

(19)日本国特許庁 ( J P )

(12) 公表特許公報 ( A ) (11)特許出願公表番号

特表2003 - 525059

(P2003 - 525059A)

(43)公表日 平成15年8月26日(2003.8.26)

(51) Int. Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* ( 参考 )
C 1 2 N 15/09	ZNA	A 6 1 K 31/711	4 B 0 2 4
A 6 1 K 31/711		39/395	D 4 B 0 6 4
38/00			N 4 B 0 6 5
39/395		48/00	4 C 0 8 4
		A 6 1 P 25/00	4 C 0 8 5

審査請求 未請求 予備審査請求 ( 全 35数 ) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 564230(P2001 - 564230)

(86)(22)出願日 平成13年2月28日(2001.2.28)

(85)翻訳文提出日 平成14年8月29日(2002.8.29)

(86)国際出願番号 PCT/FR01/00589

(87)国際公開番号 W001/064737

(87)国際公開日 平成13年9月7日(2001.9.7)

(31)優先権主張番号 00/02566

(32)優先日 平成12年2月29日(2000.2.29)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(31)優先権主張番号 00/05005

(32)優先日 平成12年4月18日(2000.4.18)

(33)優先権主張国 フランス(FR)

(71)出願人 アンスティテュ ナシオナル ドゥ ラ  
サントゥ エ ドゥ ラ ルシエルシエ  
メディカル(イーエヌエスエーエールエム  
)  
フランス国,エフ - 75013 パリ,リュ ドゥ  
トルビア,101

(72)発明者 アグエラ, ミッシェル  
フランス国,エフ - 69300 カリュイール,シ  
ュマン デ プティテ プロス,33ア

(72)発明者 アントワーヌ, ジャン - クリストフ  
フランス国,エフ - 42600 シャラン ル  
コムタール,フォンタンヌ

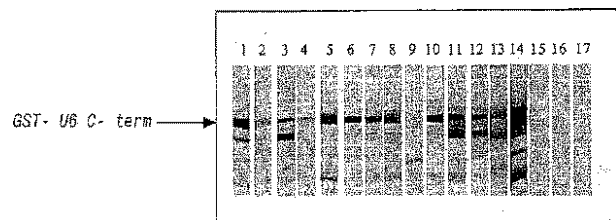
(74)代理人 弁理士 石田 敬 ( 外 4 名 )

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規ヒトULIP / CRMPタンパク質と癌及び傍新形成性神経症候群の診断及び治療におけるその使用

(57)【要約】

本発明は、アミノ酸配列SEQ ID N02を含む精製ポリペプチド(ULIP6と命名)、該ポリペプチドをコードする核酸、該コード配列のうちの3'非コード配列、及びそれらの、がんと傍腫瘍性神経症候群の診断治療への使用に関する。



**【特許請求の範囲】**

【請求項1】 アミノ酸配列SEQ ID No.2を含むULIP 6と命名された精製ポリペプチド、又は該ポリペプチドのうち配列SEQ ID No.4を含むエピトープ断片。

【請求項2】 請求項1のポリペプチド又は該ポリペプチドのエピトープ断片を含む単離核酸。

【請求項3】 ヌクレオチド配列SEQ ID No.1を含む、請求項2に記載の核酸。

【請求項4】 ヌクレオチド配列SEQ ID No.3からなる、又はSEQ ID No.1のヌクレオチド1からヌクレオチド162までの配列からなる単離核酸。

【請求項5】 請求項2～4のいずれか1項に記載の核酸配列を収めたクローニングベクター及び/又は発現ベクター。

【請求項6】 請求項5に記載のベクターによりトランスフェクトされた宿主細胞。

【請求項7】 請求項1のポリペプチドを使用して得られたモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体並びに該モノクローナル及び/又はポリクローナル抗体の断片、キメラ抗体又はイムノコンジュゲート。

【請求項8】 傍腫瘍性神経症候群の診断及び/又は腫瘍形成の早期診断に有用な、請求項1のポリペプチド又は該ポリペプチドのエピトープ断片を含有する組成物。

【請求項9】 請求項1のポリペプチドの、生体試料中の抗CV2抗体の検出への使用。

【請求項10】 請求項7のモノクローナル及び/又はポリクローナル抗体、又はその断片、キメラ抗体又はイムノコンジュゲートの、生体試料中の請求項1のULIP 6タンパク質の精製又は検出への使用。

【請求項11】 個人から採取した生体試料中のULIP 6タンパク質に対する抗体の存在が次のステップにより明らかにされる、傍腫瘍性神経症候群の診断及び/又は腫瘍形成の早期診断のための方法：

- 個人から採取した生体試料を、随意に支持体へと付着させた精製ULIP 6ポリ

ペプチドへと、該ポリペプチドと該生体試料中に存在する可能性のある自己抗体の間での特異的免疫複合体の形成を可能にするような条件下で、接触させるステップ、及び

- 形成される可能性のある該特異的免疫複合体を検出するステップ。

【請求項12】 生体試料を使用して傍腫瘍性神経症候群を診断するための、また腫瘍形成を早期診断するための、次の構成要素を含むキット：

- 随意に支持体に付着させた請求項1の1以上の精製ULIP 6ポリペプチド、及び
- 抗ULIP 6自己抗体と該ULIP 6ポリペプチドの間の特異的抗原 / 抗体複合体の形成を明らかにする手段、及び / 又は該複合体を定量する手段。

【請求項13】 請求項1のポリペプチド、請求項2～4に記載の核酸又は請求項2～4に記載の核酸と特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンス配列を含む核酸、又は請求項7に記載のポリペプチドに対する特異的抗体よりなる群から選択される1以上の治療薬とそれと混合させた製薬上許容しうる担体とを含有する製剤組成物。

【請求項14】 請求項13に記載の治療薬の、神経変性疾患及び腫瘍の治療を目的とした製剤への使用。

**【発明の詳細な説明】****【0001】**

本発明は新規ヒトULIP/CRMPタンパク質とそのがん及び傍腫瘍性神経症候群の診断治療への使用に関する。

**【0002】**

傍腫瘍（新形成）性神経症候群(PNSs)はがんの発現に際してしばしばその発見に先立って発症し、また腫瘍の増殖自体(初発、転移)にも治療にも関連しない。その発症頻度はがん全体の約1%である。いくつかの臨床像（脳脊髄炎、Denny-Brown感覚性ニューロパシー、小脳萎縮、縁辺脳炎、眼球クローヌスなど）が長期にわたり個別化されてきたが、それらは実際には特定神経細胞群の選択的又は差別的発作に対応している。病変近傍における炎症細胞の出現頻度から長年、自己免疫過程又はウィルス疾患過程の可能性が考えられた。もっと最近になって、腫瘍のタイプ及び変性神経細胞のタイプに特異的である自己抗体がPNS患者の血清中及び脳脊髄液(CSF)中に存在することが証明されたため、この病理状態を引き起こす要因は自己免疫であるとの仮説が息を吹き返した(Graus et al., 1985; Greenlee et al., 1983)。

**【0003】**

患者血液及びCSF中の高力価の自己抗体の存在とは別に、PNSsは自己免疫機序に由来するという議論がある (Anderson et al., 1987)。中枢神経系に認められる抗原が患者腫瘍中にも存在するのはそのためだとする。腫瘍組織内にはこれらの抗原に対して、またB及びT細胞に対しても特異的な抗体が見られる(Hetzel et al., 1990)。

**【0004】**

これらのデータは、自己免疫過程が腫瘍抗原の発現を引き金として起こる可能性のあることを示唆する。中枢神経系の病変は交差免疫過程に起因する可能性がある。他の議論もまた、脳の病変が自己免疫反応に起因することを示唆している。そのため、患者の脳では血清やCSFに比べて特異的抗体価が高いとする(Dalmau et al., 1991)。さらに、抗Hu抗体に関連する脳脊髄炎の場合には、破壊途上にある神経細胞近傍にB及びT細胞からなる激しいリンパ球反応が存在する(Dalmau

et al., 1991; Graus et al., 1990)。

【0005】

これまでに、免疫学的、神経学的及びがん関連基準に応じた症候群の厳密なグループ分けを可能にする数タイプの自己抗体が記述されてきた。

【0006】

たとえば、抗Yo抗体は傍腫瘍性小脳萎縮や産婦人科(卵巣、乳又は子宮)がんを患う女性の血清及びCSF中に見られる(Greenlee et al., 1983; Jaeckle et al., 1985)。

【0007】

これらの抗体は、小脳のプルキニエ細胞に特異的な34kDaと62kDaの2種類の細胞質タンパク質を認識する。

【0008】

抗Ri抗体は、眼球ミオクローヌス、小脳症候群及び乳がんの(主に女性)患者の血清及びCSF中に見られる。これらの抗体は中枢神経系の神経細胞に特異的な50kDaと80kDaの2種類のタンパク質を認識する(Luque et al., 1991)。

【0009】

抗Hu抗体はPNSsの進行過程で最も一般に見られる。抗Hu抗体が見られるのは、Denny-Brown症候群又は脳脊髄炎及び小細胞肺がんの患者の血清中及びCSF中である(Graus et al., 1985; Dalmau et al., 1992)。これらの抗体は神経系のすべての神経細胞で特異的に発現する37~45 kDaの数種のタンパク質を認識する。

【0010】

PNS患者ではもう1つのタイプの自己抗体、すなわち抗CV2抗体がすでに同定されている(Antoine et al., 1993; Honnorat et al., 1996)。これらの抗体は非定型抗体である。というのは、4患者の脳の死後検査により神経細胞の欠損、グリオーシス及びPNSsに特徴的な炎症過程の観察が可能になるとはいえ、成人において認識される抗原の標的は本質的に非神経細胞だからである。

【0011】

抗CV2抗体発見のオリジナリティーは第1に、その存在の立証にある。このタイプの自己抗体はそれまで、死後脳を対象とする通常の検査、すなわち認識された

抗原を免疫組織化学法で明らかにする検査をすべてすり抜けていた。認識された抗原は実際には可溶性であり、大多数の固定条件下では死後脳から消滅してしまう。パラホルムアルデヒドへの浸漬によるヒト死後脳組織の固定又は動物へのパラホルムアルデヒドの灌流によるin situ固定により初めて、PNS患者のCSF又は血清中の抗CV2抗体の存在を明らかにすることが可能になった(Antoine et al., 1993; Honnorat et al., 1996)。

#### 【0012】

傍腫瘍性神経症候群(PNS)患者の血清中に存在する抗CV2自己抗体は、間接免疫組織化学法により、成熟ラット脳内で脳幹、髄質及び小脳の希突起膠細胞の部分母集団が特異的に発現する細胞質抗原を認識するその能力によって特徴付けられるに至った。

#### 【0013】

抗CV2抗体発見のオリジナリティーは第2に、その診断面の有用性にある。患者血清又はCSF中のその存在は、神経症候群の傍腫瘍性の特定を可能にするため、診断面で有用である。抗CV2抗体の発見は、それががんの発見に先行する場合には、がん検査に道を開き、がんの早期発見を可能にする。抗CV2抗体をもつ19患者中6患者はそのような例であった。臨床像は患者次第で異なり、縁辺脳炎を示す患者もいれば、脳脊髄炎を示す患者もいれば、またLambert-Eaton症候群を示す患者もいた。それにもかかわらず、症例の60%余りでは小脳症候群が支配的であった。最も一般的な随伴腫瘍は小細胞肺がんであった(症例の60%)。

#### 【0014】

新生ラットの脳を対象にした実験では、抗CV2抗体は66kDaのタンパク質と反応することが判明した(Honnorat et al., 1996)。

#### 【0015】

成人の脳では、この抗原は希突起膠細胞の部分母集団中に、又は成人の脳にあって分化能を保持している細胞(嗅球、歯状回)中に、局在する。認識された該抗原は、PNS患者の死後脳で観察される神経細胞の欠損が示唆するように、神経細胞/希突起膠細胞の相互作用を通じて神経細胞の生存に寄与すると考えられる。

#### 【0016】

成人に見られるその非常に限定的な発現は発達途上の中枢及び末梢神経系での非常に強い一時的な発現とは対照的であり、それは神経系の発達で果たすと推定されるこの抗原の役割を示唆する。

【0017】

出願WO 98/37192及びHonnorat et al. (1999)論文では、抗CV2自己抗体の標的抗原、すなわち傍腫瘍性希突起膠細胞タンパク質66kDa (paraneoplastic oligodendrocyte protein 66 kDa)を略してPOP-66と命名されたタンパク質に対応する抗原がヒト型ULIP-4タンパク質として同定された。ULIP [Unc-33様リンタンパク質(Unc-33 like phosphoprotein)の略]は神経の発達と軸索輸送の調節に関与するタンパク質である(Byk et al., 1996)。ULIPファミリーのタンパク質はすでに4種類が3チーム(Byk et al., 1998; Wang and Strittmatter, 1996; Hamajima et al., 1996)により同定されていた。このファミリーに属する可能性のあるタンパク質をさらに探し求める徹底的な研究が行われたが徒労であった。

【0018】

本発明者はその後、出願WO 98/37192による同定とは首尾一貫しない新たな結果に直面した。すなわち、HeLa細胞を対象に試験したすべての抗CV2血清は免疫組織化学法では確かに組換えULIP 4タンパク質を認識したものの、同じ細胞抽出物を対象にしたウェスタンブロット法ではULIP 4タンパク質を認識したのはこれらの血清のうち20%にすぎなかった。そのうえ、脳抽出物を対象にしたウェスタンブロット法でも、免疫沈降後には試験したすべての抗CV2血清が同じ66kDaタンパク質を認識した。さらに、in situハイブリダイゼーションでは希突起膠細胞内でのULIP4 mRNAの発現は非常に弱いものにすぎなかった。これらのデータから、本発明者は希突起膠細胞中で強く発現し、かつウェスタンブロット法ですべての抗CV2血清によって認識される未同定の新規ULIPファミリーメンバーが存在するものと想定した。

【0019】

本発明者は今日、出願WO 98/37192による提唱に反し、抗CV2自己抗体の主要な標的抗原であるPOP-66がULIP 4タンパク質ではなく別のタンパク質であることを立証済みである。本発明者はこのタンパク質の特性解明にもすでに成功している

。それはULIPファミリーの新規ヒトタンパク質であり、ULIP 6と命名した。

【0020】

ULIP 6はそのC末端部分に、ウェスタンブロット法で抗CV2自己抗体により認識される大きなエピトープを含む。

【0021】

したがって、本発明の主題はアミノ酸配列SEQ ID No.2を含む精製ULIP 6ポリペプチドである。

【0022】

前述のポリペプチドのエピトープ断片もまた本発明に包含され。より具体的に言えば、本発明の主題は配列SEQ ID No.4の精製ペプチドである。

【0023】

本発明の主題はまた、前述のULIP 6ポリペプチドをコードする、好ましくはヌクレオチド配列SEQ ID No.1を含む単離核酸である。配列SEQ ID No.1は5'非コード領域(ヌクレオチド1~162)、オープンリーディングフレーム(ヌクレオチド163~1854)、及び3'非コード領域(ヌクレオチド1855~3074)を有する。

【0024】

本発明の主題はまた、ヒトコード配列SEQ ID No.1の3'非コード領域に対応するヌクレオチド配列SEQ ID No.3を含む単離核酸である。この非コード配列は5'非コード部分(SEQ ID No.1のヌクレオチド1~162)と共に特に特異的プローブの調製に使用されよう。

【0025】

本発明のポリペプチドは技術上周知の諸々の方法で合成することができる。本発明のポリペプチドはたとえば、純度、抗原特異性、無用の副産物の排除、生産し易さの点で有利であるMerrifieldタイプの合成などのような化学合成法で合成してもよい。

【0026】

配列SEQ ID No.1を含む核酸を収めたベクターを宿主細胞中に導入し、対応するポリペプチドの発現を許容するような条件下で該宿主細胞を培養するという方法で組換えULIP 6タンパク質を産生させてもよい。

## 【0027】

産生されたタンパク質は次に回収、精製することができる。

## 【0028】

使用する精製法は技術上周知である。得られた組換えポリペプチドの細胞溶解物からの、また培地上清からの精製には、分画法、クロマトグラフィー法、特異的単クローン又は多クローン抗体などの使用によるイムノアフィニティー法を用いることができる。

## 【0029】

ULIP 6ポリペプチドをコードする核酸配列は、その発現を調節するエレメント、たとえば特に転写プロモーター、アクチベーター及び/又はターミネーターと機能的に連結して発現ベクター中に挿入してもよい。

## 【0030】

ヌクレオチド配列の発現を調節するシグナル配列(プロモーター、アクチベーター、ターミネーター)は、使用宿主細胞に応じて選択する。本発明のヌクレオチド配列はこれを目的に、選択された宿主中で自己複製するベクターに、又は選択された宿主と一体化するベクターに、挿入してもよい。その種のベクターは技術上周知慣用の方法で作製されようが、そこから得られるクローンは標準方法、たとえばエレクトロポレーション法又はリン酸カルシウム法を用いて好適な宿主に導入することができる。

## 【0031】

本発明のヌクレオチド配列を収めた前述のクローニング及び/又は発現ベクターもまた本発明に包含される。

## 【0032】

本発明はまた、これらの発現ベクターが一時的又は安定的に導入された宿主細胞に関する。これらの細胞は、前述のベクターに挿入されたヌクレオチド配列を宿主細胞に導入し、次いで導入されたヌクレオチド配列の複製及び/又は発現を許容するような条件下で該細胞を培養することによって得ることができる。

## 【0033】

宿主細胞は細菌などのような原核生物系、又はたとえば酵母、昆虫細胞、CHO(

チャニーズハムスター卵巣)細胞などのような真核生物系、又は他の有利に利用可能な生物系から選択してよい。本発明のタンパク質の発現にとって好ましい宿主細胞は細菌E. coliからなる。

【0034】

本発明のヌクレオチド配列は人工起源でもそれ以外でもよい。また、配列SEQ ID No.1又はNo.3を土台にして作製されたプローブを用いて配列ライブラリーをスクリーニングすることによって得られるDNA又はRNAでもよい。そうしたライブラリーは技術上周知の通常の分子生物学的手法で作製されよう。

【0035】

本発明のヌクレオチド配列はまた、化学合成で作製しても、又はライブラリーのスクリーニングによって得られる配列の化学的又は酵素的修飾を含む混合的方法で作製してもよい。

【0036】

この核酸は、本発明のポリヌクレオチド又はその生物活性断片をコードする核酸配列、ゲノムDNA配列又はメッセンジャーRNA配列と強力かつ特異的にハイブリダイズすることができるヌクレオチドプローブの作製を可能にする。好適なハイブリダイゼーション条件は、技術上慣用の温度及びイオン強度条件(Sambrook et al., 1989)に対応し、好ましくは $[T_m - 5]$ と $[T_m - 30]$ の間の温度条件に、より好ましくは $[T_m - 5]$ と $[T_m - 10]$ の間の温度(高ストリンジェンシー)条件に対応する。ただし、 $T_m$ は理論融解温度であり、50%の相補対が離れる温度と定義される。本発明にはそうしたプローブもまた包含される。それらは、本発明のポリペプチドに対応する生体試料中の転写産物をハイブリダイゼーション実験によって検出するための、又は多型、突然変異又は不正確なスプライシングに由来する異常合成又は遺伝子異常を明らかにするための、in vitro診断手段として使用されよう。

【0037】

本発明のプローブは最小限で10個のヌクレオチドを含み、また最大限でヌクレオチド配列SEQ ID No.1かNo.3又はその相補鎖の全部を含む。

【0038】

本発明の核酸はまた、高ストリンジェンシー条件下で配列SEQ ID No.1かNo.3とハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーの作製に使用してもよい。

【0039】

これらのセンス及び/又はアンチセンスオリゴヌクレオチドプライマーは、配列決定反応に、又はPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法かその変法による特異的増幅反応に有用であろう。

【0040】

好ましくは、本発明のプローブ又はプライマーは使用前に標識する。これには技術上周知の手法がいくつかある。たとえば蛍光、放射性、化学発光又は酵素標識法などである。

【0041】

本発明には、本発明のULIP 6ポリペプチドをコードする核酸配列からヘテロ接合性の消失や遺伝子再編成などのような異常合成又は遺伝子異常を検出するためにこれらのプローブが使用されるin vitro診断法もまた包含される。その種の方法は次のステップを含む:

- 本発明のヌクレオチドプローブを、該プローブと前述のヌクレオチド配列との間で、随意に該ヌクレオチド配列の増幅という先行ステップの後に、ハイブリダイゼーション複合体の形成を可能にするような条件下で、生体試料と接触させる
- 形成される可能性のあるハイブリダイゼーション複合体を検出する、及び
- 随意に、本発明のプローブとハイブリダイゼーション複合体を形成するヌクレオチド配列の配列を決定する。

【0042】

本発明のプローブはまた、染色体異常の検出に有利に使用することができる。

【0043】

さらに、本発明のヌクレオチド配列は治療分野で、メッセンジャーRNAを含む核酸配列と特異的にハイブリダイズするアンチセンス配列を作製するうえでも有用であり、得られるアンチセンス配列は遺伝子治療に使用することができる。よって、本発明の主題は前述のような本発明のポリペプチドの産生を、少なくとも

部分的に、阻害することができるアンチセンス配列である。

【0044】

それらのアンチセンス配列は、中枢及び末梢神経系障害や視覚障害の治療に、特に傍腫瘍性神経症候群の治療に、また抗がん治療、特に傍腫瘍性神経症候群に随伴する腫瘍の治療に、とりわけ有用である。

【0045】

ULIPタンパク質特にULIP 6の利用、またこれらのタンパク質に対する抗体の利用は様々な分野で有望である。

【0046】

たとえば、固定動物脳を対象にした抗CV2自己抗体の免疫蛍光法による検出は目下、診断検査として利用されている。

【0047】

本発明による組換えULIP 6タンパク質の産生は、抗CV2抗体を検出するための迅速確実な(Elisa法又はウェスタンブロット法タイプの)検査法の実現を可能にする。

【0048】

そうした検査法は抗Hu、抗Yo及び抗Ri抗体に関してはすでに存在している。傍腫瘍性神経症候群が疑われる場合には患者血清中の抗CV2抗体を検出するための検査法を指示することができるであろうし、したがって抗CV2抗体だけでなく前述のようなPNSsで同定される他抗体も検査対象に含まれよう。

【0049】

したがって、本発明はまた傍腫瘍性神経症候群の診断及び/又はがん性腫瘍の形成の早期診断のための方法に関するが、該方法では個人から採取した生体試料(血液、血清、CSFなど)中のULIP 6タンパク質に対する抗体の存在が、次のステップにより明らかにされる:

- 個人から採取した生体試料を、随意に支持体へと付着させた精製ULIP 6ポリペプチドへと、該ポリペプチドと該生体試料中に存在する可能性のある自己抗体の間での特異的免疫複合体の形成を可能にするような条件下で、接触させる、及び

- 形成される可能性のある該特異的免疫複合体を検出する。

**【0050】**

したがって本発明の主題は、傍腫瘍性神経症候群の診断及び/又は腫瘍形成の早期診断に有用な、ULIP 6ポリペプチド又は該ポリペプチドのエピトープ断片を含む組成物である。

**【0051】**

完全長ポリペプチドの代わりに、支配的エピトープを含むC末端部分(たとえばアミノ酸No.475からアミノ酸No.564にわたる断片)を使用するのが有利であろう。特に、配列SEQ ID No.4を含むULIP 6ポリペプチドのエピトープ断片が使用されよう。たとえば、配列SEQ ID No.4の該ペプチドはULIP 6に対してきわめて特異的な抗体の産生を可能にしてきた。

**【0052】**

本発明の主題はまた、生体試料を使用して傍腫瘍性神経症候群を診断するための、また腫瘍形成を早期診断するための、次の構成要素を含むキットである:

- 随意に支持体に付着させた1以上の精製ULIP 6ポリペプチド、及び
- 抗ULIP 6自己抗体と該精製ULIP 6ポリペプチド(又はポリペプチド誘導体又は断片)の間の特異的抗原/抗体複合体の形成を明らかにする手段、及び/又は該複合体を定量する手段。

**【0053】**

本発明の主題はまた、アミノ酸配列SEQ ID No.2又はNo.4を含む精製ULIPポリペプチド又はペプチドを使用して得られる単クローン又は多クローン抗体又は断片、キメラ抗体又はそのイムノコンジュゲート、及び生体試料中のULIPタンパク質の精製又は検出を目的としたそれらの使用である。

**【0054】**

多クローン(ポリクローナル)抗体は、該タンパク質をたとえば前述の方法による遺伝子組換えにより通常の手順に従って生成し、該タンパク質に対して免疫にした動物の血清から得られよう。

**【0055】**

単クローン(モノクローナル)抗体はKoehler and Milsteinが記述している在

来ハイブリドーマ培養法に従って得られよう。

【0056】

抗体はキメラ抗体、ヒト化抗体、それにFab及びF(ab')<sub>2</sub>フラグメントである。それらもまたイムノコンジュゲート又は標識抗体の形をとってよい。

【0057】

本発明はまた、診断を目的に腫瘍及び傍腫瘍性神経症候群におけるULIP 6タンパク質の存在を明らかにするための、ULIP 6タンパク質に対する抗体の使用に関する。

【0058】

好ましくは、本発明は周知慣用の技術による白血球の不滅化によって患者の多クローン抗CV2血清から得られる単クローン抗体の使用に関する。

【0059】

たとえば、ULIPファミリーのタンパク質に対する抗体は、在来法による診断でまだがんが発見されていない神経症候群患者におけるULIPタンパク質の異常発現を検出するうえで有用である。このULIP 6タンパク質の異常発現は未発見のがんの存在と関連する可能性がある。したがって、ULIP 6タンパク質に対する抗体はがんの早期診断に有用である。

【0060】

患者から得られる、又は前述のようなULIP 6タンパク質の全部又は一部で免疫した後に得られるヒト又は非ヒト抗体は、たとえば放射性元素を結合させることにより検出可能に標識してから、個人に注射してもよい。技術上周知の画像化法を使用すれば、これらの抗体の腫瘍細胞との抗原反応後にごん性腫瘍の検出又は診断を行うことが可能になる。

【0061】

したがって、本発明の主題はまた、がん性腫瘍を検出又は診断するための方法であって、検出可能に標識した前述のような抗体の患者への投与及び該抗体の付着部位の画像化法による視覚化を含む方法である。

【0062】

本発明の主題はまた、精製ULIP 6タンパク質又は該タンパク質をコードする核

酸、ヌクレオチド配列SEQ ID No.1又はNo.3と特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンス配列、又は該タンパク質に対する抗体から選択される治療剤及び該治療剤と混合した製薬上許容しうる担体とを含有する製剤組成物である。本発明は好ましくは、有効成分として好ましくは可溶性の形にした精製ULIP 6ポリペプチド、及びそれと混合した製薬上許容しうる担体とを含有する製剤組成物を含む。

#### 【0063】

そうした組成物は中枢・末梢神経系の障害及び視覚障害特に傍腫瘍性神経症候群を治療するための新しい方針を提供する。さらに、そうした組成物は神経系における神経細胞欠損及び/又はULIP 6タンパク質の過剰発現の治療に有用である。

#### 【0064】

たとえば、ULIP 6は神経変性病理状態にも有用である。それはたとえば、希突起膠細胞小集団の異常がすでに判明しているPNSs類似の障害であり(Rapp et al., 1992)。

#### 【0065】

本発明の組成物はさらに、抗がん治療にも有効である。

#### 【0066】

ULIP 6タンパク質に対する抗体は抗腫瘍薬と併用して、該薬剤を腫瘍細胞に集中させるようにしてもよい。

#### 【0067】

ULIP 6タンパク質と前述のヌクレオチド配列、それにアンチセンス配列又はオリゴヌクレオチドは、ULIP 6タンパク質をコードする遺伝子が関与する任意タイプのがんの治療に有用であろう。そうしたがんの例としては、末梢性腫瘍たとえば小細胞肺癌、胸腺種、乳がん及び卵巣がん、それに脳腫瘍、好ましくはグリア起源の原発性脳腫瘍があげられよう。これとの関連では、ULIP 6は正常脳の非増殖細胞内で発現すること、それはたとえば肺又は胸腺などのような正常組織には見られないこと、それはこれらの組織内で腫瘍形成時に差別的に再発現すること、及び腫瘍系において分化時のその発現が調節されることは、ULIP 6が腫瘍抑

制遺伝子に由来するという可能性を示唆する。

【0068】

ULIP 6の作用を阻害する合成又は天然起源の化合物又は化合物ミックスを使用してもよい。

【0069】

あるいは、ULIP 6の刺激が望ましいかもしれない。その場合にはULIP 6タンパク質の発現又は作用を活性化する合成又は天然起源の化合物又は化合物ミックスを使用することができる。

【0070】

これらの活性化又は阻害化合物は製剤組成物中に含めてもよい。

【0071】

何よりも、本発明の製剤組成物は好ましくは静脈内、筋内、皮内又は経口法により全身投与するのがよい。

【0072】

その最適投与方法、用量及び剤型は、患者に適した治療処置を決め際に一般に考慮される基準、たとえば患者の年齢又は体重、症状全般の重篤度、該処置に対する耐性、及び観察される副作用などに応じて決定されよう。

【0073】

本発明はまた、精製ULIPタンパク質、該タンパク質をコードする又はULIP 6遺伝子の非コード領域に属する核酸、ヌクレオチド配列SEQ ID No.1又はNo.3と特異的にハイブリダイズすることができるアンチセンス配列、又は該タンパク質に対する抗体の、製薬上許容しうる担体と組み合わせた、神経変性疾患及び腫瘍の治療を目的とした製剤への使用を含む。

【0074】

最後に本発明の主題は、神経変性疾患及び腫瘍を治療するための方法であって、前述の製剤組成物の治療有効量をそうした治療を必要とする患者に投与することを含む方法である。

【0075】

以下、説明を目的に実施例と凡例を添えた図を示す。

## 【0076】

## 実施例1: 抗CV2抗体の標的の同定

本発明者は、ULIP 4ファミリーの組換えタンパク質をHela細胞中で発現させた後、当時本発明者が保有していた抗CV2血清がいずれもULIP 4を認識することを免疫組織化学法で証明することができた。この結果は、ULIP 4が抗CV2血清によって認識される主要抗原であるという可能性を示唆するものであった(Honorat et al., 1999)。他方、E. coli中で発現させたULIP 4タンパク質を対象にウェスタンブロット法でもっと大きな血清群を検査すると、いくつかの抗CV2血清は確かに組換えULIP 4タンパク質を認識するものの、それを認識しない血清もあること、ただし脳由来のタンパク質を免疫沈降させた後ではすべてのCV2血清がウェスタンブロット法で同じ66kDaタンパク質を認識することが判明した(Honorat et al., 1996)。さらに、in situハイブリダイゼーション法では希突起膠細胞はULIP 4メッセンジャーRNAを発現しなかった。そこで本発明者は、ULIPタンパク質と同族ではあるが、まだ記述されてない、また希突起膠細胞では発現されない別のタンパク質が存在するとの仮説を提出した。

## 【0077】

このタンパク質を探すために、ウェスタンブロット法では組換えULIP 4を認識しなかった抗CV2血清を発現ライブラリーのスクリーニングに用いた。gt11ファージ中にクローニングされたヒト脊髄(成人でCV2抗原の発現が最大である部位) cDNAライブラリー(Clontech, Palo alto, USA)を選択した。該ファージのスクリーニングを $2 \times 10^4$  pfu毎150 mm径ディッシュの密度で行った。42 °Cでの3時間半にわたるインキュベーション後に、IPTG (10mM) 中でインキュベートしたニトロセルロースフィルターでディッシュを覆い、37 °Cで3時間再インキュベートした。次に、フィルターにPBS-Tween-スキムミルクを飽和させ、次いで1/100に希釈した血清で一晩インキュベートした。次にフィルターをPBS-Tweenで洗い、次いでペルオキシダーゼ標識抗ヒト免疫グロブリン抗血清でインキュベートした。フィルターを洗浄後、ジアミノベンジジン法で発色させた。陽性クローンを、100%の陽性クローンが得られるまで順次継代培養した。同じタンパク質のC末端部分をコードする1400~1700塩基対の4つのcDNAを同定した。最大のコード配列を

もつクローン(クローン97)は1490塩基対(SEQ ID No.1のヌクレオチド1585~3074)を含み、90アミノ酸のポリペプチド(SEQ ID No.2のアミノ酸475~564)をコードする270ヌクレオチドのオープンリーディングフレームを有していた。データベースでの相同性検索により、このポリペプチド(本書では以下ULIP6 C-Termと呼ぶ)はULIPファミリーの各既知タンパク質のC末端部分と35%の相同性を示し、また他タンパク質ファミリーとの相同性はないことが判明した。

#### 【0078】

##### 実施例2: 組換えタンパク質GST-ULIP6 C-Termの産生

このポリペプチドが実際に抗CV2血清によって認識された抗原であることを確認するために、クローン97のコード領域を細菌発現ベクターpGex 2T (Pharmacia Amersham Biotech, Sweden)中にクローニングした。このベクターは、目的タンパク質がE. coli中でグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST, 26kDa)との融合体として発現することを可能にする。ウェスタンブロット法では、試験した18抗CV2血清のうち16血清が細菌タンパク質抽出物中のGST-ULIP6 C-Term融合タンパク質を認識した(陽性率89%) (図1)。ULIP6 C-Termポリペプチドの分子量が10kDaであり、66kDaタンパク質の約15%を占めることは注目に値する。これらの血清はいずれも単独のGSTを認識しなかった。100のコントロール血清も検査したが、GST-ULIP6 C-Term融合タンパク質に対して反応性を示すものはなかった。検査を可能な限り特異的にするために、本発明者は、アガロース-グルタチオンビーズで精製したGST-ULIP6 C-Term融合タンパク質で抗CV2血清を検査した。図2はウェスタンブロット法で得られた結果の一例である。

#### 【0079】

##### 実施例3: ヒト脊髄RNAに対するノーザンブロット法の実施

ULIP 6遺伝子の転写産物のサイズを求めるために、ヒト脊髄から抽出した精製ポリA+ RNAs (Clontech, Palo alto, USA)を対象にノーザンブロット法を実施した。プローブは  $-^{32}\text{P}$  dCTPで標識した全クローン97に対応した。RNAsを1.2%アガロースホルムアルデヒド電気泳動ゲル上で分離し、ナイロンフィルター上に移した。フィルターはハイブリダイゼーション液(Clontech, Palo alto, USA)でプレハイブリダイズした後、プローブと1時間インキュベートした。フィルターを

洗浄後、-80℃で一晩フィルムに焼き付けた。5kb転写産物に対応する単一バンドが現れた。

#### 【0080】

##### 実施例4: 脊髄でのin situハイブリダイゼーション

希突起膠細胞内にULIP 6メッセンジャーRNAが存在することを確認するために、脊髄前部切片でin situハイブリダイゼーション分析を実施した。使用プローブは、pBluescript SK (Stratagene)中にサブクローニングしたクローン97の転写によって得られた、ジゴキシゲニンで標識したコールドRNAプローブであった。ネガティブコントロールとしてセンスプローブを使用した。希突起膠細胞の特異的標識を観察することができた。

#### 【0081】

##### 実施例5: ウサギ抗ULIP 6抗体の産生

ULIP 6タンパク質に特異的なペプチド(SEQ ID No.2のアミノ酸断片505~524に対応するSEQ ID No.4のペプチドRep ULIP 6 = “KEMGTPLADTPTRPVTRHGG”)に対してウサギを免疫して単クローン抗体を産生させた。該ペプチドはCOVALAB社(Lyon, France)がペプチド合成機で合成した。試料純度はHPLCと質量分析で調節した。ヘモシアニンに結合させたペプチド1mgをフロイント完全アジュバントと共にウサギ(COVALAB, Lyon, France)に注射した。3週間ごとに、さらに0.5mgの注射を行った。抗体の産生とその特異性はウェスタンブロット法と免疫組織化学法で、免疫前血清をコントロールとして分析した。

#### 【0082】

得られた抗体はウェスタンブロット法では脳抽出物上でGST-ULIP6 C-Termタンパク質すなわち66kDaタンパク質を、また免疫組織化学法ではラット脊髄切片上で特異的に標識した希突起膠細胞を認識した。

#### 【0083】

##### 実施例6: 完全長ULIP 6配列の探索

完全長ULIP6 cDNAを得るために、gt11ファージ中にクローニングされたヒト脊髄cDNAライブラリー(Clontech, Palo alto, USA)を放射性プローブでスクリーニングした。PCRで得られたこのプローブは<sup>32</sup>P dCTPで標識したが、SEQ ID N

0.1のヌクレオチド1585~1854に対応していた。該ファージのスクリーニングを $2 \times 10^4$  pfu毎150 mm径ディッシュの密度で行った。37 °Cでの6時間にわたるインキュベーション後に、ナイロンフィルター上にレプリカを得た。このフィルターを処理してファージを変性させるようにし、次いでDNAを42 °Cで一晩固定した。急速ハイブリダイゼーション液(Clontech, Palo Alto, USA)でプレハイブリダイズした後、フィルターを放射性プローブで1時間インキュベートした。フィルターを洗浄後、-80 °Cで一晩フィルムに焼き付けた。陽性シグナルを示すクローンを、100%の陽性クローンが得られるまで順次継代培養で精製した。得られた最大のcDNAは3074ヌクレオチド(SEQ ID No.1)を含み、また1692ヌクレオチドのオープンリーディングフレーム(SEQ ID No.1のヌクレオチド163~1854)を含んでいた。該cDNAは564アミノ酸のタンパク質(SEQ ID No.2)をコードしていたが、そのC末端部分はULIP6 C-Termポリペプチド(SEQ ID No.2のアミノ酸475~564)と厳密に一致した。得られたタンパク質の既知ヒトULIP/CRMPタンパク質4種とのアラインメントにより50%の相同性が観察された。

#### 参考文献

- 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
- 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
- Graus et al., Neurology, 1985, vol. 35, pp 538-543
- Greenlee et al., Ann. Neurol., 1983, vol. 14, pp 609-13
- 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
- Honnorat J. et al., Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry, 1996, vol. 61, pp 270-278
- Jaekle et al., Ann. Neurol., 1985, vol. 18, pp 592-600

- Koehler and Milstein, Nature, 1975, vol. 256, pp 495-497
- Levy N., Mattei M.G., 1995, Geneprobs II, a practical approach, B.D. Hames and S.J. 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, 9.47-9.62
- Wang L.H. and Strittmatter S.M., (1996). J. Neurosci., 16:6197-6207.

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【図1】

図1は、GST-ULIP6 C末端融合タンパク質を発現するE. coliのタンパク質抽出物に関するウェスタンブロットである。これらの抽出物はSDS-12.5% PAGEで分離し、PVDFフィルター上に移し、ヒト血清とインキュベートした。レーン1~14: 抗CV2血清、レーン15~17: コントロール血清。

##### 【図2】

図2は、アガロース - グルタチオンビーズで精製後のGST-ULIP6 C末端融合タンパク質のウェスタンブロットである。2種類の抗CV2血清(レーン1: 血清94-822、レーン2: 血清95-590)は該タンパク質を認識しているが、コントロール血清(レーン3)は認識していない。

##### 【配列表】

## LISTE DE SEQUENCES

&lt;110&gt; INSERM

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

&lt;130&gt; BET 01/0161

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 4

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 3074

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (163)..(1854)

&lt;400&gt; 1

```

ccccccac totggactcc cgcgctgggc gcgctgaggc ggcccccgag cgagcgcgcg 60
tgcagccgcc gccgccccga gcacccgcag ctccggcgcc gcggcgagac ggagacggac 120
cgagccacgg gccccgcgg ccgcagcacc 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	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	ggt	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	
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 gaggggggcc				1974
ccgggaccca cggagccctc cctatgtctg caaagtgatt cactgtgctt cgagccaact				2034

ctaacaggca ctttgagatg tgttcctcct gctgtagtcc tttctgcctt ggectcggcg 2094  
 ggcttttctg gggcccagga agcccacact atgcacagag cccaatgcat agagccctgg 2154  
 ccagcccttc ctctcactcc tgcctccgct ggctttggga aagcccagac tttagtgcct 2214  
 tgccccctgg ctgactggcc agttgcccag agcactttag cagatgtggt ttcaaagtaa 2274  
 aggctctctc ccccaccctc taggccccgt ggtgacattt cccaagtacg acagatgtca 2334  
 gcttcccagc catgcccagg acgtcctatc tcccacaacc cacctctggc cctgtgtagg 2394  
 ggcaggggatg ggggtggctg ggactcctgg tgcccctcgc cagctttctcc tgcgccccgc 2454  
 ccacaccctc ggggggggtca caggcccaga agggtagctg ggcggggctc gaggtctggtg 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 cccctcccc tcccctcctt gtctagtttc ccacattcca 2814  
 aaagggggcc tgggatgcta gccccagaga tgcccagcct tcaggaagca ggtgtccttt 2874  
 cccctctctg cccctgatca ctcccagcac tcccctgccc ttcccctgtc ttcacctgcc 2934  
 accacacaca cacacacaca cacacacaca cacacagca tggcttccta taacttcttc 2994  
 ctgctggaca gagactcagc gctcctcctg tgtgactggc aagaggcctc atgctctgctg 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



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 aagcccccg agtgaggacg caocgcgcgc accagcccgc aactctccag 60  
 ccgaagctgc aggggcagga gaggctgggc tgggtggcac accacccgag gggggccccg 120  
 ggaccacagg agccctccct atgtctgcaa agtgattcac tgtgcttcga gccaaactta 180  
 acaggcactt tgagatgtgt tctctctgct gtagtcttt ctgccttggc ctgggcgggc 240  
 tttctgggg ccaggaagc ccacactatg cacagagccc aatgcataga gccctggcca 300  
 gcccttcttc tcaactctgc ctccgctggc ttgggaaag ccagacttt agtgcctgc 360  
 cccctggctg actggccagt tgcccagagc acttagcag atgtggtttc aaagtaaagg 420  
 cctctcccc cacccttag gccccgtggt gacatttccc aagtcagaca gatgtcagct 480  
 tcccagccat gccaggagc tcctatctcc cccaaccac ctctggccct gtgtaggggc 540  
 agggatgggg gtggctggga ctctgtgtc ccctgcccag cttctctgct gccccgcca 600  
 caccctggg ggggtcacag gcccagaagg gtagctgggc ggggctcgag gctggtgcca 660  
 ggcgctgta aatggtttt ttttgacgt ttggtttgc cagtagttt gtttgacttg 720  
 tttgtgcatc ctgtgaaaa taacgggtct tgtgtcacta gcatagaata gcgacaggaa 780  
 tagatgtggt ccttaggaga cgtgcactt gacaccaacc agacagcaca gggcaggggt 840  
 ggtggaggg gctgggctca caggcctctc ttttccccgc ctgcagtctt ctgggctgcg 900  
 ggaggccctg gcccttccc ctcccctcc cctccttctc tagtttccca cattccaaaa 960  
 ggggcccctg gatgctagcc ccagagatgc cagcccttca ggaagcaggt gtcctttccc 1020  
 ctctctgccc ctgatcactc ccagcactcc ccttgcttcc cctgtcttc acctgcacc 1080  
 acacacacac acacacacac acacacacac acacgcatgg cttcctataa cttcttctg 1140  
 ctggacagag actcagcgt cctcctgtgt gactggcaag aggcctcatg cctgctgaga 1200

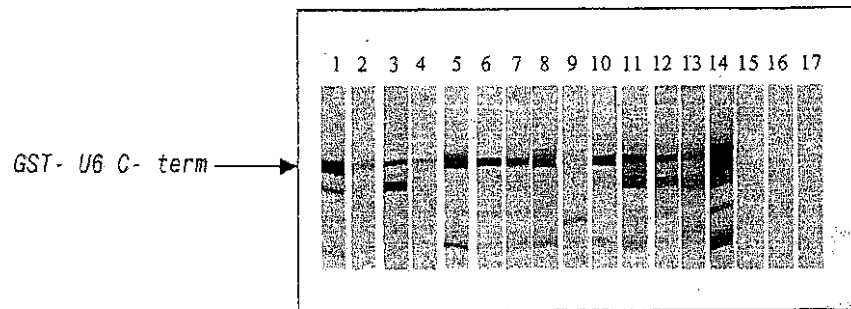
gagggtcgac ggggccc

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

【 1】



**FIG.1**

【図2】

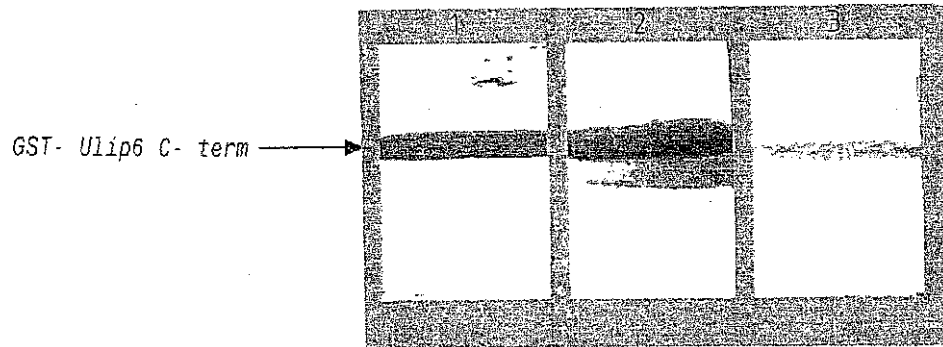


FIG.2

## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/JP 01/00589
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> 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>B. FIELDS SEARCHED</b> 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		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE GENEMBL 'Online! 19 January 2000 (2000-01-19) YANAGI, S. ET AL.: "Rattus norvegicus mRNA for dihydropyrimidinase-related protein, complete cds." XP002157134	1, 2, 5-7, 10, 13, 14
Y	Accession AB029432  -& 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  --- -/-	9, 11, 12, 14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> 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/FR 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	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 ---	4
Y	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 ---	9,11,12, 14
A	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 ---	4
P,X	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 ---	1,2,5-7, 10,13
P,X	DATABASE GENEMBL 'Online! 21 June 2000 (2000-06-21) HORIUUCHI, M.: "Homo sapiens mRNA for hypothetical protein (ORF1)" XP002157137 Accession AJ251275 -& HORIUUCHI 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 --- -/--	1,2,5-7, 10,13

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern:	plication No
PCT/JP/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/rk 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

## フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコ-ト' (参考)
A 6 1 K	48/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 6
A 6 1 P	25/00		4 H 0 4 5
	35/00	C 0 7 K 14/47	
	43/00		
C 0 7 K	14/47		
	16/18		
	16/46	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N	1/15		
	1/19		
	1/21	C 1 2 P 21/02	C
	5/10	G 0 1 N 33/53	D
C 1 2 P	21/02		Z
G 0 1 N	33/53		
	33/574	C 0 7 K 17/00	
// C 0 7 K	17/00	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 P	21/08	C 1 2 N 15/00	Z N A A
			A
		A 6 1 K 37/02	
(81)指定国	E P ( A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E , T R ) , C A , J P , U S		
(72)発明者	ブリン, マリー - フランソワーズ フランス国, エフ - 69002 リヨン, プラ ス カルノ, 5		
(72)発明者	オノラー, ジェローム フランス国, エフ - 69500 ブロン, アン パース ルネ, 9		
(72)発明者	ロジュモン, ベロニク フランス国, エフ - 69003 リヨン, アブ ニュ フェリクス フォール, 204		

Fターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA80 CA04 CA07  
DA02 DA06 EA04 GA11 GA18  
GA19 HA03  
4B064 AG01 AG27 CA02 CA10 CA19  
CA20 CC24 DA05 DA14  
4B065 AA26X AA93X AA93Y AB01  
AC14 BA02 CA24 CA44 CA46  
4C084 AA01 AA02 AA13 BA01 BA08  
BA22 BA23 CA18 DA27 MA01  
NA14 ZA012 ZB212 ZB262  
4C085 AA14 AA16 BB01 CC03 EE01  
GG02 GG03 GG05 GG08  
4C086 AA01 AA03 BC42 CB07 DA34  
GA07 GA12 MA02 MA05 NA14  
ZA01 ZB21 ZB26  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10  
BA41 CA40 DA76 DA86 EA20  
EA50 FA72 FA74

专利名称(译)	新型人类ULIP / CRMP蛋白及其在癌症和腮腺神经综合征的诊断和治疗中的应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003525059A</a>	公开(公告)日	2003-08-26
申请号	JP2001564230	申请日	2001-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	法国国家健康医学研究院		
申请(专利权)人(译)	国立研究所德拉Santu等德拉Rusherushe医疗 ( E NS ER强麦EM )		
[标]发明人	アグエラミッシェル アントワーヌジャンクリストフ ブリンマリーフランソワーズ オノラージェローム ロジュモンベロニク		
发明人	アグエラ,ミッシェル アントワーヌ,ジャン-クリストフ ブリン,マリー-フランソワーズ オノラー,ジェローム ロジュモン,ベロニク		
IPC分类号	G01N33/53 A61K31/711 A61K38/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C07K17/00 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12N15/09 C12N15/12 C12P21/02 C12P21/08 G01N33/574		
CPC分类号	A61K38/00 A61P25/00 C07K14/47 C07K14/435 C07K14/4713 C07K14/4748 C07K14/705 C07K16/18 G01N33/6854		
FI分类号	A61K31/711 A61K39/395.D A61K39/395.N A61K48/00 A61P25/00 A61P35/00 A61P43/00 C07K14/47 C07K16/18 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/02.C G01N33/53.D G01N33/574.Z C07K17/00 C12P21/08 C12N15/00.ZNA.A C12N5/00.A A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA06 4B024 /EA04 4B024/GA11 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA05 4B064/DA14 4B065/AA26X 4B065 /AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084 /CA18 4C084/DA27 4C084/MA01 4C084/NA14 4C084/ZA012 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C085 /AA14 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085/CC03 4C085/EE01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG05 4C085/GG08 4C086/AA01 4C086/AA03 4C086/BC42 4C086/CB07 4C086/DA34 4C086/GA07 4C086 /GA12 4C086/MA02 4C086/MA05 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZB21 4C086/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045 /DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000002566 2000-02-29 FR 2000005005 2000-04-18 FR		
其他公开文献	JP4990459B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了纯化的多肽，其包含氨基酸序列SEQ ID NO2（命名为ULIP6），编码所述多肽的核酸，所述编码序列的3'非编码序列，以及它们的癌症和副肿瘤特性。它涉及用于神经系统综合征的诊断治疗的用途。

