

①9 RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①1 N° de publication : **2 846 008**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②1 N° d'enregistrement national : **02 13022**

⑤1 Int Cl⁷ : C 12 Q 1/02, A 61 K 31/554, 31/473, A 61 P 25/28 //
C 12 N 1/19 (C 12 Q 1/02, C 12 R 1:865)

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②2 Date de dépôt : 18.10.02.

③0 Priorité :

④3 Date de mise à la disposition du public de la
demande : 23.04.04 Bulletin 04/17.

⑤6 Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥0 Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦1 Demandeur(s) : *CENTRE NATIONAL DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE CNRS Etablissement
public à caractère scientifique et technologique — FR,
UNIVERSITE VICTOR SEGALEN — FR et UNIVER-
SITE DE POITIERS — FR.*

⑦2 Inventeur(s) : BLONDEL MARC, BACH STEPHANE,
CULLIN CHRISTOPHE, TALAREK NICOLAS, VIER-
FOND JEAN MICHEL et RENOULT YVETTE ep. MET-
TEY.

⑦3 Titulaire(s) :

⑦4 Mandataire(s) : CABINET ARMENGAUD AINE.

⑤4 CRIBLAGE DE MOLECULES A ACTIVITE ANTI-PRION:KITS, METHODES ET MOLECULES CRIBLEES.

⑤7 La présente invention est relative à du criblage de mo-
lécules à activité anti-prion. Elle vise plus particulièrement
des kits de criblage de molécules à activité anti-prion, carac-
térisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de
phénotype [PSI+] avec un antibiogramme, les méthodes de
criblage, et une famille de molécules à activité anti-prion
mise en évidence à l'aide du crible selon l'invention. Appli-
cation des agents anti-prion pour fabriquer des médica-
ments pour le traitement de maladies neurodégénératives
impliquant des agrégats protéiques.

FR 2 846 008 - A1



Criblage de molécules à activité anti-prion :
kits, méthodes et molécules criblées.

La présente invention se rapporte à du criblage de molécules à
5 activité anti-prion. Elle vise plus particulièrement des kits
de criblage de molécules à activité anti-prion, les méthodes
de criblage, et une famille de molécules à activité anti-prion
mise en évidence à l'aide du crible selon l'invention.

10 Les prions sont des protéines infectieuses responsables chez
les mammifères de certaines maladies neuro-dégénératives de
type encéphalopathies spongiformes comme la maladie de
Creutzfeldt-Jakob chez l'homme ou encore les maladies dites
« de la vache folle » chez les bovins ou « tremblante du
15 mouton » chez les ovins. Ces différentes maladies sont
provoquées par des agents infectieux non conventionnels : à la
différence des agents infectieux traditionnels (bactéries,
virus par exemple), ils ne contiennent pas d'acides
nucléiques. Le Professeur Stanley Prusiner a formulé
20 l'hypothèse de « la protéine seule », selon laquelle l'agent
infectieux ne serait constitué que d'une protéine. Cette
protéine existe naturellement dans les cellules sous une forme
« normale » (ou PrP^C), c'est-à-dire soluble, essentiellement
sous forme d'hélice α et non agrégée donc fonctionnelle. Dans
25 certaines conditions encore inconnues, cette protéine peut se
transformer en une forme prion (ou PrP^{Sc}). Sous cette forme
prion, la protéine forme des agrégats insolubles,
essentiellement sous forme de feuillets β . Le caractère
infectieux de cette conformation prion PrP^{Sc} viendrait du fait
30 que, outre les caractéristiques indiquées précédemment, la
protéine sous forme prion gagne également la capacité à
catalyser le passage de la forme cellulaire normale PrP^C vers
la forme prion PrP^{Sc} dans un mécanisme de type « boule de
neige ».

La levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae* contient plusieurs protéines se comportant comme des prions (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dès les années soixante, deux
5 mécanismes génétiques non conventionnels y sont décrits. En 1994, les phénotypes correspondants [*PSI+*] et [*URE3*] ont été proposés comme résultant de l'inactivation auto-catalytique des protéines Sup35p et Ure2p respectivement. Ces protéines prions présentent donc a priori une analogie mécanistique avec
10 les systèmes mammifères délétères pour la santé publique. A l'instar de la protéine PrP, la protéine Sup35p « normale » passe d'un état soluble à un état insoluble et agrégé dès que la protéine est en contact avec une autre protéine Sup35p sous la forme prion. Cet état agrégé est vérifié tant par des
15 expériences de centrifugation que par des expériences de localisation intracellulaire. Les prions de la levure peuvent être éliminés (« curés ») par une forte dose (3 à 5 mM) de chlorure de guanidium. Suite à un tel traitement (qui doit être appliqué sur au moins six à dix générations), les
20 agrégats protéiques générés par la présence des prions disparaissent et la protéine en question (Sup35p, par exemple) se retrouve sous une forme normale, soluble, fonctionnelle mais ayant conservé la susceptibilité d'être convertie sous une forme prion si elle se retrouvait à nouveau en contact
25 avec une autre protéine Sup35p dans un tel état.

La protéine Sup35p, en complexe hétérodimérique avec la protéine Sup45p, forme un facteur de terminaison de la traduction. Ce facteur reconnaît les codons stop opales (UGA).
30 Sous sa forme cellulaire normale (soluble et active) dans les souches [*psi-*], Sup35p, en association avec Sup45p termine efficacement la traduction au niveau de ces codons opales. Dans une souche [*PSI+*] où la protéine Sup35p est sous forme prion, elle est majoritairement présente sous forme d'agrégats

insolubles. Ne pouvant pas se lier à Sup45p, elle est ainsi non fonctionnelle dans la terminaison de la traduction. Une petite fraction de l'ensemble des protéines Sup35p cellulaire reste toutefois soluble dans ces cellules [PSI+] où elle permet, en complexe avec Sup45p, d'assurer un « service minimum » de terminaison de la traduction, service essentiel à la survie de la levure. Un système colorimétrique permettant de détecter, de façon indirecte, la forme sous laquelle la protéine Sup35p est présente : normale ou prion, a été élaboré à partir de ces constatations. Ce système, décrit depuis longtemps (voir l'article de synthèse par Fernandez-Bellot et Cullin, 2001), est basé sur l'utilisation de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*, codant pour une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine : la SAICAR synthétase. Cette enzyme catalyse la formation de 4-(N-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole ribonucléotide (SAICAR) à partir de 4-carboxy-5-aminoimidazole ribonucléotide (CAIR). L'allèle *ade1-14* contient un codon opale dans le cadre de lecture du gène *ADE1*. Dans une souche [psi-], Sup35p en association avec Sup45p va donc arrêter la traduction du gène *ADE1* au niveau de ce codon stop. La protéine *ade1-14p* ainsi traduite sera tronquée et donc non fonctionnelle. En conséquence les substrats en amont de l'enzyme Adelp vont s'accumuler, notamment la 5-aminoimidazole ribonucléotide (AIR). L'AIR étant oxydé en un composé de couleur rouge, les colonies formées par les cellules [psi-] seront de couleur rouge. En outre, ces cellules seront auxotrophes pour l'adénine. A l'inverse, dans une souche [PSI+], la protéine Sup35p est essentiellement présente sous forme d'agrégats donc incapable de s'associer avec Sup45p pour stopper la traduction au niveau du codon opale de l'allèle *ade1-14* du gène *ADE1*. En conséquence, les ribosomes vont faire une pause au niveau de ce codon stop avant de reprendre leur activité de traduction (translecture). Une certaine quantité de protéine Adelp fonctionnelle sera donc synthétisée, les

cellules seront autotrophes pour l'adénine et formeront des colonies de couleur blanche à rosée.

Dans un article paru dans P.N.A.S, l'équipe du Pr. Stanley Prusiner divulgue un test de détection de molécules à activité anti-prion (Korth et al., 2001). Ce test est effectué sur un modèle de mammifères (neuroblastomes murins infectés par PrP^{sc}). Les conditions de sécurité (laboratoire P3) et de cultures cellulaires (manipulations assez lourdes) ne permettent pas de réaliser du criblage à haut débit.

La demande WO 98/30909 décrit également un procédé de criblage de molécules à activité anti-prion réalisé sur des rongeurs infectés par un agent transmissible non conventionnel. Cette méthode de criblage présente les mêmes limites que la méthode décrite dans P.N.A.S.

Les travaux des inventeurs les ont amenés à réaliser un système de criblage haut débit pour mettre en évidence des molécules possédant une activité anti-prion, basé sur le système rapporteur colorimétrique de la protéine Sup35p, décrit ci-dessus.

La présente invention est donc relative à un kit de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.

Bien que basé sur les prions des levures, le kit selon l'invention permet d'isoler des molécules actives contre les prions de mammifères. L'exemple 7 suivant montre que les molécules les plus actives isolées par le Pr. Prusiner présentent également une activité dans le crible selon l'invention.

Pourtant, on observe de nombreuses différences entre les prions de levure et les prions de mammifères. Dans un article de la revue « Cellular and Molecular Life Sciences », le Professeur C.Cullin propose même au vu de ces différences de distinguer les prions de levures de ceux des mammifères en employant le terme de « propagons ». Comme différences notables entre les « prions » (mammifères) et les « propagons » (levure), on peut citer le caractère cytoplasmique des propagons alors que le prion PrP des mammifères est une protéine ancrée à la membrane plasmique, le caractère pathologique des prions de mammifères, ainsi qu'un certain nombre de différences biophysiques (structure ternaire et quaternaire, réversibilité du curage...)

15

L'un des principaux avantages d'un tel crible réside dans sa parfaite innocuité ce qui permet de le réaliser dans un laboratoire de biologie moléculaire classique de niveau L2, et non, comme requis dans les techniques antérieures, dans un laboratoire de niveau P3.

20

De plus, la grande facilité d'utilisation et le très faible coût de ce kit rend le criblage à haut débit réalisable. L'utilisation de l'antibiogramme permet en outre de tester en une seule expérience un gradient de concentration, contrairement aux tests classiques, dans lesquels seule une concentration est testée. Pour chaque molécule dont on teste l'activité anti-prion, l'utilisation de l'antibiogramme permet également d'avoir des informations sur la toxicité du produit ainsi que sur le rapport activité/concentration, et de déterminer ainsi la meilleure concentration efficace.

30

Selon un mode de réalisation préféré, la souche [PSI+] utilisée dans le kit selon l'invention porte une inactivation du gène *ERG6*.

5 En effet, les levures sont naturellement assez peu perméables. En particulier, la levure préférée pour la mise en œuvre de l'invention, *Saccharomyces cerevisiae*, présente une imperméabilité telle que la réalisation d'un criblage s'avère particulièrement peu efficace sans cette inactivation.

10

La méthode d'analyse du crible selon l'invention est visuelle. Selon l'activité anti-prion de la molécule testée, les colonies de cellules auront une coloration rouge, rosée ou blanche. Le choix de la souche de levure peut permettre
15 d'améliorer le contraste entre les colonies. En effet, certaines souches dites « Strong » facilitent l'analyse visuelle du crible. De telles souches possèdent un fort niveau d'agrégation des formes prions. A contrario, la souche sera dite « Weak ». Les souches préférées pour la mise en œuvre de
20 l'invention sont donc les souches de type « Strong ».

D'autres levures peuvent également être utilisées. On citera à titre d'exemples : *Kluyveromyces lactis*, *Pichia methanolica*, *Saccharomyces ludwigii*, *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia*
25 *pastoris*, *Zygosaccharomyces rouxi*, *Schizosaccharomyces pombe*.

Etant donné la létalité synthétique observée entre l'inactivation du gène *ERG6* et l'inactivation du gène *TRP1*, le gène *ERG6* pourra être délété en utilisant le gène *TRP1* comme
30 marqueur de délétion.

Avantageusement, le kit comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.

Par curage, on entend une élimination des formes prions dans les cellules de levure. Cette élimination peut être temporaire ou définitive.

5 A titre d'exemple, un agent de curage pour le prion peut être l'eau oxygénée ou préférentiellement, le chlorure de guanidium.

10 Par doses sub-efficaces, on entend des doses qui utilisées seules ne suffiraient pas à curer les prions des levures. Les valeurs de telles doses sont données, dans les exemples qui suivent, pour le chlorure de guanidium.

15 Les intérêts de la présence d'un agent de curage à des doses sub-efficaces sont de renforcer la sensibilité du crible et d'obtenir un meilleur contraste.

20 Le kit selon l'invention peut être mis en œuvre dans une méthode de criblage de molécules à activité anti-prion. Cette méthode de criblage, également visée par l'invention, est caractérisée en ce qu'elle met en œuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :

- a. réalisation d'un tapis de cellules *in vitro*
- b. dépôt des composés à tester selon la méthode de
25 l'antibiogramme,
- c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
- d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.

30 Cette méthode possède des avantages analogues à ceux du kit selon l'invention. Il s'agit d'un test visuel, très facile à analyser. Sa mise en œuvre est très simple et peu onéreuse. Les précautions relatives à la sécurité sont celles d'un laboratoire classique de biologie moléculaire. Elle permet le

criblage massif : une personne seule peut cribler manuellement plus de 400 produits par jour. Un criblage de très haut débit serait possible par automatisation de la méthode. Le résultat du crible est révélé au bout de 7 jours, sans qu'il soit
5 nécessaire de recourir à des manipulations lourdes entre le jour J et le jour J+7 (éventuellement un changement de température de l'incubateur). Enfin, cette méthode est particulièrement économique.

10 Selon un mode de réalisation préféré, la méthode de criblage selon l'invention est caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé. Une des levures préférées pour la mise en œuvre de cette méthode est *Saccharomyces cerevisiae*.

15 Avantageusement, l'étape a. de la méthode de criblage comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

La méthode peut également comporter les étapes suivantes :

- 20 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

L'incubation à 2-6°C permet d'accentuer le contraste des
25 colorations des colonies.

Préférentiellement, le test de criblage secondaire pourra comporter les étapes suivantes :

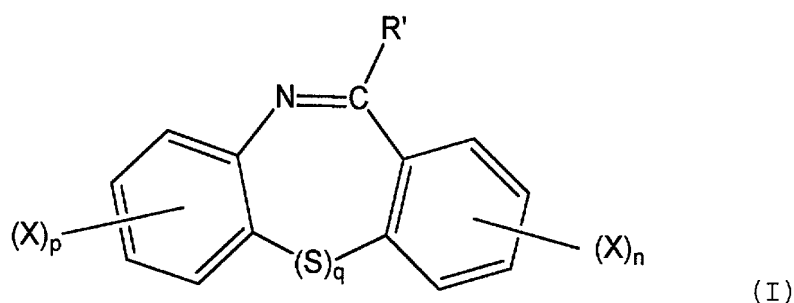
- 30 - construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- réalisation des étapes a. à e. de la méthode de criblage selon l'invention, l'étape a. comportant en

outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

Un tel crible secondaire permet de tester très rapidement si
 5 les molécules isolées lors du crible primaire peuvent avoir un
 effet général sur les prions chez la levure. En effet, les
 gènes *SUP35* (responsable du prion [*PSI+*]) et *URE2* (responsable
 du prion [*URE3*]) codent pour des enzymes ayant des fonctions
 totalement différentes et dont les séquences primaires sont
 10 très éloignées.

L'invention couvre également les molécules isolées par la
 méthode de criblage selon l'invention.

15 En particulier, la méthode de criblage a permis d'isoler des
 agents anti-prion ayant la formule (I) suivante :



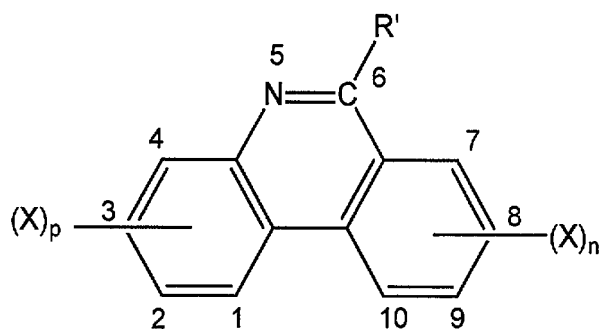
20 dans laquelle R^1 est un groupement H, NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une
 chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10
 carbones, ramifiée ou non,

X représente F, Cl, Br, I, CF_3 , SR^3 , OR^3 , OH, NO_2 ,
 COR^3 , $CONH_2$, COOH, $COOR^3$, où R^3 est un groupement
 25 alkyl de 1 à 4 carbones, de préférence CH_3 .

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou
 2,

q égale 0 ou 1.

Elle vise plus particulièrement les agents anti-prion de formule (II) :



(II)

5

dans laquelle R^1 représente un groupement H, NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F, Cl,

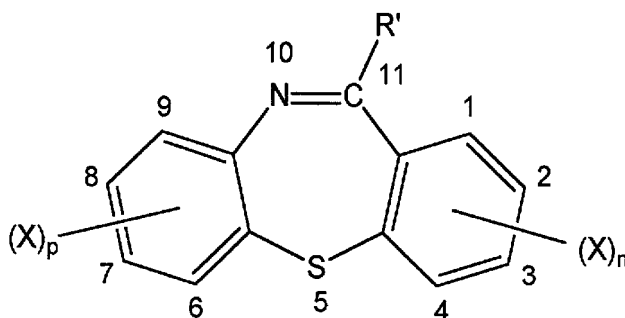
p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou

10

2.

Certains composés de cette famille sont particulièrement actifs. Il s'agit de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine, ainsi que de leurs dérivés chlorés, en particulier lorsque le chlore est placé en position 8, 9, 10, de préférence, en position 10 (voir dans les exemples qui suivent).

L'invention couvre en particulier les agents anti-prion de formule (III):



(III)

dans laquelle R^1 représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-$
 $N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,
 X représente F , Cl ,
 p et n , identiques ou différents, égalent 0, 1 ou
5 2.

Cette famille de molécules, appelée « Kastellpaolitines » par
les inventeurs, possède à un degré plus ou moins fort
l'activité anti-prion recherchée. En particulier, les dérivés
10 chlorés de cette famille sont particulièrement efficaces. Les
meilleures efficacités sont obtenues lorsque le chlore est
placé en position 2, 3, 4, de préférence, en position 4 (voir
KP1 dans les exemples qui suivent).

15 Les agents anti-prion selon l'invention sont particulièrement
utiles pour l'obtention d'un médicament destiné à prévenir
et/ou à traiter les maladies neurodégénératives, en
particulier de type à agrégation de protéines, telle que les
encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de
20 Hungtinton... Ces médicaments peuvent être à visée humaine ou
vétérinaire, en particulier pour des animaux domestiques
(vaches, moutons, ...) ou sauvages (lynx, cervidés tels que
biches, élans, ...)

25 D'autres caractéristiques et avantages de l'invention
apparaîtront dans les exemples ci-dessous et en se référant
aux figures suivantes:

- la figure 1 se rapporte à la faisabilité du crible,
- la figure 2 illustre le protocole de criblage,
- 30 - la figure 3 est relative à l'isolement des
Kastellpaolitines, de la phénanthridine et à leur
relation structure/activité,
- la figure 4 se rapporte à la détermination de
l'activité de la 6-aminophénanthridine,

- la figure 5 présente les résultats des tests de cure liquide,
- la figure 6 se rapporte au crible secondaire basé sur le prion [URE3], et,
- 5 - la figure 7 démontre la validation du test avec la chlorpromazine et la quinacrine.

Exemple 1 : Réalisation du crible.

10

1. Matériel et méthodes

Organismes (*Saccharomyces cerevisiae*) et milieux de culture

La souche de levure haploïde [PSI+] 74-D694 (Mat a, *ade1-14*, *trp1-289*, *his3-Δ200*, *ura3-52*, *leu2-3,112*) a été utilisée dans
15 la mise au point de la méthode de criblage. La souche utilisée est dite « *Strong* » car elle présente un phénotype bien marqué lorsque le facteur de terminaison de la traduction Sup35p est sous une forme prion ou agrégée.

20 Afin d'augmenter la pénétration des inhibiteurs, les inventeurs ont modifié génétiquement cette souche en y introduisant une mutation du gène *ERG6*. Ce gène intervient dans la biosynthèse de l'ergostérol, composant de la paroi cellulaire des levures. La mutation a été réalisée par
25 insertion au niveau du site chromosomique du gène *ERG6* d'une « cassette de délétion » correspondant au gène marqueur *TRP1* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *ERG6*. Cette cassette a été produite par PCR en utilisant le plasmide pFA6a-kanMX6 comme
30 matrice et les oligonucléotides oBM1060 (5') et oBM1061 (3') comme amorces. Les cellules de levure 74-D694 « *Strong* » ayant intégré la cassette de délétion (souche appelée **STRg6**, déposée à la CNCM le 10 octobre 2002 sous le numéro I-2943) sont celles qui se développent sur milieux minimum dépourvu en

tryptophane. La mutation $\Delta erg6::TRP1$ a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche **STRg6** comme matrice et les oligonucléotides oBM1030 (5') et oBM1063 (3') comme amorces.

5

Les amorces PCR utilisées présentent les séquences en nucléotides suivantes :

oBM1060 5' CGATTTAAGTTTTACATAATTTAAAAACAAGAATAAAATAATAATATAG
TAGGCAGCATAAGCGGATCCCCGGGTTAATTAA 3' (SEQ ID N°1)

10 **oBM1061** 5' CTGCATATATAGGAAAATAGGTATATATCGTGCGCTTTATTGAATCTTAT
TGATCTAGTGAATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC 3' (SEQ ID N°2)

oBM1030 5' GGTACCTCGTTCCCGTAC 3' (SEQ ID N°3)

oBM1063 5' CAGTCAGAAATCGAGTTCCA 3' (SEQ ID N°4)

15 Sauf indication du contraire, les souches de levure sont cultivées à 30°C dans du milieu riche (YPD ψ) ou dans du milieu minimum. Lorsque ce n'est pas explicitement spécifié, les pourcentages correspondent à un rapport masse/volume. La forme gélosée est obtenue par ajout d'agar à 2%.

20 **YPD ψ** : 1% d'extrait de levure (FISHER®), 2% de peptone (GIBCO®) et 2% de glucose ;

Milieu minimum : 0,175% de *yeast nitrogen base without amino acid and ammonium sulfate* (DIFCO®), 0,75% de sulfate d'ammonium et 2% de glucose. Ce milieu est amené à pH 6. Afin de

25 compenser les éventuelles auxotrophies, ce milieu peut être complété, après stérilisation, par ajout d'acides aminés (0,002% de L-Histidine et/ou 0,004% de L-Leucine et/ou 0,003% de L-Tryptophane) ou de bases azotées (0,0025% d'Uracile et/ou 0,008% d'Adénine).

30

Méthode de criblage de substances à activité anti-prionique (« Prion Halo Assay »)

La méthode de criblage élaborée est basée sur le principe de l'antibiogramme. En effet, les composés à tester sont déposés

sur un disque en papier filtre stérile, lui-même déposé sur une boîte de milieu YPD ψ solide contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium préalablementensemencée avec environ 10^6 cellules de la souche *STRg6* afin de réaliser un tapis de levure.

5 L'ajout d'une faible quantité de chlorure de guanidium (0,2 mM), dose sub-efficace pour curer les prions chez la levure (la dose efficace étant de l'ordre de 3 à 5 mM) permet d'augmenter la sensibilité du test (voir la partie Résultats). Les boîtes carrées de 12 cm de côté sont ensuite incubées 3

10 jours à 23,5°C pour permettre l'apparition et la croissance des colonies de levures. Ces boîtes sont ensuite stockées 3 jours à 4°C afin d'accentuer le coloration rouge présente autour des disques imbibés de substances actives sur la forme prion de la protéine Sup35p. La comparaison avec les témoins

15 négatifs (dépôt du solvant des inhibiteurs testés) et positif (dépôt d'une solution de chlorure de guanidium à 300 mM, provoquant une élimination efficace des protéines Sup35p sous une forme prion) permet de juger de l'efficacité d'un composé. La figure 2 illustre le protocole de la méthode de criblage :

20 (1) Culture de la souche **STRg6** ; (2) Dépôt et étalement avec des billes de verre stériles de 3 & 4 mm de diamètre, d'environ 10^6 cellules en phase exponentielle de croissance sur une boîte de milieu solide YPD ψ contenant 0,2 mM de chlorure de guanidium : constitution du "tapis" de cellules ; (3)

25 Dépôt des disques de papier filtre stériles selon un quadrillage permettant l'analyse de 32 composés (témoins inclus) et dépôt de 20 μ l maximum de chacun des produits à tester ; (4) Incubation ; (5) Numérisation du résultat obtenu ; (6) Exemple présentant l'isolement d'un composé

30 présentant une forte activité anti-prion.

Synthèse de 11-aminodibenzo[b,f] [1,4] thiazépines et de la 6-aminophénanthridine

Les 11-aminodibenzo[b,f] [1,4]thiazépines, appelés encore Kastellpaolitines, peuvent être préparés en une seule étape.

5 La synthèse de ces produits a déjà été décrite dans la publication de Mettey et al., 1997.

2. Résultats

10

Principe et faisabilité du crible

Le chlorure de guanidium, le seul produit connu pour curer efficacement les prions chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, a servi non seulement de témoin positif tout au long du criblage, mais aussi pour étudier la faisabilité de la méthode ainsi que pour la mettre au point. Le chlorure de guanidium cure efficacement les différents prions de levure à une dose comprise entre 3 et 5 mM (Fernandez-Bellot et Cullin, 2001). Dans ces conditions, la cure nécessite une présence constante de ce produit pendant six à dix générations en phase exponentielle de croissance compromettant la faisabilité du crible sur boîte tel que les inventeurs souhaitaient le réaliser.

25 La figure 1 montre la faisabilité du crible.

Les trois panneaux de gauche : une souche [PSI+] est cultivée pendant 48H en présence de chlorure de guanidium à 5 mM (avec 0,2% DMSO final) ou, comme contrôle avec seulement 0,2% DMSO final. A T = 0, puis toutes les 24H, une goutte de 10 µL (environ 10⁴ cellules) est déposée sur une boîte de milieu riche. La cure au chlorure de guanidium commence à avoir un effet après 24H de traitement, soit après 6 générations environ (une coloration rosée commence à apparaître). Au bout de 48H, soit après 12 générations environ, la goutte de

30

cellules présente une coloration nettement rouge, signe d'une cure complète des cellules [PSI+].

Le panneau du milieu : quelques cellules sont prélevées à T = 48H et sont striées sur un milieu frais. Elles forment presque
5 toutes des colonies rouges dans le cas de la cure au chlorure de guanidium.

Le panneau de droite : ces même cellules sont culottées au fond d'un tube Eppendorf après culture liquide. Dans le cas de la cure au chlorure de guanidium, elles forment un culot
10 rouge.

La première étape a donc consisté à déterminer si le chlorure de guanidium pouvait avoir un effet visualisable sur boîte sur des cellules [PSI+] avec le système de pastilles à
15 antibiogramme. Une fois cette étape réalisée, les inventeurs ont mis au point les conditions optimales de température, de milieu, de densité ainsi que de type cellulaire à utiliser (figure 2). La souche présentant la meilleure sensibilité est la souche **STRg6** cultivée à 23,5 °C et en présence de 200 µM de
20 chlorure de guanidium. En effet, l'introduction d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium dans le milieu permet d'augmenter la sensibilité du test.

Criblage d'une chimiothèque

25 Des composés (environ 1000) ont été passés au crible en utilisant les conditions optimisées par les inventeurs (figure 2). Sur chaque boîte, 15 µl de DMSO sont déposés sur le filtre en haut à gauche (témoin négatif) et 15 µl d'une solution de chlorure de guanidium en solution à 300 mM dans le DMSO
30 (témoin positif) sont déposés sur le filtre en bas à droite. Le même volume (15 µl) de chacun des produits de la banque (tous en solution à 10 mM dans le DMSO) est déposé sur les filtres restants (trente par grande boîte de Pétri carrée). Un signal positif (visualisation d'un halo rouge autour du disque

de papier filtre stérile sur lequel le produit est déposé) a été obtenu pour cinq produits. Ces produits correspondent à quatre molécules d'une même famille, appelées « Kastellpaolitines » par les inventeurs, et à une cinquième bien connue : la phénanthridine.

Exemple 2 : Identification des Kastellpaolitines et de la phénanthridine.

10

Les structures chimiques des Kastellpaolitines et de la phénanthridine sont présentées dans la figure 3B. Le panneau 3A montre une analyse comparative de la taille des halos rouges obtenus respectivement avec l'ensemble de ces molécules (toutes déposées en quantité équivalentes : 15 µl d'une solution à 10 mM dans le DMSO). Cette expérience permet de comparer l'activité relative de chacun de ces produits. Le plus actif est la Kastellpaolitine 1 (ou KP1) suivi par la phénanthridine.

20

Synthèse et test de la 6-aminophénanthridine

Une analyse comparative de la phénanthridine d'une part, et des Kastellpaolitines d'autre part montre plusieurs points communs entre ces deux groupes de molécules (figure 3). Les différentes molécules y sont classées de la moins active à la plus active et leurs formules respectives indiquées. Toutes sont tri-cycliques, le cycle central contenant dans tous les cas un azote en double liaison avec un carbone adjacent. Par contre, chez toutes les Kastellpaolitines, le carbone du cycle central qui est en double liaison avec cette azote porte un groupement amino, ce qui n'est pas le cas pour la phénanthridine. Cette observation a conduit les inventeurs à vouloir tester la 6-aminophénanthridine.

La 6-aminophénanthridine peut être préparé selon le mode opératoire mis au point par Kessar et al, 1969.

La 6-aminophénanthridine a donc été passée au crible selon l'invention, en comparaison avec les Kastellpaolitines 1 (KP1) et 5 (KP5) ainsi qu'avec la phénanthridine. Le résultat est très net : la 6-aminophénanthridine est encore plus active que les Kastellpaolitines et que la phénanthridine.

La figure 4 illustre les résultats de cette comparaison : l'activité de la 6-aminophénanthridine a été déterminée sur boîte et comparée à celle des KP1 et 5 et de la phénanthridine. Pour les quatre molécules, la même quantité est déposée (10 μ l d'une solution à 10 mM). Dans le cas du témoin positif (chlorure de guanidium), la solution utilisée était à 300 mM.

Par conséquent, en greffant ce groupement amino, caractéristique des Kastellpaolitines sur la phénanthridine, on a augmenté fortement l'activité de cette dernière.

Exemple 3 : Synergie entre les produits isolés à l'aide du crible et le chlorure de guanidium

Toutes les molécules actives ont été isolées dans un milieu contenant une faible dose de chlorure de guanidium (200 μ M / dose efficace = 4 mM). Ce parti pris établi lors de la mise au point du crible répondait au souci d'augmenter la sensibilité (et donc le seuil de détection de la méthode). L'effet des molécules dans des milieux contenant plus (500 μ M) de chlorure de guanidium ou n'en contenant pas, a par la suite été observé. La phénanthridine est toujours active sur un milieu sans chlorure de guanidium, mais son activité augmente fortement en fonction de la quantité de chlorure de guanidium

(pourtant en dose nettement sub-efficace) dans le milieu. Ce résultat indique une synergie d'action entre le chlorure de guanidium et la phénanthridine. Le même résultat a été obtenu pour toutes les autres molécules isolées par les inventeurs
5 (les Kastellpaolitines et la 6-aminophénanthridine).

Exemple 4 : Vérification de la cure en milieu liquide

10

Les inventeurs ont ensuite voulu déterminer si les halos rouges observés dans le test levure correspondaient bien à de la cure du prion [PSI+] et non pas à un artéfact (par exemple ces halos rouges pourraient être dus à une inhibition directe
15 de la chaîne de biosynthèse de l'adénine par ces molécules, ce qui conduirait à une accumulation de l'AIR). Si ces molécules curent efficacement le prion [PSI+], un traitement en culture liquide de cellules [PSI+] suivi d'un lavage desdites cellules doit leur permettre de former des colonies rouges sur un
20 milieu gélosé ne contenant plus les molécules. Ces tests ont été réalisés avec la 6-aminophénanthridine sur la souche « strong » sauvage 74-D694.

Les conditions de cure en milieu liquide sont les suivantes :
25 une souche [PSI+] est cultivée pendant 5 jours en milieu liquide en présence des quantités indiquées des différents produits (voir figure 5). Toutes les 24H, une fraction aliquote est lavée en milieu vierge de tout produit et déposée sur un milieu gélosé solide (lui aussi vierge de tout produit)
30 qui est traité ensuite comme indiqué en figure 2.

Comme montré dans la figure 5, la 6-aminophénanthridine est capable de curer partiellement le prion [PSI+] dans un nombre significatif de cellules. L'efficacité de cure peut être

notablement augmentée en rajoutant une dose sub-efficace (100 μM) de chlorure de guanidium dans le milieu de culture. Dans une telle cure liquide, le même effet synergique que celui observé dans le test sur boîte est également retrouvé.

5

Exemple 5 : Mise au point et utilisation d'un crible colorimétrique secondaire basé sur l'utilisation de [URE3], un autre prion de levure

10

Un autre test rapide sur boîte a été réalisé, basé sur un autre prion de levure : [URE3]. Ce test constitue un crible secondaire qui permet de généraliser l'effet des produits isolés lors du crible primaire à un autre prion de levure. De la sorte, il est possible d'écarter les molécules actives uniquement contre le prion [PSI+] et donc moins intéressantes car d'un effet non général.

15

Pour le prion [URE3] la souche haploïde utilisée est CC34 (*Mat a, trp1-1, ade2-1, leu2-3,112, his3-11,15, ura2::HIS3*).

20

La souche **NT34** qui a servi pour le crible secondaire a été construite à partir de CC34, souche dans laquelle la phase codante du gène *DAL5* a été remplacée par celle du gène *ADE2* en utilisant la même méthode que celle utilisée pour la construction de la souche **STRg6**. Pour cela une cassette de délétion correspondant au gène *ADE2* flanqué par des séquences en ADN se trouvant en amont et en aval de la phase codante du gène *DAL5* a été produite par PCR en utilisant de l'ADN génomique de la souche haploïde BY4742 (*Mat α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0*) comme matrice et les oligonucléotides :

30

ACAACAAAACAAGGATAATCAAATAGTGTAATAAAAAAAAAAATTCAAGATGGATTCTAGAACAG TTGG (SEQ ID N°5) (5'), et,

TATATTCTTCTCTGATAACAATAATGTCAGTGTATCTCACCCTATTATTACTTGTTTTCTA
GATAAGC (SEQ ID N°6) (3') comme amorces.

La mutation *dal5::ADE2* a ensuite été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN génomique de la souche **NT34** comme matrice et
5 les oligonucléotides :

ATAGTCTCTGCTCATAG (SEQ ID N°7) (5'), et,
GCTTACAGAAATTCTAC (SEQ ID N°8) (3') comme amorces.

La souche **NT34** (*Mat a*, *trp1-1*, *ade2-1*, *leu2-3,112*, *his3-11,15*,
ura2::HIS3, *dal5::ADE2*) a été déposée à la CNCM le 10 octobre
10 2002 sous le numéro I-2942.

Ce crible est basé sur le même système colorimétrique que le crible primaire. Dans la souche de levure **NT34**, le gène *ADE2* n'est plus sous contrôle de son propre promoteur, mais sous
15 celui du gène *DAL5*. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme prion ([*URE3*]), la transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est activée donc le gène *ADE2* est exprimé, donc les souches sont blanches et autotrophes pour l'adénine. Lorsque la protéine Ure2p est sous forme normale ([*ure3-0*]), la
20 transcription à partir du promoteur du gène *DAL5* est réprimée donc le gène *ADE2* n'est pas exprimé, donc les souches sont rouges et auxotrophes pour l'adénine. Lorsque la souche **NT34** est traitée avec 5mM de chlorure de guanidium pendant une dizaine de générations, elle forme des colonies rouges (comme
25 attendu et comme le ferait la souche [*PSI+*] utilisée pour le criblage primaire). Comme on peut l'observer sur la figure 6, la phénanthridine et la 6-aminophénanthridine provoquent l'apparition d'un halo rouge lorsqu'elles sont déposées sur le petit filtre lui-même déposé sur le tapis de cellules
30 préalablement étalées sur le milieu nutritif gélosé (même procédé que pour le crible primaire, voir figure 2). Ce résultat suggère que ces produits sont également actifs sur le prion [*URE3*]. Il est à noter, toutefois, que ce crible secondaire est nettement moins sensible que le crible

primaire. Il est donc très utile pour observer rapidement si l'effet des molécules isolées lors du premier crible est généralisable à d'autres prions de levure mais en aucun cas il ne saurait se substituer au crible primaire.

5

Exemple 6 : Vérification de la cure de [URE3] en milieu liquide

Deux types d'expériences ont été menés afin de vérifier que l'effet observé sur boîte avec la souche **NT34** correspond bien à de la cure. Tout d'abord, des cellules dans les zones environnant les filtres ont été récupérées pour le témoin négatif (DMSO), positif (chlorure de guanidium) pour la phénanthridine et pour la 6-aminophénanthridine. Ces cellules ont ensuite été striées sur un milieu frais exempt de toutes ces molécules. Les cellules récupérées autour des filtres forment toutes des colonies rouges, à l'exception de celles récoltées autour du témoin négatif. Ce résultat montre que la coloration rouge observée sur boîte pour la souche **NT34** correspond bien à une cure et non à un artéfact lié à une inhibition d'une enzyme de la voie de biosynthèse de l'adénine (dans ce cas, la coloration rouge serait perdue sur un milieu sans inhibiteur). L'effet de cure de la phénanthridine et de la 6-aminophénanthridine a également été vérifié directement sur le prion [URE3]. Des cellules [URE3] de la souche CC34 poussent sur un milieu appelé USA alors que des cellules curées ([ure3-0]) sont incapables de pousser sur ce milieu. Les inventeurs ont examiné la capacité de cellules [URE3] traitées par 200 µM de chlorure de guanidium (témoin négatif), par 5 mM de chlorure de guanidium (témoin positif) ou par différentes doses de 6-aminophénanthridine (seule ou en combinaison avec 200 µM de chlorure de guanidium) à pousser sur un milieu USA. La 6-aminophénanthridine est capable de curer le prion [URE3] de façon significative et, tout comme pour le prion [PSI+], cet effet est accentué par une faible dose de

chlorure de guanidium (200 μM). Ces résultats, outre le fait qu'ils valident le crible secondaire avec la souche **NT34**, suggèrent que l'effet des inhibiteurs mis en évidence par ledit crible devrait être général sur tous les prions de levure.

Exemple 7 : Validation du crible avec deux molécules actives sur le prion des mammifères PrP : la chlorpromazine et la quinacrine

10 Le laboratoire de Stanley Prusiner, père de l'hypothèse « protéine seule » et prix Nobel en 1997, a isolé un certain nombre de molécules actives sur le prion de mammifère PrP grâce à un système de cellules murines (neuroblastomes) chroniquement infectées par le prion PrP^{Sc} (Korth et al.,
15 2001). Ce système, de par sa lourdeur et sa complexité, ne permet pas un criblage massif comme celui mis au point par les inventeurs. Aussi l'approche du groupe de Stanley Prusiner a-t-elle été de tester une à une, parmi les molécules déjà utilisées comme médicaments, toutes celles qui passent la
20 barrière hémato-encéphalique. Certaines molécules, comme notamment la quinacrine (utilisée comme anti-paludéen depuis longtemps) ou la chlorpromazine (un anti-dépresseur) présentent une activité notable dans leur système. De façon à valider le crible, les inventeurs ont donc testé la
25 chlorpromazine et la quinacrine dans leur système levure. Comme montré dans la figure 7, ces deux molécules présentent une certaine activité contre le prion [PSI+]. Il faut toutefois noter que leurs activités sont nettement inférieures à celle de la 6-aminophénanthridine. On peut également relever
30 que la chlorpromazine et la quinacrine, tout comme l'ensemble des molécules mis en évidence par l'invention, présentent une forte synergie d'action avec le chlorure de guanidium (Sur la figure 7, le milieu utilisé contient 200 μM de chlorure de guanidium). Ce dernier résultat suggère que ces deux molécules

agissent sur la même voie biochimique que les molécules isolées selon l'invention.

Par ailleurs, il est intéressant de noter que la quinacrine, dont l'activité est environ dix fois supérieure à celle de la chlorpromazine dans le test du Pr. Prusiner, présente également
5 une activité nettement supérieure à celle-ci dans le crible mis au point par les inventeurs. En outre, tout comme dans le test du Pr. Prusiner, la chlorpromazine et la quinacrine nécessitent un traitement prolongé (au moins 6 jours dans le
10 cas du test du Pr. Prusiner, au moins deux à trois jours dans le cas du crible selon l'invention) avant de déceler une activité.

Toutes ces corrélations entre l'activité de la quinacrine et de la chlorpromazine selon le test ou le crible utilisé
15 permettent de valider l'utilisation de la méthode selon l'invention pour réaliser des criblages haut débit en vue d'isoler des molécules susceptibles de constituer des médicaments efficaces (sur les mammifères et en particulier sur l'homme) contre des maladies neurodégénératives impliquant
20 des agrégats protéiques, de type encéphalopathies spongiformes, maladies d'Alzheimer, de Huntington...

Références bibliographiques

- 5 **Fernandez-Bellot et al.**, "The protein-only theory and the yeast
Saccharomyces cerevisiae: the prions and the
propagons", CMLS, 2001, **58**:1857-1878.
- 10 **Korth C. et al.**, "Acridine and phenothiazine derivatives as
pharmacotherapeutics for prion disease",
PNAS, 2001, **98**(17):9836-9841.
- 15 **Mettey Y. et al.**, "Synthesis of 11-Aminodibenzo[b,f][1,4]
thiazepines and Fluoro derivatives", J.
Heterocyclic Chem., 1997, **34**:465-467.
- Kessar S.V. et al.**, Tetrahedron Letters, 1969, 1151.

Revendications

1. Kit de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisé en ce qu'il comporte en combinaison une levure de phénotype [PSI+] avec un antibiogramme.
5
2. Kit selon la revendication 1, caractérisé en ce que le gène *ERG6* de la souche [PSI+] est inactivé.
- 10 3. Kit selon la revendication 1 ou 2, caractérisé en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.
4. Kit selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisé en ce qu'il comporte en outre un agent de curage des prions à doses sub-efficaces.
15
5. Kit selon la revendication 4, caractérisé en ce que l'agent de curage des prions est le chlorure de guanidium.
- 20 6. Méthode de criblage de molécules à activité anti-prion, caractérisée en ce qu'elle met en oeuvre la levure de phénotype [PSI+] et comporte les étapes suivantes :
 - a. réalisation d'un tapis de cellules in vitro
 - b. dépôt des composés à tester selon la méthode de l'antibiogramme,
25
 - c. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 20-25°C, et,
 - d. analyse de la coloration des colonies cellulaires.
- 30 7. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que le gène *ERG6* de la levure est inactivé.
8. Méthode de criblage selon la revendication 6, caractérisée en ce que la levure est *Saccharomyces cerevisiae*.

9. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 8, caractérisée en ce que l'étape a. comporte en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

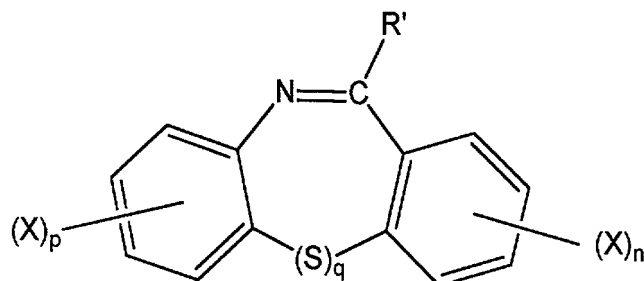
10. Méthode de criblage selon l'une quelconque des revendications 6 à 9, caractérisée en ce qu'elle comporte en outre les étapes suivantes :

- 10 e. incubation pendant environ 2-4 jours à environ 2-6°C, et/ou,
- f. réalisation d'un test de criblage secondaire.

11. Méthode de criblage selon la revendication 10, caractérisée en ce que le test de criblage secondaire comporte les étapes suivantes :

- construction d'une souche de levure dans laquelle le gène *ADE2* est sous le contrôle du promoteur du gène *DAL5*
- 20 - réalisation des étapes a. à e. des méthodes selon les revendications 6 et 10, l'étape a. comportant en outre l'ajout d'une dose sub-efficace de chlorure de guanidium.

25 12. Agents anti-prion de formule (I)



(I)

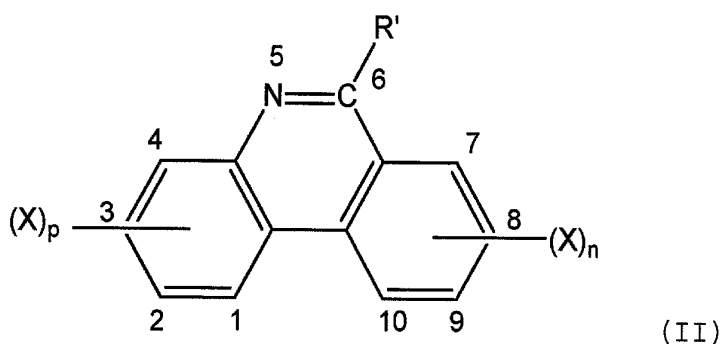
dans laquelle R' est un groupement H , NH_2 , NHR^2 , où R^2 est une chaîne alkyle ou alkylaminoalkyle de 1 à 10 carbones, ramifiée ou non,

5 X représente F , Cl , Br , I , CF_3 , SCH_3 , OCH_3 , OH , NO_2 , $COCH_3$, $CONH_2$, $COOH$, $COOR^3$, où R^3 est un groupement alkyl de 1 à 4 carbones,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2,

10 q égale 0 ou 1.

13. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (II) dans laquelle :

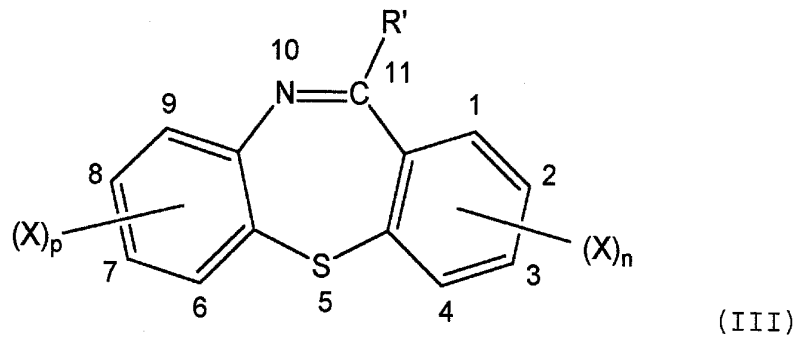


R' représente un groupement H , NH_2 , $NH-(CH_2)_3-N(CH_3)_2$, $NH-CH(CH_3)-(CH_2)_3-N(CH_2-CH_3)_2$,

X représente F , Cl ,

20 p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

14. Agents anti-prion selon la revendication 12, de formule (III) dans laquelle :



R' représente un groupement H, NH₂, NH-(CH₂)₃-N(CH₃)₂, NH-CH(CH₃)-(CH₂)₃-N(CH₂-CH₃)₂,

5 X représente F, Cl,

p et n, identiques ou différents, égalent 0, 1 ou 2.

15. Utilisation des agents anti-prion selon l'une quelconque des revendications 12 à 14, pour l'obtention d'un médicament
10 destiné à traiter les maladies neurodégénératives impliquant des agrégats protéiques.

16. Utilisation selon la revendication 15, caractérisée en ce
15 que les maladies sont les encéphalopathies spongiformes, les maladies d'Alzheimer et de Huntington.

1/4

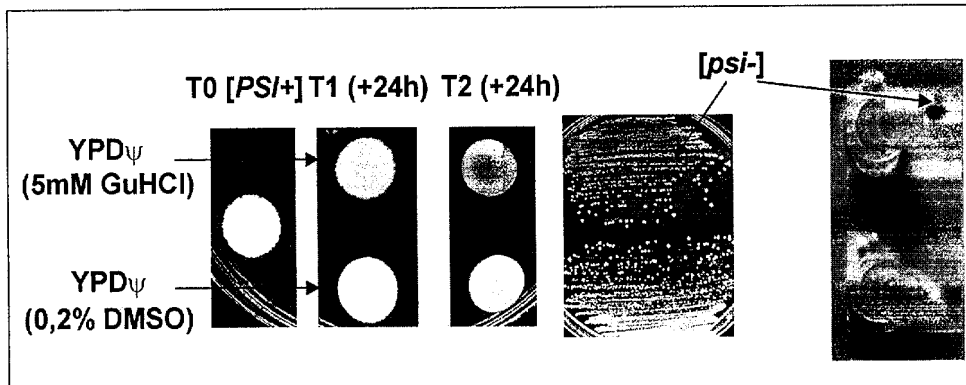


Figure 1

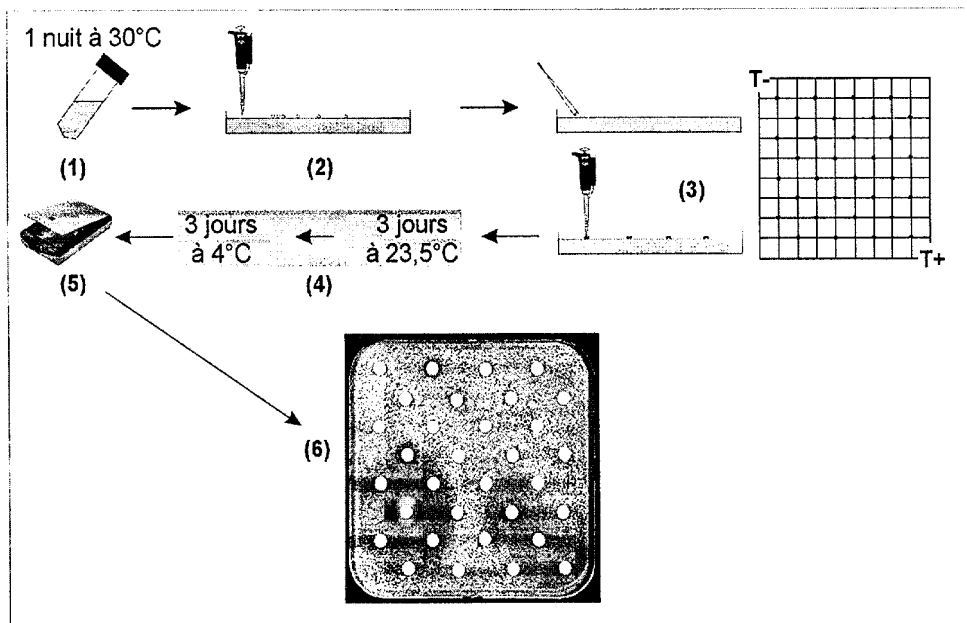


Figure 2

2/4

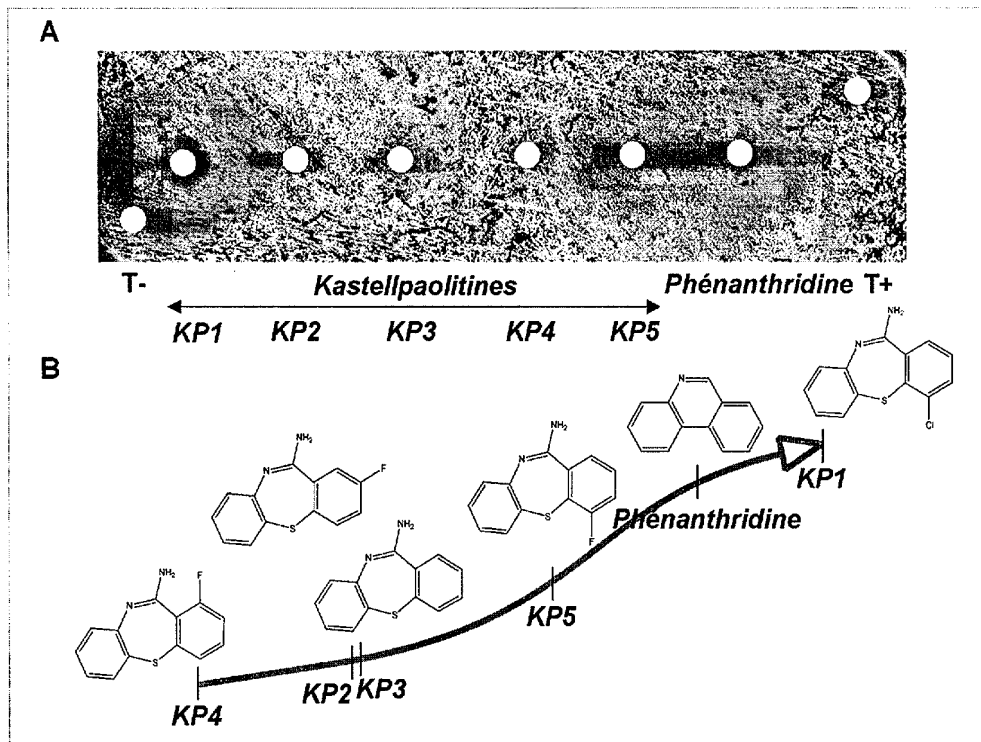


Figure 3

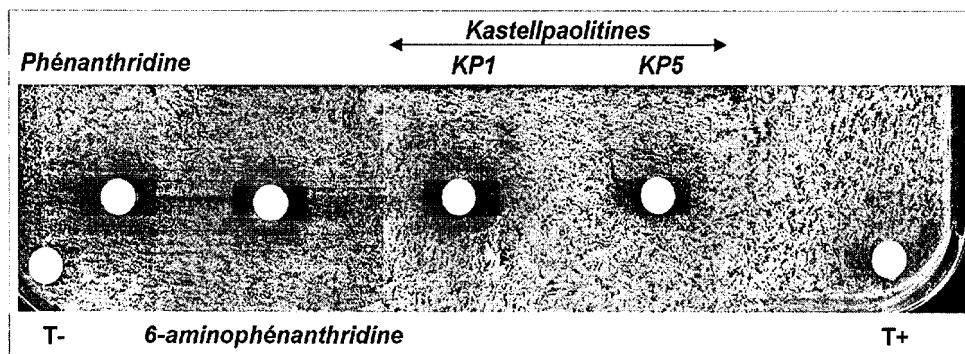


Figure 4

3/4

T-
(100 μ M GuHCl)

T+
(4mM GuHCl)

100 μ M GuHCl
+ 100 μ M
6-aminophénanthridine

100 μ M GuHCl
+ 200 μ M
6-aminophénanthridine

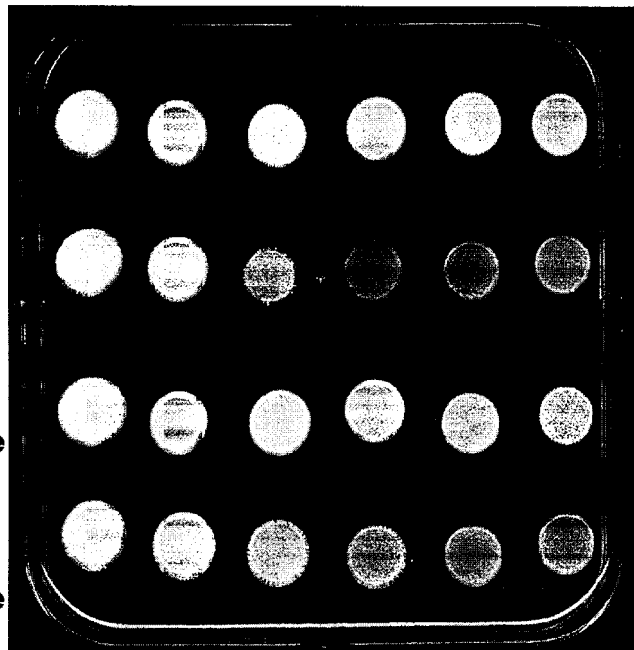


Figure 5

4/4

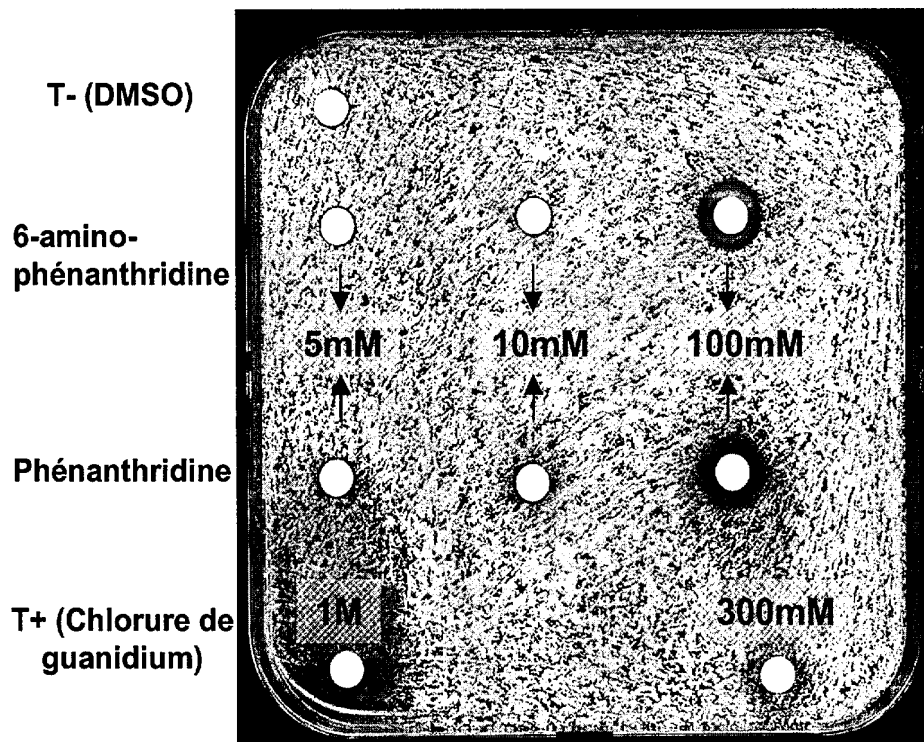


Figure 6

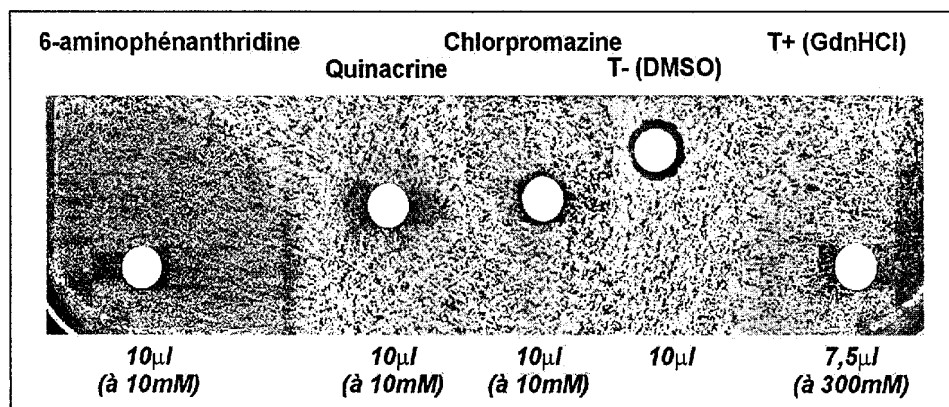


Figure 7

SEQUENCE LISTING

<110> CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S.)

<120> Criblage de molécules à activité anti-prion : kits, méthodes et molécules criblées.

<130> CNRS-1653

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 1
 cgatttaagt ttacataat ttaaaaaaac aagaataaaa taataatata gtaggcagca 60
 taagcggatc cccgggttaa ttaa 84

<210> 2

<211> 84

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 2
 ctgcatatat aggaaaatag gtatatatcg tgcgctttat ttgaatctta ttgatctagt 60
 gaatgaattc gagctcgttt aaac 84

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 3
 ggtacctcgt tcccgtag 18

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 4

cagtcagaaa tcgagttcca

20

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 5

acaacaaaac aaggataatc aaatagtgta aaaaaaaaaa ttcaagatgg attctagaac

60

agttgg

66

<210> 6

<211> 69

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 6

tatattcttc tctgataaca ataatgacag tgtatctcac cactattatt acttgttttc

60

tagataagc

69

<210> 7

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 7

atagtctctg ctcatag

17

<210> 8

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial

<400> 8
gcttacagaa attctac

17



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 626929
FR 0213022

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 02 065136 A (OUTEIRO TIAGO ;LINDQUIST SUSAN (US); UNIV CHICAGO (US); KROBITSCH) 22 août 2002 (2002-08-22) * le document en entier *	1,3,6,8	C12Q1/04 A61K31/554 A61K31/473 A61P25/28
Y	---	4,5,9	
X	WO 99 29891 A (ARCH DEV CORP ;LINDQUIST SUSAN (US)) 17 juin 1999 (1999-06-17) * revendications 1-36 *	1,3,6,8	
Y	---	4,5,9	
X	WEISSMAN J ET AL: "Mechanism of amyloid formation and propagation: Lessons from a yeast prion." BIOPHYSICAL JOURNAL, vol. 80, no. 1 Part 2, janvier 2001 (2001-01), page 329a XP002237383 45th Annual Meeting of the Biophysical Society;Boston, Massachusetts, USA; February 17-21, 2001 ISSN: 0006-3495 * le document en entier *	1,3,6,8	
Y	---	4,5,9	
X	WICKNER R B ET AL: "Prions of yeast, 'PSI! and 'URE3!, as models for neurodegenerative diseases" COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1996 UNITED STATES, vol. 61, 1996, pages 541-550, XP001098910 ISSN: 0091-7451 * le document en entier *	1,3,6,8	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7) C12Q
	---	-/--	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 avril 2003		Thiele, U	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant	

5
EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 626929
FR 0213022

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	<p>DATABASE BIOSIS 'en ligne! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; juin 2000 (2000-06) TALLOCY ZSOLT ET AL: "The (KIL-d) element specifically regulates viral gene expression in yeast." Database accession no. PREV200000387721 XP002237388 * abrégé * & GENETICS, vol. 155, no. 2, juin 2000 (2000-06), pages 601-609, ISSN: 0016-6731</p>	4,5,9	
X	<p>METTEY Y ET AL.: "Synthesis of 11-Aminodibenzo[b,f]thiazepines and Fluoro Derivatives" HETEROCYCLIC CHEM, vol. 34, pages 465-467, XP009008912 * le document en entier *</p>	12,14	
X	<p>US 3 758 479 A (SCHMUTZ J ET AL) 11 septembre 1973 (1973-09-11) * colonne 1, ligne 45 - ligne 55 *</p>	12,14	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
X	<p>US 4 024 242 A (HUNGERER KLAUS-DIETER) 17 mai 1977 (1977-05-17) * colonne 2, ligne 13 - ligne 17 *</p>	12,13	
X,D	<p>S.V. KESSAR ET AL: "New Routes to Condensed Polynuclear Compounds, II Direct Benzene Cyclisation of N-Chlorobenzylidene Arylamines" TETRAHEDRON LETTERS, 1969, pages 1155-1156, XP009009071 * le document en entier *</p>	12,13	

-/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 avril 2003		Thiele, U	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
<p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant</p>	

5

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)



**RAPPORT DE RECHERCHE
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement
national

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

FA 626929
FR 0213022

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
D,A	KORTH CARSTEN ET AL: "Acridine and phenothiazine derivatives as pharmacotherapeutics for prion disease." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES, vol. 98, no. 17, 14 août 2001 (2001-08-14), pages 9836-9841, XP002237386 August 14, 2001 ISSN: 0027-8424		
A	US 5 695 782 A (BOURQUIN JACQUES) 9 décembre 1997 (1997-12-09) * le document en entier *	12	
A	EMTER ROGER ET AL: "ERG6 and PDR5 regulate small lipophilic drug accumulation in yeast cells via distinct mechanisms." FEBS LETTERS, vol. 521, no. 1-3, 2002, pages 57-61, XP002237387 19 June, 2002 ISSN: 0014-5793		DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (Int.CL.7)
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 avril 2003		Thiele, U	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS			
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

5

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14)

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0213022 FA 626929**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09-04-2003
Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 02065136 A	22-08-2002	WO 02065136 A2	22-08-2002
WO 9929891 A	17-06-1999	AU 1633599 A WO 9929891 A1	28-06-1999 17-06-1999
US 3758479 A	11-09-1973	CH 481133 A CH 484924 A CH 485752 A AT 292716 B AT 292717 B AT 292718 B AT 292707 B BE 712114 A CH 517759 A CH 514612 A CH 499539 A CH 481940 A CH 481941 A CH 481942 A DE 1720007 A1 ES 351389 A1 FR 8046 M GB 1216523 A IL 29571 A NL 6406089 A NL 6803570 A NO 123459 B SE 364277 B US 3852446 A US 3539573 A US 3546226 A US 3683034 A US 3751415 A US 3793325 A US 3908010 A CH 484937 A CH 484926 A CH 484927 A CH 484928 A AT 292719 B AT 292722 B CH 485765 A CH 485748 A CH 485749 A CH 485750 A AT 292720 B	15-11-1969 31-01-1970 15-02-1970 15-08-1971 15-08-1971 15-08-1971 10-09-1971 13-09-1968 15-01-1972 31-10-1971 30-11-1970 30-11-1969 30-11-1969 30-11-1969 19-05-1971 01-12-1969 10-08-1970 23-12-1970 27-04-1972 01-12-1964 16-09-1968 22-11-1971 18-02-1974 03-12-1974 10-11-1970 08-12-1970 08-08-1972 07-08-1973 19-02-1974 23-09-1975 31-01-1970 31-01-1970 31-01-1970 31-01-1970 15-08-1971 15-08-1971 15-02-1970 15-02-1970 15-02-1970 15-02-1970 15-08-1971

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0213022 FA 626929**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09-04-2003

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 3758479 A		AT 292721 B	15-08-1971
		US 3884920 A	20-05-1975
US 4024242 A	17-05-1977	DE 2430380 A1	15-01-1976
		AR 205205 A1	12-04-1976
		AT 339475 B	25-10-1977
		AT 483575 A	15-02-1977
		AU 8238975 A	06-01-1977
		BE 830640 A1	29-12-1975
		CA 1052695 A1	17-04-1979
		CH 625706 A5	15-10-1981
		CU 34292 A2	08-03-1977
		DK 287275 A ,B,	26-12-1975
		FR 2276061 A1	23-01-1976
		GB 1517011 A	05-07-1978
		IE 41298 B1	05-12-1979
		IL 47509 A	31-01-1979
		JP 1210146 C	29-05-1984
		JP 51026219 A	04-03-1976
		JP 58043370 B	27-09-1983
		LU 72801 A1	04-03-1977
		NL 7507389 A	30-12-1975
		NO 752208 A ,B,	30-12-1975
SE 422153 B	22-02-1982		
SE 7507203 A	29-12-1975		
US 5695782 A	09-12-1997	AT 164762 T	15-04-1998
		AU 678492 B2	29-05-1997
		AU 7157194 A	23-03-1995
		CA 2131495 A1	09-03-1995
		DE 59405627 D1	14-05-1998
		EP 0646374 A1	05-04-1995
		ES 2115188 T3	16-06-1998
		IL 110863 A	28-10-1999
		JP 7165584 A	27-06-1995
		NZ 264407 A	21-12-1995
		PH 30478 A	28-05-1997
		SG 44498 A1	19-12-1997
		US 5472714 A	05-12-1995
		ZA 9406874 A	24-04-1995

EPO FORM P0465

Pour tout renseignement concernant cette annexe : voir Journal Officiel de l'Office européen des brevets, No.12/82