

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international



(43) Date de la publication internationale  
7 septembre 2001 (07.09.2001)

PCT

(10) Numéro de publication internationale  
**WO 01/64737 A1**

(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> :  
C07K 14/47, C12N 15/12, 5/10,  
C07K 16/18, A61K 38/17, 48/00, 39/395

(21) Numéro de la demande internationale :  
PCT/FR01/00589

(22) Date de dépôt international :  
28 février 2001 (28.02.2001)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :  
00/02566 29 février 2000 (29.02.2000) FR  
00/05005 18 avril 2000 (18.04.2000) FR

Michèle [FR/FR]; 33A, chemin des Petites Brosses,  
F-69300 Caluire (FR). ANTOINE, Jean-Christophe  
[FR/FR]; Fontannes, F-42600 Chalin Le Comtal (FR). BE-  
LIN, Marie-Françoise [FR/FR]; 5, place Carnot, F-69002  
Lyon (FR). HONNORAT, Jérôme [FR/FR]; 9, impasse  
René, F-69500 Bron (FR). ROGEMONT, Véronique  
[FR/FR]; 204, avenue Félix Faure, F-69003 Lyon (FR).

(74) Mandataire : JACOBSON, Claude; Cabinet Lavoix, 2,  
place D'Estienne d'Orves, F-75441 Paris Cedex 09 (FR).

(81) États désignés (national) : CA, JP, US.

(84) États désignés (régional) : brevet européen (AT, BE, CH,  
CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,  
SE, TR).

(71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : IN-  
STITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA  
RECHERCHE MEDICALE (INSERM) [FR/FR]; 101,  
rue de Tolbiac, F-75013 Paris (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AGUERA,

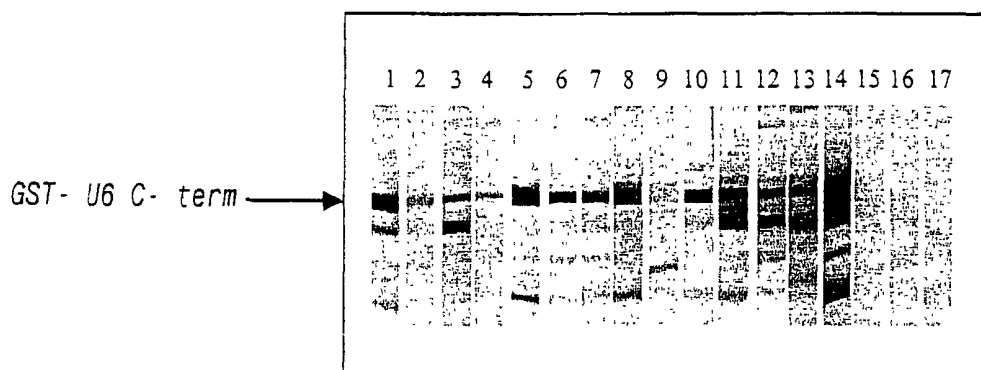
Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-  
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et  
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de  
la Gazette du PCT.

(54) Title: NOVEL HUMAN ULIP/CRMP PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCERS  
AND PARANEOPLASTIC NEUROLOGICAL SYNDROMES

(54) Titre : NOUVELLE PROTEINE ULIP/CRMP HUMAINE ET SON UTILISATION DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THE-  
RAPIE DES CANCERS ET DES SYNDROMES NEUROLOGIQUES PARANEOPLASIQUES



(57) Abstract: The invention concerns a purified polypeptide, called ULIP6, comprising an amino acid sequence SEQ ID NO 2,  
the nucleic acid coding for said polypeptide, a non-coding sequence in 3' of said encoding sequence and their use in diagnosis and  
treatment of cancers and paraneoplastic neurological syndromes.

(57) Abrégé : L'invention a pour objet un polypeptide purifié, désigné ULIP6, comprenant une séquence d'acide aminé SEQ ID n°  
2, l'acide nucléique codant pour ce polypeptide, une séquence non codante en 3' de cette séquence codante et leur utilisation dans le  
diagnostic et la thérapie des cancers et des syndromes neurologiques paranéoplasiques.



WO 01/64737 A1

Nouvelle protéine ULIP/CRMP humaine et son utilisation dans le diagnostic et la thérapie des cancers et des syndromes neurologiques paranéoplasiques

L'invention concerne une nouvelle protéine ULIP/CRMP humaine et son utilisation dans le diagnostic et la thérapie des cancers et des syndromes neurologiques paranéoplasiques.

Les syndromes neurologiques paranéoplasiques (SNP) surviennent à l'occasion d'un cancer, souvent avant sa découverte et ne sont liés ni à la prolifération tumorale elle-même (envahissement direct, métastases) ni à la thérapie. Leur fréquence est globalement estimée à environ 1 % des cancers. Plusieurs tableaux cliniques ont été depuis longtemps individualisés (encéphalomyélite, neuropathie sensitive de Denny Brown, atrophie cérébelleuse, encéphalite limbique, opsoclonus, ...) correspondant en fait à l'atteinte soit élective soit préférentielle de certains groupes de neurones. La fréquence des cellules inflammatoires au voisinage des lésions avait fait évoquer depuis de nombreuses années la possibilité d'un processus auto-immun ou viral. La mise en évidence, plus récente, d'auto-anticorps dans le sérum et le liquide céphalo-rachidien (LCR) de patients souffrant de SNP, spécifiques du type de tumeur et du type de neurones qui dégénèrent, a relancé l'hypothèse d'une participation de l'auto-immunité dans la genèse de cette pathologie (Graus et al., 1985 ; Greenlee et al., 1983).

Outre la présence d'un titre élevé de ces anticorps dans le sang et le LCR des patients, il existe plusieurs arguments suggérant que les SNP relèvent de mécanismes auto-immuns. Ainsi, les antigènes reconnus dans le système nerveux central sont aussi présents dans les tumeurs des patients (Anderson et al., 1987). Au sein du tissu tumoral, on retrouve des anticorps spécifiquement dirigés contre ces antigènes ainsi que des lymphocytes B et T (Hetzl et al., 1990).

Ces données suggèrent que le processus auto-immun serait déclenché par l'expression d'antigènes tumoraux. Un processus d'immunité croisée provoquerait les lésions du système nerveux central. D'autres arguments indiquent en outre que les lésions cérébrales résultent de la réponse auto-immune. Ainsi, dans le cerveau des patients, le titre des

anticorps spécifiques est supérieur à celui du sérum et du LCR (Dalmau et al., 1991). De plus, dans le cas des encéphalomyélites associées aux anticorps anti-Hu, il existe une réaction lymphocytaire intense, composée de cellules B et T, située à proximité de neurones en voie de destruction (Dalmau et al., 1991 ;  
5 Graus et al., 1990).

Plusieurs types d'auto-anticorps permettant des regroupements syndromiques précis en fonction de critères immunologiques, neurologiques et carcinologiques ont été décrits.

Ainsi, les anticorps anti-Yo sont retrouvés dans le sérum et le  
10 LCR de femmes présentant une atrophie cérébelleuse paranéoplasique et un cancer gynécologique (ovaire, sein ou utérus) (Greenlee et al., 1983 ; Jaeckle et al., 1985).

Ces anticorps reconnaissent deux protéines cytoplasmiques de 34 et 62 kDa spécifiques des cellules de Purkinje du cervelet.

15 Les anticorps anti-Ri sont retrouvés dans le sérum et le LCR de patients (principalement des femmes) présentant un opso-myoclonus, un syndrome cérébelleux et un cancer du sein. Ces anticorps reconnaissent deux protéines de 50 et 80 kDa spécifiques des neurones du système nerveux central (Luque et al., 1991).

20 Les anticorps anti-Hu sont les plus fréquemment rencontrés au cours des SNP. Ils sont retrouvés dans le sérum et le LCR de patients présentant un syndrome de Denny-Brown ou une encéphalomyélonévrite et un cancer du poumon à petites cellules (Graus et al., 1985 ; Dalmau et al., 1992). Ces auto-anticorps reconnaissent plusieurs protéines de 37 à 45 kDa  
25 exprimées spécifiquement par l'ensemble des neurones du système nerveux.

Un autre type d'auto-anticorps a été identifié chez des patients présentant un SNP : les anticorps anti-CV2 (Antoine et al., 1993 ; Honnorat et al., 1996). Ces derniers sont atypiques, en ce sens que la cible antigénique reconnue à l'âge adulte est essentiellement non neuronale, alors que l'analyse  
30 du cerveau *post-mortem* de quatre patients permet d'objectiver une perte neuronale, une gliose et un processus inflammatoire caractéristique des SNP.

L'originalité de la découverte de ces auto-anticorps réside, d'une part, dans leur mise en évidence. Ces derniers avaient échappé à l'ensemble

des investigations habituelles qui consistaient à révéler les antigènes reconnus par immunohistochimie sur du cerveau *post-mortem*. L'antigène reconnu est en effet soluble et disparaît du cerveau *post-mortem* dans la plupart des conditions de fixation. Seule une fixation du tissu *post-mortem* humain par immersion dans le paraformaldéhyde ou *in situ* par perfusion de paraformaldéhyde chez l'animal, a permis de révéler la présence de ces anticorps dans le LCR ou le sérum des patients atteints de SNP (Antoine et al., 1993 ; Honnorat et al., 1996).

Les auto-anticorps anti-CV2 présents dans les sérums de patients atteints de syndrome neurologique paranéoplasique (SNP) ont été définis par leur capacité à reconnaître, par immunohistochimie indirecte, un antigène cytoplasmique exprimé spécifiquement, dans le cerveau de rat adulte, par une sous-population d'oligodendrocytes du tronc cérébral, de la moelle et du cervelet.

L'originalité de ces auto-anticorps réside, d'autre part, dans leur intérêt diagnostique. Leur présence dans le sérum ou le LCR de patients a valeur diagnostique puisqu'elle permet de préciser l'origine paranéoplasique d'un syndrome neurologique. La découverte de ces anticorps lorsqu'elle précède celle du cancer, oriente la recherche de celui-ci et permet sa découverte. Tel a été le cas pour six patients sur 19 présentant des anticorps anti-CV2. Les troubles cliniques étaient différents suivant les patients, certains présentaient un tableau d'encéphalite limbique, d'autres une encéphalomyélonévrite et d'autres un syndrome de Lambert-Eaton. Néanmoins, dans plus de 60 % des cas, le syndrome cérébelleux était prédominant. La tumeur la plus fréquemment associée était le cancer du poumon à petites cellules (60 % des cas).

Des expériences sur des cerveaux de rats nouveaux-nés ont montré que ces anticorps anti-CV2 réagissaient avec une protéine de 66 kDa (Honorat et al., 1996).

Cet antigène se situe dans le cerveau adulte dans une sous-population d'oligodendrocytes ou dans des cellules qui gardent des capacités de différenciation dans le cerveau adulte (bulbe olfactif, gyrus denté). L'antigène reconnu jouerait un rôle dans la survie neuronale, via des

interactions Neurone/Oligodendrocyte, comme le suggère la perte des neurones observée dans le cerveau *post-mortem* de patients atteints de SNP.

Son expression très restreinte à l'âge adulte contraste avec une expression très forte et transitoire dans le système nerveux central et périphérique en développement, suggérant le rôle probable de cet antigène dans le développement du système nerveux.

Dans la demande WO 98/37192 et l'article de Honnorat et al de 1999, l'antigène cible des auto-anticorps anti-CV2, correspondant à une protéine désignée par «POP-66» pour «paraneoplastic oligodendrocyte protein 66 kDa», a été identifiée comme étant la forme humaine de la protéine ULIP-4. Les protéines ULIP (pour "Unc-33 like phosphoprotein") sont impliquées dans le contrôle du développement neuronal et le transport axonal (Byk et al, 1996). Quatre membres de cette famille avaient été identifiés par trois équipes différentes (Byk et al, 1998, Wang et Strittmatter, 1996 ; et Hamajima et al, 1996). La recherche extensive d'éventuels autres membres de cette famille n'avait pas abouti.

Les auteurs de la présente invention ont alors été confrontés à de nouveaux résultats, qui n'étaient pas cohérents avec l'identification établie par la demande WO 98/37192 : Alors que tous les sérums anti-CV2 testés sur des cellules Hela reconnaissaient indiscutablement la protéine recombinante ULIP 4 en immunohistochimie, seuls 20% de ces sérums reconnaissaient la protéine ULIP 4 par Western Blot sur ces mêmes extraits de cellules. Or tous les sérums anti-CV2 testés reconnaissaient par ailleurs par Western Blot la même protéine de 66 kDa après immunoprécipitation, sur des extraits de cerveaux. En outre, l'ARNm d'ULIP4 n'était que très faiblement exprimé dans les oligodendrocytes en hybridation *in situ*. A partir de ces données, les auteurs de la présente invention ont supposé qu'il pouvait exister un nouveau membre de la famille des ULIP non identifié à ce jour, fortement exprimé par les oligodendrocytes et reconnu en Western Blot par tous les sérums anti-CV2.

Les auteurs de la présente invention ont maintenant mis en évidence que, contrairement à ce que proposait la demande WO 96/37192,

POP-66, l'antigène majeur cible des auto-anticorps anti-CV2, n'était pas la protéine ULIP 4 mais une autre protéine. Ils sont parvenus à caractériser celle-ci. Il s'agit d'une nouvelle protéine humaine de la famille des ULIP, désignée ULIP6.

5 ULIP 6 comprend dans sa partie C-terminale un épitope majeur reconnu en Western Blot par les anticorps anti-CV2.

La présente invention a donc pour objet un polypeptide purifié ULIP 6, comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2.

10 Est en outre compris dans la présente invention un fragment épitopique du polypeptide mentionné ci-dessus, comprenant la séquence SEQ ID n°4. Plus particulièrement l'invention a pour objet le peptide purifié de séquence SEQ ID n°4.

15 La présente invention a également pour objet un acide nucléique isolé codant pour le polypeptide ULIP6 tel que défini ci-dessus, de préférence comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID n° 1. La séquence SEQ ID n°1 présente une région 5' non codante (nucléotides 1 à 162), un cadre de lecture ouvert (nucléotides 163 à 1854) et une région 3' non codante (nucléotides 1855 à 3074).

20

La présente invention a en outre pour objet un acide nucléique isolé comprenant la séquence nucléotidique SEQ ID n°3, qui correspond à la région non codante en 3' de la séquence codante humaine SEQ ID n°1. Cette séquence non codante de même que la partie 5' non codante (nucléotides 1 à 162 à SEQ ID n° 1) peuvent notamment servir à la préparation de sondes spécifiques.

25

Le polypeptide de la présente invention peut être synthétisé par toutes les méthodes bien connues de l'homme du métier. Le polypeptide de l'invention peut par exemple être synthétisé par les techniques de la chimie de 30 synthèse, telles que la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse pour des raisons de pureté, de spécificité antigénique, d'absence de produits secondaires non désirés et pour sa facilité de production.

Une protéine ULIP6 recombinante peut également être produite par un procédé, dans lequel un vecteur contenant un acide nucléique comprenant la séquence SEQ ID n° 1 est transféré dans une cellule hôte qui est mise en culture dans des conditions permettant l'expression du polypeptide correspondant.

La protéine produite peut ensuite être récupérée et purifiée.

Les procédés de purification utilisés sont connus de l'homme du métier. Le polypeptide recombinant obtenu peut être purifié à partir de lysats et extraits cellulaires, du surnageant du milieu de culture, par des méthodes utilisées individuellement ou en combinaison, telles que le fractionnement, les méthodes de chromatographie, les techniques d'immunoaffinité à l'aide d'anticorps mono- ou polyclonaux spécifiques, etc.

La séquence d'acide nucléique d'intérêt, codant pour le polypeptide ULIP6, peut être insérée dans un vecteur d'expression, dans lequel elle est liée de manière opérante à des éléments permettant la régulation de son expression, tels que notamment des promoteurs, activateurs et/ou terminateurs de transcription.

Les signaux contrôlant l'expression des séquences nucléotidiques (promoteurs, activateurs, séquences de terminaison...) sont choisis en fonction de l'hôte cellulaire utilisé. A cet effet, les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent être insérées dans des vecteurs à répllication autonome au sein de l'hôte choisi, ou des vecteurs intégratifs de l'hôte choisi. De tels vecteurs seront préparés selon les méthodes couramment utilisées par l'homme du métier, et les clones en résultant peuvent être introduits dans un hôte approprié par des méthodes standard, telles que par exemple l'électroporation ou la précipitation au phosphate de calcium.

Les vecteurs de clonage et/ou d'expression tels que décrits ci-dessus, contenant une séquence nucléotidique définie selon l'invention font également partie de la présente invention.

L'invention vise en outre les cellules hôtes transfectées, de manière transitoire ou stable, par ces vecteurs d'expression. Ces cellules

peuvent être obtenues par l'introduction dans des cellules hôtes d'une séquence nucléotidique insérée dans un vecteur tel que défini ci-dessus, puis la mise en culture desdites cellules dans des conditions permettant la réplication et/ou l'expression de la séquence nucléotidique transfectée.

5 L'hôte cellulaire peut être choisi parmi des systèmes procaryotes, comme les bactéries, ou eucaryotes, comme par exemple les levures, cellules d'insectes, CHO (cellules d'ovaires de hamster chinois) ou tout autre système avantageusement disponible. Un hôte cellulaire préféré pour l'expression des protéines de l'invention est constitué par la bactérie *E. coli*.

10 Les séquences nucléotidiques de l'invention peuvent être d'origine artificielle ou non. Il peut s'agir de séquences d'ADN ou d'ARN, obtenues par criblage de banques de séquences au moyen de sondes élaborées sur la base de la séquence SEQ ID n° 1 ou 3. De telles banques peuvent être préparées par des techniques classiques de biologie moléculaire, connues de l'homme de l'art.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention peuvent également être préparées par synthèse chimique, ou encore par des méthodes mixtes incluant la modification chimique ou enzymatique de séquences obtenues par criblage des banques.

20 Cet acide nucléique permet la réalisation de sondes nucléotidiques, capables de s'hybrider fortement et spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, d'un ADN génomique ou d'un ARN messager, codant pour un polypeptide selon l'invention ou un fragment biologiquement actif de celui-ci. Les conditions d'hybridation appropriées correspondent aux conditions de température et de force ionique usuellement utilisées par l'homme du métier (Sambrook et al., 1989), de préférence à des conditions de température comprises entre ( $T_m$  moins 5°C) et ( $T_m$  moins 30°C) et de préférence encore, à des conditions de température comprises entre ( $T_m$  moins 5°C) et ( $T_m$  moins 10°C) (forte stringence),  $T_m$  étant la température théorique de fusion, définie comme étant la température à laquelle 50 % des brins appariés se séparent. De telles sondes font également partie de l'invention. Elles peuvent être utilisées comme outil de diagnostic *in vitro* pour la détection, par des expériences d'hybridation, de transcrits spécifiques des polypeptides de

25

30

l'invention dans des échantillons biologiques ou pour la mise en évidence de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques résultant d'un polymorphisme, de mutations ou d'un mauvais épissage.

Les sondes de l'invention comportent au minimum 10 nucléotides, et au maximum comportent la totalité d'une séquence nucléotidique SEQ ID n° 1 ou 3, ou de son brin complémentaire.

L'acide nucléique de l'invention peut également être utilisé pour réaliser des amorces oligonucléotidiques, qui hybrident dans des conditions de forte stringence à la séquence SEQ ID n° 1 ou 3.

Ces amorces oligonucléotidiques sens et/ou antisens peuvent être utiles pour des réactions de séquençage ou d'amplification spécifique selon la technique dite de PCR (réaction de polymérisation en chaîne) ou toute autre variante de celle-ci.

Préférentiellement, les sondes ou amorces de l'invention sont marquées, préalablement à leur utilisation. Pour cela, plusieurs techniques sont à la portée de l'homme du métier comme par exemple le marquage fluorescent, radioactif, chimioluminescent ou enzymatique.

Les méthodes de diagnostic *in vitro* dans lesquelles ces sondes nucléotidiques sont mises en oeuvre pour la détection de synthèses aberrantes ou d'anomalies génétiques, telles que la perte d'hétérozygotie et le réarrangement génétique, au niveau des séquences nucléiques codant pour un polypeptide ULIP6 selon l'invention sont incluses dans la présente invention. Un tel type de méthode comprend :

- la mise en contact d'une sonde nucléotidique de l'invention avec un échantillon biologique dans des conditions permettant la formation d'un complexe d'hybridation entre ladite sonde et la susdite séquence nucléotidique, éventuellement après une étape préalable d'amplification de la susdite séquence nucléotidique ;

- la détection du complexe d'hybridation éventuellement formé ;  
- éventuellement le séquençage de la séquence nucléotidique formant le complexe d'hybridation avec la sonde de l'invention.

Les sondes de l'invention sont en outre avantageusement utilisables pour la détection d'anomalies chromosomiques.

Les séquences nucléotidiques selon l'invention ont par ailleurs des utilisations dans le domaine thérapeutique, pour la réalisation de séquences antisens, capables de s'hybrider spécifiquement avec une séquence d'acide nucléique, y compris un ARN messager, utilisables en thérapie génique.

5 L'invention a ainsi pour objet des séquences antisens capables d'inhiber, au moins partiellement, la production d'un polypeptide selon l'invention, tel que défini précédemment.

Elles sont plus particulièrement utiles dans le traitement des désordres du système nerveux central et périphérique et de la vision,

10 notamment dans le traitement des syndromes neurologiques paranéoplasiques, ainsi que dans le traitement anticancéreux, notamment des tumeurs associées à des syndromes neurologiques paranéoplasiques.

L'exploitation des protéines ULIP, et en particulier ULIP6, ainsi que des anticorps dirigés contre ces protéines, est prometteuse dans divers

15 domaines.

Ainsi, la détection de l'auto-anticorps anti-CV2 par immunofluorescence sur cerveau animal fixé est utilisée actuellement comme test diagnostique.

La production de protéine recombinante ULIP6 selon l'invention

20 permet la fabrication d'un test (de type Elisa ou Western Blot) rapide et fiable, pour détecter les anticorps anti-CV2.

De tels tests existent déjà pour les anticorps anti-Hu, anti-Yo et anti-Ri. Le test pour détecter les anti-CV2 dans le sérum des patients pourrait être prescrit en cas de suspicion de syndrome neurologique paranéoplasique

25 et inclurait par conséquent les anticorps anti-CV2 au même titre que les autres anticorps identifiés dans les SNP tels que précédemment cités.

L'invention vise donc également une méthode pour le diagnostic des syndromes neurologiques paranéoplasiques et/ou pour le diagnostic

30 précoce de la formation de tumeurs d'origine cancéreuse, caractérisée en ce que l'on met en évidence dans un échantillon biologique (tel que sang, sérum, LCR, etc) prélevé chez un individu des auto-anticorps dirigés contre une protéine ULIP6 par

- la mise en contact un échantillon biologique prélevé chez un individu avec un polypeptide purifié ULIP6 éventuellement fixé sur un support dans des conditions permettant la formation de complexes immunologiques spécifiques entre ledit polypeptide et les auto-anticorps éventuellement présent  
5 dans l'échantillon biologique, et
  - la détection des complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

L'invention a donc pour objet une composition utile pour le diagnostic des syndromes neurologiques paranéoplasiques et/ou pour le  
10 diagnostic précoce de la formation des tumeurs, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ULIP6 ou un fragment épitopique dudit polypeptide.

De manière avantageuse, on peut utiliser à la place du polypeptide complet la partie C-terminale comprenant l'épitope dominant (par exemple le fragment allant de l'acide aminé n° 475 à l'acide aminé 564). On  
15 peut en particulier utiliser un fragment épitopique du polypeptide ULIP 6, comprenant la séquence SEQ ID n°4. Le peptide de séquence SEQ ID n°4 a ainsi permis la production d'anticorps très spécifiques d'ULIP6.

L'invention a également pour objet un kit pour le diagnostic des  
20 syndromes neurologiques paranéoplasiques et pour le diagnostic précoce de la formation des tumeurs à partir d'un prélèvement biologique comprenant :

- au moins un polypeptide purifié ULIP6, éventuellement fixé sur un support,
- des moyens de révélation de la formation de complexes  
25 antigène/anticorps spécifiques entre un auto-anticorps anti-ULIP6 et ledit polypeptide purifié ULIP6, dérivé ou fragment polypeptidique et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

L'invention a également pour objet les anticorps mono- ou  
30 polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués, obtenus à partir d'un peptide ou polypeptide purifié ULIP comprenant une séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2 ou n°4 et leur utilisation, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP dans un échantillon biologique.

Des anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre la protéine, produite par exemple par recombinaison génétique suivant la méthode décrite ci-dessus, selon les modes opératoires usuels.

5 Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein.

Les anticorps peuvent être des anticorps chimériques, des anticorps humanisés, des fragments Fab et F(ab')<sub>2</sub>. Ils peuvent également se présenter sous forme d'immunoconjugués ou d'anticorps marqués.

10

L'invention porte également sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre la protéine ULIP6 pour la mise en évidence d'une protéine ULIP6 dans des néoplasmes, et des syndromes neurologiques paranéoplasiques à des fins de diagnostic.

15

De manière préférentielle, l'invention porte sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux obtenus à partir du sérum polyclonal anti-CV2 de patients par immortalisation de lymphocytes, selon les techniques usuelles connues de l'homme du métier.

20

Ainsi, les anticorps dirigés contre une protéine de la famille ULIP sont utiles pour détecter une expression anormale de protéine ULIP chez des patients présentant des syndromes neurologiques, chez qui aucun cancer n'a été diagnostiqué par les méthodes classiques. Cette expression anormale de protéine ULIP6 pourra être corrélée à l'existence d'un cancer qui n'avait pas été repéré. Ainsi, les anticorps dirigés contre la protéine ULIP6, sont utiles  
25 pour le diagnostic précoce d'un cancer.

30

Des anticorps humains ou non, obtenus chez des patients, ou après immunisation avec l'ensemble ou une partie de la protéine ULIP6 tels que définis précédemment, peuvent également être marqués de manière détectable par exemple par association à un élément radioactif, et être injectés  
à un individu. Par des procédés d'imagerie bien connus de l'homme du métier, ils peuvent permettre de détecter ou diagnostiquer une tumeur cancéreuse après réaction antigénique de ces anticorps avec les cellules de la tumeur.

L'invention a donc également pour objet une méthode de détection ou de diagnostic d'une tumeur cancéreuse comprenant l'administration à un patient d'un anticorps tel que défini précédemment marqué de manière détectable et la visualisation par imagerie du site de fixation de cet anticorps.

L'invention a également pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un agent thérapeutique choisi parmi une protéine purifiée ULIP6, ou un acide nucléique codant pour ladite protéine, une séquence anti-sens capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou n°3, ou un anticorps dirigé contre ladite protéine, associée à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

L'invention comprend de manière préférentielle des compositions pharmaceutiques comprenant comme principe actif un polypeptide ULIP6 purifié, préférentiellement sous forme soluble, associé à un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

De telles compositions offrent une nouvelle approche pour traiter les désordres du système nerveux central et périphérique et de la vision, et notamment les syndromes neurologiques paranéoplasiques. Par ailleurs, elles sont utiles pour traiter les désordres neurologiques liés à une perte neuronale et/ou une sous-expression de la protéine ULIP6 dans le système nerveux.

Ainsi, ULIP6 révèle aussi un intérêt dans des pathologies neurodégénératives telles que les atrophies multisystémiques qui sont des affections similaires à celles des SNP et pour lesquelles une anomalie d'une sous-population oligodendrocytaire a été détectée (Papp et al., 1992).

Les compositions selon l'invention sont par ailleurs utiles en thérapie anticancéreuse.

Les anticorps dirigés contre la protéine ULIP6 peuvent être associés à des agents antinéoplasiques, permettant ainsi le ciblage des médicaments vers les cellules tumorales.

Ils peuvent en outre être associés à un groupe chimique hydrophile choisi de manière à passer ou non la barrière hémato-encéphalique, selon le type de tumeur.

La protéine ULIP6 ainsi que les séquences nucléotidiques décrites plus haut, et les séquences ou oligonucléotides anti-sens, peuvent être utiles dans la thérapie de tout type de cancer dans lequel un gène codant pour la protéine ULIP6 est impliqué. Parmi des exemples de cancers, on peut  
5 citer les tumeurs périphériques, telles que le cancer du poumon à petites cellules, le thymome, le cancer du sein et de l'ovaire, ainsi que les tumeurs cérébrales, de préférence les tumeurs cérébrales primitives d'origine gliale. L'expression d'ULIP6 dans les cellules non prolifératives du cerveau normal, son absence dans des tissus normaux tels que poumon ou thymus par  
10 exemple, sa réexpression différentielle lors de la tumorigénèse de ces tissus et la modulation de son expression dans une lignée tumorale au cours de la différenciation suggèrent à cet égard que ULIP 6 pourrait être un gène suppresseur de tumeur.

On peut également utiliser un composé ou un mélange de  
15 composés d'origine synthétique ou naturelle qui inhibe l'action de l'ULIP 6.

Alternativement, une stimulation de l'ULIP 6 peut être recherchée. On peut alors utiliser un composé ou un mélange de composés d'origine synthétique ou naturelle qui active l'expression ou l'action de la protéine ULIP 6.

20 Ces composés activateurs ou inhibiteurs peuvent être inclus dans des compositions pharmaceutiques.

Préférentiellement, les compositions pharmaceutiques selon l'invention peuvent être administrées par voie systémique, de préférence par voie intraveineuse, par voie intramusculaire, intradermique ou par voie orale.

25 Leurs modes d'administration, posologies et formes galéniques optimaux peuvent être déterminés selon les critères généralement pris en compte dans l'établissement d'un traitement thérapeutique adapté à un patient comme par exemple l'âge ou le poids corporel du patient, la gravité de son état général, la tolérance au traitement et les effets secondaires constatés, etc.

30 L'invention comprend également l'utilisation d'une protéine purifiée ULIP6, un acide nucléique codant pour ladite protéine ou appartenant aux régions non codantes du gène de l'ULIP6, une séquence anti-sens

capable de s'hybrider spécifiquement avec une séquence nucléotidique SEQ ID n°1 ou n°3, ou un anticorps dirigé contre ladite protéine, associée à un véhicule pharmaceutiquement acceptable, pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives et les néoplasmes.

5

L'invention a enfin pour objet une méthode de traitement des maladies neurodégénératives et des néoplasmes comprenant l'administration à un sujet nécessitant un tel traitement d'une quantité thérapeutiquement efficace d'une composition pharmaceutique telle que définie précédemment.

10

Les exemples et les figures dont les légendes sont présentées ci-après sont donnés à titre illustratif.

15

### **LEGENDE DES FIGURES**

- La figure 1 représente un Western Blot réalisé à partir d'extraits protéiques d'*E. coli* exprimant la protéine de fusion GST-ULIP6 C-term. Ces extraits ont été séparés par SDS-PAGE 12,5 %, transférés sur membrane de PVDF et incubés avec des sérums humains. Pistes 1 à 14 : sérums anti-CV2 ;  
20 pistes 15 à 17 : sérums contrôles.

- La figure 2 représente un Western Blot réalisé à partir de protéines de fusion GST-ULIP6 C-term après purification sur billes d'agarose-glutathione. La protéine est reconnue par deux sérums anti-CV2, (piste 1 :  
25 sérum 94-822, piste 2 : sérum 95-590) mais pas par un sérum contrôle (ligne 3).

### **Exemple 1 : Identification de la cible des anticorps anti-CV2**

Après expression des protéines recombinantes de la famille Ulip  
30 dans des cellules HeLa, les auteurs de l'invention ont pu montrer que les sérums anti-CV2 alors en leur possession reconnaissaient tous Ulip4 en immunohistochimie. Ce résultat suggérait que Ulip4 pouvait être l'antigène

majeur reconnu par les sérums anti-CV2 (Honorat et al, 1999). Par contre, lorsque une cohorte plus importante de sérums a été testée en Western blot sur la protéine Ulip4 exprimée dans *E. coli*, ils se sont aperçus que si plusieurs sérums anti-CV2 reconnaissaient indiscutablement la protéine recombinante Ulip4, certains ne la reconnaissaient pas, alors que tous les sérums anti-CV2 reconnaissent par Western blot une même protéine de 66kDa après immunoprécipitation d'extraits protéiques de cerveaux (Honorat et al, 1996). De plus, par hybridation *in situ*, les oligodendrocytes n'exprimaient pas l'ARN messenger de Ulip4. Les auteurs de l'invention ont alors émis l'hypothèse de l'existence d'une autre protéine homologue aux protéines Ulip, non encore décrite et exprimée par les oligodendrocytes.

Pour rechercher cette protéine, un sérum anti-CV2, ne reconnaissant pas Ulip4 recombinante par Western blot a été utilisé pour cribler une banque d'expression. Une banque d'ADNc de moëlle épinière humaine, lieu d'expression maximale de l'antigène CV2 chez l'adulte, clonés dans le phage lambda gt11 a été choisie (Clontech, Palo Alto, USA). Les phages ont été criblés à une densité de  $2 \times 10^4$  pfu par boîtes de 150 mm de diamètres. Après incubation 3 heures 30 à 42°C, les boîtes étaient recouverte d'une membrane de nitrocellulose incubée dans l'IPTG (10 mmolaires) et réincubées 3 heures à 37°C. Les membranes étaient ensuite saturées dans du PBS-Tween-lait écrémé, puis incubées une nuit avec le sérum dilué au 1/100. Les membranes étaient ensuite lavées en PBS-Tween puis incubées avec un anti-sérum anti-immunoglobuline humaine marqué à la peroxidase. Après lavage, les membranes étaient révélées par la méthode de diaminobenzidine. Les clones donnant un signal positif ont été purifiés par repiquages successifs jusqu'à obtenir 100% de clones positifs. Quatre ADNc de 1400 à 1700 paires de bases et codant pour la partie C-terminale d'une même protéine ont été identifiés. Le clone présentant la plus grande séquence codante (clone 97) contenait 1490 paires de bases (nucléotides 1585 à 3074 de la séquence ID n°1) avec un cadre ouvert de lecture de 270 nucléotides codant pour un polypeptide de 90 acides aminés (acides aminés 475 à 564 de la séquence ID n°2). Après recherche d'homologie dans des

banques de données, il a été constaté que ce polypeptide (nommé dans la suite de l'étude Ulip6 C-Term) présentait une homologie de 35% avec la partie C-terminale de chacun des membres déjà connu de la famille Ulip et qu'il n'existait aucune homologie avec d'autres familles de protéines.

5

### **Exemple 2 : Production de la protéine recombinante GST-ULIP6 C-Term**

Pour confirmer que ce polypeptide était bien l'antigène reconnu par les sérums anti-CV2, la phase codante du clone 97 a été clonée dans un vecteur d'expression bactérien, pGex 2T (Pharmacia Amersham Biotech, Suède). Ce vecteur permet l'expression, chez E.coli, de la protéine d'intérêt en fusion avec la glutathione-S-transferase (GST, 26kDa). Par Western-blot, 16 des 18 sérums anti-CV2 testés reconnaissaient la protéine de fusion GST-Ulip6-C-Term dans un extrait protéique bactérien, soit 89 % de positifs (Figure 1). Il est à noter que le polypeptide Ulip6 C-Term a un poids moléculaire de 10 kDa ce qui représente environ 15 % d'une protéine de 66 kDa. Aucun de ces sérums ne reconnaissait la GST seule. 100 sérums contrôles ont également été testés. Aucun ne présentait de réactivité vis à vis de la protéine de fusion GST-Ulip6 C-Term. Dans le but de disposer du test le plus spécifique possible, les auteurs de l'invention ont également testé les sérums anti-CV2 sur la protéine de fusion GST-Ulip6 C-Term purifiée sur billes d'agarose-glutathione. La figure 2 montre un exemple des résultats obtenus en Western blot.

25

### **Exemple 3 : Northern-blot sur ARN de moelle épinière humaine**

Pour déterminer la taille du transcript du gène Ulip6, une analyse par Northern blot a été réalisée sur des ARN polyA+ purifiés extraits de moelle épinière humaine (Clontech, Palo Alto, USA). La sonde correspondait à la totalité du clone 97 marqué au dCTP alpha <sup>32</sup>P. Les ARN ont été séparés sur

30

gel d'électrophorèse agarose 1,2% formaldéhyde et transférés sur membrane de nylon. Après préhybridation avec la solution d'hybridation rapide (Clontech, Palo Alto, USA) la membrane était incubée une heure avec la sonde. Après lavage, la membrane était exposée sur un film pendant une nuit à -80°C. Une  
5 seule bande correspondant à un transcrit de 5 kb a été révélée.

#### **Exemple 4 : Hybridation *in situ* sur moelle épinière**

Pour vérifier la présence de l'ARN messager de Ulip6 dans les  
10 oligodendrocytes, une analyse par hybridation *in situ* a été réalisée sur coupe frontale de moelle. La sonde utilisée était une sonde ARN froide obtenue par transcription du clone 97 sous cloné dans pBluescript SK (Stratagène) et marquée à la digoxigénine. Une sonde sens était utilisée comme contrôle négatif. Un marquage spécifique des oligodendrocytes a pu être observé.

15

#### **Exemple 5 : Production d'un anticorps de lapin anti-Ulip6**

Des anticorps polyclonaux ont été produits par immunisation de  
lapins contre un peptide spécifique de la protéine Ulip6 (peptide Pep  
20 Ulip6="KEMGTPLADTPTRPVTRHGG" de séquence SEQ ID n°4 ,  
correspondant au fragment d'acides aminés 505 à 524 sur SEQ ID n°2). Le peptide a été synthétisé sur un appareil de synthèse peptidique (432A Peptide Synthesizer SYNERGY, Applied Biosystems), par la société COVALAB (Lyon, France). La pureté des échantillons a été contrôlée par HPLC et spectrométrie  
25 de masse. Un milligramme de peptide couplé à l'hémocyanine et à de l'adjuvant complet de Freund a été injecté aux lapins (COVALAB, Lyon, France). Toutes les 3 semaines, une nouvelle injection de 0,5 mg a été réalisée. La production d'anticorps et leur spécificité ont été analysées par western-blots et immunohistochimie, en utilisant comme contrôle les sérums  
30 pré-immuns.

Les anticorps obtenus reconnaissent la protéine GST-Ulip6 C-Term par western-blot, une protéine de 66 kDa sur extraits de cerveau et

marquaient spécifiquement des oligodendrocytes par immunohistochimie sur coupes de moelle de rats.

### **Exemple 6 : Recherche de la séquence complète Ulip6**

5

Pour obtenir un ADNc complet de Ulip6, la banque d'ADNc de moëlle épinière humaine, clonés dans le phage lambda gt11 (Clontech, Palo Alto, USA) a été criblée avec une sonde radioactive. Cette sonde obtenue par PCR était marquée au dCTP alpha <sup>32</sup>P, et correspondait aux nucléotides 1585 à 1854 de la séquence ID N°1. Les phages ont été criblés à une densité de 2x10<sup>4</sup> pfu par boîtes de 150 mm de diamètres. Après incubation 6 heures à 37°C, une réplique était obtenue sur une membrane de nylon. Cette membrane était traitée pour dénaturation des phages, puis l'ADN était fixé une nuit à 42°C. Après préhybridation avec la solution d'hybridation rapide (Clontech, Palo Alto, USA) la membrane était incubée une heure avec la sonde radioactive. Après lavage, la membrane était exposée sur un film pendant une nuit à -80°C. des clones donnant un signal positif ont été purifiés par repiquages successifs jusqu'a obtenir 100% de clones positifs. Le plus grand ADNc obtenu comprenait 3074 nucléotides (SEQ ID n° 1) et comprenait un cadre ouvert de lecture de 1692 nucléotides (nucléotides n° 163 à 1854 de la SEQ ID n° 1). Il codait pour une protéine de 564 acides aminés (SEQ ID n° 2), dont la partie C-terminale était strictement identique au polypeptide ULIP6 C-term (acides aminés 475 à 564 sur SEQ ID n° 2). Après alignement de la protéine obtenue avec les quatre protéines ULIP/CRMP humaines connues, une homologie de 50 % était observée.

10  
15  
20  
25

**BIBLIOGRAPHIE**

- 99  
5  
- Anderson et al., CRC Crit. Rev. Neurobiol., 1987, vol. 3, pp 245-99
- Antoine J.C. et al., Journal of the Neurological Sciences, 1993, vol. 117, pp 215-223
- 10 701  
- Byk et al., Journal of Neuroscience, 1996, vol. 16(2), pp 688-701
- Byk T, Ozon S, Sobel A (1998). Eur J. Biochem, 254:14-24
- Dalmau et al., Neurology, 1991, vol. 41, pp 1757-64
- 15  
- Graus et al., Neurology, 1985, vol. 35, pp 538-543
- Greenlee et al., Ann. Neurol., 1983, vol. 14, pp 609-13
- 20  
- Hamajima N, Matsuda K, Sakata S, Tamaki M, Nonaka M (1996). Gene,180 :157-163.
- Hetzel et al., Mayo Clin. Proc., 1990, vol. 65, pp 1558-63
- 25  
- Honnorat J. et al., Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1996, vol. 61, pp 270-278
- Jaeckle et al., Ann. Neurol., 1985, vol. 18, pp 592-600
- 30  
- Köhler et Milstein, Nature, 1975, vol. 256, pp 495-497
- Levy N., Mattei MG., 1995, Geneprobs II, a practical approach. BD Hames and SJ Higgins, Oxford University Press, pp 211-243

- Luque et al., Ann. Neurol., 1991, vol. 29, pp 241-51

- Sambrook et al., Molecular Cloning, a laboratory Manual, 1989,

5 9.47-9.62

- Wang LH and Strittmatter SM (1996). J Neurosci, 16:6197-6207.

10

## REVENDICATIONS

1. Polypeptide purifié désigné ULIP6, comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n° 2 ou fragment épitopique dudit polypeptide,  
5 comprenant la séquence SEQ ID n°4.
2. Acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide ou un fragment épitopique dudit polypeptide tel que défini dans la revendication 1.
3. Acide nucléique selon la revendication 2, comprenant une  
10 séquence nucléotidique SEQ ID n° 1.
4. Acide nucléique isolé consistant en une séquence nucléotidique SEQ ID n°3 ou la séquence allant du nucléotide 1 au nucléotide 162 de SEQ ID n° 1.
5. Vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une  
15 séquence d'acide nucléique selon l'une des revendications 2 à 4.
6. Cellule hôte transfectée par un vecteur selon la revendication 5.
7. Anticorps mono- ou polyclonaux obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1 ainsi que les fragments, les anticorps  
20 chimériques ou les immunoconjugués desdits anticorps mono- ou polyclonaux.
8. Composition utile pour le diagnostic des syndromes neurologiques paranéoplasiques et/ou pour le diagnostic précoce de la formation des tumeurs, caractérisée en ce qu'elle comprend un polypeptide ou un fragment épitopique dudit polypeptide tel que défini dans la revendication 1.
- 25 9. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 1 pour détecter la présence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique.
10. Utilisation d'anticorps mono- ou polyclonaux ou leurs fragments, anticorps chimériques ou immunoconjugués selon la revendication 7, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP6 selon la  
30 revendication 1, dans un échantillon biologique.
11. Méthode pour le diagnostic des syndromes neurologiques paranéoplasiques et/ou pour le diagnostic précoce de la formation des tumeurs cancéreuses, dans lequel on met en évidence dans un échantillon biologique

prélevé chez un individu des auto-anticorps dirigés contre une protéine ULIP 6 par

- la mise en contact d'un échantillon biologique prélevé chez un individu avec un polypeptide selon la revendication 1, éventuellement fixé sur un support dans des conditions permettant la formation de complexes immunologiques spécifiques entre ledit polypeptide et les auto-anticorps éventuellement présents dans l'échantillon biologique, et

- la détection des complexes immunologiques spécifiques éventuellement formés.

12. Kit pour le diagnostic des syndromes neurologiques paranéoplasiques et pour le diagnostic précoce de la formation des tumeurs à partir d'un prélèvement biologique comprenant :

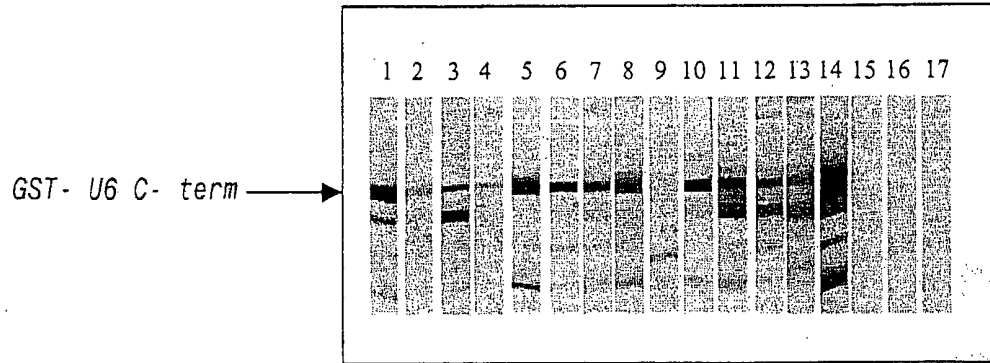
- au moins un polypeptide ULIP6, selon la revendication 1, éventuellement fixé sur un support,

- des moyens de révélation de la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre un auto-anticorps anti-ULIP6 et ledit polypeptide ULIP6 et/ou des moyens de quantification de ces complexes.

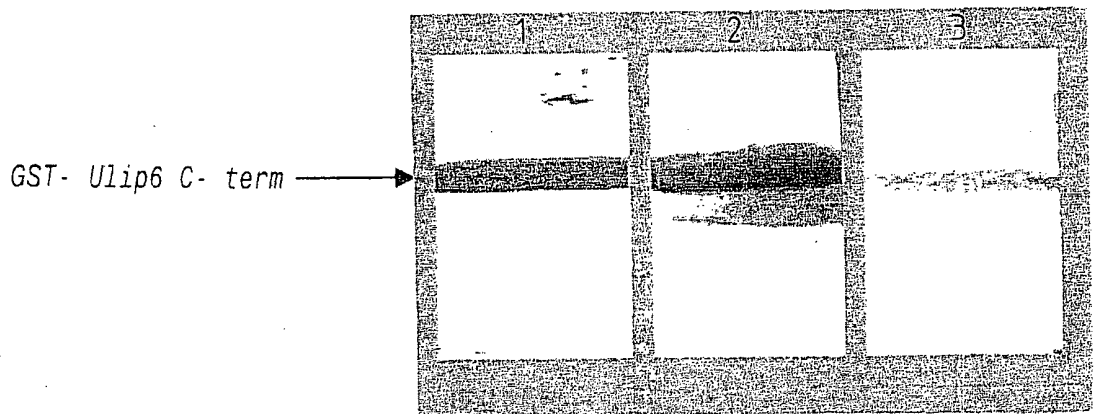
13. Composition pharmaceutique comprenant au moins un agent thérapeutique choisi parmi un polypeptide selon la revendication 1, un acide nucléique selon la revendication 2 à 4 ou un acide nucléique comprenant une séquence anti-sens capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique selon la revendication 2 à 4, ou un anticorps spécifiquement dirigé contre le polypeptide selon la revendication 7; en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

14. Utilisation d'un agent thérapeutique tel que défini dans la revendication 13 pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives et les néoplasmes.

1/1



**FIG.1**



**FIG.2**

LISTE DE SEQUENCES

<110> INSERM

<120> Nouvelle protéine ULIP/CRMP humaine et son utilisation dans le diagnostic et la thérapie des cancers et des syndromes neurologiques paranéoplasiques

<130> BET 01/0161

<140>

<141>

<160> 4

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 3074

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (163)..(1854)

<400> 1

cccccccccac tctggactcc cgcgctgggc gcgctgaggc ggcccccgag cgagcgcgcg 60

tgcagccgcc gccgccccga gcaccgcgag ctccggcgcc gcggcgagac ggagacggac 120

cgagccacgg gccccgcgg ccgcagcatc tcggaggaga ac atg ctt gcc aac 174  
Met Leu Ala Asn  
1

tca gcc agc gtg agg atc ctc atc aag gga ggc aag gtg gtg aac gat 222  
Ser Ala Ser Val Arg Ile Leu Ile Lys Gly Gly Lys Val Val Asn Asp  
5 10 15 20

gac tgc acc cac gag gct gac gtc tac atc gag aat ggc atc atc cag 270  
Asp Cys Thr His Glu Ala Asp Val Tyr Ile Glu Asn Gly Ile Ile Gln  
25 30 35

cag gtg ggc cgc gag ctc atg atc cct ggc ggg gcc aag gtg att gat 318  
Gln Val Gly Arg Glu Leu Met Ile Pro Gly Gly Ala Lys Val Ile Asp  
40 45 50

gcc aca gga aaa ctg gtg atc cct ggt ggc atc gac acc agc acc cac 366  
Ala Thr Gly Lys Leu Val Ile Pro Gly Gly Ile Asp Thr Ser Thr His  
55 60 65

ttc cac cag acc ttc atg aat gcc acg tgc gtg gac gac ttc tac cat 414  
Phe His Gln Thr Phe Met Asn Ala Thr Cys Val Asp Asp Phe Tyr His  
70 75 80

ggg acc aag gca gca ctc gtc gga ggc acc acc atg atc atc ggc cac 462  
Gly Thr Lys Ala Ala Leu Val Gly Gly Thr Thr Met Ile Ile Gly His  
85 90 95 100

gtc ctg ccc gac aag gag acc tcc ctt gtg gac gct tat gag aag tgc 510

Val	Leu	Pro	Asp	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Asp	Ala	Tyr	Glu	Lys	Cys		
				105					110					115			
cga	ggt	ctg	gcc	gac	ccc	aag	gtc	tgc	tgt	gat	tac	gcc	ctc	cac	gtg	558	
Arg	Gly	Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Val	Cys	Cys	Asp	Tyr	Ala	Leu	His	Val		
			120					125					130				
ggg	atc	acc	tgg	tgg	gca	ccc	aag	gtg	aaa	gca	gaa	atg	gag	aca	ctg	606	
Gly	Ile	Thr	Trp	Trp	Ala	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	Glu	Met	Glu	Thr	Leu		
			135				140					145					
gtg	agg	gag	aag	ggt	gtc	aac	tcg	ttc	cag	atg	ttc	atg	acc	tac	aag	654	
Val	Arg	Glu	Lys	Gly	Val	Asn	Ser	Phe	Gln	Met	Phe	Met	Thr	Tyr	Lys		
	150					155					160						
gac	ctg	tac	atg	ctt	cga	gac	agt	gag	ctg	tac	caa	gtg	ttg	cac	gct	702	
Asp	Leu	Tyr	Met	Leu	Arg	Asp	Ser	Glu	Leu	Tyr	Gln	Val	Leu	His	Ala		
165					170					175					180		
tgc	aag	gac	att	ggg	gca	atc	gcc	cgc	gtc	cat	gct	gaa	aat	ggg	gag	750	
Cys	Lys	Asp	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Arg	Val	His	Ala	Glu	Asn	Gly	Glu		
				185					190					195			
ctt	gtg	gcc	gag	ggt	gct	aag	gag	gca	ctg	gat	ttg	ggg	atc	aca	ggc	798	
Leu	Val	Ala	Glu	Gly	Ala	Lys	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Gly	Ile	Thr	Gly		
			200					205					210				
cca	gaa	gga	atc	gag	atc	agc	cgt	cca	gag	gag	ctg	gaa	gct	gaa	gcc	846	
Pro	Glu	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Arg	Pro	Glu	Glu	Leu	Glu	Ala	Glu	Ala		
		215					220					225					
act	cat	cgt	ggt	atc	acc	att	gca	aac	agg	act	cac	tgt	cca	atc	tac	894	
Thr	His	Arg	Val	Ile	Thr	Ile	Ala	Asn	Arg	Thr	His	Cys	Pro	Ile	Tyr		
	230					235					240						
ctg	gtc	aac	gtg	tcc	agt	atc	tcg	gct	ggt	gac	ggt	atc	gca	gct	gct	942	
Leu	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp	Val	Ile	Ala	Ala	Ala		
245					250					255					260		
aag	atg	caa	ggg	aag	ggt	gtg	ctg	gcg	gag	acc	acc	act	gca	cat	gcc	990	
Lys	Met	Gln	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Glu	Thr	Thr	Thr	Ala	His	Ala		
				265					270					275			
acg	ctg	aca	ggc	tta	cac	tac	tac	cac	cag	gac	tgg	tcc	cac	gcg	gct	1038	
Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	His	Tyr	Tyr	His	Gln	Asp	Trp	Ser	His	Ala	Ala		
			280					285					290				
gcc	tat	gtc	acg	gtg	cct	ccc	ctg	aga	ctg	gac	acc	aac	acc	tca	acc	1086	
Ala	Tyr	Val	Thr	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Thr	Asn	Thr	Ser	Thr		
		295					300					305					
tac	ctc	atg	agc	ctg	ctg	gcc	aat	gac	act	ctg	aac	atc	gtg	gca	tca	1134	
Tyr	Leu	Met	Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn	Ile	Val	Ala	Ser		
	310					315					320						
gat	cac	cgg	cct	ttc	acc	aca	aag	cag	aaa	gct	atg	ggc	aag	gaa	gac	1182	
Asp	His	Arg	Pro	Phe	Thr	Thr	Lys	Gln	Lys	Ala	Met	Gly	Lys	Glu	Asp		
325					330					335					340		
ttc	acc	aag	atc	cca	cat	gga	gtg	agt	ggc	gtg	cag	gac	cgc	atg	agc	1230	

Phe	Thr	Lys	Ile	Pro	His	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Gln	Asp	Arg	Met	Ser		
				345					350					355			
gtc	atc	tgg	gag	aga	gga	gtg	gtt	gga	gga	aag	atg	gat	gag	aac	cgt		1278
Val	Ile	Trp	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Lys	Met	Asp	Glu	Asn	Arg		
			360					365					370				
ttt	gtg	gcc	gtt	acc	agt	tcc	aac	gca	gct	aag	ctt	ctg	aac	ctg	tat		1326
Phe	Val	Ala	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Ala	Ala	Lys	Leu	Leu	Asn	Leu	Tyr		
		375					380					385					
ccc	cgc	aag	ggc	cgc	att	att	ccc	gga	gcc	gat	gct	gat	gtg	gtg	gtg		1374
Pro	Arg	Lys	Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Gly	Ala	Asp	Ala	Asp	Val	Val	Val		
	390					395				400							
tgg	gac	cca	gaa	gcc	aca	aag	acc	atc	tca	gcc	agc	acg	cag	gtc	cag		1422
Trp	Asp	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser	Thr	Gln	Val	Gln		
405					410					415					420		
gga	gga	gac	ttc	aac	ctg	tat	gag	aac	atg	cgc	tgc	cac	ggc	gtg	cca		1470
Gly	Gly	Asp	Phe	Asn	Leu	Tyr	Glu	Asn	Met	Arg	Cys	His	Gly	Val	Pro		
				425					430					435			
ctg	gtc	acc	atc	agc	cgg	ggg	cgc	gtc	gtg	tat	gag	aac	ggc	gtc	ttc		1518
Leu	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Gly	Arg	Val	Val	Tyr	Glu	Asn	Gly	Val	Phe		
			440					445					450				
atg	tgc	gcc	gag	ggc	acc	ggc	aag	ttc	tgt	ccc	ctg	agg	tcc	ttc	cca		1566
Met	Cys	Ala	Glu	Gly	Thr	Gly	Lys	Phe	Cys	Pro	Leu	Arg	Ser	Phe	Pro		
		455					460					465					
gac	act	gtc	tac	aag	aag	ctg	gtc	cag	aga	gag	aag	act	tta	aag	gtt		1614
Asp	Thr	Val	Tyr	Lys	Lys	Leu	Val	Gln	Arg	Glu	Lys	Thr	Leu	Lys	Val		
	470					475					480						
aga	gga	gtg	gac	cgc	act	ccc	tac	ctg	ggg	gat	gtc	gct	gtt	gtc	gtg		1662
Arg	Gly	Val	Asp	Arg	Thr	Pro	Tyr	Leu	Gly	Asp	Val	Ala	Val	Val	Val		
485					490					495					500		
cac	cct	ggg	aaa	aaa	gag	atg	gga	acc	cca	ctc	gca	gac	act	cct	acc		1710
His	Pro	Gly	Lys	Lys	Glu	Met	Gly	Thr	Pro	Leu	Ala	Asp	Thr	Pro	Thr		
				505					510					515			
cgg	ccc	gtc	acc	cgg	cat	ggg	ggc	atg	agg	gac	ctt	cac	gaa	tcc	agc		1758
Arg	Pro	Val	Thr	Arg	His	Gly	Gly	Met	Arg	Asp	Leu	His	Glu	Ser	Ser		
			520					525					530				
ttc	agc	ctc	tct	ggc	tct	cag	atc	gat	gac	cat	gtt	cca	aag	cga	gct		1806
Phe	Ser	Leu	Ser	Gly	Ser	Gln	Ile	Asp	Asp	His	Val	Pro	Lys	Arg	Ala		
		535					540					545					
tca	gct	cgg	atc	ctc	gct	cct	ccc	gga	ggc	agg	tcg	agt	ggc	att	tgg		1854
Ser	Ala	Arg	Ile	Leu	Ala	Pro	Pro	Gly	Gly	Arg	Ser	Ser	Gly	Ile	Trp		
	550					555					560						
taaaggcatt gccaaagcccc ccgagtgagg acgcaccgcc gccacpagcc cgcaactctc 1914																	
cagccgaagc tgcaggggca ggagaggctg ggctgggtgg cacaccaccc gagggggggcc 1974																	
ccgggaccca cggagccctc cctatgtctg caaagtgatt cactgtgctt cgagccaact 2034																	

ctaacaggca ctttgagatg tgttcctcct gctgtagtcc tttctgcctt ggcctcggcg 2094  
 ggcttttctg gggcccagga agcccacact atgcacagag cccaatgcat agagccctgg 2154  
 ccagcccttc ctctcactcc tgcctccgct ggctttggga aagcccagac tttagtgcc 2214  
 tgccccctgg ctgactggcc agttgcccag agcactttag cagatgtggt ttcaaagtaa 2274  
 aggctcctc ccccaccct taggcccct ggtgacattt cccaagtcag acagatgtca 2334  
 gcttcccagc catgcccagg acgtcctatc tcccccaacc cacctctggc cctgtgtagg 2394  
 ggcagggatg ggggtggctg ggactcctgg tgcccctgc cagcttctcc tgcgccccgc 2454  
 ccacaccctc gggggggtca caggcccaga agggtagctg ggcggggctc gaggctggtg 2514  
 ccaggcgcgt gtaaatggtt ttgttttgca cgtttggtt gcgcagtagt ttggtttgac 2574  
 ttgtttgtgc atcctgtgaa aaataacggt gcttgtgtca ctagcataga atagcgacag 2634  
 gaatagatgt ggtccttagg agacgctgca cttgacacca accagacagc acagggcagg 2694  
 ggtggtggag ggggctgggc tcacaggcct ctctttccc cgcctgcagt cttctgggct 2754  
 gcgggaggcc ctggcccttt ccccttccc tcccctcctt gtctagtttc ccacattcca 2814  
 aaagggggcc tgggatgcta gccccagaga tgccagcct tcaggaagca ggtgtccttt 2874  
 cccctctctg cccctgatca ctcccagcac tcccctgcc ttcccctgtc ttcacctgcc 2934  
 accacacaca cacacacaca cacacacaca cacacagca tggcttcta taacttcttc 2994  
 ctgctggaca gagactcagc gctcctctg tgtgactggc aagaggcctc atgcctgctg 3054  
 agagagggtc gacgcggccg 3074

<210> 2

<211> 564

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Ala Asn Ser Ala Ser Val Arg Ile Leu Ile Lys Gly Gly Lys  
 1 5 10 15  
 Val Val Asn Asp Asp Cys Thr His Glu Ala Asp Val Tyr Ile Glu Asn  
 20 25 30  
 Gly Ile Ile Gln Gln Val Gly Arg Glu Leu Met Ile Pro Gly Gly Ala  
 35 40 45  
 Lys Val Ile Asp Ala Thr Gly Lys Leu Val Ile Pro Gly Gly Ile Asp  
 50 55 60  
 Thr Ser Thr His Phe His Gln Thr Phe Met Asn Ala Thr Cys Val Asp  
 65 70 75 80  
 Asp Phe Tyr His Gly Thr Lys Ala Ala Leu Val Gly Gly Thr Thr Met

				85						90						95	
Ile	Ile	Gly	His	Val	Leu	Pro	Asp	Lys	Glu	Thr	Ser	Leu	Val	Asp	Ala		
			100					105					110				
Tyr	Glu	Lys	Cys	Arg	Gly	Leu	Ala	Asp	Pro	Lys	Val	Cys	Cys	Asp	Tyr		
		115					120					125					
Ala	Leu	His	Val	Gly	Ile	Thr	Trp	Trp	Ala	Pro	Lys	Val	Lys	Ala	Glu		
	130					135					140						
Met	Glu	Thr	Leu	Val	Arg	Glu	Lys	Gly	Val	Asn	Ser	Phe	Gln	Met	Phe		
145					150					155					160		
Met	Thr	Tyr	Lys	Asp	Leu	Tyr	Met	Leu	Arg	Asp	Ser	Glu	Leu	Tyr	Gln		
				165					170					175			
Val	Leu	His	Ala	Cys	Lys	Asp	Ile	Gly	Ala	Ile	Ala	Arg	Val	His	Ala		
			180					185					190				
Glu	Asn	Gly	Glu	Leu	Val	Ala	Glu	Gly	Ala	Lys	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu		
		195					200					205					
Gly	Ile	Thr	Gly	Pro	Glu	Gly	Ile	Glu	Ile	Ser	Arg	Pro	Glu	Glu	Leu		
	210					215					220						
Glu	Ala	Glu	Ala	Thr	His	Arg	Val	Ile	Thr	Ile	Ala	Asn	Arg	Thr	His		
225					230					235					240		
Cys	Pro	Ile	Tyr	Leu	Val	Asn	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Ala	Gly	Asp	Val		
				245					250					255			
Ile	Ala	Ala	Ala	Lys	Met	Gln	Gly	Lys	Val	Val	Leu	Ala	Glu	Thr	Thr		
			260					265					270				
Thr	Ala	His	Ala	Thr	Leu	Thr	Gly	Leu	His	Tyr	Tyr	His	Gln	Asp	Trp		
		275					280					285					
Ser	His	Ala	Ala	Ala	Tyr	Val	Thr	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Leu	Asp	Thr		
	290					295					300						
Asn	Thr	Ser	Thr	Tyr	Leu	Met	Ser	Leu	Leu	Ala	Asn	Asp	Thr	Leu	Asn		
305					310					315					320		
Ile	Val	Ala	Ser	Asp	His	Arg	Pro	Phe	Thr	Thr	Lys	Gln	Lys	Ala	Met		
				325					330					335			
Gly	Lys	Glu	Asp	Phe	Thr	Lys	Ile	Pro	His	Gly	Val	Ser	Gly	Val	Gln		
			340					345					350				
Asp	Arg	Met	Ser	Val	Ile	Trp	Glu	Arg	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Lys	Met		
		355					360					365					
Asp	Glu	Asn	Arg	Phe	Val	Ala	Val	Thr	Ser	Ser	Asn	Ala	Ala	Lys	Leu		
	370					375					380						
Leu	Asn	Leu	Tyr	Pro	Arg	Lys	Gly	Arg	Ile	Ile	Pro	Gly	Ala	Asp	Ala		
385					390				395						400		
Asp	Val	Val	Val	Trp	Asp	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Ser		

405 410 415

Thr Gln Val Gln Gly Gly Asp Phe Asn Leu Tyr Glu Asn Met Arg Cys  
420 425 430

His Gly Val Pro Leu Val Thr Ile Ser Arg Gly Arg Val Val Tyr Glu  
435 440 445

Asn Gly Val Phe Met Cys Ala Glu Gly Thr Gly Lys Phe Cys Pro Leu  
450 455 460

Arg Ser Phe Pro Asp Thr Val Tyr Lys Lys Leu Val Gln Arg Glu Lys  
465 470 475 480

Thr Leu Lys Val Arg Gly Val Asp Arg Thr Pro Tyr Leu Gly Asp Val  
485 490 495

Ala Val Val Val His Pro Gly Lys Lys Glu Met Gly Thr Pro Leu Ala  
500 505 510

Asp Thr Pro Thr Arg Pro Val Thr Arg His Gly Gly Met Arg Asp Leu  
515 520 525

His Glu Ser Ser Phe Ser Leu Ser Gly Ser Gln Ile Asp Asp His Val  
530 535 540

Pro Lys Arg Ala Ser Ala Arg Ile Leu Ala Pro Pro Gly Gly Arg Ser  
545 550 555 560

Ser Gly Ile Trp

<210> 3  
 <211> 1218  
 <212> ADN  
 <213> Homo sapiens

<400> 3

aggcattgcc aagccccccg agtgaggacg caccgcccgc accagcccgc aactctccag 60  
 ccgaagctgc aggggcagga gaggctgggc tgggtggcac accacccgag gggggccccg 120  
 ggacccacgg agccctccct atgtctgcaa agtgattcac tgtgcttcga gccaaactcta 180  
 acaggcactt tgagatgtgt tcctcctgct gtagtccitt ctgccttggc ctcggcgggc 240  
 ttttctgggg cccaggaagc ccacactatg cacagagccc aatgcataga gccctggcca 300  
 gcccttcctc tcaactcctgc ctccgctggc tttgggaaag cccagacttt agtgccttgc 360  
 cccctggctg actggccagt tgcccagagc actttagcag atgtggtttc aaagtaaagg 420  
 cctcctcccc cacccttag gccccgtggt gacatttccc aagtcagaca gatgtcagct 480  
 tcccagccat gcccaggacg tcctatctcc cccaaccac ctctggccct gtgtaggggc 540  
 agggatgggg gtggctggga ctccctgggtgc ccctcgccag cttctcctgc gccccgcca 600  
 caccctcggg ggggtcacag gcccagaagg gtagctgggc ggggctcgag gctgggtgcca 660  
 ggcgctgta aatggttttg ttttgcacgt ttggtttgag cagtagtttg gtttgacttg 720  
 tttgtgcata ctgtgaaaaa taacggtgct tgtgtcacta gcatagaata gcgacaggaa 780  
 tagatgtggt ccttaggaga cgctgcactt gacaccaacc agacagcaca gggcaggggt 840  
 ggtggagggg gctgggctca caggcctctc ttttccccgc ctgcagtctt ctgggctgcg 900  
 ggagggccctg gccctttccc ctccccctcc cctccttgtc tagtttccca cattccaaaa 960  
 gggggcctgg gatgctagcc ccagagatgc cagcccttca ggaagcaggt gtcctttccc 1020  
 ctctctgccc ctgatcactc ccagcactcc ccttgcttc ccctgtcttc acctgccacc 1080  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacgcatgg cttcctataa cttcttctg 1140  
 ctggacagag actcagcgt cctcctgtgt gactggcaag aggctcatg cctgctgaga 1200



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internal application No  
PCT/IN J1/00589

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18 A61K38/17  
A61K48/00 A61K39/395

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 C07K C12N 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, BIOSIS, EMBL, GENSEQ, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 19 January 2000 (2000-01-19) YANAGI, S. ET AL.: "Rattus norvegicus mRNA for dihydropyrimidinase-related protein, complete cds." XP002157134</p>	<p>1,2,5-7, 10,13,14</p>
Y	<p>Accession AB029432</p> <p>-&amp; INATOME ET AL.: "Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain" J.BIOL.CHEM, vol. 275, no. 35, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 27291-27302, XP002157142 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	<p>9,11,12, 14</p>

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  22 May 2001	Date of mailing of the international search report  30/05/2001
--	--

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer  ALCONADA RODRIG..., A
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/TR 01/00589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 22 July 1999 (1999-07-22) HILLIER ET AL.: "au56c05.y1 Schneider fetal brain 0004 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2518760 5' similar to SW:DPY3_HUMAN Q14195 dihydropyrimidinase related protein-3, mRNA sequence" XP002157135 Accession AI879238</p> <p>---</p>	4
Y	<p>FR 2 759 701 A (INST NAT SANTE RECH MED) 21 August 1998 (1998-08-21) page 12, line 14 -page 13, line 11 page 14, line 4 - line 19 page 15, line 15 - line 27 claims 5-17</p> <p>---</p>	9,11,12, 14
A	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 22 July 1999 (1999-07-22) HILLIER ET AL.: "au56c05.x1 Schneider fetal brain 00004 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2518760 3', mRNA sequence" XP002157136 Accession AI879621</p> <p>---</p>	4
P,X	<p>FUKADA, M. ET AL.: "Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family" J.BIOL.CHEM, vol. 275, no. 48, 1 December 2000 (2000-12-01), pages 37957-37965, XP002157133 figure 1</p> <p>---</p>	1,2,5-7, 10,13
P,X	<p>DATABASE GENEMBL 'Online! 21 June 2000 (2000-06-21) HORIUCHI, M.: "Homo sapiens mRNA for hypothetical protein (ORF1)" XP002157137 Accession AJ251275 -&amp; HORIUCHI ET AL.: "Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain" FEBS LETTERS, vol. 480, no. 2-3, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 283-286, XP000961794</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,2,5-7, 10,13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:            plication No  
 PCT,     01/00589

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE GENEMBL 'Online! 6 July 2000 (2000-07-06) YU, Z. ET AL.: "Homo sapiens collapsin response mediator protein-5 (CRMP5) mRNA; complete cds." XP002157138 Accession AF157634 -----	1,2,5-7, 10,13

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Internat Application No

PCT/TRK 01/00589

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2759701 A	21-08-1998	EP 0980427 A WO 9837192 A	23-02-2000 27-08-1998
-----			

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/... 01/00589

**A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE**  
CIB 7 C07K14/47 C12N15/12 C12N5/10 C07K16/18 A61K38/17  
A61K48/00 A61K39/395

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

**B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE**

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)  
CIB 7 C07K C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)  
EPO-Internal, BIOSIS, EMBL, GENSEQ, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie °	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne! 19 janvier 2000 (2000-01-19) YANAGI, S. ET AL.: "Rattus norvegicus mRNA for dihydropyrimidinase-related protein, complete cds." XP002157134</p>	1,2,5-7, 10,13,14
Y	<p>Accession AB029432</p> <p>-&amp; INATOME ET AL.: "Identification of CRAM, a novel unc-33 gene family protein that associates with CRMP3 and protein-tyrosine kinase(s) in the developing rat brain" J.BIOL.CHEM, vol. 275, no. 35, 1 septembre 2000 (2000-09-01), pages 27291-27302, XP002157142 le document en entier</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	9,11,12, 14

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

° Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 mai 2001

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

30/05/2001

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, fax. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

ALCONADA RODRIG..., A

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No  
PCT/FR 01/00589

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne! 22 juillet 1999 (1999-07-22) HILLIER ET AL.: "au56c05.y1 Schneider fetal brain 0004 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2518760 5' similar to SW:DPY3_HUMAN Q14195 dihydropyrimidinase related protein-3, mRNA sequence" XP002157135 Accession AI879238</p> <p style="text-align: center;">---</p>	4
Y	<p>FR 2 759 701 A (INST NAT SANTE RECH MED) 21 août 1998 (1998-08-21) page 12, ligne 14 -page 13, ligne 11 page 14, ligne 4 - ligne 19 page 15, ligne 15 - ligne 27 revendications 5-17</p> <p style="text-align: center;">---</p>	9, 11, 12, 14
A	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne! 22 juillet 1999 (1999-07-22) HILLIER ET AL.: "au56c05.x1 Schneider fetal brain 00004 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2518760 3', mRNA sequence" XP002157136 Accession AI879621</p> <p style="text-align: center;">---</p>	4
P, X	<p>FUKADA, M. ET AL.: "Molecular characterization of CRMP5, a novel member of the collapsin response mediator protein family" J. BIOL. CHEM, vol. 275, no. 48, 1 décembre 2000 (2000-12-01), pages 37957-37965, XP002157133 figure 1</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1, 2, 5-7, 10, 13
P, X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne! 21 juin 2000 (2000-06-21) HORIUCHI, M.: "Homo sapiens mRNA for hypothetical protein (ORF1)" XP002157137 Accession AJ251275 -&amp; HORIUCHI ET AL.: "Ulip6, a novel unc-33 and dihydropyrimidinase related protein highly expressed in developing rat brain" FEBS LETTERS, vol. 480, no. 2-3, 1 septembre 2000 (2000-09-01), pages 283-286, XP000961794</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1, 2, 5-7, 10, 13

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Deman nationale No  
PCT/FR 01/00589

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>DATABASE GENEMBL 'en ligne!                      6 juillet 2000 (2000-07-06)                      YU, Z. ET AL.: "Homo sapiens collapsin                      response mediator protein-5 (CRMP5) mRNA;                      complete cds."                      XP002157138                      Accession AF157634                      -----</p>	<p>1,2,5-7,                      10,13</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux .....bres de familles de brevets

Demande internationale No  
PCT/TRK 01/00589

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2759701 A	21-08-1998	EP 0980427 A WO 9837192 A	23-02-2000 27-08-1998
-----			