

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-543854

(P2009-543854A)

(43) 公表日 平成21年12月10日(2009.12.10)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02 Z N A	4 B 0 6 3
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 1 1	4 C 0 8 4
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 V	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-520007 (P2009-520007)	(71) 出願人	503197304 ジェネトン
(86) (22) 出願日	平成19年7月16日 (2007.7.16)		フランス・F-91000・エヴリ・リュ ・ドゥ・ランテルナシオナル・1・ビス
(85) 翻訳文提出日	平成21年3月4日 (2009.3.4)	(71) 出願人	500531141
(86) 国際出願番号	PCT/FR2007/001211		セントレ・ナショナル・デ・ラ・レシエル シュ・サイエンティフィック
(87) 国際公開番号	W02008/009802		フランス・F-75016・パリ・リュ・ ミッシェル・アンジュ・3
(87) 国際公開日	平成20年1月24日 (2008.1.24)	(74) 代理人	100064908 弁理士 志賀 正武
(31) 優先権主張番号	0653020	(74) 代理人	100089037 弁理士 渡邊 隆
(32) 優先日	平成18年7月18日 (2006.7.18)	(74) 代理人	100108453 弁理士 村山 靖彦
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サルコグリカン異常症の治療のための薬剤

(57) 【要約】

本発明は、サルコグリカン異常症の治療に関する。より正確には、本発明は、特定の形態の疾患の治療を企図した医薬品としての、小胞体関連分解経路のインヒビター、特にマンノシダーゼIインヒビターの使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サルコグリカン異常症を治療することを企図した医薬品の調製のためのクラス I - マンノシダーゼインヒビターの使用。

【請求項 2】

前記インヒビターがキフネンシンまたは 1 - デオキシマンノジリマイシン、有利にはキフネンシンであることを特徴とする、請求項 1 に記載のインヒビターの使用。

【請求項 3】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける R 7 7 C ミューテーションと関連するサルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のインヒビターの使用。 10

【請求項 4】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける E 2 6 2 K ミューテーションと関連するサルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のインヒビターの使用。

【請求項 5】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける Q 1 1 E ミューテーションと関連するサルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載のインヒビターの使用。

【請求項 6】

- そのうちの 1 種がミューテーションを有する 4 種のサルコグリカン遺伝子 (、 、 及び) で細胞をコトランスフェクションする工程 ;
- 請求項 1 または 2 に規定されたインヒビターの存在下で数時間インキュベーションする工程 ;
- サルコグリカン複合体を局在化させる工程
からなる、サルコグリカン異常症に対するクラス I - マンノシダーゼインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。 20

【請求項 7】

4 種の野生型サルコグリカンをコードする遺伝子でコトランスフェクションされた細胞で平行に実施することを特徴とする、請求項 6 に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。 30

【請求項 8】

前記インヒビターなしでインキュベートされた細胞で平行に実施することを特徴とする、請求項 6 または 7 に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【請求項 9】

前記複合体の局在化について免疫組織化学的ラベリング方法を使用することを特徴とする、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、サルコグリカン異常症の治療に関する。 40

【0002】

より正確には、本発明は、特定の形態の疾患の治療を企図した医薬品としての、小胞体関連分解経路のインヒビター、特にマンノシダーゼインヒビターの使用に関する。

【背景技術】

【0003】

サルコグリカン異常症は、肢帯筋ジストロフィー (L G M D) 群の常染色体劣性筋疾患である。この疾患の 4 種の形態 (L G M D 2 C 、 L G M D 2 D 、 L G M D 2 E 及び L G M D 2 F) が同定されており、それぞれ 、 、 及び - サルコグリカン遺伝子における 50

欠損から由来する（非特許文献 11、非特許文献 17）。

【0004】

LGM D 2 C は、地中海地域と、欧州に在住するジブシーの集団に特に広がっている。LGM D 2 D は、欧州、アフリカ、日本及びブラジルの患者において世界中で診断されている。LGM D 2 E は、アンマンのコミュニティーの大部分と北アフリカで診断されている。現在まで、LGM D 2 F はブラジル、トルコ及びイタリア起源の 7 家族のみで報告されている。サルコグリカン異常症を有する患者は、ふくらはぎ過形成としばしば関連する骨盤と上肢帯筋の段階的な筋弱さを呈する。認知障害は存在しない。心筋症のような心筋合併症は、LGM D 2 C、LGM D 2 E 及び LGM D 2 F 患者においてしばしば観察される。

10

【0005】

組織学的実験では、筋肉は、再生領域と分解領域、炎症性湿潤、線維症、及び線維サイズの変化を示す。疾患の重篤度は同胞であったとしても可変的である。ほとんどの重篤な場合には、患者は 30 歳を前に歩行能力を失い、その寿命期待値は減少する。

【0006】

二つの形態の上記疾患で再発性のミューテーションが生じる。LGM D 2 C 患者では、d e l 5 2 1 T 及び C 2 8 3 Y ミューテーションが、それぞれ北アフリカ及びジブシーの集団でしばしば観察されている（非特許文献 4、非特許文献 13）。

【0007】

LGM D 2 D 患者で見いだされる最も頻繁なミューテーションは、77 位のアルギニンがシステインに置換されている R 7 7 C 置換である。フィンランドを除き欧州の患者の 3 分の 1 がこのミューテーションを有しているが、フィンランドでは患者の 100% で観察され、ほとんどの場合両対立遺伝子について存在する（非特許文献 5、非特許文献 9）。

20

【0008】

サルコグリカン (SG) は、ジストロフィンと会合してジストロフィン糖タンパク質複合体を形成する細胞膜糖タンパク質の一群である（非特許文献 12）。この複合体は、アクチン細胞骨格と細胞外マトリックスの間での機械的な結合に寄与し、その後に筋線維の膜安定性において役割を果たす（非特許文献 10）。サルコグリカンは、C 末端（ -サルコグリカン）及び N 末端（ 、 及び -サルコグリカン）のいずれかであり得る小さな細胞内ドメイン、一本の膜貫通ドメイン、及び N - グリコシルカ部位を有する細胞外ドメインからなる。

30

【0009】

サルコグリカン複合体のアセンブルは、筋小胞体とゴルジ装置におけるこれらのタンパク質の輸送の間で生ずる（非特許文献 6、非特許文献 16）。アセンブルは、 -サルコグリカンが -サルコグリカンに結合して開始し、膜内に正確に複合体を配置する。次いで -サルコグリカンがこの複合体に結合し、次いで -サルコグリカンを結合してアセンブルが完結する。いずれかのサルコグリカンにおけるミューテーションは、複合体のアセンブルを破壊することができ、他のサルコグリカンの二次的な欠損を引き起こす。

【0010】

今日では、サルコグリカン異常症の診断方法、及び 、 、 または -サルコグリカンにおける特定のミューテーションに対する表現型の寄与については既知であるが、この疾患を有する患者の治療についてはほとんど手段を有していない。

40

【0011】

今日まで、特定の治療は開発されておらず、ほとんどの患者は、筋痙攣の悪化を避けるために理学療法を必要としている。しかしながらいくつかのチームは、動物モデルにおいてウイルスベクターを介する遺伝子移入または細胞療法を使用する実験において、ポジティブな結果を報告している（非特許文献 1、非特許文献 7、非特許文献 14）。この理由のため、国際特許出願 W O 0 0 / 2 0 5 8 2 号は、遺伝子治療アプローチを使用して、特に A A V ベクターを使用して、欠損サルコグリカン遺伝子を置換することを推奨している。

50

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献1】国際特許出願WO 00 / 20582号

【非特許文献】

【0013】

【非特許文献1】Allmand, V., K.M. Donahue, V. Straub, R.L. Davisson, B.L. Davidson, and K.P. Campbell. 2000. Early adenovirus-mediated gene transfer effectively prevents muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice. *Gene Ther.* 7: 1385-91

10

【非特許文献2】Bartoli, M., J. Poupiot, A. Goyenvallée, N. Perez, L. Garcia, O. Donas, and I. Richard. 2006a. Non-invasive Monitoring of Therapeutic Gene Transfer in Animal Models of Muscular Dystrophies. *Gene Therapy.* 13: 20-8

【非特許文献3】Bartoli, M., C. Roudaut, S. Martin, F. Fougère, L. Suel, J. Poupiot, E. Gicquel, F. Noulet, O. Danos, and I. Richard. 2006b. Safety and efficacy of AAV-mediated calpain 3 gene transfer in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy type 2A. *Mol Ther.* 13: 250-9

【非特許文献4】Bonnemann, G.C., J. Wong, K.J. Jones, H.G. Lidov, C.A. Feener, F. Shapiro, B.T. Darras, L.M. Kunkel, and K.N. North. 2002. Primary gamma-sarcoglycanopathy (LGMD 2C): broadening of the mutational spectrum guided by the immunohistochemical profile. *Neuromuscul Disord.* 12: 273-80

20

【非特許文献5】Carrie, A., F. Piccolo, F. Leturcq, C. de Toma, K. Azibi, C. Beldjord, J.M. Vallat, L. Merlini, T. Voit, C. Sewry, J.A. Urtizbera, N. Romero, F.M. Tome, M. Fardeau, Y. Sunada, K.P. Campbell, J.C. Kaplan, and M. Jeanpierre. 1997. Mutational Diversity and hot spots in the alpha-sarcoglycan gene in autosomal recessive muscular dystrophy (LGMD2D). *J Med Genet.* 34: 470-5

【非特許文献6】Chan, Y.M., C.G. Bonnemann, H.G. Lidov, and L.M. Kunkel. 1998. Molecular organization of sarcoglycan complex in mouse myotubes in culture. *J Cell Biol.* 143: 2033-44

【非特許文献7】Dressman, D., K. Araishi, M. Imamura, T. Sasaoka, L.A. Liu, E. Engvall, and E.P. Hoffman. 2002. Delivery of alpha- and beta-sarcoglycan by recombinant adeno-associated virus: efficient rescue of muscle, but differential toxicity. *Hum Gene Ther.* 13: 1631-46

30

【非特許文献8】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

【非特許文献9】Hackman, P., V. Juvonen, J. Sarparanta, M. Penttinen, T. Aarimaa, M. Unsitalo, M. Auranen, H. Pihko, R. Alen, M. Junes, T. Lonnqvist, H. Kalimo, and B. Udd. 2004. Enrichment of the R77C alpha-sarcoglycan gene mutation in Finnish LGMD2D patients. *Muscle Nerve.*

40

【非特許文献10】Lapidos, K.A., R. Kakkar, and E.M. McNally. 2004. The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res.* 94: 1023-31

【非特許文献11】Nigro, V. 2003. Molecular bases of autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophies. *Acta Myol.* 22: 35-42

【非特許文献12】Pzawa, E., Y. Mizuno, Y. Hagiwara, T. Sasaoka, and M. Yoshida. 2005. Molecular and cell biology of the sarcoglycan complex. *Muscle Nerve.*

【非特許文献13】Piccolo, F., Jeanpierre, F. Leturcq, C. Dode, K. Azibi, A. Tout

50

ain, L. Merlini, L. Jarre, C. Navarro, R. Krishnamoorthy, F.M. Tome, J.A. Urtizb
erea, J.S. Bechmann, 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

【非特許文献 1 4】Sampaolesi, M., Y. Torrente, A. Innocenzi, R. Tonlorenzi, G. D
'Antona, M.A. Pellegrino, R. Barresi, N. Bresolin, M.G. De Angelis, K.P. Campbel
l, R. Bottinelli, and G. Cossu. 2003. Cell therapy of alpha-sarcoglycan null dus
trophic mice through intra-arterial delivery of mesoangioblasts. Science. 301: 4
87-92.

【非特許文献 1 5】Schwenk, F., U. Baron, and K. Rajewsky. 1995. A cre-transgenic
mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments includin
g deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. 23: 5080-1.

【非特許文献 1 6】Shi, W., Z. Chen, J. Schottenfeld, R.C. Stahl, L.M. Kunkel, an
d Y.M. Chan. 2004. Specific assembly pathway of sarcoglycans is dependent on bet
a- and delta-sarcoglycan. Muscle Nerve. 29: 409-19.

【非特許文献 1 7】Vainzof, M., M.R. Passos-Bueno, M. Canovas, E.S. Moreira, R.C.
Pavanello, S.K. Marie, L.V. Anderson, C.G. Bonnemann, E.M. McNally, V. Nirgo, L
.M. Kunkel, and M. Zatz. 1996. The sarcoglycan complex in the six autosomal reces
sive limb-girdle muscular dystrophies. Hum Mol Genet. 5: 1963-9.

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

先行技術では、プロテアソーム機能を阻害するあらゆる治療アプローチが、筋疾患、特
に筋ジストロフィーの治療に試みられていた。しかしながら、非特定のなアプローチは特
に有効であるとは思えず、寛容性の問題を導いていた。

【0015】

それ故、新規な治療アプローチを開発すること、特にサルコグリカン異常症の患者を特
異的且つ有効に治療する医薬品を開発することが必須である。

【課題を解決するための手段】

【0016】

本発明は、

- サルコグリカン異常症と関連するいくつかのサルコグリカンミューテーションが、欠損
したフォールディングを示す糖タンパク質を生産すること；
- これらのミスフォールドタンパク質は、糖タンパク質分解経路と関連する小胞体を介し
て廃棄されること；
- この経路のインヒビターは、欠損したサルコグリカンタンパク質の分解をブロックする
こと；
- (インヒビターの存在下で) 分解しない場合、欠損したサルコグリカンは細胞膜に正確
にトランスロケーションされ、サルコグリカン複合体にアセンブルされ、正常な表現型の
回復を導くこと

を示す本発明者によって報告された結果に基づく。

【0017】

小胞体 (ER) グリコシダーゼは、糖タンパク質生産の質を制御する点で重要な役割を
演じていることが思い起こされるべきである。それらは、正確にフォールディングされた
糖タンパク質のみをその最終位置に輸送することを確保する。特に、マンノシダーゼ
による ER におけるマンノース残基の切断は、分解のためのプロテアソームにミスフォ
ールドした糖タンパク質を導くシグナルとして機能する。

【0018】

- マンノシダーゼは二つの群に属する。クラス I マンノシダーゼ (マンノシダーゼ I
) は、1 - デオキシマンノジリマイシン及びキフネンシンによって阻害され、クラス II

10

20

30

40

50

マンノシダーゼは、スワインソニンによって特異的に阻害される。プロテアソームは、細胞質における細胞内タンパク質の分解に関与し、例えばMG132またはボルテゾミブによって阻害できる。

【0019】

理論的には、この分解経路（ERAD：小胞体関連分解）のいずれかのインヒビターを使用することが可能であろう。しかしながら本発明は、非常に選択的な作用形態を有することが証明されており、サルコグリカン異常症を治療するのに顕著に有効であるマンノシダーゼIインヒビターに焦点を当てた。臨床上の観点から、これは潜在的に少ない副作用に特に対応する。

【0020】

その結果、本発明は、サルコグリカン異常症を治療することを企図した医薬品の調製のためのクラスIマンノシダーゼインヒビターの使用に関する。

【0021】

それ故本発明の文脈において、少なくとも一つのマンノシダーゼIインヒビターの使用が試験されている。特に、インヒビターの「カクテル」、特に活性/選択性の観点で相補的な阻害活性を有する異なるタイプのインヒビターの混合物の使用は排除されるものではない。

【0022】

キフネンシン(CAS 109944-15-2)及び1-デオキシマンノジリマイシン(CAS 84444-90-6)分子は、マンノシダーゼIを阻害することが既知であるため特に好ましい。

【0023】

しかしながら本発明の範囲はこれらの分子に限定されない。実際に、いずれかの候補の分子を、単純な酵素的アッセイを使用してマンノシダーゼI阻害活性について試験しても良い。

【0024】

このアプローチの目的がヒトサルコグリカン異常症のための治療溶液を見出すことを考えると、試験に使用される酵素は、ヒト起源のクラスI - マンノシダーゼ、特に登録番号NP_005898（マンノシダーゼ、アルファ、クラス1A、メンバー1 [ホモ・サピエンス]）でデータベースに参照されている酵素であるべきである。

【0025】

そのようなインヒビターを試験するのに適した酵素アッセイは、例えばJ. Biol. Chem. 2004 Oct 8; 279(41): 42638-47. Epub 2004 Jul 22. "The twisted abdomen phenotype of Drosophila POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity", Ichimiya T, Many H, Ohmae Y, Yoshida H, Takahashi K, Ueda R, Endo T, Nishihara Sで印刷された文献に記載された。

【0026】

投与方法、投与用量、及び投与頻度は、当業者に既知の古典的なプロトコールを使用して、各特定の場合について測定される。これらのパラメーターは、治療されるミューテーションと使用されるインヒビターとに特に依存する。

【0027】

キフネンシンは好ましい選択肢である。このインヒビターは非常に特異的であり、水溶性であるという利点を有し、それ故経口投与に適している。

【0028】

加えて、この治療方法は、ヒト - サルコグリカンR77Cミューテーション（遺伝子の229C>Tミューテーションに対応するタンパク質のArg77Cys）によって生ずるサルコグリカン異常症の治療に特に適している。上述の通り、このミューテーションは、特に欧州での多数の臨床の場合で関与している。しかしながら本出願人は、1-デオキシマンノジリマイシンもキフネンシンの代わりに使用できることを示した。されに、本発明の文脈では、観察された効果は特定のサブユニットの特定のミューテーションに特異的ではないことが示された。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

実際、同じ有益な効果が、使用されるインヒビターに関わりなく、及び - サブユニット、より正確にはそれぞれ Q 1 1 E 及び E 2 6 2 K ミューテーションについて観察された。

【 0 0 3 0 】

この理由のため、この治療は、4種のヒトサルコグリカンにおける全ての既知のミューテーションに関連する疾患について潜在的に投与されて良い。しかしながら、ナンセンスミューテーションまたは欠失による切り詰められたタンパク質は理論的に、分解されなくても活性ではないので、ポイントミューテーションのみがこのアプローチについて考慮されるべきである。

10

【 0 0 3 1 】

今回報告された主たるポイントミューテーションが以下の表に記載されている。このリストは排他的なものではない。

【表 1】

α-サルコグリカン			β-サルコグリカン		
キッソ	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換	キッソ	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換
			01	c.31C>G	p.Gln11Glu
02	c.92T>C	p.Leu31Pro	03	c.265G>A	p.Val89Met
02	c.100C>T	p.Arg34Cys	03	c.271C>T	p.Arg91Cys
02	c.101G>A	p.Arg34His	03	c.272G>C	p.Arg91Pro
03	c.184T>C	p.Tyr62His	03	c.274_275AT>TC	p.Ile92Ser
03	c.203G>A	p.Gly68Gln	03	c.275T>C	p.Ile92Thr
03	c.220C>T	p.Arg74Trp	03	c.299T>A	p.Met100Lys
03	c.229C>T	p.Arg77Cys	03	c.323T>G	p.Leu108Arg
03	c.266_267inv	p.Leu89Pro	03	c.341C>T	p.Ser114Phe
03	c.269A>G	p.Tyr90Cys	03	c.355A>T	p.Ile119Phe
03	c.271G>C	p.Gly91Arg	03	c.416G>A	p.Gly139Asp
03	c.278C>T	p.Ala93Val	04	c.452C>G	p.Thr151Arg
03	c.290A>G	p.Asp97Gly	04	c.499G>A	p.Gly167Ser
03	c.292C>T	p.Arg98Cys	04	c.538T>C	p.Phe180Leu
03	c.293G>A	p.Arg98His	04	c.544A>G	p.Thr182Ala
03	c.308T>C	p.Ile103Thr	04	c.551A>G	p.Tyr184Cys
04	c.329G>T	p.Arg110Leu	δ-サルコグリカン		
04	c.371T>C	p.Ile124Thr	04	c.212G>C	p.Arg71Thr
05	c.409G>A	p.Glu137Lys	06	c.451T>G	p.Ser151Ala
05	c.421C>A	p.Arg141Ser	08	c.593G>C	p.Arg198Pro
05	c.472C>T	p.Leu158Phe	08	c.631A>T	p.Asn211Tyr
05	c.518T>C	p.Leu173Pro ^a	09	c.784C>A	p.Glu262Lys
05	c.524T>C	p.Val175Ala ^a	γ-サルコグリカン		
05	c.541C>T	p.Arg181Cys	03	c.205G>C	p.Gly69Arg
06	c.586G>A	p.Val196Ile	03	c.206G>C	p.Gly69Asp
06	c.614C>A	p.Pro205His	03	c.269T>C	p.Leu90Ser
06	c.662G>A	p.Arg221His	07	c.581T>C	p.Leu194Ser
06	c.683C>A	p.Pro228Gln	07	c.629A>G	p.His210Arg
06	c.724G>T	p.Val242Phe	08	c.787G>A	p.Glu263Lys
06	c.725T>C	p.Val242Ala	08	c.848G>A	p.Cys283Tyr
06	c.739G>A	p.Val247Met ^a			
07	c.850C>T	p.Arg284Cys			

20

30

40

【 0 0 3 2 】

本発明の第二の特徴点は、サルコグリカン異常症の治療のために使用される、小胞体関連分解 (ERAD) 経路のインヒビターの効力の in vitro 評価のために使用されるアッセ

50

イである。このアッセイは以下の工程からなる：

- そのうちの一つが試験されるミューテーションを有する4種のサルコグリカン遺伝子（
、
、
及び
）と細胞とをコトランスフェクションする工程；
- インヒビターの存在下で数時間インキュベーションする工程；
- サルコグリカン複合体を局在化する工程。

【0033】

有利には、ポイントミューテーションを有するヒトサルコグリカン遺伝子が使用されるべきである。

【0034】

複合体が細胞膜に局在することが見出されたら、インヒビターが試験されるミューテーションに有効であると同定し、それ故特定の形態のサルコグリカン異常症を治療することを目的とする治療アプローチでの使用が考慮できる。

【0035】

細胞膜における複合体の検出は、以下のことを意味する：

- 初めにインヒビターが欠損タンパク質の分解を妨げた；
- 次いでミュータントタンパク質が正確にトランスロケーションされ、細胞膜複合体に挿入された。

【0036】

有利には、この方法は以下の細胞を平行に考慮する：

- 4種の野生型サルコグリカン遺伝子とコトランスフェクトされた細胞：これはポジティブコントロールである；
- 同じ実験条件だが、インヒビターが存在しないでインキュベートされた細胞：これはネガティブコントロールであり、インヒビターの考えうる効果を評価する基礎を提供する。

【0037】

好ましくは、複合体の検出は、少なくとも一つのサルコグリカンに対する抗体を使用して、免疫組織化学的方法によって実施される。

【0038】

別法として、サルコグリカンの一つを、特に蛍光タグを使用してタグ化し、次いで顕微鏡またはフローサイトメトリーによって検出できる。この解決法は、より少ない実験工程を含むため、免疫学的方法と比較して有利である。しかしながら、融合タンパク質（サルコグリカン+タグ）が複合体のアセンブルを破壊しないことを確認することが重要である。

【0039】

両者の場合（抗体の選択またはタグ化されるサルコグリカンの選択）で、検出方法はミューテーションを有するサルコグリカンを標的化できるが、必ずそうすることが必要であるわけではない。

【0040】

このインヒビターのスクリーニング方法は、特に関連するサルコグリカンミューテーションを有するトランスジェニックマウスにおいて、*in vivo*で使用されても良いことに注意すべきである。

【0041】

本発明及びそれが呈する利点は、本明細書に添付した図面によって説明される以下の一連の実験によって最もよく示される。しかしながら、これらの実験は本発明の範囲を制限するものとは考慮されるべきではない。

【0042】

本発明は、MG132（プロテアソームインヒビター）及びキフネンシン（マンノシダーゼIインヒビター）の存在下で、R77Cミューテーションを有する - サルコグリカントタンパク質を使用する実験によってほぼ説明される。

【図面の簡単な説明】

【0043】

10

20

30

40

50

【図1】図1は、 α -サルコグリカン R77C ミューテーションを有する患者から得た筋肉生検標本における、 α -サルコグリカン及びジストロフィンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図2】図2は、マウス、正常(WT)、 α -Sgca^{R77C/R77C}、及び α -Sgca^{-/-}筋肉における、 α -サルコグリカン及びジストロフィンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図3】図3は、 α -Sgca^{-/-}、WT及び α -Sgca^{R77C/R77C}筋肉の組織学的写真である(Qua = 四頭筋、Ga = 腓腹筋、Pso = 腰筋、Del = 三角筋)。

【図4】図4は、 α -Sgca^{-/-}及び α -Sgca^{R77C/R77C}筋肉におけるエバンス染色を使用する壊死細胞の検出を示す写真である。

【図5】図5は、AAV-ヒト α -Sgca^{R77C}の注射の後の α -Sgca^{-/-}筋肉における α -サルコグリカン及び β -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。左側： α -サルコグリカン；中央： β -サルコグリカン；右側： α 及び β -サルコグリカン。

【図6】図6は、AAV- α -Sgca^{R77C}の注射の後の α -Sgca^{-/-}筋肉の組織学的写真である。(左側：形質導入していない領域；右側：形質導入した領域)。

【図7】図7は、非浸透化クアドリトランスフェクト細胞における α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。左側：正常 α -サルコグリカンでのクアドリトランスフェクト；右側：ミュータント α -サルコグリカンでのクアドリトランスフェクト。

【図8】図8は、 α -サルコグリカン(左側)及びカルレチクリン(中央)の免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。右側：両染色のオーバーラップ。

【図9】図9は、MG132の存在下でのミュータント α -サルコグリカンでのクアドリトランスフェクト細胞における α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図10】図10は、キフネンシンの存在下でのミュータント α -サルコグリカンでのクアドリトランスフェクト細胞における α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図11】図11は、ミュータント α -サルコグリカンで注射したマウス α -Sgca^{-/-}筋肉におけるキフネンシンでの一週間の治療後の凝集物の不在を示す、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図12】図12Aは、3種の α -サルコグリカンと正常な α -サルコグリカン(左側)または100 μ Mの1-デオキシマンノジリマイシン(dMJ)の非存在下(中央)または存在下(右側)ミュータントR77C α -サルコグリカンでクアドリトランスフェクションされた細胞における、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。図12Bは、1-デオキシマンノジリマイシン(dMJ)の5または100 μ Mの存在下または非存在下での、3種の α -サルコグリカンとミュータントE262K α -サルコグリカンでクアドリトランスフェクションされた細胞における、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。図12Cは、1-デオキシマンノジリマイシン(dMJ)の5, 50または100 μ Mの存在下または非存在下での、3種の α -サルコグリカンとミュータントQ11E α -サルコグリカンでクアドリトランスフェクションされた細胞における、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

【図13】図13Aは、キフネンシン5 μ Mの存在下または非存在下での、3種の α -サルコグリカンとミュータントE262K α -サルコグリカンでクアドリトランスフェクションされた細胞における、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。図13Bは、キフネンシン5 μ Mの存在下または非存在下での、3種の α -サルコグリカンとミュータントQ11E α -サルコグリカンでクアドリトランスフェクトされた細胞における、 α -サルコグリカンの免疫組織化学的ラベリングを示す写真である。

10

20

30

40

50

【発明を実施するための形態】

【0044】

1. Sgca^{77c/77c}マウスの生産

Sgca遺伝子を含むファージのBamHI-SfiI切断によって得られたSgca遺伝子のエキソン2及び3を有する1075bpのDNA断片をPCRにより増幅し、次いでpSP72プラスミドベクター(Promega)に挿入した。以下のプライマー：5'-GCCCAGGTGGCTGTGCTACACACAGCGCA-3'(配列番号1)及び5'-TGCCTGTGTGTAGCACAGCCACCTGGGC-3'(配列番号2)を使用するサイトディレクトミュータジェネシスにより、エキソン3においてH77Cミューテーションを生産した。ポイントミューテーションの存在をシーケンシングによって確認した。約4kbの5' BglII-BamHI断片と2981bpの3' SfiI-SpeI断片を、ミュータント挿入部位の各側でpSP72ベクター内にクローン化した。pGEM-neo^rベクター由来のloxP-neo^r-loxPカセットを、イントロン3におけるEcoRV部位を介して挿入し、チミジンキナーゼ(TK)カセットを、3'断片の下流に挿入し、最終組換えベクターを生産した。組換えベクター(25µg)をSalI切断によって直線化し、エレクトロポレーションによってSE129Sv細胞に導入した。次いでG418耐性コロニーのDNAを単離し、PCRまたはサザンブロットにより分析し、組換え現象をチェックした。二つの別個の組換えクローン(IB4及びVIIICII)をC57Bl/6未分化胚芽細胞に注射し、キメラマウスを生産した。キメラのオスをC57Bl/6の雌と交雑し、異種接合マウスを生産した。deleter株との交雑によりneo^rカセットを除去した(15)。neo^rカセットが摘出されている生成したマウスを交配し、異種接合ミュータントマウスを生産した。Qiagen DNeasy Tissue Kitを使用して抽出された尾のDNAに対して、上流プライマーa-sarcoQ 5':5'-TATAACCTGGCTTCTCTA-3'(配列番号3)及びtestNeo1 5'-CGAATTCGCCAATGAC AAGACGCT-3'(配列番号4)、並びに下流プライマーa-sarcoQ3' 5'-TAGTGGCTCATGCCTTTAAT-3'(配列番号5)を使用してPCRによりジェノタイピングを実施し、以下のPCR条件：94℃で3分、次いで94℃で30秒、61℃で40秒、及び72℃で1分からなる30サイクル、次いで72℃で3分を使用して、neo^rカセットを有するミュータント対立遺伝子について639bp産物と、野生型対立遺伝子について484bp産物とを生産した。neo^rカセットの摘出の後、a-sarcoQ5'(配列番号3)及びa-sarcoQ3'(配列番号5)プライマーでジェノタイピングを実施し、ミュータント対立遺伝子について575bp産物を生産した。H77CミューテーションがモデルのSgca遺伝子に存在することをチェックするために、プライマーKlgenoseq2.s 5'-TGTGTTTGGGACTTATGGGG-3'(配列番号6)及びKlgenoseq2.as 5'-CAATCAGCAGCAGCAGCCTC-3'(配列番号7)で尾のDNAに対してPCRを実施し、659bpのPCR産物を生産してそれを配列決定した。

【0045】

2 - 組織学的及び免疫組織化学的分析

凍結筋肉由来の8µm切片をヘマトキシリン及びエオシン(H&E)を使用して染色した。エバンスブルーで注射したマウス由来の切片を、633nmでの蛍光励起によって視覚化した。切片を乾燥してPBSで脱水するか、PBS中の1%トリトンで20分間固定化した細胞を処理し、次いで15%胎児ウシ血清を含むPBS中で室温(RT)で30分間インキュベートした。切片をポリクローナル抗サルコグリカン抗体(α-サルコグリカン：希釈1/1000、ヒトα-サルコグリカンのアミノ酸366-379を標的化する；β-サルコグリカン：希釈1/20、NCL-b-SARC (Novocastra)；γ-サルコグリカン：希釈1/20、NCL-g-SARC (Novocastra)；ジストロフィン：希釈1/20、NCL-DYS2 (Novocastra)；及びカルレチクリン：希釈1/70、ab4109 (Abcam))で室温で1から2時間インキュベートし、次いでPBSで3回洗浄した。室温で1時間のインキュベーションの後、フルオロクロムAlexa488 (A-11032, Molecular Probes)またはAlexa594 (A-11037, Molecular Probes)で接合し、PBSで1:1000に希釈した二次抗体で、一次抗体を視覚化した。次いで切片をPBSで3回洗浄し、フルオロマウント-G (Southern Biot ech 0100-01)で搭載し、次いで共焦点顕微鏡(Leica)で観察した。ヒト生検標本の免疫組

織化学的分析をHackman等（非特許文献9）に記載されたように実施した。

【0046】

3 - プラスミド及びAAVベクターの構築

プラスミドpAAV_C5-12_{-SG}、pcDNA3_{-SG}、pcDNA3_{-SG}、pcDNA3_{-SG}、及びpcDNA3_{-SG}を、TOPO TAクローニングキット(Invitrogen)を使用して骨格筋cDNAとクローンに対するPCRにより生産した。プラスミドpcDNA3_{-SG-R77C}及びpAAV_C5-12_{-SG-R77C}を、Quickchangeサイトディレクトミュータジェネシスキット(Stratagene)と以下のプライマー：5'-GCCCGGTGGCTCTGCTACACCCAGCGC-3'（配列番号8）を使用するサイトディレクトミュータジェネシスにより、pcDNA3_{-SG}またはpAAV_C5-12_{-SG}から得た。この構築物を、酵素的切断とシーケンシングによってチェックした。アデノウイルスフリーのAAV 2/1ウイルス調製物を、トリトランスフェクションプロトコールを使用してAAV1キャプシドに組換えAAV2-ITRゲノムを導入することにより生産した（非特許文献2）。一連の標準的プラスミド希釈物と比較して、ドットプロットによりウイルスゲノムを定量した。

10

【0047】

4 - 細胞培養

グルタミン、ゲンタマイシン、及び10%胎児ウシ血清を補ったダルベッコ修飾イーグル培地で、NIH3T3または911細胞を成育させた。1μgのプラスミド当たり6μlのFugene (ROCHE)を使用して細胞をトランスフェクションした。6穴のディッシュにおいてウェル当たり0.5μgの各プラスミド（_{-SG}または_{-SG-R77C}及び_{-SG}、_{-SG}、_{-SG}）を使用した。インヒビターによる処理のため、トランスフェクションの43時間後に、マンノシダーゼインヒビター（キフネンシン5μM、VWR）またはプロテアソームインヒビター（DM50で希釈したMG132 5μM、Sigma）のいずれかで、細胞を5時間インキュベートした。次いで細胞をPBSですすぎ、室温で15分間PBS中の3.7%ホルムアルデヒドで固定し、PBSで更に3回洗浄し、その後免疫組織化学的ラベリングを実施した。

20

【0048】

5 - in vivo実験

3の連続日数でトレッドミル(Columbusトレッドミル装置Exer 6M)で1日当たり30分間Sgca^{77C/77C}マウスを運動させた。15°の下方の傾斜角を有するトレッドミルにマウスを配置し、速度を分当たり10メートルに設定した。3日目の最後で、エバンスブルー染料(0.5mg/g)でマウスを腹腔内で注射した。注射の後のみにマウスを殺傷し、三角筋、腰筋、臀筋、足の長指伸筋、及び四頭筋を切断し、液体窒素で冷却したイソペンタンで迅速に凍結した。

30

【0049】

rAAV2/1ウイルス調製物を、Sgca^{-/-}マウスの左脛骨前頭筋に注射した(30μlの全体積中に10¹⁰ウイルスゲノム(vg))。注射後の第20、22、25及び27日目で、10μMのキフネンシンまたは20μMのMG132を筋肉内に注射した(即ち、筋肉内での拡散を考慮してin vitroで使用される濃度の2倍または4倍のいずれかで)。殺傷する前日(第27日目)で、マウスにエバンスブルーを腹腔内に注射した。左及び右の脛骨筋の両方を切断し、液体窒素で冷却したイソペンタンで迅速に凍結した。

40

【0050】

II) 結果

1 - ミュータントR77C - サルコグリカンヒトの膜に不存在である

ヒトにおける - サルコグリカンのR77Cミューテーションの存在は、複合体の各種の別個のタンパク質に対する抗体を使用する免疫組織化学的ラベリングによって示されるように、サルコグリカン複合体の脱安定化を導く(図1)。

【0051】

2 - マウスでは、77位でのシステインの存在は - サルコグリカン膜標的化を妨げず、病理的状态を導かない

50

複合体の脱安定化の理由を調査するために、相同的組換えによって、77位でシステインを有する動物モデル (S g c a^{77C} / 77^C) を生産した。正常なマウスはこの位置でヒスチジン残基を有し、アルギニン残基を有さないことに注意すべきである。各種のD G C複合体タンパク質に対する抗体を使用するこれらのマウス由来の筋肉の免疫組織化学的分析により、このミューテーションは、 α -サルコグリカンの膜標的化、またはサルコグリカン複合体のアセンブルを妨げないことが示された (図2)。野生型及び α -サルコグリカン欠損 (S g c a⁻ / -、非特許文献8) 由来の組織切片をコントロールとして使用した。

【0052】

3から6月齢のS g c a^{77C} / 77^Cマウス由来の三角筋、腰筋、腓腹筋、及び四頭筋の組織を、ヘマトキシリン/エオシン染色によって調べ、S g c a⁻ / -マウス組織と比較した。後者は重篤なジストロフィーの兆候を示したが、S g c a^{77C} / 77^C筋肉では異常は検出されなかった (図3)。

10

【0053】

筋肉の異常の不在を機能的分析によって確認した。S g c a^{77C} / 77^Cマウスを常軌を逸した筋肉収縮に供し、次いで壊死細胞を特異的に染色するエバンスブルーで腹膜内で注射した。エバンスブルー染料の浸透は、S g c a^{77C} / 77^Cマウスの筋肉では観察されなかった (図4)。システイン残基が77位で存在する場合のマウスとヒトの間で観察された差異が、ヒトタンパク質の固有の特性に関連するものであるかを調べるために、77位でミューテートされたヒト α -サルコグリカン遺伝子を有するアデノ関連ウイルス (AAV) から由来するウイルスベクターを使用して、 α -サルコグリカン欠損マウスの筋肉に遺伝子導入実験を実施した。これらの注射された筋肉の分析により、ミュータントタンパク質は膜に局在するが、いくつかのタンパク質は小胞体に維持されること、サルコグリカン複合体のアセンブリーと病理的表現型が関連していることが示された (図5及び6)。図5で観察されるように、 α -サルコグリカンはいくつかの細胞の核周辺空間に蓄積していることに注意すべきである。

20

【0054】

3 - ミューテーションは α -サルコグリカンの保持とプロテアソームによる分解を導く
4種の各種のサルコグリカンをコードするクアドリトランスフェクションプラスミドによって、ヒトにおいて観察された現象を再現する細胞モデルを確立した。このモデルでは、正常な α -サルコグリカンを3種の他のサルコグリカンと共に共導入した際に、膜で正確に複合体がアセンブル形成する。しかしながら、R77C α -サルコグリカンを導入すると、正確なアセンブルは膜で観察されない。これは、非透過性細胞に対する α -サルコグリカンの細胞外部分に対する抗体を使用する免疫組織化学的ラベリングによって示された。

30

【0055】

透過性細胞における α -サルコグリカンと小胞体マーカー (カルレチキュラム) の二重ラベリングにより、ミュータントタンパク質は分泌経路に維持されることが示された (図8)。

【0056】

ミュータント α -サルコグリカンは、小胞体のタンパク質の質のコントロールシステムによって異常と認識され、次いでプロテアソームにより分解されると仮定される。これは、膜の標的化を回復するプロテアソームインヒビターMG132の使用によって確認された (図9)。

40

【0057】

4 - 膜標的化はマンノシダーゼインヒビターにより回復される
小胞体のタンパク質の質のコントロールシステムは、不正確にフォールドされたタンパク質の分解を導く。マンノシダーゼI酵素は、サルコグリカンのようなグリコシル化タンパク質のオリゴサッカリド鎖を変性することによってこの工程で重要な役割を演じる。これらの事実と発明者の結果を心に留めて、この酵素のインヒビターの使用は、ミュータン

50

ト - サルコグリカンタンパク質の膜標的化を回復するであろうと仮定した。この仮説を、ミュータント - サルコグリカンでクアッドリトランスフェクトされ、次いでキフネンシンにより処理された細胞における発明者の細胞モデルにおいて実証した(図10)。

【0058】

ヒトとマウスの間で観察された差異は、ヒトにおいて観察された分子現象に対応するin vivoマウスモデルを有さなかったことを意味する。しかしながら、遺伝子導入の後のミュータントタンパク質の部分的保持における減少は、マンノシダーゼI阻害が - サルコグリカン膜標的化に対する有益な効果を有することを示唆するであろう。このインヒビターの使用がin vivoで有効であるかを調べるために、S g c a - / - マウスに最初にA A V - S G C A 7 7 Cベクターの注射を与え、次いで(15日後に)一週間の期間に亘りこのインヒビターの3回の筋肉内注射を与えた。インヒビターを注射された筋肉は、細胞内凝集物のほぼ完全な不在を示し、特に核周辺空間における蓄積の不在を示した。これらの結果は発明者の作業仮説を実証した(図11)。

10

【0059】

同じく証明された結果は、サルコグリカン複合体由来の2種の他のサブユニットに対する2の他のポイントミューテーション: サブユニット に対するE 2 6 2 Kミューテーション(図13A)及びサブユニット に対するQ 1 1 Eミューテーション(図13B)についてキフネンシンで得られた。

【0060】

5 - 1 - デオキシマンノジリマイシン(dMJ)による回復

20

- サルコグリカンのR 7 7 Cミューテーションに対してキフネンシンで実施されたものと同様の実験を、別のクラスIマンノシダーゼインヒビターである1 - デオキシマンノジリマイシン(dMJ)を使用して実施した。その結果が図12Aに示され、ミュータント - サルコグリカン(R 7 7 Cミューテーション)の膜標的化を回復するためのこの物質の効力を示す。

【0061】

更に、同様の実験は、サルコグリカン複合体の他のサブユニットに対する他のミューテーション: サブユニット に対するE 2 6 2 Kミューテーション(図12B)及びサブユニット に対するQ 1 1 Eミューテーションについての発明者の作業仮説を確認した。

【0062】

30

結論として、77位でシステインを有するミュータント - サルコグリカンは、マウス及びヒト細胞において非常に異なった管理を受け、このミュータントタンパク質は、正確に局在した場合に機能的であり、サルコグリカン欠損に関連する病理的状态を治療できることが示された。更に細胞モデルにおいて、マンノシダーゼI阻害はミュータントサルコグリカンの分解を防止し、膜標的化を回復することが示された。in vivoでのこの物質の使用も、同じ結果を生ずるものと考慮される。

【 図 3 】

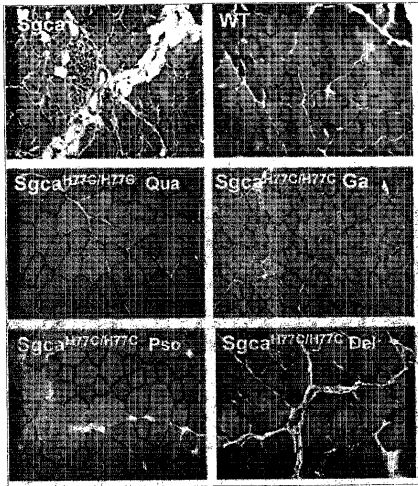


Figure 3

【 図 4 】



Figure 4

【 図 5 】

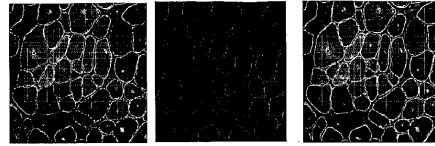


Figure 5

【 図 6 】

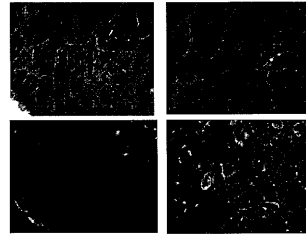


Figure 6

【 図 7 】



Figure 7

【 図 8 】

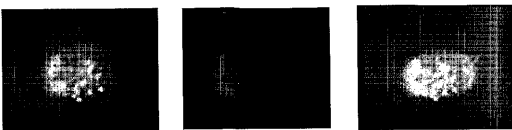


Figure 8

【 図 10 】

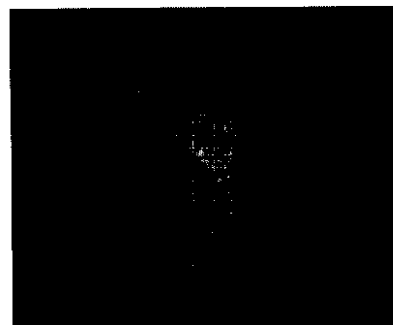


Figure 10

【 図 9 】

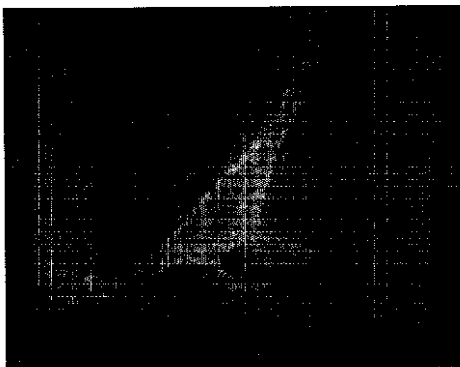


Figure 9

【 図 1 1 】

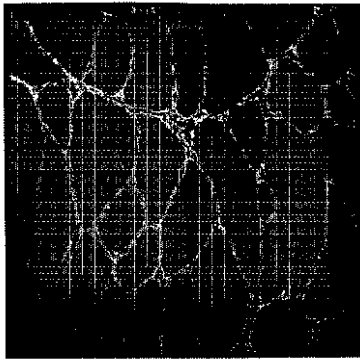
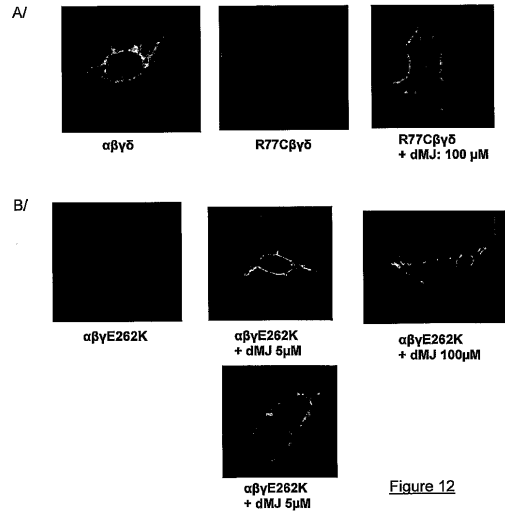
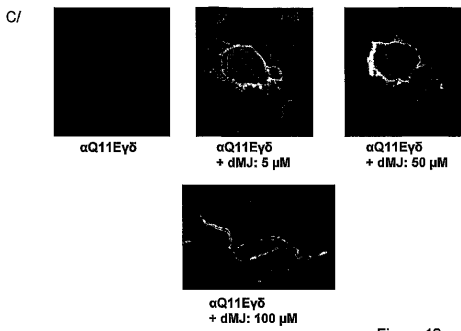


Figure 11

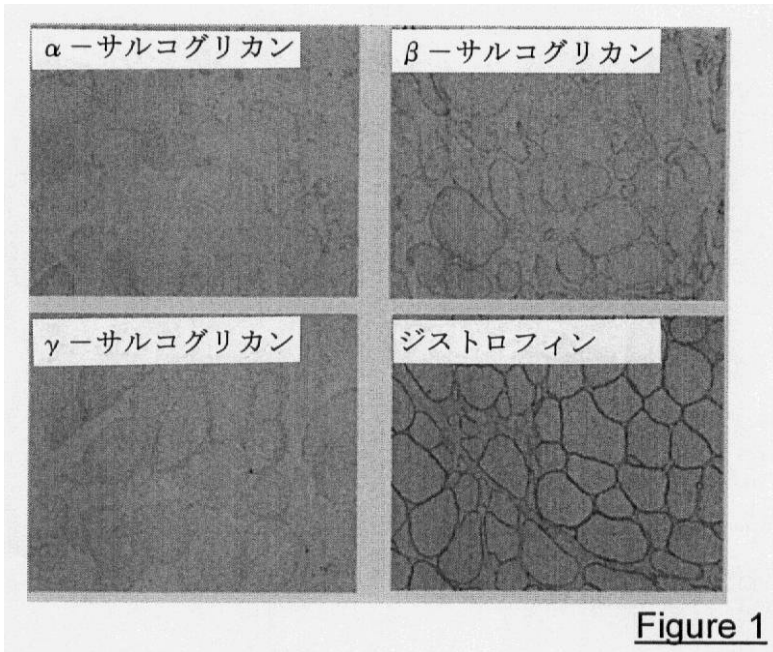
【 図 1 2 - 1 】



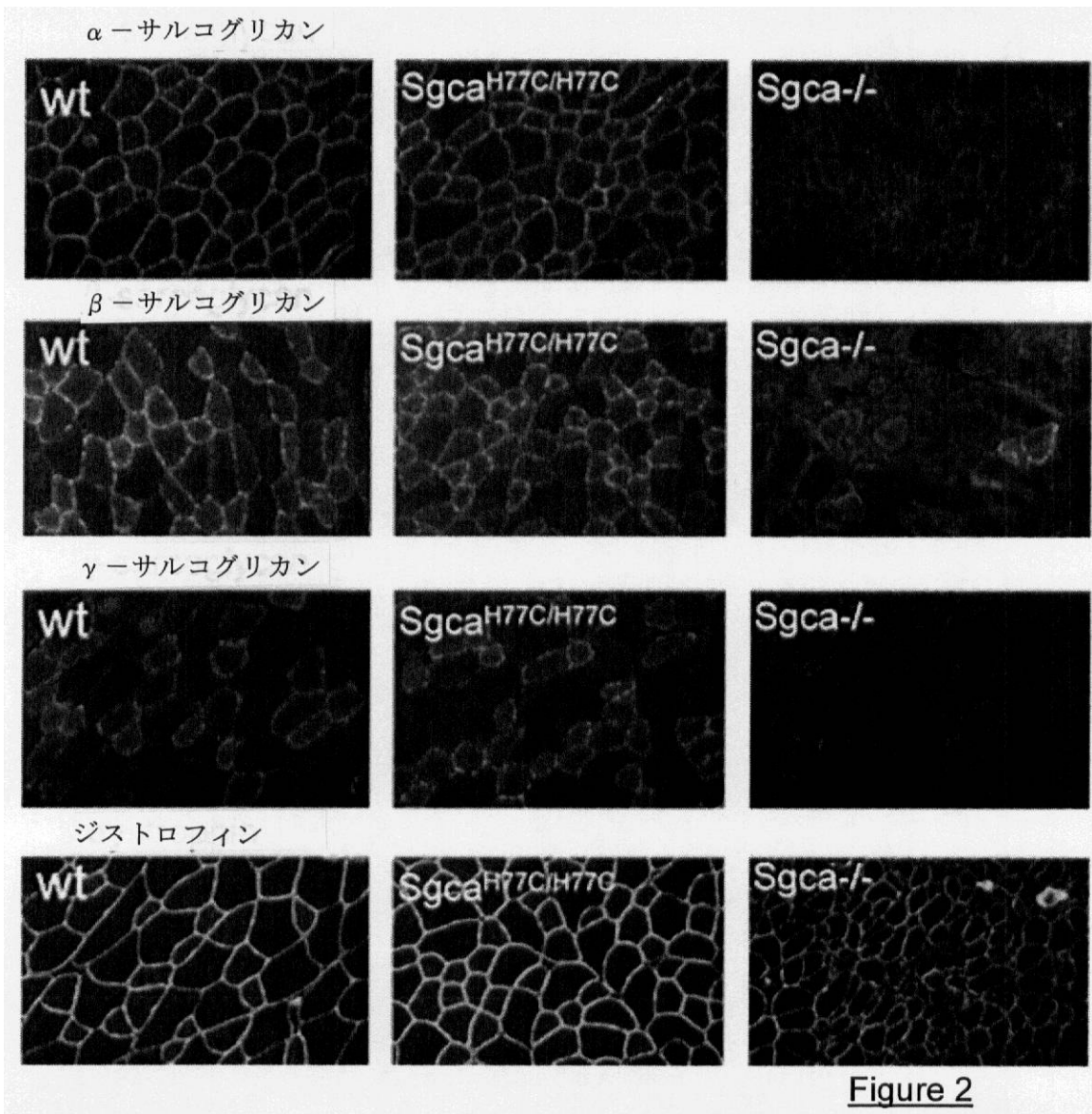
【 図 1 2 - 2 】



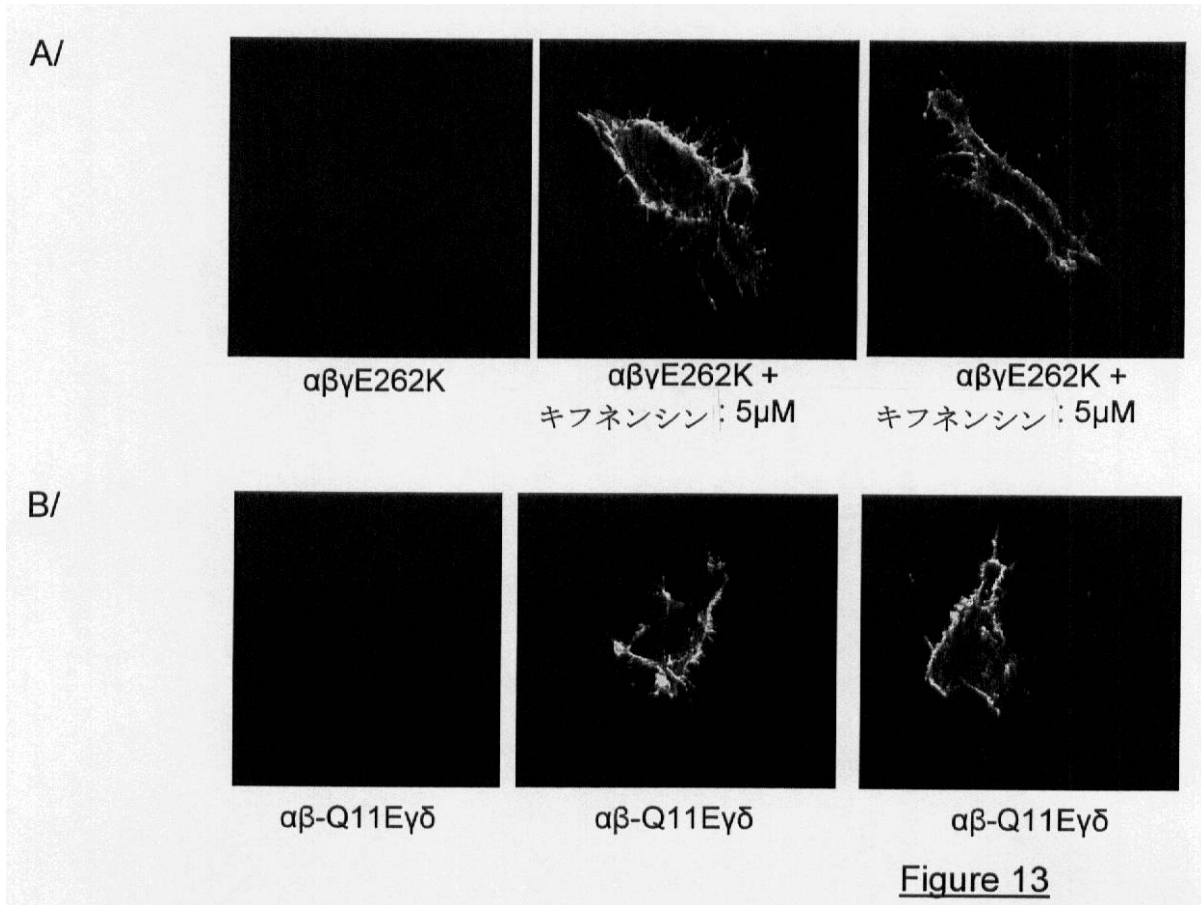
【 図 1 】



【 図 2 】



【図 13】



【配列表】

2009543854000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成20年7月7日(2008.7.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

サルコグリカン異常症を治療することを企図した医薬品の調製のためのクラス I - マンノシダーゼインヒビターの使用。

【請求項2】

前記インヒビターがクラス I - マンノシダーゼ阻害活性を有する分子であることを特徴とする、請求項1に記載のインヒビターの使用。

【請求項3】

前記インヒビターがキフネンシンまたは 1 - デオキシマンノジリマイシン、有利にはキフネンシンであることを特徴とする、請求項2に記載のインヒビターの使用。

【請求項4】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける R77C ミューテーションと関連するサルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載のインヒビターの使用。

【請求項5】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける E262K ミューテーションと関連するサ

ルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のインヒビターの使用。

【請求項 6】

前記疾患がヒト - サルコグリカンにおける Q 1 1 E ミューテーションと関連するサルコグリカン異常症であることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のインヒビターの使用。

【請求項 7】

- そのうちの 1 種がミューテーションを有する 4 種のサルコグリカン遺伝子 (、 、 及び) で細胞をコトランスフェクションする工程 ;
- 請求項 1 から 3 のいずれか一項に規定されたインヒビターの存在下で数時間インキュベーションする工程 ;
- サルコグリカン複合体を局在化させる工程
からなる、サルコグリカン異常症に対するクラス I - マンノシダーゼインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【請求項 8】

4 種の野生型サルコグリカンをコードする遺伝子でコトランスフェクションされた細胞で平行に実施することを特徴とする、請求項 7 に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【請求項 9】

前記インヒビターなしでインキュベートされた細胞で平行に実施することを特徴とする、請求項 7 または 8 に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【請求項 10】

前記複合体の局在化について免疫組織化学的ラベリング方法を使用することを特徴とする、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載のインヒビターの効力を評価するための in vitro アッセイ。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/FR2007/001211
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K31/00 A61K31/445 A61K31/437 G01N33/53 A61P21/00		
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 A61P 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 practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 618 881 A (SANTHERA PHARMACEUTICALS SCHWE [CH]) 25 January 2006 (2006-01-25) abstract page 10, paragraph 31 - paragraph 39; claims	1-5
A	ASSERETO STEFANIA ET AL: "Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY, vol. 290, no. 2, February 2006 (2006-02), pages C577-C582, XP002420099 ISSN: 0363-6143 the whole document	1-5
----- -/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *B* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 mars 2008		Date of mailing of the international search report 09/04/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Hoff, Philippe

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FR2007/001211

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BONUCCELLI GLORIA ET AL: "Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 163, no. 4, October 2003 (2003-10), pages 1663-1675, XP002420100 ISSN: 0002-9440 the whole document	1-5
A	MATHEWS KATHERINE D ET AL: "LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY" CURRENT NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE REPORTS, CURRENT SCIENCE, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 3, no. 1, January 2003 (2003-01), pages 78-85, XP008074976 ISSN: 1534-6293 the whole document	1-9
A	KAR N C ET AL: "GLYCOSIDASES IN NORMAL AND DISEASED HUMAN MUSCLE" CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 45, no. 3, 1973, pages 269-271, XP002474352 ISSN: 0009-8981 the whole document	6-9
A	KAWAI HISAOMI ET AL: "Lysosomal enzyme activities in skeletal muscle of patients with neuromuscular diseases" MUSCLE AND NERVE, vol. 18, no. 9, 1995, pages 1009-1015, XP002474353 ISSN: 0148-639X the whole document	6-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/FR2007/001211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1618881	A	AU 2005263369 A1	26-01-2006
		CA 2574135 A1	26-01-2006
		EP 1776122 A1	25-04-2007
		WO 2006007910 A1	26-01-2006
		US 2007259837 A1	08-11-2007

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001211

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE		
INV. A61K31/00	A61K31/445	A61K31/437 G01N33/53 A61P21/00
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 A61P 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, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie*	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	EP 1 618 881 A (SANTHERA PHARMACEUTICALS SCHWE [CH]) 25 janvier 2006 (2006-01-25) abrégé page 10, alinéa 31 - alinéa 39; revendications	1-5
A	ASSERETO STEFANIA ET AL: "Pharmacological rescue of the dystrophin-glycoprotein complex in Duchenne and Becker skeletal muscle explants by proteasome inhibitor treatment" AMERICAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY - CELL PHYSIOLOGY, vol. 290, no. 2, février 2006 (2006-02), pages C577-C582, XP002420099 ISSN: 0363-6143 le document en entier	1-5
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/>	Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents	
<input checked="" type="checkbox"/>	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	*T
*E	document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date	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
*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)	*X
*O	document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens	document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
*P	document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée	*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
		*Z
		document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale	
31 mars 2008	09/04/2008	
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale	Fonctionnaire autorisé	
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Hoff, Philippe	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001211

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	<p>BONUCELLI GLORIA ET AL: "Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins." AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, vol. 163, no. 4, octobre 2003 (2003-10), pages 1663-1675, XP002420100 ISSN: 0002-9440 le document en entier</p>	1-5
A	<p>MATHEWS KATHERINE D ET AL: "LIMB-GIRDLE MUSCULAR DYSTROPHY" CURRENT NEUROLOGY AND NEUROSCIENCE REPORTS, CURRENT SCIENCE, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 3, no. 1, janvier 2003 (2003-01), pages 78-85, XP008074976 ISSN: 1534-6293 le document en entier</p>	1-9
A	<p>KAR N C ET AL: "GLYCOSIDASES IN NORMAL AND DISEASED HUMAN MUSCLE" CLINICA CHIMICA ACTA, vol. 45, no. 3, 1973, pages 269-271, XP002474352 ISSN: 0009-8981 le document en entier</p>	6-9
A	<p>KAWAI HISAOMI ET AL: "Lysosomal enzyme activities in skeletal muscle of patients with neuromuscular diseases" MUSCLE AND NERVE, vol. 18, no. 9, 1995, pages 1009-1015, XP002474353 ISSN: 0148-639X le document en entier</p>	6-9

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande internationale n°

PCT/FR2007/001211

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
EP 1618881	A	AU 2005263369 A1	26-01-2006
		CA 2574135 A1	26-01-2006
		EP 1776122 A1	25-04-2007
		WO 2006007910 A1	26-01-2006
		US 2007259837 A1	08-11-2007

フロントページの続き

(51) Int. Cl. F I テーマコード (参考)
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 A

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, KM, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100110364

弁理士 実広 信哉

(72) 発明者 イザベル・リシャル

フランス・9 1 1 0 0・コルベユ・エッソヌヌ・シュマン・デュ・セージェーバー・1 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA01 DA02 EA02 GA11 HA08

4B063 QA01 QA05 QQ08 QR77 QR80 QS36 QX01

4C084 AA17 NA14 ZA942 ZC022

专利名称(译)	用于治疗sarcoglycan异常的药物		
公开(公告)号	JP2009543854A	公开(公告)日	2009-12-10
申请号	JP2009520007	申请日	2007-07-16
[标]申请(专利权)人(译)	吉尼松公司 中心国家德拉Reshe鲁沙科学费点击		
申请(专利权)人(译)	Jeneton 中心国家德拉Resherushe科学费点击		
[标]发明人	イザベルリシャル		
发明人	イザベル・リシャル		
IPC分类号	A61K45/00 C12Q1/02 A61P43/00 A61P21/00 G01N33/53 C12N15/09		
CPC分类号	A61K31/00 A61K31/437 A61K31/445 A61P21/00 G01N2500/10		
FI分类号	A61K45/00 C12Q1/02.ZNA A61P43/00.111 A61P21/00 G01N33/53.V C12N15/00.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA80 4B024/CA01 4B024/DA02 4B024/EA02 4B024/GA11 4B024/HA08 4B063/QA01 4B063/QA05 4B063/QQ08 4B063/QR77 4B063/QR80 4B063/QS36 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA942 4C084/ZC022		
代理人(译)	渡边 隆 村山彦		
优先权	2006053020 2006-07-18 FR		
其他公开文献	JP5296678B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

内质网相关降解 (ERAD) 途径的抑制剂，特别是甘露糖苷酶I的抑制剂，用于制备用于治疗sarcoglycanopathies的药物产品。

α-サルコグリカン			β-サルコグリカン		
残基	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換	残基	ヌクレオチド置換	アミノ酸置換
02	c.92T>C	p.Leu31Pro	01	c.31C>G	p.Gln11Glu
02	c.100C>T	p.Arg34Cys	03	c.265G>A	p.Val89Met
02	c.101G>A	p.Arg34His	03	c.271C>T	p.Arg91Cys
03	c.184T>C	p.Tyr62His	03	c.272G>C	p.Arg91Pro
03	c.203G>A	p.Gly68Gln	03	c.275T>C	p.Ile92Tyr
03	c.220C>T	p.Arg74Tyr	03	c.274_275AT>TC	p.Ile92Ser
03	c.229C>T	p.Arg77Cys	03	c.299T>A	p.Met100Lys
03	c.266_267inv	p.Leu89Pro	03	c.323T>G	p.Leu108Arg
03	c.269A>G	p.Tyr90Cys	03	c.341C>T	p.Ser114Phe
03	c.271G>C	p.Gly91Arg	03	c.355A>T	p.Ile119Phe
03	c.278C>T	p.Ala93Val	03	c.416G>A	p.Gly139Asp
03	c.290A>G	p.Asp97Gly	04	c.452C>G	p.Thr151Arg
03	c.292C>T	p.Arg98Cys	04	c.499G>A	p.Gly167Ser
03	c.293G>A	p.Arg98His	04	c.538T>C	p.Phe180Leu
03	c.308T>C	p.Ile103Thr	04	c.544A>G	p.Thr182Ala
04	c.329G>T	p.Arg110Leu	04	c.551A>G	p.Tyr184Cys
04	c.371T>C	p.Ile124Thr	δ-サルコグリカン		
05	c.409G>A	p.Glu137Lys	04	c.212G>C	p.Arg71Thr
05	c.421C>A	p.Arg141Ser	06	c.451T>G	p.Ser151Ala
05	c.472C>T	p.Leu158Phe	08	c.593G>C	p.Arg198Pro
05	c.518T>C	p.Leu173Pro*	08	c.631A>T	p.Asn211Tyr
05	c.524T>C	p.Val175Ala*	09	c.784C>A	p.Glu262Lys
05	c.541C>T	p.Arg181Cys	ε-サルコグリカン		
06	c.586G>A	p.Val196Ile	03	c.205G>C	p.Gly69Arg
06	c.614C>A	p.Pro205His	03	c.206G>C	p.Gly69Asp
06	c.662G>A	p.Arg221His	03	c.269T>C	p.Leu90Ser
06	c.683C>A	p.Pro228Gln	07	c.581T>C	p.Leu194Ser
06	c.724G>T	p.Val242Phe	07	c.629A>G	p.His210Arg
06	c.725T>C	p.Val242Ala	08	c.787G>A	p.Glu263Lys
06	c.739G>A	p.Val247Met*	08	c.848G>A	p.Cys283Tyr
07	c.850C>T	p.Arg284Cys			