(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2008 年3 月27 日 (27.03.2008)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2008/035823 A1

(51) 国際特許分類:
A61K 45/00 (2006.01) *A61P 19/00* (2006.01)
A61K 31/5415 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *A61P 31/00* (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01) *A61P 43/00* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2007/069141

(22) 国際出願日: 2007 年9 月21 日 (21.09.2007)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2006-257487 2006 年9 月22 日 (22.09.2006) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 武田薬品工業株式会社 (TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED) [JP/JP]; 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町四丁目１番１号 Osaka (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 木村温英 (KIMURA, Haruhide) [JP/JP]; 〒5328686 大阪府大阪市淀川区十三本町二丁目１７番８５号武田薬品工業株式会社内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 小林浩, 外(KOBAYASHI, Hiroshi et al.); 〒1040028 東京都中央区八重洲二丁目８番７号福岡ビル９階 阿部・井窪・片山法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書
— 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

WO 2008/035823 A1

(54) **Title:** CELL DEATH INHIBITOR

(54) 発明の名称: 細胞死抑制剤

(57) **Abstract:** Disclosed are: an antioxidant response element (ARE) activator comprising a macrophage migration inhibitory factor (MIF) or a modified form thereof; an ARE activator comprising a combination of an MIF or a modified form thereof and a substance capable of binding to an MIF; and others. Each of these ARE activators is useful as a safe and excellent cell death inhibitor, such as a prophylactic/therapeutic agent for a cardiovascular disease, a bone/joint disease, an infectious disease, an inflammatory disease, a renal disease, a central nervous system disease, cancer or diabetes.

(57) 要約: 本発明は、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）またはその改変体を含有してなるAntioxidant response element（ARE）活性化剤、MIFまたはその改変体とMIFに結合する能力を有する物質とを組み合わせてなるARE活性化剤などに関する。これらARE活性化剤は、安全で優れた細胞死抑制剤、例えば循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌、糖尿病の予防・治療剤として有用である。

明 細 書

細胞死抑制剤

技術分野

本発明は、細胞死抑制剤、Antioxidant response element（ＡＲＥ）活性化剤等に関する。

背景技術

従来、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）は、免疫担当細胞や脳下垂体などから生体侵襲などの刺激に即応して産生され、炎症性サイトカインカスケードの上流に位置して炎症反応を制御する種々の炎症性疾患の増悪因子であると考えられている（Annual Reports in Medicinal Chemistry、第33巻、24頁、1998年；Advances in Immunology、第66巻、197頁、1997年）。

リウマチ患者の滑膜液や血清中の MIF 濃度、急性呼吸促迫症候群患者の肺胞洗浄液中の MIF 濃度、腎臓移植を受けた患者の拒絶反応時における尿中の MIF 濃度、急性心筋梗塞、糖尿病、全身性エリテマトーデス、クローン病およびアトピー性皮膚炎の患者の血清中の MIF 濃度は、健常人と比べて顕著に上昇している。

各種動物病態モデルにおいて、MIF に対する抗体投与および MIF の欠失は、腎炎、肝炎、肺炎、関節炎、エンドドキシンショックなどの症状の改善効果を示すことが報告されている（International Journal of Molecular Medicine、第2巻、17頁、1998年）。

近年、MIF が酸化ストレスで誘発した細胞死を抑制すること（非特許文献1 J. Exp. Med. 190巻, 1375-1382頁, 1999年、非特許文献2 PNAS 99巻, 345-350頁, 2001年）、GST の発現を誘導すること（非特許文献3 Cardiovascular Res. 52巻, 438-445頁, 2001年）が報告されている。WO 03/20719号公報（特許文献1）には、細胞死抑制作用および MIF に結合する能力を有する 1,3-ベンゾチアジノン誘導体が、WO 03/90782号公報（特許文献2）には、MIF に結合する物質（例、1,3-ベンゾチアジノン誘導体等）が細胞死抑制作用、

antioxidant response element（ARE）制御下にある遺伝子の発現やタンパク質産生を増強することが報告されている。

立体構造解析より、MIF の 1 位 Pro は、32 位 Lys、64 位 Ile、95 位 Tyr、97 位 Asn と疎水性ポケットを形成し、種々の化合物と結合することが報告されている（非特許文献 4 Expert Opin. Ther. Targets, 7 巻, 153-164 頁,2003 年）。

一方、近年、酸化ストレスによる細胞死が、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症など）、虚血性疾患（例、心筋梗塞、心不全、脳卒中、脳梗塞、虚血性急性腎不全など）、骨・関節疾患（例、骨粗鬆症、変形性関節症、リウマチなど）、消化器疾患（例、炎症性腸疾患、急性膵炎など）、肝疾患（例、アルコール性肝炎、ウイルス性肝炎など）、糖尿病、エイズなど種々の疾患の発症または進展に深く関わっていることが明らかとなってきている（別冊・医学のあゆみ、79 頁、2005 年；別冊・医学のあゆみ、8 頁、1997 年；日本臨床、第 54 巻、1996 年）。Antioxidant response element（ARE）は、酸化ストレスに対する多様な防御因子の発現を調節しており、その転写活性化は酸化ストレスに対する最も重要な細胞の防御機構の一つと考えられている（Current Pharmaceutical Design 第 10 巻、879 頁、2004 年）。また、リウマチの治療に用いられる金製剤や NSAID の薬効には ARE で制御される防御因子の発現亢進が関与する可能性が指摘されている（The Journal of Biological Chemistry 第 276 巻、34074 頁、2001 年；Free Radical Biology and Medicine 第 37 巻、650 頁、2002 年）。

発明の開示

上記より、ARE 活性化は、酸化ストレスが関与する疾患の抑制につながることが予想され、ARE 活性化を主作用とする安全で強力な細胞死抑制剤の開発が切望されている。

以上のような状況に鑑み、本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、a）MIF と特異的に結合する 1,3-ベンゾチアジノン誘導体が MIF の N 末端付近に結合すること、b）MIF が、MIF と結合する該誘導体の存在下で、ARE を活性化すること、c）MIF が、ARE を活性化することなどを見出した。これらの知見に基づいて

さらに検討を重ね、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、

〔１〕MIF またはその改変体を含有してなるARE活性化剤（または組成物）、

〔２〕MIF が、配列番号：１または配列番号：７で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記〔１〕記載の剤、

〔２a〕MIF の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記〔１〕記載の剤、

〔２ｂ〕MIF の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列と９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩であって、ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用を有するものである上記〔１〕記載の剤、

〔２ｃ〕MIF の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列において、１～数個（例えば、１～６個）のアミノ酸が欠失、置換および／または付加したアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩であって、ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用を有するものである上記〔１〕記載の剤、

〔３〕MIF の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のＮ端側、３２番目付近（例えば、２２～４２番目、より好ましくは２７～３７番目、さらに好ましくは３０～３４番目）、６４番目付近（例えば、５４～７４番目、より好ましくは５９～６９番目、さらに好ましくは６２～６６番目）、９５番目付近（例えば、８５～９６番目、より好ましくは９０～９６番目、さらに好ましくは９３～９６番目）および９７番目付近（例えば、９７～１０７番目、より好ましくは９７～１０２番目、さらに好ましくは９７～９９番目）から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸が欠失、付加または（および）置換された改変体である上記〔１〕記載の剤、

〔４〕Ｎ端側が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列の第１～５番目のアミノ酸配列である上記〔３〕記載の剤、

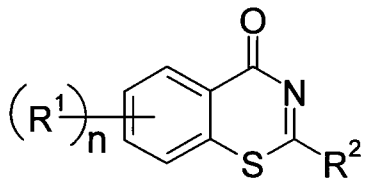
〔５〕MIF またはその改変体と、MIF に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなるARE活性化剤、

〔５a〕物質が、抗MIF抗体である、上記〔５〕記載の剤、

〔6〕物質が、MIF を活性化する能力を有する物質である上記〔5〕記載の剤、

〔7〕物質が、1，3－ベンゾチアジノン誘導体である上記〔5〕記載の剤、

〔8〕1，3－ベンゾチアジノン誘導体が、式



〔式中、R^1 は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノ、

R^2 は置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基または置換基を有していてもよいアミノ、

nは1または2を示す〕で表される化合物またはその塩である上記〔7〕記載の剤、

〔9〕MIF の改変体を含有してなる細胞死抑制剤、

〔10〕MIF が、配列番号：1または配列番号：7で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である上記〔9〕記載の剤、

〔10a〕MIF の改変体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である上記〔9〕記載の剤、

〔10b〕MIF の改変体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列と95％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩であって、ARE活性化作用または／および細胞死抑制作用を有するものである上記〔9〕記載の剤、

〔10c〕MIF の改変体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列において、1～数個（例えば、1～6個）のアミノ酸が欠失、置換および／または付加したアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩であって、ARE活性化作用または／および細胞死抑制作用を有するものである上記〔9〕記載の剤、

〔11〕MIF の改変体が、配列番号：1で表されるアミノ酸配列のN端側、32番目付近（例えば、22～42番目、より好ましくは27～37番目、さらに

好ましくは３０～３４番目）、６４番目付近（例えば、５４～７４番目、より好ましくは５９～６９番目、さらに好ましくは６２～６６番目）、９５番目付近（例えば、８５～９６番目、より好ましくは９０～９６番目、さらに好ましくは９３～９６番目）および９７番目付近（例えば、９７～１０７番目、より好ましくは９７～１０２番目、さらに好ましくは９７～９９番目）から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸が欠失、付加または（および）置換された改変体である上記〔９〕記載の剤、

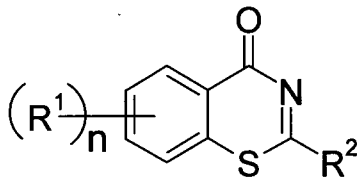
〔１２〕N端側が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列の第１～５番目のアミノ酸配列である上記〔１１〕記載の剤、

〔１３〕MIF またはその改変体と、MIF に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなる細胞死抑制剤、

〔１４〕物質が、マクロファージ遊走阻止因子を活性化する能力を有する物質である上記〔１３〕記載の剤、

〔１５〕物質が、１，３－ベンゾチアジノン誘導体である請求項〔１３〕記載の剤、

〔１６〕１，３－ベンゾチアジノン誘導体が、式



〔式中、R^1 は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノ、

R^2 は置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基または置換基を有していてもよいアミノ、

ｎは１または２を示す〕で表される化合物またはその塩である上記〔１５〕記載の剤、

〔１７〕循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤である上記〔１〕～〔１６〕のいずれかに

記載の剤、

〔１８〕MIFを改変することを特徴とするAREの活性化方法、

〔１９〕MIFを改変することを特徴とする細胞死抑制方法、

〔２０〕MIFを改変することを特徴とする循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法、

〔２１〕マクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせることを特徴とする循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法、

〔２２〕Antioxidant response element活性化剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体の使用、

〔２３〕Antioxidant response element活性化剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせた使用、

〔２４〕細胞死抑制剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子の改変体の使用、

〔２５〕細胞死抑制剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体およびマクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質の使用、

〔２６〕循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病を予防・治療する医薬を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体の使用、

〔２７〕循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病を予防・治療する医薬を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体およびマクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質の使用などに関する。

(a) MIFまたはその改変体はARE活性化剤として、(b) MIFまたはその改変体と、MIFに結合する能力を有する物質（例、1,3-ベンゾチアジノン誘導体、抗体など）との組み合わせはARE活性化剤として、安全で優れた細胞死抑制剤、例えば循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾

患、癌、糖尿病等の予防・治療剤として有用である。

図面の簡単な説明

図１は、ラット MIF と化合物 A の結合結果を示す。図中、縦軸は表面プラズモン共鳴シグナル（レゾナンスユニット）を、横軸は時間（秒）を示す。

図２は、hMIF と化合物 A および hMIF-P1S と化合物 A の結合結果を示す。図中、縦軸は表面プラズモン共鳴シグナル（レゾナンスユニット）を、横軸は時間（秒）を示す。

図３は、ラット MIF の化合物 B 存在下における ARE 活性化作用の結果を示す。図中、縦軸はルシフェラーゼの発光量を、横軸はラット MIF および化合物 B の量（培養液中濃度）を示す。

図４は、ラット MIF と化合物 A または化合物Ｃの結合結果の比較を示す。図中、縦軸は表面プラズモン共鳴シグナル（レゾナンスユニット）を、横軸は時間（秒）を示す。

図５は、hMIF と化合物 A、hMIF-P1S と化合物 A および His-hMIF と化合物 A の結合結果の比較を示す。図中、縦軸は表面プラズモン共鳴シグナル（レゾナンスユニット）を、横軸は時間（秒）を示す。

図６は、ラット MIF の GST Ya または HO-1 発現誘導作用を示す。図中、縦軸は GST Ya 又は HO-1 の mRNA 量を、横軸はラット MIF 量（培養液中濃度）を示す。

１．本発明で用いられる MIF またはその改変体

本発明で用いられるマクロファージ遊走阻止因子（MIF）としては、配列番号：１（hMIF）または配列番号７（rMIF）で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩などが挙げられる。 MIF の改変体としては、配列番号：１又は配列番号：７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩などが挙げられる。配列番号：１又は配列番号：７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質は、配列番号：１または配列番号：７で表されるアミノ酸配列と約５０％

以上、好ましくは７０％以上、好ましくは８０％以上、好ましくは９０％以上、好ましくは９５％以上の相同性を有するアミノ酸配列を含有し、ＭＩＦと同様の生理活性（ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用）を有するものを含む。

また、配列番号：１又は配列番号：７で表されるアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を含有するタンパク質は、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～５）個）のアミノ酸が欠失し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～６）個）のアミノ酸が付加し、または、そのアミノ酸配列に１または２個以上（好ましくは１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～６）個）のアミノ酸が挿入され、または、そのアミノ酸配列中の１または２個以上（好ましくは１～２０個程度、より好ましくは１～１０個程度、さらに好ましくは数（１～６）個）のアミノ酸が他のアミノ酸で置換されていてもよいタンパク質であって、ＭＩＦと同様の生理活性（ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用）を有するものを含む。

MIF の改変体としては、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のＮ端側（例、第１～５番目のアミノ酸配列など）、３２番目付近（例えば、２２～４２番目、より好ましくは２７～３７番目、さらに好ましくは３０～３４番目）、６４番目付近（例えば、５４～７４番目、より好ましくは５９～６９番目、さらに好ましくは６２～６６番目）、９５番目付近（例えば、８５～９６番目、より好ましくは９０～９６番目、さらに好ましくは９３～９６番目）および９７番目付近（例えば、９７～１０７番目、より好ましくは９７～１０２番目、さらに好ましくは９７～９９番目）から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸（例えば１～１０個、好ましくは１～５個、より好ましくは１または２個のアミノ酸）が欠失、付加または（および）置換された改変体などが挙げられる。 MIF と結合する物質が MIF の N 末端（Pro）付近に結合すること、MIF が MIF と結合し得る物質の存在下で ARE を活性化すること、MIF の 1 位 Pro は、32 位 Lys、64 位 Ile、95 位 Tyr、97 位 Asn と疎水性ポケットを形成し種々の化合物と結合することが報

告されている（Expert Opin. Ther. Targets, 7巻, 153-164頁,2003年）ことから、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のＮ端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近のアミノ酸は、ＡＲＥ活性化に密接に関連していることが考えられる。従って、上記部分のアミノ酸のうち、少なくとも一つのアミノ酸が欠失、付加または（および）置換されたＭＩＦ改変体は、有意なＡＲＥ活性化作用、細胞死抑制作用を有する可能性があると考えられる。

なお、これに限定されるわけではないが、以下の同一群に含まれるアミノ酸残基は一般的に相互に置換可能である。

（第１群）ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、o-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニンおよびシクロヘキシルアラニン

（第２群）アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸および2-アミノスベリン酸

（第３群）アスパラギンおよびグルタミン

（第４群）リジン、アルギニン、オルニチン、2,4-ジアミノブタン酸および2,3-ジアミノプロピオン酸

（第５群）プロリン、3-ヒドロキシプロリン、および4-ヒドロキシプロリン

（第６群）セリン、スレオニンおよびホモセリン

（第７群）フェニルアラニンおよびチロシン

したがって、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のＮ端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近におけるアミノ酸が上記第１群～第７群に記載の置換可能なアミノ酸で置換されたアミノ酸配列を有する MIF の改変体は、本発明において好ましく用いることができる。

また、本発明で用いることができるMIFの改変体は、所望の薬理活性（ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用）を有する限り、配列番号：１で表されるアミノ酸配列において、そのＮ端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近のアミノ酸以外を変異させることもできる。このようなMIFの改変体としては、例えば、配列番号：１で表されるアミノ酸配列において、そのＮ端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近の

アミノ酸以外の配列部分において、１～複数個（例えば、１～１０個、好ましくは１～数個（例えば、１～６個）、さらに好ましくは１又は２個）のアミノ酸が欠失、置換、付加及び／又は挿入したアミノ酸配列を有するタンパク質が挙げられる。

さらに、MIFの改変体としては、MIFと特異的に結合する物質（例、1,3-ベンゾチアジノン誘導体、抗MIF抗体など）がMIFと結合している状態のMIFなども含まれる。

MIF およびその改変体は、市販品を購入してもよく、あるいは自体公知の方法またはそれに準じた方法により製造できる。例えば、本発明で用いられる MIF またはその改変体は、公知の遺伝子工学的手法（例えば、後述の実施例、参考例、実験例などの記載を参照）、公知のタンパク質・ペプチド合成法などを用いて製造することができる。公知のタンパク質・ペプチドの合成法は、例えば、固相合成法、液相合成法などを含む（（i）M. Bodanszky および M.A. Ondetti、ペプチド・シンセシス (Peptide Synthesis), Interscience Publishers, New York (1966 年)；（ii）Schroeder および Luebke、ザ・ペプチド(The Peptide), Academic Press, New York (1965 年)；（iii）泉屋信夫他、ペプチド合成の基礎と実験、丸善(株)（1975 年）；（iv）矢島治明 および榊原俊平、生化学実験講座 1、 タンパク質の化学 IV、205、(1977 年)；（v）矢島治明監修、続医薬品の開発、第 14 巻、ペプチド合成、広川書店、など参照）。

また、反応後は通常の精製法、例えば、溶媒抽出・蒸留・カラムクロマトグラフィー・液体クロマトグラフィー・再結晶などを組み合わせて本発明のタンパク質・ペプチドを精製単離することができる。上記方法で得られるタンパク質・ペプチドが遊離体である場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって適当な塩に変換することができるし、逆に塩で得られた場合は、公知の方法あるいはそれに準じる方法によって遊離体または他の塩に変換することができる。なお、MIF およびその改変体は、ＡＲＥ活性化作用または／および細胞死抑制作用を有している限り、公知の方法により、糖鎖修飾、リン酸化、カルボニル化、ユビキチン化、アセチル化、メチル化、脂質修飾等されていてもよい。

2．MIF 又はその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなる ARE 活性化剤

本発明は、MIF 又はその改変体と MIF に結合する能力を有する物質（以下、結合物質ともいう。）とを組み合わせてなる ARE 活性化剤をも包含する。

MIF 又はその改変体としては、上述の MIF 又はその改変体を用いることができる。MIF 又はその改変体と結合物質とを組み合わせてなる ARE 活性化剤においては、配列番号：１または７で表される MIF 又はその改変体の１番目のアミノ酸がＰｒｏであることが好ましく、さらに、配列番号１または７で表される MIF 又はその改変体のＮ末端のアミノ酸がＰｒｏであることが好ましい。

MIF 又はその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなるとは、MIF 又はその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とが、共有結合している場合のほか、疎水的、電気的、イオン的に相互に影響する状態で結合していることをも意味する。

（MIF 又はその改変体に結合または活性化する能力を有する物質）

MIF 又はその改変体に結合する能力を有する物質としては、MIF 又はその改変体に結合する能力を有する物質であればいずれでもよく、MIF 又はその改変体の機能を調節する物質であってもよい。例えば、MIF を活性化する能力を有する物質などが挙げられる。

MIF に結合する能力を有する物質としては、例えば、置換基を有していてもよい５～８員の環状化合物であって環を構成する原子に少なくとも一つの炭素原子を含む化合物、各々が５～８員である置換基を有していてもよい２環性化合物であって環を構成する原子に少なくとも一つの炭素原子を含む化合物などが挙げられる。ここで、置換基としては、1,3-ベンゾチアジノン誘導体の式中R^1又はR^2における置換基と同様のものが挙げられる。

MIF に結合する能力を有する物質としては、例えば、（a）MIF に対する抗体、（b）1,3-ベンゾチアジノン誘導体などが挙げられる。

結合物質としては、1,3-ベンゾチアジノン誘導体である場合が好ましい。また、結合物質が 1,3-ベンゾチアジノン誘導体である場合には、上述のように配列番号：１または７で表される MIF 又はその改変体の１番目のアミノ酸がＰｒｏで

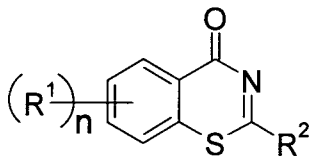
あることが好ましく、さらに、配列番号１または７で表される MIF 又はその改変体のN末端のアミノ酸がＰｒｏであることが好ましい。

MIF を活性化する能力を有する物質としては、例えば、（b）1,3-ベンゾチアジノン誘導体などが挙げられる。

MIF に対する抗体としては、MIF に特異的に反応するものであればよく、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、好ましくはモノクローナル抗体が挙げられる。該抗体は、MIF を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

(1,3-ベンゾチアジノン誘導体)

1,3-ベンゾチアジノン誘導体としては、式



(I)

〔式中、R^1 は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノ、

R^2 は置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基または置換基を有していてもよいアミノ、

nは１または２を示す〕で表される化合物またはその塩、WO 03/20719 号公報、WO 03/90782 号公報、WO2006-132438 号公報などに記載されている化合物などが挙げられる。

上記式中、R^1 は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノを示す。

R^1 で示される「ハロゲン原子」としては、例えば、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素などが挙げられる。

R^1 で示される「ハロゲン化されていてもよいアルキル」としては、例えば１ないし５個、好ましくは１ないし３個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいアルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イ

ソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC_{1-6}アルキルなど）などが挙げられる。具体例としては、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、２－ブロモエチル、２，２，２－トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、３，３，３－トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、４，４，４－トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、５，５，５－トリフルオロペンチル、ヘキシル、６，６，６－トリフルオロヘキシルなどが挙げられる。

R^1で示される「置換基を有していてもよいアルコキシ」の「アルコキシ」としては、例えば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなどのC_{1-8}アルコキシなどが挙げられる。

R^1で示される「置換基を有していてもよいアルコキシ」の「置換基」としては、後述のR^3で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」などが、１ないし３個置換可能な位置に用いられる。

R^1で示される「アシル」としては、例えば、式：$-(C=O)-R^3$、$-(C=O)-OR^3$、$-(C=O)-NR^3R^4$、$-(C=S)-NHR^3$、$-SO-R^5$、$-SO_2-R^5$ または $-SO_2-NHR^3$〔式中、R^3は水素原子、置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基、R^4は水素原子またはC_{1-6}アルキル、R^5は置換基を有していてもよい炭化水素基または置換基を有していてもよい複素環基を示す〕で表されるアシルなどが挙げられる。

前記式中、R^3で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「炭化水素基」としては、例えば、鎖状または環状炭化水素基（例、アルキル、アルケニル、アルキニル、シクロアルキル、アリール、アラルキルなど）などが挙げられる。このうち、炭素数１ないし１６個の鎖状または環状炭化水素基などが好ましい。

「アルキル」としては、例えばC_{1-6}アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、

ヘキシルなど）などが好ましい。

「アルケニル」としては、例えばC_{2-6}アルケニル（例、ビニル、アリル、イソプロペニル、１－ブテニル、２－ブテニル、３－ブテニル、２－メチル－２－プロペニル、１－メチル－２－プロペニル、２－メチル－１－プロペニルなど）などが好ましい。

「アルキニル」としては、例えば C_{2-6}アルキニル（例、エチニル、プロパルギル、１－ブチニル、２－ブチニル、３－ブチニル、１－ヘキシニルなど）などが好ましい。

「シクロアルキル」としては、例えばC_{3-6}シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが好ましい。

「アリール」としては、例えばC_{6-14}アリール（例、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、２－ビフェニリル、３－ビフェニリル、４－ビフェニリル、２－アンスリルなど）などが好ましい。

「アラルキル」としては、例えばC_{7-16}アラルキル（例、ベンジル、フェネチル、ジフェニルメチル、１－ナフチルメチル、２－ナフチルメチル、２，２－ジフェニルエチル、３－フェニルプロピル、４－フェニルブチル、５－フェニルペンチルなど）などが好ましい。

R^3で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」としては、例えばハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）、C_{1-3}アルキレンジオキシ（例、メチレンジオキシ、エチレンジオキシなど）、ニトロ、シアノ、ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキル、ハロゲン化されていてもよいC_{2-6}アルケニル、カルボキシC_{2-6}アルケニル（例、２－カルボキシエテニル、２－カルボキシ－２－メチルエテニルなど）、ハロゲン化されていてもよいC_{2-6}アルキニル、ハロゲン化されていてもよいC_{3-6}シクロアルキル、C_{6-14}アリール（例、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、２－ビフェニリル、３－ビフェニリル、４－ビフェニリル、２－アンスリルなど）、ハロゲン化されていてもよいC_{1-8}アルコキシ、C_{1-6}アルコキシ－カルボニル－C_{1-6}アルコキシ（例、エトキシカルボニルメチルオキシなど）、ヒドロキシ、C_{6-14}アリールオキシ（例、フェニルオキシ、１－ナフチルオキシ、２－ナ

フチルオキシなど）、C_{7-16}アラルキルオキシ（例、ベンジルオキシ、フェネチルオキシなど）、メルカプト、ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキルチオ、C_{6-14}アリールチオ（例、フェニルチオ、１－ナフチルチオ、２－ナフチルチオなど）、C_{7-16}アラルキルチオ（例、ベンジルチオ、フェネチルチオなど）、アミノ、モノ－C_{1-6}アルキルアミノ（例、メチルアミノ、エチルアミノなど）、モノ－C_{6-14}アリールアミノ（例、フェニルアミノ、１－ナフチルアミノ、２－ナフチルアミノなど）、ジ－C_{1-6}アルキルアミノ（例、ジメチルアミノ、ジエチルアミノ、エチルメチルアミノなど）、ジ－C_{6-14}アリールアミノ（例、ジフェニルアミノなど）、ホルミル、カルボキシ、C_{1-6}アルキル－カルボニル（例、アセチル、プロピオニルなど）、C_{3-6}シクロアルキル－カルボニル（例、シクロプロピルカルボニル、シクロペンチルカルボニル、シクロヘキシルカルボニルなど）、C_{1-6}アルコキシ－カルボニル（例、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、tert-ブトキシカルボニルなど）、C_{6-14}アリール－カルボニル（例、ベンゾイル、１－ナフトイル、２－ナフトイルなど）、C_{7-16}アラルキル－カルボニル（例、フェニルアセチル、３－フェニルプロピオニルなど）、C_{6-14}アリールオキシ－カルボニル（例、フェノキシカルボニルなど）、C_{7-16}アラルキルオキシ－カルボニル（例、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニルなど）、５ないし６員複素環カルボニル（例、ニコチノイル、イソニコチノイル、テノイル、フロイル、モルホリノカルボニル、チオモルホリノカルボニル、ピペラジン－１－イルカルボニル、ピロリジン－１－イルカルボニルなど）、カルバモイル、モノ－C_{1-6}アルキル－カルバモイル（例、メチルカルバモイル、エチルカルバモイルなど）、ジ－C_{1-6}アルキル－カルバモイル（例、ジメチルカルバモイル、ジエチルカルバモイル、エチルメチルカルバモイルなど）、アミノ化されていてもよいC_{1-6}アルキル－カルバモイル、C_{6-14}アリール－カルバモイル（例、フェニルカルバモイル、１－ナフチルカルバモイル、２－ナフチルカルバモイルなど）、５ないし６員複素環カルバモイル（例、２－ピリジルカルバモイル、３－ピリジルカルバモイル、４－ピリジルカルバモイル、２－チエニルカルバモイル、３－チエニルカルバモイルなど）、C_{1-6}アルキル

スルホニル（例、メチルスルホニル、エチルスルホニルなど）、C_{6-14}アリールスルホニル（例、フェニルスルホニル、１－ナフチルスルホニル、２－ナフチルスルホニルなど）、ホルミルアミノ、C_{1-6}アルキル－カルボニルアミノ（例、アセチルアミノなど）、C_{6-14}アリール－カルボニルアミノ（例、ベンゾイルアミノ、ナフトイルアミノなど）、C_{1-6}アルコキシ－カルボニルアミノ（例、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノなど）、C_{1-6}アルキルスルホニルアミノ（例、メチルスルホニルアミノ、エチルスルホニルアミノなど）、C_{6-14}アリールスルホニルアミノ（例、フェニルスルホニルアミノ、２－ナフチルスルホニルアミノ、１－ナフチルスルホニルアミノなど）、C_{1-6}アルキル－カルボニルオキシ（例、アセトキシ、プロピオニルオキシなど）、C_{6-14}アリール－カルボニルオキシ（例、ベンゾイルオキシ、ナフチルカルボニルオキシなど）、C_{1-6}アルコキシ－カルボニルオキシ（例、メトキシカルボニルオキシ、エトキシカルボニルオキシ、プロポキシカルボニルオキシ、ブトキシカルボニルオキシなど）、モノ－C_{1-6}アルキル－カルバモイルオキシ（例、メチルカルバモイルオキシ、エチルカルバモイルオキシなど）、ジ－C_{1-6}アルキル－カルバモイルオキシ（例、ジメチルカルバモイルオキシ、ジエチルカルバモイルオキシなど）、C_{6-14}アリール－カルバモイルオキシ（例、フェニルカルバモイルオキシ、ナフチルカルバモイルオキシなど）、ニコチノイルオキシ、置換基を有していてもよい５ないし７員飽和環状アミノ、５ないし１０員芳香族複素環基（例、２－チエニル、３－チエニル、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、２－キノリル、３－キノリル、４－キノリル、５－キノリル、８－キノリル、１－イソキノリル、３－イソキノリル、４－イソキノリル、５－イソキノリル、１－インドリル、２－インドリル、３－インドリル、２－ベンゾチアゾリル、２－ベンゾ［ｂ］チエニル、３－ベンゾ［ｂ］チエニル、２－ベンゾ［ｂ］フラニル、３－ベンゾ［ｂ］フラニルなど）、スルホなどが挙げられる。

該「炭化水素基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に１ないし５個、好ましくは１ないし３個有していてもよく、置換基数が２個以上の場合、各置換基は同一または異なっていてもよい。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいアルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどのC_{1-6}アルキルなど）などが挙げられる。具体例としては、メチル、クロロメチル、ジフルオロメチル、トリクロロメチル、トリフルオロメチル、エチル、2－ブロモエチル、2，2，2－トリフルオロエチル、ペンタフルオロエチル、プロピル、3，3，3－トリフルオロプロピル、イソプロピル、ブチル、4，4，4－トリフルオロブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、5，5，5－トリフルオロペンチル、ヘキシル、6，6，6－トリフルオロヘキシルなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{2-6}アルケニル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいC_{2-6}アルケニル（例、ビニル、プロペニル、イソプロペニル、2－ブテン－1－イル、4－ペンテン－1－イル、5－ヘキセン－1－イルなど）などが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{2-6}アルキニル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいC_{2-6}アルキニル（例、2－ブチン－1－イル、4－ペンチン－1－イル、5－ヘキシン－1－イルなど）などが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{3-6}シクロアルキル」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいC_{3-6}シクロアルキル（例、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシルなど）などが挙げられる。具体例としては、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、シクロヘキシル、4，4－ジクロロシクロヘキシル、2，2，3，3－テトラフルオロシクロペンチル、4－クロロシクロヘキシルなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{1-8}アルコキシ」としては、例えば1ないし5個、好ましくは1ないし3個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、

ヨウ素など）を有していてもよいC_{1-8}アルコキシ（例、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど）などが挙げられる。具体例としては、例えばメトキシ、ジフルオロメトキシ、トリフルオロメトキシ、エトキシ、２，２，２－トリフルオロエトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、４，４，４－トリフルオロブトキシ、イソブトキシ、sec-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなどが挙げられる。

前記「ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキルチオ」としては、例えば１ないし５個、好ましくは１ないし３個のハロゲン原子（例、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素など）を有していてもよいC_{1-6}アルキルチオ（例、メチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、sec-ブチルチオ、tert-ブチルチオなど）などが挙げられる。具体例としては、メチルチオ、ジフルオロメチルチオ、トリフルオロメチルチオ、エチルチオ、プロピルチオ、イソプロピルチオ、ブチルチオ、４，４，４－トリフルオロブチルチオ、ペンチルチオ、ヘキシルチオなどが挙げられる。

前記「置換基を有していてもよい５ないし７員飽和環状アミノ」の「５ないし７員飽和環状アミノ」としては、例えば、１個の窒素原子と炭素原子以外に、窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１または２種、１ないし４個のヘテロ原子を含んでいてもよい５ないし７員飽和環状アミノが挙げられ、具体例としては、ピロリジン－１－イル、ピペリジノ、ピペラジン－１－イル、モルホリノ、チオモルホリノ、テトラヒドロアゼピン－１－イルなどが挙げられる。

該「置換基を有していてもよい５ないし７員飽和環状アミノ」の「置換基」としては、例えばC_{1-6}アルキル（例、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなど）、C_{6-14}アリール（例、フェニル、１－ナフチル、２－ナフチル、２－ビフェニリル、３－ビフェニリル、４－ビフェニリル、２－アンスリルなど）、C_{1-6}アルキル－カルボニル（例、アセチル、プロピオニルなど）、５ないし１０員芳香族複素環基（例、２－チエニル、３－チエニル、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、２－キノリル、３－キノリル、４－キノリル、５－キノリル、

８－キノリル、１－イソキノリル、３－イソキノリル、４－イソキノリル、５－イソキノリル、１－インドリル、２－インドリル、３－インドリル、２－ベンゾチアゾリル、２－ベンゾ［ｂ］チエニル、３－ベンゾ［ｂ］チエニル、２－ベンゾ［ｂ］フラニル、３－ベンゾ［ｂ］フラニルなど）、オキソなどが１ないし３個挙げられる。

R^3 で示される「置換基を有していてもよい複素環基」の「複素環基」としては、例えば、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１または２種、１ないし４個のヘテロ原子を含む５ないし１４員（単環、２環または３環式）複素環、好ましくは（i）５ないし１４員（好ましくは５ないし１０員）芳香族複素環、（ii）５ないし１０員非芳香族複素環または（iii）７ないし１０員複素架橋環から任意の１個の水素原子を除いてできる１価基などが挙げられる。

上記「５ないし１４員（好ましくは５ないし１０員）の芳香族複素環」としては、例えば、チオフェン、ベンゾ［ｂ］チオフェン、ベンゾ［ｂ］フラン、ベンズイミダゾール、ベンズオキサゾール、ベンゾチアゾール、ベンズイソチアゾール、ナフト［２，３－ｂ］チオフェン、フラン、ピロール、イミダゾール、ピラゾール、ピリジン、ピラジン、ピリミジン、ピリダジン、インドール、イソインドール、１Ｈ－インダゾール、プリン、４Ｈ－キノリジン、イソキノリン、キノリン、フタラジン、ナフチリジン、キノキサリン、キナゾリン、シンノリン、カルバゾール、β－カルボリン、フェナントリジン、アクリジン、フェナジン、チアゾール、イソチアゾール、フェノチアジン、イソオキサゾール、フラザン、フェノキサジンなどの芳香族複素環、またはこれらの環（好ましくは単環）が１ないし複数個（好ましくは１または２個）の芳香環（例、ベンゼン環等）と縮合して形成された環などが挙げられる。

上記「５ないし１０員非芳香族複素環」としては、例えば、ピロリジン、イミダゾリン、ピラゾリジン、ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、モルホリン、チオモルホリン、ジオキサゾール、オキサジアゾリン、チアジアゾリン、トリアゾリン、チアジアゾール、ジチアゾールなどが挙げられる。

上記「７ないし１０員複素架橋環」としては、例えば、キヌクリジン、７－ア

ザビシクロ［２．２．１］ヘプタンなどが挙げられる。

該「複素環基」として好ましくは、炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１または２種、好ましくは、１ないし４個のヘテロ原子を含む５ないし１４員（好ましくは５ないし１０員）の（単環または２環式）複素環基である。具体的には、例えば２－チエニル、３－チエニル、２－フリル、３－フリル、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、２－キノリル、３－キノリル、４－キノリル、５－キノリル、８－キノリル、１－イソキノリル、３－イソキノリル、４－イソキノリル、５－イソキノリル、ピラジニル、２－ピリミジニル、４－ピリミジニル、３－ピロリル、２－イミダゾリル、３－ピリダジニル、３－イソチアゾリル、３－イソオキサゾリル、１－インドリル、２－インドリル、３－インドリル、２－ベンゾチアゾリル、２－ベンゾ［ｂ］チエニル、３－ベンゾ［ｂ］チエニル、２－ベンゾ［ｂ］フラニル、３－ベンゾ［ｂ］フラニルなどの芳香族複素環基、例えば１－ピロリジニル、２－ピロリジニル、３－ピロリジニル、２－イミダゾリニル、４－イミダゾリニル、２－ピラゾリジニル、３－ピラゾリジニル、４－ピラゾリジニル、ピペリジノ、２－ピペリジル、３－ピペリジル、４－ピペリジル、１－ピペラジニル、２－ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどの非芳香族複素環基などである。

このうち、例えば炭素原子以外に窒素原子、硫黄原子および酸素原子から選ばれる１ないし３個のヘテロ原子を含む５ないし６員の複素環基等がさらに好ましい。具体的には、２－チエニル、３－チエニル、２－ピリジル、３－ピリジル、４－ピリジル、２－フリル、３－フリル、ピラジニル、２－ピリミジニル、３－ピロリル、３－ピリダジニル、３－イソチアゾリル、３－イソオキサゾリル、１－ピロリジニル、２－ピロリジニル、３－ピロリジニル、２－イミダゾリニル、４－イミダゾリニル、２－ピラゾリジニル、３－ピラゾリジニル、４－ピラゾリジニル、ピペリジノ、２－ピペリジル、３－ピペリジル、４－ピペリジル、１－ピペラジニル、２－ピペラジニル、モルホリノ、チオモルホリノなどが挙げられる。

該「置換基を有していてもよい複素環基」の「置換基」としては、例えば前記R^3で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」と同様の

ものなどが挙げられる。

該「複素環基」は、例えば上記置換基を、置換可能な位置に１ないし５個、好ましくは１ないし３個有していてもよく、置換基数が２個以上の場合、各置換基は同一または異なっていてもよい。

R^4 で示される「C_{1-6} アルキル」としては、例えば、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられる。

R^5 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」および「置換基を有していてもよい複素環基」としては、例えば前記R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」および「置換基を有していてもよい複素環基」がそれぞれ挙げられる。

R^1 で示される「置換基を有していてもよいアミノ」の「置換基」としては、前記のR^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」の「置換基」などが、１ないし２個挙げられる。

R^1 の具体例としては、（1）水素原子、（2）ハロゲン原子、（3）ヒドロキシ、（4）ハロゲン化されていてもよいC_{1-6} アルキル、（5）カルボキシ、ヒドロキシ、C_{1-6} アルコキシーカルボニルおよびC_{6-10} アリールから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6} アルコキシ、（6）C_{1-6} アルキルーカルバモイル、（7）C_{3-6} シクロアルキルーカルバモイル、（8）５または６員飽和環状アミノーカルボニルなどが挙げられる。

R^1 として好ましくは、水素原子、ハロゲン原子、ハロゲン化されていてもよいアルキル（好ましくはC_{1-6} アルキル）またはハロゲン化されていてもよいアルコキシ（好ましくはC_{1-6} アルコキシ）などが挙げられる。特に好ましくは水素原子である。

R^2 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」および「置換基を有していてもよい複素環基」としては、例えば前記R^3 で示される「置換基を有していてもよい炭化水素基」および「置換基を有していてもよい複素環基」がそれぞれ挙げられる。

R^2 で示される「置換基を有していてもよいアミノ」としては、前記のR^1 で

示される「置換基を有していてもよいアミノ」が挙げられる。

R^2 として好ましくは、(1) ハロゲン原子、

(2) (i) ハロゲン原子、(ii) ヒドロキシ、(iii) カルボキシ、(iv) シアノ、(v) カルボキシーC_{1-6}アルコキシ、(vi) C_{1-6}アルコキシーC_{1-6}アルコキシ、(vii) C_{1-6}アルコキシーカルボニルーC_{1-6}アルコキシ、(viii) C_{1-6}アルキルーカルボニルオキシ、(ix) C_{1-6}アルコキシーカルボニル、(x) (a) カルボキシを有していてもよいモノーまたはジーC_{1-6}アルキル、(b) C_{1-6}アルキルスルホニルおよび (c) C_{6-10}アリールスルホニルから選ばれる1または2個の置換基を有していてもよいカルバモイル、(xi) カルボキシを有していてもよい5または6員飽和環状アミノーカルボニル、(xii) C_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルキルチオ、(xiii) C_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルキルスルフィニル、(xiv) C_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルキルスルホニル、(xv) C_{7-12}アラルキルチオ、(xvi) C_{7-12}アラルキルスルフィニル、(xvii) C_{7-12}アラルキルスルホニル、(xviii) 5または6員芳香族複素環ーチオ、(xix) (a) C_{1-6}アルキル、(b) C_{1-6}アルコキシーカルボニル、(c) ハロゲン化されていてもよいC_{1-6}アルキルーカルボニル、(d) C_{6-10}アリールーカルボニル、(e) チエニルカルボニル、(f) C_{1-6}アルキルチオーC_{1-6}アルキルーカルボニル、(g) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルーカルバモイル、(h) C_{1-6}アルキルスルホニル、(i) C_{6-10}アリールスルホニル、(j) ジーC_{1-6}アルキルホスホノ、(k) ジーC_{1-6}アルキルチオホスホノおよび (l) C_{6-10}アリールーカルバモイルから選ばれる1または2個の置換基を有していてもよいアミノ、(xx) フタルイミド、(xxi) C_{1-6}アルキルスルホニルオキシ、(xxii) 5または6員芳香族複素環基、(xxiii) C_{1-6}アルキルを有していてもよいホスホノ、(xxiv) (a) C_{7-12}アラルキル、(b) ハロゲン化されていてもよいC_{6-10}アリールおよび (c) ヒドロキシから選ばれる1または2個の置換基を有していてもよい5ないし7員飽和環状アミノおよび (xxv) 5ないし7員環状アミノーカルボニルから選ばれる1～5個の置換基を有していても

よいC_{1-6}アルキル、

(3) カルボキシまたはC_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルケニル、

(4) C_{1-6}アルコキシを有していてもよいC_{6-10}アリール、

(5) C_{1-6}アルコキシ、C_{1-6}アルコキシーカルボニル、フタルイミド、ジーC_{1-6}アルキルスルホンアミドおよびジーC_{1-6}アルキルアミノメチレンスルホンアミドから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルコキシ、

(6) C_{1-6}アルキルチオを有していてもよいC_{6-10}アリールオキシ、

(7) C_{7-12}アラルキルオキシ、

(8) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノ、カルボキシ、カルバモイルおよびC_{1-6}アルコキシーカルボニルから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルキルチオ、

(9) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノ、カルボキシ、カルバモイルおよびC_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルキルスルフィニル、

(10) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノ、カルボキシおよびC_{1-6}アルコキシーカルボニルから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルキルスルホニル、

(11) ハロゲン原子、C_{1-6}アルキルおよびC_{1-6}アルコキシーカルボニルから選ばれる置換基を有していてもよいC_{6-10}アリールチオ、

(12) C_{1-6}アルキルを有していてもよいC_{6-10}アリールスルフィニル、

(13) C_{1-6}アルキルを有していてもよいC_{6-10}アリールスルホニル、

(14) カルボキシ、

(15) C_{1-6}アルコキシーカルボニル、

(16) C_{7-12}アラルキルチオ、

(17) C_{7-12}アラルキルスルフィニル、

(18) C_{7-12}アラルキルスルホニル、

(19) C_{1-6}アルキル、C_{7-12}アラルキル、C_{1-6}アルコキシーC_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルコキシーカルボニル、C_{1-6}アルコキシーカルボニル

－C_{1-6}アルキル、カルボキシ－C_{1-6}アルキル、C_{1-6}アルキル－カルボニル、C_{6-10}アリール－カルボニル、C_{3-6}シクロアルキル－カルボニル、チエニルカルボニル、フリルカルボニルおよびモノ－またはジ－C_{1-6}アルキルアミノ－カルボニルから選ばれる１～２個の置換基を有していてもよいアミノ、

(20) (i) ハロゲン化されていてもよいC_{6-10}アリール、(ii) C_{7-12}アラルキル、(iii) ヒドロキシ、(iv) C_{1-6}アルコキシ－カルボニルまたはカルボキシを有していてもよいC_{1-6}アルキル、(v) オキソ、(vi) C_{1-6}アルキル－カルボニル、(vii) C_{6-10}アリール－カルボニルおよび(viii) C_{1-6}アルコキシ－カルボニルから選ばれる置換基を有していてもよい５ないし７員飽和環状アミノ、

(21) (i) ハロゲン原子、C_{1-6}アルコキシ、アミノ、C_{1-6}アルコキシ－カルボキサミドおよびヒドロキシから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルキル、(ii) C_{7-12}アラルキルおよび(iii) モノ－またはジ－C_{1-6}アルキルアミノ－カルボニルから選ばれる置換基を有していてもよいカルバモイル、

(22) ５ないし７員環状アミノ－カルボニル、

(23) C_{1-6}アルキルを有していてもよい５または６員芳香族複素環基、

(24) シアノ、

(25) C_{1-6}アルキルを有していてもよい５ないし１０員芳香族複素環基－チオ、

(26) C_{1-6}アルキルカルボニル、および

(27) オキソから選ばれる１ないし３個の置換基をそれぞれ有している芳香族複素環〔例、ピリジル、フリル、チエニル、ピロリル、キノリル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリル、テトラヒドロキノリルまたはチアゾリル（好ましくはピリジルさらに好ましくは２－または４－ピリジル）〕などが挙げられる。該ピリジルは、Ｎ－オキシド化されていてもよい。該ピリジルの置換基としては、アミノ化されていてもよいC_{1-6}アルキル－カルボニルが好ましい。

さらに好ましくは、R^2は、(1) C_{1-6}アルコキシーカルボニルーC_{1-6}アルコキシ、カルボキシーC_{1-6}アルコキシ、カルボキシ、C_{1-6}アルコキシーカルボニルおよびC_{1-6}アルキルスルホニルオキシから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルキル、(2) カルボキシまたはC_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルケニル、(3) モノーもしくはジーC_{1-6}アルキルアミノまたはC_{1-6}アルコキシーカルボニルを有していてもよいC_{1-6}アルキルチオ、(4) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノを有していてもよいC_{1-6}アルキルスルフィニル、(5) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノを有していてもよいC_{1-6}アルキルスルホニル、(6) C_{7-12}アラルキルチオ、(7) C_{7-12}アラルキルスルフィニル、(8) C_{7-12}アラルキルスルホニル、(9) (i) ハロゲン原子、C_{1-6}アルコキシおよびアミノから選ばれる置換基を有していてもよいC_{1-6}アルキル、(ii) C_{7-12}アラルキルおよび(iii) モノーまたはジーC_{1-6}アルキルアミノーカルボニルから選ばれる置換基を有していてもよいカルバモイルおよび(10) 5ないし7員環状アミノーカルボニルから1ないし3個選ばれる置換基をそれぞれ有しているピリジル、フリル、チエニル、ピロリル、キノリル、ピラジニル、ピリミジニル、ピリダジニル、インドリル、テトラヒドロキノリルまたはチアゾリル(好ましくはピリジル、さらに好ましくは2ーまたは4ーピリジル)などが挙げられる。該ピリジルは、Nーオキシド化されていてもよい。該ピリジルの置換基としては、アミノ化されていてもよいC_{1-6}アルキルーカルボニルが好ましい。

式(I)で表される化合物の「塩」としては、薬学的に許容される塩が好ましく、例えば無機塩基との塩、有機塩基との塩、無機酸との塩、有機酸との塩、塩基性または酸性アミノ酸との塩などが挙げられる。無機塩基との塩の好適な例としては、例えばナトリウム塩、カリウム塩などのアルカリ金属塩;カルシウム塩、マグネシウム塩などのアルカリ土類金属塩;アルミニウム塩;アンモニウム塩などが挙げられる。有機塩基との塩の好適な例としては、例えばトリメチルアミン、トリエチルアミン、ピリジン、ピコリン、エタノールアミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン、ジシクロヘキシルアミン、N,N'-ジベンジルエチレ

ンジアミンなどとの塩が挙げられる。無機酸との塩の好適な例としては、例えば塩酸、臭化水素酸、硝酸、硫酸、リン酸などとの塩が挙げられる。有機酸との塩の好適な例としては、例えばギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸、フマール酸、シュウ酸、酒石酸、マレイン酸、クエン酸、コハク酸、リンゴ酸、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、ｐ－トルエンスルホン酸などとの塩が挙げられる。塩基性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアルギニン、リジン、オルニチンなどとの塩が挙げられ、酸性アミノ酸との塩の好適な例としては、例えばアスパラギン酸、グルタミン酸などとの塩が挙げられる。

式（I）で表される化合物が、コンフィギュレーショナル　アイソマー（配置異性体）、ジアステレオマー、コンフォーマーなどとして存在する場合には、所望により、前記の分離、精製手段によりそれぞれを単離することができる。また、式（I）で表される化合物がラセミ体である場合には、通常の光学分割手段によりＳ体およびＲ体に分離することができる。

式（I）で表される化合物に立体異性体が存在する場合には、この異性体が単独の場合およびそれらの混合物の場合も本発明に含まれる。

式（I）で表される化合物は、市販品を購入してもよく、あるいは自体公知の方法またはそれに準じた方法により製造できる。なお、上記のような1,3-ベンゾチアジノン誘導体およびその製造法法の詳細については、例えば、WO 03/20719号公報、WO 03/90782号公報、WO2006-132438号公報などを参照することができる。

（MIFまたはその改変体の薬理作用、治療用途など）

MIF またはその改変体は、細胞保護因子（例、ヘムオキシゲナーゼ－１（Heme oxygenase-1）など）の発現を誘導し、ARE 活性化作用を有していることより、細胞死を抑制することができる。さらには薬物（例、抗癌剤、HMG-CoA 還元酵素阻害薬など）による副作用を軽減することもできる。MIF またはその改変体と結合物質とを組み合わせてなる ARE 活性剤は、細胞保護因子（例、ヘムオキシゲナーゼ－１（Heme oxygenase-1）など）の発現を誘導し、ARE 活性化作用を有していることより、細胞死を抑制することができる。さらには薬

物（例、抗癌剤、HMG-CoA 還元酵素阻害薬など）による副作用を軽減することもできる。

また、MIF またはその改変体は、ARE 活性化作用を有していることより、細胞保護因子（例、ヘムオキシゲナーゼ－１（Heme oxygenase-1）など）の発現を誘導し、細胞死を抑制することができる。さらには薬物（例、抗癌剤、HMG-CoA 還元酵素阻害薬など）による副作用を軽減することもできる。MIF またはその改変体と結合物質とを組み合わせてなる ARE 活性剤は、ARE 活性化作用を有していることより、細胞保護因子（例、ヘムオキシゲナーゼ－１（Heme oxygenase-1）など）の発現を誘導し、細胞死を抑制することができる。さらには薬物（例、抗癌剤、HMG-CoA 還元酵素阻害薬など）による副作用を軽減することもできる。 これより、（a）MIF またはその改変体、（b）MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質との組み合わせは、安全で低毒性な ARE 活性化剤（例、ARE 遺伝子の発現促進剤、ARE タンパク質の発現促進剤、ARE タンパク質の活性促進剤、ARE 制御下遺伝子（例、ヘムオキシゲナーゼ－１（Heme oxygenase-1）、Liver glutathione S-transferase Ya subunit、Liver glutathione S-transferase Yc subunit、Glutathione S-transferase Yb subunit 、 Glutathione S-transferase Yc1 subunit 、 Gammma-glutamylcysteine synthetase 、 NAD(P)H:quinone reductase 、 UDP-glucuronosyltransferase, exon 1 、 Bilirunin-specific UDP-glucuronosyltransferase、NAD(P)H-menadione oxidereductase など）発現促進剤、ARE 制御下遺伝子タンパク質（遺伝子産物）の産生亢進（促進）剤または活性促進剤など）、細胞死抑制剤（例、酸化ストレスによる細胞死、血清除去による細胞死、増殖因子の欠乏による細胞死、HMG-CoA 還元酵素阻害薬による細胞死、抗癌剤による細胞死、NO による細胞死、アミロイドβタンパク質による細胞死などの抑制剤）、細胞保護剤などとして、例えば循環器系疾患〔例、心筋症（例、拡張型心筋症、肥大型閉塞性心筋症、肥大型非閉塞性心筋症、特発性心筋症、収縮性心筋症、糖尿病性心筋症など）、心不全（例、慢性心不全、慢性うっ血性心不全、急性心不全、心代償不全、左心不全、右心不全、うっ血性心不全、急性うっ血性心不全、代謝性心不全心、拡張型心不全、高拍出性心不全、

低拍出性心不全、難治性心不全、筋梗塞予後不全など）、狭心症、心筋梗塞、動脈硬化症（動脈瘤、冠動脈硬化症、脳動脈硬化症、末梢動脈硬化症など）、虚血後再灌流障害など〕、骨・関節疾患〔例、慢性関節リウマチ、変形性関節症、変形性膝関節炎など〕、感染症疾患〔例、サイトメガルウイルス、インフルエンザウイルス、ヘルペスウイルス等のウイルス感染症、リケッチア感染症、細菌感染症など〕、炎症性疾患〔例、網膜症、腎症、神経障害、大血管障害等の糖尿病性合併症；リウマチ様脊髄炎、骨膜炎等の関節炎；手術・外傷後の炎症；腫脹の緩解；咽頭炎；膀胱炎；肺炎；アトピー性皮膚炎；クローン病、潰瘍性大腸炎等の炎症性腸疾患；髄膜炎；炎症性眼疾患；肺炎、珪肺、肺サルコイドーシス、肺結核等の炎症性肺疾患など〕、腎疾患〔例、虚血性急性腎不全、溶血性尿毒症症候群、急性尿細管壊死、水腎症、腎炎、糸球体腎炎、糸球体硬化症、腎不全、血栓性微小血管症、移植拒絶腎、透析の合併症、放射線照射による腎症を含む臓器障害など〕、中枢疾患〔例、神経変性疾患（例、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、ポリグルタミン病、筋萎縮性側索硬化症、エイズ脳症など）、中枢神経障害（脳出血および脳梗塞等の障害およびその後遺症・合併症、頭部外傷、脊椎損傷、脳浮腫、知覚機能障害、知覚機能異常、自律神経機能障害、自律神経機能異常、多発性硬化症など）、痴呆症、記憶障害、意識障害、健忘症、不安症状、緊張症状、不快精神状態、末梢神経障害など〕、癌〔例、大腸癌、乳癌、肺癌、前立腺癌、食道癌、胃癌、肝臓癌、胆道癌、脾臓癌、腎癌、膀胱癌、子宮癌、精巣癌、甲状腺癌、膵臓癌、脳腫瘍、血液腫瘍など〕、糖尿病〔例、１型糖尿病、２型糖尿病、合併症（糖尿病性網膜症、糖尿病性白内障、糖尿病性腎症、糖尿病性神経症など）など〕などの予防・治療剤として有用である。

３．MIF またはその改変体を含有する医薬（単剤）または MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを併用する医薬（併用剤）

本発明においては、MIF またはその改変体は、これを含有する単剤として用いることができる。また、MIF またはその改変体と、MIF に結合する能力を有する物質とを併用して用いることもできる。

以下、MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを併用し

て使用することを「本発明の併用剤」と称する。

MIF またはその改変体と、MIF に結合する能力を有する物質は、それぞれ単独で、あるいは両者を、自体公知の方法に従って、薬理学的に許容される担体と混合して医薬組成物、例えば錠剤（糖衣錠、フィルムコーティング錠を含む）、散剤、顆粒剤、カプセル剤、（ソフトカプセルを含む）、液剤、注射剤、坐剤、徐放剤等として、経口的または非経口的（例、局所、直腸、静脈投与等）に哺乳動物（例、ヒト、サル等）安全に投与することができる。注射剤は、静脈内、筋肉内、皮下または臓器内投与または直接病巣に投与することができる。

上記薬学的に許容される担体としては、製剤素材として慣用の各種有機あるいは無機担体物質が用いられ、賦形剤、滑沢剤、結合剤、崩壊剤、溶剤、溶解補助剤、懸濁化剤、等張化剤、緩衝剤、無痛化剤などとして配合される。また必要に応じて、通常の防腐剤、抗酸化剤、着色剤、甘味剤、吸着剤、湿潤剤等の添加物を適宜、適量用いることもできる。

MIF またはその改変体、および MIF に結合する能力を有する物質の上記製剤中の含有量は、剤全体の約 0.01 ないし 100 重量%である。

本発明の併用剤の使用に際しては、MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質の投与時期は限定されず、MIF またはその改変体またはその医薬組成物と MIF に結合する能力を有する物質またはその医薬組成物とを、投与対象に対し、同時に投与してもよいし、時間差をおいて投与してもよい。本発明の併用剤の投与量は、臨床上用いられている投与量に準ずればよく、投与対象、投与ルート、疾患、組み合わせ等により適宜選択することができる。

本発明の併用剤の投与形態は、特に限定されず、投与時に、MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とが組み合わされていればよい。このような投与形態としては、例えば、（1）MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを同時に製剤化して得られる単一の製剤の投与、（2）MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の投与の製剤の同一投与経路での同時投与、（3）MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の同一投与経路での時間差をおいての投与、（4）MIF ま

たはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での同時投与、（5）MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質とを別々に製剤化して得られる２種の製剤の異なる投与経路での時間差をおいての投与などが挙げられる。

本発明の併用剤における MIF またはその改変体と MIF に結合する能力を有する物質との配合比または使用比は、投与対象、投与ルート、疾患等により適宜選択することができる。

例えば、本発明の併用剤における MIF またはその改変体の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約 0.01～100 重量%、好ましくは約 0.1～50 重量%、さらに好ましくは約 0.5～20 重量%である。

本発明の併用剤における MIF に結合する能力を有する物質の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約 0.01～100 重量%、好ましくは約 0.1～50 重量%、さらに好ましくは約 0.5～20 重量%である。

本発明の併用剤における担体等の添加剤の含有量は、製剤の形態によって相違するが、通常製剤全体に対して約 1～99.99 重量%、好ましくは約 10～90 重量%である。

また、MIF またはその改変体および MIF に結合する能力を有する物質をそれぞれ別々に製剤化する場合も同様の含有量でよい。

MIF またはその改変体、および本発明の併用剤の投与量は、症状の程度；投与対象の年齢、性別、体重；投与の時期、間隔、医薬製剤の性質、調剤、種類；有効成分の種類などによって異なり、特に限定されないが、炎症性腸疾患の治療に用いる場合は、通常、成人に対して一日につき、活性成分として約 10μg～100mg/kg 体重、好ましくは 100μg～50mg/kg 体重である。通常 1 日 1～4 回に分けて投与する。

なお、ここでは、併用剤についての有効成分の製剤化、投与方法などについて述べたが、これらの記載は、MIF またはその改変体を含有するＡＲＥ活性化剤を単剤として使用する場合にも適用し得る。

さらに、本発明の ARE 活性化剤および細胞死抑制剤は、HMG-CoA 還元酵素阻害薬（例、 シンバスタチン（Simvastatin）、アトロバスタチン

（Atorvastatin）など）、フィブラート系高脂血症薬（例、ゲムフィブロジル（Gemfibrozil）など）、抗癌剤（例、イホスファミド（Ifosfamide）、UFT、アドリアマイシン（Adriamycin）、ドキソルビシン（Doxorubicin）、ペプロマイシン（Peplomycin）、シスプラチン（Cisplatin）、シクロフォスファミド（Cyclophosphamide）、5-FU、メトレキセート（Methotrexate）、マイトマイシン C（Mitomycin C）、マイトキサントロン（Mitoxantrone）など）などと併用して用いてもよく、これにより HMG-CoA 還元酵素阻害薬、フィブラート系高脂血症薬、抗癌剤などの、正常細胞に障害を及ぼす副作用が軽減される。

本明細書および図面において、塩基やアミノ酸などを略号で表示する場合、IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を下記する。またアミノ酸に関し光学異性体があり得る場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

ＤＮＡ	：デオキシリボ核酸
ｃＤＮＡ	：相補的デオキシリボ核酸
Ａ	：アデニン
Ｔ	：チミン
Ｇ	：グアニン
Ｃ	：シトシン
ＲＮＡ	：リボ核酸
ｍＲＮＡ	：メッセンジャーリボ核酸
ｄＡＴＰ	：デオキシアデノシン三リン酸
ｄＴＴＰ	：デオキシチミジン三リン酸
ｄＧＴＰ	：デオキシグアノシン三リン酸
ｄＣＴＰ	：デオキシシチジン三リン酸
ＡＴＰ	：アデノシン三リン酸
ＥＤＴＡ	：エチレンジアミン四酢酸
ＳＤＳ	：ドデシル硫酸ナトリウム
ＮＯ	：一酸化窒素

また、本明細書中で繁用される置換基、保護基および試薬を下記の記号で表記する。

Ｍｅ	：メチル基
Ｅｔ	：エチル基
Ｂｕ	：ブチル基
Ｐｈ	：フェニル基
ＴＣ	：チアゾリジン－４（Ｒ）－カルボキサミド基
Ｔｏｓ	：ｐ－トルエンスルフォニル
ＣＨＯ	：ホルミル
Ｂｚｌ	：ベンジル
Cl_2-Bzl	：２，６－ジクロロベンジル
Ｂｏｍ	：ベンジルオキシメチル
Ｚ	：ベンジルオキシカルボニル
Ｃｌ－Ｚ	：２－クロロベンジルオキシカルボニル
Ｂｒ－Ｚ	：２－ブロモベンジルオキシカルボニル
Ｂｏｃ	：ｔ－ブトキシカルボニル
ＤＮＰ	：ジニトロフェニル
Ｔｒｔ	：トリチル
Ｂｕｍ	：ｔ－ブトキシメチル
Ｆｍｏｃ	：Ｎ－９－フルオレニルメトキシカルボニル
ＨＯＢｔ	：１－ヒドロキシベンズトリアゾール
ＨＯＯＢｔ	：３,４－ジヒドロ－３－ヒドロキシ－４－オキソ－１,２,３－ベンゾトリアジン
ＨＯＮＢ	：1-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2,3-ジカルボキシイミド
ＤＣＣ	：Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド

本願明細書の配列表の配列番号は、以下の配列を示す。

〔配列番号：１〕

ヒトMIFのアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：２〕

参考例１で使用した抗－センス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：３〕

参考例１で使用したセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：４〕

参考例１で使用した抗－センス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：５〕

参考例１で使用したセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：６〕

ラット Glutathione S-transferase Ya subunit 遺伝子の ARE の塩基配列を示す。

〔配列番号：７〕

ラット MIF のアミノ酸配列を示す。

〔配列番号：８〕

参考例２で用いた 5'末端側に NdeI 切断部位を含むラット MIF の N 末端と一致するセンス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：９〕

参考例２で用いた 5'末端側に SapI 切断部位を含むラット MIF の C 末端と一致する抗―センス鎖の塩基配列を示す。

〔配列番号：１０〕

参考例３で用いた hMIF-5'－プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１１〕

参考例３で用いた hMIF-3" －プライマーの塩基配列を示す。

〔配列番号：１２〕

参考例３で用いた N 末端に付加したヒスチジンタグを含む 30 アミノ酸ペプチドのアミノ酸配列を示す。

Met His His His His His His Ser Ser Gly Leu Val Pro Arg Gly Ser Gly Met Lys Glu Thr Ala Ala Ala Lys Phe Glu Phe Ile Met

〔配列番号：１３〕

実験例４において rGST Ya の定量に用いたプライマー（TaqMan primer forward）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１４〕

実験例４において rGST Ya の定量に用いたプライマー（TaqMan primer reverse）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１５〕

実験例４において rGST Ya の定量に用いたプローブ（TaqMan probe）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１６〕

実験例４において rGAPD の定量に用いたプライマー（TaqMan primer forward）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１７〕

実験例４において rGAPD の定量に用いたプライマー（TaqMan primer reverse）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１８〕

実験例４において rGAPD の定量に用いたプローブ（TaqMan probe）の塩基配列を示す。

〔配列番号：１９〕

実験例４において rHO-1 の定量に用いたプライマー（TaqMan primer forward）の塩基配列を示す。

〔配列番号：２０〕

実験例４において rHO-1 の定量に用いたプライマー（TaqMan primer reverse）の塩基配列を示す。

〔配列番号：２１〕

実験例４において rHO-1 の定量に用いたプローブ（TaqMan probe）の塩基配列を示す。

実　施　例

以下に、参考例、実験例を示し、本発明をより詳細に説明するが、これらは本

発明の範囲を限定するものではない。

参考例１

ヒトMIFタンパク質およびそのN末端改変体の調製

（１）ヒトMIFタンパク質およびそのN末端改変体の発現ベクターの構築

ヒト相補的DNA（cDNA）ライブラリー（GIBCO BRL社）より、5’末端側にNdeI切断部位を含むヒトMIFのN末端と一致するセンス鎖（配列番号：５）と5’末端側にSapI切断部位を含むヒトMIFのC末端と一致する抗－センス鎖（配列番号：２）を使用して、MIFをコードする領域をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により増幅した。増幅したMIFcDNAは、NdeIとSapIで切断後、pCYB1（IMPACT I: One-Srep Protein Purification System、New England BioLabs社）のNdeIとSapI部位の間に挿入してpCYB1-hMIFを得た。次に、pCYB1-hMIFをBglIで切断後、切断面を平滑末端化し、これをさらにNdeIで切断してヒトMIFとインテイン－キチンバインディングドメインの融合タンパク質をコードするDNA断片を回収した。次に、回収したDNA断片をT7プロモータ発現プラスミドpET32b(+)(Novagen社)のNdeIとEcoRV部位の間に挿入して、ヒトMIF－インテイン－キチンバインディングドメイン融合タンパク質発現プラスミドpET32b-hMIF-Int-CBDを得た。得られた発現プラスミド内のMIFcDNA配列は、DNAシーケンス・システム（アプライド・バイオシステム社）を用いて確認した。

ヒトMIFのN末端のプロリン(Pro1)をセリンに置換した変異MIFタンパク質（hMIF-P1S)の発現プラスミドは、センス鎖（配列番号：３）と抗－センス鎖（配列番号：４）を使用し、QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社)を用いてpET32b-hMIF-Int-CBDのPro1をコードするDNA配列(CCG)をセリンをコードする配列(TCG)に置換することで作製した。得られた発現プラスミド内のMIFcDNA配列は、DNAシーケンス・システム（アプライド・バイオシステム社）を用いて確認した。

（２）ヒトMIFタンパク質の調製

pET32b-hMIF-Int-CBDを大腸菌BL21(DE3)(Novagen)に形質転換した後、アンピシリンを添加したLB培地（1％トリプトン、0.5％イーストイクストラ

クト、0.5 % NaCl）(LBamp 培地)に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。これをLBamp 培地に 1 %となるように移し、37℃で約 2.5 時間振とう培養した後、0.4 mM のイソプロピル-1-チオ-β-D-ガラクトピラノシド（IPTG）を添加して15 ℃でさらに約 24 時間培養してヒト MIF－インテイン－キチンバインディングドメイン融合タンパク質の発現を誘導した。培養終了後、大腸菌を回収し1/10 量の 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファー（20 mM Tris-HCl; pH8.0, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA）に懸濁して超音波破砕した。この菌体破砕液を 4 ℃、12000rpm で 30 分間遠心分離してその上清を回収した。回収した上清は 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファーで平衡化したキチンビーズカラム（New England BioLabs 社）を通過させて、ヒト MIF－インテイン－キチンバインディングドメイン融合タンパク質をカラムに結合させた後、カラムサイズの 10 倍容量の 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファーとカラムサイズの 10 倍容量のカラムバッファーで洗浄して非特異的に結合したタンパク質および随伴する物質を除去した。次にカラム内のバッファーを 50 mM のジチオスレイトールを含むカラムバッファーと置換して 4 ℃で一晩放置することで、インテインのタンパク質スプライシング活性を利用して融合タンパク質より MIF タンパク質を切り出した。切り出した MIF タンパク質はカラムバッファーで溶出した後、20 mM の燐酸ナトリウム緩衝液で透析した。変異 MIF タンパク質 (hMIF-P1S)も同様の方法で調製した。

参考例 2

ラット MIF タンパク質の調製

（1）ラット MIF タンパク質発現ベクターの構築

T7 プロモータ発現プラスミド pET32b(+)(Novagen 社)を SapI と TthIII で切断後、切断面を平滑末端化して再び環状化することで、pET32b(+)より SapI 切断部位を除去した pET32b-1 を得た。次に、pCYB1（IMPACT I: One-Srep Protein Purification System、New England BioLabs 社）を NdeI と BglI で切断して、マルチクローニング部位とインテイン－キチンバインディングドメイン融合蛋白質をコードする領域の DNA 断片を回収し、この BglI 切断部位を平滑

末端化した後、pET32b-1 の NdeI と EcoRV 部位の間に挿入して pET32b-Int-CBD を得た。

次にラットの相補的 DNA(cDNA)ライブラリー（GIBCO BRL 社）より MIF をコードする領域をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により増幅した。ラット MIF の cDNA 増幅には 5'末端側に NdeI 切断部位を含むラット MIF の N 末端と一致するセンス鎖；配列番号：8)と 5'末端側に SapI 切断部位を含むラット MIF の C 末端と一致する抗―センス鎖；配列番号：9）を使用した。増幅した MIFcDNA は NdeI と SapI で切断後、pET32b-Int-CBD の NdeI 切断部位と SapI 切断部位の間に挿入して、ラット MIF―インテイン―キチンバインディングドメイン融合蛋白質発現プラスミド pET32b-rMIF-Int-CBD を得た。得られた発現プラスミド内の MIFcDNA 配列は、DNA シーケンス・システム（アプライドバイオシステムズ社）を用いて確認した。

（2）ラット MIF タンパク質の調製

pET32b-rMIF-Int-CBD を大腸菌 BL21(DE3)(Novagen)に形質転換した後、アンピシリンを添加した LB 培地（1 %トリプトン、0.5 %イーストイクストラクト、0.5 % NaCl）(LBamp 培地)に植菌し、37℃で一晩振とう培養した。これを LBamp 培地に 1 %となるように移し、37℃で約 2.5 時間振とう培養した後、0.4 mM のイソプロピル－1－チオ－β－D－ガラクトピラノシド（IPTG）を添加して 15 ℃でさらに 24 時間培養してラット MIF―インテイン―キチンバインディングドメイン融合蛋白質の発現を誘導した。培養終了後、大腸菌を回収し 1/10 量の 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファー（20 mM Tris-HCl; pH8.0, 500 mM NaCl, 0.1 mM EDTA）に懸濁して超音波破砕した。この菌体破砕液を 4 ℃、12000rpm で 30 分間遠心分離してその上清を回収した。回収した上清は 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファーで平衡化したキチンビーズカラム(New England BioLabs 社)を通過させて、ラット MIF―インテイン―キチンバインディングドメイン融合蛋白質をカラムに結合させた後、カラムサイズの 10 倍容量の 0.1 %トライトン X-100 を含むカラムバッファーとカラムサイズの 10 倍容量のカラムバッファーで洗浄して非特異的に結合した蛋白質および

随伴する物質を除去した。次にカラム内のバッファーを 50 mM のジチオスレイトールを含むカラムバッファーと置換して 4 ℃で 16 時間以上放置することで、インテインの蛋白質スプライシング活性を利用して融合蛋白質より MIF 蛋白質を切り出した。切り出した MIF 蛋白質はカラムバッファーで溶出した後、20 mM の燐酸ナトリウム緩衝液で透析した。ラット MIF タンパク質のアミノ酸配列は配列番号：7に示すとおりである。

参考例３

N 末端にヒスチジンタグを含有するペプチドを付加したヒト MIF 蛋白質の N 末端改変体（His-hMIF）の調製

（１）His-hMIF 発現プラスミドの調製

参考例１と同様に、ヒト相補的 DNA(cDNA)ライブラリーより、hMIF-5' primer (5'-CGGAATTCATCATGCCGATGTTCATCGT-3'；配列番号：１０)と hMIF-3' primer (5'-GCCTCGAGTTAGGCGAAGGTGGAGTTGT-3'；配列番号：１１)を用いて MIF をコードする領域を PCR 法により増幅した。

増幅した MIFcDNA は EcoRI と XhoI で切断後、T7 プロモーター発現プラスミド pET32a(+)(Novagen 社)の EcoRI と XhoI 部位の間に挿入して pET32a/hMIF ベクターを得た。次に pET32a/hMIF を NdeI で切断後、再び環状化することで、チオレドキシンをコードする配列を除去した。このベクターを EcoRI と NspV で切断し、切断面を平滑末端化した後、再び環状化することで、MIF の N 末端にヒスチジンタグを含む 30 アミノ酸のペプチド（配列番号：１２）を付加したヒト MIF 蛋白質の (His-hMIF)発現ベクターpET32a-His-hMIF を得た。

（２）His-hMIF 蛋白質の調製

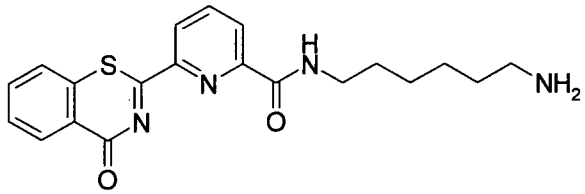
pET32a-His-hMIF を大腸菌 BL21(DE3)に形質転換した後、アンピシリンを添加した LB 培地(1%トリプトン、0.5%イーストイクストラクト、0.5% NaCl)(LB amp 培地)に植菌して 37℃で一晩培養した。これを LBamp 培地に 1%となるように移し、37℃で約 2.5 時間振とう培養した後、0.4mM の IPTG を添加して、15℃でさらに 5 時間培養した。培養終了後、大腸菌を回収して 0.1% NP-40 を添加したバインディングバッファー (20mM Tris-HCl, pH7.9, 500mM

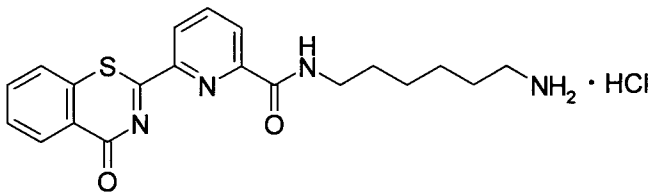
NaCl, 5mM imidazole)に懸濁して超音波破砕した。この菌体破砕液を 4℃、12,000g で 20 分間遠心分離し、その上清を回収して、0.22μm のフィルターでろ過した。次に His Bind resin (Novagen)を、カラムサイズの 5 倍量のチャージバッファー (50mM $NiSO_4$)でチャージした後、3 倍量のバインディングバッファーで平衡化し、これに上記の細胞破砕液を通過させてカラムに His-hMIF を結合させた後、カラムサイズの 10 倍量のバインディングバッファーと 6 倍量の洗浄バッファー(20mM Tris-HCl, pH7.9, 500mM NaCl, 60mM imidazole)で洗浄して非特異的に結合した蛋白質及び随伴する物質を除去した。次に、His-hMIF 蛋白質を、6 倍量の溶出バッファー(20mM Tris-HCl, pH7.9, 500mM NaCl, 1M imidazole)で溶出した。得られた His-hMIF は 8M urea と 5mM DTT を添加した 20mM 燐酸ナトリウムバッファー(pH 7.2)で透析後、5mM DTT を含む 20mM 燐酸ナトリウムバッファー(pH7.2)で透析し、さらに 20mM 燐酸ナトリウムバッファー(pH7.2) のみで透析した。

実験例 1 （1）

ラット MIF と N-(6-アミノヘキシル)-6-(4-オキソ-4H-1,3-ベンゾチアジン-2-イル)-2-ピリジンカルボキサミド またはその塩酸塩（以下、化合物 A と略記）との結合

参考例 2 で得られたラット MIF と化合物 A（WO 03/020719 号公報の実施例 107 記載参照：下式参照）との結合を BIACORE3000（ビアコア株式会社製）を用いて解析した。





化合物 A をセンサーチップ CM5（ビアコア株式会社製）に固定化後、1μg/ml のラット MIF を含む 0.005% Tween20 含有燐酸緩衝生理食塩水をチップ上に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化をラット MIF に対する化合物の結合として測定した。

結果を図１に示す。

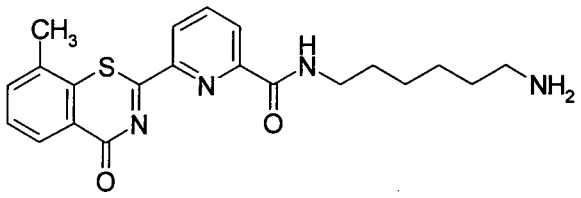
これより化合物 A はラット MIF に強く結合することがわかる。

実験例１（2）

ラット MIF と N-(6-アミノヘキシル)-6-(8-メチル-4-オキソ-4H-1,3-ベンゾチアジン-2-イル)ピリジン-2-カルボキサミドまたはその塩酸塩（以下、化合物Ｃと略記）との結合

参考例２で得られたラット MIF と化合物 C（下式参照）との結合を BIACORE3000 を用いて解析した。実験例１（１）同様に、化合物Ｃをセンサーチップ CM5（ビアコア株式会社製）に固定化後、1μg/ml のラット MIF を含む 0.005% Tween20 含有燐酸緩衝生理食塩水をチップ上に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化をラット MIF に対する化合物の結合として測定した。

結果を図４に示す。これより化合物Ｃでは化合物 A と比較してラット MIF に対する結合活性が弱いことがわかり、MIF との結合には 1,3-ベンゾチアジノン



誘導体の8位が重要であると考えられる。

実験例2

MIFまたは変異型MIFと化合物Aとの結合

参考例1で得られたヒトMIF（hMIF）および変異型ヒトMIF（hMIF-P1S）と化合物Aの結合をBIACORE3000（ビアコア株式会社製）を用いて解析した。

化合物Aをセンサーチップ CM5（ビアコア株式会社製）に固定化後、10μg/mlのhMIFまたはhMIF-P1Sを含むHBS-EP buffer(ビアコア株式会社製)をチップ上に流し、表面プラズモン共鳴シグナルの変化をヒトMIFに対する化合物の結合として測定した。

結果を図2に示す。

化合物Aのヒト MIFに対する結合能は、ヒトMIFのN末端のプロリンに変異を導入することで大幅に減弱することがわかる。これより、MIFと特異的に結合する1,3-ベンゾチアジノン誘導体は、MIFのN末端付近に結合することがわかる。

同様にして、化合物Aと参考例3で得られたN末端にペプチドを付加したHis-hMIFとの結合解析を行った。結果を図5に示す。

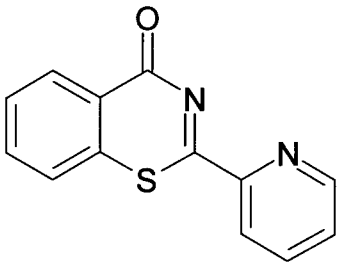
化合物Aのヒト MIFに対する結合能は、ヒトMIFのN末端のプロリンにヒスチジンタグを含む30アミノ酸ポリペプチドを付加することによって大幅に減弱することがわかる。これより、MIFと1,3-ベンゾチアジノン誘導体の結合には、N末端のプロリンがフリーであることが適していると推測される。

実験例3

MIFの2-(2-ピリジル)-4H-1,3-ベンゾチアジン-4-オン（以下、化合物Bと略

記）存在下における ARE 活性化作用

参考例 2 で得られたラット MIF（rMIF）を AKTA purifer(アマシャム・バイオサイエンス社)を用いて、Superdex 75（アマシャム・バイオサイエンス社）でゲルろ過してさらに精製した後、Detoxi-Gel (ピアス社製)でエンドトキシン除去した。次にこの精製 MIF が、MIF と結合する化合物 B（WO 02/18356 号公報の参考例 1 記載参照：下式参照）存在下で ARE 活性化作用を示すかどうかを調べた。



ラット H9c2 細胞を 7×10^4 個/ml となるように 10% 熱不活化牛胎児血清を含むダルベッコ改変イーグル培地 (10 % FBS、D-MEM 培地)に懸濁して 5 % CO_2、37 ℃で約 16 時間培養した。これに FuGENE6 Transfection reagent（ロッシュ社製）を用いて、ラット Glutathione S-transferase Ya subunit 遺伝子の ARE（配列番号：6）を pGL3-Promoter Vector（プロメガ社製）に組み込んだルシフェラーゼレポーターベクターpGL3-ARE をトランスフェクションし、さらに約 7 時間培養した。培養終了後、細胞を回収し、10 % FBS、D-MEM 培地に 1×10^5 個/ml となるように懸濁し、96 ウェル白色オパックプレート (ファルコン社製)の各ウェルに 100μl ずつ播種して 5 % CO_2、37 ℃で約 17 時間培養した。次に 0.3% FBS を含有する D-MEM 培地と交換して一日培養した後、0.3% FBS を含有する D-MEM 培地と交換してさらに約 5 時間培養し、化合物 B およびラット MIF を添加して 5 % CO_2、37 ℃で約 24 時間培養した。培養終了後、Steady-Glo Reagent（プロメガ社製）を各ウェルに 80μl づつ添加し、40 分間室温で放置した後、ルシフェラーゼによる発光量を WALLAC ARVO SX（パーキンエルマ社製）で測定した。

結果を図 3 に示す。 これより MIF と結合する化合物 B（1 μM）存在下で、ラット MIF が濃度依存的に ARE 活性化作用を示すことがわかる。

実験例４

MIF による GST Ya (Glutathione S-transferase Ya subunit) 及び HO-1 (Heme oxygenase-1) 遺伝子の発現誘導

日本チャールスリバー社より購入した妊娠ウイスター・ラットより新生仔（生後１日以内のもの）を得、これをエーテル麻酔し、70%エタノールで消毒後、ピンセットで心臓を摘出した。摘出した心臓をリン酸緩衝生理食塩水（タカラ社製、T900）で洗浄後、手術用のハサミで細片化した。この組織片を、リン酸緩衝生理食塩水で４～５回洗浄し、大部分の血液由来の非心筋細胞を除去した。この新生仔10匹分の組織片に対し、５mlの酵素液〔リン酸緩衝液（PBS）（1 ml）にトリプシン（1.25 mg）（ディフコ社製）およびコラゲナーゼ（0.25 mg）（シグマ社製）を溶解したもの〕を加え、37℃に保ちながらスターラーで１５分間攪拌した。

これに2.5mlの酵素液を追加し、さらに15分間攪拌し、この操作を２回繰り返した。続いて、10%牛胎仔血清（バイオウィカー社製）を含むMedium 199（ギブコ社製）を５ml添加して酵素反応を停止させ、これをセルストレイナー（ファルコン社製）で濾過後、400 xgで5分間遠心分離して細胞を集めた。このように集めた新生仔10匹分の細胞を、50 mlの10%牛胎仔血清を含むMedium 199に懸濁し、100 mmシャーレ（イワキ社製）に10 mlずつ播種し、５% CO_2、37℃に設定したCO_2インキュベーター中で１時間培養した。 その後、非接着性の細胞をセルストレイナーで濾過後、400 xgで5 分間遠心分離し集めた。 次に集めた細胞を2 mlの低張液〔水（１L）にNH_4Cl（8.29 g）、$KHCO_3$（1.0 g）およびEDTA/2Na（ethylenediaminetetraacetic acid disodium；同仁化学研究所製）（37 mg）を溶かしたもの〕に懸濁し、3分間放置して赤血球を破砕した。これに10 mlの10%牛胎仔血清を含むMedium 199を加え、400 xgで5分間遠心分離して集めた細胞を心筋細胞とした。

このようにして調製したラット新生仔由来初代心筋細胞を 3 x 10^5 個／ml となるように、10%牛胎仔血清を含む Medium199 に懸濁し、48 穴プレートに 0.5 ml／well ずつ播種し、５% CO_2、37℃に設定した CO_2 インキュベーター中で１日培養した。これをマイクロミキサー（大洋化学工業社製）で攪拌後、血清

を含まないMedium 199と2回交換して血清を除去し、ラットMIFを加えてさらに1時間培養した後、10 μMのNOR3（(±)-(E)-4-Ethyl-2-[(E)-hydroxyimino]-5-nitro-3-hexenamide; 同人化学研究所製）を添加してさらに3時間または6時間培養した。なお、ラットMIFは参考例2で得られたラットMIFをAKTA purifer(アマシャム・バイオサイエンス社)を用いて、Superdex 75（アマシャム・バイオサイエンス社製）でゲルろ過してさらに精製した後、Detoxi-Gel (ピアス社製)でエンドトキシン除去したものを用いた。

培養終了後、RNeasy 96 kit (キアゲン社製) を用いてRNAを精製し、以下のプライマー及びプローブを用いてリアルタイムPCRシステム（アプライドバイオシステムズ社製）にてHO-1及びGST YaのmRNA量を定量した。

GST Ya

① rGSTYaF1 TGCCAGCCTTCTGACCTCTTT（配列番号：１３）

② rGSTYaR1 CTGCAGGAACTTCTTCACATTGG（配列番号：１４）

③ rGSTYa-1 FAM-AAGGCCTTCAAGAGCAGAATCAGCAGC-TAMRA〔配列番号：１５〕

GAPDH

① rGAPDHF2 TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG（配列番号：１６）

② rGAPDHR2AGCCCAGGATGCCCTTTAGT（配列番号：１７）

③ rGAPDH-2 VIC-TGGTGAAGCAGGCGGCCGAG-TAMRA〔配列番号：１８〕

HO-1

① rHO-1F2 CCGCCTTCCTGCTCAACA（配列番号：１９）

② rHO-1R2 AAGAAACTCTGTCTGTGAGGGACTCT（配列番号：２０）

③ rHO-1-2 FAM-CAGGCACTGCTGACAGAGGAACACAAAG-TAMRA（配列番号：２１）

HO-1 mRNAはMIF添加4時間後に、GST Ya mRNAはMIF添加7時間後に回収したmRNAを用いて測定した。

結果を図6に示す。これにより、MIFがAREによって発現を支配されているGST YaやHO-1の発現を亢進することがわかる。

産業上の利用可能性

（a）MIF またはその改変体は ARE 活性化剤として、（b）MIF またはその改変体と、MIF に結合する能力を有する物質（例、1,3-ベンゾチアジノン誘導体、抗体など）との組み合わせは ARE 活性化剤として、安全で優れた細胞死抑制剤、例えば循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌、糖尿病等の予防・治療剤として有用である。

請求の範囲

1．マクロファージ遊走阻止因子またはその改変体を含有してなるAntioxidant response element活性化剤。

2．マクロファージ遊走阻止因子が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質またはその塩である請求項１記載の剤。

3．マクロファージ遊走阻止因子の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のN端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸が欠失、付加または（および）置換された改変体である請求項１記載の剤。

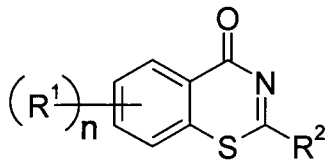
4．N端側が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列の第１～５番目のアミノ酸配列である請求項３記載の剤。

5．マクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなるAntioxidant response element活性化剤。

6．物質が、マクロファージ遊走阻止因子を活性化する能力を有する物質である請求項５記載の剤。

7．物質が、１，３－ベンゾチアジノン誘導体である請求項５記載の剤。

8．１，３－ベンゾチアジノン誘導体が、式



〔式中、R^1は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノを、

R^2は置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基または置換基を有していてもよいアミノ、

nは１または２を示す〕で表される化合物またはその塩である請求項７記載の剤。

9．マクロファージ遊走阻止因子の改変体を含有してなる細胞死抑制剤。

１０．マクロファージ遊走阻止因子が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列を含有するタンパク質である請求項９記載の剤。

１１．マクロファージ遊走阻止因子の改変体が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列のN端側、３２番目付近、６４番目付近、９５番目付近および９７番目付近から選ばれる少なくとも一つのアミノ酸が欠失、付加または（および）置換された改変体である請求項９記載の剤。

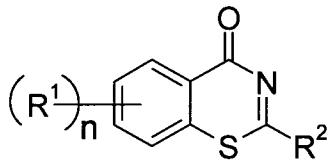
１２．N端側が、配列番号：１で表されるアミノ酸配列の第１～５番目のアミノ酸配列である請求項１１記載の剤。

１３．マクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせてなる細胞死抑制剤。

１４．物質が、マクロファージ遊走阻止因子を活性化する能力を有する物質である請求項１３記載の剤。

１５．物質が、１，３－ベンゾチアジノン誘導体である請求項１３記載の剤。

１６．１，３－ベンゾチアジノン誘導体が、式



〔式中、R^1は水素原子、ハロゲン原子、ヒドロキシ、ニトロ、ハロゲン化されていてもよいアルキル、置換基を有していてもよいアルコキシ、アシルまたは置換基を有していてもよいアミノを、
R^2は置換基を有していてもよい炭化水素基、置換基を有していてもよい芳香族複素環基または置換基を有していてもよいアミノ、
nは1または2を示す〕で表される化合物またはその塩である請求項１５記載の剤。

１７．循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療剤である請求項１～１６のいずれかに記載の剤。

１８．マクロファージ遊走阻止因子を改変することを特徴とするAntioxidant response elementの活性化方法。

１９．マクロファージ遊走阻止因子を改変することを特徴とする細胞死抑制方法。

２０．マクロファージ遊走阻止因子を改変することを特徴とする循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法。

２１．マクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせることを特徴とする循環器系疾

患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病の予防・治療方法。

２２．Antioxidant response element活性化剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体の使用。

２３．Antioxidant response element活性化剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体と、マクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質とを組み合わせた使用。

２４．細胞死抑制剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子の改変体の使用。

２５．細胞死抑制剤を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体およびマクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質の使用。

２６．循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病を予防・治療する医薬を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体の使用。

２７．循環器系疾患、骨・関節疾患、感染症疾患、炎症性疾患、腎疾患、中枢疾患、癌または糖尿病を予防・治療する医薬を製造するためのマクロファージ遊走阻止因子またはその改変体およびマクロファージ遊走阻止因子に結合する能力を有する物質の使用。

FIG. 1

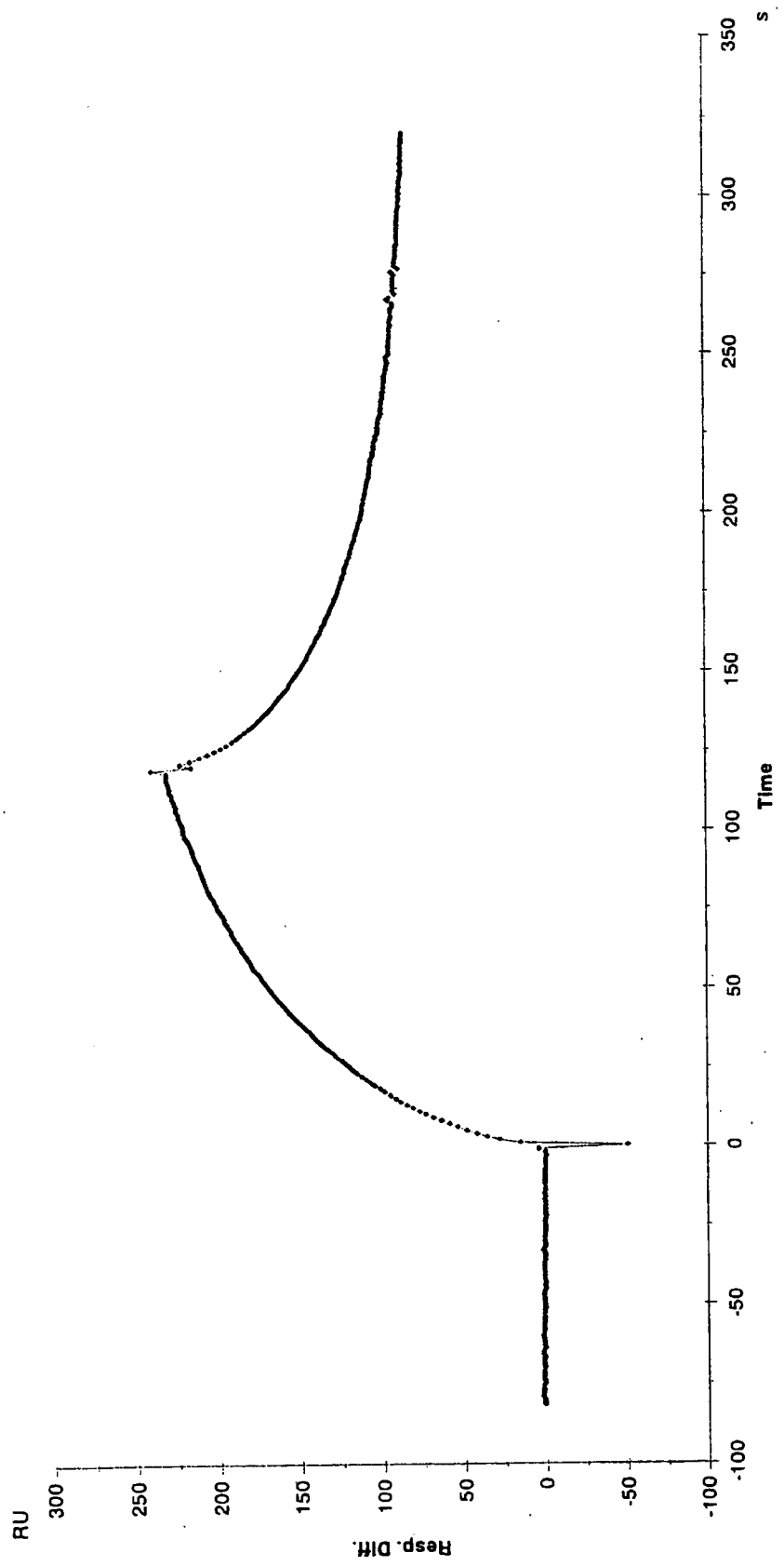

RU
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100
Resp. Diff.
-100
-50
0
50
100
150
200
250
300
350
Time
s

FIG. 2

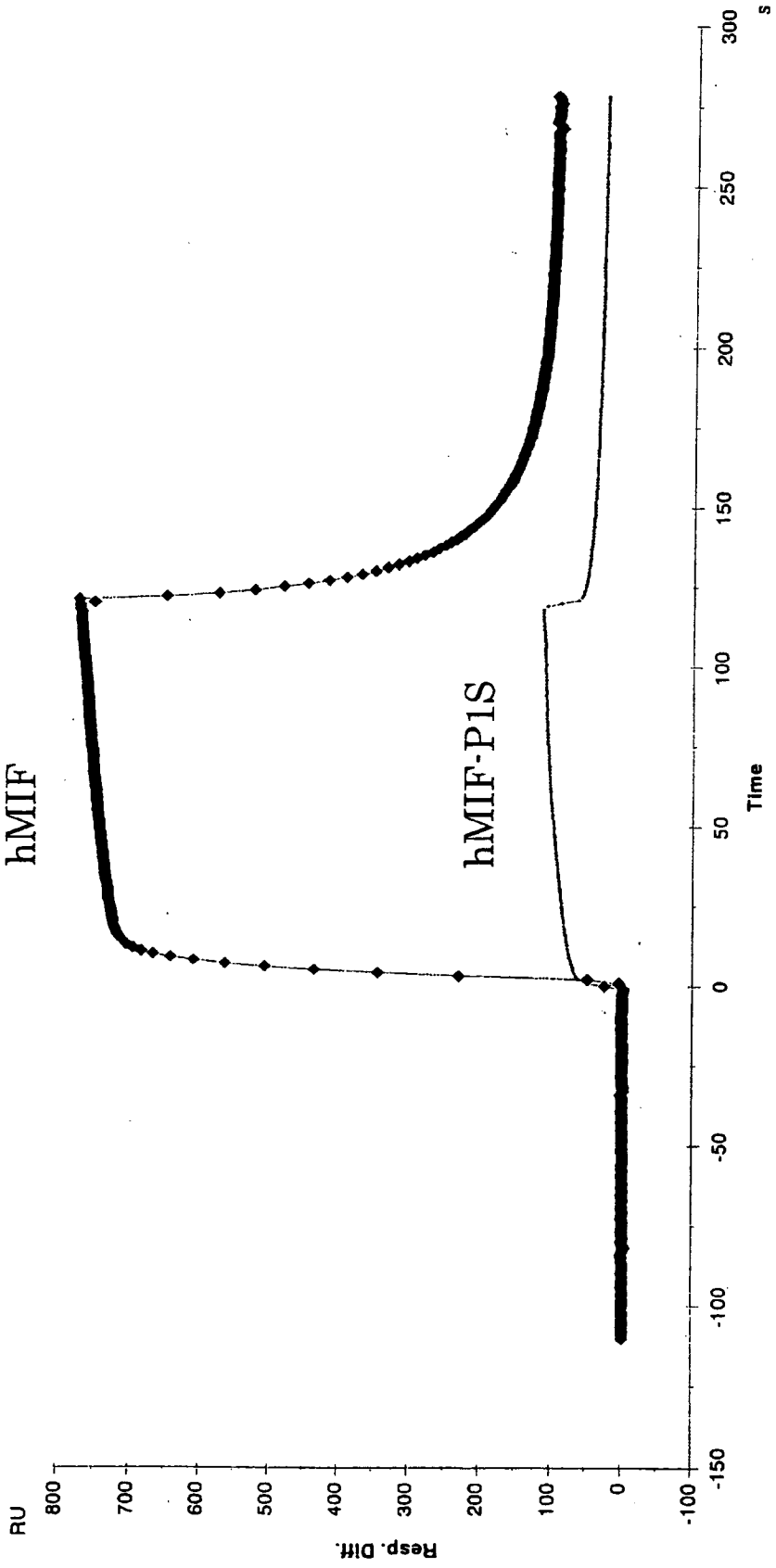

hMIF
hMIF-P1S
RU
Resp. Diff.
Time
s
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-150
-100
-50
0
50
100
150
200
250
300

FIG. 3

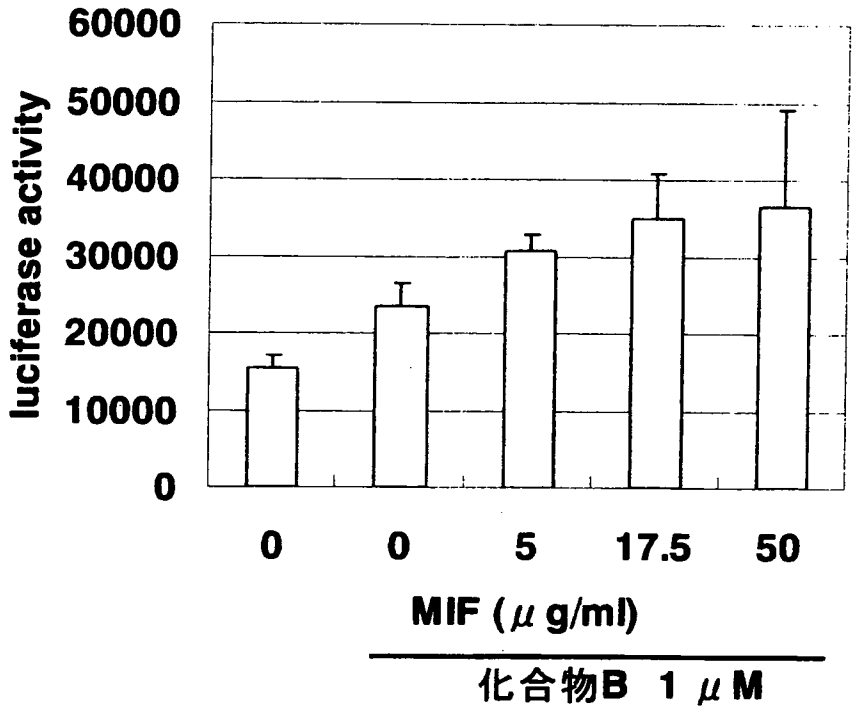

60000
50000
40000
30000
20000
10000
0
luciferase activity
0
0
5
17.5
50
MIF (μg/ml)
化合物B 1 μM

FIG. 4

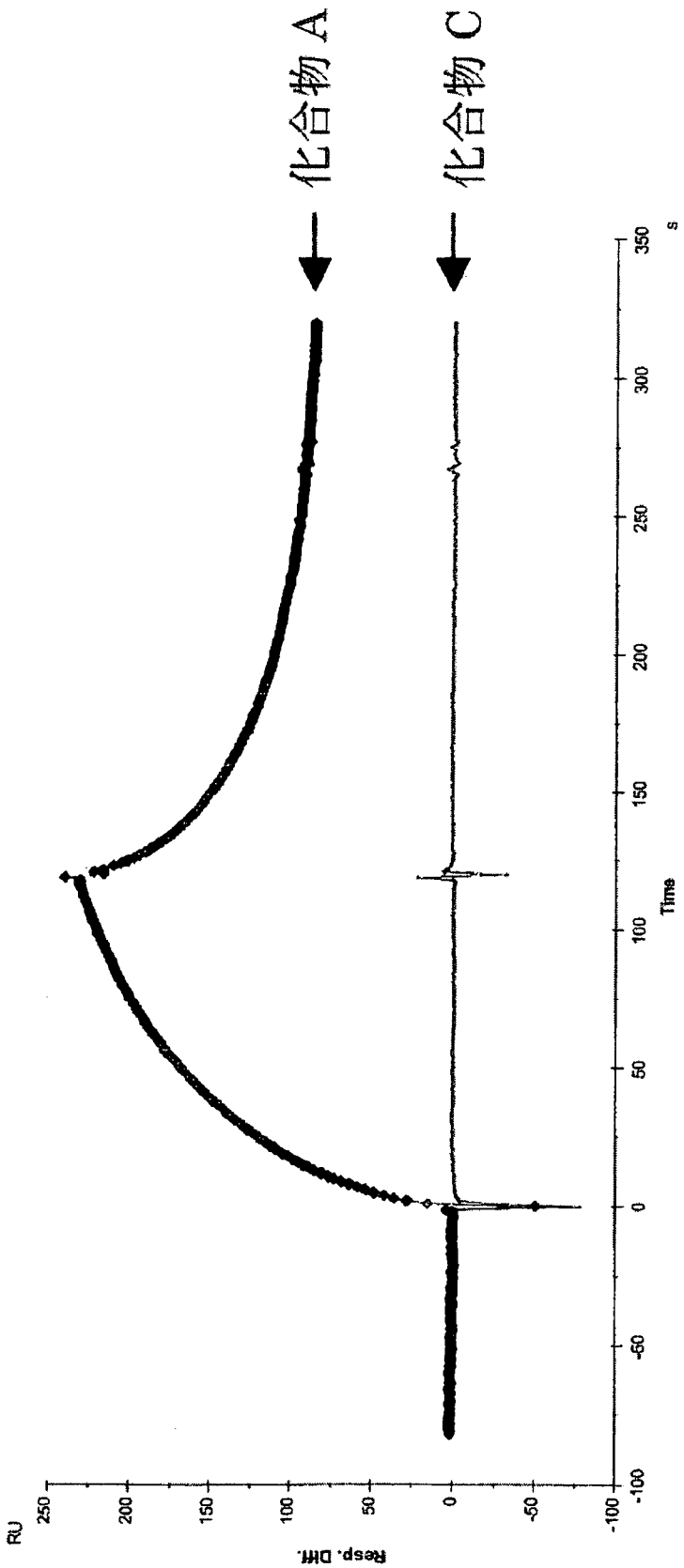

化合物 A
化合物 C
RU
Resp. Diff.
250
200
150
100
50
0
-50
-100
Time
s
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
-100

FIG. 5

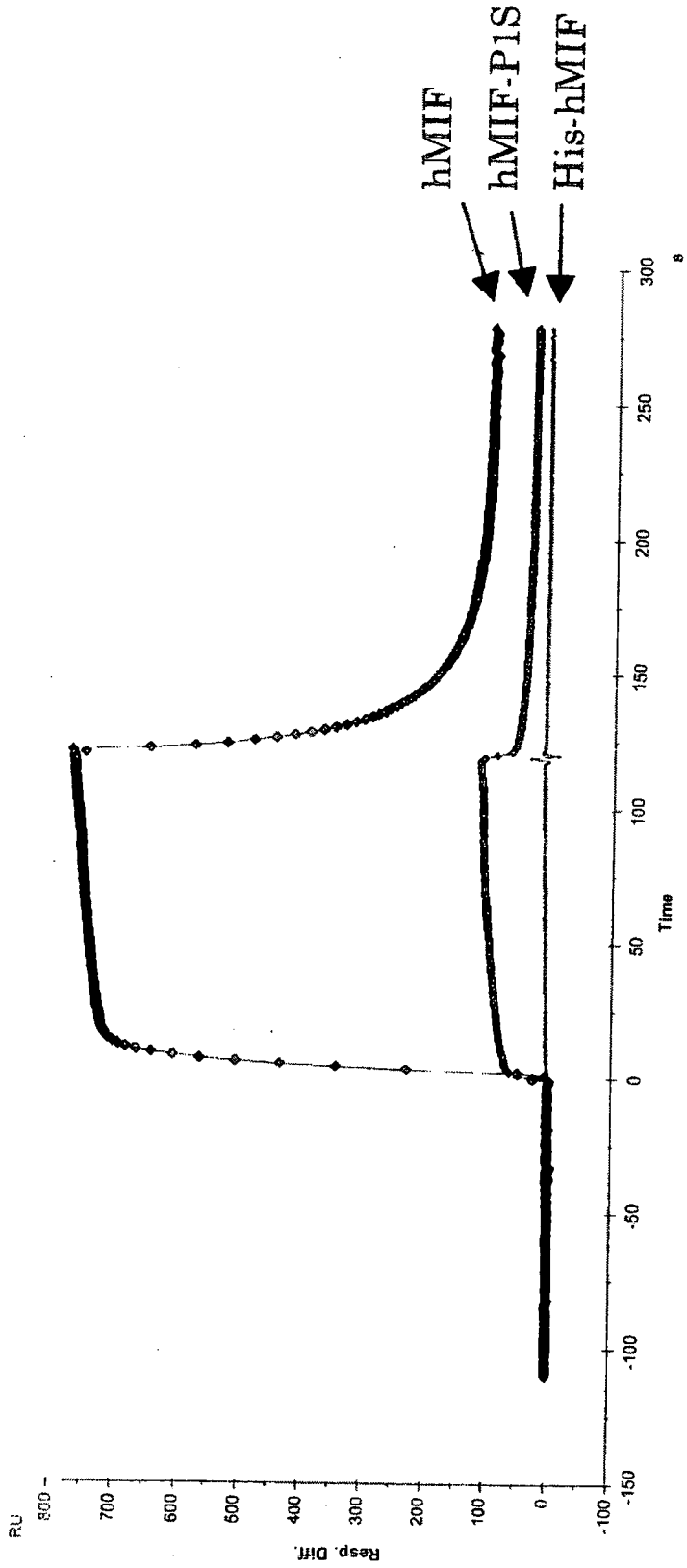
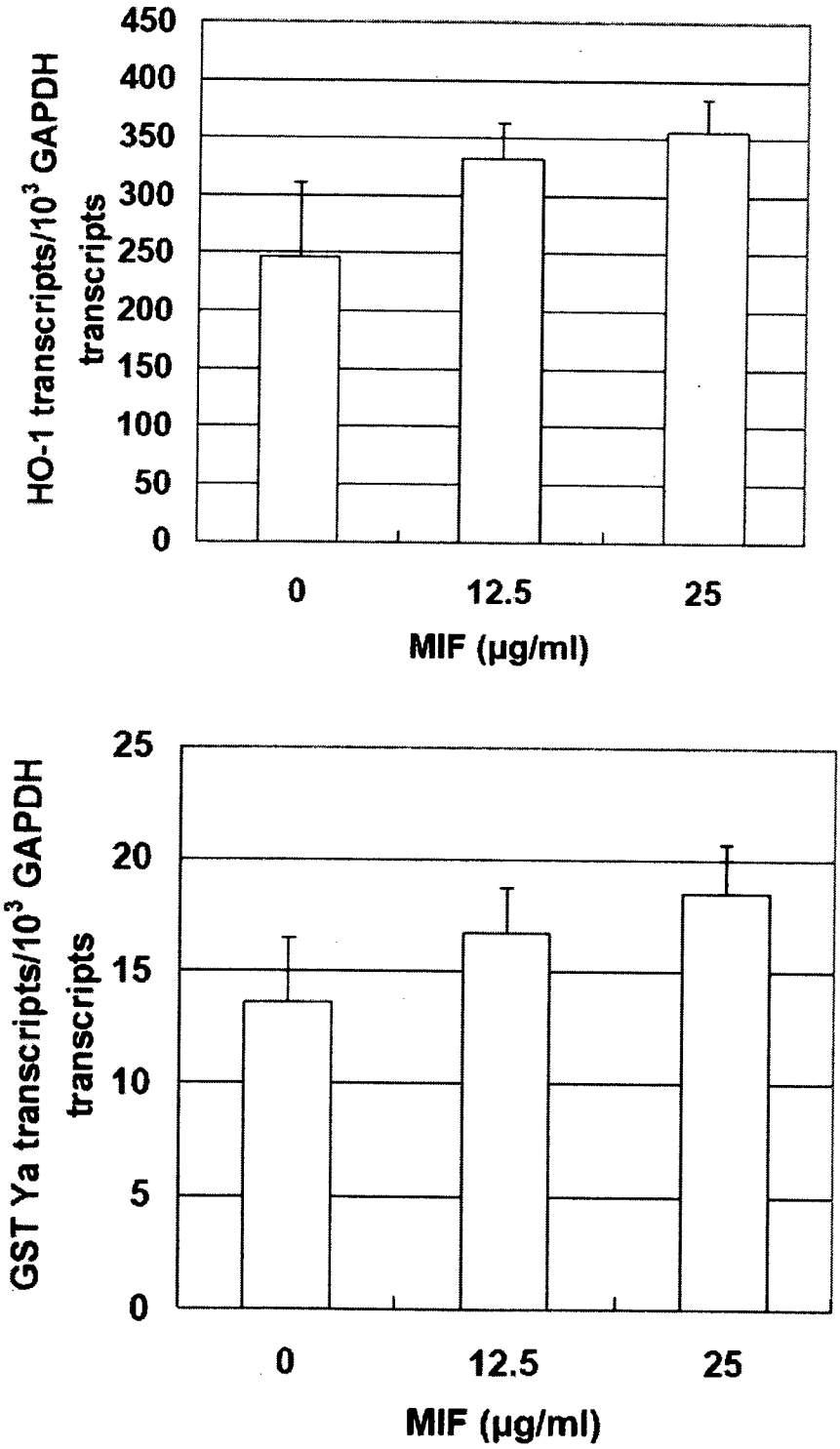

hMIF
hMIF-P1S
His-hMIF
RU
Resp. Diff.
Time
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-150
-100
-50
0
50
100
150
200
250
300

FIG. 6


HO-1 transcripts/10³ GAPDH transcripts
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0
12.5
25
MIF (μg/ml)
GST Ya transcripts/10³ GAPDH transcripts
25
20
15
10
5
0
0
12.5
25
MIF (μg/ml)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069141

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
A61K45/00(2006.01)i, *A61K31/5415*(2006.01)i, *A61K38/00*(2006.01)i, *A61P3/10*(2006.01)i, *A61P9/00*(2006.01)i, *A61P13/12*(2006.01)i, *A61P19/00*(2006.01)i, *A61P25/00*(2006.01)i, *A61P29/00*(2006.01)i, *A61P31/00*(2006.01)i,
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)
A61K45/00, A61K31/5415, A61K38/00, A61P3/10, A61P9/00, A61P13/12, A61P19/00, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/00, A61P35/00, A61P43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2007
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2007 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2007

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	Yukari NONAKA, "Macrophage Yuso Soshi Inshi (MIF) ni yoru NO Yudosei Saiboshi no Yokusei", Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry 2003 Nendo (Heisei 15 Nendo) Taikai Koen Yoshishu, 05 March, 2003 (05.03.03), page 144, Full text	1-4,9-12,22,24 5-8,13-17,23,25-27
X Y	MITCHELL,R.A. et al, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response, Proc Natl Acad Sci USA, 2002, Vol.99, No.1, p.345-50,Abstract	1-4,9-12,22,24 5-8,13-17,23,25-27

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 November, 2007 (01.11.07)	13 November, 2007 (13.11.07)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069141

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	HUDSON,J.D. et al, A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity, J Exp Med, 1999, Vol.190, No.10, p.1375-82, Abstract	1-4,9-12,22, 24 5-8,13-17, 23,25-27
Y	JP 2004-002404 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 08 January, 2004 (08.01.04), Claims; examples & WO 2003/0090782 A1 & EP 1500402 A1 & US 2006/034832 A1	5-8,13-17, 23,25-27
Y	WO 2003/020719 A1 (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 13 March, 2003 (13.03.03), Claims; examples & JP 2004-075652 A & EP 1424336 A1 & US 2005/032786 A1	5-8,13-17, 23,25-27
Y	JP 2004-196792 A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 15 July, 2004 (15.07.04), Claims; examples & WO 2004/060881 A1 & EP 1568697 A1 & US 2006/052371 A1	5-8,13-17, 23,25-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069141

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

A61P35/00(2006.01)i, *A61P43/00*(2006.01)i

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2007/069141

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.: 18-21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 18 to 21 pertain to "methods for treatment of the human body by therapy" and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

the

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, payment of a protest fee.

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６９１４１

Ａ．　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00(2006.01)i, A61K31/5415(2006.01)i, A61K38/00(2006.01)i, A61P3/10(2006.01)i, A61P9/00(2006.01)i, A61P13/12(2006.01)i, A61P19/00(2006.01)i, A61P25/00(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P31/00(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i

Ｂ．　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Int.Cl.　A61K45/00, A61K31/5415, A61K38/00, A61P3/10, A61P9/00, A61P13/12, A61P19/00, A61P25/00, A61P29/00, A61P31/00, A61P35/00, A61P43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２００７年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２００７年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２００７年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

BIOSIS(STN), CAplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN)

Ｃ．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X Y	野中由香里、マクロファージ遊走阻止因子（ＭＩＦ）によるＮＯ誘導性細胞死の抑制、日本農芸化学会2003年度（平成15年度）大会講演要旨集、2003年３月５日、１４４頁、全文	1-4,9-12,22,24 5-8,13-17,23,25-27
X Y	MITCHELL,R.A. et al, Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response, Proc Natl Acad Sci USA, 2002, Vol.99, No.1, p.345-50,Abstract	1-4,9-12,22,24 5-8,13-17,23,25-27

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 ０１．１１．２００７	国際調査報告の発送日 １３．１１．２００７
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	特許庁審査官（権限のある職員）　４Ｃ　３９５４ 今村　玲英子 電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４５２

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
X	HUDSON, J.D. et al, A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity, J Exp Med, 1999, Vol.190, No.10, p.1375-82,	1-4,9-12,22,24
Y	Abstract	5-8,13-17,23,25-27
Y	JP 2004-002404 A (武田薬品工業株式会社) 2004.01.08, 請求の範囲、実施例 & WO 2003/0090782 A1 & EP 1500402 A1 & US 2006/034832 A1	5-8,13-17,23,25-27
Y	WO 2003/020719 A1 (武田薬品工業株式会社) 2003.03.13, 請求の範囲、実施例 & JP 2004-075652 A & EP 1424336 A1 & US 2005/032786 A1	5-8,13-17,23,25-27
Y	JP 2004-196792 A (武田薬品工業株式会社) 2004.07.15, 請求の範囲、実施例 & WO 2004/060881 A1 & EP 1568697 A1 & US 2006/052371 A1	5-8,13-17,23,25-27

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２００７／０６９１４１

第Ⅱ欄　請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第１ページの２の続き）

法第8条第3項（ＰＣＴ17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

１．☑ 請求の範囲１８－２１ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲１８－２１は［治療による人体の処置方法に関するもの］であって、PCT規則39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。

２．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

３．☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿＿＿＿ は、従属請求の範囲であってＰＣＴ規則6.4(a)の第２文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄　発明の単一性が欠如しているときの意見（第１ページの３の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

１．☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

２．☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

３．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

４．☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。

☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。

☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。