

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 841**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/167** (2006.01)

**A61K 31/706** (2006.01)

**G01N 33/50** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.07.2013 PCT/FR2013/051705**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013184**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.07.2013 E 13744754 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.02.2020 EP 2874618**

54 Título: **Uso de compuestos modificadores del epigenoma para el tratamiento de enfermedades genéticas musculares relacionadas con una anomalía de conformación proteica**

30 Prioridad:

**19.07.2012 FR 1257021**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**12.08.2020**

73 Titular/es:

**GENETHON (100.0%)  
1 bis rue de l'Internationale  
91002 Evry, FR**

72 Inventor/es:

**RICHARD, ISABELLE**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 778 841 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

5      Uso de compuestos modificadores del epigenoma para el tratamiento de enfermedades genéticas musculares relacionadas con una anomalía de conformación proteica

5      Campo de la invención

10     La presente solicitud se refiere al tratamiento de enfermedades musculares genéticas causadas por un defecto en la conformación de proteínas y en donde la proteína que exhibe el defecto de conformación experimenta degradación celular. Las enfermedades a las que se refiere especialmente, por ejemplo, sarcoglicanopatías, disferlinopatías, anoctaminopatías (relacionadas con un defecto de la anoctamina 5) y distrofias asociadas con una anomalía de FKRP (para "Proteína relacionada con Fukutina").

15     Más concretamente, describe la identificación y el uso de agentes modificadores del epigenoma como fármacos para el tratamiento de estas enfermedades.

15     Estado de la técnica

20     Las patologías debidas a una anomalía de las fibras musculares se agrupan bajo el término miopatías y se caracterizan por desestabilización y degeneración muscular, conduciendo a menudo a una alteración y pérdida de las funciones locomotoras.

25     Se han identificado más de 80 miopatías raras de origen genético. Pueden tener una transmisión dominante, recesiva o ligada al cromosoma X. La prevalencia de cada una de las formas es baja (de 1/200000 a 1/8500), incluso si la frecuencia acumulada alcanza aproximadamente 1/3000.

30     Entre estas patologías, el grupo más complejo es el de las distrofias musculares progresivas que incluye al menos 25 patologías diferentes que se pueden dividir en distrofias musculares proximales, denominadas distrofias de la cintura y distrofias musculares distales.

30     Las distrofias musculares proximales se caracterizan por una atrofia progresiva y selectiva de ciertos músculos de la cintura escapular y pélvica y distrofias musculares distales por un ataque inicial en los músculos de las manos, pies, antebrazos o piernas.

35     El defecto genético conduce a un proceso cíclico de degeneración/regeneración del tejido muscular conduciendo a una reorganización patológica del mismo. Histológicamente, este proceso se caracteriza por fibras que tienen un núcleo centralizado, mostrando las etapas de necrosis y regeneración, infiltraciones macrofágicas y adiposas y fibrosis secundaria.

40     Los síntomas clínicos pueden ser muy heterogéneos según el tipo de patología, desde fatiga simple hasta pérdida de la marcha, una disminución de la fuerza que generalmente la acompaña con atrofia muscular (Daniele *et al.*, 2007). Por tanto, estas patologías pueden tener un fuerte impacto en la calidad de vida de los pacientes debido a la pérdida muscular pudiendo conducir a la muerte por afectación respiratoria o cardíaca.

45     Más específicamente, las distrofias musculares proximales o distrofias de la cintura ("Limb Girdle Muscular Dystrophy" o LGMD), se clasifican según su modo de transmisión: LGMD1 para formas dominantes y LGMD2 para formas recesivas (Bushby y Beckmann, 1995).

50     Las características comunes de LGMD1 son: aparición de síntomas en adultos jóvenes o adultos, evolución lenta, baja frecuencia de pérdida de marcha y valores de creatina quinasa relativamente normales. Estas formas dominantes son menos frecuentes que las formas recesivas, representa menos del 10 % de todas las LGMD (Nigro, 2003) con solo una o unas pocas familias informadas para cada tipo.

55     A día de hoy, se identificaron dieciséis formas de distrofias de la cintura autosómicas recesivas (LGMD2) y se anotaron por adición de una letra mayúscula (LGMD2A a 2P). Se han identificado todos los genes responsables de estas distrofias. Las proteínas correspondientes tienen varias ubicaciones y roles.

60     De manera incluso más compleja, cabe señalar que las mutaciones en un cierto número de genes implicados en LGMD2 también se asocian con una presentación clínica distal. Como ejemplos, se pueden mencionar:

- disferlina que, mutada, también puede conducir a miopatía de Miyoshi;
- anoctamina 5 que, mutada, también puede conducir a miopatía de tipo Miyoshi similar al tipo 3;
- titina que, mutada, también puede conducir a distrofia muscular tibial (TMD).

65     Entre las LGMD2, las sarcoglicanopatías son enfermedades genéticas causadas por mutaciones en los genes de los sarcoglicanos. Estas proteínas, 4 en número, son parte de un complejo asociado a distrofina presente en la membrana

de la célula muscular y que desempeña un papel esencial en la protección de la fibra muscular durante las contracciones.

De este modo, se han enumerado las siguientes formas de sarcoglicanopatías:

- LGMD2C, causada por una mutación en el gen que codifica  $\gamma$ -sarcoglicano (Ben Othmane *et al.*, 1995);
- LGMD2D, causada por una mutación en el gen que codifica  $\alpha$ -sarcoglicano (Passos-Bueno *et al.*, 1993);
- LGMD2E causada por una mutación en el gen que codifica el  $\beta$ -sarcoglicano (Lim *et al.*, 1995); y
- LGMD2F, causada por una mutación en el gen que codifica  $\delta$ -sarcoglicano (Passos-Bueno *et al.*, 1996).

Se han identificado mutaciones responsables en cada uno de estos genes: De este modo, la mutación más común en LGMD2D es la sustitución de arginina en la posición 77 por una cisteína (R77C). Una mutación específica en el gen que codifica  $\gamma$ -SG, C283Y, en el origen de LGMD2C, se encuentra con frecuencia en la comunidad gitana en Europa (Piccolo *et al.*, 1996; Todorova *et al.*, 1999). Otra mutación en el gen de la  $\gamma$ -SG, del521T, se encuentra casi exclusivamente en familias tunecinas (Kefi, *et al.*, 2003). Pacientes de la comunidad Amish en Estados Unidos, donde LGMD2E es frecuente, portan la mutación T151R (Duclos, *et al.*, 1998; Lim *et al.*, 1995).

En cualquier caso, actualmente no existe tratamiento curativo realmente eficaz para estas enfermedades. Aunque la fisioterapia es un elemento de confort muy apreciado por estos pacientes, su gestión consiste principalmente en diversos medios medicinales y/o técnicos destinados a mejorar la calidad de vida de los pacientes.

Respecto al tratamiento de las sarcoglicanopatías, el documento WO 2008/009802 recomendó el uso de inhibidores de las  $\alpha$ -manosidasas de clase I. En este contexto, se ha demostrado que una serie de mutaciones en los genes sarcoglicanos conducen, no a una pérdida de la función proteica, sino a una descomposición de la proteína formada anómalamente por el sistema de control de calidad de la célula. De este modo, los inhibidores recomendados, dirigidos pues contra este sistema, previenen la degradación de la proteína mutada, que entonces encuentra una localización de membrana funcional.

El documento WO 2004/050076, en lo que respecta al mismo, recomendó la expresión de un gen homólogo silencioso utilizando un inhibidor de histona desacetilasa, para tratar distrofias musculares causadas por una deficiencia genética en adultos.

Sin embargo existe una necesidad evidente de desarrollar nuevos enfoques terapéuticos para controlar las enfermedades musculares genéticas, como las sarcoglicanopatías.

Exposición de la invención

De este modo, es un enfoque terapéutico completamente nuevo que se propone en el contexto de la presente invención. En efecto, el solicitante ha demostrado que es posible restaurar la funcionalidad de una proteína muscular que tiene un defecto de conformación, es decir, un mal plegamiento, usando un compuesto que modifica el epigenoma.

Más precisamente y de acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere por tanto a una composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto elegido entre:

- un inhibidor de la metilación del ADN, ventajosamente un inhibidor de metiltransferasa; o
- un inhibidor de histonas desacetilasas,

para uso en el tratamiento de enfermedades genéticas musculares causadas por una anomalía de al menos una proteína, provocando dicha anomalía la degradación celular de la proteína, siendo la enfermedad muscular genética una distrofia muscular progresiva, siendo la proteína elegida del grupo que consiste en sarcoglicanos, disferlina, anoctamina 5 y la proteína FKRP ("Proteína relacionada con Fukutina").

En otras palabras, se describe el uso de una composición que comprende un compuesto que modifica el epigenoma para preparar un medicamento destinado al tratamiento de enfermedades musculares genéticas causadas por una anomalía en la conformación de al menos una proteína causando su degradación celular. Por tanto, la solicitud describe un método de tratamiento de enfermedades genéticas musculares causadas por una anomalía de conformación de al menos una proteína que causa su degradación celular que comprende la administración, a una dosis eficaz, de una composición que comprende un compuesto que modifica el epigenoma.

Dicha composición también puede contener cualquier compuesto o excipiente aceptable, especialmente farmacéutico. También puede incluir otros principios activos destinados a tratar la misma patología u otra patología. Según un modo de realización particular, los compuestos modificadores del epigenoma son los únicos principios activos en la composición.

También se puede prever combinar, en la misma composición, al menos dos compuestos que modifican el epigenoma de una naturaleza distinta, para administración simultánea o tardía.

La vía de administración también puede ser intramuscular, loco-regional o intravenoso, incluso subcutáneo, intraperitoneal u oral.

5 El modo de administración, la dosis administrada y la frecuencia de administración se determinan caso por caso, según protocolos convencionales conocidos por los expertos en la materia.

10 Por "epigenoma" se entiende el conjunto de señales bioquímicas transmisibles y potencialmente reversibles que están asociadas con los genes para gobernar su expresión y garantizar así la ejecución del programa genético vinculado a la activación e inactivación de estos genes sin modificar la secuencia de ADN de una célula diferenciada dada.

De este modo, la secuencia de ADN que compone los genes es idéntica en todas las células del mismo individuo, pero las proteínas codificadas por estos genes pueden producirse en diferentes momentos o en diferentes lugares dependiendo de las marcas epigenéticas que están presentes en los genes.

15 El soporte bioquímico del epigenoma es múltiple y complejo e implica:

- modificaciones en el ADN;
- cambios en las histonas;
- 20 - participación de ciertas proteínas, como polipeptidos;
- participación de ARN no codificantes, de tamaño pequeño (microARN) y grande (ARN largos no codificantes).

25 En otras palabras, un compuesto modificador de epigenoma descrito en el contexto de la solicitud es un modulador de un efector epigenético, es decir, capaz de modular al menos parcialmente su expresión y/o actividad. Por "modulador" se entiende tanto un activador (o inductor) como un inhibidor (o supresor).

Estos compuestos pueden ser de cualquier tipo, por ejemplo proteínas, péptidos, anticuerpos, moléculas químicas o ácidos nucleicos (oligonucleótidos antisentido, ARNs, ARNs, ribozimas, ...).

30 Según una primera realización, el nivel de expresión y/o producción del efector epigenético es el que se modula (disminuido o aumentado) por el compuesto en cuestión. Esto puede ser probado fácilmente por una persona experta en la materia, en particular gracias a las siguientes técnicas:

- nivel de expresión de la transcripción por transferencia Northern o PCR;
- 35 - nivel de producción de proteínas mediante detección utilizando anticuerpos apropiados (Western blot o ELISA).

40 Según otro modo de realización, se produce el efector epigenético y su actividad es la que se modula (aumentada o disminuida) por el compuesto presente. En este caso, esta actividad se cuantifica usando un ensayo apropiado dependiendo del efector.

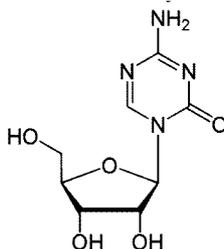
Con respecto a la naturaleza de los compuestos que modifican el epigenoma, se sabe que el primer nivel de control epigenético se refiere a la metilación del ADN que ocurre a nivel de dinucleótidos CpG y tiene lugar muy temprano durante el desarrollo. Resulta en particular de la acción concertada de tres metiltransferasas de ADN (o DNMT).

45 De este modo, según un aspecto particular, el compuesto modificador del epigenoma puede ser un inhibidor de la metilación del ADN, en particular un inhibidor de ADN metiltransferasas. Esta clase de moléculas es particularmente adecuada para aplicaciones *in vitro*.

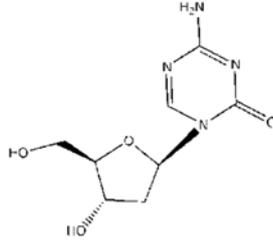
En esta categoría, particularmente se pueden mencionar:

- 50 - análogos de nucleósidos: se incorporan al ADN en replicación. Por tanto inhiben la metilación del ADN y reactivan genes silenciosos. Podrían ser:

55 ◦ 5-azactidina (o 5-aza), de fórmula:



5-aza-2'-desoxctidina o decitabina, de fórmula:



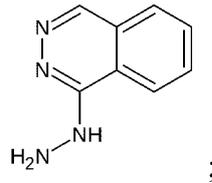
5      ° zebularina;

- análogos no nucleósidos: inhiben los DNMT al bloquear el sitio activo de la enzima o fijándose a las regiones CpG del ADN, evitando así la unión de DNMT al ADN. Podrían ser:

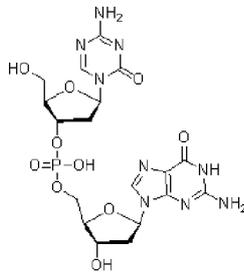
10      ° procainamida;  
 ° procaína;  
 ° galato de epigallocatequina-3 (EGCG);

- oligonucleótidos antisentido:

15      ° DNMT1 ASO;  
 - hidralazina, de fórmula:



20      - SGI110 (S110), de fórmula:



25      Alternativamente y de manera preferente para aplicaciones *in vivo*, el compuesto modificador del epigenoma es un inductor o activador de la desmetilación del ADN.

30      De manera general, la capacidad de un compuesto para modular la metilación del ADN se puede evaluar fácilmente: el perfil de metilación del ADN se puede determinar mediante tratamiento con ADN de bisulfito, que convierte las citosinas no metiladas en uracilo pero no afecta a las metilcitosinas. Para diferenciar alelos se pueden usar diferentes métodos basados en secuenciación directa, pirosecuenciación, PCR o hibridación.

De este modo, gracias a este ensayo sencillo, se pueden identificar fácilmente inhibidores de la metilación del ADN, susceptibles de uso en el contexto de la presente invención.

35      Otro nivel de acción se refiere a modificaciones covalentes de histonas. Preferentemente, estas modificaciones conciernen a: acetilación de restos de lisina, metilación de restos de lisina y arginina, fosforilación de restos de treonina y serina, ubiquitinación y sumoilación de restos de lisina.

40      Sin embargo, estas modificaciones de histonas pueden tener un efecto tanto positivo como negativo en la expresión génica. El compuesto de interés puede ser tanto de tipo activador como inhibidor.

Asimismo, es posible actuar sobre las enzimas que modifican las histonas directamente a nivel de su actividad, genéticamente al nivel de su expresión.

En la práctica, es posible analizar las modificaciones postranscripcionales de las histonas y, por tanto, evaluar el impacto de un compuesto de interés, mediante las técnicas conocidas de Western Blot o ELISA, utilizando una batería de anticuerpos específicos para modificaciones de histonas (Egelhofer *et al.*, 2011).

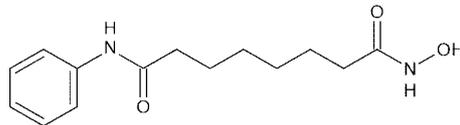
- 5 Como ejemplo y como se mencionó anteriormente, es posible modular el nivel de acetilación de las histonas. Sin embargo, este es el resultado de la actividad de dos enzimas antagonistas: histona desacetilasas (HDAC), conduciendo a supresión de cromatina e histona acetiltransferasas (HAT) que permiten la expresión génica.

10 Así y según otro aspecto de la invención, el compuesto modificador del epigenoma puede ser un inhibidor de histonas desacetilasas (HDAC).

Obsérvese que hay varias clases de inhibidores de HDAC según su modo de inhibición y categoría de HDAC a las que se dirigen. Entre los inhibidores de desacetilación de histonas, se pueden mencionar:

- 15 ◦ ácidos hidroxámicos o sus sales:

- tricostatina A (ASD);
- compuesto afa 8;
- MC1568;
- 20 ▪ Tubucina;
- ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA o vorinostat), de fórmula:



- 25 ◦ tetrapéptidos y depsipéptidos cíclicos:

- trapoxina B;
- apicidina;

- 30 ◦ benzamidas:

- entinostat (MS-275), de fórmula:



- 35
- CI-994;
  - 106
  - Mocetinostat (MGCD0103)

- 40 ◦ Cetonas electrófilas:

- cetonas trifluorometiladas;
- $\alpha$ -cetoamidas;

- 45 ◦ compuestos de ácido alifático:

- fenilbutirato, de fórmula:

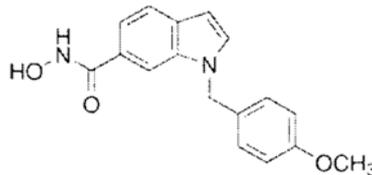


- 50
- ácido valproico;
  - belinostat (PXD101);
  - LAQ 824;

◦ Panobinostat (LBH589);

- otras moléculas:

- 5
- nicotinamida;
  - dihidroumarina;
  - naftopiranona;
  - 2-hidroxinafaldehídos;
  - ácido 10-hidroxi-2-decenoico (10HDA);
  - 10 ◦ Abexinostat (PCI-24781);
  - SB939;
  - Resminostat (4SC-201);
  - Givinostat (ITF2357);
  - CUDC-101;
  - 15 ◦ AR-42;
  - CHR-2845;
  - CHR-3996;
  - 4SC-202;
  - CG200745;
  - 20 ◦ ACY-1215;
  - sulforafano;
  - Kevetrina;
  - apicidina;
  - butirato sódico;
  - 25 ◦ (-) - Depudecina;
  - Sirtinol;
  - *N*-Hidroxi-1,3-dioxo-1*H*-benz[de]isoquinolina-2(3*H*)-hexanamida o Scriptaid;
  - El derivado hidroxamato del ácido butírico;
  - isobutiramida;
  - 30 ◦ CBHA (ácido *m*-carboxicinámico bishidroxiamida);
  - toxina HC;
  - M344 (4-dimetilamino-*N*- (6-hidroxicarbamoil-hexil)-benzamida);
  - Nullscript (4-(1,3-dioxo-1*H*,3*H*-benzo[de]isoquinolin-2-il)-*N*-hidroxibutanamida);
  - PCI-34051, de fórmula:

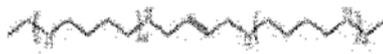


40 Las fórmulas químicas de varios de estos inhibidores se describen en el documento Kazantsev y Thompson (Nature Reviews Drug Discovery, vol. 7, n.º 10, 2008, 854-866). Por otro lado, un método para detectar inhibidores de HDAC se describe, por ejemplo, en el documento WO 03/066885.

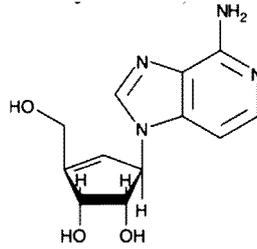
Ventajosamente y para esta clase de compuestos, el inhibidor utilizado es SAHA.

45 Asimismo, los inhibidores de la metilación de histonas pueden ser:

- SL11144, de fórmula:



50 - DZNep (3-desazaneplanocina: inhibidor de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa), de fórmula:



5 Se puede ejercer un tercer nivel de control a nivel del complejo PRC. En efecto, las proteínas del grupo polipeine (PcG) son factores de cromatina conocidos por mantener el estado transcripcional reprimido de sus genes diana durante el desarrollo. Estos factores actúan en forma de grandes complejos multiméricos llamados *Complejo Represivo Polipeine* (PRC) que se unen al ADN, a nivel de secuencias reguladoras llamadas *Elementos de respuesta de PcG* (PRE) para suprimir genes por metilación. En efecto, los complejos de PRC también contienen actividad intrínseca de histona metiltransferasa (HMTasa) y reprimen la expresión por metilación de histona.

10 Las proteínas Polipeine pueden ser dirigidas, por ejemplo, en particular inhibidas o inactivadas a nivel de su expresión usando antisentido o realizando salto de exones. La expresión o actividad de las proteínas polipeine puede ser seguida por las siguientes técnicas convencionales: nivel de expresión de Westen Blot; unión de ADN por retrasos de gel ("cambio de movilidad en gel") o precipitación de cromatina.

15 Finalmente, la participación en el control de la expresión de genes de ARN no codificantes, microARN y ARN largos no codificantes, se ha destacado.

20 Los microARN (ARNmi) son una clase de ARN no codificantes de aproximadamente 22 nucleótidos que modulan negativamente la expresión génica después de la transcripción. Al unirse al ARN diana por complementariedad, conducirán a la degradación de este ARN o inhibirán su traducción. Los ARNmi pueden, además, influir en los mecanismos epigenéticos controlando la metilación del ADN y las modificaciones de histonas mediante el reclutamiento de complejos en la correspondiente transcripción naciente.

25 Otro tipo de actor en epigenética son los ARN largos no codificantes (RNAInc). Se transcriben a nivel de secuencias génicas o intergénicas y tienen pocos o ningún marco de lectura abierto. Estos ARN pueden dirigirse a la cromatina o diferentes aspectos de la transcripción al asociarse con diferentes factores (activadores de la transcripción o represores), así como desestabilizar o, por el contrario, estabilizar un ARN que codifica en el citoplasma.

30 Tenga en cuenta que de manera conocida, el efecto de un compuesto en la expresión de un ARN no codificante puede analizarse fácilmente, por ejemplo, por Northern Blot o por RT-PCR cuantitativa.

De este modo, el compuesto que modifica el epigenoma utilizado en el contexto de la invención es un inhibidor:

- 35 - metilación del ADN; o
- histona desacetilasas;

40 Un cierto número de compuestos disponibles actualmente se enumeraron anteriormente, en particular SAHA. No obstante, no se pretende que este listado sea exhaustivo. De este modo, cualquier compuesto capaz de modular el epigenoma, mediante los mecanismos mencionados anteriormente, puede usarse en el contexto de la invención. Ventajosamente, se trata del fenilbutirato, SAHA o 5-azacitidina.

Como se mencionó, la presente invención es parte del tratamiento de enfermedades genéticas musculares causadas por una anomalía de conformación de al menos una proteína que causa su degradación celular.

45 Las enfermedades genéticas son, por definición, enfermedades resultantes de una o más mutaciones en uno o más genes.

Ventajosamente, en la presente solicitud se mencionan enfermedades monogénicas, es decir, relacionadas con un solo gen, en este caso codificando la proteína que tiene una anomalía de conformación.

50 Las mutaciones responsables de la conformación de la proteína resultante pueden ser mutaciones puntuales. No obstante, el defecto de conformación puede estar relacionado con mutaciones no estrictamente puntuales, por ejemplo, la eliminación de un codón en el gen que codifica una proteína que siempre está activa si no se degrada.

55 Más concretamente, la presente solicitud se refiere a patologías musculares recesivas.

Como se mencionó, la presente solicitud se refiere a patologías musculares, ventajosamente aquellas que afectan a los músculos esqueléticos y también al músculo cardíaco, ventajosamente los músculos esqueléticos.

En el marco de la invención, "anomalía de conformación de al menos una proteína" o "anomalía de conformación proteica" significa el hecho de que la proteína que causa la enfermedad tiene un defecto de plegamiento, relacionado con la presencia de al menos una mutación en el gen que lo codifica, resultando dicha anomalía en la degradación de dicha proteína por la célula. Por tanto, las patologías específicas se identifican fácilmente, por ejemplo mediante anticuerpos dirigidos contra la proteína mutada. En efecto, incluso si se expresa correctamente (que puede verificarse a nivel de las transcripciones), no se detecta usando tal anticuerpo, porque se degrada.

En el marco de la invención, se ha demostrado que la descomposición por las células musculares de proteínas mal formadas está controlada por mecanismos epigenéticos. De este modo, la solución propuesta se basa en el uso de compuestos que modifican el epigenoma para evitar la degradación de las proteínas mutadas, para asegurar su direccionamiento en su compartimento celular final y así restaurar un fenotipo normal.

Según un aspecto particular, la proteína que presenta la anomalía de conformación y que sufre degradación celular es una proteína de membrana o está asociada con la membrana, posiblemente integrada en un complejo proteico.

Según la invención, la enfermedad muscular genética relacionada con una anomalía de conformación proteica es la distrofia muscular progresiva, tanto proximal como distal.

Entre las distrofias musculares progresivas, las enfermedades preferentes son:

- sarcoglicanopatías, en particular,  $\alpha$ -sarcoglicanopatía o LGMD2D relacionada con un defecto del  $\alpha$ -sarcoglicano,  $\beta$ -sarcoglicanopatía o LGMD2E relacionada con un defecto de  $\beta$ -sarcoglicano,  $\gamma$ -sarcoglicanopatía o LGMD2C relacionada con un defecto en  $\gamma$ -sarcoglicano, o  $\delta$ -sarcoglicanopatía o LGMD2F relacionada con un defecto en  $\delta$ -sarcoglicano;
- disferlinopatías (LGMD2B o miopatía de Miyoshi) relacionadas con un defecto de disferlina;
- anoctaminopatías (miopatía LGMD2L o Miyoshi tipo 3) relacionadas con un defecto de anoctamina 5;
- miopatía de cinturas con deficiencia de FKRP o LGMD2I, relacionada con un defecto de la proteína FKRP (para "proteína relacionada con fukutina").

De manera más general, las enfermedades descritas se eligen del siguiente grupo:

- distrofias musculares progresivas:
  - implicando disferlina (DYSF)
  - implicando  $\gamma$ -sarcoglicano
  - implicando  $\alpha$ -sarcoglicano
  - implicando  $\beta$ -sarcoglicano
  - implicando  $\delta$ -sarcoglicano
  - implicando anoctamina 5 (Ano5)
  - implicando proteínas relacionadas con fukutina (FKRP)
  - implicando fukutina (FKTN)
  - implicando proteína-O-manosiltransferasa 1 (POMT1)
  - implicando proteína-O-manosiltransferasa 2 (POMT2)
  - implicando proteína manosa  $\beta$  1,2-acetilglucosaminil-transferasa relacionada con O (POMGT1)
  - implicando caveolina 3 (Cav3)
  - implicando UDP-N-acetil glucosamina 2-epimerasa (GNE)
- distrofias musculares congénitas (MDC):
  - implicando  $\alpha$ -dístroglicano (DAG1)
  - implicando laminina alfa2 (LAMA2)
  - implicando glicosiltransferasa similar (LARGE)
  - implicando colágeno 6A1, 6A2 o 6A3 + implicando selenoproteína 1 (SEPN1)
  - implicando integrina alfa7 (ITGA7)
  - receptor de rianodina (RYR)
- otras enfermedades que afectan al músculo esquelético o cardíaco, asociado opcionalmente con daño a otros órganos:
  - cardiomiopatía ventricular derecha arritmogénica implicando proteína transmembrana 43 (TMEM43)
  - liposdistrofia congénita tipo 4 con distrofia muscular implicando polimerasa I y factor de liberación de transcripción (PTRF)
  - miotonía condrodistrófica o síndrome de Schwartz Jampel implicando sulfato de heparán (HSPG2)

- enfermedad de Danon implicando proteína de membrana 2 asociada a lisosomas (LAMP2)
- fibrodisplasia osificante progresiva implicando receptor de activina A tipo I (ACVR1).

5 Para una misma enfermedad, diferentes mutaciones pueden afectar al mismo gen y ser responsables de la configuración incorrecta de la proteína codificada. Entonces, y como ejemplos de sarcoglicanopatías, las principales mutaciones puntuales enumeradas hasta la fecha se enumeran en el documento WO 2008/009802.

10 Como parte de la presente solicitud, la viabilidad de la invención se ha demostrado, por ejemplo, en relación con la mutación R77C de  $\alpha$ -sarcoglicano. Las proteínas que portan una mutación E262K en la subunidad  $\delta$  o una mutación Q11E en la subunidad  $\beta$  también pueden responder favorablemente al tratamiento recomendado.

15 Adecuadamente, la proteína mutada que causa la enfermedad no es distrofina y la patología a tratar no es miopatía de Duchenne (DMD) o de Becker (BMD), en donde la distrofina se trunca y no se degrada porque se pliega incorrectamente como en la invención.

De la presente solicitud pueden resultar otros procesos o usos:

Según otro aspecto, la solicitud describe un método para identificar o evaluar la eficacia de un compuesto que modifica el epigenoma que comprende las siguientes etapas:

- 20
- poner en contacto una célula que produce una proteína mal plegada causando una enfermedad muscular genética, con dicho compuesto;
  - determinar el nivel de proteína plegada correctamente, ventajosamente por localización de la proteína en la célula.

25 De manera ventajosa, el plegamiento inadecuado de la proteína conduce a su degradación por la célula.

La producción por la célula de la proteína mal plegada causando una enfermedad muscular genética se puede obtener por transfección de la célula usando el gen mutado que codifica dicha proteína.

30 La proteína mal plegada que causa enfermedad muscular genética puede ser un sarcoglicano causando sarcoglicanopatía. Aún más ventajosamente, es un  $\alpha$ -sarcoglicano, por ejemplo un  $\alpha$ -sarcoglicano que porta una mutación R77C. En cualquier caso, en el método descrito anteriormente esta proteína se puede usar como control positivo, en la medida en que se ha demostrado, en esta solicitud, que esta proteína mutada respondió favorablemente a un compuesto modificador de epigenoma.

35 Ventajosamente, el contacto entre la célula y el compuesto tiene lugar durante varios minutos, incluso varias horas.

40 El nivel de proteína plegada correctamente se correlaciona con la eficacia del compuesto de ensayo como compuesto modificador del epigenoma. Esta tasa se determina ventajosamente por detección, incluso localización, de la proteína o complejo proteico al que pertenece. Preferentemente, la proteína o complejo proteico se detecta por inmunohistoquímica, mediante anticuerpos dirigidos contra la proteína en cuestión o contra una de las proteínas del complejo proteico al que pertenece.

45 De forma alternativa, la proteína de interés o una de las proteínas del complejo de interés puede marcarse, en particular por fluorescencia, luego detectarse por microscopía o por clasificación. Esta solución es ventajosa en la medida en que la etapa de detección es más ligera que la detección inmunológica. No obstante, es importante verificar que la proteína de fusión (proteína de interés + marcado) no altera la formación del complejo proteico.

50 En caso de detectar la proteína o el complejo proteico, o incluso localizarlo en su compartimento celular final, se concluye que el compuesto probado es un compuesto eficaz para modificar el epigenoma.

De manera ventajosa, el proceso se realiza en paralelo:

- 55
- en células que expresan la proteína no mutada como control positivo para la localización de la proteína;
  - realizando una incubación en ausencia del compuesto de ensayo, permitiendo este control concluir sobre el posible efecto del compuesto probado.

60 Según otro aspecto, la presente solicitud describe un método para identificar un compuesto para tratamiento de enfermedades genéticas musculares relacionadas con una anomalía de conformación de al menos una proteína que causa su degradación celular, que consiste en evaluar el potencial del compuesto para modificar el epigenoma.

De este modo, la solicitud también describe un método para identificar un compuesto para tratamiento de enfermedades musculares genéticas relacionadas con una anomalía de conformación de al menos una proteína que causa su degradación celular, que comprende las siguientes etapas:

- 65
- poner en contacto una célula que produce una proteína mal plegada causando una enfermedad muscular genética, con dicho compuesto;

- determinación del nivel de proteína plegada correctamente.

Según otro aspecto, la solicitud describe un método para identificar enfermedades musculares genéticas relacionadas con una anomalía de conformación de al menos una proteína que causa su degradación celular, que comprende las siguientes etapas:

- poner en contacto una célula capaz de producir una proteína mal plegada causando una enfermedad muscular genética, con un compuesto modificador de epigenoma;
- determinación del nivel de proteína plegada correctamente.

En esta realización, se trata de probar células, ventajosamente musculares, de un paciente que probablemente tenga una enfermedad muscular genética relacionada con una anomalía de conformación de al menos una proteína que conduce a su degradación celular. De forma alternativa, el gen del paciente, sospechoso de portar la o las mutaciones, se transfecta en una célula para realizar el ensayo *in vitro*.

Si el paciente está realmente afectado, se espera que la proteína con una anomalía de conformación no sea detectable porque se degrada. Esto se puede probar fácilmente como se describió anteriormente, en particular usando anticuerpos dirigidos contra dicha proteína.

En presencia del compuesto modificador del epigenoma, se espera que aumente el nivel de proteína plegada correctamente y que la proteína sea detectable, especialmente en el ensayo de detección realizado en la etapa anterior.

Si, de hecho, el nivel de proteína plegada correctamente aumenta con la adición del compuesto modificador del epigenoma, se puede concluir que, de hecho, es una enfermedad muscular genética relacionada con una anomalía de conformación de la proteína analizada, causando su degradación celular.

Más generalmente y en otro aspecto, la solicitud describe un método de producción por una célula de una proteína, posiblemente recombinante, en una configuración activa que consiste en poner la célula en contacto con un compuesto modificador de epigenoma.

#### Ejemplos de realización

La invención y las ventajas que resultan de ella surgirán más claramente a partir de las siguientes realizaciones ejemplares, con el apoyo de las figuras adjuntas. Estas, sin embargo, no tienen alcance limitante.

La invención se ilustra adicionalmente respecto a la  $\alpha$ -sarcoglicanopatía relacionada con la mutación R77C en  $\alpha$ -sarcoglicano y en presencia de inhibidores de 5-azacitidina (o 5-aza), un inhibidor de la metilación del ADN) y Saha (para "SuberoylAnilide Hydroxamic Acid", inhibidor de histona desacetilasa).

Figura 1: Marcado inmunohistoquímico de la proteína  $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG) en células humanas HER 911 cuatri-transfectadas:

- A/ utilizando  $\alpha$ -SG no mutado
- B/ usando  $\alpha$ -SG portador de la mutación R77C
- C/ utilizando  $\alpha$ -SG portador de la mutación R77C y en presencia de 5-aza 5  $\mu$ M.

Figura 2: Marcado inmunohistoquímico de la proteína  $\alpha$ -sarcoglicano ( $\alpha$ -SG) en células humanas HER 911 cuatri-transfectadas:

- A/ utilizando  $\alpha$ -SG no mutado
- B/ usando  $\alpha$ -SG portador de la mutación R77C
- C/ utilizando  $\alpha$ -SG portador de la mutación R77C y en presencia de SAHA 1  $\mu$ M.

## 1/MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.1 Cultivos celulares, transfecciones y tratamientos

Las células HER-911 ("Retinoblast embrionario humano") se sembraron en matraces y se cultivaron hasta aproximadamente el 80 % de confluencia en medio Eagle modificado por Dulbecco + GlutaMAX (Gibco, Invitrogen) que contiene 10 % de suero de ternera fetal, 0,01 m/ml de gentamicina y 1 % de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, Invitrogen). Las células se mantuvieron en una atmósfera humidificada con 5 % de CO<sub>2</sub> y a 37 °C.

Las células HER-91 se transfectaron usando 12  $\mu$ l de Reactivo de transfección Fugene.6 (Roche) para 2  $\mu$ g de plásmido (0,5  $\mu$ g de cada una de las 4 construcciones de sarcoglicano (SG) para células HER-911). Los plásmidos que expresan SG, pcDNA3.V5-his<sub>6</sub>- $\alpha$ -SG, pcDNA3.V5-his<sub>6</sub>- $\beta$ -SG, pcDNA3.V5-his<sub>6</sub>- $\gamma$ -SG et pcDNA3.V5-his<sub>6</sub>- $\delta$ 1-

SG (variante transcripcional de tipo 1), son plásmidos donde la expresión de la secuencia codificante de los sarcoglicanos respectivos está bajo el control del promotor CMV.

5 Después de 48 h, las células se trataron durante 24 h con 5  $\mu$ M de 5-aza-2'-desoxicitidina o 1  $\mu$ M de SAHA (ácido suberoilánilida hidroxámico).

### 1.2 Inmunofluorescencia

10 Las células HER-911 se fijaron por incubación con 3,7 % de formaldehído durante 15 minutos a temperatura ambiente. Si fuera necesario, la permeabilización se realizó utilizando Triton X-100 al 0,2 % durante 20 min. Después de saturación con 20 % de suero de ternera fetal durante 30 minutos, las células se incubaron con anticuerpos primarios a diluciones adecuadas (en PBS) durante 1 hora a temperatura ambiente. Un anticuerpo murino monoclonal específico para  $\alpha$ -SG (NCL-A-SARC) está disponible en Novocastra. Las células se lavaron 3 veces con PBS y luego se incubaron durante 1 h con anticuerpos secundarios diluidos 1/1000 en PBS. Finalmente, las células se lavaron en PBS, se montaron usando medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector, H-1200), luego se examinaron con un microscopio de inmunofluorescencia confocal (Leica).

### 2/ RESULTADOS

20 Las células HER 911 humanas se cuadransfectaron con los plásmidos que codifican los sarcoglicanos  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  y un plásmido que codifica el  $\alpha$ -sarcoglicano no mutado (Fig. 1A y Fig. 2A), o el  $\alpha$ -sarcoglicano mutado R77C (Fig. 1B y 1C; Fig. 2B y 2C).

25 El inmunomarcado se realizó luego en células no permeabilizadas usando un anticuerpo dirigido contra la parte extracelular del  $\alpha$ -sarcoglicano, haciendo posible visualizar la proteína solo a nivel de la membrana celular y, por tanto, comparar el direccionamiento de la proteína mutada con el de la proteína normal.

30 A diferencia de la forma no mutada de la proteína  $\alpha$ -sarcoglicano (Fig. 1A y 2A), la forma mutada R77C de esta proteína no se dirige a la membrana de las células HER 911 (Fig. 1B y 2B). El tratamiento de células con 5-azacitidina (Fig. 1C) o con SAHA (Fig. 2C), restaura la localización de la membrana de la proteína mutada R77C.

35 El principio subyacente de la presente invención se confirmó por tanto *in vitro* en un modelo de células cuadransfectadas permitiendo reconstituir el complejo de los sarcoglicanos, analizando el direccionamiento membranario del complejo. El uso de fármacos modificadores del epigenoma, en particular, 5-azacitidina, un inhibidor de la metilación del ADN o Saha, un inhibidor de histona desacetilasa, permitió la reconstitución del complejo en la membrana.

### BIBLIOGRAFIA

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

45 Bushby, K.M., y J.S. Beckmann, 1995, "The limb-girdle muscular dystrophies-proposal for a new nomenclature". Neuromuscul Disord. 5:337-43.

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

50 Duclos, F., V. Straub, S.A. Moore, D.P. Venzke, R.F. Hrstka, R.H. Crosbie, M. Durbeek, 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, y K.P. Campbell, 1998, "Progressive muscular dystrophy in alpha-sarcoglycan-deficient mice". J Cell Biol. 142:1461-71.

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

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

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

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

Passos-Bueno MR, Richard I, Vainzof M, Fougerousse F, Weissenbach J, Broux O, Cohen D, Akiyama J, Marie

- SK, Carvalho AA, 1993, "Evidence of genetic heterogeneity in the autosomal recessive adult forms of limb-girdle muscular dystrophy following linkage analysis with 15q probes in Brazilian families. » J Med Genet. Mayo; 30(5):385-7.
- 5 Passos-Bueno MR, Moreira ES, Vainzof M, Marie SK, Zatz M., 1996, "Linkage analysis in autosomal recessive limb-girdle muscular dystrophy (AR LG-MD) maps a sixth form to 5q33-34 (LGMD2F) and indicates that there is at least one more subtype of AR LGMD". Hum Mol Genet. Jun; 5(6):815-20.
- 10 Piccolo, F., M. Jeanpierre, F. Leturcq, C. Dode, K. Azibi, A. Toutain, L. Merlini, L. Jarre, C. Navarro, R. Krishnamoorthy, F.M. Tome, J.A. Urtizberea, J.S. Beckmann, K.P. Campbell, y 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.
- 15 Todorova A, Ashikov A, Beltcheva O, Tournev I, Kremensky I. "C283Y mutation and other C-terminal nucleotide changes in the gamma-sarcoglycan gene in the Bulgarian Gypsy population". Hum Mutat. 1999; 14(1):40-4. Errata en: Hum Mutat 2000; 15(5):479.

**REIVINDICACIONES**

1. Composición farmacéutica que comprende al menos un compuesto elegido entre:

- 5           - un inhibidor de la metilación del ADN, ventajosamente un inhibidor de metiltransferasa; o  
          - un inhibidor de histonas desacetilasas,

10           para uso en el tratamiento de enfermedades genéticas musculares causadas por una anomalía de al menos una proteína, provocando dicha anomalía la degradación celular de la proteína, siendo la enfermedad muscular genética una distrofia muscular progresiva, siendo la proteína elegida del grupo que consiste en sarcoglicanos, disferlina, anoctamina 5 y la proteína FKRP ("Proteína relacionada con Fukutina").

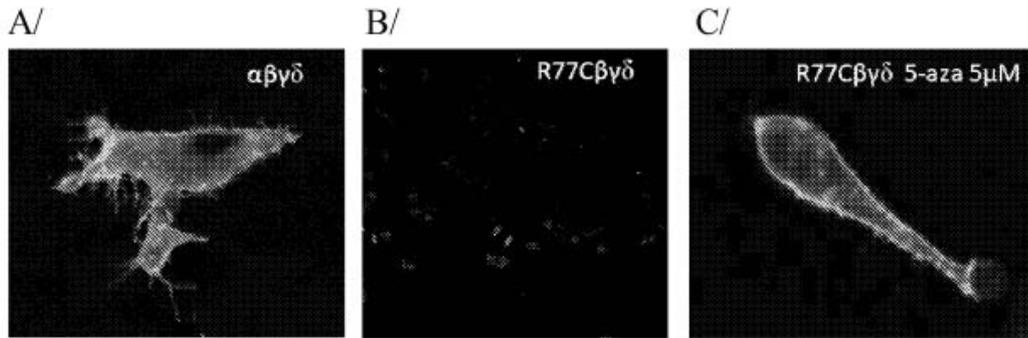
15           2. Composición para su uso según la reivindicación 1, *caracterizada* por que el compuesto es fenilbutirato, SAHA o 5-azacitidina.

          3. Composición para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, *caracterizada* por que la distrofia muscular progresiva se elige del siguiente grupo: sarcoglicanopatías, disferlinopatías, anoctaminopatías y distrofias asociadas con una anomalía de FKRP ("proteína relacionada con Fukutina").

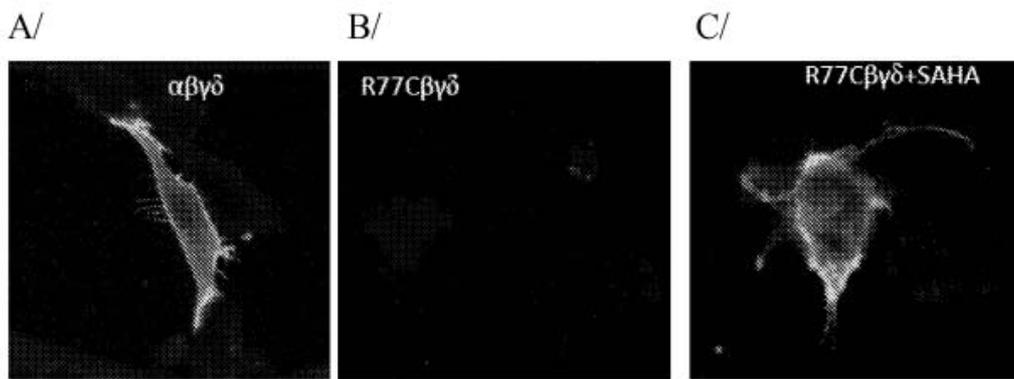
20           4. Composición para su uso según la reivindicación 3, *caracterizada* por que la distrofia muscular progresiva es una sarcoglicanopatía.

          5. Composición para su uso según la reivindicación 4, *caracterizada* por que la sarcoglicanopatías es a-sarcoglicanopatía (LGMD2D).

25           6. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, *caracterizada* por que la composición se administra por vía intramuscular, intraperitoneal, subcutánea, oral o intravenosa.



**Figura 1**



**Figura 2**