

(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2005-520557

(P2005-520557A)

(43) 公表日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68 A	2 G O 4 5
C 1 2 N 15/09	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/34	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/34	G O 1 N 33/15 Z	
G O 1 N 33/15	G O 1 N 33/50 Z	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 20 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-578588 (P2003-578588)	(71) 出願人	599022270 エグゾニ・テラピューティック・ソシエテ ・アノニム EXONHIT THERAPEUTIC S SA フランス国、エフー75017 パリ、リ ュ・ブリユネル 26
(86) (22) 出願日	平成15年3月25日 (2003. 3. 25)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(85) 翻訳文提出日	平成16年11月12日 (2004. 11. 12)	(74) 代理人	100075225 弁理士 篠田 文雄
(86) 国際出願番号	PCT/FR2003/000940	(72) 発明者	シュバイヒホッフアー, ファビアン フランス国、エフー94300 ヴァンサ ヌ、アブニュ・ポール・デルレドゥ 38
(87) 国際公開番号	W02003/080864		
(87) 国際公開日	平成15年10月2日 (2003. 10. 2)		
(31) 優先権主張番号	02/03792		
(32) 優先日	平成14年3月26日 (2002. 3. 26)		
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		
(31) 優先権主張番号	60/372, 116		
(32) 優先日	平成14年4月15日 (2002. 4. 15)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒストンデアセチラーゼ：神経毒性の新規な分子標的

(57) 【要約】

本発明は、生物学、遺伝学及び医学の分野に関連する。詳細には、本発明は、神経変性疾患、特に筋萎縮性側索硬化症の検出、性状解析及び/又は処置のための新規な方法に関する。本発明はまた、該病気において活性化化合物の同定又はスクリーニングのための方法に関する。本発明は更に、該方法を実施するために有用な、化合物、遺伝子、細胞、プラスミド又は組成物に関する。詳細には、本発明は、該病気における、ヒストンデアセチラーゼ類、そして特にヒストンデアセチラーゼ2の役割、及び処置的、診断的又は実験的な標的としてのその使用に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

対象における興奮毒性又はニューロンのストレスの状態を検出するための方法であって、対象からの試料中のヒストンデアセチラーゼ（特にヒストンデアセチラーゼ 2）の発現をインビトロで測定すること、あるいは対象からの試料中のヒストンデアセチラーゼ（特にヒストンデアセチラーゼ 2）の突然変異型、又はその対応する RNA の存在を検出することを特徴とする方法。

【請求項 2】

発現の測定が、試料と、該ヒストンデアセチラーゼ RNA に特異的な核酸プローブとのハイブリダイゼーションにより実行される、請求項 1 記載の方法。

10

【請求項 3】

核酸プローブが、ヒストンデアセチラーゼメッセンジャー RNA の配列、又はこの配列に相補的であるか若しくはここから誘導される配列の、全部又は一部を含む、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

発現の測定が、該 RNA に特異的な核酸プライマー（又はプライマー対）を用いた、試料中の核酸の選択的増幅により実行される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

試料が、神経又は筋肉細胞を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項記載の方法。

【請求項 6】

アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS 又は脳虚血の診断又は検出のための、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法。

20

【請求項 7】

多発性硬化症のその初期段階での検出のための、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

ニューロンのストレスの状態、更に具体的には興奮毒性状態の診断又は検出方法を実施するための、ヒストンデアセチラーゼ 2 遺伝子又はメッセンジャー RNA から誘導される配列の全部又は一部を含む核酸の使用。

【請求項 9】

核酸が、ヒストンデアセチラーゼ 2、又は非欠失領域の間の結合部から生じる配列、又はこれに相補的な配列の、全部又は一部を含む、請求項 8 記載の使用。

30

【請求項 10】

興奮毒性に関連する神経変性疾患の処置に使用するための組成物を調製するための、ヒストンデアセチラーゼインヒビター化合物の使用。

【請求項 11】

化合物が、ヒストンデアセチラーゼ遺伝子の転写又は対応するメッセンジャーの翻訳を阻害することができるアンチセンス核酸である、請求項 10 記載の使用。

【請求項 12】

化合物が、天然又は合成起源の化合物である、請求項 10 記載の使用。

【請求項 13】

化合物が、トリコスタチン A である、請求項 12 記載の使用。

40

【請求項 14】

神経変性疾患の初期段階におけるニューロンの興奮毒性の阻害又は軽減のための、請求項 10 ~ 13 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 15】

アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症又は脳虚血の処置のための、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項記載の使用。

【請求項 16】

ALS の処置のための、特に ALS の初期段階におけるニューロンの興奮毒性の軽減のための、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項記載の使用。

50

【請求項 17】

特に興奮毒性又はニューロンのストレスに関連する疾患に対する活性化合物の選択、同定又は性状解析のための方法であって、試験化合物を、ヒストンデアセチラーゼ又はその断片若しくは機能性変種を発現する細胞と接触させること、及びこのタンパク質の発現又は活性を阻害する化合物の能力を測定することを特徴とする方法。

【請求項 18】

特に興奮毒性又はニューロンのストレスに関連する疾患に対する活性化合物の選択、同定又は性状解析のための方法であって、試験化合物を、ヒストンデアセチラーゼ又はその変種若しくは断片と接触させること、及び該ヒストンデアセチラーゼ、断片又は変種に結合する試験化合物の能力を測定することを特徴とする方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物学、遺伝学及び医学の分野に関連する。更に詳細には、本発明は、神経変性疾患、特に筋萎縮性側索硬化症の検出、性状解析及び/又は処置のための新規な方法に関する。本発明はまた、これらの疾患において活性な化合物の同定又はスクリーニングのための方法に関する。本発明はまた、上記方法を実施するために使用することができる、化合物、遺伝子、細胞、プラスミド又は組成物に関する。本発明は特に、これらの疾患における、核因子（特にヒストンに言及すべきである）のリン酸化に参与する酵素の役割の同定を前提とし、そしてこのような障害の治療的、診断的又は実験的な標的又はマーカーとしてこれらの使用を記述する。

20

【0002】

多くの神経変性疾患は、興奮毒性に関連する構成要素又は段階を有するものと表現されている。これは、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症及びハンチントン舞蹈病に当てはまる。

【0003】

筋萎縮性側索硬化症（ALS）は、レーヴィ（Lewy）小体のような種々の型の封入体に関連する神経変性疾患であり、脊髄及び皮質運動ニューロンのアポトーシスを特徴とし、その致命的な結果は、ときに前頭痴呆に関連している。突然変異が報告されていない散発型の疾患と、スーパーオキシドジスムターゼをコードするSOD1遺伝子の突然変異に関連した家族型（FALS）が存在する。大部分の症例は、散発型であり、家族型（FALS）は非常に稀である。臨床的症候の発現の前には、長い無症候期があるようである。発症は変わりやすく、その分類は複雑である。将来の治療法の進歩によって、症状の治療が、疾患の分子的要因に基づく方策に置き換えられよう。細胞レベルでは、これらの症状は、皮質運動ニューロン及び脊髄運動ニューロンの死に関連している。このニューロンの細胞死は、幾つかの神経変性疾患の基礎を形成する種々の現象と関連している。これは、グルタミン酸関連興奮毒性、酸化ストレス、ニューロンのマーカー（ALSの症例ではカルシウムチャンネル）に向けられたある型の自己免疫疾患、並びに細胞骨格の異常について当てはまる。これらの現象は、報告されているとはいえ、ALSを含むこれらの疾患の原因は曖昧なままである。更に、FALSは、スーパーオキシドジスムターゼをコードするSOD1遺伝子の突然変異と関連しているとしても、ニューロンを細胞死に委ねる機序（その少なくとも1つの構成要素は、アポトーシスである）は、不明である。

30

40

【0004】

細胞死に参与する種々の現象に参与する分子事象の同定によって、新規な治療方策を策定することができよう。ヒトの生検試料を用いてこれらの事象を研究することは容易ではない。これらの生検試料は、言うまでもなく死後標本に由来するため、その品質を検証することは困難であり、そしてこれらは、疾患の後期段階に対応する病態を表すだけである。

【0005】

動物モデルにより、疾患の進展の種々の段階を解析したり、健常対照と比較したりでき

50

るようにする、生物学的試料が入手できる。この点に関して、F A Lにおいて優勢な突然変異の1つ(突然変異G 9 3 A)を持つヒトS O D 1遺伝子を発現するトランスジェニックマウスは、その使用に関するライセンスをノースウエスタン大学(NorthWestern University)から得るという条件で、ジャクソンラボラトリー(Jackson Laboratory)から入手できる。120日以内に、このモデルは、ヒト疾患の症状に匹敵する症状の疾患の致命的な結果を再現する。S O D 1 G 9 3 A突然変異に関連するA L Sの症候の発現は、スーパーオキシドジスムターゼ活性の低下の結果ではなく、フリーラジカルを発生させる酵素の能力を上昇させる、機能の獲得の結果である。このような観察にもかかわらず、A L Sの種々の段階の原因となる分子事象はあまり理解されていない。これらの分子事象の複雑さは、疾患の進行を反映する：試験したトランスジェニックモデルでは、ニューロンの調節不全も臨床症状発現も30日目まで報告されていない。60日目は、最初の症候にちょうど先立つ段階であるが、既に脳レベルで、興奮毒性に関連したミトコンドリア代謝の変質、ストレス及びニューロンの細胞死のような、細胞生理学の変化を特徴とする段階に対応する。90日目に、50%の皮質及び脊髄運動ニューロンは死に、星状細胞活性化と並行してニューロンのアポトーシスの活発なプロセスが開始する。興奮毒性は、この段階ではもはや見られない。ニューロンの細胞死は、ここではカスパーゼの活性化と関連しているが、これは、疾患の初期段階には関与していないと考えられる。

10

【0006】

この動物モデルの他に、細胞に基づくモデルを用いて興奮毒性を研究することもできる。小脳顆粒細胞は、実験的ニューロンの細胞死を研究するための有用なモデルに相当する。実際、これらニューロンの培養物は、グリア細胞に比較してニューロンの濃縮を示すため、ニューロンの細胞死に特異的な事象を優先的に研究することができる。

20

【0007】

興奮毒性のある側面を再現するために、幾つかのアプローチを構想することができる。ニューロンをグルタミン酸で処理することができるが、これはこの興奮性アミノ酸の全ての受容体(代謝調節型受容体とイオン調節型受容体)を刺激する。N M D A又はカイニン酸を用いる処理もまた、これらの各イオン調節型受容体を刺激するために適用することができる。これらのイオン調節型受容体を刺激することの結果の1つは、これらのチャネルが開くときのカリウムの流出である。カリウムの細胞外濃度を上昇させることにより、細胞死が低減するため、このカリウムの流出は、興奮毒性の直接の一因である。

30

【0008】

相互に、低濃度のカリウムの存在下でのニューロンの培養は、これらに死をもたらす。結果として、興奮毒性の構成要素の1つは、低濃度のカリウムの存在下でニューロンを培養することにより研究することができる。この現象に特異的な種々の分子事象の同定によって、新しい治療標的、並びに新しい診断マーカーが同定できるはずである。

【0009】

本発明は次に、興奮毒性及びニューロンの細胞死現象に関与する遺伝子事象の同定を説明する。よって本発明は、これらの現象に関連した疾患への新しい治療的及び診断的アプローチ法、並びに活性化化合物の同定のための新しい標的を提供する。

【0010】

更に詳細には、当業者には既知の手法により培養したラット小脳顆粒細胞から抽出したR N Aを用いて定性差分分析を実行した。有利には、25 μ Mカリウムの存在下で培養した生存ニューロンからのR N A抽出物を、カリウム濃度を5 μ Mに低下させることにより毒性条件下で培養したニューロンからのR N A抽出物と比較した。この分析は、D A T A S法(出願番号W O 99/46403に記載されている)を利用する定性差分スクリーニング法を用いて実行した。

40

【0011】

この分析によって、ヒストンデアセチラーゼのm R N Aから誘導されたc D N A断片を同定することができ、興奮毒性の進展及びニューロンの細胞死プロセスへのこの酵素の関与を証明した。更に詳細には、本出願は、興奮毒性現象の過程におけるヒストンデアセチ

50

ラーゼのサプライシングの修飾の存在を証明している。得られた結果は、ALSの症候の発現時に興奮毒性にかかわった脳内のこの酵素のコード配列の変質を証明している。この変質は、対応する酵素の活性の上昇と、ヒストン及び他の核内標的の低アセチル化とを示唆する。

【0012】

これらの標的のアセチル化のレベルは、プレmRNAの転写活性とサプライシングを調節する。ヒストン及び他の核因子のアセチル化のレベルは、2つの酵素活性：ヒストンアセチルトランスフェラーゼ活性とヒストンデアセチラーゼ活性の間の均衡によって調節される。

【0013】

グルタミン付加の反復によって修飾されているタンパク質の凝集（ハンチントン舞踏病のハンチンチン（huntingtin）、ある型の脊髄性又は延髄性筋萎縮症の場合のアンドロゲン受容体）に関連する疾患の場合には、ヒストンアセチルトランスフェラーゼが、タンパク質凝集体中に隔離されていることが証明されている。出願番号W0 01/17514は、リン酸化により調節される遺伝子の発現を制御するための、遺伝子発現誘導剤及びヒストンアセチル化のモジュレーターを含む複合組成物を提案している。このような組成物は、クロマチンレベルでの非特異的作用に基づくものであり、神経毒性の機序へのヒストンデアセチラーゼの関係も、またこのような病状を治療するためのこれらの酵素の調節に基づく方策も何ら示唆しない。出願W0 00/71703は、癌の治療のための、ヒストンデアセチラーゼに特異的なアンチセンスオリゴヌクレオチドの使用に関する。

【0014】

驚くべきことに、本発明は初めて、遺伝子発現の調節に関与するヒストン及び他の核因子のアセチル化を低下させることによる、興奮毒性をもたらす遺伝子調節不全の分子機序の存在を証明している。

【0015】

よって本発明は、興奮毒性に関連する疾患に対する治療的及び診断的アプローチの開発のための新しい分子標的を提供する。このような方策は、ヒストンアセチル化活性の調節に基づき、そして更に詳細には、ヒストンアセチル化のレベルの上昇に基づく。この調節は、種々の方法で、好ましくはヒストンデアセチラーゼインヒビターの使用により達成することができる。これらの治療方策により、神経系の種々の疾患、特にアルツハイマー病、多発性硬化症及び筋萎縮性側索硬化症（ALS）に関与する興奮毒性現象においてニューロンの生存率を改善することができる。

【0016】

本発明の目的は、神経変性疾患を、特に初期段階で治療するための、更に好ましくは神経変性疾患に、特に初期段階に関連するニューロンの興奮毒性を低下させるための、組成物の調製のためにヒストンデアセチラーゼインヒビターを使用することである。

【0017】

本発明の別の目的は、ニューロンのストレス、特に興奮毒性に関連する疾患の治療方法であって、対象にヒストンデアセチラーゼインヒビターを投与することを特徴とする方法を提供することである。

【0018】

本発明において使用されるとき、興奮毒性に関連する疾患とは、更に好ましくは、ALS、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症及び脳虚血から選択される神経変性疾患を意味する。本発明はまた、他の疾患において発生するニューロンの興奮毒性の、特にその初期段階での処置にも適用できる。

【0019】

本発明に照らして、「処置」という用語は、予防的、治療的又は緩和的処置、並びに患者管理を意味する（苦痛の軽減、平均余命の改善、疾患の進行の減速、興奮毒性の条件下でのニューロンの生存率の改善など）。本治療は更に、他の薬剤又は治療、特にカスパーゼインヒビター又は他の活性化化合物のような、疾患の後期事象に対応するものと組合せて

10

20

30

40

50

実施することができる。

【0020】

「インヒビター」という用語は、ヒストンデアセチラーゼの発現又は活性を阻害又は軽減することができる化合物又は処置を意味する。本インヒビターは、好ましくは選択的である、即ち、その活性は、本質的にヒストンデアセチラーゼに向けられ、他のどの酵素にも実質的な直接の活性を及ぼさない。詳細には、ヒストンデアセチラーゼインヒビターは、ヒストンアセチルトランスフェラーゼに及ぼす直接の阻害作用を持たないことが肝心である。

【0021】

種々のヒストンデアセチラーゼが同定、クローン化及び性状解析されている。以下を特に引用することができる：ヒストンデアセチラーゼ - 1 (H D A C 1)、ヒストンデアセチラーゼ - 2 (H D A C 2) 及びヒストンデアセチラーゼ - 3 (H D A C 3)、特にヒト酵素。これらの酵素をコードする核酸配列及び対応するアミノ酸配列は、先行技術、例えば、ジーンバンク (GenBank) のデータバンクに参照番号：NM__004964 (h H D A C 1) ; NM__001527 (h H D A C 2) ; NM__003883 (h H D A C 3) ; A F 0 0 6 6 0 3 (m H D A c 2) の下に記述されている。これらの配列はまた、他の公共の関係筋からも入手できる。当然のことながら、本発明はまた、これらの特異的配列の天然の変種及び / 又は相同体にも関係する。

10

【0022】

本発明の範囲内で、ヒトヒストンデアセチラーゼのインヒビター、特に h H D A C 1、h H D A C 2 及び / 又は h H D A C 3 のインヒビター、更に好ましくはインヒビター化合物が優先的に使用される。

20

【0023】

使用される化合物は、ヒストンデアセチラーゼの発現を阻害することができる化合物、即ち、詳細には遺伝子の転写、R N A 成熟、R N A 翻訳、翻訳後のタンパク質の修飾、分子標的へのタンパク質の結合などを阻害する化合物であってよい。

【0024】

本化合物は、特に天然起源 (例えば、植物、細菌、ウイルス、動物又は真核生物起源) 又は合成 (特に有機又は無機の合成又は半合成分子) のような、種々の性質及び起源のものであってよい。例えば、核酸、ポリペプチド (又はタンパク質若しくはペプチド)、脂質又は化合物などであってよい。

30

【0025】

第1の実施態様では、本インヒビターは、ヒストンデアセチラーゼ遺伝子の転写又は対応するメッセンジャーの翻訳を阻害することができるアンチセンス核酸である。このアンチセンス核酸は、ヒストンデアセチラーゼ遺伝子、ヒストンデアセチラーゼメッセンジャーの配列、又はこれらに相補的な配列の、全部又は一部を含むことができる。このアンチセンス配列は、D N A、R N A、リボザイムなどであってよい。これは、1本鎖でも2本鎖であってよい。また、アンチセンス遺伝子によりコードされる R N A であってよい。検討中の遺伝子又はメッセンジャーの配列の一部を含むアンチセンス核酸が使用される時、特異的なハイブリダイゼーションを確保するために、配列からの少なくとも10個 (更に好ましくは少なくとも15個) の連続塩基を含む部分を使用することが好ましい。アンチセンスオリゴヌクレオチドの場合には、典型的には100個未満の塩基、例えば、10~50個程度の塩基を含む。このオリゴヌクレオチドは、その安定性、そのヌクレアーゼ抵抗性、その細胞浸透性などを改善するために修飾することができる。アンチセンス分子の配列と、標的遺伝子又はメッセンジャーの配列との間の完璧な相補性は、必要ではないが、一般には好ましい。

40

【0026】

別の実施態様では、インヒビター化合物は、ポリペプチドである。これは、例えば、ヒストンデアセチラーゼ配列の一領域を含み、かつその活性に拮抗できるペプチドであってよい。ペプチドは、有利には検討中のデアセチラーゼの一次配列の5~50個 (典型的に

50

は7～40個)の連続アミノ酸を含む。このポリペプチドはまた、抗ヒストンデアセチラーゼ抗体、又はこのような抗体の断片若しくは誘導體、例えば、Fab断片、CDR領域、又は更に好ましくは1本鎖抗体(例えば、ScFv)であってよい。1本鎖抗体は、特異的にかつ細胞内で作用して標的タンパク質の活性を調節することができる限り、特に有利である。このような抗体、断片、又は誘導體は、動物を免疫し、血清(ポリクローナル)又は脾臓細胞(適切な細胞株との融合によりハイブリドーマを産生させるため)を回収することを含む従来法により産生することができる。

【0027】

種々の種においてポリクローナル抗体を産生するための方法は、先行技術に報告されている。典型的には、抗原をアジュバント(例えば、フロイントアジュバント)と合わせて、典型的には皮下注射により動物に投与する。反復注射を実施することができる。血液試料を回収して、免疫グロブリン又は血清を分離する。モノクローナル抗体を産生するための従来法は、動物を抗原で免疫し、続いて脾臓細胞を回収し、次にこれを骨髄腫細胞のような不死化細胞と融合する。生じたハイブリドーマは、モノクローナル抗体を産生するので、個々のクローンを単離するために限界希釈法により選択することができる。Fab又はF(ab')₂断片は、従来法によりプロテアーゼ消化によって生成することができる。

10

【0028】

別の実施態様では、本化合物は、ヒストンデアセチラーゼの発現又は活性を調節することができる、天然又は合成起源の化合物、特に有機又は無機分子である。このような化合物は、後述の種々の測定法により製造及び/又は選択することができる。好ましい非限定的な一例として、トリコスタチンA(trichostatin A)、トラポキシシン(trapoxin)、アピシジン(apicidin)、ピロキサミド(pyroxamide)、バルプロエート(valproate)、ベンズアミド、酪酸ナトリウム又はフェニルブチラートのような種々のブチレート類、出願WO 98/00127に記載されているようなブチレート誘導體、並びに類似体などを引用することができる。トリコスタチンAは、好ましい一例である。

20

【0029】

ニューロンの興奮毒性の軽減に使用するための組成物を調製するために、ヒトヒストンデアセチラーゼインヒビター化合物、特に選択的インヒビターを使用することは、本発明の特定の目的である。

30

【0030】

ニューロンの興奮毒性の軽減に使用するため、特にALSの処置のための組成物を調製するために、ヒトヒストンデアセチラーゼ2インヒビター化合物、特に選択的インヒビターを使用することは、本発明の特定の目的である。

【0031】

ALSの処置用、特にALSの初期段階におけるニューロンの興奮毒性の軽減用の組成物を調製するために、ヒトヒストンデアセチラーゼインヒビター、特に選択的インヒビターを使用することは、本発明の特定の目的である。

【0032】

ニューロンの興奮毒性の軽減に使用するための組成物を調製するため、及び/又はALSの処置用の組成物を調製するために、トリコスタチンAを使用することは、本発明の別の特定の目的である。

40

【0033】

ALSの患者におけるヒストンデアセチラーゼ2の活性の阻害に使用するための組成物を調製するために、トリコスタチンAを使用することは、本発明の別の特定の目的である。

【0034】

本発明はまた、ALSの処置方法であって、対象に、ヒストンデアセチラーゼ、特にヒストンデアセチラーゼ2(好ましくはヒトの)の発現又は活性を阻害する有効量の化合物を投与することを特徴とする方法に関する。

50

【0035】

好ましくは、本発明は、神経変性疾患の初期段階における処置のために利用される。

【0036】

投与は、当業者には既知の任意の方法により、好ましくは注射により、典型的には腹腔内、脳内、静脈内、動脈内又は筋肉内経路により行うことができる。このような注射される用量は、当業者ならば適合させることができる。典型的には、化学的性質のインヒビター化合物では約0.01mg~100mg/kgの間が注射される。核酸化合物では、用量は、例えば、1用量当たり0.01mg~100mgの間で変化させることができる。当然のことながら、反復注射は、ことによると他の活性物質又は任意の薬剤学的に許容しうる担体（例えば、安定剤などの存在下での緩衝剤、食塩水又は等張液）と組合せて行うことができる。

10

【0037】

本発明は、哺乳動物、特にヒトにおいて使用することができる。

【0038】

本発明は詳細には、ヒストンデアセチラーゼ2（mHDA2、ジーンバンク参照番号：AF006603）のコード領域、更に詳細にはヌクレオチド2934~3243にまたがる領域に影響するスプライシング事象の存在を示す。ニューロン生存の条件（25µMカリウム）下で優先的に検出される、このスプライシング事象は、酵素を不活化して、生存ニューロンにおける遺伝子発現に関与するヒストンや他の因子のアセチル化の上昇を引き起こす。相互的に、同じ核因子のアセチル化の低下は、5µMカリウムの存在下でのニューロンの細胞死と関連することが証明されている。よって本発明は、カリウム流出における、詳細には興奮毒性現象における、更に詳細にはALSのような疾患におけるニューロン生存率を復元するための、ヒストンデアセチラーゼインヒビターの使用に基づく新しい治療方策の可能性を開く。本発明は、ヒストンデアセチラーゼ2を、興奮毒性に関連する分子事象を処理するための治療標的として初めて提案する。特定の実施態様により、本発明は、神経変性疾患の初期段階におけるニューロンの興奮毒性を阻害又は軽減するために利用することができる。本発明は、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、又は脳虚血の処置には特に適している。

20

【0039】

本発明はまた、活性化合物を同定、認証、選択又は最適化するための新しい標的を提供する。実際本発明により、ヒストンデアセチラーゼの発現又は活性を調節するその能力に基づいて、有利な治療的又は生物学的性質を持つ化合物の選択が可能である。これらの測定法は、細胞ベース系若しくは動物系、又は無細胞系（例えば、単離タンパク質、ポリペプチド又は核酸を使用するか、あるいはインビトロ発現系において）で実施することができる、そして相互作用（例えば、結合、置換又は競合測定法など）又は機能（活性、転写など）の大きさに基づくことができる。

30

【0040】

本発明の別の特定の目的は、特に興奮毒性又はニューロンのストレスに関連する疾患における、活性化合物の選択、同定又は性状解析のための方法であって、試験化合物をヒストンデアセチラーゼ又はその断片若しくは機能性変種を発現する細胞と接触させること、及びこのタンパク質の発現又は活性を阻害する化合物の能力を測定することを特徴とする方法に関する。

40

【0041】

本方法は、哺乳動物起源（ヒト、ネズミなど）の初代細胞又は細胞株のような、種々の細胞集団を用いて実施することができる。有利には、当のヒストンデアセチラーゼを自然には発現しないが、目的酵素をコードする核酸でトランスフェクションされた細胞が使用される。このように、本方法の選択性は増大する。下等真核生物細胞（酵母など）又は原核生物細胞も使用することができる。非ヒトトランスジェニック動物も使用することができる。

【0042】

50

阻害作用は、詳細にはRNAの検定、タンパク質の検定、活性の測定などにより、種々の方法で測定することができる。これらは、任意の従来の免疫酵素法（RIA、ELISA、EIAなど）を用いて、又は標識プローブ若しくはチップを使用するハイブリダイゼーション法により、又は特異的プライマーを使用する増幅などにより測定することができる。

【0043】

選択法はまた、無細胞系でも、ヒストンデアセチラーゼ又はその変種若しくは断片に結合する試験結合の能力を測定することにより実施することができる。これに関連して、本発明の別の特定の目的は、特に興奮毒性又はニューロンのストレスに関連する疾患に対する活性化合物の選択、同定又は性状解析のための方法であって、試験化合物をヒストンデアセチラーゼ又はその変種若しくは断片と接触させること、及び該ヒストンデアセチラーゼ、断片又は変種に結合する試験化合物の能力を測定することを特徴とする方法に関する。ヒストンデアセチラーゼ、断片又は変種は、単離及び精製した形で、可溶性の形で、又はマトリックス（例えば、ビーズ又はカラムなど）に結合して、又は膜若しくは小胞に取り込まれて使用することができる。ヒストンへの試験化合物の結合は、任意の既知の方法により、特に標識対照リガンドの置換により、ゲル移動又は電気泳動などにより測定することができる。

10

【0044】

「変種」という用語は、1つ又は幾つかのアミノ酸残基の、1つ又は幾つかの突然変異、置換、欠失及び/又は付加を含み、かつ実質的に同じ抗原特異性又は活性を持ち、かつヒストンを脱アセチル化する能力を大いに保持しているポリペプチドを含む。誘導体の典型例は、ヒストンデアセチラーゼ多型による、スプライシングによるなどの配列変化物を含む。特に好ましい誘導体は、野生型配列に存在するアミノ酸とは異なる、多くとも5個のアミノ酸残基を含む。「断片」という用語は、ヒストンデアセチラーゼアミノ酸配列由来の5～100個（好ましくは10～100個）の連続残基を含むポリペプチドを意味する。断片は有利には、酵素の活性部位を含む。

20

【0045】

試験化合物は、天然又は合成化合物、脂質、核酸、ポリペプチド、化学製品などのような、多様な性質と起源のものであってよい。これらは、単離化合物であっても、又は混合物、コンビナトリアルライブラリーなどであってもよい。本発明の方法において、幾つかの試験化合物を、並行して、例えば、マルチウェルプレート、箱などのような適切な装置で試験することができる。

30

【0046】

本発明の別の目的は、ヒストンデアセチラーゼのスプライス変種、並びにこのようなポリペプチドをコードする核酸、同核酸を含むベクター、組換え細胞、及びこれらの使用に関する。ベクターは、プラスミド、ファージ、コスミド、ウイルス、人工染色体などであってよい。好ましいベクターは、例えば、市販のプラスミド（pUC、pcDNA、pBRなど）から誘導されたベクターのような、プラスミドベクターである。このようなベクターは、有利には選択遺伝子及び/又は複製の起点及び/又は転写プロモーターを含む。他の特定のベクターは、例えば、ウイルス又はファージ、特に、レトロウイルス、アデノウイルス、AAV、ヘルペスウイルス、バキュロウイルスなどから誘導されたウイルスのような、複製欠損の組換えウイルスである。ベクターは、例えば、原核生物又は真核生物細胞のようなコンピテント宿主で使用することができる。これらは、細菌（例えば、大腸菌（*E. coli*））、酵母（例えば、サッカロミケス（*Saccharomyces*）又はクルイベロミケス（*Kluyveromyces*））、植物細胞、昆虫細胞、哺乳動物細胞、特にヒト細胞などであってよい。これらは、細胞株、初代細胞、混合培養などであってもよい。

40

【0047】

本発明はまた、特に初期段階で、興奮毒性の状態を診断するために使用することができる。本発明は、対象における興奮毒性状態、特にこのような状態と関連した、アルツハイマー病、パーキンソン病、多発性硬化症、ALS又は脳虚血のような疾患の存在、素因又

50

は進展を検出するのに特に有用である。本発明は、多発性硬化症又はALSを初期段階で検出するために特に適合する。

【0048】

よって本出願の別の態様は、生物学的試料中の、ヒストンデアセチラーゼ（又はそのスプライス変種若しくは他の遺伝子改変物）の存在を検出するための、又はその相対量を投与又は決定するための方法及び手段に関する。

【0049】

本発明の特定の目的は、対象における興奮毒性又はニューロンのストレスの状態を検出するための方法であって、インビトロ又はエクスピボで、対象からとった試料中の1種（又は数種）のヒストンデアセチラーゼ、特にヒストンデアセチラーゼ2の発現を測定することを特徴とする方法に関する。

10

【0050】

別の特定の目的は、対象における興奮毒性又はニューロンのストレスの状態を検出するための方法であって、対象からとった試料中の、突然変異型の1種（又は数種）のヒストンデアセチラーゼ、特にヒストンデアセチラーゼ2、又は対応するRNAの存在（又は非存在）を検出することを特徴とする方法に関する。

【0051】

タンパク質、RNA又は発現の測定又は検出のために適切な手段は、特にプローブ又は核酸プライマー、抗体又は他の特異的リガンド、キット、装置、チップなどを含む。検出方法は、ハイブリダイゼーション、PCR、クロマトグラフィー又は免疫学的方法などを含んでよい。これらの方法は、本明細書に上述されたような疾患の進行又は同疾患における処置の効力の検出、性状解析、モニターに、あるいは疾患の素因の測定に特に適している。

20

【0052】

本方法は、血液、血漿、尿、血清、唾液、生検試料又は培養細胞などのような、種々の生物学的試料を使用して実施することができる。好ましくは、神経又は筋肉細胞を含む試料であってよい。利用される手法に応じて、試料は前処理することができ、例えば、核酸をハイブリダイゼーション及び/又は増幅反応に利用可能にし、かつ/あるいはタンパク質を免疫又は酵素反応に利用可能にすることができる。

【0053】

特定の実施態様では、ヒストンデアセチラーゼをコードするmRNAの試料における発現が測定されるか、あるいはmRNAの存在又は量が検出又は検定される。幾つかのヒストンデアセチラーゼは、並行して検出又は検定することができる。

30

【0054】

この測定、検出又は検定は、試料と、検討中のRNAに特異的な核酸プローブ、詳細にはヒストンデアセチラーゼのメッセンジャーRNAからの配列又は相補的若しくは誘導された配列の全部又は一部を含むプローブとのハイブリダイゼーションにより実行することができる。特定の実施態様では、このプローブは、ハイブリダイゼーション生成物の検出を容易にするために、1本鎖であり、かつ/又は標識されている。標識付けは、放射活性、蛍光、ルミネセントなどであってよい。プローブは、マトリックスに固定化することができる。

40

【0055】

ニューロンのストレスの状態、そして更に詳細には興奮毒性状態の診断、検出、スクリーニング又は性状解析のための方法、特に興奮毒性又はニューロンのストレスに関連する構成要素又は段階による神経変性疾患の診断、検出、スクリーニング又は性状解析のための方法を実施するために、ヒストンデアセチラーゼの遺伝子又はメッセンジャーRNAから誘導された配列、とりわけこの配列に特異的、相補的又はここから誘導された配列の全部又は一部を含む核酸を使用することは、本発明の特定の目的である。

【0056】

本明細書に上述されているように、本出願は、神経毒性プロセスに関与しているある種

50

の組織における非スプライス型の存在を証明しており、そして本発明により、試料中のスプライス型と非スプライス型の検出又は相対量決定が可能になる。非スプライス種の発現、存在又はレベルの上昇は、興奮毒性状態の進展と相関している。よって特定の変法では、本発明の方法は、ヒストンデアセチラーゼRNAのスプライス型及びノ又は非スプライス型の存在の分析を含む。この検出は、例えば、RNAの非欠失（即ち、非スプライス）領域の間の結合部に由来する配列に特異的な核酸プローブを用いることにより、行うことができる。スプライス型と非スプライス型の間の比の変化は、疾患の進行（又は治療の効力）のインジケータとしてモニターすることができる。

【0057】

測定、検出又は検定はまた、検討中のRNAに特異的な核酸プライマー（又はプライマー対）を用いる、試料中の核酸の選択的増幅により行うことができる。特定の実施態様では、プライマー（又は対のプライマーの一方）は、RNAの非欠失（即ち、非スプライス）領域の間の結合部に由来する配列に特異的である。増幅は、例えば、PCRを利用して実行することができる。増幅生成物は、任意の既知の手法により検出又は検定することができる。このようなプライマー（又はプライマー対）は、本出願の別の目的を構成する。

10

【0058】

別の特定の実施態様では、試料中のヒストンデアセチラーゼの存在又は量が検出又は検定される。この検出は、特異的抗体、又は任意の他の特異的リガンドを用いて実行することができる。

【0059】

本発明の別の目的は、本明細書に上述された、1つ又は幾つかの核酸（ベクター、プローブ、プライマー、オリゴヌクレオチド、アンチセンス配列を含む）、ポリペプチド（抗体を含む）又は細胞が固定化されている、マトリックス（を含む産物）に関する。このマトリックスは、例えば、ナイロン、ガラス、プラスチックなど、又は任意の他の互換性の材料のように、固体で、扁平か又はそうでなく、均質か又はそうでなくてもよい。ポリペプチド又は核酸は、好ましくは一方の末端により、抗体又はプローブのような特異的リガンドとの相互作用に参与する反応にその分子を接近させる条件下で固定化される。このポリペプチド又は核酸は、マトリックス上に正確なやり方で配置させ、そして幾重にも沈積させることができる。

20

【0060】

本発明はまた、組織及び虚血状態を性状解析するために使用することができる。この使用法もまた、組織におけるヒストンデアセチラーゼ又は改変型の検出又は検定に基づく。

30

【0061】

本発明の他の態様及び利点は、具体例であって非限定的と考えるべき以下の実施例を読めば、明らかとなる。

【0062】

実施例

実施例1：興奮毒性の分子標的としてのヒストンデアセチラーゼ2の同定

疾患の異なる段階に対応する動物脳の試料からのポリアデニル化（ポリA+）RNA抽出物を用いて、定性差分分析を行った。ニューロンは、疾患の進展に関連した最大数の代替スプライシング事象に配慮するために、前もって単離しなかった。

40

【0063】

ポリA+RNAは、当業者には既知の手法を用いて調製した。詳細には、チオシアン酸グアニジニウムのようなカオトロピック剤での処理、これに続く溶媒（例えば、フェノール又はクロロホルム）による総RNAの抽出を含むことができる。このような方法は、当業者には周知であり（Maniatisら、Chomczynskiら、Anal. Biochem. 162 (1987) 156を参照のこと）、市販のキットを用いて容易に実施することができる。

【0064】

ポリA+RNAは、この総RNAから、当業者に知られており、かつ市販のキットの形で利用可能な従来法により調製した。

50

【0065】

このポリA + RNAは、逆転写酵素を用いる逆転写反応の鋳型として使用した。有利には、使用する逆転写酵素は、RNAアーゼH活性を持たず、このため得られる相補DNAの最初の鎖は、従来の逆転写酵素により得られる鎖よりも長くなる。このようなRNAアーゼH活性のない逆転写酵素調製物は市販されている。

【0066】

疾患の進展の動態の各時点（30日、60日及び90日）で、ポリA + RNA及び1本鎖cDNAをトランスジェニック動物（T）及び同系対照動物（C）から調製した。

【0067】

DATAS法により、動態の各時点でmRNA（C）とcDNA（T）の間のハイブリダイゼーションを、逆のmRNA（T）とcDNA（C）との間のハイブリダイゼーションと同様に実行した。

【0068】

これらmRNA / cDNAヘテロ2本鎖を、次にDATAS法プロトコールにより精製した。

【0069】

相補DNAと対形成しないRNA配列を、RNAアーゼHの作用によって（この酵素は、不對RNA配列を分解するため）これらのヘテロ2本鎖から取り除いた。このような不對配列は、他の点では相同なRNA分子の間に存在する定性的な差を表す。このような定性的な差は、RNA分子の配列内のどこか、配列の5'、3'又は中央のいずれか、そして特にコード配列に位置を特定することができる。これらの局在性に応じて、これらの配列は、スプライシングによる修飾というだけでなく、転座又は欠失の結果でもありうる。

【0070】

定性的な差を表すRNA配列は、次に当業者には既知の手法、そして特にDATAS法特許に記述された手法によりクローン化した。

【0071】

これらの配列は、定性差分ライブラリーを構成するcDNAライブラリーに分類した。これらのライブラリーの1つは、健常状態に特異的なエクソンとイントロンを含む；他のライブラリーは、病的症状の特徴を示すスプライシング事象を含む。

【0072】

クローンの発現の差は、試験した種々の状態から抽出したメッセンジャーRNA分子の逆転写により得られたプローブとのハイブリダイゼーションにより照合した。ハイブリダイゼーションの差を示すクローンは、後の分析のために保持した。DATASにより同定した配列は、そのスプライシングに関して、健常状態に比較して疾患状態において差をつけて発現するイントロン及び/又はエクソンに対応する。これらのスプライシング事象は、疾患の進展の所定の段階に特異的であっても、あるいは健常状態に典型的であってもよい。

【0073】

これらの配列をデータバンクと比較することにより、得られた情報を分類することができ、そしてその診断的又は治療的価値により、配列の健全な選択を提案することができる。

【0074】

得られた結果は、ヒストンデアセチラーゼ2（mHDA2、ジーンバンク参照番号：AF006603）のコード領域、更に詳細にはヌクレオチド2934～3243にまたがる領域に影響するスプライシング事象の存在を示した。ニューロン生存の条件（25 μMカリウム）下で優先的に検出される、このスプライシング事象は、酵素を不活化して、ヒストンや生存ニューロンにおける遺伝子発現に関与する他の因子のアセチル化の増加を引き起こした。相互的に、同じ核因子のアセチル化の低下は、5 μMカリウムの存在下でのニューロンの細胞死と関連することが証明された。

【0075】

実施例 2 : ヒストンデアセチラーゼインヒビターによる興奮毒性の阻害

この実施例のために、ラット小脳顆粒細胞を、当業者には既知の手法により培養した。興奮毒性は、2つの型の処理により（第1には、100 μM NMDA（N-メチル-D-アスパラギン酸）と10 μMセリンの合同投与により、そして第2には、50 μMカイニン酸の投与により）これらの細胞において誘導した。採用した実験条件下で、30～40%の毒性が観測され、当業者には知られているMTT試験を用いてこれを測定した。

【0076】

興奮毒性の阻害は、ヒストンデアセチラーゼインヒビター、特にトリコスタチンAの存在下で証明することができる。よって本発明は、興奮毒性機序における、特にALSモデルにおけるヒストンデアセチラーゼ2の関与を、また興奮毒性に関連するストレスの中でニューロンの生存を維持するこの酵素のインヒビターの能力を立証する。

10

【0077】

本発明の他の態様及び応用は、以下にある：

- このような疾患の患者におけるヒストンデアセチラーゼ2発現を阻害することを目的とした、アンチセンスRNAを含む核酸断片の使用、
- このような疾患の患者におけるヒストンデアセチラーゼ2発現を阻害することを目的とした、化合物、トリコスタチンA、又はこれを含む任意の薬剤組成物の使用。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Internal Application No PCT/FR 03/00940
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68 A61K31/7088 A61K31/00 A61P25/00		
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) IPC 7 C12Q A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	AIT-IKHLEF A ET AL: "Identification of splice variants in Amyotrophic Lateral Sclerosis using a new technology: DATAS" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 27, no. 2, 2001, page 1649 XP002201672 ISSN: 0190-5295 the whole document	1-7
A	WO 02 00872 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA ;AIT IKHLEF ALI (FR); RESINK ANNELIES (FR)) 3 January 2002 (2002-01-03) the whole document	1-7
A	WO 00 71703 A (METHYLGENE INC) 30 November 2000 (2000-11-30) claims 1-11,16-35	11,12, 17,18
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 22 August 2003		Date of mailing of the international search report 28/08/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Osborne, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internation	Application No
	PCT/FR 03/00940

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SALMINEN A ET AL: "NEURONAL APOPTOSIS INDUCED BY HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 61, 1998, pages 203-206, XP002935360 ISSN: 0169-328X ---	
X	WO 01 17514 A (SALK INST OF BIOLOG STUDIES ;MONTMINY MARC R (US)) 15 March 2001 (2001-03-15) claims 1-3, 28-38 ---	10, 13-16
P, X	WO 02 26703 A (ROMERO MARTIN MARIA ROSARIO ;FINN PAUL W (GB); HARRIS C JOHN (GB);) 4 April 2002 (2002-04-04) page 74, line 19 - line 21 ---	10, 13-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat	Application No
PCT/FR	03/00940

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0200872	A	03-01-2002	FR 2810995 A1	04-01-2002
			AU 7069101 A	08-01-2002
			WO 0200872 A2	03-01-2002
WO 0071703	A	30-11-2000	AU 6718200 A	12-12-2000
			CA 2366408 A1	30-11-2000
			EP 1173562 A2	23-01-2002
			WO 0071703 A2	30-11-2000
			JP 2003500052 T	07-01-2003
			US 2003078216 A1	24-04-2003
WO 0117514	A	15-03-2001	AU 7108400 A	10-04-2001
			WO 0117514 A1	15-03-2001
WO 0226703	A	04-04-2002	AU 9013201 A	08-04-2002
			CA 2423970 A1	04-04-2002
			WO 0226703 A1	04-04-2002

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE		Demande internationale No PCT/FR 03/00940
A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE CIB 7 C12Q1/68 A61K31/7088 A61K31/00 A61P25/00		
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) CIB 7 C12Q A61K		
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 réalisable, termes de recherche utilisés) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	AIT-IKHLEF A ET AL: "Identification of splice variants in Amyotrophic Lateral Sclerosis using a new technology: DATAS" SOCIETY FOR NEUROSCIENCE ABSTRACTS, SOCIETY FOR NEUROSCIENCE, US, vol. 27, no. 2, 2001, page 1649 XP002201672 ISSN: 0190-5295 le document en entier	1-7
A	WO 02 00872 A (EXONHIT THERAPEUTICS SA ;AIT IKHLEF ALI (FR); RESINK ANNELIES (FR)) 3 janvier 2002 (2002-01-03) le document en entier	1-7
A	WO 00 71703 A (METHYLGENE INC) 30 novembre 2000 (2000-11-30) revendications 1-11,16-35	11,12, 17,18
-/--		
<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 *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée) *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée		*T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier *&* document qui fait partie de la même famille de brevets
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
22 août 2003		28/08/2003
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P. B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé Osborne, H

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande internationale No
PCT/FR 03/00940

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	SALMINEN A ET AL: "NEURONAL APOPTOSIS INDUCED BY HISTONE DEACETYLASE INHIBITORS" MOLECULAR BRAIN RESEARCH, ELSEVIER SCIENCE BV, AMSTERDAM, NL, vol. 61, 1998, pages 203-206, XP002935360 ISSN: 0169-328X ---	
X	WO 01 17514 A (SALK INST OF BIOLOG STUDIES ;MONTMINY MARC R (US)) 15 mars 2001 (2001-03-15) revendications 1-3,28-38 ---	10,13-16
P,X	WO 02 26703 A (ROMERO MARTIN MARIA ROSARIO ;FINN PAUL W (GB); HARRIS C JOHN (GB);) 4 avril 2002 (2002-04-04) page 74, ligne 19 - ligne 21 -----	10,13-16

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR 03/00940

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 0200872	A	03-01-2002	FR 2810995 A1	04-01-2002
			AU 7069101 A	08-01-2002
			WO 0200872 A2	03-01-2002
WO 0071703	A	30-11-2000	AU 6718200 A	12-12-2000
			CA 2366408 A1	30-11-2000
			EP 1173562 A2	23-01-2002
			WO 0071703 A2	30-11-2000
			JP 2003500052 T	07-01-2003
			US 2003078216 A1	24-04-2003
WO 0117514	A	15-03-2001	AU 7108400 A	10-04-2001
			WO 0117514 A1	15-03-2001
WO 0226703	A	04-04-2002	AU 9013201 A	08-04-2002
			CA 2423970 A1	04-04-2002
			WO 0226703 A1	04-04-2002

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/566	
G 0 1 N 33/566	C 1 2 N 15/00	A

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, IT, LU, MC, NL, 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, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 レサネク, アヌリス

オランダ国、1 2 5 1 ナラーレン・エヌハー、エームネッセルウェッヒ 1アー

Fターム(参考) 2G045 AA35 BB20 CB01 DA13 DA14 FB02
 4B024 AA11 BA11 CA01 CA02 CA04 CA09 CA12 CA20 HA11 HA13
 HA14
 4B063 QA01 QA13 QA17 QA19 QQ02 QQ08 QQ30 QQ42 QQ43 QQ53
 QR08 QR32 QR35 QR40 QR42 QR56 QR62 QS16 QS34 QS36
 QX02