

(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
23 janvier 2014 (23.01.2014)

WIPO | PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2014/013184 A1

- (51) Classification internationale des brevets :
A61K 31/19 (2006.01) *G01N 33/50* (2006.01)
- (21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2013/051705
- (22) Date de dépôt international :
16 juillet 2013 (16.07.2013)
- (25) Langue de dépôt : français
- (26) Langue de publication : français
- (30) Données relatives à la priorité :
1257021 19 juillet 2012 (19.07.2012) FR
- (71) Déposant : GENETHON [FR/FR]; 1 bis rue de l'Internationale, F-91002 Evry (FR).
- (72) Inventeur : RICHARD, Isabelle; 113 chemin du CGB, F-91100 Corbeil Essonnes (FR).
- (74) Mandataires : BUCHET, Anne et al.; Cabinet Laurent & Charras, "Le Contemporain", 50 chemin de la Bruyère, F-69574 Dardilly Cedex (FR).
- (81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) : AE, AG, AL, AM,

AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), européen (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale (Art. 21(3))

(54) Title : USE OF EPIGENOME-MODIFYING COMPOUNDS FOR THE TREATMENT OF GENETIC MUSCULAR DISEASES LINKED TO A PROTEIN-CONFORMATIONAL DISORDER

(54) Titre : UTILISATION DE COMPOSES MODIFIANT L'EPIGENOME POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES GÉNÉTIQUES MUSCULAIRES LIÉES À UNE ANOMALIE DE CONFORMATION PROTÉIQUE

(57) Abstract : The invention relates to a pharmaceutical composition including at least one epigenome-modifying compound, for the use thereof in the treatment of genetic muscular diseases linked to a conformational anomaly of at least one protein, said anomaly leading to the cellular degradation of the protein.

(57) Abrégé : L'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé modifiant l'épigénome, pour son utilisation dans le traitement des maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine, ladite anomalie entraînant la dégradation cellulaire de la protéine.



WO 2014/013184 A1

UTILISATION DE COMPOSES MODIFIANT L'EPIGENOME POUR LE TRAITEMENT DES MALADIES GENETIQUES MUSCULAIRES LIEES A UNE ANOMALIE DE CONFORMATION PROTEIQUE

DOMAINE DE L'INVENTION

La présente invention concerne le traitement des maladies génétiques musculaires liées à un défaut de conformation protéique et dans lesquelles la protéine présentant le défaut de conformation subit une dégradation cellulaire. Des maladies particulièrement visées sont par exemple les sarcoglycanopathies, les dysferlinopathies, les anoctaminopathies (liées à un défaut de l'anoctamine 5) et les dystrophies associées à une anomalie de FKRP (pour « Fukutin-Related Protein »).

Plus précisément, elle préconise l'identification et l'utilisation d'agents modifiant l'épigénome comme médicaments pour le traitement de ces maladies.

ETAT DE LA TECHNIQUE

Les pathologies dues à une anomalie des fibres musculaires sont regroupées sous le terme de myopathies et sont caractérisées par une déstabilisation et une dégénérescence musculaire conduisant le plus souvent à une altération et à une perte des fonctions locomotrices.

Plus de 80 myopathies rares d'origine génétique ont été identifiées. Elles peuvent avoir une transmission dominante, récessive ou liée au chromosome X. La prévalence de chacune des formes est faible (de 1/200000 à 1/8500), même si la fréquence cumulée atteint environ 1/3000.

Parmi ces pathologies, le groupe le plus complexe est celui des dystrophies musculaires progressives qui comprend au moins 25 pathologies différentes qui peuvent être divisées en dystrophies musculaires proximales, dites dystrophies des ceintures, et en dystrophies musculaires distales.

Les dystrophies musculaires proximales sont caractérisées par une atrophie progressive et sélective de certains muscles des ceintures scapulaires et pelviennes et les dystrophies musculaires distales par une atteinte initiale des muscles des mains, des pieds, des avant-bras ou des jambes.

Le défaut génétique conduit à un processus cyclique de dégénérescence / régénération du tissu musculaire conduisant à un remaniement pathologique de celui-ci. Sur le plan histologique, ce processus est caractérisé par des fibres possédant un noyau centralisé, témoignant des étapes de nécrose et régénération, des infiltrations macrophagiques et adipeux et une fibrose secondaire.

Les symptômes cliniques peuvent être très hétérogènes selon le type de pathologie, allant de la simple fatigue jusqu'à la perte de la marche, une diminution de force qui s'accompagne habituellement d'une atrophie musculaire (**Daniele et al., 2007**). Ces pathologies peuvent donc avoir un fort impact sur la qualité de vie des patients en raison de la perte musculaire pouvant conduire au décès par atteinte respiratoire ou cardiaque.

De manière plus précise, les dystrophies musculaires proximales, ou dystrophies des ceintures (« Limb Girdle Muscular Dystrophy » ou LGMD), sont classées en fonction de leur mode de transmission : LGMD1 pour les formes dominantes et LGMD2 pour les formes récessives (**Bushby and Beckmann, 1995**).

Les caractéristiques communes des LGMD1 sont : une apparition des symptômes à l'âge jeune-adulte ou adulte, une évolution lente, une faible fréquence de perte de la marche et des valeurs de créatine kinase relativement normales. Ces formes dominantes sont moins fréquentes que les formes récessives, représentant moins de 10% de toutes les LGMDs (**Nigro, 2003**) avec seulement une ou quelques familles rapportées pour chaque type.

A ce jour, seize formes de dystrophies des ceintures autosomiques récessives (LGMD2) ont été identifiées et annotées par l'addition d'une lettre capitale (LGMD2A à 2P). Tous les gènes responsables de ces dystrophies ont été identifiés. Les protéines correspondantes ont des localisations et des rôles variés.

De manière encore plus complexe, il faut noter que des mutations dans un certain nombre de gènes impliqués dans les LGMD2 sont également associées à une présentation clinique de type distal. A titre d'exemples, on peut citer :

- la dysferline qui, mutée, peut également conduire à une myopathie de Miyoshi ;
- l'anoctamine 5 qui, mutée, peut également conduire à une myopathie de type Miyoshi like type 3 ;
- la titine qui, mutée, peut également conduire à une dystrophie musculaire tibiale (TMD).

Parmi les LGMD2, les sarcoglycanopathies sont des maladies génétiques dues à des mutations dans les gènes des sarcoglycanes. Ces protéines, au nombre de 4, font partie d'un complexe associé à la dystrophine présent à la membrane de la cellule musculaire et qui joue un rôle essentiel dans la protection de la fibre musculaire au cours des contractions.

Ainsi, les formes suivantes de sarcoglycanopathies ont été répertoriées :

- la LGMD2C, provoquée par une mutation du gène codant la γ -sarcoglycane (**Ben Othmane et al.**, 1995) ;
- la LGMD2D, provoquée par une mutation du gène codant l' α -sarcoglycane (**Passos-Bueno et al.**, 1993) ;
- la LGMD2E provoquée par une mutation du gène codant la β -sarcoglycane (**Lim et al.**, 1995) ; et
- la LGMD2F, provoquée par une mutation du gène codant la δ -sarcoglycane (**Passos-Bueno et al.**, 1996).

Des mutations responsables dans chacun de ces gènes ont pu être identifiées : Ainsi, la mutation la plus fréquente dans la LGMD2D est la substitution de l'arginine en position 77 par une cystéine (R77C). Une mutation spécifique dans le gène codant pour la γ -SG, la C283Y, à l'origine de LGMD2C, est fréquemment retrouvée dans la communauté Tzigane en Europe (**Piccolo et al.**, 1996; **Todorova et al.**, 1999). Une autre mutation dans le gène de la γ -SG, la del521T, est presque exclusivement retrouvée dans les familles tunisiennes (**Kefi, et al.**, 2003). Les patients de la communauté Amish aux Etats-Unis, où la LGMD2E est fréquente, sont porteurs de la mutation T151R (**Duclos, et al.**, 1998; **Lim et al.**, 1995).

En tout état de cause, il n'existe pas actuellement de traitement curatif vraiment efficace de ces maladies. Bien que la kinésithérapie soit un élément de confort très apprécié par ces patients, leur prise en charge consiste principalement en divers moyens médicamenteux et/ou techniques visant à améliorer la qualité de vie des patients.

En rapport avec le traitement des sarcoglycanopathies, le document WO 2008/009802 a préconisé l'utilisation d'inhibiteurs des α -mannosidases de classe I. Dans ce cadre, il a été montré qu'un certain nombre de mutations dans les gènes des sarcoglycanes conduisaient, non pas à une perte de fonction de la protéine, mais à une dégradation de la protéine anormalement conformée par le système de contrôle-qualité de la cellule. Ainsi, les inhibiteurs préconisés, dirigés contre ce système, empêcheraient la

dégradation de la protéine mutée, qui retrouve alors une localisation membranaire fonctionnelle.

Il existe toutefois un besoin évident de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour prendre en charge les maladies génétiques musculaires telles que les sarcoglycanopathies.

EXPOSE DE L'INVENTION

Ainsi, c'est une toute nouvelle approche thérapeutique qui est proposée dans le cadre de la présente invention. En effet, le Demandeur a montré qu'il était possible de restaurer la fonctionnalité d'une protéine musculaire présentant un défaut de conformation, à savoir un mauvais repliement, à l'aide d'un composé modifiant l'épigénome.

Plus précisément et selon un premier aspect, la présente invention concerne donc une composition pharmaceutique comprenant au moins un composé modifiant l'épigénome, pour son utilisation dans le traitement des maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine, ladite anomalie entraînant la dégradation cellulaire de la protéine.

En d'autres termes, il s'agit d'utiliser une composition comprenant un composé modifiant l'épigénome pour préparer un médicament destiné au traitement des maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire. L'invention concerne donc une méthode de traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire comprenant l'administration, à une dose effective, d'une composition comprenant un composé modifiant l'épigénome.

Ladite composition peut en outre contenir tout composé ou excipient acceptable, notamment pharmaceutiquement. Elle peut en outre comprendre d'autres principes actifs destinés à traiter la même pathologie ou une autre pathologie. Selon un mode de réalisation particulier, le ou les composé(s) modifiant l'épigénome sont les seuls principes actifs de la composition.

Il peut également être envisagé d'associer, dans la même composition, au moins deux composés modifiant l'épigénome de nature distincte, pour une administration simultanée ou décalée dans le temps.

La voie d'administration peut aussi bien être intramusculaire, loco-régionale, ou intraveineuse, voire sous-cutanée, intrapéritonéale ou orale.

Le mode d'administration, la dose administrée ainsi que la fréquence d'administration sont déterminés au cas par cas, selon des protocoles classiques connus de l'homme du métier.

On entend par « épigénome » l'ensemble des signaux biochimiques transmissibles et potentiellement réversibles qui sont associés aux gènes afin d'en gouverner l'expression et d'assurer ainsi l'exécution du programme génétique lié à l'activation et à l'inactivation de ces gènes sans modification de séquence de l'ADN d'une cellule différenciée donnée.

Ainsi, la séquence d'ADN qui compose les gènes est identique dans toutes les cellules d'un même individu mais les protéines codées par ces gènes pourront être produites à des moments ou à des endroits différents suivant les marques épigénétiques qui sont présentes sur les gènes.

Le support biochimique de l'épigénome est multiple et complexe et implique :

- des modifications au niveau de l'ADN ;
- des modifications au niveau des histones ;
- la participation de certaines protéines, telles que les polycombs ;
- la participation d'ARN non codants, de petite taille (les microARN) et de grande taille (les longs ARN non-codants).

En d'autres termes, un composé modifiant l'épigénome mis en œuvre dans le cadre de l'invention est un modulateur d'un effecteur épigénétique, c'est-à-dire capable d'en moduler au moins partiellement l'expression et/ou l'activité. On entend par « modulateur » aussi bien un activateur (ou inducteur) qu'un inhibiteur (ou suppresseur).

Ces composés peuvent être de toute nature, par exemple des protéines, des peptides, des anticorps, des molécules chimiques ou des acides nucléiques (oligonucléotides antisens, ARNsi, ARNsh, ribozymes, ...).

Selon un premier mode de réalisation, c'est le niveau d'expression et/ou de production de l'effecteur épigénétique qui est modulé (diminué ou augmenté) par le composé en question. Ceci peut être aisément testé par l'homme du métier, notamment grâce aux techniques suivantes :

- niveau d'expression du transcrit par Northern blot ou PCR ;
- niveau de production de la protéine par détection à l'aide d'anticorps appropriés (Western blot ou ELISA).

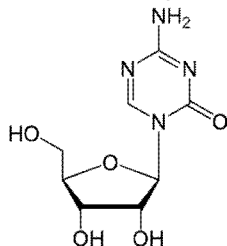
Selon un autre mode de réalisation, l'effecteur épigénétique est produit et c'est son activité qui est modulée (augmentée ou diminuée) par le composé en présence. Dans ce cas de figure, cette activité est quantifiée à l'aide d'un test approprié en fonction de l'effecteur.

Concernant la nature des composés modifiant l'épigénome, il est connu que le premier niveau du contrôle épigénétique concerne la méthylation de l'ADN qui se produit au niveau des dinucléotides CpG et se met en place très tôt au cours du développement. Elle résulte notamment de l'action concertée de trois méthyltransférases de l'ADN (ou DNMT).

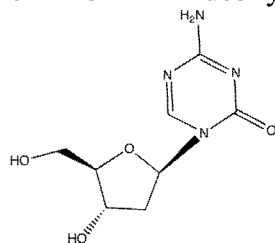
Ainsi, selon un aspect particulier, le composé modifiant l'épigénome peut être un inhibiteur de la méthylation de l'ADN, notamment un inhibiteur des méthyltransférases de l'ADN. Cette classe de molécules est particulièrement adaptée pour les applications *in vitro*.

Dans cette catégorie, on peut notamment citer :

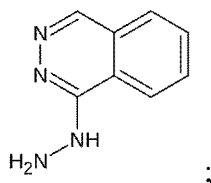
- des analogues nucléosides : ils sont incorporés dans l'ADN en réplication. Ils inhibent ainsi la méthylation de l'ADN et réactivent des gènes silencieux. Il peut s'agir de :
 - la 5-azacytidine (ou 5-aza), de formule :



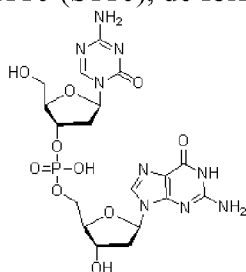
- la 5-aza-2'-déoxycytidine ou décitabine, de formule :



- la zébularine ;
- des analogues non nucléosidiques : ils inhibent les DNMT en bloquant le site actif de l'enzyme ou en se fixant sur les régions CpG de l'ADN empêchant ainsi la liaison des DNMT à l'ADN. Il peut s'agir de :
 - la procainamide ;
 - la procaine ;
 - l'epigallocatechin-3 gallate (EGCG) ;
- des oligonucléotides antisens :
 - DNMT1 ASO ;
- l'hydralazine, de formule :



- le SGI110 (S110), de formule :



Alternativement et de manière préférentielle pour les applications *in vivo*, le composé modifiant l'épigénome est un inducteur ou activateur de la déméthylation de l'ADN.

De manière générale, la capacité d'un composé à moduler la méthylation de l'ADN peut être aisément testée : Le profil de méthylation de l'ADN peut être déterminé grâce à un traitement de l'ADN au bisulfite, qui convertit les cytosines non méthylées en uracile mais n'affecte pas les méthylcytosines. Différentes méthodes basées sur le séquençage direct, le pyroséquençage, la PCR ou l'hybridation peuvent ensuite être utilisées pour différencier les allèles.

Ainsi, grâce à ce test simple, des inhibiteurs ou des activateurs de la méthylation de l'ADN, susceptibles d'être utilisés dans le cadre de la présente invention, peuvent être aisément identifiés.

Un autre niveau d'action concerne les modifications covalentes des histones. De manière préférentielle, ces modifications concernent : l'acétylation des résidus lysine, la méthylation des résidus lysine et des arginine, la phosphorylation des résidus thréonine et sérine, l'ubiquitination et la sumoylation des résidus lysine.

Or, ces modifications au niveau des histones peuvent aussi bien avoir un effet positif que négatif sur l'expression des gènes. Le composé d'intérêt peut aussi bien être de type activateur qu'inhibiteur.

En outre, il est possible d'agir sur les enzymes de modification des histones soit directement au niveau de leur activité, soit génétiquement au niveau de leur expression.

En pratique, il est possible d'analyser les modifications post-transcriptionnelles des histones, et donc d'évaluer l'impact d'un composé d'intérêt, par les techniques bien connues de Western Blot ou d'ELISA, mettant en œuvre une batterie d'anticorps spécifiques des modifications des histones (**Egelhofer *et al.*, 2011**).

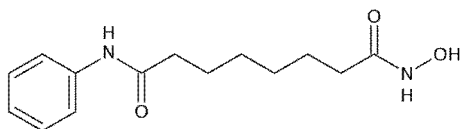
A titre d'exemple et comme déjà dit, il est possible de moduler le niveau d'acétylation des histones. Or celui-ci est la résultante de l'activité de deux enzymes antagonistes : les histones désacétylases (HDAC), conduisant à une chromatine réprimée et les histone-acétyltransférases (HAT) qui permettent l'expression génique.

Ainsi et selon un aspect particulier de l'invention, le composé modifiant l'épigénome peut être un inhibiteur des histones désacétylases (HDAC).

A noter qu'il existe plusieurs classes d'inhibiteurs des HDACs en fonction de leur mode d'inhibition et de la catégorie des HDACs qu'ils ciblent. Parmi les inhibiteurs de la désacétylation des histones, on peut citer :

- les acides hydroxamiques ou leurs sels :
 - trichostatine A (TSA) ;
 - apha compound 8 ;
 - MC1568 ;
 - Tubucine ;

- suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA ou vorinostat), de formule :

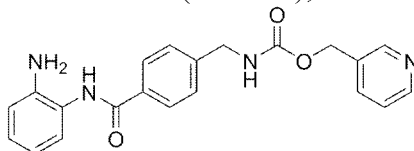


- les tétrapeptides cycliques et des depsipeptides :

- trapoxine B ;
- apicidine ;

- les benzamides :

- entinostat (MS-275), de formule :



- CI-994 ;
- 106
- Mocetinostat (MGCD0103)

- les cétones électrophiles :

- les cétones trifluorométhylées ;
- les α -cétoamides ;

- les composés acides aliphatiques :

- le phénylbutyrate, de formule :



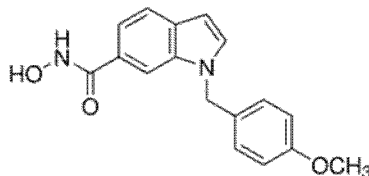
- l'acide valproïque ;

- belinostat (PXD101) ;
- LAQ 824 ;
- Panobinostat (LBH589) ;

- les autres molécules :

- nicotinamide ;
- dihydrocoumarine ;
- naphthopyranone ;
- 2-hydroxynaphaldéhydes ;
- 10-hydroxy-2-decenoic acid (10HDA) ;
- Abexinostat (PCI-24781) ;
- SB939 ;
- Resminostat (4SC-201) ;
- Givinostat (ITF2357) ;
- CUDC-101 ;

- AR-42 ;
- CHR-2845 ;
- CHR-3996 ;
- 4SC-202 ;
- CG200745 ;
- ACY-1215 ;
- Sulforaphane ;
- Kevetrine ;
- Apicidin ;
- Sodium butyrate ;
- (-)-Depudecin ;
- Sirtinol ;
- *N*-Hydroxy-1,3-dioxo-1*H*-benz[de]isoquinoline-2(3*H*)-hexanamide ou Scriptaid ;
- Le dérivé hydroxamate de l'acide butyrique ;
- L'isobutyramide ;
- Le CBHA (m-carboxycinnamic acid bishydroxamide) ;
- L'HC toxin ;
- Le M344 (4-diméthylamino-*N*-(6-hydroxycarbamoyl-hexyl)-benzamide) ;
- Le Nullscript (4-(1,3-dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolin-2-yl)-*N*-hydroxybutanamide) ;
- PCI-34051, de formule :



Les formules chimiques d'un certain nombre de ces inhibiteurs sont décrites dans le document Kazantsev and Thompson (Nature Reviews Drug Discovery, vol. 7, n° 10, 2008, 854-866). Par ailleurs, une méthode de criblage d'inhibiteurs des HDAC est par exemple décrite dans le document WO 03/066885.

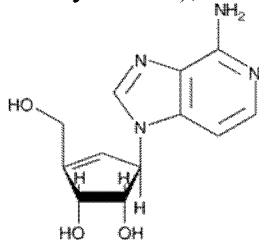
Avantageusement et pour cette classe de composés, l'inhibiteur utilisé est le SAHA.

En outre, des inhibiteurs de la méthylation des histones peuvent être :

- le SL11144, de formule :



- le DZNep (3-Deazaneplanocin : inhibiteur de la S-adénosylhomocystéine hydrolase), de formule :



Un troisième niveau de contrôle peut être exercé au niveau du complexe PRC. En effet, les protéines du groupe polycomb (PcG) sont des facteurs chromatinien connus pour maintenir l'état transcriptionnel réprimé de leurs gènes cibles au cours du développement. Ces facteurs agissent sous forme de larges complexes multimériques appelés *Polycomb Repressive Complex* (PRC) qui se fixent sur l'ADN, au niveau de séquences régulatrices appelées *PcG response elements* (PRE) afin de réprimer des gènes par méthylation. En effet, les complexes PRC contiennent également une activité histone méthyltransférase (HMTase) intrinsèque et répriment l'expression par la méthylation des histones.

Dans le cadre de la présente invention, tout modulateur du complexe PRC peut être mis en œuvre.

Les protéines polycomb peuvent par exemple être ciblées, notamment inhibées ou inactivées au niveau de leur expression à l'aide d'un antisens ou en réalisant du saut d'exons. L'expression ou l'activité des protéines polycomb peut être suivie par les techniques classiques suivantes : niveau d'expression par Western Blot ; liaison à l'ADN par gels retards (« gel mobility shift ») ou précipitation de la chromatine.

Enfin, l'implication dans le contrôle de l'expression des gènes des ARN non codants, les microARN et les longs ARN non codants, a été soulignée.

Les microARN (miARN) sont une classe d'ARN non-codants d'environ 22 nucléotides qui modulent négativement l'expression des gènes de façon post-transcriptionnelle. En se fixant par complémentarité sur l'ARN cible, ils vont conduire soit à la dégradation de cet ARN soit en inhiber la traduction. Les miARN peuvent, de plus, influencer les mécanismes épigénétiques en contrôlant la méthylation de l'ADN et les modifications des histones par recrutement de complexes au niveau du transcrit naissant correspondant.

Un autre type d'acteur en épigénétique sont les longs ARN non codants (ARNlnc). Ils sont transcrits au niveau de séquences géniques ou intergéniques et n'ont pas ou peu de cadres de lecture ouverts. Ces ARN peuvent cibler la chromatine ou différents aspects de la transcription en s'associant avec différents facteurs (activateurs de transcription ou répresseurs) ainsi que déstabiliser ou au contraire stabiliser un ARN codant dans le cytoplasme.

Ainsi, selon un autre aspect, le composé modifiant l'épigénome peut être un modulateur des ARN non codants, en particulier des miARN et des ARNlnc. Le composé peut aussi bien jouer le rôle de d'« éponge », c'est-à-dire diminuer le nombre de copies de l'ARN non codant ciblé (par exemple une séquence complémentaire ou un antisens), que celui de « mimic », c'est-à-dire augmenter le nombre de copies de l'ARN non codant ciblé (par exemple un vecteur porteur du miARN).

A noter que de manière connue, l'effet d'un composé sur l'expression d'un ARN non codant peut être aisément analysé, par exemple par Northern Blot ou par RT-PCR quantitative.

De manière avantageuse, le composé modifiant l'épigénome mis en œuvre dans le cadre de l'invention est un activateur ou un inhibiteur :

- de la méthylation de l'ADN ; ou
- de la modification des histones; ou
- du complexe PRC ; ou
- des ARN non codants, avantageusement des microARN et/ou des longs ARN non codants.

Un certain nombre de composés actuellement disponibles sont listés ci-dessus, notamment le SAHA. Toutefois, cette liste ne peut se prétendre être exhaustive. Ainsi, tout composé pouvant moduler l'épigénome, notamment via les mécanismes mentionnés ci-dessus, peut être utilisé dans le cadre de l'invention.

Comme déjà dit, la présente invention s'inscrit dans le traitement des maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire.

Les maladies génétiques sont, par définition, des maladies résultant d'une ou plusieurs mutations dans un ou plusieurs gènes.

Avantageusement, sont visées dans la présente demande les maladies monogéniques, c'est-à-dire lié à un seul gène, en l'occurrence celui codant la protéine présentant une anomalie de conformation.

La ou les mutations responsables de l'anomalie de conformation de la protéine résultante peuvent être des mutations ponctuelles. Toutefois, le défaut de conformation peut être lié à des mutations non strictement ponctuelles, par exemple la délétion d'un codon dans le gène qui code une protéine toujours active si elle n'est pas dégradée.

De manière avantageuse, la présente invention vise les pathologies musculaires récessives.

Comme déjà dit, la présente invention vise les pathologies du muscle, avantageusement celles affectant les muscles squelettiques mais aussi le muscle cardiaque, avantageusement les muscles squelettiques.

Dans le cadre de l'invention, on entend par « anomalie de conformation d'au moins une protéine » ou « anomalie de conformation protéique » le fait que la protéine causatrice de la maladie présente un défaut de repliement, lié à la présence d'au moins une mutation dans le gène la codant, ladite anomalie entraînant la dégradation de ladite protéine par la cellule. Les pathologies visées sont donc aisément identifiées, par exemple à l'aide d'anticorps dirigées contre la protéine mutée. En effet, même si celle-ci est correctement exprimée (ce qui peut être vérifié au niveau des transcrits), elle n'est pas détectée à l'aide d'un tel anticorps, puisque dégradée.

Dans le cadre de l'invention, il a été mis en évidence que la dégradation par les cellules musculaires des protéines mal conformées était contrôlée par des mécanismes épigénétiques. Ainsi, la solution proposée repose sur l'utilisation de composés modifiant l'épigénome afin d'éviter la dégradation des protéines mutées, d'assurer leur adressage dans leur compartiment cellulaire final et ainsi de restaurer un phénotype normal.

Selon un aspect particulier, la protéine présentant l'anomalie de conformation et subissant la dégradation cellulaire est une protéine membranaire ou associée à la membrane, éventuellement intégrée dans un complexe protéique.

De manière avantageuse, la maladie génétique musculaire liée à une anomalie de conformation protéique est une dystrophie musculaire progressive ou congénitale, encore plus avantageusement progressive, aussi bien de type proximal que distal.

Parmi les dystrophies musculaires progressives, des maladies privilégiées sont :

- les sarcoglycanopathies, à savoir l' α -sarcoglycanopathie ou LGMD2D liée à un défaut de l' α -sarcoglycane, la β - sarcoglycanopathie ou LGMD2E liée à un défaut de la β -sarcoglycane, la γ -sarcoglycanopathie ou LGMD2C liée à un défaut de la γ -sarcoglycane, ou la δ -sarcoglycanopathie ou LGMD2F liée à un défaut de la δ -sarcoglycane ;
- les dysferlinopathies (LGMD2B ou myopathie de Miyoshi) liées à un défaut de la dysferline ;
- les anoctaminopathies (LGMD2L ou myopathie de Miyoshi type 3) liées à un défaut de l'anoctamine 5 ;
- la myopathie des ceintures avec déficit en FKRP ou LGMD2I, liée à un défaut de la protéine FKRP (pour « fukutin-related protein »).

Plus généralement, les maladies ciblées sont choisies dans le groupe suivant :

- des dystrophies musculaires progressives :
 - o impliquant la dysferline (DYSF)
 - o impliquant la γ -sarcoglycane
 - o impliquant l' α -sarcoglycane
 - o impliquant la β -sarcoglycane
 - o impliquant la δ -sarcoglycane
 - o impliquant l'anoctamine 5 (Ano5)
 - o impliquant la fukutin related protein (FKRP)
 - o impliquant la fukutine (FKTN)
 - o impliquant la protéine-O-mannosyltransférase 1 (POMT1)
 - o impliquant la protéine-O-mannosyltransférase 2 (POMT2)
 - o impliquant la protéine-O-linked mannose β 1,2-acétylglucosaminyl-transférase (POMGT1)
 - o impliquant la cavéoline 3 (Cav3)
 - o impliquant l'UDP-N-acétyl glucosamine 2-épimérase (GNE)
- des dystrophies musculaires congénitales (MDC) :
 - o impliquant l' α -dystroglycane (DAG1)
 - o impliquant la laminine alpha2 (LAMA2)
 - o impliquant la like-glycosyltransférase (LARGE)
 - o impliquant la collagène 6A1, 6A2 ou 6A3

- impliquant la sélénoprotéine 1 (SEPN1)
- impliquant l'intégrine alpha7 (ITGA7)
- le récepteur à la ryanodine (RYR)
- d'autres maladies touchant le muscle squelettique ou cardiaque, associé éventuellement à des atteintes d'autres organes :
 - la cardiomyopathie ventriculaire droite arrhythmogénique impliquant la protéine transmembranaire 43 (TMEM43)
 - la lipodystrophie congénitale de type 4 avec dystrophie musculaire impliquant la polymérase I et le transcript release factor (PTRF)
 - la Chondrodystrophie myotonia ou Syndrome de Schwartz Jampel impliquant l'héparan sulfate (HSPG2)
 - la maladie de Danon impliquant la lysosomal-associated membrane protéine 2 (LAMP2)
 - la Fibrodysplasia ossificans progressiva impliquant le type I activin A receptor (ACVR1).

Pour une même maladie, différentes mutations peuvent affecter le même gène et être responsable de la mauvaise configuration de la protéine codée. Ainsi et à titre d'exemples pour les sarcoglycanopathies, les principales mutations ponctuelles répertoriées à ce jour sont listées dans le document WO 2008/009802.

Dans le cadre de la présente demande, la faisabilité de l'invention a par exemple été démontrée en relation avec la mutation R77C de l' α -sarcoglycane. Les protéines portant une mutation E262K dans la sous-unité δ ou une mutation Q11E dans la sous-unité β peuvent également répondre favorablement au traitement préconisé.

De manière adaptée, la protéine mutée causatrice de la maladie n'est pas la dystrophine et la pathologie à traiter n'est pas la myopathie de Duchenne (DMD) ou de Becker (BMD), dans laquelle la dystrophine est tronquée, et non pas dégradée car mal repliée comme dans l'invention.

D'autres procédés ou utilisations peuvent découler de la présente invention :

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé d'identification ou d'évaluation de l'efficacité d'un composé modifiant l'épigénome qui comprend les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule produisant une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec ledit composé ;

- détermination du taux de protéine correctement repliée, avantageusement par localisation de la protéine dans la cellule.

Selon l'invention et de manière avantageuse, le mauvais repliement de la protéine entraîne sa dégradation par la cellule.

La production par la cellule de la protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire peut être obtenue par transfection de la cellule à l'aide du gène muté codant ladite protéine.

La protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire peut être un sarcoglycane causant une sarcoglycanopathie. Encore plus avantageusement, il s'agit d'un α -sarcoglycane, par exemple un α -sarcoglycane portant une mutation R77C. En tout état de cause, cette protéine peut être utilisée comme témoin positif dans le procédé décrit ci-dessus, dans la mesure où il a été démontré, dans la présente demande, que cette protéine mutée répondait favorablement à un composé modifiant l'épigénome.

Avantageusement, la mise en contact entre la cellule et le composé a lieu pendant plusieurs minutes, voire plusieurs heures.

Le taux de protéine correctement repliée est corrélé à l'efficacité du composé testé en tant que composé modifiant l'épigénome. Ce taux est avantageusement déterminé par détection, voire localisation, de la protéine ou du complexe protéique auquel elle appartient. De manière préférée, la détection de la protéine ou du complexe protéique est réalisée par immunohistochimie, à l'aide d'anticorps dirigé contre la protéine en question ou contre l'une des protéines du complexe protéique auquel elle appartient.

Alternativement, la protéine d'intérêt ou une des protéines du complexe d'intérêt peut être marquée, notamment par fluorescence, puis détectée par microscopie ou par triage. Cette solution est avantageuse dans la mesure où l'étape de détection est moins lourde que la détection immunologique. Toutefois, il est important de vérifier que la protéine fusion (protéine d'intérêt + marquage) ne perturbe pas la formation du complexe protéique.

Dans le cas où la protéine ou le complexe protéique est détecté, voire localisé dans son compartiment cellulaire final, il est conclu que le composé testé est un composé efficace pour la modification de l'épigénome.

De manière avantageuse, le procédé est mis en œuvre en parallèle :

- sur des cellules exprimant la protéine non mutée comme témoin positif de la localisation de la protéine ;
- en réalisant une incubation en l'absence du composé testé, ce témoin permettant de conclure quant à l'effet éventuel du composé testé.

Selon un autre aspect, la présente invention vise un procédé d'identification d'un composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, consistant à évaluer le potentiel du composé à modifier l'épigénome.

Ainsi, l'invention vise également un procédé d'identification d'un composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule produisant une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec ledit composé ;
- détermination du taux de protéine correctement repliée.

Selon un autre aspect, l'invention concerne un procédé d'identification de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule susceptible de produire une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec un composé modifiant l'épigénome ;
- détermination du taux de protéine correctement repliée.

Dans ce mode de réalisation, il s'agit de tester des cellules, avantageusement musculaires, d'un patient susceptible d'être atteint d'une maladie génétique musculaire liée à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire. Alternativement, le gène du patient, suspecté de porter la ou les mutations, est transfecté dans une cellule pour réaliser le test *in vitro*.

Si le patient est effectivement atteint, il est attendu que la protéine présentant une anomalie de conformation ne soit pas détectable car dégradée. Ceci peut être aisément testé comme décrit ci-dessus, notamment à l'aide d'anticorps dirigés contre ladite protéine.

En présence du composé modifiant l'épigénome, il est attendu que le taux de protéine correctement repliée soit augmenté et que la protéine devienne détectable, notamment dans le test de détection mis en œuvre dans l'étape précédente.

Si, de fait, le taux de protéine correctement repliée augmente avec l'ajout du composé modifiant l'épigénome, il peut être conclu qu'il s'agit bien d'une maladie génétique musculaire liée à une anomalie de conformation de la protéine testée, entraînant sa dégradation cellulaire.

Plus généralement et selon un autre aspect, l'invention concerne une méthode de production par une cellule d'une protéine, éventuellement recombinante, dans une configuration active consistant à mettre la cellule en contact avec un composé modifiant l'épigénome.

EXEMPLES DE REALISATION

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation suivants, à l'appui des figures annexées. Ceux-ci n'ont toutefois aucune portée limitative.

L'invention est illustrée plus avant en rapport avec l' α -sarcoglycanopathie liée à la mutation R77C dans l' α -sarcoglycane et en présence des inhibiteurs 5-azacytidine (ou 5-aza, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN) et Saha (pour « SuberoylAnilide Hydroxamic Acid », un inhibiteur des histones désacétylases).

Figure 1 : Marquage immunohistochimique de la protéine α -sarcoglycane (α -SG) dans des cellules humaines HER 911 quadri-transfectées :

A/ à l'aide de l' α -SG non mutée

B/ à l'aide de l' α -SG portant la mutation R77C

C/ à l'aide de l' α -SG portant la mutation R77C et en présence de 5-aza 5 μ M.

Figure 2 : Marquage immunohistochimique de la protéine α -sarcoglycane (α -SG) dans des cellules humaines HER 911 quadri-transfectées :

A/ à l'aide de l' α -SG non mutée

B/ à l'aide de l' α -SG portant la mutation R77C

C/ à l'aide de l' α -SG portant la mutation R77C et en présence de SAHA 1 μ M.

1/ MATERIELS ET METHODES

1.1 Cultures cellulaires, transfections et traitements

Des cellules HER-911 ("Human Embryonic Retinoblast") ont étéensemencées dans des flacons et cultivées jusqu'à environ 80% de confluence dans du milieu Dulbecco's modified Eagle's + GlutaMAX (Gibco, Invitrogen) contenant 10% de sérum de veau foetal, 0.01 mg/ml de gentamicine et 1% MEM Non Essential Amino Acids (Gibco, Invitrogen). Les cellules ont été maintenues dans une atmosphère humidifiée à 5% en CO₂ et à 37°C.

Les cellules HER-91 ont été transfectées à l'aide de 12 µl de Fugene.6 Transfection Reagent (Roche) pour 2 µg de plasmide (0.5 µg de chacune des 4 constructions sarcoglycane (SG) pour cellules HER-911). Les plasmides exprimant les SG, pcDNA3.V5-his_hα-SG, pcDNA3.V5-his_hβ-SG, pcDNA3.V5-his_hγ-SG et pcDNA3.V5-his_hδ1-SG (variant transcriptionnel de type 1), sont des plasmides où l'expression de la séquence codante des sarcoglycanes respectives est sous le contrôle du promoteur CMV.

Après 48h, les cellules ont été traitées pendant 24h avec 5 µM de 5-aza-2'-deoxycytidine ou 1 µM de SAHA (Suberoylanilide hydroxamic acid).

1.2 Immunofluorescence

Les cellules HER-911 ont été fixées par incubation avec 3.7% de formaldéhyde pendant 15 min à température ambiante. Si nécessaire, une perméabilisation a été réalisée en utilisant du Triton X-100 0.2% pendant 20 min. Après avoir été saturées avec du sérum de veau foetal à 20% pendant 30 min, les cellules ont été incubées avec des anticorps primaires à des dilutions adaptées (dans du PBS) pendant 1h à température ambiante. Un anticorps murin monoclonal spécifique pour α-SG (NCL-A-SARC) est disponible auprès de Novocastra. Les cellules ont été lavées 3 fois avec du PBS puis incubées 1h avec des anticorps secondaires dilués au 1/1000 dans du PBS. Enfin, les cellules ont été lavées dans du PBS, montées en utilisant un milieu Vectashield Mounting Medium avec du DAPI (Vector, H-1200), puis examinées avec un microscope confocal à immunofluorescence (Leica).

2/ RESULTATS

Des cellules humaines HER 911 ont été quadri-transfectées avec les plasmides codant pour les sarcoglycanes β , γ et δ et un plasmide codant soit pour l' α -sarcoglycane non mutée (Fig. 1A et Fig. 2A), soit pour l' α -sarcoglycane mutée R77C (Fig. 1B et 1C ; Fig. 2B et 2C).

Un immuno-marquage a ensuite été réalisé sur les cellules non perméabilisées en utilisant un anticorps dirigé contre la partie extracellulaire de l' α -sarcoglycane, ce qui permet de visualiser la protéine uniquement au niveau de la membrane cellulaire et donc de comparer l'adressage de la protéine mutée avec celui de la protéine normale.

Contrairement à la forme non mutée de la protéine α - sarcoglycane (Fig. 1A et 2A), la forme mutée R77C de cette protéine n'est pas adressée à la membrane des cellules HER 911 (Fig. 1B et 2B). Le traitement des cellules par la 5-azacytidine (Fig. 1C) ou par le SAHA (Fig. 2C), restaure la localisation membranaire de la protéine mutée R77C.

Le principe sous-tendant la présente invention a donc été confirmé *in vitro* sur un modèle de cellules quadritransfectées permettant de reconstituer le complexe des sarcoglycanes, en analysant l'adressage membranaire du complexe. L'utilisation de drogues modifiant l'épigénome, à savoir la 5-azacytidine, un inhibiteur de la méthylation de l'ADN ou Saha, un inhibiteur des histones désacétylases, a permis la reconstitution du complexe à la membrane.

BIBLIOGRAPHIE

Ben Othmane K, Speer MC, Stauffer J, Blél S, Middleton L, Ben Hamida C, Etribi A, Loeb D, Hentati F, Roses AD, “Evidence for linkage disequilibrium in chromosome 13-linked Duchenne-like muscular dystrophy (LGMD2C).” *Am J Hum Genet.* **1995** Sep;57(3):732-4.

Bushby, K.M., and J.S. Beckmann, **1995**, “The limb-girdle muscular dystrophies--proposal for a new nomenclature”. *Neuromuscul Disord.* 5:337-43.

Daniele, N., I. Richard, and M. Bartoli, **2007**, “Ins and outs of therapy in limb girdle muscular dystrophies.” *Int J Biochem Cell Biol.* 39:1608-24.

Duclos, F., V. Straub, S.A. Moore, D.P. Venzke, R.F. Hrstka, R.H. Crosbie, M. Durbeej, C.S. Lebakken, A.J. Ettinger, J. van der Meulen, K.H. Holt, L.E. Lim, J.R. Sanes, B.L. Davidson, J.A. Faulkner, R. Williamson, and K.P. Campbell, **1998**, “Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice.” *J Cell Biol.* 142:1461-71.

Egelhofer et al., *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2011** Jan ; 18(1) : 91-3.

Kefi M, Amouri R, Driss A, Ben Hamida C, Ben Hamida M, Kunkel LM, Hentati F. “Phenotype and sarcoglycan expression in Tunisian LGMD 2C patients sharing the same del521-T mutation *Neuromuscul Disord.*” **2003** Dec;13(10):779-87.

Lim LE, Duclos F, Broux O, Bourg N, Sunada Y, Allamand V, Meyer J, Richard I, Moomaw C, Slaughter C, **1995**, “Beta-sarcoglycan: characterization and role in limb-girdle muscular dystrophy linked to 4q12.” *Nat Genet.* Nov;11(3):257-65.

Nigro, V., **2003**, “Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies.” *Acta Myol.* 22:35-42.

Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, Fougerousse F, Weissenbach J, Broux O, Cohen D, Akiyama J, Marie SK, Carvalho AA, **1993**, “Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. » *J Med Genet.* May;30(5):385-7.

Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M., **1996**, "Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LGMD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD." *Hum Mol Genet.* Jun;5(6):815-20.

Piccolo, F., M. Jeanpierre, F. Leturcq, C. Dode, K. Azibi, A. Toutain, L. Merlini, L. Jarre, C. Navarro, R. Krishnamoorthy, F.M. Tome, J.A. Urtizberea, J.S. Beckmann, K.P. Campbell, and J.C. Kaplan, **1996**, "A founder mutation in the gamma-sarcoglycan gene of gypsies possibly predating their migration out of India." *Hum Mol Genet.* 5:2019-22.

Todorova A, Ashikov A, Beltcheva O, Tournev I, Kremensky I. "C283Y mutation and other C-terminal nucleotide changes in the gamma-sarcoglycan gene in the Bulgarian Gypsy population." *Hum Mutat.* **1999**;14(1):40-4. Erratum in: *Hum Mutat* 2000;15(5):479.

REVENDEICATIONS

1. Composition pharmaceutique comprenant au moins un composé modifiant l'épigénome, pour son utilisation dans le traitement des maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine, ladite anomalie entraînant la dégradation cellulaire de la protéine.

2. Composition pour son utilisation selon la revendication 1, *caractérisée* en ce que le composé est un activateur ou un inhibiteur :

- de la méthylation de l'ADN ; ou
- de la modification des histones; ou
- du complexe PRC ; ou
- des ARN non codants, avantageusement des microARN et/ou des longs ARN non codants.

3. Composition pour son utilisation selon la revendication 2, *caractérisée* en ce que le composé est le SAHA ou la 5-azacytidine.

4. Composition pour son utilisation selon l'une des revendications précédentes, *caractérisée* en ce que la maladie génétique musculaire est une dystrophie musculaire progressive.

5. Composition pour son utilisation selon la revendication 4, *caractérisée* en ce que la dystrophie musculaire progressive est choisie dans le groupe suivant : les sarcoglycanopathies, les dysferlinopathies, les anoctaminopathies et les dystrophies associées à une anomalie de FKRP (« Fukutin-Related Protein »).

6. Composition pharmaceutique pour son utilisation selon l'une quelconque des revendications précédentes, *caractérisée* en ce que la composition est sous une forme destinée à être administrée par voie intramusculaire, intrapéritonéale, sous-cutanée, orale ou intraveineuse.

7. Procédé *in vitro* d'identification ou d'évaluation de l'efficacité d'un composé modifiant l'épigénome comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule produisant une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec ledit composé ;
- détermination du taux de protéine correctement repliée, avantageusement par localisation de la protéine dans la cellule,

le taux de protéine correctement repliée étant corrélé à l'efficacité du composé modifiant l'épigénome.

8. Procédé *in vitro* d'identification d'un composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, consistant à évaluer le potentiel du composé à modifier l'épigénome, le potentiel du composé à modifier l'épigénome étant corrélé à l'efficacité du composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire.

9. Procédé *in vitro* d'identification d'un composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule produisant une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec ledit composé ;
- détermination du taux de protéine correctement repliée,

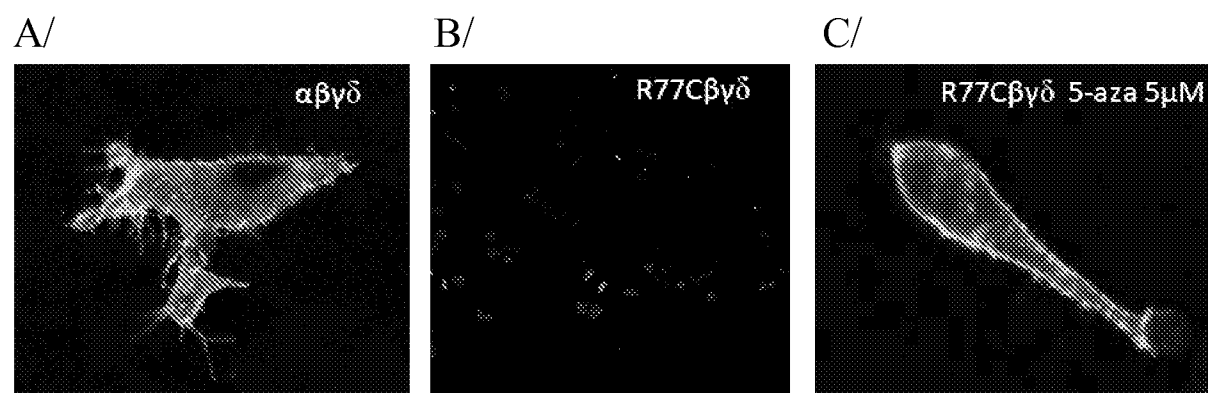
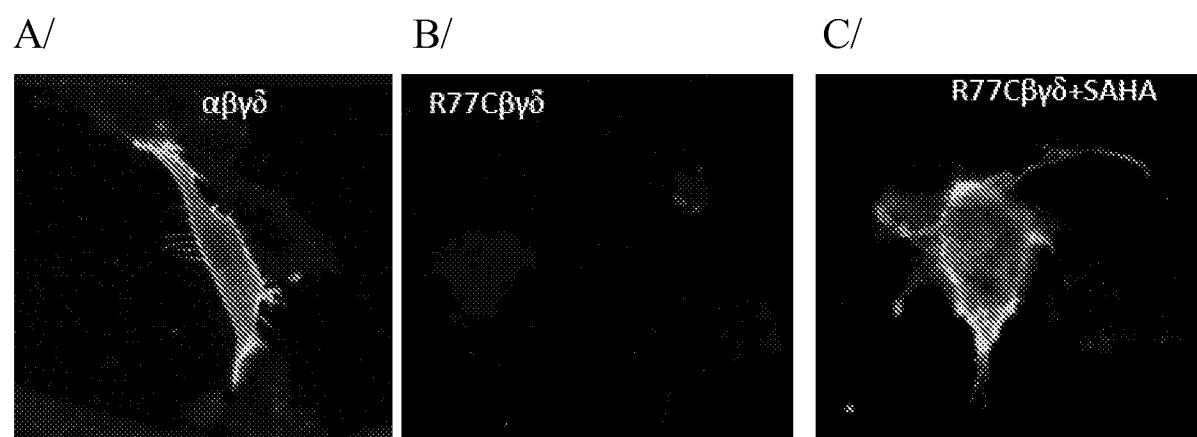
le taux de protéine correctement repliée étant corrélé à l'efficacité du composé pour le traitement de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire.

10. Procédé *in vitro* d'identification de maladies génétiques musculaires liées à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire, comprenant les étapes suivantes :

- mise en contact d'une cellule susceptible de produire une protéine mal repliée causant une maladie génétique musculaire, avec un composé modifiant l'épigénome ;
- détermination du taux de protéine correctement repliée,

le taux de protéine correctement repliée étant corrélé à l'identification d'une maladie génétique musculaire liée à une anomalie de conformation d'au moins une protéine entraînant sa dégradation cellulaire.

1/1

Figure 1Figure 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/051705

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 INV. A61K31/19 G01N33/50
 ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/050076 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; DE LA PORTE SABINE [FR]; ISRAEL MAURICE []) 17 June 2004 (2004-06-17) page 8 - page 11; claims 1-7 -----	1-6
A	E. FUJITA ET AL: "Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 16, no. 6, 2006, pages 618-629, XP055052681, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddm002 page 624 - page 625 ----- -/-	1-6



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent 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

11 October 2013

Date of mailing of the international search report

23/10/2013

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Deleu, Laurent

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/051705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/066885 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; ASSELBERGS FREDERICUS ALP) 14 August 2003 (2003-08-14) claims 1-3 -----	7
Y	DERRICK SEK TONG ONG ET AL: "Chemical and/or biological therapeutic strategies to ameliorate protein misfolding diseases", CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 23, no. 2, 2011, pages 231-238, XP028193846, ISSN: 0955-0674, DOI: 10.1016/J.CEB.2010.11.002 [retrieved on 2010-11-20] page 236 - page 237 -----	7,8,10
Y	TAYEBEH SOHEILI ET AL: "Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality control is associated with minimal structural modifications", HUMAN MUTATION, vol. 33, no. 2, February 2012 (2012-02), pages 429-439, XP055052557, ISSN: 1059-7794, DOI: 10.1002/humu.21659 abstract page 432 - page 435 -----	7-10
Y	WO 00/20582 A2 (UNIV IOWA RES FOUND [US]) 13 April 2000 (2000-04-13) claim 24 -----	9
Y	WO 2008/009802 A2 (GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; RICHARD ISABELLE [FR]) 24 January 2008 (2008-01-24) cited in the application page 12 - page 15 -----	10
A	ALEKSEY G. KAZANTSEV ET AL: "Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 7, no. 10, October 2008 (2008-10), pages 854-868, XP055044174, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd2681 page 860 -----	1-10
A	WO 2007/014327 A2 (UNIV FLORIDA RESEARCH FOUNDAT [US]; KAUSHAL SHALESH [US]; NOORWEZ SYE) 1 February 2007 (2007-02-01) page 12; claim 1 ----- -/--	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/FR2013/051705

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011/068522 A1 (NIMBLE EPITECH [US]; EPNER ELLIOT M [US]; VAUGHAN LUKE M [US]) 9 June 2011 (2011-06-09) page 5 - page 6 -----	3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FR2013/051705

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004050076 A1	17-06-2004	AU 2003294110 A1 CA 2507450 A1 EP 1565175 A1 FR 2847817 A1 US 2006148684 A1 US 2008160108 A1 WO 2004050076 A1	23-06-2004 17-06-2004 24-08-2005 04-06-2004 06-07-2006 03-07-2008 17-06-2004
WO 03066885 A2	14-08-2003	AU 2003214055 A1 EP 1476565 A2 JP 2006505241 A US 2005118596 A1 WO 03066885 A2	02-09-2003 17-11-2004 16-02-2006 02-06-2005 14-08-2003
WO 0020582 A2	13-04-2000	AU 6060999 A US 6262035 B1 WO 0020582 A2	26-04-2000 17-07-2001 13-04-2000
WO 2008009802 A2	24-01-2008	AT 454889 T CA 2658400 A1 EP 2063877 A2 ES 2335623 T3 FR 2903905 A1 JP 2009543854 A PT 2063877 E US 2010010036 A1 US 2013035353 A1 WO 2008009802 A2	15-01-2010 24-01-2008 03-06-2009 30-03-2010 25-01-2008 10-12-2009 09-02-2010 14-01-2010 07-02-2013 24-01-2008
WO 2007014327 A2	01-02-2007	AU 2006272497 A1 BR PI0615962 A2 CA 2616537 A1 CN 101267779 A CN 101600475 A EP 1909812 A2 EP 2374451 A2 IL 189032 A JP 2009502954 A KR 20080033463 A NZ 565953 A US 2010004156 A1 WO 2007014327 A2	01-02-2007 31-05-2011 01-02-2007 17-09-2008 09-12-2009 16-04-2008 12-10-2011 29-03-2012 29-01-2009 16-04-2008 12-01-2012 07-01-2010 01-02-2007
WO 2011068522 A1	09-06-2011	AU 2010326699 A1 CA 2782205 A1 CN 102711686 A EP 2506814 A1 JP 2013512898 A KR 20120127580 A US 2011129521 A1 US 2012310183 A1 WO 2011068522 A1	19-07-2012 09-06-2011 03-10-2012 10-10-2012 18-04-2013 22-11-2012 02-06-2011 06-12-2012 09-06-2011

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/051705

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
INV. A61K31/19 G01N33/50
ADD.

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

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
A61K G01N

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

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	WO 2004/050076 A1 (CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; DE LA PORTE SABINE [FR]; ISRAEL MAURICE []) 17 juin 2004 (2004-06-17) page 8 - page 11; revendications 1-7 -----	1-6
A	E. FUJITA ET AL: "Two endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) systems for the novel variant of the mutant dysferlin: ubiquitin/proteasome ERAD(I) and autophagy/lysosome ERAD(II)", HUMAN MOLECULAR GENETICS, vol. 16, no. 6, 2006, pages 618-629, XP055052681, ISSN: 0964-6906, DOI: 10.1093/hmg/ddm002 page 624 - page 625 ----- -/-	1-6



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



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent

"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date

"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)

"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens

"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

"&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

11 octobre 2013

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/10/2013

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

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

Fonctionnaire autorisé

Deleu, Laurent

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	WO 03/066885 A2 (NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS PHARMA GMBH [AT]; ASSELBERGS FREDERICUS ALP) 14 août 2003 (2003-08-14) revendications 1-3 -----	7
Y	DERRICK SEK TONG ONG ET AL: "Chemical and/or biological therapeutic strategies to ameliorate protein misfolding diseases", CURRENT OPINION IN CELL BIOLOGY, vol. 23, no. 2, 2011, pages 231-238, XP028193846, ISSN: 0955-0674, DOI: 10.1016/J.CEB.2010.11.002 [extrait le 2010-11-20] page 236 - page 237 -----	7,8,10
Y	TAYEBEH SOHEILI ET AL: "Rescue of sarcoglycan mutations by inhibition of endoplasmic reticulum quality control is associated with minimal structural modifications", HUMAN MUTATION, vol. 33, no. 2, février 2012 (2012-02), pages 429-439, XP055052557, ISSN: 1059-7794, DOI: 10.1002/humu.21659 abrégé page 432 - page 435 -----	7-10
Y	WO 00/20582 A2 (UNIV IOWA RES FOUND [US]) 13 avril 2000 (2000-04-13) revendication 24 -----	9
Y	WO 2008/009802 A2 (GENETHON [FR]; CENTRE NAT RECH SCIENT [FR]; RICHARD ISABELLE [FR]) 24 janvier 2008 (2008-01-24) cité dans la demande page 12 - page 15 -----	10
A	ALEKSEY G. KAZANTSEV ET AL: "Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders", NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 7, no. 10, octobre 2008 (2008-10), pages 854-868, XP055044174, ISSN: 1474-1776, DOI: 10.1038/nrd2681 page 860 -----	1-10
A	WO 2007/014327 A2 (UNIV FLORIDA REASEARCH FOUNDAT [US]; KAUSHAL SHALESH [US]; NOORWEZ SYE) 1 février 2007 (2007-02-01) page 12; revendication 1 ----- -/--	1-10

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2013/051705

C(suite). DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO 2011/068522 A1 (NIMBLE EPITECH [US]; EPNER ELLIOT M [US]; VAUGHAN LUKE M [US]) 9 juin 2011 (2011-06-09) page 5 - page 6 -----	3

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2013/051705

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 2004050076	A1	17-06-2004	AU 2003294110 A1	23-06-2004
			CA 2507450 A1	17-06-2004
			EP 1565175 A1	24-08-2005
			FR 2847817 A1	04-06-2004
			US 2006148684 A1	06-07-2006
			US 2008160108 A1	03-07-2008
			WO 2004050076 A1	17-06-2004

WO 03066885	A2	14-08-2003	AU 2003214055 A1	02-09-2003
			EP 1476565 A2	17-11-2004
			JP 2006505241 A	16-02-2006
			US 2005118596 A1	02-06-2005
			WO 03066885 A2	14-08-2003

WO 0020582	A2	13-04-2000	AU 6060999 A	26-04-2000
			US 6262035 B1	17-07-2001
			WO 0020582 A2	13-04-2000

WO 2008009802	A2	24-01-2008	AT 454889 T	15-01-2010
			CA 2658400 A1	24-01-2008
			EP 2063877 A2	03-06-2009
			ES 2335623 T3	30-03-2010
			FR 2903905 A1	25-01-2008
			JP 2009543854 A	10-12-2009
			PT 2063877 E	09-02-2010
			US 2010010036 A1	14-01-2010
			US 2013035353 A1	07-02-2013
			WO 2008009802 A2	24-01-2008

WO 2007014327	A2	01-02-2007	AU 2006272497 A1	01-02-2007
			BR PI0615962 A2	31-05-2011
			CA 2616537 A1	01-02-2007
			CN 101267779 A	17-09-2008
			CN 101600475 A	09-12-2009
			EP 1909812 A2	16-04-2008
			EP 2374451 A2	12-10-2011
			IL 189032 A	29-03-2012
			JP 2009502954 A	29-01-2009
			KR 20080033463 A	16-04-2008
			NZ 565953 A	12-01-2012
			US 2010004156 A1	07-01-2010
			WO 2007014327 A2	01-02-2007

WO 2011068522	A1	09-06-2011	AU 2010326699 A1	19-07-2012
			CA 2782205 A1	09-06-2011
			CN 102711686 A	03-10-2012
			EP 2506814 A1	10-10-2012
			JP 2013512898 A	18-04-2013
			KR 20120127580 A	22-11-2012
			US 2011129521 A1	02-06-2011
			US 2012310183 A1	06-12-2012
			WO 2011068522 A1	09-06-2011
