



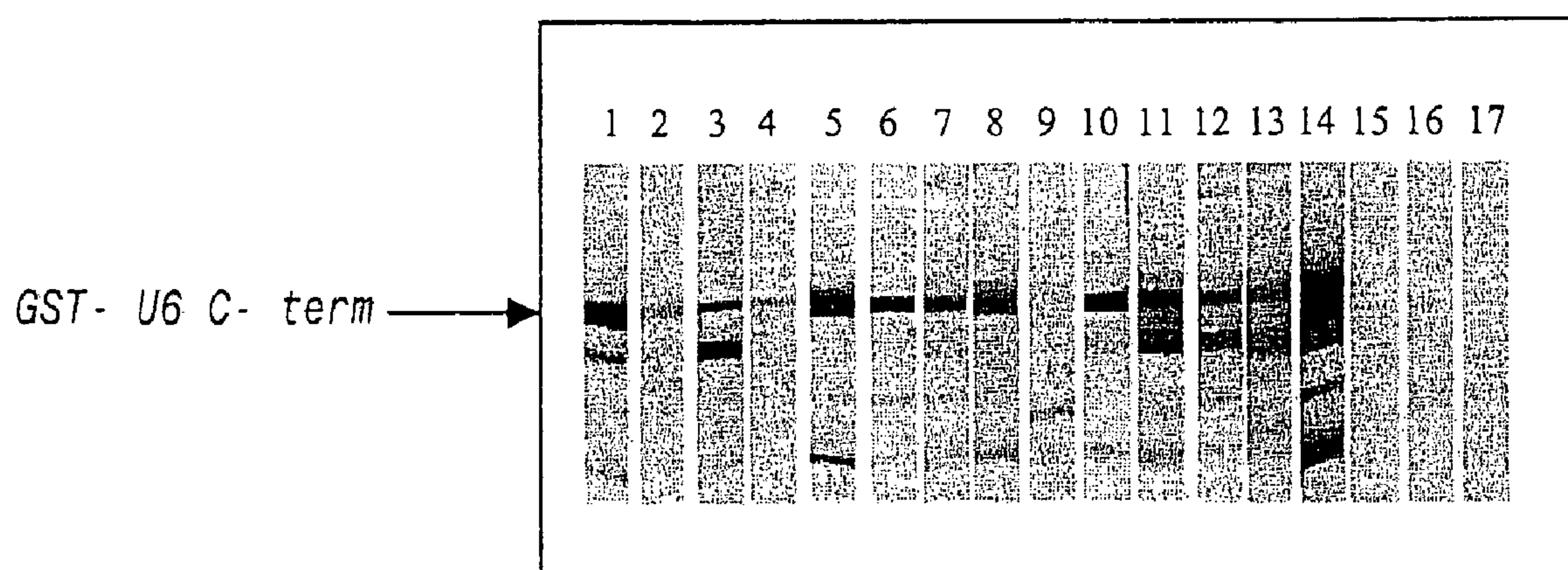
(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2001/02/28
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2001/09/07
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2011/11/29
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2002/08/27
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2001/000589
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2001/064737
(30) Priorités/Priorities: 2000/02/29 (FR00/02566);
2000/04/18 (FR00/05005)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C07K 14/47* (2006.01),
A61K 38/17 (2006.01), *A61K 39/395* (2006.01),
A61K 48/00 (2006.01), *C07K 16/18* (2006.01),
C12N 15/12 (2006.01), *C12N 5/10* (2006.01),
A61K 38/00 (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
AGUERA, MICHELE, FR;
ANTOINE, JEAN-CHRISTOPHE, FR;
BELIN, MARIE-FRANCOISE, FR;
HONNORAT, JEROME, FR;
ROGEMONT, VERONIQUE, FR

(73) Propriétaire/Owner:

(54) Titre : NOUVELLE PROTEINE ULIP/CRMP HUMAINE ET SON UTILISATION DANS LE DIAGNOSTIC ET LA
THERAPIE DES CANCERS ET DES SYNDROMES NEUROLOGIQUES PARANEOPLASIQUES
(54) Title: NOVEL HUMAN ULIP/CRMP PROTEIN AND USE THEREOF IN DIAGNOSIS AND TREATMENT OF
CANCERS AND PARANEOPLASTIC NEUROLOGICAL SYNDROMES



(57) Abrégé/Abstract:

L'invention a pour objet un polypeptide purifié, designé 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.

(73) **Propriétaires(suite)/Owners(continued):**

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE (INSERM), FR

(74) **Agent:** ROBIC

(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 brevets⁷ :
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) FRMichèle [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

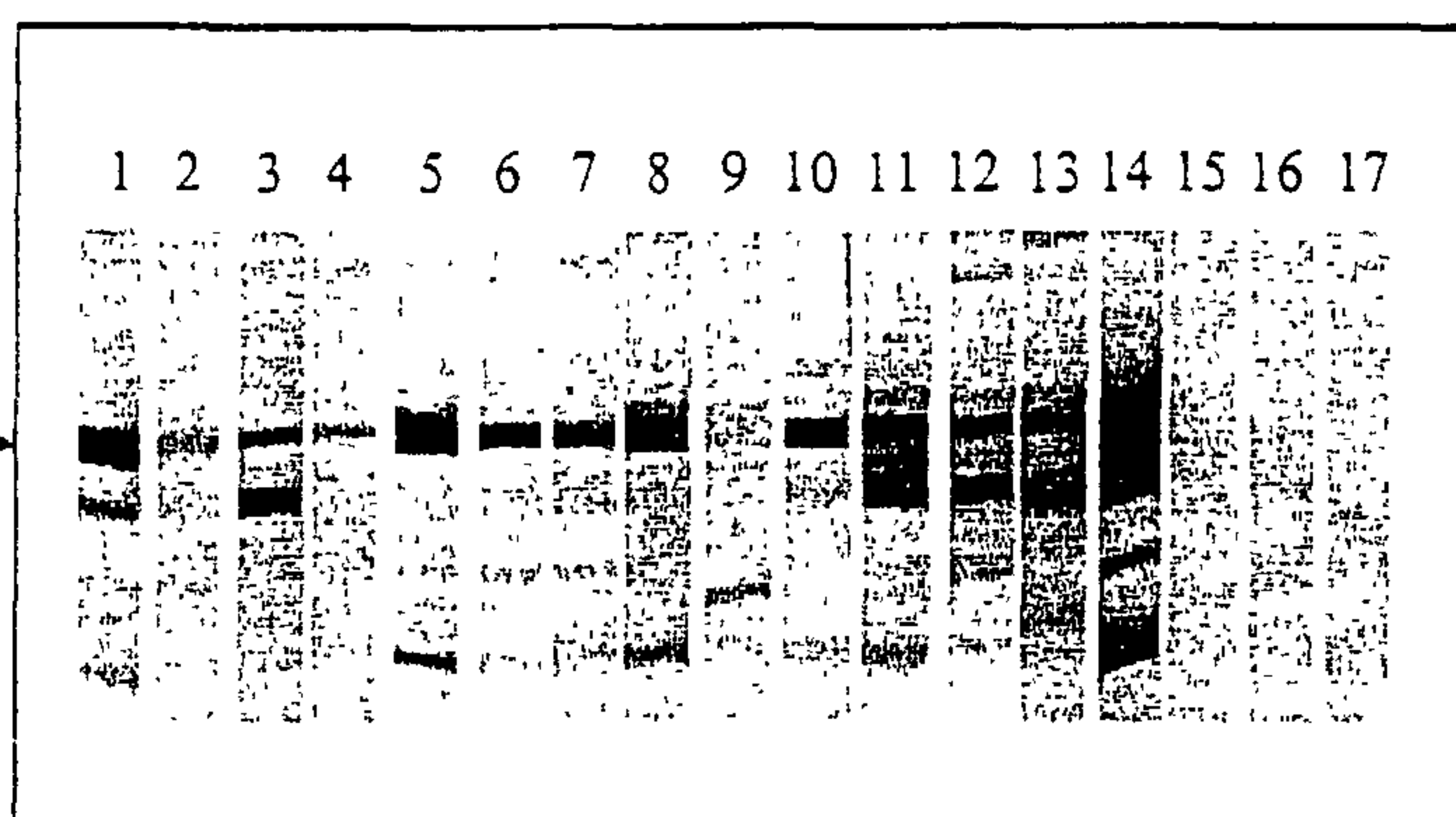
(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : AGUERA,

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
abrégiactions" 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 PARANEOPLASQUES

GST- U6 C- term →

(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
5 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,
10 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
15 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
20 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
25 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
30 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
5 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
10 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.

15 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
20 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
25 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 (Honnorat et al., 1996).

30 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.

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.

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.

Sommaire de l'invention

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un polypeptide purifié désigné ULIP6, comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n°2 ou fragment épitopique dudit polypeptide, comprenant la séquence SEQ ID n° 4 ou la séquence SEQ ID N°5.

10 Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un acide nucléique isolé comprenant une séquence nucléotidique codant pour un polypeptide ou un fragment épitopique dudit polypeptide tel que défini plus haut.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un vecteur de clonage et/ou d'expression contenant une séquence d'acide nucléique tel que décrit ci-haut.

En particulier, la présente invention a pour objet une cellule hôte transfectée par un vecteur tel que décrit ci-haut.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet des anticorps obtenus à partir d'un polypeptide tel que décrit ci-haut, ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps.

5a

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet des anticorps polyclonaux obtenus à partir d'un polypeptide, tel que défini ci-haut ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps.

De plus, la présente invention a pour objet des anticorps spécifiquement dirigés contre un polypeptide, tel que défini ci-haut ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps, lesdits fragments ou immunoconjugués étant spécifiquement dirigés contre un polypeptide tel que défini ci-haut.

10 Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une 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 plus haut.

La présente invention vise également l'utilisation d'un polypeptide, tel que décrit ci-haut pour détecter la présence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps ou leurs fragments ou immunoconjugués, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP6 tel que décrit plus haut, dans un échantillon biologique.

20 En particulier, la présente invention a pour objet l'utilisation d'anticorps polyclonaux ou leurs fragments ou immunoconjugués, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP6 tel que décrit plus haut, dans un échantillon biologique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une 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, dans des conditions permettant la

5b

formation de complexes immunologiques spécifiques entre ledit polypeptide et les auto-anticorps qui sont présents dans l'échantillon biologique, et

- la détection des complexes immunologiques spécifiques qui sont formés.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet un 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:

- 10
- au moins un polypeptide ULIP6, tel que décrit ci-haut
 - 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.

De plus, la présente invention a pour objet une composition pharmaceutique comprenant au moins un agent thérapeutique choisi parmi un polypeptide, tel que décrit ci-haut, un acide nucléique, tel que décrit ci-haut ou un acide nucléique comprenant une séquence anti-sens capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique, tel que décrit ci-haut ou un anticorps spécifiquement dirigé contre le polypeptide tel que décrit plus haut, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

20

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet l'utilisation d'un agent thérapeutique tel que défini plus haut pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives et les néoplasmes.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

- la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 4 ou la séquence SEQ ID NO: 5 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et

5c

- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

Plus particulièrement, la présente invention a pour objet une méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

10 - la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 2 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et

- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

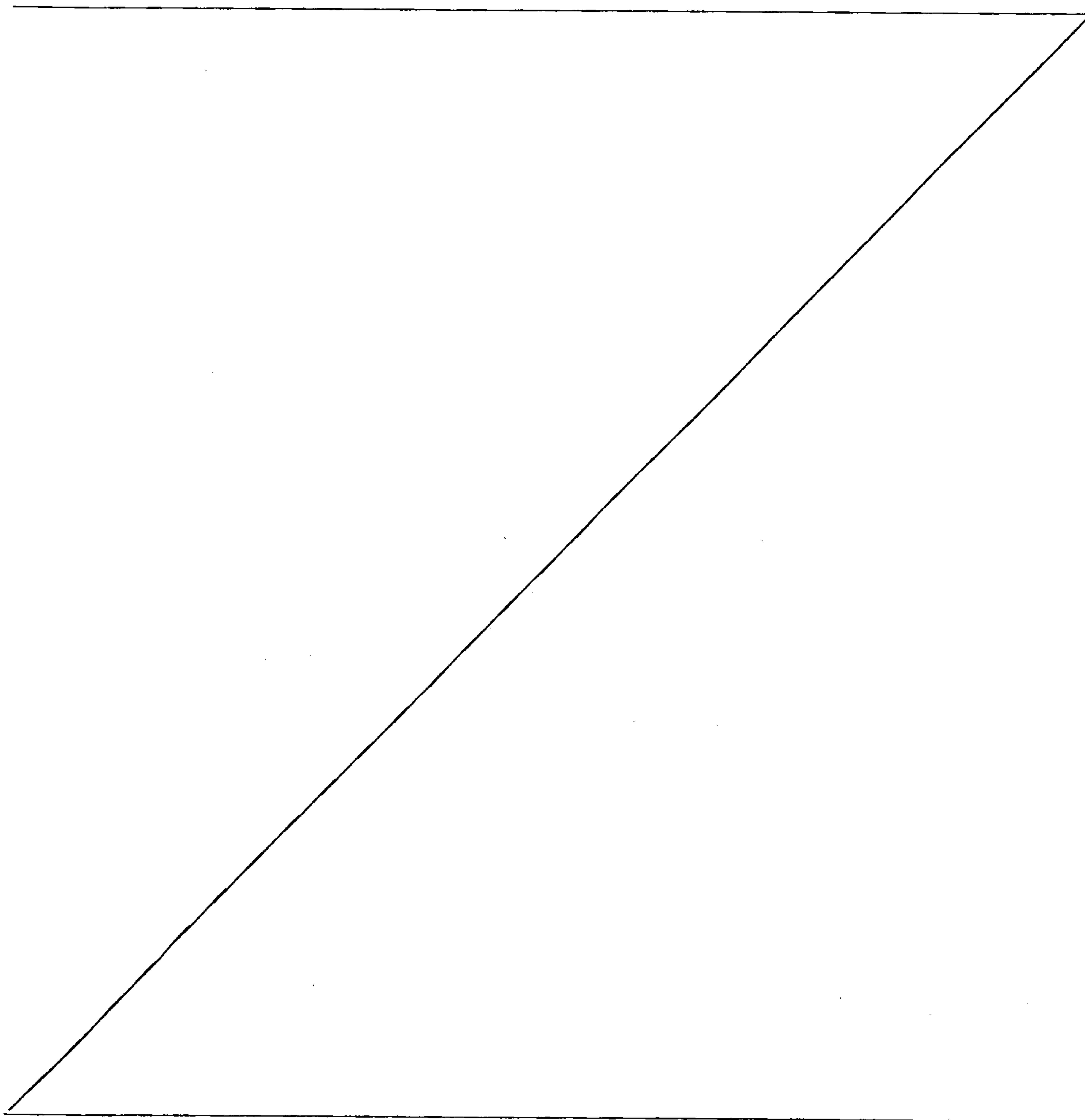
Description détaillée de l'invention

20 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).

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.

5d

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 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 réplication 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,
15 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
25 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,
30 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

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.

La présente invention vise également la méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

- la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 4 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et
- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas
10 détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

De plus, la présente invention vise aussi une méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

- la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 2 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et
- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas
20 détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

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 messenger, utilisables en thérapie génique. 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.

9a

Elles sont plus particulièrement utiles dans le traitement des désordres du système nerveux central et périphérique et de la vision, notamment dans le traitement des syndromes neurologiques paranéoplasiques, ainsi que dans le traitement anticancéreux, notamment des tumeurs associées à des syndromes neurologiques paranéoplasiques.

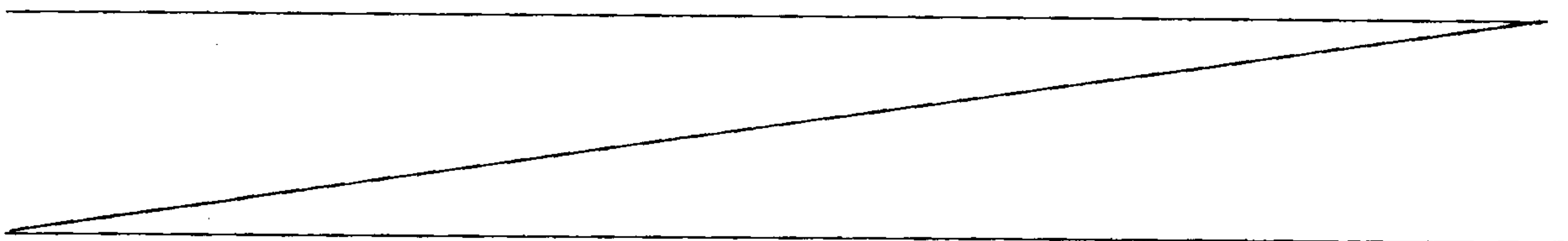
L'exploitation des protéines ULIP, et en particulier ULIP6, ainsi que des anticorps dirigés contre ces protéines, est prometteuse dans divers domaines.

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

La production de protéine recombinante ULIP6 selon l'invention 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 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 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')₂. 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.

25

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
30 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
5 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
10 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 pharma-
15 ceutiquement 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
20 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).

25 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.

30 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 (Honnorat 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 (Honnorat 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 2×10^4 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
10 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-
15 Ulip6-CTerm 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
20 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
30 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 ³²P. Les ARN ont été séparés sur

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 seule bande correspondant à un transcrit de 5 kb a été révélée.

Exemple 4 : Hybridation *in situ* sur moelle épinière

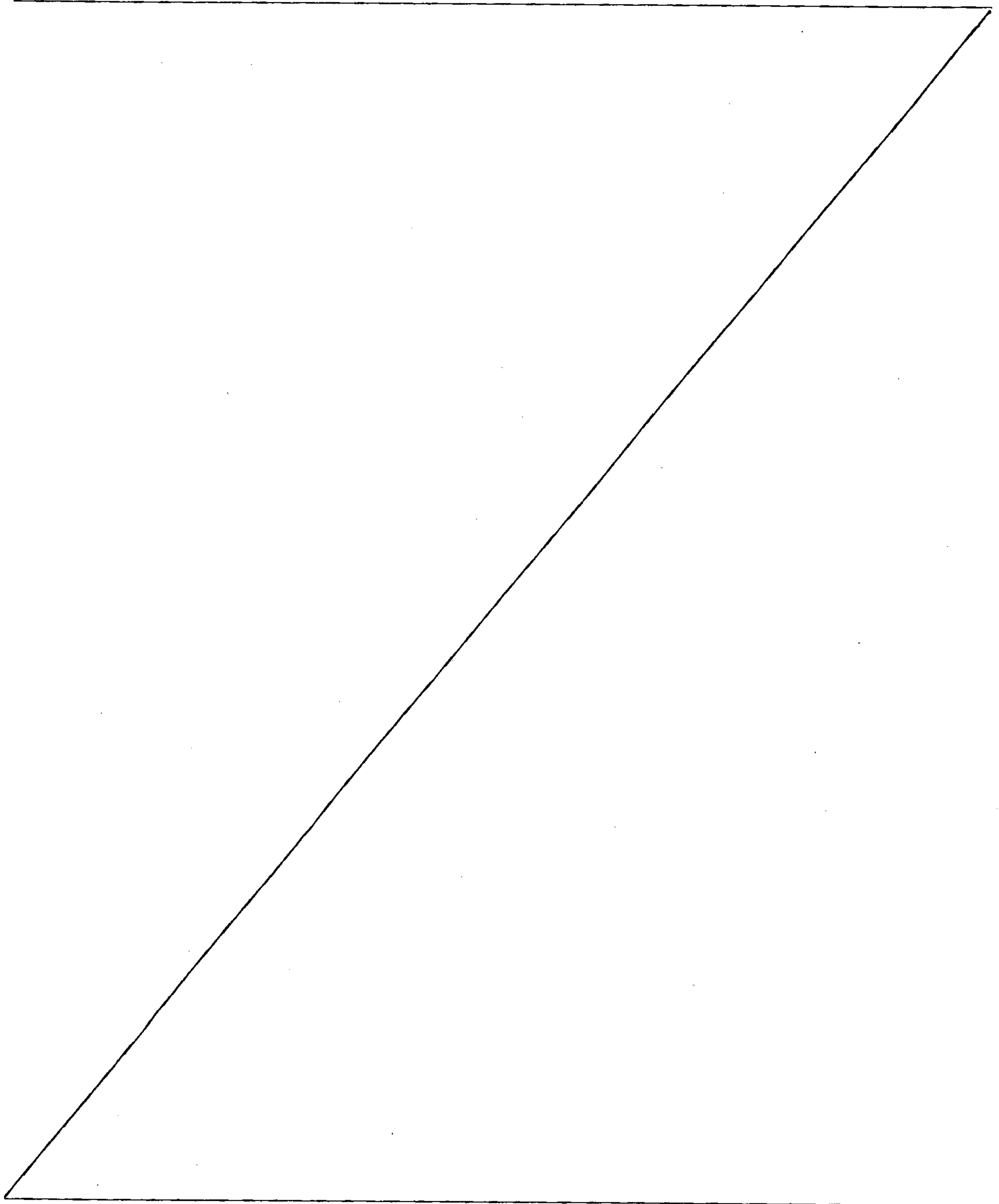
10 Pour vérifier la présence de l'ARN messager de Ulip6 dans les oligodendrocytes, une analyse par hybridation *in situ* a été réalisée sur coupe frontale de moelle. La sonde utilisée était une sonde ARN froide obtenue par transcription du clone 97 sous cloné dans pBluescript SK (Stratagène) et marquée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

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

20 Des anticorps polyclonaux ont été produits par immunisation de lapins contre un peptide spécifique de la protéine Ulip6 (peptide Pep Ulip6="KEMGTPLADTPTRPVTRHGG" de séquence SEQ ID n°5, 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 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 pré-immuns.

17a

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 ^{32}P , et correspondait aux nucléotides 1585 à 1854 de la séquence ID N°1. Les phages ont été criblés à une densité de 2×10^4 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'à 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-
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.

2010-02-26 listing de séquences.txt
SEQUENCE LISTING

<110> INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE
(INSERM)

<120> NOUVELLE PROTEINE ULIP/CRMP HUMAINE ET SON UTILISATION
DANS LE DIAGNOSTIC ET LA THERAPIE DES CANCERS ET DES
SYNDROMES NEUROLOGIQUES PARANEOPLASIQUES

<130> 003810-0970

<140> CA 2,401,438

<141> 2001-02-28

<150> PCT/FR 01/00589

<151> 2001-02-28

<150> FR 00/05005

<151> 2000-04-18

<150> FR 00/02566

<151> 2000-02-29

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3074

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (163)..(1854)

2010-02-26 listing de séquences.txt

<223>

<400> 1

```

ccccccac tctggactcc cgcgctgggc gcgctgagggc ggcccccgag cgagcgcgcg      60
tgcagccgcc gccgccccga gcacccgcag 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

```

2010-02-26 listing de séquences.txt

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	gtt	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	ggc	gac	gtt	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	gtt	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			

2010-02-26 listing de séquences.txt

atg tgc gcc gag ggc acc ggc aag ttc tgt ccc ctg agg tcc ttc cca Met Cys Ala Glu Gly Thr Gly Lys Phe Cys Pro Leu Arg Ser Phe Pro 455 460 465	1566
gac act gtc tac aag aag ctg gtc cag aga gag aag act tta aag gtt Asp Thr Val Tyr Lys Lys Leu Val Gln Arg Glu Lys Thr Leu Lys Val 470 475 480	1614
aga gga gtg gac cgc act ccc tac ctg ggg gat gtc gct gtt gtc gtg Arg Gly Val Asp Arg Thr Pro Tyr Leu Gly Asp Val Ala Val Val Val 485 490 495 500	1662
cac cct ggg aaa aaa gag atg gga acc cca ctc gca gac act cct acc His Pro Gly Lys Lys Glu Met Gly Thr Pro Leu Ala Asp Thr Pro Thr 505 510 515	1710
cgg ccc gtc acc cgg cat ggg ggc atg agg gac ctt cac gaa tcc agc Arg Pro Val Thr Arg His Gly Gly Met Arg Asp Leu His Glu Ser Ser 520 525 530	1758
ttc agc ctc tct ggc tct cag atc gat gac cat gtt cca aag cga gct Phe Ser Leu Ser Gly Ser Gln Ile Asp Asp His Val Pro Lys Arg Ala 535 540 545	1806
tca gct cgg atc ctc gct cct ccc gga ggc agg tcg agt ggc att tgg Ser Ala Arg Ile Leu Ala Pro Pro Gly Gly Arg Ser Ser Gly Ile Trp 550 555 560	1854
taaaggcatt gccaaagcccc ccgagtgagg acgcaccgcc gccaccagcc cgcaactctc	1914
cagccgaagc tgcaggggca ggagaggctg ggctgggtgg cacaccaccc gaggggggcc	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 tttagtggcc	2214
tgccccctgg ctgactggcc agttgcccag agcactttag cagatgtggt ttcaaagtaa	2274
aggcctcctc ccccaccctc taggccccgt ggtgacattt cccaagtcag acagatgtca	2334
gcttcccagc catgcccagg acgtcctatc tcccccaacc cacctctggc cctgtgtagg	2394
ggcaggggatg ggggtggctg ggactcctgg tgccccctgc cagcttctcc tgcgccccgc	2454
ccacaccctc ggggggggtca caggcccaga agggtagctg ggcggggctc gaggctgggtg	2514
ccaggcgcgt gtaaagtgtt ttgttttgca cgtttggttt gcgcagtagt ttggtttgac	2574
ttgtttgtgc atcctgtgaa aaataacggt gcttgtgtca ctagcataga atagcgacag	2634
gaatagatgt ggtccttagg agacgctgca cttgacacca accagacagc acagggcagg	2694
ggtggtggag ggggctgggc tcacaggcct ctcttttccc cgctgcagt cttctgggct	2754
gcgggaggcc ctggcccttt ccccttcccc tcccctcctt gtctagtttc ccacattcca	2814
aaagggggcc tgggatgcta gcccagaga tgccagccct tcaggaagca ggtgtccttt	2874
cccctctctg ccctgatca ctcccagcac tccccttgcc ttcccctgtc ttcacctgcc	2934

2010-02-26 listing de séquences.txt

accacacaca cacacacaca cacacacaca cacacacgca tggcttccta taacttcttc 2994
 ctgctggaca gagactcagc gctcctcctg 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

2010-02-26 listing de séquences.txt

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

2010-02-26 listing de séquences.txt

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> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

aggcattgcc aagcccccg agtgaggacg caccgccgcc accagcccgc aactctccag	60
ccgaagctgc aggggcagga gaggctgggc tgggtggcac accacccgag gggggccccg	120
ggacccacgg agccctccct atgtctgcaa agtgattcac tgtgcttcga gccaactcta	180
acaggcactt tgagatgtgt tcctcctgct gtagtccttt ctgccttggc ctcggcgggc	240
ttttctgggg cccaggaagc ccacactatg cacagagccc aatgcataga gccctggcca	300
gcccttcctc tcaactcctgc ctccgctggc tttgggaaag cccagacttt agtgccctgc	360
cccctggctg actggccagt tgcccagagc actttagcag atgtggtttc aaagtaaagg	420

2010-02-26 listing de séquences.txt

```

cctcctcccc cacccttag gccccgtggt gacatttccc aagtcagaca gatgtcagct 480
tcccagccat gcccaggacg tcctatctcc cccaaccac ctctggccct gtgtaggggc 540
agggatgggg gtggctggga ctctggtgc ccctcgccag cttctcctgc gccccgcca 600
caccctcggg ggggtcacag gcccagaagg gtagctgggc ggggctcgag gctggtgcca 660
ggcgcgtgta aatggttttg ttttgcacgt ttggtttgcg cagtagtttg gtttgacttg 720
tttgtgcatc ctgtgaaaaa taacggtgct tgtgtcacta gcatagaata gcgacaggaa 780
tagatgtggt ccttaggaga cgctgcactt gacaccaacc agacagcaca gggcaggggt 840
ggtggagggg gctgggctca caggcctctc ttttccccgc ctgcagtctt ctgggctgcg 900
ggaggccctg gccctttccc cttccccctc cctccttgtc tagtttcca cattccaaaa 960
gggggcctgg gatgctagcc ccagagatgc cagcccttca ggaagcaggt gtcctttccc 1020
ctctctgccc ctgatcactc ccagcactcc ccttgcttc ccctgtcttc acctgccacc 1080
acacacacac acacacacac acacacacac acacgcatgg cttcctataa cttcttcctg 1140
ctggacagag actcagcgct cctcctgtgt gactggcaag aggcctcatg cctgctgaga 1200
gagggtcgac gcggccgc 1218

```

```

<210> 4
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 4
Lys Glu Met Gly Thr Pro Leu Ala Asp Thr Pro Thr Arg Pro Val Thr
1      5      10      15
Arg His Gly Gly Cys
20

```

```

<210> 5
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapiens

```

```

<400> 5
Lys Glu Met Gly Thr Pro Leu Ala Asp Thr Pro Thr Arg Pro Val Thr
1      5      10      15

```

2010-02-26 listing de séquences.txt

Arg His Gly Gly
20

REVENDICATIONS

1. Polypeptide purifié désigné ULIP6, comprenant la séquence d'acides aminés SEQ ID n°2 ou fragment épitopique dudit polypeptide, comprenant la séquence SEQ ID n° 4 ou la séquence SEQ ID N°5.
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 séquence nucléotidique SEQ ID n° 1.
- 10 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 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 obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1, ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps.
8. Anticorps polyclonaux obtenus à partir d'un polypeptide selon la revendication 1, ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps.
9. Anticorps spécifiquement dirigés contre un polypeptide selon la revendication
- 20 1, ainsi que les fragments ou les immunoconjugués desdits anticorps, lesdits fragments ou immunoconjugués étant spécifiquement dirigés contre un polypeptide selon la revendication 1.

10. 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.

11. Utilisation d'un polypeptide selon la revendication 1, pour détecter la présence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique.

12. Utilisation d'anticorps ou leurs fragments ou immunoconjugués selon la revendication 7 ou 9, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP6 selon la revendication 1, dans un échantillon biologique.

10 13. Utilisation d'anticorps polyclonaux ou leurs fragments ou immunoconjugués selon la revendication 8, pour la purification ou la détection d'une protéine ULIP6 selon la revendication 1, dans un échantillon biologique.

14. 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

- 20
- la mise en contact d'un échantillon biologique prélevé chez un individu avec un polypeptide selon la revendication 1, dans des conditions permettant la formation de complexes immunologiques spécifiques entre ledit polypeptide et les auto-anticorps qui sont présents dans l'échantillon biologique, et
 - la détection des complexes immunologiques spécifiques qui sont formés.

15. Méthode selon la revendication 14, dans laquelle le polypeptide selon la revendication 1 est fixé sur un support.

16. 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,
- 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.

17. Kit selon la revendication 16, dans lequel le au moins un polypeptide ULIP6 est fixé sur un support.

10 18. Composition pharmaceutique comprenant au moins un agent thérapeutique choisi parmi un polypeptide selon la revendication 1, un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4 ou un acide nucléique comprenant une séquence anti-sens capable de s'hybrider spécifiquement avec un acide nucléique selon l'une quelconque des revendications 2 à 4, ou un anticorps spécifiquement dirigé contre le polypeptide selon l'une quelconque des revendications 7 à 9, en association avec un véhicule pharmaceutiquement acceptable.

19. Utilisation d'un agent thérapeutique tel que défini dans la revendication 18 pour la fabrication d'un médicament destiné à traiter les maladies neurodégénératives et les néoplasmes.

20 20. Méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

- la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 4 ou la séquence SEQ ID NO: 5 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et
- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

21. Méthode selon la revendication 20, dans laquelle l'échantillon biologique comprend du sang, du fluide céphalorachidien ou du sérum.

22. Méthode selon la revendication 20, dans laquelle le polypeptide est fixé à un support.

23. Méthode de détection *in vitro* de la présence ou de l'absence d'anticorps anti-CV2 dans un échantillon biologique, la méthode comprenant:

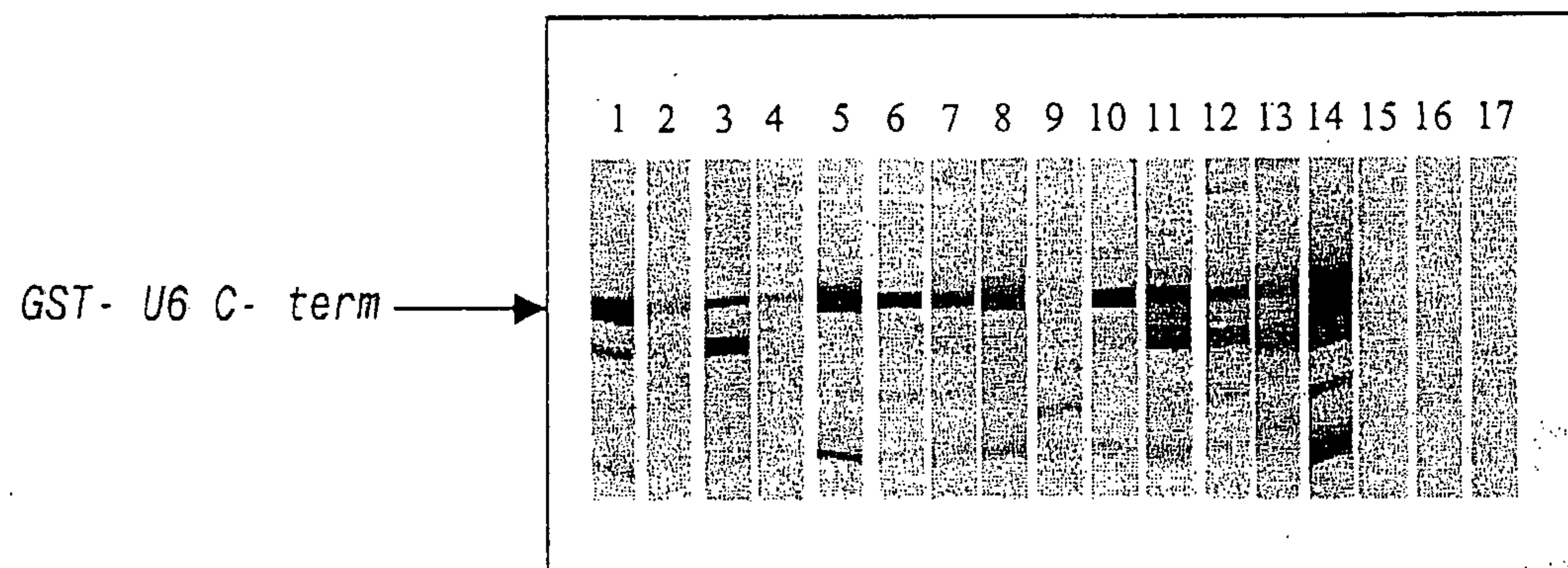
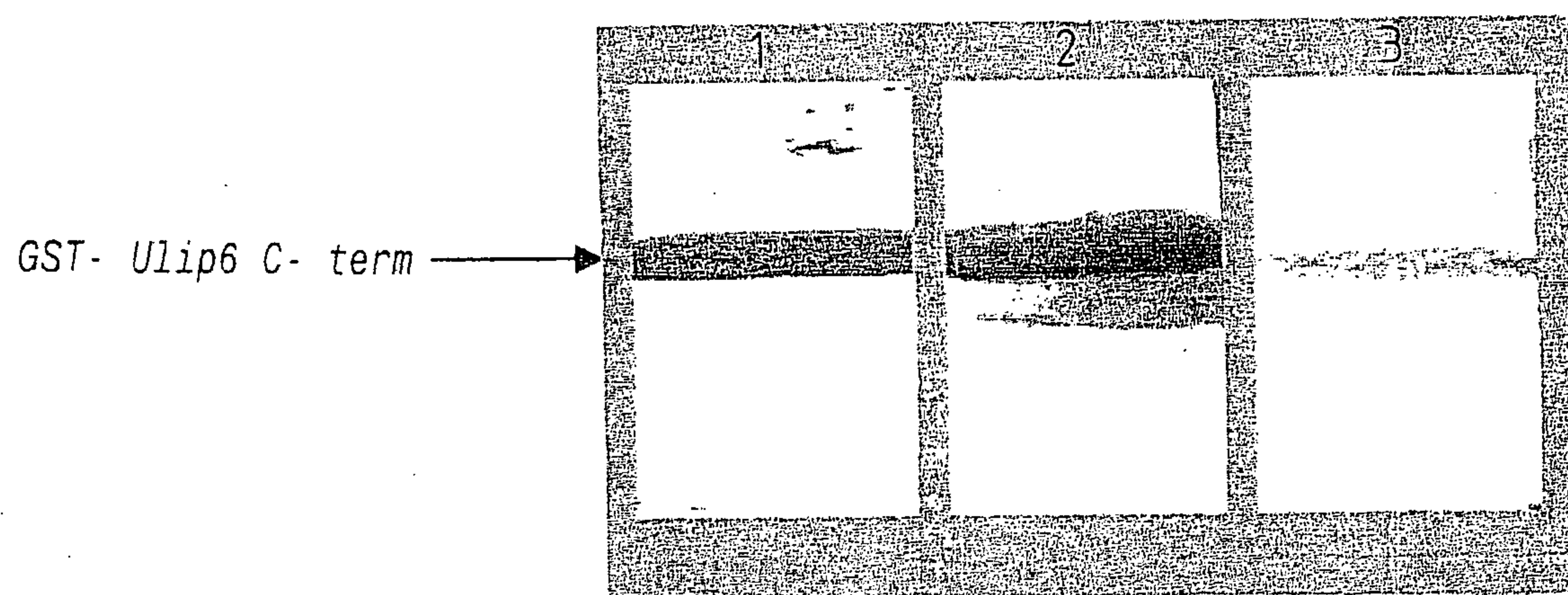
- 10 - la mise en contact de l'échantillon avec un polypeptide ULIP6 purifié comprenant la séquence SEQ ID NO: 2 dans des conditions permettant la formation de complexes antigène/anticorps spécifiques entre le polypeptide et les anticorps, et
- la détection des complexes;

dans laquelle si les complexes sont détectés, des anticorps anti-CV2 sont présents dans l'échantillon biologique et dans laquelle si des complexes ne sont pas détectés, des anticorps anti-CV2 ne sont pas présents dans l'échantillon biologique.

24. Méthode selon la revendication 23, dans laquelle l'échantillon biologique comprend du sang, du fluide céphalorachidien ou du sérum.

20 25. Méthode selon la revendication 23, dans laquelle le polypeptide est fixé à un support.

1 / 1

**FIG.1****FIG.2**

GST- U6 C- term



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17

