984、J. Natl. Cancer Inst. 73:51~57）、SK-N-SHヒト神経芽細胞種（Biochim. Biophys. Acta、1982、704:450~460）など、Daoyヒト小脳髄芽細胞種（He他、1992、Cancer Res. 52:1144~1148）、DBTRG-05MG膠芽細胞種（Kruse他、1992、In Vitro Cell Dev. Biol. 28A:609~614）、IMR-32ヒト神経芽細胞種（Cancer Res.、1970、30:2110~2118）、1321N1ヒト星状細胞種（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1977、74:4816）、MOG-G-CCMヒト星状細胞種（Br. J. Cancer、1984、49:269）、U87MGヒト膠芽細胞種—星状細胞種（Acta Pathol Microbiol. Scand.、1968、74:465~486）、A172ヒト膠芽細胞種（Olopade他、1992、Cancer Res. 52:2523~2529）、C6ラット神経膠腫細胞（Benda他、1968、Science 161:370~371）、Neuro-2aマウス神経芽細胞種（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1970、65:129~136）、NB41A3マウス神経芽細胞種（Proc. Natl. Acad. Sci. USA、1962、48:1184~1190）、SCPヒツジ脈絡叢（Bolin他、1994、J. Virol. Methods 48:211~221）、G355-5、PG-4ネコの正常な星状細胞（Haapala他、1985、J. Virol. 53:827~833）、Mpfフェレット脳（Trowbridge他、1982、In Vitro 18:952~960）、および正常な細胞株、たとえばCTX TNA2ラットの正常な大脳（Radany他、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:6467~6471）など、たとえばCRL7030およびHs578Bstなどがあるが、これらだけには限られない。さらに、異なるベクター／宿主発現系が、異なる程度でプロセッシング反応を行う可能性がある。

20

30

40

【0189】

50

組換えタンパク質を長期にわたって高収率で生成するためには、安定した発現が好ましい。たとえば、MSP Iを安定的に発現する細胞系を操作 (engineered) することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するのではなく、適切な発現調節要素 (たとえばプロモーター、エンハンサー、配列、転写終結信号、ポリアデニル化部位など) によって調節されるDNA、および選択マーカーを用いて、宿主細胞を形質転換することができる。外来性DNAの導入の次に、操作した細胞は富化培地で1~2日増殖させることができ、次いで選択培地に移す。組換えプラスミド中の選択マーカーによって選択に対する耐性が与えられ、細胞はプラスミドをそれらの染色体に安定的に組み込むことができ、増殖して小増殖巣を形成し、次いでクローン化させ、細胞株へと広げることができる。この方法を有利に使用して、MSP Iを発現する細胞株を操作することができる。このような操作した細胞株は、MSP Iの外来性の活性に影響を与える作用剤をスクリーニングおよび評価する際に、非常に有用である。

10

【0190】

単純疱疹ウイルス・チミジンキナーゼ (Wigler他、1977、Cell 111: 223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Szybalska and Szybalski、1962、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、48: 2026) だけには限られないがこれらを含めた、いくつかの選択系を使用することができる。アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Lowy他、1980、Cell 22: 817) 遺伝子は、tk-、hgprt-またはaprt-細胞中でそれぞれ使用することができる。代謝拮抗物質耐性を、メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr (Wigler他、1980、Natl. Acad. Sci. USA、77: 3567; O'Hare他、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78: 1527)、マイコフェノール酸に対する耐性を与えるgpt (Mulligan and Berg、1981、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、78: 2072)、アミノグリコシドG-418に対する耐性を与えるneo (Collier-Garapin他、1981、J. Mol. Biol. 150: 1)、およびヒグロマイシンに対する耐性を与えるhygro (Santerre他、1984、Gene 30: 147) 遺伝子に関する選択の基準として使用することができる。

20

【0191】

他の特異的な実施形態では、MSP I、断片、類似体、または誘導体を、融合またはキメラ・タンパク質産物 (ペプチド結合を介して異種タンパク質配列に結合した、タンパク質、断片、類似体または誘導体を含む) として、発現させることができる。たとえば、本発明のポリペプチドは、免疫グロブリン (IgA、IgE、IgG、IgM) の定常ドメイン、またはその一部分 (CH1、CH2、CH3、またはこれらおよびその一部分の任意の組合せ) と融合させることができ、これによってキメラ・ポリペプチドが生成する。このような融合タンパク質によって、精製が助長され、in vivoでの半減期が増大し、上皮性関門から免疫系への抗原の送達が増大する可能性がある。in vivoでの半減期が増大し、精製が助長されることが、ヒトCD4-ポリペプチドの第1の2つのドメイン、および哺乳動物免疫グロブリンの重鎖または軽鎖の定常領域のさまざまなドメインからなるキメラ・タンパク質に関して、示されている。たとえば、EP 394, 827; Trauncker他、Nature、331: 84~86 (1988) を参照のこと。上皮性関門から免疫系への抗原の送達の向上は、IgGまたはFc断片などのFcRn結合パートナーに結合した、抗原 (たとえばインシュリン) に関して実証されている (たとえば、WO 96/22024 および WO 99/04813 を参照のこと)。

30

40

【0192】

MSP I、MSP Iの断片、またはMSP I関連ポリペプチド、またはMSP I関連ポリペプチドの断片をコードする核酸を、エピトープ・タグ (たとえば赤血球凝集素 (「HA」) タグまたはフラッグ・タグ) に融合させて、発現したポリペプチドの検出および精製を手助けすることができる。たとえば、Janknecht他によって記載されたシステムによって、ヒト細胞株中で発現された非変性融合タンパク質を容易に精製することがで

50

きる (Janknecht 他、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、88:8972~897)。

【0193】

融合タンパク質は、当分野で知られている方法によって正確なコード枠で、所望のアミノ酸配列をコードする適切な核酸配列を互いに連結させ、当分野で一般的に知られている方法によってキメラ産物を発現させることによって、作製することができる。あるいは、融合タンパク質は、タンパク質合成技法によって、たとえばペプチド合成装置を使用することによって作製することができる。

【0194】

cDNAおよびゲノム配列の両方を、クローン化および発現させることができる。

10

【0195】

1.10 MSP I のドメイン構造

いくつかのMSP I のドメインが当分野で知られており、科学文献中に記載されている。さらに、当業者に知られている技法を使用して、MSP I のドメインを同定することができる。たとえば、1つまたは複数のMSP I のドメインを、1つまたは複数の以下のプログラム: ProDom、TMpred、およびSAPSを使用して同定することができる。ProDomは、ポリペプチドのアミノ酸配列を、1つにまとめたドメインのデータベースと比較する (たとえば <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>; Corpet F. Gouzy J. and Kahn D., 1999、Nucleic Acids Res., 27:263~267を参照のこと)。TMpredは、ポリペプチドの膜貫通領域およびその方向を予想する。このプログラムは、TMbase、天然に存在する膜貫通タンパク質のデータベースの統計的分析に基づくアルゴリズムを使用する (たとえば http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; Hofmann and Stoffel. (1993)「TMbase-A database of membrane spanning proteins segments」Biol. Chem. Hoppe-Seyler 347、166を参照のこと)。SAPSプログラムは、電荷一群、繰り返し、疎水性領域、組成ドメインのような、統計学的に有意な特徴に関してポリペプチドを分析する (たとえば Brendel 他、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、89:2002~2006を参照のこと)。したがって、本発明の記載に基づいて、当業者は、酵素または結合活性を有するMSP I のドメインを同定することができ、このようなドメインをコードするヌクレオチド配列をさらに同定することができる。次いで、これらのヌクレオチド配列を、MSP I の酵素または結合活性を保持しているMSP I 断片の、組換え発現のために使用することができる。

20

30

【0196】

本発明の記載に基づいて、当業者は、酵素または結合活性を有するMSP I のドメインを同定することができ、このようなドメインをコードするヌクレオチド配列をさらに同定することができる。次いでこれらのヌクレオチド配列は、MSP I の酵素または結合活性を保持しているMSP I 断片の、組換え発現のために使用することができる。

【0197】

一実施形態では、MSP I は、知られているポリペプチドの同定されたドメインと十分に類似した、アミノ酸配列を有する。本明細書で使用するように、「十分に類似した」という語は、第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列と同一または等価な (たとえば類似の側鎖を有する)、多数のアミノ酸残基またはヌクレオチドを含む第1のアミノ酸またはヌクレオチド配列のことであり、したがって第1および第2のアミノ酸またはヌクレオチド配列は、共通の構造ドメインまたは共通の機能活性あるいはこの両方を、有しているかあるいはコードしている。

40

【0198】

MSP I ドメインを、当業者によく知られている技法を使用して、その機能に関して評価することができる。たとえば、当業者に知られている技法を使用して、そのキナーゼ活性

50

に関して、あるいはDNAに結合するその能力に関して、ドメインを評価することができる。たとえば、基質をリン酸化するポリペプチドの能力を測定することによって、キナーゼ活性を評価することができる。DNA結合活性は、たとえば電気泳動移動度シフト・アッセイにおいて、DNA結合要素に結合するポリペプチドの能力を測定することによって、評価することができる。好ましい実施形態では、MSPIのドメインの機能を、以下の表IXに示した1つまたは複数の参考文献中に記載されたアッセイを使用して決定する。

【0199】

1. 11 MSPIに対する抗体の生成

本発明に従って、MSPI、MSPI断片、またはMSPI関連ポリペプチド、またはMSPI融合タンパク質、または任意の前述のものの誘導体を免疫原として使用して、このような免疫原に免疫特異的に結合する抗体を生成させることができる。このような免疫原は、前に記載した方法を含めた、任意の好都合な手段によって単離することができる。本発明の抗体には、ポリクローナル、モノクローナル、二重特異性、ヒト化またはキメラ抗体、単鎖抗体、Fab断片およびF(ab')断片、Fab発現ライブラリーによって生成される断片、抗イディオタイプ（抗-I d）抗体、および任意の前述のもののエピトープ結合断片などがあるが、これらだけには限られない。本明細書で使用する「抗体」という語は、免疫グロブリン分子、および免疫グロブリン分子の免疫学的に活性がある部分、すなわち抗原に特異的に結合する抗原結合部位を含む分子のことである。本発明の免疫グロブリン分子は、任意のクラスのもの（たとえばIgG、IgE、IgM、IgDおよびIgA）、または免疫グロブリン分子のサブクラスであってよい。

【0200】

一実施形態では、MSPIをコードする遺伝子の遺伝子産物を認識する抗体が、公に入手可能である。たとえば、これらのMSPI、MSPI断片、またはMSPI関連ポリペプチド、またはMSPI融合タンパク質を認識する抗体には MSPI-1, MSPI-2, MSPI-3, MSPI-4, MSPI-5.1, MSPI-6, MSPI-7, MSPI-8.1, MSPI-8.2, MSPI-9, MSPI-10, MSPI-11, MSPI-12.1, MSPI-12.2, MSPI-13, MSPI-14, MSPI-15, MSPI-16, MSPI-18, MSPI-22, MSPI-24, MSPI-27, MSPI-28, MSPI-29, MSPI-30, MSPI-31, MSPI-32, MSPI-33.1, MSPI-36, MSPI-37, MSPI-39.1, MSPI-40, MSPI-42.2, MSPI-47, MSPI-48.1, MSPI-51.1, MSPI-52.1, MSPI-52.2, MSPI-54, MSPI-55, MSPI-56, MSPI-58, MSPI-60, MSPI-65, MSPI-67.1, MSPI-67.2, MSPI-70, MSPI-72, MSPI-75, MSPI-76, MSPI-78.1, MSPI-78.2, MSPI-79, MSPI-80.1, MSPI-81, MSPI-84.1, MSPI-89.1, MSPI-90, MSPI-91.1, MSPI-92, MSPI-93.1, MSPI-93.2, MSPI-95, MSPI-96, MSPI-98, MSPI-102.1, MSPI-102.2, MSPI-102.3, MSPI-104, MSPI-105.1, MSPI-105.2, MSPI-106, MSPI-107, MSPI-108, MSPI-110, MSPI-111, MSPI-113, MSPI-114, MSPI-119, MSPI-120, MSPI-122, MSPI-123.1, MSPI-127.1, MSPI-128, MSPI-130, MSPI-132, MSPI-133, MSPI-134, MSPI-137, MSPI-140, MSPI-141.2, MSPI-142, MSPI-145.2, MSPI-147.2, MSPI-149, MSPI-150, MSPI-151, MSPI-152, MSPI-154.1, MSPI-155.2, MSPI-155.3, MSPI-156.2, MSPI-158.2, MSPI-159, MSPI-160, MSPI-161, MSPI-165.2, MSPI-167, MSPI-169.2, MSPI-170, MSPI-171, MSPI-172, MSPI-173.2, MSPI-175, MSPI-176.1, MSPI-176.2, MSPI-177, MSPI-178, MSPI-179.1, MSPI-179.2, MSPI-181.2, MSPI-182, MSPI-183, MSPI-184, MSPI-186, MSPI-187.1, MSPI-187.2, MSPI-189, MSPI-191, MSPI-192.1, MSPI-193, MSPI-194.1, MSPI-195.1, MSPI-196, MSPI-197, MSPI-198, MSPI-199.1, MSPI-199.2, MSPI-200, MSPI-201, MSPI-202.1, MSPI-205, MSPI-206, MSPI-209, MSPI-210, MSPI-212.2, MSPI-213, MSPI-215, MSPI-216, MSPI-217.3, MSPI-218, MSPI-219, MSPI-220, MSPI-221.1, MSPI-222.2, MSPI-223.1, MSPI-224.1, MSPI-228.1, MSPI-228.2, MSPI-229.2, MSPI-230, MSPI-231, MSPI-232, MSPI-233.1, MSPI-233.2, MSPI-234, MSPI-235, MSPI-236.1, MSPI-236.2, MSPI-237, MSPI-238, MSPI-239.1, MSPI-239.2, MSPI-240.1, MSPI-240.2, MSPI-241.2, MSPI-242.2, MSPI-243, MSPI-244, MSPI-245, MSPI-246.1, MSPI-246.2, MSPI-248, MSPI-251, MSPI-257.2, MSPI-257.3, MSPI-260.2, MSPI-265, MSPI-266, MSPI-268.1, MSPI-270, MSPI-273, MSPI-274, MSPI-277, MSPI-279, MSPI-280.2, MSPI-283.2, MSPI-284.1, MSPI-289, MSPI-290, MSPI-291.2, MSPI-292

、MSPI-295、MSPI-298.2、MSPI-299、MSPI-301、MSPI-302、MSPI-303.2、MSPI-305、MSPI-306、MSPI-307、MSPI-311.1、MSPI-311.2、MSPI-311.3、MSPI-313、MSPI-316、MSPI-318、MSPI-319、MSPI-320、MSPI-322、MSPI-323.1、MSPI-323.2、MSPI-324、MSPI-325.1 を認識する抗体があり、これらの抗体は、前述の表VIIに示したコマーシャルソースから購入することができる。他の実施形態では、当業者に知られている方法を使用して、MSPI、MSPI断片、またはMSPI関連ポリペプチド、またはMSPI融合タンパク質、または任意の前述のものの誘導体を認識する抗体を生成する。

【0201】

本発明の一実施形態では、MSPIの特異的ドメインに対する抗体を生成する。特定の実施形態では、MSPIの親水性断片を、抗体生成用の免疫原として使用する。

10

【0202】

抗体の生成では、当分野で知られている技法、たとえばELISA（酵素結合免疫吸着アッセイ）によって、所望の抗体のスクリーニングを行うことができる。たとえば、MSPIの特異的ドメインを認識する抗体を選択するために、このようなドメインを含むMSPI断片に結合する生成物の、生成したハイブリドーマをアッセイすることができる。第1のMSPI相同体に特異的に結合するが、第2のMSPI相同体には特異的に結合しない（または、それほど強烈には結合しない）抗体を選択するために、第1のMSPI相同体へのポジティブな結合、および第2のMSPI相同体への結合がない（またはわずかに結合する）ことに基づいて選択を行うことができる。同様に、MSPIに特異的に結合するが、同じタンパク質の異なるアイソフォーム（MSPIと同じコア・ペプチドを有する異なるグリコフォームなど）には特異的に結合しない（または、それほど強烈には結合しない）抗体を選択するために、MSPIへのポジティブな結合、および異なるアイソフォーム（たとえば異なるグリコフォーム）への結合がない（またはわずかに結合する）ことに基づいて選択を行うことができる。したがって本発明は、MSPIの異なる1つまたは複数のアイソフォーム（たとえばグリコフォーム）よりも大きな親和性（好ましくは少なくとも2倍大きな親和性、より好ましくは少なくとも5倍大きな親和性、さらに好ましくは少なくとも10倍大きな親和性）でMSPIに結合する、抗体（好ましくはモノクローナル抗体）を提供する。

20

【0203】

本発明の方法で 사용할 ことができるポリクローナル抗体は、免疫処置した動物の血清に由来する異種の群の抗体分子である。非分画免疫血清を使用することもできる。当分野で知られているさまざまな手順を、MSPI、MSPI断片、MSPI関連ポリペプチドまたはMSPI融合タンパク質に対するポリクローナル抗体を生成させるために使用することができる。特定の実施形態では、MSPI、MSPI断片、MSPI関連ポリペプチドまたはMSPI融合タンパク質のエピトープに対する、ウサギ・ポリクローナル抗体を得ることができる。たとえば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成するために、ウサギ、マウス、ラットなどだけには限られないがこれらを含めた、さまざまな宿主動物を、MSPI、MSPI断片、MSPI関連ポリペプチドまたはMSPI融合タンパク質の原型または合成型（たとえば組換え体）を注射することによって、免疫処置することができる。本明細書に記載する好ましい技術によって、このような免疫処置に適した単離MSPIが与えられる。MSPIをゲル電気泳動によって精製する場合、自前のポリアクリルアミド・ゲルから抽出処理の有無に関らず免疫処置にMSPIを使用することができる。完全または不完全なフロイントのアジュバント、水酸化アルミニウムなどの無機化合物のゲル、リゾレシチン、プルロニック・ポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳剤、キーホールリンベットヘモシアニン、ジニトロフェノールなどの界面活性物質、およびBCG（カルメットゲラン桿菌）またはコリネバクテリウム・パルブムなどのアジュバントだけには限られないがこれらを含めた、さまざまなアジュバントを使用して、宿主種に依って免疫応答を高めることができる。他のアジュバントも当分野ではよく知られている。

30

40

【0204】

50

MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチドまたはMSP I融合タンパク質を対象とするモノクローナル抗体 (mAb) を調製するために、培養中の一連の細胞系による抗体分子の生産をもたらす、任意の技法を使用することができる。たとえば、KohlerおよびMilstein (1975、Nature 256: 495~497) によって本来開発されたハイブリドーマ技法、およびtrioma技法、ヒトB細胞ハイブリドーマ技法 (Kozbor他、1983、Immunology Today 4: 72)、およびヒト・モノクローナル抗体を生産するためのEBV-ハイブリドーマ技法 (Cole他、1985、in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., pp. 77~96)。このような抗体は、IgG、IgM、IgE、IgA、IgDを含めた任意の免疫グロブリン・クラス、および任意のこれらのサブクラスであってよい。本発明のmAbを生産するハイブリドーマは、in vitroまたはin vivoで培養することができる。本発明の追加的な実施形態では、知られている技術 (PCT/US90/02545) を利用して無菌の動物中で、mAbを生産することができる。

【0205】

mAbには、ヒトmAbおよびキメラmAb (たとえばヒト・マウス・キメラ) があるが、これらだけには限られない。キメラ抗体は、その中の異なる部分が異なる動物種に由来する分子、ヒト免疫グロブリンの定常領域およびネズミmAbに由来する可変領域を有する分子 (たとえば米国特許第4,816,567号および米国特許第4,816,397号を参照のこと) などである。ヒト化抗体は、ヒト以外の種からの1つまたは複数の相補性決定領域 (CDR) およびヒト免疫グロブリン分子からの骨格領域を有する、ヒト以外の種からの抗体分子である (たとえば、参照によってその全容を本明細書に取り込んである、米国特許第5,585,089号を参照のこと)。

【0206】

キメラおよびヒト化mAbは、当分野で知られている組換えDNA技法、たとえばWO/87/02671; EP184,187A; EP171,496A; EP173,494A; WO/86/01533; 米国特許第4,816,567号; EP125,023A; Better他、1988、Science 240: 1041~1043; Liu他、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84: 3439~3443; Liu他、1987、J. Immunol. 139: 3521~3526; Sun他、1987、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、84: 214~218; Nishimura他、1987、Canc. Res. 47: 999~1005; Wood他、1985、Nature 314: 446~449; およびShaw他、1988、J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553~1559; Morrison、1985、Science 229: 1202~1207; Oi他、1986、Bio/Techniques 4: 214; 米国特許第5,225,539号; Jones他、1986、Nature 321: 552~525; Verhoeyan他、(1988) Science 239: 1534; およびBeidler他、1988、J. Immunol. 141: 4053~4060中に記載された方法を使用して、生産することができる。

【0207】

完全なヒト抗体は、ヒトの被験体の療法治療に非常に望ましい。このような抗体は、外来性の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の遺伝子を発現することはできないが、ヒト重鎖および軽鎖の遺伝子を発現することができるトランスジェニック・マウスを使用して、生産することができる。トランスジェニック・マウスは、選択した抗原、たとえば本発明のMSP Iの全体または一部分を用いて、通常の方法で免疫処置する。抗原を対象とするモノクローナル抗体は、従来のハイブリドーマ技術を使用して、得ることができる。トランスジェニック・マウスに保持されているヒト免疫グロブリンの導入遺伝子は、B細胞の分化中に転位し、その後クラスの変更および体細胞突然変異を受ける。したがって、このような技法を使用して、治療上有用なIgG、IgA、IgMおよびIgE抗体を生産すること

が可能である。ヒト抗体を生産することに関するこの技術の概要に関しては、Lonberg および Huzar (1995、Int. Rev. Immunol. 13: 65~93) を参照のこと。ヒト抗体およびヒト・モノクローナル抗体の生産に関するこの技術の詳細な論述、およびこのような抗体の生産に関するプロトコルに関しては、たとえば米国特許第 5,625,126 号、米国特許第 5,633,425 号、米国特許第 5,569,825 号、米国特許第 5,661,016 号、および米国特許第 5,545,806 号を参照のこと。さらに、Abgenix, Inc. (Freemont, CA) および Genpharm (San Jose, CA) などの企業が提携して、前に記載した技術と類似の技術を使用して、選択した抗原を対象とするヒト抗体を提供することができる。

【0208】

10

選択したエピトープを認識する完全なヒト抗体は、「誘導選択」と呼ばれる技法を使用して、生産することができる。この手法では、選択した非ヒト・モノクローナル抗体、たとえばマウス抗体を使用して、同じエピトープを認識する完全なヒト抗体の選択を誘導する (Jespers 他、(1994) Bio/technology 12: 899~903)。

【0209】

本発明の抗体は、当分野で知られているさまざまなファージ・ディスプレイ法を使用して、生成させることもできる。ファージ・ディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインを、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面に示す。特に、このようなファージを利用して、レパートリーまたは組合せ抗体ライブラリー (たとえばヒトまたはネズミ) から発現される抗原結合ドメインを示すことができる。当該の抗原に結合する抗原結合ドメインを発現するファージは、抗原を用いて、たとえば標識した抗原、または固体表面またはビーズに結合または捕獲させた抗原を使用して、選択または同定することができる。典型的には、これらの方法において使用されるファージは、ファージから発現される fd および M13 結合ドメイン、およびファージ遺伝子 III または遺伝子 VII I タンパク質のいずれかに組換えによって融合した、Fab、Fv またはジスルフィド安定化 Fv 抗体ドメインを含む、線状ファージである。本発明の抗体を作製するために使用することができるファージ・ディスプレイ法には、いずれも参照によってその全容を本明細書に取り込んである、Brinkman 他、J. Immunol. Methods 182: 41~50 (1995)、Ames 他、J. Immunol. Methods 184: 177~186 (1995)、Kettleborough 他、Eur. J. Immunol. 24: 952~958 (1994)、Persic 他、Gene 187: 9~18 (1997)、Burton 他、Advances in Immunology 57: 191~280 (1994)、PCT/GB91/01134、WO90/02809、WO91/10737、WO92/01047、WO92/18619、WO93/11236、WO95/15982、WO95/20401、および米国特許第 5,698,426 号、第 5,223,409 号、第 5,403,484 号、第 5,580,717 号、第 5,427,908 号、第 5,750,753 号、第 5,821,047 号、第 5,571,698 号、第 5,427,908 号、第 5,516,637 号、第 5,780,225 号、第 5,658,727 号、第 5,733,743 号および第 5,969,108 号中に開示された方法がある。

20

30

40

【0210】

前述の参照文献中に記載されたように、ファージを選択した後、たとえば以下に詳細に記載するように、ファージからの領域をコードする抗体、ヒト抗体を含めた完全な抗体、または任意の他の所望の抗原結合断片を生成するために単離し使用することができ、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母菌、および細菌を含めた任意の所望の宿主中で、これらが発現させることができる。たとえば、Fab、Fab' および F(ab')₂ 断片を組換えによって生成させるための技法を、当分野で知られている方法、WO92/22324; Mullinax 他、Bio Techniques 12(6) 864~869 (1992); および Sawai 他、AJRI 34: 26~34 (1995); および B

50

etter 他、Science 240:1041~1043 (1988) 中に開示された方法などを使用して行うこともできる。

【0211】

単鎖 Fvs および抗体を生成させるために使用することができる技法の例には、米国特許第 4,946,778 号および第 5,258,498 号; Huston 他、Methods in Enzymology 203:46~88 (1991); Shu 他、PNAS 90:7995~7999 (1993); および Skerrra 他、Science 240:1038~1040 (1988) 中に記載された技法がある。

【0212】

本発明はさらに、当分野で知られている方法によって作製することができる、二重特異性抗体の使用を提供する。完全長の二重特異性抗体の伝統的な生産は、2本の鎖が異なる特異性を有する場合、2つの免疫グロブリン重鎖および軽鎖対を同時発現させることに基づく (Milstein 他、1983、Nature 305:537~539)。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな取り合わせのために、これらのハイブリドーマ (クワドローマ) によって、10種の異なる抗体分子の考えうる混合物が生産され、その中ではただ1つが正確な二重特異性構造を有する。通常は親和性クロマトグラフィーのステップによって行われる、正確な分子の精製は、どちらかというとな煩わしいものであり、その産物の収率は低い。類似の手順が、WO 93/08829、および Traunecker 他、1991、EMBO J. 10:3655~3659 中に開示されている。

【0213】

異なる好ましい手法に従って、所望の結合特異性を有する抗体の可変ドメイン (抗体-抗原結合部位) を、免疫グロブリンの定常ドメイン配列に融合させる。この融合は、ヒンジ、CH2、および CH3 領域の少なくとも一部分を含む、免疫グロブリン重鎖の定常ドメインとの融合であることが好ましい。少なくとも1つの融合体中に存在する、軽鎖との結合に必要な部位を含む第1の重鎖の定常領域 (CH1) を有することが好ましい。免疫グロブリン重鎖の融合体、および望むならば免疫グロブリン軽鎖をコードする DNA を、別の発現ベクターに挿入し、適切な宿主生物に共トランスフェクトする。これによって、構築中に使用される3本のポリペプチド鎖の不均一な比率が、最適な収率を与える実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互の比率を調節する際に高度な柔軟性が与えられる。しかしながら、均一な比率である少なくとも2本のポリペプチド鎖の発現が高い収率をもたらすとき、あるいはこの比率が特に重要ではないときは、2本または3本すべてのポリペプチド鎖のコード配列を、1つの発現ベクターに挿入することができる。

【0214】

この手法の好ましい実施形態では、二重特異性抗体は、1つのアームに第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、およびもう1つのアームに免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (第2の結合特異性を与える) で構成されている。この非対称な構造によって、望ましくない免疫グロブリン鎖の組合せからの、所望の二重特異性化合物の分離が助長されることが見出された。なぜなら、二重特異性分子のわずか半分中の免疫グロブリン軽鎖の存在によって、分離法が容易になるからである。この手法は、WO 94/04690 中に開示されている。二重特異性抗体を生成させるための他の詳細に関しては、たとえば Suresh 他、Methods in Enzymology、1986、121:210 を参照のこと。

【0215】

本発明は、抗 MSPI 免疫グロブリン分子の機能的に活性がある断片、誘導体または類似体を提供する。機能的に活性があるとは、断片、誘導体または類似体が、断片、誘導体または類似体が由来する抗体によって認識される同じ抗原を認識する抗-抗イディオタイプ抗体 (すなわち三次抗体) を誘導することができることを意味する。具体的には、好ましい実施形態では、イディオタイプの免疫グロブリン分子の抗原性を、抗原を特異的に認識する CDR 配列の C 末端の、骨格および CDR 配列を欠失させることによって高めることができる。どの CDR 配列が抗原に結合するかを決定するために、当分野で知られている

任意の結合アッセイ法によって、CDR配列を含む合成ペプチドを、抗原との結合アッセイにおいて使用することができる。

【0216】

本発明は、F(ab')₂断片およびFab断片だけには限られないが、これらなどの抗体断片を提供する。特異的なエピトープを認識する抗体断片は、知られている技法によって生成させることができる。F(ab')₂断片は、可変領域、軽鎖の定常領域および重鎖のCH1ドメインからなり、抗体分子をペプシンで消化することによって生成する。Fab断片は、F(ab')₂断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成する。本発明は、本発明の抗体の重鎖と軽鎖の二量体、またはFvsまたは単鎖抗体(SCA)などの、その任意の最小断片（たとえば米国特許第4,946,778号；Bird、1988、Science 242:423~42；Houston他、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879~5883；およびWard他、1989、Nature 334:544~54中に記載されたものと同様の）、または本発明の抗体と同じ特異性を有する任意の他の分子も提供する。単鎖抗体は、Fv領域の重鎖断片と軽鎖断片をアミノ酸架橋を介して連結させることによって形成され、その結果、単鎖ポリペプチドが生じる。大腸菌の機能的Fv断片の組み立てに関する技法を、使用することができる（Skerra他、1988、Science 242:1038~1041）。

【0217】

他の実施形態では、本発明は、本発明の免疫グロブリンの融合タンパク質（またはその機能的に活性がある断片）を提供し、たとえばその中では、免疫グロブリンが共有結合（たとえばペプチド結合）を介して、N末端またはC末端のいずれかで、免疫グロブリンではない他のタンパク質のアミノ酸配列（またはその一部分、好ましくはタンパク質の少なくとも10、20または50個のアミノ酸部分）に融合している。免疫グロブリン、またはその断片は、定常ドメインのN末端で、他のタンパク質に共有結合することが好ましい。前述のように、このような融合タンパク質によって、精製が助長され、in vivoでの半減期が増大し、上皮性関門から免疫系への抗原の送達が向上する可能性がある。

【0218】

本発明の免疫グロブリンは、すなわち任意のタイプの分子の共有結合が、免疫特異的な結合を害さない限りこのような共有結合によって、いずれかが改変されている類似体および誘導体を含む。たとえば、ただし、制限するためではなく、免疫グロブリンの誘導体および類似体には、たとえばグリコシル化、アセチル化、ペジル化、リン酸化、アミド化、知られている保護基／ブロック基による誘導体化、タンパク質の開裂、細胞リガンドまたは他のタンパク質への連結などによって、さらに改変されたものがある。特異的な化学開裂、アセチル化、ホルミル化などだけには限られないが、これらを含めた知られている技法によって、任意の無数の化学改変を行うことができる。さらに、類似体または誘導体は、1つまたは複数の非古典的なアミノ酸を含んでよい。

【0219】

前述の抗体は、たとえばこれらのポリペプチドを画像化するため、適切な生理学的試料中、診断方法中でのそのレベルを測定するためなどの、本発明のMSPIの局在化および活性に関する当分野で知られている方法において、使用することができる。

【0220】

1. 12 抗体の発現

本発明の抗体は、抗体の合成に関する当分野で知られている任意の方法によって、特に化学合成または組換え発現によって、生産させることができ、組換え発現技法によって生産されることが好ましい。

【0221】

抗体、またはその断片、誘導体もしくは類似体の組換え発現には、抗体をコードする核酸の構築が必要である。抗体のヌクレオチド配列が知られている場合、抗体をコードする核酸を、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから組み立てることができる（たとえば、Ku 50

tmeier 他、1994、Bio Techniques 17:242 中に記載されたのと同様に)、これは簡潔には、抗体をコードする配列の一部分を含む重複オリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリングおよび連結、次いでPCRによる連結したオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【0222】

あるいは、抗体をコードする核酸は、抗体をクローン化することによって得ることができる。特定の抗体をコードする核酸を含むクローンは入手可能ではないが、抗体分子の配列が知られている場合、その抗体をコードする核酸を、配列の3'および5'端にハイブリッド形成可能な合成プライマーを使用するPCR増幅によって、あるいは特定の遺伝子配列に特異的なオリゴヌクレオチド・プローブを使用するクローン化によって、適切な源（たとえば抗体cDNAライブラリー、またはその抗体を発現する任意の組織または細胞から作製したcDNAライブラリー）から得ることができる。 10

【0223】

特定の抗原を特異的に認識する抗体分子（または、このような抗体をコードする核酸をクローン化するためのcDNAライブラリーの源）が入手可能ではない場合、特定の抗原に特異的な抗体を、当分野で知られている任意の方法、たとえばウサギなどの動物を免疫処置してポリクローナル抗体を生成させること、あるいはより好ましくはmAbを生成させることによって生成することができる。あるいは、少なくとも抗体のFab部分をコードするクローンは、特異的な抗原に結合するFab断片のクローンに関して、Fab発現ライブラリーをスクリーニングすることによって（たとえばHuse 他、1989、Science 246:1275~1281中に記載されたのと同様に）、あるいは抗体ライブラリーをスクリーニングすることによって（たとえばClackson 他、1991、Nature 352:624; Hane 他、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、94:4937を参照のこと）、得ることができる。 20

【0224】

抗体分子の可変ドメインを少なくともコードする核酸をひとたび得た後に、抗体分子の定常領域をコードするヌクレオチド配列を含むベクターに、その核酸を導入することができる（たとえばWO86/05807、WO89/01036、および米国特許第5,122,464号を参照のこと）。核酸と同時発現させて完全な抗体分子の発現を可能にするために、完全な軽鎖または重鎖を含むベクターも利用可能である。次いで、抗体をコードする核酸を使用して、メルカプト基を含んでいないアミノ酸残基との鎖間ジスルフィド結合と関連がある、1つまたは複数の可変領域システイン残基を、置換（または欠失）するのに必要なヌクレオチド置換体または欠失体を導入することができる。このような改変は、特異的な突然変異体または欠失体をヌクレオチド配列中に導入するための、当分野で知られている任意の方法、たとえば化学的突然変異導入法、in vitroでの位置指定突然変異導入法（Hutchinson 他、1978、J. Biol. Chem. 253:6551）、PCR系の方法などだけには限られないが、これらを含めた方法によって行うことができる。 30

【0225】

さらに、抗原特異性が適切であるマウス抗体分子からの遺伝子、および生物学的活性が適切であるヒト分子からの遺伝子をスプライシングすることによって、「キメラ抗体」を生産するために開発された技法（Morrison 他、1984、Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851~855、Neuberger 他、1984、Nature 312:604~608、Takeda 他、1985、Nature 314:452~454）を使用することができる。上に記載したように、キメラ抗体は、その中の異なる部分が異なる動物種に由来する分子、ネズミmAbに由来する可変領域、およびヒト抗体の定常領域を有する抗体、たとえばヒト化抗体などである。 40

【0226】

本発明の抗体分子をコードする核酸をひとたび得た後に、抗体分子を生産するためのベクターを、当分野でよく知られている技法を使用する組換えDNA技術によって生産するこ 50

とができる。したがって、抗体分子の配列を含む核酸を発現させることによって、本発明のタンパク質を調製するための方法を本明細書に記載する。当業者によく知られている方法を使用して、配列をコードする抗体分子、適切な転写および翻訳調節シグナルを含む発現ベクターを構築することができる。これらの方法には、たとえば *in vitro* での組換え DNA 技法、合成技法、および *in vivo* での遺伝的組換えがある。たとえば、Sambrook 他、(1990、Molecular Cloning、A Laboratory Manual、第2版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、NY)、および Ausubel 他 (eds.、1989、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY) 中に記載された、技法を参照のこと。 10

【0227】

発現ベクターを、従来の技法によって宿主細胞に運び、次いでトランスフェクトされた細胞を従来の技法によって培養して、本発明の抗体を生産する。

【0228】

本発明の組換え抗体を発現させるために使用する宿主細胞は、特に組換え抗体分子全体を発現させるためには、大腸菌などの細菌細胞、または好ましくは真核細胞のいずれかであってよい。特に、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞 (CHO) などの哺乳動物細胞は、ヒトのサイトメガロ・ウイルスからの主要中間体初期遺伝子プロモーター要素などのベクターと併せて、抗体用の有効な発現系である (Foecking 他、198、Gene 20 45:101; Cockett 他、1990、Bio/Technology 8:2)。

【0229】

さまざまな宿主発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させることができる。このような宿主発現系には、それによって当該のコード配列を生産し後に精製することができる運搬体だけでなく、適切なヌクレオチドのコード配列を用いて形質転換またはトランスフェクトすると、本発明の抗体分子を *in situ* で発現することができる細胞もある。これらの宿主発現系には、抗体コード配列を含む組換えバクテリオファージ DNA、プラスミド DNA、またはコスミド DNA 発現ベクターを用いて形質転換された細菌 (たとえば *E. coli*、*B. subtilis*) などの微生物、抗体コード配列を含む組換え酵母菌発現ベクターを用いて形質転換された酵母菌 (たとえば *Saccharomyces*、*Pichia*)、抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター (たとえばバキュロ・ウイルス) を用いて感染させた昆虫細胞系、抗体コード配列を含む組換えウイルス発現ベクター (たとえばカリフラワー・モザイク・ウイルス、CaMV; タバコ・モザイク・ウイルス、TMV) を用いて感染させ、あるいは抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター (たとえば Ti プラスミド) を用いて形質転換された植物細胞系、または哺乳動物細胞のゲノムに由来するプロモーター (たとえばメタロチオネイン・プロモーター) または哺乳動物ウイルスに由来するプロモーター (たとえばアデノウイルス後期プロモーター、ワクシニアウイルス 7.5 K プロモーター) を含む組換え発現構築体を保持している、哺乳動物細胞系 (たとえば COS、CHO、BHK、HEK 293、3 T3 細胞) があるが、これらだけには限られない。 40

【0230】

細菌系では、いくつかの発現ベクターを、抗体分子を発現させることを目的とする使用に応じて、有利に選択することができる。たとえば、多量のこのようなタンパク質を生産させるとき、抗体分子を含む薬剤組成物を生成させるためには、容易に精製される融合タンパク質産物の高レベルの発現を指示するベクターが望ましいと思われる。このようなベクターには、抗体コード配列が lacZ コード領域と共にインフレームになるようにベクター中に独立に連結することができ、その結果融合タンパク質が生産される大腸菌発現ベクター pUR278 (Rutherford 他、1983、EMBO J. 2:1791)、pIN ベクター (Inouye and Inouye、1985、Nucleic Acid Res. 13:3103~3109; Van Heeke and Schuster 50

、1989、J. Biol. Chem. 24:5503~5509) などがあるが、これらだけには限られない。pGEXベクターを使用して、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)との融合タンパク質として、外来性ポリペプチドを発現させることもできる。一般に、このような融合タンパク質は可溶性であり、マトリックス・グルタチオン-アガロース・ビーズへの吸着および結合、次に遊離グルタチオンの存在下での溶出によって、溶解した細胞から容易に精製することができる。pGEXベクターは、トロンビンまたは因子Xaプロテアーゼ開裂部位を含むように設計されており、したがってクローン化した標的遺伝子産物を、GST部分から切り離すことができる。

【0231】

昆虫系では、Autographa californica核多角体病ウイルス(ACNPV)を、外来性遺伝子を発現させるためのベクターとして使用する。このウイルスは、Spodoptera frugiperda細胞中で増殖する。抗体コード配列を、ウイルスの非必須領域(たとえばポリヘドリン遺伝子)に独立にクローン化して、ACNPVプロモーター(たとえばポリヘドリン・プロモーター)の調節下に置くことができる。哺乳動物宿主細胞では、いくつかのウイルス系の発現系(たとえばアデノウイルス発現系)を利用することができる。

【0232】

前に論じたように、所望の特定の方式で、挿入配列の発現を調節する、あるいは遺伝子産物を改変および加工する、宿主細胞株を選択することができる。タンパク質産物のこのような改変(たとえばグリコシル化)およびプロセッシング(たとえば開裂)は、タンパク質の機能にとって重要である可能性がある。

【0233】

組換え抗体の長期の高収率の生産のためには、安定した発現が好ましい。たとえば、当該の抗体を安定的に発現する細胞株は、抗体のヌクレオチド配列および選択マーカー(たとえばネオマイシンまたはヒグロマイシン)のヌクレオチド配列を含む発現ベクターを用いて細胞をトランスフェクトし、選択マーカーの発現を選択することによって生産することができる。このような操作した細胞株は、抗体分子と直接的あるいは間接的に相互作用する作用剤をスクリーニングおよび評価する際に、非常に有用である可能性がある。

【0234】

抗体分子の発現レベルは、ベクター増幅によって増大させることができる(概要に関しては、Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, 第3巻(Academic Press New York, 1987)を参照のこと)。抗体を発現させるベクター系中のマーカーが増幅可能であるとき、宿主細胞の培養物中に存在する阻害物質のレベルの増大によって、マーカー遺伝子のコピー数が増大すると思われる。増幅領域は抗体の遺伝子と関連があるので、抗体の生産も増大すると思われる(Crouse他、1983、Mol. Cell. Biol. 3:257)。

【0235】

宿主細胞は、本発明の2つの発現ベクター、ポリペプチドに由来する重鎖をコードする第1のベクター、およびポリペプチドに由来する軽鎖をコードする第2のベクターを用いてコトランスフェクトすることができる。この2つのベクターは、重鎖および軽鎖ポリペプチドを等しく発現させることができる、同一の選択マーカーを含んでよい。あるいは、重鎖および軽鎖ポリペプチドの両方をコードする、1つのベクターを使用することができる。こうした状況では、軽鎖を重鎖より先に配置して、過剰な無毒性重鎖を回避しなければならない(Proudfoot、1986、Nature 322:52; Kohler、1980、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197)。重鎖および軽鎖のコード配列は、cDNAまたはゲノムDNAを含んでよい。

【0236】

10

20

30

40

50

ひとたび本発明の抗体分子を組換えによって発現させた後に、抗体分子を精製するための当分野で知られている任意の方法、たとえばクロマトグラフィー（たとえばイオン交換クロマトグラフィー、プロテインAまたは特異的抗原などに関する親和性クロマトグラフィー、およびサイジング・カラム・クロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の違いによって、あるいはタンパク質を精製するための任意の他の標準的な技法によって、抗体分子を精製することができる。

【0237】

あるいは、発現される融合タンパク質に特異的な抗体を利用することによって、任意の融合タンパク質を容易に精製することができる。たとえば、Janknecht他によって記載された系は、ヒト細胞株中で発現される非変性状態の融合タンパク質の、容易な精製を可能にする（Janknecht他、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972~897）。この系では、遺伝子のオープン・リーディング・フレームが、6つのヒスチジン残基からなるアミノ末端タグに翻訳によって融合するように、当該の遺伝子をワクシニア組換えプラスミドにサブクローン化する。このタグは、融合タンパク質のマトリックス結合ドメインとして働く。組換えワクシニアウイルスを用いて感染させた細胞からの抽出物を、Ni²⁺ニトリロ酢酸-アガロース・カラムに載せ、イミダゾールを含む緩衝液を用いて、ヒスチジン-タグ・タンパク質を選択的に溶出させる。

【0238】

1. 13 結合した抗体

好ましい実施形態では、抗MSP1抗体またはその断片を、診断用または治療用成分に結合させる。診断のために、または所与の治療方式の効果を判定するために、抗体を使用することができる。抗体を検出可能な物質に結合させることによって、検出を容易にすることができる。検出可能な物質の例には、さまざまな酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、放射性核種、（陽電子放出断層撮影法において使用するための）陽電子放出金属、および非放射性的常磁性金属イオンがある。本発明の診断用物質として使用するための抗体に結合することができる金属イオンに関する、米国特許第4,741,900号を概略的に参照のこと。適切な酵素にはホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼがあり、適切な補欠分子族にはストレプトアビジン、アビジンおよびビオチンがあり、適切な蛍光物質にはウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルおよびフィコエリトリンがあり、適切な発光物質にはルミノールがあり、適切な生物発光物質にはルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンがあり、および適切な放射性核種には¹²⁵I、¹³¹I、¹¹¹Inおよび⁹⁹Tcがある。

【0239】

抗MSP1抗体またはその断片を、治療剤または薬剤成分に結合させて、所与の生物学的応答を改変することができる。治療剤または薬剤成分は、古典的な化学治療剤、たとえば小分子に限られるものとして解釈すべきではない。たとえば薬剤成分は、所望の生物学的活性を有する、タンパク質またはポリペプチドであってよい。このようなタンパク質には、たとえばアブリン、リシンA、シュードモナス属の外毒素、またはジフテリア毒素などの毒素、腫瘍壊死因子、 α -インターフェロン、 β -インターフェロン、神経成長因子、血小板由来の成長因子、組織プラスミノゲン活性化因子、血栓剤または抗血管新生剤、たとえばアンギオスタチンまたはエンドスタチンなどのタンパク質、またはリンホカイン、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-6（IL-6）、顆粒状マクロファージ・コロニー刺激因子（GM-CSF）、顆粒状コロニー刺激因子（G-CSF）、神経成長因子（NGF）または他の成長因子などの生物学的応答調節物質がある。

【0240】

このような治療成分を抗体に結合させるための技法は、よく知られている。たとえば、A

10

20

30

40

50

non他、「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」 in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy、Reisfeld他、(eds.)、pp. 243~56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstrom他、「Antibodies For Drug Delivery」、in Controlled Drug Delivery (第2版)、Robinson他、(eds.)、pp. 623~53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe、「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications、Pinchera他、(eds.)、pp. 475~506 (1985) ; 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy、Baldwin他、(eds.)、pp. 303~16 (Academic Press 1985)、およびThorpe他、「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」、Immunol. Rev.、62:119~58 (1982) を参照のこと。

【0241】

あるいは、米国特許第4,676,980号に記載されたように、抗体を第2の抗体に結合させて、抗体ヘテロ結合を形成することができる。

【0242】

治療成分が結合しているかあるいは結合していない抗体を、単独またはサイトカインと組み合わせて投与される治療用物質として、使用することができる。

【0243】

1. 14 MSの診断

本発明に従って、MSを有している疑いがあるかあるいはMSを有することが判っている被験体から得たCSF、血清、血漿または尿の第1の試料を、診断または調査用に使用することができる。一実施形態では、(MSを有していない1または複数の被験体からの)第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲に対しての、第1の試料または試料セット中の1つまたは複数のMSFまたはMSPI (または任意のこれらの組合せ)の存在量の減少は、MSの存在を示す。この目的に適したMSFおよびMSPIは、前に詳細に記載したように、それぞれ表Iおよび表IVにおいて識別される。本発明の他の実施形態では、第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲と比べた、第1の試料または試料セット中の1つまたは複数のMSFまたはMSPI (または任意のこれらの組合せ)の存在量の増大は、MSの存在を示す。この目的に適したMSFおよびMSPIは、前に詳細に記載したように、それぞれ表IIおよび表Vにおいて識別される。他の実施形態では、第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲と比べた、第1の試料または試料セット中の1つまたは複数のMSFまたはMSPI (または任意のこれらの組合せ)の相対的な存在量が、MSのサブタイプ (たとえば良性または進行性MS)を示す。他の実施形態では、第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲と比べた、第1の試料または試料セット中の1つまたは複数のMSFまたはMSPI (または任意のこれらの組合せ)の相対的な存在量が、MSの程度または重度を示す。任意の前述の方法において、本明細書に記載した1つまたは複数のMSPIの検出は、等電点電気泳動によって明らかになるCSF中のオリゴクローナル免疫グロブリン・バンドだけには限られないがこれを含めた、MSに関する1つまたは複数の追加的なバイオマーカーの検出と、場合によっては組み合わせることもできる (Reiber H他 (1998) Mult Scler 3:111~7)。MSPIを検出および/または視覚化

するための本明細書に記載した好ましい技術、キナーゼ・アッセイ、イムノアッセイ（たとえばウエスタン・ブロット法、免疫沈降、次にドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミド・ゲル電気泳動、免疫細胞化学法など）だけには限られないがこれを含めた、当分野の任意の適切な方法を使用して、M S FおよびM S P Iのレベルを測定することができる。M S P Iが知られている機能を有している場合、その機能に関するアッセイを使用して、M S P I発現を測定することができる。他の実施形態では、第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲に対しての、第1の試料または試料セット中の表IVで識別した1つまたは複数のM S P I（または任意のこれらの組合せ）を含む、m R N Aの存在量の減少は、M Sの存在を示す。他の実施形態では、第2の試料または試料セット、または自前に決定した基準範囲に対しての、第1の試料または試料セット中の表Vで識別した1つまたは複数のM S P I（または任意のこれらの組合せ）をコードする、m R N Aの存在量の増大は、M Sの存在を示す。任意の適切なハイブリダイゼーション・アッセイを使用して、M S P Iをコードするm R N Aを検出および／または視覚化することによって（たとえばノーザン・アッセイ、ドット・ブロット、i n s i t uハイブリダイゼーションなど）、M S P I発現を検出することができる。

10

【0244】

本発明の他の実施形態では、M S P Iに特異的に結合する標識抗体、その誘導体または類似体を診断目的で使用して、M Sを検出、診断、または調査することができる。M Sは動物中で検出されることが好ましく、より好ましくは哺乳動物中、最も好ましくはヒト中で検出されることが好ましい。

20

【0245】

1. 15 スクリーニング・アッセイ

本発明は、M S P Iに結合するか、あるいはM S P Iの発現または活性に対して刺激または阻害効果がある、作用剤（たとえば候補物質）を同定するための方法を提供する。本発明は、M S P I断片、M S P I関連ポリペプチド、またはM S P I融合タンパク質に結合するか、あるいはM S P I断片、M S P I関連ポリペプチド、またはM S P I融合タンパク質の発現または活性に対して刺激または阻害効果がある、作用剤または候補物質を同定する方法も提供する。作用剤または候補物質の例には、核酸（たとえばD N AおよびR N A）、炭水化物、脂質、タンパク質、ペプチド、ペプチド模倣体、小分子および他の薬剤があるが、これらだけには限られない。作用剤は、生物学的ライブラリー、空間的指定可能パラレル固相または溶液相ライブラリー、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリー法、「1ビーズ1化合物」ライブラリー法、および親和性クロマトグラフィー選択を使用する合成ライブラリー法を含めた、当分野で知られているコンビナトリアル・ライブラリー法の任意の非常に多数の手法を使用して得ることができる。生物学的ライブラリー手法は、ペプチド・ライブラリーに限られるが、他の4つの手法は、化合物のペプチド、非ペプチド・オリゴマーまたは小分子ライブラリーに適用可能である（L a m、1997、A n t i c a n c e r D r u g D e s . 12 : 145 ; 米国特許第5,738,996号および米国特許第5,807,683号）。

30

【0246】

分子ライブラリーを合成するための方法の例は、当分野ではたとえば、D e W i t t 他、1993、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90 : 6909 ; E r b 他、1994、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 91 : 11422 ; Z u c k e r m a n n 他、1994、J . M e d . C h e m 37 : 2678 ; C h o 他、1993、S c i e n c e 261 : 1303、C a r r e l l 他、1994、A n g e w . C h e m . I n t . E d . E n g l . 33 : 2059、C a r e l l 他、1994、A n g e w . C h e m . I n t . E d . E n g l . 33 : 2061 ; およびG a l l o p 他、1994、J . M e d . C h e m 37 : 1233中に見出すことができる。

40

【0247】

化合物のライブラリーは、たとえば溶液中（たとえばH o u g h t e n、1992、B i o / T e c h n i q u e s 13 : 412 ~ 421）、またはビーズ上（L a m、199

50

1、Nature 354:82~84)、チップ (Fodor、1993、Nature 364:555~556)、細菌 (米国特許第5,223,409号)、孢子 (米国特許第5,571,698号、第5,403,484号、第5,223,409号)、プラスミド (Cull 他、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865~1869) またはファージ (Scott and Smith、1990、Science 249:386~390; Devlin、1990、Science 249:404~406; Cwirlla 他、1990、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:6378~6382; および Felici、1991、J. Mol. Biol. 222:301~310) に存在してよく、これらはそれぞれ参照によってその中身を本明細書に取り込んである。

10

【0248】

一実施形態では、MSP I、MSP I断片 (たとえば機能的に活性がある断片)、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質と相互作用する (すなわち結合する) 作用剤を、細胞系アッセイ・システムにおいて同定する。この実施形態に従って、MSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質を発現する細胞を、候補物質または対照物質と接触させ、候補物質がMSP Iと相互作用する能力を決定する。望むならば、このアッセイを使用して、複数の候補物質 (たとえばライブラリー) をスクリーニングすることができる。たとえば細胞は、原核生物起源 (たとえば大腸菌) または真核生物起源 (たとえば酵母菌または哺乳動物) であってよい。さらに、細胞はMSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質を内生的に発現することができ、あるいは細胞を遺伝子工学的に操作して、MSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質を発現させることができる。いくつかの場合、MSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質または候補物質を、たとえば放射性標識 (32P、35Sまたは125I など) または蛍光標識 (フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、オーフタルアルデヒドまたはフルオレサミンなど) で標識して、MSP Iと候補物質の間の相互作用を検出することができる。MSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質と、候補物質が直接的または間接的に相互作用する能力は、当業者に知られている方法によって決定することができる。たとえば、候補物質とMSP I、MSP Iの断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質の間の相互作用は、フロー・サイトメトリー、シンチレーション・アッセイ、免疫沈降法またはウェスタン・ブロット分析によって決定することができる。

20

30

【0249】

他の実施形態では、MSP I、MSP I断片 (たとえば機能的に活性がある断片)、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質と相互作用する (すなわち結合する) 作用剤を、無細胞アッセイ・システムにおいて同定する。この実施形態に従って、原形または組換えMSP Iあるいはその断片、または原形または組換えMSP I 関連ポリペプチドあるいはその断片、またはMSP I 融合タンパク質あるいはその断片を、候補物質または対照物質と接触させ、候補物質がMSP IまたはMSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質と相互作用する能力を決定する。望むならば、このアッセイを使用して、複数の (たとえばライブラリー) 候補物質をスクリーニングすることができる。好ましくは、MSP I、MSP I断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質は、たとえばMSP I、MSP I断片、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I 関連ポリペプチドの断片、またはMSP I 融合タンパク質を、それを特異的に認識し結合させる固定された抗体と接触させること、あるいはMSP I、MSP I断片、MSP I 関連ポリペプチド

40

50

、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質の精製された調製物を、タンパク質に結合するように設計された表面と接触させることによって最初に固定する。M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質は、部分的または完全に精製されているか（たとえば部分的または完全に他のポリペプチドを含まない）、あるいは細胞溶解産物の一部であってよい。さらに、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片は、M S P I もしくは生物学的に活性があるその一部分、またはM S P I 関連ポリペプチドおよびグルタチオニン-S-トランスフェラーゼなどのドメインを含む融合タンパク質であってよい。あるいは、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質を、当業者によく知られている技法（たとえばビオチン化キット、P i e r c e C h e m i c a l s ; R o c k f o r d、I L）を使用してビオチン化することができる。候補物質がM S P I、M S P I の断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に知られている方法によって決定することができる。

10

【0250】

他の実施形態では、細胞系アッセイ・システムを使用して、酵素などのM S P I の生産または分解を担い、あるいはM S P I の翻訳後の改変を担うタンパク質、または生物学的に活性があるその一部分に結合するかまたはその活性を調節する作用剤を同定する。一次スクリーニングでは、M S P I、M S P I 相同体、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 融合タンパク質、または断片の生産、分解または翻訳後の改変を調節する作用剤を同定するために、複数の（たとえばライブラリー）候補物質を、（i）M S P I、M S P I 相同体、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 融合タンパク質、または前述の任意のものの生物学的に活性がある断片、および（ii）M S P I、M S P I 相同体、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 融合タンパク質、または断片のプロセッシングを担うタンパク質を、本来あるいは組換えによって発現する細胞と接触させる。望むならば、一次スクリーニングで同定した候補物質を、当該の特異的なM S P I を本来あるいは組換えによって発現する細胞に対する二次スクリーニングにおいて、次いでアッセイすることができる。候補物質がM S P I、M S P I 相同体、M S P I 関連ポリペプチドまたはM S P I 融合タンパク質の生産、分解または翻訳後の改変を調節する能力は、フロー・サイトメトリー、シンチレーション・アッセイ、免疫沈降法およびウエスタン・ブロット分析を非制限的に含めた、当業者に知られている方法によって決定することができる。

20

30

【0251】

他の実施形態では、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質と競合的に相互作用する（すなわち結合する）作用剤を、競合結合アッセイにおいて同定する。この実施形態に従って、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質を発現する細胞を候補物質、およびM S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質と相互作用することが知られている作用剤と接触させる。候補物質がM S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質と競合的に相互作用する能力を、次いで決定する。あるいは、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、またはM S P I 関連ポリペプチドの断片と競合的に相互作用する（すなわち結合する）作用剤を、M S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質を、候補物質、およびM S P I、M S P I 関連ポリペプチド、またはM S P I 融合タンパク質と相互作用することが知られている作用剤と接触させることによって、無細胞アッセイ・システムにおいて同定する。前述のように、候補物質がM S P I、M S P I 断片、M S P I 関連ポリペプチド、M S P I 関連ポリペプチドの断片、またはM S P I 融合タンパク質と相互作用する能力は、当業者に知られている方法によって決定することができ

40

50

る。これらのアッセイ、細胞系または無細胞アッセイを使用して、複数の（たとえばライブラリー）候補物質をスクリーニングすることができる。

【0252】

他の実施形態では、MSP I、またはMSP I 関連ポリペプチドの発現を調節する（すなわち上方制御または下方制御する）作用剤を、MSP I、またはMSP I 関連ポリペプチドを発現する細胞（たとえば原核生物起源または真核生物起源の細胞）を候補物質または対照物質（たとえばリン酸緩衝生理食塩水（PBS））と接触させ、MSP I、MSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I 融合タンパク質、MSP I をコードするmRNA、またはMSP I 関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現を決定することによって同定する。候補物質の存在下での、選択したMSP I、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I をコードするmRNA、またはMSP I 関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現のレベルを、候補物質の不在下（たとえば対照物質の存在下）での、MSP I、MSP I 関連ポリペプチド、MSP I をコードするmRNA、またはMSP I 関連ポリペプチドをコードするmRNAの発現のレベルと比較する。次いでこの比較に基き、候補物質を、MSP I、またはMSP I 関連ポリペプチドの発現の調節物質として同定することができる。たとえば、MSP I またはmRNAの発現が、候補物質の不在下よりも候補物質の存在下で著しく高いとき、その候補物質はMSP I またはmRNAの発現の刺激物質として同定される。あるいは、MSP I またはmRNAの発現が、候補物質の不在下よりも候補物質の存在下で著しく低いときは、その候補物質はMSP I またはmRNAの発現の阻害物質として同定される。それをコードするMSP I またはmRNAの発現のレベルは、当業者に知られている方法によって決定することができる。たとえば、mRNAの発現はノーザン・ブロット分析またはRT-PCRによって評価することができ、タンパク質のレベルはウェスタン・ブロット分析によって評価することができる。

【0253】

候補物質は、MSP I、MSP I 関連ポリペプチド、もしくはMSP I 融合タンパク質の、またはMSP I、MSP I 関連ポリペプチド、もしくはMSP I 融合タンパク質の上流エフェクターの、アゴニストまたはアンタゴニストであってよい。

【0254】

他の実施形態では、MSP I、またはMSP I 関連ポリペプチドの活性を調節する作用剤を、MSP I もしくはMSP I 関連ポリペプチド、またはMSP I もしくはMSP I 関連ポリペプチドを発現する細胞（たとえば原核細胞または真核細胞）を含む調製物を候補物質または対照物質と接触させ、候補物質がMSP I またはMSP I 関連ポリペプチドの活性を調節する（たとえば刺激あるいは阻害する）能力を決定することによって同定する。MSP I またはMSP I 関連ポリペプチドの活性は、MSP I またはMSP I 関連ポリペプチドの細胞シグナル変換経路（たとえば細胞内でのCa²⁺、ジアシルグリセロール、IP₃など）の誘導など、これだけには限られないが、下流エフェクターの変化を検出すること、適切な基質を標的とする触媒活性または酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（たとえばMSP I またはMSP I 関連ポリペプチドに対して応答性があり、検出可能なマーカー、たとえばルシフェラーゼをコードする核酸に動作可能に連結する制御要素）の誘導を検出すること、あるいは細胞応答、たとえば細胞分化、または細胞増殖を検出することによって評価することができる。本発明の記載に基づいて、当業者に知られている技法を、これらの活性を測定するために使用することができる（たとえば、参照によって本明細書に取り込んである米国特許第5,401,639号を参照のこと）。したがって候補物質は、候補物質の対照物質に対する影響を比較することによって、MSP I またはMSP I 関連ポリペプチドの活性の調節物質として同定することができる。適切な対照物質には、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）および正常な生理食塩水（NS）がある。

【0255】

他の実施形態では、MSP I、もしくはMSP I 関連ポリペプチドの発現、活性、または発現と活性の両方を調節する（すなわち上方制御または下方制御する）作用剤を、動物モデルにおいて同定する。適切な動物の例には、マウス、ラット、ウサギ、サル、モルモッ

ト、イヌおよびネコがあるが、これらだけには限られない。使用する動物は、MSのモデルであることが好ましい（たとえば、実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）Steinman（1999）Neuron、24：511～514）。この実施形態に従って、候補物質または対照物質を適切な動物に投与し（たとえば、経口的に、直腸に、または腹腔内もしくは静脈内などに非経口的に）、MSPI、もしくはMSPI関連ポリペプチドの発現、活性、または発現と活性の両方に対する影響を決定する。MSPIまたはMSPI関連ポリペプチドの発現の変化は、前に概略した方法によって評価することができる。

【0256】

他の実施形態では、MSPIまたはMSPI関連ポリペプチドを、ツー・ハイブリッド・アッセイまたはスリー・ハイブリッド・アッセイにおいて「ベイトタンパク質」として使用して、MSPIまたはMSPI関連ポリペプチドと結合または相互作用する他のタンパク質を同定する（たとえば、米国特許第5,283,317号；Zervos他（1993）Cell 72：223～232；Madura他（1993）J. Biol. Chem. 268：12046～12054；Bartel他（1993）Bio／Techniques 14：920～924；Iwabuchi他（1993）Oncogene 8：1693～1696；およびWO／94／10300を参照のこと）。当業者によって理解されるように、このような結合タンパク質は、本発明のMSPIによるシグナルの伝達に、たとえば本発明のMSPIに関するシグナル経路の上流または下流要素として関与している可能性がある。

10

【0257】

表IXには、MSPI、MSPI類似体、MSPI関連ポリペプチド、または前述の任意のものの断片の酵素活性または結合活性を検出または定量化するための、適切なアッセイを記載している科学文献を列挙する。それぞれのこのような参照文献は、その全容をここに取り込んである。好ましい実施形態では、表IXに参照したアッセイを、本明細書に記載したスクリーニングおよびアッセイにおいて使用して、たとえばMSPI、MSPI類似体、またはMSPI関連ポリペプチド、前述の任意のものの断片の活性または発現を調節する候補物質をスクリーニングまたは同定する。

20

【0258】

【表54】

表 IX

MSPI	参考文献
MSPI-81	<i>Nature Structural Biology</i> 7, 312-321, 2000 <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 122, 2178-2192, 2000
MSPI-133	
MSPI-187.2	
MSPI-201	
MSPI-205	
MSPI-243	
MSPI-246.1	
MSPI-257.3	
MSPI-270	
MSPI-292	
MSPI-301	
MSPI-318	
MSPI-323.2	
MSPI-8.2	Clin Chem 1993 Feb 39:2 309-12 J Immunol Methods 1987 Aug 24 102:1 7-14
MSPI-52.1	
MSPI-52.2	
MSPI-76	
MSPI-93.1	
MSPI-102.1	
MSPI-128	
MSPI-171	
MSPI-233.2	
MSPI-251	
MSPI-266	
MSPI-273	
MSPI-283.2	
MSPI-323.3	
MSPI-14	J Clin Lab Immunol 1986 Dec 21:4 201-7
MSPI-30	
MSPI-84.1	
MSPI-216	
MSPI-244	
MSPI-307	
MSPI-325.1	

10

20

30

40

【 0 2 5 9 】

【 表 5 5 】

MSPI	参考文献
MSPI-7 MSPI-127.1 MSPI-137 MSPI-142 MSPI-161 MSPI-182 MSPI-196 MSPI-289 MSPI-311.3	Neuroendocrinology 1992 Mar 55:3 308-16
MSPI-91.2	J Chromatogr 1991 Jul 5 567:2 369-80; Clin Chem 1989 Apr 35:4 582-6
MSPI-300	Eur J Biochem 2000 267:2965-2972 Eur J Biochem 2000 267:5085-5092 Eur J Biochem 2000 267:6311-6318

10

【0260】

20

さらに本発明は、本明細書に記載するように、前に記載したスクリーニング・アッセイによって同定される新規な作用剤、および治療用のその使用を提供する。

【0261】

1. 16 MSPIの治療上の使用

本発明は、治療剤を投与することによる、さまざまな疾患および障害の治療または予防を提供する。このような治療剤には、MSPI、MSPI類似体、またはMSPI関連ポリペプチドおよびその誘導体（断片含む）、前述のものに対する抗体、MSPI、MSPI類似体、またはMSPI関連ポリペプチドおよびその断片をコードする核酸、MSPIまたはMSPI関連ポリペプチドをコードする遺伝子に対するアンチセンス核酸、およびMSPIまたはMSPI関連ポリペプチドをコードする遺伝子の調節物質（たとえばアゴニストおよびアンタゴニスト）があるが、これらだけには限られない。本発明の重要な特徴は、MSと関連があるMSPIをコードする遺伝子の同定である。MSを有するMS被験体のCSF中で減少している1つまたは複数のMSPIの機能または発現を促進する治療剤を投与することによって、あるいはMSを有する被験体のCSF中で増大している1つまたは複数のMSPIの機能または発現を低下させる治療剤を投与することによって、MSを治療する（たとえば症状を改善するため、または発症もしくは進行を遅らせるために）、あるいは予防することができる。

30

【0262】

一実施形態では、それぞれMSPIに特異的に結合する1つまたは複数の抗体を、単独で、あるいは1つまたは複数の追加的な治療剤または処置と組み合わせて投与する。このような治療剤または処置の例には、インターフェロン β -1b（Betaseron（商標））、Betaferon（商標）、インターフェロン β -1a（Avonex（商標））、Rebif（商標）、酢酸グラチマー（Copaxone（商標））、静脈内注射用免疫グロブリン、および急性再発の発生に対する、コルチコステロイドを用いた治療（Noseworthy（1999）Nature 399: suppl. A40～A47）があるが、これらだけには限られない。

40

【0263】

抗体などの生物学的産物は、それが投与される被験体と同種であることが好ましい。好ましい実施形態では、ヒトMSPIまたはヒトMSPI関連ポリペプチド、ヒトMSPIもしくはヒトMSPI関連ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列、またはヒトMSPI

50

I もしくはヒト M S P I 関連ポリペプチドに対する抗体を、治療（たとえば症状を改善するため、あるいは発症または進行を遅らせるために）または予防用に、ヒト被験体に投与する。

【0264】

1. 16. 1 M S の治療および予防

M S は、M S を有している疑いがあるか、あるいは M S を有することが判っているか、あるいは M S が進行している危険がある被験体に、M S を有していない被験体の C S F と比べて M S を有する被験体の C S F 中に差別的に存在する、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは活性（すなわち機能）、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを調節する（すなわち増大または低下させる）作用剤を投与することによって、治療または予防する。10

一実施形態では、M S を有している疑いがあるか、あるいは M S を有することが判っているか、あるいは M S が進行している危険がある被験体に、M S を有する被験体の C S F 中で低下している、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは活性（すなわち機能）、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを上方制御する（すなわち増大させる）作用剤を投与することによって、M S を治療または予防する。他の実施形態では、M S を有する被験体の C S F 中で増大している、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは活性（すなわち機能）、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを上方制御する、作用剤を投与する。このような作用剤の例には、M S P I、M S P I 断片および M S P I 関連ポリペプチド；M S P I、M S P I 断片および M S P I 関連ポリペプチドをコードする核酸（たとえば遺伝子治療において使用するのためのもの）；および酵素活性がある M S P I または M S P I 関連 20

ポリペプチドに対し、酵素活性を調節することが知られている作用剤または分子があるが、これらだけには限られない。使用することができる他の作用剤、たとえば M S P I アゴニストは、*in vitro* アッセイを使用して同定することができる。

【0265】

M S を有している疑いがあるか、あるいは M S を有することが判っているか、あるいは M S が進行している危険がある被験体に、M S を有する被験体の C S F 中で増大している、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは活性、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを下方制御する作用剤を投与することによっても、M S は治療または予防される。他の実施形態では、M S を有する被験体の C S F 中で低下している、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは活性、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを下方制御する、作用剤を 30

投与する。このような作用剤の例には、M S P I アンチセンス・オリゴヌクレオチド、リボザイム、M S P I を対象とする抗体、M S P I の酵素活性を阻害する作用剤があるが、これらだけには限られない。他の有用な作用剤、たとえば M S P I アンタゴニストおよび小分子 M S P I アンタゴニストは、*in vitro* アッセイを使用して同定することができる。

【0266】

好ましい実施形態では、治療または予防法を、個々の被験体の必要性に合わせる。したがって、特定の実施形態では、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは機能、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを助長する作用剤を、前記 1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは機能、または前記 1 つまたは複数の M S F のレベルが、対照または正常の基準範囲 40

に対して存在しないかあるいは低下している、M S を有している疑いがあるかあるいは M S を有することが判っている被験体に、治療的または予防的に投与する。他の実施形態では、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは機能、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを助長する作用剤を、前記 1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは機能、または前記 1 つまたは複数の M S F のレベルが、対照または正常の基準範囲に対して増大している、M S を有している疑いがあるかあるいは M S を有することが判っている被験体に、治療的または予防的に投与する。他の実施形態では、1 つまたは複数の M S P I のレベルまたは機能、または 1 つまたは複数の M S F のレベルを低下させる作用剤を、前記 1 つまたは 40

複数の M S P I のレベルまたは機能、または前記 1 つまたは複数の M S F のレベルが、対照または正常の基準範囲に対して増大している、M S を有している疑いがあるかあるいは

はMSを有することが判っている被験体に、治療的または予防的に投与する。他の実施形態では、1つまたは複数のMSP Iのレベルまたは機能、または1つまたは複数のMSFのレベルを低下させる作用剤を、前記1つまたは複数のMSP Iのレベルまたは機能、または前記1つまたは複数のMSFのレベルが、対照または正常の基準範囲に対して低下している、MSを有している疑いがあるかあるいはMSを有することが判っている被験体に、治療的または予防的に投与する。このような作用剤を投与することによる、MSP Iの機能またはレベル、MSFのレベルの変化は、たとえば試料（たとえばCSF、血液もしくは尿の試料、または生検組織などの組織試料）を得て、前記MSFのレベルまたは前記MSP Iのレベルまたは活性、または前記MSP IをコードするmRNAのレベル、または前述のものの任意の組合せを*in vitro*でアッセイすることによって、容易に検出することができる。このようなアッセイは、本明細書に記載したように、作用剤の投与の前後に行うことができる。

10

【0267】

本発明の作用剤には、たとえばMS、MSP IまたはMSFのプロファイルを正常方向に回復させる、小さな有機分子、タンパク質、ペプチド、抗体、核酸などがあるが、これらだけには限られない。ただし、このような作用剤は、インターフェロン β -1b (Betaseron (商標)、Betaferon (商標))、インターフェロン β -1a (Avonex (商標)、Rebif (商標))、酢酸グラチラマー (Copaxone (商標))、静脈内注射用免疫グロブリン、および急性再発の発生に対するコルチコステロイドを用いた治療 (Noseworthy (1999) Nature 399: suppl 20. A40~A47) は含まないものとする。

20

【0268】

1. 16. 2 遺伝子治療

特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で、MSP I、MSP I断片、MSP I関連ポリペプチド、またはMSP I関連ポリペプチドの断片をコードする配列を含む核酸を投与して、MSP I機能を助長する。遺伝子治療とは、発現しているかあるいは発現可能な核酸を被験体に投与することである。この実施形態では、核酸はそれがコードしているポリペプチドを生産し、これがMSP I機能を助長することによって治療効果を仲介する。

【0269】

当分野で利用可能な遺伝子治療に関する任意の方法を、本発明に従って使用することができる。代表的な方法を以下に記載する。

30

【0270】

遺伝子治療の方法のおおまかな概要に関しては、Goldspiel他、1993、Clinical Pharmacy 12: 488~505; Wu and Wu、1991、Biotherapy 3: 78~95; Tolstoshev、1993、Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32: 573~596; Mulligan、1993、Science 260: 926~932; およびMorgan and Anderson、1993、Ann. Rev. Biochem. 62: 191~217; May、1993、TIBTECH 11 (5): 155~215を参照のこと。使用することができる組換えDNA技法の、当分野で一般的に知られている方法は、Ausubel他 (eds)、1993、Current Protocols in Molecular Biology、John Wiley & Sons、NY; およびKriegler、1990、Gene Transfer and Expression、A Laboratory Manual、Stockton Press、NY中に記載されている。

40

【0271】

好ましい態様では、作用剤は、MSP Iまたは断片またはそのキメラ・タンパク質をコードする核酸を含み、前記核酸は、MSP Iまたは断片またはそのキメラ・タンパク質を適切な宿主中で発現する発現ベクターの一部である。特に、このような核酸は、MSP Iコード領域に動作可能に連結しているプロモーターを有しており、前記プロモーターは誘導

50

性または構成性（および場合によっては組織特異的）である。他の特定の実施形態では、その中でMSPICコード配列および任意の他の所望の配列が、ゲノム中の所望の部位で相同的組換えを助長する領域にはさまれて位置している、核酸分子を使用し、したがってMSPIC核酸の染色体内発現がもたらされる（Koller and Smithies、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932~8935；Zijlstra他、1989、Nature 342:435~438）。

【0272】

被験体中への核酸の送達は直接的なものであってよく、その場合被験体は、核酸または核酸運搬ベクターに直接さらされる。この手法は、*in vivo* 遺伝子治療として知られている。あるいは、被験体中への核酸の送達は間接的なものであってよく、その場合細胞は、核酸を用いて*in vitro*で最初に形質転換され、次いで被験体に移植される。この手法は、*ex vivo* 遺伝子治療として知られている。

【0273】

特定の実施形態では、核酸を*in vivo*に直接投与し、この場合、核酸が発現してコードしている産物を生成する。このことは、当分野で知られている任意の無数の方法、たとえば適切な核酸発現ベクターの一部として核酸を構築し、細胞内性のものになるように核酸を投与することによって、たとえば欠陥または弱毒化レトロウイルスまたは他のウイルス・ベクターを使用した感染（米国特許第4,980,286号を参照のこと）によって、裸のDNAを直接注射することによって、マイクロ粒子のボンバードメントを使用すること（たとえば遺伝子ガン、Biolistic（商標）、Dupont）によって、脂質、細胞表面受容体またはトランスフェクト剤でコーティングすることによって、リポソーム、マイクロ粒子またはマイクロ・カプセル中に被包することによって、核に入ることが知られているペプチドとのリンケージ中に核酸を投与することによって、あるいは受容体仲介エンドサイトーシス用のリガンド物質との結合中に核酸を投与すること（たとえばWu and Wu、1987、J. Biol. Chem. 262:4429~4432を参照のこと）によって行うことができ、これを使用して受容体の特異的に発現する細胞タイプを標的化することができる。他の実施形態では、リガンドがエンドソームを破壊するために紡錘状のウイルス・ペプチドを含む、核酸-リガンド複合体を形成することができ、これによって核酸のリソソーム分解が避けられる。他の実施形態では、特異的な受容体を標的化することによって、細胞の特異的な取り込みおよび発現に関して、核酸を*in vivo*で標的化することができる（たとえばWO92/06180、WO92/22635、WO92/20316、WO93/14188、WO93/20221を参照のこと）。あるいは、核酸を細胞内に導入し、相同的組換えによって、発現用の宿主細胞DNA中に取り込ませることができる（Koller and Smithies、1989、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:8932~8935；Zijlstra他、1989、Nature 342:435~438）。

【0274】

特定の実施形態では、MSPICをコードする核酸を含むウイルス・ベクターを使用する。たとえば、レトロウイルス・ベクターを使用することができる（Miller他、1993、Meth. Enzymol. 217:581~599を参照のこと）。これらのレトロウイルス・ベクターは改変されて、ウイルス・ゲノムのパッケージングおよび宿主細胞DNA中への組み込みに必要ではないレトロウイルスの配列が欠失している。遺伝子治療で使用する、MSPICをコードする核酸をベクターにクローン化し、これによって被験体への遺伝子の送達が容易になる。レトロウイルス・ベクターに関するさらなる詳細は、レトロウイルス・ベクターを使用してmdr1遺伝子を造血幹細胞に送達して、幹細胞を化学療法に対してより耐性があるものにすることを記載している、Boesen他、1994、Biotherapy 6:291~302中に見出すことができる。遺伝子治療におけるレトロウイルス・ベクターの使用を示す他の参考文献は、Clowes他、1994、J. Clin. Invest. 93:644~651；Kiern他、1994、Blood 83:1467~1473；Salmons and Gunzberg、19 50

93、Human Gene Therapy 4:129~141; および Grossman and Wilson、1993、Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110~114である。

【0275】

アデノウイルスは、遺伝子治療において使用することができる他のウイルス・ベクターである。アデノウイルスは、遺伝子を気道上皮細胞に送達するための非常に魅力的な媒体である。アデノウイルスは気道上皮細胞に自然に感染し、軽度の疾患を引き起こす。アデノウイルス系の送達系の他の標的は肝臓、中枢神経系、内皮細胞、および筋肉である。アデノウイルスには、非分裂性細胞に感染することができる利点がある。Kozarsky and Wilson、1993、Current Opinion in Genetics and Development 3:499~503は、アデノウイルス系遺伝子治療の概要を示す。Bout 他、1994、Human Gene Therapy 5:3~10は、アデノウイルス・ベクターを使用して、アカゲザルの気道上皮細胞に遺伝子を送達することを実証した。遺伝子治療においてアデノウイルスを使用する他の例は、Rosenfeld 他、1991、Science 252:431~434; Rosenfeld 他、1992、Cell 68:143~155; Mastrangeli 他、1993、J. Clin. Invest. 91:225~234; WO94/12649; および Wang 他、1995、Gene Therapy 2:775~783 中に見出すことができる。

【0276】

アデノ関連ウイルス (AAV) も、遺伝子治療において使用するために提案されている (Walsh 他、1993、Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289~300; 米国特許第 5,436,146 号)。

【0277】

遺伝子治療のための他の手法は、エレクトロポレーション、リポフェクション、リン酸カルシウム仲介のトランスフェクション、またはウイルス感染などの方法によって、組織培養中の細胞に遺伝子を導入することに関するものである。通常、導入法は、選択マーカーを細胞に導入することを含む。次いで細胞を選択条件下に置いて、導入した遺伝子を取り込んで発現している細胞を単離する。次いでこれらの細胞を、被験体に送達する。

【0278】

この実施形態では、生成した組換え細胞を *in vivo* に投与する前に、核酸を細胞に導入する。このような導入は、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、核酸配列を含むウイルスまたはバクテリオファージ・ベクターを用いた感染、細胞融合、染色体仲介の遺伝子導入、マイクロセル仲介の遺伝子導入、スフェロプラスト融合などだけには限られないが、これらを含めた、当分野で知られている任意の方法によって行うことができる。外来性遺伝子を細胞に導入するための、多数の技法が当分野で知られており (たとえば Loeffler and Behr、1993、Meth. Enzymol. 217:599~618; Cohen 他、1993、Meth. Enzymol. 217:618~644; Cline、1985、Pharmac. Ther. 29:69~92 を参照のこと)、本発明に従ってこれらを使用することができる。ただし、レシピエント細胞の必要な発生および生理学的機能は害されないものとする。技法によって、核酸の細胞への安定した導入がもたらされなければならない、その結果核酸は細胞によって発現可能であり、その細胞の子孫によって遺伝可能かつ発現可能であることが好ましい。

【0279】

生成した組換え細胞は、当分野で知られているさまざまな方法によって、被験体に送達することができる。好ましい実施形態では、上皮細胞をたとえば皮下に注射する。他の実施形態では、組換え皮膚細胞を、皮膚移植片として被験体に施すことができる。組換え血液細胞 (たとえば造血幹細胞または始原細胞) を、静脈内に投与することが好ましい。使用に関して想定される細胞の量は、被験体の所望の効果、状態などに依存し、これは当業者

によって決定することができる。

【0280】

遺伝子治療の目的で核酸を導入することができる細胞は、任意の所望の入手可能な細胞タイプを含み、これにはニューロン細胞、グリア細胞（たとえば希突起膠細胞または星状膠細胞）、上皮細胞、内皮細胞、ケラチン生成細胞、線維芽細胞、筋肉細胞、肝細胞、Tリンパ球、Bリンパ球、単球、マクロファージ、好中球、好酸球、巨核球、顆粒などの血液細胞、たとえば骨髄、へその緒の血液、末梢血液、または胎児肝臓から得られる、さまざまな幹細胞または始原細胞、特に造血幹細胞または始原細胞があるが、これらだけには限られない。

【0281】

好ましい実施形態では、遺伝子治療用に使用する細胞は、治療する被験体に自己由来するものである。

【0282】

遺伝子治療において組換え細胞を使用する実施形態では、MSP Iをコードする核酸を、それが細胞またはその子孫によって発現可能であるように、細胞に導入し、次いで組換え細胞を治療効果のために *in vivo* に投与する。特定の実施形態では、幹細胞または始原細胞を使用する。単離し *in vitro* で保つことができる任意の幹細胞または始原細胞を、本発明のこの実施形態に従って使用することができる（たとえばWO94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71: 973~985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A: 229; および Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clin Proc. 61: 771を参照のこと）。

【0283】

特定の実施形態では、遺伝子治療の目的で導入される核酸は、コード領域に動作可能に連結した誘導性プロモーターを含み、したがってこの核酸の発現は、転写の適切な誘導物質の有無を制御することによって制御可能である。

【0284】

MSP IをコードするDNAの直接的な注入は、たとえば米国特許第5,589,466号に記載された技法に従って行うこともできる。これらの技法は、「裸のDNA」、すなわちリポソーム、細胞、または任意の他の物質、および適切な担体がない、単離したDNA分子を注入することを含む。タンパク質をコードし適切なプロモーターに動作可能に連結したDNAを注入することによって、注入部位の近くの細胞中でタンパク質が生成され、注入されたDNAによってコードされているタンパク質に対する免疫応答が被験体中で誘導される結果となる。好ましい実施形態では、(a) MSP IをコードするDNAおよび(b) プロモーター、を含む裸のDNAを被験体に注入して、MSP Iに対する免疫応答を誘導する。

【0285】

1. 16. 3 MSを治療するためのMSP Iの阻害

本発明の一実施形態では、MSを有していない被験体の体液試料と比べてMSを有する被験体の体液試料中で高まっている、1つまたは複数のMSP Iのレベルおよび／または機能を相殺する（阻害する）作用剤を投与することによって、MSを治療または予防する。この目的に有用な作用剤には、抗MSP I抗体（およびその結合領域を含む断片および誘導体）、MSP Iアンチセンスまたはリボザイム核酸、および相同的組換えによって内生MSP I機能を「ノックアウトする」ために使用する、機能不全MSP Iをコードする核酸（たとえばCapecci, 1989, Science 244: 1288~1292を参照のこと）があるが、これらだけには限られない。MSP I機能を阻害する他の作用剤は、知られている *in vitro* アッセイ、たとえば試験物質がMSP Iの他のタンパク質または結合パートナーへの結合を阻害する能力、または知られているMSP I機能を阻害する能力に関するアッセイを使用することによって、同定することができる。このような阻害は *in vitro* または細胞培養においてアッセイされることが好ましい

10

20

30

40

50

が、遺伝的アッセイを使用することもできる。好ましい技術を使用して、作用剤の投与の前後の、MSP I のレベルを検出することもできる。以下に詳細に記載したように、適切な *in vitro* または *in vivo* アッセイを使用して、特異的な作用剤の効果、およびその投与によって冒された組織の治療が示されるかどうかを決定することが好ましい。

【0286】

特定の実施形態では、MSP I 機能を阻害する作用剤を、MS を有していない被験体の CSF または所定の基準範囲と比べて、増大した CSF レベルまたは MSP I の機能的活性が検出される（たとえば正常レベルまたは所望レベルより高い）被験体に、治療的または予防的に投与する。前に概略したように、当分野の方法基準を使用して、MSP I レベルまたは機能の増大を測定することができる。好ましい MSP I 阻害組成物には小分子、すなわち 1000 ダルトン未満の分子がある。このような小分子は、本明細書に記載したスクリーニング法によって同定することができる。

【0287】

他の実施形態では、MSP I が CSF 中で低下しているのを見ることができ、この場合この低下は、他の区画中での MSP I レベルの増大、たとえば非制限的にではあるが、CSF への分泌ではなく、細胞、亜細胞区画、体液または組織中の MSP I の封鎖を表す。このような条件下では、MSP I 機能を阻害する作用剤を、MS を有していない被験体の CSF または所定の基準範囲と比べて、低下した CSF レベルまたは MSP I の機能的活性が検出される（たとえば正常レベルまたは所望レベルより高い）被験体に、治療的または予防的に投与する。

【0288】

1. 16. 4 MSP I のアンチセンス制御

特定の実施形態では、MSP I 発現が、MSP I アンチセンス核酸を使用することによって阻害される。本発明は、MSP I またはその一部分をコードする遺伝子または cDNA に対してアンチセンスである少なくとも 6 個のヌクレオチドを含む核酸の、治療的または予防的使用を提供する。本明細書で使用するように、MSP I 「アンチセンス」核酸とは、いくつかの配列相補性によって、MSP I をコードする RNA（好ましくは mRNA）の一部分とハイブリダイズすることができる核酸のことである。アンチセンス核酸は、MSP I をコードする mRNA のコードおよび／または非コード領域と相補的であってよい。このようなアンチセンス核酸は、MSP I 発現を阻害する作用剤として有用性があり、MS の治療または予防において使用することができる。

【0289】

本発明のアンチセンス核酸は、二本鎖または一本鎖オリゴヌクレオチド、RNA または DNA あるいはこれらの改変体または誘導体であり、これらは細胞に直接投与することができ、外生の導入された配列の転写によって細胞内で生成することができる。

【0290】

さらに本発明は、以下に記載する薬剤として許容される担体中に有効量の本発明の MSP I アンチセンス核酸を含む、薬剤組成物を提供する。

【0291】

他の実施形態では本発明は、原核または真核細胞中で MSP I 核酸配列の発現を阻害するための方法であって、本発明の MSP I アンチセンス核酸を含む組成物を細胞に有効量与えることを含む方法を提供する。

【0292】

MSP I アンチセンス核酸およびその使用は、以下に詳細に記載する。

【0293】

1. 16. 5 MSP I アンチセンス核酸

MSP I アンチセンス核酸は、少なくとも 6 個のヌクレオチドであり、6 ～ 約 50 オリゴヌクレオチド範囲のオリゴヌクレオチドであることが好ましい。特定の態様では、オリゴヌクレオチドは少なくとも 10 個のヌクレオチド、少なくとも 15 個のヌクレオチド、少

なくとも100個のヌクレオチド、あるいは少なくとも200個のヌクレオチドである。オリゴヌクレオチドはDNAまたはRNA、あるいはこれらのキメラ混合物または誘導体または改変型であってよく、一本鎖または二本鎖であってよい。オリゴヌクレオチドは、塩基部分、糖部分、またはリン酸骨格において改変することができる。オリゴヌクレオチドは、ペプチド、細胞膜（たとえばL e t s i n g e r 他、1989、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 86:6553~6556; L e m a i t r e 他、1987、P r o c . N a t l . A c a d . S c i . 84:648~652; W O 88/09810を参照のこと）または血液脳関門（たとえばW O 89/10134を参照のこと）を通した運搬を助長する作用剤、ハイブリダイゼーション誘発開裂剤（たとえばK r o l 他、1988、B i o T e c h n i q u e s 6:958~976を参照のこと）などの他の付属群または挿入剤（たとえばZ o n、1988、P h a r m . R e s . 5:539~549を参照のこと）などの他の付属群を含むことができる。 10

【0294】

本発明の好ましい態様では、好ましくは一本鎖DNAのM S P I アンチセンス・オリゴヌクレオチドを提供する。オリゴヌクレオチドは、当分野で一般的に知られている置換基を用いて、その構造上の任意の位置で修飾することができる。

【0295】

M S P I アンチセンス・オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの以下の修飾塩基部分：5-フルオロウラシル、5-ブロモロウラシル、5-クロロウラシル、5-ヨードウラシル、ヒポキサンチン、キサンチン、4-アセチルシトシン、5-（カルボキシヒドロキシメチル）ウラシル、5-カルボキシメチルアミノメチル-2-チオウリジン、5-カルボキシメチルアミノメチルウラシル、ジヒドロウラシル、 β -D-ガラクトシルケオシン、イノシン、N6-イソペンテニルアデニン、1-メチルグアニン、1-メチルイノシン、2,2-ジメチルグアニン、2-メチルアデニン、2-メチルグアニン、3-メチルシトシン、5-メチルシトシン、N6-アデニン、7-メチルグアニン、5-メチルアミノメチルウラシル、5-メトキシアミノメチル-2-チオウラシル、 β -D-マンノシルケオシン、5-メトキシカルボキシメチルウラシル、5-メトキシウラシル、2-メチルチオ-N6-イソペンテニルアデニン、ウラシル-5-オキシ酢酸(v)、偽ウラシル、ケオシン、2-チオシトシン、5-メチル-2-チオウラシル、2-チオウラシル、4-チオウラシル、5-メチルウラシル、ウラシル-5-オキシ酢酸メチルエステル、3-（3-アミノ-3-N-2-カルボキシプロピル）ウラシル、（a c p 3）w、2,6-ジアミノプリン、および他の塩基類似体を含むことができる。 20 30

【0296】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの修飾糖部分、たとえば以下の糖部分、アラビノース、2-フルオロアラビノース、キシルロース、ヘキソースの1つを含む。

【0297】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、少なくとも1つの以下の修飾リン酸骨格、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホラミドチオエート、ホスホラミデート、ホスホラジアミデート、メチルホスホネート、アルキルホスホトリエステル、ホルムアセタール、またはホルムアセタールの類似体を含む。 40

【0298】

他の実施形態では、オリゴヌクレオチドは、 α -アノマー・オリゴヌクレオチドである。 α -アノマー・オリゴヌクレオチドは、相補的RNAと特異的な二本鎖ハイブリッドを形成し、その内部では、通常の α 単位とは反対に、鎖は互いに平行している（G a u t i e r 他、1987、N u c l . A c i d s R e s . 15:6625~6641）。

【0299】

オリゴヌクレオチドは、他の分子、たとえばペプチド、ハイブリダイゼーション誘発架橋剤、輸送剤、またはハイブリダイゼーション誘発開裂剤に結合することができる。

【0300】

本発明のオリゴヌクレオチドは、当分野で知られている標準的な方法、たとえば自動DNA合成装置（Biosearch、Applied Biosystemsなどから市販されているものなど）を使用することによって、合成することができる。例として、ホスホロチオエート・オリゴヌクレオチドは、Stein他（1988、Nucleic Acids Res. 16:3209）によって合成することができ、メチルホスホネート・オリゴヌクレオチドは、微細孔性ガラス・ポリマー支持体を使用することによって作製することができる（Sarin他、1988、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448~7451）。

【0301】

特定の実施形態では、本発明のMSPIアンチセンス核酸を、外来性配列からの転写によって、細胞内で生成させる。たとえば、ベクターが細胞によって取り込まれるように、ベクターを*in vivo*に導入することができ、その細胞内では、ベクターまたはその一部分が転写され、本発明のアンチセンス核酸（RNA）が生成される。このようなベクターは、MSPIアンチセンス核酸をコードする配列を含むと思われる。このようなベクターは、それが転写されて所望のアンチセンスRNAを生成することができる限りは、エピソードであり続けるか、あるいは染色体に組み込まれることができる。このようなベクターは、当分野の標準的な組換えDNA技術によって構築することができる。ベクターは、哺乳動物細胞中で複製および発現用に使用される、プラスミド、ウイルス、または当分野で知られている他のものであってよい。MSPIアンチセンスRNAをコードする配列の発現を、当分野で知られている任意のプロモーターにより行って、哺乳動物細胞、好ましくはヒト細胞中で作用させることができる。このようなプロモーターは、誘導性または構築性であってよい。このようなプロモーターの例は、前で概説している。

【0302】

本発明のアンチセンス核酸は、MSPIをコードする遺伝子、好ましくはMSPIをコードするヒト遺伝子の、RNA転写物の少なくとも一部分と相補的な配列を含む。しかしながら絶対的な相補性は、好ましいが必要とはされない。本明細書で名付ける「RNAの少なくとも一部分と相補的な」配列とは、厳しい条件（たとえば上で定義した、非常に厳しい条件または適度に厳しい条件）下でRNAとハイブリダイズして、安定した二重らせんを形成することができる十分な相補性を有する配列を意味し、二本鎖MSPIアンチセンス核酸の場合、したがって二重らせんDNAの一本鎖を試験してもよく、あるいは三重らせん形成をアッセイしてもよい。ハイブリダイズするための能力は、アンチセンス核酸の相補性の度合いおよび長さの両方に依存するであろう。一般に、ハイブリダイズする核酸が長くなるほど、MSPIをコードするRNAとの塩基のミスマッチをより多く含む可能性があり、それでもなお安定した二重らせん（あるいは三重らせんの場合もある）を形成することができる。当業者は許容されるミスマッチの度合いを、標準的な手順を使用することによって確認して、ハイブリダイズした複合体の融点を決定することができる。

【0303】

1. 16. 6 MSPIアンチセンス核酸の治療的使用

MSを有しているかMSに罹患している疑いがある被験体のCSF中で、標的MSPIが過剰発現しているとき、MSPIアンチセンス核酸を使用して、MSを治療または予防することができる。好ましい実施形態では、一本鎖DNAアンチセンスMSPIオリゴヌクレオチドを使用する。

【0304】

MSPIをコードするRNAを発現または過剰発現する細胞タイプは、当分野で知られているさまざまな方法によって同定することができる。このような細胞タイプには、白血球（たとえば好中球、マクロファージ、単球）、および常駐細胞（たとえば星状膠細胞、グリン細胞、ニューロン細胞、および上皮細胞）があるが、これらだけには限られない。このような方法には、MSPI特異的な核酸とのハイブリダイゼーション（たとえばノーザン・ハイブリダイゼーション、ドットブロット・ハイブリダイゼーション、*in situ* ハイブリダイゼーションによる）、細胞タイプからのRNAが*in vitro*でMS

P I に翻訳される能力を観察すること、イムノアッセイなどがあるが、これらだけには限られない。好ましい態様では、被験体からの1次組織を、たとえば免疫細胞化学法または *i n s i t u* ハイブリダイゼーションによって、治療前に M S P I 発現に関してアッセイすることができる。

【0305】

薬剤として許容される担体中に有効量の M S P I アンチセンス核酸を含む、本発明の薬剤組成物を、M S を有する被験体に投与することができる。

【0306】

M S の治療において有効であろう M S P I アンチセンス核酸の量は、標準的な臨床技法によって決定することができる。

10

【0307】

特定の実施形態では、1つまたは複数の M S P I アンチセンス核酸を含む薬剤組成物を、リボソーム、マイクロ粒子、またはマイクロ・カプセルを介して投与する。本発明のさまざまな実施形態では、このような組成物を使用して、M S P I アンチセンス核酸を徐放することができる。

【0308】

1. 16. 7 阻害リボザイムおよび三重らせん手法

他の実施形態では、M S P I をコードする遺伝子配列およびよく知られている遺伝子「ノックアウト」を使用すること、あるいは M S P I の遺伝子発現を低下させるためのリボザイムまたは三重らせん法によって、M S P I のレベルまたは M S P I の活性を低下させることにより、M S の症状を改善することができる。この手法では、リボザイムまたは三重らせん分子を使用して、M S P I をコードする遺伝子の活性、発現または合成を調節し、したがって M S の症状を改善する。突然変異または非突然変異遺伝子の発現を低下させるかあるいは阻害するために、このような分子を設計することができる。このような分子を生成および使用するための技法は、当業者によく知られている。

20

【0309】

M S P I をコードする遺伝子 m R N A 転写物を触媒的に開裂させるように設計されているリボザイム分子を使用して、標的遺伝子 m R N A の翻訳および、その結果の遺伝子産物の発現を防ぐことができる（たとえば W O 90 / 11364 ; S a r v e r 他、1990、*S c i e n c e* 247 : 1222 ~ 1225 を参照のこと）。

30

【0310】

リボザイムは、R N A の特異的開裂を触媒することができる、酵素 R N A 分子である。（概要に関しては、R o s s i、1994、*C u r r e n t B i o l o g y* 4、469 ~ 471 を参照のこと）。リボザイム作用の機構は、リボザイム分子の相補的な標的 R N A への配列特異的なハイブリダイゼーション、次に内ヌクレオチド鎖分解性の開裂事象を含む。リボザイム分子の組成物は標的遺伝子の m R N A と相補的な1つまたは複数の配列を含まなければならず、m R N A の開裂を担うよく知られている触媒配列を含まなければならない。この配列に関しては、たとえば参照によってその全容を本明細書に取り込んでいる、米国特許第 5,093,246 号を参照のこと。

【0311】

部位特異的な認識配列において m R N A を開裂させるリボザイムを使用して、M S P I をコードする m R N A を破壊することができるが、ハンマーヘッド・リボザイムを使用することが好ましい。ハンマーヘッド・リボザイムは、標的 m R N A と相補的塩基対を形成するフランキング領域によって示される位置で m R N A を開裂させる。唯一の要件は、標的 m R N A が2塩基の以下の配列：5' - U G - 3' を有することである。ハンマーヘッド・リボザイムの構築および生成は当分野でよく知られており、M y e r s、1995、*M o l e c u l a r B i o l o g y a n d B i o t e c h n o l o g y : A C o m p r e h e n s i v e D e s k R e f e r e n c e*、V C H P u b l i s h e r s、New York、（特に833ページ図4を参照のこと）、および H a s e l o f f a n d G e r l a c h、1988、*N a t u r e*、334、585 ~ 591 中により

40

50

詳細に記載されており、これらはそれぞれ参照によってその全容を本明細書に取り込んでいる。

【0312】

開裂認識部位がMSP IをコードするmRNAの5'端の近くに位置し、すなわち効率を高め、非機能性mRNA転写物の細胞内蓄積を最小限にするように、リボザイムを操作することが好ましい。

【0313】

本発明のリボザイムは、RNAエンドリボヌクレアーゼ（本明細書では以後は「Cechタイプのリボザイム」）、例えば*Tetrahymena thermophila*中に天然に存在し（IVS、またはL-19IVS RNAとして知られている）、Thomas Cechおよび共同研究者によって広く記載されている（Zaug他、1984、*Science*、224、574～578；Zaug and Cech、1986、*Science*、231、470～475、Zaug他、1986、*Nature*、324、429～433；University Patents Incによる公開国際特許出願No. WO88/04300；Been and Cech、1986、*Cell*、47、207～216）、RNAエンドリボヌクレアーゼなども含む。Cechタイプのリボザイムは8つの塩基対活性部位を有しており、これが標的RNA配列にハイブリダイズし、その後標的RNAの開裂が起こる。本発明は、MSP Iをコードする遺伝子中に存在する8つの塩基対活性部位配列を標的とする、Cechタイプのリボザイムを含む。

【0314】

アンチセンス手法と同様に、リボザイムは改変型オリゴヌクレオチド（たとえば安定性、標的化などが改善されている）から構成されていてよく、*in vivo*でMSP Iを発現する細胞にこれを送達しなければならない。好ましい送達法は、強力な構成的p_{ol} II Iまたはp_{ol} IIプロモーターの制御下で、リボザイムを「コードする」DNA構築体を使用することを含み、その結果トランスフェクトされた細胞は、MSP Iをコードする内生mRNAを破壊するのに十分な量のリボザイムを生成し、翻訳を阻害するであろう。リボザイムはアンチセンス分子と異なり触媒的であるので、有効性に関してはより低い細胞内濃度が必要とされる。

【0315】

内生MSP I発現は、標的化した相同的組換えを使用して、MSP Iをコードする遺伝子、またはこのような遺伝子のプロモーターを不活性化または「ノックアウトする」ことによって、低下させることもできる（たとえば、それぞれ参照によってその全容を本明細書に取り込んである、Smithies他、1985、*Nature*、317：230～234；Thomas and Capecechi、1987、*Cell*、51：503～512；Thompson他、1989、*Cell*、5：313～321；およびZijlstra他、1989、*Nature*、342：435～438を参照のこと）。たとえば、内因性遺伝子（MSP Iをコードする遺伝子のコード領域または制御領域）と相同なDNAには含まれた、非機能性MSP I（または完全に無関係なDNA配列）をコードする突然変異遺伝子を、選択マーカーおよび／または負の選択マーカーと共に、あるいはこれら無しで使用して、*in vivo*で標的遺伝子が発現する細胞をトランスフェクトすることができる。標的化した相同的組換えによってDNA構築体を挿入することにより、標的遺伝子の不活性化がもたらされる。このような手法は農業分野に非常に適しており、この場合ES（胚幹）細胞に対する改変を使用して、不活性化標的遺伝子を有する動物の子孫を発生させることができる（たとえば、上記のThomas and Capecechi、1987、およびThompson、1989を参照のこと）。しかしながら、この手法は、組換えDNA構築体は、適切なウイルス・ベクターを使用して、*in vivo*の必要な部位に直接投与されるか、そこを標的とするものという条件で、ヒトにおける使用に適合させることができる。

【0316】

あるいは、MSP Iをコードする遺伝子の内生発現を、遺伝子の調節領域（すなわち遺伝

子のプロモーターおよび／またはエンハンサー)と相補的なデオキシリボヌクレオチド配列を標的化して、身体中の標的細胞内のMSP Iをコードする遺伝子の転写を妨げる三重らせん構造を形成することによって、低下させることができる。(Helene、1991、Anticancer Drug Des.、6(6)、569～584; Helene他、1992、Ann. N. Y. Acad. Sci.、660、27～36; および Maher、1992、Bioassays 14(12)、807～815を概略的に参照のこと)。

【0317】

転写を阻害するための三重らせん構造の形成において使用される核酸分子は、一本鎖でなければならず、デオキシヌクレオチドから構成されていなければならない。これらのオリゴヌクレオチドの塩基組成は、Hoogsteenの塩基対の法則による三重らせん構造の形成を助長するように設計されていなければならない、この法則は一般に、二重らせんの1本の鎖上に存在するプリンまたはピリミジンの相当な大きさの範囲を必要とする。ヌクレオチド配列はピリミジン系のものであってよく、これによって生成する三重らせんの3本の関連鎖にわたって、TATおよびCGCトリプレットが生成するであろう。ピリミジンが豊富な分子によって、その鎖を平行な方向にある二重らせんの一本鎖のプリンが豊富な領域と相補的な塩基が与えられる。さらに、プリンが豊富である、たとえばG残基の範囲を含む、核酸分子を選択することができる。これらの分子はGC対が豊富なDNA二重らせんと三重らせんを形成し、その大部分のプリン残基は標的の二重らせんの1本の鎖上に位置し、三重らせんの3本の鎖にわたってGGCトリプレットが生成する。

【0318】

あるいは、三重らせん形成用に標的化される可能性がある配列は、いわゆる「スイッチバック」核酸分子を作製することによって増大させることができる。スイッチバック分子は、別の5'-3'、3'-5'方式で、これらが二重らせんの第1の鎖、次いでもう1本の鎖と塩基対を形成し、二重らせんの1本の鎖上に存在するプリンまたはピリミジンの相当な大きさの範囲の必要性をなくすように合成される。

【0319】

本明細書に記載するアンチセンス、リボザイム、または三重らせん分子を利用して、突然変異遺伝子の発現を阻害する場合、MSP Iの正常な対立遺伝子によって生成されるmRNAの転写(三重らせん)または翻訳(アンチセンス、リボザイム)を技法が効率的に低下または阻害し、存在するMSP Iの濃度が正常な表現型に必要とされる濃度よりも低くなる状況が生じる可能性があることが考えられる。このような場合、MSP Iをコードする遺伝子の活性の実質的に正常なレベルが保たれることを確実にするために、遺伝子治療を使用して、MSP Iをコードしておりそれを発現させ、正常な遺伝子活性を示し、どのようなアンチセンス、リボザイム、または三重らせん処理を利用しても影響を受ける配列は含まない核酸分子を、細胞に導入することができる。あるいは、遺伝子が細胞外タンパク質をコードしている場合は、正常なMSP Iを同時投与して、MSP I活性の必要なレベルを保つことができる。

【0320】

本発明のアンチセンスRNAおよびDNA、リボザイム、または三重らせん分子は、前に論じたようなDNAおよびRNA分子を合成するための、当分野で知られている任意の方法によって作製することができる。これらの方法には、当分野でよく知られているオリゴデオキシリボヌクレオチドおよびオリゴリボヌクレオチドを化学的に合成するための技法、たとえば固相ホスホラミダイト化学合成などがある。あるいはRNA分子を、アンチセンスRNA分子をコードするDNA配列の、in vitroおよびin vivoでの転写によって生成させることができる。このようなDNA配列は、T7またはSP6ポリメラーゼ・プロモーターなどの適切なRNAポリメラーゼ・プロモーターを取り込んでいる、非常にさまざまなベクターに取り込ませることができる。あるいは、使用するプロモーターに応じて、アンチセンスRNAを構成的あるいは誘導的に合成するアンチセンスcDNA構築体を、細胞株中に安定的に導入することができる。

【0321】

1. 17 治療剤または予防剤に関するアッセイ

本発明は、薬剤の発見において使用して、MSを治療または予防するための作用剤の有効性を同定または確認するためのアッセイも提供する。候補物質を、MSを有する被験体のMSFまたはMSPIのレベルをMSを有していない被験体で見られるレベルに回復させる能力、またはMSの実験動物モデルと類似の変化を生じさせる能力に関してアッセイすることができる。MSを有する被験体のMSFまたはMSPIのレベルをMSを有していない被験体で見られるレベルに回復させることができるか、あるいはMSの実験動物モデルと類似の変化を生じさせることができる作用剤は、他の薬剤を発見するためのリード物質として使用することができ、あるいは治療的に使用することができる。MSFおよびMSPIの発現は、好ましい技術、イムノアッセイ、ゲル電気泳動、次に視覚化、MSPI活性の検出、または本明細書で教示しているか当業者に知られている任意の他の方法によってアッセイすることができる。このようなアッセイを使用して、臨床的調査または薬剤開発において、候補薬剤をスクリーニングすることができ、この場合豊富なMSFまたはMSPIが、臨床疾患に関する代理マーカーとして働くことができる。

10

【0322】

さまざまな特定の実施形態では、*in vitro*アッセイを、被験体の疾患と関連がある細胞タイプの代表的な細胞に関して行って、作用剤がそのような細胞タイプに対して望ましい影響があるかどうかを決定することができる。

【0323】

治療に使用する作用剤は、ヒトで試験する前に、ラット、マウス、ニワトリ、ウシ、サル、ウサギなどを含むが、それらに限らない適切な動物モデル系で試験することができる。*in vivo*での試験に関しては、ヒトに投与する前に、当分野で知られている任意の動物モデル系を使用することができる。MSの動物モデルの例には、実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)(Steinman(1999)Neuron、24:511~514)だけには限られないが、これがある。本発明の開示に基づいて、1つまたは複数のMSPIをコードする1つまたは複数の遺伝子の「ノックアウト」突然変異体を用いて、トランスジェニック動物を生成することも当業者には明白である。遺伝子の「ノックアウト」突然変異体とは、突然変異した遺伝子を発現させない、あるいは異常な形または低レベルで発現させる突然変異体であり、したがって遺伝子産物に関する活性は、ほとんど存在しないかあるいは全く存在しない。トランスジェニック動物は哺乳動物であることが好ましく、トランスジェニック動物はマウスであることがより好ましい。

20

30

【0324】

一実施形態では、MSPIの発現を調節する候補物質を、ヒト以外の動物(たとえばマウス、ラット、サル、ウサギ、およびモルモット)において、好ましくはMSPIを発現するMS用のヒト以外の動物モデルにおいて同定する。この実施形態に従って、候補物質または対照物質を動物に投与し、1つまたは複数のMSPIの発現に対する候補物質の影響を決定する。1つのMSPI(または複数のMSPI)の発現を変化させる候補物質は、候補物質で処理した動物または動物群中の選択した1つまたは複数のMSPI(またはそれをコードするmRNA)のレベルを、対照物質で処理した動物または動物群中のMSPIまたはmRNAのレベルと比較することによって、同定することができる。当業者に知られている技法を使用して、たとえば*in situ*ハイブリダイゼーションにおいて、mRNAおよびタンパク質レベルを決定することができる。動物を殺傷して、あるいは殺傷せずに、候補物質の影響をアッセイすることができる。

40

【0325】

他の実施形態では、MSPIまたは生物学的に活性があるその一部分の活性を調節する候補物質を、ヒト以外の動物(たとえばマウス、ラット、サル、ウサギ、およびモルモット)において、好ましくはMSPIを発現するMS用のヒト以外の動物モデルにおいて同定する。この実施形態に従って、候補物質または対照物質を動物に投与し、MSPIの活性に対する候補物質の影響を決定する。1つのMSPI(または複数のMSPI)の活性を

50

変化させる候補物質は、候補物質で処置した動物および候補物質で処置した動物をアッセイすることによって、同定することができる。MSP Iの活性は、MSP Iの細胞の第2のメッセンジャー（たとえば細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）の誘導を検出すること、MSP Iまたはその結合パートナーの触媒または酵素活性を検出すること、レポーター遺伝子（たとえば、ルシフェラーゼまたは緑色蛍光タンパク質などの検出可能なマーカーをコードする核酸に動作可能に連結している、本発明のMSP Iに対応する制御要素）の誘導を検出すること、または細胞応答（たとえば、細胞分化または細胞増殖）を検出することによって、評価することができる。当業者に知られている技法を利用して、MSP Iの活性の変化を検出することができる。（たとえば、米国特許第5,401,639号を参照のこと）。

10

【0326】

他の実施形態では、1つのMSP I（または複数のMSP I）のレベルまたは発現を調節する候補物質を、MSを有するヒト、好ましくは重度のMSを有するヒトにおいて同定する。この実施形態に従って、候補物質または対照物質をヒト被験体に投与し、MSP I発現に対する候補物質の影響を、生物試料（たとえばCSF、血清、血漿、または尿）中のMSP IまたはこれをコードするmRNAの発現を分析することによって決定する。MSP Iの発現を変化させる候補物質は、対照物質で処置した被験体または被験体群中のMSP IまたはこれをコードするmRNAのレベルと、候補物質で処置した被験体または被験体群中のそれを比較することによって、同定することができる。あるいは、MSP Iの発現の変化は、候補物質の投与の前後に、被験体または被験体群中のMSP IまたはこれをコードするmRNAのレベルを比較することによって、同定することができる。当業者に知られている技法を使用して、生物試料を得て、そのmRNAまたはタンパク質の発現を分析することができる。たとえば、本明細書に記載する好ましい技術を使用して、MSP Iのレベルの変化を評価することができる。

20

【0327】

他の実施形態では、1つのMSP I（または複数のMSP I）の活性を調節する候補物質を、MSを有するヒト、好ましくは重度のMSを有するヒトにおいて同定する。この実施形態では、候補物質または対照物質をヒト被験体に投与し、MSP Iの活性に対する候補物質の影響を決定する。MSP Iの活性を変化させる試験用候補物質である化合物は、対照物質で処置した被験体からの生物試料と、候補物質で処置した被験体からの試料を比較することによって、同定することができる。あるいは、MSP Iの活性の変化は、候補物質の投与の前後に、被験体または被験体群中のMSP Iの活性を比較することによって、同定することができる。MSP Iの活性は、生物試料（たとえばCSF、血清、血漿、または尿）中のMSP Iの細胞シグナル変換経路誘導（たとえば細胞内 Ca^{2+} 、ジアシルグリセロール、IP3など）、MSP Iまたはその結合パートナーの触媒または酵素活性、または細胞応答、たとえば細胞分化または細胞増殖を検出することによって、評価することができる。当業者に知られている技法を使用して、MSP Iの下流エフェクターの誘導の変化、または細胞応答の変化を検出することができる。たとえば、RT-PCRを使用して、下流エフェクターの誘導の変化を検出することができる。

30

【0328】

好ましい実施形態では、対照被験体（たとえばMSを有していないヒト）中で検出されるレベルに対するMSP Iのレベルまたは発現を調節する候補物質を、さらなる試験または治療用途に選択する。他の好ましい実施形態では、対照被験体（たとえばMSを有していないヒト）中で見られる活性に対するMSP Iの活性を変化させる候補物質を、さらなる試験または治療用途に選択する。

40

【0329】

他の実施形態では、MSと関連がある1つまたは複数の症状の重度を低下させる候補物質を、MSを有するヒト被験体、好ましくは重度のMSを有する被験体において同定する。この実施形態に従って、候補物質または対照物質を被験体に投与し、MSの1つまたは複数の症状に対する候補物質の影響を決定する。1つまたは複数の症状を低下させる候補物

50

質は、対照物質で処置した被験体と候補物質で処置した被験体を比較することによって、同定することができる。MSに精通している医師に知られている技法を使用して、候補物質がMSと関連がある1つまたは複数の症状を低下させるかどうかを決定することができる。たとえば、臨床的再発率、新しいMRI病巣の進行を低下させ、障害の進行を遅らせ、臨床的回復の速度を高め、MRIの血液-脳関門の状態を回復させ、あるいはMRI病巣の容積の増大を遅らせ、MSを有する被験体の希突起膠細胞、軸再有髓化を保護する候補物質は、MSを有する被験体の治療に有益であると思われる。

【0330】

好ましい実施形態では、MSを有するヒトにおいて、MSと関連がある1つまたは複数の症状の重度を低下させる候補物質を、さらなる試験または治療用途用を選択する。

10

【0331】

1. 18 治療および予防組成物、およびそれらの使用

本発明は、治療（および予防）の方法であって、有効量の活性物質を被験体に投与することを含む方法を提供する。本明細書で使用する「活性物質」は、MSP I、MSP I断片、MSP I 関連ポリペプチド、抗MSP I抗体、抗MSP I抗体の断片、およびMSP Iの発現を調節する作用剤、たとえばMSP Iのアゴニストおよびアンタゴニストを含む。好ましい態様では、作用剤は実質的に精製されている（たとえば、効果を制限するかあるいは望ましくない副作用を生み出す物質は実質的に含まない）。被験体は好ましくは動物であり、好ましくは哺乳動物であり、最も好ましくはヒトである。

【0332】

作用剤が核酸を含むときに使用することができる処方物および投与法は、前に記載している。他の適切な処方物および投与経路は、以下に記載する。本明細書で使用する「薬剤組成物」は、活性物質、場合によっては薬剤として許容される担体を含む。

20

【0333】

たとえば、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロ・カプセルの被包、作用剤を発現することができる組換え細胞、受容体仲介エンドサイトーシス（たとえばWu and Wu、1987、J. Biol. Chem. 262:4429~4432を参照のこと）、レトロウイルスまたは他のベクターの一部としての核酸の構築などの、さまざまな送達系が知られており、これらを使用して本発明の作用剤を投与することができる。導入法は、経腸的または非経口的であってよく、これには皮内、筋肉内、腹膜内、静脈内、皮下、鼻腔内、硬膜外、および経口経路があるが、これらだけには限られない。作用剤は任意の好都合な経路、たとえば注入または多量注射によって、上皮または粘膜皮膚の内層（たとえば口腔粘膜、直腸および腸管粘膜など）を介した吸収によって投与することができ、他の生物学的に活性がある作用剤と共に投与することができる。投与は全身性または局所性であってよい。さらに、心室内およびくも膜下注入を含めた任意の適切な経路によって、本発明の薬剤組成物を中枢神経系に導入することが望ましいと思われる、心室内注入は、たとえばオマヤ・レザバーなどのレザバーに結合させた心室内用カテーテルによって、容易にすることができる。たとえば吸入器またはネブライザー、およびエアロゾル剤を含む処方物を使用することによって、肺への投与も行うことができる。

30

【0334】

特定の実施形態では、治療を必要とする領域に局所的に、本発明の薬剤組成物を投与することが望ましいと思われる。このことは、たとえば非制限的に、手術中の局所的注入によって、局所的施用、たとえば注入によって、カテーテルによって、あるいはインプラントによって行うことができ、前記インプラントは多孔性、非多孔性、またはシアラスティック（sialastic）膜のような膜、または繊維を含めたゲル状物質である。一実施形態では投与は、CSFへの、または神経が退化した部位（またはその前の部位）での、あるいはCNS組織への直接的な注入によるものであってよい。

40

【0335】

他の実施形態では、作用剤を小胞、特にリポソームに送達することができる（たとえばLanger、1990、Science 249:1527~1533; Treat 他、

50

in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss New York, pp. 353~365 (1989); Lopez-Berestein, ibid., pp. 317~327を参照のこと、同書全般を参照のこと)。

【0336】

他の実施形態では、放出制御系で作用剤を送達することができる。一実施形態では、ポンプを使用することができる (Langer 上記、Sefton、1987、CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201; Buchwald 他、1980、Surgery 88:507; Saudek 他、1989、N. Engl. J. Med. 321:574を参照のこと)。他の実施形態では、ポリマー物質を使用することができる (Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Press, Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley New York (1984); Ranger and Peppas, J. 1983, Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61を参照のこと。Levy 他、1985、Science 228:190; During 他、1989、Ann. Neurol. 25:351、Howard 他、1989、J. Neurosurg 71:105も参照のこと)。他の実施形態では、放出制御系を治療標的、たとえば CNS の近くに置くことができ、ごくわずかな全身用量が必要とされる (たとえば Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, 上記、vol. 2, pp. 115~138 (1984))。

【0337】

他の放出制御系は、Langer (1990、Science 249:1527~1533) による概説中に論じられている。

【0338】

本発明の作用剤がタンパク質をコードする核酸である、特定の実施形態では、上記のように核酸を *in vivo* に投与することができる。

【0339】

本発明は、薬剤組成物も提供する。このような組成物は、治療上有効量の作用剤、および薬剤として許容される担体を含む。特定の実施形態では、「薬剤として許容される」という語は、連邦または州政府の制御機関によって認められているか、あるいは米国薬局方、または動物、特にヒトにおける使用に関する、他の一般に認められている薬局方中に列挙されていることを意味する。「担体」という語は、治療物質がそれと共に投与される、希釈剤、アジュバント、添加剤、またはビヒクルのことである。このような薬剤担体は、水、および石油、動物、野菜または合成源の油を含めた油など、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、胡麻油などの、滅菌された液体であってよい。薬剤組成物を静脈内に投与するときは、水が好ましい担体である。生理食塩水溶液および水性デキストロスおよびグリセロール溶液を、液状担体、特に注射溶液として使用することもできる。適切な医薬添加剤には澱粉、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦、米、小麦粉、チョコレート、シリカ・ゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキム・ミルク、グリセロール、プロピレングリコール、水、エタノールなどがある。望むならば組成物は、微量の湿潤剤または乳化剤、または pH 緩衝剤も含んでよい。これらの組成物は、溶液、懸濁液、乳濁液、錠剤、ピル、カプセル、粉末、徐放性処方物などの形をとることができる。組成物は、伝統的な結合剤および担体、例えばトリグリセリドなどと共に、坐薬として調合することができる。経口処方物は、製薬グレードのマニトール、ラクトース、澱粉、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどの標準的な担体を含むことができる。適切な薬剤

担体の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」、Ed. E. W. Martin、ISBN、0-912734-04-3、MacK Publishing Co. 中に記載されている。このような組成物は、好ましくは精製された形である治療上有効量の作用剤、および適量の担体を含んでおり、したがって被験体に正確に投与するための形を与える。処方物は、投与の形式に適合させなければならない。

【0340】

特定の実施形態では、決まった手順に従って、ヒト被験体への静脈内投与に適合させた薬剤組成物として、組成物を調合する。典型的には、静脈投与用の組成物は、滅菌された等張の水性緩衝液に溶けた溶液である。必要な場合、組成物は可溶化剤、および注射部位の痛みを和らげるための、リドカインなどの局所麻酔薬を含んでもよい。一般に、成分は別々に、あるいはたとえば乾性の凍結乾燥した粉末または水を含まない濃縮物として、活性剤の量を示すアンプルまたは小プラ容器 (sachet) などの密閉型容器中に単位剤形に1つに混合して、供給される。組成物を注入によって投与する場合、滅菌された製薬グレードの水または生理食塩水を含む注入容器に、組成物を分配することができる。組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射用の滅菌水または生理食塩水のアンプルを与えることができる。

10

【0341】

本発明の作用剤は、中性または塩形として調合することができる。薬剤として許容される塩には、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などから誘導される遊離アミノ基と共に形成される塩、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどから誘導される遊離カルボキシル基と共に形成される塩がある。

20

【0342】

MSの治療において有効であろう本発明の作用剤の量は、標準的な臨床技法によって決定することができる。さらに、in vitroアッセイを場合によっては行って、最適な用量範囲を同定するのを手助けすることができる。処方物において使用する正確な用量は、活性物質、活性物質の投与経路、および疾患または障害の重度にも依存すると思われ、実行者の判断およびそれぞれの被験体の状態に従って決定すべきである。しかしながら、静脈投与に適した用量範囲は、一般には身体重量1キログラム当たり、活性物質約20～500 µgである。鼻腔内投与に適した用量範囲は、一般には約0.01 pg/身体重量1キログラム～1 mg/身体重量1キログラムである。in vitroまたは動物モデル試験系から誘導された用量応答曲線から、有効用量を推定することができる。

30

【0343】

本発明は、本発明の薬剤組成物の1つまたは複数の成分を充填した1つまたは複数の容器を含む、薬剤パックまたはキットも提供する。場合によってはこのような容器に、薬剤または生物学的製品の製造、使用または販売を規制する政府機関によって定められた形の通知書が付随してよく、この通知書は (a) ヒト投与に関する製造、使用または販売の、機関による承認、(b) 使用説明書、またはこの両方を反映するものである。

40

【0344】

〔実施例〕

2. 実施例1: MSのCSF中で差別的に発現するタンパク質の同定

以下の手順に従って、MSを有する7被験体および7対照被験体からのCSF試料中のタンパク質を、等電点電気泳動、次にSDS-PAGEによって分離させ、分析した。以下で述べるパート2. 1. 1～2. 1. 14 (これを含めた) の手順を、これにより「参照プロトコル」として示す。

【0345】

2. 1 物質および方法

2. 1. 1 試料調製

50

タンパク質のアッセイ (Pierce BCA カタログ番号 23225) を、得られたそれぞれの CSF 試料に行った。タンパク質分離の前に、それぞれの試料を、いくつかのタンパク質を選択的に減少させるために処理して、タンパク質分離を向上させ簡略化し、当該のタンパク質の分析を害するかあるいは制限する可能性があるタンパク質を、除去することによって分析を容易にした。参照によってその全容を取り込んである WO 99/63351、特に 3 ページおよび 6 ページを参照のこと。

【0346】

CSF からのアルブミン、ハプトグロビン、トランスフェリンおよび免疫グロブリン G (IgG) の除去を (「CSF 減少」)、親和性クロマトグラフィーの精製ステップによって行い、このステップでは試料を、固定化された抗体を含む一連の Hi-Trap (商標) カラムに通してアルブミン、ハプトグロビン、およびトランスフェリンを選択的に除去し、そして固定化されたプロテイン G を含む該カラムに通して免疫グロブリン G を選択的に除去した。Hi-Trap (商標) カラム (プロテイン G-セファロース Hi-Trap カラム (1 ml) Pharmacia カタログ番号 17-0404-01) 中に含まれるプロテイン G-セファロースに抗体を結合させることによって、タンデムに組み立てた 2 つの親和性カラムを作製した。このことは、以下の溶液をカラム中で順次循環させることによって行った: (1) ダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水 (Gibco BRL カタログ番号 14190-094)、(2) 濃縮抗体溶液、(3) 200 mM の炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.35、(4) 架橋溶液 (200 mM の炭酸ナトリウム緩衝液、pH 8.35、20 mM のジメチルピメリイミデート)、および (5) 500 mM のエタノールアミン、500 mM の NaCl。次いで第 3 の (非誘導体化) プロテイン G Hi-Trap カラムを、組み立てたタンデムカラムの下端に結合させた。

【0347】

Akta Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System を使用して、クロマトグラフィー手順を自動化し、一連の 7 つまでのランを順次行うことができるようにした。試料を一連の 3 つの Hi-Trap カラムに通し、その中では親和性クロマトグラフィー媒体が前述のタンパク質に選択的に結合し、このことによってそれらを試料から除去した。カラム充填および洗浄段階中にカラムから溶出した非結合物質 (「素通り画分」)、Immunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce カタログ番号 21013) を用いた溶出ステップによって溶出させた、結合タンパク質 (「結合/溶出画分」) の画分 (典型的にはチューブ 1 本当たり 3 ml) を回収した。非結合物質を含む溶出物を画分に回収し、それを集め、遠心分離超濾過によって脱塩/濃縮し、2 D PAGE によってさらなる分析を待つばかりの状態にして保存した。

【0348】

約 100 ~ 150 μ g の総タンパク質を含む欠乏 CSF の容積を等分し、等しい容積の 10% (w/v) SDS (Fluka 71729)、2.3% (w/v) ジチオスレイトール (BDH 443852A) を加えた。試料を 95°C で 5 分間加熱し、次いで 20°C に放冷した。次いで 125 μ l の以下の緩衝液を試料に加えた:

8 M 尿素 (BDH 452043w)

4% CHAPS (Sigma C3023)

65 mM ジチオスレイトール (DTT)

2% (w/v) Resolytes (商標) 3.5-10 (BDH 44338 2x)

この混合物を攪拌し、15°C において 13000 rpm で 5 分間遠心分離し、等電点電気泳動によって上清を分析した。

【0349】

2.1.2 等電点電気泳動

等電点電気泳動 (IEF) を、製造者の教示書に記載された手順に従い、Immobiline (商標) Dry Strip Kit (Pharmacia Bio Tech) を使用して行った。Instructions for Immobililine (商標) D

10

20

30

40

50

ry Strip Kit Pharmacia、#18-1038-63、Edition ABを参照のこと（参照によってその全容を本明細書に取り込んである）。Immobilized pH Gradient (IPG) ストリップ（18 cm、pH 3～10 非線形ストリップ、Pharmaciaカタログ番号17-1235-01）を、Immobiline Dry Strip Kit Users Manual中に記載されたように、8 M尿素、2 % (v/v) CHAPS、10 mMのDTT、2 % (w/v) Resolytes 3.5-10の溶液中で、20℃において一晩、再水和させた。IEF 10
に関しては、50 mlの上清（前述のように調製したもの）をストリップ上に載せ、カップ
充填機をストリップの基端に置いた。次いで載せたゲルを鉱油（Pharmacia 17-3335-01）で覆い、Pharmacia EPS 3500 XL パワー・サプライ
（Cat 19-3500-01）を使用して、以下のプロファイルに従い、電圧をストリ
ップに即座に加えた：

開始電圧 = 300 Vで2時間

リニア・ランプ = 300 V～3500 Vで3時間以上

3500 Vで19時間保つ

プロセスのすべての段階に関して、電流制限は12個のゲルに関して10 mAに設定し、
ワット制限は5 Wまでにした。温度は操作全体を通して20℃に保った。

【0350】

2. 1. 3 ゲル平衡化およびSDS-PAGE

最後の19時間のステップの後、ストリップを即座に取り出し、以下の組成：6 M尿素、
2 % (w/v) DTT、2 % (w/v) SDS、30 % (v/v) グリセロール（Fluka 49767）、0.05 M Tris/HCl、pH 6.8（Sigma Cat T-1503）の第1の溶液中に、20℃において10分間浸した。ストリップを第1の溶
液から取り出し、以下の組成：6 M尿素、2 % (w/v) ヨードアセトアミド（Sigma I-6125）、2 % (w/v) SDS、30 % (v/v) グリセロール、0.05
M Tris/HCl、pH 6.8の第2の溶液中に、20℃において10分間浸した。
第2の溶液から取り出した後、Hochstrasser他、1988、Analytical Biochemistry 173: 412～423（参照によってその全容を
本明細書に取り込んである）に従い、ストリップをSDS-PAGE用の担体ゲル上に載
せ、以下に詳述したように改変させた。 20
30

【0351】

2. 1. 4 担体ゲルの作製

以下の寸法：23 cm幅×24 cm長（後プレート）、23 cm幅×24 cm長、中央の19 cm中
に2 cmの深さのノッチ（前プレート）の2枚のガラス・プレートの間に、ゲルをキャスト
ィングした。SDS-PAGEゲルの共有結合を助長するために、後プレートを、g-メ
タクリル-オキシプロピルトリメトキシシランをエタノールに溶かした0.4 %溶液（B
ind Silane J Pharmaciaカタログ番号17-1330-01）で処理
した。前プレートは、ジメチルジクロロシランをオクタメチルシクロオクタシラン（R
epel Silane J Pharmaciaカタログ番号17-1332-01）に溶
かした2 %溶液で処理して、ゲルの接着性を低下させた。過剰な試薬を水で洗浄すること
によって除去し、プレートを乾燥させた。この段階で、ゲルを識別するためのものとして
、プレートのコーティングされた表面を識別するためのマーカーとして、接着性バーコード
を、それがゲル・マトリックスと接触しないと思われるような位置で、後プレートに結
合させた。 40

【0352】

乾燥させたプレートを、ゲル・サンドイッチ13個分の容量のキャスティング・ボックス
に組み込んだ。それぞれのサンドイッチの上部および底部プレートを、厚さ1 mm、幅2.
5 cmのスペーサーによって間隔をあけた。サンドイッチにアセテートシートを挿入して、
ゲル重合後のサンドイッチの分離を容易にした。次いで、Hochstrasser他の
引用書に従って、キャスティングを行った。 30

【0353】

9～16%の線状ポリアクリルアミド勾配ゲルをキャストイングし、Angelique 勾配ゲル・キャストイング・システム (Large Scale Biology) を使用して、前プレートのノッチの2cm下のレベルの地点まで広げた。ストック溶液は以下の通りであった。アクリルアミド (水中に40%) は、Servaからのものであった (カタログ番号10677)。架橋剤は、合計出発モノマー含有率が濃度2.6% (w/w) であるPDA (BioRad161～0202) であった。ゲル緩衝液は、0.375M Tris/HCl、pH8.8であった。重合触媒は、0.05% (v/v) TEMED (BioRad161～0801) であり、開始剤は0.1% (w/v) APS (BioRad161～0700) であった。SDSはゲル中に含まれておらず、濃縮ゲルは使用しなかった。キャストイングしたゲルを20℃で一晩重合させ、次いで6mlのゲル緩衝液を含む密閉ポリエチレン・バッグ中に4℃で保存し、4週間以内に使用した。

10

【0354】

2. 1. 5 SDS-PAGE

0.5% (w/v) アガロース (Fluka Cat05075) を、泳動用バッファー (0.025MのTris、0.198Mのグリシン (Fluka50050)、1% (w/v) SDS、微量のプロモフェノールブルーを補った) 中に溶かした溶液を作製した。アガロース懸濁液を、アガロースが溶けるまで、攪拌しながら70℃に加熱した。担体2次元ゲルの上部をアガロース溶液で満たし、平衡化させたストリップをアガロース中に置き、そのゲルが2次元ゲルと密に接触するまで、パレット・ナイフを用いて穏やかに叩いた。Ames 他、1995、Electrophoresis 16:1255～1267 (参照によってその全容を本明細書に取り込んである) によって記載されたように、ゲルを2次元操作タンク中に置いた。バッファーのレベルが、ポリアクリルアミドを含む2次元ゲルの領域の上部よりもわずかに高くなり、その結果、活性ゲル領域の効率の良い冷却が得られるまで、タンクを泳動用バッファー (前述のもの) で満たした。泳道用バッファーをゲルによって形成された上部のバッファー区画に加え、次いでConsort E-833 パワー・サプライを使用して、ゲルに電圧を即座に加えた。1時間かけて、ゲルを20mA/ゲルで泳動した。6個のゲルを含むタンクに関しては、ワット制限は150Wに設定し、電圧制限は600Vに設定した。1時間後、電圧制限およびワット制限を前と同じにして、プロモフェノールブルーのラインがゲルの底部から0.5cmになるまで、次いでゲルを40mA/ゲルで泳動した。バッファーの温度は泳動全体を通して16℃に保った。ゲルは全く同様には泳動されなかった。

20

30

【0355】

2. 1. 6 染色

電気泳動の泳動終了時に、固定用にゲルをタンクから即座に取り外した。ゲル・カセットの上部プレートを注意深く外し、底部プレートに付着したゲルは残した。次いでゲルが付着している底部プレートを、12個のゲルを収容することができる染色装置中に置いた。40% (v/v) エタノール (BDH28719)、10% (v/v) 酢酸 (BDH100016X)、50% (v/v) 水 (MilliQ-Millipore) の固定溶液中にゲルを完全に浸し、この溶液をゲル上で連続的に循環させた。一晩のインキュベーションの後に、固定剤をタンクから排出し、7.5% (v/v) 酢酸、0.05% (w/v) SDS、92.5% (v/v) 水中に30分間浸すことによって、ゲルを下塗りした。次いで下塗り溶液を排出し、ピリジニウム、4-[2-[4-(ジペンチルアミノ)-2-トリフルオロメチルフェニル]エチル]-1-(スルホブチル)-、分子内塩の染色溶液中に4時間完全に浸すことによって、ゲルを染色した。この染色溶液は、この染料 (DMSO中に2mg/ml) を7.5% (v/v) 酢酸水溶液に溶かしたストック溶液を希釈して、最終濃度1.2mg/Lにすることによって調製した。染色溶液は、使用前に0.4μmのフィルター (Durapore) を介して真空濾過した。

40

【0356】

2. 1. 7 ゲルの画像化

50

コンピュータ可読の出力を、好ましいスキヤナ (Oxford Glycosciences、Oxford UK、上記のセクション1.2に記載) を用いて、蛍光染色したゲルを画像化することによって作製した。このスキヤナは、ゲル担体および4つの完全な蛍光マーカー (M1、M2、M3、M4と指定する) を有しており、これらのマーカーを使用して画像の形状を正し、これらはスキヤニングが正しく行われたことを確認するための、品質を調節する特徴点である。

【0357】

スキヤニングに関しては、ゲルを染色液から取り出し、水ですすぎ、簡単に空気乾燥させ、好ましいスキヤナ上で画像化した。画像化した後、少量の染色溶液を含むポリエチレン・バッグ中にゲルを密閉し、次いで4℃で保存した。

10

【0358】

2.1.8 データのデジタル分析

WO98/23950、セクション5.4および5.5中に記載されたように (参照によって本明細書に取り込んである)、以下により詳細に述べるように、データを処理した。

【0359】

スキヤナからの出力を、MELANIE 7 II 2D PAGE分析プログラム (Release 2.2、1997、BioRad Laboratories、Hercules、California、カタログ番号170-7566) を使用し最初に処理して、位置合わせポイントM1、M2、M3、およびM4を自動検出し、画像を自動的に切り取り (すなわち、ゲルの境界標識の外側に存在するスキヤニングされた画像、たとえば基準フレームの領域由来のシグナルを排除する)、埃による人工産物を濾過除去し、特徴点を検出および定量化し、GIF形式で画像ファイルを作製した。以下のパラメータを使用して、特徴点を検出した：

20

滑らかさ = 2

ラプラシアン閾値 50

部分閾値 1

飽和度 = 100

ピーク = 0

最小周囲 = 10

【0360】

30

2.1.9 pIおよびMW値の割り当て

境界標識の識別を使用して、画像中に検出された特徴点のpIおよびMWを決定した。CSF1～CSF12と指定した、12個の境界標識の特徴点を、集めた試料から得た標準的なCSF画像中で識別した。これらの境界標識の特徴点は図1で識別し、表Xで識別されるpIおよび/またはMW値を割り当てた。

【0361】

【表56】

表X この実験で使用した境界標識の特徴点

標識名	pI	MW (Da)	標識名	pI	MW (Da)
CSF1	5.96	185230	CSF7	4.78	41340
CSF2	5.39	141700	CSF8	9.2	40000
CSF3	6.29	100730	CSF9	5.5	31900
CSF4	5.06	71270	CSF10	6.94	27440
CSF5	7.68	68370	CSF11	5.9	23990
CSF6	5.67	48090	CSF12	6.43	10960

10

【0362】

可能な限り多くのこれらの境界標識を、データ・セットのそれぞれのゲル画像中で識別した。次いで研究ゲル中のそれぞれの特徴点に、2つの最近の境界標識に対する直線捕間法または外挿法（MELANIE7-IIソフトウェアを使用する）によってpI値を割り当て、2つの最近の境界標識に対する直線捕間法または外挿法（MELANIE7-IIソフトウェアを使用する）によってMW値を割り当てた。

20

【0363】

2. 1. 10 主要マスター画像との整合

画像を編集して、埃などの粗悪な人工産物を除去し、タンパク質の特徴点の汚れなどの粗悪な異常がある、あるいは充填または全体的な画像強度が最も強烈な特徴点を越える識別を可能にするには低すぎる、あるいは解像度が特徴点の正確な検出を可能にするには悪すぎる画像は棄却した。次いで画像を、試料セット全体からの1つの共通な画像と対にすることによって比較した。この共通画像、「主マスター画像（primary master image）」は、タンパク質充填量（最大充填量は最大の特徴点検出と呼応する）、充分解明されたミオグロビン領域（ミオグロビンは内部標準として使用した）、および一般的な画質に基づいて選択した。さらに、主要なマスター画像は、分析中に含まれているこれらすべての一般的な代表であるような画像であるように選択した（主マスター画像が研究ゲルの代表的なものであることを判断した、このプロセスは以下に記載する方法で再チェックし、主マスターゲルが代表的なものではない場合は、それを棄却し、代表的な主マスターゲルを発見するまでそのプロセスを繰り返した）。

30

【0364】

それぞれの残りの研究ゲルの画像を主マスター画像と個別に整合させて、その結果、主マスター画像とそれぞれ個々の研究ゲル画像の間の共通のタンパク質の特徴点を、以下に記載したように対にした。

40

【0365】

2. 1. 11 試料間の交差整合試験

差別的に発現される特徴点を識別する目的で多数の試料の統計分析を容易にするために、それぞれの研究ゲルの形状を、タンパク質特徴点のそのパターンと主マスターのそれとの間の整列を最高のものにするために、以下のように調節した。それぞれの研究ゲルの画像を、多重解像度解析手順を使用して、主マスター画像の形状に個別に変換した。この手順によって、1つの試料から他の試料への電気泳動分離プロセスの、物理的パラメータのわずかな変化によってもたらされる歪みに関して、画像の形状が補正される。観察される変化は、発見された歪みが単なる形状的歪みではなく、局所的および全体的規模で変化している滑らかな流れであるような変化である。

50

【0366】

多重解像度モデリングにおける基本原則は、滑らかなシグナルを「スケール・スペース」からの放射としてモデル化できることであり、連続的に細かい規模で、低い解像度近似値で細目を加えて、高い解像度シグナルを得ることである。このタイプのモデルを、フローフィールドのベクター（基準画像のそれぞれのピクセル位置で定義する）に適用し、任意の滑らかさの流れを比較的低い自由度でモデル化することができる。それぞれの画像は、最初の画像に由来するスタックまたはピラミッドに最初に還元するが、それぞれのレベルでそれぞれの方向に、平滑化し解像度を2分の1に低下させ（ガウス・ピラミッド）、対応する異なる画像もそれぞれのレベルで計算し、平滑化画像とその元の画像の間の違いを表す（ラプラシアン・ピラミッド）。したがってラプラシアン画像は、異なる規模の画像の詳細を表す。

10

【0367】

任意の2つの所与の画像間の歪みを評価するために、ピラミッドのレベル7（すなわち7回連続で解像度を低下させた後）で、計算を行った。ラプラシアン画像は16×16ピクセルのグリッドに分割し、それは両方向の隣接グリッド位置間で50%重複しており、基準および試験画像上の対応するグリッド・スクエア間の相互補正を計算した。次いで歪みの変位を、補正マトリックスの最大値の位置によって与えた。個々のレベルですべての変位を計算した後、これらをピラミッドの次のレベルに挿入し、試験画像に適用し、次いで変位に対するさらなる補正を、次の規模で計算した。

【0368】

解析法によって、主マスター画像、および他の試料に関する画像中の、共通の特徴点の間の良い整列がもたらされた。MELANIE7II 2D PAGE分析プログラムを使用して、主マスターとそれぞれの他の画像の間の、約500～700の整合した特徴点の対を計算および記録した。このプログラムの精度は、前に記載した方式の画像の整列によって著しく高まった。精度をさらに改善するために、MelView相互作用編集プログラムにおいて、すべての対合を最後に目で調べ、残りの認識上不正確な対合は除去した。このような認識上不正確な対合の数が、好ましい技術の全体的な再現性を超える場合（同じ生物試料の繰り返しの分析によって測定される）、主マスター・ゲルであるように選択したゲルは、主マスター・ゲルとして働くための代表的な研究ゲルには不十分であると判断した。この場合、主マスター・ゲルとして選択したゲルは棄却し、異なるゲルを主マスター・ゲルとして選択し、プロセスを繰り返した。

20

30

【0369】

次いで、すべての画像を一緒に加えて複合マスター画像を作成し、すべての構成画像のゲル特徴点すべての位置および形状を、以下に記載するようにこの複合マスターの上に重ね合わせた。

【0370】

最初の対すべてを計算、補正および保存した後、第2の工程を行い、これによって元の（解析されていない）画像を主マスターの形状に変換した（2回目）。今回はフローフィールドを使用し、対になったゲル特徴点の中心軌跡によって定義した多数のタイ・ポイントを滑らかに挿入することによって計算した。したがって複合マスター画像は、その特徴的な記述子を用いて主マスター画像を初期化することによって作製した。それぞれの画像を主マスターの形状に変換したので、それをピクセル毎に複合マスター画像に合計し、前述の手順によって対にしなかった特徴点も、フロー制御フィールド補正を使用し、その軌跡をマスターの形状に調節した、複合マスター画像の記述子に同様に加えた。

40

【0371】

処理の最終段階を複合マスター画像、およびその特徴的な記述子に施した。研究中のすべての画像からのすべての特徴点が、共通の形状に変換されることがここで示される。特徴点と一緒に、それらの間の重複度に従って、関連セットまたは「群」に分類した。次いでそれぞれの群に、特有の識別指数、分子群指数（MCI）を与えた。

【0372】

50

M C Iによって、異なる画像上の1組の整合させた特徴点が識別される。したがってM C Iは、異なる試料の2次元分離において等しい位置で溶出する、1つまたは複数のタンパク質を表す。

【0373】

2. 1. 12 プロファイルの構築

研究中の成分ゲルすべてを最終的な複合マスター画像に整合させた後、それぞれの特徴点の強度を測定し保存した。この分析の最終結果は、それぞれの識別した特徴点に関する、1) 複合マスター画像中の対応する特徴点に対する特有の識別コード(M C I)、2) ゲル中の特徴点のx、y座標、3) 特徴点の等電点(p I)、4) 特徴点のみかけの分子量(MW)、5) シグナル値、6) それぞれの前述の測定値に関する標準偏差、および7) それぞれの特徴点のM C Iと、この特徴点を整合させたマスター・ゲルを関連付ける方法を含むデジタル・プロファイルを生成したことであった。Laboratory Information Management System(LIMS)によって、このM C Iプロファイルが、M C Iがそこから生成した実際保存したゲルに対して追跡可能であり、したがってゲル・プロファイルのデータベースのコンピュータ分析によって同定したタンパク質を、探索することができた。LIMSによって、元の試料または患者に対してプロファイルを追跡することもできた。

【0374】

2. 1. 13 プロファイルの統計分析

以下に示す相補的統計戦略を列挙した順に使用して、マスター群中のM C IからM S Fを同定した。

【0375】

(a) ウィルコクソンの順位和検定。この検定を、それぞれのM C I単位に関して対照とM S試料の間で行った。0.05以下のp値を記録したM C Iを、統計上有意なM S Fとして95%の選択率で選択した。

【0376】

(b) 第2の非重複性選択戦略は、性質の有無のみに基づくものである。この手順を使用して、このような性質基準、すなわち有無のみに基づいて潜在的なM S FであるそれぞれのM C Iに関して、対照試料およびM S試料の特徴点の存在パーセンテージを計算した。M S試料で95%以上の特徴点の存在パーセンテージ、および対照試料で15%以下の特徴点の存在パーセンテージを記録したM C Iを、性質の異なるM S Fとして85%の選択率で選択した。選択率が85%である第2集団の性質の異なるM S Fは、対照試料で95%以上の特徴点の存在パーセンテージ、およびM S試料で15%以下の特徴点の存在パーセンテージを記録したM C Iによって形成された。

【0377】

(c) 第3の非重複性選択戦略は、折りたたみの変化に基づくものである。M C I中のM S Fの平均的な正常なタンパク質の存在量の割合を表す、折りたたみの変化を、それぞれの組の対照とM S試料の間でそれぞれのM C Iに関して計算した。折りたたみの変化の平均値に関して、95%の信頼限界を計算した。折りたたみの変化が信頼限界の外側であるM C Iを、有意な折りたたみの変化の閾値の基準を満たすM S Fとして95%の選択率で選択した。M C Iの折りたたみの変化は95%の信頼限界に基づくので、有意な折りたたみの変化の閾値そのものが95%ということになる。

【0378】

この3つの分析戦略を適用することによって、(a) ウィルコクソンの順位和検定によって測定した統計的有意性、(b) 選択した選択率での性質の違い、または(c) 選択した選択率での有意な折りたたみの変化の閾値に基づいてM S Fを選択することができた。

【0379】

2. 1. 14 選択したタンパク質の回収および分析

M S F中のタンパク質をロボットによって切断しおよび処理して、トリプシン消化ペプチドを生成した。トリプシン・ペプチドを、PerSeptive Biosystems

Voyager-DETM STR Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) 質量分析装置を使用した質量分析法によって分析し、選択したトリプシン・ペプチドを、nanoflow (商標) エレクトロ・スプレー・Z スプレー・ソースを備える Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) 質量分析装置 (Micromass Alttrincham, UK) を使用したタンデム質量分析法 (MS/MS) によって分析した。MSPi の部分的なアミノ酸配列決定および同定のために、トリプシン・ペプチドの解釈されていないタンデム質量スペクトルを、SEQUEST 検索プログラム (Eng 他、1994、J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5: 976~989)、version v. C. 1 を使用して検索した。データベースの同定に関する基準には、トリプシンの開裂特異性、データベースから回収したペプチド中の 1 組の a、b および y イオンの検出があった。検索したデータベースは、National Centre for Biotechnology Information (NCBI) によって保持されており、http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ でアクセス可能な余分でないデータベース中の、タンパク質集合体で構築されたデータベースであった。SEQUEST プログラムを使用するスペクトルスペクトル補正による以下のタンパク質の同定結果に従って、MALDI-TOF 質量スペクトルで検出した質量を、同定したタンパク質中のトリプシン消化ペプチドに割り当てた。SEQUEST プログラムを使用した、トリプシン消化ペプチドの解釈されていない MS/MS スペクトルに関する検索によって、アミノ酸配列を同定することができなかった場合、ペプチドのタンデム質量スペクトルを、当分野で知られている方法を使用して手作業で解釈した (ペプチド・イオン低エネルギー断片質量スペクトルを解釈する場合、Gaskell 他、1992、Rapid Commun. Mass Spectrom. 6: 658~662 を参照のこと)。参照によってその全容を本明細書に取り込んである、PCT 出願 No. PCT/GB01/04034 中に記載された方法も、質量スペクトルを解釈するために使用した。

【0380】

3. 実施例 2: MS の診断および治療

以下の実施例は、MS をスクリーニングまたは診断するため、MS 患者の予後を決定するため、MS 治療の有効性を調べるための、本発明の MSPi の使用を例示するものである。以下の実施例は、MS を治療または予防するための、本発明の MSPi の調節物質 (たとえばアゴニストまたはアンタゴニスト) の使用も例示する。カテプシンは、細胞内のタンパク質分解で主要な役割を果たすリソソームのシステイン・プロテイナーゼの、パパイン・スーパーファミリーの一部である (Kirschke, H. and Barrett, A. J. (1987) in Lysosomes: Their role in protein breakdown (Glaumann, H. and Barrard, F. J. eds) 193~238, Academic Press, London)。さらにカテプシン S は、主要な組織適合複合体 (MHC) クラス II 分子による抗原提示に不可欠なようである。カテプシンは、癌 (Hughes 他、(1998) Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 12410~12415)、および神経細胞死 (Isahara 他、Al (1999) NeuroScience 91: 233~249) を含めたいくつかの病状において、推定的な役割を有す可能性があり、例えば海馬の虚血性神経細胞死の後におけるカテプシン B (Yamashima 他、(1998) Eur J Neurosci 5: 1723~33) がある。カテプシン L は、関節炎 (Esser 他、(1994) Arthritis Rheum. 37: 236~247) および腫瘍転移 (Sheahan 他、(1989) Cancer Research 49: 3809~3814) を含めたさまざまな病理過程に関係している可能性がある。多くの他のプロテアーゼと同様に、カテプシン L は不活性前酵素として合成され、その後、成熟酵素のシグナル配列と N 末端の間に位置するアミノ末端前領域の開裂によって、成熟形に加工され (Menar 他、(1998) J Biol Chem 273: 4478~4484)

、その結果アイソフォームが生じる。したがって前領域は、触媒活性を調節することができ、成熟酵素の強力な阻害剤であることが示されている（Carmona他、（1996）Biochemistry 35：8149～8157）。

【0381】

分子量40,820DaおよびpI4.37を有するカテプシンLの発現は、本明細書では、MSを有していない被験体の脳脊髄液（CSF）と比べて、MSを有する被験体のCSF中で、著しく増大することが示されている（表II、MSPi-300を参照のこと）。したがって、CSF中でのカテプシンLの定量検出を使用して、MSを診断し、MSの予後を決定し、あるいはMSに関する治療の有効性を調べることができる。

【0382】

本発明の一実施形態では、カテプシンLの発現、活性、または発現と活性の両方を調節する（たとえば下方調節する）作用剤を、MSの治療または予防を必要とする被験体に投与する。カテプシンLの発現、活性、または発現と活性の両方を調節する抗体は、この目的に適している。さらに、カテプシンLの全体または一部分をコードする核酸、またはカテプシンLの全体または一部分と相補的な核酸を、投与することができる。カテプシンL、またはカテプシンLポリペプチドの断片も、投与することができる。本発明は、カテプシンLの発現またはカテプシンLの活性を調節する他の作用剤を同定するための、スクリーニング・アッセイも提供する。in vitroでのカテプシンLの発現を調節する作用剤は、候補物質で処理した細胞中のカテプシンLの発現と対照物質（たとえば生理食塩水）で処理した細胞中のカテプシンLの発現を比較することによって、同定することができる。カテプシンLの発現を検出するための方法は当分野で知られており、これにはカテプシンLのRNAのレベルを測定すること（たとえばノーザン・ブロット分析またはRT-PCRによって）、およびカテプシンLのタンパク質を測定すること（たとえばイムノアッセイまたはウェスタン・ブロット分析によって）がある。カテプシンLの活性を調節する作用剤は、神経栄養活性または神経保護活性などの、カテプシンLの機能を害するかあるいは機能と拮抗する候補物質の能力と、カテプシンLの同じ機能を阻害する対照物質（たとえば生理食塩水）の能力を比較することによって、同定することができる。カテプシンLの活性を調節することができる作用剤は、MSを治療するための有用な作用剤としてのさらなる開発に適した、作用剤として同定する。

【0383】

このようなアッセイを使用することによって、カテプシンLの活性と拮抗する能力に関して、候補物質を試験することができる。

【0384】

カテプシンLの発現または活性に影響を与えるin vitroで同定された作用剤を、in vivo、MSの動物モデル、またはMSを有する被験体で試験して、その治療有効性を決定することができる。

【0385】

特定の作用剤または作用剤の組合せを使用する、疾患または病状の治療または予防の方法を本明細書で参照すると、このような参照は、疾患または病状の治療または予防用の薬剤の調製において、作用剤または作用剤の組合せを使用することを含むことを意図するものであることが理解されるべきである。

【0386】

本発明は、本出願に記載した個々の実施形態に関して制限されるべきではなく、これらは本発明の個別の態様の単なる例示として考えられる。本発明の範囲内の機能的に均等である方法および装置、さらに本明細書で列挙した方法および装置は、前述の記載および添付の図面から当業者には明らかであろう。このような改良形態および変形形態は、添付の特許請求の範囲内にあると考えられる。本明細書で列挙したそれぞれの参考文献、特許および特許出願の内容は、参照によってその全容をここに取り込んである。

【図面の簡単な説明】

【0387】

10

20

30

40

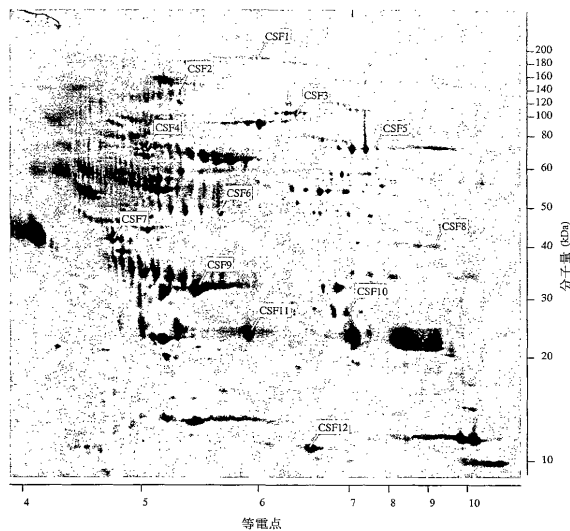
50

【図 1】 C S F の 2 次元電気泳動から得た像を示す図である。C S F 1 ～ C S F 1 2 で示した 1 2 個の境界標識の特徴点を識別するために、注釈を施した。

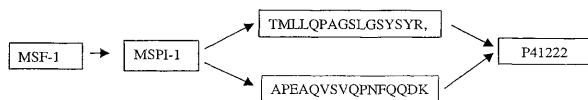
【図 2】 M S F の特徴付け、および M S F と M S P I の関係を示す流れ図である。M S F は、M S F の p I および M W と関連がある特定のペプチド配列を有する M S P I として、あるいはこれによって、さらに特徴付けることができる。本明細書で示すように、M S F は、好ましい技術を使用することによって区別不能な p I および M W を有するが異なるペプチド配列を有する、1 つまたは複数の M S P I を含むことができる。M S P I のペプチド配列を使用して、このようなペプチド配列を含む以前に同定したタンパク質に関する、データベースを検索することができる。以前に同定したタンパク質および／またはそのタンパク質ファミリーのメンバーを認識することができる市販の抗体が、存在するかどうかを確かめることができる。

10

【図 1】



【図 2】



【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
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059604 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/564,
A61K 39/00, A61P 25/00PEREKH, Rajesh, Bhikhu [GB/GB]; The Forum, 86 Mil-
ton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB). ROHLFF,
Christian [DE/GB]; The Forum, 86 Milton Park, Abing-
don, Oxon OX14 4RY (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/00330

(22) International Filing Date: 25 January 2002 (25.01.2002)

(74) Agent: BLAKEY, Alison, Jane; Oxford GlycoSciences
(UK) Ltd, The Forum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxon
OX14 4RY (GB).

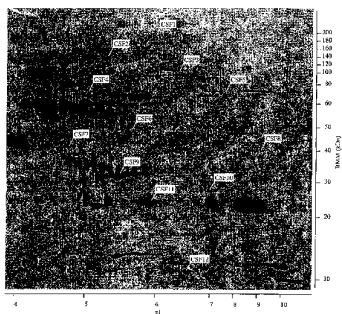
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/264,404 20 November 2001 (20.11.2001) US
60/331,647(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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(71) Applicant (for all designated States except US): OXFORD
GLYCOSCIENCES (UK) LTD [GB/GB]; The Forum, 86
Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KI, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent

[Continued on next page]

(54) Title: PROTEINS, GENES AND THEIR USE FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and prognosis of Multiple Sclerosis, for monitoring the effectiveness of Multiple Sclerosis treatment, identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment and for drug development. Multiple Sclerosis-Associated Features (MSAFs), detectable by two-dimensional electrophoresis of body fluid e.g. cerebrospinal fluid are described. The invention further provides Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) detectable in body fluid e.g. cerebrospinal fluid, preparations comprising isolated MSPIs, antibodies immunospecific for MSPIs, and kits comprising the aforesaid.

WO 02/059604 A2

WO 02/059604 A2 

(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

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.

Published:

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

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

**PROTEINS, GENES AND THEIR USE FOR
DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS**

5

1. INTRODUCTION

The present invention relates to the identification of polypeptides, proteins and protein isoforms that are associated with Multiple Sclerosis and its onset and development, and of genes encoding the same, and to their use for e.g., clinical screening, diagnosis, prognosis, therapy and prophylaxis, as well as for drug screening and drug development.

10

2. BACKGROUND OF THE INVENTION

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory demyelinating disorder with preservation of the axons and considered the most common cause of neurologic disability in young adults. Although the mean age at onset for MS is 30 years, there are two prevalent age groups. The majority of patients are between 21 and 25 years at onset and a smaller percentage are 41 to 45 years of age. In the western world, more than 80 per 100,000 population are effected (Kurtzke, J.F. (1980) *Neurology* (N.Y.), 7:261-279). Several twin studies in Canada and the UK revealed that monozygotic twins are concordant in the order of 30%, compared to 2% in dizygotic twins and siblings (Ebers, G.C. et al. (1986) *New Engl J Med*, 315:1638-42; Mumford, C.J. et al. The British Isles survey of multiple sclerosis in twins. (1994) *Neurology*, 1004:44, 11-15) and the current evidence suggests that multiple genes may interact to increase susceptibility to MS (Noseworthy (1999) *Nature* 399:suppl. A40-A47).

20

While genetics and genotyping may help to define the heritable risk for MS, the utility for diagnosis, prognosis and treatment of MS may be considerably less. It remains still unknown whether MS is a single disease and how it relates to the less common inflammatory-demyelinating central nervous system (CNS) syndromes including neuromyelitis optica, transverse myelitis, Balo's concentric sclerosis, the Marburg variant of acute MS and acute disseminated encephalomyelitis (Noseworthy, Progress in determining the causes and treatment of multiple sclerosis. (1999) *Nature* 399:suppl. A40-A47). Furthermore, no CNS tissue necessary for any gene expression analysis can be obtained for a living patient under normal circumstances. Proteomic approaches appear most suitable for a molecular dissection of such disease phenotypes in the CNS. The entire CNS is largely inaccessible to meaningful mRNA expression-based analyses of primary human material, since post mortem delays in primary human brain tissue affects mRNAs more readily than proteins (Edgar et al. *Molecular Psychiatry* 1999, 4, 173-17). Given that cerebrospinal fluid (CSF) bathes the brain, changes in its protein composition may reveal alterations in CNS protein expression pattern causatively or diagnostically linked to the disease. Reasonable amounts of disease specific proteins (DSPs) are secreted or released into body fluids by diseased tissue in the living patient at the onset and/or during progression of the disease. In many cases these alterations in DSPs will be independent of the genetic makeup of the individual and rather directly related to a set of molecular and cellular alterations which contribute to the pathogenic phenotype (Carpenter J *Psychiatr Res* 1998 32, 191-5).

30

35

40

Postmortem examination of MS patients revealed the presence of multiple lesions

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

(plaques) in the CNS characterized by demyelination, with relative preservation of axons, as well as gliosis and different degrees of inflammation. Although there are certain sites of predilection including the optic nerves, the spinal cord, and the periventricular regions, any part of the brain or cord can be affected (Lumsden, C.E. (1970) In Vinken P.J. Bruyn, G.W. eds., Handbook of Clinical Neurology. Vol. 9. Amsterdam, North Holland, P.P. 217-309). In the majority of inflammatory neurological disorders like MS, little is known about a link between changes at a cellular and/or molecular level and nervous system structure and function.

The diagnosis remains a clinical one. Diagnosis requires the demonstration of lesions disseminated in time and space and the exclusion of other conditions that may produce the same clinical picture. Clinical classification of MS known as the Poser criteria include abnormalities of evoked response and Magnetic Resonance Imaging (MRI), and immunologic abnormalities in the CSF (Poser, C.M. et al. (1983) Ann Neurol 13: 227-231). Symptoms of MS at presentation vary among studied populations but include sensory symptoms in 24% of patients, optic neuritis in 31% of patients, limb weakness in 17% of patients and brain stem and cerebellar symptoms 25% of patients. (Thompson, A.J. et al. (1986) Q.J. Med. 225:69-80). Consequently MS has a wide range of clinical presentations and courses, and the clinical course of any given patient is unpredictable. In the majority of MS patients it begins with a relapsing and remitting course, where episodes of neurological dysfunction last several weeks. Over the course of the disease remissions tend to be less than complete and patients pass into a progressive phase (secondary progression). During this phase of the disease patients develop severe irreversible disabilities. About one-third of patients have benign MS, which does not develop secondary progression. Approximately 10% of patients develop progressive disability from onset without relapses and remissions (primary progressive MS). Few biochemical changes have been identified in MS. Consequently the identification and characterization of cellular and/or molecular causative defects and neuropathologies are necessary for improved treatment of neurological disorders. Due to the possibility of worsening or recurrence, speedy diagnosis would be of great benefit, in particular to categorise the patient as follows:

1. Benign versus progressive MS
2. Primary versus secondary progressive MS
3. Specific pathophysiological subtypes of primary and secondary progressive MS

Treatment strategies have three aims: 1, to modify the course of the disease, 2, to affect severity and duration of relapse and 3, symptomatic treatment and neurorehabilitation.

Currently MS has no objective biochemical markers useful for diagnosis and prognosis in living patients. The identification of DSPs in the CSF of MS patients may provide important insights into disease pathology and opportunities for better diagnosis and treatment strategies. Isoelectric focusing of CSF from MS patients revealed the presence of oligoclonal bands in 95% of patients with MS (McLean et al. (1990) Brain, 113:1269-89). However, similar to MRI, this finding is not specific to MS patients and can also be detected in other neurological disorders including Guillain-Barre syndrome, sarcoidosis and chronic meningitis. Therefore, the specificity and the sensitivity of distinguishing individual neurological disorders as well as acute and chronic CNS disease may require the selection of a repertoire of DSPs rather than an individual protein.

Due to the time consuming nature of existing, largely inadequate, tests and their

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

expense it would be highly desirable to measure a substance or substances in samples of CSF, or other body fluids (e.g. urine, blood, serum) that would lead to a positive diagnosis of MS or that would help to exclude MS from the differential diagnosis.

- 5 Therefore, a need exists to identify MS associated proteins as sensitive and specific biomarkers for the diagnosis of MS in living subjects. Additionally, there is a clear need for new therapeutic agents for MS that work quickly, potently, specifically, and with fewer side effects.

3. SUMMARY OF THE INVENTION

- 10 The present invention provides methods and compositions for clinical screening, diagnosis and treatment of MS, for monitoring the effectiveness of Multiple Sclerosis treatment, for selecting participants in clinical trials, for identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment and for screening and development of drugs for treatment of MS.

- 15 A first aspect of the invention provides methods for diagnosis of MS that comprise analyzing a sample of CSF by two-dimensional electrophoresis to detect the presence or level of at least one Multiple Sclerosis-Associated Feature (MSF), e.g., one or more of the MSFs disclosed herein or any combination thereof. These methods are also suitable for clinical screening, prognosis, monitoring the results of therapy, identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment, for drug screening and development, and identification of new targets for drug treatment.

- 20 A second aspect of the invention provides methods for diagnosis of MS that comprise detecting in a sample of CSF the presence or level of at least one Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform (MSPI), e.g., one or more of the MSPIs disclosed herein or any combination thereof. These methods are also suitable for clinical screening, prognosis, monitoring the results of therapy, identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment, drug screening and development, and identification of new targets for drug treatment.

- 25 A third aspect of the invention provides antibodies, e.g. monoclonal and polyclonal, chimeric and humanised antibodies capable of immunospecific binding to an MSPI, e.g., an MSPI disclosed herein.

- 30 A fourth aspect of the invention provides a preparation comprising an isolated MSPI, i.e., an MSPI free from polypeptides, proteins or protein isoforms having a significantly different isoelectric point or a significantly different apparent molecular weight from the MSPI.

- 35 A fifth aspect of the invention provides kits that may be used in the above recited methods and that may comprise single or multiple preparations, or antibodies, together with other reagents, labels, substrates, if needed, and directions for use. The kits may be used for diagnosis of disease, or may be assays for the identification of new diagnostic and/or therapeutic agents.

- 40 A sixth aspect of the invention provides methods of treating MS, comprising administering to a subject a therapeutically effective amount of an agent that modulates (e.g., upregulates or downregulates) the expression or activity (e.g. enzymatic or binding activity), or both, of an MSPI in subjects having MS, in order to prevent or delay the onset or development of MS, to prevent or delay the progression of MS, or to ameliorate the symptoms of MS.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

A seventh aspect of the invention provides methods of screening for agents that modulate (e.g., upregulate or downregulate) a characteristic of, e.g., the expression or the enzymatic or binding activity, of a MSF, MSPI, a MSPI analog, or a MSPI-related polypeptide.

5 4. BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 is an image obtained from 2-dimensional electrophoresis of CSF, which has been annotated to identify twelve landmark features, designated CSF1 to CSF12.

Figure 2 is a flow chart depicting the characterization of an MSF and relationship of a MSF and MSPI. A MSF may be further characterized as or by an MSPI having a particular peptide sequence associated with its pI and MW. As depicted herein, a MSF may comprise one or more MSPIs, which have indistinguishable pIs and MWs using the Preferred Technology, but which have distinct peptide sequences. The peptide sequence(s) of the MSPI can be utilized to search database(s) for previously identified proteins comprising such peptide sequence(s). It can be ascertained whether a commercially available antibody exists that may recognize the previously identified protein and/or a member of its protein family.

5. DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

The invention described in detail below provides methods and compositions for clinical screening and diagnosis of Multiple Sclerosis in a mammalian subject for identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment, for monitoring the results of Multiple Sclerosis therapy, for drug screening and drug development. The invention also encompasses the administration of therapeutic compositions to a mammalian subject to treat or prevent Multiple Sclerosis. The mammalian subject may be a non-human mammal, but is preferably human, more preferably a human adult, i.e. a human subject at least 21 years old. For clarity of disclosure, and not by way of limitation, the invention will be described with respect to the analysis of CSF samples. However, as one skilled in the art will appreciate, the assays and techniques described below can be applied to other types of samples, including a body fluid (for example but without limitation: blood, serum, plasma, saliva or urine), a tissue sample from a subject at risk of having or developing MS (e.g. a biopsy such as a brain biopsy) or homogenate thereof. The methods and compositions of the present invention are useful for screening and diagnosis of a living subject, but may also be used for postmortem diagnosis in a subject, for example, to identify family members of the subject who are at risk of developing the same disease.

The following definitions are provided to assist in the review of the instant disclosure.

35 5.1 DEFINITIONS

"Feature" refers to a spot identified in a 2D gel, and the term "Multiple Sclerosis - Associated Feature" (MSF) refers to a feature that is differentially present in a first sample or sample set from a subject having MS compared with a second sample or sample set from a subject free from MS. A feature or spot identified in a 2D gel is characterized by its isoelectric point (pI) and apparent molecular weight (MW) as determined by 2D gel electrophoresis, particularly utilizing the Preferred Technology described herein. As used herein, a feature is "differentially present" in a first sample or sample set with respect to a second sample or sample set when a method for detecting the said feature (e.g., 2D electrophoresis) gives a

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

different signal when applied to the first and second samples or sample sets. A MSF, (or a Protein Isoform, i.e. MSPI, as defined *infra*) is "increased" in the first sample or sample set with respect to the second sample or sample set if the method of detection indicates that the MSF, or MSPI is more abundant in the first sample or sample set than in the second sample or sample set, or if the MSF, or MSPI is detectable in the first sample or sample set and substantially undetectable in the second sample or sample set. Conversely, a MSF, or MSPI is "decreased" in the first sample or sample set with respect to the second sample or sample set if the method of detection indicates that the MSF, or MSPI is less abundant in the first sample or sample set than in the second sample or sample set or if the MSF, or MSPI is undetectable in the first sample or sample set and detectable in the second sample or sample set.

Particularly, the relative abundance of a feature in the two samples or sample sets is determined in reference to its normalized signal, in two steps. First, the signal obtained upon detecting the feature in a first sample or sample set is normalized by reference to a suitable background parameter, *e.g.*, (a) to the total protein in the sample being analyzed (*e.g.*, total protein loaded onto a gel); (b) to an Expression Reference Feature (ERF) i.e., a feature whose abundance is substantially invariant, within the limits of variability of the Preferred Technology, in the population of subjects being examined, *e.g.* the ERFs disclosed in Table III, or (c) more preferably to the total signal detected as the sum of each of all proteins in the sample.

Secondly, the normalized signal for the feature in the first sample or sample set is compared with the normalized signal for the same feature in the second sample or sample set in order to identify features that are "differentially present" in the first sample or sample set with respect to the second sample or sample set.

"Fold change" includes "fold increase" and "fold decrease" and refers to the relative increase or decrease in abundance of a MSF or the relative increase or decrease in expression or activity of a polypeptide (*e.g.* a MSPI, as defined *infra*.) in a first sample or sample set compared to a second sample or sample set. A MSF or polypeptide fold change may be measured by any technique known to those of skill in the art, albeit the observed increase or decrease will vary depending upon the technique used. Preferably, fold change is determined herein as described in the Examples *infra*.

"Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform" (MSPI) refers to a polypeptide that is differentially present in a first sample or sample set from a subject having MS compared with a second sample or sample set from a subject free from MS. As used herein, a MSPI is "differentially present" in a first sample or sample set with respect to a second sample or sample set when a method for detecting the said feature, (*e.g.*, 2D electrophoresis or immunoassay) gives a different signal when applied to the first and second samples or sample sets (as described above in relation to MSFs). A MSPI is characterised by one or more peptide sequences of which it is comprised, and further by a pI and MW, preferably determined by 2D electrophoresis, particularly utilising the Preferred Technology as described herein. Typically, MSPIs are identified or characterised by the amino acid sequencing of MSFs (Figure 2).

An MSPI is characterized as, or by, a particular peptide sequence associated with its pI and MW. As depicted herein, a MSF may comprise one or more MSPI(s), which have indistinguishable pIs and MWs using the Preferred Technology, but which have distinct peptide sequences. The peptide sequence(s) of the MSPI can be utilized to search database(s) for

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

previously identified proteins comprising such peptide sequence(s). In some instances, it can be ascertained whether a commercially available antibody exists which may recognize the previously identified protein and/or a variant thereof. Preferably the MSPI corresponds to the previously identified protein, or be a variant of the previously identified protein.

5 "Variant" as used herein refers to a polypeptide which is a member of a family of polypeptides that are encoded by a single gene or from a gene sequence within a family of related genes and which differ in their pI or MW, or both. Such variants can differ in their amino acid composition (e.g. as a result of alternative mRNA or premRNA processing, e.g. alternative splicing or limited proteolysis) and in addition, or in the alternative, may arise from
10 differential post-translational modification (e.g., glycosylation, acylation, phosphorylation).

"Modulate" in reference to expression or activity of a MSF, MSPI or MSPI-related polypeptide refers to any change, e.g., upregulation or downregulation, increase or decrease, of the expression or activity of the MSF, MSPI or MSPI-related polypeptide. Those skilled in the art, based on the present disclosure, will understand that such modulation can be determined
15 by assays known to those of skill in the art.

"MSPI analog" refers to a polypeptide that possesses similar or identical function(s) as a MSPI but need not necessarily comprise an amino acid sequence that is similar or identical to the amino acid sequence of the MSPI, or possess a structure that is similar or identical to that of the MSPI. As used herein, an amino acid sequence of a polypeptide is "similar" to that of a
20 MSPI if it satisfies at least one of the following criteria: (a) the polypeptide has an amino acid sequence that is at least 30% (more preferably, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99%) identical to the amino acid sequence of the MSPI; (b) the polypeptide is encoded by a nucleotide sequence that hybridizes under stringent
25 conditions to a nucleotide sequence encoding at least 5 amino acid residues (more preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino acid residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues,
30 or at least 150 amino acid residues) of the MSPI; or (c) the polypeptide is encoded by a nucleotide sequence that is at least 30% (more preferably, at least 35%, at least 40%, at least 45%, at least 50%, at least 55%, at least 60%, at least 65%, at least 70%, at least 75%, at least 80%, at least 85%, at least 90%, at least 95% or at least 99%) identical to the nucleotide sequence encoding the MSPI. As used herein, a polypeptide with "similar structure" to that of
35 a MSPI refers to a polypeptide that has a similar secondary, tertiary or quaternary structure as that of the MSPI. The structure of a polypeptide can be determined by methods known to those skilled in the art, including but not limited to, X-ray crystallography, nuclear magnetic resonance, and crystallographic electron microscopy.

"MSPI fusion protein" refers to a polypeptide that comprises (i) an amino acid
40 sequence of an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or a fragment of an MSPI-related polypeptide and (ii) an amino acid sequence of a heterologous polypeptide (i.e., a non-MSPI, non-MSPI fragment or non-MSPI-related polypeptide).

"MSPI homolog" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence similar to that of a MSPI but does not necessarily possess a similar or identical function as the

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI.

"MSPI ortholog" refers to a non-human polypeptide that (i) comprises an amino acid sequence similar to that of a MSPI and (ii) possesses a similar or identical function to that of the MSPI.

- 5 "MSPI-related polypeptide" refers to a MSPI homolog, a MSPI analog, a variant of MSPI, a MSPI ortholog, or any combination thereof.

- 10 "Chimeric Antibody" refers to a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a human immunoglobulin constant region and a variable region derived from a murine mAb. (See, e.g., Cabilly et al., U.S. Patent No. 4,816,567; and Boss et al., U.S. Patent No. 4,816,397, which are incorporated herein by reference in their entirety.)). For example, a portion of the antibody may be fused with the constant domain of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, IgM), or portions thereof (CH1, CH2, CH3, or any combination thereof and portions thereof) resulting in chimeric antibodies.

- 15 "Humanised Antibody" refers to a molecule from non-human species having one or more complementarily determining regions (CDRs) from the non-human species and a framework region from a human immunoglobulin molecule.

- 20 "Derivative" refers to a polypeptide that comprises an amino acid sequence of a second polypeptide that has been altered by the introduction of at least one amino acid residue substitution, deletion or addition. The derivative polypeptide possesses a similar or identical function as the second polypeptide.

- 25 "Fragment" refers to a peptide or polypeptide comprising an amino acid sequence of at least 5 amino acid residues (preferably, at least 10 amino acid residues, at least 15 amino acid residues, at least 20 amino acid residues, at least 25 amino acid residues, at least 40 amino acid residues, at least 50 amino acid residues, at least 60 amino acid residues, at least 70 amino acid residues, at least 80 amino acid residues, at least 90 amino acid residues, at least 100 amino acid residues, at least 125 amino acid residues, at least 150 amino acid residues, at least 175 amino acid residues, at least 200 amino acid residues, or at least 250 amino acid residues) of the amino acid sequence of a second polypeptide. Preferably the fragment of a MSPI possesses the functional activity of the MSPI.

- 30 The "percent identity" of two amino acid sequences or of two nucleic acid sequences can be or is generally determined by aligning the sequences for optimal comparison purposes (e.g., gaps can be introduced in either sequences for best alignment with the other sequence) and comparing the amino acid residues or nucleotides at corresponding positions. The "best alignment" is an alignment of two sequences that results in the highest percent identity. The percent identity is determined by the number of identical amino acid residues or nucleotides in the sequences being compared (i.e., % identity = # of identical positions/total # of positions x 100).

- 40 The determination of percent identity between two sequences can be accomplished using a mathematical algorithm known to those of skill in the art. An example of a mathematical algorithm for comparing two sequences is the algorithm of Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268, modified as in Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877. The NBLAST and XBLAST programs of Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 have incorporated such an algorithm. BLAST nucleotide searches can be performed with the NBLAST program, score = 100,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

wordlength = 12 to obtain nucleotide sequences homologous to a nucleic acid molecule of the invention. BLAST protein searches can be performed with the XBLAST program, score = 50, wordlength = 3 to obtain amino acid sequences homologous to a protein molecule of the invention. To obtain gapped alignments for comparison purposes, Gapped BLAST can be
 5 utilized as described in Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402. Alternatively, PSI-Blast can be used to perform an iterated search which detects distant relationships between molecules (*Id.*). When utilizing BLAST, Gapped BLAST, and PSI-BLAST programs, the default parameters of the respective programs (*e.g.*, XBLAST and NBLAST) can be used.

Another example of a mathematical algorithm utilized for the comparison of sequences
 10 is the algorithm of Myers and Miller, CABIOS (1989). The ALIGN program (version 2.0) which is part of the GCG sequence alignment software package has incorporated such an algorithm. Other algorithms for sequence analysis known in the art include ADVANCE and ADAM as described in Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10 :3-5; and FASTA described in Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8. Within
 15 FASTA, ktup is a control option that sets the sensitivity and speed of the search.

"Diagnosis" refers to diagnosis, prognosis, monitoring, characterizing, selecting patients, including participants in clinical trials, and identifying patients at risk for or having a particular disorder or those most likely to respond to a particular therapeutic treatment, or for assessing or monitoring a patient's response to a particular therapeutic treatment.

20 "Treatment" refers to therapy, prevention and prophylaxis and particularly refers to the administration of medicine or the performance of medical procedures with respect to a patient, for either prophylaxis (prevention) or to cure the infirmity or malady in the instance where the patient is afflicted.

"Agent" refers to all materials that may be used to prepare pharmaceutical and
 25 diagnostic compositions, or that may be compounds, agonists, antagonists, nucleic acids, polypeptides, fragments, isoforms, variants, or other materials that may be used independently for such purposes, all in accordance with the present invention.

"Highly stringent conditions" refers to hybridization to filter-bound DNA in 0.5 M NaHPO₄, 7% sodium dodecyl sulfate (SDS), 1 mM EDTA at 65°C, and washing in
 30 0.1xSSC/0.1% SDS at 68°C (Ausubel F.M. et al., eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., New York, at p. 2.10.3; incorporated herein by reference in its entirety.)

For some applications, less stringent conditions for duplex formation are required. As used herein "moderately stringent conditions" refers to washing in 0.2xSSC/0.1% SDS at 42°C
 35 (Ausubel et al., 1989, *supra*).

"Cerebrospinal fluid (CSF)" refers to the fluid that surrounds the bulk of the CNS, as described in Physiological Basis of Medical Practice (J.B. West, ed., Williams and Wilkins, Baltimore, MD 1985). CSF includes ventricular CSF and lumbar CSF.

40 "Serum" refers to the supernatant fluid produced by clotting and centrifugal sedimentation of a blood sample.

"Plasma" refers to the supernatant fluid produced by inhibition of clotting (for example, by citrate or EDTA) and centrifugal sedimentation of a blood sample.

"Blood" as used herein includes serum and plasma.

"Two-dimensional electrophoresis" (2D-electrophoresis) means a technique

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

comprising isoelectric focusing, followed by denaturing electrophoresis; this generates a two-dimensional gel (2D-gel) containing a plurality of separated proteins.

5.2 THE "PREFERRED TECHNOLOGY"

5 Preferably, the step of denaturing electrophoresis uses polyacrylamide electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate (SDS-PAGE). Especially preferred are the highly accurate and automatable methods and apparatus ("the Preferred Technology") described in WO 98/23950 and in U.S. Patent Nos 6,064,654, and 6,278,794, each of which is incorporated herein by reference in its entirety with particular reference to the protocol at pages 23-35 of
10 WO 98/23950. Briefly, the Preferred Technology provides efficient, computer-assisted methods and apparatus for identifying, selecting and characterising biomolecules (e.g. proteins, including glycoproteins) in a biological sample. A two-dimensional array is generated by separating biomolecules on a two-dimensional gel according to their electrophoretic mobility and isoelectric point. A computer-generated digital profile of the array is generated,
15 representing the identity, apparent molecular weight, isoelectric point, and relative abundance of a plurality of biomolecules detected in the two-dimensional array, thereby permitting computer-mediated comparison of profiles from multiple biological samples, as well as computer aided excision of separated proteins of interest.

A preferred scanner for detecting fluorescently labeled proteins is described in WO
20 96/36882 and in the Ph.D. thesis of David A. Basiji, entitled "Development of a High-throughput Fluorescence Scanner Employing Internal Reflection Optics and Phase-sensitive Detection (Total Internal Reflection, Electrophoresis)", University of Washington (1997), Volume 58/12-B of Dissertation Abstracts International, page 6686, the contents of each of which are incorporated herein by reference. These documents describe an
25 image scanner designed specifically for automated, integrated operation at high speeds. The scanner can image gels that have been stained with fluorescent dyes or silver stains, as well as storage phosphor screens. The Basiji thesis provides a phase-sensitive detection system for discriminating modulated fluorescence from baseline noise due to laser scatter or homogeneous fluorescence, but the scanner can also be operated in a non-phase-sensitive
30 mode. This phase-sensitive detection capability would increase the sensitivity of the instrument by an order of magnitude or more compared to conventional fluorescence imaging systems. The increased sensitivity would reduce the sample-preparation load on the upstream instruments while the enhanced image quality simplifies image analysis downstream in the process.

35 A more highly preferred scanner is a modified version of the above described scanner. In the preferred scanner, the gel is transported through the scanner on a precision lead-screw drive system. This is preferable to laying the glass plate on the belt-driven system that is described in the Basiji thesis, as it provides a reproducible means of accurately transporting the gel past the imaging optics.

40 In the preferred scanner, the gel is secured against three alignment stops that rigidly hold the glass plate in a known position. By doing this in conjunction with the above precision transport system, the absolute position of the gel can be predicted and recorded. This ensures that co-ordinates of each feature on the gel can be determined more accurately and communicated, if desired, to a cutting robot for excision of the feature. In the preferred

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

scanner, the carrier that holds the gel has four integral fluorescent markers for use to correct the image geometry. These markers are a quality control feature that confirms that the scanning has been performed correctly.

In comparison to the scanner described in the Basiji thesis, the optical components of the preferred scanner have been inverted. In the preferred scanner, the laser, mirror, waveguide and other optical components are above the glass plate being scanned. The scanner described in the Basiji thesis has these components underneath. In the preferred scanner, the glass plate is mounted onto the scanner gel side down, so that the optical path remains through the glass plate. By doing this, any particles of gel that may break away from the glass plate will fall onto the base of the instrument rather than into the optics. This does not affect the functionality of the system, but increases its reliability.

Still more preferred is a modified version of the preferred scanner, in which the signal output is digitised to the full 16-bit data without any peak saturation or without square root encoding of the signal. A compensation algorithm has also been applied to correct for any variation in detection sensitivity along the path of the scanning beam. This variation is due to anomalies in the optics and differences in collection efficiency across the waveguide. A calibration is performed using a perspex plate with an even fluorescence throughout. The data received from a scan of this plate are used to determine the multiplication factors needed to increase the signal from each pixel level to a target level. These factors are then used in subsequent scans of gels to remove any internal optical variations.

5.3 MULTIPLE SCLEROSIS-ASSOCIATED FEATURES (MSFs)

In one aspect of the invention, two-dimensional electrophoresis is used to analyze CSF from a subject, preferably a living subject, in order to detect or quantify the expression of one or more Multiple Sclerosis-Associated Features (MSFs) for screening, prevention or diagnosis of MS, to determine the prognosis of a subject having MS, to monitor progression of MS, to monitor the effectiveness of MS therapy, for identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment, or for drug development.

By way of example and not of limitation, using the Preferred Technology, a number of samples from subjects having MS and samples from subjects free from MS are separated by two-dimensional electrophoresis, and the fluorescent digital images of the resulting gels are matched to a chosen representative primary master gel image. This process allows any gel feature, characterised by its pI and MW, to be identified and examined on any gel of the study. In particular, the amount of protein present in a given feature can be measured in each gel; this feature abundance can be averaged amongst gels from similar samples (e.g. gels from samples from subjects having MS). Finally, statistical analyses can be conducted on the thus created sample sets, in order to compare 2 or more sample sets to each other.

The MSFs disclosed herein have been identified by comparing CSF samples from subjects having MS against CSF samples from subjects free from MS. Subjects free from MS include subjects with no known disease or condition (normal subjects) and subjects with diseases other than MS.

Two groups of MSFs have been identified through the methods and apparatus of the Preferred Technology. The first group consists of MSFs that are decreased in the CSF of subjects having MS as compared with the CSF of subjects free from MS, where the differential

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

presence is significant. These MSFs can be described by apparent molecular weight (MW) and isoelectric point (pI) as provided in Table I.

Table I. MSFs Decreased in CSF of Subjects Having MS

5

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Decrease
MSF-1	8.75	21021	>100
MSF-2	5.62	34394	>100
MSF-3	9.75	11627	>100
MSF-4	6.24	102603	>100
MSF-5	6.18	105482	>100
MSF-6	5.91	21888	>100
MSF-7	5.52	56560	>100
MSF-8	5.49	34394	>100
MSF-9	6.01	184426	>100
MSF-10	6.06	184426	86.63
MSF-11	5.96	185225	83.95
MSF-12	5.41	51566	79.92
MSF-13	5.92	185225	74.98
MSF-14	6.80	32080	65.52
MSF-15	5.88	186027	53.51
MSF-16	6.14	186027	49.41
MSF-17	5.51	12598	46.66
MSF-18	5.79	186832	43.72
MSF-20	5.50	20607	39.71
MSF-21	4.70	43626	39.47
MSF-22	5.75	186832	35.45
MSF-23	5.67	178932	35.06
MSF-24	6.18	187641	34.05
MSF-25	6.23	48975	32.70
MSF-26	6.18	178932	29.18
MSF-27	6.11	126160	26.38
MSF-28	6.23	186832	25.16
MSF-29	6.10	184426	23.38
MSF-30	7.82	31104	22.71
MSF-31	5.84	186832	22.09
MSF-32	6.03	135312	21.97
MSF-33	4.89	52993	21.83
MSF-34	5.59	21103	21.54
MSF-35	6.24	74941	20.84
MSF-36	5.93	49874	20.74
MSF-37	5.30	179707	20.61
MSF-38	6.28	87995	20.13
MSF-39	4.82	98505	19.20
MSF-40	5.35	11955	17.97
MSF-41	5.79	22491	17.70
MSF-42	5.98	64540	17.13
MSF-43	5.54	37852	16.38
MSF-44	6.28	27735	16.05
MSF-45	4.70	64736	15.87
MSF-46	6.13	178161	14.86

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Decrease
MSF-47	5.49	64150	13.99
MSF-48	4.77	99610	12.90
MSF-49	4.54	74941	12.85
MSF-50	5.83	111485	12.58
MSF-51	7.48	11668	12.15
MSF-52	5.72	146050	11.63
MSF-53	4.99	40463	11.59
MSF-54	8.64	20604	11.51
MSF-55	5.65	150534	10.77
MSF-56	5.49	158545	10.52
MSF-57	9.92	29162	10.44
MSF-58	5.66	186832	10.26
MSF-59	6.23	178932	10.26
MSF-60	5.60	150534	10.25
MSF-61	6.35	164223	9.93
MSF-62	6.52	175109	9.70
MSF-63	5.00	171366	9.60
MSF-64	6.32	178932	9.40
MSF-65	6.18	136566	9.21
MSF-66	5.49	98505	9.01
MSF-67	5.16	53159	8.86
MSF-69	4.51	126852	8.79
MSF-70	6.15	89080	8.73
MSF-71	5.56	85203	8.73
MSF-72	5.09	156672	8.58
MSF-73	7.26	33226	8.46
MSF-75	10.06	11587	8.39
MSF-76	5.72	151186	8.30
MSF-77	6.38	177393	8.14
MSF-78	6.25	33313	8.09
MSF-79	5.48	85680	8.08
MSF-80	6.06	60926	7.60
MSF-81	5.94	42899	7.16
MSF-82	5.72	100168	6.73
MSF-83	5.51	44365	6.71
MSF-84	5.53	99610	6.70
MSF-85	5.39	38741	6.34
MSF-86	4.54	27735	6.23
MSF-87	5.29	125687	5.86
MSF-88	5.57	80579	5.62
MSF-89	5.58	63762	5.61
MSF-90	6.08	93159	5.38
MSF-91	6.26	21818	5.34
MSF-92	5.54	150534	5.13
MSF-93	5.70	34998	5.12
MSF-94	5.63	178161	5.08
MSF-95	5.28	52673	5.01
MSF-96	5.80	91613	4.99
MSF-97	5.71	91103	4.86
MSF-98	5.54	48679	4.80
MSF-99	5.43	112518	4.62

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Decrease
MSF-100	5.99	67749	4.54
MSF-101	5.59	178161	4.54
MSF-102	5.95	34494	4.49
MSF-104	6.29	100168	4.40
MSF-105	4.84	25658	4.37
MSF-106	8.13	68368	4.33
MSF-107	4.95	52196	4.33
MSF-108	6.05	47450	4.25
MSF-109	5.32	35100	4.15
MSF-110	6.17	93159	4.14
MSF-111	5.67	48092	4.06
MSF-112	5.48	55124	4.06
MSF-113	6.12	101661	3.96
MSF-114	5.28	154488	3.91
MSF-115	5.85	29583	3.88
MSF-116	5.39	142313	3.85
MSF-117	5.00	132839	3.85
MSF-119	6.00	49723	3.84
MSF-120	5.78	72071	3.83
MSF-121	4.97	18472	3.79
MSF-122	5.03	17230	3.76
MSF-123	5.89	91613	3.76
MSF-125	4.46	29058	3.66
MSF-126	5.86	17929	3.63
MSF-127	5.62	54294	3.63
MSF-128	5.57	142313	3.61
MSF-130	4.88	95795	3.56
MSF-131	5.03	50944	3.55
MSF-132	5.16	41028	3.51
MSF-133	5.87	67575	3.51
MSF-134	5.98	90092	3.50
MSF-135	5.18	180485	3.45
MSF-136	4.70	37742	3.44
MSF-137	5.97	56994	3.43
MSF-139	6.06	28850	3.42
MSF-140	6.95	19478	3.39
MSF-141	5.77	52354	3.35
MSF-142	5.77	54791	3.35
MSF-143	5.95	19673	3.30
MSF-144	5.48	46191	3.29
MSF-145	5.40	151841	3.29
MSF-147	7.10	73878	3.26
MSF-148	5.07	131619	3.23
MSF-149	6.21	101661	3.22
MSF-150	5.50	151186	3.20
MSF-151	9.39	11427	3.18
MSF-152	5.55	60192	3.16
MSF-153	5.79	20456	3.15
MSF-154	5.28	142929	3.14
MSF-155	6.33	49273	3.13
MSF-156	5.85	48238	3.10

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Decrease
MSF-157	5.83	27935	3.09
MSF-158	5.88	64150	3.06
MSF-159	6.37	101661	3.03
MSF-160	5.54	47450	3.02
MSF-161	6.25	55124	3.01
MSF-163	5.32	142929	2.99
MSF-165	5.77	50178	2.95
MSF-167	6.17	48679	2.94
MSF-168	5.36	98505	2.93
MSF-169	5.12	139109	2.82
MSF-170	5.31	156503	2.82
MSF-171	4.99	15072	2.73
MSF-172	5.56	54294	2.72
MSF-173	5.85	62512	2.65
MSF-174	5.95	36556	2.63
MSF-175	4.98	100168	2.63
MSF-176	5.43	48238	2.63
MSF-177	7.67	68368	2.63
MSF-178	8.47	22644	2.60
MSF-179	5.60	46036	2.54
MSF-180	6.21	36134	2.47
MSF-181	5.13	21638	2.46
MSF-182	5.62	52038	2.46
MSF-183	8.76	18350	2.44
MSF-184	6.30	50790	2.43
MSF-185	4.81	18657	2.42
MSF-186	6.81	48827	2.38
MSF-187	6.01	29689	2.37
MSF-188	5.59	100168	2.37
MSF-189	5.74	65725	2.34
MSF-190	5.92	16835	2.33
MSF-191	6.24	87097	2.33
MSF-192	5.49	19869	2.33
MSF-193	5.90	23795	2.32
MSF-194	6.91	116746	2.29
MSF-195	5.45	66932	2.28
MSF-196	8.22	51254	2.26
MSF-197	5.11	50790	2.23
MSF-198	5.59	20201	2.17
MSF-199	5.43	49573	2.16
MSF-200	7.14	116746	2.15
MSF-201	6.65	12463	2.14
MSF-202	4.93	81483	2.14
MSF-203	6.00	38405	2.13
MSF-204	5.82	67210	2.10
MSF-205	5.28	72474	2.09
MSF-206	6.47	28747	2.07
MSF-207	4.94	134070	2.06
MSF-208	5.37	123390	2.02
MSF-209	5.49	24374	1.96
MSF-210	5.66	50026	1.95

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Decrease
MSF-211	5.19	50178	1.94
MSF-212	5.79	64150	1.89
MSF-213	5.83	13375	1.87
MSF-215	5.11	35613	1.86
MSF-216	9.43	68368	1.82
MSF-217	9.04	11790	1.81
MSF-218	5.08	91613	1.81
MSF-219	7.01	117828	1.74
MSF-220	4.56	46503	1.74
MSF-221	5.55	66125	1.70
MSF-222	5.54	49573	1.69
MSF-223	5.62	50026	1.65
MSF-224	5.07	65130	1.64
MSF-225	4.64	122257	1.61
MSF-226	4.81	50178	1.60
MSF-227	7.46	118510	1.59
MSF-228	4.95	44515	1.57
MSF-229	6.07	79685	1.54
MSF-230	6.98	97467	1.53
MSF-231	5.30	49423	1.53
MSF-232	7.27	27636	1.52
MSF-233	7.35	36450	1.46
MSF-234	5.37	24470	1.43
MSF-235	5.36	20134	1.42
MSF-236	5.20	72071	1.38

The second group consists of MSFs that are increased in the CSF of subjects having MS as compared with the CSF of subjects free from MS where the differential presence is significant. These MSFs can be described by MW and pI as provided in Table II:

5

Table II. MSFs Increased in CSF of Subjects Having MS

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Increase
MSF-237	10.15	11421	>100
MSF-238	8.26	11328	>100
MSF-239	6.65	14399	68.46
MSF-239	6.65	14399	68.46
MSF-240	7.73	27538	64.71
MSF-241	6.10	86456	41.27
MSF-242	7.30	25465	25.21
MSF-243	6.01	12948	22.91
MSF-244	5.27	11037	16.46
MSF-245	6.21	80579	16.40
MSF-246	8.78	15019	15.96
MSF-247	6.28	27245	15.02
MSF-248	7.19	30921	14.98
MSF-250	4.33	42755	12.76
MSF-251	7.60	81385	12.75
MSF-252	5.62	26380	11.74

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Increase
MSF-253	6.30	17837	11.68
MSF-254	4.28	11270	11.29
MSF-257	4.64	13792	10.95
MSF-259	5.25	27594	10.73
MSF-260	6.06	78111	10.45
MSF-261	4.86	44065	10.19
MSF-262	4.40	60275	10.15
MSF-263	7.50	45269	10.12
MSF-264	7.93	66125	10.06
MSF-265	6.56	20744	9.93
MSF-266	6.54	13783	9.64
MSF-267	5.54	21908	9.63
MSF-268	8.85	13625	9.38
MSF-269	5.49	28193	9.27
MSF-270	5.74	32454	9.23
MSF-271	6.43	45269	8.92
MSF-273	4.94	16019	8.81
MSF-274	9.80	23795	8.15
MSF-276	7.32	13812	7.85
MSF-277	6.29	80131	7.59
MSF-278	4.90	82867	7.48
MSF-279	6.69	24664	7.36
MSF-280	6.06	33713	7.36
MSF-281	6.37	80131	7.23
MSF-282	6.28	27116	7.14
MSF-283	4.78	43626	7.03
MSF-284	6.43	26066	6.88
MSF-285	5.75	27835	6.83
MSF-287	6.65	17872	6.72
MSF-289	6.74	54791	6.39
MSF-290	4.36	20951	6.36
MSF-291	4.33	105354	6.33
MSF-292	5.76	13128	6.31
MSF-294	8.76	15213	6.29
MSF-295	4.32	36134	6.23
MSF-296	4.94	20403	6.22
MSF-298	7.51	24762	6.09
MSF-299	8.12	54806	6.03
MSF-300	4.37	40820	5.84
MSF-301	5.58	32266	5.75
MSF-302	4.28	21301	3.96
MSF-303	7.84	65034	3.75
MSF-305	9.04	21021	3.49
MSF-306	6.86	50636	3.47
MSF-307	7.48	59646	3.38
MSF-308	7.78	55797	3.32
MSF-310	5.01	13359	2.69
MSF-311	5.41	58040	2.67
MSF-312	7.39	40510	2.66
MSF-313	5.58	24087	2.49
MSF-314	4.84	26797	2.33

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	pI	MW (Da)	Fold Increase
MSF-316	5.51	31894	2.13
MSF-318	4.57	13499	2.00
MSF-319	6.72	59646	1.94
MSF-320	8.16	24182	1.91
MSF-321	6.37	21021	1.84
MSF-322	5.21	22551	1.75
MSF-323	5.21	31216	1.73
MSF-324	7.10	23117	1.60
MSF-325	4.05	43334	1.44

For any given MSF, the signal obtained upon analyzing CSF from subjects having MS relative to the signal obtained upon analyzing CSF from subjects free from MS will depend upon the particular analytical protocol and detection technique that is used. Accordingly, the present invention contemplates that each laboratory will, based on the present description, establish a reference range for each MSF in subjects free from MS according to the analytical protocol and detection technique in use, as is conventional in the diagnostic art. Preferably, at least one control positive CSF sample from a subject known to have MS or at least one control negative CSF sample from a subject known to be free from MS (and more preferably both positive and negative control samples) are included in each batch of test samples analyzed. In one embodiment, the level of expression of a feature is determined relative to a background value, which is defined as the level of signal obtained from a proximal region of the image that (a) is equivalent in area to the particular feature in question; and (b) contains no discernable protein feature.

In a preferred embodiment, the signal associated with an MSF in the CSF of a subject (e.g., a subject suspected of having or known to have MS) is normalised with reference to one or more ERFs detected in the same 2D gel. As will be apparent to one of ordinary skill in the art, such ERFs may readily be determined by comparing different samples using the Preferred Technology. Suitable ERFs include (but are not limited to) those described in Table III.

Table III. Expression Reference Features

ERF#	pI	MW (Da)
ERF-1	5.28	57515
ERF-2	5.25	20268
ERF-3	8.76	16126

As those of skill in the art will readily appreciate, the apparent MW and pI of a given feature or protein isoform will vary to some extent depending on the precise protocol used for each step of the 2D electrophoresis and for landmark matching (as described in section 6.1.8 *infra*). As used herein, the terms "MW" and "pI" are defined, respectively, to mean the apparent molecular weight and the apparent isoelectric point of a feature or protein isoform as measured in exact accordance with the Reference Protocol identified in Section 6 below.

When the Reference Protocol is followed and when samples are run in duplicate or a higher

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

number of replicates, variation in the measured mean pI of an MSF or MSPI is typically less than 3% and variation in the measured mean MW of an MSF or MSPI is typically less than 5%. Where the skilled artisan wishes to deviate from the Reference Protocol, calibration experiments should be performed to compare the MW and pI for each MSF or protein isoform as detected (a) by the Reference Protocol and (b) by the deviant protocol.

MSFs can be used for detection, diagnosis, or monitoring of MS, or for identifying patients most likely to respond to a specific therapeutic treatment, or for drug development. In one embodiment of the invention, a first sample of body fluid from a subject (e.g., a subject suspected of having MS) is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of one or more of the MSFs as defined in Table I. A decreased abundance of said one or more of these MSFs in the first sample from the subject relative to a second sample from a subject or subjects free from MS (e.g., a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of MS.

In another embodiment of the invention, a first sample of body fluid from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for the quantitative detection of one or more of the MSFs as defined in Table II. An increased abundance of said one or more MSFs in the first sample from the subject relative to a second sample from a subject or subjects free from MS (e.g., a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of MS.

In yet another embodiment, a first sample of body fluid from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of (a) one or more MSFs or any combination of them, whose decreased abundance indicates the presence of MS, i.e., the MSFs as defined in Table I; and (b) one or more MSFs or any combination of them, whose increased abundance indicates the presence of MS i.e., MSFs as defined in Table II.

In yet another embodiment of the invention, a first sample of body fluid from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of one or more of the MSFs as defined in Table I or Table II; wherein the ratio of the one or more MSFs relative to an Expression Reference Feature (ERF) indicates whether MS is present. In a specific embodiment, a decrease in one or more MSF/ERF ratios in a first sample relative to the MSF/ERF ratios in a second sample or a reference range indicates the presence of MS; i.e. the MSFs as defined in Table I are suitable MSFs for this purpose. In another specific embodiment, an increase in one or more MSF/ERF ratios in a first sample relative to the MSF/ERF ratios in a second sample or a reference range indicates the presence of MS; the MSFs as defined in Table II are suitable MSFs for this purpose.

In a further embodiment of the invention, a first sample of body fluid from a subject is analyzed by 2D electrophoresis for quantitative detection of (a) one or more MSFs, or any combination of them, whose decreased MSF/ERF ratio(s) in a first sample relative to the MSF/ERF ratio(s) in a second sample indicates the presence of MS, i.e., the MSFs as defined in Table I; (b) one or more MSFs, or any combination of them, whose increased MSF/ERF ratio(s) in a first sample relative to the MSF/ERF ratio(s) in a second sample indicates the presence of MS, i.e., the MSFs as defined in Table II.

In a preferred embodiment, CSF from a subject is analyzed for quantitative detection of a plurality of MSFs.

5.4 MULTIPLE SCLEROSIS-ASSOCIATED PROTEIN ISOFORMS (MSPIs)

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

In another aspect of the invention, a sample of body fluid from a subject, preferably a living subject, is analyzed for quantitative detection of one or more Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) for screening or diagnosis of MS, to monitor the effectiveness of MS therapy, for identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment or for drug development. As is well known in the art, a given protein may be expressed as variants that differ in their amino acid composition (e.g. as a result of alternative mRNA or premRNA processing, e.g. alternative splicing or limited proteolysis) or as a result of differential post-translational modification (e.g., glycosylation, phosphorylation, acylation), or both, so that proteins of identical amino acid sequence can differ in their pI, MW, or both. It follows that differential presence of a protein isoform does not require differential expression of the gene encoding the protein in question. As used herein, the term "Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform" refers to a polypeptide that is differentially present in a first sample of body fluid from a subject having MS compared with second sample from a subject free from MS.

Two groups of MSPIs have been identified by amino acid sequencing of MSFs. MSPIs were isolated, subjected to proteolysis, and analyzed by mass spectrometry using the methods and apparatus of the Preferred Technology. One skilled in the art can identify sequence information from proteins analyzed by mass spectrometry and/or tandem mass spectrometry using various spectral interpretation methods and database searching tools. Examples of some of these methods and tools can be found at the Swiss Institute of Bioinformatics web site at <http://www.expasy.com/>, and the European Molecular Biology Laboratory web site at <http://www.narrador.embl-heidelberg.de/GroupPages/PageLink/peptidesearchpage.html>. Identification of MSPIs was performed primarily using the SEQUEST search program (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989) and the method described in PCT/GB01/04034. The first group consists of MSPIs that are decreased in the CSF of subjects having MS as compared with the CSF of subjects free from MS, where the differential presence is significant. The amino acid sequences of tryptic digest peptides of these MSPIs identified by tandem mass spectrometry and database searching as described in the Examples, infra are listed in Table IV in addition to the pIs and MWs of these MSPIs.

Table IV. MSPIs Decreased in CSF of Subjects Having MS

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-1	MSPI-1	8.75	21021	APEAQSVQPNFQQDK	SEQ ID NO.: 25
				TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-2	MSPI-2	5.62	34394	FMETVAEK	SEQ ID NO.: 110
				ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
MSF-3	MSPI-3	9.75	11627	LVGGPMDASVEREGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-4	MSPI-4	6.24	102603	AASGTQNNVLR	SEQ ID NO.: 3
				EQTMSCEAGALR	SEQ ID NO.: 94
MSF-5	MSPI-5.1	6.18	105482	AASGTQNNVLR	SEQ ID NO.: 3
				GCPTEEGCGER	SEQ ID NO.: 120
MSF-6	MSPI-6	5.91	21888	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-7	MSPI-7	5.52	56560	VLSALQAVQGLLVAQGR	SEQ ID NO.: 338
				FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 111
				LQAILGVPWK	SEQ ID NO.: 204

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 62
				SLDFTELDVAAEK	SEQ ID NO.: 276
				ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 22
MSF-8	MSPI-8.1	5.49	34394	ASSIIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
MSF-8	MSPI-8.2	5.49	34394	LEEQAQQR	SEQ ID NO.: 183
				QQTEWQSGQR	SEQ ID NO.: 251
				LGPLVEQGR	SEQ ID NO.: 192
				GEVQAMLGQSTELR	SEQ ID NO.: 123
				SELEQLTPVAFETR	SEQ ID NO.: 267
MSF-9	MSPI-9	6.01	184426	VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
				VTAAPQSVICALR	SEQ ID NO.: 346
				LVHVVEEPTETVR	SEQ ID NO.: 212
MSF-10	MSPI-10	6.06	184426	VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
MSF-11	MSPI-11	5.96	185225	VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				VTAAPQSVICALR	SEQ ID NO.: 346
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
MSF-12	MSPI-12.1	5.41	51566	LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
MSF-12	MSPI-12.2	5.41	51566	YEAAPDPR	SEQ ID NO.: 366
				TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
				EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 89
MSF-13	MSPI-13	5.92	185225	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
				HYDGSYSTFGER	SEQ ID NO.: 150
MSF-14	MSPI-14	6.80	32080	VVEEQESR	SEQ ID NO.: 349
				VHYTVCIWR	SEQ ID NO.: 334
				CSVFYGAPEK	SEQ ID NO.: 47
				ITQVLHFTK	SEQ ID NO.: 165
				VEYGFQVK	SEQ ID NO.: 329
				FACYYPK	SEQ ID NO.: 102
				GLQDEEDGYR	SEQ ID NO.: 133
MSF-15	MSPI-15	5.88	186027	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-16	MSPI-16	6.14	186027	VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-18	MSPI-18	5.79	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
				VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
MSF-20	MSPI-20	5.50	20607	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-21	MSPI-21	4.70	43626	AYLEEECPATLR	SEQ ID NO.: 35
MSF-22	MSPI-22	5.75	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
MSF-24	MSPI-24	6.18	187641	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-25	MSPI-25	6.23	48975	YDSVSVFNGAVSDDSR	SEQ ID NO.: 365
				GVSYLLMGQVEENR	SEQ ID NO.: 142
MSF-27	MSPI-27	6.11	126160	TLNICEVGTR	SEQ ID NO.: 309
				QLEWGLER	SEQ ID NO.: 247
MSF-28	MSPI-28	6.23	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-29	MSPI-29	6.10	184426	AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-30	MSPI-30	7.82	31104	GLQDEDGYR	SEQ ID NO.: 133
MSF-31	MSPI-31	5.84	186832	VGIFYESDVMGR	SEQ ID NO.: 333
				AIGYLNTGYQR	SEQ ID NO.: 17
MSF-32	MSPI-32	6.03	135312	HEGSFIQGAEK	SEQ ID NO.: 145
				TLNICEVGTIR	SEQ ID NO.: 309
				QLEWGLER	SEQ ID NO.: 247
MSF-33	MSPI-33.1	4.89	52993	YEAAVPDPR	SEQ ID NO.: 366
				EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 89
MSF-33	MSPI-33.2	4.89	52993	SGNENGFEYLR	SEQ ID NO.: 269
MSF-34	MSPI-34	5.59	21103	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-36	MSPI-36	5.93	49874	YEAAVPDPR	SEQ ID NO.: 366
				EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 89
				TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-37	MSPI-37	5.30	179707	QSEDSTFYLGSR	SEQ ID NO.: 252
				NNEGTYYSPTYNPQSR	SEQ ID NO.: 232
				GAYPLSIEPIGVR	SEQ ID NO.: 119
MSF-39	MSPI-39.1	4.82	98505	TGYFFDGISR	SEQ ID NO.: 301
				CLAFECPEYR	SEQ ID NO.: 42
				IIEVEEEQEDPYLNDLR	SEQ ID NO.: 159
MSF-39	MSPI-39.2	4.82	98505	SILFVPTSAPR	SEQ ID NO.: 274
				FAFQAEVNR	SEQ ID NO.: 103
				LGVIEDHSNR	SEQ ID NO.: 193
				NLLHVTDTGVGMTR	SEQ ID NO.: 230
				EEEAQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 71
MSF-40	MSPI-40	5.35	11955	LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-42	MSPI-42.2	5.98	64540	VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				GECQAEGLFFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
MSF-43	MSPI-43	5.54	37852	IDVHWTR	SEQ ID NO.: 153
				AYLEEECPATLR	SEQ ID NO.: 35
				AGEVQEPFLR	SEQ ID NO.: 16
				DYIEFNK	SEQ ID NO.: 68
				AREIDFMETLK	SEQ ID NO.: 27
				WBAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 354
MSF-44	MSPI-44	6.28	27735	AVVVHAGEDDLGR	SEQ ID NO.: 34
				GGNQASVENGNAQR	SEQ ID NO.: 126
				VTEIWQEVMDR	SEQ ID NO.: 347
MSF-47	MSPI-47	5.49	64150	VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				GECQAEGLFFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
MSF-48	MSPI-48.1	4.77	99610	TGYFFDGISR	SEQ ID NO.: 301
				CLAFECPEYR	SEQ ID NO.: 42
				IIEVEEEQEDPYLNDLR	SEQ ID NO.: 159
MSF-48	MSPI-48.2	4.77	99610	SILFVPTSAPR	SEQ ID NO.: 274
				FAFQAEVNR	SEQ ID NO.: 103
				LGVIEDHSNR	SEQ ID NO.: 193
				NLLHVTDTGVGMTR	SEQ ID NO.: 230
				EEEAQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 71

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-48	MSPI-48.3	4.77	99610	SILFVPTSAPR FAFQAEVNR EEEAQLDGLNASQIR	SEQ ID NO.: 274 SEQ ID NO.: 103 SEQ ID NO.: 71
MSF-49	MSPI-49.1	4.54	74941	MNPLEQYER VIALINDQR	SEQ ID NO.: 217 SEQ ID NO.: 335
MSF-49	MSPI-49.2	4.54	74941	SGNENGIFYLR	SEQ ID NO.: 269
MSF-51	MSPI-51.1	7.48	11668	LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-52	MSPI-52.1	5.72	146050	GYTQQLAFR	SEQ ID NO.: 144
				AVLYNYR SGSDEVQVGQQR AGDFLEANYMNLQR	SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 14
MSF-52	MSPI-52.2	5.72	146050	GYTQQLAFR AVLYNYR SGSDEVQVGQQR	SEQ ID NO.: 144 SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270
MSF-54	MSPI-54	8.64	20604	AQGFTEDTIVLPQTDK TMLLQAPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-55	MSPI-55	5.65	150534	VQVTSQEYSAR	SEQ ID NO.: 342
MSF-56	MSPI-56	5.49	158545	GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLGFR NNEGTYSPNYPQSR	SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 232
MSF-58	MSPI-58	5.66	186832	LPPNVVEESAR	SEQ ID NO.: 202
MSF-60	MSPI-60	5.60	150534	IVESYQIR NDGGIYTCFAENNR TILSDDWK FIPLIPER	SEQ ID NO.: 167 SEQ ID NO.: 222 SEQ ID NO.: 305 SEQ ID NO.: 106
MSF-62	MSPI-62.2	6.52	175109	NGFYPATR EIMENYNIALR	SEQ ID NO.: 226 SEQ ID NO.: 79
MSF-63	MSPI-63	5.00	171366	VEEVKPLEGR SMEQNGPGLEYR VEEVKPLEGR SMEQNGPGLEYR	SEQ ID NO.: 325 SEQ ID NO.: 277 SEQ ID NO.: 325 SEQ ID NO.: 277
MSF-64	MSPI-64.1	6.32	178932	TGDEITYQCR NGFYPATR	SEQ ID NO.: 300 SEQ ID NO.: 226
MSF-65	MSPI-65	6.18	136566	QLEWGLER GFVVAGPSR	SEQ ID NO.: 247 SEQ ID NO.: 125
MSF-66	MSPI-66	5.49	98505	QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 244
MSF-67	MSPI-67.1	5.16	53159	TALASGGVLDASGDYR WVNLPEESLLR	SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 363
MSF-67	MSPI-67.2	5.16	53159	LAAAVSNFYDLYR KTSLEDFYLDEER TSLEDFYLDEER ALYYDLISSPDHGTYS	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 173 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 24
MSF-69	MSPI-69	4.51	126852	GLGEISAASEFK	SEQ ID NO.: 131
MSF-70	MSPI-70	6.15	89080	QDACQDSGGVFAVR	SEQ ID NO.: 238
MSF-72	MSPI-72	5.09	156672	ALYLQYTDITFR NNEGTYSPNYPQSR QSEDSTFYLGFR GAYPLSIEPIGVR YTVNQCR	SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 232 SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 375
MSF-73	MSPI-73	7.26	33226	DNLAIQTR ITVVDALHEIPVK	SEQ ID NO.: 61 SEQ ID NO.: 166

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				TELLPGDR	SEQ ID NO.: 294
MSF-75	MSPI-75	10.06	11587	LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
				ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 19
MSF-76	MSPI-76	5.72	151186	GYTQQLAFR	SEQ ID NO.: 144
				AVLYNYR	SEQ ID NO.: 33
				SGSDEVQVGQQR	SEQ ID NO.: 270
				AGDFLEANYMNLQR	SEQ ID NO.: 14
MSF-77	MSPI-77.2	6.38	177393	IDVHLVPDR	SEQ ID NO.: 152
				EYHFGQAVR	SEQ ID NO.: 100
MSF-78	MSPI-78.1	6.25	33313	ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
				TLISNLEEAK	SEQ ID NO.: 307
MSF-78	MSPI-78.2	6.25	33313	APFAQVSVQPNFQQDK	SEQ ID NO.: 25
				TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-79	MSPI-79	5.48	85680	NDGGIYTCFAENNR	SEQ ID NO.: 222
MSF-80	MSPI-80.1	6.06	60926	TFTCTAAYPESK	SEQ ID NO.: 297
				QEPSQGTTTFAVTSILR	SEQ ID NO.: 240
				WLQGSQELPR	SEQ ID NO.: 359
MSF-81	MSPI-81	5.94	42899	GSPAINVAVHVER	SEQ ID NO.: 140
MSF-82	MSPI-82	5.72	100168	MILEIAPTSNDNDFGR	SEQ ID NO.: 216
				LTITNANIEDAGIYR	SEQ ID NO.: 210
				IEIFQTLFVR	SEQ ID NO.: 156
MSF-83	MSPI-83	5.51	44365	IVFLEEASQGEK	SEQ ID NO.: 168
				FQNIDFAEEVYTR	SEQ ID NO.: 114
				FLYLGDDR	SEQ ID NO.: 109
MSF-84	MSPI-84.1	5.53	99610	QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 244
MSF-84	MSPI-84.2	5.53	99610	IEIFQTLFV	SEQ ID NO.: 155
				NIINSDGGPYVCR	SEQ ID NO.: 228
MSF-86	MSPI-86	4.54	27735	LSELIQPLPLER	SEQ ID NO.: 205
				KPNLQVFLGK	SEQ ID NO.: 171
				GLVSWGNIPCGSK	SEQ ID NO.: 135
				YTNWIK	SEQ ID NO.: 374
MSF-87	MSPI-87	5.29	125687	AFLFQDTPR	SEQ ID NO.: 10
MSF-89	MSPI-89.1	5.58	63762	VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				DYFMPCGR	SEQ ID NO.: 67
				RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258
				GECQAEGVLFFQGD	SEQ ID NO.: 122
MSF-90	MSPI-90	6.08	93159	EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 90
				HVVPNEVVQR	SEQ ID NO.: 149
MSF-91	MSPI-91.1	6.26	21818	VSFLSALEEYTK	SEQ ID NO.: 344
				DEPPQSPWDR	SEQ ID NO.: 56
				WQHEMELYR	SEQ ID NO.: 360
				AKPALEDLR	SEQ ID NO.: 18
				LSPLGEEMR	SEQ ID NO.: 206
				DYVSQFEFSALGK	SEQ ID NO.: 69
				THLAPYSDEL	SEQ ID NO.: 302
				ATEHLSTLSEK	SEQ ID NO.: 29
				VQPYLDDFQK	SEQ ID NO.: 341
				QGLLPVLESFK	SEQ ID NO.: 243
				THLAPYSDEL	SEQ ID NO.: 302
MSF-92	MSPI-92	5.54	150534	NDGGIYTCFAENNR	SEQ ID NO.: 222

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				TILSDDWK IVESYQIR FIPLIPER	SEQ ID NO.: 305 SEQ ID NO.: 167 SEQ ID NO.: 105
MSF-93	MSPI-93.1	5.70	34998	GEVQAMLGQSTEELR AATVGSLAGQPLQER SELEEQLTPVAEETR LEEQAQQR LGPLVEQGR	SEQ ID NO.: 123 SEQ ID NO.: 4 SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 192
MSF-93	MSPI-93.2	5.70	34998	ASSIDELFQDR ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 28 SEQ ID NO.: 83
MSF-94	MSPI-94	5.63	178161	CTSTGWIPAPR	SEQ ID NO.: 48
MSF-95	MSPI-95	5.28	52673	IPIEDGSGEVVLSR VLLDGVQNPR TIYTPGSTVLRYR QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 337 SEQ ID NO.: 306 SEQ ID NO.: 239
MSF-96	MSPI-96	5.80	91613	TGAQELLR HVVPEVNVVQR	SEQ ID NO.: 299 SEQ ID NO.: 149
MSF-97	MSPI-97	5.71	91103	VELEDWNGR YLQEIYNSNNQK	SEQ ID NO.: 326 SEQ ID NO.: 371
MSF-98	MSPI-98	5.54	48679	IGAENVYHNLK LAQANGWGMVSHR VNQIGSVTESIQACK VVIGMDVAASEFFR	SEQ ID NO.: 158 SEQ ID NO.: 178 SEQ ID NO.: 340 SEQ ID NO.: 350
MSF-99	MSPI-99	5.43	112518	TYFEGER NNAHGYFK CVTDPCQADTIR HNGQIWWLENDR YLELESSGHR TCPTCNDHFHGLVQK AFLFQESPR LDQCYCER	SEQ ID NO.: 317 SEQ ID NO.: 231 SEQ ID NO.: 50 SEQ ID NO.: 146 SEQ ID NO.: 369 SEQ ID NO.: 291 SEQ ID NO.: 11 SEQ ID NO.: 179
MSF-102	MSPI-102.1	5.95	34494	SWFEPLVEDMQR SELEEQLTPVAEETR KVEQAVETEPEPELR LEEQAQQR LGPLVEQGR GEVQAMLGQSTEELR	SEQ ID NO.: 285 SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 174 SEQ ID NO.: 183 SEQ ID NO.: 192 SEQ ID NO.: 123
MSF-102	MSPI-102.2	5.95	34494	TLLSNLEAK ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 307 SEQ ID NO.: 28
MSF-102	MSPI-102.3	5.95	34494	LIAPVAEEATVPNNK LKDDDEVAQLK SLADELALVDVLEDK IVVVTAGVR SADTLWDIQK MVVESAYEVIK GLTSVINQK	SEQ ID NO.: 194 SEQ ID NO.: 196 SEQ ID NO.: 275 SEQ ID NO.: 169 SEQ ID NO.: 263 SEQ ID NO.: 219 SEQ ID NO.: 134
MSF-104	MSPI-104	6.29	100168	FLCTGGVSPYADPNICR GDSGGPLIVHK ALFVSEEEK QLNEINYEDHK LEDSTVYHCSR	SEQ ID NO.: 107 SEQ ID NO.: 121 SEQ ID NO.: 20 SEQ ID NO.: 248 SEQ ID NO.: 182

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-105	MSPI-105.1	4.84	25658	TMLLQPAAGSLGYSYR	SEQ ID NO.: 311
				AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-105	MSPI-105.2	4.84	25658	TGAQELLR	SEQ ID NO.: 299
MSF-106	MSPI-106	8.13	68368	IPEDGSGEVVLSR	SEQ ID NO.: 162
				AELQCPQPAAR	SEQ ID NO.: 7
				KQELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 172
				QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 239
MSF-107	MSPI-107	4.95	52196	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-108	MSPI-108	6.05	47450	ELLDTVTAPQK	SEQ ID NO.: 84
				TVQAVLTVPK	SEQ ID NO.: 316
				SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 284
				LSYEGEVTK	SEQ ID NO.: 208
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
				LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				DTDTGALLFGK	SEQ ID NO.: 65
MSF-110	MSPI-110	6.17	93159	AGALNSNDAFVLK	SEQ ID NO.: 13
				YIETDPANR	SEQ ID NO.: 368
				HVVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 149
				EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 90
MSF-111	MSPI-111	5.67	48092	LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 284
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
MSF-112	MSPI-112	5.48	55124	ATVVYQGER	SEQ ID NO.: 30
				EHSSLAFWK	SEQ ID NO.: 77
MSF-113	MSPI-113	6.12	101661	LPPTTTCQQK	SEQ ID NO.: 203
				GDGGGLIVHK	SEQ ID NO.: 121
MSF-114	MSPI-114	5.28	154488	ALYLQYTDFTFR	SEQ ID NO.: 23
				GAYPLSIEPIGVR	SEQ ID NO.: 119
				YTVNQCR	SEQ ID NO.: 375
				QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 252
MSF-116	MSPI-116	5.39	142313	AETIEGVYQCTAR	SEQ ID NO.: 9
				GKPPPSFSWTR	SEQ ID NO.: 128
				ERPPTLTLPENASNK	SEQ ID NO.: 95
				IDGDTIIFSNVQER	SEQ ID NO.: 151
				NALGAIHHTISVR	SEQ ID NO.: 220
				NEVHLEIK	SEQ ID NO.: 223
				QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 250
MSF-117	MSPI-117	5.00	132839	LICSELNGR	SEQ ID NO.: 195
				EGLDLQVLEDSGR	SEQ ID NO.: 75
				GNLAGLTIR	SEQ ID NO.: 137
MSF-119	MSPI-119	6.00	49723	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-120	MSPI-120	5.78	72071	HVVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 149
				TGAQELLR	SEQ ID NO.: 299
MSF-122	MSPI-122	5.03	17230	MPCAEIVR	SEQ ID NO.: 218
				LEGEACGVYTPR	SEQ ID NO.: 184
				EPGCGCCSVCAR	SEQ ID NO.: 88
MSF-123	MSPI-123.1	5.89	91613	EVQGFESATFLGYFK	SEQ ID NO.: 98
				HVVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 149
				RTPTVVVK	SEQ ID NO.: 260
				EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 90
MSF-125	MSPI-125.1	4.46	29058	AVVVHAGEDDLGR	SEQ ID NO.: 34

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-125	MSPI-125.2	4.46	29058	GATADPLCAPAR TALAVIDGEAR LGERPPALLGSQGLR	SEQ ID NO.: 118 SEQ ID NO.: 288 SEQ ID NO.: 191
MSF-126	MSPI-126.1	5.86	17929	GLEEELQFSLGSK	SEQ ID NO.: 129
MSF-126	MSPI-126.2	5.86	17929	EVAGLWIK EGTYSLPK	SEQ ID NO.: 96 SEQ ID NO.: 76
MSF-127	MSPI-127.1	5.62	54294	VLSALQAVQGLLVAQGR DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 62
				SLDFTELDVAEEK ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22
MSF-128	MSPI-128	5.57	142313	GYTQQLAFR AVLYNYR SGSDEVQVGQQR SNLDEDIAEENIVSR	SEQ ID NO.: 144 SEQ ID NO.: 33 SEQ ID NO.: 270 SEQ ID NO.: 279
MSF-130	MSPI-130	4.88	95795	GYHLNEEGTR CLAFECPENYR TGYFFDGISR	SEQ ID NO.: 143 SEQ ID NO.: 42 SEQ ID NO.: 301
MSF-131	MSPI-131	5.03	50944	GTQEQDFYVTSETVVR EDQYHYLLDR TLYLADTFPTNFR	SEQ ID NO.: 141 SEQ ID NO.: 70 SEQ ID NO.: 310
MSF-132	MSPI-132	5.16	41028	ITCTEEGWSPTPK INHGLYDEEK EIMENYNIALR	SEQ ID NO.: 164 SEQ ID NO.: 161 SEQ ID NO.: 79
MSF-133	MSPI-133	5.87	67575	AADDTWEPFASGK GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 1 SEQ ID NO.: 140
MSF-134	MSPI-134	5.98	90092	HVVPNEVVVQR EPGLQIWR YIETDPANR	SEQ ID NO.: 149 SEQ ID NO.: 90 SEQ ID NO.: 368
MSF-135	MSPI-135	5.18	180485	VIAVNEVGR	SEQ ID NO.: 336
MSF-136	MSPI-136	4.70	37742	IETALTSLHQR WTFEACR FQLTFPLR LENLEQYSR	SEQ ID NO.: 157 SEQ ID NO.: 362 SEQ ID NO.: 113 SEQ ID NO.: 186
MSF-137	MSPI-137	5.97	56994	SLDFTELDVAEEK ALQDQLVLVAAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR LQAILGVPWK DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 62
MSF-139	MSPI-139	6.06	28850	VTEIWQEVQMR	SEQ ID NO.: 347
MSF-140	MSPI-140	6.95	19478	EQQALQTVCLK TFHEASEDCISR NWETETIAQPDGK	SEQ ID NO.: 92 SEQ ID NO.: 296 SEQ ID NO.: 235
MSF-141	MSPI-141.1	5.77	52354	YTFELSR	SEQ ID NO.: 373
MSF-141	MSPI-141.2	5.77	52354	EPGEFALLR VAMHLVCFPSR TALASGGVLDASGDYR YEAAYDPDR	SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 287 SEQ ID NO.: 366
MSF-142	MSPI-142	5.77	54791	DPTFIPAPIQAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR	SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				ALQDQLVLVAAK SLDFTELDVAABK LQAILGVVWK	SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 276 SEQ ID NO.: 204
MSF-143	MSPI-143.1	5.95	19673	QITVNDLPVGR	SEQ ID NO.: 246
MSF-144	MSPI-144	5.48	46191	YVGGQEHFAHLLLR EQLGEFYEAALDCLR TLMFGSYLDDEK NWGLSVYADKPETTK	SEQ ID NO.: 376 SEQ ID NO.: 91 SEQ ID NO.: 308 SEQ ID NO.: 236
				TEDTIFLR TYMLAFDVNDEK WFTYASAFR	SEQ ID NO.: 292 SEQ ID NO.: 318 SEQ ID NO.: 358
MSF-145	MSPI-145.2	5.40	151841	ALYLQYTDETFR IYHSHIDAPK DLYSGLIPLIVCR GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 170 SEQ ID NO.: 59 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252
MSF-147	MSPI-147.2	7.10	73878	QELSEAEQATR IPIEDGSGEVVLSR	SEQ ID NO.: 239 SEQ ID NO.: 162
MSF-148	MSPI-148	5.07	131619	SPEQQETVLDGNLIR ILDDLSPR LALDNGGLAR	SEQ ID NO.: 281 SEQ ID NO.: 160 SEQ ID NO.: 177
MSF-149	MSPI-149	6.21	101661	LEDSVTYHCSR GDSGGPLIVHK LPPTTTCQQQK CLVNLIEK DAQYAPGYDK	SEQ ID NO.: 182 SEQ ID NO.: 121 SEQ ID NO.: 203 SEQ ID NO.: 45 SEQ ID NO.: 51
MSF-150	MSPI-150	5.50	151186	VQVTSQEYSAR	SEQ ID NO.: 342
MSF-151	MSPI-151	9.39	11427	ALDFAVGEYNK LVGGPMDASVEEEGVR	SEQ ID NO.: 19 SEQ ID NO.: 211
MSF-152	MSPI-152	5.55	60192	WLQGSQELPR DASGVTFWTPSTSGK TFTCTAAYPESK	SEQ ID NO.: 359 SEQ ID NO.: 52 SEQ ID NO.: 297
MSF-154	MSPI-154.1	5.28	142929	QSEDSTFYLGFR ALYLQYTDETFR GAYPLSIEPIGVR NNEGTYYPNYPQSR	SEQ ID NO.: 252 SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 232
MSF-154	MSPI-154.2	5.28	142929	QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 250
MSF-154	MSPI-154.3	5.28	142929	AFLFQDTFR	SEQ ID NO.: 10
MSF-155	MSPI-155.1	6.33	49273	YLQEIYNSNNQK DTVQIHDITGK DNCCILDER LTIGEGQQHHLGAK VELEDWNGR YEASILTHDSSIR	SEQ ID NO.: 371 SEQ ID NO.: 66 SEQ ID NO.: 60 SEQ ID NO.: 209 SEQ ID NO.: 326 SEQ ID NO.: 367
MSF-155	MSPI-155.2	6.33	49273	TSLEDFYLDDEER LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176
MSF-155	MSPI-155.3	6.33	49273	EPGEFALLR YEAAVPDPR TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 287
MSF-156	MSPI-156.2	5.85	48238	ELLDTVTAPQK TVQAVLTVPK	SEQ ID NO.: 84 SEQ ID NO.: 316

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				LSYEGETVK SSFVAPLEK TSLEDFYLDEER LAAAVSNFGYDLYR DTDTGALLFIGK	SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 65
MSF-158	MSPI-158.2	5.88	64150	YYCFQGNQFLR GECQAEGLVFFQGDR VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 380 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 351
				DYFMPCPGR NFPSPVDAFR RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 258
MSF-159	MSPI-159	6.37	101661	LPPTTTCQQQK LEDSTVTHCSR QLNEINYEDHK CLVNLIEK VASYGKPKR ALFVSEEEK GDSGGPLIVHK	SEQ ID NO.: 203 SEQ ID NO.: 182 SEQ ID NO.: 248 SEQ ID NO.: 45 SEQ ID NO.: 321 SEQ ID NO.: 20 SEQ ID NO.: 121
MSF-160	MSPI-160	5.54	47450	LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDEER SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 284
MSF-161	MSPI-161	6.25	55124	LQAILGVPWK DPTFIPAIQAK FMQAVTGWK VLSALQAVQGLLVAQGR ALQDQLVLVAAK SLDFTELDVAEEK	SEQ ID NO.: 204 SEQ ID NO.: 62 SEQ ID NO.: 111 SEQ ID NO.: 338 SEQ ID NO.: 22 SEQ ID NO.: 276
MSF-163	MSPI-163	5.32	142929	QPEYAVVQR	SEQ ID NO.: 250
MSF-165	MSPI-165.1	5.77	50178	DNCCILDER VELEDWNGR	SEQ ID NO.: 60 SEQ ID NO.: 326
MSF-165	MSPI-165.2	5.77	50178	YEAAPDPR VAMHLVCFPSR EPGEFALLR TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 366 SEQ ID NO.: 320 SEQ ID NO.: 89 SEQ ID NO.: 287
MSF-167	MSPI-167	6.17	48679	VWVYPPEK GECQAEGLVFFQGDR DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 67
MSF-168	MSPI-168	5.36	98505	SHALQLNRR QGSFQGGFR EELVYELNPLDHR	SEQ ID NO.: 272 SEQ ID NO.: 244 SEQ ID NO.: 72
MSF-169	MSPI-169.1	5.12	139109	ILDDLSPR VRPQQLVK FAHTVVTSR LALDNGGLAR	SEQ ID NO.: 160 SEQ ID NO.: 343 SEQ ID NO.: 104 SEQ ID NO.: 177
MSF-169	MSPI-169.2	5.12	139109	EYTDASFTNR QYTDSTFR YTVNQCR GAYPLSIEPIGVR QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 101 SEQ ID NO.: 256 SEQ ID NO.: 375 SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 252
MSF-170	MSPI-170	5.31	156503	NNEGTYSPNYPQSR QSEDSTFYLGFR	SEQ ID NO.: 232 SEQ ID NO.: 252

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				GAYPLSIEPIGVR ALYLQYTDETFR IYHSHIDAPK	SEQ ID NO.: 119 SEQ ID NO.: 23 SEQ ID NO.: 170
MSF-171	MSPI-171	4.99	15072	SELEEQLTPVAEETR GEVQAMLGQSTEELR KVEQAVETEPEPELR	SEQ ID NO.: 267 SEQ ID NO.: 123 SEQ ID NO.: 174
MSF-172	MSPI-172	5.56	54294	IPEDGSGEVVLSR SGPIVTSPIYQIHFTK	SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 268
				TVMVNIENPEGIPVK QELSEAEQATR VLLDGVQNPR GLEVTITAR FYYTYNEK TIYTPGSTVLRY	SEQ ID NO.: 315 SEQ ID NO.: 239 SEQ ID NO.: 337 SEQ ID NO.: 130 SEQ ID NO.: 117 SEQ ID NO.: 306
MSF-173	MSPI-173.2	5.85	62512	GECQABGVLFQGDR NFPSPVDAAFR VWVYPPEK DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 122 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 67
MSF-175	MSPI-175	4.98	100168	TGYFFDGISR HVEVEEQEDPYLNDR	SEQ ID NO.: 301 SEQ ID NO.: 159
MSF-176	MSPI-176.1	5.43	48238	LSYGEVTK SSFVAPEK LAAAVSNFGYDLYR TSLEDFYLDDEER ELLDITVAPQK	SEQ ID NO.: 208 SEQ ID NO.: 284 SEQ ID NO.: 176 SEQ ID NO.: 312 SEQ ID NO.: 84
MSF-176	MSPI-176.2	5.43	48238	QTVPAQILLHYR EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 253 SEQ ID NO.: 89
MSF-177	MSPI-177	7.67	68368	SGPIVTSPIYQIHFTK EVVADSVWADV GLEVTITAR YYTYLIMNK TIYTPGSTVLRY FYYTYNEK IPEDGSGEVVLSR VLLDGVQNPR	SEQ ID NO.: 268 SEQ ID NO.: 99 SEQ ID NO.: 130 SEQ ID NO.: 381 SEQ ID NO.: 306 SEQ ID NO.: 117 SEQ ID NO.: 162 SEQ ID NO.: 337
MSF-178	MSPI-178	8.47	22644	APEAQVSVQPNFQQDK AQGFTEITVFLPQIDK TMLLQPAAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 25 SEQ ID NO.: 26 SEQ ID NO.: 311
MSF-179	MSPI-179.1	5.60	46036	SAVQGPPEK QEPSQGTITFAVTSILR WLQGSQELPR YLTWASR DASGVTFITWTPSSGK	SEQ ID NO.: 264 SEQ ID NO.: 240 SEQ ID NO.: 359 SEQ ID NO.: 372 SEQ ID NO.: 53
MSF-179	MSPI-179.2	5.60	46036	DYFMPCPGR NFPSPVDAAFR VWVYPPEK GECQABGVLFQGDR	SEQ ID NO.: 67 SEQ ID NO.: 225 SEQ ID NO.: 351 SEQ ID NO.: 122
MSF-180	MSPI-180	6.21	36134	DCSGVSLHLTR CVFTGEGR	SEQ ID NO.: 54 SEQ ID NO.: 49
MSF-181	MSPI-181.1	5.13	21638	EVAGLWIK EGTYSLPK	SEQ ID NO.: 96 SEQ ID NO.: 76

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-181	MSPI-181.2	5.13	21638	AQGFTEDTIVFLPQIDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLQPAGSLGYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-182	MSPI-182	5.62	52038	LQAILGVVWK	SEQ ID NO.: 204
				FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 111
				ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 22
				VLSALQAVQGILLVAQGR	SEQ ID NO.: 338
				SLDFTELDVAAEK	SEQ ID NO.: 276
				DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 62
MSF-183	MSPI-183	8.76	18350	TMLLQPAGSLGYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-184	MSPI-184	6.30	50790	TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
				LAAAVSNFGYDLR	SEQ ID NO.: 176
MSF-185	MSPI-185	4.81	18657	VFSNGADLSGVTEEAPLK	SEQ ID NO.: 331
				FLENEDR	SEQ ID NO.: 108
MSF-186	MSPI-186	6.81	48827	VAMHLVCPSPR	SEQ ID NO.: 320
				WVNLPEESLLR	SEQ ID NO.: 363
				TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
				YEAAVPDPR	SEQ ID NO.: 366
				EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 89
MSF-187	MSPI-187.1	6.01	29689	ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
MSF-187	MSPI-187.2	6.01	29689	AADDTEWPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVER	SEQ ID NO.: 140
MSF-188	MSPI-188.2	5.59	100168	QGEDAEVVCRR	SEQ ID NO.: 242
				SNPPASIHWR	SEQ ID NO.: 280
MSF-189	MSPI-189	5.74	65725	GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
				RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258
				NFPSPVDAFR	SEQ ID NO.: 225
				YYCFQGNQFLR	SEQ ID NO.: 380
MSF-191	MSPI-191	6.24	87097	EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 90
				HVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 149
MSF-192	MSPI-192.1	5.49	19869	TENCAVLSGAANGK	SEQ ID NO.: 295
				LDTLAQEVALLK	SEQ ID NO.: 180
				NWETEITAQPDGGK	SEQ ID NO.: 235
				TFHEASEDCISR	SEQ ID NO.: 296
				NWETEITAQPDGGK	SEQ ID NO.: 235
				CFLAFTQTK	SEQ ID NO.: 41
				EQQALQTVCLK	SEQ ID NO.: 92
MSF-192	MSPI-192.2	5.49	19869	RVIMERDITYPR	SEQ ID NO.: 261
				LDTSQWPLLLK	SEQ ID NO.: 181
MSF-193	MSPI-193	5.90	23795	APEAQVSVQPNFQQDK	SEQ ID NO.: 25
				AQGFTEDTIVFLPQIDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLQPAGSLGYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-194	MSPI-194.1	6.91	116746	HSIFTPEINPR	SEQ ID NO.: 148
				CEEDEEFTCR	SEQ ID NO.: 37
MSF-194	MSPI-194.2	6.91	116746	CFEQGDHGFQDNK	SEQ ID NO.: 40
				IEDIHLVER	SEQ ID NO.: 154
				CFELQEAGPPDCR	SEQ ID NO.: 39
MSF-195	MSPI-195.1	5.45	66932	GECQAEGVLFFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				NPPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
MSF-196	MSPI-196	8.22	51254	DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 62
				ALQDQLVLVAEK	SEQ ID NO.: 22
				FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 111
				SLDFIETDVAAEK	SEQ ID NO.: 276
				VLSALQAVQGLLVAQGR	SEQ ID NO.: 338
				LQAILGVPWK	SEQ ID NO.: 204
MSF-197	MSPI-197	5.11	50790	LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
MSF-198	MSPI-198	5.59	20201	EQQALQTVCLK	SEQ ID NO.: 92
				LDTLAQEVALLK	SEQ ID NO.: 180
				CFLAFTQTK	SEQ ID NO.: 41
				NWETEITAQPDGGK	SEQ ID NO.: 235
				TFHEASEDCISR	SEQ ID NO.: 296
MSF-199	MSPI-199.1	5.43	49573	ELLDVTIAPQK	SEQ ID NO.: 84
				TVQAVLTVPK	SEQ ID NO.: 316
				ALYYDLISSPDHGTYS	SEQ ID NO.: 24
				DDTDGALLFIGK	SEQ ID NO.: 65
				LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 284
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
				LSYEGETVK	SEQ ID NO.: 208
MSF-199	MSPI-199.2	5.43	49573	TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
MSF-200	MSPI-200	7.14	116746	EQQCVIMAENR	SEQ ID NO.: 93
				NLDENYCR	SEQ ID NO.: 229
				HSIFTPEINPR	SEQ ID NO.: 148
				WELCDIPR	SEQ ID NO.: 355
				WSSTSPHRPR	SEQ ID NO.: 361
				CEEDEEFTCR	SEQ ID NO.: 37
MSF-201	MSPI-201	6.65	12463	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-202	MSPI-202.1	4.93	81483	SPQELLCGASLISDR	SEQ ID NO.: 282
				ELLESYIDGR	SEQ ID NO.: 85
				TATSEYQIFFNPR	SEQ ID NO.: 289
MSF-202	MSPI-202.2	4.93	81483	WEPDPQR	SEQ ID NO.: 356
				VIALINDQR	SEQ ID NO.: 335
MSF-203	MSPI-203	6.00	38405	AYLEEECPATLR	SEQ ID NO.: 35
				WEAEFVYVQR	SEQ ID NO.: 354
MSF-205	MSPI-205	5.28	72474	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-206	MSPI-206	6.47	28747	NPNLPPETVDSLK	SEQ ID NO.: 233
				IPITTFENGR	SEQ ID NO.: 163
MSF-207	MSPI-207	4.94	134070	EGLDLQVLEDSGR	SEQ ID NO.: 75
				GNLAGLILR	SEQ ID NO.: 137
				QEPTPGIR	SEQ ID NO.: 241
MSF-208	MSPI-208	5.37	123390	HNGQIWWLENDR	SEQ ID NO.: 146
				ARLPQESPR	SEQ ID NO.: 11
				YLELESSGHR	SEQ ID NO.: 369
				LDQCYCER	SEQ ID NO.: 179
				NNAHGYFK	SEQ ID NO.: 231
				CVTDPCQADTIR	SEQ ID NO.: 50

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				TCPTCNDFFHGLVQK	SEQ ID NO.: 291
MSF-209	MSPI-209	5.49	24374	TMLLQFAGSLGYSYSYR	SEQ ID NO.: 311
				AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-210	MSPI-210	5.66	50026	TVQAVLTVPK	SEQ ID NO.: 316
				LSYEGETVK	SEQ ID NO.: 208
				SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 284
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
				LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
MSF-211	MSPI-211	5.19	50178	SNAQGIDLNR	SEQ ID NO.: 278
				NFPDLDR	SEQ ID NO.: 224
MSF-212	MSPI-212.2	5.79	64150	YYCFQGNQFLR	SEQ ID NO.: 380
				RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258
				VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				GECQAEGVLFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
MSF-213	MSPI-213	5.83	13375	GGSTSYGTGSETESPR	SEQ ID NO.: 127
				ADSGEGDFLAEGGGVR	SEQ ID NO.: 5
				GLIDEVNDQFTNR	SEQ ID NO.: 132
MSF-215	MSPI-215	5.11	35613	ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
				ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
MSF-216	MSPI-216	9.43	68368	VDFTLSSEK	SEQ ID NO.: 322
				AEPQDALEK	SEQ ID NO.: 6
				SCGLHQLLR	SEQ ID NO.: 265
				TTNIQGINLLFSSR	SEQ ID NO.: 313
				VGDTLNLNLR	SEQ ID NO.: 332
				LNMGITDLQGLR	SEQ ID NO.: 199
MSF-217	MSPI-217.3	9.04	11790	LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
				ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 19
MSF-218	MSPI-218	5.08	91613	GYHLNEEGTR	SEQ ID NO.: 143
MSF-219	MSPI-219	7.01	117828	CEEDEEFTCR	SEQ ID NO.: 37
				FVTWIEGVMR	SEQ ID NO.: 116
				HSIFTPETNPR	SEQ ID NO.: 148
				EQQCIVMAENR	SEQ ID NO.: 93
				NLDENYCR	SEQ ID NO.: 229
				WEYCNLK	SEQ ID NO.: 357
MSF-220	MSPI-220	4.56	46503	TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
				SSFVAPLEK	SEQ ID NO.: 284
				LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
MSF-221	MSPI-221.1	5.55	66125	GECQAEGVLFQGDR	SEQ ID NO.: 122
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
				VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				YYCFQGNQFLR	SEQ ID NO.: 380
				RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258
				LTIGEGQQHHLGGAK	SEQ ID NO.: 209
				VELEDWNGR	SEQ ID NO.: 326
				RLDGSVDFK	SEQ ID NO.: 257
				YLQEIYNSNNQK	SEQ ID NO.: 371
MSF-222	MSPI-222.2	5.54	49573	LAAAVSNFGYDLYR	SEQ ID NO.: 176
				TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-223	MSPI-223.1	5.62	50026	TSLEDFYLDDEER	SEQ ID NO.: 312
MSF-223	MSPI-223.2	5.62	50026	IETALTSLHQR	SEQ ID NO.: 157
				LENLEQYSR	SEQ ID NO.: 186
				FQLTFPLR	SEQ ID NO.: 113
				LPFVINDGK	SEQ ID NO.: 201
MSF-224	MSPI-224.1	5.07	65130	VEESELAR	SEQ ID NO.: 324
				SIEVFGQFNGK	SEQ ID NO.: 273
				CLCACPFK	SEQ ID NO.: 44
				TEHYEEQIEAFK	SEQ ID NO.: 293
				DGNLTLYYR	SEQ ID NO.: 57
				DRDGNLTLYYR	SEQ ID NO.: 64
				RPWNVASLIYETK	SEQ ID NO.: 259
MSF-225	MSPI-225	4.64	122257	NAPTPQEFRR	SEQ ID NO.: 221
				AGEQDATHLK	SEQ ID NO.: 15
				GLGEISAASEFK	SEQ ID NO.: 131
				DIQVIVNVPTIQR	SEQ ID NO.: 58
MSF-226	MSPI-226	4.81	50178	VEQATQAPMER	SEQ ID NO.: 327
				QMYPELQIAR	SEQ ID NO.: 249
MSF-228	MSPI-228.1	4.95	44515	GECQAEGVLFQGD	SEQ ID NO.: 122
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
				NFPSPVDAEFR	SEQ ID NO.: 225
MSF-228	MSPI-228.2	4.95	44515	NGVAQEPVHLDSPA	SEQ ID NO.: 227
				CLAPLEGAR	SEQ ID NO.: 43
				CEGPIPDVTFELLR	SEQ ID NO.: 38
				HQFLITGDTQGR	SEQ ID NO.: 147
				ATWSGAVLAGR	SEQ ID NO.: 31
MSF-229	MSPI-229.1	6.07	79685	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-229	MSPI-229.2	6.07	79685	QIQVSWLR	SEQ ID NO.: 245
				VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
				YVTSAPMPEFQAPGR	SEQ ID NO.: 377
MSF-230	MSPI-230	6.98	97467	EPGLQIWR	SEQ ID NO.: 90
				HVVPNEVVVQR	SEQ ID NO.: 149
				TGAQEILR	SEQ ID NO.: 299
MSF-231	MSPI-231	5.30	49423	VAMHLVCPGR	SEQ ID NO.: 320
				WVNLPEESLLR	SEQ ID NO.: 363
				TALASGGVLDASGDYR	SEQ ID NO.: 287
				YEAAPDPGR	SEQ ID NO.: 366
				EPGEFALLR	SEQ ID NO.: 89
MSF-232	MSPI-232	7.27	27636	IPITIFENGR	SEQ ID NO.: 163
MSF-233	MSPI-233.1	7.35	36450	KYNELLK	SEQ ID NO.: 175
				ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
				EILSVDCSTNNPSQAK	SEQ ID NO.: 78
				ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
MSF-233	MSPI-233.2	7.35	36450	LGADMEDVCGR	SEQ ID NO.: 190
				QWAGLVEK	SEQ ID NO.: 255
				QQTEWQSGQR	SEQ ID NO.: 251
				SWFEPLVEDMQR	SEQ ID NO.: 285
				AATVGSAGQPLQER	SEQ ID NO.: 4
				GEVQAMLGQSTEELR	SEQ ID NO.: 123
				SELEBQLTPVAEETR	SEQ ID NO.: 267
				LEEQAQQR	SEQ ID NO.: 183

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-234	MSPI-234	5.37	24470	LGPLVEQGR	SEQ ID NO.: 192
MSF-235	MSPI-235	5.36	20134	TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
				EVDSGNDIYGNPIK	SEQ ID NO.: 97
				SDGSCAWYR	SEQ ID NO.: 266
MSF-236	MSPI-236.1	5.20	72071	LETPDFQLFK	SEQ ID NO.: 187
				CLAPLEGAR	SEQ ID NO.: 43
				LELHVDGPPRPQLR	SEQ ID NO.: 185
				CEGPIPDVTFELR	SEQ ID NO.: 38
				NGVAQEPVHLDSPAIK	SEQ ID NO.: 227
				ATWSGAVLAGR	SEQ ID NO.: 31
				HQFLLTGDTQGR	SEQ ID NO.: 147
MSF-236	MSPI-236.2	5.20	72071	VWVYPPPEK	SEQ ID NO.: 351
				GECQAEGVLFQGDGR	SEQ ID NO.: 122

- The second group comprises MSPIs that are increased in the CSF of subjects having MS as compared with the CSF of subjects free from MS, where the differential presence is significant. The amino acid sequences of tryptic digest peptides of these MSPIs identified by tandem mass spectrometry and database searching are listed in Table V in addition to the pIs and MWs of these MSPIs.

Table V. MSPIs Increased in CSF of Subjects Having MS

10

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
MSF-237	MSPI-237	10.15	11421	ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 19
				LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-238	MSPI-238	8.26	11328	ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 19
				LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-239	MSPI-239.1	6.65	14399	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-239	MSPI-239.2	6.65	14399	ALDFAVGEYNK	SEQ ID NO.: 19
				LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-240	MSPI-240.1	7.73	27538	GFQALGDAADIR	SEQ ID NO.: 124
MSF-240	MSPI-240.2	7.73	27538	YAASSYLSLTPEQWK	SEQ ID NO.: 364
				AAPSVTLFPPSSEELQANK	SEQ ID NO.: 2
MSF-241	MSPI-241.1	6.10	86456	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-241	MSPI-241.2	6.10	86456	QIQVSWLR	SEQ ID NO.: 245
				VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
				YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 377
MSF-242	MSPI-242.1	7.30	25465	AAPSVTLFPPSSEELQANK	SEQ ID NO.: 2
				YAASSYLSLTPEQWK	SEQ ID NO.: 364
MSF-242	MSPI-242.2	7.30	25465	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-243	MSPI-243	6.01	12948	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
MSF-244	MSPI-244	5.27	11037	AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-245	MSPI-245	6.21	80579	VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
				YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 377
MSF-246	MSPI-246.1	8.78	15019	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-246	MSPI-246.2	8.78	15019	ALDFAVGEYVK	SEQ ID NO.: 19
				LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-248	MSPI-248	7.19	30921	CSVFYGAPSK	SEQ ID NO.: 47
				VEYGFQVK	SEQ ID NO.: 329
				GLQDEDEGYR	SEQ ID NO.: 133
				ITQVLHFTK	SEQ ID NO.: 165
MSF-250	MSPI-250.2	4.33	42755	TEDTIFLR	SEQ ID NO.: 292
MSF-251	MSPI-251	7.60	81385	TIYTPGSTVLRY	SEQ ID NO.: 306
				QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 239
MSF-254	MSPI-254.1	4.28	11270	DQDGEILLPR	SEQ ID NO.: 63
MSF-257	MSPI-257.1	4.64	13792	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-257	MSPI-257.2	4.64	13792	SELEQLTPVAETR	SEQ ID NO.: 267
MSF-257	MSPI-257.3	4.64	13792	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-260	MSPI-260.1	6.06	78111	AEMADQAAAWLTR	SEQ ID NO.: 8
MSF-260	MSPI-260.2	6.06	78111	QIQVSWLR	SEQ ID NO.: 245
				VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
				YVTSAPMPEPQAPGR	SEQ ID NO.: 377
MSF-261	MSPI-261	4.86	44065	WEAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 354
				IDVHWTR	SEQ ID NO.: 153
				AGEVQPELR	SEQ ID NO.: 16
				AREDFMETLK	SEQ ID NO.: 27
MSF-262	MSPI-262.2	4.40	60275	EFEGEEYLEILGTR	SEQ ID NO.: 74
				VTNYPPTTESK	SEQ ID NO.: 348
MSF-265	MSPI-265	6.56	20744	SDGSCAWYR	SEQ ID NO.: 266
				EVDSGNDIYGNPIK	SEQ ID NO.: 97
MSF-266	MSPI-266	6.54	13783	LEEQAQQIR	SEQ ID NO.: 183
MSF-267	MSPI-267	5.54	21908	PPYTVVYFPVR	SEQ ID NO.: 237
				FQDGLTLTYSNTILR	SEQ ID NO.: 112
				EEVTVTETWQEGSLK	SEQ ID NO.: 73
MSF-268	MSPI-268.1	8.85	13625	ALDFAVGEYVK	SEQ ID NO.: 19
				LVGGPMDASVEEGVR	SEQ ID NO.: 211
MSF-270	MSPI-270	5.74	32454	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-271	MSPI-271	6.43	45269	TIEAEEAHGTVIR	SEQ ID NO.: 304
MSF-273	MSPI-273	4.94	16019	LGPLVEQGR	SEQ ID NO.: 192
				AATVGSAGQPLQER	SEQ ID NO.: 4
				LEEQAQQIR	SEQ ID NO.: 183
MSF-274	MSPI-274	9.80	23795	GFQALGDAADIR	SEQ ID NO.: 124
MSF-276	MSPI-276	7.32	13812	LYTLVLTDFDAPSR	SEQ ID NO.: 214
				YVWLVEQDR	SEQ ID NO.: 378
				GNDISSGTVLSDYVGGPPK	SEQ ID NO.: 136
				NRPTISWDGLDSGK	SEQ ID NO.: 234
				YVWLVEQDRPLK	SEQ ID NO.: 379
MSF-277	MSPI-277	6.29	80131	VSVFVPPR	SEQ ID NO.: 345
MSF-279	MSPI-279	6.69	24664	APAEQSVQPNFQQDK	SEQ ID NO.: 25
				AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLQAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-280	MSPI-280.1	6.06	33713	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-280	MSPI-280.2	6.06	33713	ELDESLQVAER	SEQ ID NO.: 83
				LFDSDPITVTVPVEVSR	SEQ ID NO.: 189
MSF-283	MSPI-283.1	4.78	43626	WEAEPVYVQR	SEQ ID NO.: 354
MSF-283	MSPI-283.2	4.78	43626	CAEENCPIQK	SEQ ID NO.: 36
				ENEGFTVTAEGK	SEQ ID NO.: 87
				VYAYYNLEESCTR	SEQ ID NO.: 353
				SGSDEVQVVGQQR	SEQ ID NO.: 270
				GQGTLVSVVTMYHAK	SEQ ID NO.: 138
MSF-284	MSPI-284.1	6.43	26066	TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-284	MSPI-284.2	6.43	26066	TVAAPSVFIFPPSDEQLK	SEQ ID NO.: 314
				LLIYDASTR	SEQ ID NO.: 198
				SGTASVVCLLNNFYPR	SEQ ID NO.: 271
				EIVMTQSPATLSVSPGER	SEQ ID NO.: 81
MSF-285	MSPI-285	5.75	27835	SYSCQVTHEGSTVEK	SEQ ID NO.: 286
MSF-289	MSPI-289	6.74	54791	VLSALQAVQGGLVLAQGR	SEQ ID NO.: 338
				SLDFTELDVAEEK	SEQ ID NO.: 276
				ALQDQLVLVAAK	SEQ ID NO.: 22
				LQAILGVFWK	SEQ ID NO.: 204
				FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 111
				DPTFHAPIQAK	SEQ ID NO.: 62
MSF-290	MSPI-290	4.36	20951	TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
				AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-291	MSPI-291.1	4.33	105354	LLDSLPSDTR	SEQ ID NO.: 197
MSF-291	MSPI-291.2	4.33	105354	THPHFVIPYR	SEQ ID NO.: 303
				SQVMTHLR	SEQ ID NO.: 283
				VESLEQEAANER	SEQ ID NO.: 328
				AVIQHFQEK	SEQ ID NO.: 32
				VEAMLNDR	SEQ ID NO.: 323
MSF-292	MSPI-292	5.76	13128	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-295	MSPI-295	4.32	36134	IPITTFENGR	SEQ ID NO.: 163
MSF-298	MSPI-298.1	7.51	24762	EIVLTQSPATLSLSPGER	SEQ ID NO.: 80
				FSGSGSGTDFTLTISR	SEQ ID NO.: 115
				VYACEVTHQGLSSPVTK	SEQ ID NO.: 352
MSF-298	MSPI-298.2	7.51	24762	TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
				AQGFTEDTIVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
MSF-299	MSPI-299	8.12	54806	QELSEAEQATR	SEQ ID NO.: 239
MSF-300	MSPI-300	4.37	40820	VFQEPFLFYAEP	SEQ ID NO.: 330
				MIELHNQEYR	SEQ ID NO.: 215
				LYGMNEEGWR	SEQ ID NO.: 213
				QVMNGFQNR	SEQ ID NO.: 254
MSF-301	MSPI-301	5.58	32266	AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
				GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
				CPLMVKVLDAVR	SEQ ID NO.: 46
MSF-302	MSPI-302	4.28	21301	APEAQVSVQPNFQQDK	SEQ ID NO.: 25
				TMLLQPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-303	MSPI-303.2	7.84	65034	VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				DYFMPCGR	SEQ ID NO.: 67
				NFPSPVDAAFR	SEQ ID NO.: 225
				RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	pI	MW (Da)	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides	SEQ ID NO:
				GECQAEGVLFQGD	SEQ ID NO.: 122
MSF-305	MSPI-305	9.04	21021	APEAQVSVQPNFQDDK	SEQ ID NO.: 25
				TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-306	MSPI-306	6.86	50636	RLWWLDLK	SEQ ID NO.: 258
				DYFMPCPGR	SEQ ID NO.: 67
				YYCFQGNQFLR	SEQ ID NO.: 380
				VWVYPPEK	SEQ ID NO.: 351
				GECQAEGVLFQGD	SEQ ID NO.: 122
MSF-307	MSPI-307	7.48	59646	EMSGSPASGHPVK	SEQ ID NO.: 86
				LNMGTDLQGLR	SEQ ID NO.: 199
				GQIVFMNR	SEQ ID NO.: 139
MSF-308	MSPI-308	7.78	55797	TCPKPDDLFPSTVVPLK	SEQ ID NO.: 290
				TFYEPGEETYSCK	SEQ ID NO.: 298
				ATVVYQGER	SEQ ID NO.: 30
				EHSSLAFWK	SEQ ID NO.: 77
MSF-311	MSPI-311.1	5.41	58040	RVWELSK	SEQ ID NO.: 262
				DDLTVSDAFHK	SEQ ID NO.: 55
MSF-311	MSPI-311.2	5.41	58040	WLQGSQELPR	SEQ ID NO.: 359
MSF-311	MSPI-311.3	5.41	58040	ALQDQLVLAALK	SEQ ID NO.: 22
				VLSALQAVQGLLVAQGR	SEQ ID NO.: 338
				DPTFIPAPIQAK	SEQ ID NO.: 62
				SLDFTELDVAEEK	SEQ ID NO.: 276
				FMQAVTGWK	SEQ ID NO.: 111
MSF-313	MSPI-313	5.58	24087	TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-314	MSPI-314	4.84	26797	EKPGVYTNVCR	SEQ ID NO.: 82
				LSELIQPLPLER	SEQ ID NO.: 205
				YTNWIKQ	SEQ ID NO.: 374
				GLVSWGNIPCGSK	SEQ ID NO.: 135
MSF-316	MSPI-316	5.51	31894	ASSIDELFQDR	SEQ ID NO.: 28
MSF-318	MSPI-318	4.57	13499	GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
MSF-319	MSPI-319	6.72	59646	LNVTIVGPR	SEQ ID NO.: 200
				LFAYPDTHR	SEQ ID NO.: 188
				AFYVNVVLEEQR	SEQ ID NO.: 12
				LSQEDPDYGR	SEQ ID NO.: 207
MSF-320	MSPI-320	8.16	24182	APEAQVSVQPNFQDDK	SEQ ID NO.: 25
				AQGFTEITVFLPQTDK	SEQ ID NO.: 26
				TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-322	MSPI-322	5.21	22551	TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-323	MSPI-323.1	5.21	31216	EILSVDCSTNNPSQAK	SEQ ID NO.: 78
MSF-323	MSPI-323.2	5.21	31216	GSPAINVAVHVFR	SEQ ID NO.: 140
				AADDTWEPFASGK	SEQ ID NO.: 1
MSF-324	MSPI-324	7.10	23117	TMLLPAGSLGSYSYR	SEQ ID NO.: 311
MSF-325	MSPI-325.1	4.05	43334	VLSLAQEQVGSPEK	SEQ ID NO.: 339
				QGSFQGGFR	SEQ ID NO.: 244
MSF-325	MSPI-325.2	4.05	43334	ALGHLDLSGNNR	SEQ ID NO.: 21
				VAAGAFQGL	SEQ ID NO.: 319
				YLFNLGNK	SEQ ID NO.: 370

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- As will be evident to one of skill in the art, based upon the present description, a given MSPI can be described according to the data provided for that MSPI in Table IV or V. The MSPI is a polypeptide comprising a peptide sequence described for that MSPI (preferably comprising a plurality of, more preferably all of, the peptide sequences described for that MSPI) and has a pI of about the value stated for that MSPI (preferably within 10%, more preferably within 5% still more preferably within 1% of the stated value) and has a MW of about the value stated for that MSPI (preferably within 10%, more preferably within 5%, still more preferably within 1% of the stated value).
- In one embodiment, a first sample of body fluid from a subject is analyzed for quantitative detection of one or more of the MSPIs as defined in Table IV, or any combination of them, wherein a decreased abundance of the MSPI or MSPIs (or any combination of them) in the first sample from the subject relative to the second sample from a subject or subjects free from MS (e.g., a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of MS.
- In another embodiment of the invention, a first sample of body fluid from a subject is analyzed for quantitative detection of one or more of the MSPIs as defined in Table V, or any combination of them, wherein an increased abundance of the MSPI or MSPIs (or any combination of them) in first sample from the subject relative to the second sample from a subject or subjects free from MS (e.g., a control sample or a previously determined reference range) indicates the presence of MS.
- In a further embodiment, a first sample of body fluid from a subject is analyzed for quantitative detection of (a) one or more MSPIs, or any combination of them, whose decreased abundance indicates the presence of MS, i.e., the MSPIs as defined in Table IV; and (b) one or more MSPIs, or any combination of them, whose increased abundance indicates the presence of MS, i.e., the MSPIs as defined in Table V.
- In yet a further embodiment, a first sample of body fluid from a subject is analyzed for quantitative detection of one or more MSPIs and one or more previously known biomarkers of MS (e.g., candidate markers such as hypersensitive platelet glutamate receptors (Berk et al. Int Clin Psychopharmacol 1999 14, 199-122)). In accordance with this embodiment, the abundance of each MSPI and known biomarker relative to a control or reference range indicates whether a subject has MS.
- Preferably, the abundance of an MSPI is normalized to an Expression Reference Protein Isoform (ERPI). ERPIs can be identified by partial amino acid sequencing of ERPs, which are described above, using the methods and apparatus of the Preferred Technology. The partial amino acid sequences of an ERPI, and the known proteins to which it is homologous is presented in Table VI.

Table VI. Expression Reference Protein Isoforms

ERF#	ERPI#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides
ERF-1	ERPI-1.1	RVWELSK, FATTFYQHLADSK, VAEGTQVLELPFK, GDDITMVLILPKPEK,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

ERF#	ERPI#	Amino Acid Sequences of Tryptic Digest Peptides
		LPGIVAEGR, DDLYVSDAFHK, EVPLNTIIFMGR
ERF-1	ERPI-1.2	YTFELSR, RTHLPEVFLSK
ERF-2	ERPI-2	FSGTWYAMAK, YWGVASFLQK, QEELCLAR, LIVHNGYCDGR
ERF-3	ERPI-3	SVVAPATDGGNLNSTFLR, TMLLPAGSLGSYSYR

The MSPIs described herein include isoforms of known proteins where the isoforms were not previously known to be associated with MS. For each MSPI, the present invention additionally provides: (a) antibodies that bind to said MSPI, to said fragments, or both to said MSPI and to said fragments. Preferably the MSPI is in an isolated form, as used herein, an MSPI is "isolated" when it is present in a preparation that is substantially free of contaminating proteins, i.e., a preparation in which less than 10% (preferably less than 5%, more preferably less than 1%) of the total protein present is contaminating protein(s). A contaminating protein is a protein or protein isoform having a significantly different pI or MW from those of the isolated MSPI, as determined by 2D electrophoresis. As used herein, a "significantly different" pI or MW is one that permits the contaminating protein to be resolved from the MSPI on 2D electrophoresis, performed according to the Reference Protocol.

In one embodiment, an isolated polypeptide is provided, said polypeptide comprising a peptide with the amino acid sequence identified in Table IV or V for an MSPI, said polypeptide having a pI and MW within 10% (preferably within 5%, more preferably within 1%) of the values identified in Table IV or V for that MSPI.

The MSPIs of the invention can be qualitatively or quantitatively detected by any method known to those skilled in the art, including but not limited to the Preferred Technology described herein, kinase assays, enzyme assays, binding assays and other functional assays, immunoassays, and western blotting. In one embodiment, the MSPIs are separated on a 2-D gel by virtue of their MWs and pIs and visualized by staining the gel. In one embodiment, the MSPIs are stained with a fluorescent dye and imaged with a fluorescence scanner. Sypro Red (Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon) is a suitable dye for this purpose. A preferred fluorescent dye is Pyridinium, 4-[2-[4-(dipentylamino)-2-trifluoromethylphenyl] ethenyl]-1-(sulfobutyl)-, inner salt. See U.S. Application No. 09/412,168, filed on October 5, 1999, which is incorporated herein by reference in its entirety.

Alternatively, MSPIs can be detected in an immunoassay. In one embodiment, an immunoassay is performed by contacting a first sample from a subject to be tested with a capture reagent (e.g. an antibody) under conditions such that immunospecific binding can occur

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- if the MSPI is present, and detecting or measuring the amount of any immunospecific binding by the capture reagent. Anti-MSPI antibodies can be produced by the methods and techniques taught herein; examples of such antibodies known in the art are set forth in Table VII. These antibodies shown in Table VII are already known to bind to the protein of which the MSPI is itself a family member. Preferably, the anti-MSPI antibody preferentially binds to the MSPI rather than to other isoforms of the same protein. In a preferred embodiment, the anti-MSPI antibody binds to the MSPI with at least 2-fold greater affinity, more preferably at least 5-fold greater affinity, still more preferably at least 10-fold greater affinity, than to said other isoforms of the same protein.
- MSPIs can be transferred from a gel to a suitable membrane (e.g. a PVDF membrane) and subsequently probed in suitable assays that include, without limitation, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots and "sandwich" immunoassays using anti-MSPI antibodies as described herein, e.g., the antibodies raised against the MSPIs of interest. The immunoblots can be used to identify those anti-MSPI antibodies displaying the selectivity required to immuno-specifically differentiate an MSPI from other isoforms encoded by the same gene.

Table VII. Known Antibodies That Recognize MSPIs or MSPI-Related Polypeptides or Protein family of which MSPI is a member

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
MSPI-1	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-2	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-3	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL-574
MSPI-4	C7 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G34
MSPI-5.1	C7 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G34
MSPI-6	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-7	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-8.1	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS,	RDI-CLUSTRCabG

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		INC	
MSPI-8.2	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-9	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-10	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-11	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-12.1	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-12.2	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-13	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-14	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-15	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-16	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-18	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-22	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-24	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-27	C6 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G33
MSPI-28	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-29	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-30	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-31	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-32	C6 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE	BMD- G33

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-33.1	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-36	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-37	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-39.1	Goat anti-human Fibulin-1(polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-40	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-42.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-47	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-48.1	Goat anti-human Fibulin-1(polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-51.1	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-52.1	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-52.2	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL &	IMS- 01-001-02

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-54	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-55	Anti-Human Contactin, Mouse monoclonal	BD Biosciences	610579
MSPI-56	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-58	rabbit anti-human alpha-2-macroglobulin	Cambio Ltd.	CA-0427
MSPI-60	Anti-Human Contactin, Mouse monoclonal	BD Biosciences	610579
MSPI-65	C6 Complement, Goat anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BMD- G33
MSPI-67.1	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-67.2	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-70	C1r Complement, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YSRT- AHC002
MSPI-72	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-75	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-76	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-78.1	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-78.2	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-79	Anti-Human Contactin, Mouse monoclonal	BD Biosciences	610579
MSPI-80.1	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-81	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL &	MED- CLA 193

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-84.1	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-89.1	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-90	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-91.1	Apolipoprotein A1 (HDL), Sheep anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	ACL- 20075AP
MSPI-92	Anti-Human Contactin, Mouse monoclonal	BD Biosciences	610579
MSPI-93.1	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-93.2	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-95	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-96	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-98	Monoclonal anti-Neuron Specific Enolase	BIODESIGN INTERNATIONAL	M37403M
MSPI-102.1	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-102.2	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-102.3	Lactic Dehydrogenase (LDH) (H-subunit), Clone: HH-17, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6019-1
MSPI-104	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL &	AXL- 466/2

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-105.1	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-105.2	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-106	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-107	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-108	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-110	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-111	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-113	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-114	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-119	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-120	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-122	Rabbit anti-human Insulin Growth Factor Binding Protein 2	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-IGFBP2abr
MSPI-123.1	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
MSPI-127.1	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-128	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-130	Goat anti-human Fibulin-1(polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-132	Factor H (Complement), Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-066-02
MSPI-133	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-134	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-137	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-140	Tetranectin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-141.2	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-142	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-145.2	Rabbit Polyclonal Anti-Human	DAKO	A0031

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
	Ceruloplasmin	CORPORATION	
MSPI-147.2	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-149	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-150	Anti-Human Contactin, Mouse monoclonal	BD Biosciences	610579
MSPI-151	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-152	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-154.1	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-155.2	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-155.3	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-156.2	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-158.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti- Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHEPX
MSPI-159	Complement Factor B, C3 proactivator, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 466/2
MSPI-160	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-161	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-165.2	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG	sc-7140

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	
MSPI-167	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-169.2	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-170	Rabbit Polyclonal Anti-Human Ceruloplasmin	DAKO CORPORATION	A0031
MSPI-171	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clones: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-172	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-173.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-175	Goat anti-human Fibulin-1 (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-176.1	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-176.2	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOG Y, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-177	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-178	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-179.1	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-179.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC	YN- RHHPX

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		CORPORATION	
MSPI-181.2	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-182	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-183	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-184	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-186	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-187.1	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-187.2	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-189	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-191	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-192.1	Tetranectin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-193	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-194.1	Monoclonal mouse anti-human plasminogen	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11-4D2
MSPI-195.1	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-196	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC -	sc-579

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		RESEARCH ANTIBODIES 98/99	
MSPI-197	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-198	Tetranectin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 494
MSPI-199.1	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-199.2	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-7140
MSPI-200	Monoclonal mouse anti-human plasminogen	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11-4D2
MSPI-201	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-202.1	Prothrombin, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 448/2
MSPI-205	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-206	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
MSPI-209	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-210	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-212.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-213	Monoclonal anti-human Fibrinogen	BIODESIGN INTERNATIONAL	N77190M
MSPI-215	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH	RDI-

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		DIAGNOSTICS, INC	CLUSTRCabG
MSPI-216	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-217.3	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-218	Goat anti-human Fibulin-1(polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-8674
MSPI-219	Monoclonal mouse anti-human plasminogen	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK4P11-4D2
MSPI-220	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-221.1	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-222.2	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-223.1	Mouse anti-Human pigment epithelium-derived factor (PEDF) (monoclonal) Clone 10F12.2	Chemicon International	MAB1059
MSPI-224.1	Mouse anti-human complement component C9 (monoclonal)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-COMP C9abm-A6
MSPI-228.1	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-228.2	Alpha-1-Acid Glycoprotein, Clone: AGP-47, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6189-1
MSPI-229.2	Chicken polyclonal to human mu-chain	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-230	Gelsolin, plasma + cytoplasmic, Sheep anti-	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YBG- 4628-6210
MSPI-231	goat anti-Pyruvate Kinase (polyclonal)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC -	sc-7140

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		RESEARCH ANTIBODIES 98/99	
MSPI-232	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
MSPI-233.1	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-233.2	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-234	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-235	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 (TIMP2) (NO X w/TIMP1), Clone: 3A4, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA498
MSPI-236.1	Alpha-1-Acid Glycoprotein, Clone: AGP-47, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 6189-1
MSPI-236.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-237	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-238	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574.
MSPI-239.1	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-239.2	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-240.1	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 (TIMP1) (NO X w/TIMP2) Clone: 2A5, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA497
MSPI-240.2	Monoclonal to human lambda light chain	Diatec.com	1020
MSPI-241.2	Chicken polyclonal to human mu-chain	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-242.2	Anti-prostaglandin D	Oxford Biomedical	PD-01

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
	synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Research	
MSPI-243	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-244	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-245	Chicken polyclonal to human mu-chain	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-246.1	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-246.2	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-248	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-251	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-257.2	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-257.3	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-260.2	Chicken polyclonal to human mu-chain	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-265	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 2 (TIMP2) (NO X w/TIMP1), Clone: 3A4, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA498
MSPI-266	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human, frozen/paraffin	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YM- 5029
MSPI-268.1	Cystatin C, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	AXL- 574
MSPI-270	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-273	Apolipoprotein E, LDL, VLDL, Clone: 3D12, Mab anti-Human,	ACCURATE CHEMICAL &	YM- 5029

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
	frozen/paraffin	SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-274	Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase 1 (TIMP1) (NO X w/TIMP2) Clone: 2A5, Mab anti-Human, paraffin, IH	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA497
MSPI-277	Chicken polyclonal to human mu-chain	Abcam Ltd.	ab453-1000
MSPI-279	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-280.2	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- CLUSTRCabG
MSPI-283.2	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-284.1	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-289	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-290	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-291.2	Anti-Alzheimer precursor protein A4	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI- ALZHPA4abm
MSPI-292	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-295	Apolipoprotein D, Clone: 36C6, Mab anti-Human, paraffin, IH/WB	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA457
MSPI-298.2	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-299	C3 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-001-02
MSPI-301	Transferrin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-302	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-303.2	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-	ACCURATE	YN- RHHPX

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
	Human, precipitating	CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	
MSPI-305	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-306	Hemopexin, Beta-1, Rabbit anti-Human, precipitating	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	YN- RHHPX
MSPI-307	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	IMS- 01-032-02
MSPI-311.1	Antithrombin III, Clone: BL-ATIII/3, Mab anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	BYA- 9009-1
MSPI-311.2	Monoclonal mouse anti-human IgA1	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-TRK1A2-2B5
MSPI-311.3	AT1 (306)	SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC - RESEARCH ANTIBODIES 98/99	sc-579
MSPI-313	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-316	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-318	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-319	Rabbit anti-Catalase (polyclonal)	Abcam Ltd.	ab6572
MSPI-320	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-322	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-323.1	Goat anti-Clusterin (human)	RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC	RDI-CLUSTRCabG
MSPI-323.2	Transthyretin, Prealbumin, 55kD, Rabbit anti-Human	ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION	MED- CLA 193
MSPI-324	Anti-prostaglandin D synthase/Prostaglandin H2-D isomerase	Oxford Biomedical Research	PD-01
MSPI-325.1	C4 Complement, Chicken anti-Human	ACCURATE CHEMICAL &	IMS- 01-032-02

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI#	Antibody	Manufacturer	Catalogue Number
		SCIENTIFIC CORPORATION	

*Further information about these antibodies can be obtained from their commercial sources at:
 ACCURATE CHEMICAL & SCIENTIFIC CORPORATION

<http://www.accuratechemical.com/>; BIODESIGN INTERNATIONAL -

<http://www.biodesign.com/>; RDI RESEARCH DIAGNOSTICS, INC. -

<http://www.researchd.com/>; SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC. -

<http://www.scbt.com/>.

As used herein, an "aberrant level" means a level that is increased or decreased in a first sample compared with the level in a second sample from a subject free from MS or a reference level. In one embodiment, binding of antibody in tissue sections can be used to detect aberrant MSPI localization or an aberrant level of one or more MSPIs. In a specific embodiment, antibody to an MSPI can be used to assay a first tissue sample (e.g., a brain biopsy) from a subject for the level of the MSPI where an aberrant level of MSPI is indicative of MS.

Any suitable immunoassay can be used, including, without limitation, competitive and non-competitive assay systems using techniques such as western blots, radioimmunoassays, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), "sandwich" immunoassays, immunoprecipitation assays, precipitin reactions, gel diffusion precipitin reactions, immunodiffusion assays, agglutination assays, complement-fixation assays, immunoradiometric assays, fluorescent immunoassays and protein A immunoassays.

For example, an MSPI can be detected in a fluid sample (e.g., CSF, blood, urine, or tissue homogenate) by means of a two-step sandwich assay. In the first step, a capture reagent (e.g., an anti-MSPI antibody) is used to capture the MSPI. Examples of such antibodies known in the art are set forth in Table VII. The capture reagent can optionally be immobilized on a solid phase. In the second step, a directly or indirectly labeled detection reagent is used to detect the captured MSPI. In one embodiment, the detection reagent is a lectin. Any lectin can be used for this purpose that preferentially binds to the MSPI rather than to other isoforms that have the same core protein as the MSPI or to other polypeptides that share the antigenic determinant recognized by the antibody. In a preferred embodiment, the chosen lectin binds to the MSPI with at least 2-fold greater affinity, more preferably at least 5-fold greater affinity, still more preferably at least 10-fold greater affinity, than to said other isoforms that have the same core protein as the MSPI or to said other polypeptides that share the antigenic determinant recognized by the antibody. Based on the present description, a lectin that is suitable for detecting a given MSPI can readily be identified by methods well known in the art, for instance upon testing one or more lectins enumerated in Table I on pages 158-159 of Sumar et al., *Lectins as Indicators of Disease-Associated Glycoforms*, In: Gabius H-J & Gabius S (eds.), 1993, *Lectins and Glycobiology*, at pp. 158-174 (which is incorporated herein by reference in its entirety). Lectins with the desired oligosaccharide specificity can be identified, for example, by their ability to detect the MSPI in a 2D gel, in a replica of a 2D gel following transfer to a suitable solid substrate such as a nitrocellulose membrane, or in a two-step assay following capture by capture reagent. In an alternative embodiment, the detection reagent is an antibody, e.g., an antibody that immunospecifically detects

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

post-translational modifications, such as an antibody that immunospecifically binds to phosphorylated amino acids. Examples of such antibodies include those that bind to phosphotyrosine (BD Transduction Laboratories, 2002, catalog nos. P11120; P39020), those that bind to phosphoserine (Zymed Laboratories Inc. 2002, South San Francisco, CA, catalog no. 61-8100) and those that bind to phosphothreonine (Zymed Laboratories Inc., 2002, South San Francisco, CA, catalog nos. 71-8200, 13-9200).

If desired, a gene encoding an MSPI, a related gene, or related nucleic acid sequences or subsequences, including complementary sequences, can also be used in hybridization assays. A nucleotide encoding an MSPI, or subsequences thereof comprising at least 8 nucleotides, preferably at least 12 nucleotides, and most preferably at least 15 nucleotides can be used as a hybridization probe. Hybridization assays can be used for detection, prognosis, diagnosis, or monitoring of conditions, disorders, or disease states, associated with aberrant expression of genes encoding MSPIs, or for differential diagnosis of subjects with signs or symptoms suggestive of MS. In particular, such a hybridization assay can be carried out by a method comprising contacting a subject's sample containing nucleic acid with a nucleic acid probe capable of hybridizing to a DNA or RNA that encodes an MSPI, under conditions such that hybridization can occur, and detecting or measuring any resulting hybridization. Nucleotides can be used for therapy of subjects having MS, as described below.

The invention also provides diagnostic kits, comprising an anti-MSPI antibody. In addition, such a kit may optionally comprise one or more of the following: (1) instructions for using the anti-MSPI antibody for diagnosis, prognosis, therapeutic monitoring or any combination of these applications; (2) a labeled binding partner to the antibody; (3) a solid phase (such as a reagent strip) upon which the anti-MSPI antibody is immobilized; and (4) a label or insert indicating regulatory approval for diagnostic, prognostic or therapeutic use or any combination thereof. If no labeled binding partner to the antibody is provided, the anti-MSPI antibody itself can be labeled with a detectable marker, e.g., a chemiluminescent, enzymatic, fluorescent, or radioactive moiety.

The invention also provides a kit comprising a nucleic acid probe capable of hybridizing to RNA encoding an MSPI. In a specific embodiment, a kit comprises in one or more containers a pair of primers (e.g., each in the size range of 6-30 nucleotides, more preferably 10-30 nucleotides and still more preferably 10-20 nucleotides) that under appropriate reaction conditions can prime amplification of at least a portion of a nucleic acid encoding an MSPI, such as by polymerase chain reaction (see, e.g., Innis et al., 1990, PCR Protocols, Academic Press, Inc., San Diego, CA), ligase chain reaction (see EP 320,308) use of Q replicase, cyclic probe reaction, or other methods known in the art.

Kits are also provided which allow for the detection of a plurality of MSPIs or a plurality of nucleic acids each encoding an MSPI. A kit can optionally further comprise a predetermined amount of an isolated MSPI protein or a nucleic acid encoding an MSPI, e.g., for use as a standard or control.

5.5 STATISTICAL TECHNIQUES FOR IDENTIFYING MSFs AND MSF CLUSTERS

The uni-variate differential analysis tools, such as fold changes, wilcoxon rank sum test and t-test, are useful in identifying individual MSFs or MSPIs that are diagnostically

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

associated with MS or in identifying individual MSPIs that regulate the disease process. In most cases, however, those skilled in the art appreciate that the disease process is associated with a combination of MSFs or MSPIs (and to be regulated by a combination of MSPIs), rather than individual MSFs and MSPIs in isolation. The strategies for discovering such combinations of MSFs and MSPIs differ from those for discovering individual MSFs and MSPIs. In such cases, each individual MSF and MSPIs can be regarded as one variable and the disease can be regarded as a joint, multi-variate effect caused by interaction of these variables.

The following steps can be used to identify markers from data produced by the Preferred Technology.

The first step is to identify a collection of MSFs or MSPIs that individually show a significant aberrant expression in MS. The association between the identified MSFs or MSPIs and MS need not be as highly significant as is desirable when an individual MSF or MSPI is used as a diagnostic. Any of the tests discussed above (fold changes, Wilcoxon rank sum test, etc.) can be used at this stage. Once a suitable collection of MSFs or MSPIs has been identified, a sophisticated multi-variate analysis capable of identifying clusters can then be used to estimate the significant multivariate associations with MS.

Linear Discriminant Analysis (LDA) is one such procedure, which can be used to detect significant association between a cluster of variables (i.e., MSFs or MSPIs) and MS. In performing LDA, a set of weights is associated with each variable (i.e., MSF or MSPI) so that the linear combination of weights and the measured values of the variables can identify the disease state by discriminating between subjects having MS and subjects free from MS. Enhancements to the LDA allow stepwise inclusion (or removal) of variables to optimize the discriminant power of the model. The result of the LDA is therefore a cluster of MSFs or MSPIs which can be used, without limitation, for diagnosis, prognosis, therapy or drug development. Other enhanced variations of LDA, such as Flexible Discriminant Analysis permit the use of non-linear combinations of variables to discriminate a disease state from a normal state. The results of the discriminant analysis can be verified by post-hoc tests and also by repeating the analysis using alternative techniques such as classification trees.

A further category of MSFs or MSPIs can be identified by qualitative measures by comparing the percentage feature presence of an MSF or MSPI of a first sample or sample set (e.g., samples from diseased subjects) with the percentage feature presence of an MSF or MSPI in a second sample or sample set (e.g., samples from control subjects). The "percentage feature presence" of an MSF or MSPI is the percentage of samples in a sample set in which the MSF or MSPI is detectable by the detection method of choice. For example, if an MSF is detectable in 95 percent of samples from diseased subjects, the percentage feature presence of that MSF in that sample set is 95 percent. If only 5 percent of samples from non-diseased subjects have detectable levels of the same MSF, detection of that MSF in the sample of a subject would suggest that it is likely that the subject suffers from MS.

5.6 USE IN CLINICAL STUDIES

The diagnostic methods and compositions of the present invention can assist in monitoring a clinical study, e.g. to evaluate drugs for therapy of MS. In one embodiment, candidate molecules are tested for their ability to restore MSF or MSPI levels in a

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- subject having MS to levels found in subjects free from MS or, in a treated subject (e.g. after treatment for relapsing-remitting MS with include Interferon β -1b (BetaseronTM, BetaferonTM), Interferon β -1a (AvonexTM, RebifTM), Glatiramer acetate (CopaxoneTM), intravenous immunoglobulin and, for incidences of acute relapse, therapies with corticosteroids
- 5 (Noseworthy (1999) Nature 399:suppl. A40-A47), to preserve MSF or MSPI levels at or near non-MS values. The levels of one or more MSFs or MSPIs can be assayed.

- In another embodiment, the methods and compositions of the present invention are used to screen candidates for a clinical study to identify individuals having MS; such individuals can then be either excluded from or included in the study or can be placed in a
- 10 separate cohort for treatment or analysis. If desired, the candidates can concurrently be screened to identify individuals with MS; procedures for these screens are well known in the art.

5.7 PURIFICATION OF MSPIs

- In particular aspects, the invention provides isolated mammalian MSPI, preferably human MSPI, and fragments thereof which comprise an antigenic determinant (i.e., can be recognized by an antibody) or which are otherwise functionally active, as well as nucleic acid sequences encoding the foregoing. "Functionally active" as used herein refers to material displaying one or more functional activities associated with a full-length (wild-type) MSPI,
- 20 e.g., binding to an MSPI substrate or MSPI binding partner, antigenicity (binding to an anti-MSPI antibody), immunogenicity, enzymatic activity and the like.

- In specific embodiments, the invention provides fragments of an MSPI comprising at least 5 amino acids, at least 10 amino acids, at least 50 amino acids, or at least 75 amino acids. Fragments lacking some or all of the regions of an MSPI are also provided, as are
- 25 polypeptides (e.g., fusion proteins) comprising such fragments. Nucleic acids encoding the foregoing are provided.

- Once a recombinant nucleic acid which encodes the MSPI, MSPI fragment, or a precursor of the MSPI is identified, the gene product can be analyzed. This is achieved by assays based on the physical or functional properties of the product, including radioactive
- 30 labeling of the product followed by analysis by gel electrophoresis, immunoassay, etc.

- The MSPIs identified herein can be isolated and purified by standard methods including chromatography (e.g., ion exchange, affinity, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins.

- Alternatively, once a recombinant nucleic acid that encodes the MSPI is identified, the entire amino acid sequence of the MSPI can be deduced from the nucleotide sequence of the gene coding region contained in the recombinant nucleic acid. As a result, the protein can be synthesized by standard chemical methods known in the art (e.g., see Hunkapiller et al., 1984, Nature 310:105-111).

- In another alternative embodiment, native MSPIs can be purified from natural sources, by standard methods such as those described above (e.g., immunoaffinity purification).

In a preferred embodiment, MSPIs are isolated by the Preferred Technology described supra. For preparative-scale runs, a narrow-range "zoom gel" having a pI range of 2 pI units or less is preferred for the isoelectric step, according to the method described in Westermeier,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

1993, Electrophoresis in Practice (VCH, Weinheim, Germany), pp. 197-209 (which is incorporated herein by reference in its entirety); this modification permits a larger quantity of a target protein to be loaded onto the gel, and thereby increases the quantity of isolated MSPIs that can be recovered from the gel. When used in this way for preparative-scale runs, the Preferred Technology typically provides up to 100 ng, and can provide up to 1000 ng, of an isolated MSPI in a single run. Those of skill in the art will appreciate that a zoom gel can be used in any separation strategy which employs gel isoelectric focusing.

The invention thus provides an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein; any of the foregoing can be produced by recombinant DNA techniques or by chemical synthetic methods.

5.8 ISOLATION OF DNA ENCODING AN MSPI

Specific embodiments for the cloning of a gene encoding an MSPI are presented below by way of example and not of limitation.

The nucleotide sequences of the present invention, including DNA and RNA, and comprising a sequence encoding an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein, may be synthesized using methods known in the art, such as using conventional chemical approaches or polymerase chain reaction (PCR) amplification. The nucleotide sequences of the present invention also permit the identification and cloning of the gene encoding an MSPI homolog or MSPI ortholog including, for example, by screening cDNA libraries, genomic libraries or expression libraries.

For example, to clone a gene encoding an MSPI by PCR techniques, anchored degenerate oligonucleotides (or a set of most likely oligonucleotides) can be designed for all MSPI peptide fragments identified as part of the same protein. PCR reactions under a variety of conditions can be performed with relevant cDNA and genomic DNAs (e.g., from CSF or from cells of the immune system) from one or more species. Also vectorette reactions can be performed on any available cDNA and genomic DNA using the oligonucleotides (which preferably are nested) as above. Vectorette PCR is a method that enables the amplification of specific DNA fragments in situations where the sequence of only one primer is known. Thus, it extends the application of PCR to stretches of DNA where the sequence information is only available at one end. (Arnold C, 1991, PCR Methods Appl. 1(1):39-42; Dyer KD, Biotechniques, 1995, 19(4):550-2). Vectorette PCR may be performed with probes that are, for example, anchored degenerate oligonucleotides (or most likely oligonucleotides) coding for MSPI peptide fragments, using as a template a genomic library or cDNA library pools.

Anchored degenerate oligonucleotides (and most likely oligonucleotides) can be designed for all MSPI peptide fragments. These oligonucleotides may be labeled and hybridized to filters containing cDNA and genomic DNA libraries. Oligonucleotides to different peptides from the same protein will often identify the same members of the library. The cDNA and genomic DNA libraries may be obtained from any suitable or desired mammalian species, for example from humans.

Nucleotide sequences comprising a nucleotide sequence encoding MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein of the present invention are useful for their ability to hybridize selectively with complementary stretches of genes encoding other proteins. Depending on the application, a variety of hybridization conditions may be

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

employed to obtain nucleotide sequences at least 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical, or 100% identical, to the sequence of a nucleotide encoding an MSPI.

For a high degree of selectivity, relatively stringent conditions are used to form the duplexes, such as low salt or high temperature conditions. Hybridization conditions can also be rendered more stringent by the addition of increasing amounts of formamide, to destabilize the hybrid duplex. Thus, particular hybridization conditions can be readily manipulated, and will generally be chosen depending on the desired results. In general, convenient hybridization temperatures in the presence of 50% formamide are: 42°C for a probe which is 95 to 100% identical to the fragment of a gene encoding an MSPI, 37°C for 90 to 95% identity and 32°C for 70 to 90% identity.

In the preparation of genomic libraries, DNA fragments are generated, some of which will encode parts or the whole of an MSPI. Any suitable method for preparing DNA fragments may be used in the present invention. For example, the DNA may be cleaved at specific sites using various restriction enzymes. Alternatively, one may use DNase in the presence of manganese to fragment the DNA, or the DNA can be physically sheared, as for example, by sonication. The DNA fragments can then be separated according to size by standard techniques, including but not limited to agarose and polyacrylamide gel electrophoresis, column chromatography and sucrose gradient centrifugation. The DNA fragments can then be inserted into suitable vectors, including but not limited to plasmids, cosmids, bacteriophages lambda or T4, and yeast artificial chromosome (YAC). (See, e.g., Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, IRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II; Ausubel F.M. et al., eds., 1989, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & sons, Inc., New York). The genomic library may be screened by nucleic acid hybridization to labeled probe (Benton and Davis, 1977, *Science* 196:180; Grunstein and Hogness, 1975, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72:3961).

Based on the present description, the genomic libraries may be screened with labeled degenerate oligonucleotide probes corresponding to the amino acid sequence of any peptide of the MSPI using optimal approaches well known in the art. Any probe used is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 20 nucleotides, at least 25 nucleotides, at least 30 nucleotides, at least 40 nucleotides, at least 50 nucleotides, at least 60 nucleotides, at least 70 nucleotides, at least 80 nucleotides, or at least 100 nucleotides.

In Tables IV and V above, some MSPIs disclosed herein were found to correspond to isoforms of previously identified proteins encoded by genes whose sequences are publicly known. (Sequence analysis and protein identification of MSPIs was carried out using the methods described in Section 6.1.14). To screen such a gene, any probe may be used that is complementary to the gene or its complement; preferably the probe is 10 nucleotides or longer, more preferably 15 nucleotides or longer. The SWISS-PROT and trEMBL databases (held by the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB) and the European Bioinformatics Institute (EBI) which are available at <http://www.expasy.com/>) and the GenBank database (held by the National Institute of Health (NIH) which is available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank/>) provide protein sequences for the MSPIs listed in

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Tables IV and V under the following accession numbers and each sequence is incorporated herein by reference:

Table VIII. Nucleotide sequences encoding MSPIs, MSPI Related Proteins or ERPIs

5

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-1	MSPI-1	P41222
MSF-2	MSPI-2	P10909
MSF-3	MSPI-3	P01034
MSF-4	MSPI-4	P10643
MSF-5	MSPI-5.1	P10643
MSF-6	MSPI-6	P41222
MSF-7	MSPI-7	P01019
MSF-8	MSPI-8.1	P10909
MSF-8	MSPI-8.2	P02649
MSF-9	MSPI-9	P01023
MSF-10	MSPI-10	P01023
MSF-11	MSPI-11	P01023
MSF-12	MSPI-12.1	P36955
MSF-12	MSPI-12.2	2745741
MSF-13	MSPI-13	P01023
MSF-14	MSPI-14	P01028
MSF-15	MSPI-15	P01023
MSF-16	MSPI-16	P01023
MSF-18	MSPI-18	P01023
MSF-20	MSPI-20	Q06830
MSF-21	MSPI-21	P25311
MSF-22	MSPI-22	P01023
MSF-24	MSPI-24	P01023
MSF-25	MSPI-25	Q15113
MSF-27	MSPI-27	P13671
MSF-28	MSPI-28	P01023
MSF-29	MSPI-29	P01023
MSF-30	MSPI-30	P01028
MSF-31	MSPI-31	P01023
MSF-32	MSPI-32	P13671
MSF-33	MSPI-33.1	2745741
MSF-33	MSPI-33.2	Q12805
MSF-34	MSPI-34	P32119
MSF-36	MSPI-36	2745741
MSF-37	MSPI-37	P00450
MSF-39	MSPI-39.1	P23142
MSF-39	MSPI-39.2	P14625
MSF-40	MSPI-40	P01034
MSF-42	MSPI-42.2	P02790
MSF-43	MSPI-43	P25311
MSF-44	MSPI-44	P08294
MSF-47	MSPI-47	P02790
MSF-48	MSPI-48.1	P23142
MSF-48	MSPI-48.2	P14625
MSF-48	MSPI-48.3	P14625

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-49	MSPI-49.1	P51693
MSF-49	MSPI-49.2	Q12805
MSF-51	MSPI-51.1	P01034
MSF-52	MSPI-52.1	P01024
MSF-52	MSPI-52.2	P01024
MSF-54	MSPI-54	P41222
MSF-55	MSPI-55	Q12860
MSF-56	MSPI-56	P00450
MSF-58	MSPI-58	P01023
MSF-60	MSPI-60	Q12860
MSF-62	MSPI-62.2	P08603
MSF-63	MSPI-63	2190958
MSF-64	MSPI-64.1	P08603
MSF-65	MSPI-65	P13671
MSF-66	MSPI-66	179674
MSF-67	MSPI-67.1	2745741
MSF-67	MSPI-67.2	P36955
MSF-69	MSPI-69	P13591
MSF-70	MSPI-70	P00736
MSF-72	MSPI-72	P00450
MSF-73	MSPI-73	861521
MSF-75	MSPI-75	P01034
MSF-76	MSPI-76	P01024
MSF-77	MSPI-77.2	P08603
MSF-78	MSPI-78.1	P10909
MSF-78	MSPI-78.2	P41222
MSF-79	MSPI-79	Q12860
MSF-80	MSPI-80.1	P01876
MSF-81	MSPI-81	P02766
MSF-82	MSPI-82	O15394
MSF-83	MSPI-83	Q9Y2T3
MSF-84	MSPI-84.1	P01028
MSF-84	MSPI-84.2	O15394
MSF-86	MSPI-86	Q92876
MSF-87	MSPI-87	Q99435
MSF-89	MSPI-89.1	P02790
MSF-90	MSPI-90	P06396
MSF-91	MSPI-91.1	P02647
MSF-92	MSPI-92	Q12860
MSF-93	MSPI-93.1	P02649
MSF-93	MSPI-93.2	P10909
MSF-94	MSPI-94	P08603
MSF-95	MSPI-95	P01024
MSF-96	MSPI-96	P06396
MSF-97	MSPI-97	P02679
MSF-98	MSPI-98	P06733
MSF-99	MSPI-99	Q99435
MSF-102	MSPI-102.1	P02649
MSF-102	MSPI-102.2	P10909
MSF-102	MSPI-102.3	P07195
MSF-104	MSPI-104	P00751

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-105	MSPI-105.1	P41222
MSF-105	MSPI-105.2	P06396
MSF-106	MSPI-106	P01024
MSF-107	MSPI-107	2745741
MSF-108	MSPI-108	P36955
MSF-110	MSPI-110	P06396
MSF-111	MSPI-111	P36955
MSF-112	MSPI-112	P02749
MSF-113	MSPI-113	P00751
MSF-114	MSPI-114	P00450
MSF-116	MSPI-116	2511666
MSF-117	MSPI-117	7662374
MSF-119	MSPI-119	2745741
MSF-120	MSPI-120	P06396
MSF-122	MSPI-122	P18065
MSF-123	MSPI-123.1	P06396
MSF-125	MSPI-123.1	P08294
MSF-125	MSPI-125.2	7416827
MSF-126	MSPI-126.1	179674
MSF-126	MSPI-126.2	P17900
MSF-127	MSPI-127.1	P01019
MSF-128	MSPI-128	P01024
MSF-130	MSPI-130	P23142
MSF-131	MSPI-131	P05154
MSF-132	MSPI-132	Q03591
MSF-133	MSPI-133	P02766
MSF-134	MSPI-134	P06396
MSF-135	MSPI-135	2190958
MSF-136	MSPI-136	Q15818
MSF-137	MSPI-137	P01019
MSF-139	MSPI-139	P08294
MSF-140	MSPI-140	P05452
MSF-141	MSPI-141.1	P02774
MSF-141	MSPI-141.2	2745741
MSF-142	MSPI-142	P01019
MSF-143	MSPI-143.1	X82321.1
MSF-144	MSPI-144	P02763
MSF-145	MSPI-145.2	P00450
MSF-147	MSPI-147.2	P01024
MSF-148	MSPI-148	Q14624
MSF-149	MSPI-149	P00751
MSF-150	MSPI-150	Q12860
MSF-151	MSPI-151	P01034
MSF-152	MSPI-152	P01876
MSF-154	MSPI-154.1	P00450
MSF-154	MSPI-154.2	2511666
MSF-154	MSPI-154.3	Q99435
MSF-155	MSPI-155.1	P02679
MSF-155	MSPI-155.2	P36955
MSF-155	MSPI-155.3	2745741
MSF-156	MSPI-156.2	P36955

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-158	MSPI-158.2	P02790
MSF-159	MSPI-159	P00751
MSF-160	MSPI-160	P36955
MSF-161	MSPI-161	P01019
MSF-163	MSPI-163	2511666
MSF-165	MSPI-165.1	P02679
MSF-165	MSPI-165.2	2745741
MSF-167	MSPI-167	P02790
MSF-168	MSPI-168	179674
MSF-169	MSPI-169.1	Q14624
MSF-169	MSPI-169.2	P00450
MSF-170	MSPI-170	P00450
MSF-171	MSPI-171	P02649
MSF-172	MSPI-172	P01024
MSF-173	MSPI-173.2	P02790
MSF-175	MSPI-175	P23142
MSF-176	MSPI-176.1	P36955
MSF-176	MSPI-176.2	2745741
MSF-177	MSPI-177	P01024
MSF-178	MSPI-178	P41222
MSF-179	MSPI-179.1	P01876
MSF-179	MSPI-179.2	P02790
MSF-180	MSPI-180	P19021
MSF-181	MSPI-181.1	P17900
MSF-181	MSPI-181.2	P41222
MSF-182	MSPI-182	P01019
MSF-183	MSPI-183	P41222
MSF-184	MSPI-184	P36955
MSF-185	MSPI-185	P01009
MSF-186	MSPI-186	2745741
MSF-187	MSPI-187.1	P10909
MSF-187	MSPI-187.2	P02766
MSF-188	MSPI-188.2	O15394
MSF-189	MSPI-189	P02790
MSF-191	MSPI-191	P06396
MSF-192	MSPI-192.1	P05452
MSF-192	MSPI-192.2	O60832
MSF-193	MSPI-193	P41222
MSF-194	MSPI-194.1	P00747
MSF-194	MSPI-194.2	1160616
MSF-195	MSPI-195.1	P02790
MSF-196	MSPI-196	P01019
MSF-197	MSPI-197	P36955
MSF-198	MSPI-198	P05452
MSF-199	MSPI-199.1	P36955
MSF-199	MSPI-199.2	2745741
MSF-200	MSPI-200	P00747
MSF-201	MSPI-201	P02766
MSF-202	MSPI-202.1	P00734
MSF-202	MSPI-202.2	P51693
MSF-203	MSPI-203	P25311

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-205	MSPI-205	P02766
MSF-206	MSPI-206	P05090
MSF-207	MSPI-207	7662374
MSF-208	MSPI-208	Q99435
MSF-209	MSPI-209	P41222
MSF-210	MSPI-210	P36955
MSF-211	MSPI-211	P16870
MSF-212	MSPI-212.2	P02790
MSF-213	MSPI-213	P02671
MSF-215	MSPI-215	P10909
MSF-216	MSPI-216	P01028
MSF-217	MSPI-217.3	P01034
MSF-218	MSPI-218	P23142
MSF-219	MSPI-219	P00747
MSF-220	MSPI-220	P36955
MSF-221	MSPI-221.1	P02790
MSF-222	MSPI-222.1	P02679
MSF-222	MSPI-222.2	P36955
MSF-223	MSPI-223.1	P36955
MSF-223	MSPI-223.2	Q15818
MSF-224	MSPI-224.1	P02748
MSF-225	MSPI-225	P13591
MSF-226	MSPI-226	P51693
MSF-228	MSPI-228.1	P02790
MSF-228	MSPI-228.2	P04217
MSF-229	MSPI-229.1	179674
MSF-229	MSPI-229.2	P01871
MSF-230	MSPI-230	P06396
MSF-231	MSPI-231	2745741
MSF-232	MSPI-232	P05090
MSF-233	MSPI-233.1	P10909
MSF-233	MSPI-233.2	P02649
MSF-234	MSPI-234	P41222
MSF-235	MSPI-235	P16035
MSF-236	MSPI-236.1	P04217
MSF-236	MSPI-236.2	P02790
MSF-237	MSPI-237	P01034
MSF-238	MSPI-238	P01034
MSF-239	MSPI-239.1	P41222
MSF-239	MSPI-239.2	P01034
MSF-240	MSPI-240.1	P01033
MSF-240	MSPI-240.2	X57822.1
MSF-241	MSPI-241.1	179674
MSF-241	MSPI-241.2	P01871
MSF-242	MSPI-242.1	3659942
MSF-242	MSPI-242.2	P41222
MSF-243	MSPI-243	P02766
MSF-244	MSPI-244	P41222
MSF-245	MSPI-245	P01871
MSF-246	MSPI-246.1	P02766
MSF-246	MSPI-246.2	P01034

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-248	MSPI-248	P01028
MSF-250	MSPI-250.2	P19652
MSF-251	MSPI-251	P01024
MSF-254	MSPI-254.1	8918224
MSF-257	MSPI-257.1	1181953
MSF-257	MSPI-257.2	P02649
MSF-257	MSPI-257.3	P02766
MSF-260	MSPI-260.1	179674
MSF-260	MSPI-260.2	P01871
MSF-261	MSPI-261	P25311
MSF-262	MSPI-262.2	Q13449
MSF-265	MSPI-265	P16035
MSF-266	MSPI-266	P02649
MSF-267	MSPI-267	P09211
MSF-268	MSPI-268.1	P01034
MSF-270	MSPI-270	P02766
MSF-271	MSPI-271	U52144.1
MSF-273	MSPI-273	P02649
MSF-274	MSPI-274	P01033
MSF-276	MSPI-276	P30086
MSF-277	MSPI-277	P01871
MSF-279	MSPI-279	P41222
MSF-280	MSPI-280.1	1181953
MSF-280	MSPI-280.2	P10909
MSF-283	MSPI-283.1	P25311
MSF-283	MSPI-283.2	P01024
MSF-284	MSPI-284.1	P41222
MSF-284	MSPI-284.2	7438712
MSF-285	MSPI-285	106647
MSF-289	MSPI-289	P01019
MSF-290	MSPI-290	P41222
MSF-291	MSPI-291.1	P05155
MSF-291	MSPI-291.2	P05067
MSF-292	MSPI-292	P02766
MSF-295	MSPI-295	P05090
MSF-298	MSPI-298.1	10835792
MSF-298	MSPI-298.2	P41222
MSF-299	MSPI-299	P01024
MSF-300	MSPI-300	P07711
MSF-301	MSPI-301	P02766
MSF-302	MSPI-302	P41222
MSF-303	MSPI-303.2	P02790
MSF-305	MSPI-305	P41222
MSF-306	MSPI-306	P02790
MSF-307	MSPI-307	P01028
MSF-308	MSPI-308	P02749
MSF-311	MSPI-311.1	P01008
MSF-311	MSPI-311.2	P01876
MSF-311	MSPI-311.3	P01019
MSF-313	MSPI-313	P41222
MSF-314	MSPI-314	Q92876

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF#	MSPI#	Accession #
MSF-316	MSPI-316	P10909
MSF-318	MSPI-318	P02766
MSF-319	MSPI-319	P04040
MSF-320	MSPI-320	P41222
MSF-322	MSPI-322	P41222
MSF-323	MSPI-323.1	P10909
MSF-323	MSPI-323.2	P02766
MSF-324	MSPI-324	P41222
MSF-325	MSPI-325.1	P01028
MSF-325	MSPI-325.2	P02750

- For any MSPI, degenerate probes, or probes taken from the sequences described above by accession number may be used for screening. In the case of degenerate probes, they can be constructed from the partial amino sequence information obtained from tandem mass spectra of tryptic digest peptides of the MSPI. To screen such a gene, any probe may be used that is complementary to the gene or its complement; the probe is 10 nucleotides or longer, preferably 15 nucleotides or longer. When a library is screened, clones with insert DNA encoding the MSPI or a fragment thereof will hybridize to one or more members of the corresponding set of degenerate oligonucleotide probes (or their complement). Hybridization of such oligonucleotide probes to genomic libraries is carried out using methods known in the art. For example, hybridization with one of the above-mentioned degenerate sets of oligonucleotide probes, or their complement (or with any member of such a set, or its complement) can be performed under highly stringent or moderately stringent conditions as defined *supra*, or can be carried out in 2X SSC, 1.0% SDS at 50°C and washed using the washing conditions described *supra* for highly stringent or moderately stringent hybridization.

- In yet another aspect of the invention, clones containing nucleotide sequences encoding the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein any of the foregoing may also be obtained by screening expression libraries. For example, DNA from the relevant source is isolated and random fragments are prepared and ligated into an expression vector (e.g., a bacteriophage, plasmid, phagemid or cosmid) such that the inserted sequence in the vector is capable of being expressed by the host cell into which the vector is then introduced. Various screening assays can then be used to select for the expressed MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein. In one embodiment, the various anti-MSPI antibodies of the invention can be used to identify the desired clones using methods known in the art. See, for example, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, Appendix IV. Colonies or plaques from the library are brought into contact with the antibodies to identify those clones that bind antibody.

- In an embodiment, colonies or plaques containing DNA that encodes MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein can be detected using DYNA Beads according to Olsvick et al., 29th ICAAC, Houston, Tex. 1989, incorporated herein by reference. Anti-MSPI antibodies are crosslinked to tosylated DYNA Beads M280, and these antibody-containing beads are then contacted with colonies or plaques expressing recombinant polypeptides. Colonies or plaques expressing an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein are identified as any of those that bind the beads.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Alternatively, the anti-MSPI antibodies can be nonspecifically immobilized to a suitable support, such as silica or Celite[®] resin. This material is then used to adsorb to bacterial colonies expressing the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein as described herein.

5 In another aspect, PCR amplification may be used to isolate from genomic DNA a substantially pure DNA (i.e., a DNA substantially free of contaminating nucleic acids) encoding the entire MSPI or a part thereof. Preferably such a DNA is at least 95% pure, more preferably at least 99% pure. Oligonucleotide sequences, degenerate or otherwise, that correspond to peptide sequences of MSPIs disclosed herein can be used as primers.

10 PCR can be carried out, e.g., by use of a Perkin-Elmer Cetus thermal cycler and Taq polymerase (Gene Amp[™] or AmpliTaq[™] DNA polymerase). One can choose to synthesize several different degenerate primers, for use in the PCR reactions. It is also possible to vary the stringency of hybridization conditions used in priming the PCR reactions, to allow for greater or lesser degrees of nucleotide sequence similarity between the degenerate primers and the corresponding sequences in the DNA. After successful amplification of a segment of the sequence encoding an MSPI, that segment may be molecularly cloned and sequenced, and utilized as a probe to isolate a complete genomic clone. This, in turn, will permit the determination of the gene's complete nucleotide sequence, the analysis of its expression, and the production of its protein product for functional analysis, as described *infra*.

20 The gene encoding an MSPI can also be identified by mRNA selection by nucleic acid hybridization followed by in vitro translation. In this procedure, fragments are used to isolate complementary mRNAs by hybridization. Such DNA fragments may represent available, purified DNA encoding an MSPI of another species (e.g., mouse, human). Immunoprecipitation analysis or functional assays (e.g., aggregation ability in vitro; binding to receptor) of the in vitro translation products of the isolated products of the isolated mRNAs identifies the mRNA and, therefore, the complementary DNA fragments that contain the desired sequences. In addition, specific mRNAs may be selected by adsorption of polysomes isolated from cells to immobilized antibodies that specifically recognize an MSPI. A radiolabeled cDNA encoding an MSPI can be synthesized using the selected mRNA (from the adsorbed polysomes) as a template. The radiolabeled mRNA or cDNA may then be used as a probe to identify the DNA fragments encoding an MSPI from among other genomic DNA fragments.

30 Alternatives to isolating genomic DNA encoding an MSPI include, but are not limited to, chemically synthesizing the gene sequence itself from a known sequence or making cDNA to the mRNA which encodes the MSPI. For example, RNA for cDNA cloning of the gene encoding an MSPI can be isolated from cells which express the MSPI. Those skilled in the art will understand from the present description that other methods may be used and are within the scope of the invention.

40 Any suitable eukaryotic cell can serve as the nucleic acid source for the molecular cloning of the gene encoding an MSPI. The nucleic acid sequences encoding the MSPI can be isolated from vertebrate, mammalian, primate, human, porcine, bovine, feline, avian, equine, canine or murine sources. The DNA may be obtained by standard procedures known in the art from cloned DNA (e.g., a DNA "library"), by chemical synthesis, by cDNA cloning, or by the cloning of genomic DNA, or fragments thereof, purified from the desired cell. (See, e.g.,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Glover, D.M. (ed.), 1985, *DNA Cloning: A Practical Approach*, MRL Press, Ltd., Oxford, U.K. Vol. I, II.) Clones derived from genomic DNA may contain regulatory and intron DNA regions in addition to coding regions; clones

5 derived from cDNA will contain only exon sequences.

The identified and isolated gene or cDNA can then be inserted into any suitable cloning vector. A large number of vector-host systems known in the art may be used. As those skilled in the art will appreciate, the only limitation is that the vector system chosen be compatible with the host cell used. Such vectors include, but are not limited to, bacteriophages

10 such as lambda derivatives, plasmids such as PBR322 or pUC plasmid derivatives or the Bluescript™ vector (Stratagene) or modified viruses such as adenoviruses, adeno-associated viruses or retroviruses. The insertion into a cloning vector can be accomplished, for example, by ligating the DNA fragment into a cloning vector which has complementary cohesive termini. However, if the complementary restriction sites used to fragment the DNA are not

15 present in the cloning vector, the ends of the DNA molecules may be enzymatically modified. Alternatively, any site desired may be produced by ligating nucleotide sequences (linkers) onto the DNA termini; these ligated linkers may comprise specific chemically synthesized oligonucleotides encoding restriction endonuclease recognition sequences. In an alternative method, the cleaved vector and the gene encoding an MSPI may be modified by

20 homopolymeric tailing. Recombinant molecules can be introduced into host cells via transformation, transfection, infection, electroporation, etc., so that many copies of the gene sequence are generated.

In specific embodiments, transformation of host cells with recombinant DNA molecules that incorporate the isolated gene encoding the MSPI, cDNA, or synthesized DNA

25 sequence enables generation of multiple copies of the gene. Thus, the gene may be obtained in large quantities by growing transformants, isolating the recombinant DNA molecules from the transformants and, when necessary, retrieving the inserted gene from the isolated recombinant DNA.

The nucleotide sequences of the present invention include nucleotide sequences

30 encoding amino acid sequences with substantially the same amino acid sequences as native MSPI, nucleotide sequences encoding amino acid sequences with functionally equivalent amino acids, nucleotide sequences encoding MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein.

In a specific embodiment, an isolated nucleic acid molecule encoding an MSPI-related

35 polypeptide can be created by introducing one or more nucleotide substitutions, additions or deletions into the nucleotide sequence of an MSPI such that one or more amino acid substitutions, additions or deletions are introduced into the encoded protein. Standard techniques known to those of skill in the art can be used to introduce mutations, including, for example, site-directed mutagenesis and PCR-mediated mutagenesis. Preferably, conservative

40 amino acid substitutions are made at one or more predicted non-essential amino acid residues. A "conservative amino acid substitution" is one in which the amino acid residue is replaced with an amino acid residue having a side chain with a similar charge. Families of amino acid residues having side chains with similar charges have been defined in the art. These families include amino acids with basic side chains (e.g., lysine, arginine, histidine), acidic side chains

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

(e.g., aspartic acid, glutamic acid), uncharged polar side chains (e.g., glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, cysteine), nonpolar side chains (e.g., alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, tryptophan), beta-branched side chains (e.g., threonine, valine, isoleucine) and aromatic side chains (e.g., tyrosine, phenylalanine, tryptophan, histidine). Alternatively, mutations can be introduced randomly along all or part of the coding sequence, such as by saturation mutagenesis, and the resultant mutants can be screened for biological activity to identify mutants that retain activity. Following mutagenesis, the encoded protein can be expressed and the activity of the protein can be determined.

10 5.9 EXPRESSION OF DNA ENCODING MSPIs

The nucleotide sequence coding for an MSPI, MSPI fragment or MSPI-related polypeptide or other derivative of any of the foregoing, can be inserted into an appropriate expression vector, i.e., a vector which contains the necessary elements for the transcription and translation of the inserted protein-coding sequence. The necessary transcriptional and translational signals can also be supplied by the native gene encoding the MSPI or its flanking regions, or the native gene encoding the MSPI-related polypeptide or its flanking regions. A variety of host-vector systems may be utilized in the present invention to express the protein-coding sequence. These include but are not limited to mammalian cell systems infected with virus (e.g., vaccinia virus, adenovirus, etc.); insect cell systems infected with virus (e.g., baculovirus); microorganisms such as yeast containing yeast vectors; or bacteria transformed with bacteriophage, DNA, plasmid DNA, or cosmid DNA. The expression elements of vectors vary in their strengths and specificities. Depending on the host-vector system utilized, any one of a number of suitable transcription and translation elements may be used. In specific embodiments, a nucleotide sequence encoding a human gene (or a nucleotide sequence encoding a functionally active portion of a human MSPI) is expressed. In yet another embodiment, a fragment of an MSPI comprising a domain of the MSPI is expressed.

Any of the methods previously described for the insertion of DNA fragments into a vector may be used to construct expression vectors containing a chimeric gene consisting of appropriate transcriptional and translational control signals and the protein coding sequences. These methods may include in vitro recombinant DNA and synthetic techniques and in vivo recombinants (genetic recombination). Expression of nucleic acid sequence encoding an MSPI or fragment thereof may be regulated by a second nucleic acid sequence so that the MSPI or fragment is expressed in a host transformed with the recombinant DNA molecule. For example, expression of an MSPI may be controlled by any promoter or enhancer element known in the art. Promoters which may be used to control the expression of the gene encoding an MSPI or an MSPI-related polypeptide include, but are not limited to, the SV40 early promoter region (Bernoist and Chambon, 1981, Nature 290:304-310), the promoter contained in the 3' long terminal repeat of Rous sarcoma virus (Yamamoto, et al., 1980, Cell 22:787-797), the herpes thymidine kinase promoter (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78:1441-1445), the regulatory sequences of the metallothionein gene (Brinster et al., 1982, Nature 296:39-42), the tetracycline (Tet) promoter (Gossen et al., 1995, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89:5547-5551); prokaryotic expression vectors such as the b-lactamase promoter (Villa-Komaroff, et al., 1978, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75:3727-3731), or the tac

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

promoter (DeBoer, et al., 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:21-25; see also "Useful proteins from recombinant bacteria" in Scientific American, 1980, 242:74-94); plant expression vectors comprising the nopaline synthetase promoter region (Herrera-Estrella et al., Nature 303:209-213) or the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter (Gardner, et al., 1981, Nucl. Acids Res. 9:2871), and the promoter of the photosynthetic enzyme ribulose biphosphate carboxylase (Herrera-Estrella et al., 1984, Nature 310:115-120); promoter elements from yeast or other fungi such as the Gal 4 promoter, the ADC (alcohol dehydrogenase) promoter, PGK (phosphoglycerol kinase) promoter, alkaline phosphatase promoter, and the following animal transcriptional control regions, which exhibit tissue specificity and have been utilized in transgenic animals: elastase I gene control region which is active in pancreatic acinar cells (Swift et al., 1984, Cell 38:639-646; Ornitz et al., 1986, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 50:399-409; MacDonald, 1987, Hepatology 7:425-515); insulin gene control region which is active in pancreatic beta cells (Hanahan, 1985, Nature 315:115-122), immunoglobulin gene control region which is active in lymphoid cells (Grosschedl et al., 1984, Cell 38:647-658; Adames et al., 1985, Nature 318:533-538; Alexander et al., 1987, Mol. Cell. Biol. 7:1436-1444), mouse mammary tumor virus control region which is active in testicular, breast, lymphoid and mast cells (Leder et al., 1986, Cell 45:485-495), albumin gene control region which is active in liver (Pinkert et al., 1987, Genes and Devel. 1:268-276), alpha-fetoprotein gene control region which is active in liver (Krumlauf et al., 1985, Mol. Cell. Biol. 5:1639-1648; Hammer et al., 1987, Science 235:53-58; alpha 1-antitrypsin gene control region which is active in the liver (Kelsey et al., 1987, Genes and Devel. 1:161-171); beta-globin gene control region which is active in myeloid cells (Mogam et al., 1985, Nature 315:338-340; Kollias et al., 1986, Cell 46:89-94; myelin basic protein gene control region which is active in oligodendrocyte cells in the brain (Readhead et al., 1987, Cell 48:703-712); myosin light chain-2 gene control region which is active in skeletal muscle (Sani, 1985, Nature 314:283-286); neuronal-specific enolase (NSE) which is active in neuronal cells (Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83); brain-derived neurotrophic factor (BDNF) gene control region which is active in neuronal cells (Tabuchi et al., 1998, Biochem. Biophysic. Res. Com. 253:818-823); glial fibrillary acidic protein (GFAP) promoter which is active in astrocytes (Gomes et al., 1999, Braz J Med Biol Res 32(5):619-631; Morelli et al., 1999, Gen. Virol. 80:571-83) and gonadotropic releasing hormone gene control region which is active in the hypothalamus (Mason et al., 1986, Science 234:1372-1378).

In a specific embodiment, a vector is used that comprises a promoter operably linked to an MSPI-encoding nucleic acid, one or more origins of replication, and, optionally, one or more selectable markers (e.g., an antibiotic resistance gene).

In a specific embodiment, an expression construct is made by subcloning an MSPI, MSPI fragment or MSPI-related polypeptide coding sequence into the EcoRI restriction site of each of the three pGEX vectors (Glutathione S-Transferase expression vectors; Smith and Johnson, 1988, Gene 7:31-40). This allows for the expression of the MSPI product or MSPI-related polypeptide from the subclone in the correct reading frame.

In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems may be utilized. In cases where an adenovirus is used as an expression vector, the MSPI coding sequence or MSPI-related polypeptide coding sequence may be ligated to an adenovirus

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

transcription/translation control complex, e.g., the late promoter and tripartite leader sequence. This chimeric gene may then be inserted in the adenovirus genome by in vitro or in vivo recombination. Insertion in a non-essential region of the viral genome (e.g., region E1 or E3) will result in a recombinant virus that is viable and capable of expressing the antibody molecule in infected hosts. (e.g., see Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:355-359). Specific initiation signals may also be required for efficient translation of inserted antibody coding sequences. These signals include the ATG initiation codon and adjacent sequences. Furthermore, the initiation codon must be in phase with the reading frame of the desired coding sequence to ensure translation of the entire insert. These exogenous translational control signals and initiation codons can be of a variety of origins, both natural and synthetic. The efficiency of expression may be enhanced by the inclusion of appropriate transcription enhancer elements, transcription terminators, etc. (see Bitner et al., 1987, Methods in Enzymol. 153:51-544).

Expression vectors containing inserts of a gene encoding an MSPI, MSPI fragment or MSPI-related polypeptide can be identified by three general approaches: (a) nucleic acid hybridization, (b) presence or absence of "marker" gene functions, and (c) expression of inserted sequences. In the first approach, the presence of a gene encoding an MSPI inserted in an expression vector can be detected by nucleic acid hybridization using probes comprising sequences that are homologous to an inserted gene encoding an MSPI. In the second approach, the recombinant vector/host system can be identified and selected based upon the presence or absence of certain "marker" gene functions (e.g., thymidine kinase activity, resistance to antibiotics, transformation phenotype, occlusion body formation in baculovirus, etc.) caused by the insertion of a gene encoding an MSPI in the vector. For example, if the gene encoding the MSPI is inserted within the marker gene sequence of the vector, recombinants containing the gene encoding the MSPI insert can be identified by the absence of the marker gene function. In the third approach, recombinant expression vectors can be identified by assaying the gene product (i.e., MSPI) expressed by the recombinant. Such assays can be based, for example, on the physical or functional properties of the MSPI in in vitro assay systems, e.g., binding with anti-MSPI antibody.

In addition, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Expression from certain promoters can be elevated in the presence of certain inducers; thus, expression of the genetically engineered MSPI or MSPI-related polypeptide may be controlled. Furthermore, different host cells have characteristic and specific mechanisms for the translational and post-translational processing and modification (e.g., glycosylation, phosphorylation of proteins). Appropriate cell lines or host systems can be chosen to ensure the desired modification and processing of the foreign protein expressed. For example, expression in a bacterial system will produce an unglycosylated product and expression in yeast will produce a glycosylated product. Eukaryotic host cells which possess the cellular machinery for proper processing of the primary transcript, glycosylation, and phosphorylation of the gene product may be used. Such mammalian host cells include but are not limited to CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, HEK293, 3T3, WI38, and in particular, neuronal cell lines such as, for example, SK-N-AS, SK-N-FI, SK-N-DZ human neuroblastomas (Sugimoto et al., 1984, J. Natl. Cancer Inst. 73: 51-57), SK-N-SH human neuroblastoma

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- (Biochim. Biophys. Acta, 1982, 704: 450-460), Daoy human cerebellar medulloblastoma (He et al., 1992, Cancer Res. 52: 1144-1148) DBTRG-05MG glioblastoma cells (Kruse et al., 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol. 28A: 609-614), IMR-32 human neuroblastoma (Cancer Res., 1970, 30: 2110-2118), 1321NI human astrocytoma (Proc. Natl Acad. Sci. USA, 1977, 74: 4816), MOG-G-CCM human astrocytoma (Br. J. Cancer, 1984, 49: 269), U87MG human glioblastoma-astrocytoma (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 1968, 74: 465-486), A172 human glioblastoma (Olopade et al., 1992, Cancer Res. 52: 2523-2529), C6 rat glioma cells (Benda et al., 1968, Science 161: 370-371), Neuro-2a mouse neuroblastoma (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1970, 65: 129-136), NB41A3 mouse neuroblastoma (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1962, 48: 1184-1190), SCP sheep choroid plexus (Bolin et al., 1994, J. Virol. Methods 48: 211-221), G355-5, PG-4 Cat normal astrocyte (Haapala et al., 1985, J. Virol. 53: 827-833), Mpf ferret brain (Trowbridge et al., 1982, In Vitro 18: 952-960), and normal cell lines such as, for example, CTX TNA2 rat normal cortex brain (Radany et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 6467-6471) such as, for example, CRL7030 and Hs578Bst. Furthermore, different

- vector/host expression systems may effect processing reactions to different extents.
- For long-term, high-yield production of recombinant proteins, stable expression is preferred. For example, cell lines which stably express the MSPI may be engineered. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with DNA controlled by appropriate expression control elements (e.g., promoter, enhancer, sequences, transcription terminators, polyadenylation sites, etc.), and a selectable marker. Following the introduction of the foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched medium, and then are switched to a selective medium. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows cells to stably integrate the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. This method may advantageously be used to engineer cell lines which express the MSPI. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of agents that affect the endogenous activity of the MSPI.

- A number of selection systems may be used, including but not limited to the herpes simplex virus thymidine kinase (Wigler, et al., 1977, Cell 11:223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), and adenine phosphoribosyltransferase (Lowy, et al., 1980, Cell 22:817) genes can be employed in tk-, hgpri- or aprt- cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for dhfr, which confers resistance to methotrexate (Wigler, et al., 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare, et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); gpt, which confers resistance to mycophenolic acid (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (Colberre-Garapin, et al., 1981, J. Mol. Biol. 150:1); and hygri, which confers resistance to hygromycin (Santerre, et al., 1984, Gene 30:147) genes.

- In other specific embodiments, the MSPI, fragment, analog, or derivative may be expressed as a fusion, or chimeric protein product (comprising the protein, fragment, analog, or derivative joined via a peptide bond to a heterologous protein sequence). For example, the polypeptides of the present invention may be fused with the constant domain of immunoglobulins (IgA, IgE, IgG, IgM), or portions thereof (CH1, CH2, CH3, or any combination thereof and portions thereof) resulting in chimeric polypeptides. Such fusion

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

proteins may facilitate purification, increase half-life in vivo, and enhance the delivery of an antigen across an epithelial barrier to the immune system. An increase in the half-life in vivo and facilitated purification has been shown for chimeric proteins consisting of the first two domains of the human CD4-polypeptide and various domains of the constant regions of the heavy or light chains of mammalian immunoglobulins. See, e.g., EP 394,827; Trautnecker et al., *Nature*, 331:84-86 (1988). Enhanced delivery of an antigen across the epithelial barrier to the immune system has been demonstrated for antigens (e.g., insulin) conjugated to an FcRn binding partner such as IgG or Fc fragments (see, e.g., WO 96/22024 and WO 99/04813).

Nucleic acids encoding an MSPI, a fragment of an MSPI, an MSPI-related polypeptide, or a fragment of an MSPI-related polypeptide can be fused to an epitope tag (e.g., the hemagglutinin ("HA") tag or flag tag) to aid in detection and purification of the expressed polypeptide. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:8972-8977).

Fusion proteins can be made by ligating the appropriate nucleic acid sequences encoding the desired amino acid sequences to each other by methods known in the art, in the proper coding frame, and expressing the chimeric product by methods commonly known in the art. Alternatively, a fusion protein may be made by protein synthetic techniques, e.g., by use of a peptide synthesizer.

Both cDNA and genomic sequences can be cloned and expressed.

5.10 DOMAIN STRUCTURE OF MSPIs

Domains of some MSPIs are known in the art and have been described in the scientific literature. Moreover, domains of an MSPI can be identified using techniques known to those of skill in the art. For example, one or more domains of an MSPI can be identified by using one or more of the following programs: ProDom, TMPred, and SAPS. ProDom compares the amino acid sequence of a polypeptide to a database of compiled domains (see, e.g., <http://www.toulouse.inra.fr/prodom.html>; Corpet F., Gouzy J. & Kahn D., 1999, *Nucleic Acids Res.*, 27:263-267). TMPred predicts membrane-spanning regions of a polypeptide and their orientation. This program uses an algorithm that is based on the statistical analysis of TMbase, a database of naturally occurring transmembrane proteins (see, e.g., http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html; Hofmann & Stoffel. (1993) "TMbase - A database of membrane spanning proteins segments." *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* 347,166). The SAPS program analyzes polypeptides for statistically significant features like charge-clusters, repeats, hydrophobic regions, compositional domains (see, e.g., Brendel et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2002-2006). Thus, based on the present description, the skilled artisan can identify domains of an MSPI having enzymatic or binding activity, and further can identify nucleotide sequences encoding such domains. These nucleotide sequences can then be used for recombinant expression of an MSPI fragment that retains the enzymatic or binding activity of the MSPI.

Based on the present description, the skilled artisan can identify domains of an MSPI having enzymatic or binding activity, and further can identify nucleotide sequences encoding such domains. These nucleotide sequences can then be used for recombinant expression of MSPI fragments that retain the enzymatic or binding activity of the MSPI.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

In one embodiment, an MSPI has an amino acid sequence sufficiently similar to an identified domain of a known polypeptide. As used herein, the term "sufficiently similar" refers to a first amino acid or nucleotide sequence which contains a sufficient number of identical or equivalent (e.g., with a similar side chain) amino acid residues or nucleotides to a second amino acid or nucleotide sequence such that the first and second amino acid or nucleotide sequences have or encode a common structural domain or common functional activity or both.

An MSPI domain can be assessed for its function using techniques well known to those of skill in the art. For example, a domain can be assessed for its kinase activity or for its ability to bind to DNA using techniques known to the skilled artisan. Kinase activity can be assessed, for example, by measuring the ability of a polypeptide to phosphorylate a substrate. DNA binding activity can be assessed, for example, by measuring the ability of a polypeptide to bind to a DNA binding element in a electromobility shift assay. In a preferred embodiment, the function of a domain of an MSPI is determined using an assay described in one or more of the references identified in Table IX, infra.

5.11 PRODUCTION OF ANTIBODIES TO MSPIs

According to the invention an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein or derivative of any of the foregoing may be used as an immunogen to generate antibodies which immunospecifically bind such an immunogen. Such immunogens can be isolated by any convenient means, including the methods described above. Antibodies of the invention include, but are not limited to polyclonal, monoclonal, bispecific, humanized or chimeric antibodies, single chain antibodies, Fab fragments and F(ab') fragments, fragments produced by a Fab expression library, anti-idiotypic (anti-Id) antibodies, and epitope-binding fragments of any of the above. The term "antibody" as used herein refers to immunoglobulin molecules and immunologically active portions of immunoglobulin molecules, i.e., molecules that contain an antigen binding site that specifically binds an antigen. The immunoglobulin molecules of the invention can be of any class (e.g., IgG, IgE, IgM, IgD and IgA) or subclass of immunoglobulin molecule.

In one embodiment, antibodies that recognize gene products of genes encoding MSPIs are publicly available. For example, antibodies that recognize these MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion proteins include antibodies recognizing MSPI-1, MSPI-2, MSPI-3, MSPI-4, MSPI-5.1, MSPI-6, MSPI-7, MSPI-8.1, MSPI-8.2, MSPI-9, MSPI-10, MSPI-11, MSPI-12.1, MSPI-12.2, MSPI-13, MSPI-14, MSPI-15, MSPI-16, MSPI-18, MSPI-22, MSPI-24, MSPI-27, MSPI-28, MSPI-29, MSPI-30, MSPI-31, MSPI-32, MSPI-33.1, MSPI-36, MSPI-37, MSPI-39.1, MSPI-40, MSPI-42.2, MSPI-47, MSPI-48.1, MSPI-51.1, MSPI-52.1, MSPI-52.2, MSPI-54, MSPI-55, MSPI-56, MSPI-58, MSPI-60, MSPI-65, MSPI-67.1, MSPI-67.2, MSPI-70, MSPI-72, MSPI-75, MSPI-76, MSPI-78.1, MSPI-78.2, MSPI-79, MSPI-80.1, MSPI-81, MSPI-84.1, MSPI-89.1, MSPI-90, MSPI-91.1, MSPI-92, MSPI-93.1, MSPI-93.2, MSPI-95, MSPI-96, MSPI-98, MSPI-102.1, MSPI-102.2, MSPI-102.3, MSPI-104, MSPI-105.1, MSPI-105.2, MSPI-106, MSPI-107, MSPI-108, MSPI-110, MSPI-111, MSPI-113, MSPI-114, MSPI-119, MSPI-120, MSPI-122, MSPI-123.1, MSPI-127.1, MSPI-128, MSPI-130, MSPI-132, MSPI-133, MSPI-134, MSPI-137, MSPI-140, MSPI-141.2, MSPI-142, MSPI-145.2, MSPI-147.2, MSPI-149, MSPI-150, MSPI-151, MSPI-

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- 152, MSPI-154.1, MSPI-155.2, MSPI-155.3, MSPI-156.2, MSPI-158.2, MSPI-159, MSPI-160, MSPI-161, MSPI-165.2, MSPI-167, MSPI-169.2, MSPI-170, MSPI-171, MSPI-172, MSPI-173.2, MSPI-175, MSPI-176.1, MSPI-176.2, MSPI-177, MSPI-178, MSPI-179.1, MSPI-179.2, MSPI-181.2, MSPI-182, MSPI-183, MSPI-184, MSPI-186, MSPI-187.1, MSPI-187.2, MSPI-189, MSPI-191, MSPI-192.1, MSPI-193, MSPI-194.1, MSPI-195.1, MSPI-196, MSPI-197, MSPI-198, MSPI-199.1, MSPI-199.2, MSPI-200, MSPI-201, MSPI-202.1, MSPI-205, MSPI-206, MSPI-209, MSPI-210, MSPI-212.2, MSPI-213, MSPI-215, MSPI-216, MSPI-217.3, MSPI-218, MSPI-219, MSPI-220, MSPI-221.1, MSPI-222.2, MSPI-223.1, MSPI-224.1, MSPI-228.1, MSPI-228.2, MSPI-229.2, MSPI-230, MSPI-231, MSPI-232, MSPI-233.1, MSPI-233.2, MSPI-234, MSPI-235, MSPI-236.1, MSPI-236.2, MSPI-237, MSPI-238, MSPI-239.1, MSPI-239.2, MSPI-240.1, MSPI-240.2, MSPI-241.2, MSPI-242.2, MSPI-243, MSPI-244, MSPI-245, MSPI-246.1, MSPI-246.2, MSPI-248, MSPI-251, MSPI-257.2, MSPI-257.3, MSPI-260.2, MSPI-265, MSPI-266, MSPI-268.1, MSPI-270, MSPI-273, MSPI-274, MSPI-277, MSPI-279, MSPI-280.2, MSPI-283.2, MSPI-284.1, MSPI-289, MSPI-290, MSPI-291.2, MSPI-292, MSPI-295, MSPI-298.2, MSPI-299, MSPI-301, MSPI-302, MSPI-303.2, MSPI-305, MSPI-306, MSPI-307, MSPI-311.1, MSPI-311.2, MSPI-311.3, MSPI-313, MSPI-316, MSPI-318, MSPI-319, MSPI-320, MSPI-322, MSPI-323.1, MSPI-323.2, MSPI-324, MSPI-325.1, which antibodies can be purchased from commercial sources as shown in Table VII above. In another embodiment, methods known to those skilled in the art are used to produce antibodies that recognize an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein or derivatives of any of the foregoing.
- In one embodiment of the invention, antibodies to a specific domain of an MSPI are produced. In a specific embodiment, hydrophilic fragments of an MSPI are used as immunogens for antibody production.
- In the production of antibodies, screening for the desired antibody can be accomplished by techniques known in the art, e.g. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). For example, to select antibodies which recognize a specific domain of an MSPI, one may assay generated hybridomas for a product which binds to an MSPI fragment containing such domain. For selection of an antibody that specifically binds a first MSPI homolog but which does not specifically bind to (or binds less avidly to) a second MSPI homolog, one can select on the basis of positive binding to the first MSPI homolog and a lack of binding to (or reduced binding to) the second MSPI homolog. Similarly, for selection of an antibody that specifically binds an MSPI but which does not specifically bind to (or binds less avidly to) a different isoform of the same protein (such as a different glycoform having the same core peptide as the MSPI), one can select on the basis of positive binding to the MSPI and a lack of binding to (or reduced binding to) the different isoform (e.g., a different glycoform). Thus, the present invention provides an antibody (preferably a monoclonal antibody) that binds with greater affinity (preferably at least 2-fold, more preferably at least 5-fold still more preferably at least 10-fold greater affinity) to an MSPI than to a different isoform or isoforms (e.g., glycoforms) of the MSPI.
- Polyclonal antibodies which may be used in the methods of the invention are heterogeneous populations of antibody molecules derived from the sera of immunized animals. Unfractionated immune serum can also be used. Various procedures known in the art may be used for the production of polyclonal antibodies to an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

polypeptide or the MSPI-fusion protein. In a particular embodiment, rabbit polyclonal antibodies to an epitope of an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein can be obtained. For example, for the production of polyclonal or monoclonal antibodies, various host animals can be immunized by injection with the native or a synthetic (e.g., recombinant) version of an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein, including but not limited to rabbits, mice, rats, etc. The Preferred Technology described herein provides isolated MSPIs suitable for such immunization. If the MSPI is purified by gel electrophoresis, the MSPI can be used for immunization with or without prior extraction from the polyacrylamide gel. Various adjuvants may be used to enhance the immunological response, depending on the host species, including, but not limited to, complete or incomplete Freund's adjuvant, a mineral gel such as aluminum hydroxide, surface active substance such as lysolecithin, pluronic polyol, a polyanion, a peptide, an oil emulsion, keyhole limpet hemocyanin, dinitrophenol, and an adjuvant such as BCG (bacille Calmette-Guerin) or corynebacterium parvum. Additional adjuvants are also well known in the art.

For preparation of monoclonal antibodies (mAbs) directed toward an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein, any technique which provides for the production of antibody molecules by continuous cell lines in culture may be used. For example, the hybridoma technique originally developed by Kohler and Milstein (1975, *Nature* 256:495-497), as well as the trioma technique, the human B-cell hybridoma technique (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today* 4:72), and the EBV-hybridoma technique to produce human monoclonal antibodies (Cole et al., 1985, in *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Such antibodies may be of any immunoglobulin class including IgG, IgM, IgE, IgA, IgD and any subclass thereof. The hybridoma producing the mAbs of the invention may be cultivated in vitro or in vivo. In an additional embodiment of the invention, mAbs can be produced in germ-free animals utilizing known technology (PCT/US90/02545).

The mAbs include but are not limited to human mAbs and chimeric mAbs (e.g., human-mouse chimeras). A chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a human immunoglobulin constant region and a variable region derived from a murine mAb. (See, e.g., US 4,816,567 and U.S. Patent No. 4,816,397.) Humanized antibodies are antibody molecules from non-human species having one or more complementarily determining regions (CDRs) from the non-human species and a framework region from a human immunoglobulin molecule. (See, e.g. US 5,585,089, which is incorporated herein by reference in its entirety.)

Chimeric and humanized mAbs can be produced by recombinant DNA techniques known in the art, for example using methods described in WO 87/02671; EP 184,187A; EP 171,496A; EP 173,494A; WO 86/01533; US 4,816,567; EP 125,023A; Better et al., 1988, *Science* 240:1041-1043; Liu et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443; Liu et al., 1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526; Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218; Nishimura et al., 1987, *Canc. Res.* 47:999-1005; Wood et al., 1985, *Nature* 314:446-449; and Shaw et al., 1988, *J. Natl. Cancer Inst.* 80:1553-1559; Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207; Oi et al., 1986, *Bio/Techniques* 4:214; U.S. 5,225,539; Jones et al., 1986, *Nature* 321:552-525; Verhoecyan et al. (1988) *Science* 239:1534; and Beidler et al., 1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Completely human antibodies are particularly desirable for therapeutic treatment of human subjects. Such antibodies can be produced using transgenic mice which are incapable of expressing endogenous immunoglobulin heavy and light chains genes, but which can express human heavy and light chain genes. The transgenic mice are immunized in the normal fashion with a selected antigen, e.g., all or a portion of an MSP1 of the invention. Monoclonal antibodies directed against the antigen can be obtained using conventional hybridoma technology. The human immunoglobulin transgenes harbored by the transgenic mice rearrange during B cell differentiation, and subsequently undergo class switching and somatic mutation. Thus, using such a technique, it is possible to produce therapeutically useful IgG, IgA, IgM and IgE antibodies. For an overview of this technology for producing human antibodies, see Lonberg and Huszar (1995, *Int. Rev. Immunol.* 13:65-93). For a detailed discussion of this technology for producing human antibodies and human monoclonal antibodies and protocols for producing such antibodies, see, e.g., U.S. Patent 5,625,126; U.S. Patent 5,633,425; U.S. Patent 5,569,825; U.S. Patent 5,661,016; and U.S. Patent 5,545,806. In addition, companies such as Abgenix, Inc. (Freemont, CA) and Genpharm (San Jose, CA) can be engaged to provide human antibodies directed against a selected antigen using technology similar to that described above.

Completely human antibodies which recognize a selected epitope can be generated using a technique referred to as "guided selection." In this approach a selected non-human monoclonal antibody, e.g., a mouse antibody, is used to guide the selection of a completely human antibody recognizing the same epitope. (Jespersen et al. (1994) *Bio/technology* 12:899-903).

The antibodies of the present invention can also be generated using various phage display methods known in the art. In phage display methods, functional antibody domains are displayed on the surface of phage particles which carry the polynucleotide sequences encoding them. In particular, such phage can be utilized to display antigen binding domains expressed from a repertoire or combinatorial antibody library (e.g., human or murine). Phage expressing an antigen binding domain that binds the antigen of interest can be selected or identified with antigen, e.g., using labeled antigen or antigen bound or captured to a solid surface or bead. Phage used in these methods are typically filamentous phage including fd and M13 binding domains expressed from phage with Fab, Fv or disulfide stabilized Fv antibody domains recombinantly fused to either the phage gene III or gene VIII protein. Phage display methods that can be used to make the antibodies of the present invention include those disclosed in Brinkman et al., *J. Immunol. Methods* 182:41-50 (1995); Ames et al., *J. Immunol. Methods* 184:177-186 (1995); Kettleborough et al., *Eur. J. Immunol.* 24:952-958 (1994); Persic et al., *Gene* 187 9-18 (1997); Burton et al., *Advances in Immunology* 57:191-280 (1994); PCT/GB91/01134; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; and U.S. Patent Nos. 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 and 5,969,108; each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

As described in the above references, after phage selection, the antibody coding regions from the phage can be isolated and used to generate whole antibodies, including human antibodies, or any other desired antigen binding fragment, and expressed in any desired

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

host, including mammalian cells, insect cells, plant cells, yeast, and bacteria, e.g., as described in detail below. For example, techniques to recombinantly produce Fab, Fab' and F(ab')₂ fragments can also be employed using methods known in the art such as those disclosed in WO 92/22324; Mullinax et al., *BioTechniques* 12(6):864-869 (1992); and Sawai et al., *AJRI* 5 34:26-34 (1995); and Better et al., *Science* 240:1041-1043 (1988).

Examples of techniques which can be used to produce single-chain Fvs and antibodies include those described in U.S. Patents 4,946,778 and 5,258,498; Huston et al., *Methods in Enzymology* 203:46-88 (1991); Shu et al., *PNAS* 90:7995-7999 (1993); and Skerra et al., *Science* 240:1038-1040 (1988).

10 The invention further provides for the use of bispecific antibodies, which can be made by methods known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Milstein et al., 1983, *Nature* 305:537-539). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas 15 (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Trautnecker et al., 1991, *EMBO J.* 10:3655-3659.

20 According to a different and preferred approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain 25 binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction 30 provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

35 In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile 40 way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details for generating bispecific antibodies see, for example, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 1986, 121:210.

The invention provides functionally active fragments, derivatives or analogs of the anti-MSPI immunoglobulin molecules. Functionally active means that the fragment, derivative

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

or analog is able to elicit anti-anti-idiotypic antibodies (i.e., tertiary antibodies) that recognize the same antigen that is recognized by the antibody from which the fragment, derivative or analog is derived. Specifically, in a preferred embodiment the antigenicity of the idiotype of the immunoglobulin molecule may be enhanced by deletion of framework and CDR sequences that are C-terminal to the CDR sequence that specifically recognizes the antigen. To determine which CDR sequences bind the antigen, synthetic peptides containing the CDR sequences can be used in binding assays with the antigen by any binding assay method known in the art.

The present invention provides antibody fragments such as, but not limited to, F(ab')₂ fragments and Fab fragments. Antibody fragments which recognize specific epitopes may be generated by known techniques. F(ab')₂ fragments consist of the variable region, the light chain constant region and the CH1 domain of the heavy chain and are generated by pepsin digestion of the antibody molecule. Fab fragments are generated by reducing the disulfide bridges of the F(ab')₂ fragments. The invention also provides heavy chain and light chain dimers of the antibodies of the invention, or any minimal fragment thereof such as Fvs or single chain antibodies (SCAs) (e.g., as described in U.S. 4,946,778; Bird, 1988, Science 242:423-42; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; and Ward et al., 1989, Nature 334:544-54), or any other molecule with the same specificity as the antibody of the invention. Single chain antibodies are formed by linking the heavy and light chain fragments of the Fv region via an amino acid bridge, resulting in a single chain polypeptide. Techniques for the assembly of functional Fv fragments in *E. coli* may be used (Skerra et al., 1988, Science 242:1038-1041).

In other embodiments, the invention provides fusion proteins of the immunoglobulins of the invention (or functionally active fragments thereof), for example in which the immunoglobulin is fused via a covalent bond (e.g., a peptide bond), at either the N-terminus or the C-terminus to an amino acid sequence of another protein (or portion thereof, preferably at least 10, 20 or 50 amino acid portion of the protein) that is not the immunoglobulin. Preferably the immunoglobulin, or fragment thereof, is covalently linked to the other protein at the N-terminus of the constant domain. As stated above, such fusion proteins may facilitate purification, increase half-life in vivo, and enhance the delivery of an antigen across an epithelial barrier to the immune system.

The immunoglobulins of the invention include analogs and derivatives that are either modified, i.e., by the covalent attachment of any type of molecule as long as such covalent attachment that does not impair immunospecific binding. For example, but not by way of limitation, the derivatives and analogs of the immunoglobulins include those that have been further modified, e.g., by glycosylation, acetylation, pegylation, phosphorylation, amidation, derivatization by known protecting/blocking groups, proteolytic cleavage, linkage to a cellular ligand or other protein, etc. Any of numerous chemical modifications may be carried out by known techniques, including, but not limited to specific chemical cleavage, acetylation, formylation, etc. Additionally, the analog or derivative may contain one or more non-classical amino acids.

The foregoing antibodies can be used in methods known in the art relating to the localization and activity of the MSPLs of the invention, e.g., for imaging these polypeptides, measuring levels thereof in appropriate physiological samples, in diagnostic methods, etc.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

5.12 EXPRESSION OF ANTIBODIES

The antibodies of the invention can be produced by any method known in the art for the synthesis of antibodies, in particular, by chemical synthesis or by recombinant expression, and are preferably produced by recombinant expression techniques.

5 Recombinant expression of antibodies, or fragments, derivatives or analogs thereof, requires construction of a nucleic acid that encodes the antibody. If the nucleotide sequence of the antibody is known, a nucleic acid encoding the antibody may be assembled from chemically synthesized oligonucleotides (e.g., as described in Kutniseier et al., 1994, BioTechniques 17:242), which, briefly, involves the synthesis of overlapping oligonucleotides containing portions of the sequence encoding antibody, annealing and ligation of those
10 oligonucleotides, and then amplification of the ligated oligonucleotides by PCR.

Alternatively, the nucleic acid encoding the antibody may be obtained by cloning the antibody. If a clone containing the nucleic acid encoding the particular antibody is not available, but the sequence of the antibody molecule is known, a nucleic acid encoding the
15 antibody may be obtained from a suitable source (e.g., an antibody cDNA library, or cDNA library generated from any tissue or cells expressing the antibody) by PCR amplification using synthetic primers hybridizable to the 3' and 5' ends of the sequence or by cloning using an oligonucleotide probe specific for the particular gene sequence.

If an antibody molecule that specifically recognizes a particular antigen is not available
20 (or a source for a cDNA library for cloning a nucleic acid encoding such an antibody), antibodies specific for a particular antigen may be generated by any method known in the art, for example, by immunizing an animal, such as a rabbit, to generate polyclonal antibodies or, more preferably, by generating mAbs. Alternatively, a clone encoding at least the Fab portion of the antibody may be obtained by screening Fab expression libraries (e.g., as described in
25 Huse et al., 1989, Science 246:1275-1281) for clones of Fab fragments that bind the specific antigen or by screening antibody libraries (See, e.g., Clackson et al., 1991, Nature 352:624; Hane et al., 1997 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4937).

Once a nucleic acid encoding at least the variable domain of the antibody molecule is obtained, it may be introduced into a vector containing the nucleotide sequence encoding the
30 constant region of the antibody molecule (see, e.g., WO 86/05807; WO 89/01036; and U.S. 5,122,464). Vectors containing the complete light or heavy chain for co-expression with the nucleic acid to allow the expression of a complete antibody molecule are also available. Then, the nucleic acid encoding the antibody can be used to introduce the nucleotide substitution(s) or deletion(s) necessary to substitute (or delete) the one or more variable region cysteine
35 residues participating in an intrachain disulfide bond with an amino acid residue that does not contain a sulfhydryl group. Such modifications can be carried out by any method known in the art for the introduction of specific mutations or deletions in a nucleotide sequence, for example, but not limited to, chemical mutagenesis, in vitro site directed mutagenesis (Hutchinson et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551), PCR based methods, etc.

40 In addition, techniques developed for the production of "chimeric antibodies" (Morrison et al., 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. 81:851-855; Neuberger et al., 1984, Nature 312:604-608; Takeda et al., 1985, Nature 314:452-454) by splicing genes from a mouse antibody molecule of appropriate antigen specificity together with genes from a human antibody molecule of appropriate biological activity can be used. As described supra, a

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

chimeric antibody is a molecule in which different portions are derived from different animal species, such as those having a variable region derived from a murine mAb and a human antibody constant region, e.g., humanized antibodies.

Once a nucleic acid encoding an antibody molecule of the invention has been obtained, the vector for the production of the antibody molecule may be produced by recombinant DNA technology using techniques well known in the art. Thus, methods for preparing the protein of the invention by expressing nucleic acid containing the antibody molecule sequences are described herein. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct expression vectors containing an antibody molecule coding sequences and appropriate transcriptional and translational control signals. These methods include, for example, in vitro recombinant DNA techniques, synthetic techniques, and in vivo genetic recombination. See, for example, the techniques described in Sambrook et al. (1990, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) and Ausubel et al. (eds., 1998, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

The expression vector is transferred to a host cell by conventional techniques and the transfected cells are then cultured by conventional techniques to produce an antibody of the invention.

The host cells used to express a recombinant antibody of the invention may be either bacterial cells such as *Escherichia coli*, or, preferably, eukaryotic cells, especially for the expression of whole recombinant antibody molecule. In particular, mammalian cells such as Chinese hamster ovary cells (CHO), in conjunction with a vector such as the major intermediate early gene promoter element from human cytomegalovirus is an effective expression system for antibodies (Foecking et al., 198, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, BioTechnology 8:2).

A variety of host-expression vector systems may be utilized to express an antibody molecule of the invention. Such host-expression systems represent vehicles by which the coding sequences of interest may be produced and subsequently purified, but also represent cells which may, when transformed or transfected with the appropriate nucleotide coding sequences, express the antibody molecule of the invention in situ. These include but are not limited to microorganisms such as bacteria (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*) transformed with recombinant bacteriophage DNA, plasmid DNA or cosmid DNA expression vectors containing antibody coding sequences; yeast (e.g., *Saccharomyces*, *Pichia*) transformed with recombinant yeast expression vectors containing antibody coding sequences; insect cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., baculovirus) containing the antibody coding sequences; plant cell systems infected with recombinant virus expression vectors (e.g., cauliflower mosaic virus, CaMV; tobacco mosaic virus, TMV) or transformed with recombinant plasmid expression vectors (e.g., Ti plasmid) containing antibody coding sequences; or mammalian cell systems (e.g., COS, CHO, BHK, HEK293, 3T3 cells) harboring recombinant expression constructs containing promoters derived from the genome of mammalian cells (e.g., metallothionein promoter) or from mammalian viruses (e.g., the adenovirus late promoter; the vaccinia virus 7.5K promoter).

In bacterial systems, a number of expression vectors may be advantageously selected depending upon the use intended for the antibody molecule being expressed. For example,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

when a large quantity of such a protein is to be produced, for the generation of pharmaceutical compositions comprising an antibody molecule, vectors which direct the expression of high levels of fusion protein products that are readily purified may be desirable. Such vectors include, but are not limited, to the *E. coli* expression vector pUR278 (Ruther et al., 1983, EMBO J. 2:1791), in which the antibody coding sequence may be ligated individually into the vector in frame with the lac Z coding region so that a fusion protein is produced; pIN vectors (Inouye & Inouye, 1985, Nucleic Acids Res. 13:3101-3109; Van Heeke & Schuster, 1989, J. Biol. Chem. 24:5503-5509); and the like. pGEX vectors may also be used to express foreign polypeptides as fusion proteins with glutathione S-transferase (GST). In general, such fusion proteins are soluble and can easily be purified from lysed cells by adsorption and binding to a matrix glutathione-agarose beads followed by elution in the presence of free glutathione. The pGEX vectors are designed to include thrombin or factor Xa protease cleavage sites so that the cloned target gene product can be released from the GST moiety.

In an insect system, *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus (AcNPV) is used as a vector to express foreign genes. The virus grows in *Spodoptera frugiperda* cells. The antibody coding sequence may be cloned individually into non-essential regions (for example the polyhedrin gene) of the virus and placed under control of an AcNPV promoter (for example the polyhedrin promoter). In mammalian host cells, a number of viral-based expression systems (e.g., an adenovirus expression system) may be utilized.

As discussed above, a host cell strain may be chosen which modulates the expression of the inserted sequences, or modifies and processes the gene product in the specific fashion desired. Such modifications (e.g., glycosylation) and processing (e.g., cleavage) of protein products may be important for the function of the protein.

For long-term, high-yield production of recombinant antibodies, stable expression is preferred. For example, cell lines that stably express an antibody of interest can be produced by transfecting the cells with an expression vector comprising the nucleotide sequence of the antibody and the nucleotide sequence of a selectable marker (e.g., neomycin or hygromycin), and selecting for expression of the selectable marker. Such engineered cell lines may be particularly useful in screening and evaluation of agents that interact directly or indirectly with the antibody molecule.

The expression levels of the antibody molecule can be increased by vector amplification (for a review, see Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3. (Academic Press, New York, 1987)). When a marker in the vector system expressing antibody is amplifiable, increase in the level of inhibitor present in culture of host cell will increase the number of copies of the marker gene. Since the amplified region is associated with the antibody gene, production of the antibody will also increase (Crouse et al., 1983, Mol. Cell. Biol. 3:257).

The host cell may be co-transfected with two expression vectors of the invention, the first vector encoding a heavy chain derived polypeptide and the second vector encoding a light chain derived polypeptide. The two vectors may contain identical selectable markers which enable equal expression of heavy and light chain polypeptides. Alternatively, a single vector may be used which encodes both heavy and light chain polypeptides. In such situations, the light chain should be placed before the heavy chain to avoid an excess of toxic free heavy

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

chain (Proudfoot, 1986, Nature 322:52; Kohler, 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197). The coding sequences for the heavy and light chains may comprise cDNA or genomic DNA.

Once the antibody molecule of the invention has been recombinantly expressed, it may be purified by any method known in the art for purification of an antibody molecule, for example, by chromatography (e.g., ion exchange chromatography, affinity chromatography such as with protein A or specific antigen, and sizing column chromatography), centrifugation, differential solubility, or by any other standard technique for the purification of proteins.

Alternatively, any fusion protein may be readily purified by utilizing an antibody specific for the fusion protein being expressed. For example, a system described by Janknecht et al. allows for the ready purification of non-denatured fusion proteins expressed in human cell lines (Janknecht et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:8972-897). In this system, the gene of interest is subcloned into a vaccinia recombination plasmid such that the open reading frame of the gene is translationally fused to an amino-terminal tag consisting of six histidine residues. The tag serves as a matrix binding domain for the fusion protein. Extracts from cells infected with recombinant vaccinia virus are loaded onto Ni²⁺ nitriloacetic acid-agarose columns and histidine-tagged proteins are selectively eluted with imidazole-containing buffers.

5.13 CONJUGATED ANTIBODIES

In a preferred embodiment, anti-MSPI antibodies or fragments thereof are conjugated to a diagnostic or therapeutic moiety. The antibodies can be used for diagnosis or to determine the efficacy of a given treatment regimen. Detection can be facilitated by coupling the antibody to a detectable substance. Examples of detectable substances include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials, bioluminescent materials, radioactive nuclides, positron emitting metals (for use in positron emission tomography), and nonradioactive paramagnetic metal ions. See generally U.S. Patent No. 4,741,900 for metal ions which can be conjugated to antibodies for use as diagnostics according to the present invention. Suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, beta-galactosidase, or acetylcholinesterase; suitable prosthetic groups include streptavidin, avidin and biotin; suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride and phycoerythrin; suitable luminescent materials include luminol; suitable bioluminescent materials include luciferase, luciferin, and aequorin; and suitable radioactive nuclides include ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹¹¹In and ⁹⁹Tc.

An anti-MSPI antibodies or fragments thereof can be conjugated to a therapeutic agent or drug moiety to modify a given biological response. The therapeutic agent or drug moiety is not to be construed as limited to classical chemical therapeutic agents, e.g., small molecules. For example, the drug moiety may be a protein or polypeptide possessing a desired biological activity. Such proteins may include, for example, a toxin such as abrin, ricin A, pseudomonas exotoxin, or diphtheria toxin; a protein such as tumor necrosis factor, alpha-interferon, beta-interferon, nerve growth factor, platelet derived growth factor, tissue plasminogen activator, a thrombotic agent or an anti-angiogenic agent, e.g., angiostatin or endostatin; or, a biological response modifier such as a lymphokine, interleukin-1 (IL-1), interleukin-2 (IL-2), interleukin-6 (IL-6), granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF), granulocyte colony stimulating factor (G-CSF), nerve growth factor (NGF) or other growth

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

factor.

Techniques for conjugating such therapeutic moiety to antibodies are well known, see, e.g., Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

Alternatively, an antibody can be conjugated to a second antibody to form an antibody heteroconjugate as described in U.S. 4,676,980.

An antibody with or without a therapeutic moiety conjugated to it can be used as a therapeutic that is administered alone or in combination with cytokine(s).

5.14 DIAGNOSIS OF MS

In accordance with the present invention, a first sample of CSF, serum, plasma or urine obtained from a subject suspected of having or known to have MS can be used for diagnosis or monitoring. In one embodiment, a decreased abundance of one or more MSFs or MSPIs (or any combination of them) in a first sample or sample set relative to a second sample or sample set (from a subject or subjects free from MS) or a previously determined reference range indicates the presence of MS; MSFs and MSPIs suitable for this purpose are identified in Tables I and IV, respectively, as described in detail above. In another embodiment of the invention, an increased abundance of one or more MSFs or MSPIs (or any combination of them) in a first sample or sample set compared to a second sample or sample set or a previously determined reference range indicates the presence of MS; MSFs and MSPIs suitable for this purpose are identified in Tables II and V, respectively, as described in detail above. In another embodiment, the relative abundance of one or more MSFs or MSPIs (or any combination of them) in a first sample or sample set compared to a second sample or sample set or a previously determined reference range indicates a subtype of MS (e.g., benign or progressive MS). In yet another embodiment, the relative abundance of one or more MSFs or MSPIs (or any combination of them) in a first sample or sample set relative to a second sample or sample set or a previously determined reference range indicates the degree or severity of MS. In any of the aforesaid methods, detection of one or more MSPIs described herein may optionally be combined with detection of one or more additional biomarkers for MS including, but not limited to, oligoclonal immunoglobulin bands in CSF revealed by isoelectric focusing (Reiber H et al. (1998) *Mult Scler* 3: 111-7). Any suitable method in the art can be employed to measure the level of MSFs and MSPIs, including but not limited to the Preferred Technology described herein, kinase assays, immunoassays to detect and/or visualize the MSPIs (e.g., Western blot, immunoprecipitation followed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, immunocytochemistry, etc.). In cases where an MSPI has

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

a known function, an assay for that function may be used to measure MSPI expression. In a further embodiment, a decreased abundance of mRNA including one or more MSPIs identified in Table IV (or any combination of them) in a first sample or sample set relative to a second sample or sample set or a previously determined reference range indicates the presence of MS.

5 In yet a further embodiment, an increased abundance of mRNA encoding one or more MSPIs identified in Table V (or any combination of them) in a first sample or sample set relative to a second sample or sample set or previously determined reference range indicates the presence of MS. Any suitable hybridization assay can be used to detect MSPI expression by detecting and/or visualizing mRNA encoding the MSPI (e.g., Northern assays, dot blots, *in situ*

10 hybridization, etc.).

In another embodiment of the invention, labeled antibodies, derivatives and analogs thereof, which specifically bind to an MSPI can be used for diagnostic purposes to detect, diagnose, or monitor MS. Preferably, MS is detected in an animal, more preferably in a mammal and most preferably in a human.

15

5.15 SCREENING ASSAYS

The invention provides methods for identifying agents (e.g., candidate agents) that bind to an MSPI or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of an MSPI. The invention also provides methods of identifying agents or candidate agents that bind

20 to an MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or the MSPI-fusion protein or have a stimulatory or inhibitory effect on the expression or activity of an MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or an MSPI fusion protein. Examples of agents or candidate agents include, but are not limited to, nucleic acids (e.g., DNA and RNA), carbohydrates, lipids, proteins, peptides, peptidomimetics, small molecules and other drugs. Agents can be obtained using any of the numerous approaches in combinatorial library methods known in the art, including: biological libraries; spatially addressable parallel solid phase or solution phase

25 libraries; synthetic library methods requiring deconvolution; the "one-bead one-compound" library method; and synthetic library methods using affinity chromatography selection. The biological library approach is limited to peptide libraries, while the other four approaches are applicable to peptide, non-peptide oligomer or small molecule libraries of compounds (Lam,

30 1997, *Anticancer Drug Des.* 12: 145; U.S. 5,738,996; and U.S. 5,807,683).

Examples of methods for the synthesis of molecular libraries can be found in the art, for example in: DeWitt et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909; Erb et al., 1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Zuckermann et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:2678; Cho

35 et al., 1993, *Science* 261:1303; Carrell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al., 1994, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061; and Gallop et al., 1994, *J. Med. Chem.* 37:1233.

Libraries of compounds may be presented, e.g., presented in solution (e.g., Houghten, 1992, *Bio/Techniques* 13:412-421), or on beads (Lam, 1991, *Nature* 354:82-84), chips (Fodor, 1993, *Nature* 364:555-556), bacteria (U.S. Patent No. 5,223,409), spores (US Patent Nos. 5,571,698; 5,403,484; and 5,223,409), plasmids (Cull et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869) or phage (Scott and Smith, 1990, *Science* 249:386-390; Devlin, 1990, *Science* 249:404-406; Cwirla et al., 1990, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382; and Felici, 1991, *J. Mol. Biol.* 222:301-310), each of which is incorporated herein in its entirety by reference.

40

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

In one embodiment, agents that interact with (i.e., bind to) an MSPI, an MSPI fragment (e.g., a functionally active fragment), an MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein are identified in a cell-based assay system. In accordance with this embodiment, cells expressing an MSPI, a fragment of an MSPI, an MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein are contacted with a candidate agent or a control agent and the ability of the candidate agent to interact with the MSPI is determined. If desired, this assay may be used to screen a plurality (e.g., a library) of candidate agents. The cell, for example, can be of prokaryotic origin (e.g., *E. coli*) or eukaryotic origin (e.g., yeast or mammalian). Further, the cells can express the MSPI, fragment of the MSPI, MSPI-related polypeptide, a fragment of the MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein endogenously or be genetically engineered to express the MSPI, fragment of the MSPI, MSPI-related polypeptide, a fragment of the MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein. In certain instances, the MSPI, fragment of the MSPI, MSPI-related polypeptide, a fragment of the MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein or the candidate agent is labeled, for example with a radioactive label (such as ³²P, ³⁵S or ¹²⁵I) or a fluorescent label (such as fluorescein isothiocyanate, rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde or fluorescamine) to enable detection of an interaction between an MSPI and a candidate agent. The ability of the candidate agent to interact directly or indirectly with an MSPI, a fragment of an MSPI, an MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art. For example, the interaction between a candidate agent and an MSPI, a fragment of an MSPI, an MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein can be determined by flow cytometry, a scintillation assay, immunoprecipitation or western blot analysis.

In another embodiment, agents that interact with (i.e., bind to) an MSPI, an MSPI fragment (e.g., a functionally active fragment) an MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein are identified in a cell-free assay system. In accordance with this embodiment, a native or recombinant MSPI or fragment thereof, or a native or recombinant MSPI-related polypeptide or fragment thereof, or an MSPI-fusion protein or fragment thereof, is contacted with a candidate agent or a control agent and the ability of the candidate agent to interact with the MSPI or MSPI-related polypeptide, or MSPI fusion protein is determined. If desired, this assay may be used to screen a plurality (e.g., a library) of candidate agents. Preferably, the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI-fusion protein is first immobilized, by, for example, contacting the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein with an immobilized antibody which specifically recognizes and binds it, or by contacting a purified preparation of the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein with a surface designed to bind proteins. The MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein may be partially or completely purified (e.g., partially or completely free of other polypeptides) or part of a cell lysate. Further, the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide may be a fusion protein comprising the MSPI or a

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

biologically active portion thereof, or MSPI-related polypeptide and a domain such as glutathione-S-transferase. Alternatively, the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, fragment of an MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein can be biotinylated using techniques well known to those of skill in the art (e.g., biotinylation kit, Pierce Chemicals; Rockford, IL). The ability of the candidate agent to interact with an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art.

In another embodiment, a cell-based assay system is used to identify agents that bind to or modulate the activity of a protein, such as an enzyme, or a biologically active portion thereof, which is responsible for the production or degradation of an MSPI or is responsible for the post-translational modification of an MSPI. In a primary screen, a plurality (e.g., a library) of candidate agents are contacted with cells that naturally or recombinantly express: (i) an MSPI, an MSPI homolog, an MSPI-related polypeptide, an MSPI fusion protein, or a biologically active fragment of any of the foregoing; and (ii) a protein that is responsible for processing of the MSPI, MSPI homolog, MSPI-related polypeptide, MSPI fusion protein, or fragment in order to identify agents that modulate the production, degradation, or post-translational modification of the MSPI, MSPI homolog, MSPI-related polypeptide, MSPI fusion protein or fragment. If desired, candidate agents identified in the primary screen can then be assayed in a secondary screen against cells naturally or recombinantly expressing the specific MSPIs of interest. The ability of the candidate agent to modulate the production, degradation or post-translational modification of an MSPI, homolog, MSPI-related polypeptide, or MSPI fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art, including without limitation, flow cytometry, a scintillation assay, immunoprecipitation and western blot analysis.

In another embodiment, agents that competitively interact with (i.e., bind to) an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein are identified in a competitive binding assay. In accordance with this embodiment, cells expressing an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein are contacted with a candidate agent and a agent known to interact with the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide or an MSPI fusion protein; the ability of the candidate agent to competitively interact with the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein is then determined. Alternatively, agents that competitively interact with (i.e., bind to) an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or fragment of an MSPI-related polypeptide are identified in a cell-free assay system by contacting an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein with a candidate agent and a agent known to interact with the MSPI, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein. As stated above, the ability of the candidate agent to interact with an MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, a fragment of an MSPI-related polypeptide, or an MSPI fusion protein can be determined by methods known to those of skill in the art. These assays, whether cell-based or cell-free, can be used to screen a plurality (e.g., a library) of candidate agents.

In another embodiment, agents that modulate (i.e., upregulate or downregulate) the

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- expression of an MSPI, or an MSPI-related polypeptide are identified by contacting cells (e.g., cells of prokaryotic origin or eukaryotic origin) expressing the MSPI, or MSPI-related polypeptide with a candidate agent or a control agent (e.g., phosphate buffered saline (PBS)) and determining the expression of the MSPI, MSPI-related polypeptide, or MSPI fusion protein, mRNA encoding the MSPI, or mRNA encoding the MSPI-related polypeptide. The level of expression of a selected MSPI, MSPI-related polypeptide, mRNA encoding the MSPI, or mRNA encoding the MSPI-related polypeptide in the presence of the candidate agent is compared to the level of expression of the MSPI, MSPI-related polypeptide, mRNA encoding the MSPI, or mRNA encoding the MSPI-related polypeptide in the absence of the candidate agent (e.g., in the presence of a control agent). The candidate agent can then be identified as a modulator of the expression of the MSPI, or an MSPI-related polypeptide based on this comparison. For example, when expression of the MSPI or mRNA is significantly greater in the presence of the candidate agent than in its absence, the candidate agent is identified as a stimulator of expression of the MSPI or mRNA. Alternatively, when expression of the MSPI or mRNA is significantly less in the presence of the candidate agent than in its absence, the candidate agent is identified as an inhibitor of the expression of the MSPI or mRNA. The level of expression of an MSPI or the mRNA that encodes it can be determined by methods known to those of skill in the art. For example, mRNA expression can be assessed by Northern blot analysis or RT-PCR, and protein levels can be assessed by western blot analysis.
- The candidate agent may be an agonist or an antagonist of the MSPI, MSPI-related polypeptide, or MSPI fusion protein, or of an upstream effector of the MSPI, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein.
- In another embodiment, agents that modulate the activity of an MSPI, or an MSPI-related polypeptide are identified by contacting a preparation containing the MSPI or MSPI-related polypeptide, or cells (e.g., prokaryotic or eukaryotic cells) expressing the MSPI or MSPI-related polypeptide with a candidate agent or a control agent and determining the ability of candidate agent to modulate (e.g., stimulate or inhibit) the activity of the MSPI or MSPI-related polypeptide. The activity of an MSPI or an MSPI-related polypeptide can be assessed by detecting changes in a downstream effector such as, without limitation, induction of a cellular signal transduction pathway of the MSPI or MSPI-related polypeptide (e.g., intracellular Ca^{2+} , diacylglycerol, IP3, etc.), detecting catalytic or enzymatic activity of the target on a suitable substrate, detecting the induction of a reporter gene (e.g., a regulatory element that is responsive to an MSPI or an MSPI-related polypeptide and is operably linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, e.g., luciferase), or detecting a cellular response, for example, cellular differentiation, or cell proliferation. Based on the present description, techniques known to those of skill in the art can be used for measuring these activities (see, e.g., U.S. Patent No. 5,401,639, which is incorporated herein by reference). The candidate agent can then be identified as a modulator of the activity of an MSPI or MSPI-related polypeptide by comparing the effects of the candidate agent to the control agent. Suitable control agents include phosphate buffered saline (PBS) and normal saline (NS).
- In another embodiment, agents that modulate (i.e., upregulate or downregulate) the expression, activity or both the expression and activity of an MSPI or MSPI-related polypeptide are identified in an animal model. Examples of suitable animals include, but are not limited to, mice, rats, rabbits, monkeys, guinea pigs, dogs and cats. Preferably, the animal

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

used represent a model of MS (e.g., experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Steinman (1999) *Neuron*, 24:511-514)). In accordance with this embodiment, the candidate agent or a control agent is administered (e.g., orally, rectally or parenterally such as intraperitoneally or intravenously) to a suitable animal and the effect on the expression, activity or both expression and activity of the MSPI or MSPI-related polypeptide is determined. Changes in the expression of an MSPI or MSPI-related polypeptide can be assessed by the methods outlined above.

In yet another embodiment, an MSPI or MSPI-related polypeptide is used as a "bait protein" in a two-hybrid assay or three hybrid assay to identify other proteins that bind to or interact with an MSPI or MSPI-related polypeptide (see, e.g., U.S. Patent No. 5,283,317; Zervos et al. (1993) *Cell* 72:223-232; Madura et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268:12046-12054; Bartel et al. (1993) *Bio/Techniques* 14:920-924; Iwabuchi et al. (1993) *Oncogene* 8:1693-1696; and WO 94/10300). As those skilled in the art will appreciate, such binding proteins may be involved in the propagation of signals by the MSPIs of the invention as, for example, upstream or downstream elements of a signaling pathway involving the MSPIs of the invention.

Table IX enumerates scientific publications describing suitable assays for detecting or quantifying enzymatic or binding activity of an MSPI, an MSPI analog, an MSPI-related polypeptide, or a fragment of any of the foregoing. Each such reference is hereby incorporated in its entirety. In a preferred embodiment, as assay referenced in Table IX is used in the screens and assays described herein, for example to screen for or identify candidate agent that modulates the activity and or expression of an MSPI, MSPI analog, or MSPI-related polypeptide, a fragment of any of the foregoing.

Table IX.

MSPI	References
MSPI-81	<i>Nature Structural Biology</i> 7, 312-321, 2000
MSPI-133	<i>J. Am. Chem. Soc.</i> 122, 2178-2192, 2000
MSPI-187.2	
MSPI-201	
MSPI-205	
MSPI-243	
MSPI-246.1	
MSPI-257.3	
MSPI-270	
MSPI-292	
MSPI-301	
MSPI-318	
MSPI-323.2	

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSPI	References
MSPI-8.2	Clin Chem 1993 Feb 39:2 309-12
MSPI-52.1	J Immunol Methods 1987 Aug 24 102:1 7-14
MSPI-52.2	
MSPI-76	
MSPI-93.1	
MSPI-102.1	
MSPI-128	
MSPI-171	
MSPI-233.2	
MSPI-251	
MSPI-266	
MSPI-273	
MSPI-283.2	
MSPI-323.3	
MSPI-14	J Clin Lab Immunol 1986 Dec 21:4 201-7
MSPI-30	
MSPI-84.1	
MSPI-216	
MSPI-244	
MSPI-307	
MSPI-325.1	
MSPI-7	Neuroendocrinology 1992 Mar 55:3 308-16
MSPI-127.1	
MSPI-137	
MSPI-142	
MSPI-161	
MSPI-182	
MSPI-196	
MSPI-289	
MSPI-311.3	
MSPI-91.2	J Chromatogr 1991 Jul 5 567:2 369-80; Clin Chem 1989 Apr 35:4 582-6
MSPI-300	Eur J Biochem 2000 267:2965-2972 Eur J Biochem 2000 267:5085-5092 Eur J Biochem 2000 267:6311-6318

This invention further provides novel agents identified by the above-described screening assays and uses thereof for treatments as described herein.

5 5.16 THERAPEUTIC USES OF MSPIs

The invention provides for treatment or prevention of various diseases and disorders by administration of a therapeutic agent. Such agents include but are not limited to: MSPIs, MSPI analogs, MSPI-related polypeptides and derivatives (including fragments) thereof;

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

antibodies to the foregoing; nucleic acids encoding MSPIs, MSPI analogs, MSPI-related polypeptides and fragments thereof; antisense nucleic acids to a gene encoding an MSPI or MSPI-related polypeptide; and modulator (e.g., agonists and antagonists) of a gene encoding an MSPI or MSPI-related polypeptide. An important feature of the present invention is the identification of genes encoding MSPIs involved in MS. MS can be treated (e.g. to ameliorate symptoms or to retard onset or progression) or prevented by administration of a therapeutic agent that promotes function or expression of one or more MSPIs that are decreased in the CSF of MS subjects having MS, or by administration of a therapeutic agent that reduces function or expression of one or more MSPIs that are increased in the CSF of subjects having MS.

In one embodiment, one or more antibodies each specifically binding to an MSPI are administered alone or in combination with one or more additional therapeutic agents or treatments. Examples of such therapeutic agents or treatments include, but are not limited to, Interferon β -1b (BetaseronTM, BetaferonTM), Interferon β -1a (AvonexTM, RebifTM), Glatiramer acetate (CopaxoneTM), intravenous immunoglobulin and, for incidences of acute relapse, therapies with corticosteroids (Noseworthy (1999) Nature 399:suppl. A40-A47).

Preferably, a biological product such as an antibody is allogeneic to the subject to which it is administered. In a preferred embodiment, a human MSPI or a human MSPI-related polypeptide, a nucleotide sequence encoding a human MSPI or a human MSPI-related polypeptide, or an antibody to a human MSPI or a human MSPI-related polypeptide, is administered to a human subject for therapy (e.g. to ameliorate symptoms or to retard onset or progression) or prophylaxis.

5.16.1 Treatment And Prevention of MS

MS is treated or prevented by administration to a subject suspected of having or known to have MS or to be at risk of developing MS of a agent that modulates (i.e., increases or decreases) the level or activity (i.e., function) of one or more MSPIs - or the level of one or more MSFs - that are differentially present in the CSF of subjects having MS compared with CSF of subjects free from MS. In one embodiment, MS is treated or prevented by administering to a subject suspected of having or known to have MS or to be at risk of developing MS a agent that upregulates (i.e., increases) the level or activity (i.e., function) of one or more MSPIs - or the level of one or more MSFs - that are decreased in the CSF of subjects having MS. In another embodiment, a agent is administered that upregulates the level or activity (i.e., function) of one or more MSPIs - or the level of one or more MSFs - that are increased in the CSF of subjects having MS. Examples of such a agent include but are not limited to: MSPIs, MSPI fragments and MSPI-related polypeptides; nucleic acids encoding an MSPI, an MSPI fragment and an MSPI-related polypeptide (e.g., for use in gene therapy); and, for those MSPIs or MSPI-related polypeptides with enzymatic activity, agents or molecules known to modulate that enzymatic activity. Other agents that can be used, e.g., MSPI agonists, can be identified using in vitro assays.

MS is also treated or prevented by administration to a subject suspected of having or known to have MS or to be at risk of developing MS of a agent that downregulates the level or activity of one or more MSPIs - or the level of one or more MSFs - that are increased in the CSF of subjects having MS. In another embodiment, a agent is administered that downregulates the level or activity of one or more MSPIs - or the level of one or more MSFs -

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- that are decreased in the CSF of subjects having MS. Examples of such an agent include, but are not limited to, MSPI antisense oligonucleotides, ribozymes, antibodies directed against MSPIs, and agents that inhibit the enzymatic activity of an MSPI. Other useful agents e.g., MSPI antagonists and small molecule MSPI antagonists, can be identified using in vitro assays.
- In a preferred embodiment, therapy or prophylaxis is tailored to the needs of an individual subject. Thus, in specific embodiments, agents that promote the level or function of one or more MSPIs, or the level of one or more MSFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have MS, in whom the levels or functions of said one or more MSPIs, or levels of said one or more MSFs, are absent or are decreased relative to a control or normal reference range. In further embodiments, agents that promote the level or function of one or more MSPIs, or the level of one or more MSFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have MS in whom the levels or functions of said one or more MSPIs, or levels of said one or more MSFs, are increased relative to a control or to a reference range. In further embodiments, agents that decrease the level or function of one or more MSPIs, or the level of one or more MSFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have MS in whom the levels or functions of said one or more MSPIs, or levels of said one or more MSFs, are increased relative to a control or to a reference range. In further embodiments, agents that decrease the level or function of one or more MSPIs, or the level of one or more MSFs, are therapeutically or prophylactically administered to a subject suspected of having or known to have MS in whom the levels or functions of said one or more MSPIs, or levels of said one or more MSFs, are decreased relative to a control or to a reference range. The change in MSPI function or level, or MSF level, due to the administration of such agents can be readily detected, e.g., by obtaining a sample (e.g., a sample of CSF, blood or urine or a tissue sample such as biopsy tissue) and assaying in vitro the levels of said MSFs or the levels or activities of said MSPIs, or the levels of mRNAs encoding said MSPIs, or any combination of the foregoing. Such assays can be performed before and after the administration of the agent as described herein.
- The agents of the invention include but are not limited to any agent, e.g., a small organic molecule, protein, peptide, antibody, nucleic acid, etc. that restores the MS MSPI or MSF profile towards normal with the proviso that such agents do not include Interferon β -1b (BetaseronTM, BetaferonTM), Interferon β -1a (AvonexTM, RebifTM), Glatiramer acetate (CopaxoneTM), intravenous immunoglobulin and, for incidences of acute relapse, therapies with corticosteroids (Noseworthy (1999) Nature 399:suppl. A40-A47).

5.16.2 Gene Therapy

- In a specific embodiment, nucleic acids comprising a sequence encoding an MSPI, an MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or fragment of an MSPI-related polypeptide, are administered to promote MSPI function by way of gene therapy. Gene therapy refers to administration to a subject of an expressed or expressible nucleic acid. In this embodiment, the nucleic acid produces its encoded polypeptide that mediates a therapeutic effect by promoting MSPI function.

Any of the methods for gene therapy available in the art can be used according to the

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

present invention. Exemplary methods are described below.

- For general reviews of the methods of gene therapy, see Goldspiel et al., 1993, *Clinical Pharmacy* 12:488-505; Wu and Wu, 1991, *Biotherapy* 3:87-95; Tolstoshev, 1993, *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32:573-596; Mulligan, 1993, *Science* 260:926-932; and Morgan and Anderson, 1993, *Ann. Rev. Biochem.* 62:191-217; May, 1993, *TIBTECH* 11(5):155-215). Methods commonly known in the art of recombinant DNA technology which can be used are described in Ausubel et al. (eds.), 1993, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY; and Kriegler, 1990, *Gene Transfer and Expression*, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY.
- In a preferred aspect, the agent comprises a nucleic acid encoding an MSPI or fragment or chimeric protein thereof, said nucleic acid being part of an expression vector that expresses an MSPI or fragment or chimeric protein thereof in a suitable host. In particular, such a nucleic acid has a promoter operably linked to the MSPI coding region, said promoter being inducible or constitutive (and, optionally, tissue-specific). In another particular embodiment, a nucleic acid molecule is used in which the MSPI coding sequences and any other desired sequences are flanked by regions that promote homologous recombination at a desired site in the genome, thus providing for intrachromosomal expression of the MSPI-nucleic acid (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435-438).
- Delivery of the nucleic acid into a subject may be direct, in which case the subject is directly exposed to the nucleic acid or nucleic acid-carrying vector; this approach is known as in vivo gene therapy. Alternatively, delivery of the nucleic acid into the subject may be indirect, in which case cells are first transformed with the nucleic acid in vitro and then transplanted into the subject; this approach is known as ex vivo gene therapy.
- In a specific embodiment, the nucleic acid is directly administered in vivo, where it is expressed to produce the encoded product. This can be accomplished by any of numerous methods known in the art, e.g., by constructing it as part of an appropriate nucleic acid expression vector and administering it so that it becomes intracellular, e.g., by infection using a defective or attenuated retroviral or other viral vector (see U.S. Patent No. 4,980,286); by direct injection of naked DNA; by use of microparticle bombardment (e.g., a gene gun; Biolistic™, Dupont); by coating with lipids, cell-surface receptors or transfecting agents; by encapsulation in liposomes, microparticles or microcapsules; by administering it in linkage to a peptide which is known to enter the nucleus; or by administering it in linkage to a ligand subject to receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, 1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432); which can be used to target cell types specifically expressing the receptors. In another embodiment, a nucleic acid-ligand complex can be formed in which the ligand comprises a fusogenic viral peptide to disrupt endosomes, allowing the nucleic acid to avoid lysosomal degradation. In yet another embodiment, the nucleic acid can be targeted in vivo for cell specific uptake and expression, by targeting a specific receptor (see, e.g., WO 92/06180, WO 92/22635, WO92/20316, WO93/14188, WO 93/20221). Alternatively, the nucleic acid can be introduced intracellularly and incorporated within host cell DNA for expression, by homologous recombination (Koller and Smithies, 1989, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:8932-8935; Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435-438).
- In a specific embodiment, a viral vector that contains a nucleic acid encoding an MSPI

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

is used. For example, a retroviral vector can be used (see Miller et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:581-599). These retroviral vectors have been modified to delete retroviral sequences that are not necessary for packaging of the viral genome and integration into host cell DNA. The nucleic acid encoding the MSPI to be used in gene therapy is cloned into the vector, which facilitates delivery of the gene into a subject. More detail about retroviral vectors can be found in Boesen et al., 1994, Biotherapy 6:291-302, which describes the use of a retroviral vector to deliver the *mdr1* gene to hematopoietic stem cells in order to make the stem cells more resistant to chemotherapy. Other references illustrating the use of retroviral vectors in gene therapy are: Clowes et al., 1994, J. Clin. Invest. 93:644-651; Kiem et al., 1994, Blood 83:1467-1473; Salmons and Gunzberg, 1993, Human Gene Therapy 4:129-141; and Grossman and Wilson, 1993, Curr. Opin. in Genetics and Devel. 3:110-114.

Adenoviruses are other viral vectors that can be used in gene therapy. Adenoviruses are especially attractive vehicles for delivering genes to respiratory epithelia. Adenoviruses naturally infect respiratory epithelia where they cause a mild disease. Other targets for adenovirus-based delivery systems are liver, the central nervous system, endothelial cells, and muscle. Adenoviruses have the advantage of being capable of infecting non-dividing cells. Kozarsky and Wilson, 1993, Current Opinion in Genetics and Development 3:499-503 present a review of adenovirus-based gene therapy. Bout et al., 1994, Human Gene Therapy 5:3-10 demonstrated the use of adenovirus vectors to transfer genes to the respiratory epithelia of rhesus monkeys. Other instances of the use of adenoviruses in gene therapy can be found in Rosenfeld et al., 1991, Science 252:431-434; Rosenfeld et al., 1992, Cell 68:143-155; Mastrangeli et al., 1993, J. Clin. Invest. 91:225-234; WO94/12649; and Wang, et al., 1995, Gene Therapy 2:775-783.

Adeno-associated virus (AAV) has also been proposed for use in gene therapy (Walsh et al., 1993, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 204:289-300; U.S. Patent No. 5,436,146).

Another approach to gene therapy involves transferring a gene to cells in tissue culture by such methods as electroporation, lipofection, calcium phosphate mediated transfection, or viral infection. Usually, the method of transfer includes the transfer of a selectable marker to the cells. The cells are then placed under selection to isolate those cells that have taken up and are expressing the transferred gene. Those cells are then delivered to a subject.

In this embodiment, the nucleic acid is introduced into a cell prior to administration in vivo of the resulting recombinant cell. Such introduction can be carried out by any method known in the art, including but not limited to transfection, electroporation, microinjection, infection with a viral or bacteriophage vector containing the nucleic acid sequences, cell fusion, chromosome-mediated gene transfer, microcell-mediated gene transfer, spheroplast fusion, etc. Numerous techniques are known in the art for the introduction of foreign genes into cells (see, e.g., Loeffler and Behr, 1993, Meth. Enzymol. 217:599-618; Cohen et al., 1993, Meth. Enzymol. 217:618-644; Cline, 1985, Pharmac. Ther. 29:69-92) and may be used in accordance with the present invention, provided that the necessary developmental and physiological functions of the recipient cells are not disrupted. The technique should provide for the stable transfer of the nucleic acid to the cell, so that the nucleic acid is expressible by the cell and preferably heritable and expressible by its cell progeny.

The resulting recombinant cells can be delivered to a subject by various methods known in the art. In a preferred embodiment, epithelial cells are injected, e.g., subcutaneously.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

In another embodiment, recombinant skin cells may be applied as a skin graft onto the subject. Recombinant blood cells (e.g., hematopoietic stem or progenitor cells) are preferably administered intravenously. The amount of cells envisioned for use depends on the desired effect, the condition of the subject, etc., and can be determined by one skilled in the art.

- 5 Cells into which a nucleic acid can be introduced for purposes of gene therapy encompass any desired, available cell type, and include but are not limited to neuronal cells, glial cells (e.g., oligodendrocytes or astrocytes), epithelial cells, endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, muscle cells, hepatocytes; blood cells such as T lymphocytes, B lymphocytes, monocytes, macrophages, neutrophils, eosinophils, megakaryocytes,
- 10 granulocytes; various stem or progenitor cells, in particular hematopoietic stem or progenitor cells, e.g., as obtained from bone marrow, umbilical cord blood, peripheral blood or fetal liver.

In a preferred embodiment, the cell used for gene therapy is autologous to the subject that is treated.

- In an embodiment in which recombinant cells are used in gene therapy, a nucleic acid encoding an MSPI is introduced into the cells such that it is expressible by the cells or their progeny, and the recombinant cells are then administered in vivo for therapeutic effect. In a specific embodiment, stem or progenitor cells are used. Any stem or progenitor cells which can be isolated and maintained in vitro can be used in accordance with this embodiment of the present invention (see e.g. WO 94/08598; Stemple and Anderson, 1992, Cell 71:973-985; Rheinwald, 1980, Meth. Cell Bio. 21A:229; and Pittelkow and Scott, 1986, Mayo Clinic Proc. 61:771).
- 15
- 20

- In a specific embodiment, the nucleic acid to be introduced for purposes of gene therapy comprises an inducible promoter operably linked to the coding region, such that expression of the nucleic acid is controllable by controlling the presence or absence of the appropriate inducer of transcription.
- 25

- Direct injection of a DNA coding for an MSPI may also be performed according to, for example, the techniques described in United States Patent No. 5,589,466. These techniques involve the injection of "naked DNA", i.e., isolated DNA molecules in the absence of liposomes, cells, or any other material besides a suitable carrier. The injection of DNA encoding a protein and operably linked to a suitable promoter results in the production of the protein in cells near the site of injection and the elicitation of an immune response in the subject to the protein encoded by the injected DNA. In a preferred embodiment, naked DNA comprising (a) DNA encoding an MSPI and (b) a promoter are injected into a subject to elicit an immune response to the MSPI.
- 30
- 35

5.16.3 Inhibition of MSPIs to Treat MS

- In one embodiment of the invention, MS is treated or prevented by administration of a agent that antagonizes (inhibits) the level(s) and/or function(s) of one or more MSPIs which are elevated in a body fluid sample of subjects having MS as compared with a body fluid sample of subjects free from MS. Agents useful for this purpose include but are not limited to anti-MSPI antibodies (and fragments and derivatives containing the binding region thereof), MSPI antisense or ribozyme nucleic acids, and nucleic acids encoding dysfunctional MSPIs that are used to "knockout" endogenous MSPI function by homologous recombination (see, e.g., Capecchi, 1989, Science 244:1288-1292). Other agents that inhibit MSPI function can be
- 40

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

identified by use of known in vitro assays, e.g., assays for the ability of a test agent to inhibit binding of an MSPI to another protein or a binding partner, or to inhibit a known MSPI function. Preferably such inhibition is assayed in vitro or in cell culture, but genetic assays may also be employed. The Preferred Technology can also be used to detect levels of the MSPIs before and after the administration of the agent. Preferably, suitable in vitro or in vivo assays are utilized to determine the effect of a specific agent and whether its administration is indicated for treatment of the affected tissue, as described in more detail below.

In a specific embodiment, a agent that inhibits an MSPI function is administered therapeutically or prophylactically to a subject in whom an increased CSF level or functional activity of the MSPI (e.g., greater than the normal level or desired level) is detected as compared with CSF of subjects free from MS or a predetermined reference range. Methods standard in the art can be employed to measure the increase in an MSPI level or function, as outlined above. Preferred MSPI inhibitor compositions include small molecules, i.e., molecules of 1000 daltons or less. Such small molecules can be identified by the screening methods described herein.

In a further embodiment, an MSPI may be seen to be decreased in the CSF where this decrease represents an increase in the MSPI level in another compartment, for example but without limitation sequestering of the MSPI in a cell, subcellular compartment, body fluid or tissue rather than secretion into CSF. Under these conditions, a agent that inhibits an MSPI function is administered therapeutically or prophylactically to a subject in whom a decreased CSF level or functional activity of the MSPI (e.g., greater than the normal level or desired level) is detected as compared with CSF of subjects free from MS or a predetermined reference range.

5.16.4 Antisense Regulation of MSPIs

In a specific embodiment, MSPI expression is inhibited by use of MSPI antisense nucleic acids. The present invention provides the therapeutic or prophylactic use of nucleic acids comprising at least six nucleotides that are antisense to a gene or cDNA encoding an MSPI or a portion thereof. As used herein, an MSPI "antisense" nucleic acid refers to a nucleic acid capable of hybridizing by virtue of some sequence complementarity to a portion of an RNA (preferably mRNA) encoding an MSPI. The antisense nucleic acid may be complementary to a coding and/or noncoding region of an mRNA encoding an MSPI. Such antisense nucleic acids have utility as agents that inhibit MSPI expression, and can be used in the treatment or prevention of MS.

The antisense nucleic acids of the invention are double-stranded or single-stranded oligonucleotides, RNA or DNA or a modification or derivative thereof, and can be directly administered to a cell or produced intracellularly by transcription of exogenous, introduced sequences.

The invention further provides pharmaceutical compositions comprising an effective amount of the MSPI antisense nucleic acids of the invention in a pharmaceutically acceptable carrier, as described infra.

In another embodiment, the invention provides methods for inhibiting the expression of an MSPI nucleic acid sequence in a prokaryotic or eukaryotic cell comprising providing the cell with an effective amount of a composition comprising an MSPI antisense nucleic acid of

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

the invention.

MSPI antisense nucleic acids and their uses are described in detail below.

5.16.5 MSPI Antisense Nucleic Acids

- 5 The MSPI antisense nucleic acids are of at least six nucleotides and are preferably oligonucleotides ranging from 6 to about 50 oligonucleotides. In specific aspects, the oligonucleotide is at least 10 nucleotides, at least 15 nucleotides, at least 100 nucleotides, or at least 200 nucleotides. The oligonucleotides can be DNA or RNA or chimeric mixtures or derivatives or modified versions thereof and can be single-stranded or double-stranded. The
- 10 oligonucleotide can be modified at the base moiety, sugar moiety, or phosphate backbone. The oligonucleotide may include other appended groups such as peptides; agents that facilitate transport across the cell membrane (see, e.g., Letsinger et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6553-6556; Lemaitre et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. 84:648-652; WO 88/09810,) or blood-brain barrier (see, e.g., WO 89/10134.); hybridization-triggered cleavage agents (see, e.g., Krol et al., 1988, BioTechniques 6:958-976) or intercalating agents (see, e.g., Zon, 1988, Pharm. Res. 5:539-549).

In a preferred aspect of the invention, an MSPI antisense oligonucleotide is provided, preferably of single-stranded DNA. The oligonucleotide may be modified at any position on its structure with substituents generally known in the art.

- 20 The MSPI antisense oligonucleotide may comprise at least one of the following modified base moieties: 5-fluorouracil, 5-bromouracil, 5-chlorouracil, 5-iodouracil, hypoxanthine, xanthine, 4-acetylcytosine, 5-(carboxyhydroxymethyl) uracil, 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine, 5-carboxymethylaminomethyluracil, dihydrouracil, beta-D-galactosylqueosine, inosine, N6-isopentenyladenine, 1-methylguanine,
- 25 1-methylinosine, 2,2-dimethylguanines, 2-methyladenine, 2-methylguanine, 3-methylcytosine, 5-methylcytosine, N6-adenine, 7-methylguanine, 5-methylaminomethyluracil, 5-methoxyaminomethyl-2-thiouracil, beta-D-mannosylqueosine, 5-methoxycarboxymethyluracil, 5-methoxyuracil, 2-methylthio-N6-isopentenyladenine, uracil-5-oxyacetic acid (v), pseudouracil, queosine, 2-thiocytosine, 5-methyl-2-thiouracil, 2-thiouracil, 4-thiouracil, 5-methyluracil, uracil-5-oxyacetic acid methylester,
- 30 3-(3-amino-3-N-2-carboxypropyl) uracil, (acp3)w, 2,6-diaminopurine, and other base analogs.

In another embodiment, the oligonucleotide comprises at least one modified sugar moiety, e.g., one of the following sugar moieties: arabinose, 2-fluoroarabinose, xylulose, and hexose.

- 35 In yet another embodiment, the oligonucleotide comprises at least one of the following modified phosphate backbones: a phosphorothioate, a phosphorodithioate, a phosphoramidothioate, a phosphoramidate, a phosphordiamidate, a methylphosphonate, an alkyl phosphotriester, a formacetal, or an analog of formacetal.

In yet another embodiment, the oligonucleotide is an alpha-anomeric oligonucleotide.

- 40 An alpha-anomeric oligonucleotide forms specific double-stranded hybrids with complementary RNA in which, contrary to the usual alpha -units, the strands run parallel to each other (Gautier et al., 1987, Nucl. Acids Res. 15:6625-6641).

The oligonucleotide may be conjugated to another molecule, e.g., a peptide, hybridization triggered cross-linking agent, transport agent, or hybridization-triggered cleavage

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

agent.

Oligonucleotides of the invention may be synthesized by standard methods known in the art, e.g., by use of an automated DNA synthesizer (such as are commercially available from Biosearch, Applied Biosystems, etc.). As examples, phosphorothioate oligonucleotides may be synthesized by the method of Stein et al. (1988, Nucl. Acids Res. 16:3209), and methylphosphonate oligonucleotides can be prepared by use of controlled pore glass polymer supports (Sarin et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7448-7451).

In a specific embodiment, the MSPI antisense nucleic acid of the invention is produced intracellularly by transcription from an exogenous sequence. For example, a vector can be introduced *in vivo* such that it is taken up by a cell, within which cell the vector or a portion thereof is transcribed, producing an antisense nucleic acid (RNA) of the invention. Such a vector would contain a sequence encoding the MSPI antisense nucleic acid. Such a vector can remain episomal or become chromosomally integrated, as long as it can be transcribed to produce the desired antisense RNA. Such vectors can be constructed by recombinant DNA technology standard in the art. Vectors can be plasmid, viral, or others known in the art, used for replication and expression in mammalian cells. Expression of the sequence encoding the MSPI antisense RNA can be by any promoter known in the art to act in mammalian, preferably human, cells. Such promoters can be inducible or constitutive. Examples of such promoters are outlined above.

The antisense nucleic acids of the invention comprise a sequence complementary to at least a portion of an RNA transcript of a gene encoding an MSPI, preferably a human gene encoding an MSPI. However, absolute complementarity, although preferred, is not required. A sequence "complementary to at least a portion of an RNA," as referred to herein, means a sequence having sufficient complementarity to be able to hybridize under stringent conditions (e.g., highly stringent conditions or moderately stringent conditions as defined *supra*) with the RNA, forming a stable duplex; in the case of double-stranded MSPI antisense nucleic acids, a single strand of the duplex DNA may thus be tested, or triplex formation may be assayed. The ability to hybridize will depend on both the degree of complementarity and the length of the antisense nucleic acid. Generally, the longer the hybridizing nucleic acid, the more base mismatches with an RNA encoding an MSPI it may contain and still form a stable duplex (or triplex, as the case may be). One skilled in the art can ascertain a tolerable degree of mismatch by use of standard procedures to determine the melting point of the hybridized complex.

5.16.6 Therapeutic Use of MSPI Antisense Nucleic Acids

The MSPI antisense nucleic acids can be used to treat or prevent MS when the target MSPI is overexpressed in the CSF of subjects suspected of having or suffering from MS. In a preferred embodiment, a single-stranded DNA antisense MSPI oligonucleotide is used.

Cell types which express or overexpress RNA encoding an MSPI can be identified by various methods known in the art. Such cell types include but are not limited to leukocytes (e.g., neutrophils, macrophages, monocytes) and resident cells (e.g., astrocytes, glial cells, neuronal cells, and ependymal cells). Such methods include, but are not limited to; hybridization with an MSPI-specific nucleic acid (e.g., by Northern hybridization, dot blot hybridization, *in situ* hybridization), observing the ability of RNA from the cell type to be translated *in vitro* into an MSPI, immunoassay, etc. In a preferred aspect, primary tissue from

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

a subject can be assayed for MSPI expression prior to treatment, e.g., by immunocytochemistry or in situ hybridization.

Pharmaceutical compositions of the invention, comprising an effective amount of an MSPI antisense nucleic acid in a pharmaceutically acceptable carrier, can be administered to a subject having MS.

The amount of MSPI antisense nucleic acid which will be effective in the treatment of MS can be determined by standard clinical techniques.

In a specific embodiment, pharmaceutical compositions comprising one or more MSPI antisense nucleic acids are administered via liposomes, microparticles, or microcapsules. In various embodiments of the invention, such compositions may be used to achieve sustained release of the MSPI antisense nucleic acids.

5.16.7 Inhibitory Ribozyme and Triple Helix Approaches

In another embodiment, symptoms of MS may be ameliorated by decreasing the level of an MSPI or MSPI activity by using gene sequences encoding the MSPI in conjunction with well-known gene "knock-out," ribozyme or triple helix methods to decrease gene expression of an MSPI. In this approach ribozyme or triple helix molecules are used to modulate the activity, expression or synthesis of the gene encoding the MSPI, and thus to ameliorate the symptoms of MS. Such molecules may be designed to reduce or inhibit expression of a mutant or non-mutant target gene. Techniques for the production and use of such molecules are well known to those of skill in the art.

Ribozyme molecules designed to catalytically cleave gene mRNA transcripts encoding an MSPI can be used to prevent translation of target gene mRNA and, therefore, expression of the gene product. (See, e.g., WO90/11364; Sarver et al., 1990, Science 247:1222-1225).

Ribozymes are enzymatic RNA molecules capable of catalyzing the specific cleavage of RNA. (For a review, see Rossi, 1994, Current Biology 4, 469-471). The mechanism of ribozyme action involves sequence specific hybridization of the ribozyme molecule to complementary target RNA, followed by an endonucleolytic cleavage event. The composition of ribozyme molecules must include one or more sequences complementary to the target gene mRNA, and must include the well known catalytic sequence responsible for mRNA cleavage. For this sequence, see, e.g., U.S. Patent No. 5,093,246, which is incorporated herein by reference in its entirety.

While ribozymes that cleave mRNA at site specific recognition sequences can be used to destroy mRNAs encoding an MSPI, the use of hammerhead ribozymes is preferred.

Hammerhead ribozymes cleave mRNAs at locations dictated by flanking regions that form complementary base pairs with the target mRNA. The sole requirement is that the target mRNA have the following sequence of two bases: 5'-UG-3'. The construction and production of hammerhead ribozymes is well known in the art and is described more fully in Myers, 1995, Molecular Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference, VCH Publishers, New York, (see especially Figure 4, page 833) and in Haseloff and Gerlach, 1988, Nature, 334, 585-591, each of which is incorporated herein by reference in its entirety.

Preferably the ribozyme is engineered so that the cleavage recognition site is located near the 5' end of the mRNA encoding the MSPI, i.e., to increase efficiency and minimize the intracellular accumulation of non-functional mRNA transcripts.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

The ribozymes of the present invention also include RNA endoribonucleases (hereinafter "Cech-type ribozymes") such as the one that occurs naturally in *Tetrahymena thermophila* (known as the IVS, or L-19 IVS RNA) and that has been extensively described by Thomas Cech and collaborators (Zaug, et al., 1984, *Science*, 224, 574-578; Zaug and Cech, 1986, *Science*, 231, 470-475; Zaug, et al., 1986, *Nature*, 324, 429-433; published International patent application No. WO 88/04300 by University Patents Inc.; Been and Cech, 1986, *Cell*, 47, 207-216). The Cech-type ribozymes have an eight base pair active site which hybridizes to a target RNA sequence whereafter cleavage of the target RNA takes place. The invention encompasses those Cech-type ribozymes which target eight base-pair active site sequences that are present in the gene encoding the MSPI.

As in the antisense approach, the ribozymes can be composed of modified oligonucleotides (e.g., for improved stability, targeting, etc.) and should be delivered to cells that express the MSPI in vivo. A preferred method of delivery involves using a DNA construct "encoding" the ribozyme under the control of a strong constitutive pol III or pol II promoter, so that transfected cells will produce sufficient quantities of the ribozyme to destroy endogenous mRNA encoding the MSPI and inhibit translation. Because ribozymes, unlike antisense molecules, are catalytic, a lower intracellular concentration is required for efficacy.

Endogenous MSPI expression can also be reduced by inactivating or "knocking out" the gene encoding the MSPI, or the promoter of such a gene, using targeted homologous recombination (e.g., see Smithies, et al., 1985, *Nature* 317:230-234; Thomas and Capecchi, 1987, *Cell* 51:503-512; Thompson et al., 1989, *Cell* 5:313-321; and Zijlstra et al., 1989, *Nature* 342:435-438, each of which is incorporated by reference herein in its entirety). For example, a mutant gene encoding a non-functional MSPI (or a completely unrelated DNA sequence) flanked by DNA homologous to the endogenous gene (either the coding regions or regulatory regions of the gene encoding the MSPI) can be used, with or without a selectable marker and/or a negative selectable marker, to transfect cells that express the target gene in vivo. Insertion of the DNA construct, via targeted homologous recombination, results in inactivation of the target gene. Such approaches are particularly suited in the agricultural field where modifications to ES (embryonic stem) cells can be used to generate animal offspring with an inactive target gene (e.g., see Thomas and Capecchi, 1987 and Thompson, 1989, *supra*). However this approach can be adapted for use in humans provided the recombinant DNA constructs are directly administered or targeted to the required site in vivo using appropriate viral vectors.

Alternatively, the endogenous expression of a gene encoding an MSPI can be reduced by targeting deoxyribonucleotide sequences complementary to the regulatory region of the gene (i.e., the gene promoter and/or enhancers) to form triple helical structures that prevent transcription of the gene encoding the MSPI in target cells in the body. (See generally, Helene, 1991, *Anticancer Drug Des.*, 6(6), 569-584; Helene, et al., 1992, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 660, 27-36; and Maher, 1992, *Bioassays* 14(12), 807-815).

Nucleic acid molecules to be used in triplex helix formation for the inhibition of transcription should be single stranded and composed of deoxynucleotides. The base composition of these oligonucleotides must be designed to promote triple helix formation via Hoogsteen base pairing rules, which generally require sizeable stretches of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex. Nucleotide sequences may be

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

pyrimidine-based, which will result in TAT and CGC+ triplets across the three associated strands of the resulting triple helix. The pyrimidine-rich molecules provide base complementarity to a purine-rich region of a single strand of the duplex in a parallel orientation to that strand. In addition, nucleic acid molecules may be chosen that are purine-rich, for example, contain a stretch of G residues. These molecules will form a triple helix with a DNA duplex that is rich in GC pairs, in which the majority of the purine residues are located on a single strand of the targeted duplex, resulting in GGC triplets across the three strands in the triplex.

Alternatively, the potential sequences that can be targeted for triple helix formation may be increased by creating a so called "switchback" nucleic acid molecule. Switchback molecules are synthesized in an alternating 5'-3', 3'-5' manner, such that they base pair with first one strand of a duplex and then the other, eliminating the necessity for a sizeable stretch of either purines or pyrimidines to be present on one strand of a duplex.

In instances wherein the antisense, ribozyme, or triple helix molecules described herein are utilized to inhibit mutant gene expression, it is possible that the technique may so efficiently reduce or inhibit the transcription (triple helix) or translation (antisense, ribozyme) of mRNA produced by normal gene alleles of an MSPI that the situation may arise wherein the concentration of MSPI present may be lower than is necessary for a normal phenotype. In such cases, to ensure that substantially normal levels of activity of a gene encoding an MSPI are maintained, gene therapy may be used to introduce into cells nucleic acid molecules that encode and express the MSPI that exhibit normal gene activity and that do not contain sequences susceptible to whatever antisense, ribozyme, or triple helix treatments are being utilized. Alternatively, in instances whereby the gene encodes an extracellular protein, normal MSPIs can be co-administered in order to maintain the requisite level of MSPI activity.

Antisense RNA and DNA, ribozyme, and triple helix molecules of the invention may be prepared by any method known in the art for the synthesis of DNA and RNA molecules, as discussed above. These include techniques for chemically synthesizing oligodeoxyribonucleotides and oligoribonucleotides well known in the art such as for example solid phase phosphoramidite chemical synthesis. Alternatively, RNA molecules may be generated by in vitro and in vivo transcription of DNA sequences encoding the antisense RNA molecule. Such DNA sequences may be incorporated into a wide variety of vectors that incorporate suitable RNA polymerase promoters such as the T7 or SP6 polymerase promoters. Alternatively, antisense cDNA constructs that synthesize antisense RNA constitutively or inducibly, depending on the promoter used, can be introduced stably into cell lines.

5.17 ASSAYS FOR THERAPEUTIC OR PROPHYLACTIC AGENTS

The present invention also provides assays for use in drug discovery in order to identify or verify the efficacy of agents for treatment or prevention of MS. Candidate agents can be assayed for their ability to restore MSF or MSPI levels in a subject having MS towards levels found in subjects free from MS or to produce similar changes in experimental animal models of MS. Agents able to restore MSF or MSPI levels in a subject having MS towards levels found in subjects free from MS or to produce similar changes in experimental animal models of MS can be used as lead agents for further drug discovery, or used therapeutically. MSF and MSPI expression can be assayed by the Preferred Technology, immunoassays, gel

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

electrophoresis followed by visualization, detection of MSPI activity, or any other method taught herein or known to those skilled in the art. Such assays can be used to screen candidate drugs, in clinical monitoring or in drug development, where abundance of an MSF or MSPI can serve as a surrogate marker for clinical disease.

5 In various specific embodiments, in vitro assays can be carried out with cells representative of cell types involved in a subject's disorder, to determine if a agent has a desired effect upon such cell types.

Agents for use in therapy can be tested in suitable animal model systems prior to testing in humans, including but not limited to rats, mice, chickens, cows, monkeys, rabbits, etc. For in vivo testing, prior to administration to humans, any animal model system known in 10 the art may be used. Examples of animal models of MS include, but are not limited to, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Steinman (1999) Neuron, 24:511-514). It is also apparent to the skilled artisan that, based upon the present disclosure, transgenic animals can be produced with "knock-out" mutations of the gene or genes encoding one or more MSPIs. A "knock-out" mutation of a gene is a mutation that causes the mutated gene to 15 not be expressed, or expressed in an aberrant form or at a low level, such that the activity associated with the gene product is nearly or entirely absent. Preferably, the transgenic animal is a mammal, more preferably, the transgenic animal is a mouse.

In one embodiment, candidate agents that modulate the expression of an MSPI are 20 identified in non-human animals (e.g., mice, rats, monkeys, rabbits, and guinea pigs), preferably non-human animal models for MS, expressing the MSPI. In accordance with this embodiment, a candidate agent or a control agent is administered to the animals, and the effect of the candidate agent on expression of one or more MSPIs is determined. A candidate agent that alters the expression of an MSPI (or a plurality of MSPIs) can be identified by comparing 25 the level of the selected MSPI or MSPIs (or mRNA(s) encoding the same) in an animal or group of animals treated with a candidate agent with the level of the MSPIs(s) or mRNA(s) in an animal or group of animals treated with a control agent. Techniques known to those of skill in the art can be used to determine the mRNA and protein levels, for example, in situ hybridization. The animals may or may not be sacrificed to assay the effects of a candidate 30 agent.

In another embodiment, candidate agents that modulate the activity of an MSPI or a biologically active portion thereof are identified in non-human animals (e.g., mice, rats, monkeys, rabbits, and guinea pigs), preferably non-human animal models for MS, expressing the MSPIs. In accordance with this embodiment, a candidate agent or a control agent is 35 administered to the animals, and the effect of a candidate agent on the activity of an MSPI is determined. A candidate agent that alters the activity of an MSPI (or a plurality of MSPIs) can be identified by assaying animals treated with a control agent and animals treated with the candidate agent. The activity of the MSPI can be assessed by detecting induction of a cellular second messenger of the MSPI (e.g., intracellular Ca^{2+} , diacylglycerol, IP3, etc.), detecting 40 catalytic or enzymatic activity of the MSPI or binding partner thereof, detecting the induction of a reporter gene (e.g., a regulatory element that is responsive to an MSPI of the invention operably linked to a nucleic acid encoding a detectable marker, such as luciferase or green fluorescent protein), or detecting a cellular response (e.g., cellular differentiation or cell proliferation). Techniques known to those of skill in the art can be utilized to detect changes

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

in the activity of an MSPI (see, e.g., U.S. 5,401,639).

In yet another embodiment, candidate agent that modulate the level or expression of an MSPI (or plurality of MSPIs) are identified in human subjects having MS, preferably those having severe MS. In accordance with this embodiment, a candidate agent or a control agent is administered to the human subject, and the effect of a candidate agent on MSPI expression is determined by analyzing the expression of the MSPI or the mRNA encoding the same in a biological sample (e.g., CSF, serum, plasma, or urine). A candidate agent that alters the expression of an MSPI can be identified by comparing the level of the MSPI or mRNA encoding the same in a subject or group of subjects treated with a control agent to that in a subject or group of subjects treated with a candidate agent. Alternatively, alterations in the expression of an MSPI can be identified by comparing the level of the MSPI or mRNA encoding the same in a subject or group of subjects before and after the administration of a candidate agent. Techniques known to those of skill in the art can be used to obtain the biological sample and analyze the mRNA or protein expression. For example, the Preferred Technology described herein can be used to assess changes in the level of an MSPI.

In another embodiment, candidate agents that modulate the activity of an MSPI (or plurality of MSPIs) are identified in human subjects having MS, preferably those having severe MS. In this embodiment, a candidate agent or a control agent is administered to the human subject, and the effect of a candidate agent on the activity of an MSPI is determined. A test compound candidate agent that alters the activity of an MSPI can be identified by comparing biological samples from subjects treated with a control agent to samples from subjects treated with the candidate agent. Alternatively, alterations in the activity of an MSPI can be identified by comparing the activity of an MSPI in a subject or group of subjects before and after the administration of a candidate agent. The activity of the MSPI can be assessed by detecting in a biological sample (e.g., CSF, serum, plasma, or urine) induction of a cellular signal transduction pathway of the MSPI (e.g., intracellular Ca^{2+} , diacylglycerol, IP_3 , etc.), catalytic or enzymatic activity of the MSPI or a binding partner thereof, or a cellular response, for example, cellular differentiation, or cell proliferation. Techniques known to those of skill in the art can be used to detect changes in the induction of a downstream effector of an MSPI or changes in a cellular response. For example, RT-PCR can be used to detect changes in the induction of a downstream effector.

In a preferred embodiment, a candidate agent that changes the level or expression of an MSPI towards levels detected in control subjects (e.g., humans free from MS) is selected for further testing or therapeutic use. In another preferred embodiment, a candidate agent that changes the activity of an MSPI towards the activity found in control subjects (e.g., humans free from MS) is selected for further testing or therapeutic use.

In another embodiment, candidate agent that reduce the severity of one or more symptoms associated with MS are identified in human subjects having MS, preferably subjects having severe MS. In accordance with this embodiment, a candidate agent or a control agent is administered to the subjects, and the effect of a candidate agent on one or more symptoms of MS is determined. A candidate agent that reduces one or more symptoms can be identified by comparing the subjects treated with a control agent to the subjects treated with the candidate agent. Techniques known to physicians familiar with MS can be used to determine whether a candidate agent reduces one or more symptoms associated with MS. For example, a candidate

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

agent that reduces clinical relapse rate, development of new MRI lesions, delays disability progression, enhances speed of clinical recovery, restores blood brain barrier status on MRI or delays increase of MRI lesion volume, protection of oligodendrocytes, axonal remyelination in a subject having MS will be beneficial for treating subjects having MS.

- 5 In a preferred embodiment, a candidate agent that reduces the severity of one or more symptoms associated with MS in a human having MS is selected for further testing or therapeutic use.

5.18 THERAPEUTIC AND PROPHYLACTIC COMPOSITIONS AND THEIR USE

- 10 The invention provides methods of treatment (and prophylaxis) comprising administering to a subject an effective amount of an active agent. An "active agent" as used herein comprises MSPIs, MSPI fragments, MSPI-related polypeptides, anti-MSPI antibodies, fragments of anti-MSPI antibodies and agents which modulate the expression of MSPIs e.g. agonists and antagonists of MSPIs. In a preferred aspect, the agent is substantially purified (e.g., substantially free from substances that limit its effect or produce undesired side-effects).

- 15 The subject is preferably an animal and is preferably a mammal, and most preferably human. Formulations and methods of administration that can be employed when the agent comprises a nucleic acid are described above; additional appropriate formulations and routes of administration are described below. A "pharmaceutical composition" as used herein comprises 20 an active agent optionally with a pharmaceutically acceptable carrier.

- Various delivery systems are known and can be used to administer a agent of the invention, e.g., encapsulation in liposomes, microparticles, microcapsules, recombinant cells capable of expressing the agent, receptor-mediated endocytosis (see, e.g., Wu and Wu, 1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432), construction of a nucleic acid as part of a retroviral or other 25 vector, etc. Methods of introduction can be enteral or parenteral and include but are not limited to intradermal, intramuscular, intraperitoneal, intravenous, subcutaneous, intranasal, epidural, and oral routes. The agents may be administered by any convenient route, for example by infusion or bolus injection, by absorption through epithelial or mucocutaneous linings (e.g., oral mucosa, rectal and intestinal mucosa, etc.) and may be administered together 30 with other biologically active agents. Administration can be systemic or local. In addition, it may be desirable to introduce the pharmaceutical compositions of the invention into the central nervous system by any suitable route, including intraventricular and intrathecal injection; intraventricular injection may be facilitated by an intraventricular catheter, for example, attached to a reservoir, such as an Ommaya reservoir. Pulmonary administration can also be 35 employed, e.g., by use of an inhaler or nebulizer, and formulation with an aerosolizing agent.

- In a specific embodiment, it may be desirable to administer the pharmaceutical compositions of the invention locally to the area in need of treatment; this may be achieved, for example, and not by way of limitation, by local infusion during surgery, topical application, e.g., by injection, by means of a catheter, or by means of an implant, said implant being of a 40 porous, non-porous, or gelatinous material, including membranes, such as sialastic membranes, or fibers. In one embodiment, administration can be by direct injection into CSF or at the site (or former site) of neurodegeneration or to CNS tissue.

In another embodiment, the agent can be delivered in a vesicle, in particular a liposome (see Langer, 1990, Science 249:1527-1533; Treat et al., in Liposomes in the

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, pp. 317-327; see generally *ibid.*)

In yet another embodiment, the agent can be delivered in a controlled release system.

In one embodiment, a pump may be used (see Langer, *supra*; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref.

- 5 Biomed. Eng. 14:201; Buchwald et al., 1980, Surgery 88:507; Saudek et al., 1989, N. Engl. J. Med. 321:574). In another embodiment, polymeric materials can be used (see Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Florida (1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance, Smolen and Ball (eds.), Wiley, New York (1984); Ranger and Peppas, J., 1983, Macromol. Sci. Rev.
- 10 Macromol. Chem. 23:61; see also Levy et al., 1985, Science 228:190; During et al., 1989, Ann. Neurol. 25:351; Howard et al., 1989, J. Neurosurg. 71:105). In yet another embodiment, a controlled release system can be placed in proximity of the therapeutic target, e.g. the CNS, thus requiring only a fraction of the systemic dose (see, e.g., Goodson, in Medical Applications of Controlled Release, *supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

- 15 Other controlled release systems are discussed in the review by Langer (1990, Science 249:1527-1533).

In a specific embodiment where the agent of the invention is a nucleic acid encoding a protein, the nucleic acid can be administered *in vivo* as described *supra*.

- The present invention also provides pharmaceutical compositions. Such compositions
- 20 comprise a therapeutically effective amount of an agent, and a pharmaceutically acceptable carrier. In a specific embodiment, the term "pharmaceutically acceptable" means approved by a regulatory agency of the Federal or a state government or listed in the U.S. Pharmacopeia or other generally recognized pharmacopeia for use in animals, and more particularly in humans. The term "carrier" refers to a diluent, adjuvant, excipient, or vehicle with which the therapeutic
- 25 is administered. Such pharmaceutical carriers can be sterile liquids, such as water and oils, including those of petroleum, animal, vegetable or synthetic origin, such as peanut oil, soybean oil, mineral oil, sesame oil and the like. Water is a preferred carrier when the pharmaceutical composition is administered intravenously. Saline solutions and aqueous dextrose and glycerol solutions can also be employed as liquid carriers, particularly for injectable solutions. Suitable
- 30 pharmaceutical excipients include starch, glucose, lactose, sucrose, gelatin, malt, rice, flour, chalk, silica gel, sodium stearate, glycerol monostearate, talc, sodium chloride, dried skim milk, glycerol, propylene glycol, water, ethanol and the like. The composition, if desired, can also contain minor amounts of wetting or emulsifying agents, or pH buffering agents. These compositions can take the form of solutions, suspensions, emulsion, tablets, pills, capsules,
- 35 powders, sustained-release formulations and the like. The composition can be formulated as a suppository, with traditional binders and carriers such as triglycerides. Oral formulation can include standard carriers such as pharmaceutical grades of mannitol, lactose, starch, magnesium stearate, sodium saccharine, cellulose, magnesium carbonate, etc. Examples of suitable pharmaceutical carriers are described in "Remington's Pharmaceutical Sciences", Ed.
- 40 E.W. Martin, ISBN: 0-912734-04-3, Mack Publishing Co. Such compositions will contain a therapeutically effective amount of the agent, preferably in purified form, together with a suitable amount of carrier so as to provide the form for proper administration to the subject. The formulation should suit the mode of administration.

In a specific embodiment, the composition is formulated in accordance with routine

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

procedures as a pharmaceutical composition adapted for intravenous administration to human beings. Typically, compositions for intravenous administration are solutions in sterile isotonic aqueous buffer. Where necessary, the composition may also include a solubilizing agent and a local anesthetic such as lidocaine to ease pain at the site of the injection. Generally, the ingredients are supplied either separately or mixed together in unit dosage form, for example, as a dry lyophilized powder or water free concentrate in a hermetically sealed container such as an ampoule or sachette indicating the quantity of active agent. Where the composition is to be administered by infusion, it can be dispensed with an infusion bottle containing sterile pharmaceutical grade water or saline. Where the composition is administered by injection, an ampoule of sterile water for injection or saline can be provided so that the ingredients may be mixed prior to administration.

The agents of the invention can be formulated as neutral or salt forms. Pharmaceutically acceptable salts include those formed with free amino groups such as those derived from hydrochloric, phosphoric, acetic, oxalic, tartaric acids, etc., and those formed with free carboxyl groups such as those derived from sodium, potassium, ammonium, calcium, ferric hydroxides, isopropylamine, triethylamine, 2-ethylamino ethanol, histidine, procaine, etc.

The amount of the agent of the invention which will be effective in the treatment of MS can be determined by standard clinical techniques. In addition, in vitro assays may optionally be employed to help identify optimal dosage ranges. The precise dose to be employed in the formulation will also depend on the active agent, the route of administration of the active agent, and the seriousness of the disease or disorder, and should be decided according to the judgment of the practitioner and each subject's circumstances. However, suitable dosage ranges for intravenous administration are generally about 20-500 micrograms of active agent per kilogram body weight. Suitable dosage ranges for intranasal administration are generally about 0.01 pg/kg body weight to 1 mg/kg body weight. Effective doses may be extrapolated from dose-response curves derived from in vitro or animal model test systems.

The invention also provides a pharmaceutical pack or kit comprising one or more containers filled with one or more of the ingredients of the pharmaceutical compositions of the invention. Optionally associated with such container(s) can be a notice in the form prescribed by a governmental agency regulating the manufacture, use or sale of pharmaceuticals or biological products, which notice reflects (a) approval by the agency of manufacture, use or sale for human administration, (b) directions for use, or both.

6. EXAMPLE: IDENTIFICATION OF PROTEINS DIFFERENTIALLY EXPRESSED IN THE CSF IN MS

Using the following procedure, proteins in CSF samples from 7 subjects having MS and 7 control subjects were separated by isoelectric focusing followed by SDS-PAGE and analyzed. Parts 6.1.1 to 6.1.14 (inclusive) of the procedure set forth are hereby designated as the "Reference Protocol"

6.1 MATERIALS AND METHODS

6.1.1 Sample Preparation

A protein assay (Pierce BCA Cat # 23225) was performed on each CSF sample as

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

received. Prior to protein separation, each sample was processed for selective depletion of certain proteins, in order to enhance and simplify protein separation and facilitate analysis by removing proteins that may interfere with or limit analysis of proteins of interest. See WO 99/63351, which is incorporated by reference in its entirety, with particular reference to pages 3 and 6.

Removal of albumin, haptoglobin, transferrin and immunoglobulin G (IgG) from CSF ("CSF depletion") was achieved by an affinity chromatography purification step in which the sample was passed through a series of Hi-Trap™ columns containing immobilized antibodies for selective removal of albumin, haptoglobin and transferrin, and protein G for selective removal of immunoglobulin G. Two affinity columns in a tandem assembly were prepared by coupling antibodies to protein G-sepharose contained in Hi-Trap™ columns (Protein G-Sepharose Hi-Trap columns (1 ml) Pharmacia Cat. No. 17-0404-01). This was done by circulating the following solutions sequentially through the columns: (1) Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (Gibco BRL Cat. No. 14190-094); (2) concentrated antibody solution; (3) 200 mM sodium carbonate buffer, pH 8.35; (4) cross-linking solution (200 mM sodium carbonate buffer, pH 8.35, 20 mM dimethylpimelimidate); and (5) 500 mM ethanolamine, 500 mM NaCl. A third (un-derivatised) protein G Hi-Trap column was then attached to the lower end of the tandem column assembly.

The chromatographic procedure was automated using an Akta Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) System such that a series of up to seven runs could be performed sequentially. The samples were passed through the series of 3 Hi-Trap columns in which the affinity chromatography media selectively bind the above proteins thereby removing them from the sample. Fractions (typically 3 ml per tube) were collected of unbound material ("Flowthrough fractions") that eluted through the column during column loading and washing stages and of bound proteins ("Bound/Eluted fractions") that were eluted by step elution with Immunopure Gentle Ag/Ab Elution Buffer (Pierce Cat. No. 21013). The eluate containing unbound material was collected in fractions which were pooled, desalted/concentrated by centrifugal ultrafiltration and stored to await further analysis by 2D PAGE.

A volume of depleted CSF containing approximately 100-150 µg of total protein was aliquoted and an equal volume of 10% (w/v) SDS (Fluka 71729), 2.3% (w/v) dithiothreitol (BDH 443852A) was added. The sample was heated at 95°C for 5 mins, and then allowed to cool to 20°C. 125 µl of the following buffer was then added to the sample:

8M urea (BDH 452043w)
4% CHAPS (Sigma C3023)
65mM dithiothreitol (DTT)
2% (v/v) Resolytes™ 3.5-10 (BDH 44338 2x)

This mixture was vortexed, and centrifuged at 13000 rpm for 5 mins at 15°C, and the supernatant was analyzed by isoelectric focusing.

6.1.2 Isoelectric Focusing

Isoelectric focusing (IEF), was performed using the Immobiline™ DryStrip Kit (Pharmacia BioTech), following the procedure described in the manufacturer's instructions, see Instructions for Immobiline™ DryStrip Kit, Pharmacia, # 18-1038-63, Edition AB

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

(incorporated herein by reference in its entirety). Immobilized pH Gradient (IPG) strips (18cm, pH 3-10 non-linear strips; Pharmacia Cat. # 17-1235-01) were rehydrated overnight at 20°C in a solution of 8M urea, 2% (w/v) CHAPS, 10mM DTT, 2% (v/v) Resolytes 3.5-10, as described in the Immobiline DryStrip Users Manual. For IEF, 50ml of supernatant (prepared as above) was loaded onto a strip, with the cup-loading units being placed at the basic end of the strip. The loaded gels were then covered with mineral oil (Pharmacia 17-3335-01) and a voltage was immediately applied to the strips according to the following profile, using a Pharmacia EPS3500XL power supply (Cat 19-3500-01):

- 10 Initial voltage = 300V for 2 hrs
 Linear Ramp from 300V to 3500V over 3hrs
 Hold at 3500V for 19hrs

For all stages of the process, the current limit was set to 10mA for 12 gels, and the wattage limit to 5W. The temperature was held at 20°C throughout the run.

6.1.3 Gel Equilibration and SDS-PAGE

After the final 19hr step, the strips were immediately removed and immersed for 10 mins at 20°C in a first solution of the following composition: 6M urea; 2% (w/v) DTT; 2% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol (Fluka 49767); 0.05M Tris/HCl, pH 6.8 (Sigma Cat T-1503). The strips were removed from the first solution and immersed for 10 mins at 20°C in a second solution of the following composition: 6M urea; 2% (w/v) iodoacetamide (Sigma I-6125); 2% (w/v) SDS; 30% (v/v) glycerol; 0.05M Tris/HCl, pH 6.8. After removal from the second solution, the strips were loaded onto supported gels for SDS-PAGE according to Hochstrasser et al., 1988, Analytical Biochemistry 173: 412-423 (incorporated herein by reference in its entirety), with modifications as specified below.

6.1.4 Preparation of supported gels

The gels were cast between two glass plates of the following dimensions: 23cm wide x 24cm long (back plate); 23cm wide x 24cm long with a 2cm deep notch in the central 19cm (front plate). To promote covalent attachment of SDS-PAGE gels, the back plate was treated with a 0.4% solution of *g*-methacryl-oxypropyltrimethoxysilane in ethanol (BindSilaneJ; Pharmacia Cat. # 17-1330-01). The front plate was treated with a 2% solution of dimethyldichlorosilane dissolved in octamethyl cyclo-octasilane (RepelSilaneJ Pharmacia Cat. # 17-1332-01) to reduce adhesion of the gel. Excess reagent was removed by washing with water, and the plates were allowed to dry. At this stage, both as identification for the gel, and as a marker to identify the coated face of the plate, an adhesive bar-code was attached to the back plate in a position such that it would not come into contact with the gel matrix.

The dried plates were assembled into a casting box with a capacity of 13 gel sandwiches. The top and bottom plates of each sandwich were spaced by means of 1mm thick spacers, 2.5 cm wide. The sandwiches were interleaved with acetate sheets to facilitate separation of the sandwiches after gel polymerization. Casting was then carried out according to Hochstrasser et al., op. cit.

A 9-16% linear polyacrylamide gradient was cast, extending up to a point 2cm below

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

the level of the notch in the front plate, using the Angelique gradient casting system (Large Scale Biology). Stock solutions were as follows. Acrylamide (40% in water) was from Serva (Cat. # 10677). The cross-linking agent was PDA (BioRad 161-0202), at a concentration of 2.6% (w/w) of the total starting monomer content. The gel buffer was 0.375M Tris/HCl, pH 8.8. The polymerization catalyst was 0.05% (v/v) TEMED (BioRad 161-0801), and the initiator was 0.1% (w/v) APS (BioRad 161-0700). No SDS was included in the gel and no stacking gel was used. The cast gels were allowed to polymerize at 20°C overnight, and then stored at 4°C in sealed polyethylene bags with 6ml of gel buffer, and were used within 4 weeks.

10

6.1.5 SDS-PAGE

A solution of 0.5% (w/v) agarose (Fluka Cat 05075) was prepared in running buffer (0.025M Tris, 0.198M glycine (Fluka 50050), 1% (w/v) SDS, supplemented by a trace of bromophenol blue). The agarose suspension was heated to 70°C with stirring, until the agarose had dissolved. The top of the supported 2nd D gel was filled with the agarose solution, and the equilibrated strip was placed into the agarose, and tapped gently with a palette knife until the gel was intimately in contact with the 2nd D gel. The gels were placed in the 2nd D running tank, as described by Amess et al., 1995, Electrophoresis 16: 1255-1267 (incorporated herein by reference in its entirety). The tank was filled with running buffer (as above) until the level of the buffer was just higher than the top of the region of the 2nd D gels which contained polyacrylamide, so as to achieve efficient cooling of the active gel area. Running buffer was added to the top buffer compartments formed by the gels, and then voltage was applied immediately to the gels using a Consort E-833 power supply. For 1 hour, the gels were run at 20mA/gel. The wattage limit was set to 150W for a tank containing 6 gels, and the voltage limit was set to 600V. After 1 hour, the gels were then run at 40mA/gel, with the same voltage and wattage limits as before, until the bromophenol blue line was 0.5cm from the bottom of the gel. The temperature of the buffer was held at 16°C throughout the run. Gels were not run in duplicate.

30

6.1.6 Staining

Upon completion of the electrophoresis run, the gels were immediately removed from the tank for fixation. The top plate of the gel cassette was carefully removed, leaving the gel bonded to the bottom plate. The bottom plate with its attached gel was then placed into a staining apparatus, which can accommodate 12 gels. The gels were completely immersed in fixative solution of 40% (v/v) ethanol (BDH 28719), 10% (v/v) acetic acid (BDH 100016X), 50% (v/v) water (MilliQ-Millipore), which was continuously circulated over the gels. After an overnight incubation, the fixative was drained from the tank, and the gels were primed by immersion in 7.5% (v/v) acetic acid, 0.05% (w/v) SDS, 92.5% (v/v) water for 30 mins. The priming solution was then drained, and the gels were stained by complete immersion for 4 hours in a staining solution of Pyridinium, 4-[2-[4-(dipentylamino)-2-trifluoromethylphenyl] ethenyl]-1-(sulfobutyl)-, inner salt, prepared by diluting a stock solution of this dye (2mg/ml in DMSO) in 7.5% (v/v) aqueous acetic acid to give a final concentration of 1.2 mg/l; the staining solution was vacuum filtered through a 0.4µm filter (Duropore) before use.

40

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

6.1.7 Imaging of the gel

A computer-readable output was produced by imaging the fluorescently stained gels with the preferred scanner (Oxford Glycosciences, Oxford, UK described in section 5.2, supra. This scanner has a gel carrier with four integral fluorescent markers (Designated M1, M2, M3, M4) that are used to correct the image geometry and are a quality control feature to confirm that the scanning has been performed correctly.

For scanning, the gels were removed from the stain, rinsed with water and allowed to air dry briefly, and imaged on the preferred scanner. After imaging, the gels were sealed in polyethylene bags containing a small volume of staining solution, and then stored at 4°C.

6.1.8 Digital Analysis of the Data

The data were processed as described in WO 98/23950 at Sections 5.4 and 5.5 (incorporated herein by reference), as set forth more particularly below.

The output from the scanner was first processed using the MELANIE7 II 2D PAGE analysis program (Release 2.2, 1997, BioRad Laboratories, Hercules, California, Cat. # 170-7566) to autodetect the registration points, M1, M2, M3 and M4; to autocrop the images (i.e., to eliminate signals originating from areas of the scanned image lying outside the boundaries of the gel, e.g. the reference frame); to filter out artifacts due to dust; to detect and quantify features; and to create image files in GIF format. Features were detected using the following parameters:

Smooths = 2
Laplacian threshold 50
Partials threshold 1
Saturation = 100
Peakedness = 0
Minimum Perimeter = 10

6.1.9 Assignment of pI and MW Values

Landmark identification was used to determine the pI and MW of features detected in the images. Twelve landmark features, designated CSF1 to CSF12, were identified in a standard CSF image obtained from a pooled sample. These landmark features are identified in Figure 1 and were assigned the pI and/or MW values identified in Table X.

Table X. Landmark Features Used In This Study

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Name	pI	MW (Da)	Name	pI	MW (Da)
CSF1	5.96	185230	CSF7	4.78	41340
CSF2	5.39	141700	CSF8	9.2	40000
CSF3	6.29	100730	CSF9	5.5	31900
CSF4	5.06	71270	CSF10	6.94	27440
CSF5	7.68	68370	CSF11	5.9	23990
CSF6	5.67	48090	CSF12	6.43	10960

As many of these landmarks as possible were identified in each gel image of the dataset. Each feature in the study gels was then assigned a pI value by linear interpolation or extrapolation (using the MELANIE7-II software) to the two nearest landmarks, and was assigned a MW value by linear interpolation or extrapolation (using the MELANIE7-II software) to the two nearest landmarks.

6.1.10 Matching With Primary Master Image

Images were edited to remove gross artifacts such as dust, to reject images which had gross abnormalities such as smearing of protein features, or were of too low a loading or overall image intensity to allow identification of more than the most intense features, or were of too poor a resolution to allow accurate detection of features. Images were then compared by pairing with one common image from the whole sample set. This common image, the "primary master image", was selected on the basis of protein load (maximum load consistent with maximum feature detection), a well resolved myoglobin region, (myoglobin was used as an internal standard), and general image quality. Additionally, the primary master image was chosen to be an image which appeared to be generally representative of all those to be included in the analysis. (This process by which a primary master gel was judged to be representative of the study gels was rechecked by the method described below and in the event that the primary master gel was seen to be unrepresentative, it was rejected and the process repeated until a representative primary master gel was found.)

Each of the remaining study gel images was individually matched to the primary master image such that common protein features were paired between the primary master image and each individual study gel image as described below.

6.1.11 Cross-matching Between Samples

To facilitate statistical analysis of large numbers of samples for purposes of identifying features that are differentially expressed, the geometry of each study gel was adjusted for maximum alignment between its pattern of protein features, and that of the primary master, as follows. Each of the study gel images was individually transformed into the geometry of the primary master image using a multi-resolution warping procedure. This procedure corrects the image geometry for the distortions brought about by small changes in the physical parameters of the electrophoresis separation process from one sample to another. The observed changes are such that the distortions found are not simple geometric distortions, but rather a smooth

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

flow, with variations at both local and global scale.

The fundamental principle in multi-resolution modeling is that smooth signals may be modeled as an evolution through 'scale space', in which details at successively finer scales are added to a low resolution approximation to obtain the high resolution signal. This type of model is applied to the flow field of vectors (defined at each pixel position on the reference image) and allows flows of arbitrary smoothness to be modeled with relatively few degrees of freedom. Each image is first reduced to a stack, or pyramid, of images derived from the initial image, but smoothed and reduced in resolution by a factor of 2 in each direction at every level (Gaussian pyramid) and a corresponding difference image is also computed at each level, representing the difference between the smoothed image and its progenitor (Laplacian pyramid). Thus the Laplacian images represent the details in the image at different scales.

To estimate the distortion between any 2 given images, a calculation was performed at level 7 in the pyramid (i.e. after 7 successive reductions in resolution). The Laplacian images were segmented into a grid of 16x16 pixels, with 50% overlap between adjacent grid positions in both directions, and the cross correlation between corresponding grid squares on the reference and the test images was computed. The distortion displacement was then given by the location of the maximum in the correlation matrix. After all displacements had been calculated at a particular level, they were interpolated to the next level in the pyramid, applied to the test image, and then further corrections to the displacements were calculated at the next scale.

The warping process brought about good alignment between the common features in the primary master image, and the images for the other samples. The MELANIE7 II 2D PAGE analysis program was used to calculate and record approximately 500-700 matched feature pairs between the primary master and each of the other images. The accuracy of this program was significantly enhanced by the alignment of the images in the manner described above. To improve accuracy still further, all pairings were finally examined by eye in the MelView interactive editing program and residual recognizably incorrect pairings were removed. Where the number of such recognizably incorrect pairings exceeded the overall reproducibility of the Preferred Technology (as measured by repeat analysis of the same biological sample) the gel selected to be the primary master gel was judged to be insufficiently representative of the study gels to serve as a primary master gel. In that case, the gel chosen as the primary master gel was rejected, and different gel was selected as the primary master gel, and the process was repeated.

All the images were then added together to create a composite master image, and the positions and shapes of all the gel features of all the component images were super-imposed onto this composite master as described below.

Once all the initial pairs had been computed, corrected and saved, a second pass was performed whereby the original (unwarped) images were transformed a second time to the geometry of the primary master, this time using a flow field computed by smooth interpolation of the multiple tie-points defined by the centroids of the paired gel features. A composite master image was thus generated by initialising the primary master image with its feature descriptors. As each image was transformed into the primary master geometry, it was digitally summed pixel by pixel into the composite master image, and the features that had not been paired by the procedure outlined above were likewise added to the composite master image

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

description, with their centroids adjusted to the master geometry using the flow field correction.

The final stage of processing was applied to the composite master image and its feature descriptors, which now represent all the features from all the images in the study transformed to a common geometry. The features were grouped together into linked sets or "clusters", according to the degree of overlap between them. Each cluster was then given a unique identifying index, the molecular cluster index (MCI).

An MCI identifies a set of matched features on different images. Thus an MCI represents a protein or proteins eluting at equivalent positions in the 2D separation in different samples.

6.1.12 Construction of Profiles

After matching all component gels in the study to the final composite master image, the intensity of each feature was measured and stored. The end result of this analysis was the generation of a digital profile which contained, for each identified feature: 1) a unique identification code relative to corresponding feature within the composite master image (MCI), 2) the x, y coordinates of the features within the gel, 3) the isoelectric point (pI) of the features, 4) the apparent molecular weight (MW) of the features, 5) the signal value, 6) the standard deviation for each of the preceding measurements, and 7) a method of linking the MCI of each feature to the master gel to which this feature was matched. By virtue of a Laboratory Information Management System (LIMS), this MCI profile was traceable to the actual stored gel from which it was generated, so that proteins identified by computer analysis of gel profile databases could be retrieved. The LIMS also permitted the profile to be traced back to an original sample or patient.

6.1.13 Statistical Analysis of the Profiles

The complementary statistical strategies specified below were used in the order in which they are listed to identify MSFs from the MCIs within the mastergroup.

(a) The Wilcoxon Rank-Sum test. This test was performed between the control and the MS samples for each MCI basis. The MCIs which recorded a p-value less than or equal to 0.05 were selected as statistically significant MSFs with 95% selectivity.

(b) A second non-overlapping selection strategy is based on qualitative presence or absence alone. Using this procedure, a percentage feature presence was calculated across the control samples and MS samples for each MCI which was a potential MSF based on such qualitative criteria alone, i.e. presence or absence. The MCIs which recorded a percentage feature presence of 95% or more on MS samples and a percentage feature presence of 15% or less on control samples, were selected as the qualitative differential MSFs with 85% selectivity. A second group of qualitative differential MSFs with 85% selectivity were formed by those MCIs which recorded a percentage feature presence of 95% or more on control samples and a percentage feature presence of 15% or less on MS samples.

(c) A third non-overlapping selection strategy is based on the fold change. A fold change representing the ratio of the average normalized protein abundances of the MSFs within an MCI, was calculated for each MCI between each set of controls and MS samples. A 95% confidence limit for the mean of the fold changes was calculated. The MCIs with fold

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

changes which fall outside the confidence limit were selected as MSFs which met the criteria of the significant fold change threshold with 95% selectivity. Because the MCI fold changes are based on a 95% confidence limit, it follows that the significant fold change threshold is itself 95%.

5

Application of these three analysis strategies allowed MSFs to be selected on the basis of: (a) statistical significance as measured by the Wilcoxon Rank-Sum test, (b) qualitative differences with a chosen selectivity, or (c) a significant fold change threshold with a chosen selectivity,

10

6.1.14 Recovery and analysis of selected proteins

Proteins in MSFs were robotically excised and processed to generate tryptic digest peptides. Tryptic peptides were analyzed by mass spectrometry using a PerSeptive Biosystems Voyager-DETM STR Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight (MALDI-TOF) mass spectrometer, and selected tryptic peptides were analyzed by tandem mass spectrometry (MS/MS) using a Micromass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) mass spectrometer (Micromass, Altrincham, U.K.) equipped with a nanoflowTM electrospray Z-spray source. For partial amino acid sequencing and identification of MSPIs uninterpreted tandem mass spectra of tryptic peptides were searched using the SEQUEST search program (Eng et al., 1994, J. Am. Soc. Mass Spectrom. 5:976-989), version v.C.1. Criteria for database identification included: the cleavage specificity of trypsin; the detection of a suite of a, b and y ions in peptides returned from the database. The database searched was database constructed of protein entries in the non-redundant database held by the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) which is accessible at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Following identification of proteins through spectral-spectral correlation using the SEQUEST program, masses detected in MALDI-TOF mass spectra were assigned to tryptic digest peptides within the proteins identified. In cases where no amino acid sequences could be identified through searching with uninterpreted MS/MS spectra of tryptic digest peptides using the SEQUEST program, tandem mass spectra of the peptides were interpreted manually, using methods known in the art. (In the case of interpretation of low-energy fragmentation mass spectra of peptide ions see Gaskell et al., 1992, Rapid Commun. Mass Spectrom. 6:658-662). The method described in PCT Application No. PCT/GB01/04034, which is incorporated herein by reference in its entirety, was also used to interpret mass spectra.

35

7. EXAMPLE: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MS

The following example illustrates the use of an MSPI of the invention for screening or diagnosis of MS, determining the prognosis of a MS patient, or monitoring the effectiveness of MS therapy. The following example also illustrates the use of modulators (e.g., agonists or antagonists) of an MSPI of the invention to treat or prevent MS.

40

Cathepsins are part of the papain superfamily of lysosomal cysteine proteinases that play a major role in intracellular protein degradation (Kirschke, H. and Barrett, A.J. (1987) in *Lysosomes: Their role in protein breakdown* (Glaumann, H., and Ballard, F.J., eds) 193-238, Academic Press, London). In addition Cathepsin S appears to be essential for antigen presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules. Cathepsin may

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

have putative roles in several pathologies including cancer (Hughes et al. (1998) Proc. Nat. Acad. Sci. 95: 12410-12415) and neuronal cell death (Isahara et. Al (1999) Neuroscience 91:233-249), such as Cathepsin B in post ischaemic hippocampal neuronal death (Yamashima et al. (1998) Eur J Neurosci 5:1723-33). Cathepsin L may participate in various pathological processes including arthritis (Esser et al. (1994) Arthritis Rheum. 37:236-247) and tumor metastasis (Sheahan et al. (1989) Cancer Research 49:3809-3814). Like many other proteases, Cathepsin L is synthesized as an inactive proenzyme, which is subsequently processed to the mature form through cleavage of an amino-terminal proregion, located between the signal sequence and the N terminus of the mature enzyme (Menar et al. (1998) J Biol Chem 273:4478-4484), resulting in isoforms. Thus the proregion may regulate catalytic activity, and has been shown to be a potent inhibitor of the mature enzyme (Carmona et al. (1996) Biochemistry 35:8149-8157).

The expression of Cathepsin L with a molecular weight of 40,820 Da and pI of 4.37 has been shown herein to be significantly increased in the cerebrospinal fluid (CSF) of subjects having MS as compared with the CSF of subjects free from MS (see Table II – MSP1-300). Thus, quantitative detection of Cathepsin L in CSF can be used to diagnose MS, determine the progression of MS or monitor the effectiveness of a therapy for MS.

In one embodiment of the invention, agents that modulate (*e.g.*, downregulate) the expression, activity or both the expression and activity of Cathepsin L are administered to a subject in need of treatment or for prophylaxis of MS. Antibodies that modulate the expression, activity or both the expression and activity of Cathepsin L are suitable for this purpose. In addition, nucleic acids coding for all or a portion of Cathepsin L, or nucleic acids complementary to all or a portion of Cathepsin L, may be administered. Cathepsin L, or fragments of the Cathepsin L polypeptide may also be administered. The invention also provides screening assays to identify additional agents that modulate the expression of Cathepsin L or activity of Cathepsin L. Agents that modulate the expression of Cathepsin L *in vitro* can be identified by comparing the expression of Cathepsin L in cells treated with a candidate agent to the expression of Cathepsin L in cells treated with a control agent (*e.g.*, saline). Methods for detecting expression of Cathepsin L are known in the art and include measuring the level of Cathepsin L RNA (*e.g.*, by northern blot analysis or RT-PCR) and measuring Cathepsin L protein (*e.g.*, by immunoassay or western blot analysis). Agents that modulate the activity of Cathepsin L can be identified by comparing the ability of a candidate agent to agonize or antagonize a function of Cathepsin L, such as its neurotrophic or neuroprotective activity, to the ability of a control agent (*e.g.*, saline) to inhibit the same function of Cathepsin L. Agents capable of modulating Cathepsin L activity are identified as agents suitable for further development as a agent useful for the treatment of MS.

Through the use of such assays, candidate agents may be tested for their ability to antagonize the activity of Cathepsin L.

Agents identified *in vitro* that affect the expression or activity of Cathepsin L can be tested *in vivo* in animal models of MS, or in subjects having MS, to determine their therapeutic efficacy.

When a reference is made herein to a method of treating or preventing a disease or condition using a particular agent or combination of agents, it is to be understood that such a

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

reference is intended to include the use of that agent or combination of agents in the preparation of a medicament for the treatment or prevention of the disease or condition.

- 5 The present invention is not to be limited in terms of the particular embodiments described in this application, which are intended as single illustrations of individual aspects of the invention. Functionally equivalent methods and apparatus within the scope of the invention, in addition to those enumerated herein, will be apparent to those skilled in the art from the foregoing description and accompanying drawings. Such modifications and variations are intended to fall within the scope of the appended claims. The contents of each
10 reference, patent and patent application cited in this application is hereby incorporated by reference in its entirety.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

WE CLAIM:

1. A method for screening or diagnosis of Multiple Sclerosis in a subject, for determining the stage or severity of Multiple Sclerosis in a subject, for identifying a subject at risk of developing Multiple Sclerosis, or for monitoring the effect of therapy administered to a subject having Multiple Sclerosis, said method comprising:
 - (a) analysing a test sample of body fluid from the subject by two-dimensional electrophoresis to generate a two-dimensional array of features, said array comprising one or more of the following Multiple Sclerosis-Associated Features (MSFs): MSF-1, MSF-2, MSF-3, MSF-4, MSF-5, MSF-6, MSF-7, MSF-8, MSF-9, MSF-10, MSF-11, MSF-12, MSF-13, MSF-14, MSF-15, MSF-16, MSF-17, MSF-18, MSF-20, MSF-21, MSF-22, MSF-23, MSF-24, MSF-25, MSF-26, MSF-27, MSF-28, MSF-29, MSF-30, MSF-31, MSF-32, MSF-33, MSF-34, MSF-35, MSF-36, MSF-37, MSF-38, MSF-39, MSF-40, MSF-41, MSF-42, MSF-43, MSF-44, MSF-45, MSF-46, MSF-47, MSF-48, MSF-49, MSF-50, MSF-51, MSF-52, MSF-53, MSF-54, MSF-55, MSF-56, MSF-57, MSF-58, MSF-59, MSF-60, MSF-61, MSF-62, MSF-63, MSF-64, MSF-65, MSF-66, MSF-67, MSF-69, MSF-70, MSF-71, MSF-72, MSF-73, MSF-75, MSF-76, MSF-77, MSF-78, MSF-79, MSF-80, MSF-81, MSF-82, MSF-83, MSF-84, MSF-85, MSF-86, MSF-87, MSF-88, MSF-89, MSF-90, MSF-91, MSF-92, MSF-93, MSF-94, MSF-95, MSF-96, MSF-97, MSF-98, MSF-99, MSF-100, MSF-101, MSF-102, MSF-104, MSF-105, MSF-106, MSF-107, MSF-108, MSF-109, MSF-110, MSF-111, MSF-112, MSF-113, MSF-114, MSF-115, MSF-116, MSF-117, MSF-119, MSF-120, MSF-121, MSF-122, MSF-123, MSF-125, MSF-126, MSF-127, MSF-128, MSF-130, MSF-131, MSF-132, MSF-133, MSF-134, MSF-135, MSF-136, MSF-137, MSF-139, MSF-140, MSF-141, MSF-142, MSF-143, MSF-144, MSF-145, MSF-147, MSF-148, MSF-149, MSF-150, MSF-151, MSF-152, MSF-153, MSF-154, MSF-155, MSF-156, MSF-157, MSF-158, MSF-159, MSF-160, MSF-161, MSF-163, MSF-165, MSF-167, MSF-168, MSF-169, MSF-170, MSF-171, MSF-172, MSF-173, MSF-174, MSF-175, MSF-176, MSF-177, MSF-178, MSF-179, MSF-180, MSF-181, MSF-182, MSF-183, MSF-184, MSF-185, MSF-186, MSF-187, MSF-188, MSF-189, MSF-190, MSF-191, MSF-192, MSF-193, MSF-194, MSF-195, MSF-196, MSF-197, MSF-198, MSF-199, MSF-200, MSF-201, MSF-202, MSF-203, MSF-204, MSF-205, MSF-206, MSF-207, MSF-208, MSF-209, MSF-210, MSF-211, MSF-212, MSF-213, MSF-215, MSF-216, MSF-217, MSF-218, MSF-219, MSF-220, MSF-221, MSF-222, MSF-223, MSF-224, MSF-225, MSF-226, MSF-227, MSF-228, MSF-229, MSF-230, MSF-231, MSF-232, MSF-233, MSF-234, MSF-235, MSF-236, MSF-237, MSF-238, MSF-239, MSF-240, MSF-241, MSF-242, MSF-243, MSF-244, MSF-245, MSF-246, MSF-247, MSF-248, MSF-250, MSF-251, MSF-252, MSF-253, MSF-254, MSF-257, MSF-259, MSF-260, MSF-261, MSF-262, MSF-263, MSF-264, MSF-265, MSF-266, MSF-267, MSF-268, MSF-269, MSF-270, MSF-271, MSF-273, MSF-274, MSF-276, MSF-277, MSF-278, MSF-279, MSF-280, MSF-281, MSF-282, MSF-283, MSF-284, MSF-285, MSF-287, MSF-289, MSF-290, MSF-291, MSF-292, MSF-294, MSF-295, MSF-296, MSF-298, MSF-299, MSF-300, MSF-301, MSF-302, MSF-303, MSF-305, MSF-306, MSF-307, MSF-308, MSF-310, MSF-311, MSF-312, MSF-313, MSF-314, MSF-316, MSF-318, MSF-319,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

MSF-320, MSF-321, MSF-322, MSF-323, MSF-324, MSF-325; and

- (b) comparing the abundance of the one or more MSFs in the test sample with the abundance of the one or more MSFs in a body fluid sample from one or more subjects free from Multiple Sclerosis, or with a previously determined reference range for that feature in subjects free from Multiple Sclerosis, or with the abundance at least one Expression Reference Feature (ERF) in the test sample.

2. A method for screening or diagnosis of Multiple Sclerosis in a subject, for determining the stage or severity of Multiple Sclerosis in a subject, for identifying a subject at risk of developing Multiple Sclerosis, or for monitoring the effect of therapy administered to a subject having Multiple Sclerosis, said method comprising quantitatively detecting, in a test sample of body fluid from the subject, one or more of the following Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs): MSPI-1, MSPI-2, MSPI-3, MSPI-4, MSPI-5.1, MSPI-6, MSPI-7, MSPI-8.1, MSPI-8.2, MSPI-9, MSPI-10, MSPI-11, MSPI-12.1, MSPI-12.2, MSPI-13, MSPI-14, MSPI-15, MSPI-16, MSPI-18, MSPI-20, MSPI-21, MSPI-22, MSPI-24, MSPI-25, MSPI-27, MSPI-28, MSPI-29, MSPI-30, MSPI-31, MSPI-32, MSPI-33.1, MSPI-33.2, MSPI-34, MSPI-36, MSPI-37, MSPI-39.1, MSPI-39.2, MSPI-40, MSPI-42.2, MSPI-43, MSPI-44, MSPI-47, MSPI-48.1, MSPI-48.2, MSPI-48.3, MSPI-49.1, MSPI-49.2, MSPI-51.1, MSPI-52.1, MSPI-52.2, MSPI-54, MSPI-55, MSPI-56, MSPI-58, MSPI-60, MSPI-62.2, MSPI-63, MSPI-64.1, MSPI-64.3, MSPI-65, MSPI-66, MSPI-67.1, MSPI-67.2, MSPI-69, MSPI-70, MSPI-72, MSPI-73, MSPI-75, MSPI-76, MSPI-77.2, MSPI-78.1, MSPI-78.2, MSPI-79, MSPI-80.1, MSPI-81, MSPI-82, MSPI-83, MSPI-84.1, MSPI-84.2, MSPI-86, MSPI-87, MSPI-89.1, MSPI-90, MSPI-91.1, MSPI-92, MSPI-93.1, MSPI-93.2, MSPI-94, MSPI-95, MSPI-96, MSPI-97, MSPI-98, MSPI-99, MSPI-102.1, MSPI-102.2, MSPI-102.3, MSPI-104, MSPI-105.1, MSPI-105.2, MSPI-106, MSPI-107, MSPI-108, MSPI-110, MSPI-111, MSPI-112, MSPI-113, MSPI-114, MSPI-116, MSPI-117, MSPI-119, MSPI-120, MSPI-122, MSPI-123.1, MSPI-125.1, MSPI-125.2, MSPI-126.1, MSPI-126.2, MSPI-127.1, MSPI-128, MSPI-130, MSPI-131, MSPI-132, MSPI-133, MSPI-134, MSPI-135, MSPI-136, MSPI-137, MSPI-139, MSPI-140, MSPI-141.1, MSPI-141.2, MSPI-142, MSPI-143.1, MSPI-144, MSPI-145.2, MSPI-147.2, MSPI-148, MSPI-149, MSPI-150, MSPI-151, MSPI-152, MSPI-154.1, MSPI-154.2, MSPI-154.3, MSPI-155.1, MSPI-155.2, MSPI-155.3, MSPI-156.2, MSPI-158.2, MSPI-159, MSPI-160, MSPI-161, MSPI-163, MSPI-165.1, MSPI-165.2, MSPI-167, MSPI-168, MSPI-169.1, MSPI-169.2, MSPI-170, MSPI-171, MSPI-172, MSPI-173.2, MSPI-175, MSPI-176.1, MSPI-176.2, MSPI-177, MSPI-178, MSPI-179.1, MSPI-179.2, MSPI-180, MSPI-181.1, MSPI-181.2, MSPI-182, MSPI-183, MSPI-184, MSPI-185, MSPI-186, MSPI-187.1, MSPI-187.2, MSPI-188.2, MSPI-189, MSPI-191, MSPI-192.1, MSPI-192.2, MSPI-193, MSPI-194.1, MSPI-194.2, MSPI-195.1, MSPI-196, MSPI-197, MSPI-198, MSPI-199.1, MSPI-199.2, MSPI-200, MSPI-201, MSPI-202.1, MSPI-202.2, MSPI-203, MSPI-205, MSPI-206, MSPI-207, MSPI-208, MSPI-209, MSPI-210, MSPI-211, MSPI-212.2, MSPI-213, MSPI-215, MSPI-216, MSPI-217.3, MSPI-218, MSPI-219, MSPI-220, MSPI-221.1, MSPI-222.1, MSPI-222.2, MSPI-223.1, MSPI-223.2, MSPI-224.1, MSPI-225, MSPI-226, MSPI-228.1, MSPI-228.2,

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

- MSPI-229.1, MSPI-229.2, MSPI-230, MSPI-231, MSPI-232, MSPI-233.1, MSPI-233.2, MSPI-234, MSPI-235, MSPI-236.1, MSPI-236.2, MSPI-237, MSPI-238, MSPI-239.1, MSPI-239.2, MSPI-240.1, MSPI-240.2, MSPI-241.1, MSPI-241.2, MSPI-242.1, MSPI-242.2, MSPI-243, MSPI-244, MSPI-245, MSPI-246.1, MSPI-246.2, MSPI-248, MSPI-250.2, MSPI-251, MSPI-254.1, MSPI-257.1, MSPI-257.2, MSPI-257.3, MSPI-260.1, MSPI-260.2, MSPI-261, MSPI-262.2, MSPI-265, MSPI-266, MSPI-267, MSPI-268.1, MSPI-270, MSPI-271, MSPI-273, MSPI-274, MSPI-276, MSPI-277, MSPI-279, MSPI-280.1, MSPI-280.2, MSPI-283.1, MSPI-283.2, MSPI-284.1, MSPI-284.2, MSPI-285, MSPI-289, MSPI-290, MSPI-291.1, MSPI-291.2, MSPI-292, MSPI-295, MSPI-298.1, MSPI-298.2, MSPI-299, MSPI-300, MSPI-301, MSPI-302, MSPI-303.2, MSPI-305, MSPI-306, MSPI-307, MSPI-308, MSPI-311.1, MSPI-311.2, MSPI-311.3, MSPI-313, MSPI-314, MSPI-316, MSPI-318, MSPI-319, MSPI-320, MSPI-322, MSPI-323.1, MSPI-323.2, MSPI-324, MSPI-325.1, MSPI-325.2
- 15
3. The method according to claim 1 or 2 where the body fluid is cerebrospinal fluid (CSF).
4. The method according to claim 2 or 3 where the abundance of the one or more MSPIs in the test sample is compared with the abundance of the one or more MSPIs in a sample from one or more subjects free from Multiple Sclerosis, or with a previously determined reference range for that feature in subjects free from Multiple Sclerosis, or with the abundance at least one Expression Reference Feature (ERF) in the test sample.
- 20
5. The method according to any one of claims 2 to 4, wherein the step of quantitatively detecting comprises testing at least one aliquot of the first sample, said step of testing comprising:
- (a) contacting the aliquot with an antibody that is immunospecific for a MSPI;
- (b) quantitatively measuring the binding of the antibody and the MSPI; and
- (c) comparing the results of step (b) with a predetermined reference range.
- 30
6. The method according to claim 5, wherein the step of quantitatively detecting comprises testing a plurality of aliquots with a plurality of antibodies cognate for a plurality of preselected MSPIs.
- 35
7. A pharmaceutical composition comprising a Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform (MSPI) as defined in claim 2, or a nucleic acid encoding an MSPI, and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 40
8. The pharmaceutical composition according to claim 7, wherein the Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform (MSPI) is in recombinant form.
9. An antibody capable of immunospecific binding to a Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoform (MSPI) as defined in claim 2.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

10. The method according to claim 5 or 6 or an antibody according to claim 9, wherein the antibody is a monoclonal antibody.
- 5 11. The method according to claim 5 or 6 or an antibody according to claim 9 or 10, wherein the antibody is a chimeric antibody.
12. The method according to claim 5 or 6 or an antibody according to claim 9 or 10, wherein the antibody is a bispecific antibody.
- 10 13. The method according to claim 5 or 6 or an antibody according to claim 9 or 10, wherein the antibody is a humanised antibody.
14. The method according to claim 5 or 6 or an antibody according to any one of claims 9 to 13, wherein the antibody binds to the MSPI with greater affinity than to another isoform of the MSPI.
- 15 15. A kit comprising one or more antibodies as claimed in any one of claims 9 to 14 and/or one or more MSPIs as defined in claim 2, other reagents and instructions for use.
- 20 16. The kit of claim 15 for use in the screening or diagnosis of Multiple Sclerosis in a subject, for determining the stage or severity of Multiple Sclerosis in a subject, for identifying a subject at risk of developing Multiple Sclerosis, or for monitoring the effect of therapy administered to a subject having Multiple Sclerosis.
- 25 17. The kit according to claim 15 or 16 comprising a plurality of antibodies as claimed in any one of claims 9 to 14 and/or a plurality of MSPIs as defined in claim 2.
18. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an antibody, or a fragment or derivative of an antibody according to any one of claims 9 to 14 and a pharmaceutically acceptable carrier.
- 30 19. A method of treating or preventing Multiple Sclerosis comprising administering to a subject in need of such treatment a therapeutically effective amount of an antibody as claimed in any one of claims 9 to 14.
- 35 20. A method of treating or preventing Multiple Sclerosis comprising administering to a subject in need of such treatment or prevention a therapeutically effective amount of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2 and/or a nucleic acid encoding said MSPIs.
- 40 21. A method of treating or preventing Multiple Sclerosis comprising administering to a subject in need of such treatment or prevention a therapeutically effective amount of a nucleic acid that inhibits the function of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Protein

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2.

22. The method according to claim 21, wherein the nucleic acid is an MSPI antisense nucleic acid or ribozyme.
23. A method of screening for agents that interact with one or more a Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2, fragments of MSPIs (MSPI fragment), polypeptides related to MSPIs (MSPI-related polypeptide), or MSPI-fusion proteins said method comprising:
 - (a) contacting an MSPI, a fragment of an MSPI, an MSPI-related polypeptide, or an MSPI-fusion protein with a candidate agent; and
 - (b) determining whether or not the candidate agent interacts with the MSPI, the MSPI fragment, the MSPI-related polypeptide, or the MSPI-fusion protein.
24. The method according to claim 23, wherein the determination of interaction between the candidate agent and the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein comprises quantitatively detecting binding of the candidate agent and the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein.
25. A method of screening for or identifying agents that modulate the expression or activity of one or more Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2, fragments of MSPIs (MSPI fragment), polypeptides related to MSPIs (MSPI-related polypeptide) or MSPI-fusion proteins comprising:
 - (a) contacting a first population of cells expressing the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein with a candidate agent;
 - (b) contacting a second population of cells expressing said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein with a control agent; and
 - (c) comparing the level of said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein in the first and second populations of cells, or comparing the level of induction of a downstream effector in the first and second populations of cells.
26. A method of screening for or identifying agents that modulate the expression or activity of one or more Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2, fragments of MSPIs (MSPI fragment), polypeptides related to MSPIs (MSPI-related polypeptide) or MSPI-fusion proteins said method comprising:
 - (a) administering a candidate agent to a first mammal or group of mammals;
 - (b) administering a control agent to a second mammal or group of mammals; and
 - (c) comparing the level of expression of the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein, or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein in the first and second groups, or comparing the level of induction of a downstream effector in the first and second groups.

WO 02/059604

PCT/GB02/00330

27. The method as claimed in claim 26, wherein the mammals are animal models for Multiple Sclerosis.
- 5 28. The method according to any one of claims 25 to 27, wherein administration of a candidate agent results in an increase in the level of said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI-fusion protein, or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein, or said downstream effector in the first population of cells or mammals compared to the second population of cells or mammals.
- 10 29. The method according to any one of claims 25 to 27, wherein administration of a candidate agent results in a decrease in the level of said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein, or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein, or said downstream effector in the first population of cells or mammals compared to the second population of cells or mammals.
- 15 30. The method as claimed in claim 25 or 27, wherein the levels of said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein, or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI-fusion protein, or of said downstream effector in the first and second groups are further compared to the level of said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein, or mRNA encoding said MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein in normal control mammals.
- 20 31. The method according to claim 30, wherein said mammals are human subjects having Multiple Sclerosis.
- 25 32. A method of screening for or identifying agents that modulate the activity of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Proteins Isoforms (MSPIs) as defined in claim 2, fragments of MSPIs (MSPI fragment), polypeptides related to MSPIs (MSPI-related polypeptide) or MSPI-fusion proteins said method comprising:
- 30 (a) in a first aliquot, contacting a candidate agent with the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein, and
- (b) determining and comparing the activity of the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein in the first aliquot after addition of the candidate agent with the activity of the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein in a control aliquot, or with a previously determined reference range.
- 35 33. The method according to any one of claims 20 or 23 to 32, wherein the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide, or MSPI fusion protein is a recombinant protein.
- 40 34. The method according to any one of claims 23, 24 or 32, wherein the MSPI, MSPI fragment, MSPI-related polypeptide or MSPI fusion protein is immobilized on a solid phase.

WO 02/059604

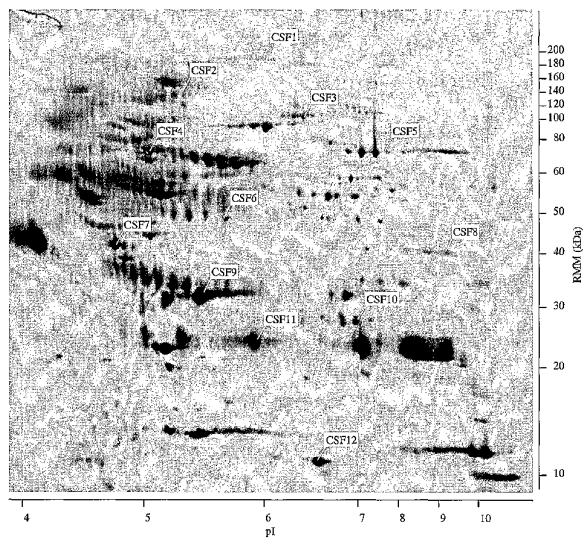
PCT/GB02/00330

35. A method for screening or diagnosis of Multiple Sclerosis in a subject or for monitoring the effect of an anti-Multiple Sclerosis drug or therapy administered to a subject, comprising:
- 5 (a) contacting at least one oligonucleotide probe comprising 10 or more consecutive nucleotides complementary to a nucleotide sequence encoding an MSPi as defined in claim 2 with RNA obtained from a biological sample from the subject or with cDNA copied from the RNA wherein said contacting occurs under conditions that permit hybridization of the probe to the nucleotide sequence if present;
 - 10 (b) detecting hybridization, if any, between the probe and the nucleotide sequence; and
 - (c) comparing the hybridization, if any, detected in step (b) with the hybridization detected in a control sample, or with a previously determined reference range.
36. The method as claimed in claim 35, wherein step (a) includes the step of hybridizing the nucleotide sequence to a DNA array, wherein one or more members of the array are the probes complementary to a plurality of nucleotide sequences encoding distinct MSPis.
37. A method of modulating the activity of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms as defined in claim 2 comprising administering to a subject an agent identified by any one of claims 23 to 34.
38. A method of treating or preventing Multiple Sclerosis comprising administering to a subject in need of such treatment or prevention a therapeutically effective dose of an agent that modulates the activity of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms as defined in claim 2; whereby the symptoms of Multiple Sclerosis are ameliorated.
39. A method for identifying targets for therapeutic modulation of Multiple Sclerosis wherein the activity of one or more of the Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms as defined in claim 2 is utilized as a measure to determine whether a candidate target is effective for modulation of Multiple Sclerosis.

WO 02/059604

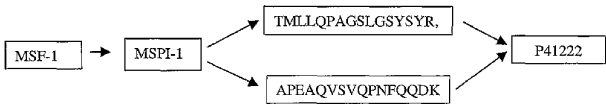
PCT/GB02/00330

FIGURE 1



5

FIGURE 2



10

【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)

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059604 A2(51) International Patent Classification: G01N 33/564,
A61K 39/00, A61P 25/00

(21) International Application Number: PCT/GB02/00330

(22) International Filing Date: 25 January 2002 (25.01.2002)

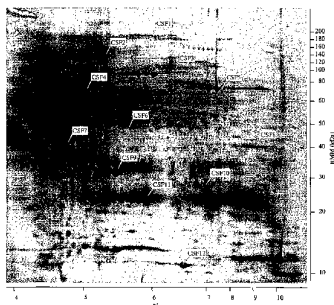
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,404 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/331,647 20 November 2001 (20.11.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): OXFORD
GLYCOSCIENCES (UK) LTD [GB/GB]; The Forum, 86
Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): HERATH, Herath,Mudiyanselage, Athula, Chandrasiri [GB/GB]; The Fo-
rum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).
PAREKH, Rajesh, Bhikhu [GB/GB]; The Forum, 86 Mil-
ton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB). ROHLFF,
Christian [DE/GB]; The Forum, 86 Milton Park, Abing-
don, Oxon OX14 4RY (GB).(74) Agent: BLAKEY, Alison, Jane; Oxford GlycoSciences
(UK) Ltd, The Forum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxon
OX14 4RY (GB).(81) Designated States (national): AR, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, 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, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW).

[Continued on next page]

(54) Title: PROTEINS, GENES AND THEIR USE FOR DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and prognosis of Multiple Sclerosis, for monitoring the effectiveness of Multiple Sclerosis treatment, identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment and for drug development. Multiple Sclerosis-Associated Features (MSAFs), detectable by two-dimensional electrophoresis of body fluid e.g. cerebrospinal fluid are described. The invention further provides Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPIs) detectable in body fluid e.g. cerebrospinal fluid, preparations comprising isolated MSPIs, antibodies immunospecific for MSPIs, and kits comprising the aforesaid.

WO 02/059604 A2

WO 02/059604 A2 

Urnsian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IL, 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).

(48) Date of publication of this corrected version:
21 November 2002

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 47/2002 of 21 November 2002, Sec-
tion II

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

*For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

【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
1 August 2002 (01.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/059604 A3(51) International Patent Classification: G01N 33/564,
A61K 39/00, A61P 25/00FAREKH, Rajesh, Bhikhu [GB/GB]; The Forum, 86 Mil-
ton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB); ROHLFF,
Christian [DE/GB]; The Forum, 86 Milton Park, Abing-
don, Oxon OX14 4RY (GB).

(21) International Application Number: PCT/GB02/00330

(22) International Filing Date: 25 January 2002 (25.01.2002)

(74) Agent: BLAKEY, Alison, Jane; Oxford GlycoSciences
(UK) Ltd, The Forum, 86 Milton Park, Abingdon, Oxon
OX14 4RY (GB).

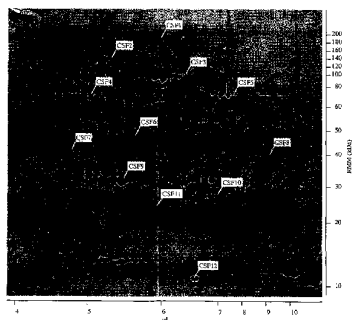
(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/264,404 26 January 2001 (26.01.2001) US
60/331,647 20 November 2001 (20.11.2001) US(71) Applicant (for all designated States except US): OXFORD
GLYCOSCIENCES (UK) LTD [GB/GB]; The Forum, 86
Milton Park, Abingdon, Oxon OX14 4RY (GB).(81) Designated States (national): AI, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GI,
GM, GR, GU, HD, 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, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GI, 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

[Continued on next page]

(54) Title: DIAGNOSIS AND TREATMENT OF MULTIPLE SCLEROSIS



(57) Abstract: The present invention provides methods and compositions for screening, diagnosis and prognosis of Multiple Sclerosis, for monitoring the effectiveness of Multiple Sclerosis treatment, identifying patients most likely to respond to a particular therapeutic treatment and for drug development. Multiple Sclerosis-Associated Features (MSFs), detectable by two-dimensional electrophoresis of body fluid e.g. cerebrospinal fluid are described. The invention further provides Multiple Sclerosis-Associated Protein Isoforms (MSPs) detectable in body fluid e.g. cerebrospinal fluid, preparations comprising isolated MSPs, antibodies immunospecific for MSPs, and kits comprising the aforesaid.

WO 02/059604 A3

WO 02/059604 A3 

(B1), BJ, CF, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,
NI, SN, TD, TG).

(15) Information about Correction:**Previous Correction:**

see PCT Gazette No. 47/2002 of 21 November 2002, Sec-
tion II

Published:

— with international search report

— before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendments

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(88) Date of publication of the international search report:

3 July 2003

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Inter. at Application No PCT/GB 02/00330		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 G01N33/364 A61K39/00 A61P25/00				
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 G01N A61K				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	HARRINGTON MICHAEL G ET AL: "Identification of a brain-specific human cerebrospinal fluid glycoprotein, beta-trace protein." APPLIED AND THEORETICAL ELECTROPHORESIS, vol. 3, no. 5, 1993, pages 229-234, XP009003878 ISSN: 0954-6642 abstract page 233, column 2, paragraph 2; figures 1-3 --- -/--	1-39		
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0"> <tr> <td> "A" document claiming 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 claim 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 </td> <td> "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 </td> </tr> </table>			"A" document claiming 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 claim 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
"A" document claiming 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 claim 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 15 January 2003		Date of mailing of the international search report 30.04.03		
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5816 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-3040, Tx: 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Vanmontfort, D		

Form PCT/ISA210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/GB 02/00330

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HIRAKA ATSUSHI ET AL: "Capillary-zone electrophoretic analyses of the proteins and amino acid components in cerebrospinal fluid of central nervous system diseases." BIOLOGICAL & PHARMACEUTICAL BULLETIN, vol. 16, no. 10, 1993, pages 949-952, XP001121494 ISSN: 0918-6158 abstract page 952, column 1, line 20 -column 2, line 2 ---	1-39
X	MELEGOS D N ET AL: "Prostaglandin D Synthase Concentration in Cerebrospinal Fluid and Serum of Patients with Neurological Disorders" PROTAGLANDINS, BUTTERWORTH, STONEHAM, MA, US, vol. 54, no. 1, 1 July 1997 (1997-07-01), pages 463-474, XP004087867 ISSN: 0090-6980 abstract page 469, paragraph 2 -page 470, paragraph 1; table 4 page 471, paragraph 3 ---	1-39
X	BOLLENGIER F: "CYSTATIN C ALIAS POST-GAMMA-GLOBULIN A MARKER FOR MULTIPLE SCLEROSIS" JOURNAL OF CLINICAL CHEMISTRY AND CLINICAL BIOCHEMISTRY, vol. 25, no. 9, 1987, pages 589-594, XP009003893 ISSN: 0340-076X abstract ---	1-39
X	MARIA ASSUNTA LAURENZI ET AL: "OLIGOCLONAL IGG AND FREE LIGHT CHAINS IN MULTIPLE SCLEROSIS DEMONSTRATED BY THIN-LAYER POLYACRYLAMIDE GEL ISOELECTRIC FOCUSING AND IMMUNOFIXATION" ANNALS OF NEUROLOGY, BOSTON, US, vol. 8, no. 3, September 1980 (1980-09), pages 241-247, XP001105807 ISSN: 0364-5134 the whole document ---	1-39
A	ROHLFF C: "PROTEOMICS IN MOLECULAR MEDICINE: APPLICATIONS IN CENTRAL NERVOUS SYSTEMS DISORDERS" ELECTROPHORESIS, WEINHEIM, DE, vol. 21, 2000, pages 1227-1234, XP000944098 ISSN: 0173-0835 the whole document ---	1-39

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/GB 02/00330
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PAGE M J ET AL: "Proteomics: a major new technology for the drug discovery process" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 4, no. 2, February 1999 (1999-02), pages 55-62, XP002217224 ISSN: 1359-6446 the whole document ---	1-39
A	W0 99 41612 A (JOHNSON PHILIP J ; OXFORD GLYCOSCIENCES UK LTD (GB); MOYSES CHRISTO) 19 August 1999 (1999-08-19) the whole document -----	1-39

INTERNATIONAL SEARCH REPORT	International application No. PCT/GB 02/00330
Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)	
This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. ☒ Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: Although claims 19-22, 26-31, 37 and 38 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.	
2. ☐ Claims Nos.: because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:	
3. ☐ Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).	
Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:	
see additional sheet	
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.	
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.	
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:	
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-39 (partially)	
Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest. ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.	

International Application No. PCT/GB 02/00330

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

Invention 1: 1-39 (partially)

Method for diagnosis of multiple sclerosis using the feature/isoform MSF-1/MSPI-1 as marker; antibodies against said marker and a kit comprising said antibodies; pharmaceutical composition comprising said marker or said antibodies; A method for screening for agents that interact with said marker; Use of said antibody, said marker or said modulating agent for treating multiple sclerosis.

Inventions 2-311: 1-39 (partially)

Method for diagnosis of multiple sclerosis using the features/isoforms MSF-2 to MSF-325/MSPI-2 to 325.2 as markers; antibodies against said markers and a kit comprising said antibodies; pharmaceutical composition comprising said markers or said antibodies; A method for screening for agents that interact with said markers; Use of said antibodies, said markers or said modulating agents for treating multiple sclerosis.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/GB 02/00330

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0 9941612	A	19-08-1999	
		AU 2534999 A	30-08-1999
		CA 2321160 A1	19-08-1999
		CN 1295668 T	16-05-2001
		EP 1055126 A1	29-11-2000
		WO 9941612 A1	19-08-1999
		HU 0101285 A2	28-08-2001
		JP 2002503813 T	05-02-2002
		PL 342365 A1	04-06-2001
		ZA 9901184 A	15-08-2000

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 25/00	A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 C 0 8 6
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	4 H 0 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	F
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/566	G 0 1 N 33/566	
// C 1 2 N 15/09	A 6 1 K 37/02	
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	A
	C 1 2 P 21/08	

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN, TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE, GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,P L,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 ヘラース・ムディヤンセラゲ・アースーラ・チャンドラシリ・ヘラース
イギリス国オックスフォードシャーOX14 4RY. アビンドン. ミルトンパーク86. ザフォーラム. オックスフォード・グリコサイエンシズ・(ユーケイ)・リミテッド

(72)発明者 ラージェシュ・ビクー・パレク
イギリス国オックスフォードシャーOX14 4RY. アビンドン. ミルトンパーク86. ザフォーラム. オックスフォード・グリコサイエンシズ・(ユーケイ)・リミテッド

(72)発明者 クリスティアン・ロールフ
イギリス国オックスフォードシャーOX14 4RY. アビンドン. ミルトンパーク86. ザフォーラム. オックスフォード・グリコサイエンシズ・(ユーケイ)・リミテッド

Fターム(参考) 2G045 AA25 AA40 CB17 DA12 DA13 DA14 DA36 DA77 FB02 FB03
FB05
4B024 AA01 AA11 BA41 CA04 CA09 CA11 GA11 HA12 HA15 HA17
4B063 QA01 QA05 QA18 QA19 QQ08 QQ20 QQ53 QR32 QR48 QR55
QR77 QR82 QS34
4B064 AG27 CC24 DA01 DA13
4C084 AA02 AA06 AA07 AA13 BA01 BA02 BA22 CA53 DC50 ZA022
4C085 AA13 AA14 BB11 DD62 DD63 DD88
4C086 AA01 AA02 AA03 AA04 EA16 MA01 MA04 ZA02
4H045 AA11 AA30 BA41 CA40 EA20 EA50

专利名称(译)	蛋白质，基因及其用于诊断和治疗多发性硬化症的用途		
公开(公告)号	JP2004532386A	公开(公告)日	2004-10-21
申请号	JP2002559670	申请日	2002-01-25
[标]申请(专利权)人(译)	牛津格力高学英国有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津格力高科学学院 (英国) 有限公司		
[标]发明人	ヘラースムディヤンセラゲアースーラチャンドラシリヘラース ラージェシュビクーパレク クリスティアンロールフ		
发明人	ヘラース・ムディヤンセラゲ・アースーラ・チャンドラシリ・ヘラース ラージェシュ・ビクー・パレク クリスティアン・ロールフ		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/7088 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12N15/09 C12P21/08 C12Q1/02 C12Q1/68 G01N33/15 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/ 566 G01N33/68		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 C07K14/4713 C07K2319/00 G01N33/6803 G01N33/6896 G01N2800/285 G01N2800/52		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D A61K31/7088 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P25/00 C07K16/18 C07K16/46 C12Q1/02 C12Q1/68.A G01N33/15.Z G01N33/483.F G01N33/50.Z G01N33/566 A61K37/ 02 C12N15/00.A C12P21/08		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/AA40 2G045/CB17 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/ DA77 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB05 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA04 4B024/CA09 4B024/CA11 4B024/GA11 4B024/HA12 4B024/HA15 4B024/HA17 4B063/QA01 4B063/ QA05 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ20 4B063/QQ53 4B063/QR32 4B063/QR48 4B063/QR55 4B063/QR77 4B063/QR82 4B063/QS34 4B064/AG27 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/ DA13 4C084/AA02 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA22 4C084/CA53 4C084/DC50 4C084/ZA022 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/BB11 4C085/DD62 4C085/ DD63 4C085/DD88 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/AA03 4C086/AA04 4C086/EA16 4C086/MA01 4C086/MA04 4C086/ZA02 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/EA20 4H045/ EA50		
代理人(译)	西村 公佑		
优先权	60/264404 2001-01-26 US 60/331647 2001-11-20 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了用于多发性硬化症的筛选，诊断和预后，监测多发性硬化症治疗的有效性，鉴定最有可能对特定治疗方法作出反应的患者以及用于药物开发的方法和组合物。多发性硬化症相关特征 (MSF) ，可通过体液的二维电泳检测，例如 描述了脑脊液。本发明进一步提供了可在体液中检测到的多发性硬化症相关蛋白同工型 (MSPI) ，例如。脑脊液，包含分离的MSPI的制剂，对MSPI免疫特异性的抗体以及包含上述物质的试剂盒。

