(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl. [6]
A61K 38/00
A61K 31/00

(45) 공고일자 2001년10월24일
(11) 등록번호 10-0296899
(24) 등록일자 2001년05월15일

(21) 출원번호 10-1994-0701319
(22) 출원일자 1994년04월21일
번역문 제출일자 1994년04월21일
(86) 국제출원번호 PCT/US1993/01642
(86) 국제출원출원일자 1993년02월23일

(65) 공개번호 특1994-0703681
(43) 공개일자 1994년12월12일

(87) 국제공개번호 WO 1994/18959
(87) 국제공개일자 1994년09월01일

(81) 지정국 국내특허 : 기네, 오스트레일리아, 바베이도스, 불가리아, 브라질, 캐나다, 헝가리, 일본, 북한, 대한민국, 스리랑카, 마다가스카르, 노르웨이, 폴란드, 루마니아, 몽고,
AP ARIPO특허: 말라위, 수단,
EA 유라시아특허: 러시아,
EP 유럽특허: 그리스, 모나코, 오스트리아, 스위스, 리히텐슈타인, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 영국, 룩셈부르크, 네덜란드, 스웨덴,
OA OAPI특허: 코트디브와르,

(73) 특허권자 브리검앤드위민즈하스피탈, 인코포레이티드
쉘비 칼베르그 모르스
미합중국,매사츄세츠02115,보스톤,프란시스스트리트75
엔피에스 파마슈티칼즈, 인코포레이티드
젠센, 제임스 유.
미국, 유타주 84108-1256 솔트 레이크 시티 치페타 웨이420

(72) 발명자 네메드,에드워드,에프.
미합중국84108유타주솔트레이크시티이.포튜나드라이브3258
브라운,에드워드엠.
미합중국02186메사추세츠주밀톤하이랜드스트리트341
허버트,스티븐씨.
미합중국02187메사추세츠주웰레슬리햄프셔로드146
반와게넨,브래드포드,씨.
미합중국84102유타주솔트레이크시티#507이스트300사우쓰1070
발란드린,마누엘,에프.
미합중국84121유타주솔트레이크시티사우쓰1585이스트5787
풀러,포레스트에이치.
미합중국84103유타주솔트레이크시티밀리터리웨이1401
델마,에릭쥐.
미합중국84108유타주솔트레이크시티이스트세인트메리즈서클2967

(74) 대리인 주성민

심사관 : 백경업

(54) 칼슘수용체활성분자

요약

본 발명은 그의 활성이 1종 이상의 무기 이온 수용체의 활성에 의해 조절되거나 영향을 받는 1종 이상의 성분의 양이 비정상적인 것이 특징인 질병을 가진 환자의 치료에 유용한 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 이러한 방법 및 조성물에 유용한 신규의 화합물을 제공한다. 이 방법은 환자에게 1종 이상의 무기 이온 수용체에 활성인 분자의 치료적 유효량을 제제 또는 길항질로서 투여하는 것으로 이루어진다. 바람직하게는, 이 분자는 상피소체 세포, 골 파골세포, 신장 사구체 세포, 근의 뇨 세관 세포, 원의 뇨 세관 세포, 헨레계제(Henle's loop) 및 (또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포, 갑상선 방려포세포(C-세포), 장 세포, 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포로 이루어지는군 중에서 선택된 세포 중 모든 세포는 아닌 1종 이상의 세포외 Ca^{2+} 수용체에서 선택적인 작용질 또는 길항길로 작용할 수 있다.

대표도

도 1a

명세서

[발명의 명칭]

칼슘 수용체 활성 분자

[발명의 상세한 설명]

[발명의 분야]

본 발명은 세포에 대해 세포의 칼슘 이온과 유사한 방식으로 작용할 수 있는 신규의 칼슘 유사 분자의 디자인, 개발, 조성 및 용도, 세포에 대해 세포의 칼슘이온의 활성을 차단시키는 칼슘 길항 분자, 및 이들 분자의 사용 및 동정 방법에관한 것이다.

본 발명은 또한 칼슘 수용체를 포함하는 무기 이온 수용체들의 신규 수퍼패밀리(superfamily), 이 칼슘 수용체를 코딩하는 핵산, 이 핵산을 함유하는 세포, 조직 및 동물, 수용체에 대한 항체, 수용체 활용 분석법 및 이들 모두와 관련된 방법에 관한 것이다.

[발명의 배경]

하기 설명은 본 발명과 관련된 정보를 요약해서 제공한다. 본 명세서에 제공된 정보들 중 어느 것도 본 발명에 대한 선행 기술로서 인정되지 않으며, 구체적으로나 또는 함축적으로 참조된 간행물 중 어느 것도 본 발명에 대한 선행 기술이 아니다.

신체 중 특정 세포는 화학적 시그날뿐만 아니라 세포의 칼슘 이온(Ca^{2+})과 같은 이온들에도 반응한다. 세포외 Ca^{2+}의 농도(본 명세서에서는 "$[Ca^{2+}]$"로 칭해짐) 변화는 이들 세포의 기능적 반응을 변화시킨다. 이러한 세포로서 구체적인 하나는 상피소체 호르몬(PTH)을 분비하는 상피소체 소포이다. PTH는 혈액과 세포외 유체중의 Ca^{2+} 항상성을 조절하는 주요 내분비 인자이다.

PTH는 골과 신장 세포에 작용함으로써 혈액 중 Ca^{2+} 의 농도를 증가시킨다. 이어서, 이러한 [Ca^{2+}]의 증가는 PTH분비를 억제하면서 부정적인 피드백 시그날로서 작용한다. [Ca^{2+}]와 PTH분비 사이의 상화 관계는 신체의 Ca^{2+} 항상성을 유지하는 본질적인 메카니즘을 형성한다.

세포외 Ca^{2+} 는 상피소체 세포에 직접 작용하여 PTH 분비를 조절한다. [Ca^{2+}]의 변화를 감지하는 상피소체 세포의 표면 단백질의 존재는 이미 제안되어 왔다. 이 단백질은 세포외 Ca^{2+} 에 대한 수용체(" Ca^{2+} 수용체")로서 작용하며, [Ca^{2+}]의 변화를 감지하고 기능적 세포 반응, 즉 PTH 분비를 개시하는 것으로 제안되었다. 예컨대, 세포내 Ca^{2+} 및 세포 기능에 있어서의 Ca^{2+} 수용체 및 세포외 Ca^{2+} 의 역할에 대해서는 네메드 등의 문헌[11 Cell Calcium 319, 1990]에서 고찰하고 있으며, 방려포세포 및 상피소체에 있어서의 Ca^{2+} 수용체의 역할은 네메드 등의 문헌[11 Cell Calcium 323, 1990]에 논의되어 있고, 골 파골세포에 대한 Ca^{2+} 수용체의 역할은 자이디(Zaidi)의 문허[10 Bioscience Reports 493, 1990]에 논의되어 있다.

신체 중의 기타 세포, 구체적으로 골 파골세포, 신장의 사구체 및 인접 세관 세포, 표피의 표피세포, 갑상선의 방려포세포 및 태반의 트로포블라스트(trophoblast)는 [Ca^{2+}]의 변화를 감지하는 능력이 있다. 세포 표면 Ca^{2+} 수용체들은 또한 이들 세포위에 존재하여 이들 세포에 [Ca^{2+}]의 변화를 감지하고 이러한 변화에 대한 반응을 개시하거나 또는 이러한 변화에 대해 반응할 수 있는 능력을 부여하는 것으로 제안되어 왔다.

상피소체 세포, 파골세포, 방려포세포(C-세포), 표피세포, 사구체 세포 및 트로포블라스트에서, [Ca^{2+}]의 증가는 세포내 유리 Ca^{2+} 농도(" [Ca^{2+}]i")를 증가시킨다. 이러한 증가는 세포외 Ca^{2+} 의 대량유입에 의해서나 또는 세포내 기능질로부터 Ca^{2+} 의 동원에 의해 유발될 수 있다. [Ca^{2+}]i의 변화는 fura-2 또는 indo-1(미합중국 오레곤주 유겐(Eugene)사로부터 시판되는 분자 탐침)과 같은 형광계를 사용하여 쉽게 모니터되고 정량화된다. [Ca^{2+}]i의 측정은 Ca^{2+} 수용체에서 작용질 또는 길항질로 작용하는 분자들의 능력을 평가하는 분석을 제공한다.

상피소체 세포에서, 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가는 [Ca^{2+}]i의 급격하고 일시적인 증가에 이어 보다 낮으나 지속적인 [Ca^{2+}]i의 증가를 일으킨다. [Ca^{2+}]i의 일시적 증가는 세포내 Ca^{2+} 의 동원에 의해 생기며, 반면에 더 낮고 지속적인 증가는 세포외 Ca^{2+} 의 대량유입으로부터 생긴다. 세포내 Ca^{2+} 의 동원은 각종의 기타 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 수용체 의존성 동원과 관련있는 두가지의 생화학적 지시체인 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트(IP_3) 및 디아실글리세롤의 형성을 증가시키면 가능하다.

Ca^{2+} 이외에도, 각종의 다른 2가 및 3가 양이온, 예컨대 Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} ,La^{3+} 및 Gd^{3+} 역시 상피소체에서 세포내 Ca^{2+} 를 동원할 수 있다. Mg^{2+} 및 La^{3+} 도 또한 IP_3의 형성을 증가시키며. 이들 무기 양이온은 모두 PTH의 분비를 저하시킨다. 따라서 상피소체위에 존재한는 것으로 추측된 Ca^{2+} 수용체는 그것이 각종의 세포외 2가 및 3가 양이온들을 감지하기 때문에 우발적인 것이다.

시험관내에서 세포외 Ca^{2+} 와 유사하게 작용하는 각종 화합물의 능력에 대해서는 문헌[네메드 외 공저, " Calcium-Binding Proteins in Health and Disease" 중의(스페르민 및 스페르미딘),1987, 아카데미 출판사, 제33-35 페이지; 브라운(Brown)의 공저, (예컨대 네오마이신) 128 Endocrinology 3047, 1991; 첸(Chen)외 공저, (딜티아젬 및 이들의 동족체, TA-3090) 5 J. Bone and Mineral Res. 581, 1990; 및 자이디(Zaidi)외 공저, (베라파밀)167 Biochem Biophys Res Comm 807, 1990]에 논의되어 있다.

브라운 등의 문헌[6. J.Bone and Mineral Res. 11, 1991]은 상피소체 세포에 대한 Ca^{2+} 이온의 작용에 관한 현존 이론들에 대해 논의하고 있으며, 그 결과들은 다음과 같은 수용체 유사 메카니즘 및 수용체 독립성 메카니즘 양자에 의해 설명될 수 있다고 제안하고 있다.

다가 양이온, 예컨대 2가 및 3가 양이온들은 상피소체 호르몬(PTH) 분비 및 cAMP 축적의 억제, 이노시톨 포스페이트 축적의 자극, 및 세포질 칼슘 농도의 상승과 같은 상피소체 기능에 대하여 다양한 작용을 한다. 이러한 작용은 " 수용체 유사 메카니즘" 에 의해 달성되는 것으로 간주된다. 작용질로 자극되는 cAMP 축적의 2가 및 3가 양이온에 의한 억제는 예를 들면 백일해 독소로 예비인큐베이션시킨 후에 차단된다. 따라서, 추정적인 다가 양이온 수용체는 억제성 구아닌 뉴클레오티드 억제(G) 단백질 Gi에 의해 아데닐산 시클라제를 억제시키는 것으로 결부시켜 생각할 수 있다.

최근에 본 발명자들은 폴리양이온성 항생제 네오마이신이 상피소체 기능의 몇가지 면에서 2가 및 3가 양이온과 유사한 작용을 한다는 것을 알았다. 이들 작용이 이 제제에 대해서만 특이적인 것인지 아니면 폴리양이온의 보다 일반화된 작용을 나타내는 것인지를 결정하기 위하여 본 발명자들은 분산시킨 소의 상피소체세포에서 동일한 인자에 대해 고도로 염기성인 펩티드, 폴리아르기닌 및 폴리리신, 그리고 프로타민의 효과를 시험하였다. 이 결과로부터 상피소체 세포는 잠재적으로는 유사한 생화학적 경로를 통해 다양한 폴리양이온 뿐만 아니라 다가 양이온에도 반응하는 것으로 드러났다. 이 결과는 최근에 추정된 바와 같이 다른 시스템에서의 폴리양이온에 의한 G 단백질의 " 수용체 독립성" 조절이라는 관점에서 논의된다.

Ca^{2+} 수용체는 G 단백질과 결합된 다른 수용체, 예컨대 글리코프로틴과 유사한 것으로 추정되어 왔으나, 다른 세포 유형에 대한 최근의 연구에서는 폴리양이온이 별법 또는 추가의 메카니즘에 의해 세포의 기능을 조절할 수 있다는 가능성을 제시했다. 마스트(mast) 세포에서, 예를 들면 마스토파란을 포함하여 각종의 양성계 양이온, 와스프(wasp) 독의 펩티드, 48/80, 합성 폴리양이온 및 폴리리신을 백일해 독소 감지 메카니즘에 의해 분비를 증가시키는데, 이러안 사실로부터 G단백질의 관련 여부가 제안되고 있다. 전통적인 세포 표면 수용체 중 어느 것도 이렇게 다양한 제제들의 작용을 매개할 수 있는 것으로 동정된 것은 없었다. 더우기, 이와 동일한 화합물들은 용액 또는 인공의 인지질 소포 중에서 정제된 G 단백질을 직접 활성화시키는 것으로 드러났다. 이러한 고찰을 기초로 할 때, 양성계 양이온은 G 단백질을 활성화시키는, 환언하면 " 수용체-독립성" 메카니즘에 의해 마스트 세포가 분비되는 것으로 제안되어 왔다.

또한, 폴리양이온은 산성 인지질과 강하게 상호작용하는 것으로 나타났다. 사슬의 길이가 가변적인(20-1,000개의 아미노산) 폴리리신은 0.5 nM 내지 1.5 μM의 해리 상수를 가지며 인공 인지질 소포와 결합한다. 이 결합 친화도는 폴리리신 사슬의 길이에 직접 연관되어 있으며, 0.5 nM의 Kd를 갖는 1000개의 아미노산으로 된 중합체의 경우, 중합체의 길이가 더 짧을수록 Kd값은 더 커지고, 리신은 상당한 정도로 상호작용하지 않는다. 효능과 사슬 길이와의 이러한 관계는 상피소체 기능에 대한 폴리리신$_{10,200}$, 폴리리신$_{3.800}$ 및 리신의 효과에 대해 관찰된 것과 유사하다.

생체막과 폴리양이온의 결합은 이들 생체막의 생물학적 작용의 일부를 제공할 수 있다. 일부 세포 유형에서 폴리양이온을 포함하여 각종의 세공형성제에 의해 유발된 형질막의 투과는 이들 제제와 포스파티딜세린 유사 구조와의 상호작용에 의해 매개되는 것으로 추정되어 왔다. 또한, 양성계 양이온에 의한 정제된 G단백질의 " 수용체 독립성" 활성와는 이들 단백질이 인지질 소포속에 혼입될 때 더 강화된다.

칼슘 이온은 밀리몰 농도로 사용될 경우에도 막 구조에서 놀라운 변화를 일으킨다. 일부 경우에, 칼슘은 폴리양이온과 막 지질간의 상호작용에 대해 길항작용을 할 수도 있고 강화 작용을 할 수도 있다. 이러한 고려를 근거로 해 볼 때 다가 양이온 및 폴리양이온의 상피소체 세포에 대한 작용은 전통적인 세포 표면의 G 단백질과 결합된 수용체를 필요로하지 않는 수용체 독립성 메카니즘과 관련이 있다는 사실을 발견할 수 있다. 그러나, 또다른 연구에서는 이러한 세포 및 기타 세포 유형에 의해 Ca^{2+} 를 감지하기 의한 분자 체계가 요구된다(참고 문헌 생략).

문헌[쇼박(Shoback) 및 첸(Chen) 공저, 6(부록 1), J Bone and Mineral Res. 1991, S135) 및 라케(Racke)의 공저, 6(부록 1), J. Bone and Mineral Res. 1991, S118]은 Ca^{2+} 수용체 또는 Ca^{2+} 감지체가 상피소체 세포에 존재한다는 것을 나타내주는 실험에 대해 기재하고 있다. 세포로부터 단리된 전사 RNA는 난모세포를 발현시켜 이들 난모세포에 표현형을 제공할 수 있으며, 이러한 사실은 Ca^{2+} 수용체 단백질의 존재로 인해 설명될 수 있다.

[발명의 요약]

본 발명자들은 Ca^{2+} 수용체 단백질이 신체의 Ca^{2+} 대사와 관련된 임의의 특정 세포로 하여금 세포외 Ca^{2+} 의 농도 변화를 감지하고 그 변화에 반응할 수 있게 한다는 것을 설명해 왔다. 비록 이들 수용체는 소정의 일반적 특성을 공유하고 있지만,이들은 상이한 약리학상 제제에 의해 선택적으로 영향을 받는다. 이하에서 상세히 설명한 바와 같이, 소정의 분자들은 상피소체 세포, 파골세포 및 C-세포에서 Ca^{2+} 수용체에 대해 선택적인 활성을 가짐으로 인해 동정된다.

Ca^{2+} 수용체는 세포외 Ca^{2+} 의 작용과 유사하게 작용하거나(" 칼슘 유사물") 또는 세포외 Ca^{2+} 의 작용에 길항 작용을 하는(" 칼슘 길항물") 새로운 종류의 분자에 대해서 특이적인 분자 표적을 이룬다. 이들 수용체는 표면 세포상에 존재하며 세포외 Ca^{2+} 에 대해 낮은 친화도를 갖는다(일반적으로 약 0.5mM이상의 Kd).

이들 수용체는 쿠퍼(Cooper), 블룸(Bloom) 및 로드(Roth)의 문헌[The Biochemical Basis of Neuropharnncology" , 제4장]에 정의된 바와 같이 유리 또는결합 실행체 메카니즘을 포함할 수도 있다. 따라서, 이러한 수용체는 세포내 Ca^{2+} 수용체, 예컨대 칼모둘린 및 트로포닌과는 뚜렷이 구분된다. 예를 들어 칼슘 유사물은 Ca^{2+} 수용체에 선택적으로 작용하여 상피소체 세포나 파골 세포의 기능을 직간접적으로 저하시키거나 또는 C-세포의 기능을 자극한다. 본 발명의 칼슘 유사물 및 칼슘 길항물은 상피소체기능항진중, 골다공중 및 기타 Ca^{2+} 관련 질환에 대한 새로운 치료법을 제공할 수 있다. 본 발명은 이러한 3가지 세포 유형 및 [Ca^{2+}]의 변화를 감지하고 그 변화에 반응하는 기타 세포 유형들 각각에 대해 Ca^{2+} 수용체를 표적으로 하는 것에 관한 것이다.

먼저, 본 출원인은 상피소체에서 Ca^{2+} 수용체 단백질의 존재를 입증하고, C-세포 및 파골세포와 같은 다른 세포에 있는 이러한 Ca^{2+} 수용체를 약리학적으로 구별하고자 하였다. 또한, 본 출원인은 먼저 이들 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성인 분자들을 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성인 유용한 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물의 발견, 개발, 디자인, 변형, 및(또는) 구성시에 리드(lead) 분자로서 동정 및 사용할 수 있는 방법을 설명하고자 한다. 이러한 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물은 1종 이상의 성분, 예컨대 호르몬, 효소 또는 성장 인자와 같은 폴리펩티드 및 1종 이상의 Ca^{2+} 수용체에서 활성에 의해 조절 또는 영향을 받는 단백질 발현 및(또는) 분비의 수준이 비정상적인 것이 특징인 각종 질병 상태의 치료에 유용하다. 또한, 상이한 세포 유형에서의 상이한 Ca^{2+} 수용체의 동정 및 이러한 수용체의 상이한 리드분자에 대한 특이적 반응은 이러한 특이 Ca^{2+} 수용체에서 활성에 의해 영향을 받을 수 있는 특이 질병의 치료에 효력이 있는 특이 분자의 디자인 및 구성을 가능케 한다. 예컨대, 상피소체 호르몬 분비의 비정상적 수준은 다른 Ca^{2+} 억제 호르몬 등의 분비 수준에 영향을 미치지 않는 이러한 특이 분자에 의해 영향을 받을 수 있다.

이러한 리드 분자의 동정은 활성 분자를 발견하기 위한 종래의 고처리량 선별 시스템의 결합 및 효과적인 약물 후보를 디자인하기 위한 구조적 데이타 베이스의 부재로 인해 어려움을 겪어왔다. 현재 이러한 장벽은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체 및 이와 기능적으로 연관된 수용체들의 클로닝, 및 이렇게 클로닝된 Ca^{2+} 수용체 및 이와 기능적으로 연관된 수용체들을 활성화시키는 소정 리드 분자의 구조적 특징들의 조직적인 조사에 의해 제거된다. Ca^{2+} 수용체의 클로닝은 또한 천연 물질 또는 분자, 라이브러리 및 합성 분자의 고처리량 선별법에 적합한 형질감염된 세포주의 개발도 가능케 한다. 이것은 후술되어 있는 구조-활성 연구와 함께 신규의 칼슘 유사물 및 칼슘 길항물을 개발하기 의해 요구되는 기술을 제공한다.

본 출원인은 이러한 과정을 본 출원에서 이룩하였다. 소 상피소체 세포 칼슘 수용체 cDNA를 클로닝하였고, 이를 수탁번호 ATCC 75416으로 ATCC에 기탁하였다. 이 클론을 사용하면, 다른 조직 및 중 동족체 중의 무기 이온 수용체를 쉽게 얻을 수 있다. 예컨대, 인체 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체 cDNA는 크세노푸스(Xenopus) 난모세포에서 기능적인 단백질 합성에 대한 선별법에 의해 클로닝시킬 수 있으며, Ca^{2+} 수용체에 대한 활성에 필요한 유기 분자의 구조적 특징은 선택된 천연 물질 또는 기타 분자 라이브러리 및 후속되는 구조-활성 연구의 시험을 통해 결정할 수 있다.

따라서, 본 발명의 제1특징은 세포에서 [Ca^{2+}]i를 증기시킴으로써 세포외 Ca^{2+} 와 유사한 활성을 갖거나 또는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유도된 [Ca^{2+}]i의 증가를 차단시키는 한 분자를 포함하는 제약 조성물에 있다. 이 분자는 5μm 이하의 EC_{50} 을 가지나, 프로타민은 아니다.

" 유사한 활성을 갖는다" 는 것은 상기 분자가 세포외 Ca^{2+} 에 반응하는 세포에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 특이적 활성 중 한가지 이상을 갖고 있다는 것을 의미한다.

이것은 세포외 Ca^{2+} 의 모든 생물학적 기능과 유사한 기능을 갖고 있을 필요는 없으며, 이들 기능 중 적어도 한가지가 유사한 것으로 족하다. 더우기, 이 분자는 세포외 Ca^{2+} 이 수용체에 결합하는 부위와 동일한 부위에 결합할 필요도 없다(예를 들면, 하기 실시예 20에서 신규 화합물 NPS 467 및 그의 작용 참조). " 차단시킨다" 는 것은 이러한 Ca^{2+} 의 한가지 작용이 이 분자에 의해 저하되거나 또는 방해받는다는 것을 의미한다. EC_{50} 은 후술된 분석으로 측정할 수 있으며, 이 분석에서 유사한 작용을 하는 활성을 측정하였고 최대 유사 작용 효과의 절반 수준으로 유사 작용할 때의 분자의 농도가 EC_{50} 이다. 이와는 반대로, 칼슘 길항물의 IC_{50} 은 최대 활성을 절반 차단시키는 그 양이다. 바람직하게는, 이 분석은 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 측정하고, 후술된 방법 또는 이 방법의 등가물에 의해 Ca^{2+} 수용체에 특이적 인가를 확인한다.

바람직한 실시태양에서, 본 명세서에 기재되어 있는 생물분석으로부터 세포에서 $[Ca^{2+}]i$의 증가는 1분 미만의 지속기를 갖는 일시적인 것이고; $[Ca^{2+}]i$의 증가는 30초 내에 일어나는 급속한 것이며; 또한 상기한 분자는 (a) $[Ca^{2+}]i$의 지속적인 증가(30초 이상)를 일으키고, (b) 예를 들면 60초 미만의 시간 이내에 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트 및(또는) 디아실글리세롤 농도를 증가시키며, (c) 도파민 또는 이소프로테레놀로 자극된 시클릭 AMP 형성을 억제시키는 것으로 입증되었다. 또한, $[Ca^{2+}]i$의 일시적 증가는 10mM 불화나트륨으로 세포를 10분간 예비처리함으로써 저하되거나 또는 단백질 키나제(kinase) C의 활성제, 예컨대 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA), 메제레인 또는 (-)인도락탐 V로 세포를 간단하게 예비처리(10분 이하)함으로써 저하된다.

상피소체 세포에서, 상기한 모든 분석에서 활성이 있는 분자들은 본 발명에특히 유용한데, 이것은 상기한 세포외 Ca^{2+} 수용체에 대해 이들 분자의 작용이 특이적이기 때문이다. 이것은 특히 상기한 PMA 예비처리 효과의 경우 잘 부합된다.

보다 바람직한 태양에서, 세포는 상피소체 세포이고 상기한 분자는 세포로부터 상피소체 호르몬 분비를 억제한다. 다른 바람직한 태양은 검출되는 $[Ca^{2+}]i$의증가를 유발시키는 분자, 예컨대 상피소체 세포, 골 파골세포, 신장 사구체 세포, 근위 뇨 세관 세포, 원위 뇨 세관 세포, 헨레계제(Henle's loop) 및(또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포, 갑상선 방려포세포(C-세포), 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포의 mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 Cl- 의 증가를 유발시키는 분자를 포함한다.

또다른 바람직한 태양에서, 상기한 분자는 세포내 Ca^{2+} 을 동원하여 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 일으키고; 세포는 C-세포 또는 파골세포이며, 상기한 분자는 생체내 골흡수를 억제시키고; 세포는 파골세포이며, 상기한 분자는 생체내 골흡수를 억제시키고; 또는 세포는 C-세포이며, 상기한 분자는 시험관내 또는 생체내 칼시토닌 분비를 자극하고; 가장 바람직하게는, 상기한 분자가 Ca^{2+} 수용체에서 5μM 이하, 더욱 더 바람직하게는 1μM, 100nM, 10nM 또는 1nM 이하의 EC_{50} 또는 IC_{50} 을 갖는 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물이다. 이렇게 낮은 EC_{50} 값 또는 IC_{50} 값은 저농도의 분자로도 치료 또는 진단용으로 생체내에서나 또는 시험관내에서 사용될 수 있게 하기 때문에 유리하다. 이렇게 낮은 EC_{50} 값 및 IC_{50} 값을 갖는 분자들의 발견으로 말미암아 유사한 효능 및 효과를 갖는 분자들의 디자인 및 합성이 가능하게 된다.

" 칼슘 유사" 분자란 세포외 Ca^{2+} 의 활성 중 한가지 이상을 갖는 임의의 분자를 의미하며, 바람직하게는 Ca^{2+} 수용체에서 Ca^{2+} 의 활성과 유사한 활성율 갖는다. 예를 들어 상피소체 세포와 관련하여 사용될 때, 상기 분자는 시험관내에서 상피소체 세포에 대해 시험할 경우 당업자들에게 공지되어 있는 기술에 의해 측정된 다음의 특성들 중 한가지 이상, 바람직하게는 이들 특성 모두를 갖는 분자이다.

1. 이들 분자는 La^{3+} 또는 Gd^{3+} 에 의해 억제하기 어려운 $[Ca^{2+}]i$의 급속하고(피크에 도달하는 시간 5초 미만) 일시적인 증가를 일으킨다. $[Ca^{2+}]i$의 증가는 세포외 Ca^{2+} 가 없을 경우 지속되나, 이오노마이신에 의한 예비처리(세포외 Ca^{2+} 가 없을 경우)에 의해 그 증가가 소멸된다;

2. 이들 분자는 세포외 Ca^{2+} 의 최대 이하 농도에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 강화시킨다;

3. 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$의 증가는 디히드로피리딘에 의해 억제되지 않는다:

4. 이들 분자에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$의 일시적 증가는 10mM 불화나트륨에 의한 10분간의 예비처리로 저하된다;

5. 이들 분자에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 일시적 증가는 단백질 키나제 C(PKC)의 활성제, 예컨대 포르볼 미리스테이트 아세테이트(PMA), 메제레인 또는 (-)-인도락탐 V에 의한 예비처리로 감소된다. 단백질 키나제 C 활성제의 총체적인 효과는 최대 반응에 영향을 미치지 않고 분자의 농도-반응 곡선을 우측으로 이동시키는 것이다;

6. 이들 분자는 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트 및(또는) 디아실글리세롤의 형성시 급속한(< 30초) 증가를 일으킨다;

7. 이들 분자는 도파민- 또는 이소프로테레놀로 자극된 시클릭 AMP 형성을억제시킨다;

8. 이들 분자는 PTH 분비를 억제시킨다;

9. 백일해 독소에 의한 예비처리(4시간 이상 동안 100ng/ml)는 시클릭 AMP 형성에 대한 이들 분자의 억제 영향을 차단시키나, [Ca^{2+}]i, 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트 또는 디아실글리세롤의 증가를 일으키는데는 영향을 미치지 않으며, PTH 분비는 저하시킨다;

10. 이들 분자는 소 또는 인체 상피소체의 폴리(A)$^{+}$ + 풍부 mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 Cl- 유동를 증가시키나, 물, 쥐의 뇌 또는 간 mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서는 아무런 영향을 미치지 않는다;

11. 마찬가지로, 상피소체 세포로부터 클로닝된 수용체를 사용할 경우, 이들 분자는 수용체를 코딩하는 특이 cDNA 또는 mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 반응을 유발시킬 것이다.

"칼슘길항성" 분자란 세포외 Ca^{2+} 감지 세포에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 활성 중 한가지 이상을, 바람직하게는 Ca^{2+} 수용체에서 길항질로 작용함으로써 차단시키는 임의의 분자를 의미한다. 예컨대,

1. 이들 분자는 농도가 증가된 세포외 Ca^{2+} 의 (a) [Ca^{2+}]i를 증가시키고, (b) 세포내 Ca^{2+} 를 동원하고 (c) 이노시톨-1,4,5-트리스포스페이트의 형성을 증가시키고, (d) 도파민-또는 이소프로테레놀로 자극된 시클릭 AMP 형성을 감소시키고, (e) PTH 분비를 억제시키는 능력을 부분적으로 또는 완전히 차단시킨다;

2. 낮은 [Ca^{2+}]i, 즉 0.5mM에서, 상기한 분자는 단독으로는 [Ca^{2+}]i를 변화시키지 않는다:

3. 이들 분자는 세포외 Ca^{2+} 또는 칼슘 유사 화합물에 의해 유발된 소 또는 인체 상피소체의 폴리(A)$^{+}$-mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 Cl- 유동의 증가를 차단시키나, 물, 쥐의 뇌 또는 간 mRNA를 주입된 크세노푸스 난모세포에서는 아무런 영향을 미치지 않는다;

4. 마산가지로, 상피소체 세포로부터 클로닝된 수용체를 사용할 경우, 이들 분자는 세포외 Ca^{2+} 또는 칼슘 유사 화합물에 의해 유발된 Ca^{2+} 수용체를 코딩하는 특이 cDNA 또는 mRNA로 주입된 크세노푸스 난모세포에서 반응을 유발시킬 것이다.

기타 세포 유형에 대한 Ca^{2+} 수용체에서의 유용한 칼슘 유사물 및 칼슘 길항물의 대응적 정의는 후술되는 실시예들로부터 명백해질 것이다.

Ca^{2+} 수용체는 소정의 무기 폴리양이온 및 폴리양이온성 유기 분자를 감지하고 이들에 대해 반응할 수 있다. 예컨대, 상피소체 세포는 이들 유기 폴리양이온의 첨가로 인한 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가를 구별할 수 없는데, 이것은 아마도 이들 유기 분자가 Ca^{2+} 수용체에서 세포외 Ca^{2+} 와 똑같이 행동하기 때문일 것이다.

본 발명의 칼슘 유사 분자는 Ca^{2+} 수용체의 특히 양호한 작용질이며, 선택된세포기능, 에컨대 상피소체 세포로부터 PTH의 분비를 변화시키는 약물로서 사용될수 있다. Ca^{2+} 와는 달리 이들 분자는 오직 1종 이상, 그러나 모든 Ca^{2+} 수용체에서 작용하지는 않기 때문에 한가지의 Ca^{2+} 수용체를 특이적으로 표적화할 수 있는 능력을 제공한다.

이들 분자는 또한 $[Ca^{2+}]i$ 및 $[Ca^{2+}]$가 원인이 되는 각종 질병, 예컨대 상피소체기능항진중, 골다공증, 파제트명(Paget's disease), 고혈압, 신장 질환, 피부질환, 심장혈관 질환, 혈병성 질환, 위장관 질환, 엔도크린성 질환, 비정상적 인물 대사 및 암의 치료에 있어서 효과적인 보다 새로운 요법을 개발하기 의한 리드구조를 제공한다.

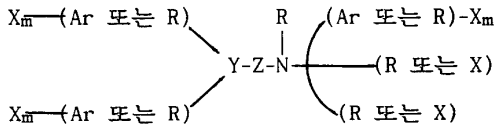
칼슘 유사물 및 칼슘 길항물은 환자에게 제약 조성물을 투여함으로써 환자에 있어서 세포외 유리 Ca^{2+} 의 농도를 조절하고 상기한 군으로부터 선택된 세포에 대한 세포외 Ca^{2+} 와 유사한 영향을 갖도록 하는데 유용한 제약 조성물로서 제제할 수 있다. 본 발명이 있기 이전에 본 출원인들은 Ca^{2+} 수용체의 작동 또는 조절에 있어서의 불규칙성으로 인한 질병 또는 이러한 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키거나 또는 불활성화시킴으로써 처치될 수 있는 정상적인 Ca^{2+} 수용체를 갖는 동물들의 질병 치료에 유용한 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용하는 이러한 분자들을 전혀 알지 못하였다.

또다른 바람직한 실시태양에서, 이들 분자는 상피소체 세포, 골의 파골세포, 신장 사구체 세포, 근위 뇨 세관 세포, 신장 원심 세관 세포, 헨레계제(Henle's1oop) 및(또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포,갑상선 방려포세포(C-세포), 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비 세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포로 이루어지는 군 중에서 선택된 모든 세포가 아닌 1종 이상의 세포에서 5μM 이하의 EC_{50} 을 갖는다.

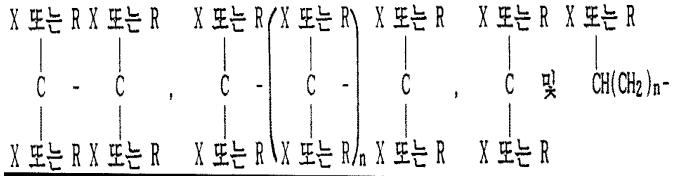
본 발명에서, 특히 유리한 점은 이들 분자의 작용 특이성에 있으며, 왜냐 하면 이로 인해 특이적 생체내 및 시험관내 치료와 진단 및 칼슘 유사 분자와 칼슘길항성 분자의 발견이 가능하기 때문이다.

구체적으로 바람직한 실시태양에서, 이들 분자는 생리학적 pH에서 양으로 하전되며, 분지쇄 또는 시클릭 폴리아민, 양으로 하전된 폴리아미노산 및 아릴알킬아민, 예컨대 일반식 $H_2N-(CH_2)j-(NR_i-(CH_2)j)k-NH_2$ [여기서, k는 1-10의 정수이고, j는 각기 동일 또는 상이한 것으로서 2-20의 정수이고, Ri는 각기 동일 또는 상이한 것으로서 수소 및 $-(CH_2)j-NH_2$ (여기서, j는 상기 정의한 바와 같음) 중에서 선택되며 적어도 하나는 수소가 아님]를 갖는 분지쇄 폴리아민으로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

별도 실시태양에서, 이들 분자는 다음 일반식을 갖는다.

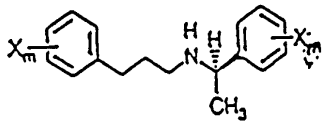


상기 식 중, X는 각기 독립적으로 H, CH_3, CH_3O, CH_3CH_2O, Br, Cl, F, CF_3, CHF_2, CH_2F, CF_3O, CH_3S, OH, CH_2OH, $CONH_2$, CN, NO_2, 및 CH_3CH_2로 이루어지는 군 중에서 선택되고; Ar은 소수성 물질이고; R은 독립적으로 수소, 메틸, 에틸, 프로필,이소프로필, 부틸, 이소부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 인데닐, 인다닐, 디히드로인돌릴, 티오디히드로인돌릴, 2-, 3- 또는 4-피페리드, (인)일로 이루어지는 군 중에서 선택되고; Y는 CH, 질소 및 불포화 탄소로 이루어지는 군 증에서 선택되고; Z는 산소, 질소, 황,



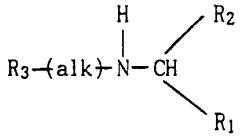
(여기서, n은 각기 독립적으로 1-4이고, m은 각기 독립적으로 0-5임)로 이루어지는 군 중에서 선택된다. 가장 바람직한 분자는 칼슘 유사 분자 또는 칼슘 길항분자이다.

바람직한 실시 태양에서, 소수성 물질은 페닐, 2-, 3-, 또는 4-피리딜, 1-또는 2-나프틸, 1- 또는 2-퀴놀리닐, 2- 또는 3-인돌릴, 벤질, 및 페녹시로 이루어지는 군 중에서 선택되며; 이들 분자는 다음 일반식을 갖는다:



상기 식 중, X는 바람직하게는 각기 독립적으로 Cl, F, CF_3, CH_3 및 CH_3O 로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

본 발명의 바람직한 측면에 따르면, 다음 일반식을 갖는 페닐-C-페네틸아민 동족체 및 유도체가 제공된다:



상기 식 중, alk는 탄소 원자수 1-6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌이고; R_1은 탄소원자수 1-3의 저급 알킬 또는 1-7개의 할로겐 원자로 치환된 탄소 원자수 1-3의 저급 할로알킬이고: R_2 및 R_3는 탄소 원자수 1-3의 저급 알킬, 1-7개의 할로겐 원자로 치환된 탄소 원자수 1-3의 저급 할로알킬, 탄소 원자수 1-3의 저급 알콕시, 할로겐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아미도, 탄소 원자수 1-3의 저급 알킬아미도, 시아노, 히드록시, 탄소 원자수 2-4의 아실, 탄소 원자수 1-3의 저급 히드록시알킬 또는 탄소 원자수 1-3의 저급 티오알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택된 1-5개의 치환체에 의해 임의로 치환된 5- 또는 6원 고리를 갖는 일환식 또는 이환식 카르보시클릭아릴 또는 시클로알킬기 중에서 독립적으로 선택된다.

적합한 카르보시클릭 아릴기는 1 또는 2개의 고리를 갖는 기이고, 이들 고리 중 적어도 한 개는 방향족 특성을 가지며, 페닐과 같은 카르보시클릭 아릴기 및 나프틸과 같은 이환식 카르보시클릭 아릴기를 포함한다. 상기 일반식으로부터 명백히 알 수 있는 바와 같이, 이들 화합물은 라세미체 혼합물 및 개개의 입체 이성질체로서 존재할 수 있다. 특히 바람직한 것은 혈청 이온화 칼슘을 저하시키는데 증강된 활성을 나타내는 것으로 간주되는 R-페닐프로필-C-페네틸아민 유도체이다.

바람직한 화합물에는 alk가 n-프로필렌인 것들이 포함된다. 또한 바람직한 화합물은 R_1이 메틸인 것들이다. 또한 바람직한 화합물은 R_2 및 R_3가 임의로 치환된페닐인 것들이다.

특히 바람직한 화합물에는 R_2가 일치환된 페닐이, 더 바람직하게는 메타치환된 것이 포함된다. 특히 바람직한 R_3기에는 비치환 또는 일치환된 페닐이, 구체적으로는 오르토치환된 페닐이 포함된다. R_2에 대한 바람직한 치환체에는 할로겐, 할로알킬, 바람직하게는 트리할로메틸, 및 알콕시, 바람직하게는 메톡시가 포함된다. R_3에 대한 바람직한 치환체에는 할로겐이 포함된다.

본 발명의 제2 특징은 1종 이상의 세포에서, 혈액 또는 혈장에서, 또는 세포의 유체에서 비정상적인 [Ca^{2+}] 또는 [Ca^{2+}]i를 나타내는 것이 특징인 질병 또는상태를 지닌 환자의 치료 방법에 있다. 이 방법은 세포에서 [Ca^{2+}]i를 증가시킴으로써 세포외 Ca^{2+} 와 유사한 활성과 갖거나 또는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발되는 [Ca^{2+}]i의 증가를 차단시키는 분자의 치료적 유효량을 환자에게 투여하는 단계로 이루어진다.

" 비정상적" 이란 일반적인 모집단과 비교하여 환자가 혈액 또는 세포의 체액중의 1종 이상의 단백질(예컨대, 호르몬)에 의해 영향을 받는 상이한 Ca^{2+} 대사 또는 세포의 및(또는) 세포내 Ca^{2+} 의 농도에 영향을 미치는 다른 분자를 갖는 것을 의미한다. 따라서, 이러한 질병에는 상피소체가능항진중, 골다공중 및 기타골 및 광물 관련 질병 등이 포함된다(" Harrison's Principles of Internal Medicine" 과 같은 표준 의학 교과서 참조). 본 발명에서 이러한 질병은 Ca^{2+} 의 효과 중 한가지 이상과 유사한 효과를 갖거나 또는 이를 차단시키는 분자에 의해 처리되며, 이 치료는 환자의 신체에서 단백질 또는 다른 분자들의 농도에 직간접적으로 영향을 미친다.

" 치료적 유효량" 이란 환자의 질병 또는 상태의 한가지 이상의 징후를 어느정도까지 경감시키는 양을 의미한다. 또한, " 치료적 유효량" 이란 질병 또는 상태의 원인과 관련된 생리학적 또는 생물학적 인자들을 부분적으로 또는 완전히 정상으로 회복되게 하는 양을 의미한다. 일반적으로, 이 양은 분자의 EC_{50} , 및 연령, 체격 및 환자의 관련 질병에 따라 분자 약 1nmole 내지 1μmole이다.

바람직한 실시태양에서, 분자는 5μM 이하의 EC_{50} 을 가지나 프로타민은 아니며, 가장 바람직하게는 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물로서 Ca^{2+} 수용체에서 상호작용칸다. 가장 바람직한 분자는 상기한 것들 중 하나로부터 선택된다.

다른 바람직한 실시태양에서, 환자는 1종 이상의 Ca^{2+} 수용체의 활성에 의해 그 농도가 조절되거나 영향을 받는 1종 이상의 성분의 농도가 비정상적인 것이 특징인 질병을 가지며, 이들 분자는 상피소체 세포, 골 파골세포, 신장 사구체 세포, 근의 뇨 세관 세포, 원의 뇨 세관 세포, 헨레계제(Henle's loop) 및(또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포, 갑상선 방려포세포(C-세포), 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비 세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포로 이루어지는 군 중에서 선택된 세포외 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성이 있다.

또다른 바람직한 실시태양에서, 이들 분자는 환자의 혈청 중 상피소체 호르몬의 양을, 예를 들면 정상적인 개인에게 존재하는 그러한 양으로나 또는 혈장 Ca^{2+} 의 감소를 일으키기에 충분한 정도로 저하시키며, 이들 분자는 환자에게 치료적으로 적절한 효과를 나타내기에 충분한 양으로 제공된다.

본 발명의 제3 특징은 환자내에 있는 1종 이상의 Ca^{2+} 수용체의 수 및(또는)위치(및(또는) 기능적 통합성)를 동정하고 질병 또는 상태의 존재 여부의 표시로서 이 수 및(또는) 위치(및(또는) 기능적 통합성)를 정상적인 개인에게서 관찰되는 것과 비교함으로써 환자의 질병 또는 상태를 진단하는 방법에 있다.

바람직한 실시태양에서, 이 방법은 Ca^{2+} 수용체의 수 및(또는) 위치 및(또는) 기능적 통합성을 동정하는데 Ca^{2+} 수용체에 대한 항체가 사용되는 면역분석법이거나 또는 이 분석은 Ca^{2+} 수용체와 결합하는 표지된 칼슘 유사 분자 또는 칼슘길항 분자를 제공하는 것에 관련되며, 진단된 질병은 암, 예컨대 상피소체의 전위성 종양 또는 골 파골세포 수에 있어서 정상적 수준을 초과하거나 이 세포의 활성이 증가된 것이 특징인 상태이다.

본 발명의 다른 특징은 치료용 분자로서 유용한 분자를 동정하는 방법에 있다. 이 방법은 세포에서 세포외 Ca^{2+} 의 활성과 유사한 활성을 갖거나 또는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발되는 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 차단시키는 능력을 위해 잠재적으로 유용한 분자의 선별 단계 및 이들 분자가 5μM 이하의 EC_{50} 또는 IC_{50} 을 갖는지 여부를 측정하는 단계가 포함된다.

본 발명의 또다른 특징은 재조합 Ca^{2+} 수용체, 재조합 Ca^{2+} 수용체 함유 세포, Ca^{2+} 수용체를 코딩하는 정제된 핵산, NPS 019 분자의 생물학적 활성 및 용도, NPS 459, NPS 467 및 NPS 568인 신규 화합물 또는 조성물(제36도 참조), 및 예를 들어 재조합 Ca^{2+} 수용체의 사용에 의해 제2 Ca^{2+} 수용체가 아닌 제1 Ca^{2+} 수용체에서 Ca^{2+} 의 한가지 이상의 활성과 유사한 활성을 갖거나 또는 이 활성을 차단시키는 분자를 동정함으로써 유용한 칼슘 유사 분자 또는 칼슘 길항 분자를 동정하는 방법에 있다.

본 발명의 또다른 특징은 신장의 재조합 Ca^{2+} 수용체를 포함하는 세포가 인체에서 신장 독성을 일으키는 칼슘 수용체에서의 활성에 대한 항생물질(예컨대, 아미노글리코시드 항생 물질)을 선별하기 위한 시험제로 사용되는 것에 있다.

" 재조합" 이란 그의 위치, 순도 및 구조에 있어서 천연 Ca^{2+} 수용체와 구별되도록 재조합 DNA 기술에 의해 생산된 모든 Ca^{2+} 수용체를 포함한다는 의미이다.

일반적으로, 이러한 수용체는 세포 중에 정상적인 천연 세포에서 관찰되는것과 다른 양으로 존재할 것이다.

" 정제된" 이란 항체 또는 핵산이 예를 들면 벡터계(vector system)에서 천연항체 또는 핵산과 분리되어 재조합 Ca^{2+} 수용체를 발현시키는데 사용될 수 있도록 천연 항체 또는 핵산과 구별됨을 의미한다. 바람직하게는 이들 항체 또는 핵산은 표준 기술에 의해 균질 제제로 제공된다.

이렇게 클로닝된 수용체는 목적하는 세포에서 발현시킬 수 있으며, 단리 및결정화시켜 구조를 결정할 수 있다. 이러한 구조는 Ca^{2+} 수용체와 결합할 수 있는 본 발명의 유용한 분자의 디자인을 가능케 한다. 또한, 이와 동등한 수용체들은 다른 세포, cDNA 또는 게놈 라이브러리에 존재하는 클론에 대한 탐침으로서 첫번째 탐침을 사용하여 클로닝시킬 수 있다.

클로닝된 수용체에 대한 항체들은 단리시켜 본 발명의 치료제로서나 또는 Ca^{2+} 관련 질병 또는 상태를 진단하기 위한 Ca^{2+} 수용체의 수 및(또는) 위치 및(또는) 기능적 통합성을 결정하기 위한 진단 기구로 사용할 수 있다. 이러한 항체들은 생체내에서 정맥내 주사에 의해 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물로도 사용될 수 있다.

따라서, 일반적으로 본 발명의 특징은 상피소체 세포, 골 파골세포, 신장 사구체 세포, 근위 뇨 세관 세포, 원위 뇨 세관 세포, 헨레계제(Henle's loop) 및 (또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포, 갑상선 방려포세포(C-세포), 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비 세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포로 이루어지는 군 중에서 선택된 세포 중 모든 세포는 아닌 1종 이상의 세포외 Ca^{2+} 수용체에서 선택적인 작용질 또는 길항질로 각기 작용할 수 있는 칼슘 유사 분자 또는 칼슘 길항 분자에 있다.

이러한 조성물은 제약 조성물을 제공하기 위하여 당업자에게 공지되어 있는 제약상 허용되는 임의의 담체를 포함할 수 있다.

또한, 본 발명의 특징은 질병에 대한 일종의 치료로서 표준 기술, 예컨대 항감작 및 관련 기술(예를 들면 리보자임)에 의한 환자의 Ca^{2+} 수용체의 수 조절에있다.

본 발명은 후술된 바와 같이 칼슘 유사물 및(또는) 칼슘 길항물을 감지하기 위한 분석법을 이용하여 Ca^{2+} 수용체의 활성에 영향을 미치는 분자의 동정 방법을 제공한다. 또한, 이 분자들은 치료용으로 정의될 수 있는 후술되는 분석법 또는 항체, 또는 기타 기술을 이용함으로써 전사 또는 번역 양에 있어서 Ca^{2+} 수용체의 발현을 저하 또는 증강시키는데 효과적인 것으로 밝혀졌다.

상기 요약은 대체로 칼슘 수용체에 통상 관계되는 바람직한 실시태양과 관련 되어 있다. 또다른 면에서, 본 발명은 폴리펩티드 수용체/센서 분자의 신규 수퍼 패밀리에 관한 것이다. 본 명세서에 개시되어 있는 정규 기탁된 cDNA 클론 Bo PCaP 1은 상기 수퍼패밀리의 일원인 수용체/센서를 코딩하기 위해 기재된 상기 첫번째 클론을 나타낸다. 본 발명의 목적을 의해, 상기 수퍼패밀리에 속하는 수용체/센서를 무기 이온 수용체라고 칭한다.

무기 이온 수용체의 신규 수퍼패밀리는 아미노산 서열의 유사성, 구조 및(또는) 기능에 있어서 서로 관련있는 상기 분자의 변형체도 포함한다. 또한 전체적인 면에서, 이러한 속성에 의해 상기 수용체의 수퍼패밀리의 구성원은 현재 당업계에 공지된 모든 수용체/센서로부터 구별된다.

근본적으로, 상기 수용체의 수퍼패밀리의 일원은 칼슘, 마그네슘, 칼륨, 나트륨 또는 수소 이온등과 같은 무기 양이온 수준의 변화를 감지하고 반응하며, 또한 상기 이온의 감지시에 세포 기능에 변화를 가져오는 그의 획기적인 능력에 의해 기능적인 면에서 구별된다. 이러한 변화로서 공지 G 단백질과 결합된 수용체에 대해 발생되는 2차 정보 전달 물질 수준의 변화 또는 막내의 이온 유동의 변화등이 있다. 또한 상기 수퍼패밀리의 다른 일원은 인산 또는 염소 이온과 같은 무기 음이온을 감지할 수 있다. 또한, 무기 이온 수용체의 수퍼패밀리에 속하는 수용체/센서에 대한 모든 분리된 천연 또는 합성 리간드는 본 발명의 범위에 속한다. 또다른 일면에서, 본 발명은 무기 이온 수용체에 대한 임의의 상기 천연 또는 합성 리간드의 치료적 사용을 특징으로 한다.

본 발명의 또다른 일면은 무기 이온 수용체의 수퍼패밀리에 속하는 수용체가 리간드 결합 이외의 자극에 의해 활성화될 수 있다는 것이다. 예를 들면, 상기 수용체의 수퍼패밀리의 일원은 상기 수용체를 발현하는 세포막에 작용하는 신장력과 같은 물리력에 의해 활성화될 수 있다. 모든 상기 수용체는 본 발명의 범위에 속한다.

무기 이온 수용체는 바람직한 수용체와 결합하여 상기 방법으로 사용될 수 있다. 인간의 조직 유형을 포함한 다양한 조직 유형에서 발현되는 재조합 수용체는 당업자에 공지된 방법으로 약제 개발에 대한 탐색(다량 처리 탐색 포함)에 사용될 수 있다. 이온 의태제(ionmimetics) 및 이온 용해제(ionlytics)는 용이하게 동정될 수 있다. 상기 방법은 수용체의 개개 기능에 따라 적당히 변경될 수 있다. 예를 들면, 칼슘에 의해 활성화된 염소 유동이 칼슘 통로(channel)를 형성하거나, 또는 세포내 칼슘을 중화시키는 무기 이온 수용체일 경우 사용될 수 있다.

리간드-게이트 이온 통로는 당업계에 공지되었다. 2차 정보 전달계에 결합된 무기 이온 수용체는 시클릭 AMP 및 이노시톨 포스페이트의 측정을 포함하는 상기 분석을 가능케한다. 또한 쉽게 감지될 수 있는 약제에 결합된 재조합 수용체를 갖는 세포는 상기 문헌에 기재한 바와 같이 수용체의 G 단백질 결합과 같은 멜라닌

색소포 중의 색소 분산에 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명은 무기 이온 수용체의 의태제 및 용해제인 약제, 바람직하게는 상기 상술한 의태제 및 용해제 중에서 선택된 것을 포함하여 상기 의태제 및 용해제 그 자체를 개발하기 의한 방법을 가능케 한다. 마찬가지로, 본 발명은 바람직한 실시태양과 결합하여, 상기 무기 이온 수용체 관련 질병 및 상태의 진단 및 치료에 관한 것이다. 예를 들면, 높은 수준의 무기 이온 수용체와 관련된 질병은 상기 늪은 수준에 대한 분석을 기초로 진단될 수 있다. 치료성 물질들은 관련 천연 이온의 활성을 모방하거나 관련 천연 이온의 효과 또는 효능를 변경시키는 약제의 탐색에 의해 동정될 수 있다. 조직 특이성 발현 및 발현의 수준은 평가될 수 있다.

따라서, 본 발명의 상기 측면에서, 분리된 무기 이온 수용체의 신규 수퍼패밀리가 제공되고, 또한 그의 특이 단편도 제공된다. 바람직하게는 분리된 수용체는 인체 수용체이며, 매우 바람직하게는 분리된 수용체는 부갑상선, 혈관, 신장, 표피, 갑상선, 파골세포, 장, 유방, 트로포블라스트, 혈소판, 가스트린 분비체, 글루카곤 분비체, 심장 및 뇌, 및 그의 특이 단편으로 이루어지는 군에서 선택된 조직 및 세포 중에서 발현된 칼슘 수용체이다. 또한, 본 발명은 바람직한 활성을 갖는 상기 무기 이온 수용체의 폴리펩티드 단편에 관한 것이다. 예를 들면, 단편들은 단지 한개의 결합 부위, 또는 의태제, 작용질, 또는 길항길에 결합하는 부위를 포함할 수 있다. 다른 유용한 단편들로는 단지 수용체의 외부 영역, 막에 걸쳐진 영역, 또는 세포내 영역을 갖는 단편이 있다. 더우기, 상기 단편은 이하에서 상세히 기재되는 바와 같이, 다른 수용체 단편과의 키메릭 수용체를 형성하는데 유용하다. 또한 본 발명은 분리된 수용체의 돌연변이 단백질 또는 유사체 및 다른 유도체에 관한 것이다. 따라서, 본 발명은 천연 단백질뿐만 아니라, 그의 유도체도 포함한다.

또한, 본 발명은 상기 무기 이온 수용체 및 그의 단편 및 유도체를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 관한 것이다. 이러한 뉴클레오티드 서열은 다양한 방법으로 얻어질 수 있으며, 본 발명에 따른 개시는 당업계의 통상의 방법 중 하나에 의해 상기 수용체를 코딩하는 cDNA 또는 게놈 클론을 얻을 수 있도록 한다. 예를 들면, 교잡(hybrization) 탐침은 BoPCaR 1의 뉴클레오티드 서열을 기초로 제조될 수 있다. 임의의 조직으로부터 cDNA 라이브러리에 대한 게놈 라이브러리가 상기 탐침을 사용하여 낮은 엄격성(stringency)으로 탐색되는 경우, 수퍼패밀리의 다른 일원을 코딩하는 교잡 클론이 얻어진다. 또한, 클로닝된 또는 분리된 무저 이온수용체에 결합하는 항체가 용이하게 제조될 수 있다. 또한 상기 항체는 당업계에 공지된 발현-클로닝 기법을 사용하여 본 발명의 다른 수용체를 분리하는데 사용될 수 있다. 또한 목적하는 유전자 워킹(gene walking)은 무기 이온 수용체의 수퍼패밀리의 일원을 동정하고 클로닝하기 위해 사용될 수 있다. 또한, 클론들은 상기한 발현 클로닝 방법을 사용하여 얻어질 수 있다. 상기 방법들은 관심의 대상이 되는 무기 이온 수용체 개개의 기능에 대해 변경 사용될 수 있다. 예를 들면, 칼슘에 의해 활성화된 염소 유동은 칼슘 통로를 형성하거나 세포내 칼슘을 이동시키는 무기 이온 수용체의 클로닝을 의해 또한 사용될 수 있다. 상기 리간드-게이트 이온 통로는 당업계에 공지되었다. 예를 들면, 세로토닌 게이트 이온 통로는 상기 방법에 의해 클로닝되어 왔다. 그러나, 본 발명의 수용체는

그의 아미노산 서열 및 이들이 칼슘, 마그네슘, 수소 이온, 인산 이온등과 같은 무기 이온을 감지한다는 점에서 다른 공지 리간드 게이트 이온 통로와는 구별된다.

또한, 당업자는, 본 발명의 방법에 따라 얻어진 클로닝된 각 수용체에 의해무기 이온 수용체를 코딩하는 추가 클론을 동정하기 의하여 그 자체로 사용되는 신규의 상기 DNA 또는 항체 탐침을 제공함을 인식할 수 있을 것이다. 더우기,1개 이상의 상기 수용체의 서열을 얻는 것에 의해, 상기 수퍼패밀리의 다른 일원을 코딩하는 추가 클론을 얻기에 유용한 국지 서열 보존성을 포함하는 정보를 얻을 수 있다. 상기 보존된 서열은 BoPCaR 1의 전체 구조의 분석으로부터 유도될 수 있는데, 이들은 통상적으로 세포외 영역, 막내외(transmembrane) 영역 및 세포내 영역을 포함한다.

따라서, 무기 이온 수용체 및 그의 특이 단편을 코딩하는 분리된 핵산이 제공된다. 바람직한 수용체는 상기한 군에서 선택된 조직 또는 세포에서 발현되는 칼슘 수용체이다. 매우 바람직하게는, 핵산은 인체의 무기 이온 수용체 또는 그의 특이 단편을 코딩한다. 또한, 본 발명은 상기 무기 이온 수용체의 발현을 조절하는 내재성 조절 요소를 분리시키며, 이러한 조절 요소의 활성에 작용질로 작용하거나 길항질로 작용할 수 있는 약제를 제공한다.

또한, 본 발명은 본 발명의 핵산을 발현하는 재조합 세포를 제공한다. 이러한 세포에서, 핵산은 게놈 조절 요소의 통제하에 있을 수 있거나, 외인성 프로모터를 포함하는 외인성 조절 요소의 통제하에 있을 수 있다. 여기서, " 외인성" 이라 함은 무기 이온 수용체에 대한 코딩 서열에 생체내 전사적으로 통상 결합되지 않는 프로모터를 의미한다.

상기 무기 이온 수용체에 대한 정제된 항체 및 상기 수용체의 알로스테릭 부위에 대한 항체, 그리고 상기 수용체의 이디오타임(idiotype)이 제공된다.

또한, 독소에 결합된 무기 이온 수용체 결합제가 제공된다. 상기 결합제는 항체일 수 있고, 예를 들면 면역독소이다. 이러만 면역독소는 예를 들면 생체의 또는 생체내에서 무기 이온 수용체를 발현하는 세포를 사멸시키는 데 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 무기 이온 수용체 또는 그의 특이 단편을 코딩하는 변종(transgene) 유전자를 함유하는 인간을 제외한 변종 포유 동물을 제공한다.

이러한 변종 유전자는 무기 이온 수용체의 발현에 영향을 미치거나 또는 이러한 발현을 변경시키는데, 이는 예를 들면 상동성 재조합을 통하여 무기 이온 수용체의 발현을 불활성화시키는데 유용할 수도 있다. 이러한 포유 동물에서 천연 무기 이온수용체 유전자의 발현을 변경시킬 수 있는 안티센스 또는 단백질을 코딩하는 변종 유전자들을 포함하여 다른 변종 유전자들이 제공될 수도 있다. 이러한 변경은 상향 조정, 하향 조정 또는 완전한 불활성와 조정일 수 있다.

따라서, 세포를, 무기 이온 수용체의 발현에 영향을 미치기 위한 세포 성분과 결합하는 제제와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법이 제공된다. 이러한 제제들은 프로모터, 이 프로모터에 작용하는 기타 조절제, 수용체에 결합할 수 있는 제제 및 수용체 코딩 핵산 또는 그의 특이 단편에 결합할 수 있다. 이러한 접촉은 제제를 코딩하는 변종 유전자를 제공하거나, 또는 특정 방법이 목적하는 용도에 따라 기타 임의의 적합한 방법으로 세포외 투여에 의해 행할 수 있다.

본 발명의 다른 특징 및 잇점들은 이하 명세서의 바람직한 실시태양 및 청구범위로부터 명백해질 것이다.

[바람직한 실시태양의 설명]

도면

제1도는 본 발명에 유용한 대표적인 분자를 도시한 것이다.

제2도는 quin-2 또는 fura-2를 가한 소의 상피소체 세포에서 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된$[Ca^{2+}]i$의 증가를 나타내는 그래프도이다. 최초 $[Ca^{2+}]$는 0.5mM($CaCl_2$사용)($CaC1_2$사용)이었고, 각 화살표에서 0.5mM씩 증가되었다.

제3도는 소의 상피소체 세포에서 [Ca^{2+}]i의 동원을 나타내는 그래프도이다.

최초 [Ca^{2+}]는 0.5mM이었고, 도시된 바와 같이 EGTA를 첨가함으로 인해 1μM 미만으로 감소되었다. (a) 세포외 Ca^{2+} (8mM, 최종)는 세포외 Ca^{2+} 가 존재하지 않는 경우 [Ca^{2+}]i의 증가를 일으킨다. (b) 이오노마이신(1μM)으로의 예비처리는 Mg^{2+} 에 대한 반응을 차단시킨다. (c) 5μM 분자 1799(미토콘드리아 분해제)로의 예비처리는 Mg^{2+} 에 대한 반응에 아무 영향을 미치지 않는다.

제4도는 소 상피소체 세포의 [Ca^{2+}]i의 정상 상태적 증가에 대한 저농도의 Cd^{3+} 의 선택적인 억제 효과 및 고농도의 Gd^{3+} 는 [Ca^{2+}]i를 일시적으로 증가시킴을 나타내는 그래프도이다. 상부 패널(panel): 대조도. 세포외 Ca^{2+} 의 초기 농도는 0.5 mM이었고 각 화살촉에서 0.5mM씩 증가되었다. 중간 패널: Gd^{3+} (5μM)는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 정상 상태적 증가는 차단시키나 일시적 증가는 차단시키지 않는다. 저부 패널:Gd^{3+} (50μM)는 [Ca^{2+}]i의 일시적 증가를 일으키고 세포외 Ca^{2+} 에 대한 일시적이고 지속적인 반응을 없앤다. 중간 및 저부패널에서, 선택적으로 Gd^{3+} 를 킬레이트화시키기 위한 충분량 정도의 EGTA를 첨가하였고, 이것은 Ca^{2+} 대량유입의 차단을 제거시키고 [Ca^{2+}]i를 즉각적으로 상승시켰다.

제5도는 [Ca^{2+}]i, IP_3 형성 및 PTH 분비에 대한 PMA의 효과가 소 상피소체세포의 세포외 Ca^{2+} 의 농도를 증가시킴으로써 극복됨을 나타내는 그래프도이다.

각 인자에 대해서, 세포외 Ca^{2+} 의 농도-반응 곡선에서 우측으로의 이동이 있다.

또한 이 농도-반응 곡선이 [Ca^{2+}]가 선형 증가함에 따라 S자형으로 변하는 것에 주목하라.

제6도는 스페르민에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 증가가 소 상피소체 세포의 [Ca^{2+}]를 증가시킴으로써 점진적으로 감소됨을 나타내는 그래프도이다. 스페르민(200μM)은 화살촉으로 나타내어진 지점에서 첨가하였다. 이 도면과 모든 후속 도면에서, 트레이스와 수반된 숫자들은 mM로 된 [Ca^{2+}]i이다.

제7도는 스페르민이 소의 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 를 동원함을 나타내는 그래프도이다. 나타난 바와 같이(좌측 트레이스), EGTA를 첨가한 경우 스페르민(200μM)을 첨가하기 전에 [Ca^{2+}]는 1μM 미만으로 감소되었다. 이오노마이신(1μM)에 의한 예비처리는 스페르민에 대한 반응을 차단시킨다(우측 트레이스).

제8a 및 8b도는 스페르민이 세포외 Ca^{2+} 와 유사하게 소의 상피소체 세포에서 [Ca^{2+}]i를 증가시키고 PTH 분비를 억제함을 나타내는 그래프도이다. 스페르민 투여량-농도 반응 곡선에 대한 데이타 포인트는 두 실험의 결과이다.

제9도는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응 및 소의 상피소체 세포 중의 ATP⟦S에 대한 반응에 있어서의 PMA의 대비 효과를 나타내는 그래프도이다. 상부 패널: 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 시클릭 AMP 형성의 억제에 대한 농도-반응 곡선이 PMA(100nM)에 의해 우측으로 이동한다. 중간 패널: PMA는 [Ca^{2+}]i를 증가시키는 ATP⟦S의 능력에 영향을 미치지 않는다. 또한 이 ATP⟦S에 대한 농도-반응 곡선은세포외 Ca^{2+} 와는 대조적으로 로그 농도의 함수로서 전통적인 S자형 행동을 나타낸다는 것에 주목하라.

제10도는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 인체 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 동원을 나타내는 그래프도이다. 이 세포는 선종에서 채취하여 0.5mM세포외 Ca^{2+} 을 함유하는 완충액 중에 침지시켰다. (a) 0.5mM의 세포외 Ca^{2+} (10mM, 최종)에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 일시적이고 지속적인 증가는 이러한 지속적 증가가 니모니핀(1μM)에 의해서는 영향을 받지 않고, La^{3+} (1μM)에 의해서 그 증가가 저하되며, 이 La^{3+} 가 저농도의 EGTA에 의해 선택적으로 킬레이트화될 경우 즉각적으로 다시 증가됨을 나타낸다. (b) La^{3+} (1μM)은 세포외 Mg^{2+} 에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 지속적이되 비일시적인 증가를 차단시킨다. (c) 세포의 Mg^{2+} 에 의해 유발된 일시적인 세포질 Ca^{2+} 는 세포외 Ca^{2+} 가 존재하지 않을 경우 지속된다.

제11도는 소의 상피소체 세포에서 네오마이신 또는 프로타민에 의해 유발된 세포내 Ca^{2+} 의 동원을 나타내는 그래프도이다. 모든 트레이스에서, 초기 [Ca^{2+}] 및 [Mg^{2+}]는 각각 0.5 및 1 mM이었다. 트레이스 (a) 및 (b)에서, Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 의 농도는 각각 0.5 및 1mM에서 2 및 8 mM로 증가되었다. (c)-(i)의 기타 트레이스에서, 도시된 바와 같이 네오마이신 B(30μM) 또는 프로비타민(1μg/ml)를 첨가 하였다. 도시된 바와 같이 La^{3+} (1μM), EGTA(1mM) 또는 이오노마이신(100nM)도 첨가하였다. 각 트레이스는 3종 이상의 세포 제제를 사용한 5회 이상의 시도에서 나타난 대표적인 패턴이다. 바아=1분.

제12도는 네오마이신 B가 소 상피소체 세포의 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 증가를 일시적으로는 차단시키나 정상 상태적으로는 차단시키지 않음을 나타내는 그래프도이다. 좌측 대조도: [Ca^{2+}]는 초기에는 0.5mM이었고, 네오마이신 B(30μM)를 첨가하기 전에는 각 개방 화살촉에서 0.5mM씩 증가되었다. 우측: 네모마이신 B는 [Ca^{2+}]전에 첨가하였다. 바아=1분.

제13도는 네오마이신 B 또는 프로타민이 소 상피소체 세포의 [Ca^{2+}]의 증가를 일으키는 농도에서 PTH 분비를 억제시킴을 나타내는 그래프도이다. 세포들은 도시된 농도의 유기 폴리양이온으로 0.5mM 세포외 Ca^{2+} 의 존재하에서 30분간 인큐베이션시켰다. 개방 기호: 0.5(원) 또는 2mM(다이아몬드)의 세포외 Ca^{2+} 의 존재하에서 PTH 분비에 대한 대조 반응. [Ca^{2+}]i에 대한 값은 다이아몬드 기호이다. 이 실험에서 소 세포에는 프로타민을 사용하였고 인체(선종)의 상피소체 세포에는 네오마니신 B를 사용하였다. 각 포인트는 3회 실험의 평균치±SEM이다.

제14도는 소 상피소체 세포의 스페르민에 의해 유발되는 일시적 세포질 Ca^{2+} 에 대한 PMA의 선택적인 억제 효과를 나타내는 그래프도이다. 초기 [Ca^{2+}]는 0.5mM이었고, 도시된 바와 같이 200μM 스페르민 또는 50μM ATP를 첨가하였다. 바아=1분.

제15도는 PMA가 세포외 Ca^{2+} 및 네오마이신 B에 의해 유발된 소 상피소체 세포의 [Ca^{2+}]i의 증가에 대한 농도-반응 곡선을 우측으로 이동시킴을 나타내는 그래프도이다. 세포들은 도시된 바와 같이 [Ca^{2+}]를 증가시키거나 네오마이신을 첨가하기 전에 PMA로 1분간 예비처리하였다. 각 포인트는 3-5의 실험의 평균치 ±SEM이다.

제16도는 PMA가 세포외 Ca^{2+} 및 스페르민에 의해 유발튄 소 상피소체 세포의[Ca^{2+}]i의 증가에 대한 농도-반응 곡선을 우측으로 이동시킴을 나타내는 그래프도이다. 세포들은 도시된 바와 같이 100nM PMA의 존재(밀폐원) 또는 부재(개방원)하에서 도시된 [Ca^{2+}] 및 스페르민으로 30분간 인큐베이션시켰다. 각 포인트는 3회 실험의 평균치±SEM이다.

제17도는 프로타민이 소 상피소체 세포의 이노시톨 포스페이트의 형성을 증가시킴을 나타내는 그래프도이다. 상피소체 세포는 4uCi/ml의 ^{3}H-미오-이노시톨을 함유하는 배양 배지에서 철야 인큐베이션시키고, 세척하고, 37℃에서 도시된 농도의 프로타민으로 인큐베이션시켰다. 30초 후에 $CHCl_3$:MeOH:Cl을 첨가하여 이 반응을 종결시키고, 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 IP_1 (원) 및 IP_3 (삼각형)을 분리시켰다. 각 포인트는 각기 3회씩 2번 수행된 시험의 평균치이다.

제18도는 PMA가 소 상피소체 세포의 세포외 Ca^{2+} 또는 스페르민에 의해 유발되는 IP_1 의 형성을 저하시킴을 나타내는 그래프도이다.^{3}H-미오-이노시톨로 표지된 세포들을 도시된 [Ca^{2+}] 또는 스페르민에 30초간 노출시킨 후, 반응을 종결시키고 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 IP_1 을 측정하였다. 해칭된 컬럼: 세포들을 [Ca^{2+}]를 증가시키거나 또는 스페르민을 첨가하기 전에 5분간 100nM PMA로 예비처리하였다. 각 수치는 3회씩 2번 수행된 실험의 평균치이다.
제19도는 인체(선종)의 상피소체 세포에서 네오마이신 B에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 일시적이고 지속적인 증가를 나타내는 그래프도이다. [Ca^{2+}]는 0.5mM이었다. (a) 10μM 네오마이신 B에 의해 유발된 [Ca^{2+}]의 지속적인 증가는 La^{3+} 에 의해 저하되었다. (b) 네오마이신 B에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 일시적 증가는 La^{3+} 에 의해서는 영향을 받지 않았다. (c) [Ca^{2+}]i의 일시적 증가는 세포외 Ca^{2+} 가 없을 경우 지속되었다.

제20도는 네오마이신 B가 Ca^{2+} 수용체를 발현시키는 크세노푸스 난모세포에서 Cl-인덕턴스의 진동적 증가를 일으킴을 나타내는 그래프도이다. 상부 도면은 인체의 과형성 상피소체 세포 폴리(A)+-mRNA를 주입하고 3일이 경과된 난모세포에 트레이싱한 것이다. 하부 도면은 물을 주입한 난모세포에 트레이싱한 것이다.

네오마이신 B는 물을 주입한 5개의 난모세포 반응을 유발시키지 못했으나 카르바콜은 한개에서 반응을 유발시켰고, 이것이 도시되어 있다. 양 트레이스에서 유지전위차는 -76mV이었다.

제21도는 네오마이신 B가 C-세포에서 기초적 또는 유발된 증가에는 영향을 미치지 못함을 나타내는 그래프도이다. 대조도인 좌측 트레이스: fura-2를 가한 rMTC 6-23 세포를 [Ca^{2+}]를 3mM로 증가시키기 전에 1mM Ca^{2+} 을 함유하는 완충액에 침지시켰다. 우측 트레이스:5mM 네오마이신 B로 예비처리.

제22도는 세포외 Ca^{2+} 가 쥐의 파골세포에서 [Ca^{2+}]i의 증가를 유발시킴을 나타내는 그래프도이다. 하나의 쥐 파골세포에서 마이크로형광정량 기록시 indo-1을 가하고, 도시된 [Ca^{2+}]를 함유하는 완충액으로 도시된 기간(바아들) 동안 수퍼융합시켰다. 바아 사이에 수퍼융합된 통상의 완충액은 1 mM Ca_2^+ 을 함유하고 있었다.

제23도는 스페르민 또는 네오마이신 B가 쥐의 파골세포에서 [Ca^{2+}]i의 증가를 유발시키지 못함을 나타내는 그래프도이다. indo-1을 가한 파골세포를 도시된 농도의 스페르민 또는 네오마이신 B 단독으로(개방 바아) 또는 20mM Ca^{2+} 과 함께(밀폐 바아) 수퍼 융합시켰다.

제24도는 소의 상피소체 세포에서 [Ca^{2+}]i에 대한 아르기오톡신(도면에 아르기오핀으로 도시되어 있으며 그 구조는 제1도에 도시되어 있음) 659 및 아르기오톡신 636의 상이한 효과를 나타내는 그래프도이다. 최초 [Ca^{2+}]는 0.5mM이었고 도시된(우측 트레이스)지점에서 1.5mM로 증가되었다. 도시된 지점에서 300μM 아르기오톡신 659 또는 400μM 아르기오특신 636을 첨가하였다.

제25도는 세포의 Mg^{2+} 또는 Gd^{3+} 가 소 상피소체 세포의 폴리(A)+-mRNA을 주입한 크세노푸스 난모세포에서 C1- 유동의 진동적 증가를 일으킴을 나타내는 그래프도이다. 트레이스(a)에서, 세포외 Ca^{2+} 의 농도는 1μM이었고 트레이스(b)는 0.7mM이었다. 트레이스(c)는 세포외 Ca^{2+} 가 비록 물질 K로 수퍼융합시킨 것의 반응은 유발시키지만 물질 K에 대해 mRNA만을 주입한 난모세포에서는 반응을 유발시키지 못함을 나타낸다. 유지 전위차는 -70 내지 -80 mW이었다.

제26도는 세포외 Ca^{2+} 가 인체(과형성) 상피소체 조직의 폴리(A)+-mRNA을 주입한 크세노푸스 난모세포에서 C1- 유동의 진동적 증가를 일으킴을 나타내는 그래프도이다. 난모세포는 폴리(A)+-mRNA 50 ng을 주입한지 3일 후에 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응성을 시험하였다. 유지 전위차는 -80 mW이었다.

제27도는 부드먼키아민에 의해 유발된 소의 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 동원을 나타내는 그래프도이다. 도시된 지점에서 300μM 부드먼키아민(구조역시 도시되어 있음)을 첨가하였다.

제28도는 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 를 동원하는 능력이 입체특이적임을나타낸 그래프도이다. fura-2를 가한 소의 상피소체 세포를 도시된 농도의 각 분자를 첨가하기 전에 0.5mM세포외 Ca^{2+} 을 함유하는 원충액 중에 먼저 현탁시켰다.

제29도는 파골세포 중의 [Ca^{2+}]i에 대한 La^{3+} 의 효과를 나타낸 그래프도이다. indo-1을 가한 한 개의 쥐 파골세포로부터 얻은 대표적인 트레이스가 도시되어 있다. 저농도에서 La^{3+} 는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 증가를 부분적으로 차단시킨다.

제30A도 및 3OB도는 쥐 파골세포에서 세포의 Mg^{2+} 에 의해 유발된 세포내 Ca^{2+} 의 동원을 나타낸 그래프도이다. 세포의 Mn^{2+} 는 [Ca^{2+}]i의 농도 의존성 증가(제30A도)를 일으키고 이 증가는 세포외 Ca^{2+} 가 없을 경우 지속된다(제30B도).

제31A도 및 31B도는 NPS 449로 명명된 분자에 의해 유발된 쥐 파골세포에서 [Ca^{2+}]i의 동원을 나타낸 그래프도이다(제38도 참조). indo-1을 가한 단리된 쥐파골세포를 1mM 세포외 $CaCl_2$ 의 존재(제31A도) 또는 부재(제31B도) 하에서 도시된 농도의 NPS 449로 수퍼융합시켰다.

제32도는 NPS 019에 의해 유발된 C-세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 동원을 나타낸 그래프도이다(제1도 참조). rMTC세포 6-23개에 fura-2를 가하고 이를 0.5mM[Ca^{2+}]를 함유하는 완충액에 첨가하였다. 도시된 바와 같이, NPS 019를 10μM의 최종 농도로 첨가하였다. 이들 대표적 트레이스는 NPS 019에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 일시적 증가를 La^{3+}(중간 트레이스)에 의해 억제시키기는 어려우며, 그 증가는 세포외 Ca^{2+} 가 없을 경우(우측 트레이스) 지속됨을 보여준다.

제33도는 NPS 456(제36도)가 소 상피소체 세포의 폴리(A)+-mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 Cl-유동의 진동적 증가를 유발시킴을 나타낸 그래프도이다.

제34도는 세포외 Ca^{2+} 가 인체 파골세포 mRNA를 주입한 크세노푸스 난모세포에서 Cl-유동의 진동적 증가를 유발시킴을 나타낸 그래프도이다. 이 난모세포는 폴리(A)+-mRNA를 총 50 ng 주입한지 3일 후에 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응성을 시험하였다.

제35도는 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체가 mRNA에 의해 2.5-3.5kb의 크기 범위로 코딩됨을 나타낸 그래프도이다. 소 상피소체 세포의 폴리(A)+-mRNA를 변성 글리세롤 구배 상에서 크기별로 분류하여 10개의 분획으로 푸올학하였다. 각 분획을 각기 크세노푸스 난모세포에 주입하였다(50 ng/분획). 3일 후에, 이 난모세포를 Cl- 유동의 진동적 증가를 일으키면서 세포외 Ca^{2+} 에 반응할 수 있는 능력에 대해 조사하였다.

제36도는 본 발명의 유용한 분자를 발견하기 위하여 제조 및 선별된 일 군의 분자들을 예시하는 디페닐프로필- -페네틸아민으로부터 유도된 분자들의 화학적 구조를 도시한 도면이다.

제37도는 NPS 021이 소 상피소체 세포에서 [Ca^{2+}]i에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 효과를 차단시키는 칼슘 길항 화합물임을 나타낸 그래프도이다. 먼저 이 세포들을 0.5 mM $CaCl_2$를 함유하는 완충액속에 담그고, 지시된 지점에서 [Ca^{2+}]를 2mM의 최종 농도(좌측 트레이로)로 증가시켰다. 200μM NPS 021의 첨가는 [Ca^{2+}]i의 변화를 전혀 일으키지 않았으나, 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 [Ca^{2+}]i의 증가를 억제시켰다(우측 트레이스).

제38도는 NPS R,S-467에 대한 생체내 Ca^{2+} 반응을 나타낸 그래프도이다.

제39도는 NPS R,S-467에 대한 생체내 PTH 반응을 나타낸 그래프도이다.

제40도는 NPS R,S-467 25 mg/kg에 대한 생체내 혈청 Ca^{2+} 의 반응을 나타낸 그래프도이다.

제41도는 NPS 467의 상이한 에난티오머에 대한 소 상피소체 세포의 생체내 [Ca^{2+}]i의 반응을 나타낸 그래프도이다.

제42도는 NPS 467의 상이한 에난티오머에 대한 쥐의 혈청 Ca^{2+} 의 생체내 반응을 나타낸 그래프도이다.

제43a도는 제36도에 도시되어 있는 펜딜린, 또는 펜딜린 동족체 또는 유도체를 제조하기 의한 반응식을 도시한 도면이다.

제43b도는 NPS 467를 합성하기 위한 반응식을 도시한 도면이다.

제44도는 NPS 467이 경구로 투여될 때 혈청 이온화 칼슘을 저하시킴을 나타내는 투여량 반응 곡선을 도시한 도면이다.

제45도는 수탁 번호 ATCC 75416으로 ATCC에 기탁된 BoPCaR 1 함유 플라즈미드의 제한 지도(restriction map)를 도시한 도면이다.

제46도는 BoPCaR 1의 제한 지도를 도시한 도면이다.

제47도는 서열화된 BoPCaR 1의 2.2kb 단편에 대응하는(약 90%정확도) 뉴클레오티드 서열을 도시한 도면이다.

[칼슘 유사 분자 및 칼슘 길항 분자]

본 발명에 유용한 칼슘 유사 분자 및 칼슘 길항 분자에 대해서는 일반적으로 이상에서 설명되어 있다. 이러한 분자들은 Ca^{2+} 수용체에서 Ca^{2+} 의 활성과 유사한 활성을 갖거나 또는 그 활성에 길항 작용을 하는 분자들을 동정하기 의한 선별과정에 의해 쉽게 동정할 수 있다 이러한 과정의 예들은 후술된다. 이러한 예들은 본 발명을 제한하는 것은 아니며, 단지 당업자들에 의해 쉽게 사용되거나 채택되는 방법들을 예시하기 위한 것이다.

일반적으로, 칼슘 유사 분자 및 칼슘 길항 분자들은 후술되는 것들(소위 " 리드분자")을 따라 모델화되는 분자들을 선별함으로써 동정한다. 이하에서 알 수 있는 바와 같이, 각종의 Ca^{2+} 수용체에 유용한 몇몇 특이적인 칼슘 유사 분자 및 칼슘 길항 분자들이 있다. 유도 분자는 표준 과정에 의해 쉽게 디자인되며, 당업자들에게 알려진 여러 프로토콜 중 하나에서 시험된다. 다수의 분자들을 쉽게 선별함으로써 본 발명에 가장 유용한 것을 동정할 수 있다.

다른 시스템에서 Ca^{2+} 의 활성과 유사한 활성을 갖거나 또는 이 활성에 길항작용을 하는 유기 양이온 분자들은 Ca^{2+} 수용체에 대한 활성에 요구되는 구조를 갖고 있다. 다른 유용한 분자들의 합리적 디자인은 칼슘 유사 분자 또는 칼슘 길항 분자로 알려진 분자의 연구 및 이 공지 분자의 구조를 변형시키는 단계를 포함한다. 예컨대, 폴리아민은 스페르민이 몇몇 시험관내 시스템에서 Ca^{2+} 와 유사한 작용을 하기 때문에 효능있는 칼슘 유사물이다. 이 결과에 따르면, 스페르민은 $[Ca^{2+}]i$ 및 세포의 2가 및 3가 양이온(이하 참조)에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 기억하는 PTH 분비의 증가를 정말 일으킨다. 이와 반대로, Ga^{3+} 는 소 상피소체 칼슘 수용체(들)에 대한 Ga^{3+} 의 효과에 길항 작용을 한다. 따라서, 이하에 개괄되어 있는 실험들은 스페르민에 의해 얻어진 현상이 세포외 Ca^{2+} 에 의해 이용된 것과 동일한 메카니즘과 관련되어 있음을 입증하기 위한 것이다. 이렇게 하기 위하여, Ca^{2+} 수용체의 활성화를 특징으로 하는 다양한 생리학적 및 생화학적 인자들에 대한 스페르민의 효과를 평가하였다. 유사한 효과를 갖는 그러한 분자들은 본 발명에 유용하며, 스페르민과 유사한 구조를 갖는 분자들을 선택하거나 또는 분자들을 이러한 구조로 만듦으로써 발견할 수 있다. 또한 일단 유용한 다른 분자들이 발견되면, 이 선택 방법을 쉽게 반복할 수 있다.

명료화시키기 위해, 이하에는 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 활성이거나 또는$[Ca^{2+}]$의 변화에 대한 세포 반응의 작용질 또는 길항질로서 작용하는 이렇게 유용한 분자들을 동정하기 위한 특이 계열의 선별 프로토콜이 제공된다. 이와 동등한 분석법들은 다른 Ca^{2+} 수용체 또는 다른 무기 이온 수용체에 활성을 갖거나, 또는 그렇지 않을 경우, $[Ca^{2+}]$ 또는 다른 이온에 의해 조절되는 세포 기능과 유사한 기능을 갖거나 또는 이 기능에 길항 작용을 하는 분자에 대해 사용될 수 있다.

이들 분석법은 칼슘 유사 분자를 포함하며 본 발명의 분자를 찾는데 유용한 과정들을 예시한다. 이와 동등한 과정을 사용하여 세포외 Ca^{2+} 의 작용에 가장 길항적인 분자들에 대해 선별함으로써 칼슘 길항 분자를 포함하여 유사 분자들을 찾아낼 수도 있다. 시험관내 분석법은 표준 기술에 의해 이들 유사 분자 및 길항 분자의 선택성, 포화성 및 가열성을 특징화하는데 사용될 수 있다.

[선별과정]

일반적으로, fura-2를 가한 소 상피소체 세포를 먼저 0.5mM $CaCl_2$를 함유한 완충액에 현탁시켰다. 시험 물질을 5-15㎕의 소용적으로 쿠베트에 첨가하고 형광 시그날에서의 임의의 변화를 기록하였다. 일부 소징 농도에 도달하거나 또는 형광성의 변화가 관찰될 때까지 쿠베트 중의 시험 물질의 농도를 누적적으로 증가 시켰다. 형광성의 변화가 전혀 없으면 이 분자를 불활성으로 간주하고 더 이상의 시험을 행하지 않는다. 최초 연구, 예컨대 폴리아민형 분자에 대한 연구에서는 분자들을 5 또는 10mM 정도의 농도로 시험하였다. 현재 보다 효능있는 분자들이 알려짐에 따라(후술됨), 최고 농도가 낮추어졌다. 예컨대, 보다 새로운 분자들은 최대 500㎛M 또는 그 이하의 농도에서 시험한다. 이 농도에서 형광성의 변화가 전혀 없으면, 이 분자는 불활성인 것으로 간주될 수 있다.

$[Ca^{2+}]i$의 증가를 일으키는 분자들은 추가의 시험을 수행한다. 이 분자들의 칼슘 유사 분자로서 고려되여야 할 중요한 두가지의 필수적인 특성은 세포내 Ca^{2+}의 동원 및 PKC 활성제에 대한 감지도이다. PMA 감지 방식으로 세포내 Ca^{2+}의 동원을 일으키는 분자들은 반드시 칼슘 유사 분자이며 PTH 분비를 억제시키는 것으로 밝혀졌다. 이러한 신념을 보다 굳건히 하기 위해 필요한 경우 추가의 실험을 수행할 수 있다. 통상적으로, 칼슘 유사 또는 칼슘 길항 활성에 대한 각종의 모든 시험들(상술됨)이 수행되지는 않는다. 오히려, 한 분자가 PMA 감지 방식으로 세포내 Ca^{2+}의 동원을 일으킬 경우, 상기 시험은 인체 상피소체 세포에 대한 선별단계로 진척시킨다. 예컨대, $[Ca^{2+}]i$의 측정은 EC_{50}을 측정하고 1차 또는 2차 상피소체기능항진중에 대한 외과수술을 거치는 환자로부터 얻어진 인체 상피소체 세포에서 PTH 분비를 억제시키는 분자의 능력을 측정하기 위하여 수행된다. EC_{50} 또는 IC_{50}이 작을수록, 이 분자는 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물로서 보다 효능이 있다. fura-2에 의한 $[Ca^{2+}]i$의 측정은 신규의 유기 분자들을 활성에 따라 선별하는 매우 신속한 방법이다. 하루의 오후동안 10-15개의 분자를 조사하여 이들의 세포내 Ca^{2+}를 동원하거나 또는 동원하지 못하는 능력을 평가할 수 있다. 또한, 이 방법은 $[Ca^{2+}]i$의 저하에 대한 임의의 관찰된 증가에 대한 PMA의 감지도를 평가할 수 있다. 게다가, 한가지의 세포 제제가 $[Ca^{2+}]i$, 시클릭 AMP의 양, IP_3 및 PTH 분비에 대한 데이타를 제공할 수 있다. 전형적인 과정은 세포에 fura-2를 가한 다음 이 세포 현탁물을 2개로 나누는 것이며, 이 세포 중 대다수는 $[Ca^{2+}]i$의 측정용으로 사용되고 나머지는 시클릭 AMP 및 PTH 분비에 대한 이들의 효과를 평가하기 위한 분자로 인큐베이션시킨다. 시클릭 AMP 및 PTH에 대한 방사면역분석의 감도로 인해, 두 변수를 세포 현탁물(약 500,000 세포) 0.3 ml를 함유하는 한개의 인큐베이션 튜브에서 측정할 수 있다. 이노시톨 포스페이트의 측정은 선별법의 시간 소모적 특징이다. 그러나, 포름산염보다는 염화물로 용출시킨 이온 교환 컬럼은 30시간이 소요되는 회전식 증발이 요구되지 않기 때문에 IP_3 형성에 따른 매우 신속한 선별 방법을 제공한다. 이 방법은 하루 중 오후만에 거의 100개의 샘플을 처리할 수 있다. $[Ca^{2+}]i$, 시클릭 AMP IP_3 및 PTH의 측정에 의해 평가된 바와 같이, 흥미있는 것으로 입증된 이들 분자는 이어서 각종 이노시톨 포스페이트의 형성을 조사하고 HPLC에 의해 이들의 이성길체 형태를 평가함으로써 보다 활발한 분석을 거친다.

이어서, 이러한 프로토콜에서 감지된 흥미있는 분자들을 예컨대 쥐 MTC 6-23 세포주를 사용하여 칼시토닌 분비 C-세포에서 $[Ca^{2+}]i$에 대한 이들의 효과를 시험함으로써 그 특이성에 대해 평가하였다.

다음은 상기한 선별 과정에 유용한 방법들을 예시한 것이다. 각종의 시험용칼슘 유사 분자 또는 칼슘 길항 분자에 대한 대표적인 결과들은 그 예로서 제2-34도에 제공된다.

[상피소체 세포의 제조]

상피소체선을 지방 도살장에서 갓 희생시킨 12-15 주된 소로부터 취하고, 이를 실험실에서 126mM NaCl, 4mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 20mM Na-HEPES, 5.6 mM 글루코스 및 가변적 양의 $CaCl_2$, 예컨대 1.25mM을 함유한 때 7.4의 빙냉 상피소체 세포 완충액(PCB)에 이식하였다. 1차 또는 요독성 상피소체기능항진중(HPT)으로 인해 상피소체 조직의 외과적 제거 수술을 받은 환자로부터 취한 인체 상피소체선을 소 조직과 유사하게 처리하였다. 선들은 과도한 지방 및 연결 조직의 제거 손질을 한 후에 미세 가위를 사용하여 약 2-3mm의 입방체로 세분하였다. 분리시킨 상피소체 세포를 콜라게나제 소화에 의해 제제하였다. 이어서, 분리시킨 세포 퍼콜(percoll) 완충액 중에서 원심분리시켜 정제하였다. 상 대비 현미경 및 수단 B염색으로 평가한 결과, 얻어진 상피소체 세포 제제에는 적혈구 세포, 지방세포 및 모세관 조직이 전혀 없었다. 분리 및 정제된 상피소체 세포는 5-20개의 세포를 함유하는 작은 덩어리로 존재하엿다. 트리판 블루 또는 에티듐 브로마이드를 배제시킴에 따라 색인된 세포의 생존능은 거의 95 %이었다.

비록 세포들을 상기한 면에 대한 실험 목적을 위하여 사용할 수 있지만, 생리학적 반응들(PTH 분리 및 $[Ca^{2+}]i$의 보유량 억제가능성)은 세포들을 철야 배양한 후에 보다 양호하였다. 또한, 1차 배양은 이노시톨 포스페이트 대사의 측정에 관한 연구에 필요한 바와 같이 세포들을 동위원소를 이용해 거의 동위원소적 평형상태로 표지화 시킬 수 있다(이하 참조). 세포들은 퍼콜 구배 상에서 정제한 후에 스트렙토마이신 50㎍/ml, 페니실린 U/ml, 젠타마이신 5㎍/ml를 보충시킨 집코(GlBCO)사의 햄즈(Ham's) F-12 Dulbecco's 변형된 이글스 배지와 ITS+ 1:1의 혼합물로 수회 세척하였다. ITS+는 인슐린, 트랜스페린, 셀레니엄 및 소 혈칭 알부민(BSA)-리놀레산(미합중국 매사추세츠주 베드포드 소재의 콜래보러티브 리서치(Collaborative Research)사 제품)을 함유하는 프리믹스 용액이다. 이어서, 이세포들을 플라스틱 플라스크(75 또는 150cm^3: 팔콘사 제품)로 이동시켜 37℃에서 5% $C0_2$의 습한 분위기 하에서 인큐베이션시켰다. 이들 철야 배양물에는 혈청은 전혀 첨가하지 않았는데,이것은 혈청이 존재할 경우 세포들을 플라스틱에 붙게 하고 증식시키며, 비분리되게 하기 때문이다. 상기 조건 하에서 배양된 세포들은 데칸테이션에 의해 플레이크로부터 쉽게 분리되며 갓 제조한 세포와 동일한 생식능을 나타낸다.

[세포질 Ca^{2+} 의 측정]

정제한 상피소체 세포를 1μM fura-2-아세톡시메틸에스테르를 함유하는 1.25 mM $CaCl_2$-2% BSA-PCB에 재현탁시키고, 37℃에서 20분간 인큐베이션시켰다. 이어서 이 세포들을 펠릿화하고, 에스테르가 없는 동일 완충액에 재현탁시키고 37℃에서 15분간 더 인큐베이션시켰다. 이어서 세포들을 0.5mM $CaCl_2$ 및 0.5% BSA를 함유하는 PCB로 2회 세척하고 실온(20℃)으로 유지시켰다. 사용 직전에 세포들을 사전 가열한 0.5mM $CaCl_2$-PCB로 4-5배 희석시켜 BSA의 최종 농도가 0.1%가 되게 하였다. 형광성 기록용으로 사용된 쿠베트에서 세포 농도는 1-2 x 10^6/ml이었다.

지시약을 가한 세포의 형광성을 37℃에서 여기 및 방출 파장이 각각 340 nm및 510 nm인 서모스탯학 구베트 호울더 및 자기 교반기가 장치된 형광분광계(미합중국 펜실바니아주 필라델피아 소재의 필라델피아 대학 생의학 기기화 그룹 제조)로 측정하였다. 이 형광성은 세포질 Ca^{2+} 의 양을 나타낸다. 이 형광 시그날은 최대 형광성(Fmax)을 얻기 위해서는 디기토닌(50 Ug/ml, 최종)을 사용하고 최소 형광성성(Fmin)을 얻기 위해서는 EGTA(10 mM, PH 8.3, 최종)를 사용하고 224 nM의 해리 상수를 사용하여 눈금을 측정하였다. 염료의 누출은 온도에 따라 좌우되고 쿠베트에서 세포들을 가온한 지 최초 2분 이내에 가장 잘 일어나며, 염료의 누출은 이후에 매우 서서히 증가한다. 염료 누출에 대한 눈금을 보정하기 위하여 세포를 쿠베트에 위치시키고 37℃에서 2-3분간 교반시켰다. 이어서, 세포 현탁액을 분리하고, 세포들을 펠릿화시키고, 상징액을 깨끗한 쿠베트에 회수하였다. 이어서, 이 상징액을 상기한 바와 같이 디기토닌 및 EGTA로 처리하여 염료 누출의 측정량으로서 얻었으며, 이것은 통상 전체 Ca^{2+} 의존성 형광 시그날의 10-15%이다. 이 측정량은 명확한 Fmin을 뺀 것이다.

[PHT 분비의 측정]

대부분의 실험에서, fura-2를 가한 세포를 PHT 분비의 연구에 사용하였다. fura-2를 가한 상피소체 세포는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 이들의 분비 반응을 변화시키지 않는다. 세포들은 0.5 mM $CaCl_2$ 및 0.1% BSA를 함유하는 PCB에 현탁시켰다. 세포 현탁액 0.3ml를 함유하는 플라스틱 튜브(팔콘(Falcon) 2058) 중에서 소량의 $CaCl_2$ 및(또는) 유기 폴리양이온의 존재 또는 부재하에 인큐베이션시켰다. 37℃에서 여러 시간(전형적으로 30분) 동안 인큐베이션시킨 후, 튜브를 얼음 위에 놓고, 세포들을 2℃에서 펠릿화하였다. 상징액 시료를 아세트산을 사용하여 pH4.5로 되게 하고, -70℃에서 저장하였다. 이 프로토콜을 소 상피소체 세포 및 인체 상피소체 세포 모두에 대해 사용하였다.

소 세포에 대하여, 상징액 시료 중의 PTH의 양은 GW-1 항체 또는 그의 등가물을 사용하는 동종 방사선 면역 분석법에 의해 1/45,000의 최종 희석 농도에서 축정하였다. ^{125}I-PTH(65-84: INCSTAR, Stil1water, MN)를 트레이서로서 사용하고, 분획을 덱스트란 활성화 목탄에 의해 분리시켰다. 시료 계수 및 데이타 환산을 패커드 코브라(Packard Cobra) 5005 감마 계수기로 수행하였다.

인체 세포에 대하여, GW-1 항체는 인세 PTH를 인지하는 능력이 불량하므로, 손상되지 안은 N-말단 인체 PTH를 인지하는 상업적으로 유용한 방사선 면역 검정키트(INS-PTH; 캘리포니아주 로스앤젤레스 소재 니콜스 인스티튜트로부터 입수)를 사용하였다.

[시클릭 AMP의 측정]

세포들을 PTH 분비 연구에 대해 상술한 바와 같이 인큐베이션시키고, 인큐베이션 종기에, 시료 0.15ml를 취하여 70℃의 열수 0.85ml에 옮기고, 이 온도에서 5 내지 10 분 동안 가열하였다. 이어서, 튜브를 냉각시키고 수회 녹이고, 세포 잔해를 원심분리시켜 침전시켰다. 상징액의 일부를 아세틸화시키고, 시클릭 AMP 농도를 방사선 면역 검정법으로 측정하였다.

[이노시톨 포스페이트 형성의 측정]

인지질막은 상피소체 세포를 ^{3}H-미오-이니시톨 4μCi/ml로 20 내지 24 시간동안 인큐베이션시킴으로써 표식화하였다. 이어서, 세포들을 세척하고, 0.5mM $CaCl_2$ 및 0.1% BSA를 함유하는 PCB에 재현탁시켰다. 인큐베이션은 마이크로푸그 튜브 중에서 다양한 농도의 유기 폴리양이온의 존재 또는 부재하에 상이한 횟수로 수행하였다.

클로로포름/메탄올/12 N HCl(200:100:1; v/v/v)1ml를 첨가함으로써 반응을 종결시켰다. 이어서, 피틴산 가수분해물(200μℓ : 25μℓ 인산염/튜브)을 첨가하였다. 이들 튜브를 원심분리시키고, 수성상 600μℓ를 물 100㎖중으로 희석시켰다.

이노시톨 포스페이트를 AG1-X8을 사용하는 이온 교환 크로마토그로피에 의해 클로라이드 또는 포르메이트 형태로 분리시켰다. IP_3 레벨만을 측정해야 하는 경우, 클로라이드 형태를 사용하는 반면, 포르메이트 형태는 이노시톨 포스페이트(IP_3,IP_2 및 IP_1) 주성분을 분해시키는 데 사용하였다. IP_3 만을 측정하기 위해 희석시킨 시료를 클로라이드 형태의 컬럼에 가하고, 이 컬럼을 30mM HCl 10 m1로 세척한 후, 90 mM HCl 6m1로 세척하고, 이 IP3를 500mM HCl 3m1로 희석시켰다.

최종 용출액을 희석시키고 계수하였다. 이노시톨 포스페이트 주성분 모두를 측정하기 위해, 희석시킨 시료를 포르메이트 형태의 컬럼에 가하고, IP_1, IP_2 및 IP_3 를 순차로 포르메이트 완충액의 농도를 증가시킴으로써 희석시켰다. 포르메이트컬럼으로부터 희석시킨 시료들을 회전 증발시키고, 잔류물을 칵테일시키고, 계수하였다.

IP_3 의 이성질체 형태를 HPLC로 평가하였다. 0.45M 과염소산 1m1를 첨가함으로써 반응을 종결시키고, 얼음 위에서 10분 동안 유지시켰다. 원심분리시킨 후, 상징액을 $NaHCO_3$ 를 사용하여 pH 7 내지 8로 조정하였다. 이어서, 추출물을 파르티실 SAX 음이온 교환 컬럼에 가하고, 포름산 암모늄의 선형 구배 상에서 희석시켰다. 이어서, 여러 분획을 도웩스(Dowex)로 탈염시키고, 회전 증발시킨 후, 패커드 트리카르브(Packard Tricarb) 1500 LSC 로 액체 신틸레이션 계수를 행하였다.

모든 이노시톨 포스페이트 분리 방법에 대하여, 진정한 표준치를 사용하는적절한 대조군을 사용하여 유기 폴리양이온이 분리를 방해하는지를 측정하였다.

그러한 경우, 시료들을 양이온 교환 수지로 처리하여 손상 분자를 제거한 후 이노시톨 인산염을 분리하였다.

[C-세포 중의 세포질 Ca^{2+} 의 측정]

아메리칸 타입 컬춰 컬렉션(ATCC 제1607호)으로부터 입수한 쥐의 수질 갑상선암종(rMTC 6-23)으로부터 유도된 신생 C-세포를 둘베코(Dulbecco)의 개질된 이 글 배지([MEM) + 15% 말 혈청중에서 항생제의 부재하에 단일층으로 배양하였다. [Ca^{2+}]i를 측정하기 위해, 세포들을 0.02% EDTA/0.05% 티로신을 사용하여 수거하고, 1.25mM $CaCl_2$ $CaCl_2$ 및 0.1% BSA를 함유하는 PCB로 2회 세척하고, 상피소체 세포에 대해 상술한 바와 같이 fura-2를 가하였다. [Ca^{2+}]i 측정은 염료 누출을 적절히 보정하면서 상술한 바와 같이 수행하였다.

[쥐의 파골세포 중의 [Ca^{2+}]i의 측정]

파골세포를 생후 1 내지 2일 된 스프라규-다우리(Sprague-Dawley) 쥐로부터 무균 조건을 사용하여 얻었다. 새끼 쥐들을 단두시켜 희생시키고, 뒷 다리를 제거하고, 대퇴로부터 연조직을 신속히 제거하고, 미리 가온시킨 F-12/DMEM 배지(10 % 송아지 태아의 혈청 및 항생제(페니실린-스트렙토마이신-겐타미신; 100U/ml-100μg/ml-100μg/ml)를 함유하는 DMEM)에 넣었다. 새끼 쥐 2마리의 골을 길이로 절단하고, 1ml의 배지에 넣었다. 골 단편들을 플라스틱 피펫으로 부드럽게 처리하여 골 세포를 얻고, 배지로 희석시켰다. 골 단편들을 고정시키고, 동일분량 (약 1ml)의 매질을 25mm의 유리 덮개를 포함하는 6개의 웰 배양만에 옮겼다. 세포들을 37℃에서 습한 5% CO_2 -공기 분위기에서 1시간 동안 고정시켰다. 이어서, 덮개 유리를 신선한 배지로 3회 세척하여 무유착성 세포들을 제거하였다. 파골 세포 중의 [Ca^{2+}]i의 측정은 무유착성 세포들을 제거하면서 6 내지 8 시간동안 수행하였다.

덮개 유리에 부착된 세포들에 5μM indo-1 아세톡시메틸에스테르/0.01% 플루로닉 F28을 사용하여 37℃에서 0.5% BSA 대신에 F-12/DMEM 결핍 혈청 중에서 30분 동안 인큐베이션시킴으로써 indo-1을 가하였다. 이어서, 덮개 유리를 세척하고, 추가로 37℃에서 F-12/DMEM 결핍 에스테르 중에서 15분 동안 인큐베이션시킨 후, 마이크로형광정량용으로 구비된 니콘 다이아포트(Nikon Diaphot) 도립(invert) 현미경 단에 설치된 과융해 챔버로 옮겼다. 파골 세포는 그들의 크기가 크고 다핵이 존재함으로서 용이하게 동정될 수 있다. 이들 세포는 시험 물질의 존재 또는 부재하에 완충액(전형적으로 0.1% BSA 및 1mM Ca^{2+} 를 함유하는 PCB)를 사용하여 과융해시켰다. 340nm에서 여기시킴으로써 방출되는 형광을 현미경의 비데오 포트를 통해 440nm의 이색 거울 상으로 통과시키고, 495nm 및 405nm에서의 형광 세기를 광전자 증배관에 의해 수집하였다. 광전자 증배관으로부터의 산출치를 증폭시키고, 디지탈화하여 80386 PC에 저장하였다. 형광 세기율을 $[Ca^{2+}]i$를 추정하는 데 사용하였다.

[난모 세포 발현]

추가 연구에서, 소 또는 인체 상피소체 세포로부터 얻은 mRNA를 사용하여 주입안 크세노푸스 난모세포를 선별 프로토콜에서 사용하고, C1-유동을 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 감지하는 간접적인 수단으로서 측정하였다. 다음은 네오마이신의 효과를 시험하기 위한 예이다.

난모 세포에 인체 상피소체 조직 (2차 HPT의 경우로부터 얻은 과형성 선)으로부터 얻은 폴리(A)+-풍부 mRNA를 주입시켰다. 3일 후, 난모 세포를 네오마이신에 대한 그들의 반응에 대해 시험하였다. 진동을 나타내는 네오마이신 B는 무 약물 함유 염수를 사용하여 과융해시킴에 따라 중단되는 C1-유동율 증가시켰다(제20도 참조). 네오마이신 B에 대한 반응은 100 μM 내지 10μM의 농도에서 관찰되었다. 네오마이신 B에 의해 나타나는 반응이 상피소체 mRNA의 주입에 의존함을 확인하기 위해, 네오마이신 B의 물을 주입한 난모 세포의 유동에 대한 효과를 측정하였다. 조사된 5개의 난모 세포 각각에서, 네오마이신 B (10mM)은 유동에 있어서 어떠한 변화도 일으키지 못하였다. 난모 세포의 약 40%가 카르바콜에 반응하는 것으로 알려져 있으며, 그 효과는 내인성 무스카린 수용체에 의해 매개된다.

조사한 5개의 난모 세포 증의 하나는 카르바콜에 반응하는 내측 유동을 보이고, 이는 제20도의 하측 트레이스에 나타낸 바와 같다. 따라서,$[Ca^{2+}]i$ 및 C1-유동을 증가시키기 의해 커플링된 무스카린 수용체를 발현시키는 세포에 있어서, 네오마이신 B는 반응을 나타내지 않았다. 이러한 사실은 네오마이신 B에 대한 반응이상피소체 세포의 mRNA에 의해 코딩되는 특이 단백질의 발현에 의존함을 보여준다.이는 손상되지 안은 세포에 있어서, 네오마이신 B가 Ca^{2+} 수용체 상에 직접적으로 작용하여 상피소체 세포의 기능을 변경시킬 수 있음을 강하게 시사한다.

[리드 분자로부터 얻은 약물 설계]

특정 유기 분자들은 븐 명세서에 나타낸 바와 같이 Ca^{2+} 수용체에 작용함으로써 세포외 Ca^{2+} 의 작용과 유사하게 작용하거나 길항작용한다. 그러나, 시험 분자들은 약물 후보로서 필수적으로 적합하지 않지만, 이들은 Ca^{2+} 수용체를 근간으로 하는 요법에 기초한 가설이 정확하다는 것을 나타내는 작용을 한다. 이들 분자는 이둘을 Ca^{2+} 수용체 상에 작용시키고, 그에 따라 본 발명에 유용한 분자들을 선택할 수 있게 하는 구조적 특징을 측정하는 데 사용할 수 있다.

이러한 분석 방법 중 한가지 예는 다음과 같다: 이러한 예는 하기 실시예에서 상술하지만, 여기서 논의하는 리드 분자로부터 본 발명의 유용한 분자를 설계하는 데 사용할 수 있는 이론적 근거를 나타내기 위해 사용한다. 당업자들은 실시예에서 한정한 분석 단계 및 유사한 분석 방법을 대부분의 목적하는 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물이 분명해질 때까지 다른 리드 분자들에 대해 수행할 수 있음을 이해할 것이다.

또한, 다른 실시예를 아래 제공된다. 나타난 데이타는 유용한 리드 분자들이 1개 이상의 위치가 치환되는 것이 바람직한 방향족 기를 가질 것을 나타냄과 동시에, 바람직하다면 분지쇄 또는 직쇄 치환 또는 비치환 알킬기를 가질 수 있음을 나타낸다. 또한, 목적하는 Ca^{2+} 수용체에 대해 높은 친화력을 보장하기 위해 정확한 입체특이성을 갖는 분자를 선택하는 것이 중요하다. 따라서, 이들 데이타는 당업자들에게 아래 상술하는 바와 같이 본 발명의 목적하는 최적 분자들을 발견하기 위해 유도될 수 있는 적절한 리드 분자들을 지시해 준다.

구조적으로 다르더라도, 시험한 분자들은 연구될 수 있는 일반적 특성을 가질 것이다. 이러한 예에 있어서, 이동성 세포내 Ca^{2+} 중에서 순 양전하와 효능사이의 상관 관계를 시험하였다. 프로타민(+21; EC_{50} = 40nM)은 네오마이신 B(+6:EC_{50} = 인체 상피소체 세포 내에서 20μM, 소 상피소체 세포 내에서 40μmM)보다 더 효과적이고, 이 네오마이신 B는 상피소체 세포에서 [Ca^{2+}]i의 이동을 유발시키는 스페르민 (+4;EC_{50} = 150μM)보다 더 효과적이다. 이러한 결과는 양전하만이 효능을 결정하는 것인지 또는 Ca^{2+} 수용체에 대한 활성에 기여하는 다른 구조적 특징이 있는 것인지에 관한 의문을 제기시킨다. 이는 Ca^{2+} 수용체가 효과적이고 특이적인 치료 분자로 표적화될 수 있다는 관점에 대해 깊은 영향을 미치기 때문에 초기에 측정하는 것이 중요하다. 따라서, 네오마이신 B 및 스페르민과 관련된 여러가지 다른 유기 폴리양이온을 연구하여 분자의 순 양전하와 그의 세포외 Ca^{2+} 를 이동화시키는 효능 사이의 관계를 측정할 수 있다.

연구한 제1군의 분자들은 아미노글리코시드류이다. 이들 분자를 소 상피소체 세포에 대해 조사하고, 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시키기 의한 이들의 EC_{50} 을 측정하였다. 아미노클리코시드류에 대해서, 순간적인 세포질 Ca^{2+} 증가를 이끌어내기 위한 효능의 등급은 네오마이신 B(EC_{50} = 20 또는 40μM) > 겐타미신(15Oμ M) > 베카나마이신(200μM) > 스트렙토마이신(600μM)이었다. 카나마이신 및 린코마이신은 500 μM의 농도에서 시험할 경우 효과가 없었다. pH 7.3에서 이들 아미노글리코시드류에 대한 순 양전하는 네오마이신 B(+6) > 젠타미신(+5) = 베카나마이신(+5) > 카나마이신(평균 +4.5) > 스트렙토마이신(+3) > 린코마이신(+1)이었다. 아미노글리코시드 군에 있어서, 절대적인 것은 아닌 순 양전하와 카나마이신 사이에 약간의 상관 관계가 있으며, 이 카나마이신은 활성은 없지만, 스트렙토마이신보다 더 효능이 클 것이라는 것을 예상할 수 있다.

여러가지 폴리아민류를 시험함에 따라 순 양전하와 효능 사이에 부가적이고보다 현저한 불일치가 나타났다. 3가지 구조군의 폴리아민류를 조사하였다: (1) 직쇄 폴리아민, (2) 분지쇄 폴리아민, 및 (3) 시클릭 폴리아민 시험한 폴리아민류의 구조를 제1도에 나타냈다. 직쇄 폴리아민 중에서, 펜타에틸렌헥사민(+6;EC_{50} = 500μM) 및 테트라에틸렌펜타민(+5;EC_{50} = 2.5mM) 분자들이 스페르민(+4;EC_{50} = 150 μM)보다 더 큰 순 양전하를 가질지라도 스페르민이 이들보다 더 큰 효능을 가졌다.

본 발명자들은 상이한 수의 이급 및 일급 아미노기를 갖고, 이에 따라 순 양전하가 변화되는 몇몇 분지쇄 폴리아민류를 합성하였다. 이들 분자중의 2가지, 즉 NPS 381 및 NPS 382를 소 상피소체 세포 중에서 [Ca^{2+}]i에 대한 효과를 조사하 였다. NPS 382(+8;EC_{50} = 50μM)은 NPS 381 (+10;EC_{50} = 100μM)보다 양전하가 2개 더 적지만, 거의 두배의 효능을 가졌다.

양전하와 효능 사이의 마찬가지 불일치가 시클릭 폴리아민류를 사용한 실험에서 나타났다. 예를 들면, 헥사시클렌(+6 : EC_{50} = 20μM)은 NPS 383(+8: EC_{50} = 150μM)보다 더 큰 효능을 가졌다. 이들 폴리아민을 사용하여 얻은 결과는 양전하가 효능에 기여하는 유일안 인자가 아님을 보여준다.

추가의 연구에 의해 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성을 부여하는 분자들의 구조적 특징에 대한 관찰이 이루어졌다. 구조적으로 중요한 특징 중의 하나는(양전하를 갖는) 질소 사이의 분자내 거리이다. 따라서, 스페르민은 소 상피소체 세포중에서 [Ca^{2+}]i의 증가를 나타내는 트리에틸렌테트라민(EC_{50} = 8mM)보다 50배 큰 효능을 갖지만, 이들 분자 모두는 +4의 순 양전하를 가졌다. 이들 두 폴리아민 사이의 구조에 있어서 유일한 차이는 질소 원자들을 분리하는 메틸렌의 수가 스페르민에서는 3-4-3인 반면, 트리에틸렌테트라민에서는 2-2-2라는 것이다. 질소 원자들 사이의 공간 배치에 있어서의 이와 같이 사소한 겉보기 변화는 효능과 깊은 관련이 있으며, 분자내 질소 형태의 관계가 중요함을 시사한다. 이를 지지하는 결과를 헥사시클렌 및 펜타에틸렌헥사민을 사용하여 얻었다. 헥사시클렌 분자는 펜타에틸렌헥사민의 단순한 시클릭 유사체이며, 모든 질소 원자들 사이에 동일한 수의 메틸렌을 함유하지만, 고리 구조로 존재하는 경우, 효능이 25배 증가한다. 이러한 결과는 양전하 자체가 Ca^{2+} 수용체에 대한 유기 분자의 활성을 측정하는 중요한 인자가 아님을 나타낸다.

다른 일련의 실험은 Ca^{2+} 수용체에 대한 활성을 측정하는 데 있어서 방향족기의 중요성을 나타낸다. 이 결과는 아르지오페 로바타(Argiope 1obata) 거미의 독액으로부터 단리시킨 2개의 아릴알킬아민을 사용하여 얻었다. 이들 분자, 아르기오톡신 636 및 아르기오톡신 659는 상이한 방향족기에 결합된 동일한 폴리양이온 부분을 갖는다(제24도). 아르기오톡신 659는 100 내지 300μM의 농도에서 시험할 때 소 상피소체 세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 순간적으로 증가시켰다. 이와 대조적으로, 아르기오톡신 636은 동일한 농도에서 시험할 때 효과가 없었다(제24도). 이들 두 아릴알킬아민 사이의 구조에 있어서 유일한 차이는 분자의 방향족 부분에 있다: 아르기오톡신 659는 4-히드록시인들 잔기를 함유하는 반면, 아르기오톡신 636은 2,4-디히드록시페닐기를 함유한다. 이들 두 아릴알킬아민류 상의 순 양전하는 동일하므로(+4), 이들의 효능의 차이는 상이한 방향족 기들로부터 초래되는 것이 틀림없다. 이는 순 양전하만으로 효능을 측정할 수 없음을 보여준다. 그러나, 이러한 발명에 있어서 실제로 중요한 것은 방향족기가 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 분자의 능력에 대해 현저히 기여한다는 발견이다.

EC_{50} 이 각각 6 μM 및 22μM인 아가톡신 489(NPS 017) 및 아가톡신 505(NPS015) 모두가 상피소체 세포의 세포내 Ca^{2+} 를 동원시킨다. 이들 분자 구조의 유일한 차이는 인돌 잔기 상의 히드록실기이다(제1도). 이는 분자의 방향족 영역상의 치환체가 효능에 영향을 미칠수 있음을 보여준다. 이는 추가로 연구한 리드분자들이 치환된 방향족 잔기를 갖는 분자들을 포함할 수 있음을 나타낸다.

본 명세서에 기재한 리드 분자들로부터 계통적으로 변화시킨 구조적 특징은 (1)순 양전하, (2)질소 원자들을 분리시키는 메틸렌의 수, 및 (3)메틸엔의 공간 배치 및 순 양전하의 변화의 유무에 따른 폴리아민의 시클릭 형태를 포함한다.

방향족기의 구조 및 위치에 있어서의 추가의 계통적 변명, 예를 들면 말벌및 거미 독액으로부터 단리시킨 각종 아릴알킬아민류를 조사할 수 있으며, 합성 분자들은 아르기오톡신 폴리아민 잔기에 시판중인 방향족 잔기를 커플링시킴으로써 제조할 수 있다. 아르기오특신 폴리아민 잔기는 카르복실기를 함유하는 임의의 방향족 잔기에 용이하게 커플링시킬 수 있다. 따라서, 페닐아세트산 및 벤조산의 히드록시 및 메톡시 유도체 뿐만 아니라 히드록시인들 아세트산 계열을 계통적으로 선별하는 것은 단순하다. 또한, 헤테로방향족 관능기를 함유하는 유사체를 제조하여 활성을 평가할 수 있다.

이러한 분자들 사이의 효능 및 효율을 비교하면 일정한 양전하에서 방향족기의 최적 구조 및 위치가 드러났다.

효능을 증가시키는 것으로 보이는 폴리아민 모티브에 대한 구조적 변형 중의 하나는 직쇄 부모 분자의 시클릭 형이 존재하는 것이다. 알비지아 아마라 (Albizia annra) 식물로부터 단리시킨 부드먼키아민(Budmunchiamine) A는 스페르민의 시클릭 유도체이다(제1도). 부드먼키아민 A를 소 상피소체 세포에 첨가함으로써 세포외 Ca^{2+} 의 부재하에 지속되는 신속하고 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 야기시키고, PMA로 예비처리함으로써 둔화시켰다. 따라서, 이 분자는 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용시킴으로써 상피소체 세포 중에서 세포내 Ca^{2+} 를 동원할 것이다. 이 분자는 스페르민보다 1개 더 작은 양전하(+3)를 갖지만, 스페르민 (EC_{50} 가 약 200μM임)과 거의 동일한 효능을 가졌다.

부드먼키아민 A를 사용하여 얻은 결과는 구조-활성 연구의 예견 능력 및 천연 생성물을 시험함으로써 얻어지는 신규한 구조적 정보를 나타낸다. 따라서, 구조적 정보를 기준으로 합리적으로 선택되는 천연 생성물을 선별하는 것은 용이하며, 예를 들면 분자들은 나프라러트(Napralert) 등의 적절한 데이타 베이스를 사용하여 잘 설계된 화학분류학의 원리를 기준으로 선택할 수 있다. 예를 들면 피테콜로븀 (Pithecolobium)등의 알비지아에 관련된 파필리오노이드 콩과 식물로부터 유도되는 매크로시클릭 폴리아민 알카로이드류 및 다른 식물 유도 분자들을 선별할 수 있다.

제36도는 본 발명의 유용한 분자들을 측정하기 위해 선별되는 일련의 분자들의 다른 예를 제공한다. 이들 분자는 일반적으로 펜딜린으로부터 유도되며 이들각각의 EC_{50} 을 측정하기 위해 시험하였다. 또한, NPS 447 및 NPS 448 등의 관련 분자들을 시험함으로써 분자 구조의 입체특이성이 드러났다. 현재까지 시험한 대부분의 활성 화합물들은 신규 화합물로서 EC_{50} 이 5μM 이하인 NPS 467 및 NPS 568로 동정되었다. 당업자라면 이러한 일련의 분자들을 검토함으로써 본 발명에서 시험할 수 있는 다른 적절한 유도체들을 결정할 수 있다.

이들 예는 본 발명에 유용한 일반적인 설계 및 선별 공정을 나타내며, 추가의 화합물 및 천연 생성물 라이브러리가 본 발명의 다른 유용한 리드 분자 또는 신규 분자들을 측정하기 위해 당업자들에 의해 용이하게 선별될 수 있다.

상술한 바와 같이, 칼슘 유사물로서 유용한 분자의 예로서는 분지쇄 또는 시클릭 폴리아민, 양으로 하전된 폴리아미노산, 및 아릴알킬아민을 들 수 있다.

또한, 천연 분자 및 이들의 동족체를 포함하는 양으로 하전된 기타 유기 분자들이 유용한 칼슘 유사물이다. 이들 천연 분자 및 이들의 동족체는 본 명세서에서 예시한 분자들의 비와 상관 관계인 양전하 대 중량비를 갖는 것이 바람직하다. (그 예로는 해양 동물, 절지 동물 독액, 육생 식물 및 세균 및 진균으로부터 유도되는 발효액으로부터 단리시킨 물질을 들 수 있다.) 칼슘 유사물로서 유용한 바람직한 천연 분자 및 동족체의 일군은 약 1:40 내지 1:200, 바람직하게는 약 1:40 내지 1:100의 양전하:분자량(달톤 단위)의 비를 가질 것이 예상된다. 이러한 분자들의 구체적인 예는 아래와 같다.

[폴리아민류]

본 발명에 있어서 칼슘 유사물로서 유용한 폴리아민류는 분지쇄 또는 시클릭형태일 수 있다. 분지쇄 또는 시클릭 폴리아민류는 이들의 다른 직쇄 동족체보다 더 큰 칼슘 유사 활성을 잠정적으로 갖는다. 즉, 분지쇄 또는 시클릭 폴리아민류는 생리학적 pH에서 동일한 유효 전하를 갖는 이들의 대응하는 선형 폴리아민류보다 더 낮은 EC_{50} 을 갖는 경향이 있다(표1 참조).

[표 1]

분자	순 (+) 전하	EC_{50}(μM)
네오마이신	+6	20 또는 40
헥사시클렌	+6	20
NPS 382	+8	50
NPS 381	+10	100
NPS 383	+8	150
겐타미신	+5	150
스페르민	+4	150
베카나마이신	+5	200
아르기오톡신-659	+4	300
펜타에틸렌헥사민 (PEHA)	+6	500
스트렙토마이신	+3	600
스페르미딘	+3	2000
테트라에틸렌펜타아민 (TEPA)	+5	2500
1,12-디아미노도데칸 (DADD)	+2	3000
트리에틸렌트리아민 (TETA)	+4	8000

본 명세서에서 사용된 " 분지쇄 폴리아민류" 는 아미노 결합에 의해 함께 결합된 짧은 알킬 브리지 또는 알킬기로 이루어지고, 사슬이 분지된 분지점을 함유하는 사슬 분자를 의미한다. 이들 " 분지점" 은 탄소 원자 또는 질소 원자에 모두 위치할 수 있으며, 바람직하게는 질소 원자에 위치할 수 있다. 질소 원자 분지점은 전형적으로 3급 아민이지만, 4급 아민일 수도 있다. 분지쇄 폴리아민은 1 내지 20개의 분지점, 바람직하게는 1 내지 10개의 분지점을 가질 수 있다.

일반적으로, 분지쇄 폴리아민 중의 알킬 브리지 및 알킬 분지는 1 내지 50개의 탄소 원자, 바람직하게는 2 내지 6개의 탄소 원자를 가질 수 있다. 또한, 알킬 분지는 1종 이상의 헤테로 원자(질소, 산소 또는 황)에 의해 단속되거나, 또는 플루오로, 클로로, 브로모, 또는 요오도 등의 할로; 히드록시; 니트로; 아실옥시(R'CO0-), 아실아미도(R'CONH-) 또는 알콕시(-OR')(여기서, R'는 1 내지 4개의 탄소 원자를 함유함)등의 관능기로 치환될 수 있다. 또한, 알킬 분지는 생리학적 pH에서 양전하를 띠는 기, 예를 들면 아미노 또는 구아니도기로 치환될 수 있다. 이들 관능성 치환체는 용해도 등의 물성을 부여하거나 또는 물성을 변화시킴으로써 분자의 활성, 전달 또는 생물학적 이용가능성을 증가시킨다.

분지쇄 폴리아민은 3개 이상의 사슬 및 분지 말단점을 가질 수 있다. 이들말단점은 메틸기 또는 아미노기일 수 있으며, 바람직하게는 아미노기일 수 있다.

바람직한 분자군 중의 하나는 하기 일반식을 갖는 분지쇄 폴리아민군이다.

$H_2N-(CH_2)j-(NRi-(CH_2)j)k-NH_2$

상기 식에서, k는 1 내지 10의 정수이고, j 각각은 서로 동일하거나 또는 상이한 것으로, 2 내지 20의 정수이며, Ri 각각은 서로 동일하거나 상이한 것으로,수소 및 $-(CH_2)j-NH_2$ (여기서, j는 상기 정의한 바와 같음)로 이루어진 군으로부터 선택되며, 단, 적어도 하나의 Ri는 수소가 아니다.

특히 바람직한 본 발명의 분지쇄 폴리아민류는 분자 $N^1,N^1,N^5,N^{10},N^{14},N^{14}$-헥사키스-(3-아미노프로필)스페르민 및 $N^1,N^1,N^5,N^{14},N^{14}$-테트라키스-(3-아미노프로필)스페르민이며, 제1도에서 각각 NPS 381 및 NPS 382로서 언급된다.

본 명세서에서 사용된 " 시클릭 폴리아민류" 는 2종 이상의 헤테로 원자(질소, 산소 또는 황)를 함유하고, 그 중 적어도 2개는 질소 원자인 헤테로사이클을 의미한다. 일반적으로 헤테로사이클은 원주에 약 6 내지 약 20 개의 원자, 바람직하게는 약 10 내지 약 18개의 원자를 갖는다. 질소 헤테로 원자는 2 내지 10개의 탄소 원자에 의해 분리된다. 헤테로사이클은 질소 부위에서 아미노알킬 또는 아미노아릴기(NH_2R-)(여기서, R은 아미노아릴 또는 탄소 원자수 2 내지 6의 저급알킬임)로 치환될 수도 있다.

특히 바람직한 본 발명의 시클릭 폴리아민류는 헥사시클렌 (1,4,7,10,13,16-헥사아자-시클로옥타데칸) 및 NPS 383으로 제1도에 나타낸 것이다.

[폴리아미노산류]

본 발명에 유용한 폴리아미노산류는 생리학적 pH에서 양으로 하전된 아미노산 잔기를 2개 이상 함유할 수 있다. 이들 양으로 하전된 아미노산으로는 히스티딘, 리신 및 아르기닌을 들 수 있다. 이들 폴리펩티드는 2 내지 800개의 아미노산, 바람직하게는 20 내지 300개의 아미노산으로 된 다양한 길이를 갖는다. 이들 폴리펩티드는 단일 아미노산 잔기로 반복되거나, 또는 다양한 천연 단백질 또는 효소를 가질 수 있다.

폴리아미노산을 구성하는 아미노산 잔기는 20개의 천연 아미노산 중의 임의의 아미노산, 또는 다른 잔기일 수 있다. 다른 잔기는 표지 물질로서 작용하는 분자 또는 이온으로 유도된 성분들을 함유하는 본 발명의 조성물을 포함할 수도 있다. 방사성 동위 원소, 발색단 및 형광 표지 물질을 포함한 다양한 표지 물질을 사용할 수 있다. 특히, 방사성 동위 원소 표지가 생체내에서 용이하게 검출될 수 있다. 방사성 동의 원소는 포르피린 계에서 양이온으로서 동위화됨으로써 커플링될 수 있다. 유용한 양이온으로는 테크네튬, 갈륨 및 인듐을 들 수 있다.

본 발명의 조성물에 있어서, 양으로 하전된 분자를 표지 물질에 연결시키거나, 표식 물질과 결합시킬 수 있다.

[합성 방법]

폴리아민류의 합성 및 개질 방법은 관능성 분자를 제조하기 의해 선택적으로 제거될 수 있는 각종 아민 보호기(프탈이미도, BOC. CBZ, 벤질 및 니트릴)의 사용율 포함한다. 관련된 합성 방법은 아르기오핀 636 및 659 및 거미 독액으로부터 유도된 기타 아릴알킬아민을 제조하는 데 사용한 후에 모델화시켰다.

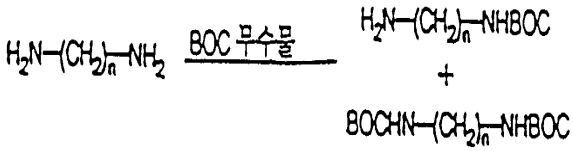
2 내지 4개 메틸렌의 사슬 신장은 전형적으로 대응하는 N-(브로모알킬)프탈이미드를 사용하여 알킬화시킴으로써 수행되었다. 브로모알킬프탈이미드에 대한 아민의 1:1.2 혼합물은 셀라이트 상에서 50% KF의 존재하에 아세토니트릴 중에서 환류시켰다. 또한, 사슬 신장은 주어진 아민을 아크릴로니트릴 또는 에틸아크릴레이트를 사용하여 알킬화시킴으로써 수행하였다. 반응의 진행은 TLC에 의해 감지하고, 중간체는 디클로로메탄, 메탄올 및 이소프로필아민의 혼합물을 사용하여 실리카겔 상에서 정제하였다. 최종 생성물을 양이온 교환 (HEMA-SB) 및 RP-HPLC(Vydac C-18)에 의해 정제하였다. 순도 및 구조 확인은 ^{1}H 및 ^{13}C-NMR 및 고분석능 질량 분석기 (EI, CI 및(또는) FAB)로 수행하였다.

BOC 보호기는 아민 (1° 또는 2°)을 디클로로메탄 중에서 촉매량의 디메틸아미노미리딘의 존재하에 디-tert-부틸디카르보네이트로 처리함으로써 첨가하였다. 벤질 보호기는 다음 2가지 방법 중의 하나로 첨가하였다: (1) 1° 아민을 벤즈알데히드와 축합시킨 후, 붕수소화나트륨에 의해 환원시키거나, 또는 (2) 2° 아민을 KF의 존재하에 벤질브로마이드를 사용하여 알킬화시키는 방법. 아미드 결합 및 고리화는 전형적으로 아민(1° 또는 2°)을 주어진 산의 N-히드록시숙신이미드 에스테르와 반응시킴으로써 수행하였다. (고리화의 경우에) "아미노산"을 희석 조건하에 디시클로헥실카르보디이미드로 처리함으로써 이 방법을 직접적으로 수행하였다.

프탈이미도 관능기의 탈보호는 환류 메탄올 중에서 히드라진을 사용하여 환원시킴으로써 수행하였다. BOC 관능기의 탈보호는 무수 TFA 중에서 수행하였다.

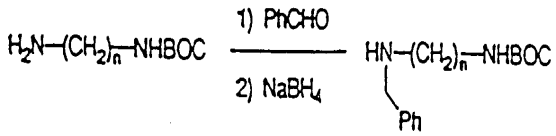
벤질, 니트릴, 및 CBZ 보호 관능기의 탈보호는 빙초산 중에서 3.8 바아(55psi)의 수소압하에 촉매량의 탄소 기재 수산화 팔라듐의 존재하에 환원시킴으로써 수행할 수 있다. (벤질 및 CBZ기의 존재하의) 니트릴 관능기는 스폰지 라네이 니켈의 존재하에 수소 분위기에서 선택적으로 환원시켰다.

특히, 분지쇄 폴리아민류는 전형적으로 일반식 Mb-(CH_2)n-NH_2의 단순한 디아미노알칸류 또는 스페르미딘 또는 스페르민 등의 단순한 폴리아민류로부터 제조한다. 2개의 일급(말단) 아민 중의 하나는 BOC(t-부틸옥시카르보닐), 프탈이미도, 벤질, 2-에틸니트릴(아민과 아크릴로니트릴의 미카엘 축합 반응 생성물), 또는 아미드 등의 보호기로 보호 또는 "차폐" 시킬 수 있다. 통상적인 반응은 다음과 같이 디-t-부틸-디카르보네이트(BOC 무수물)로 처리함으로써 BOC 보호기를 첨가하는 것이다:

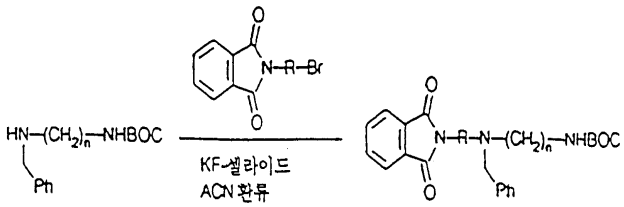


일보호 생성물은 미보호 및 이보호 생성물로부터 단순한 크로마토그래피 기술 또는 증류 기술에 의해 분리시킨다.

이어서, 일보호 생성물 중의 나머지 유리 아민은 알킬화제(또는 아실화제)를 사용하여 선택적으로 알킬화(또는 아실화)시킨다. 일알킬화시키기 의해, 유리아민을 벤즈알데히드와 축합시켜 부분적으로 보호시킨 후, 붕수소화나트륨에 의해 환원시켜 N-벤질 유도체를 형성한다:

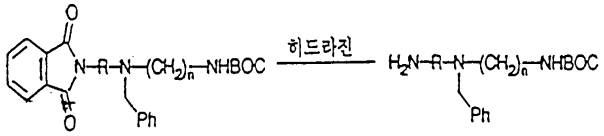


이어서, N-벤질 유도체를 알킬화제와 반응시킨다. 전형적인 알킬화제는 N-(브로모알킬)프탈이미드 중에서 다음과 같이 반응한다:



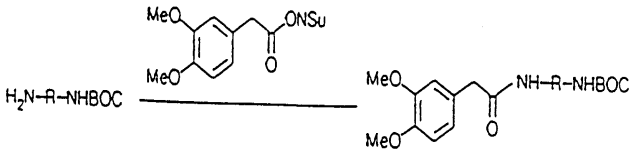
예를 들면, N-(브로모부틸)프탈이미드는 4개의 메틸렌 단위를 사용하여 사슬을 신장시키거나 또는 분지화시키는 데 사용된다. 별법으로, 아크릴로니트릴과 반응시킨 후, 시아노기를 환원시켜 3개의 메틸렌기 및 아미노기에 의해 사슬을 신장시킬 수 있다.

이어서, 생성된 사슬 신장된 분자의 보호기를 선택적으로 분열시켜 신규 유리 아민을 생성할 수 있다. 예를 들면, 트리플루오로아세트산은 BOC기를 제거하는 데 사용되고; 접촉 수소첨가반응은 니트릴 관능기를 환원시키고 벤질기를 제거하는 데 사용되며; 히드라진은 다음과 같이 프탈아미도기를 제거하는 데 사용된다.



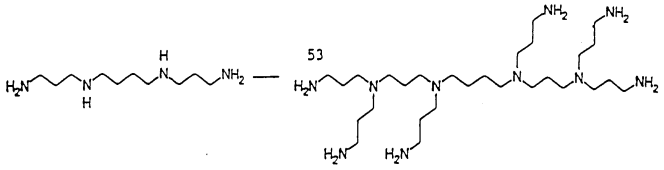
신규 유리 아민을 상술한 바와 같이 알킬화(또는 아실화)시켜 폴리아민의 길이를 증가시킬 수 있다. 이 방법을 목적하는 사슬 길이 및 분지쇄의 수가 얻어질 때까지 반복한다. 최종 단계에서, 생성물을 탈보호시킴으로써 목적하는 폴리아민을 얻는다. 그러나, 보호 반응 종반에 추가로 개질시킨 후 다음과 같은 방법으로 탈보호시킬 수 있다.

예를 들면, 폴리아민을 BOC 탈보호시키기 전에 3,4-디메특시페닐아세트산의 N-히드록시숙신이미드 에스테르를 사용하여 아실화시켜 이보호된 폴리아민을 생성한다.



이 반응은 긍극적으로 아릴 폴리아민을 생성한다. 이어서, BOC기는 트리플루오로 아세트산을 사용하여 선택적으로 제거하여 상술한 바와 같이 신장될 수 있는 다른 아미노 말단을 나타낼 수 있다.

특정 분지쇄 폴리아민류는 유리 일급 및 이급 아민을 상술한 바와 같이 형성된 폴리아민 중에서 동시에 알킬화 또는 아실화시킴으로써 형성할 수 있다. 예를 들면,스페르민을 과량의 아크릴로니트릴로 처리한 후, 접촉 환원시켜 다음을 생성할 수 있다.



시클릭 폴리아민류는 헥사시클렌(알드리치 켐 제품)등의 출발 물질을 사용하여 상술한 바와 같이 제조할 수 있다.

본 발명의 범위에 속하는 폴리아미노산류는 당업계에 공지된 재조합 기술에의해 제조할 수 있고, 당업계에 공지된 표준 고상 기술을 사용하여 합성할 수 있다. 고상 합성은 펩티드의 카르복시 말단으로부터 α-아미노 보호된 아미노산을 사용하여 제조한다. 비록 다른 보호기가 적절하더라도, BOC 보호기를 모든 아미노기에 대해 사용할 수 있다. 예를 들면, BOC-리스-OH를 에스테르화시켜 클로로메틸화 폴리스티렌 수지 지지체를 얻을 수 있다. 폴리스티렌 수지 지지체는 스티렌과, 폴리스티렌 중합체를 특정 유기 용매 중에서 완전히 불용화시키는 가교제로서 0.5 내지 2%의 디비닐벤젠의 공중합체인 것이 바람직하다. [스튜어트(Stewart)등의 Solid-Phase Peptide Synthesis(1969), 샌프란시스코 소재 프리맨 코(W.H.Freeman Co.); 및 메리필드(Merrifield)의, J. Am. Chem. Soc. (1963), 85:2149-2154 페이지 참조]. 또한, 이와 같은 또는 다른 펩티드 합성 방법은 미합중국 특허 제3,862,925호, 동 제3,842,067호; 동 제3,972,859호 및 동 제4,105,602호에 예시되어 있다.

폴리펩티드 합성법은 제조업자에 의한 인스트럭션 매뉴얼에 제공된 명령에 따라 수동 기술을 사용하거나, 또는 어플라이드 바이오시스템 403A 펩티드 합성기(캘리포니아주 포스터 시티) 또는 바이오서치 SAM II 자동 펩티드 합성기 (캘리포니아주 산라파엘 소재 바이오서치 인크. 제조)를 자동으로 사옹할 수 있다.

본 발명의 아릴알킬아민류는 공지 기술에 의해 단리시킨 천연 생성물 또는 문헌[자시스(Jasys), Tetrahedron Lett. (1988) 29: 6223-6226페이지 및 네이손(Nason)의 Tetrahedron Lett.(1989) 30:2337-2340페이지]에 기재된 바와 같이 합성한 것이다.

펜딜린 (또는 제36도에 나타낸 펜딜린 동족체)를 제조하기 위한 한가지 일반적인 프로토콜은 다음과 같다. 자기 교반 막대 및 고무 격벽이 구비된 10ml들이 둥근 바닥 플라스크에서 에탄올 2ml 중의 3,3'-비스페닐프로필아민 (또는 일급 알킬 아민) 1.0 밀리몰을 페놀 1.1 밀리몰 및 아세토페논(또는 치환 아세토페논) 1.0 밀리몰로 처리하였다. 여기에 $MgSO_4$ 2.0 밀리몰 및 $NaCNBH_3$ 1.0 밀리몰을 첨가하였다. 이 반응 혼합물을 질소 분위기하에 실온(약 20℃)에서 24시간동안 교반시켰다. 반응물을 에테르 50ml에 붓고 1N NaOH로 3회 및 염수로 1회 세척하였다. 에테르층을 무수 K_2CO_3를 사용하여 건조시키고 및 진공 제거하였다.

이어서, 생성물을 컬럼 크로마토그래피 또는 실리카 정제상을 혼입시킨 HPLC에 의해 CH_2Cl_2-메탄올-이소프로필아민의 혼합물(전형적으로 염화메틸렌 중의 3% 메탄올 및 0.1% 이소프로필아민)을 사용하여 정제시켰다.

펜딜린 또는 펜딜린 유사체 (예를 들면 제36도에 나타낸 것)를 제조하기 위한 바람직한 방법은 티타늄(IV) 이소프로폭시드를 사용하며, 문헌[J.Org. Chem. 55:2552페이지(1990)]에 기재된 방법으로 변형시켰다. NPS 544를 합성하기 의해, 티타늄(IV) 이소프로폭시드 대신에 티타늄 테트라클로라이드를 사용하였다(Tetrahedron Letters 31:5547 (1990)에 기재된 방법 참조). 반응식은 제43a도에 나타냈다. 제43a도에서, R, R', R" 는 히드로카르빌기를 나타낸다. 일 실시태양에 따라, 4ml들이 바이알에서 아민 (1)(전형적으로 일급 아민) 1밀리몰 및 케톤 또는 알데히드 (2)(일반적으로 아세토페논) 1 밀리몰을 혼합시킨 후, 티타늄(IV) 이소프로폭시드 (3)1.25 밀리몰로 처리하고 30 분 동안 실온에서 때때로 교반시키면서 방치하였다. 별법으로 (1)대신에 이급 아민을 사용할 수 있다. 주: 몇몇 반응은 반응 과정에 걸쳐 교반/혼합시키기 위해 수회 가온/가열해야 하는 다량의 침전물 또는 고상물을 제공할 것이다. 이 반응 혼합물은 소듐 시아노보로히드리드 (4)1 밀리물을 함유하는 에탄올 1ml로 처리하고, 이어서, 생성된 혼합물은 약 16 시간 둥안 때때로 교반시키면서 실온에 방치하였다. 그 후, 반응을 약500㎕의 물을 가하여 종결시켰다. 이어서, 반응 혼합물을 에틸 에테르를 가하여 총 부피가 약 4 ml로 될 때까지 희석시킨 후, 원심분리시켰다. 상층 유기상을 제거하고 로토베이퍼 상에서 희석시켰다. 생성물 (6)을 단 실리카 컬럼을 통해 디클로로메탄:메탄올:이소프로필아민의 혼합물(전형적으로 95:5:0.1)을 사용하여 (또는 이와 달리 실리카 상에서 예비 TLC를 사용함으로써) 크로마토그래피시켜 부분적으로 정제한 후, HPLC (실리카와 디클로로메탄:메탄올:이소프로필아민을 사용하는 정상, 또는 C-18과 0.1% TFA와 아세토니트릴 또는 메탄올을 사용하는 역상)에 의해 정제하였다.

적합하다면, 또는 필요할 경우, 키랄 분해를 실시예 21에 기재된 바와 같은방법을 사용하여 수행할 수 있다.

[제제 및 투여]

본 명세서에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 분자들은 (a) 세포외 Ca^{2+} 를 포함하여 1 이상의 세포의 이온의 효과와 유사하게 작용하거나 길항작용을 하고; (b)개개인에서 세포외 유리 Ca^{2+} 농도에 영향을 미치며; (c) 상피소체기능항진중, 골다공증 및 고혈혈 등의 질병을 치료하는 데 사용할 수 있다. 일반적으로, 현재 무기 이온 수용체와 관련된 질병 또는 상태들이 계속 연구되고 있으며, 이들 질병은 진단 및(또는) 유리하게 치료될 수 있다. 이들 분자들은 일반적으로 상피소체세포에 대해 활성을 갖는 한면, 골 파골세포, 신장 사구체 세포, 근위 뇨 세관 세포, 원위 뇨 세관 세포, 헨레계제(Hen1e's loop) 및(또는) 집합관의 후(厚) 상행각 세포, 표피의 표피세포, 감상선 방려포세포(C-세포), 태반 트로포블라스트, 혈소판, 혈관 평활근 세포, 심실 세포, 가스트린 및 글루카곤 분비 세포, 신장 맥관막 세포 및 유세포 등을 포함하여 다른 세포에 대해서도 Ca^{2+} 수용체를 조절할 수 있다.

이들 분자들은 전형적으로 인간 환자들을 치료하는 데 사용될 수 있는 한편, 예를 들면 다른 영장류 등의 다른 온혈 동물종, 백조, 가축 및 가금 등의 사육 동물, 및 스포츠용 동물 및 말, 개 및 고양이 등의 애완 동물에 있어서의 유사하거나 동일한 질병을 치료하는 데 사용할 수 있다.

치료 및(또는) 진단 용도에 있어서, 본 발명의 분자들은 전신 투여, 국소 또는 국부 투여를 포함한 각종 투여 형태로 제형화할 수 있다. 그 기술 및 제제는 일반적으로 문헌[레밍톤의 파마슈티칼 사이언스(Remington's Pharnnceutical Sciences), 펜실바니아주 이스톤 수재 맥 퍼블리싱 코(Mack Publishing Co.)]에서 발견할 수 있다.

전신 투여용으로, 경구 투여가 바람직하다. 이와 달리, 주사, 예를 들면 근육내, 정맥내, 복막내 및 피하 주사를 사용할 수 있다. 주사용으로, 본 발명의 분자들을 액상 용액, 예를 들면 행크(Hank) 용액 또는 링거(Ringer) 용액 등의 생리학적으로 허용되는 완충액으로 제형화할 수 있다. 또한, 이들 분자를 고상 형태로 제형화시키고, 사용 직전에 재용해 또는 현탁시킬 수 있다. 동결 건조시킨 형태도 포함된다.

전신 투여는 경피 또는 경점막 수단에 의해 이루어질 수도 있으며, 이들 분자는 경구 투여할 수 있다. 경점막 또는 경피 투여용으로, 배리어에 침투되기 적절한 침투제가 본 발명의 제제에 사용된다. 이러한 침투제는 일반적으로 당업계에 공지되어 있으며, 경점막 투여용으로 담즙산염 및 푸시드산 유도체를 들 수 있다. 또한, 침투를 용이하게 하기 위해 계면활성제를 사용할 수 있다. 경점막 투여는 좌약을 사용하여 비내 분무함으로써 이루어질 수 있다. 경구 투여용으로, 이들 분자를 캡슐제, 정제 및 강장제 등의 종래의 경구 투여영으로 제제화할 수 있다.

국소 투여용으로 본 발명의 분자들을 당업계에 일반적인 연고제, 겔제 또는 크림제로 제형화할 수 있다.

하기 실시예에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 각종 화합물의 투여량은 표준방법에 의해 결정할 수 있다. 일반적인 양은 약 1 내지 50 mg/치료하는 동물의 체중 kg이다.

[재조합 수용체]

천연 생성물 선별은 전통적으로 다양한 치료 분자의 개발에 대한 기본 골격을 제공하였다. 그러나, 천연 생성물 라이브러리 또는 다른 분자 라이브러리의 Ca^{2+} 수용체에 대한 활성의 고처리량 선별이 이전에는 가능하지 않았다. 이러한 처리 능력을 달성하기 위해서는 Ca^{2+} 수용체 cDNA를 클로닝한 다음 고처리량 선별에 적합한 트랜스펙션된 세포를 생성시키는 것이 최선책이다. 수용체 구조는 추가로 리간드 결합 부위(들)의 분자 형태를 관찰하는데 사용할 수 있으며, 상기한 정보는 상기한 바와 같이 합리적인 약물 설계 프로그램을 증가시켰다. 선택된 천연 생성물 분자의 제한된 구조-활성 연구 및 시험은 합리적인 천연 생성물 선별 및 약물 설계를 이끌어 내는데 필요한 초기의 구조적 근거 자료를 제공할 것이다.

유전자 수퍼패밀리의 발견은 모든 무기 이온 수용체와 관련된 동일한 잇점을 제공가능하게 한다. 하기 논의는 통상 칼슘 수용체의 클로닝 방법에 대한 것이지만, 당업자들에게는 다음 방법을 일반적으로 모든 무기 이온 수용체의 클로닝에 적용시킬 수 있다는 것이 이해될 것이다.

이와 같은 재조합 수용체들은 먼저 칼슘 유사물 및 칼슘 길항물을 포함한 유사물 및 길항물을, 예컨대 수용체를 이용한 결합 분석에 의하여 선별할 수 있게한다. 이것은 치료적으로 유용한 화합물들을 동정하기 위하여 인체 수용체를 사용하여 선별화하는데 특히 유용하다.

소 및 인체의 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체 cDNA는 크세노푸스(Xenpopus) 난모세포에서의 기능적, 발현에 의해 클로닝될 수 있다. 내인성 Ca^{2+} 에 의해 활성화되는 Cl^- 채널을 통해 유동을 측정함으로써 크세노푸스 난모세포 내에서의 세포내 Ca^{2+} 의 증가를 간접적으로 모니터할 수 있다. 이러한 시그날 형질도입 경로에 의해 제공되는 반응의 증폭에 의해 매우 낮은 양에서도 mRNA에 의해 코딩되는 수용체 단백질이 검출될 수 있다. 이것은 고친화성 리간드, 특정 항혈청, 또는 단백질 또는 핵산 서열 정보에 대한 요구없이 수용체 특이성 cDNA 클론의 검출을 가능하게 한다. 이러한 방법의 한 예는 다음과 같다.

성숙한 크세노푸스 래비스(Xenopus laevis)암컷을 크세노푸스 I 미합중국

미시간주 소재의 앤 아버(Ann Arbor)사로부터 얻어 표준 방법에 따라 사육하였다. 체온저하시켜 마취시킨 두꺼비로부터 난소엽을 잘라내었다. 난모세포 덩어리를 개질시킨 바르트(Barth)의 생리적 식염수(MBS) 내에 넣었다. 콜라게나제(시그마(Sigma)사 제품, 1A 유형) 2 mg/ml를 함유하는 MBS 중에서 21℃에서 2시간 동안 인큐베이션시켜 각각의 난모세포들을 얻고, 주사하기 위해 V-Vl 단계의 난모세포를 선별하였다.

유리 모세관(직경 1 mm)을 잡아당겨 끝을 날카롭게 하고, 손으로 부러뜨려선단부의 직경이 약 15μM이 되도록 하였다. mRNA(디에틸피로카보네이트(DEPE)처리수 중의 1 mg/ml) 소적을 파라필름 상에 떨어뜨리고, 홉인시켜 모세관 내로 빨아드렸다. 이어서 모세관을 피코스프릿쩌(picospritzer) [더블유피아이 인스트 루먼츠 (WPI Instpuments)사 제품]에 연결시키고 공기-펄스시킨 소적의 부피를 mRNA 50 ng을 운반하도록(전형적으로는 50 nl) 조절하였다. 바닥에 고정된 나일론 스톡킹 팻치를 갖는 35 mm 배양 접시를 사용하여 식물성 폴(pole) 내에 mRNA를 주사하는 동안 난모세포를 보존하였다. 주사된 난모 세포를 MBS, 페니실린 100ug/ml 및 스트렙트마이신 100 U/ml를 함유하는 35 mm 배양 접시 내에 넣고 18℃에서 3일 동안 인큐베이션시켰다.

인큐베이션에 이어, 난모 세포를 100μl 플라스틱 챔버에 넣고 급속 펌프를 사용하여 유속 0.5 ml/분의 MBS로 과융해시켰다. 관을 상이한 완충액 내로 급속하게 이동시킴으로써 시험 분자 또는 무기 폴리양이온을 첨가하였다. 저항을 1-3Mohm으로 하고, 3 M KCl을 충전시킨 얇은 벽 모관으로부터 기록 및 유동 통과 전극을 만들었다. 난모세포를 현미경으로 관찰하였을 때 2개의 전극을 모두 갖도록 (동물성 폴 내에) 찔러 넣고, 정지 포텐셜을 셋팅하고(-70 내지 -80 nW), 정지 포텐셜을 유지하기 의해 통과시킨 유동을 측정하는데 사용되는 액손 인스트루먼츠액소클램프(Axon lnstruments Axoclamp) 2A 전압-클램프 증폭기에 연결시켰다. 유동을 직접적으로 스트림 챠트 기록계 상에 기록하였다.

mRNA 제조를 위해 상피소체를 수술로 제거한 2차 HPT를 갖는 송아지 또는 환자로부터 조직을 얻었다. 정제시킨 세포를 제조할 필요는 없고, 선 전체를 사용하여 크세노푸스 난모세포 내에서 Ca^{2+} 수용체의 발현을 이끄는 mRNA를 제조하였다. 전 세포 RNA를 균질화시킨 선을 산 구아니디늄 티오시아네이트/페놀 추출시켜 제조하였다. 올리고-dT 셀룰로오스 크로마토그래피를 사용하여 표준 방법에 의해 폴리(A)+ mRNA를 선별하였다. mRNA의 크기 분별화를 의해 글리세롤 구배를 통한 원심분리법을 사용하였다. 20 mM 수산화 메틸수은을 사용하여 mRNA를 변성시키고, 벡크만(Becknnn) TLS55 관 내에서 제조된 15-30 % 글리세롤 직선 구배 상에 부하시켰다(1 mg/ml의 농도로 50 내지 100 ug), 34,000 rpm에서 16시간 동안 원심분리시킨 후, 구배 분획물 0.3 ml를 수거하여 5 mM 베타-머캅토에탄올을 함유하는 동일 부피의 물 중에서 희석시켰다. 이어서 2회의 에탄을 침전을 행하여 mRNA를 회수하였다. 경우에 따라 일정 RNA 크기 범위의 마커와 함께 1.2 % 아가로스/6.0 M 우레아 예비 겔 상에서 mRNA(폴리(A)+ 50-10O ug)를 분리시킬 수 있다. 브롬화 에티듐 염색에 의해 mRNA를 가시화시킨 후, -1.5-2.0 kb 크기 단계의 RNA를 함유하는 겔 슬라이스를 잘라냈다. 아가로스 겔 슬라이스로부터 RNAid 결합 매트릭스[생산자의 표준 프로토콜에 따라; 스트라타진 인크(Stratagene, lnc.)]를 사용하여 mRNA를 회수하고, 회수한 mRNA 분획물을 DEPC-처리수 내로 용출시켰다.

회수한 mRNA의 양을 UV 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. 각 시료 소량(0.5 ug)을 사용하여 포름알데히드/아가로스 겔 전기 영동시킴으로써 각 분획물내에 포함된 mRNA의 크기 범위를 결정하였다. mRNA의 완전성을 각 시료의 시험관내 번역에 의해 평가하였다. 망적혈구 용해질(상업적으로 구입가능한 킷트; BRL)을 사용하여 각 mRNA 분획물 0.05-0.05ug을 번역하였다. 생성된 ^{35} S-표지시킨 단백질을 SDS-PAGE로 분석하였다. 무상 mRNA는 개개의 mRNA 분획물의 크기와 대략 일치하는 완전한 크기 범위의 단백질의 합성을 이끌 수 있었다.

거블러(Gubler) 및 호프만(Hoffnnn)의 기술을 변형시켜 벡터 λ ZAPII 내에 cDNA 라이브러리를 구축하였다. 난모세포 분석에서 최상의 반응을 제공한 분획물로부터 얻은 RNA를 출발 물질로서 사용하였다. 제1 스트랜드 cDNA 합성은 올리고 -dT/Not I 프라이머-링커로 프라임시켰다. 제2 스트랜드 합성은 RNase H/DNA 폴리머라제 I 자기 프라이밍법으로 행하였다. 2중 스트랜드의 cDNA를 T4 DNA 폴리머라제로 블런팅시키고, EcoRI 어댑터 블런트 말단을 T4 리가제를 사용하여 cDNA에 연결시켰다. NotI 절단하여 링커를 절단한 후, 전체 길이의 cDNA를 세피크릴(Sephacryl) 50O HA 상에서 배제 크로마토그래피시켜 크기 선별화하였다. 제1 스트랜드 cDNA를 α-^{32}P-dATP로 방사성 표지시키고, 모든 합성 및 회수 단계를 방사능의 혼입에 따라 모니터하였다. 크기 선별 컬럼으로부터 회수한 전체 길이의 cDNA를 EcoRI/No+IP 절단시킨 λ ZAPII 아암에 연결시켰다. 리게이션 믹스를 상업적으로 구입가능한 고효율 팩키징 엑기스[스트라타진 인크(Stratagene,lnc.)]로 시험 팩키징하고, 적절한 숙주 균주(XL1-blue) 상에 플레이트시켰다. 라이브러리를 IPTG 및 X-ga1 상에 플레이트시켰을 때의 청색 플라크에 대한 백색 플라크의 비율에 의해 재조합 파지의 %를 결정하였다.

10개의 무작위로 선별한 클론으로부터 삽입물의 평균 크기를 측정하였다. 파지 DNA " 미니-프렙스" (mini-preps)를 EcoRI 및 NotI로 절단시켜 삽입물을 유리시키고 아가로스 겔 전기영동법으로 크기를 결정하였다. 라이브러리는 90 % 이상의 재조합 파지로 구성되었고, 삽입물 크기 범위는 1.5 내지 4.2kb이었다. 재조합 리게이션을 대규모로 팩키징하여 800,000개의 1차 클론을 생성시켰다. 팩키징믹스를 적정시키고, 15 cm 플레이트 당 50,000개의 플라크로 플레이트시켰다. 50,000 클론의 각 푸올을 SM 완충액 중에서 용출시키고, 개별적으로 저장하였다.

각각의 클론 푸올의 플레이트 용해질 저장물을 소규모의 파지 DNA 제조에 사용하였다. 파지 입자들을 폴리에틸렌글리콜 침전에 의해 농축시키고, 파지 DNA를프로테이나제 K 절단에 이어 페놀: 클로로포름 추출시켜 정제하였다. DNA 20μg을 NotI로 절단시켜 감지-스트랜드(sense-strand) RNA의 시험관내 전사에 대한 주형으로서 사용하였다. 시험관내 전사는 표준 프로토콜에 따르며, 전체 반응 부피 50μ1에서 T7 RNA 폴리머라제 및 5' 캡 아나로그 m^{7}GpppG를 사용하였다. Dnase I/프로테이나제 K 절단 및 페놀/클로로포름 추출 후, 에탄올 침전시켜 RNA를 농축시키고, 난모세포 주사용으로 사용하였다.

각각 50,000 독립성 클론을 구성하는 16개의 라이브러리 서브푸올 각각으로 부터의 합성 mRAN(cDNA)를 난모세포에 주사시켰다. 3 내지 4일 동안 인큐베이션시킨 후, 난모세포를 1OmM 네오마이신이 Ca^{2+} 의존성 C1- 유동을 이끌어낼 수 있는 능력에 대해 평가하였다. " 푸올 6" 으로 표시한 푸올은 양의 시그날을 제공하였으므로, 이는 기능성 칼슘 수용체를 코딩하는 cDNA 클론을 함유한다. 푸올(b)의 복합성을 감소시켜 이 푸올 내에 함유되어 있는 칼슘 수용체 클론을 정제하는 방향으로 진행시키기 위해, 푸올(b) 파지를 플레이트 당 μ20,000 플라크로 재플레이트시키고, 12개의 플레이트를 수거하였다. 이들 각각의 서브푸올로부터 DNA를 제조하고 cRNA를 합성하였다. 다시, cRNA를 난모세포에 주사하고 3 내지 4일후에 1O mM 네오마이신이 Ca^{2+} 의존성 C1- 유동을 이끌어내는 능력을 평가하였다 ·

서브푸올 6-3은 양성이었고, 이 푸올을 푸올의 복합성을 푸올 당 5,000 클론 부근으로 감소시키는 추가의 플레이팅을 행하였다. 푸올을 다시 cDNA의 제조 및 난모세포 내로의 주사에 의해 평가하였다. 서브푸올 6-3.4는 양성이었다. 푸올6-3.4 중의 양성 클론의 추가의 정제를 진척시키기 의해, 이 푸올로부터 얻은 파지 DNA를 헬퍼(helper) 파지 ExAssist(스트레이타젠사(Stratagene) 제품)로 과감염시켜 플라즈미드 DNA로 얻었다. 얻은 플라즈미드를 박테리아 균주 DH5alphaF'내에 트랜스펙션시켜 암피실린 플레이트 상에 형질전환된 박테리아 클로니를 생성시켰다.이들을 각각 900 클론의 푸올내에 수거하였다. 이어서 각 서브푸올로부터 플라즈미드 DNA를 제조하고, cRNA를 합성하고, 통상의 방법으로 평가하였다.

서브푸올 6-3,4.4는 양성이었다. 플라즈미드 서브푸올 6-3,4.4를 함유하는 박테리아를 계속해서 각 μ50 클론의 서브푸올내에 플레이트시켰다. 이러한 공정을 계속함으로써 기능성 칼슘 수용체를 코딩하는 단일 클론의 생산을 기대할 수 있다.

난모세포에서 칼슘 수용체의 발현을 검출하기 위하여 다른 분석법, 예컨대 난모세포에 $^{45}Ca^{a++}$ 를 충전시킨 후 칼슘 유사물로 처리하는 방법을 이용할 수도 있다. 세포내 저장물로부더 $^{45}Ca^{++}$ 의 동원은 $^{45}Ca^{++}$ 유출을 실제로 증가시키며, 이것은 쉽게 측정된다. 형광 Ca^{++} 지시약을 난모세포에 주입할 수도 있다. 이 경우에, 칼슘 수용체를 발현시키는 난모세포는 칼슘 유사물로 활성화시켰을 때 형광성의 증가를 나타낼 것이다. 이러한 분석법은 상기 실시예에 기술된 칼슘 유도 C1- 유동에 대한 전기생리학적 분석법 대신에 칼슘 수용체를 클로닝시키는데 사용될 수 있다. 또한, 이 클로닝 과정에 사용된 칼슘 유사성 리간드는 상기한 바와 같이 네오마이신일 필요는 없으며, 대신에 예를 들면 Gd^{+++} , Ca^{++} , Mg^{++} 또는 기타 칼슘 유사 화합물일 수 있다.

초기 실험은 소 상피소체 세포로부터 얻은 폴리(A)+ 풍부한 mRNA(50 ng) 또는 물을 주사한 크세노푸스 난모세포를 사용하였다. 3일 후, 세포의 2 및 3가 양이온 농도의 증가에 반응하여 세포내 Ca^{2+} 를 증가시키는 난모세포의 능력을 관찰하였다. 난모세포에 기록 및 유동 통과 전극을 찔러넣고, 내인성 Ca^{2+} -활성화 C1- 채널을 통해 유동을 측정함으로써 $[Ca^{2+}]i$를 간접적으로 평가하였다. 소(또는 인체, 제26도 참조)의 상피소체 세포로부터 얻은 폴리(A)+ 풍부한 mRNA를 주사한 난모세포에서, 세포외 Ca^{2+} 농도가 0.7mM로부터 3,5 또는 10mM로 증가하면 C1- 전도도는 급격하게 및 일시적으로 증가한 다음 보다 높은 기저 전도도 근처에서 진동하게 된다. 세포의 Mg^{2+} 농도의 1mM로부터 1OmM로의 증가는 마찬가지로 C1- 전도의 진동성 증가를 일으킨다. 세포외 Mg^{2+} 에 대한 C1- 전도도 반응은 세포외 Ca^{2+} 농도가 1μM 이하로 감소되었을 때에도 지속된다(제25도 참조).

비침투성 3가 양이온 Gd^{3+} (600μM) 또한 C1- 전도도의 진동성 증가를 야기시킨다(제25도 참조). 진동하고, 세포외 Ca^{2+} 의 명목상의 부재시에도 지속되는 상기한 C1- 전도도의 증가는 난모 세포가 다른 Ca^{2+} 이동화 수용체를 발현시키게 되었을 때 나타나고, 적절한 리간드(예를 들면, 물질 K, 제25도 참조)에 의해 자극된다. 이러한 경우에, C1- 전도도의 증가는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 의미한다.

이러한 초기의 연구들은 마찬가지로, 세포의 폴리양이온이 상피소체 세포 mRNA 주사된 난모세포에서의 세포내 Ca^{2+} 를 이동시킨다는 것을 보여준다.

물을 주사한 난모세포는 세포외 Ca^{2+} (10mM) 또는 Mg^{2+} (20 또는 30 mM)에 노출되었을 때 C1- 유동에 어떠한 변화도 나타내지 않았다. 한 일련의 실험에서, 난모세포에 물질 K 수용체를 코딩하는 mRNA를 주사하였다. 이들 난모세포에서 세포외 Mg^{2+} (20mM)는 어떠한 유동도 이끌어내지 못했지만 셰포는 물질 K의 첨가에 대해 격렬하게 반응하였다(제25도 참조). 이들 실험은 세포외 Ca^{2+} 또는 Mg^{2+} 에 대한 난모세포의 내인성 감응성이 없다는 것을 나타낸다.

인체 상피소체(2차 HPT인 경우로부터 얻은 과형성 조직)로부터 제조한 폴리(A)+ 풍부한 mRNA를 주사한 난모세포를 사용하여 유사한 실험을 행하였다.

이들 난모세포에서는, 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가는 진동하는 Cl- 전도도의 가역적 증가를 일으켰다(제26도 참조). 300μM La^{3+} 의 첨가는 마찬가지로 Cl- 전도도의 진동성 증가를 야기시켰다. 세포의 Mg^{2+} 의 농도가 1mM로부터 10mM로 증가한 것은 Cl- 전도도의 증가를 이끌어 내었고, 이는 세포외 Ca^{2+} 부재시에도 지속되었다. 추가의 실험은 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응이 농도 의존성인 것을 보여주었다. 따라서, 3개의 mRNA 주사한 난모세포에서 Cl- 전도도는 3mM 세포외 Ca^{2+} 에서는 111±22 nA 및 10mM 세포외 Ca^{2+} 에서는 233±101 nA의 최대치로 증가하였다.

크세노푸스 난모세포에서 얻은 결과는 정상적으로 비반응성인 세포에 세포외 Ca^{2+} 에 대한 감응성을 부여할 수 있는 단백질을 코딩하는 mRNA(s)가 상피소체 세포 내에 존재함을 증명하였다. 게다가, 세포외 Ca^{2+} 부재하에 Cl- 유동의 진동성 증가를 일으키는 세포외 Mg^{2+} 의 능력은 Cl- 유동이 세포외 Ca^{2+} 의 유입보다는 세포내 Ca^{2+} +의 이동에 의존한다는 것을 증명한다. La^{3+} 를 사용하였을 때 얻은 결과는 마찬가지로 발현된 단백질(들)이 세포내 Ca^{2+} 의 이동과 관련된다는 것을 보여준다. 이와 함께, 이들 데이타는 발현된 단백질이 채널이라기 보다는 세포 표면 수용체로서 작용함을 보여준다. 이들 연구는 상피소체 세포의 표면 상에 Ca^{2+} 수용체 단백질이 존재함에 대한 거역할 수 없는 증거를 제공하고, Ca^{2+} 수용체 cDNA의 분자 클로닝를 달성하는데 크세노푸스 난모세포계를 사용하는 것에 대한 가능성을 논증하였다.

다른 일련의 실험에서는, 상피소체 세포 mRNA를 글리세롤 분배를 통한 원심분리법으로 크기 분별화시켰다. 10개의 분획물을 수거하였다. 각 군의 물질을 크세노푸스 난모세포 내에 주사하고, 3일 동안 인큐베이션시킨 후 난모세포를 Ca^{2+} 수용체의 발현에 대해 평가하였다. 분획물 4-6을 주사한 난모세포들은 세포외 Ca^{2+} 에 반응하여 최대의 및 가장 일정한 Cl- 전도도의 증가를 나타냈다(제35도 참조). 이들 결과는 Ca^{2+} 수용체가 2.5 내지 3.5kb 크기 범위의 mRNA에 의해 코딩된다는 것을 나타낸다. 이것은 전사 벡터 cDNA 라이브러리로부터 합성한 RNA의 직접적 발현을 사용하는 전략이 가능함을 나타낸다. 이러한 종류의 크기 분별화실험을 행하여 3개의 상이한 분별화 실험 각각에서 유사한 결과를 얻었다.

앞의 실험에서 얻어 특성화한 mRNA 분획물은 난모세포내로 주사함으로써 평가분석할 수 있다. 각 mRNA 분획물에 대해, 10-20 난모세포에 물 중의 1 ng/nl 농도의 RNA 50 ng을 주사하였다. 주사한 난모세포를 48-72시간 동안 18℃로 유지시킨 후, Cl- 유동 측정법을 사용하여 Ca^{2+} 수용체의 발현에 대해 평가하였다.

주사한 난모세포 각 군에 대해, 수용체의 발현에 양성인 수 및 측정한 Ca^{2+} 의존성 Cl- 유동의 세기를 측정하였다. 음성의 대조용으로서, 난모세포를 쥐 간의폴리(A)+ 풍부한 mRNA, 호모 RNA 또는 물로 주사하였다.

2.5 내지 3.5 kb 크기 범위의 mRNA가 수용체를 코딩할 것으로 예상하였다.보다 큰 크기의 mRNA는 난모세포 주사 전에 상피소체 mRNA의 하이브리드 소모에 기초한 클로닝 방법을 필요로 한다. 이 방법은 성공하기 위해 전체 길이의 cDNA 클론의 생성에 의존하지 않는다. mRNA의 단일의 크기 분획물로는 수용체 발현이 얻어지지 않았을 경우, 난모세포에 혼합된 크기 분획물들을 주사하여 기능성 수용체를 야기시키는 조합물을 결정하였다. 기능성 수용체의 형성에 다수의 서브유니트가 필요할 것으로 생각되는 경우, 하이브리드 소모 발현 클로닝 방법을 사용한다. 이 방법에서는, 전체 mRNA 집단으로부터 특이성 mRNA 종을 소모하는 능력에 기초하여 클론을 선별한다. 단일의 서브유니트를 코딩하는 클론을 활성 다수 서브 유니트 복합체의 형성을 막는 능력에 의해 동정하였다. 소모성 선별에 의해, 필요한 서브 유니트 모두를 코딩하는 클론을 동정할 수 있다.

이 방법은 기능성 수용체 복합체를 형성하는데 필요한 개개의 서브유니트를 코딩하는 클론의 단리를 가능하게 한다. 원 mRNA 분획물을 분석하는데 사용한 바와 동일한 기술을 사용하여 클론의 푸올들로부터 얻은 합성 RNA를 크세노푸스 난모세포 내에서 Ca^{2+} 수용체의 발현을 유도하는 능력에 대해 평가하였다. 원래, 100,000 1차 클론을 각각 나타내는 10 푸올을 관찰한다. 양성의 반응을 나타내는 클론의 푸올을 보다 낮은(전형적으로는 4 내지 10배) 복합성으로 선별하고, 다시 양의 푸올을 추가로 나누어 선별하였다. 이러한 라이브러리 서브분별화 방법은 개개의 양성 클론이 동정될 때까지 행한다. 난모세포 발현 분석을 위한 음의 대조용으로서 항 감지 전사체를 양의 반응을 유도하는 DNA 주형의 T7 전사에 의해 생성시켰다. 항 감지 전사체는 진정한 수용체를 생성시킬 수 없고, 이는 합성 RNA의 주사로부터 발생되는 임의의 비특이적 양의 시그날을 조절하게 된다. 다른 관심은 합성 RNA가 종종 정의되지 않은 메카니즘에 의해 주사한 난모세포 내에서 " 독소" 를 번역할 수 있다는 사실이다. 이러한 가능성을 조절하기 의해, 음의 반응을 제공하는 합성 RNAs를 각종의 희석 농도로 상피소체 세포 mRNA와 함께 동시 주사하여 이들이 Ca^{2+} 수용체의 발현을 비특이적으로 방해하는지를 결정한다.

Ca^{2+} 수용체를 코딩하는 개개의 클론을 동정할 때, cDNA 삽입물을 λ 벡터로 부터 잘라내어 대규모의 합성 RNA의 생산에 사용한다. 이러한 단일의 RNA 종을 난모세포에 주사함으로써 발현된 수용체의 특성을 정확하게 평가할 수 있다.

Ca^{2+} 수용체를 코딩하는 mRNA의 크기가 너무 커서 직접적인 전사 및 발현에 의해 클로닝할 수 없을 경우, 또는 다수의 서브유니트가 관여할 경우, 클론의 푸올을 선별하는데 하이브리드 소모 기술을 사용한다. cDNA 삽입물 DNA는 크기 선별한 상피소체 세포 cDNA 라이브러리로부터 얻은 클론의 푸올로부터 제조될 수 있다. 이 DNA를 DNA/RNA 이합체(duplex)를 형성시킬 수 있는 조건 하에서 상피소체 세포 mRNA와 하이브리드 형성시킨다. 어닐링되지 않고, 하이브리드 소모된 RNA를 회수하여 난모세포, 주사에 사용한다. 다른 하이브리드 소모 또는 하이브리드 구속 방법이 사용될 수도 있으며, 이 방법은 당업자들에게 공지되어 있다. Ca^{2+} 수용체 mRNA를 나타내는 서열을 함유하는 클론의 푸올로부터 얻은 DNA가 전체 상피 소체 세포 mRNA 집단으로부터 얻은 mRNA로부터 소모되고, 난모 세포 주사시에 수용체의 발현이 감소되거나 또는 없어졌다. 감소하는 복합성을 갖는 클론의 푸올에 대해 서브분별화 방법을 행하고, 각 단계에서 전체 상피소체 세포 mRNA 집단으로부터 Ca^{2+} 수용체를 코딩하는 mRNA를 소모시키는 클로닝 DNA에 대해 평가하였다. 하이브리드 소모 분석 동안에 내부 대조물을 사용하는 것은 하이브리드 소모된 RNA가 무상이며 난모세포 내에서 번역될 수 있음을 확인시켜 준다.

인체 상피소체 세포는 아데닐레이트 시클라제에 커플링된 베타-아드레날린작동성 수용체를 발현시킨다. 이 수용체는 난모세포 내에서 발현될 수 있으며, 난모세포에서는 내인성 아데닐레이트 시클라제의 작동질 유도성 활성화가 가능하다. Ca^{2+} 수용체 클론에 대한 하이브리드 소모 선별 동안, 하이브리드 소모된 mRNA를 주사한 난모세포를 이소프로테레놀 유도성 아데닐레이트 시클라제 활성화에 대해 평가하였다. 이 분석에서의 양성 반응은 Ca^{2+} 수용체 반응의 관찰된 임의의 억제가 전체 mRNA 집단의 일반적인 억제에 기인한 것이 아닌 특이적인 것임을 나타내는데 사용된다.

하이브리드 소모 선별 방법은 원전한 단백질 코딩 영역을 함유하지 않는 클론을 단리시킬 수 있다. 이 선별 방법에 의해 단리된 양성 클론을 서열화하여 그들의 코딩 능력을 결정하였다. 인체 상피소체 RNA의 노던 블롯 분석에 의해 특이성 클론에 대응하는 완전한 mRNA의 크기를 결정할 수 있다. 양성 클론이 전체 길이의 것이 아닌 경우, 클로닝 cDNA는 상피소체 cDNA 라이브러리를 완전한 cDNAs에 대해 선별하는 하이브리드 형성 프로브로서 사용될 수 있다.

각종의 세포주는 외인적으로 발현된 수용체를 내인성 기능적 반응에 커플링시킬 수 있다. 다수의 이들 세포주(예를 들면, NIH-3T3, HeLa, NG115, CH0, HEK, 293 및 C0S7)은 내인성 Ca^{2+} 수용체가 없다는 것을 확인하기 위해 시험할 수 있다. 외부의 Ca^{2+} 에 대한 반응이 없는 세포주는 클로닝 Ca^{2+} 수용체를 발현시키는, 안정하게 트랜스펙션된 세포주를 만드는데 사용할 수 있다.

이와 같이 안정한 형질감염체는 적절한 세포주를, Ca^{2+} 수용체 cDNA에 대한 코딩 서열이 다수의 클로닝 부의로 클로닝된 pMSG와 같은 진핵 발현 벡터로 형질감염시켜 얻는다. 이들 발현 벡터는 광범위한 각종 포유동물 세포에서 cDNA의 고수준 전사를 유도하는 생쥐 유방 중양 바이러스 프로모터(MMTV) 등의 프로모터 영역을 갖고 있다. 또한, 이들 벡터는 관심의 대상이 되는 cDNA를 안정하게 발현시키는 세포를 선택하기 위한 유전자를 함유한다. pMSG 벡터 중의 선택성 마커(marker)는 크산틴-구아닌 포스포리보실 트란스퍼라제(XGPRT) 효소를 코딩하는데, 이 효소는 형질감염되지 않은 세포들을 죽이기 위하여 배양물에 첨가되는 대사 억제제에 대해 내성이 있다. 각종의 발현 벡터 및 선택 방법은 통상 고처리량 선별분석에 사용되는 세포주를 발현시키는 Ca^{2+} 수용체를 생산하기 위한 최적 조건을 결정하는 것으로 평가된다.

플라즈미드 DNA를 사용한 진핵 세포주의 트랜스펙션에 가장 효과적인 방법은 주어진 세포 유형에 따라 변화한다. Ca^{2+} 수용체 발현 구축물을 적절한 기술, 예를 들면 Ca^{2+} 포스페이트 침전법, DEAE-덱스트란 트랜스펙션, 리포펙션(lipofection) 또는 일렉트로포레이션(electroporation)에 의해 배양시킨 세포 내로 도입할 수 있다.

안정하게 첨가되어 형질감염된 DNA를 갖는 세포들은 상기한 바와 같이 선택배지에 대안 그들의 내성에 의하여 동정되며, 클로날 세포주는 이러한 내성 콜로니의 확대에 의해 생성될 것이다. 이들 세포주에 의한 Ca^{2+} 수용체 cDNA의 발현은 용액 교잡법 및 노던 블롯 분석법에 의해 평가될 것이다. 수용체 단백질의 기능성 발현은 외부적으로 가해진 Ca^{2+} 수용체 작동질에 반응하는 세포내 Ca^{2+} 의 이동을 측정함으로써 결정된다.

Ca^{2+} 수용체의 클로닝은 이러한 신규 수용체의 구조직 및 기능적 연구를 가능하게 한다. 재조합 기술로 생성된 수용체는 구조적 연구를 의해 결정화시킬 수 있다. 수용체를 발현하는 안정하게 트랜스펙션된 세포주는 천연 생성물 또는 다른 화합물 라이브러리의 고처리량 선별에 사용될 수 있다. 필요한 효능 및 특이성을 갖는 분자를 표지시킬 수 있다(방사능으로 또는 형광으로). 시험 분자/엑기스의 상기 표지시킨 분자를 대치시키는 능력은 고처리량 선별 분석의 기초를 이룬다.

난모 세포중의 무기 이온 수용체를 클로닝시키는 다른 방법은 다음과 같다:개구리 난모세포의 일반적인 단리, 디폴리클레이션(defo1licu1ation) 및 주입 과정을 기술하면 다음과 같다. 이를 요약하면, 크세노푸스 래비스(Xenopus laevis) 개구리를 0.17 % 트리카인 속에 침지시켜 마취시키고, 난소 엽을 제거하고 소편으로 세분하였다. 난소 조직을 실온에서 90분간 칼슘 무함유 완충액 속에서 인큐베이션시킨 후에 L자형 모세관을 사용하여 각 단계 V-VI의 난모세포를 단리시켰다. 이어서, 분리한 난모세포(통상 1회 실험당 200-300개)를 90분간 더 콜가게나제 용액[시그마사 제품, 타입 II;2 mg/ml]속에서 인큐베이션시킨 후, 여포층을 미세 겹자로 제거할 수 있다. 디폴리큘레이션된 난모세포를 17℃에서 개구리 링거액[ND96] 속에서 철야 인큐베이션시키고, 변성된 난모세포를 제거하였다.

(통상 총 양의 2-3 % 이하). 이어서, 생존한 난모세포에 50 nl H_2O(대조용) 또는 폴리(A)+ RNA[H_2O 50nl 중의 15-50 ng/난모세포]를 주입한 후, 17℃에서 2-4일간 인큐베이션시켰다(개구리 링거액 ND96은 mM 단위로 NaCl(96), KC1(2), $CaCl_2$(0.5), $MgCl_2$(0.5), MEPES(5), 및 피루베이트(2.5)를 함유함).

구아니디늄 티오시아네이트를 이용해 조직[신장, 파골세포 등]으로부터 전 RNA를 추출하고 CsCl 큐션 위에서 분리시켰다. 이어서, 올리고(dT) 셀룰로오스크로마토그래피[컬럼 2회 통과]에 의해 폴리(A)+RNA를 단리시켰다. 아가로스 겔 전기영동법에 의하여 폴리(A)+RNA의 일체성을 평가하였다. 세포외 Gd^{3+} 에 노출시킬 때 폴리(A)+RNA 25-50 ng의 Ca^{2+} 의존성 C1- 채널 활성 유발 능력을 평가하였다(즉, Ca^{2+} 수용체 활성에 대한 증거로서). 다음 단계는 Ca^{2+} 수용체 활성을 발현시키는 mRNA를 소형 크기 범의(1kb)로 편재시키는 것이다. 이를 위하여, 수크로오스 구배를 사용하여 폴리(A)+RNA 100㎍을 분리시키고, 이 구배로부터 40개 크기 분획을 수집하였다. 다른 방법으로, 폴리(A)+RNA 200-300㎍을 예비적 연속 유동 아가로스 겔 전기영동에 의해 분별화시키고[헤디거(Hediger, M.A.):Anal. Biochem.159:280-86,(1986) 참조], 70-90개의 분획을 수집하였다.

X.laevis 난모세포에 푸올(들)로부터 폴리(A)+RNA[0.2-0.5ng/난모세포의 분획[3-5 분획/푸올]의 푸울을 주입하고, 이들 푸울의 Ca^{2+} 수용체 활성 유발능을 평가하였다. 최대 Ca^{2+} 수용체 활성을 제공하는 푸울로부터 얻은 개개 분획들을 난모세포에 주입하여 난모세포에서 Ca^{2+} 수용체의 최대 발현을 일으키는 폴리(A)+RNA의 푸울 내의 분획들을 동정한다.

방향성 cDNA 라이브러리는 이 폴리(A)+RNA로부터 수퍼스크립트 플라즈미드시스템(SuperScript Plasmid System : pSPORT1; BRL)을 사용하여 구성한다. cDNA는 수퍼스크립트 MuMLV-RT, 역전사체(이들 중 다수는 코딩 영역에 대해 완전 길이를 가질 것이다)를, 사용하여 생성한다. cDNA는 겔 전기영동에 의해 크기를 분별하고, GENECLEAN II[Bio 101]를 사용하여 폴리(A)+RNA 크기 범위를 기초로 한 적절한 cDNA 크기 영역을 추출하였다. 이어서, 크기 선택된 cDNA를 3' 말단에서 N o t I 프라이머 및 5' 말단에서 Sal I에 대한 어댑터를 사용하여 pSPORT1 플라즈미드 벡터 속으로 방향성 있게 연결시켰다. 생성된 플라즈미드를 일렉트로포레이션에 의해 ELECTROMAX DHlOB 세포속으로 주입시켰다. 형질전환된 박테리아를 니트로셀룰로오스 필터(500-800 콜로니/밀터) 및 40℃에서 단기간 또는 -70℃에서 장기간 저장된 마스터(master) 필터 상에서 성장시켰다. 복제(replicate) 필터를 성장시키고, 이들 필터로부터 플라즈미드 DNA를 단리시키고 제한 효소로 잘라 선형화한 후, 시험관내 전사[Cap-동족체의 존재하에서의 T7 프로모터]에 의하여 센스 cRNA 합성을 위한 주형으로 사용한다. cRNA의 푸울들을 각기 난모세포속에 주입하고, 이를 C1- 유동의 Gd^{3+} 유도[1-100μM] 활성화의 발현에 대하여 평가하였다. 표준 시브(sib) 선택 과정을 사용하여 난모세포에서 Ca^{2+} 수용체 활성을 발현시키는 클론을 동정한다.

Ca^{2+} 수용체 cDNA의 제한 지도를 만들고 적합한 제한 효소 단편을 pSPORT1 속으로 서브클론시킨다. 서브클로닝된 cDNA를 표준방법[서열폴리머라제2ˆ2,USB]을 사용하여 2방향으로 서열화한다. 서브클론들 내부 또는 그 사이의 영역을 서열화하거나, 또는 서열의 밀집된 영역 또는 불분명한 영역을 분해시키는 것이 필요한 경우, 서열용 프라이머(18-mer)를 사용한다. Ca^{2+} 수용체 단백질에 대한 코딩 영역은 코작(Kozak) 공통 서열과 상동인 개시 부위를 갖는 최장 독출 프레임으로부터 결정된다. Ca^{2+} 수용체 단백질의 토폴러지(topology)를 생성하는 데에는 수치료법 및 기타 단백질 알고리듬(algorithm)이 사용된다. cDNA의 뉴클레오티드 서열, Ca $^{2+}$ 수용체 단백질의 아미노산 서열 및 단백질 토폴로지를 데이타 베이스에 있는 다른 Ca^{2+} 수용체 및 공지된 cDNA 및 단백질의 그것과 비교한다. 일치하는 영역들은 양이온 결합 또는 조절에 연루된 도메인을 나타낼 수 있다.

무기 수용체 헥산을 단리시키는 바람직안 방법은 교잡 차단을 기초로 한다.

DNA합성 및 PCR 증폭을 개시하고 공지된 방법[인니스(Innis)등의 PCR Protocols 미합중국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 Academic Press(1990)]을 사용하여 무기 이온 수용체군의 일부를 코딩하는 클로닝된 DNA를 함유 콜로니들을 동정하는 데에는 BoPCaR 1으로부터 유도된 영역 특이성 프라이머 또는 프로브를 사용할 수 있다.

무기 이온 수용체를 코딩하는 헥산으로부터 유도된 프라이머를 사용하는 경우, 당업계의 숙련자는 50-60℃에서 어닐링하는 고긴축 조건을 사용하여 약 76 %이상의 프라이머와 상동인 서열이 증폭될 것임을 인정할 것이다. 35-37℃에서 어닐링시키는 보다 저긴축 조건을 사용함으로써 약 40-50 % 이상의 프라이머와 상동인 서열이 증폭된다.

군체/플라그(plaque) 혼성화에 무기 이온 수용체로부터 유도된 DNA 프로브를 사용하는 경우, 당 업계의 숙련자는 고긴축 조건, 50-65℃에서의 혼성화, SX SSPC, 50 % 포름아미드, 50-65℃에서의 세척, 0.5X SSPC를 사용함으로써 약 90 %이상의 프로브와 상동인 영역을 갖는 서열을 얻을 수 있으며, 보다 낮은 긴축 조건, 35-37℃에서의 혼성화, 5X SSPC, 40-45 % 포름아미드, 42℃ SSPC에서의 세척을 이용함으로써 35-45 % 이상의 프로브와 상동 영역을 갖는 서열을 얻게 됨을 인정할 것이다.

무기 이온 수용체군의 일부분을 코딩하는 게놈 DNA에 대한 공급원으로서 모든 조직이 사용될 수 있다. 그러나, RNA와 관련하여 가장 바람직한 공급원은 증가된 수준의 목적하는 무기 이온 수용체군 일부분을 발현하는 조직이다. 본 발명에서는 조직 공급원의 발현을 동정하기 위해 난모세포 주입 및 그 전극 전체 난모세포 전압 클램핑을 사용하였다. 그러나, 이제 본 명세서에 기재된 서열을 사용함으로써, 노던 블롯(nothern b1ot) 또는 현장에서의 혼성화 방법에 있어서 프로브로서 무기 이온 수용체 서열을 사용하여 이와 같은 세포를 동정할 수 있으며, 따라서, 상기 수용체군의 제1부분을 복제하는데 사용되는 과정이 배제되고 증가된 수준의 무기 이온 수용체를 발현하는 조직으로부터 RNA를 얻을 필요가 없어진다.

추가로 본 발명은 무기 이온 수용체군의 일부를 발현하는 세포 또는 조직을 동정하는 방법을 제공한다. DNA 서열, 예를 들면 BoPCaR 1, 그의 단편 또는 단백질의 무기 이온 수용체군의 또다른 부분을 코딩하는 DNA 서열로 이루어진 프로브를, 프로브 또는 프라이머와 상동인 메시지를 발현하는 세포 검출용 프로브 또는 증폭 프라이머로서 사용할 수 있다. 당 업계의 숙련자는 현재 이용되고 있는 증폭 또는검출 기술을 용이하게 적용시켜 무기 이온 수용체 군의 일부분을 코딩하는 서열을 기초로 한 프로브 또는 프라이머에 사용할 수 있다.

다른 칼슘 수용체를 발현하는 적절한 세포 또는 조직의 경우, 이들 수용체는 상피소체 세포 칼슘 수용체에 대해 상기한 바와 유사한 방식으로 클로닝될 수 있다. 예를 들면, 인체 파골세포종 조직으로부터 얻은 mRNA는 파골세포 칼슘 수용체를 코딩한다(제34도). 따라서, 인체 파골세포 수용체에 대한 클론을 단리하기 위해서는, 상기한 바와 같이, 단지 파골세포종 조직으로부터 mRNA를 단리하고, cDNA 라이브러리를 제조하고 서브푸울을 분석/분별화하면 된다. 게다가, 약물 선별에 바람직한 수용체는 인체 기원의 것이다. 1개의 종으로부터 얻은 칼슘 수용체를 코딩하는 클론을 사용하여 당업계의 숙련인에게 공지되어 있는 교차 하이브리드 형성(cross-hybridization)에 의해 대응하는 인체 cDNA 클론을 얻을 수 있다. 또한, 상피소체 세포 또는 기타 세포 Ca^{2+} 수용체의 클론은 다른 세포에서 유사한 무기 이온 센스 단백질을 코딩하는 유전자의 단리 및 이들 단백질의 발현을 가능하게 한다. 이것은 각종 방법에 의해 행해질 수 있다. 하이브리드 형성 프로브로서 Ca^{2+} 수용체 cDNA를 사용하는 인체 게놈 DNA의 서던 블롯 분석은 게놈내에 코딩된 관련 서열의 수를 나타내고, 다양한 조건에서의 하이브리드 형성은 관련 서열들 사이의 분화 정도를 나타낼 수 있다. 이것은 관련 수용체 단백질을 코딩하는 유전자의 가능한 수에 대한 정보를 제공한다. 프로브로서 Ca^{2+} 수용체 cDNA를 사용한 노던 블롯 분석은 동일하거나 또는 관련된 전사체가 각종 조직 내에 존재하는지를 결정한다.

상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 상동성인 관련 전사체가 검출될 경우, 적절한 cDNA 라이브러리의 선별 또는 폴리머라제 사슬 반응(PCR)기술에 의해 이들 mRNAs의 클론을 얻는 것은 비교적 간단한 일이다.

표적 유전자 이동(TGW)은 알려진 서열의 짧은 단편에 인접한 미지의 DNA 서열을 증폭시키는 표준 폴리머라제 연쇄반응(PCR)의 변형이다[파커(Parker) 등의 Nuc1, Acids Res., 19:3055(1991)]. 알려진 2개의 프라이머 서열 사이의 DNA 서열을 증폭시키는 통상적인 PCR 기술과는 달리 TGW는 1개의 프라이머 부위에 인접한 DNA를 증폭시킬 수 있다. 따라서, TGW는 알려진 서열의 상류 또는 하류 서열을 단리시키는 통상적인 클로닝 및 라이브러리 차단 방법에 대한 대체 방법으로서 제공될 수 있다. 이 방법은 제한된 양의 서열 정보가 공지된 임의의 개시 DNA 주형으로부터 유전자를 단리시키는데 사용할 수 있다.

첫번째로 몇몇 표준 PCR반응을 1개 " 표적 프라이머" 및 상이한 " 이동" 프라이머를 사용하여 나란히 진행시킨다. 표적 프라이머는 목적하는 DNA 분자의 알려진 서열에 정확히 상보성인 서열 특이성 프라이머이며 미지의 인접 서열을 향하고 있다. 이동 프라이머는 표적 프라이머 근처의 DNA에 비상보적인 비특이성 서열이다. 이동 프라이머는 표적 프라이머 서열과 무관한 임의의 올리고뉴클레오티드일 수 있다. PCR의 첫번째 시리즈에서 생성물은 표적 프라이머가 혼성화되는 가닥에 인접하고 이 가닥과 상보성인 DNA 가닥에 이동 프라이머가 어닐링되는 경우에만 생성된다. 목적 PCR 생성물은 5 킬로베이스 크기 범위이내가 바람직하다. 증폭 생성물은 DNA 주형과 관련있는 이동 프라이머내에서 60 % 정도의 짝짓지 못한 뉴클레오티드를 가지면서 생성된다. 이동 프라이머의 최초 2개 3' 뉴클레오티드에서는 정확한 염기 짝짓기만이 요구되나, 이와 달리 부분 상동이 허용되기도 한다.

어닐링 온도는 한천 겔 전기 영동법에 의해 동정되는 PCR 생성물의 수를 결정하는 주요 변수이다.

두번째로, 내부 검출 프라이머를 사용하여 올리고머 확장 분석을 수행한다.이 프라이머는 표적 프라이머에 인접한 전기 2개 프라이머 사이의 알려진 서열을 나타낸다. 내부 검출 프라이머를^{32} p-r-ATP로 인산화(Kinased)시키고, 이어서, 주형인 제1 PCR로부터의 DNA와 단일 PCR사이클에 사용된다. 이러한 확장은 표적 프라이머에 인접한 제1 PCR의 생성물을 동정한다. 이들 신규 생성물은 한천 겔 전기영동법 및 자동 방사선 사진법에 의해 동정된다. 내부 검출 프라이머에 혼성화되지 않은 임의의 생성물은 프라이머의 임의의 부분 집합에 의해 생성된 비인접 증폭 생성물을 나타낸다.

마지막으로, 올리고머 확장 분석에서 동정된 띠(밴드)를 겔로부터 절단하고, 표적 프라이머와 최초로 띠를 생성한 이동 프라이머를 사용하여 PCR 가닥으로 재증폭시킨다. 이어서, 신규 PCR 띠를 직접 서열화시켜 미지의 서열 정보를 얻는다.

반대 방향으로 정보를 확장시키기 위해 표적 프라이머와 내부 검출 프라이머로 상보체를 형성시키고, 그의 순서를 프로토콜대로 바꾸어 놓는다.

혼성화 선별 및 클로닝 수행시 하기 사항들을 고려해야 한다. 유전자 코드에 변성이 있기 때문에 거의 모든 아미노산(트립토만 및 메티오닌은 제의)에는 하나 이상의 코돈이 존재한다. 게다가, 임의의 특정 코돈의 사용 빈도는 인체와 비교하여 비인체에서는 다르다. 코돈 변성 및 인체에 바람직한 코돈을 고려하여 올리고뉴클레오티드를 합성한다. 또한, 가능한 코돈의 다양한 순열을 갖는 올리고뉴클레오티드가 합성된다. 과도한 수를 피하기 위해 코드의 변성으로 인해 생성가능한 모든 서열을 합성할 필요는 없다. 오히려 최고 발생 빈도를 갖는 코돈의 부분 집합을 선정한다. 이렇게 얻어진 신규의 수용체 클론은 난모세포 내에서 또는 트랜스펙션된 세포주 내에서 발현시킴으로써 기능적으로 평가할 수 있다. 이어서 세포 특이성 무기 이온 수용체를 발현하는 트랜스펙션된 세포주는 예를 들면 파골세포 또는 사구체의 이온 감지 메타니즘 상에 특이적으로 작용하는 분자에 대한 고처리량 선별의 한 방법을 제공한다.

별법으로는, 칼슘 수용체는 진핵 세포 내에성, 발현에 의해 클로닝될 수 있다. 예를 들면, cDNA 라이브러리를 상피소체 RNA로부터 제조하여 진핵 발현 벡터 pCDNA1 내에 클로닝시킬 수 있다. 이 라이브러리로부터 얻은 서브푸올은 코딩된 cDNA 서열의 비교적 고순준의 일시적 발현을 야기시키는 COS7 또는 HEK293 세포와 같은 진핵 세포내로 트랜스펙션시킬 수 있다. 기능성 칼슘 수용체 클론으로 트랜스펙션시킨 세포는 칼슘 수용차를 발현시키고, 칼슘 수용체는 이어서 칼슘, 네오마이신 또는 기타 칼슘유사 화합물에 의해 활성화될 수 있다. 먼저 세포에 $[Ca^{2+}]i$에 대한 형광성 지시약을 가할 경우, 칼슘 수용체의 활성와는 형광의 증가를 일으킨다. 따라서 칼슘 수용체를 함유하는 라이브러리 서브푸올은 진핵 세포내에 트랜스펙션시에 형광의 칼슘 또는 칼슘유사물 특이적 증가를 유도하는 이들의 능력에 의해 동정된다. 이 형광은 형광계 또는 형광 활성화 세포 분류기(FACS)를 사용하여 검출할 수 있다.

또한, 본 발명의 발명자들은 G-단백질 커플링 수용체를 발현하는 COS 7 세포의 검출을 위한 "칼슘 포획 분석법"을 개발하였다. 이 분석법에서, C0S 7 세포단층은 소 상피소체 cDNA 라이브러리로부터의 cDNA 클론(예, pCDNA1에서 제조된 라이브러리로부터의 서브프랙션(subfraction) 또는 푸올(pool))으로 트랜스펙션시키고, Ca^{2+} 수용체의 작용제를 사용한 치료에 반응하여 방사성^{45} Ca^{++} 를 포획하는 능력을 분석한다. 단층을 유제 자동 방사선 사진 촬영하고^{45} Ca^{++} 를 포획한 세포를 사진 그레인 클러스터(grain cluster)에 의해 암시야현미경에서 동정한다. 이어서, 양성 신호를 생성하는 라이브러리 푸울을 이 신호를 생성하는 단일 cDNA가 동정될 때 까지 계속해서 세분한다. 칼슘 수용체는 세포내 신호에 결합한 리간드를 커플링시키는 소위 "G" 단백질을 사용하는 수용체군과 기능적으로 관련이 있는 것으로 나타났다. 이와 같은 "G-커플링" 수용체들은 수용체 활성화 "Gs" 단백질에 의한 아데닐릴 시클라제의 자극으로 인한 세포내 시클릭 AMP의 증가를 유도할 수 있거나, 또는 수용체 활성화 "Gi" 단백질에 의한 아데닐 시클라제의 억제로 인간 시클릭 AMP의 감소를 유도할 수 있다. 다른 수용체 활성확 G 단백질은 분자내 저장물로부터 Ca^{++} 의 분리를 생성하는 이노시톨 트리스포스페이트 수준의 변화를 유도한다. 후자의 메카니즘은 특히 칼슘 수용체에 적합하다. 모든 알려진 G-커플링 수용체는 구조적으로 연관이 있으며, 7개의 보호 막내의 도메인을 갖는다.

다수의 이와 같은 수용체들은 이미 클로닝된 수용체와 상동인 서열을 기초로하여 클로닝된다. 한가지 특히 유용한 접근 방법은 보호 막내외 도메인 코딩 영역에 상동인 변성 프라이머를 사용하고 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 이들 서열을 코딩하는 DNA 영역을 증폭시키는 것이다. 따라서, 이와 같은 올리고뉴클레오티드 프라이머를 특정 조직에서 단리시킨 게놈 DNA 또는 cDNA 내지 RAN와 혼합시키고 PCR을 수행한다. 이미 알려진 G-커플링 수용체와 반드시 동일할 필요는 없으나, 이는 당업계의 숙련자들에 의해 잘 이해되는 것이기 때문에 신규 G-커플링 수용체 서열을 특이적으로 증폭시키는 것이 필요할 수도 있다(부크(Buck, L.)및 액셀(Axel, R.),(1991) Cell,65:175-187 참조).

또한 칼슘 수용체는 이와 같은 PCT 접근법에 의해 클로닝될 수 있다. 칼슘수용체를 코딩하는 PCR 증폭 서열에 사용할 수 있는 변성 올리고뉴클레오티드 프라이머쌍의 2가지 예를 이하에 기재한다. 제1쌍은 각각 막내외 도메인 II 및 VII를 코딩하는 서열의 다수의 G-커플링 수용체에 의해 나타나는 교차 상동을 기초로 한다. 제2 프라이머쌍은 칼시토닌, 세크레틴, PTH 및 GLP 수용체를 함유하는 G-커플링 수용체의 보다 분화된 아군에 의해 나타나는 교차 상동을 기초로 한다. 이 쌍은 막내의 도메인 III 및 VII을 코딩하는 보호 서열과 일치한다. 이들 2개 프라이머쌍 중 하나 또는 둘 모두를 상피소체 또는 파골 세포 조직의 cDNA와 혼합시키는 경우,예를 들면 PCR 증폭으로 약 500 내지 800 염기쌍의 증폭된 DNA가 생성된다.이 DNA는 단리시킬 수 있으며, 이에 의해 칼슘 수용체 서열의 존재를 분석할 수 있다. 예를 들면, 각각의 증폭 서열은 완전 길이 cDNA 클론을 단리시키는 프로브로서 사용될 수 있으며, 이어서 이 프로브는 무기 이온 수용체가 코딩되었는지를 결정하기 의해 상기 한가지 이상의 분석 방법으로 평가할 수있다.

프라이머 제1쌍 :

```
5'   GACTACTTCCTGGTGAACCTGGC  3'

     A   T    T  T C C   C
-----------------------------------------------------------------------

5'   TCAAIGAGCCIGTAGATGATGGGGTT    3'

      T C   AGG A  A AC CA  A
                       GC
```

프라이머 제2쌍 :

```
5'   AACTACTICTGGITGCTGGTGGAGGGCCTCTA   3'

                  C        A  GG G
                  T
-----------------------------------------------------------------------

5'   GAAGCAGTAIATAATGGCAACAAAAAAGCCCTGGAA    3'

        A        G CA     G    GA
                          C     T
```

별법으로 무기 이온 수용체는 수용체에 대해 생성된 모노클론 항체를 사용하여 클로닝할 수 이다. 모노클론 항체는 특이성 단백질의 면역칭화 정제를 위한 강력한 기구를 제공한다. 일단 정제되면, 관심을 갖는 단백질로부터 제하노딘 아미노산서열 데이타를 얻을 수 있고, 이것은 완전히 cDNA 서열의 클론을 선별하기 위한 올리고뉴클레오티드 서열 프로브를 설계하는데 사용될 수 있다.

칼슘 수용체를 포함하는 예를 기재한다. 하이브리도마를 생성시키기 위해 면역원으로서 전체 소 상피소체선 세포를 사용한다. 정제 및 분산된 세포를 얻고, 간 또는 응고 세포 제제를 확립된 방법에 따라 적절한 생쥐 종에 복막내로 주사한다. 표준 프로토콜에 따라 면역 스케줄 및 하이브리도마 생성을 수행한다. 2단계 선별 과정을 사용하여 Ca^{2+} 수용체를 인식하는 모노클로날 항체를 분비하는 하이브리도마를 동정한다. 최초 선별로 상피소체 세포 표면 항체를 인식하는 모노클로날을 동정한다. 이어서, 면적조직화학적 기술을 사용하여 상피소체 세포표면에 결합된 생쥐의 항체 존재 확인을 위해 하이브리도마 상징액을 선별한다. 이 선별은 상피소체선 조직의 응고 절변 또는 1차 배양액 중에 분산된 세포에서 수행할 수 있다. 이 분석을 위한 기술은 문헌에 잘 설명되어 있다.

이러한 선별로 다양한 세포 표면 결정 인자에 대한 모노클로날 항체를 생성하는 하이브리도마는 동정되고, Ca^{2+} 수용체에 특이적인 모노클로날은 이들 중 단지 작은 부분집합을 함유하는 것으로 예상된다. Ca^{2+} 수용체에 결합된 모느클로날 항체를 동정하기 위해 최초 선별에서 양성으로 나타난 하이브리도마 상징액을 Ca^{2+} 수용체 작용제에 대한 배양 상피소체 세포의 반응 차단능에 대해 평가하였다. 수용체의 세포외부 도메인에 결합한 일부 항체는 리간드 결합을 억제 또는 활성화시키거나, 또는 수용체의 활성화를 방해하거나 수용체에 영향을 미치는 것으로 예상된다.

양쪽 선택에서 양성인 모노클로날 항체는 웨스턴 블로팅, 면역 침전 및 면역조직화학을 통해 특성이 구체화된다. 이는 인식되는 항원의 크기 및 그의 조직분포를 결정한다. 이어서, 적절한 모노클로날 항체를 표준 기술에 따른 면역 친화성 크로마토그래피에 의한 Ca^{2+} 수용체 단백질의 정제에 사용한다. 제한된 아미노산 서열 결정을 위해 충분한 양의 단백질을 얻는다. 이어서, 서열의 정보를 기초로 변성 올리고뉴클레오티드 프로브 펩티드를 도안한다. 이어서 이 프로브를 사용하여 Ca^{2+} 수용체의 완전 길이 클론을 의한 상피소체선 cDNA 라이브러리를 선별한다. 얻은 클론을 DNA 서열화, 및 난모세포 시스템 및 배양된 포유동물 세포주에서의 기능적 발현에 의해 특성화시킨다.

별법으로, 반응 단백질을 항유전자적으로 발현하는 클론을 측정하기 위해 발현 라이브러리, 예를 들면 λgt11 또는 그의 등가물에서 cDNA 라이브러리를 사용할 수 있다. 이어서, 이와 같은 클론을 Ca^{2+} 수용체일 것으로 추측되는 단백질을 코딩하고 있는지 여부를 결정하기 위하여 서열화할 수 있다.

또한 당업계의 통상의 숙련자들은 클로닝 및 분석을 위해 파지 모노클로날항체 대신에 칼슘 수용체를 사용할 수 있음을 인정할 것이다.

이들 라이브러리에서, 항체 가변 영역 또는 가변 펩티드를 숏건으로 파지 발현 벡터에 클로닝시킴으로서 항체 영역 또는 펩티드를 파지 입자의 표면 상에 디스플레이시킨다. 칼슘 수용체에 고 특이적으로 결합할 수 있는 항체 영역 또는 펩티드를 디스플레이하는 파지는 이들 수용체를 디스플레이하는 세포(예, 상피소체 세포, C-세포, 파골세포 둥)에 결합된다. 수백만개의 이와 같은 파지를, 이들 파지를 우선적으로 선택하고 이들 파지(칼슘 수용체를 결합한 파지들을 포함)가 결합될 수 있는 세포에 패닝(pan)시킬 수 있다. 이런 방법으로 라이브러리의 복잡성을 크게 줄일 수 있다. 이 방법을 반복하여 사용되는 세포 유형에 결합한 파지의 푸올이 생성된다. 결과적으로, 상기 모노클로날 항체의 선별법은 칼슘 수용체-결합 항체 또는 펩티드 영역을 디스플레이하는 파지를 단리시키는데 사용될 수 있으며, 이 파지는 구조 동정 및 클로닝을 의해 칼슘 수용체를 단리시키는데 사용할 수 있다. 이와 같은 파지-디스플레이 라이브러리를 제조하는 기구는 시판 중에 있다(예를 들면, 스트라타사이트사(Stratacyte), 또는 캠프리지 안티바디 테크놀러지 리미티드(Cambridge Antibody Technology Limited)). 이와 같은 칼슘 수용체-결합 특성을 제공하는 재조합 파지는 다양한 칼슘 수용체 분석에서 모노클로날 항체 대신에 사용할 수 있다. 또한, 이와 같은 파지는 칼슘 수용체에 기능적으로 결합할 수 있는, 칼슘 수용체의 인체 치료 작용 개선을 위한 구조 유도물로서 제공될 수 있는 유기 화합물을 동정하기 위한 고처리량 결합-경합 선별에 사용될 수 있다.

별법으로, 문헌(Pilch & Czech,1 Receptor Biochem, Methodol.(6), 1984)에 기재된 바와 같이, 방사성 리간드의 수용체에 대한 친화성 교차 결합을 사용하여 수용체 단백질을 사용할 수 있다. 방사성 리간드의 공유 결합으로 인해 비특이적 결합을 제거하는 광범위한 세척이 가능해졌다. 예를 들면, 고 친화성 분자(예, 세포내 Ca^{2+} 에 약 1OOnM이하의 EC_{50} 을 부여하는 아르기닌 및 티로신의 랜덤 공중합체(MW = 22K; 아르그티르(argtyr) 비 = 4:1)를 ^{125}I를 요오드화시키고 교차결합시킨다. 프로타민은 그 크기가 훨씬 작기 때문에 교차 결합 조사에 바람직할 수 있으며, 문헌 (Dottavio-Martin & Ravel, 87 Analyt, Biochem, 562,1987)에 기재된 바와 같이 환원적으로 알킬화될 수 있다.

비특이적 표지는 비표지 다가 양이온 및 2 및 3가 양이온 존재하에 교차 결합시킴으로써 최소로 유지시킨다. 이들 분자들이 고농도에서, 표지와 세포 표면과의 비특이적 상호 반응은 줄어들 수 있다.

본 발명은 무기 이온 수용체를 코딩하는 달리된 헥산 서열 및 단리된 수용체 그 자체를 제공한다. 또한, 본 발명은 전술한 특이 단편을 제공한다. " 단리된" 이란 (i) 예를 들면 폴리머마제 연쇄 반응(PCR)에 의해 시험관 내에서 증폭시키거나, (ii) 예를 들면 화학적 합성에 의해 합성시키거나, (iii) 클로닝에 의해 재조합적으로 생성시키거나, 또는 (iv) 분할 및 겔 분리에 의해 정제한 핵산 서열을 의미한다. " 단리된" 이란 용어가 폴리펩티드 또는 아미노산 서열의 설명에 사용되는 경우, 본 발명의 단리 핵산 서열을 사용하여 발현 시스템에서 생성된 폴리펩티드, 예를 들면 화학적 합성법에 의해 합성된 폴리펩티드, 및 천연 생물학적 물질로부터 단리시키고 계속해서 통상적인 단백질 분석 방법을 사용하여 정제시킨 폴리펩티드를 의미한다.

또한, 무기-이온 수용체의 특이 단편도 본 발명의 범위내에 포함된다. "특이 단편"이란 본 발명의 발명일 현재 공지된 서열들 중에서 대응물이 없는 수용체부분을 의미한다. 이들 폴리펩티드 단편은 본 발명의 발명 당시 공지된 단백질 데이타 베이스를 동일 펩티드에 스캐닝(scanning) 함으로써 독특한 것으로 용이하게 동정될 수 있다. 수용체 DNA의 클로닝된 부분 서열의 발현으로 수용체의 단편을 생성하는 방법이외에, 상기 단편은 완전 단백질로부터 직접 생성할 수도 있다. 단백질을 한정하는 것은 아니나 트립신, 키모트립신 또는 펩신을 포함한 단백질 분해 효소에 의해 특이적으로 분해된다. 이들 효소들 각각은 공격하는 펩티드 결합 유형에 특이적이다. 트립신은 염기성 아미노산, 일반적으로 아르기닌 또는 라이신의 펩티드 결합의 카르보닐기의 가수분해에 촉매로 작용한다. 펩신 및 키모트립신은 방향족 아미노산, 특히 트립토판, 티로신 및 페닐알라닌의 펩티드 결합의 가수분해에 촉매로 작용한다. 단백질 분해 효소에 약한 부위에서의 분할을 방지시킴으로써 분할된 폴리펩티드 단편의 별도 세트가 생성된다. 예를 들면, 라이신 ε-아미노산과 에틸트리플루오로티오아세테이트의 온화한 염기성 용액 중에서의 반응시킴으로써 인접 펩티드 결합이 트립신에 의한 가수분해에 더 이상 약하지 않는 차단된 아미노산 잔기를 얻는다(골드버거(Goldberger) 등의 Biochem., 1:401(1962) 참조). 따라서, 트립신을 사용한 상기 반응된 폴리펩티드의 처리로 아르기닐 잔기에서만 분할이 생성된다. 또한, 단백질 분해 효소 촉매 가수분해에 약한 펩티드 결합을 생성하기 위해 폴리펩티드를 변성시킬 수 있다. 예를 들면, 시스테인 잔기 β-할로에틸아민으로 알킬화시킴으로써 트립신에 의해 가수분해되는 펩티드 결합이 생성된다.(린드리(Lindley), Nature, 178:467(1956)참조). 또한, 특정 잔기에서 폴리펩티드 사슬을 분할시키는 화학 반응제를 사용할 수 있다(위트콥(Witcop), Adv, Protein Chem. 16:221(1961) 참조). 예를 들면, 브롬화 시아노겐은 메티오닌 잔기에서 폴리펩티드를 분할시킨다(Gross & Witkip, J. Am Chem SOc. 83:1510(1961)참조), 따라서, 무기 이온 수용체(예를 들면, 사람의 칼슘 수용체 또는 그의 단편)을 변성제, 단백질 분해 효소 및 (또는) 화학 반응제로 처리함으로써 각종 크기를 갖는 다수의 이산성 중첩 펩티드의 다양한 혼합물이 생성된다. 이들 펩티드 단편은 크로마토그래피법에 의한 분해로 단리 및 정제될 수 있다.

별법으로, 적절한 고상 합성 방법을 사용하여 단면을 합성시킬 수 있다(스튜워드(Steward) 및 영(Young), Solid Phase Peptide Synthesis, Freematle, 미합중국, 캘리포니아 샌프란시스코 소재(1968) 참조).

이 단편들은 분석에, 이온 결합제로서, 그리고 항체 등의 제조에 사용될 수있다. 또한, 이 단면들은 바람직한 생물학적 활성을 갖도록 선별될 수 있다. 예를 들면, 이 단편은 결합 부위에 결합하는 부의를 함유 또는 본 명세서에 기재된 작용제 또는 길항제(예, 칼슘)에 결합하는 부위를 함유할 수 있다. 이와 같은 단편은 당 업계의 숙련자들에 의해 단편에의 특이적 결합을 검출하는 통상적인 방법을 사용함으로써 용이하게 동정된다. 예를 들면, 칼슘 수용체의 경우, 시험되는 단편은 재조합 수용체를 코딩하는 유전자의 단편으로부터 재조합 DNA 방법을 사용하여 발현시킬 수 있다. 이어서, 이 단편은 칼슘이 단편에 결합했는지 여부를 결정하기 의한 적당한 관련 조건 하에서 칼슘 또는 다른 화합물과 접촉시킨다. 이들 단편은 칼슘 작용제 및 길항제, 그리고 플라즈미드 또는 기타 신체 조직으로부터 칼슘을 제거하는데 유용한 치료효과의 선별 분석에 유용하다.

다른 유용한 단편으로는 수용체의 외부 영역, 막에 걸쳐진 영역 또는 세포내 영역 만을 갖는 것을 들 수가 있다. 이러한 영역들은 그 수용체와 공지된 수용체의 아미노산 서열의 비교법, 또는 다른 표준 측정법에 의해 쉽게 확인된다. 이러한 단편들은 다른 수용체 단편들과 키메릭 수용체를 형성하기에 유용하므로 수용체 결핍 세포가 그 세포 내에서 목적하는 기능을 수행하는 세포내 영역, 및 세포가 이온의 존재에 반응을 일으키도록 하는 세포의 영역, 또는 본 명세서에 기재된 작용질 또는 길항질로 형성될 수 있다. 그러한 키메릭 수용체 유전자는 적절하게 조제될 때 수용체의 기능 장애를 비롯한 각종 질병에 대한 유용한 유전학적 치료제이며, 또는 수용체 기능의 변형은 환자에게 바람직한 효과를 제공한다. 또한, 키메릭 수용체가 제조되어 세포내 도메인이 비색 분석, 방사 분석, 광도 분석, 분광광도 분석 또는 형광 분석법에 의해 쉽게 검출될 수 있는 바람직한 효소 방법에 결합되고 그의 천연 리간드(예, 칼슘) 또는 본 발명의 작용질 및(또는) 길항질과 세포의 영역의 상호 작용에 의해 활성화되도록 한다. 그러한 키메릭 수용체를 발현하는 세포는 본 발명의 새로운 작용질 및(또는) 길항질의 발견을 위한 손쉬운 선별법에 대한 기초이다.

본 발명은 또한 본 명세서에서 설명한 바와 같이 단리된 수용체의 뮤테인 또는 유사체 및 다른 유도체를 특징으로 한다. 따라서, 본 발명은 자연 발생 단백질 뿐만 아니라 그러한 유도체까지도 포함한다. 이러한 유도체는 본 명세서에 기재된 소정의 수용체 활성을 가지며 본 명세서에 기재된 방법에 의해 일반적으로 동정된다. 이러한 단백질의 예 및 그들을 코딩하는 유전자가 제공되어 있지만, 본 발명이 이러한 예에 제한되는 것은 아니며 이러한 유전자 및 단백질에 관련될 수 있는 변이 만을 입증하는 것이다. 일반적으로 이 유전자는 천연 수용체의 아미노산 서열을 가질 것이지만 생성된 수용체 단백질의 수용체 활성에 큰 영향을 미치지 않는 1개 이상의 아미노산 위치에서 변화될 수 있다. 따라서, 예를 들면 칼슘 수용체 단백질의 비보존 영역(즉, 수용체 활성에 필요하지 않는 부분)에서, 아미노산은 제거되거나, 첨가되거나 또는 치환될 수 있다. 수용체 활성에 필요한 더 보존된 영역에서, 아미노산은 더욱 보존적으로 치환될 수 있다. 예를 들면, 서열내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 기능적 등가물로서 작용하는 유사한 극성을 가진 또 다른 아미노산에 의해 치환될 수 있다. 서열내의 아미노산에 대한 치환체는 아미노산이 속한 군의 다른 성분으로부터 선택될 수 있다. 비극성(소수성) 아미노산으로는 알라닌, 로이신, 이소로이신, 발린, 프롤린, 페닐알라닌, 트립토판 및 메티오닌을 들 수가 있다. 극성 중성 아미노산으로는 글리신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 티로신, 아스파라긴, 및 글루타민을 들 수가 있다, 양으로 하전된(염기성) 아미노산으로는 아르기닌, 리신 및 히스티딘을 들 수가 있다. 음으로 하전된 (산성) 아미노산으로는 아스파르트산 및 글루탐산을 들 수가 있다.

당업계의 숙련인이라면 실험실내 돌연변이 형성 기술 또는 제거 분석 기술을 이용하여 단백질의 보존 및 비보존 영역을 결정하는데 표준 기술을 사용할 수 있으며 이러한 모든 유도체가 하기하는 것과 등가물임을 인식할 수 있을 것이다.

또한, 번역 중 또는 후에 예를 들면 부인산 반응, 글리코실화 반응, 가교반응, 아실화 반응, 단백질 분해 반응, 항체 분자, 막 분자 또는 다른 리간드로의 결합 반응[Ferguson et al., 1988, Ann, Rev. Biochem, 57: 285-320 참조]에 의해 감별적으로 변형되는 수용체 단백질 또는 특이 단편 또는 그의 유도체도 본 발명의 영역 내에 포함된다.

또한, 본 발명의 재조합 핵산 서열은 수용체 서열의 처리 또는 발현을 변형시키기 위해 가공할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면 코딩 서열은 잘 특성화된 방법을 이용하여 프로모터 서열 및(또는) 리보좀 결합 부위와 조합됨으로써, 발현 및 생물학적 이용능의 개선을 촉진 시킬수 있다.

또한, 서열을 코딩하는 소정의 재조합체는 실험실내 또는 생체내에서 돌연변이 형성되어 코딩 영역에서의 변이를 일으키고(또는) 새로운 제한 엔도뉴클레아제 부위를 형성하거나 또는 기존의 것을 파괴하여 실험실내 변형을 더욱 용이하게 한다. 당업계에 공지된 돌연변이 형성 기술로는, 제한되는 것은 아니지만, 실험실내 부위 관련 돌연변이 형성(Hutchinson, et al., 1978, J. Biol. Chem. 253:6551 참조)을 비롯하여 TAB 링커 (Pharmacia)의 사용, PCR-관련 돌연변이 형성 등을 포함할 수 있다.

또한, 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하도록 변형될 수 있고 그 코돈은 선택된 발현 시스템에서 바람직한 코돈일 수 있다.

본 발명은 또한 무기 이온 수용체를 코딩하는 핵산의 특이 단편을 제공한다. " 특이 단편" 이란 용어는 본 발명의 발명일 현재 공지된 서열에서 동일한 것을 발견할 수 없는 핵산 부분을 의미한다.

이러한 단편은 등일한 부분을 검출하기 위해 본 발명의 발명일 현재 존재하는 핵산 데이타 베이스르 분석하여 쉽게 확인할 수 있다. 특이 서열은 클로닝 절차 및 분석에서 무엇보다도 유용하다.

본 발명은 또한 독소 잔기에 접합되거나 또는 재조합 융합 단백질로서 독소잔기와 함께 발현될 수 있는 항체 및(또는) 그의 단편을 비롯한 수용체 결합제를 제공한다. 독소 잔기는 결합제 및 대응하는 표적 세포 표면 수용체의 상호 작용을 이용하여 표적 세포에 결합하거나 또는 표적 세포에 유입될 것이다. 약제, 항체 및(또는) 단편이 포합되는 독성 잔기는 단백질, 예를들면 미국자리공(pokeweed) 항바이러스 단백질, 리신, 겔로닌, 아브린, 디프테리아 균체의 독소, 또는 슈

도모나스 균체의 독소일 수 있다. 이 독소 잔기는 코발트-60과 같은 고에너지 방출 방사성핵종일 수 있다. 이 독소 잔기의 화학적 잔기는 본 발명의 영역을 제한하는 것이 아니다. 당업계의 숙련인이라면 가능한 한 많은 종류의 잔기들이 결합제에 결합될 수 있다는 것을 인식할 것이다[" Conjugate Vaccines" ,Contributions to Microbiology and Immunology, J.M Cruse 및 Lewis, Jr(eds). Carger Press, New York, (1989) 참조]. 또한, 상기 열거한 것을 비롯한 많은 독소 잔기가 제약학상 허용되는 것이라는 것을 인식할 수 있다.

다른 잔기(예, 박테리아 독소)에 대한 결합제의 접합은 두 분자가 그들 각각의 활성을 유지하기만 하면 두 분자를 결합할 임의의 화학 반응에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 결합 반응으로는 많은 화학적 메카니즘, 예를 들면 공유 결합, 친화 결합, 치윤 반응(intercalation), 배위 결합 및 착화를 들 수가 있다. 그러나, 바람직한 결합은 공유 결합이다. 공유 결합은 존재하는 측쇄의 직접 축합 또는 외부 다리 분자의 혼입에 의해 이루어질 수 있다. 많은 이가 또는 다가 결합제는 항체과 같은 단백질 분자를 다른 분자에 커플링시키는데 유용하다. 예를 들면, 대표적인 커플링제로는 유기 화합물, 예를 들면 티오에스테르, 카르보디이미드, 숙신이미드 에스테르, 디이소시아네이트, 글루타르알데히드, 디아조벤젠 및 헥사메틸렌 디아민을 들 수가 있다. 이것은 당업계에 공지된 커플링제의 다양한 군을 배제하려는 것이 아니며, 오히려 더욱 통상적인 커플링제의 예를 나타내는 것이다[Killen 및 Lindstrom 1984, " Specific killing of lymphocytes that cause experimental Autoimmune Myasthenia Gravis by toxin-acetylcholine receptor conjugate. " Jour. Immun. 133: 1335-2549; Jansem, F.K. , H.E. Blythman, D. Carriers, P. Casella, 0, Gros P. Gros, J.C. Laurent, F. Paolucci, B. Pau, P. Poncelet, G. Richer, H. Vidal, and G. A. Voisin. 1982. " Immunotoxins: Hybrid molecules combining high specificity and potent cytotoxicity" . Immunological Reviews 62: 185-216; 및 Vitetta et al., 상기 참조]

본 발명은 재조합 DNA 기술을 이용하여 무기 이온 수용체를 발현하도록 가공된 포유동물 표적 세포를 비롯한 표적 세포를 위해 제공된다. 예를 들면, 상기 방법에 따라 클로닝된 수용체에 대한 유전자는 재조합 유전자가 고도로 발현되도록 수용체를 자연적으로 발현하는 세포에 삽입될 수 있다.

본 발명은 또한 수용체의 생리적 역할을 연구하기 위한 실험 모델 시스템을 위해 제공된다. 이러한 모델 시스템에서, 무기 이온 수용체, 단편, 또는 그의 유도체는 시스템으로 공급되거나 또는 그 시스템 내부에서 생산될 수 있다. 이러한 모델 시스템은 수용체 과잉 또는 고갈의 효과 또는 세포 기능을 연구하는데 사용될 수 있다. 이 실험 모델 시스템은 세포 또는 조직 배양에서, 전체 동물에서, 또는 전체 동물 또는 조직 배양 시스템 내의 특정 세포 또는 조직에서의 효과를 연구하는 데 일정 시간 간격에 결쳐(배태 발육 증을 포함) 사용될 수 있다. 바람직한 실시태양은 고처리량의 약제 선별 분석에 특히 유용한 것을 비롯한 클로닝된 수용체 또는 그의 일부를 포함하는 분석이다.

본 발명의 다른 실시태양에서, 재조합 유전자는 상동성 재조합에 의해 내분비 유전자를 불활성화하는데 사용됨으로써, 무기 이온 수용체 결핍 세포, 조직, 또는 동물을 발생시킨다. 제한되는 것은 아니지만, 예를 들면 재조합 유전자는 수용 세포, 조직 또는 동물의 게놈으로 삽입될 때 수용체의 전사를 불활성화시키는 삽입성 돌연변이(예, 신(neo) 유전자)를 함유하도록 가공될 수 있다. 그러한 작제는 형질 감염, 형질 도입, 주입 등과 같은 기술에 의해 배태성 간(stem) 세포와 같은 세포에 도입될 수 있다. 완전한 수용체 서열이 부족한 간 세포는 수용체가 결핍된 변종 동물을 발생시킬 수 있다.

" 변종 동물" 이란 세포에 인공적으로 삽입되는 DNA를 합유하는 세포를 가진동물을 의미하며, 여기서 DNA는 그 세포를 성장시키는 동물의 게놈의 일부가 된다.

바람직한 변종동물은 영장류, 마우스, 쥐, 소, 돼지, 말, 염소, 양, 개 및 고양이이다. 변종 DNA는 인간 무기 이온 수용체를 코딩할 수 있다. 본 발명의 다른 실시태양에서, 동물에서의 자연 발현은 수용체의 발현을 감소시키는데 효과적인 양의 안티센스 RNA 또는 DNA를 제공함으로써 감소될 수 있다.

많은 방법들이 본 발명과 관련된 변종 동물의 형성에 이용될 수 있다. DNA는 숫컷 및 암컷 전핵의 융합 전에 수정란의 전핵에 주입되거나 또는 세포 분열의 개시에 이어서 배(embryo) 세포의 핵(예, 2 세포 배의 핵)으로 주입될 수 있다.

[Brinster et al., Proc Nat Acad Sci USA, 82: 4438-4442 (1985) 참조]. 배는 본 발명의 무기 이온 수용체 뉴클레오타이드 서열을 갖도록 변형된 바이러스, 특히 레트로바이러스로 감염될 수 있다.

배의 내부 세포 덩어리에서 유도되고 배양으로 안정된 다분화능성 간세포는 배양으로 증식되어 본 발명의 뉴클레오타이드 서열을 혼입할 수 있다. 변종 동물은 양모로 이식되는 미분화 배아 세포로의 이식을 통해 수태되게 하는 그러한 세포로부터 형성될 수 있다.

변종 실험에 적합한 동물은 챨스 리버(Wilmington, MA), 타코닉(Germantown,NY), 할란 스프라그 다올리(lndiana polis,IN) 등과 같은 표준 시판 동물로부터 얻을 수 있다.

설치류 배의 증식 방법 및 접합체의 전핵으로 DNA를 미량주입법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다(Hogan et al., 상기 참조). 어류, 수륙 양서류 알 및 조류를 위한 미량주입법은 문헌[Houdebine 및 Chourrout, Experientia, 47: 897-905 (1991) 참조]에 상세히 기재되어 있다. 동물의 조직으로 DNA를 도입하기 위한 다른 기술은 미합중국 특허 제4,945,050호(Sandford et al., 1990. 7. 30)에 기재되어 있다.

변종 마우스를 제조하기 위하여, 단지 예시의 목적으로 암컷 마우스를 과배란으로 유도한다. 암컷을 숫컷과 같이 두었다가 교접한 암컷을 CO_2 질식시키거나 또는 경부 절단시켜 희생시키고 절개한 난관으로부터 배를 회수한다. 주위의 난구 세포를 제거한다. 전핵 배를 세척하고 주입할 때까지 보관한다. 무작위로 선택한 성장한 암컷 마우스를 정관 절제한 숫컷과 교접시켰다. 수용 암컷 마우스를 동시에 공여 암컷으로서 교접시킨다. 이어서 배를 외과적으로 전이시킨다. 변종 쥐를 발생시키기 위한 방법은 마우스의 방법과 유사하다[Hammer et a1., Cell., 63: 1099-1112 (1990) 참조].

배태성 간(ES) 세포를 배양하고 이어서 일렉트로포레이션, 인산 칼슘/DNA 침전 및 직접 주입술과 같은 방법을 이용하여 DNA를 ES 세포로 도입함으로써 변종동물을 형성시키는 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다 [Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Prctical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL Press (1987) 참조].

무작위적 유전자 조입을 비롯한 경우에, 본 발명의 서열(들)을 함유하는 클론은 유전자 코딩하는 내성체로 공감염된다. 또한, 유전자 코딩하는 네오마이신 내성체는 본 발명의 서열(들)에 물리적으로 결합된다. 소정의 클론의 형질감염 및 단리는 당업계에 공지된 몇가지 방법 중의 하나에 의해 수행된다(E.J. Robertson, 상기 참조).

ES 세포로 도입되는 DNA 세포는 상동성 재조합의 방법을 통해 크로모좀으로 조입될 수 있다[Capecchi, Science 244: 1288-1292 (1989) 참조]. 재조합 발생의 양성 선별(즉, 신 저항성) 및 이중 양성-음성 선별(즉, 신 저항성 및 간사이클로비르 저항성) 및 뒤이은 PCR에 의한 소정의 클론의 동정법은 문헌[Capecchi, 상기 참조 및 Joyner et al.,Nature, 338: 153-156 (1989)]에 기재되어 있으며, 그 기술은 본명세서에 참고로 기재하였다. 방법의 최종 과정은 표적 ES 세포를 미분화 배아세포에 주입하고 미분화 배아세포를 인공 수정된 암컷에 전이시켰다. 결과의 키메릭 동물을 채혈하고 서던 블롯법에 의해 태아를 분석하여 변종을 갖는 개체를 동정하였다.

비설치류 포유 동물 및 다른 동물의 형성법은 다른 문헌[Houdebine 및 Chourrout, 상기 참조; Pursel et al., et a1., Science 244; 1281-1288(1989); 및 Simms et al., Bio/Technology, 6: 179-183(1988)]에 논의되어 있다.

[용도]

1차 상피소체기능항진증(HPT) 과칼슘혈증 및 높은 수준의 순환하는 PTH에 의해 특성화된다. HPT에서의 주요한 결함 중 한가지는 세포외 Ca^{2+} 에 의한 음성의 피드백(feedback) 제어에 대한 상피소체 세포의 감응성의 감소이다. 따라서, 1차 HPT를 앓은 환자로부터 얻은 조직에서는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 " 설정점(set-point)이 오른쪽으로 이동하여 PTH 분비를 억제하기 위해서는 정상 농도보다 높은 농도의 세포외 Ca^{2+} 가 필요하다. 게다가 1차 HDT에서는, 세포외 Ca^{2+} 의 농도가 높더라도 종종 PTH분비를 단지 부분적으로만 억제시킨다. 2차(요독증) HPT에서의 세포외 Ca^{2+} 에 대한 설정점의 유사한 증가는 Ca^{2+} 가PTH 분비를 억제하는 정도가 정상일 때에도 관찰된다. PTH 분비의 변화는 $[Ca^{2+}]i$에서의 변화와 평행하다. 즉, 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유도된 $[Ca^{2+}]i$의 증가에 대한 설정점은 오른쪽으로 이동하고 이러한 증가의 크기는 감소된다. 게다가, Ca^{2+} 수용체를 인지하는 모노클론 항체를 이용한 조직의 스테이닝은 선종증 및 과형성 상피소체 세포 내에서 감소되었다.

Ca^{2+} 수용체는 약리학적 조정을 위한 개별적 분자 실체를 구성한다. 세포외 Ca^{2+} 과 유사 활성을 갖거나 또는 길항하는 분자는 1차 및 2차 HPT의 장기간의 치료에 유리하다. 상기 분자는 과칼슘혈중 상태만으로는 달성될 수 없는 PTH 분비를 억제하는데 필요한 증가된 기동력을 제공한다. 세포외 Ca^{2+} 보다 큰 효능을 갖는 상기 분자는 선종종 조직에서 특히 곤란한 PTH 분비의 두드러진 비억제성 성분을 극복할 수 있다. 다르게 또는 추가로, 상기 분차는 지속된 과칼슘혈증이 소 및 인체의 선종증 상피소체 조직내의 preproPTH mRNA의 수준을 억제시키는 것으로 나타난 바와 같이 PTH의 합성을 억제할 수 있다. 지속된 과칼슘혈증은 또한 시험관 내에서의 상피소체 세포 증식을 억제하여 칼슘 유사물은 또한 2차 HPT의 특성인 상피소체 세포 과형성을 제한하는데 효과적일 수 있다.

신체내의 다른 세포는 세포외 Ca^{2+} 농도의 생리적 변화에 직접적으로 반응할수 있다. 갑상선(C-세포) 내의 방려포 세포로부터의 칼시토닌 분비는 세포외 Ca^{2+} 농도의 변화에 의해 조절된다. 신장 내의 사구체로부터의 레닌 분비는 PTH 분비와 마찬가지로 증가된 세포외 Ca^{2+} 농도에 의해 억제된다. 세포외 Ca^{2+} 는 이 Ca^{2+} 는들 세포 내에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동을 일으킨다. 다른 신장 세포는 칼슘에 대해 다음과 같이 반응한다. 증가된 Ca^{2+} 는 근위 뇨세관 세포에 의해 $1,25(OH)_2$ 비타민 D의 형성을 억제하고, 원위 뇨세관 세포에서의 칼슘 결합 단백질의 생성을 자극하며, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 관 재흡착 및 헨레(Henle) 루프(MTAL)의 수질의 두꺼운 상행 수족에 대한 바소프레신 작용을 억제하고, 중추성 수집 관 세포에서의 바소프레신 작용을 감소시키고, 신사구체의 혈관에서의 혈관 평활근 세포에 영향을 미친다. 칼슘은 소장 고블렛 세포, 포유 동물 세포 및 피부 세포의 분화를 촉진시킨다. 이것은 또한 심방으로부터의 심방성 나트륨 이뇨펩티드 분비를 억제하고, 혈소판에서의 cAMP 축적을 감소시키고, 가스트린 및 글루카곤 분비를 변화시키고, 혈관 평활근 세포에 대해 작용하여 혈관 활성 인자의 세포 분비를 변화시킨다. 단리된 파골세포는 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가에 반응하여 부분적으로는 세포내 Ca^{2+} 의 이동에 의해 야기되는 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 일으킨다. 파골세포 내에서의 $[Ca^{2+}]i$의 증가는 상피소체세포에서의 PTH 분비와 유사한 기능적 반응(뼈 재흡수)의 억제와 관계있다. 골격 형성 파골세포로부터의 알칼리 인산염의 방출은 칼슘에 의해 직접 자극된다. 따라서, Ca^{2+} 는 그의 세포내 시그날로서의 보편적 역할 외에 특정의 특별화된 세포의 반응을 조절하는 세포외 시그날로서도 작용한다는 것을 충분히 보여준다. 본 발명의 분자들은 이들 세포에서의 방해된 Ca^{2+} 반응과 관련된 질병의 치료에 사용될 수 있다.

상피소체 세포 및 기타 세포 상에서의 Ca^{2+} 수용체의 클로닝은 다른 세포에서의 상동성 단백질의 존재가 직접적으로 평가될 수 있도록 한다. 따라서, 구조적으로 상동성인 Ca^{2+} 수용체 단백질 계가 얻어질 수 있다. 상기 수용체에 의해 이들 세포가 어떻게 세포외 Ca^{2+} 를 검출하는 지에 대한 이해가 가능하고, HPT, 골다공중 및 고혈압의 치료에 효과적인 상기한 치료제에 대한 작용 부위로서의 메카니즘(들)을 평가할 수 있고, 다른 뼈 및 무기질 관련 질환에 대한 신규의 치료가 가능하다.

다른 용도는 상기한 바와 같다. 예를 들면, 재조합 Ca^{2+} 수용체 단백질은 치료에 사용할 수 있으며, 표준 방법, 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 핵산의 트랜스펙션에 의해 도입될 수 있다. 또한, 상기 단백질은 본 발명의 칼슘유사 분자의 분석에 유용하다.

하기 실시예는 본 발명을 설명하나, 본 발명의 영역을 제한하지는 않는다.

배태성 간(ES) 세포를 배양하고 이어서 일렉트로포레이션, 인산 칼슘/DNA 침전 및 직접 주입술과 같은 방법을 이용하여 DNA를 ES 세포로 도입함으로써 변종동물을 형성시키는 방법은 당업계의 숙련인에게 공지되어 있다 [Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells, A Prctical Approach, E.J. Robertson, ed., IRL Press (1987) 참조].

무작위적 유전자 조입을 비롯한 경우에, 본 발명의 서열(들)을 함유하는 클론은 유전자 코딩하는 내성체로 공감염된다. 또한 유전자 코딩하는 네오마이신 내성체는 본 발명의 서열(들)에 물리적으로 결합된다. 소정의 클론의 형질감염 및 단리는 당업계에 공지된 몇가지 방법 중의 하나에 의해 수행된다(E.J. Robertson, 상기 참조).

ES 세포로 도입되는 DNA 세포는 상동성 재조합의 방법을 통해 크로모좀으로 조입될 수 있다[Capecchi, Science, 244: 1288-1292 (1989) 참조]. 재조합 발생의 양성 선별(즉, 신 저항성) 및 이중 양성-음성 선별(즉, 신 저항성 및 간사이클로비르 저항성) 및 뒤 이은 PCR에 의한 소정의 클론의 동정법은 문헌[[Capecchi, 상기 참조 및 Joyner et al., Nature, 338: 153-156 (1989)]에 기재되어 있으며, 그 기술은 본 명세서에서 참고로 기재하였다. 방법의 최종 과정은 표적 ES 세포를 미분화 배아세포에 주입하고 미분화 배아세포를 인공 수정된 암컷에 전이시켰다. 결과의 키메릭 동물을 채혈하고 서던 블롯법에 의해 태아를 분석하여 변종을 갖는 개체를 동정하였다.

비설치류 포유 동물 및 다른 동물의 형성법은 다른 문헌[Houdebine 및 Chourrout, 상기 참조; Pursel et al., Science 244; 1281-1288 (1989); 및 Simms et al., Bio/Technoly, 6: 179-183 (1988)]에 논의되어 있다.

[용도]

1차 상피소체기능항진증(HPT)은 과칼슘혈증 및 높은 수준의 순환하는 PTH에의해 특성화된다. HPT에서의 주요한 결함 중 한가지는 세포외 Ca^{2+} 에 의한 음성의 피드백(feedback) 제어에 대한 상피소체 세포의 감응성의 감소이다. 따라서, 1차 HPT를 앓은 환자로부터 얻은 조직에서는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 " 설정점(set-point)이 오른쪽으로 이동하여 PTH 분비를 억제하기 의해서는 정상 농도보다 높은 농도의 세포외 Ca^{2+} 가 필요하다. 게다가, 1차 HDT에서는, 세포외 Ca^{2+} 의 농도가 높더라도 종종 PTH 분비를 단지 부분적으로만 억제시킨다. 2차(요독증) HPT에서는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 설정점의 유사한 증가는 Ca^{2+} 가 PTH 분비를 억제하는 정도가 정상일 때에도 관찰된다. PTH 분비의 변화는 $[Ca^{2+}]i$에서의 변화와 평행하다. 즉, 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유도된 $[Ca^{2+}]i$의 증가에 대한 설정점은 오른쪽으로 이동하고 이러한 증가의 크기는 감소된다. 게다가, Ca^{2+} 수용체를 인지하는 모노클론 항체를 이용한 조직의 스테이닝은 선종증 및 과형성 상피소체 세포 내에서 감소되었다.

Ca^{2+} 수용체는 약리학적 조정을 의한 개별적 분자 실체를 구성한다. 세포외 Ca^{2+} 과 유사 활성을 갖거나 또는 길항하는 분자는 1차 및 2차 PHT의 장기간의 치료에 유리하다. 상기 분자는 과칼슘혈증 상태만으로는 달성될 수 없는 PTH 분비를 억제하는데 필요한 증가된 기동력을 제공한다. 세포외 Ca^{2+} 보다 큰 효능을 갖는 상기 분자는 선종증 조직에서 특히 곤란한 PTH 분비의 두드러진 비억제성 성분을 극복할 수 있다. 다르게 또는 추가로, 상기 분자는 지속된 과칼슘혈증이 소 및 인체의 선종증 상피소체 조직내의 preproPTH mRNA의 수준을 억제시키는 것으로 나타난 바와 같이 PTH의 합성을 억제할 수 있다. 지속된 과칼슘 혈증은 또한 시험관 내에서의 상피소체 세포 증식을 억제하여 칼슘유사물은 또한 2차 HPT의 특성인 상피소체 세포 과형성을 제한하는데 효과적일 수 있다.

신체내의 다른 세포는 세포외 Ca^{2+} 농도의 생리적 변화에 직접적으로 반응할수 있다. 갑상선(C-세포)내의 방려포 세포로부터의 칼시토닌 분비는 세포외 Ca^{2+} 농도의 변화에 의해 조절된다. 신장 내의 사구체로부터의 레닌 분비는 PTH 분비와 마찬가지로 증가된 세포외 Ca^{2+} 농도에 의해 억제된다. 세포외 Ca^{2+} 는 이 Ca^{2+} 는들 세포 내에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동을 일으킨다. 다른 신장 세포는 칼슘에 대해 다음과 같이 반응한다. 증가된 Ca^{2+} 는 근의 뇨세관 세포에 의해 $1,25(OH)_2$ 비타민 D의 형성을 억제하고, 원위 뇨세관 세포에서의 칼슘 결합 단백질의 생성을 자극하며, Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 의 관 재흡착 및 헨레(Henle) 루프(MTAL)의 수질의 두꺼운 상행 수족에 대한 바소프레신 작용을 억제하고, 중추성 수집 관 세포에서의 바소프레신 작용을 감소시키고, 신사구체의 혈관에서의 혈관 평활근 세포에 영향을 미친다. 칼슘은 소장 고블렛 세포, 포유 동물 세포 및 피부 세포의 분화를 촉진시킨다. 이것은 또한 심방으로부터의 심방성 나트륨 이뇨펩티드 분비를 억제하고, 혈소판에서의 cAMP 축적을 감소시키고, 가스트린 및 글루카곤 분비를 변화시키고, 혈관 평활근 세포에 대해 작용하여 혈관 활성 인자의 세포 분비를 변화시킨다. 단리된 파골세포는 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가에 반응하여 부분적으로는 세포내 Ca^{2+} 의 이동에 의해 야기되는 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 일으킨다. 파골세포 내에서의$[Ca^{2+}]i$의 증가는 상피소체 세포에서의 PTH 분비와 유사한 기능적 반응(뼈 재흡수)의 억제와 관계있다. 골격 형성 파골세포로부터의 알칼리 인산염의 방출은 칼슘에 의해 직접 자극된다. 따라서, Ca^{2+} 는 그의 세포내 시그날로서의 보편적 역할 외에 특정의 특별화된 세포의 반응을 조절하는 세포외 시그날로서도 작용한다는 것을 충분히 보여준다. 본 발명의 분자들은 이들 세포에서의 방해된 Ca^{2+} 반응과 관련된 질병의 치료에 사용될 수 있다.

상피소체 세포 및 기타 세포 상에서의 Ca^{2+} 수용체의 클로닝은 다른 세포에서의 상동성 단백질의 존재가 직접적으로 평가될 수 있도록 한다. 따라서, 구조적으로 상동성인 Ca^{2+} 수용체 단백질 계가 얻어질 수 있다. 상기 수용체에 의해 이들 세포가 어떻게 세포외 Ca^{2+} 를 검출하는 지에 대한 이해가 가능하고, HPT, 골다공중 및 고혈압의 치료에 효과적인 상기한 치료제에 대한 작용 부위로서의 메카니즘(들)을 평가할 수 있고, 다른 뼈 및 무기질 관련 질환에 대한 신규의 치료가 가능하다.

다른 용도는 상기한 바와 같다. 예를 들면, 재조합 Ca^{2+} 수용체 단백질은 치료에 사용할 수 있으며, 표준 방법, 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 핵산의 트랜스펙션에 의해 도입될 수 있다. 또한, 상기 단백질은 본 발명의 칼슘유사 분자의 분석에 유용하다.

하기 실시예는 본 발명을 설명하나, 본 발명의 영역을 제한하지는 않는다.

[실시예]

본 명세서에 기재한 연구에서, 여러가지 유기 분자가 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시키고 PTH 분비를 억제시키는 것으로 발견되었다. 이 분자들은 구조적으로 상이하지만, 대부분 생리적 pH에서 순 양전하를 가진다. 유기 분자들의 양이온 특성은 중요한 역할을 하지만, 활성을 결정하는 유일한 인자는 아니다.

[실시예 1 : 소 상피소체 세포에서의 칼슘 유사 분자 선별]

분리된 소 상피소체 세포를 페르콜의 구배하에 정제해서 무혈청 배지에서 철야 배양하였다. 이어서, 이 세포들에 fura-2를 가하고, 유리 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 형광 정량법으로 측정하였다. $[Ca^{2+}]i$ 변화를 이용하여 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성인 분자들을 선별하였다. 어떤 분자가 칼슘 유사 물질이라고 불리기 위해서는, 세포외 Ca^{2+} 증가에 의해 유발되어 Ca^{2+} 수용체의 활성화에 의해 개시되는 정상적인 효과를 나타내는 것이 요구되었다. 즉, 1) 그 분자는 세포외 Ca^{2+} 부재하에 지속되는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켜야 하고 (또는) 분자는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 입증된 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 촉진시킬 수 있다(세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 입증함); 2) 그 분자는 백일해 독소에 의해 차단되는, 이소프로테레놀에 의해 자극되는 시클릭 AMP 형성을 감소시켜야 하며; 3) 그 분자는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키는 농도와 동일범위의 농도에서 PTH 분비를 억제하여야 하고; 4) 그 분자에 의한 Ca^{2+} 증가 및 PTH 분비의 농도-반응 곡선이 포르볼 미리스테이트 아세테이트 (PMA)와 같은 PKC 활성 인자에 의해 오른쪽으로 이동해야 한다.

구조적으로 상이한 몇몇 부류의 분자들을 시험하였다: 폴리아민, 아미노글리코시드 항생물질, 프로타민, 및 리신 또는 아르기닌의 중합체, 이 분자들의 구조는 제1도에 나타내었다. 제1도에는 분자들의 순 양전하, 및 이 분자들이 소 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으키는 EC_{50} 을 기재하였다.

일반적으로, 분자 상의 순 양전하가 클수록 분자가 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를일으킬 수 있는 능력이 더 커진다. 그러나, 이러한 명백한 규칙에 대한 몇가지 놀랄만한 예외가 후술하는 바와 같이 발견되었다.

도면으로부터 알 수 있는 바와 같이, 스페르민, 네오마이신 B, 및 프로타민은 fura-2를 가한 소 상피소체 세포에서 신속하고 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다(제6도, 7도 및 11도). 그러나, 이들은 인체 상피소체 세포에서는 지속적이며 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰지만(제19도), 소 상피소체 세포에서는 이러한 증가를 일으키지 않았다(제6도, 11도). 이러한 점에서, 이들은 세포의 Mg^{2+} 에 의해 일어나는 세포질 Ca^{2+} 의 반응과 유사하였으며, 이는 소 세포에서 세포외 Ca^{2+} 의 유입을 수반하지 않는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으킨다(제11b도). 스페르민, 네오마이신 B, 또는 프로타민에 의해 일어나는 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가는 저농도 (1 M)의 La^{3+} 또는 Gd^{3+} 에 의해서는 차단되지 않았다(제11f도, 11g도). 분자 다가 양이온에 의해 일어나는 순간적인 세포질 Ca^{2+} 증가는 세포외 Ca^{2+} 부재하에서 지속되었지만, 이노마이신에 의한 예비 처리에 의해 세포외 Ca^{2+} 저장이 고갈되었을 때 차단되었다(제7도, 11h도, 11i도). 따라서, 이 분자들은 모두 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으켰다.

또한, 분자 다가 양이온은 세포외 Ca^{2+} 에 의해 사용된 것과 동일한 푸올(pool)의 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시켰다. 따라서, 세포외 Ca^{2+} 농도의 증가는 스페르민에 의해 일어나는 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 점진적으로 억제하였다(제6도).

이와는 반대로, 최대 유효 농도의 스페르민 또는 네오마이신 B(제12도)는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 순간적이며 정상 상태가 아닌 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 차단하였다.

중요한 것은, 스페르민, 네오마이신 B, 및 프로타민은 세포외 Ca^{2+} 와 동일한정도로 PTH 분비를 억제하였다. 이러한 분비 억제 효과는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으키는 농도에서 얻어졌다(제8도, 13도). 이러한 발견은 세포외 Ca^{2+} 에 의한 PTH 분비 조절에 이바지하는 메카니즘을 이해하는 것과 관련있다. 다양한 무기 다가 양이온은 모두 분비를 억제하지만 세포외 Ca^{2+} 만이 지속적이며 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키기 때문에, 이러한 $[Ca^{2+}]i$ 증가는 분비 조절에 중요하게 관련될 수는 없다. 세포외 Ca^{2+} 의 유입보다는 오히려 세포내 Ca^{2+} 의 이동화가 PTH 분비 억제와 관련된 중요한 메카니즘이다. 이것은, 세포내 Ca^{2+} 의 이동화는 어떤 분자가 PTH 분비에 영향을 줄 수 있는 경우 영향을 받을 수 있는 충분한 메카니즘을 한정하기 때문에 중요하며; 세포외 Ca^{2+} 의 유입을 선택적으로 자극하는 분자는 PTH 분비 억제에 있어서는 비교적 비효과적일 것이다. 이와는 반대로, 세포내 Ca^{2+} 의 이동화만을 일으키는 분자는 PTH 분비 억제에 있어서 세포외 Ca^{2+} 와 마찬가지로 효과적일 것이다.

세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화와 마찬가지로, 분자 다가 양이온에 의해 일어나는 이동화는 PMA에 의해 억제되었다. 제14도에는 스페르민에 의해 일어나는 순간적인 세포질 Ca^{2+} 증가에 미치는 PMA의 선택적인 억제 효과를 보여주는 대표적인 실험을 도시하였다. ATP에 의해 일어나는 순간적인 세포질 Ca^{2+} 증가는 최대 농도 이하의 ATP가 사용되는 경우조차도 영향을 받지 않았다. 분자 다가 양이온에 의해 일어나는 순간적인 세포질 Ca2+ 증가에 미치는 PMA의 효과는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응에 미치는 PMA의 효과와 동등하였으며, 두 경우 모두에 있어서 농도-반응 곡선에서 오른쪽으로 이동하였다(제15도). $[Ca^{2+}]i$에 대한 PMA의 억제 효과는 고농도의 유기 다가 양이온에서 극복되는 분비에 대한 강력한 효과를 수반하였다(제16도).

분자 다가 양이온에 의해 일어나는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화는 이노시톨 포스페이트 생성의 증가와 관련이 있었다. 예를 들면, 프로타민은 IP_1 수준의 증가를 수반하는 IP_3 생성의 신속한(30초 이내) 증가를 일으켰다. 이 효과들은 모두 세포의 프로타민 농도에 의존하였다(제17도). 게다가, PMA를 이용한 예비 처리는 분자 다가 양이온에 의해 일어나는 이노시톨 포스페이트의 생성율 둔화시켰다. 스페르민을 이용하여 얻은 대표적인 결과를 제18도에 나타내었다.

스페르민, 네오마이신 B, 및 프로타민은 이소프로테레놀에 의해 유발되는시클릭 AMP 증가를 억제하였다. 시클릭 AMP 생성에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 억제 효과와 마찬가지로, 분자 다가 양이온에 의해 일어나는 억제 효과는 백일해 독소를 이용한 예비 처리에 의해 차단되었다(표 2).

[표 2]

	시클릭 AMP (조절 %)	
	대조군	+PTx
0.5 mM Ca^{2+}	100	106 ± 8
2.0 mM Ca^{2+}	19 ± 4	94 ± 2
0.5 mM Ca^{2+}, 200 μM 스페르민	23 ± 5	93 ± 6
0.5 mM Ca^{2+}, 30 μM 네오마이신 B	28 ± 8	87 ± 6
0.5 mM Ca^{2+}, 2 μg/ml 프로타민	20 ± 4	89 ± 9

백일해 독소(PTx)는 시클릭 AMP 생성에 대한 세포외 Ca^{2+} 및 분자 다가 양이온의 억제 효과를 차단한다. 소 상피소체 세포를 100 ng/ml 백일해 독소의 존재 또는 부재 하에서 16시간 동안 배양하였다. 이어서, 이 세포들을 세척하고, 지시된 농도의 세포외 Ca^{2+} 또는 분자 다가 양이온의 존재 또는 부재 하에 10μM 이 소프로테레놀을 함유시켜서 15분 동안 배양하였다. 전체 시클릭 AMP(세포+상징액)를 RIA에 의해 측정하고, 그 결과를 0.5mM Ca^{2+} (112±17 pmole/10^6 세포)에서 얻은 수준에 대한 백분율로써 나타내었다. 각 값은 3회 실험의 평균±SEM이다.

인체 상피소체 세포에서, 세포외 Mg^{2+} 는 신속하고 순간적인 증가 이의에 지속적이며 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다(제1O도). 세포외 Ca^{2+} 에 대해 반응하는 소 상피소체 세포에서와 마찬가지로, 인체 상피소체 세포에서 Mg^{2+} 에 의해 일어나는 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$ 증가는 전압 불감성 채널을 통한 Ca^{2+} 유입에 기인하는 것이다(제1Oa도). 이와 같이 인체 상피소체 세포에서 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$증가에 대한 Mg^{2+} 의 효과는 선종 및 과형성 조직 모두에서 관찰되었다.

네오마이신 B 및 스페르민을 선종 조직으로 부터 얻은 인체 상피소체 세포에서의 $[Ca^{2+}]i$에 대한 효과를 평가하기 위하여 시험하였다. 네오마이신 B를 이용하여 얻은 대표적인 결과를 제19도에 나타내었다. 네오마이신 B는 인체 상피소체 세포에서 순간적일 뿐만 아니라 추가로 정상 상태의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다.

따라서, 인체 세포에서, 세포외 Ca^{2+} , Mg^{2+} 또는 네오마이신 B에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 변화의 양상은 매우 유사하였다.

네오마이신 B에 의해 일어나는 순간적인 세포질 Ca^{2+} 증가는 La^{3+} (1μM)존재하에서 및 세포외 Ca^{2+} 부재하에서 지속되었다. 따라서, 네오마이신 B는 인체 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으켰다. 네오마이신 B는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으키는 농도에서 인체 상피소체 세포로부터의 PTH 분비를 억제하였다 (제13도). 그러나, 네오마이신 B에 대한 인체 및 소 상피소체 세포의 반응에는 몇가지 차이점이 있었다. 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 위한 네오마이신 B의 EC_{50} 은 소에서는 40μM이고 인체 상피소체 세포에서는 20μM인 반면(제13도 및 15도), 스페르민의 효능은 소 및 인체 상피소체 세포에서 유사하였다(EC_{50} =150μM). 따라서, 활성을 평가하기 위해 시험 분자를 선별하는 초기 연구에서는 소세포를 사용할 수 있지만, 인체 상피소체 세포를 이용하여 후속 연구를 행하는 것이 중요하다.

C-세포에 대한 분자 다가 양이온의 효과를 평가하기 위하여, 쥐 수질 갑상선암(rMTC 6-23 세포)으로부터 얻어낸 신생 세포주를 사용하였다. 스페르민 (10mM) 및 네오마이신 B (5mM)는 모두 이들 세포에서 기초 $[Ca^{2+}]i$에 대해 효과를 나타내지 않았다. 어느 분자도 세포외 Ca^{2+} 의 후속 첨가에 대한 반응에 영향을 주지 않았다. 제21도에는 네오마이신 B의 효과가 결여되어 있음을 입증하는 대표적인 결과를 나타내었다. 네오마이신 B(1mM) 또는 스페르민 (1 또는 5mM)은 파골세포에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 전혀 일으키지 못하였다(제23도). 도시한 트레이스에서는, 세포외 Ca^{2+} 농도의 후속 증가에 대한 반응을 어느 정도 강화시키는 것처럼 보였지만, 이것은 일정하게 발견되지는 않았다. 두개의 다른 세포에서, 스페르민(5mM)은 기초 $[Ca^{2+}]i$에 대해 역시 효과를 나타내지 못하였으며, 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발되는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 조금(약 15 %) 억제시켰다. 제3세포에서, 네오마이신 B(5mM)는 기초 $[Ca^{2+}]i$에 대해 효과를 나타내지 못하였으며, 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 증가에 영향을 미치지 못하였다. 이 연구로부터 얻은 전반적인 구상은 스페르민 및 네오마이신 B가 파골세포에서 기초 또는 자극된 세포질 Ca^{2+} 수준에 대해 효과를 나타내지 못한다는 것이다.

분자 다가 양이온이 C-세포 또는 파골세포외 Ca^{2+} 감지 메카니즘에 영향을 주지 않는다는 것은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해 특이적으로 작용하거나 또는 $[Ca^{2+}]$에 대한 상피소체 세포의 정상적인 반응의 하나 이상의 기능을 조정하는 신규 리드(lead) 분자를 발견 또는 고안할 수 있음을 입증한다.

여러 가지 다른 분자들의 선별을 후술하며, 그 결과를 표 1에 요약하였다.

[실시예 2 : 폴리아민 선별]

직쇄형 폴리아민 (스페르민, 스페르미딘, TETA, TEPA 및 PEHA) 및 그의 유도체 2개(NPS 381 및 NPS 382)를 실시예 1에 기재한 바와 같이 선별하였다. 이 분자들은 모두 소 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시키는 것으로 발견되었다. 이 분자들의 효능 순서는 다음과 같으며, 순 양전하를 괄호에 나타내었다.

[표 3]

분자	EC_{50} (μM)
NPS 382 (+8)	50
NPS 381 (+10)	100
스페르민 (+4)	150
PEHA (+6)	500
스페르미딘 (+3)	2000
TEPA (+5)	2500
TEPA (+4)	8000

푸트레신 (+2) 및 카다베린 (+2)은 2mM 농도에서 불활성이었다.

또다른 직쇄형 폴리아민 DADD는 나머지 다른 폴리아민과는 다소 상이하게 행동하였으며, 실시예 7에 기재하였다.

[실시예 3 : 시클릭 폴리아민 선별]

두개의 시클릭 폴리아민, 헥사사이클렌 및 NPS 383을 실시예 1에 기재된 바와 같이 선별하였다. 헥사사이클렌(+6, EC_{50} =20μM)은 NPS 383(+8, EC_{50} =150μM)보다 7배나 더 효능이 있었다.

Ca^{2+} 수용체 활성을 위한 구조적 특징으로서 순 양전하만을 기초로 할 때는 반대 현상이 예상될 것이다.

[실시예 4 : 아미노글리코시드 항생물질 선별]

6개의 항생물질을 실시예 1에 기재된 바와 같이 선별하였다. 세포내 Ca^{2+} 의이동화를 위한 EC_{50} 의 결과를 효능 순서대로 하기 표에 나타내었다.

[표 4]

항생물질	EC_{50} (μM)
네오마이신 (+6)	10
겐타미신 (+5)	150
베카나마이신 (+5)	200
스트렙토마이신 (+3)	600

가나마이신 (+4.5) 및 린코마이신(+1)은 500μM의 농도에서 효과를 나타내지 않았다. 아미노글리코사이드류에서는 순 양전하와 효능 사이에는 상관 관계가 있었다. 그러나, 네오마이신은 동등하거나 또는 보다 더 큰 양전하를 갖는 여러 가지 폴리아민(NPS 381, NPS 382, NPS 383 PEHA)에 비해 상당히 큰 효능을 나타내었다. 이러한 유형의 아미노글리코시드 항생 물질은 신장에서의 칼슘 수용체와의 상호 작용과 관련될 수 있는 독성을 갖기 때문에, 그러한 선별은 새로운 아미노글리코시드 항생 물질의 성장에 있어서의 독성에 대한 스크린으로 사용될 수 있다.

[실시예 5 : 펩타이드 및 폴리아미노산 선별]

펩타이드 길이가 상이한 프로타민, 및 리신 또는 아르기닌의 중합체를 이들의 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시킬 수 있는 능력을 평가하기 위하여 실시예 1에 기재한 바와 같이 선별하였다. 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 위한 EC_{50} 의 결과를 효능 순서대로 하기 표 5에 나타내었다.

[표 5]

펩타이드 (분자량, kD)	EC_{50} (μM)
폴리Arg (100)	4
폴리Arg (40)	15
폴리Lys (27)	30
프로타민 (4.8)	75
폴리ArgTyr (22)	200
폴리Lys (14)	1000
폴리Lys (3.8)	3000

이들 중합체의 순 양전하는 분자량이 증가함에 따라 증가하였다. 따라서, 아미노글리코시드계의 경우와 마찬가지로, 이 폴리아미노산계에서도 순 전하와 효능 사이에 직접적인 상관 관계가 있었다. 프로타민은 본질적으로는 순 양전하 +21의 폴리Afg이다.

[실시예 6 : 아릴알킬아민 선별]

장수 말벌 및 거미의 독액으로부터 얻은 아릴알킬아민 독소군으로부터 선택된 분자들을 실시예 1에 기재된 바와 같이 선별하였다.

필란토톡신-433(+3)은 500μM의 농도에서 효과를 나타내지 않았다. 이것은 구조적인 면에서 하기 아르기 아르기오톡신과 유사하였다.

아르기오톡신-636(400μM)은 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았지만, 세포외 Ca^{2+} 후속 첨가에 대한 세포질 Ca^{2+} 반응을 강화시켰다. 이것은 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 모든 분자들이 가지는 공통적인 특징이며, 여러가지 세포외 2가 양이온에 대해서도 관찰된다. 이에 대해서는 실시예 7에 보다 더 상세히 서술한다.

아르기오톡신-636과는 대조적으로, 아르기오톡신-659는 300μM의 EC_{50} 에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다. 아르기오톡신-659는 디히드록시페닐기가 아니라 히드록실화된 인돌 부분을 갖는다는 점에서 아르기오톡신-636과는 다르다. 이것은 이 두분자의 유일한 구조적 차이점이다. 따라서, 효능의 차이는 양전하를 갖는 폴리아민 사슬에 있는 것이 아니라 방향족기의 특성에 있었다.

[실시예 7 : Ca^{2+} 채널 차단제의 선별]

Ca^{2+} 채널 차단제, 즉 전압 민감성 Ca^{2+} 채널을 통한 세포외 Ca^{2+} 의 유입을 차단하는 분자들을 실시예 1에 기재한 바와 같이 선별하였다. 구조적인 면에서 볼 때, Ca^{2+} 채널 차단제는 세종류가 있다: (1) 디히드로피리딘류,(2) 페닐알킬아민류, 및 (3)벤조티아지민류.

시험한 디히드로피리딘(니페디핀, 니트레디핀, BAY K 8644, 및 (-) 202-791 및 (+) 202-791)은 1μM로 시험할때, 기초 $[Ca^{2+}]i$ 또는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 증가에 대해 아무런 효과도 미치지 않았다. 종전의 연구는 상피소체 세포가 전압 민감성 Ca^{2+} 채널이 결여되어 있지만, Ca^{2+} 수용체에 의해 조정되는 전압 불감성 Ca^{2+} 채널을 갖는다는 것을 알려주고 있다.

시험한 페닐알킬아민은 베라파밀, D-600(베라파밀의 메톡시 유도체), TMB-8 및 TMB-8의 유사체, NPS 384이었다. 처음 세 분자는 100μM의 농도에서 시험하였다. 페닐알킬아민은 시험한 다른 분자들과는 상이하게 행동하였다. 이들은 저농도(0.5mM) 세포외 Ca^{2+} 를 함유하는 완충제 중에 놓은 세포에 첨가했을 때 $[Ca^{2+}]i$ 변화를 일으키지 않았다. 그러나, 베라파밀, D-600, 및 TMB-8은 세포외 2가 양이온이 일으키는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 가능하게 하있으며, 또한 세포외 Ca^{2+} 의 유입을 차단시켰다. 중간 수준(1-1.5mM)의 세포외 Ca^{2+} 에서, 이 분자들은 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 기인하는 $[Ca^{2+}]i$의 작지만 견실한 증가를 일으킬 수 있었다.

페닐알킬아민은 네오마이신과 같은 유기 다가 양이온과는 상이하게 작용하였다. 이 데이타는 베라파밀, D-600 및 TMB-8이, 완전 아고니스트인 시험한 다른 분자들과는 대조적으로, Ca^{2+} 수용체에서 부분 아고니스트 또는 알로스테릭 활성화제로서 작용한다는 것을 제시한다.

분자 NPS 384는 300μM의 농도에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았지만 세포외 Ca^{2+} 의 유입을 차단시켰다. 고농도로 시험하였을 때, 이 분자는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으킬 수 있음을 나타낼 수 있다.

이 분자들의 유입을 차단하는 능력은 흥미롭고 전혀 예상 밖의 것이 아니지만, 이 분자들이 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키는 능력(세포내 Ca^{2+} 이동화에 기인함)은 중요하다. 상피소체 세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 측정하는 많은 경험으로부터, 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가는 거의 변함없이 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 기인하므로 Ca^{2+} 수용체의 활성화를 반영한다는 것을 알 수 있었다.

시험된 벤조티아지핀인 딜티아젬은 모든 면에서 베라파밀 및 D-600과 유사하였으며, 또한 100μM에서도 유효하였다.

페닐알킬아민을 제외하고, 시험된 모든 활성 분자들은 최대 유효 농도의 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 것과 유사한 정도의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으킨다는 것이 언급되어야 한다. 이로부터, 이 분자들은 세포외 2가 양이온과 동등한 효능을 가진다는 것을 알 수 있다. 이는 부분 아고니스트로서만 작용하는 것으로 보이는 페닐알킬아민의 활성과는 대조적이다.

페닐알킬아민에서는 흥미를 끄는 몇가지 구조-활성 관계가 나타난다. TMB-8및 NPS 384와 같은 분자들이 효능에 있어서 차이가 있다는 것은 중요하다. 이 분자들은 동일한 순 양전하를 가지고 있음에도 불구하고, TMB-8은 100μM에서 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지만, NPS 384는 300μM에서조차도 이러한 증가를 일으키지 않았다. 따라서, 순전하와는 관련이 없는 몇가지 다른 구조적 특징이 TMB-8에 보다 더 큰 효능을 부여한다는 것을 알 수 었다.

[실시예 8 : 인체 상피소체 세포에서의 분자 선별]

외과 수술에 의해 제거한 선(腺)으로부터 얻어서 실시예 1에 기재된 바와 같이 제조한 인체 상피소체 세포에서 $[Ca^{2+}]i$에 미치는 효과를 평가하기 위하여 스페르민 및 네오마이신을 시험하였다. 인체 상피소체 세포에서, 스페르민은 300μM의 농도로 시험하였을 때 극소량의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으킨다는 것을 발견하였다.

한편, 네오마이신은 20μM의 농도로 시험하였을 때 인체 상피소체 세포에서큰 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다. 네오마이신이 일으키는 반응의 크기는 최대 유효농도의 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 크기와 동일하였다.

[실시예 9 : 크세노푸스 난모 세포에서의 분자 선별]

인체 상피소체 세포로부터 얻은 mRNA를 주사한 난모 세포는 Ca^{2+} 수용체를 발현하며, 여러 가지 세포외 무기 2가 및 3가 양이온에 대해 반응하여 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시킨다. 이러한 선별을 이용하여 Ca^{2+} 수용체에 대한 직접 작용을 평가하기 위해 시험할 수 있다. 또한, Ca^{2+} 수용체를 발현하는 난모 세포는 다음과 같이 선별했을 때 무상(無傷) 상피소체 세포에 대해 활성인 및개의 분자들에 대해 반응하였다. 헥사사이클렌은 135μM의 농도에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으켰다. 네오마이신(100μM) 및 NPS 382(5mM)도 또한 유효하였다. 이러한 결과는 이들 분자가 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용하거나 또는 이 수용체의 기능과 밀접하게 관련있는 몇가지 다른 단백질에 대해 작용한다는 것을 보여주는 다소 흥미로운 증거를 제공한다.

예를 들면, 본 발명자들은$^{45}Ca^{2+}$ 이동화를 측정함으로써 난모 세포에서 Ca^{2+} 수용체 발현을 관찰할 수 있었다. 이 실험에서는, 난모 세포에 소 상피소체 mRNA 또는 물을 주사하고, 이어서 72시간 후에 혈청 또는 10 mM 네오마이신에 노출시켰다. 자극을 주기 전에, 난모 세포에$^{45}Ca^{2+}$ 를 가하였다. 20분 동안 혈청으로 자극한 결과, 완충제로 모의 자극한 것에 비해 45 % 증가를 나타내는 세포내$^{45}Ca^{2+}$ 방출이 일어났다. 20분 동안 10mM 네오마이신으로 자극한 결과,$^{45}Ca^{2+}$ 방출이 76 % 증가하였다. 이 분석은 Ca^{2+} 수용체를 클로닝하는데 이용하기에 충분할 정도로 민감하였으며, Ca^{2+} 에 의해 활성화된 C1- 유동을 전기생리학적으로 측정하는 것보다 모든 점에서 보다 더 유리하다.

또다른 예를 들면, 소 부검 조직으로부터 인체 파골세포종 조직을 얻었다. 이 조직으로 부터 단리시킨 mRNA를 주사한 난모 세포를 30mM Ca^{2+} 로 자극하였다. 대조군은 반응을 나타내지 않는 반면, 파골세포종 mRNA를 주사한 12개의 난모 세포 중 8개는 적절히 반응을 나타내었다(제34도). 이 실험은 세포외 Ca^{2+} 에 대한 파골세포외 Ca^{2+} 반응이 사실상 유전적으로 코딩된다는 첫번째 증거를 제공한다.

또한, 이 결과는 파골세포 Ca^{2+} 수용체가 크세노푸스 난모세포에서의 발현에의해 클로닝될 수 있다는 것을 나타낸다.

[실시예 10 : 쥐 파골세포에서의 분자 선별]

세포외 Ca^{2+} 에 대한 상피소체 세포 및 쥐 파골세포의 민감성이 상이하다는 것은 그들의 Ca^{2+} 수용체가 상이하다는 것을 나타낸다. 상피소체 세포는 0.5 내지 3mM의 세포외 Ca^{2+} 농도에 대해서 반응을 나타내지만, 과골세포는 세포외 Ca^{2+} 농도가 5mM을 초과할 때만 반응을 나타낸다.

그럼에도 불구하고, 이와 같이 다소 높은 Ca^{2+} 농도는 파골세포의 경우에는 생리적 농도이며; 이들이 뼈를 흡수할 때, 세포외 Ca^{2+} 의 국부적인 농도는 30mM 정도의 높은 농도에 달할 수도 있다.

쥐 파골세포를 이용한 분자 선별은 다음과 같이 행하였다. 파골세포를 신생아 쥐의 긴 뼈로부터 얻었다, $[Ca^{2+}]i$는 형광 정량 지시제인 indo-1을 이용하여 단세포에서 측정하였다. 스페르민, 스페르미딘, 네오마이신 및 베라파밀을 시험하였으며, 이들은 (비록 반응이 조금 관찰되기는 했지만) 어느 것도 파골세포에서의 큰 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았다.

1mM 농도에서, 스페르미딘은 작은$[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다(최대 농도의 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 증가의 약 10 %에 해당함). 네오마이신(10mM) 및 스페르민(10 또는 20 mM)는 모두 쥐 파골세포에서의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았다. 네오마이신(10mM)은 25 mM 세포외 Ca^{2+} 의 후속 첨가에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 차단하지 못하였다. 그러나, 스페르민(20mM)을 이용한 예비 처리는 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응을 억제하였다. 베라파밀(100 μM)은 감지할 수 있는 정도의 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았지만, 세포외 Ca^{2+} 에 대한 반응을 차단하였다.

파골세포와 상피소체 세포를 비교함으로써, 상피소체 세포에 대해 활성인 분자들이 파골세포에 대해서는 비교적 불활성이라는 것을 알 수 있다. 이것은 다른 Ca^{2+} 감지 세포 상에 존재하는 수용체 유형에 영향을 미치지 않고 특이적인 Ca^{2+} 수용체를 표적으로 하는 약물이 쉽게 개발된다는 것을 입증한다. 마찬가지로, 두개 이상의 이러한 Ca^{2+} 수용체에 대해 활성인 약물도 개발할 수 있다.

[파골세포 칼슘 수용체에 대한 칼슘 유사물 및 칼슘 길항물 활성의 선별]

파골세포 칼슘 수용체에 대해 활성을 가진 화합물은 상기한 바와 같이 쥐 파골세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 측정함으로써 발견될 수 있다. 개선된 분석으로써 화합물 처리량의 수준을 중간 내지 높은 수준으로 올려놓았다. 이러한 새로운 방법은 고수율(동물 당 10^5) 및 고순도(세포 95 %가 파골세포임)로 얻을 수 있는 토끼 파골세포의 사용에 기초한 것이다. 토끼 파골세포 제제의 순도는 세포의 군에서 수행되는 $[Ca^{2+}]i$의 측정을 가능케 한다. 기록된 형광 신호가 평균 집락 반응이기 때문에, 세포간 가변성이 최소화되고 분석의 정확도도 크게 증가한다. 이것은 또한 더욱 많은 화합물의 활성에 대한 선별을 가능케 한다.

토끼 파골세포는 6일된 다람쥐로부터 제조하였다. 이 동물을 단두법에 의해희생시키고 긴 뼈를 제거하고 파골세포 배지(0C 배지: 5% 태아 소 혈청 및 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 알파 최소 필수 배지)에 두었다. 뼈를 날이 둥근 칼로 절단하고 50 ml 용량의 원추형 원심분리관 중의 2 ml 0C 배지에 두었다. 이 절단된 뼈를 뼈 입자들의 균질 현탁액이 얻어질 때 까지 가위로 잘게 썰었다. 이 현탁액을 0C 배지 25ml로 희석시키고 이 제제를 30초 동안 부드럽게 소용돌이 치도록 저었다(" 와동시켰다."). 이 뼈 입자들을 2분 동안 침강시켜 상징액을 제거하고 50 ml 원심분리관에 첨가하였다. 이 뼈 입자들을 상기와 같이 0C 배지에 재현탁시키고, 와동시키고 침강시키고 수확하였다. 2개의 수확물로부터 얻은 상징액을 합하고 원심분리시키고 형성된 세포 펠릿을 퍼콜(Percoll)에 재현탁시켰다. 이 현탁액을 원심분리시키고 메니스커스 바로 아래의 백색의 점성 밴드를 제거하고 0C 배지로 세척하였다. 그 퍼콜 원심분리 단계의 결과 순도가 상당히 개선되고 파골세포가 세포 군에서의 $[Ca^{2+}]i$를 측정하기에 적합한 고밀도로 플레이팅 되었다. 이 세포를 하기하는 방법 중의 하나에 따라서 $[Ca^{2+}]i$를 측정하기에 적합한 유리 커버 슬립 상에 플레이팅시켰다. 필요에 따라서. 제제의 순도는 개선될 수 있다. 이 경우에, 세포를 철야 배양한 후 Ca^{2+} - 및 Mg^{2+} - 유리 버퍼로 헹구었다. 이 세포 단일층을 0.02 % EDTA 및 0.001% 프로나제를 함유한 Ca^{2+} - 및 Mg^{2+} - 유리 버퍼중에 5분 동안 침지시켰다. 이 버퍼를 게거하고 OC 배지로 대체하고 이 세포를 1 내지 2시간 동안에 걸쳐 회수하고 하기하는 바와 같이 형광 지시계로 세포를 로딩하고 $[Ca^{2+}]i$를 측정하였다.

한 실시태양에서, 형광 현미경법을 이용하여 파골세포의 군에서 $[Ca^{2+}]i$를 측정하였다. 정제된 파골세포를 25mm 직경의 유리 커버 슬립에 부착하고 indo-1로 로딩시켰다. 이 커버 슬립을 과도융합 챔버에 고정시키고 형광 현미경 측정하였다. 저배율(x4)의 대물 렌즈로 10 내지 15개의 파골세포를 함유한 부분을 가시화하였다. 한 변형 방법에서, 부분내의 각 세포의 형광성을 동시에 기록하고 이후의 분석을 위해 분리하여 보관하였다. 각 세포의 $[Ca^{2+}]i$의 변화를 평가하고 부분 내의 모든 세포의 평균 반응을 계산하였다. 다른 변형 방법에서, 세포의 전체 부분으로부터 얻은 형광성을 기록할 수 있고 즉시 처리하였다. 두 변형 방법에서, 최종 데이타는 미세 현미경 영역내에 존재하는 세포로부터 얻은 평균 반응의 형태이다. 이런 이유로, 세포내 가변성은 최소화되며 분석의 정확도는 크게 증가된다. 이러한 방법으로써 파골세포 칼슘 수용체에 대한 활성에 대해 1주 당 10 내지 20 가지의 화합물을 선별할 수 있었다.

더욱 바람직한 실시태양에서, 이러한 기술로써 통상의 형광제를 이용하여 파골세포의 집락에서의 $[Ca^{2+}]i$를 측정할 수 있다. 정제된 파골세포는 직사각형 유리 커버 슬립에 부착할 수 있다. 한 변형 방법에서는, 표준 석영 큐벳($1cm^{2}$)을 사용하고 2 x1.35 cm 크기의 유리 커버 슬립을 사용하였다. 다른 변형 방법에서, 마이크로큐벳($0.5cm^{2}$)을 사용하고 1x0.75cm 크기의 유리 커버 슬립을 사용하였다. 두 방법에서, 세포를 fura-2 또는 $[Ca^{2+}]i$를 측정하기에 적합한 다른 형광 지시계로 로딩시켰다. 이 지시계로 로딩된 세포의 형광성을 소 상피소체 세포에 대해 상기한 바와 같이 기록하였다. 이 방법으로써 형광 현미경법 보다 고처리량을 처리할 수 있으며 파골세포 칼슘 수용체에 대한 활성에 대해 1주 당 20 내지 50 가지의 화합물을 선별할 수 있다.

가장 바람직한 실시태양에서. 이 기술은 96 웰 플레이트에서 파골세포 중의 $[Ca^{2+}]i$를 측정하는데 사용될 수 있다. 정제된 파골세포를 96 월 플레이트의 각 웰로 고밀도로 플레이팅시키고 이어서 적합한 형광 지시계로 로딩시켰다. 각 웰의 형광성을 적합한 형광 플레이트 기록기를 사용하여 기록하였다. 이 방법은 1주 당 50 내지 100 가지의 화합물을 선별할 수 있는 고처리량 선별을 가능케 하는 로봇을 이용하여 완전 자동화되도록 할 가능성을 갖고 있다.

[다른 Ca^{2+} 수용체의 예]

다음 실시예는 분자 리간드 수용체의 아형이 존재하는 것과 마찬가지로, 약물에 의해 상이하게 영향을 받을 수 있는 Ca^{2+} 수용체의 아형이 존재하는 것처럼 보이는 것을 입증한다. 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체는 약 1.5mM의 세포외 Ca^{2+} 수준을 감지하지만, 파골세포 상의 Ca^{2+} 수용체는 약 1O mM의 수준에 대해서 반응을 나타내었다(제22도). 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 네오마이신 또는 스페르민은 C-세포 또는 파골세포 상의 Ca^{2+} 수용체에 영향을 미치지 못한다(제21도 및 23도). 이 데이타는 Ca^{2+} 수용체의 약리학적으로 상이한 아형에 대한 첫번재 증거를 제공하며, 이 데이타는 Ca^{2+} 수용체의 특정 형태에 대해 선택적으로 작용하는 약물을 고안하고 개발하는데 사용된다. 사실상, 리드 분자에 대한 시험은 이러한 세포 특이성 효과를 입증한다. 예를 들면, 파골 세포에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키는 NPS 449는 상피소체 세포에서는 $[Ca^{2+}]i$에 영향을 미치지 않는다. 이와는 반대로, 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 NPS 447은 10배나 더 높은 농도에서만 파골세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는데 효과적이다. 마지막으로, 아가톡신 489는 C-세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는데 그다지 효능이 있지는 않지만(EC_{50} =15O μM), 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해서는 매우 효능있는 활성 인자이다(EC_{50} =3μM). 본 발명에 따라 개발 중인 리드 분자는 생체내에서의 Ca 감지 세포의 특정 유형의 활성에 선택적으로 영향을 미칠 것이다.

특이성이 작은 약물들이 반드시 치료적으로 바람직하지 못한 것은 아닐 것이다. 따라서, 파골세포 활성을 억제하는 것 및 칼시토닌 분비를 자극하는 것은 뼈 흡수를 억제하기 위한 상이한 두가지 방법이다. 이들 세포 모두의 Ca^{2+} 수용체를 표적으로 하는 약물은 골다공증 치료를 위해서 매우 효과적일 것이다. 또한, PTH는 뼈 대사를 조정하는 것과 관련이 있기 때문에, 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용하는 약물은 또한 골다공증의 치료 및(또는) 예방에 유용할 수 있다.

몇몇 시험 분자들에 대한 결과를 후술한다. 표 6에, 칼슘 유사 분자의 비교활성을 나타내었다. 소 상피소체 세포 및 C-세포(rMT 6-23 세포)에 fura-2를 가하고, 쥐 파골세포에 indo-1을 가하고, 지시된 분자들의 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시키는 효능을 누적 농도-반응 곡선을 그려서 결정하였다. "불활성"이라고 표시된 분자들은 1mM 농도로 시험할 때 $[Ca^{2+}]i$를 변화시키지 않았다.

[표 6]

	EC_{50} (μM)		
화합물	상피소체 세포	파골세포	세포
NPS R-568	0.60	200	> 300
NPS S-568	30	-	-
NPS R-467	2	> 100	-
NPS S-467	> 30	-	-
NPS 017	6	불활성	150
NPS 447	9	150	-
NPS 456*	15	200	> 100
NPS 015	22	-	불활성
NPS 109	40	> 300	5
NPS 449	불활성	150	-
NPS 468*	30	250	-
스페르민	150	불활성	불활성
네오마이신	40	불활성	불활성

라세미 혼합물: "불활성"이라는 용어는 1 내지 5mM의 농도에서 세포질 Ca^{2+} 증가를 일으키지 않음을 의미한다.

[실시예 11 : 상피소체 Ca^{2+} 수용체를 위한 리드 분자]

폴리아민 및 아릴알킬아민을 사용한 구조-활성 연구를 NPS 456과 구조적으로 유사한 분자들의 시험에 이용하였다. NPS 456은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체의 효능있는 활성 인자이다. 이 분자는 양전하만을 가지지만 많은 다가 염기성 분자들보다 훨씬 더 효능이 있기 때문에 주목할 만하다. PMA를 이용한 간단한(2분) 예비처리는 NPS 456의 농도-반응 곡선을 오른쪽으로 이동시켰다. 이것은 NPS 456이 세포외 Ca^{2+} 에 의해 사용되는 메카니즘과 동일한 메카니즘에 의해 작용한다는 것을 나타낸다. NPS 456은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 발현하는 크세노푸스 난모세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으키며, 이는 Ca^{2+} 수용체에 대한 직접 작용을 입증한다(제33도). 게다가, NPS 456은 키랄 탄소를 함유하며, 따라서 두개의 이성질체 형태로 존재한다. 두 이성질체를 합성해서, 활성 시험을 하였다. R-이성질체인 NPS 447은 S-이성질체인 NPS 448에 비해 12배나 더 효능이 있다(제28도). 이것은 Ca^{2+} 수용체가 입체특이적 방식으로 유기 분자들을 인식할 수 있다는 것에 관한 첫번째 증거이다.

NPS 447은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해 선택적이고 효능이 있는 효과를 가지며 구조적으로 단순한 분자이기 때문에, 이러한 리드 분자에 대한 구조-활성 연구는 간단하다. 이러한 연구의 목적은 최종적으로 개발될 후보 물질이 선택될 수 있는 여러 가지 특성을 갖는 일련의 관련 분자를 얻어내는 것이다. 이러한 노력은 활성 및 효능에 이바지하는 NPS 447의 구조 도메인 중의 일부를 이미 밝혀냈다. 예를 들면, 신규 화합물 NPS 459는 모분자보다는 작지만(분자량 < 240) 효능이 거의 유사한 NPS 447의 유사체인 반면, 몇몇 다른 유사체는 비교적 불활성이다. 이 유사 프로젝트로부터 가장 관심을 끄는 분자들을 PTH 분비 및 혈청 Ca2+수준에 대한 효과를 평가하기 위한 시험을 위해 생체내에 도입할 수 있다(실시예 15, 16, 17, 18 및 23 참조).

신규 화합물인 NPS 467은 NPS 447보다 훨씬 작은 분자이지만, 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 증가를 일으킴에 있어서 NPS 467은 NPS 447보다 약 3배나 더효능이 있다. NPS 456과 마찬가지로, NPS 467은 라세미 혼합물이다. NPS 467을 그의 에난티오머로 분해하면, 라세미 혼합물보다 훨씬 더 큰 효능을 갖는 이성질체가 제공되리라고, 예상된다(실시예 16 참조). NPS 447, NPS 467 및 NPS 568과 관련된 분자들에 대안 또다른 구조-활성 연구로부터, 이러한 라세미체 형태의 분자들보다 더 큰 효능을 갖는 순수한 이성질체가 얻어지리라고 예상된다.

NPS 456을 이용하여 얻은 결과 (제33도)로부터, NPS 456이 100μM의 농도에서 Cl- 흐름을 진동적으로 증가시킨다는 것을 알 수 있다. NPS 456은 상피소체세포 Ca^{2+} 수용체를 발현하는 크세노푸스 난모 세포에 대해 활성을 갖는 가장 효능이 있는 분자이다. 네오마이신 및 NPS 456을 이용하는 이 실험 시스템에서 얻은 결과는 이 분자들이 Ca^{2+} 수용체에 대해 직접 작용한다는 것을 입증하였다.

[실시예 12 : 파골세포 Ca^{2+} 수용체 리드 분자]

파골세포에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 작용 메카니즘을 밝히기 위해 사용된 방법은 상피소체 세포에서 유효한 것으로 입증된 것과 유사하였다. 첫번째 실험은 형광정량 지시제인 indo-1을 가한 단일 쥐 파골세포에서 $[Ca^{2+}]i$에 대한 La^{3+}의 효과를 시험하였다. 상기한 바와같이, La^{3+} 와 같은 3가 양이온은 불침투성이며, Ca^{2+} 유입을 차단하였다. 낮은 마이크로몰 농도의 La^{3+} 는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 부분적으로 억제하였다(제29도). $[Ca^{2+}]i$ 증가가 La^{3+} 내성이라는 점의 입증은 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 대한 증거를 제공한다. 이 실험의 결과는 상피소체 세포에서 얻은 결과와 동일하였으며, 두 세포 유형에서 $[Ca^{2+}]i$를 조정하기 위하여 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유사한 메카니즘이 이용된다는것을 제시한다.

또다른 일련의 실험으로부터, 세포외 Mn^{2+} 은 세포외 Ca^{2+} 의 부재하에 지속되는(제30B도) 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으킨다(제30(a)도)는 것을 알 수 있었다.

마찬가지로, 이 결과들은 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 나타낸다. Mn^{2+} 이 일부 세포내에 들어갈 수 있지만, Mn^{2+} 이 indo-1의 형광을 억제하기 때문에 파골세포에서는 침투하지 못할 것이다. 따라서, Mn^{2+} 이 세포내로 침투한다면, 형광시그날의 증가가 아니라 감소가 관찰될 것이다. 여러 가지 2가 및 3가 양이온을 이용하여 얻은 결과는 모두 전압 불감성 채널을 통한 세포외 Ca^{2+} 의 유입 및 세포내 Ca^{2+} 의 이동화와 관련있는 파골세포의 표면 상에 Ca^{2+} 수용체가 존재한다는 것과 부합하였다. 이러한 결과들은 Ca^{2+} 수용체 단백질을 코딩하는 인체 파골세포 중의 유전 물질의 증거를 제공한다(하기 사항 참조). 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 기인하는 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가는 시험관내에서 파골 세포의 뼈 흡수를 억제하기에 충분하다. 따라서, 상피소체 세포에서와 마찬가지로, Ca^{2+} 수용체의 활성화는 파골세포 활성을 억제시키는 필수적인 수단인 것처럼 보인다.

본 발명에서, NPS 449는 이 수용체에 대해 작용하는 칼슘 유사 약물을 위한리드 분자이다. 이것은 분자량이 작고(분자량< 425) 150μM의 EC50으로 쥐 파골세포에서 세포내 Ca2+를 이동화시킨다(제31A도 및 31B도). NPS 449의 효능은 비교적 낮지만, NPS 449는 오직 하나의 양전하를 갖는 간단한 구조를 가지며, 바람직스러운 약리학적 및 약물동력학적 특성을 갖는 것으로 예상된다.

시험관 내에서 뼈 흡수를 억제하는 NPS 449의 능력을 평가하기 위하여 NPS 449를 시험하였다. 이 시험은 주사 전자현미경을 사용하여 소 피질성 뼈의 얇은 슬라이스 상의 소와 형성을 형태 측정 분석에 의해 행하였다. 쥐 파골 세포를 여러 농도의 NPS 449 존재 또는 부재 하에 뼈 슬라이스에서 24시간 동안 배양하였다. NPS 449는 10μM의 IC_{50} 으로 뼈 흡수에 대한 농도 의존성 억제를 일으켰다.

예상되는 결과는 이러한 신규 부위에서 작용하는 분자들이 파골세포의 뼈 흡수를 억제할 수 있다는 것을 입증하는 첫번째 증거를 제공한다. NPS 449의 보다 더 효능이 있는 동족체는 합성 화학에 의해 얻어서, 본 명세서에 기재된 방법을 이응하여 시험되고 분석될 것이다.

[실시예 13 : C-세포 Ca^{2+} 수용체 리드 분자]

C-세포 Ca^{2+} 수용체의 활성화는 칼시토닌 분비를 자극하며, 이어서 뼈 흡수를 억제하기 위하여 파골세포에 대해 작용한다. C-세포에 대해 선택적으로 영향을 미치는 칼슘 유사 약물은 골다공증 치료에 유용하다.

세포내 Ca^{2+} 의 이동화는 Ca^{2+} 수용체 활성의 기능적인 지수로서 이용된다. C-세포에서 선별을 위한 노력은 C-세포 표현형을 발현하는 배양 세포주(예: 쥐 수질 갑상선 암 세포; rMTC 6-23 세포)를 이용함으로써 쉽게 행할 수 있다. 초기 연구로부터 세개의 아릴알킬아민 분자를 선정하였다. 두개의 분자는 천연적으로 생성되는 것이며(아가톡신 489 및 아가톡신 505), 나머지 하나(NPS 019)는 합성에 의한 아가톡신 유사체이다. 아가톡신 505는 3μM의 IC_{50} 으로 세포외 Ca^{2+} 에 의해 유발된 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 차단하는 것으로 발견되었다. 이들 세포에 존재하는 L형 전압 민감성 Ca^{2+} 채널을 차단함으로써 억제 효과가 발생하였다. 이와는 대조적으로, 아가톡신 489는 150μM의 EC_{50} 으로 rMTC 세포에서 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시킨다는 것이 발견되었다. 이것은 C-세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 것으로 발견된 최초의 유기 분자이었다. 합성에 의한 유사체인 NPS 019는 훨씬 더 효능이 있고, 5μM의 EC_{50} 으로 세포내 Ca^{2+} 를 이동화시켰다(제32도). NPS 019와 아가톡신 489의 유일한 구조적 차이점이 히드록시기의 존재 유무라는 것이 중요하다. 이와 같은 구조상의 미묘한 차이가 분자의 효능에 심하게 영향을 미친다는 사실은 Ca^{2+} 수용체 상에 구조 특이적 결합 부위가 존재한다는 것을 나타낸다. 또한, 이것은 Ca^{2+} 수용체에 대해 매우 효능이 있고 선택적인 활성 인자를 개발할 수 있다는 점을 고무시킨다.

작은 분자(분자량 < 500)인 NPS 019는 C-세포 Ca2+수 ^{용체} 의 칼슘 유사 물질을 개발하기 위한 리드 분자이며, 시험관내에서 칼시토닌 분비를 자극하는 능력을 평가하기 위하여 시험될 수 있다. 이어서, 후속 생체내 시험은 이 분자가 칼시토닌 분비를 자극하고 뼈 흡수롤 억제하는 능력을 결정할 것이다. 이러한 생체내 연구는 쥐를 이용하여 수행될 것이다. 긍정적인 것으로 예상되는 이 연구에서 얻어지는 결과들은 신규 수용체에 대해 작용하는 작은 유기 분자가 칼시토닌 분비를 자극하고 뼈 흡수를 억제할 수 있다는 것을 보여주는 첫번째 증거를 제공할 것이다.

[실시예 14 : 상피소체 세포에 대한 NPS 021의 칼슘 길항 활성]

어떤 화합물을 칼슘 길항 물질이라고 부르기 위해서는, 그 화합물은 세포외 Ca^{2+} 감지 세포에 미치는 세포외 Ca^{2+} 또는 칼슘 유사 화합물의 효과를 차단하여야 한다. 칼슘 길항 화합물의 일례는 NPS 021이며, 이 화합물의 구조를 제1도에 나타내었다. fura-2를 가한 소 상피소체 세포에서, NPS 021은 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 차단한다. 이 반응을 차단하기 위한 NPS 021의 IC_{50} 은 약 200μM이고, 약 500μM의 농도에서는 세포외 Ca^{2+} 에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$ 증가가 사라진다. 중요한 것은 NPS 021은 그 자체로는 낮은 $[Ca^{2+}]i$(0.5mM)로 시험할 때 $[Ca^{2+}]i$ 변화를 전혀 일으키지 않는다(제37도). Ga^{3+} 는 또한 클로닝된 Ca^{2+} 수용체를 발현하는 크세노 난모 세포에 대한 칼슘 길항질이며, Ga^{3+} 는 그 자체로는 칼슘 유사물인 Gd^{3+} 에 의해 활성화되는 C1- 유동에 대해 영향을 미치지 않지만, Ga^{3+} 로 예비 처리함으로써 Gd^{3+} 의 작용을 차단한다.

[실시예 15 : 혈청 이온화 칼슘을 저하시키는 NPS 467]

시험관 내에서 소 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시키는 것으로 알려진화합물을 생체내에서의 저칼슘혈중 활성을 평가하기 위하여 시험하였다. 스프래그-다우레이 쥐 수컷(200g)에 시험 물질 또는 대조군인 담체를 공급하기 전에 1주일 동안 저칼슘 식이로 유지시켰다. NPS 467을 복강내 투여한 후 3시간이 되었을 때 꼬리 동맥으로부터 혈액을 채취했다. 시바-코닝(Ciba-Corning) 634 분석기로 이 기기에 첨부된 설명서에 따라서 전혈 또는 혈청에서의 이온화 Ca^{2+} 를 측정 하였다. 당업계에 널리 공지된 기술을 이용하여 혈청의 전체 칼슘, 알부민 및 포스페이트를 측정하였다.

NPS 467은 혈청 또는 전혈에서 투여량 의존성 Ca^{2+} 감소를 일으켰다(제38도). 이때, 혈액의 Ca^{2+} 강하는 혈액 전체 칼슘 농도의 비례적인 강하에 필적하였다. 시험한 어떠한 투여량에서도 혈청 알부민 또는 포스페이트 수준을 변화시키지 않았다. 예비 연구에서, 혈액의 Ca^{2+} 을 저하시키는데 유효한 투여량의 NPS 467은 PTH의 순환 수준을 투여량 의존성 방식으로 감소시켰다(제39도). NPS 467의 저칼슘혈증 효과는 3시간 이내에 최대값에 달했으며, 24시간후 대조군 수준으로 되돌아 왔다(제40도).

NPS R-467(실시예 16 참조)은 또한 칼슘을 보강시킨 정상식으로 유지시킨 쥐에서 혈청 이온와 Ca^{2+} 를 저하시키는데 효과적이었다. NPS 467의 1의 투여(EE 이성질체,10 mg/kg 복강내)는 헐청에서의 이온와 Ca^{2+} 의 수준을 신속하게 강하시켰으며, 이는 1시간 정도에서 최대(대조군 수준으로부터 22 % 감소됨)에 달했으며 6시간 이하동안 이 수준 이하로 억제되었다.

[실시예 16 : 입체특이적 방식으로 혈청 이온화 칼슘을 저하시키는 NPS 467]

NPS 467은 라세미 혼합물이다. 키랄 칼럼을 사용하여 NPS 467을 그의 에난티오머로 분해하였다. 에난티오머들이 상피소체 세포에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키는 능력에 의해 평가되는 바와 같이 시험관 내에서 소 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 활성화시킴에 있어서, R-이성질체는 S-이성질체보다 약 100배나 더 효능이 있었다(제41도). 마찬가지로, 신규 화합물 NPS 568을 그의 에난티오머로 분해함으로써, 소 상피소체 세포에서 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으킴에 있어서 R-이성질체가 R-이성질체보다 40배나 더 효능이 있다는 것을 알 수 있었다(상기 표 6 참조).NPS 467의 이성질체들을 실시예 15에 기재된 바와 같이 혈청 Ca^{2+} 에 미치는 효과를 평가하기 위하여 시험하였다. 시험관내 실험의 결과와 마찬가지로, NPS 467의 R-이성질체는 생체내에서 혈청 Ca^{2+} 를 저하시킴에 있어서 S-이성질체보다 더 효능이 있다는 것이 입증되었다(제42도; 각 화합물은 5mg/kg 체중의 농도로 시험하였다).

[실시예 17 : 이차 상피소체기능항진증의 생체 모델에서 혈청 이온화 칼슘을 저하시키는 NPS 467]

만성 신장 장해에 기인하는 이차 상피소체기능항진증의 허용되어 널리 이용되는 동물 모델은 신장이 5/6 절제된 쥐이다. 이 수술을 받은 동물은 초기에 저칼슘혈증 증상을 보이고, 헐청 Ca^{2+} 수준을 유지시키기 위하여, 상피소체 선을 상보적으로 과형성하고 순환 PTH 수준을 증가시킨다. 스프라그-다우레이 쥐 수컷(250 g)을 5/6 신장 절제 수술시키고, 2주 동안 회복시켰다. 이때, 이들은 정상칼슘혈증 상태이었다(증가된 수준의 혈청 PTH에 기인함). NPS 467(10 mg/kg 복강내)을 투여함으로써, 이차 상피소체기능항진증을 보이는 동물 모델에서 대조군의 83%로까지 혈청 이온화 Ca^{2+} 수준을 급속히(2시간 이내) 강하시켰다. 이것은 이러한 종류의 화합물이 이차 상피소체기능항진증 및 과형성 상피소체선을 갖는 환자에서 PTH 분비를 효과적으로 억제하리라는 것을 제시한다.

[실시예 18 : 상피소체가 절제된 동물에서 혈청 이온화 칼슘 수준을 저하시키지 못하는 NPS 467]

칼슘 저혈증 반응을 일으키기 위하여 NPS 467이 작용하는 주요 표적 조직을 결정하기 위하여, 쥐의 상피소체선을 수술로 제거하였다. 완전 상피소체 절게 수술을 받은 동물들은 저칼슘혈증 상태이며, 혈청 Ca^{2+} 항상성을 유지시키기 위한 칼슘 식이에 크게 의존한다. 상피소체가 절제된 동물은 0.92mM의 혈청 이온화 Ca^{2+} 수준을 가졌으며, 단식 후 6시간이 지났을 때 점차적으로 0.76mM로 강하하였다. 1회 투여량의 NPS R-467(10 mg/kg 복강내)의 투여는 6시간에 걸쳐서 혈청이온화 Ca^{2+} 수준을 전혀 변화시키지 못하였다. 이 결과들은 NPS R-467의 저칼슘혈증 효과를 위해서는 무상 상피소체선이 필요하다는 것을 입증한다. 또한, 이 데이타는 NPS R-467이 생체내에서 상피소체선을 표적으로 할 수 있다는 것을 입증한다. 이 결과들은 NPS R-467이 PTH 분비를 억제시키기 위하여 생체내에서 상피 소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용하고 이에 따라 혈청의 이온화 Ca^{2+} 수준을 강하시킨다는 점과 부합한다.

[실시예 19 : 인체 상피소체 선에서 세포내 칼슘을 증가시키는 NPS 467]

분리된 상피소체 세포는 일차 상피소체기능항진증을 갖는 환자로부터 수술하여 얻은 상피소체 선종으로부터 제조하있다. 이 세포들에 fura-2를 가하고, 상기한 바와 같이 $[Ca^{2+}]i$를 측정하였다. NPS R-467 및 NPS R-568은 모두 농도 의존성 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다. NPS R-467 및 NPS R-568의 EC_{50} 은 각각 20 및 3μM이었다. 따라서, 이 두 화합물은 병변 인체 조직에서 $[Ca^{2+}]i$를 증가시킬 수 있으며, 따라서 일차 상피소체기능항진증을 갖는 환자에서 혈청 PTH 및 Ca^{2+} 수준을 감소시키리라고 예상된다.

[실시예 20 : 상피소체 세포 칼슘 수용체에서 NPS 467의 작용 메카니즘]

분리된 소 상피소체 세포를 사용하여 수용체 수준에서 NPS 467의 작용 메카니즘을 연구하였다. 0.5mM 세포외 Ca^{2+} 존재하에서, NPS R-467은 신속하고 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰으며, 이는 1M La^{3+} 존재하에서 지속되었고, PMA를 이용한 예비 처리(100 nM, 2분 동안)에 의해 부분적으로 억제되었다. 이 결과들은 모두 NPS R-467이 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용한다는 것과 부합한다. 그러나, NPS R-467에 대한 세포질 Ca^{2+} 반응은 상피소체 세포가 Ca^{2+} 미함유 완충제 중에 현탁될 때 사라졌다. 이것은 NPS 467이 그 자체로는 세포내 Ca^{2+} 의 이동화를 일으킬 수 없다는 것을 제시한다. 그러나, 소량의 세포외 Ca^{2+} 가 존재할 때 NPS 467은 상피소체 세포 및 난모 세포에서 반응을 일으켰다. 이것은 NPS 467이 반응을 일으키기 의해서는 Ca^{2+} 결합 부위를 부분적으로 점유할 필요가 있다는 것을 제시한다. 이 가설을 시험하기 위하여, 상피소체 세포를 Ca^{2+} 미함유 완충제 중에 현탁시키고 최대 농도 이하의 네오마이신에 노출시켰다. 네오마이신은 상피소체 세포, 및 상피소제 세포 Ca^{2+} 수용체를 발현하는 크세노푸스 난모세포에 대한 세포외 Ca^{2+} 의 효과와 거의 모든 면에서 유사하기 때문에 이용되었다. 10μM 네오마이신 첨가 그 자체로는 이러한 조건 하에서 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 못하였다.

그러나, NPS R-467의 후속 첨가는 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰으며, 이는 세포외 Ca^{2+} 가 존재하지 않기 때문에 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 기인하는 것임에 틀림 없었다. Ca^{2+} 미함유 완충제 중에 넣은 세포를 30μM NPS R-467에 노출시킬 때 $[Ca^{2+}]i$ 증가가 일어나지 않았다. 이 농도의 NPS R-467은 세포외 Ca^{2+} 가 존재할 때(0.5mM) $[Ca^{2+}]i$를 증가시키는데 최대로 효과적이다. 그러나, 10μM 네오마이신의 후속 첨가는 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다. 추측컨대, 네오마이신은 세포외 Ca^{2+} 와 동일 부위에서 결합하며 기능적으로 세포외 Ca^{2+} 를 대신한다. 그 자체로는 반응을 일으키지 않는 최대 농도 이하의 농도를 이용함으로써 Ca^{2+} 결합 부위를 부분적으로 점유할 수 있고, NPS R-467에 의한 Ca^{2+} 수용체의 활성화를 가능하게 한다.

NPS 467의 작용 메카니즘을 더 한정하기 위한 또다른 연구를 행하였다. 관찰된 $[Ca^{2+}]i$ 증가가 세포내 Ca^{2+} 의 이동화에 기인한다는 것을 확신시키기 위하여, 이 세포들을 다시 Ca^{2+} 미함유 완충제 중에 현탁시켰다. 그러나, 이 실험에서는 네오마이신을 최대 유효 농도 (100μM)로 사용하였다. 세포외 Ca^{2+} 부재하에서, 100μM 네오마이신은 신속하고 순간적인 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으켰다. 30μM NPS R-467의 후속 첨가는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았다. 이 실험과는 역으로 행간실험에서, 30μM NPS R-467을 첨가한 후 100μM 네오마이신을 첨가하였다. 예상되는 바와 같이, NPS 467 EE는 $[Ca^{2+}]i$ 증가를 일으키지 않았다. 그러나, 이것은 100μM 네오마이신의 후속 첨가에 의해 일어나는 $[Ca^{2+}]i$증가에 영향을 미치지 않았다. 최대 유효 농도의 NPS R-467 및 네오마이신을 이용하여 얻은 이 결과들은 이 두 화합물이 동일 부위에서 작용하지 않는다는 것을 제시한다. 오히려, 이 결과들은 Ca^{2+} 수용체 상의 두 개의 상이한 부위, 즉 세포외 Ca^{2+} 및 네오마이신이 결합하는 부위, 및 NPS R-467 및 구조적으로 관련있는 화합물(예: NPS R-568)이 결합하는 부위를 가정함으로써 충분히 설명될 수 있다. 세포외 Ca^{2+} 및 네오마이신 결합 부위에 결합하는 리간드는 Ca^{2+} 수용체를 완전히 활성화시킬 수 있는 반면, NPS 467 및 구조적으로 관련있는 화합물 결합 부위에 결합하는 리간드는 세포외 Ca^{2+} 결합 부위가 아직 정의되지는 않았지만 어느 정도까지 점유되었을 때만 나타나고 (또는) 기능적으로 관련을 갖는다. 세포외 Ca^{2+} 결합 부위에 결합하는 리간드는 NPS R-467에 대해서 이미 폐쇄된 결합 부위를 노출시킬 수 있을 것이다. NPS R-467 결합 부위는 세포외 Ca^{2+} 결합 부위에 결합하는 리간드에 대해 반응하여 수용체 활성화를 증가시키는 알로스테릭 부위인 것처럼 여겨진다.

이 데이타는 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체가 유기 리간드를 위한 적어도 두 개의 상이한 부위를 가진다는 것을 입증한다. 한 부위는 생리학적 리간드, 세포외 Ca^{2+} , 및 네오마이신과 같은 특정 유기 다가 양이온과 결합한다. 이 부위와 결합함으로써, Ca^{2+} 수용체가 완전히 활성화되고 $[Ca^{2+}]i$가 증가하며 PTH 분비가 억제된다. NPS R-467 및 NPS R-568은 Ca^{2+} 수용체 상에 존재하는 종전에는 인식되지 못했던 결합 부위를 한정한다. 이 부위와의 결합은 세포외 Ca^{2+} 결합 부위가 부분적으로 채워졌을 때 일어날 수 있을 뿐이며 (또는) Ca^{2+} 수용체를 완전히 활성화시킬 수 있다. 어느 한 부위에서 작용하는 리간드들은 생체내에서 혈청 Ca^{2+} 수준을 억제하는데 효과적이다.

[상피소체 세포 칼슘 수용체에 대한 알로스테릭 부위]

소의 상피소체 세포 칼슘 수용체를 활성화시키는 칼슘 유사물, 예를 들면 NPS R-467 및 NPS R-568은 세포외 Ca^{2+}의 부재하에 세포내 Ca^{2+}를 동원시키지 않는다. 오히려, 이들은 세포외 Ca^{2+}에 의한 활성화에 대한 Ca^{2+} 수용체의 감도를 증가시킴으로써 세포외 Ca^{2+}에 대한 농도 응답 곡선을 왼쪽으로 이동시킨다. 이로 인해, 이들 화합물은 세포외 Ca^{2+}가 작용하는 바와 같이 이 수용체에 대해 동일 부위에 작용하는 것은 쉽지 않다. 이와는 대조적으로, 유기 및 무기 폴리양이온은 세포외 Ca^{2+}의 부재하에 세포내 Ca^{2+}를 동원시키지 않으므로, 세포외 Ca^{2+}가 작용하는 바와 동일한 부위에서 작용할 것이다. NPS R-568과 같은 화합물은 아마도 알로스테릭 방식으로 작용할 것이며, 이들의 활성은 세포외 Ca^{2+}의 약간의 최소 농도에 대해 의존적이다. 이는 수용체에 대한 세포외 Ca^{2+}-결합 부위의 부분점유가 NPS R-568 등의 화합물을 활성화시키는 데 필요함을 제안한다. 이 모델은 실시예 20에 기재된 관찰치와 일치한다.

그러나, 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대한 NPS R-568의 작용 메카니즘에 대한 다른 상세한 설명은 결합 연구에 의해 더 정확히 조사되며, 여기서,(예를 들면 ^{3}H를 사용하여) 방사선 표지된 NPS R-568의 특정 결합이 평가된다. 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대한 NPS R-568의 활성을 설명할 수 있는 여러 분자 메카니즘이 있다. 1 메카니즘 (모델 1)에 있어서, NPS R-568은 점유될 때, 수용체를 관능적으로 활성화시키는 데 충분하지 않은 부위에서 Ca^{2+} 수용체에 결합할 수 있다.

활성화는 세포외 Ca^{2+} 결합 부위(들)의 점유의 일부 농도가 달성될 때만 일어날 수 있다. 별개의 메카니즘 (모델 2)에서, 세포외 Ca^{2+} 결합 부위의 점유는 NPS R-568등의 화합물에 대한 잠정 결합 부위를 차폐시킬 수 없다. 이어서, NPS R-568에 의한 이러한 잠정 부위의 점유는 세포외 Ca^{2+} 부위에서 결합 친화도 및 (또는) 효능을 증가시킨다. 이들 두 메카니즘은 NPS R-568 등의 화합물에 의한 Ca^{2+} 수용체의 알로스테릭 활성화 형태를 포함한다. 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대한 NPS R-568 등의 화합물의 효과를 설명할 수 있는 메카니즘이 유일한 것은 아니다. 결합 연구 결과로 제안될 수 있는 다른 작용 메카니즘을 후술한다.

상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 대한 NPS R-568 등의 화합물의 작용 메카니즘을 추가로 연구하기 위해, ^{3}H-NPS R-568을 사용하는 결합 연구를 수행할 수 있다. 손상되지 않은 상피소체 세포 또는 상피소체 세포로부터 제조한 막에 대한 ^{3}H-NPS R-568의 특이 결합은 당업계에 공지된 기술에 의하여 초기에 연구하였다. 이어서, 결합의 키네틱 파라메타를 세포외 Ca^{2+} 농도의 함수로서 측정하였다. 더 구체적으로, 데이타의 스캐처드 분석은 결합 부위의 수 및 ^{3}H-NPS R-568의 수용체 부위의 명백한 친화도를 나타낼 것이다. 이어서, 이들 파라메타를 분석을 위해 사용된 완충액 중의 세포외 Ca^{2+}의 농도 변화의 함수로서 조사한다. 모델 1이 정확하다면, 현저한 농도의 특이 결합이 세포외 Ca^{2+}의 부재하에 일어날 수 있다. 세포외 Ca^{2+}의 농도의 함수로서 결합의 키네틱 파라메타에 있어서의 큰 변화에 의해 모델 2가 선호된다. 상기 다른 실시예에 기재된 여러가지 무기 및 유기 폴리양이온이 세포외 Ca^{2+}가 작용하는 바와 같이 ^{3}H-NPS R-568의 결합 파라메타에 있어서 마찬가지 변화를 일으킬 것으로 기대된다. 이는 폴리양이온이 NPS R-568 등의 화합물이 결합한 부위에서 멀리 떨어진 세포외 Ca^{2+} 결합 부위에서 작용한다는 견해를 뒷받침할 수 있다.

[실시예 21 : NPS 467의 제조]

250 ml용 둥근 바닥 플라스크에서, 3'-메톡시 아세토페논 10.0g(100 mmo1e) 및 3-페닐프로필아민 13.5g(100 mmole)을 혼합하고, 티타늄(IV) 이소프로폭사이드 125 mmole(35.5g)으로 처리하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 실온에서 30분 동안 교반하였다. 이어서, 에탄올 100ml 중의 시아노붕수소와나트륨 6.3g(100mm ole)을 2분 동안 적가하였다. 반응 혼합물을 질소 분위기하에 실온에서 16시간 동안 교반하였다. 이어서, 반응 혼합물을 에틸 에테르 1.5 L 및 물 0.5L를 함유하는 2L용 분별 깔때기에 옮겼다. 상을 평형화시키고, 에테르 층을 제거하였다. 나머지 수성상을 에테르를 1L식 4회 사용하여 철저히 추출시켰다.

세척물을 한데 모아서, 무수 탄산칼륨 상에서 건조시키고, 투명한 엷은 호박색 오일로서 얻었다.

클로로포름-메탄올-이소프로필아민(100:5:1)을 사용하여 실리카겔 상에서 이 물질을 TLC 분석한 결과, 생성물은 Rf 0.65에서 용출되고, 두개의 출발 물질은 Rf 0.99(3'-메톡시아세토페논) 및 Rf 0.0 (3-페닐프로필아민)에서 용출되었음을 나타낸다.

클로로포름-메탄올-이소프로필아민을 99:1:0.1로부터 90:10:0.1까지의 구배로 실리카를 사용하여 반응 혼합물을 크로마토그래피(48 x 4.6 cm)시켜서, 정제된 NPS 467 13.66 g을 얻었다. 이 물질을 0.1 % 디에틸아민을 함유하는 헥산-이소프로판올(99:1) 중에 용해시켜서 50 mg/ml 농도의 용액을 얻었다. 260 nm에서 광학 밀도를 모니터하면서, 100 ml/분의 속도로 헥산 중의 0.7 % 이소프로필아민, 0.07 % 디에틸아민을 사용하여 키랄셀 OD (25 x 2 cm)를 통하여 상기 용액 4ml(200 mg, 분리할 수 있는 최대량)를 크로마토그래피함으로써 키랄 분해를 수행하였다. 이러한 조건 하에서(물질 100mg을 주입하여), 초기 용출 이성질체(NPS 467 R)는 약 26분에서 칼럼으로부터 나오기 시작하였고, 후기 용출 이성질체(NPS 467 S)는 약 34분에서 나타나기 시작하였다. 이러한 조건 하에서 기저 분해를 수행하였다. 유리 염기 3g을 에탄올 100ml 중에 용해시키고 이것을 10 몰당량 HCl을 함유하는 물 100 ml로 처리하여 각 광학 이성질체 (유리 염기)를 대응하는 염산염으로 전환시켰다. 이 용액을 동결 건조시켜서 백색 고체를 얻었다.

[NPS 568]

NPS 568은 소 및 인체 상피소체 세포에서 $[Ca^{2+}]i$를 증가시키는데 더 효능있는 NPS 467의 구조 유사체이다. NPS 467과 마찬가지로, NPS 568의 효과는 입체 특이적이며, R-이성질체가 보다 더 효능있는 에난티오머이다(상기 표 6 참조).

NPS R-568은 현재 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체에 선택적 활성을 갖는 리드 칼슘 유사 화합물이다. 이 화합물은 큰 효능을 갖기는 하지만, 상기 실시예의 NPS R-467에 기재된 바와 마찬가지로 작용한다. 따라서, NPS R-568는 입체 특이적 방법으로 소의 상피소체 세포에 있어서 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 유발시킨다 (상기 표 6 참조).

NPS R-568은 세포외 Ca^{2+} 의 부재하에 $[Ca^{2+}]i$의 증가를 유발할 수 없지만, 세포외 Ca^{2+} 에 대한 응답을 강화시킨다. NPS R-568은 세포외 Ca^{2+} 에 대한 농도 응답 곡선을 왼쪽으로 이동시킨다.

NPS R-568를 쥐에 경구 투여하면 혈청 Ca^{2+} (ED_{50} = 7 mg/kg)의 농도를 투여량 의존 방식으로 감소시킨다. NPS R-568을 경구 투여함으로써 유발된 저칼슘혈증 응답은 신속히 개시되어 혈청 PTH의 농도가 감소함에 따라 평형화된다. NPS R-568을 경구 투여함으로써 유발되는 저칼슘혈증 응답은 단지 앞서 완결된 신절제술에 의해 최저 한도로 영향을 받는다. 그러나, NPS R-568은 상피소체 절제된 쥐에 있어서 저칼슘혈증 반응을 유발하는 데 실패하였다. 따라서, NPS R-568은 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체를 생체내에서 선택적으로 표적화하고, PTH 분비를 억제시킬 수 있다 . 혈청 중의 PTH농도의 감소는 유도되는 저칼슘혈증과 더불어 상피소체기능항진중의 경우에 바람직한 치료효과를 가져온다. NPS R-568의 합성에 대하여 아래 기재한다.

[실시예 22 : NPS 568의 제조]

NPS 568은 실시예 21에서 3-페닐프로필아민 대신에 3-(2-클로로페닐)프로필아민 1 당량을 사용하는 것을 제외하고는 실시예 21의 방법과 유사한 방법으로 제조하였다. 3'-메톡시아세토페논, 3-(2-클로로페닐)프로필아민 및 티타늄(IV) 이소프로폭사이드의 혼합물을 $NaCNBH_3$/EtOH로 처리하기 전에 5시간 동안 교반시킨 결과 수율이 상당히 증가(98 %)하였음을 발견하였다.

[실시예 23 : 경구 투여시 혈청 이온화 칼슘을 저하시키는 NPS 467]

쥐(수컷, 스프래그-다우레이, 250-300 g)에게 표준 쥐 식이를 공급하고, 실험하기 전에 철야 단식시켰다. NPS R-467을 옥수수유 중에 현탁시키고, 영양 니들(gavage needle)을 통하여 1회 경구 투여량을 투여하였다. 3시간 후 꼬리 정맥으로부터 혈액 샘플을 채취하고 이온화 Ca^{2+} 농도를 평가하였다. 제44도는 NPS R-467이 경구 투여시 혈청의 이온화 Ca^{2+} 농도를 투여량 의존 방식으로 감소시킨다는 것을 나타낸다.

[실시예 24]

BoPCAR 1 클로닝법 1

크세노푸스 래비스 난모 세포를 사용하는 발현 클로닝 기술은 cDNA 코딩화된 소의 상피소체 칼슘 수용세를 동정하는 데 사용하였다. 이들 기술을 본 명세서에 간단히 기재하며, 더 상세한 설명은 다른 세포형으로부터 Ca^{2+} 수용체의 다른 형태를 클로닝하는 데 사용될 수 있는 기술을 기재한 부분에서 이것에 선행된다.

폴리(A+)-강화 RNA는 구아니디늄 티오시아네이트를 사용한 추출, CsCl을 통한 원심분리 및 올리고(dT) 셀룰로오스 크로마토그래피를 이용하여 소의 상피소체선으로부터 초기에 제조할 수 있다. 생성된 폴리(A+)-강화 RNA를 난모 세포에 주입하면 증가된 세포외 Ca^{2+} 농도 및 본 명세서에 기재된 바의 3가 양이온 Gd^{3+} 1 내지 100μM에 대한 감도를 부여함으로써 이들 2 양이온은 칼슘 활성화 클로라이드 유동을 유발시킬 수 있다. 물을 주입한 대조란에서는 이러한 유동이 유발되지 않았다. X. 래비스 개구리를 (i) 높은 수준의 성숙도 (즉, 단계 V, VI);(ii) A23187과 같이 Ca^{2+} 이오노포어(ionophore)에 의해 활성화된 높은 활성의 Cl- 유동; (iii) 소 상피소체로부터 단리시킨 전체 폴리(A+)-RNA의 난모 세포중 25 ng을 주입할 때 높은 농도의 Gd^{3+} -유도 Cl- 유동의 기능적 발현 등의 특성을 나타내는 이들의 수확한 난모 세포를 기준으로 선별하였다. 이어서, mRNA를 예비 연속 유동한천 겔 전기영동(헤디거(Hediger. M. A.)의 Anal. Biochem.,159, 제280-286페이지 참조)을 사용하여 크기 분급시켜 Ca^{2+} 수용체에 대해 코딩한 전사체 중에 더 풍부한 폴리(A+)-RNA 분획을 얻었다. 이들 분획으로부터 얻은 mRNA를 주입한 난모 세포의 활성 피크는 4 내지 5.5kb로 얻은 Gd^{3+} -활성화 Cl- 유동의 발현 증진을 나타냈다. 이 RNA는 전체 길이의 전사체 중에 풍부한 플라즈미드 pSPORT1에 있어서 크기 선별된 방향성 cDNA 라이브러리를 제조하는 데 사용하였다. 이어서, 이 라이브러리로부터 얻은 350 - 500개의 의존성 클론으로부터 풀링시킨 DNA 삽입물로부터 센스 상보 RNA를 합성한 후 난모 세포에 주입하였다. Gd^{3+} -활성화 Cl-유동은 350개의 콜로니를 함유하는 단일 필터로부더 RNA를 주입한 후에 관찰하였다. 계속적으로 더 작아지는 클론 풀로부터 cRNA를 제조하여 주입함으로써 그의 cRNA를 난모 세포에 주입한 후 매우 증진된 Ca^{2+} 수용체 활성을 발현시키는 5.3kb의 cDNA 삽입물을 사용하여 단일 클론 (BoPCaR 1)을 단리시켰다. BoPCaR 1 cRNA (제45도의 플라즈미드; 제46도의 제한 지도: 및 제47도의 부분 뉴클레오타이드 서열 참조)를 함유하는 플라즈미드를 ATCC에 기탁 번호 ATCC 75416호로 기탁하였다.

크기 선별된 RNA의 크기 범위 밖의 BoPCaR 1 cRNA는 크세노푸스 난모 세포에 있어서 Cl- 채널 활성을 유발하는 네오마이신을 발현시키는 것으로 밝혀졌다.

이는 상이한 이소타입 또는 다중 유전자가 다른 수의 Ca^{2+} 수용체 유전자군을 은폐시킬 수 있다는 가능성과 일치한다.

여러가지 약리학적 및 생화학적 표준을 보나 파이드(bona fide) 소 상피소체 Ca^{2+} 수용체를 코딩시킨 바의 이러한 클론을 동정하는 데 사용하였다. 물을 주입하지는 않았지만, 클로닝된 수용체를 발현시키는 난모 세포는 세포외 Ca^{2+} 의 농도 (1.5 - 5.mM) 또는 Gd^{3+} 의 농도 (20 - 600μM)의 증가 및 폴리(A+)-주입된 난모세포에서 관찰되는 것보다 몇 배 더 큰 Cl- 유동(1.8μA 이하)에 있어서의 큰 증가로 반응하였다. 이들 반응은 BoPCaR 1 cDNA로부터 제조한 cRNA를 난에 주입시킨 후 1 내지 4일에 걸쳐 현저히 증가하였다. 또한, 이러한 응답을 유발하는 2개의 양이온의 농도 범위는 소 상피소체 세포에 대해 시험관 내에서 작용하는 것으로 이미 나타낸 것과 매우 유사하였다. 상피소체 세포에 대한 Ca^{2+} 의 효과와 거의 유사한 작용을 하는 것으로 알려진 네오마이신 20 내지 100μM은 난모 세포의 Cl- 유동에 있어서 Ca^{2+} 또는 Gd^{3+} 에 의해 제조된 것과 동일한 변화를 생성하였으며, 이는 항생제가 상피소체 기능을 시험관 내에서 조절하는 것 이상의 동일농도 범위에 결쳐 발생하였다. 마지막으로, 시험관 내에서 클론으로부터 제조한 RNA의 해독은 폴리아크릴아미드 겔 상의 분자량이 1OO kd인 단일 주요 단백질에서 얻었으며, 그의 합성은 개의 췌장 마이크로좀을 내포시킴으로써 증진되며, 10 내지 15%의 분자량의 증가를 수반한다. 후자는 클로닝된 수용체가 전체 막 단백질 수용체의 기대할 수 있는 바의 막과 강하게 상호 작용하고, 그의 천연 형태로 글리코실화됨을 제안한다. 레시틴 콘카나발린 A에 대한 연구는 Ca^{2+} 수용체가 유사한 글리코프로테인임을 나타낸다. 따라서, 난모 세포에서 높은 수준으로 발현되는 클로닝된 수용체의 약리학적 특성 및 오늘날까지 수행된 생화학적 연구는 소상피소체 Ca^{2+} 동력학(난모 세포 중의 Ca^{2+} -활성화 Cl- 유동의 변화로 예시됨)에 대한 그의 동정과 일치한다.

[진단 용도]

칼슘 수용체에 대해 활성인 NPS R-568 또는 다른 화합물을 진단 도구로서 사용할 수 있다. 더 구체적으로, 이러한 화합물의 제제는 진단 도구로서 유용하다. 일례로서 NPS R-568 등의 상피소체 세포 칼슘혈증 화합물 함유 제제를 우울증을 저칼슘혈증 환자에게 경구 또는 다른 투여 경로로 투여할 수 있다. 이중상이 제1 상피소체기능항진증 등의 원 상

피소체기능항진증으로부터 악화돠면, NPS R-568 또는 이와 마찬가지로 작용하는 화합물을 투여함으로써 이러한 중상을 경감시킬 수 있다. 이 증상이 완화되지 않으면, 우울증은 상피소체기능항진증이 아닌 다른 병적 상태를 초래한다. 따라서, 상피소체 세포 칼슘 유사 화합물은 우울증의 다른 진단에 사용할 수 있다.

상피소체기능항진증 및 다른 질병에 일반적인 증상 및 증후는 상기한 방법과 다르게 진단할 수도 있다. 이러한 공통되는 증후 및 증상은 고혈압, 근육 약화증 및 일반적인 권태감을 포함하지만 이로써 한정되지는 않는다. 상피소체 세포 Ca^{2+} 수용체의 칼슘 유사 화합물로 처리한 후 이러한 증상이 완화된다는 것은 문제가 원 상피소체기능항진증으로부터 초래됨을 의미할 것이다.

다른 실시예에서, C-세포 Ca^{2+} 수용체에서 길항길(칼슘 길항물)로서 작용하는 화합물을 수질 갑상선암을 진단하기 위해 상술한 바와 같이 투여할 수 있다.

이 경우, C-세포 Ca^{2+} 수용체의 칼슘 길항 화합물을 투여하면 방사선 면역 분석에 의해 용이하게 측정할 수 있는 칼시토닌의 혈청 농도를 억제할 것이다. 설사 등의 수질 갑상선암과 관련한 특정 증상은 이들 증상이 칼슘 길항 화합물을 투여한후에 완화 또는 경감되는지를 측정하기 위해 모니터링할 수도 있다.

제3실시예에서, 사구체 세포 Ca^{2+} 수용체에서 칼슘 유사물로서 작용하는 화합물을 고혈압을 진단하는 다른 잔단에 사용할 수 있다. 이 경우, 사구체 세포 Ca^{2+} 수용체의 칼슘 유사 화합물을 상술한 바와 같이 투여할 수 있다. 혈압이 정상 농도로 강하하는 것은 고혈압이 다른 병적 상태로부터 형성되는 것보다는 상승된 농도의 레닌으로부터 대부분 또는 배타적으로 초래되는 경우에 발생한다.

다른 실시예에서, 파골세포 Ca^{2+} 수용체에 대한 특이 칼슘 유사물로서 작용하는 화합물을 골다공증의 고- 및 저-전환형의 다른 진단에 사용할 수 있다. 이 경우, 이러한 화합물은 적절한 제제로 투여할 수 있으며, 혈청 알칼리 포스페이트, 오스테오칼신, 피리디놀린 및(또는) 데옥시피리디놀린 가교제 및(또는) 골흡수 또는 골형성의 기타 다른 예상 가능한 마커의 농도는 당업계에 공지된 기술로 측정하였다. 1 이상의 이들 파라메타에 있어서 감소치가 크다면 고 전환형 골다공증을 예상할 수 있는 반면 이들 파라메타에 있어서 감소치가 적거나 전혀 없다면 저 전환형 골다공증을 예상할 수 있다. 이러한 정보는 적절한 처리를 지시한다. 항흡수성 의약은 저 전환형 골다공증에 대한 적절한 단독 치료일 수 없다.

이들 실시예는 완전한 것은 아니지만, 특이 Ca^{2+} 수용체가 제제로 표적화될 수 있다는 것 및 이러한 제제의 신체 기능 및(또는) 화학적 성분에 대한 관찰 효과가 진단학적으로 사용될 수 있음을 설명한다. 일반적으로 상기 여러 세포외 Ca^{2+} 수용체에 대해 작용하는 칼슘 유사물 및 칼슘 길항 화합물은 특정 세포형과 관련된 여러 질병을 진단하는 데 사용할 수 있다. 이들 질병은 뼈 및 무기질 관련 질환 (Coe, Disorders of Bone and Minera1 Metabolism, Raven Press지, 1990 참조), 신장 질환, 내분비 질환, 암, 심장혈관계 질환, 신경성 질환, 위장병, 및 임신 관련 질병을 포함하며, 이들로써 한정되지 않는다. 이러한 분자들이 치료에 효과적인 인체 질병 또는 질환의 예는 다음과 같다. (1) 칼슘 유사물은 비정상적인 피부 세포의 증식을 감소시킴으로써 건선을 회복시킬 것으로 예상된다. (2) Ca^{2+} 는 MTAL 및 피질 수집 세포에 대한 바소프레신의 효과를 차단하기 때문에, 칼슘 유사물은 부적절한 바소프레신(ADH) 분비증 등의 바소프레신 과다증에 있어서 물 보유량을 감소시킬 것으로 기대된다. 결과적으로, ADH 결핍 상태에 사용되는 칼슘 수용체 길항질은 잠행성의 부분 센트럴 당뇨병에서와 같이 존재하는 임의의 ADH의 작용을 강화시킬 것으로 기대된다. (3) 칼슘 유사물은 (a) 리닌 분비를 감소시키고, (b) 혈관 평활근에 의해 PTHrP (PTH-관련 펩티드)등의 혈관확장제의 제조를 자극함으로써 고혈압을 치료하는데 사용할 수 있다. (4) 칼슘 유사물은 혈소판 수가 작은 경우에 유용한 혈소판 응집을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다. 결과적으로, 칼슘 길항물은 과응집 상태에서 혈소판의 기능을 억제할 것으로 기대된다. (5) 칼슘은 결장 및 유방 세포의 분화를 촉진한다. 칼슘 유사물은 결장암 또는 유방암의 위험을 감소시킬 것으로 기재된다. (6) 칼슘은 MTAL의 요 칼슘 분비를 촉진시킨다. 칼슘 유사물은 과칼슘혈증 치료에 유용한 칼슘저하 작용을 가질 것으로 기대된다. 칼슘 유사물의 파골 세포에 대한 억제 효과 및 저칼슘혈증 펩티드 칼시토닌의 분비를 자극함으로써 과칼슘혈증 및 그의 증상의 치료에 유용하게 하는 것으로 기대된다. 칼슘 유사물은 칼슘 수용체를 활성화시킴으로써 저칼슘혈증을 개선시킬 수도 있다. 결과적으로, 칼슘 길항물은 요 칼슘 분비를 감소시키고, 신장 결석의 치료에 유용한 것으로 기대된다. 또한, 칼슘은 신장 근위 세관에서 1,25-디히드록시비타민 D의 형성을 억제하며, 이 비타민 D 대사산물은 신장 결석증 환자에 있어서 빈번하게 과다 형성되며, 이들의 과칼슘뇨증에 기여한다. 칼슘 유사물에 의한 1,25-디히드록시비타민 D의 형성 억제는 신장 칼슘결석증의 치료에 유용한 것으로 기대된다. (7) 내인성 아민은 칼슘 유사물 또는 칼슘 길항물에 의해 요독증 환자의 증상을 재생시킬 수 있는 것으로 기대된다.

칼슘 유사물 및(또는) 칼슘 길항제는 이들 증상을 개선시킬 것으로 기대된다. (8) 아미노글리코사이드 항생제의 신장 독성의 일부는 이들 약물과 신장 칼슘 수용체의 상호 작용에 의해 중재될 수 있다. 칼슘 수용체를 갖는다는 것은 신장 독성을 최소화시키는 군의 새로운 약물을 고안했을 경우의 약물을 용이하게 선별할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 신장의 칼슘 수용체 길항질은 이러한 메카니즘과 관련된 경우 신장 독성을 예방 또는 치료할 것이다. (9) 골다공증, 신장 결석 및 고혈압 등의 칼슘 관련 질병의 유전자 성분의 일부는 수용체의 특정 형태와 더불어 유전 문제에 관련될 것으로 예상된다. 수용체 기재 제제를 사용하여 연구하고, 유전자 선별/시험을 수행하였다. 인체의 질병, 가족성 과칼슘뇨증성 과칼슘혈증은 칼슘 수용체의 결함에 기인할 수 있다. 제1 상피소체기능항진증의 경우의 한정적인 진단 분리는 수용체-기재 기술을 사용하여 수행할 수 있다. (10) 칼슘수용체는 태반 중에 위치하며, 태반의 기능 장애에 영향을 미치고. 성장하는 태아에게 영양분을 수송할 것으로 기대된다.

기타 다른 실시 태양은 다음 특허 청구의 범의 내에 포함된다.

[서열 표]

(1) 일반 정보 :

(i) 출원인

(A) 명칭 : 브리감 앤드 위민스 하스피털, 인크.

(B) 거리명 : 프란시스 스트리트 75

(C) 도시명 : 보스톤

(D) 주 : 메사추세츠주

(E) 국명 : 미합중국

(F) 우편번호(ZIP) : 02115

(G) 전화번호 : 617-732-6679

(H) 팩스번호 : 617-732-6392

(A) 명칭 : 엔피에스 파마슈티칼스, 인크.

(B) 거리명 : 치페타 웨이 420

(C) 도시명 : 솔트 레이크 시티

(D) 주 : 유타주

(E) 국명 : 미합중국

(F) 우편번호(ZIP) : 84108

(G) 전화번호 : 801-583-4939

(H) 팩스번호 : 801-583-4961

(ii) 발명의 명칭 : 칼슘 수용체 활성 분자

(iii) 서열수 : 5

(iv) 대응 주소 :
(A) 수신인 : 올프, 그린필드 & 색스, 피.씨.
(B) 거리명 : 아틀란틱 애비뉴 600
(C) 도시명 : 보스톤
(D) 주 : 메사추세츠주
(E) 국명 : 미합중국
(F) ZIP : 02210-2204

(v) 컴퓨터 판독형 :
(A) 전달형 : 디스켓, 3 1/2 인치
(B) 컴퓨터 : IBM-호환형
(C) 작동 시스템 : MS:DOS 버전 3.3
(D) 소프트웨어 : 워드퍼펙트 5.1

(vi) 현 출원인 데이타 :
(A) 출원번호 : PCT/US93/01642
(B) 출원일 : 1993. 2. 23.

(viii) 변리사/대리인 정보 :
(A) 성명 : 게이츠, 에드워드 알.

(B) 등록 번호 : 31,616
(C) 참고/정리 번호 : B0801/7012WO

(ix) 통신 정보 :
(A) 전화 번호 : (617) 720-3500
(B) 팩스 번호 : (617) 720-2441
(C) 텔렉스 : 921742 EZEKIEL

(2) 서열 번호 1에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :
(A) 서열 길이 : 2148쌍 염기
(B) 서열형 : 핵산
(C) 쇄 수 : 2 쇄상
(D) 토폴로지 : 직쇄상

(ii) 분자 종류 : cDNA 내지 mRNA

(iii) 하이포세티칼 : 없음

(iv) 안티센스 : 없음

(xi) 서열 표시 : 서열 번호 : 1:

```
CCACGCGTCC GCGGAAAAAA AAAAAAAGTT CCCCACTCTA      40
GTACAGAGAA GGTTGGCAGA GTCGTAAGCC CCCAACCTCT      80
TAAACTTCTC TGCATCTCCA AGGAGAAGGA GGGAAGAGGG     120
GTTCTTTCCG ACCTGAGGAG CTGGATCTGG GGTCCGAGAA     160
CCCCAAGGTA GCACCGGAAA GAACAGCACA GGAGGCGAGA     200
GCGTGCGGTG GCCGGTKGGC GGGAGAACCA GACCCGACKY     240
CGCGGTCCTC GGYGCTGCCG GGKYCCSGGG ACTCAGCTCA     280
GCACGACTGG GAAGCCGAAA GTACTACACA CGGTCTCTGC     320
ATGATGTGAC TTCTGAAGAC TCAAGAGCCA CCCACTTCAC     360
TAGTCTGCAA TGGAGAAGGC AGAAATGGAA AGTCAAACCC     400
CACGGTTCCA TTCTATTAAT TCTGTAGACA TGTGCCCCCA     440
CTGCAGGGAG TGAGTCGCAC CAAGGGGGAA AGTCCTCAGG     480
GGCCCCCAGA CCACCAGCGC TTGAGTCCCT CTTCCTGGAG     520
AGAAAGCAGA ACTATGGCAC TTTATAGCTG CTGTTGGATC     560
CTCTTGGCTT TTTTCTACCT GGTGCACTTC CGCCTATGGG     600

CCTGACCAGC GAGCCCAAAA GAAAGGGGAC ATTATCCTCG     640
GGGGGCTCTT TCCTATTCAT TTTGGGGTTG MMGTGAAAGA     680
TCAGGATCTA AAGTCGAGGC CGGAGTCCGT GGAGTGTATC     720
AGGTATAATT TCCGAGGATT TCGCTGGTTA CAAGCTATGA     760
TATTTGCCAT AGAGGAAATA AACAGCAGTC CAGCCCTTCT     800
TCCCAACATG ACCCTGGGAT ACAGGATATT CGACACTTGT     840
AACACCGTCT CTAAAGCCTT GGAGGCCACC CTGAGTTTTG     880
TGGCCCAGAA CAAAATTGAC TCTTTGAACC TTGATGAGTT     920
CTGCAACTGC TCAGAGCACA TCCCCTCTAC CATCGCAGTG     960
GTGGGAGCTA CTGGCTCGGG CATCTCCACA GCAGTGGCCA    1000
ACCTGCTGGG GCTCTTCTAC ATCCCCCAGG TCAGCTATGC    1040
CTCCTCCAGC AGACTCCTCA GCAACAAGAA TCAATTCAAG    1080
TCCTTCCTCC GCACCATACC CAATGATGAA CACCAGGCCA    1120
CGGCCATGGC TGACATCATC GAGTACTTCC GCTGGAACTG    1160
GGTGGGCACA ATTGCAGCTG ACGATGACTA TGGCCGGCCA    1200
GGGATCGAGA AGTTTCGAGA GGAAGCTGAG GAGAGGGACA    1240
TCTGCATCGA CTTCAGCGAG CTCATCTCCC AATACTCTGA    1280
TGAGGAAAAG ATCCAGCAGG TGGTGGAGGT GATCCAGAAT    1320
TCCACCGCCA AAGTCATTGT CCGTCTTCTC CAGCGGCCCA    1360
GACCTGGAAC CCCTCATCAA AGAGATCGTC CGGCGCAATA    1400
TCACAGGCAG GATCTGGCTG GCCAGCGAGS CTGGSCAGCT    1440
CTTCCCTGAT TGCTATGCCC GAGTATTTCC ATGTGGTCGG    1480
AGGCACCATT GGGTTTGGTT TGAAAGCTGG GCAGATCCCA    1520
GGCTTCCGGG AATTCCTGCA GAAAGTCCAC CCCAGGAAGT    1560
CTGTCCACAA TGGTTTTGCC AAGGAGTTTT GGGAAGAAAC    1600
ATTTAACTGC CACCTGCAAG AGGGTGCTAA AGGCCCATTA    1640
CCGGTGGACA CCTTCCTGAG AGGTCACGAA GAAGGAGGTG    1680
CCAGGTTAAG CAACAGTCCC ACTGCCTTCC GACCTCTGTG    1720
CACTGGGGAG GAGAACATCA GCAGTGTCGA GACTCCTTAC    1760
ATGGATTATA CACATTTACG GATATCCTAC AACGTCTACT    1800
TAGCCGTCTA CTCCATTGCT CATGCCCTAC AAGATATATA    1840
CACCTGCATA CCTGGGAGAG GGCTCTTCAC CAACGGTTCC    1880
TGCGCAGATA TCAAGAAGGT TGAAGCTTGG CAGGTCCTGA    1920
AACACCTGCG GCACCTAAAT TTTACCAGCA ATATGGGGGA    1960
GCAAGTAACT TTCGATGAAT GTGGAGACCT GGCAGGGAAC    2000
TATTCCATCA TCAACTGGCA CCTCTCCCCA GAGGACGGCT    2040
CCATAGTGTT TAAGGAAGTT GGATATTACA ATGTCTATGC    2080
CAAGAAAGGA GAGAGACTCT TCATCAATGA TGAAAAAATT    2120
CTGTGGAGTG GATTCTCAAG GGAGGTGC                 2148
```

(2) 서열 번호 2에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 서열 길이 : 23쌍 염기

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쇄 수 : 1 쇄상

(D) 토폴로지 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 다른 핵산

(A) 설명 : 서열 번호 2 및 서열 번호 3은 칼슘 수용체를 코딩하는 서열을 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍을 나타낸다.

(iii) 하이포세티칼 : 없음

(iv) 안티센스 : 없음

(xi) 서열 표시 : 서열 번호 : 2:

RACTWCTTCY TGKTSAMCCT SGC 23

(2) 서열 번호 3에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 서열 길이 : 26쌍 염기

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쇄 수 : 1 쇄상

(D) 토폴로지 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 다른 핵산

(A) 설명 : 서열 번호 2 및 서열 번호 3은 칼슘 수용체를 코딩하는 서열을 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머 쌍을 나타낸다.

(iii) 하이포세티칼 : 없음

(iv) 안티센스 : 없음

(xi) 서열 표시 : 서열 번호 : 3:

TYAMIGARSS IRTARAWSAB VGGRTT 26

(2) 서열 번호 4에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 서열 길이 : 32쌍 염기

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쇄 수 : 1 쇄상

(D) 토폴로지 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 다른 핵산

(A) 설명 : 서열 번호 4 및 서열 번호 5는 칼슘 수용체를 코딩하는 서열을 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 나타낸다.

(iii) 하이포세티칼 : 없음

(iv) 안티센스 : 없음

(xi) 서열 표시 : 서열 번호 : 4:

AACTACTICT GGITBCTGGT GGARGGSSTS TA 32

(2) 서열 번호 5에 대한 정보 :

(i) 서열 특성 :

(A) 서열 길이 : 36쌍 염기

(B) 서열형 : 핵산

(C) 쇄 수 : 1 쇄상

(D) 토폴로지 : 직쇄상

(ii) 분자형 : 다른 핵산

(A) 설명 : 서열 번호 4 및 서열 번호 5는 칼슘 수용체를 코딩하는 서열을 증폭시키기 위한 올리고뉴클레오타이드 프라이머쌍을 나타낸다.

(iii) 하이포세티칼 : 없음

(iv) 안티센스 : 없음

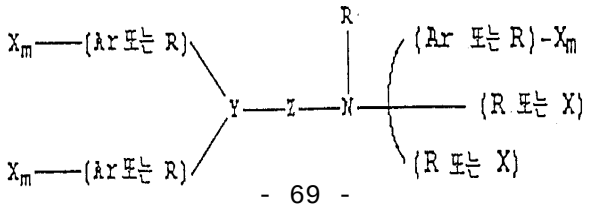
(xi) 서열 표시 : 서열 번호 : 5:

GAARCAGTAI ATRAYRGCAA CVAAAARDCC CTGGAA 36

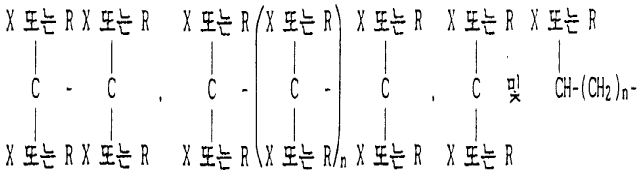
(57) 청구의 범위

청구항 1.

칼슘 수용체의 하나 이상의 활성을 조절하는 다음 일반식의 화합물 또는 그의 제약상 허용가능한 염의 유효량을 포함하는, 신장 질환, 피부 질환, 혈액응고 장애, 위장관 질환, 엔도크린성 질환, 비정상적인 물 대사, 유방암 및 직장암으로 이루어진 군 중에서 선택된 질환 또는 장애를 가진 환자의 치료용 제약 조성물.



상기 식에서, X는 각기 독립적으로 H, CH_3, CH_3O, CH_3CH_2O, Br, Cl, F, CF_3, CHF_2, CH_2F, CF_3O, CH_3S, OH, CH_2OH, $CONH_2$, CN, NO_2, 또는 CH_3CH_2이고; 각 Ar은 소수성 기이고; 각 R은 독립적으로 수소, 메틸, 에틸, 프로필, 이소프로필, 부틸, 이소부틸, 시클로펜틸, 시클로헥실, 시클로헵틸, 시클로옥틸, 인데닐, 인다닐, 디히드로인돌릴, 티오디히드로인돌릴, 2-, 3- 또는 4-피페리드(인)일로 이루어지는 군 중에서 선택되고; Y는 CH, 질소 및 불포화 탄소로 이루어지는 군 중에서 선택되고; Z는 산소, 질소, 황,



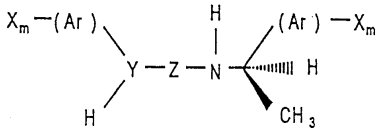
(여기서, n은 각기 독립적으로 1 내지 4이고, m은 각기 독립적으로 0 내지 5임)로 이루어지는 군 중에서 선택된다.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 소수성 기가 페닐, 2-, 3- 또는 4-피리딜, 1- 또는 2-나프틸, 1- 또는 2-퀴놀리닐, 2- 또는 3-인돌릴, 벤질 및 페녹시로 이루어지군 중에서 선택되는 조성물.

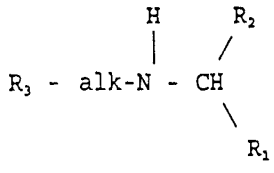
청구항 3.

제2항에 있어서, 상기 화합물이 다음 화학식을 갖는 R-에난티오머 또는 그의 제약상 허용가능한 염인 조성물.



청구항 4.

다음 일반식의 화합물 또는 그의 제약상 허용되는 염의 유효량을 포함하는, 신장 질환, 피부 질환, 혈액 응고 장애, 위장관 질환, 엔도크린성 질환, 비정상적인 물 대사, 유방암, 직장암 및 심장혈관계 질환(단, 상기 질환 또는 장애가 심장 혈관계 질환인 경우, 그 질환 또는 장애는 고혈압은 아님)으로 이루어진 군중에서 선택된 질환 또는 장애를 가진 환자의 치료용 제약 조성물



상기 식에서, alk는 탄소 원자수 1 내지 6의 직쇄 또는 분지쇄 알킬렌이고; R_1은 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬, 또는 1 내지 7개의 할로겐 원자로 치환된 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 할로알킬이고; R_2 및 R_3은 OCF_3, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬, 1 내지 7개의 할로겐원자로 치환된 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 할로알킬, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬아미도, 시아노, 히드록시, 탄소 원자수 2 내지 4의 아실, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 히드록시알킬 및 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 티오알킬로 이루어지는 군중에서 각각 독립적으로 선택된 1 내지 5개의 치환체에 의해 임의로 치환된, 5- 또는 6원 고리를 갖는 일환식 또는 이환식 카르보시클릭아릴 또는 시클로알킬기 중에서 독립적으로 선택된다.

청구항 5.

제4항에 있어서, R_1은 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬이고; R_2는 나프틸,또는 1 내지 5개의 치환체로 치환된 페닐이고, R_3는 시클로헥실, 나프틸, 또는 1 내지 5개의 치환체로 임의로 치환된 페닐이고, 여기서 각 R_2 및 R_3의 치환체는 OCF_3, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬, 1 내지 7개의 할로겐 원자로 치환된 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 할로알킬, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알콕시, 할로겐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아미도, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬아미도, 시아노, 히드록시, 탄소 원자수 2 내지 4의 아실, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 히드록시알킬 및 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 티오알킬로 이루어지는 군 중에서 독립적으로 선택되는 조성물.

청구항 6.

제5항에 있어서, R_1은 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬이고; R_2는 나프틸,또는 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬, 1 내지 7개의 할로겐원자로 치환된 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 할로알킬, 탄소 원자수 1 내지 알콕시, 할로겐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아미도, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬아미도, 시아노, 히드록시, 탄소 원자수 2 내지 4의 아실, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 히드록시알킬 및 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 티오알킬로 이루어지는 군 중에서 각각 독립적으로 선택된 1 내지 5개의 치환체로 임의로 치환된 페닐이고; R_3는 시클로헥실, 나프틸, 또는 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬, 1 내지 7개의 할로겐 원자로 치환된 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 할로알킬 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알콕시, 할로겐, 니트로, 아미노, 알킬아미노, 아미도, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 알킬아미도, 시아노, 히드록시, 탄소 원자수 2 내지 4의 아실, 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 히드록시알킬 및 탄소 원자수 1 내지 3의 저급 티오알킬로 이루어지는 군 중에서 각각 독립적으로 선택된 1 내지 5개의 치환체로 임의로 치환된 페닐인 조성물.

청구항 7.

제6항에 있어서, R_1이 메틸이고 alk는 n-프로필렌인 조성물.

청구항 8.

제6항에 있어서, R_1이 메틸이고 alk는 1, 1-에틸리딘인 조성물.

청구항 9.

제6항에 있어서, R_1이 메틸이고 alk는 2, 4-부틸렌인 조성물.

청구항 10.

제6항에 있어서, R_1이 메틸이고 alk는 1, 3-부틸레인 조성물.

청구항 11.

제6항에 있어서, R_1이 메틸이고 alk는 메틸레인 조성물.

청구항 12.

제5항에 있어서, R_3가 나프틸인 조성물.

청구항 13.

제5항에 있어서, R_3가 임의로 치환된 페닐인 조성물.

청구항 14.

제13항에 있어서, R_2가 나프틸인 조성물.

청구항 15.

제13항에 있어서, R_2가 치환된 페닐인 조성물.

청구항 16.

제15항에 있어서, R_2가 메타-메톡시 페닐인 조성물.

청구항 17.

제6항에 있어서, R_3가 나프틸인 조성물.

청구항 18.

제6항에 있어서, R_3가 임의로 치환된 페닐인 조성물.

청구항 19.

제18항에 있어서, R_2가 나프틸인 조성물.

청구항 20.

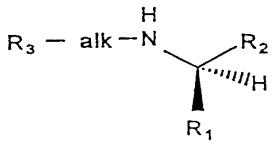
제18항에 있어서, R_2가 치환된 페닐인 조성물.

청구항 21.

제5항에 있어서, R_2가 메타-메톡시 페닐인 조성물.

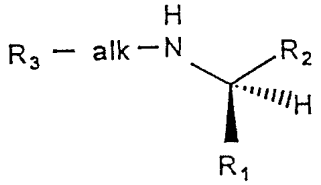
청구항 22.

제5항에 있어서, 화합물이 다음 절대 배열을 갖는 R 에난티오머 또는 그의 제약상 허용가능한 염인 조성물.



청구항 23.

제6항에 있어서, 화합물이 다음 절대 배열을 갖는 R 에난티오머 또는 그의 제약상 허용가능한 염인 조성물.



청구항 24.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 신장 질환 치료용인 조성물.

청구항 25.

제5항 내지 23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 피부 질환 치료용인 조성물.

청구항 26.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 심장혈관계 질환(단, 고혈압이 아님)치료용인 조성물.

청구항 27.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 혈액 응고 장애 치료용인 조성물.

청구항 28.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 칼슘 유사 화합물이고, 질환 또는 장애가 적은 혈소판 수를 특징으로 하는 혈액 응고 장애인 조성물.

청구항 29.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 칼슘 길항 화합물이고, 질환 또는 장애가 고응집성을 특징으로 하는 혈액 응고 장애인 조성물.

청구항 30.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 위장관 질환의 치료용인 조성물.

청구항 31.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 조성물이 엔도크린성 질환의 치료용인 조성물.

청구항 32.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 칼슘 유사 화합물이고, 질환 또는 장애가 건선인 조성물.

청구항 33.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 비정상적인 물 대사의 치료용인 조성물.

청구항 34.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 직장암의 치료용인 칼슘 유사 화합물인 조성물.

청구항 35.

제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 유방암의 치료용인 칼슘 유사 화합물인 조성물.

청구항 36.

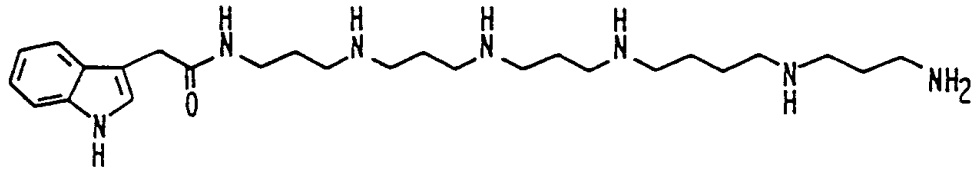
제5항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 화합물이 신장 칼슘 결석 질환의 치료용인 칼슘 유사 화합물인 조성물.

청구항 37.

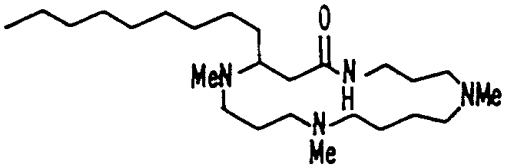
(정정) 제1항 또는 제2항에 있어서, 화합물이 신장 결석 치료용인 칼슘 길항 화합물인 조성물.

도면

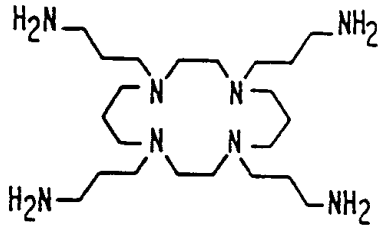
도면 1a



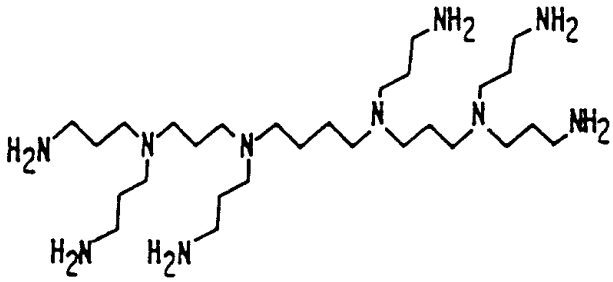
NPS 019



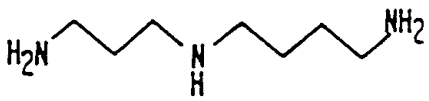
부드먼키아민 A (+3)



NPS 383 (+8 EC_{50}=150μM)



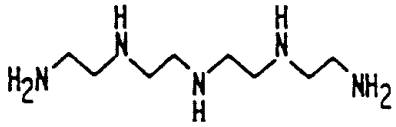
NPS 381 (+10 EC_{50}=100μM)



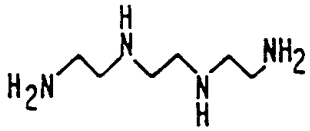
스페르미딘 +3



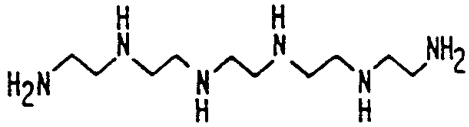
1,12-디아미노도데칸 - 2
(DADD)



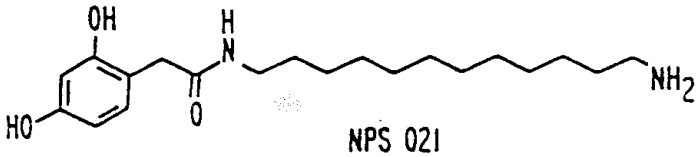
테트라에틸렌펜타민 (+5 EC_{50}=2500μM)



트리에틸렌테트라민 (+4 EC_{50}=8000μM)

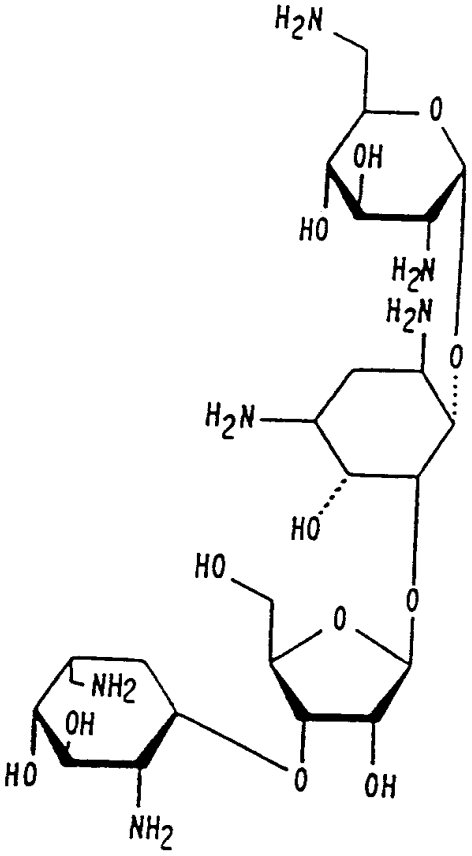


펜타에틸렌헥사민 (+6 EC_{50}=500μM)

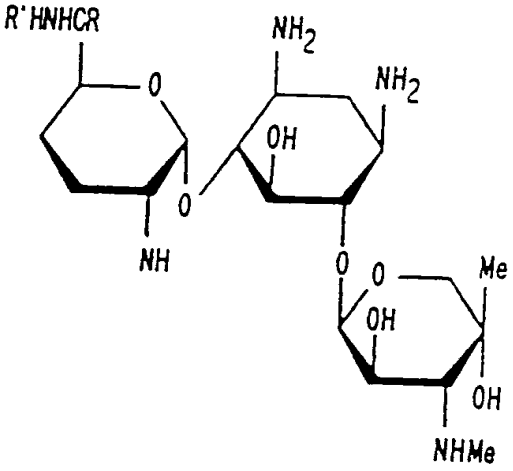


NPS 021

도면 1b



네오마이신 B (+6)

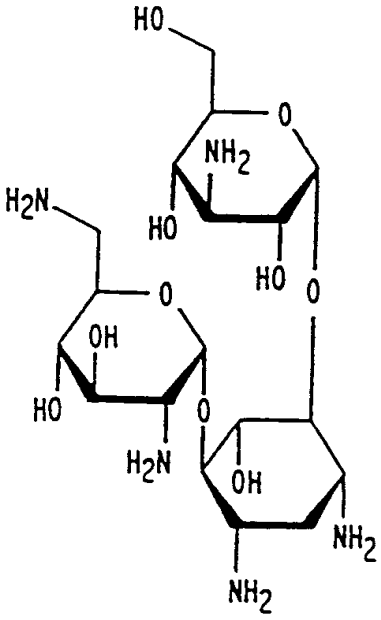


젠타마이신 (복합체 +5)

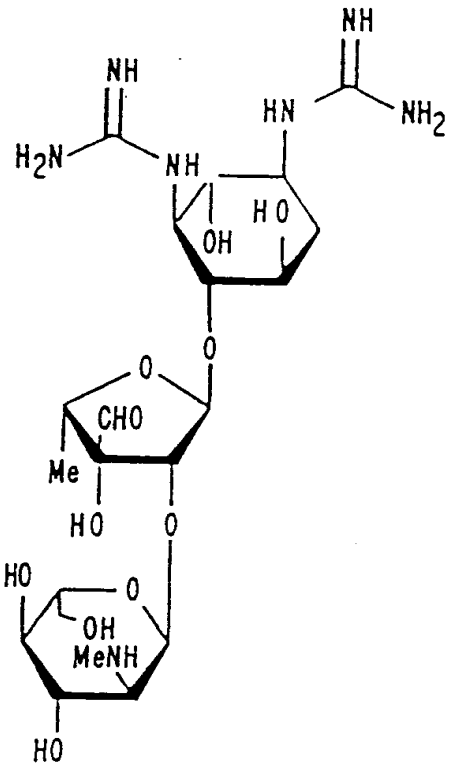
C1 R = R' = Me

C2 R = Me; R' = H

C1aR = R' = H

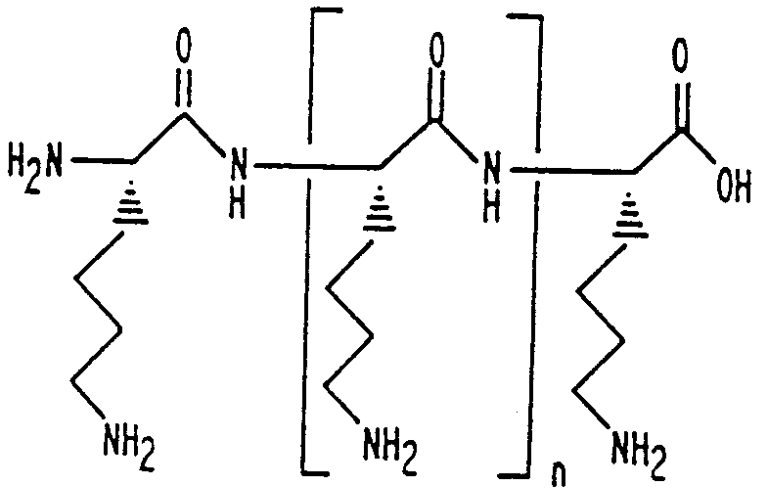


베카나마이신 (+5)

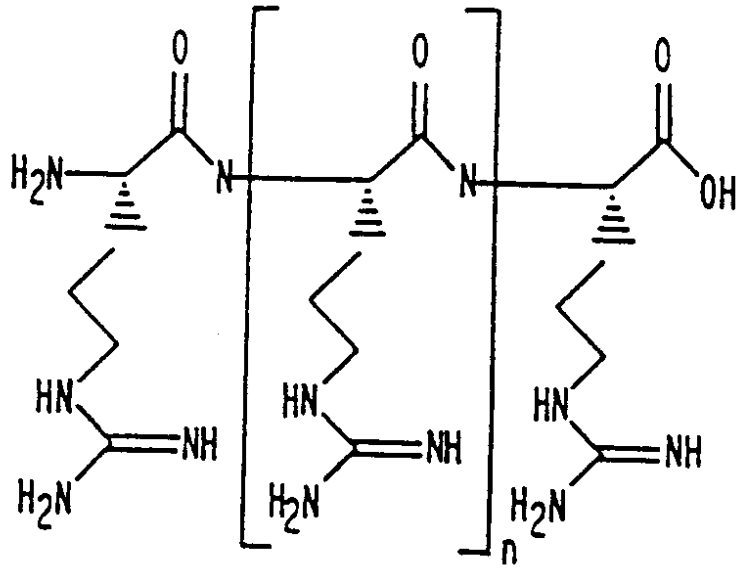


스트렙토마이신 (+3)

도면 1c



폴리-Lys (27kD) n=210 +210
폴리-Lys (14kD) n=110 +110
폴리-Lys (38kD) n=55 +55

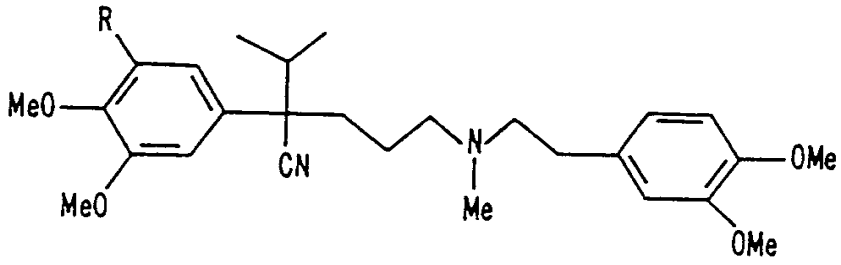


폴리-Arg (100kD) n=640 +640
폴리-Arg (40kD) n=256 +256

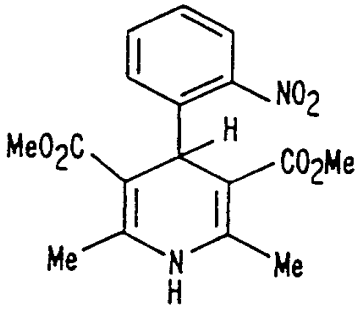
프로타민 +21

H N-Pro-Arg-Arg-Arg-Arg-Ser-Ser-Ser-Arg-Pro-Val-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-
Pro-Arg-Val-Ser-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Gly-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-OH

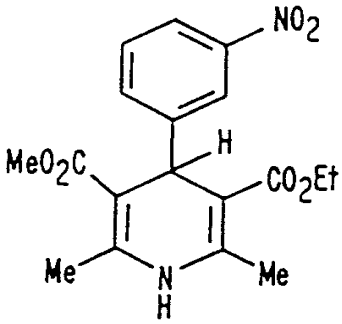
도면 1d



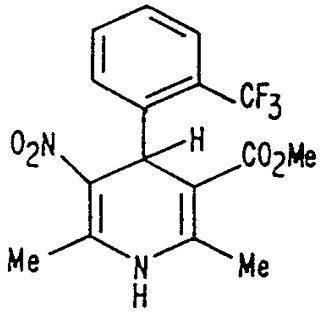
베라파밀 R=H +1
D-600 R=OMe +1



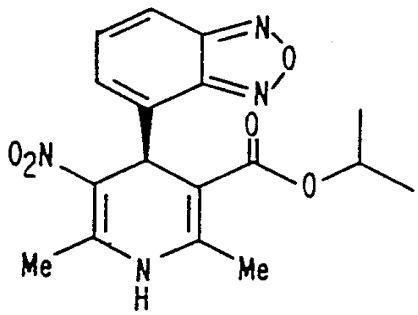
니페디핀 +1



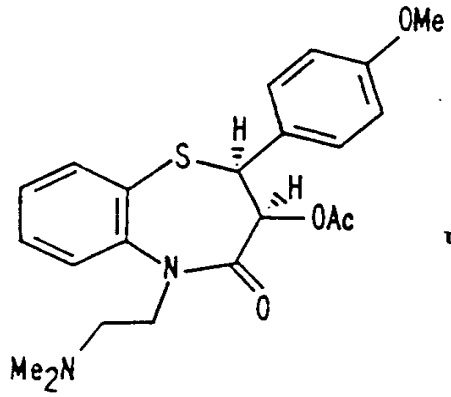
니트렌디핀 +1



BAY K 8644 +1

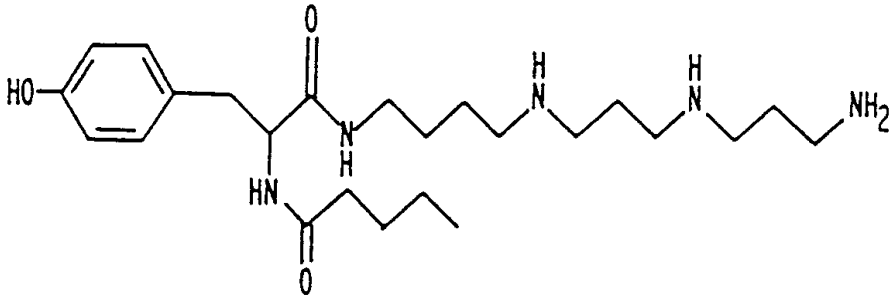


202-791 +1

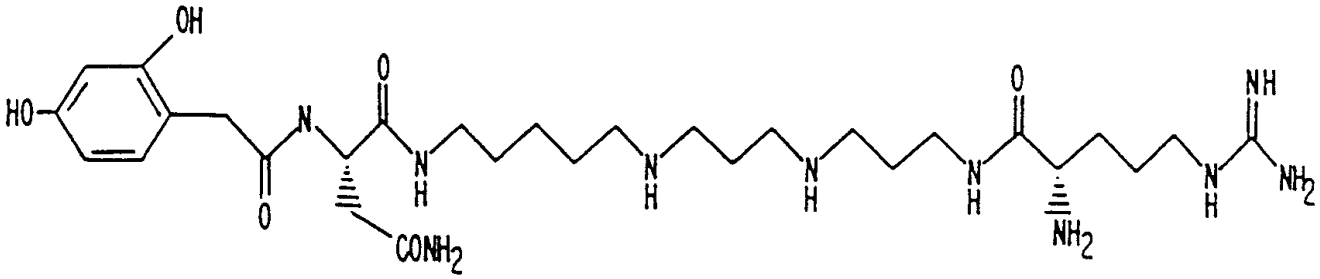


딜피아젬 +1

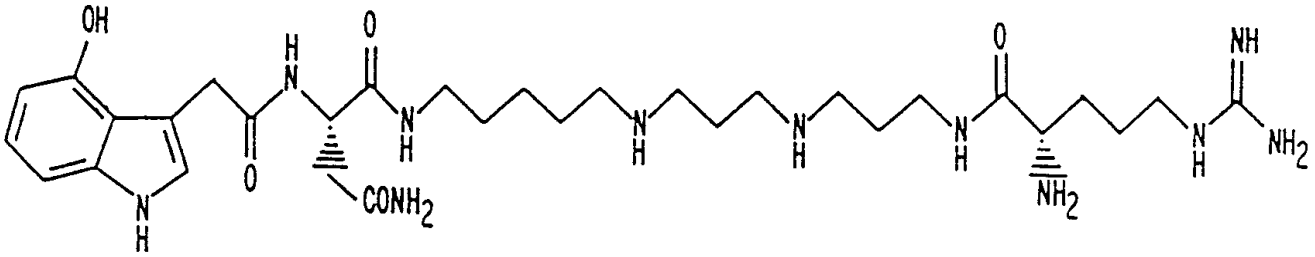
도면 1e



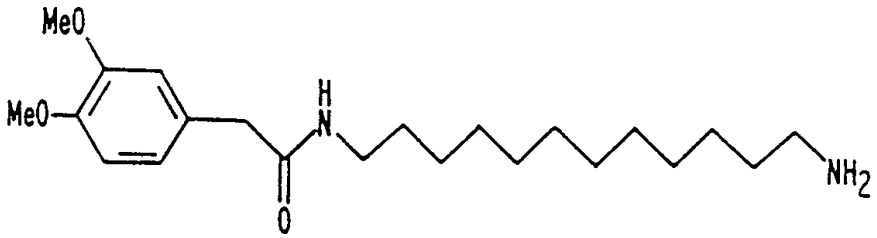
필란토톡신 433 +3



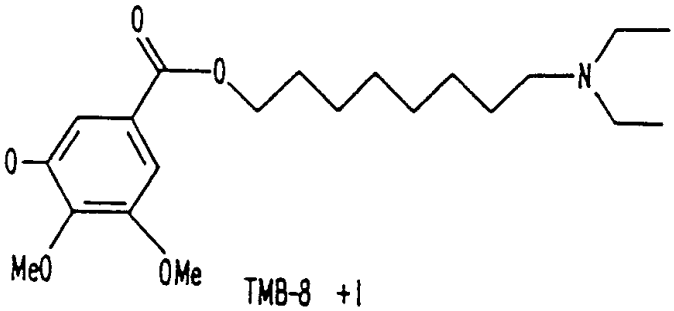
아르기오톡신 636 +4



아르기오톡신 659 +4

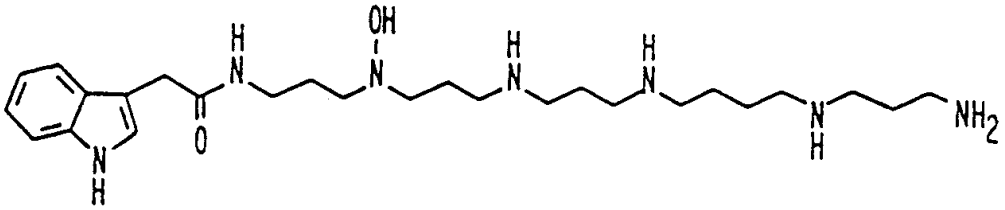


NPS 384

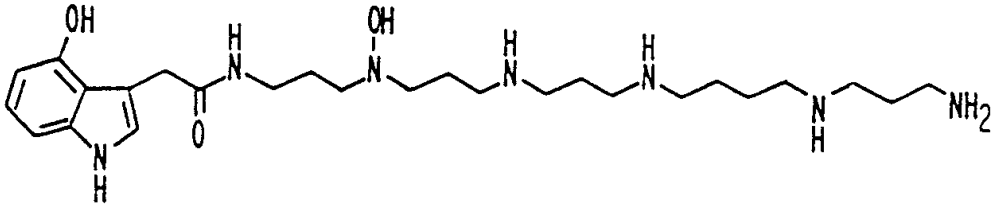


TMB-8 +1

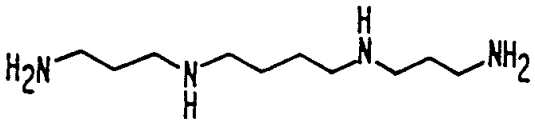
도면 1f



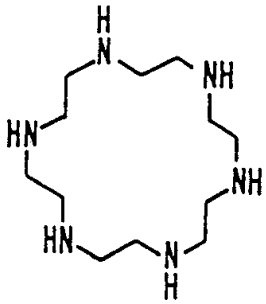
AGA 489



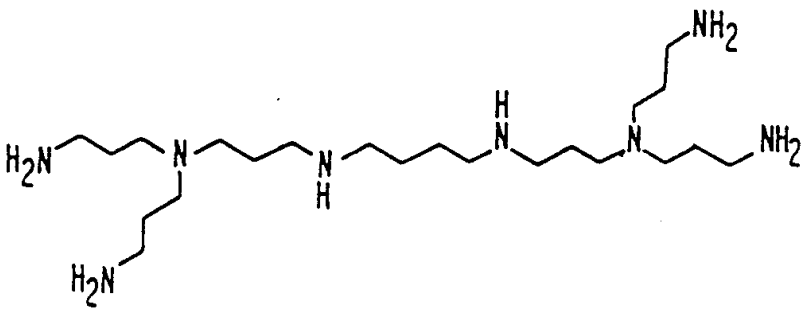
AGA 505



스페르민 141.148

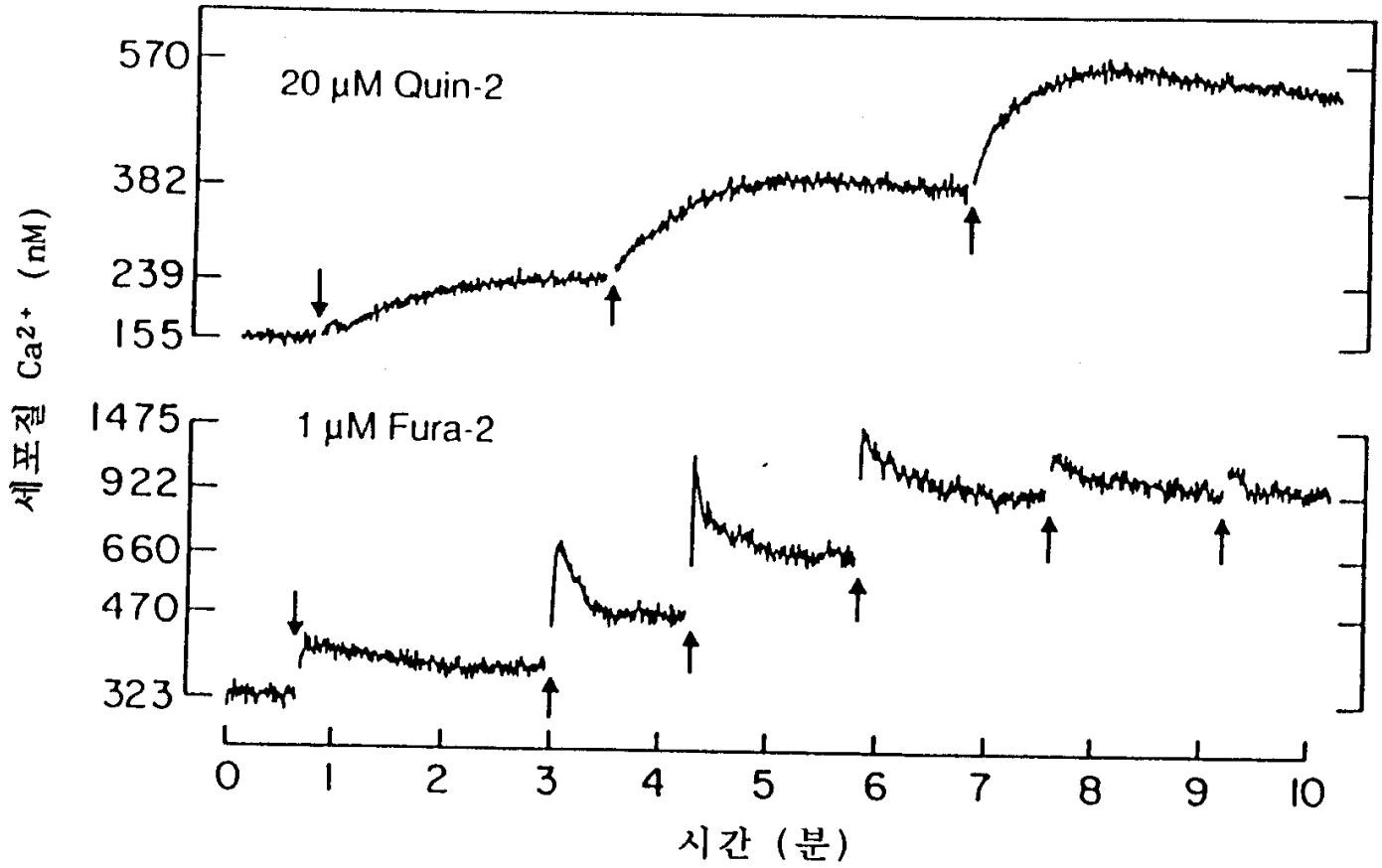


헥사시클렌 20.9

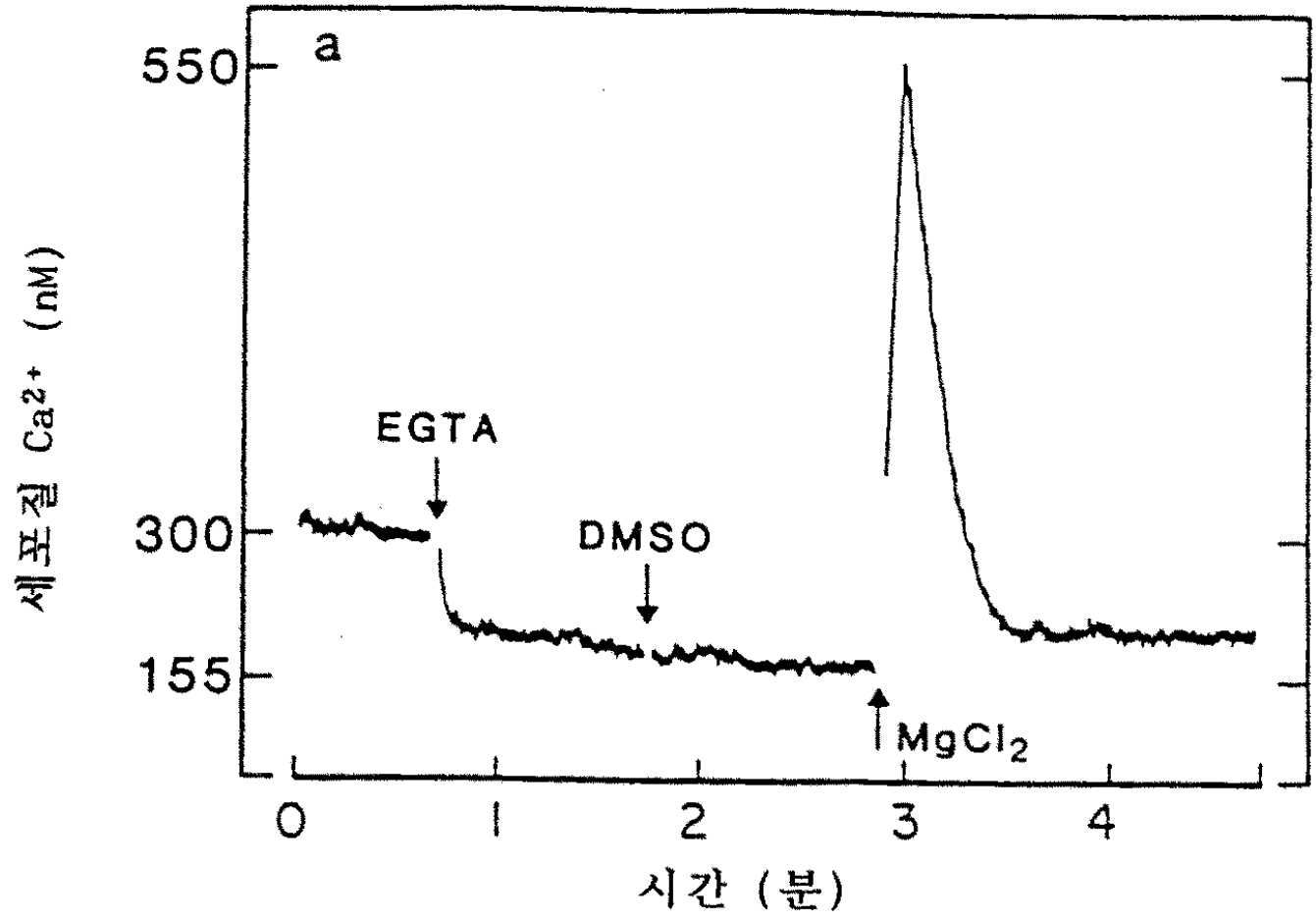


NPS 382 55.0

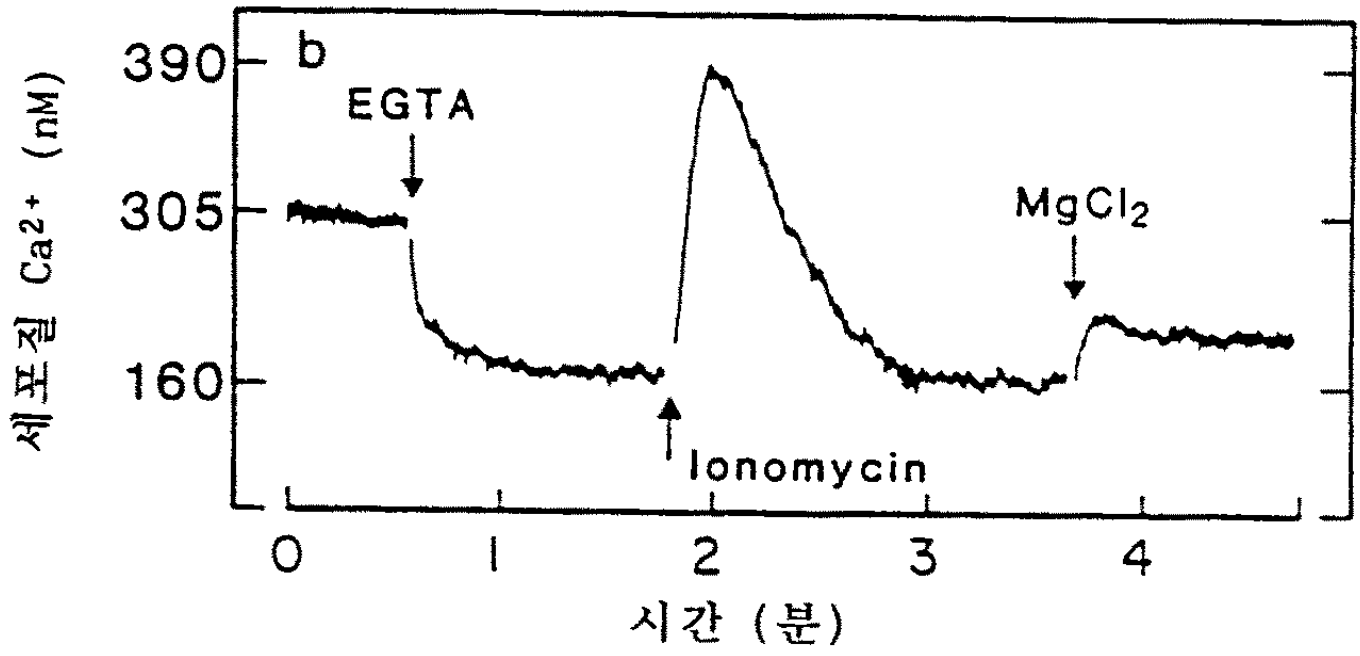
도면 2


570
382
239
155
20 μM Quin-2
1475
922
660
470
323
1 μM Fura-2
세포질 Ca^{2+} (nM)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
시간 (분)

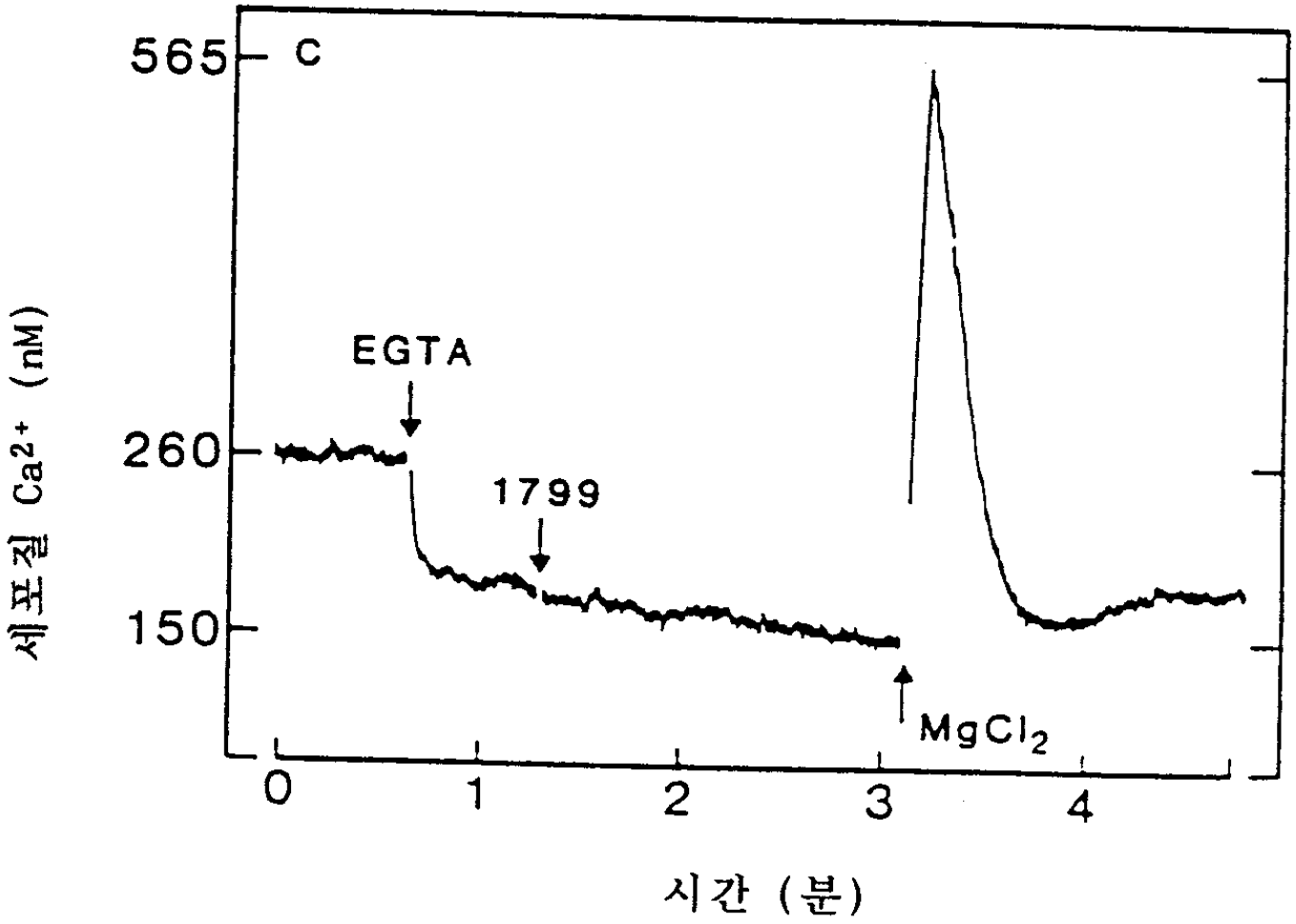
도면 3a


a
550
300
155
EGTA
DMSO
MgCl2
0
1
2
3
4
시간 (분)
세포질 Ca2+ (nM)

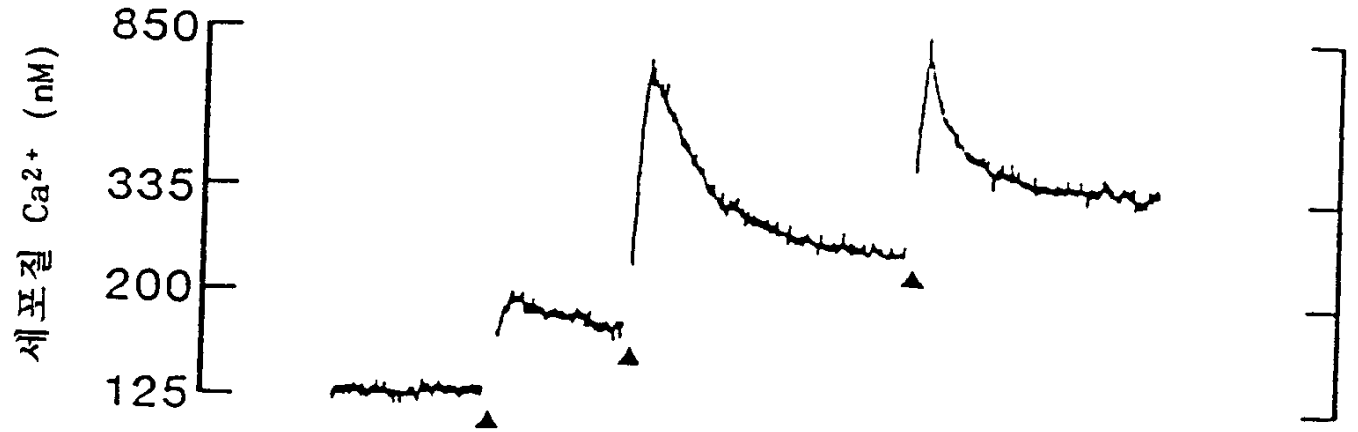
도면 3b


b
390
305
160
EGTA
MgCl2
Ionomycin
0
1
2
3
4
시간 (분)
세포질 Ca2+ (nM)

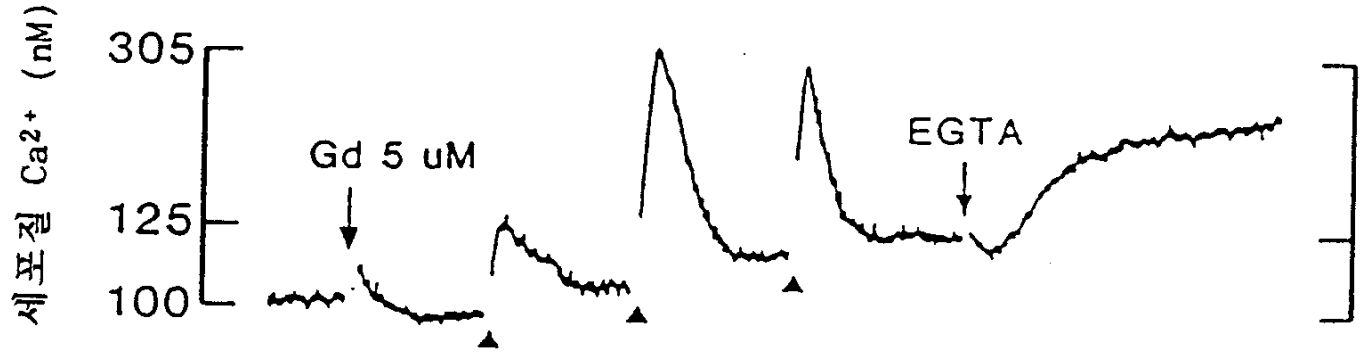
도면 3c


565
260
150
C
EGTA
1799
MgCl2
0
1
2
3
4
세포질 Ca2+ (nM)
시간 (분)

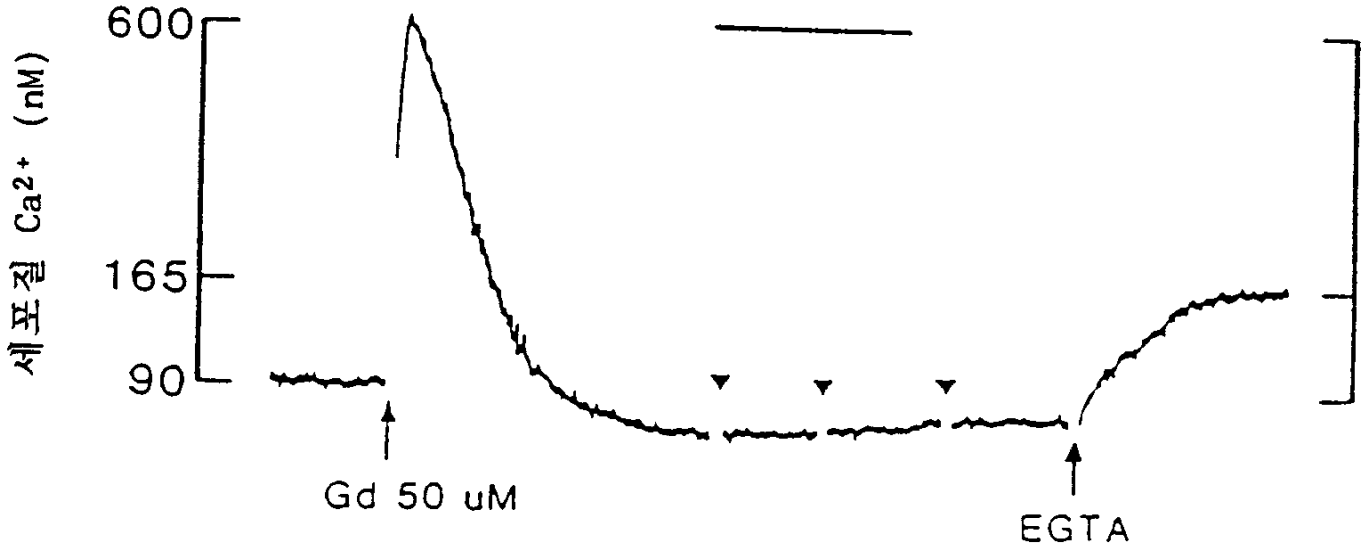
도면 4a


850
335
200
125
세포질 Ca2+ (nM)

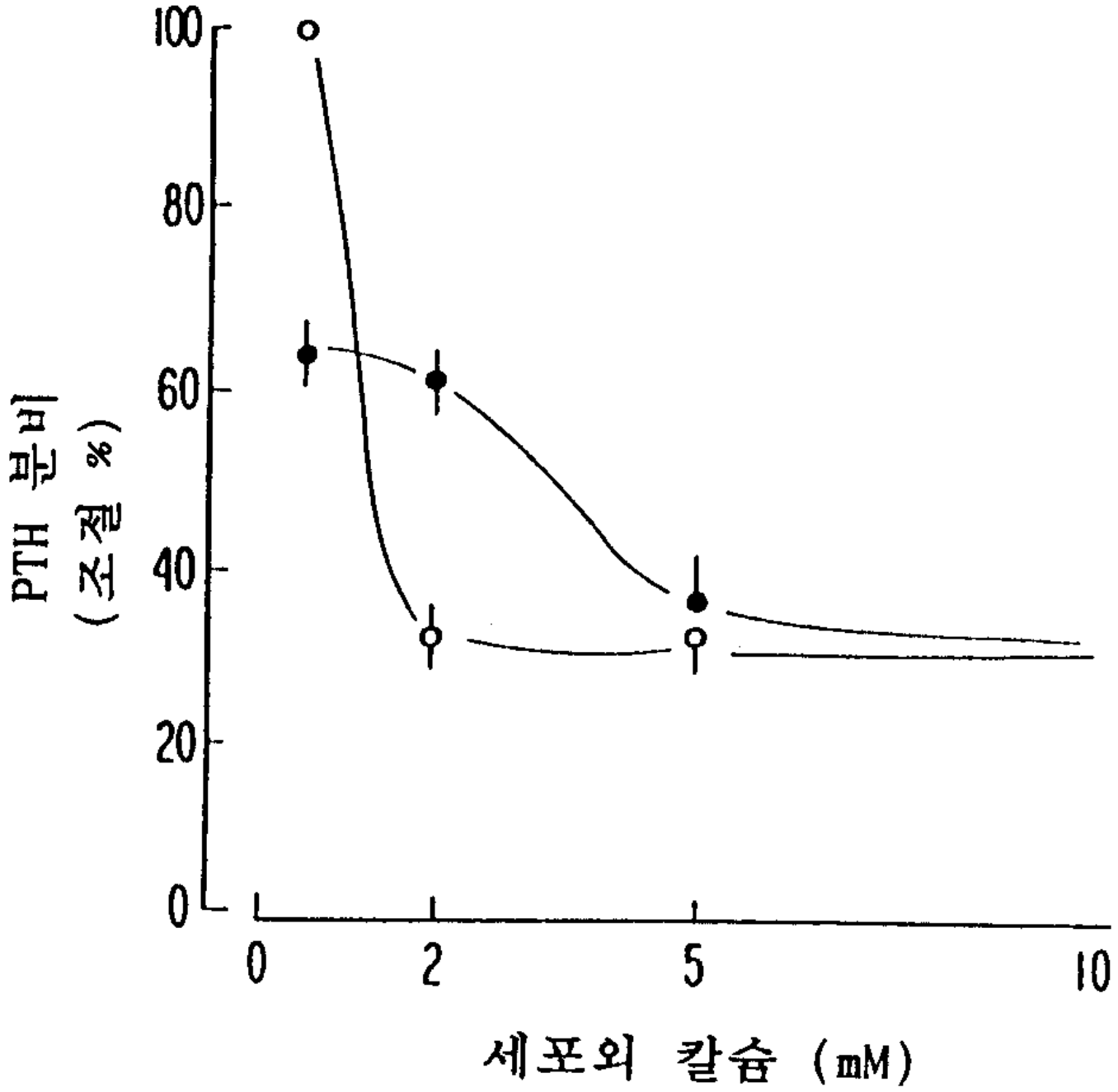
도면 4b


세포질 Ca2+ (nM)
305
125
100
Gd 5 uM
EGTA

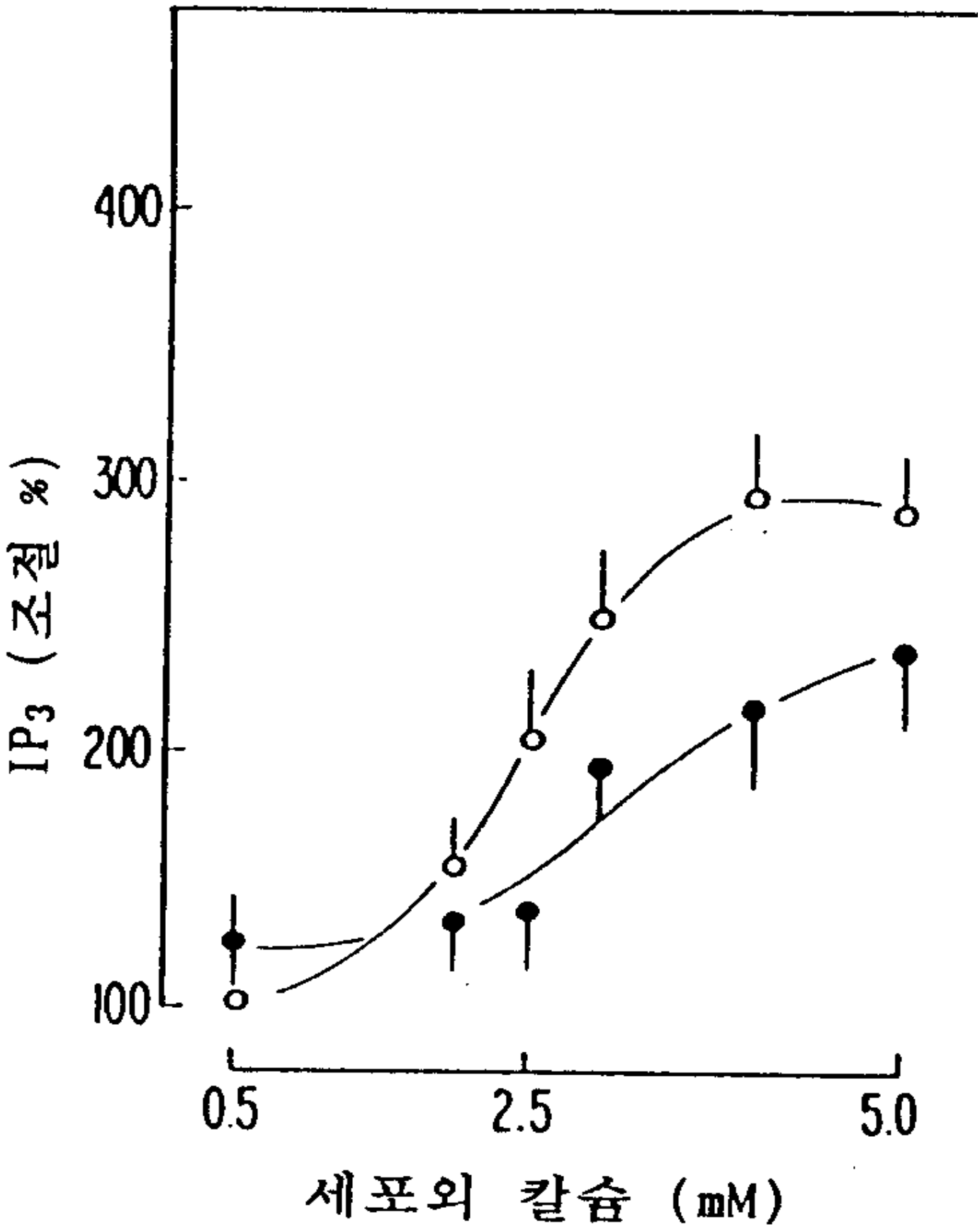
도면 4c


세포질 Ca2+ (nM)
600
165
90
Gd 50 uM
EGTA

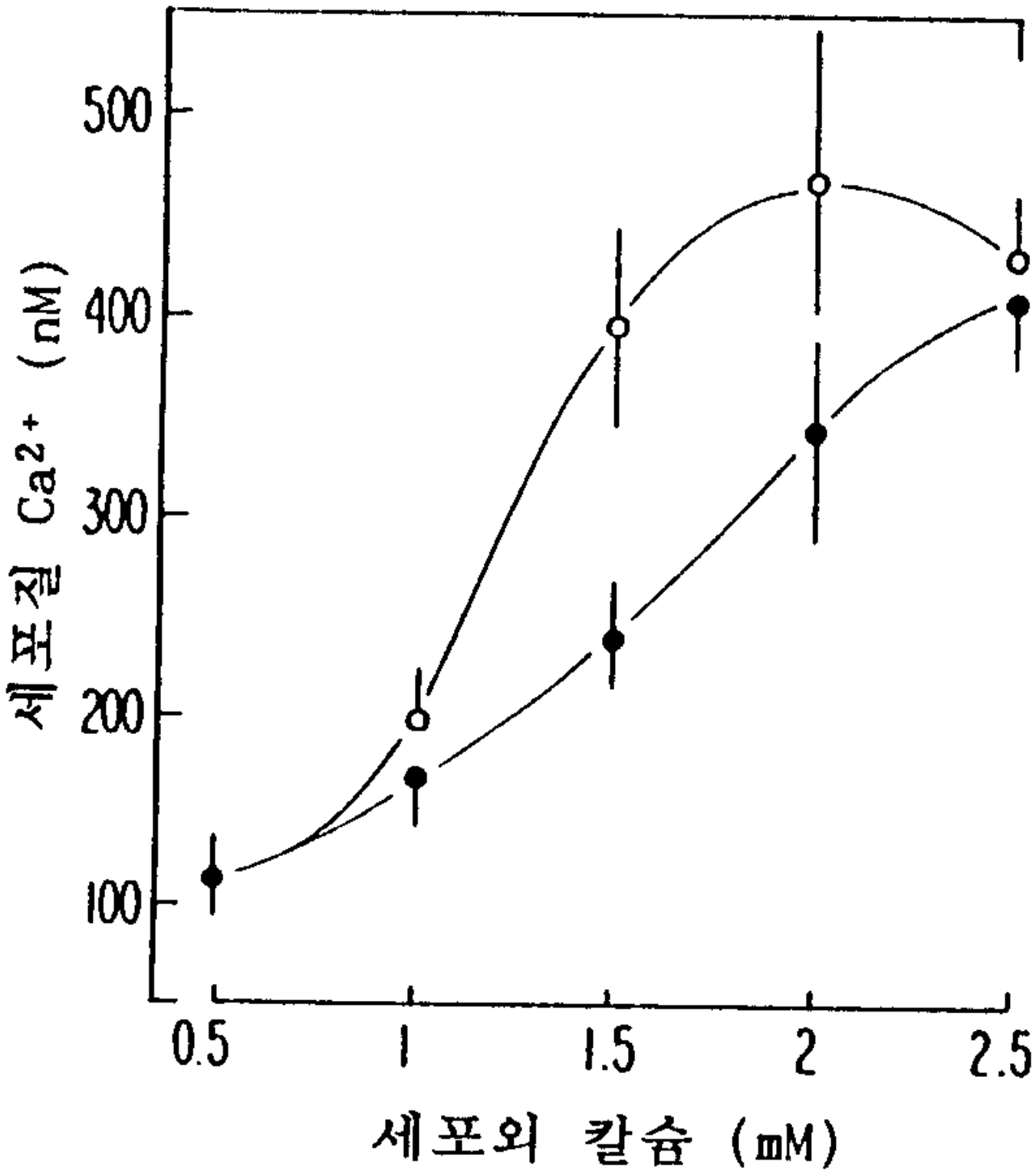
도면 5a



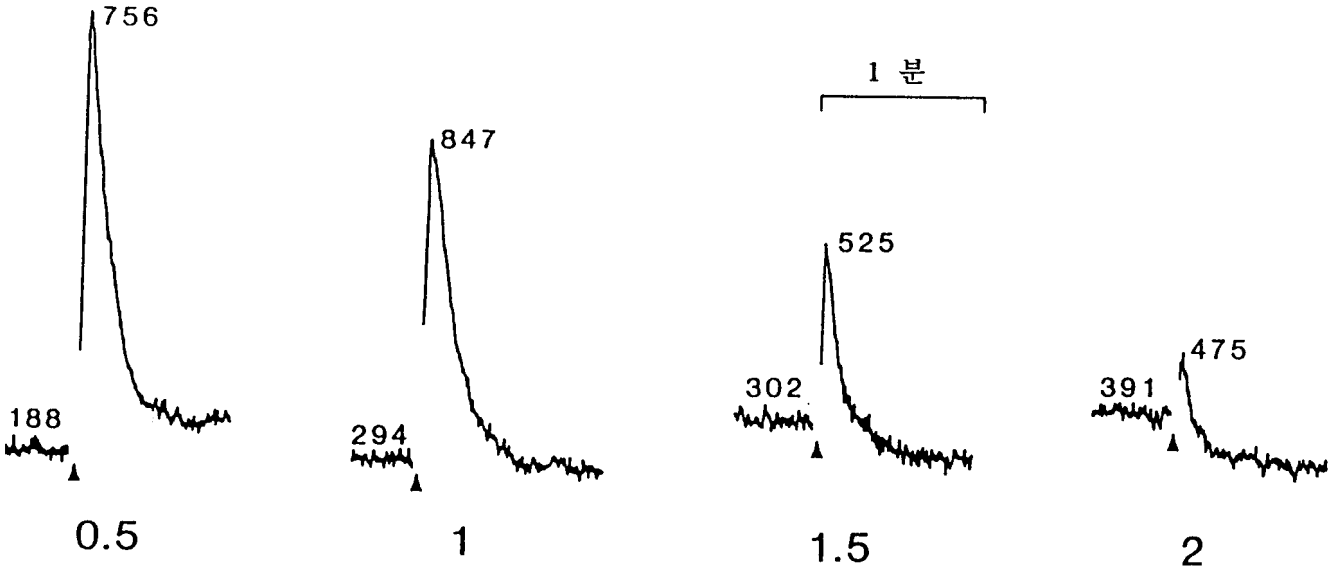
도면 5b



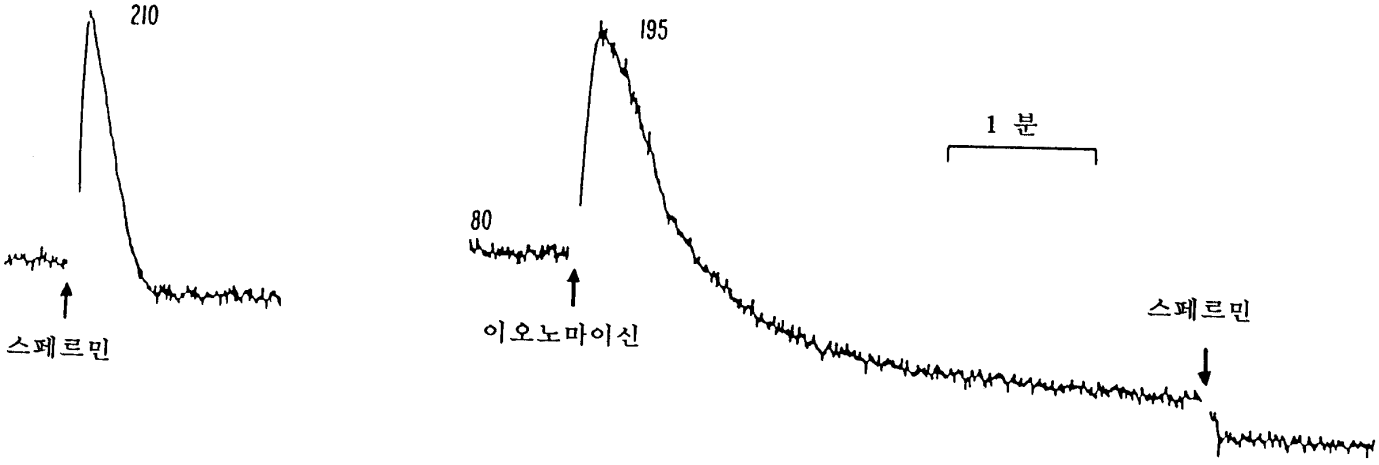
도면 5c



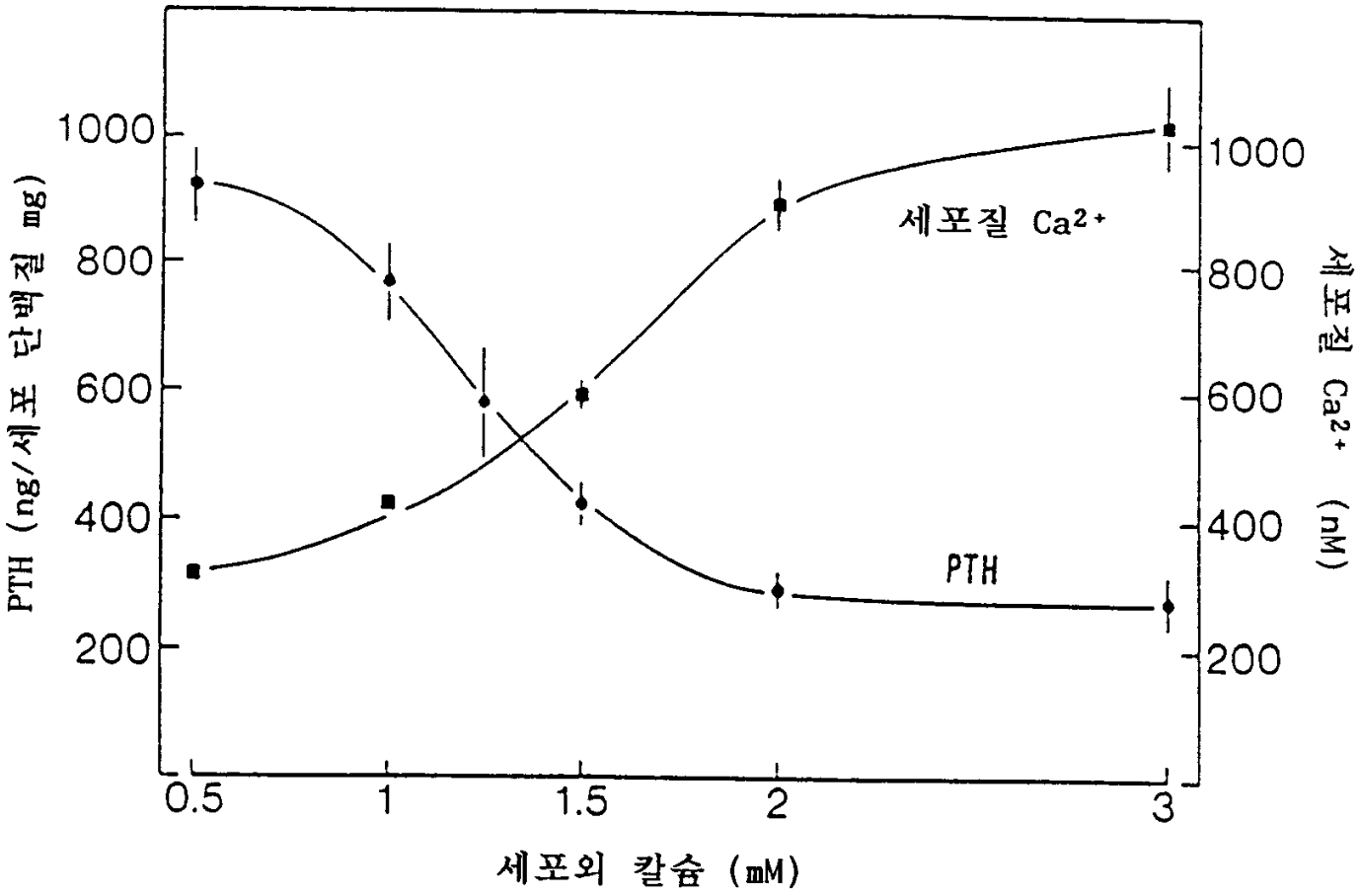
도면 6


756
188
847
294
1 분
525
302
475
391
0.5
1
1.5
2
세포외 칼슘 (mM)

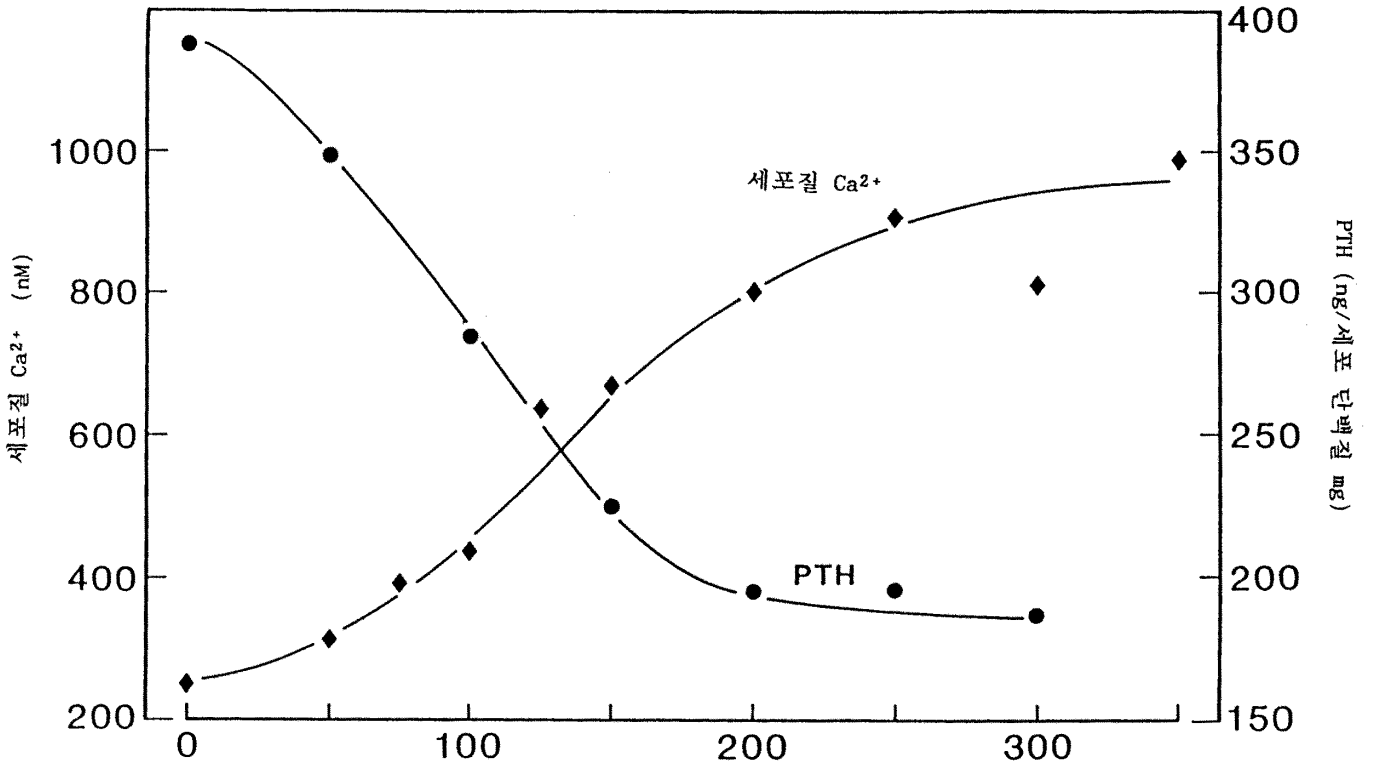
도면 7


210
스페르민
195
80
이오노마이신
1 분
스페르민

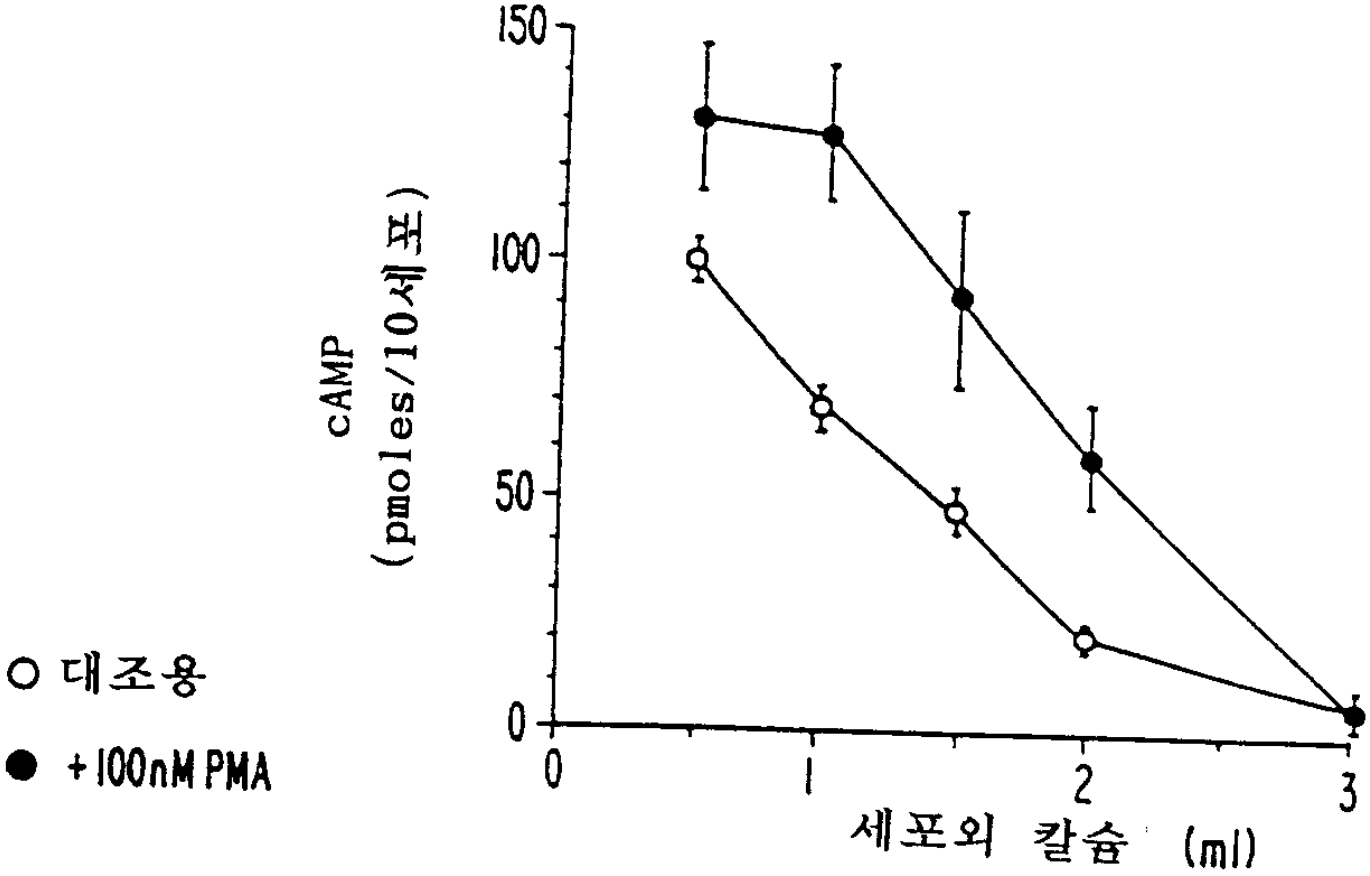
도면 8a


PTH (ng/세포 단백질 mg)
세포질 Ca2+ (nM)
세포질 Ca2+
PTH
세포외 칼슘 (mM)
1000
800
600
400
200
0.5
1
1.5
2
3

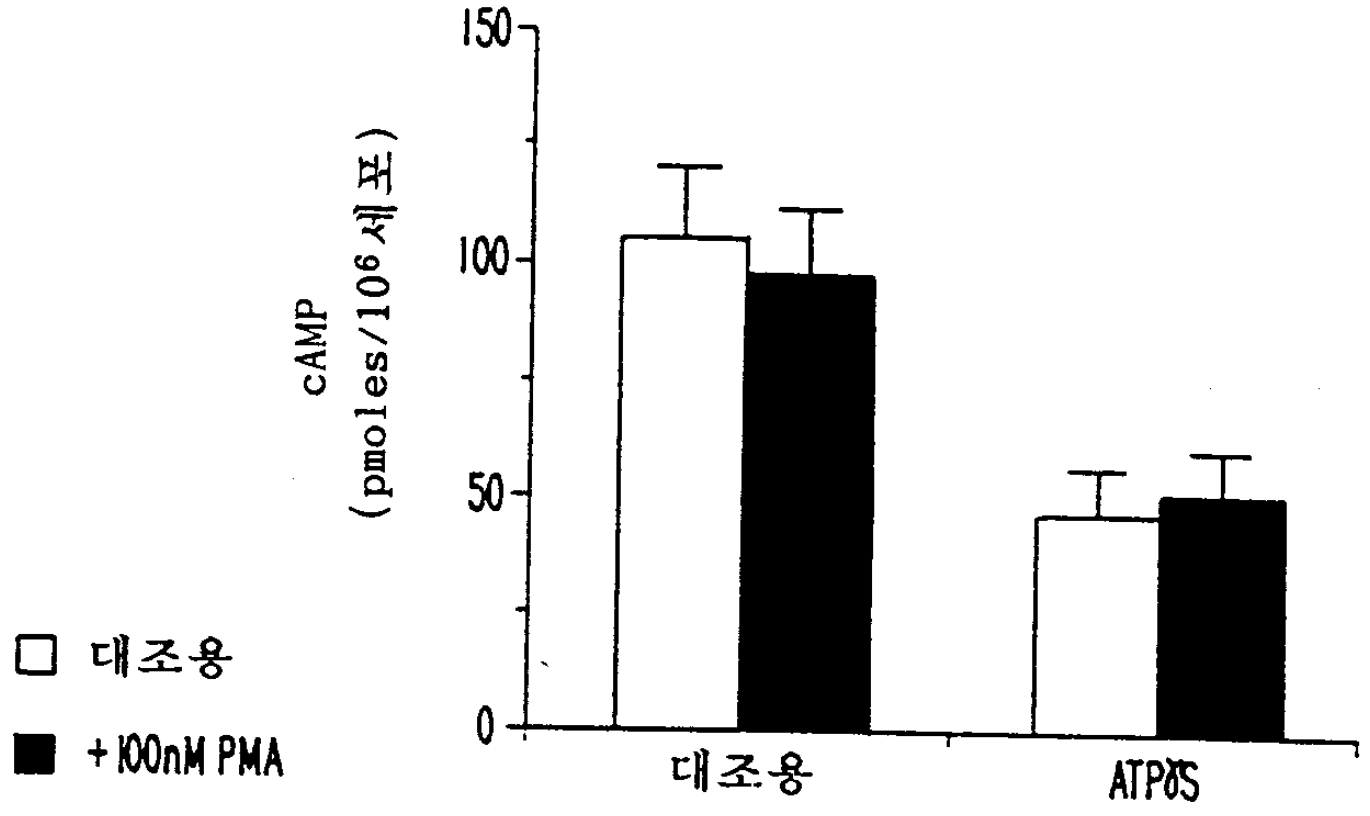
도면 8b


세포질 Ca2+ (nM)
PTH (ng/세포 단백질 mg)
세포질 Ca2+
PTH
스페르민 (μM)
1000
800
600
400
200
400
350
300
250
200
150
0
100
200
300

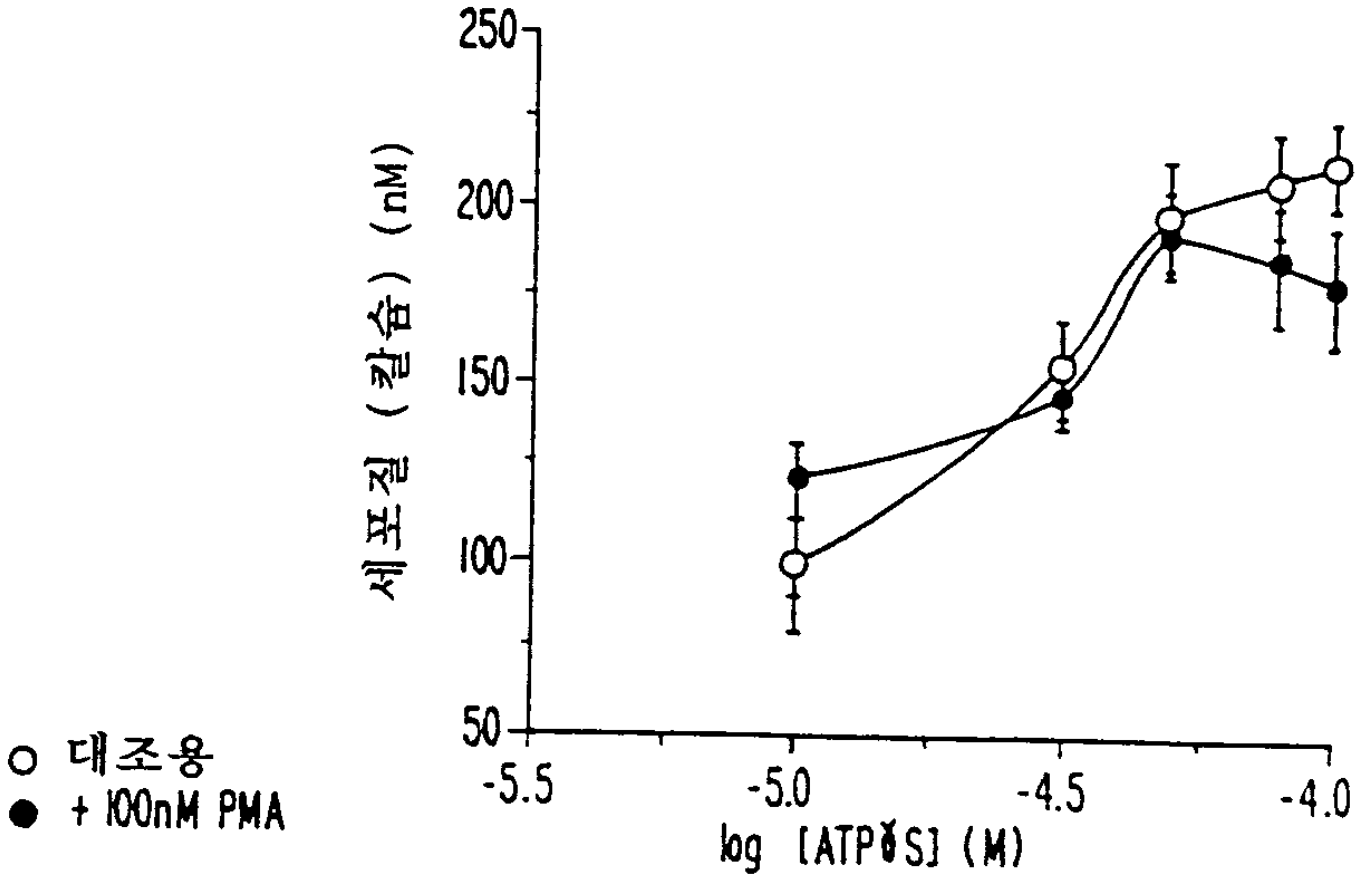
도면 9a


150
100
50
0
cAMP
(pmoles/10세포)
0
1
2
3
세포외 칼슘 (ml)
○ 대조용
● +100nM PMA

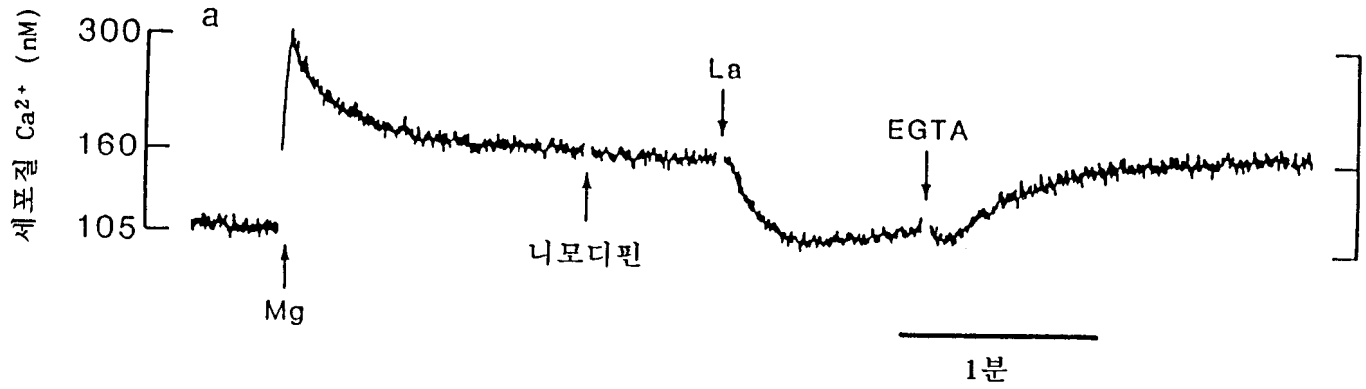
도면 9b


150
100
50
0
cAMP
(pmoles/10⁶세포)
대조용
ATPγS
□ 대조용
■ +100nM PMA

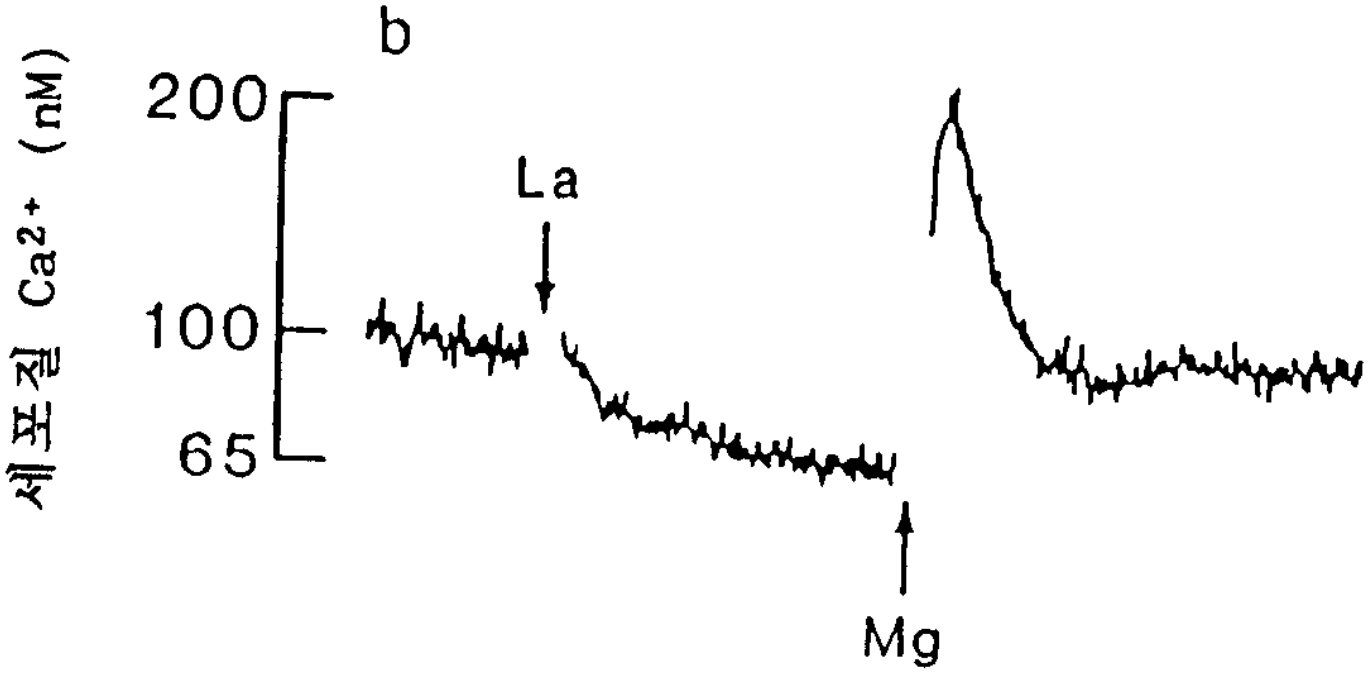
도면 9c


250
200
150
100
50
세포질 (칼슘) (nM)
-5.5
-5.0
-4.5
-4.0
log [ATPγS] (M)
○ 대조용
● + 100nM PMA

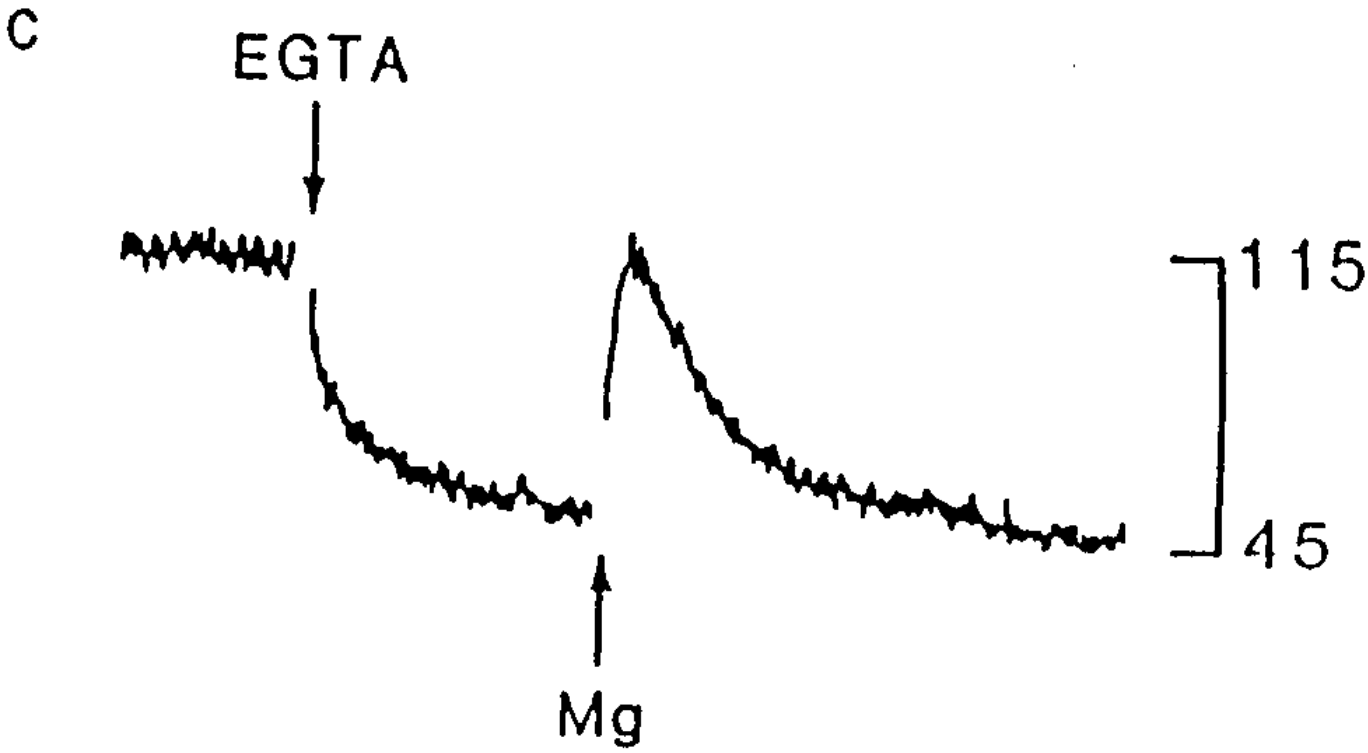
도면 10a


a
300
160
105
세포질 Ca2+ (nM)
Mg
니모디핀
La
EGTA
1분

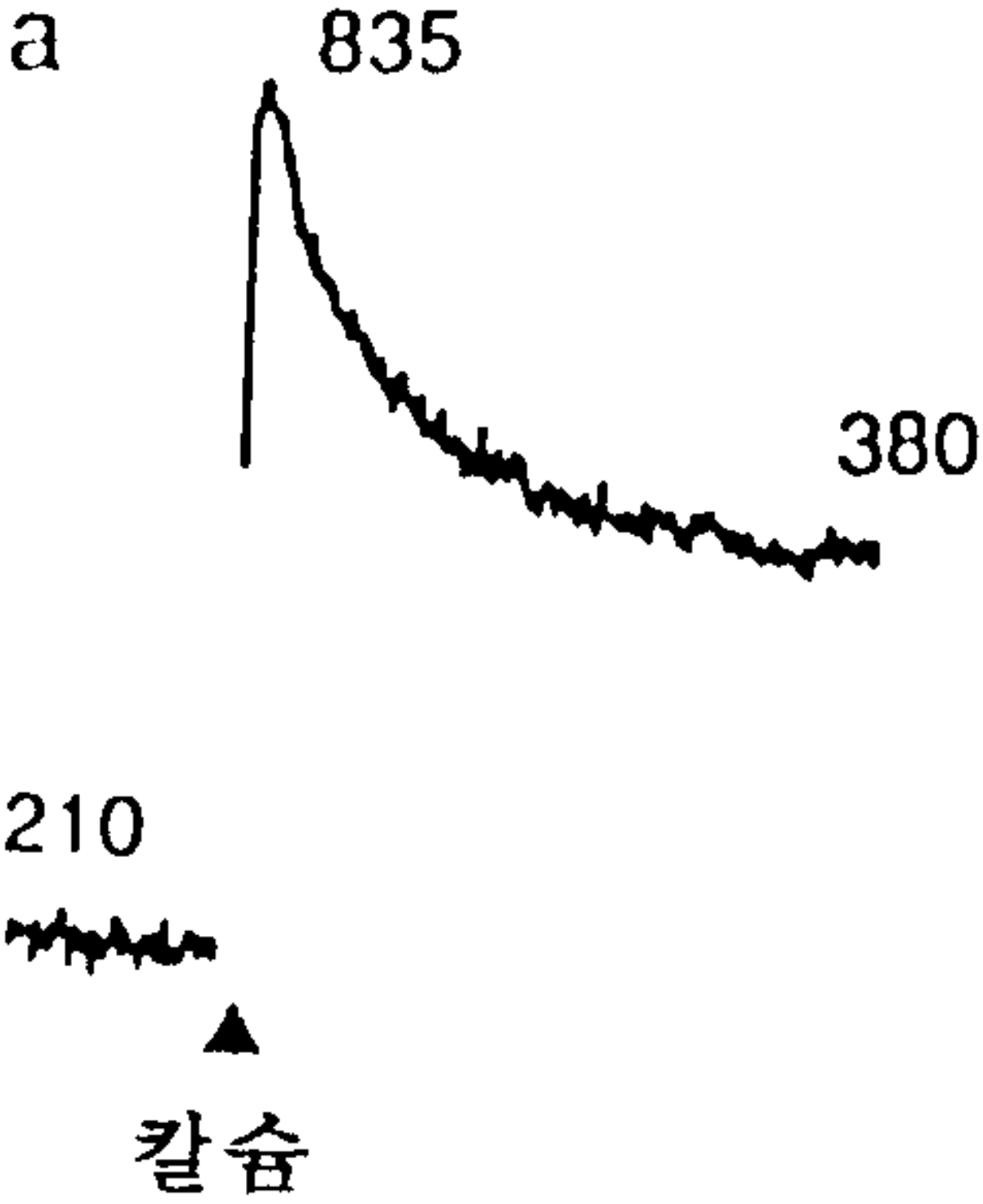
도면 10b



도면 10c



도면 11b



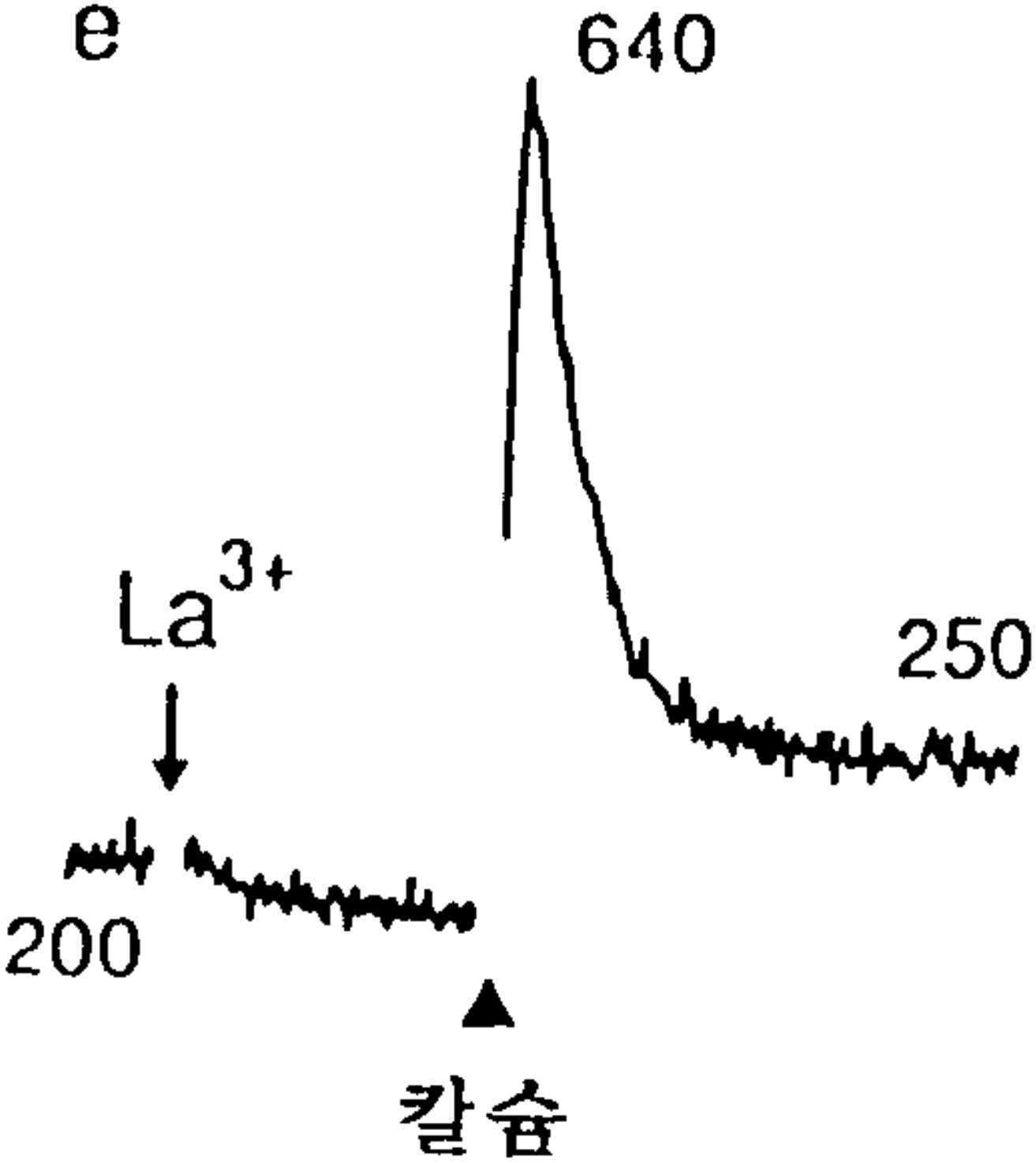
도면 11c



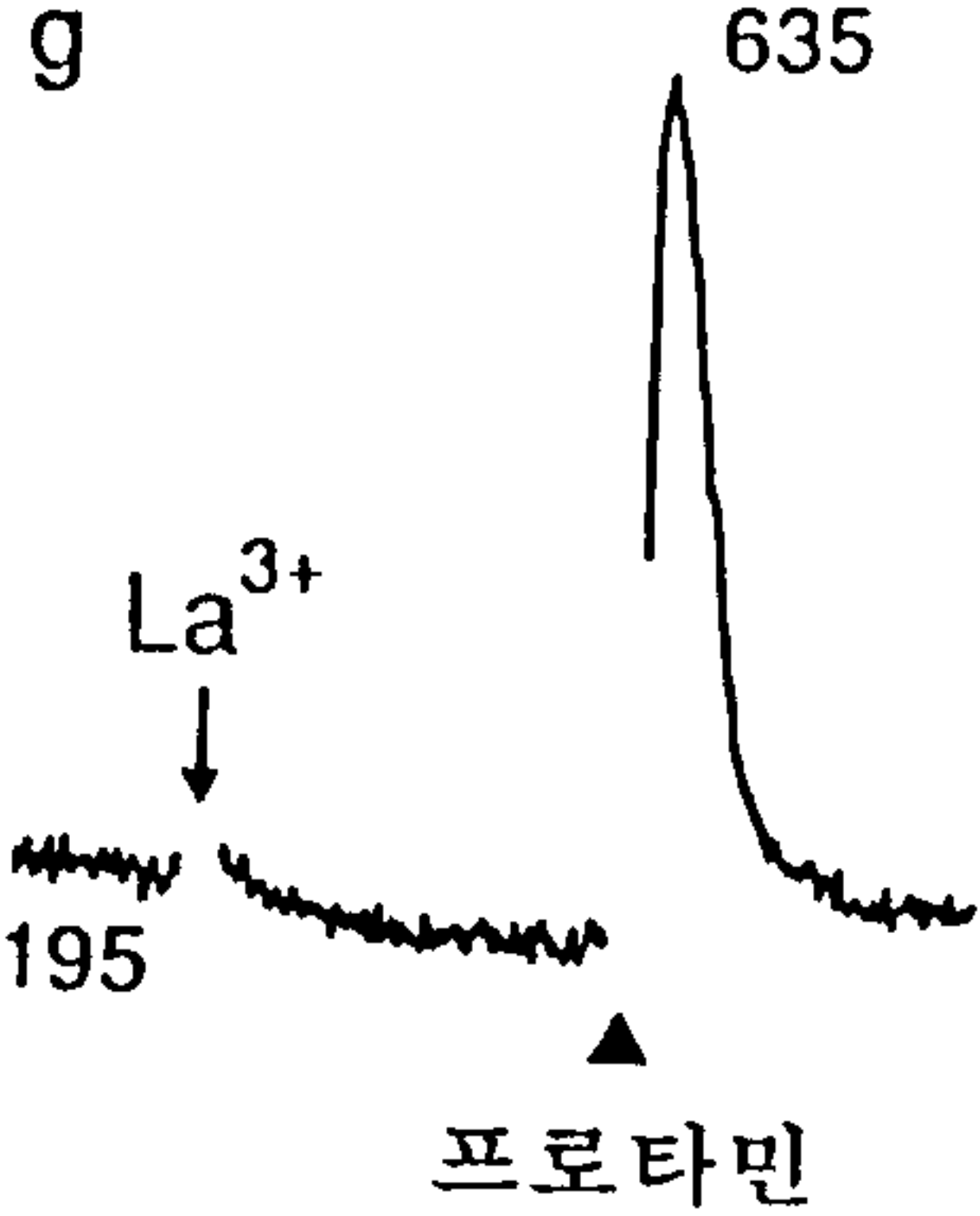
도면 11d



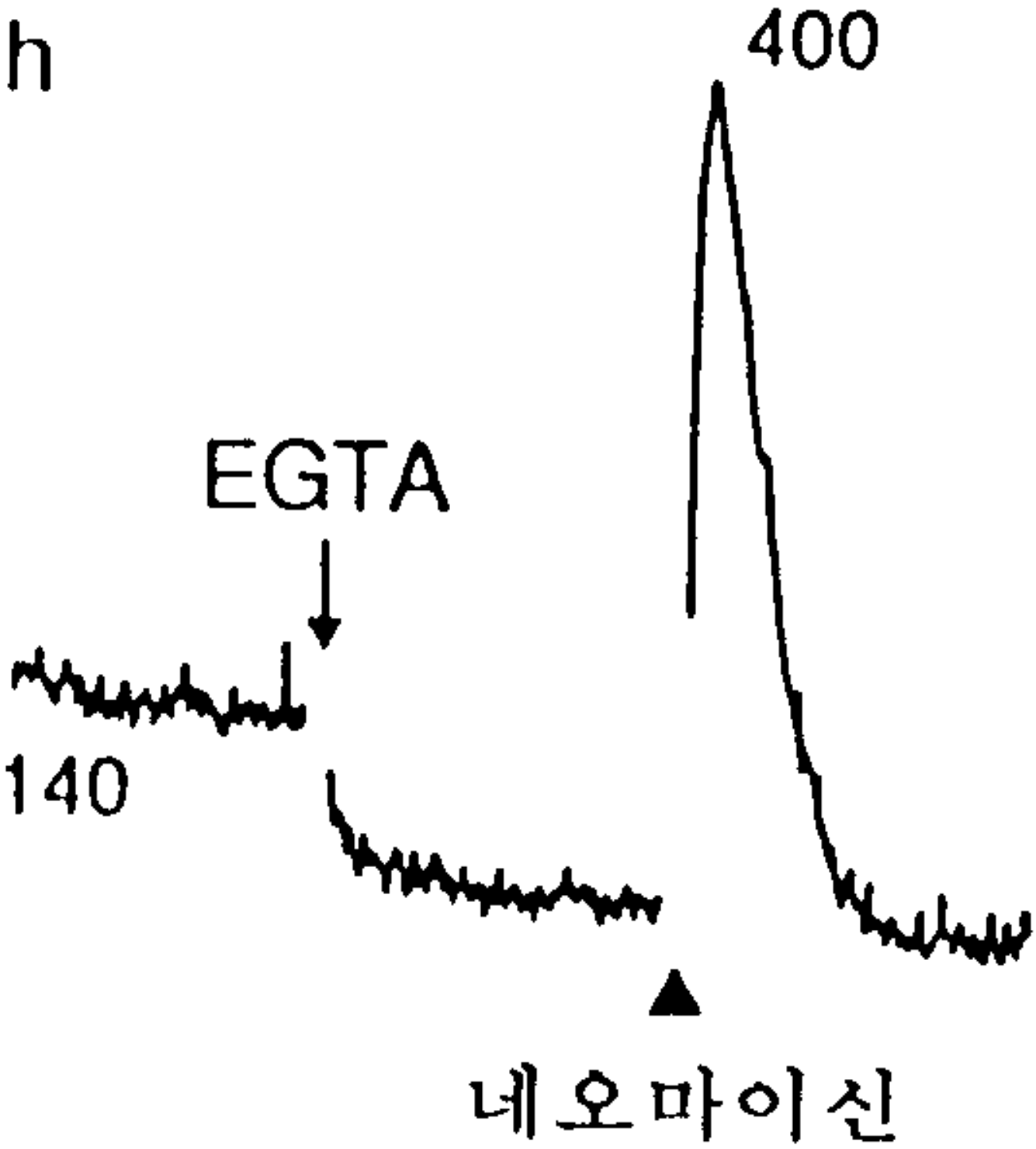
도면 11e



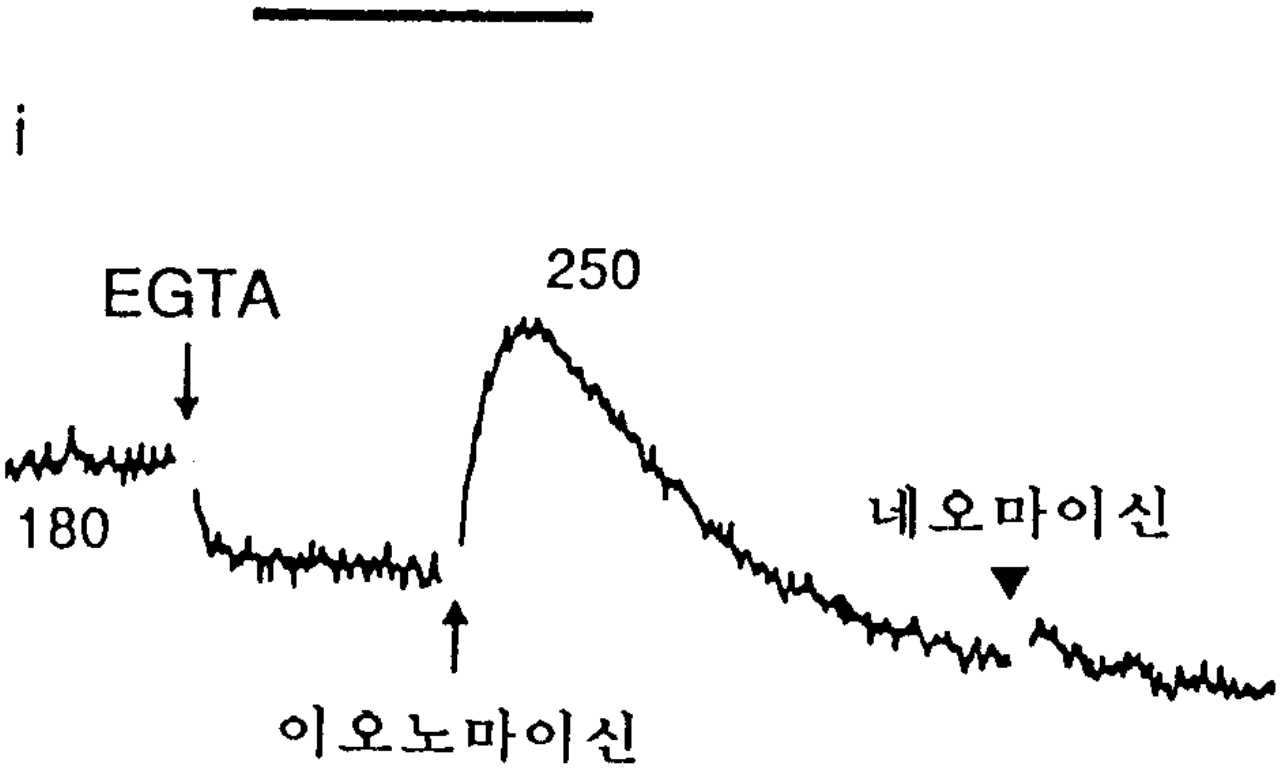
도면 11g



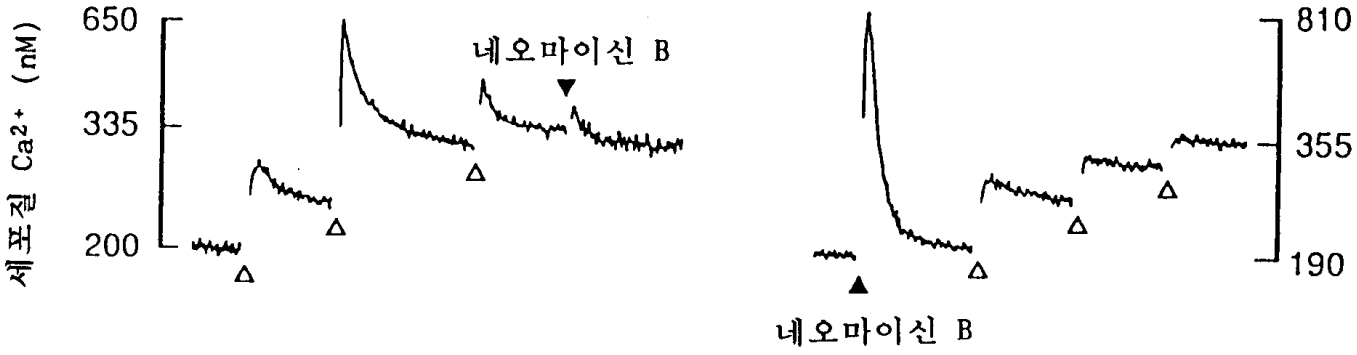
도면 11h



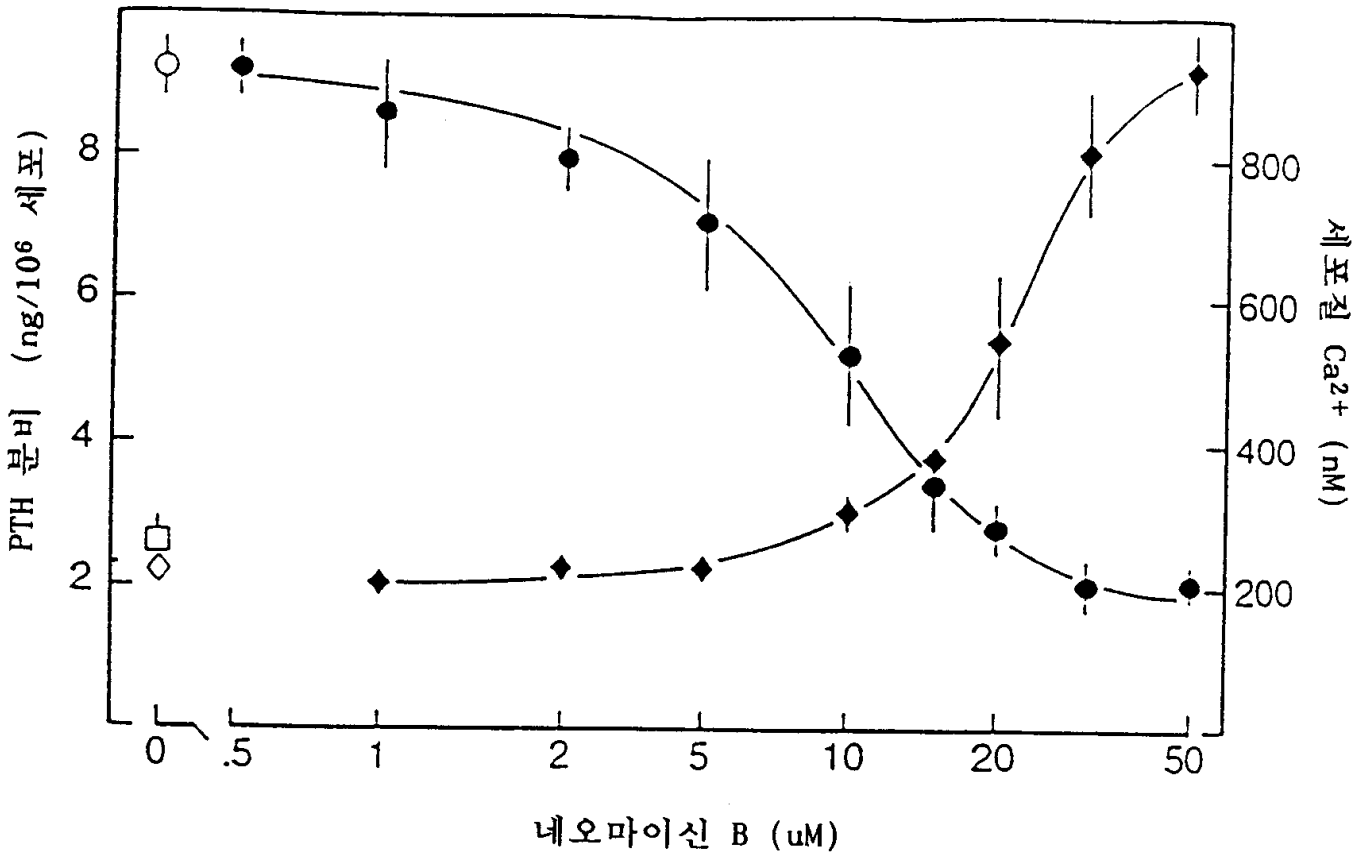
도면 11i


i
EGTA
250
180
네오마이신
이오노마이신

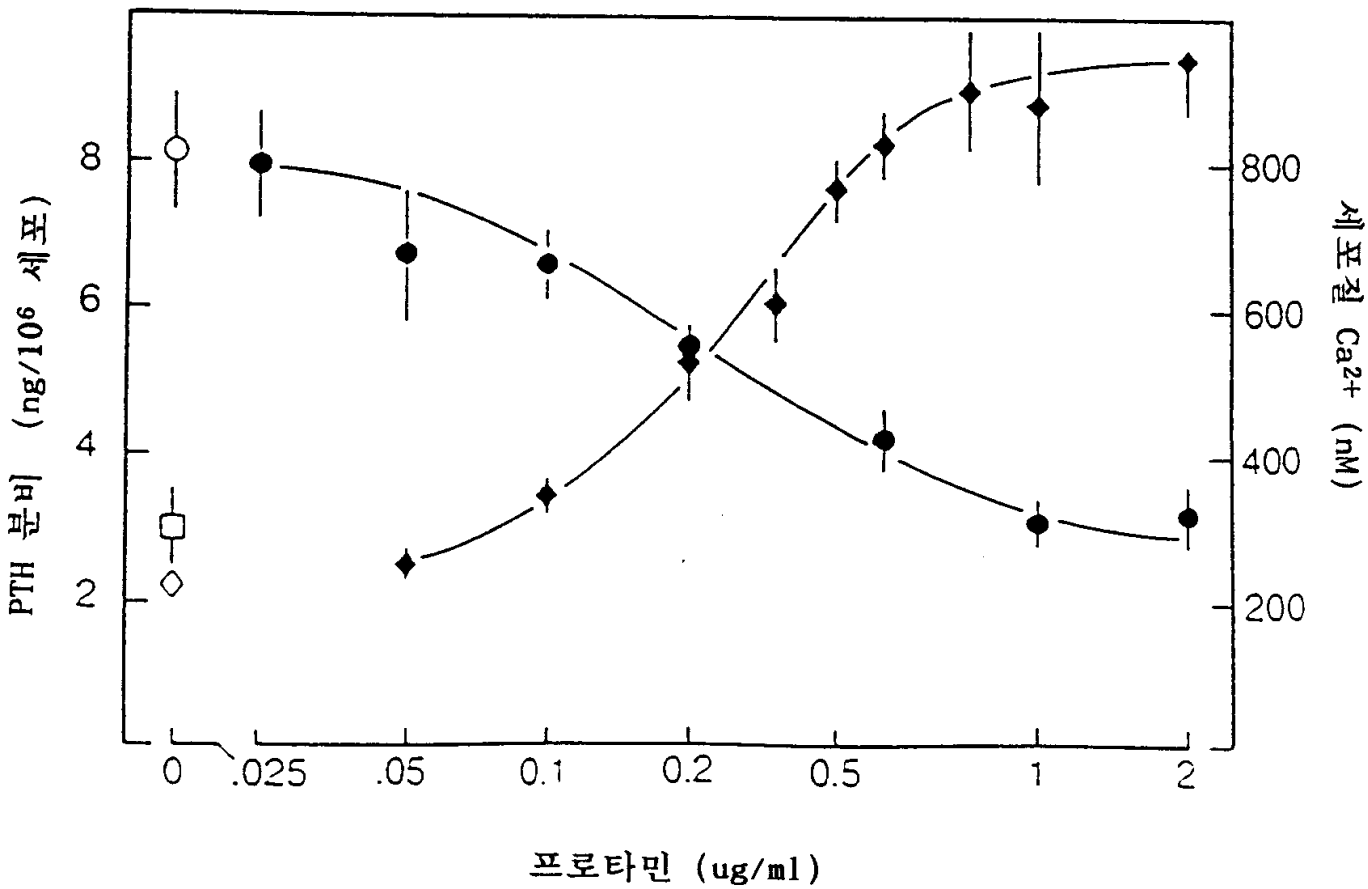
도면 12


650
335
200
세포질 Ca2+ (nM)
네오마이신 B
810
355
190
네오마이신 B

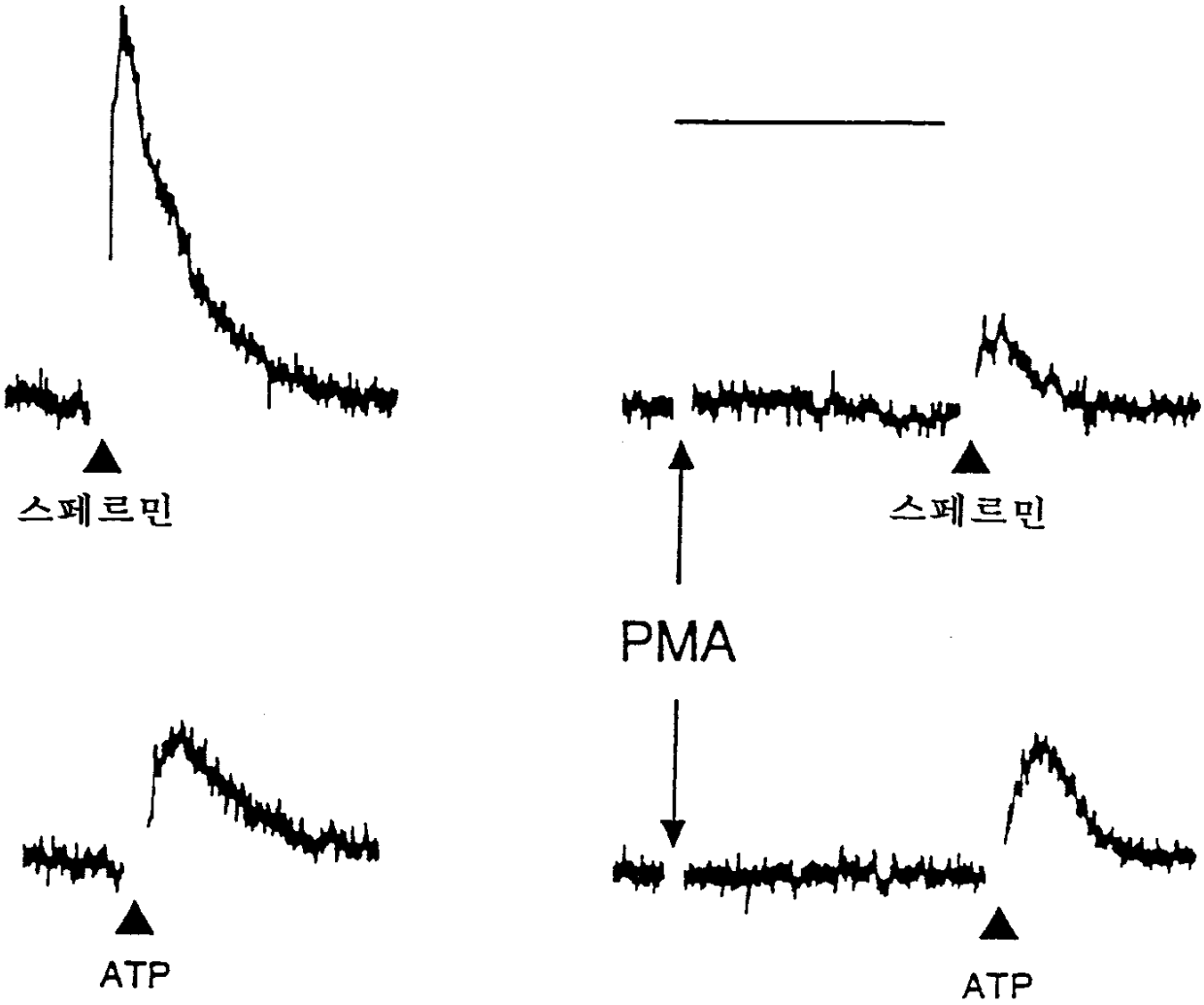
도면 13a


PTH 분비 (ng/10⁶ 세포)
세포질 Ca²⁺ (nM)
네오마이신 B (uM)
0
.5
1
2
5
10
20
50
2
4
6
8
200
400
600
800

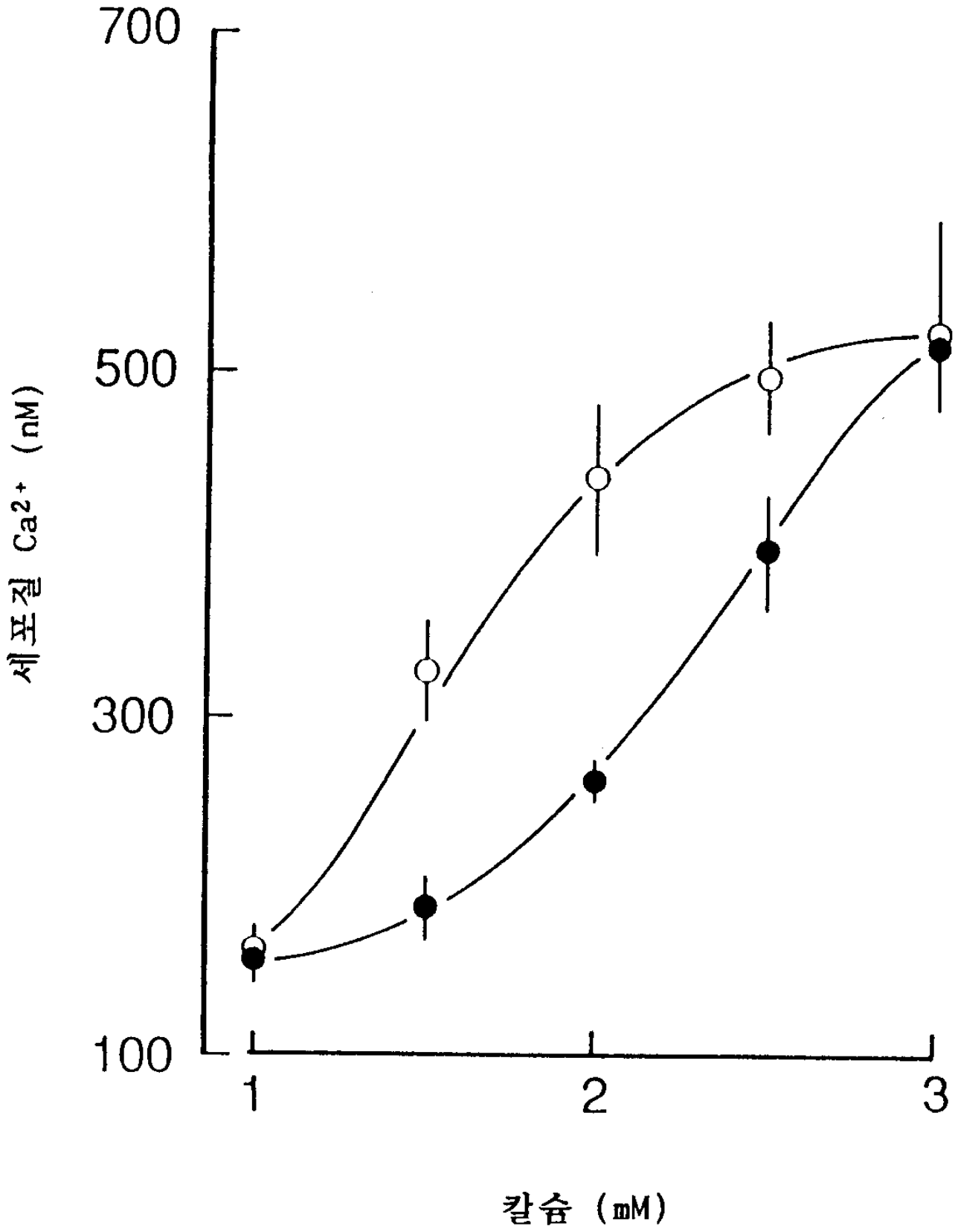
도면 13b


PTH 분비 (ng/10⁶ 세포)
세포질 Ca²⁺ (nM)
프로타민 (ug/ml)
0
.025
.05
0.1
0.2
0.5
1
2
2
4
6
8
200
400
600
800

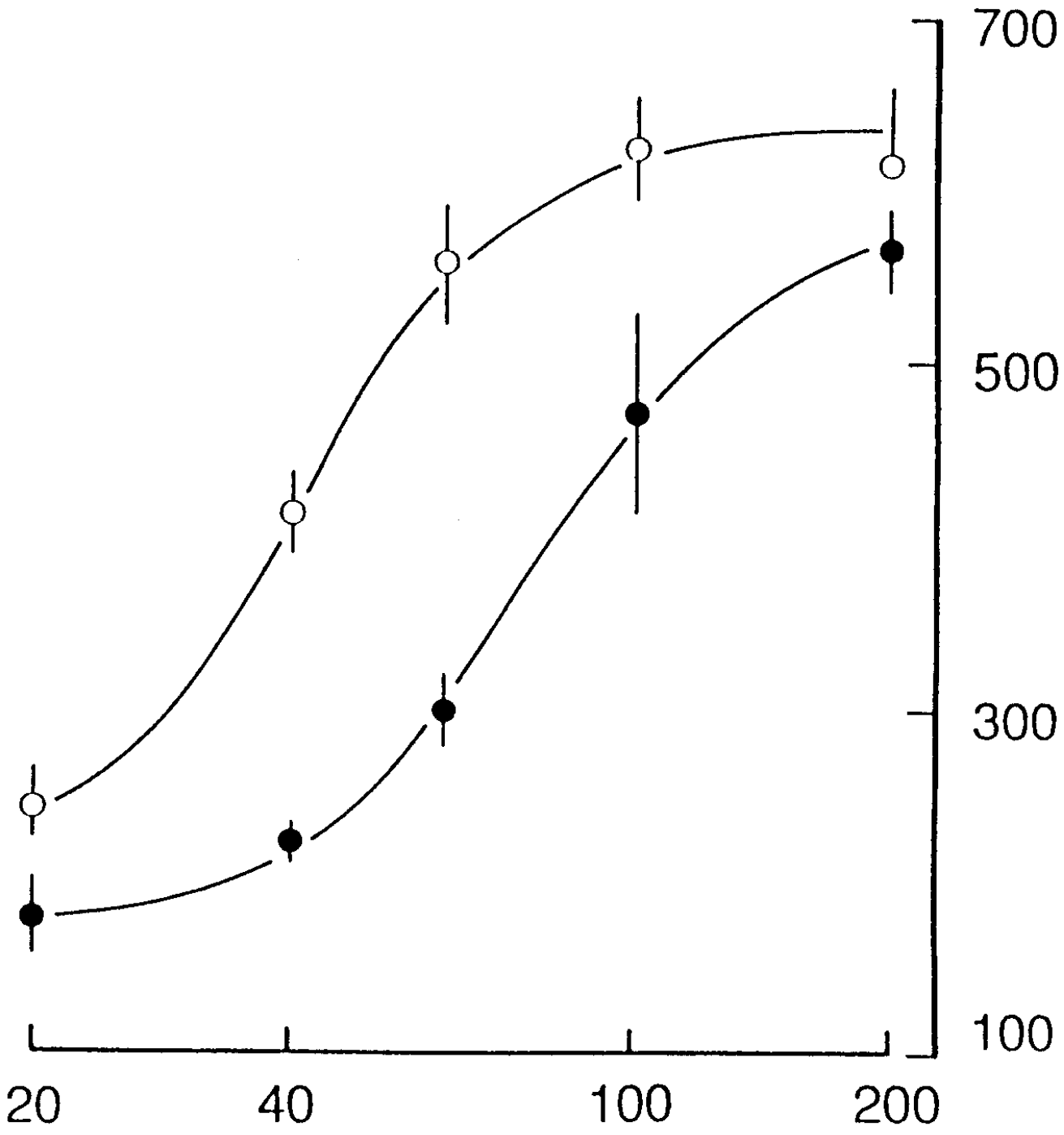
도면 14



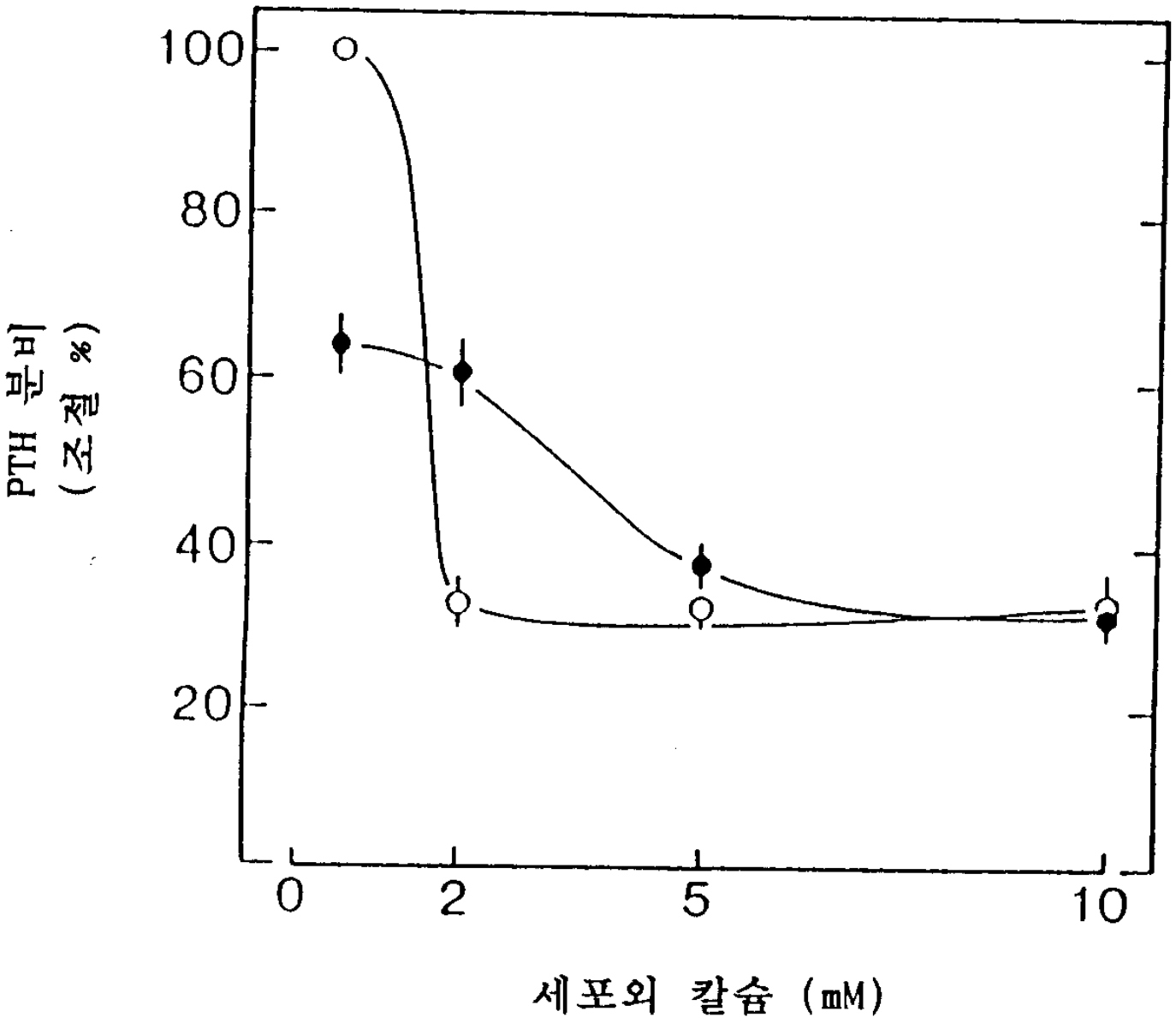
도면 15a



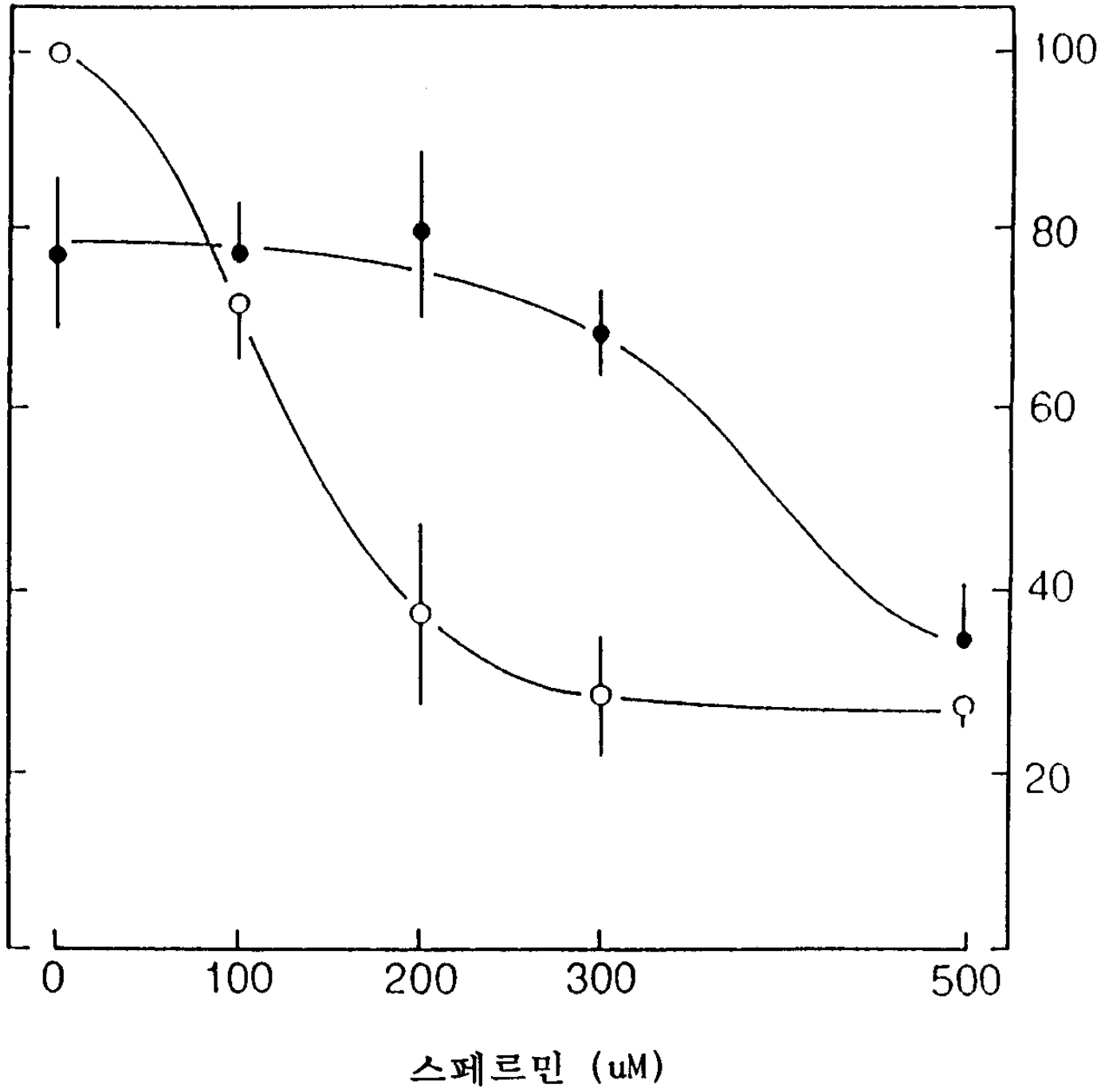
도면 15b



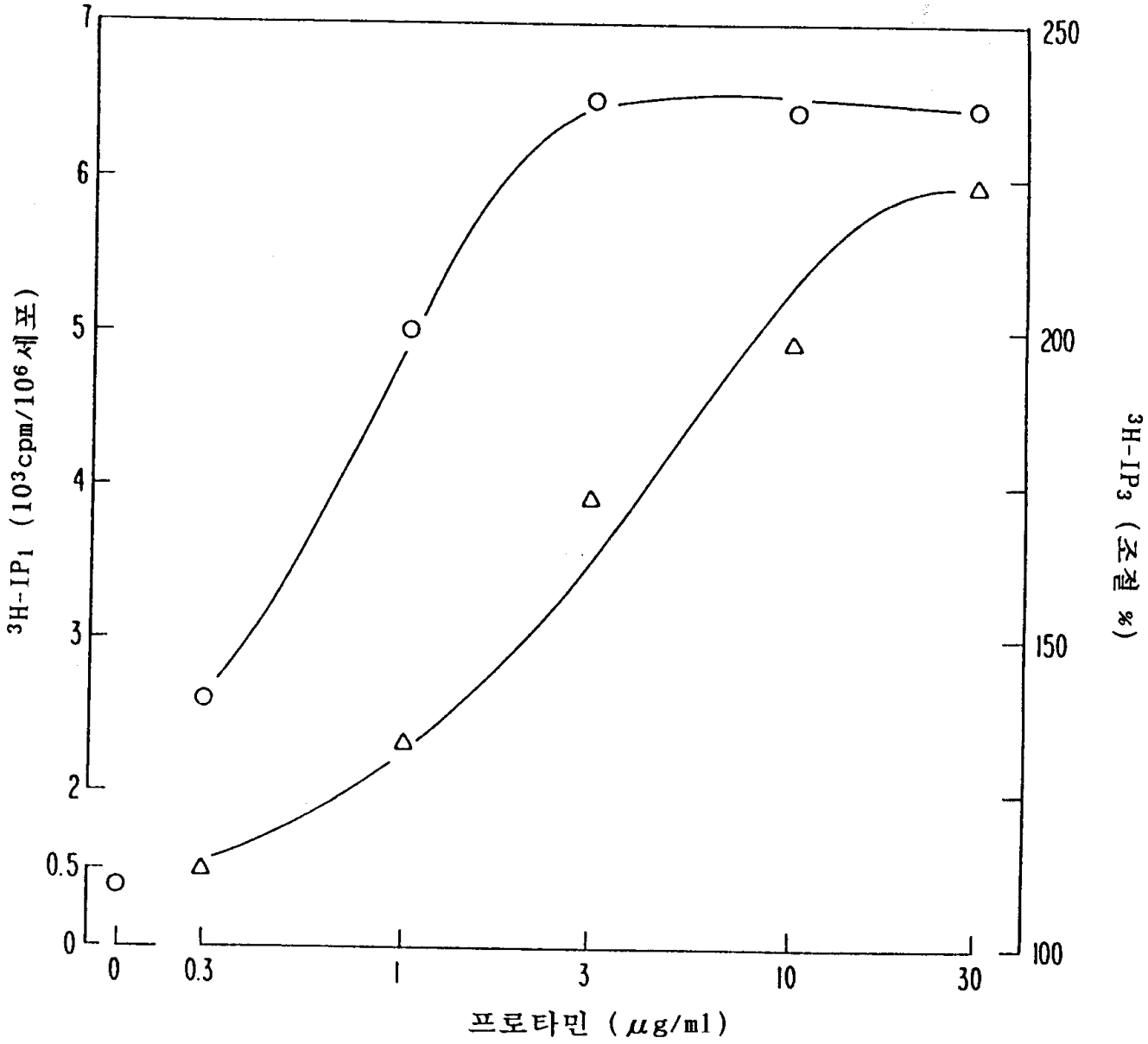
도면 16a



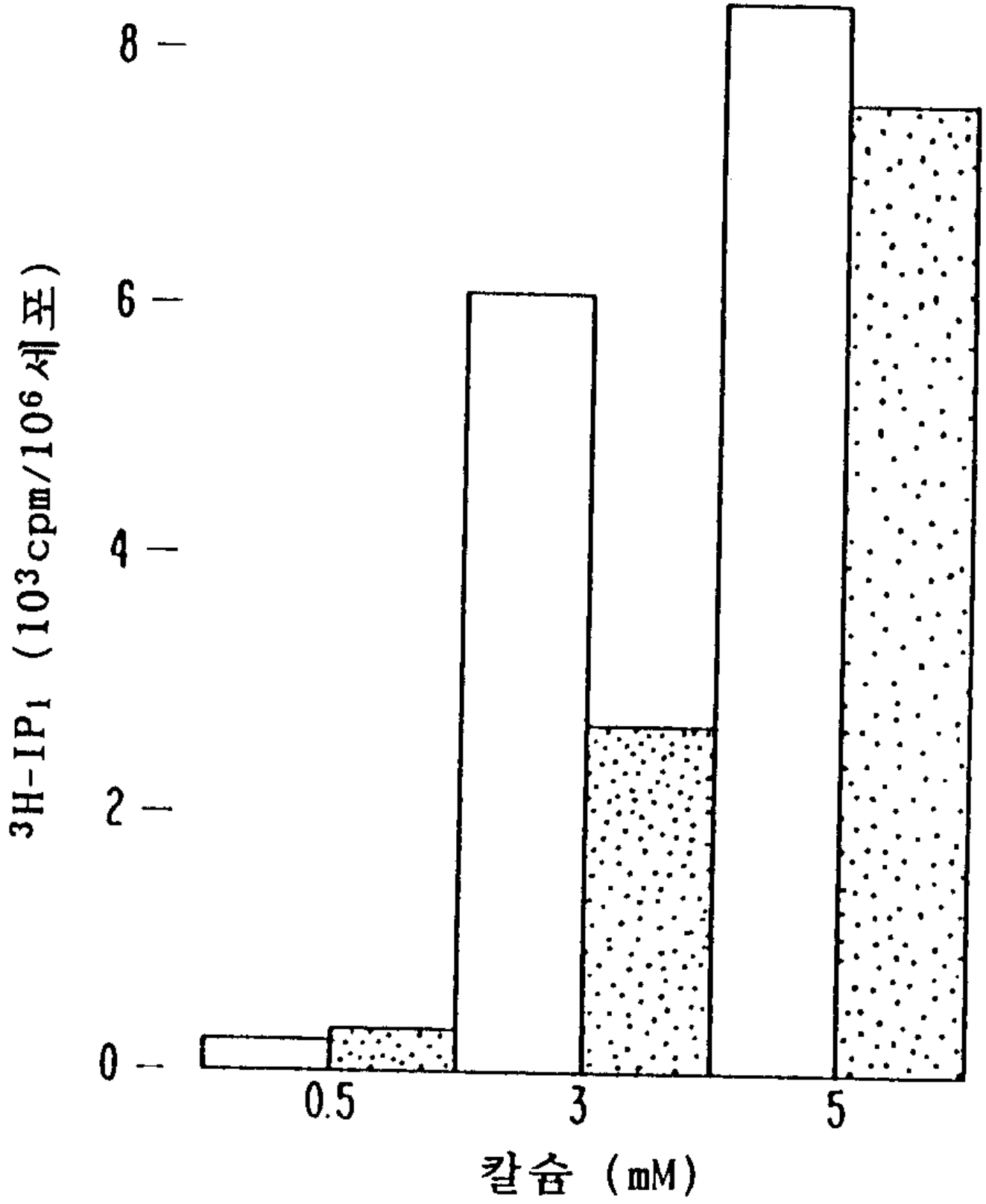
도면 16b



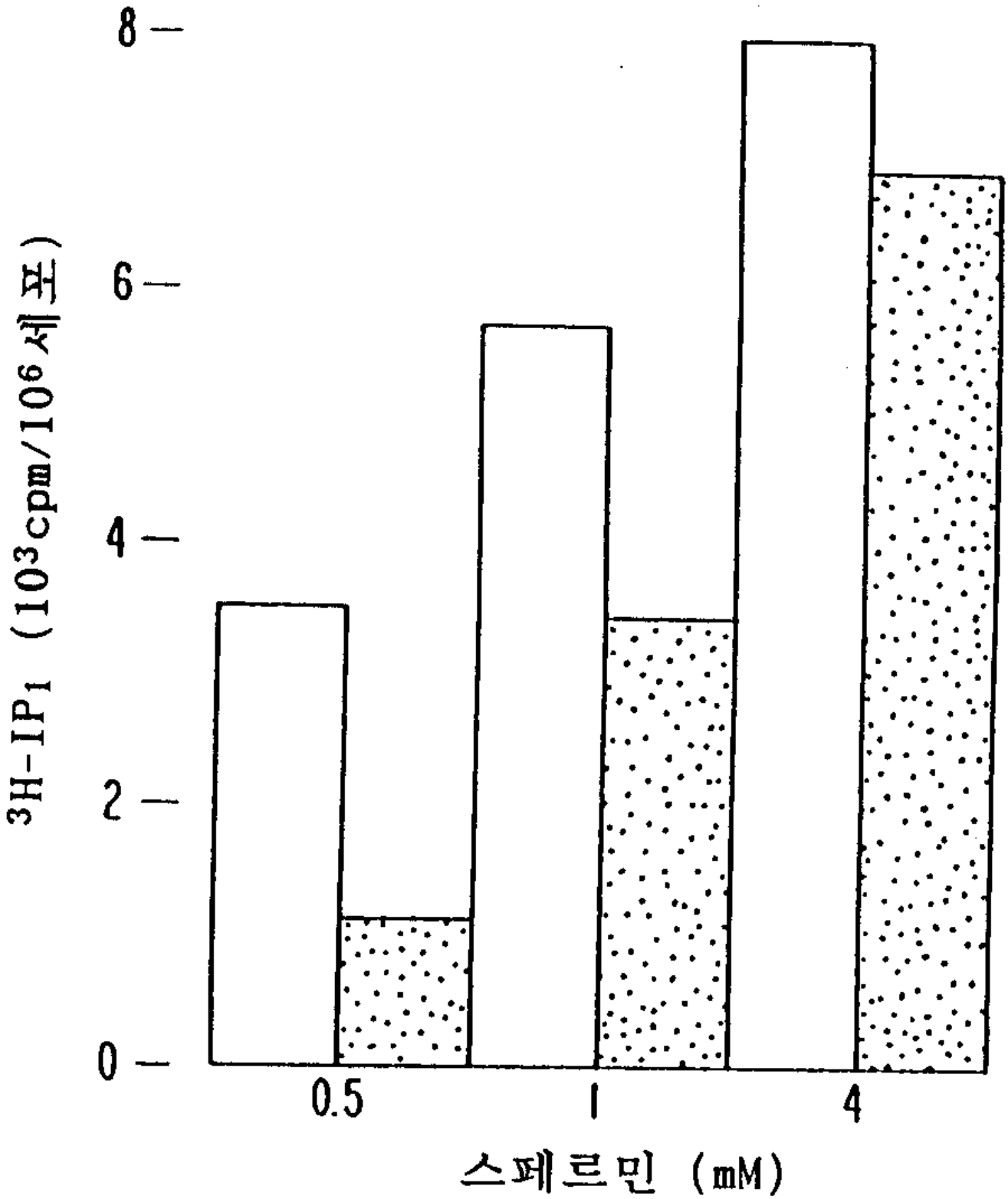
도면 17


7
6
5
4
3
2
0.5
0
250
200
150
100
0
0.3
1
3
10
30
^{3}H-IP$_1$ (10^3cpm/10^6세포)
^{3}H-IP$_3$ (조절 %)
프로타민 (μg/ml)

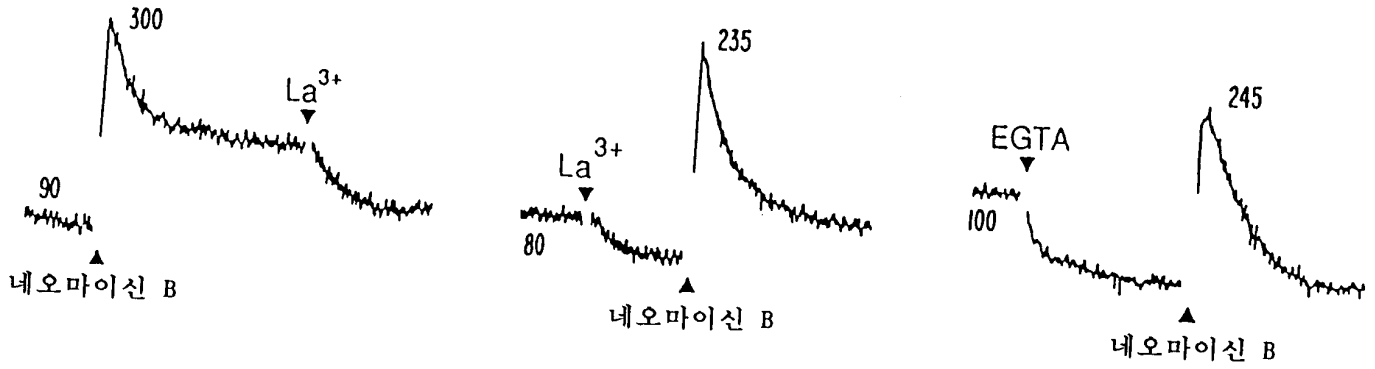
도면 18a



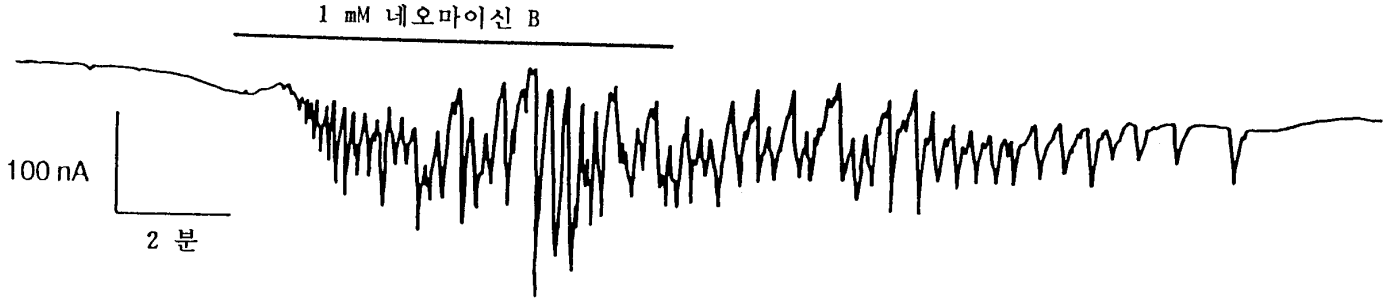
도면 18b



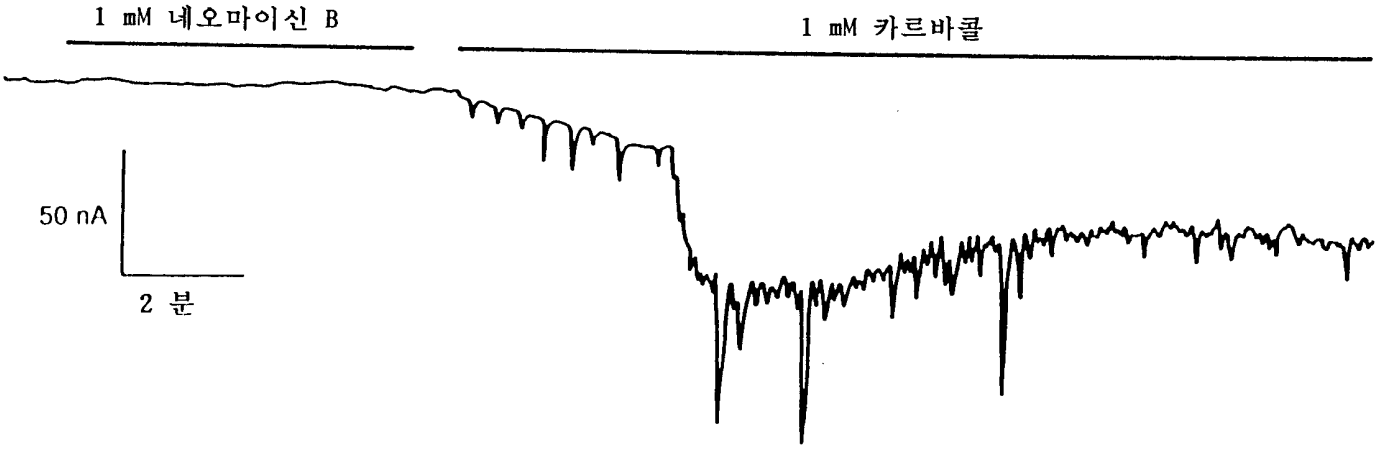
도면 19



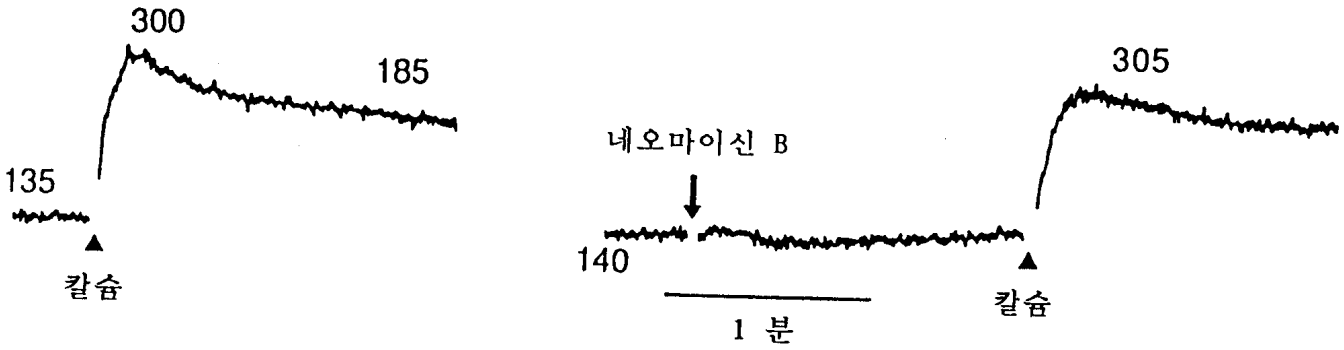
도면 20a



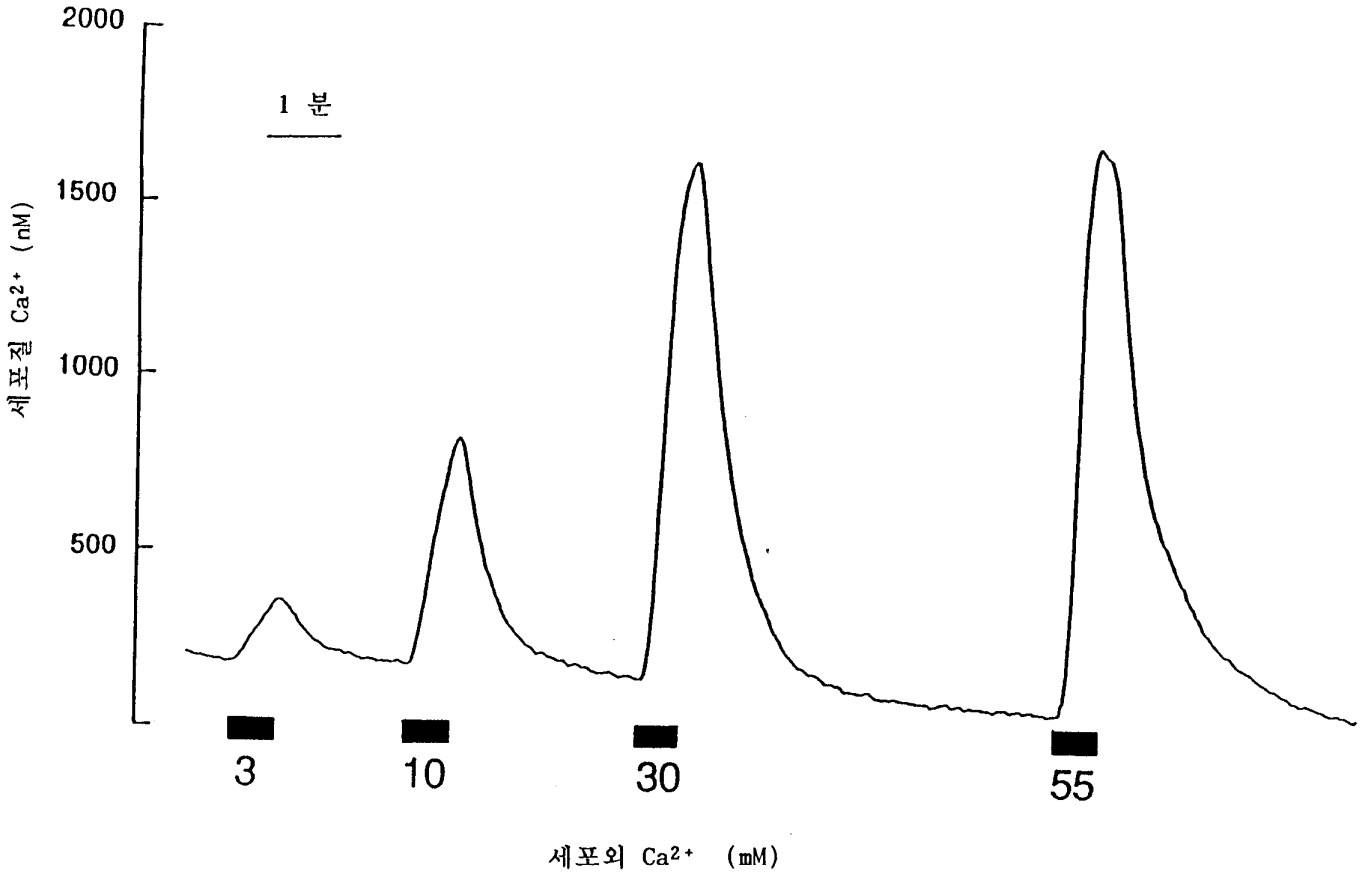
도면 20b



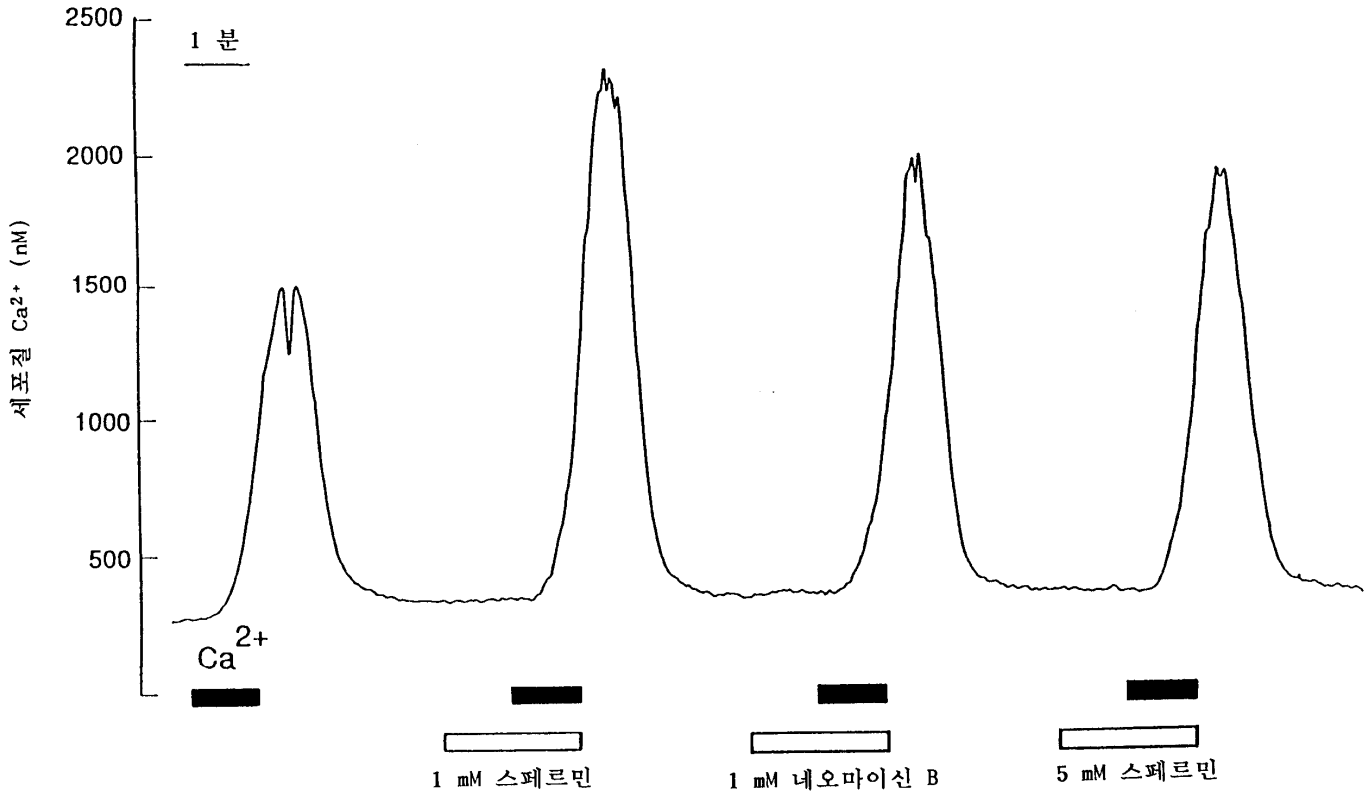
도면 21


300
185
135
칼슘
네오마이신 B
305
140
칼슘
1 분

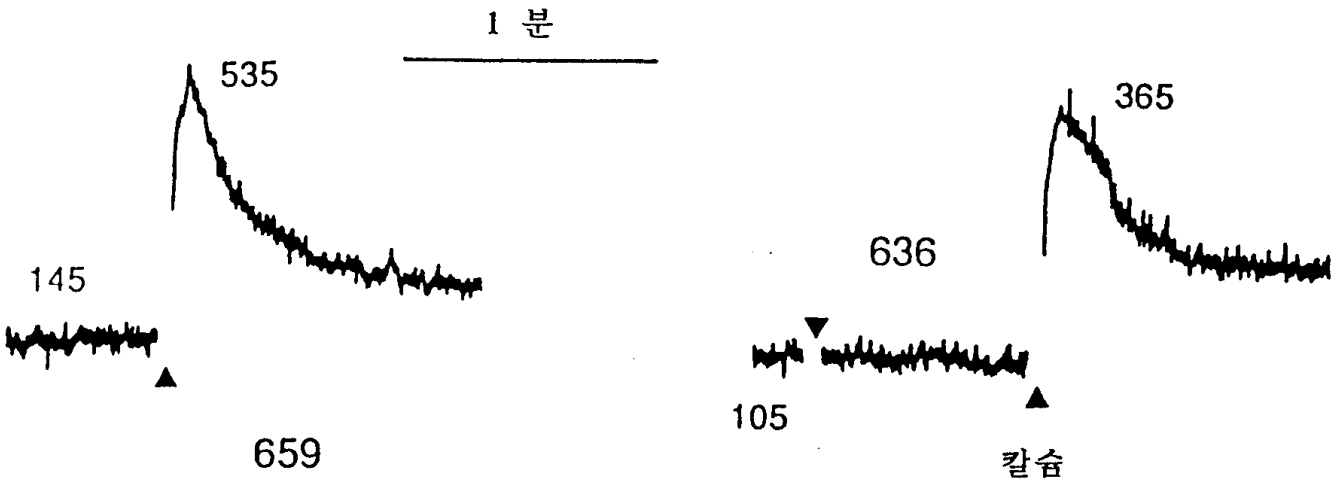
도면 22


2000
1500
1000
500
1 분
세포질 Ca2+ (nM)
3
10
30
55
세포외 Ca2+ (mM)

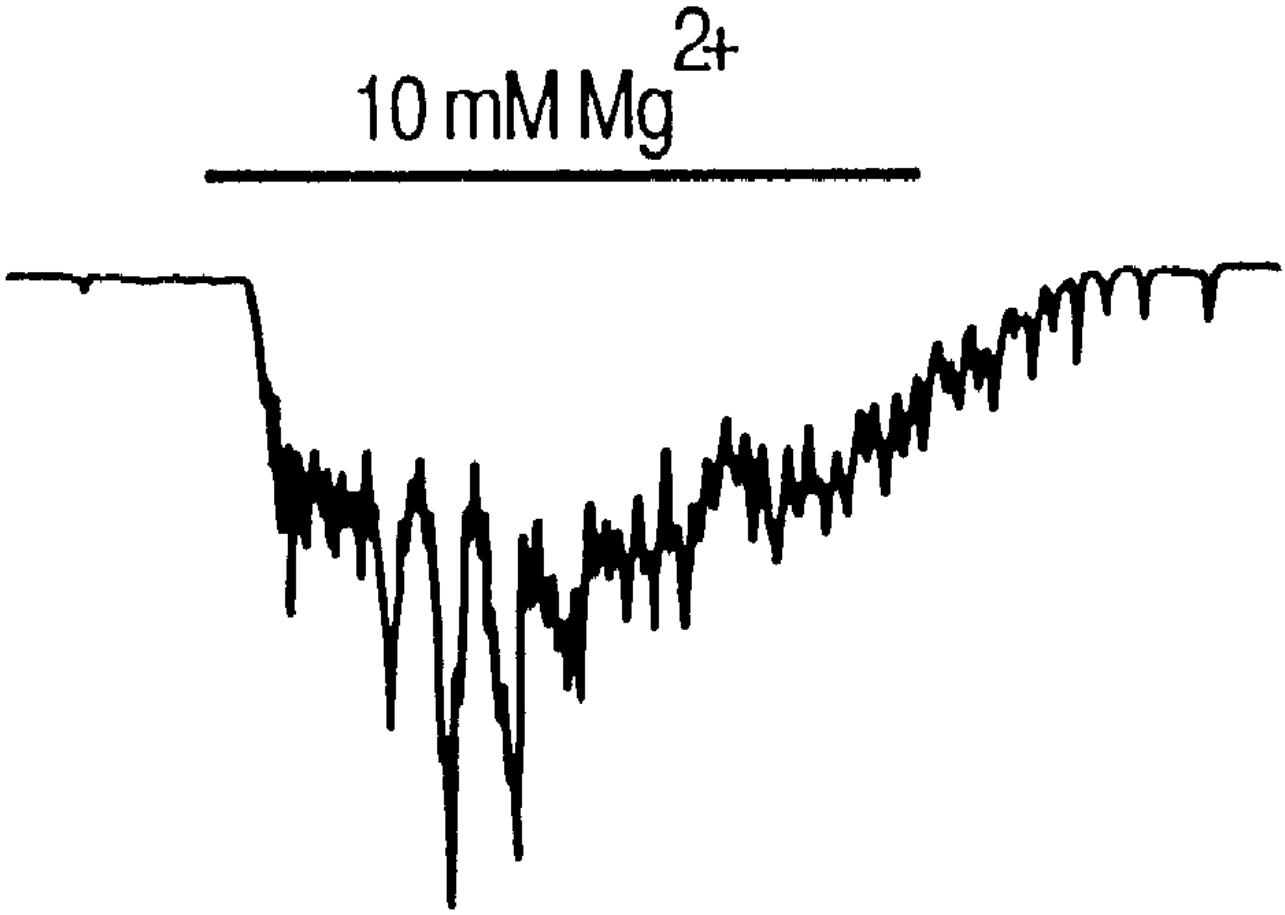
도면 23


2500
2000
1500
1000
500
세포질 Ca2+ (nM)
1 분
Ca2+
1 mM 스페르민
1 mM 네오마이신 B
5 mM 스페르민

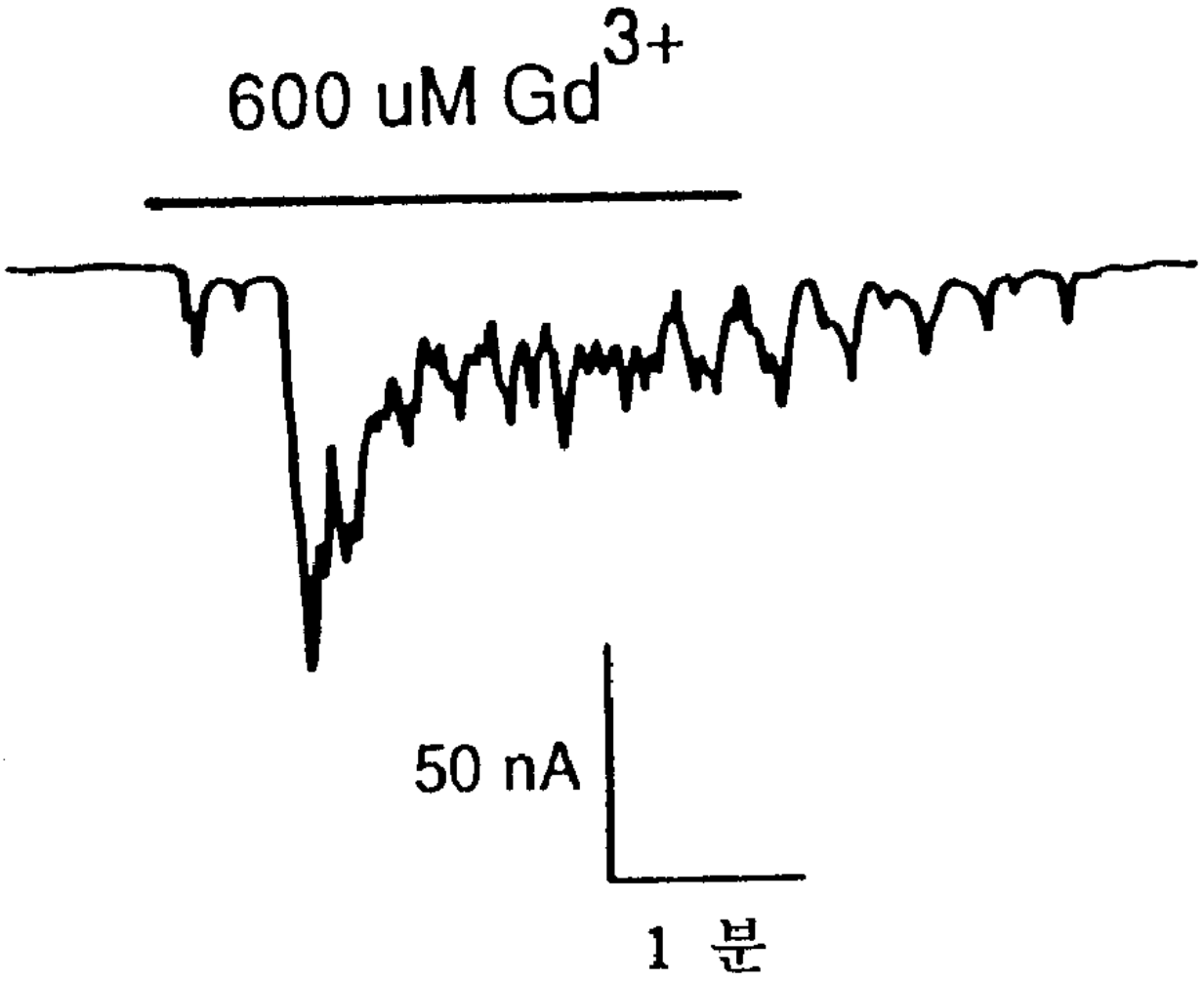
도면 24


1 분
535
145
659
365
636
105
칼슘

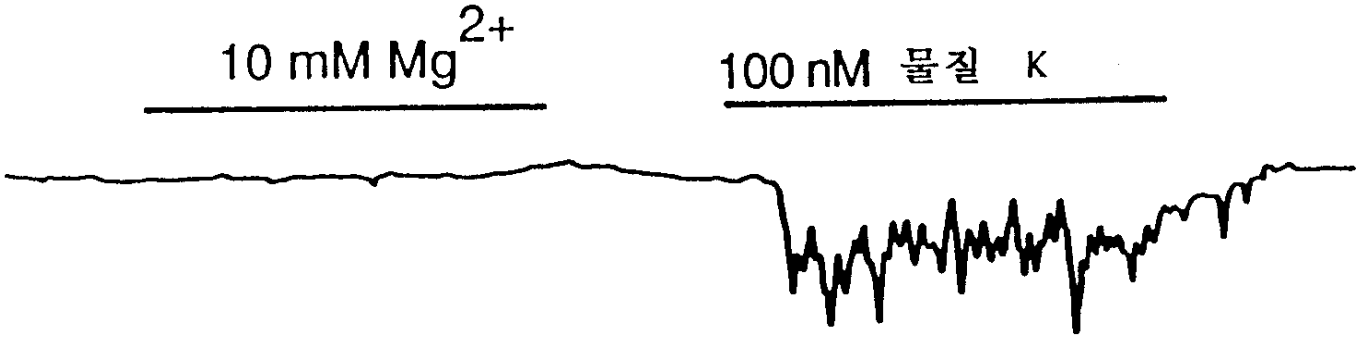
도면 25a



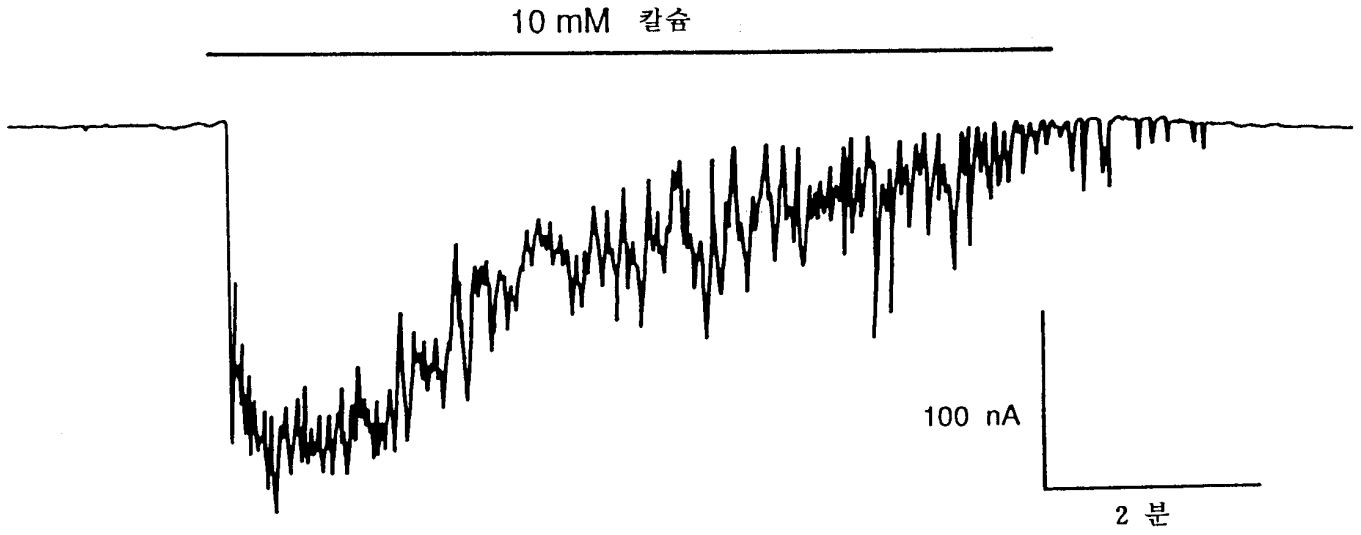
도면 25b



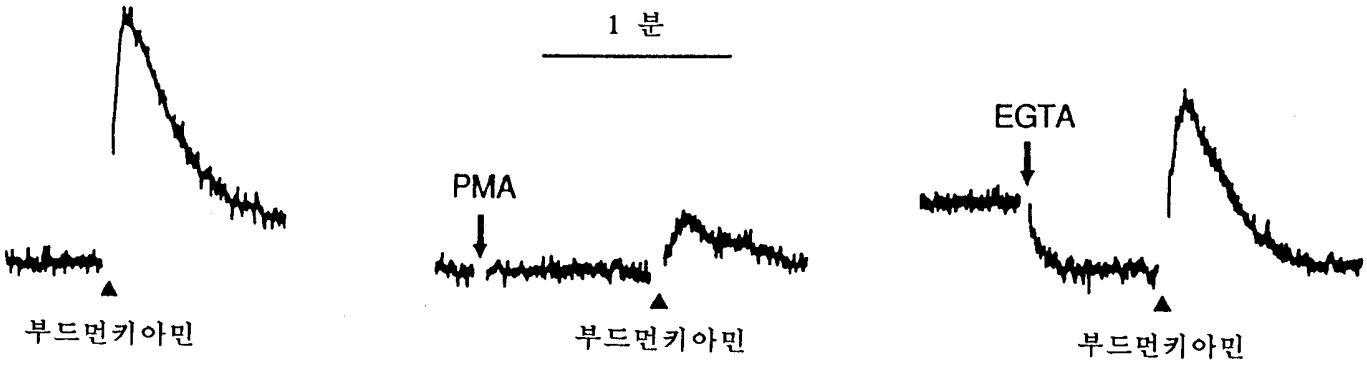
도면 25c



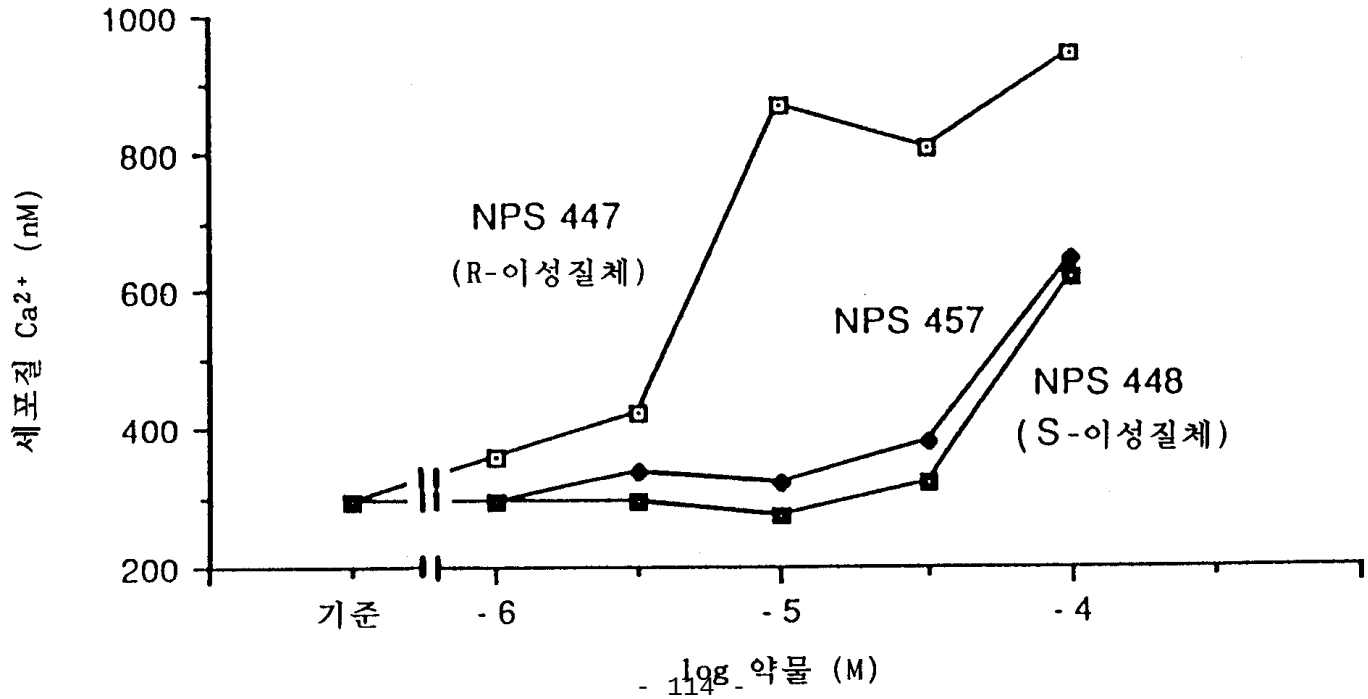
도면 26



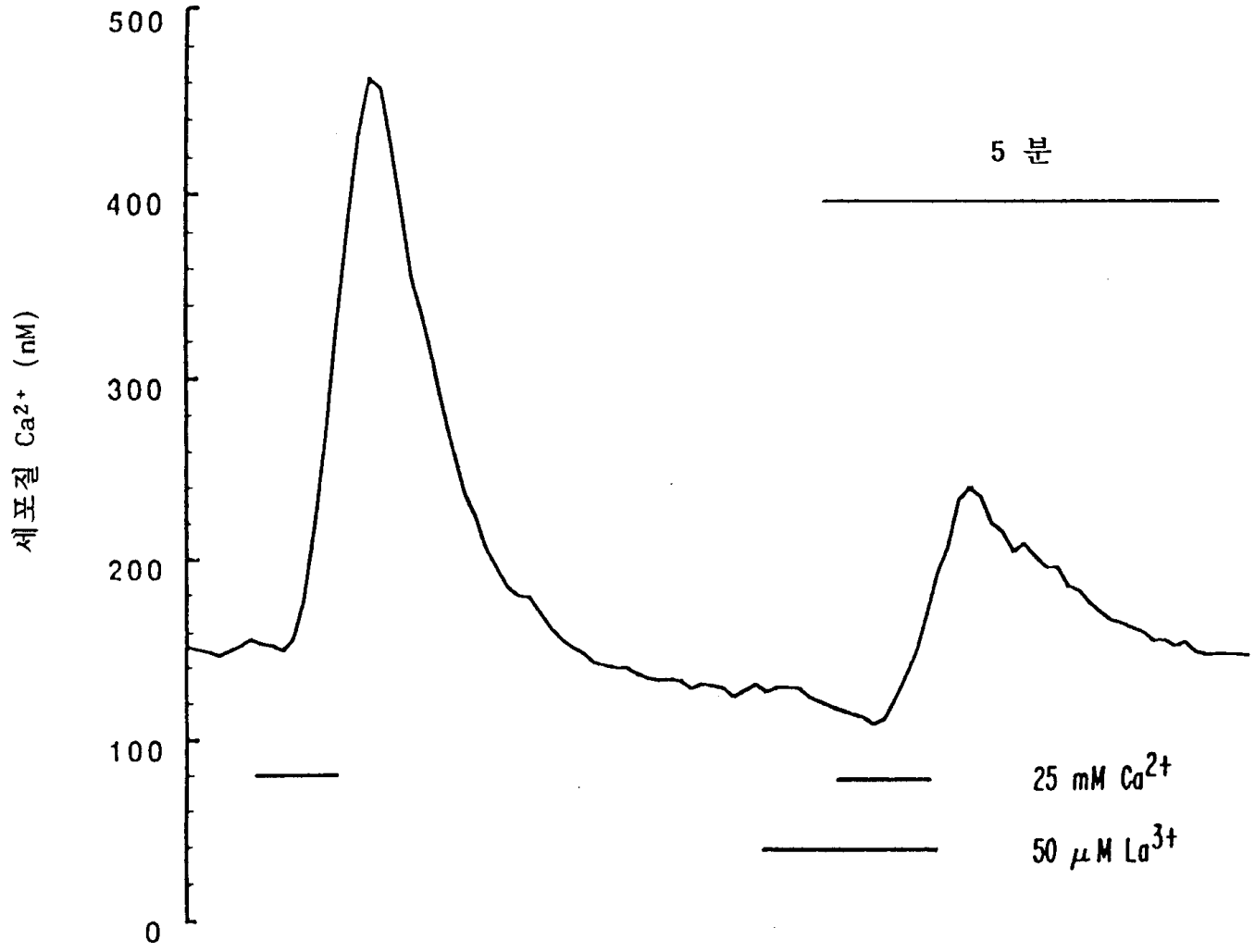
도면 27



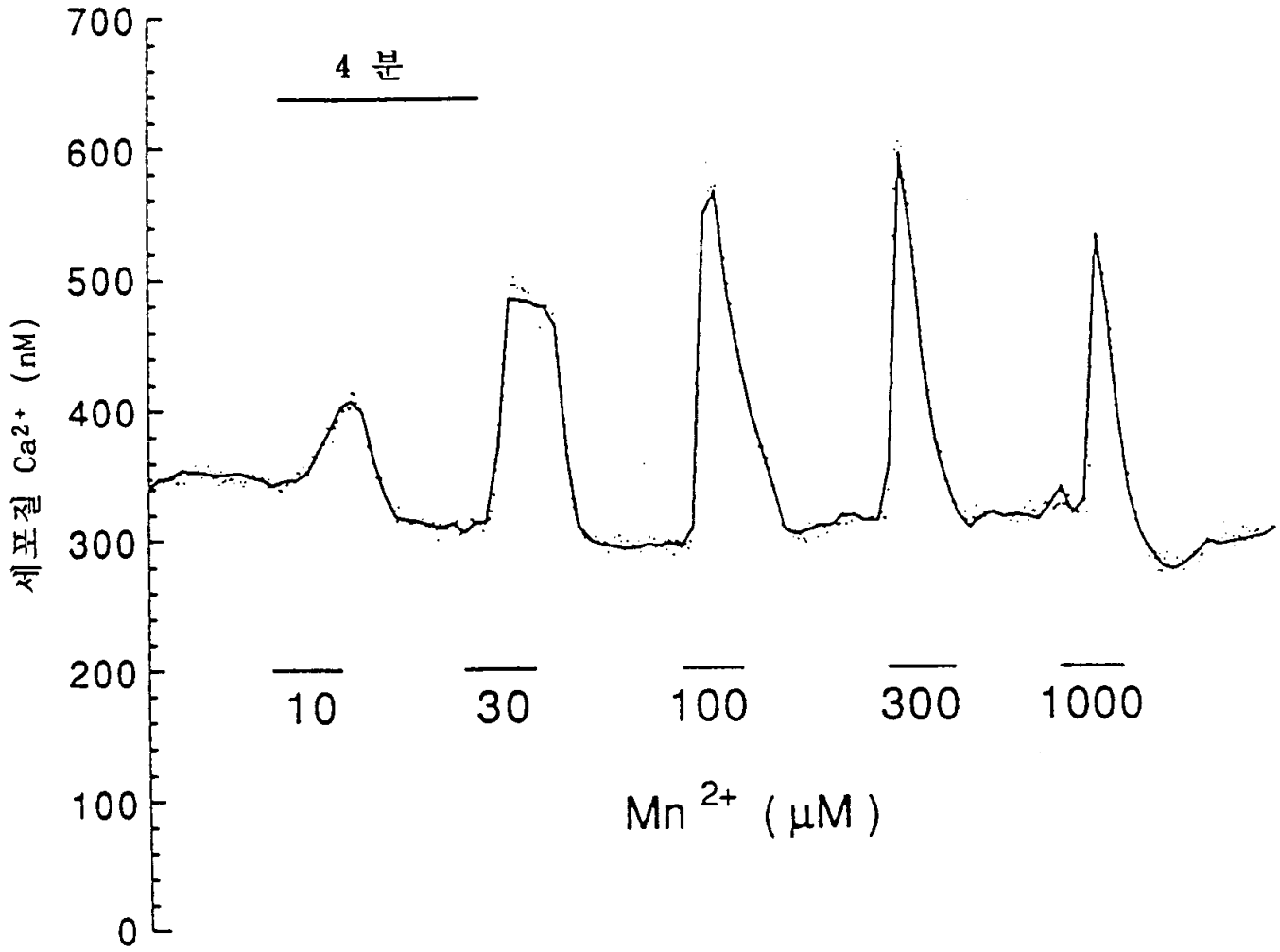
도면 28



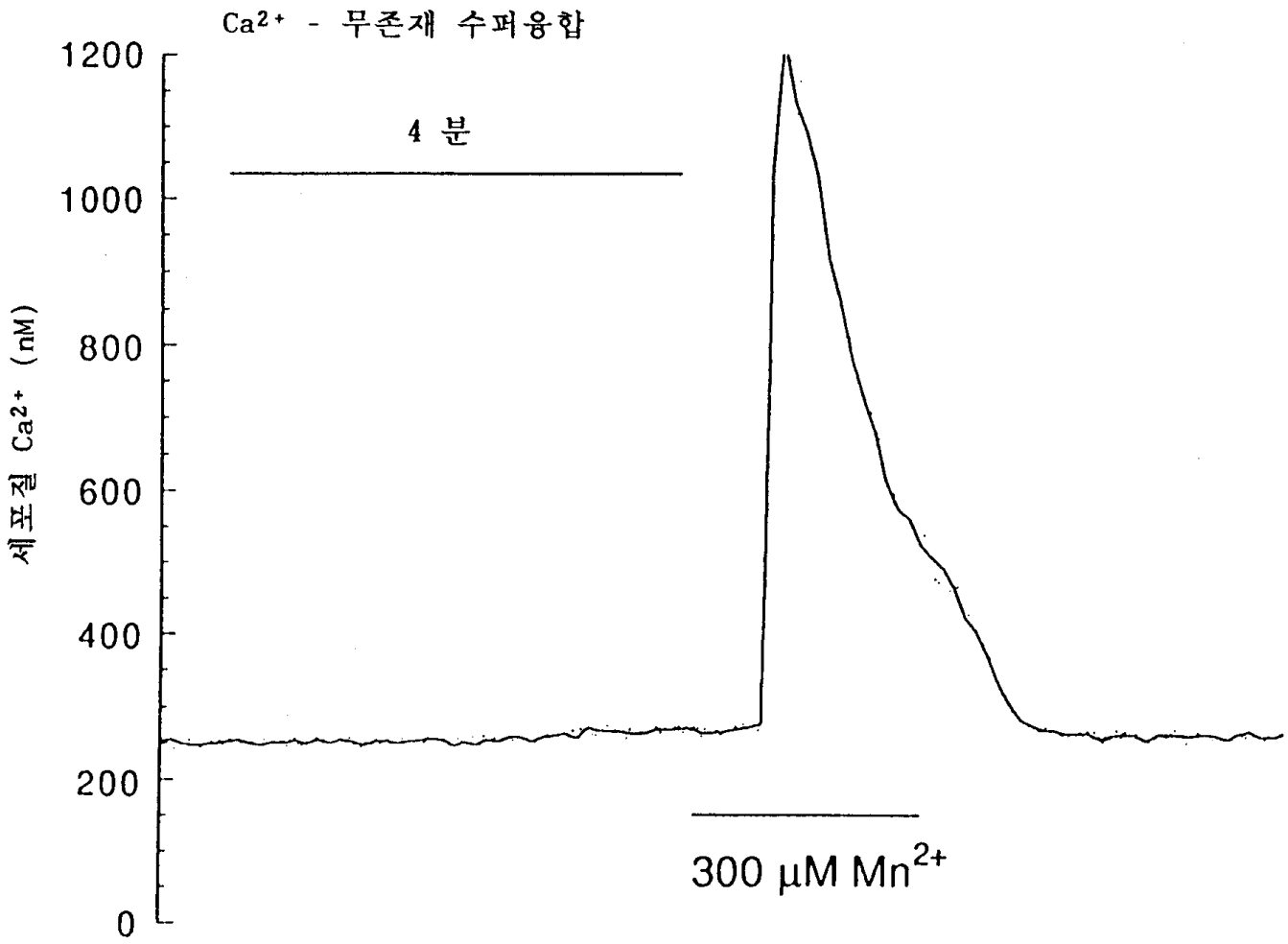
도면 29



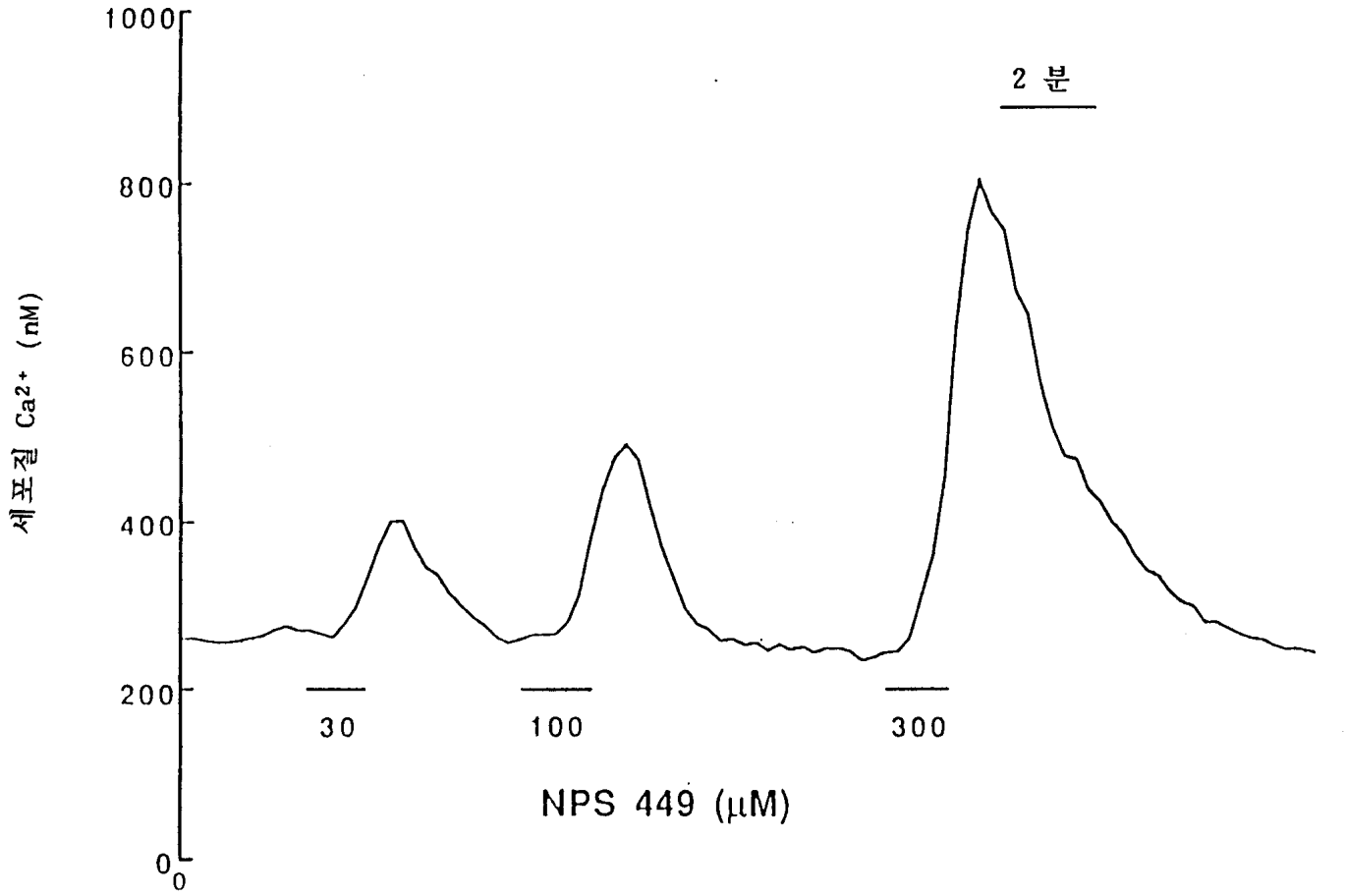
도면 30a


700
600
500
400
300
200
100
0
세포질 Ca2+ (nM)
4 분
10
30
100
300
1000
Mn 2+ (μM)

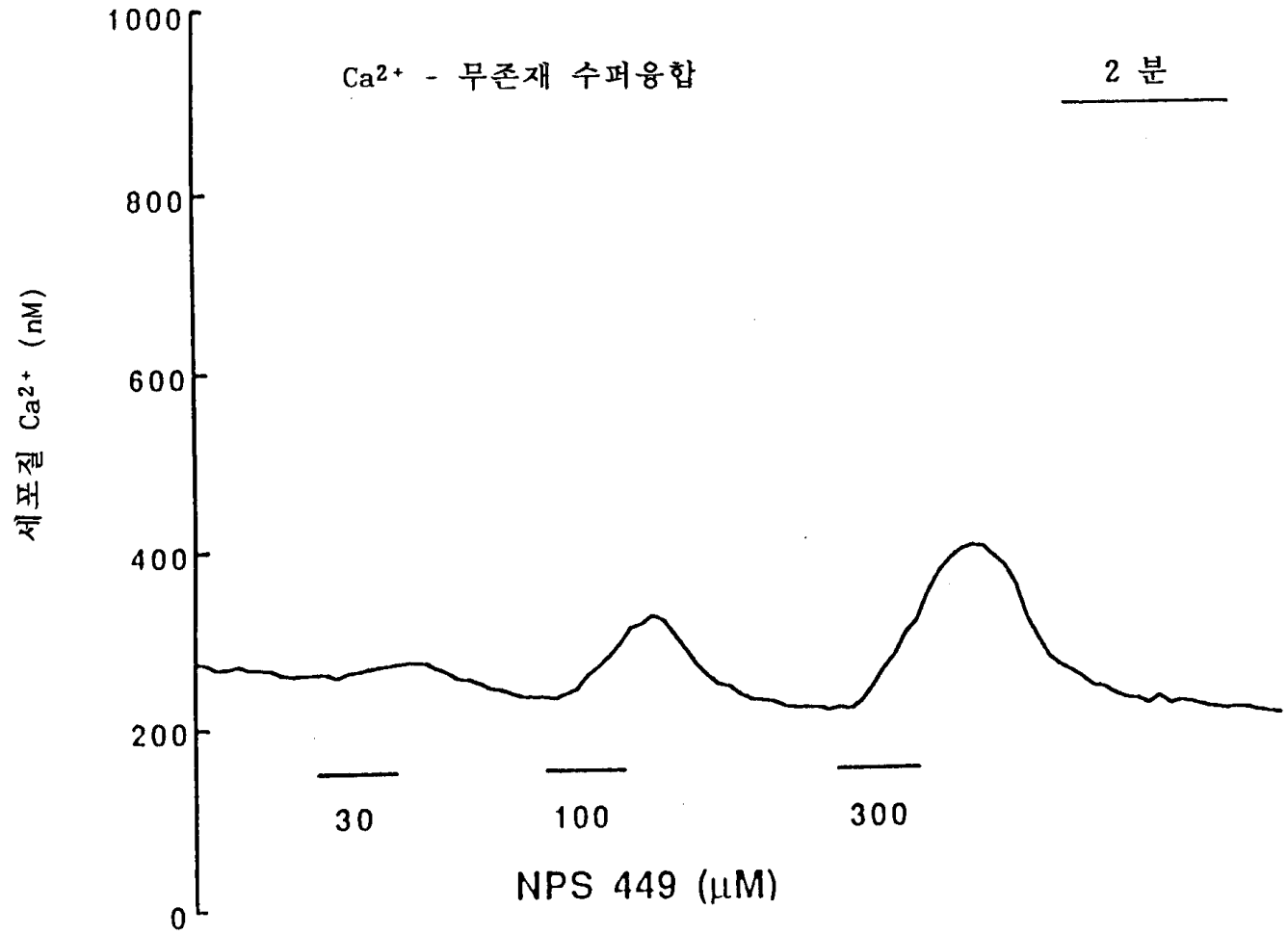
도면 30b



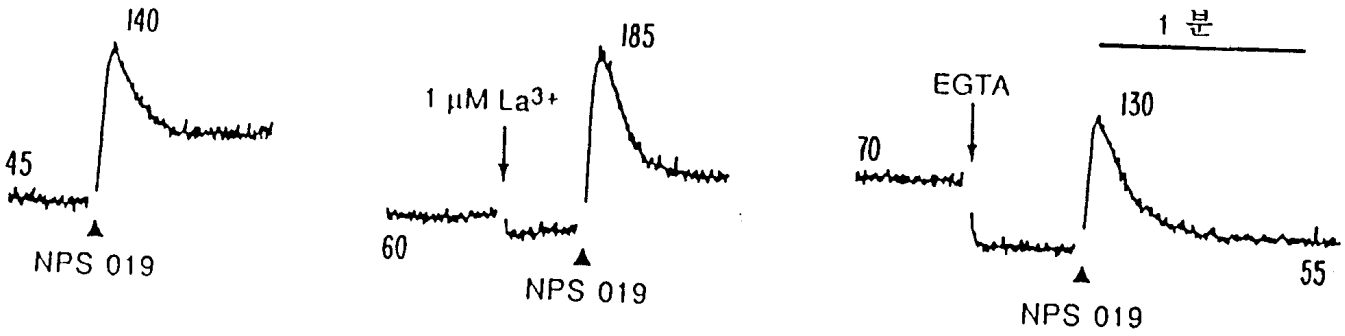
도면 30c



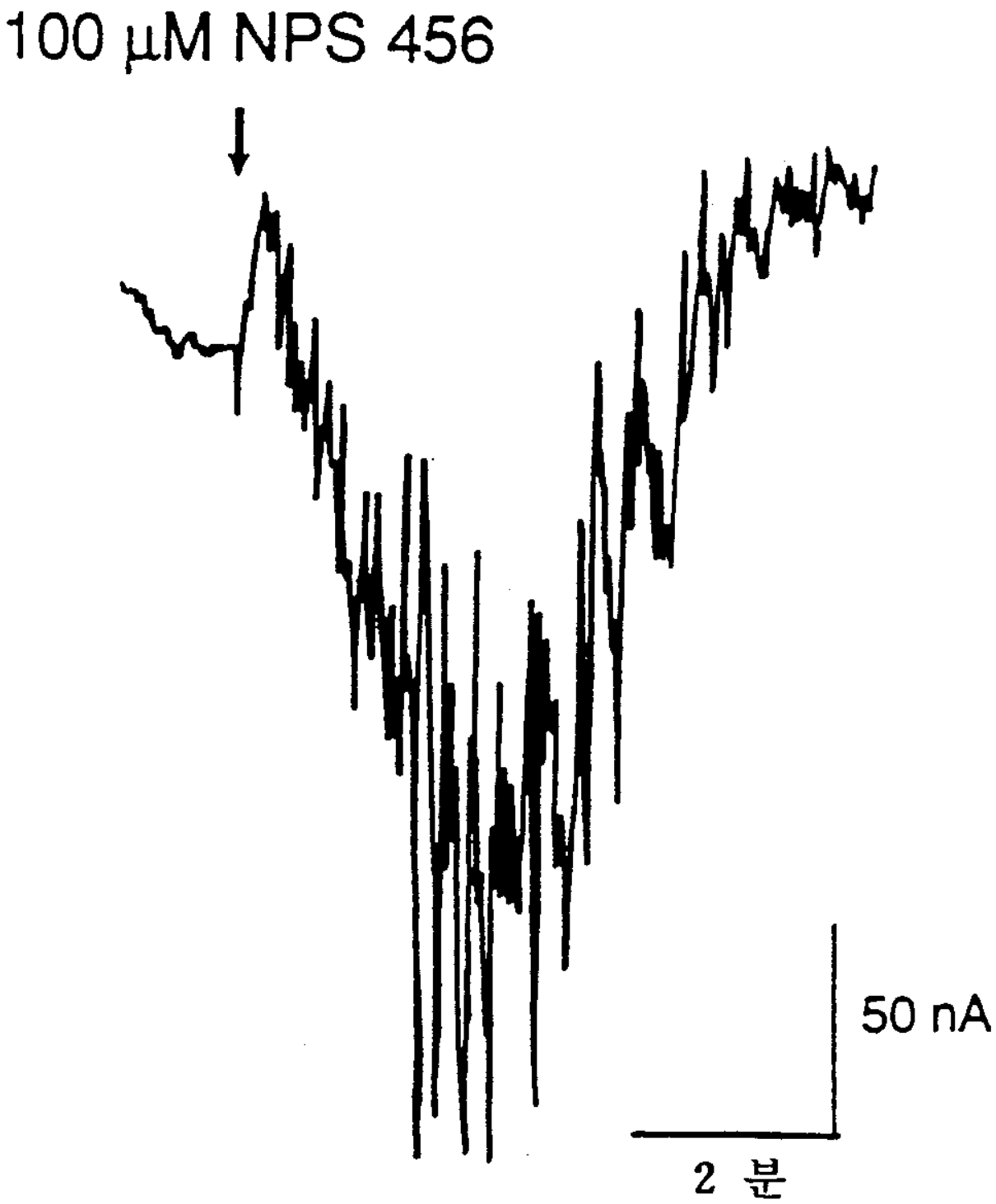
도면 31b


1000
800
600
400
200
0
세포질 Ca2+ (nM)
Ca2+ - 무존재 수퍼융합
2 분
30
100
300
NPS 449 (μM)

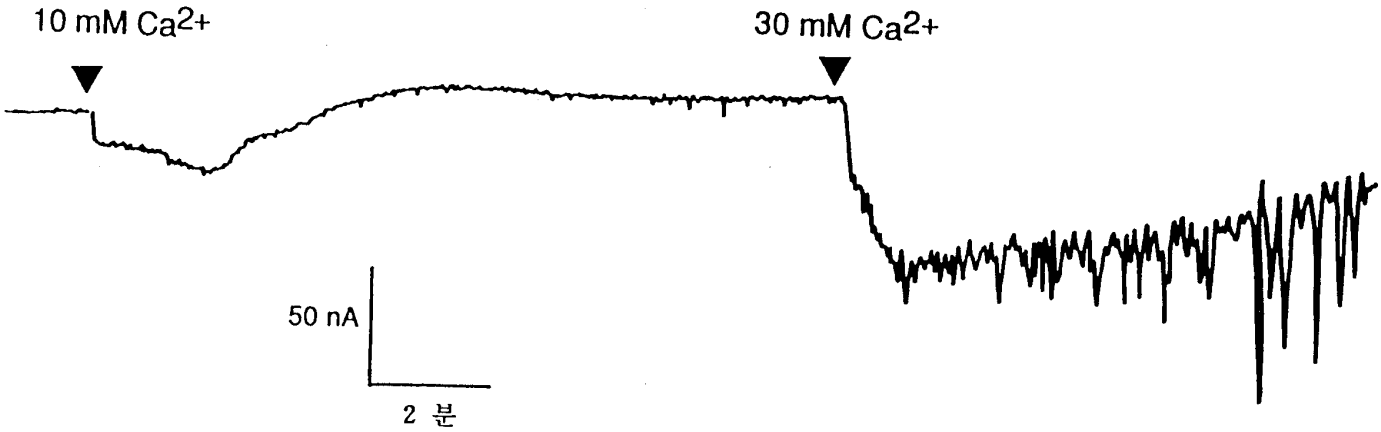
도면 32


140
45
NPS 019
185
1 μM La3+
60
NPS 019
1 분
EGTA
130
70
55
NPS 019

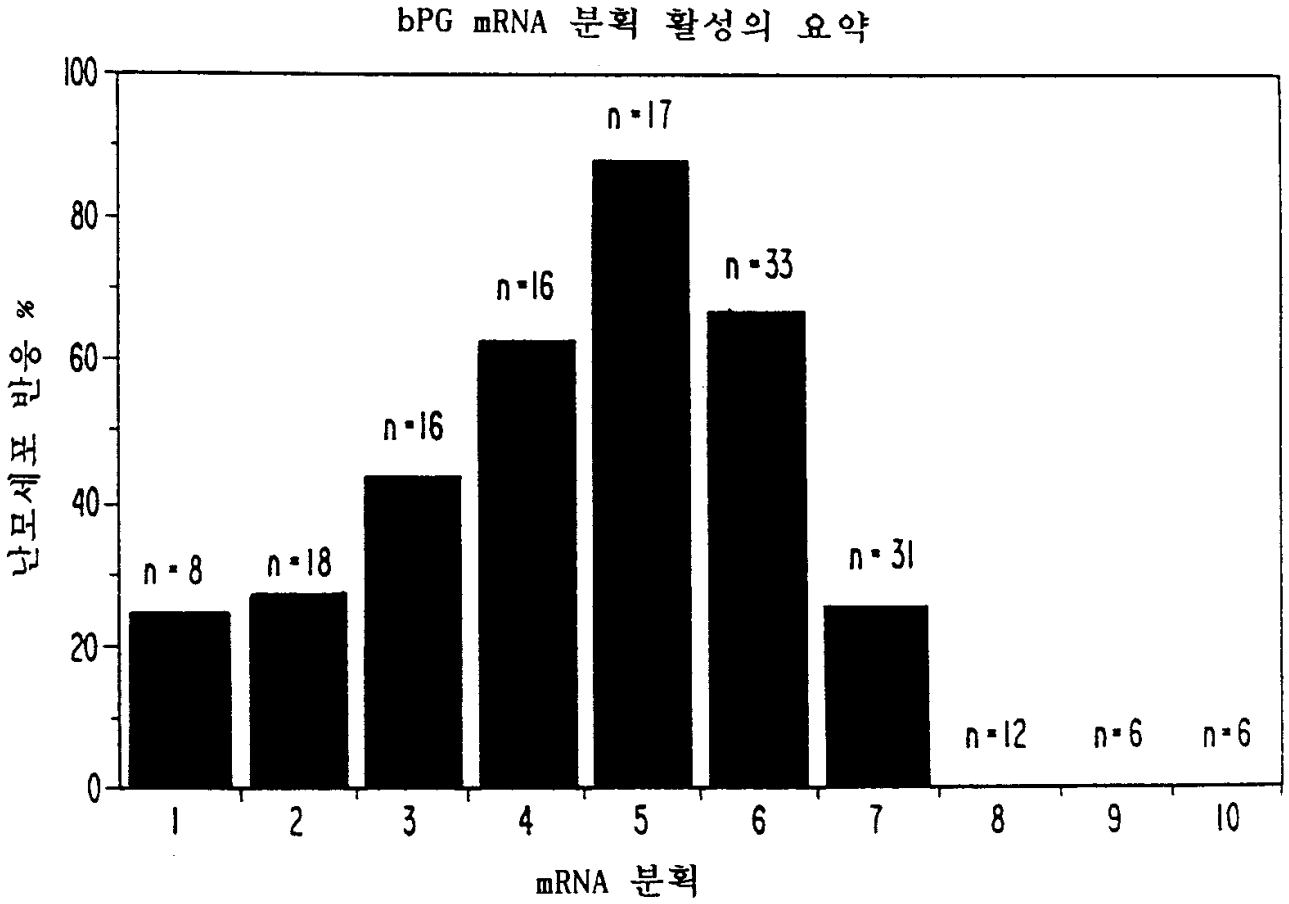
도면 33



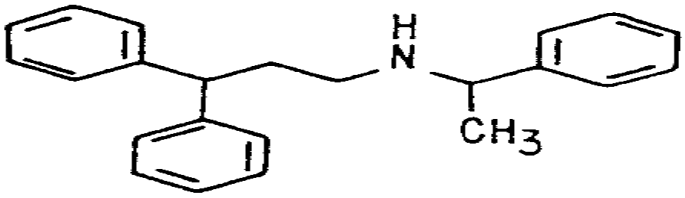
도면 34


10 mM Ca2+
30 mM Ca2+
50 nA
2 분

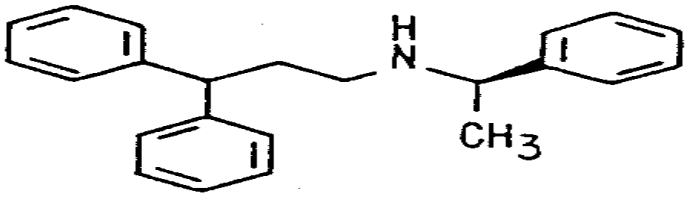
도면 35


bPG mRNA 분획 활성의 요약
난모세포 반응 %
100
80
60
40
20
0
n=8
n=18
n=16
n=16
n=17
n=33
n=31
n=12
n=6
n=6
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
mRNA 분획

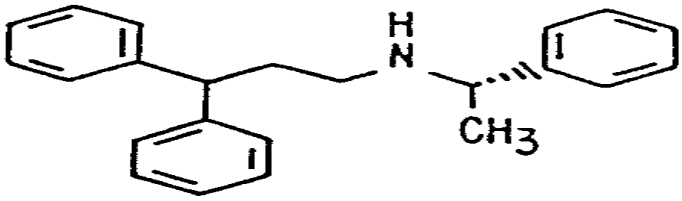
도면 36a



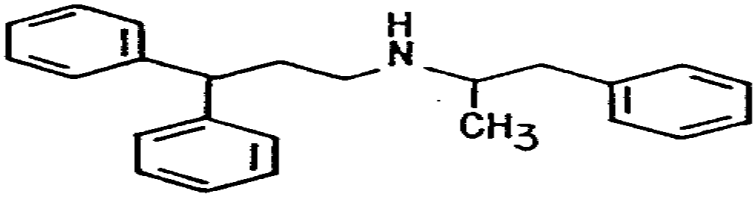
NPS
456



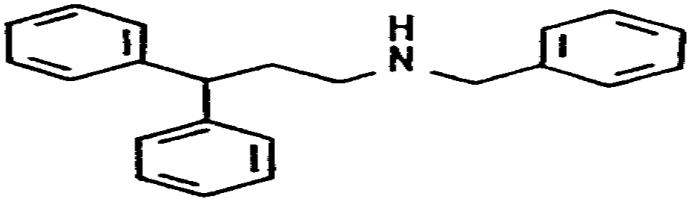
447



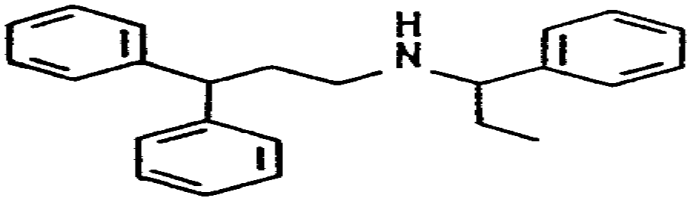
448



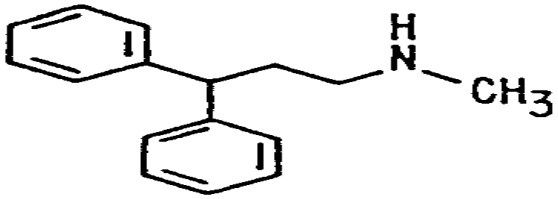
449



455

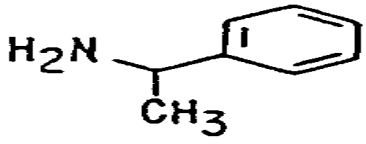


460



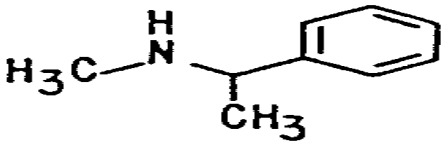
519

도면 36b

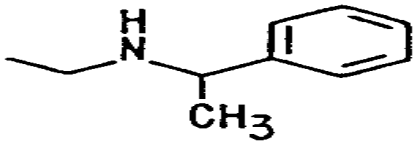


NPS ~~II~~

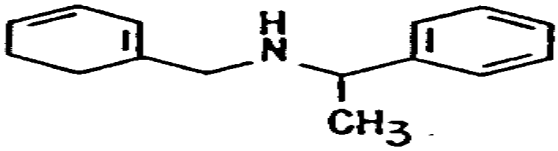
518



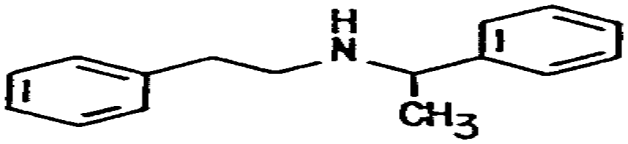
517



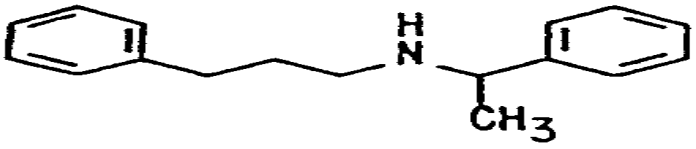
516



457



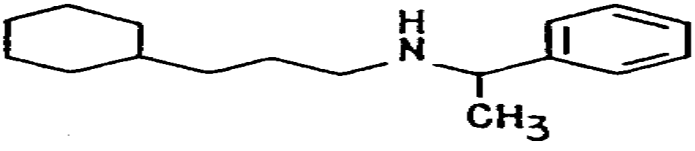
458



459

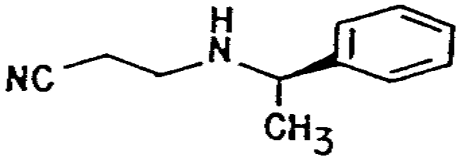


523

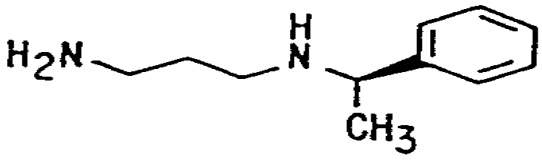


524

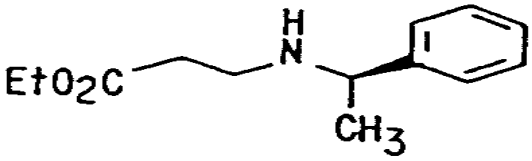
도면 36c



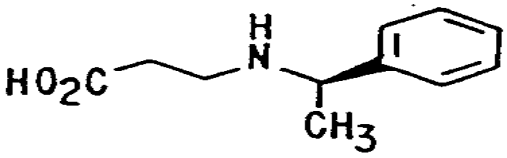
NPS #
527



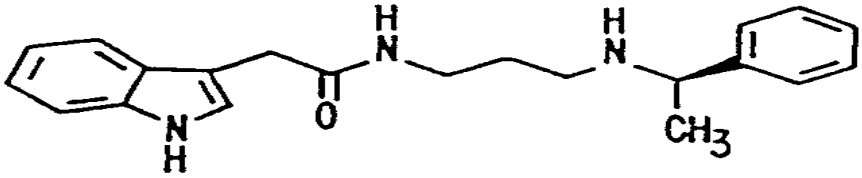
534



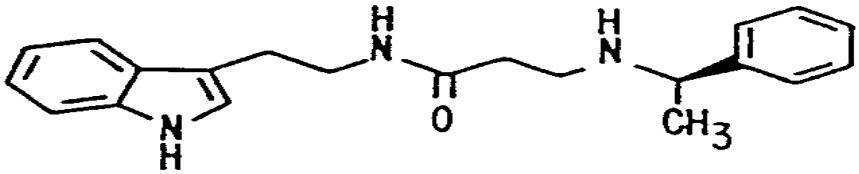
528



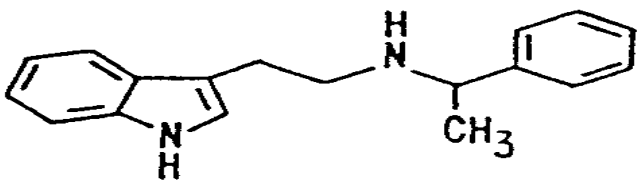
530



532

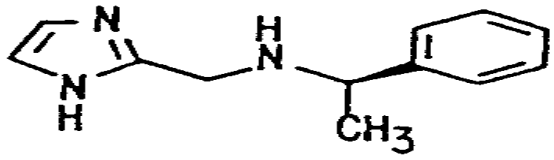


533



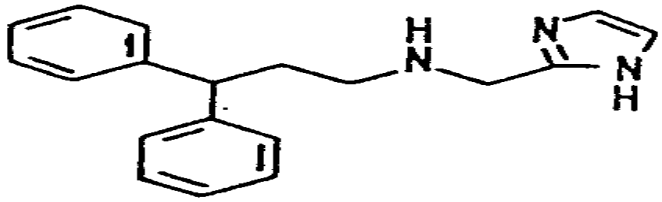
531

도면 36d

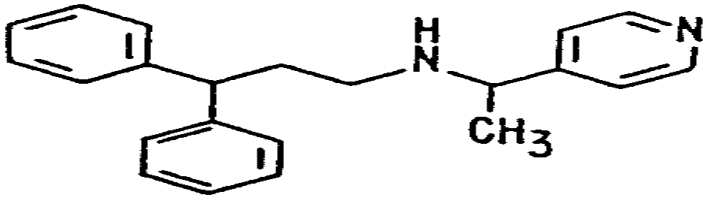


NPS ~~zz~~

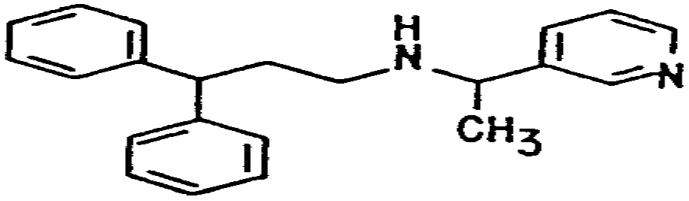
526



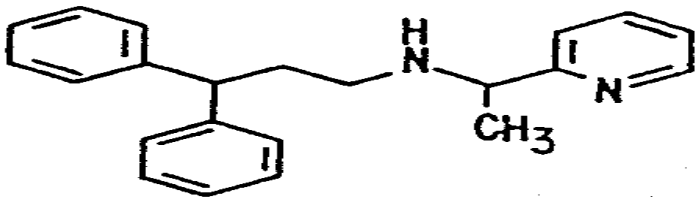
535



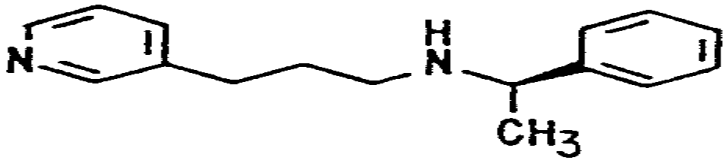
536



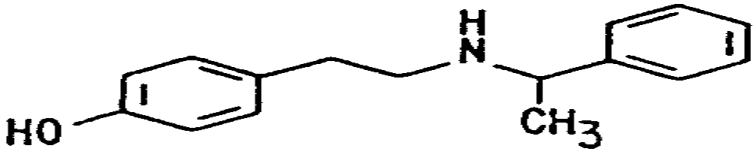
537



538



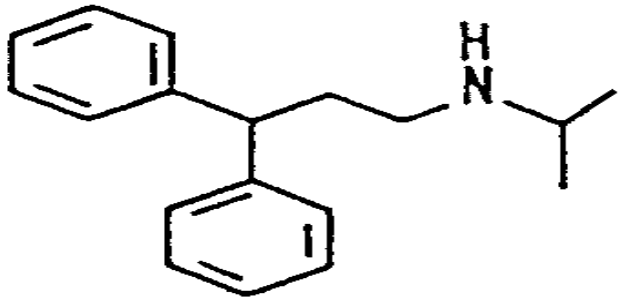
543



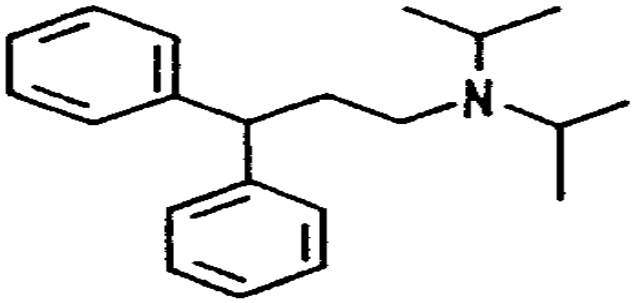
529

도면 36e

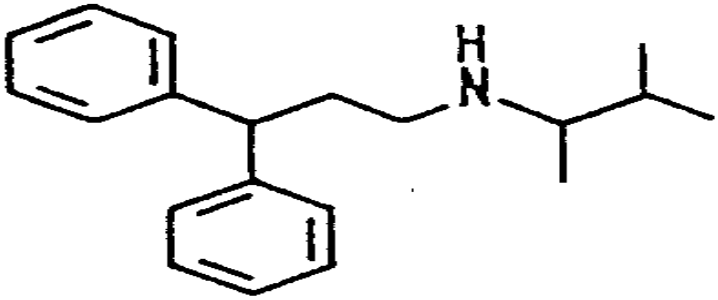
NPS #



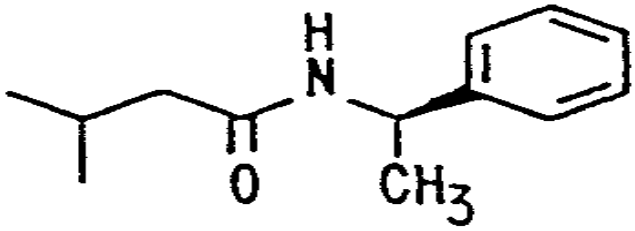
539



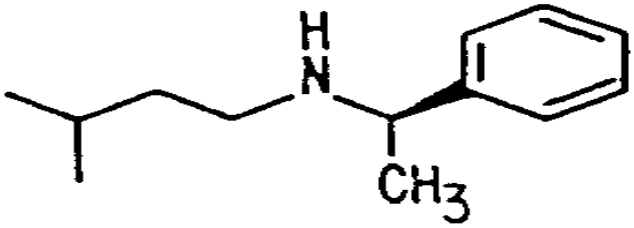
540



542



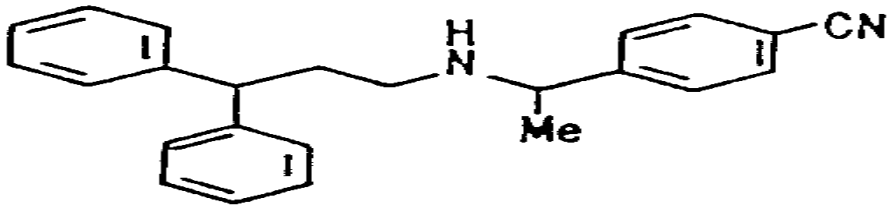
546



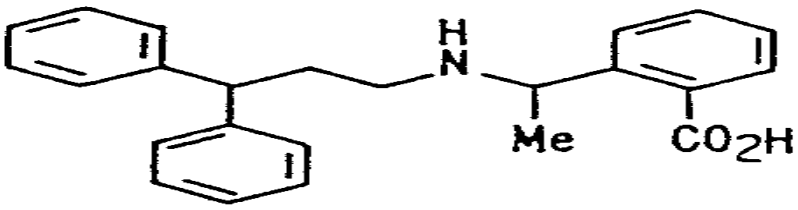
547

도면 36f

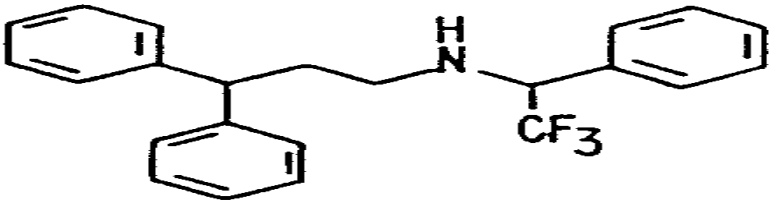
NPS 41



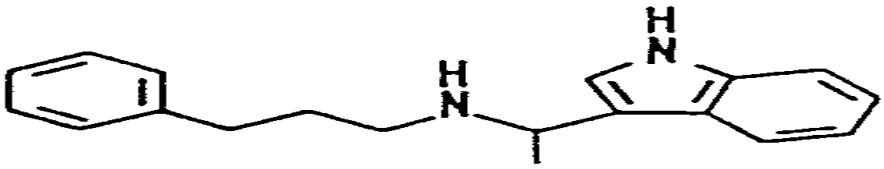
541



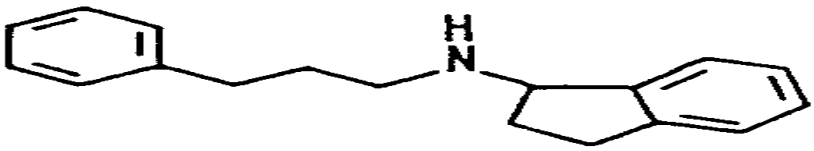
545



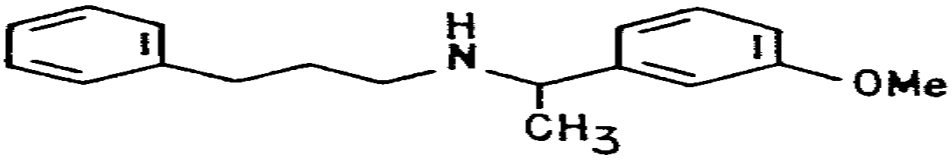
544



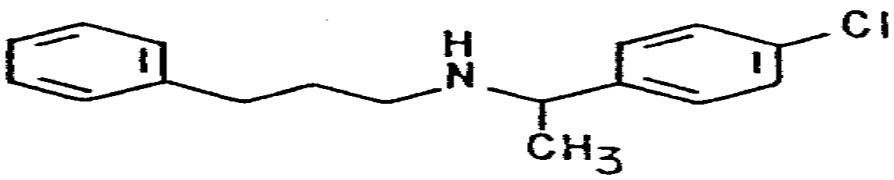
548



549

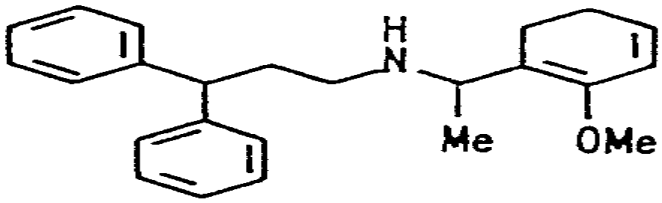


467



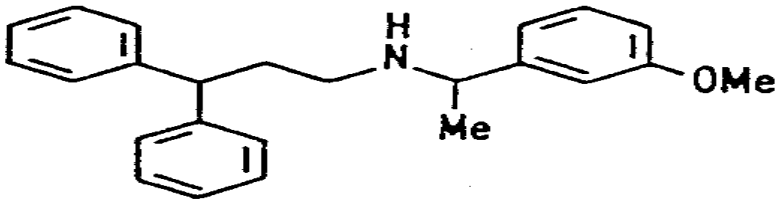
468

도면 36g

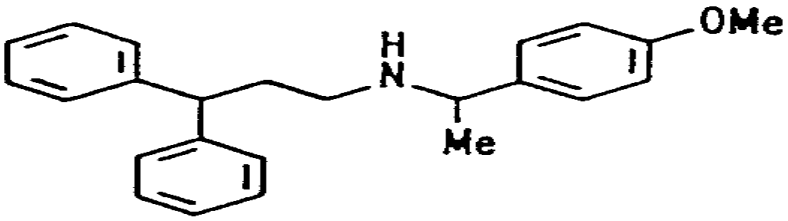


NPS ~~#~~

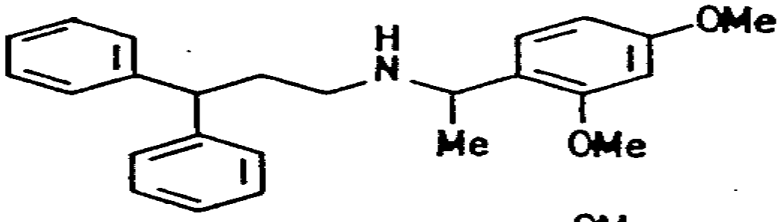
550



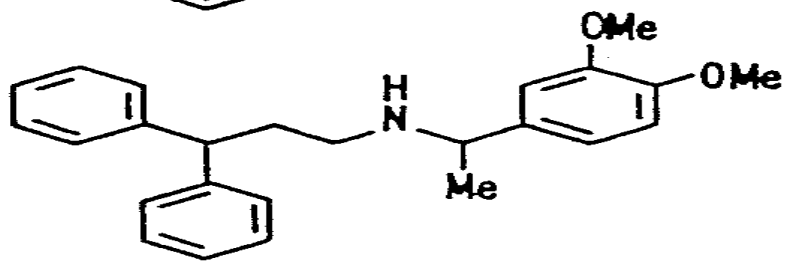
551



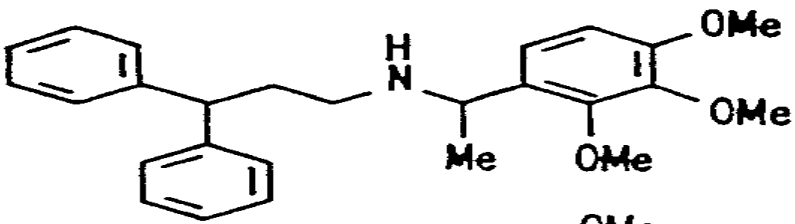
552



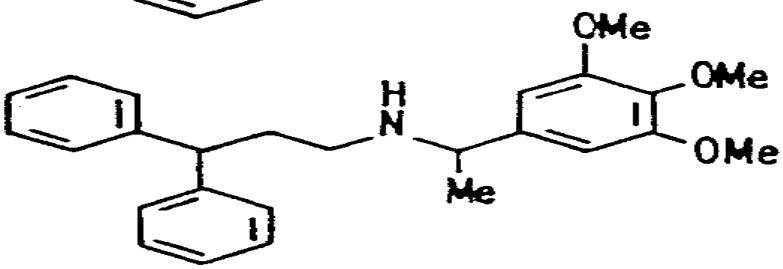
553



554

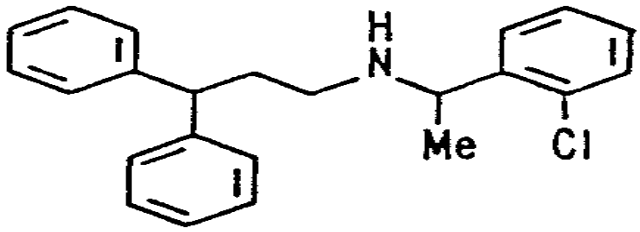


555

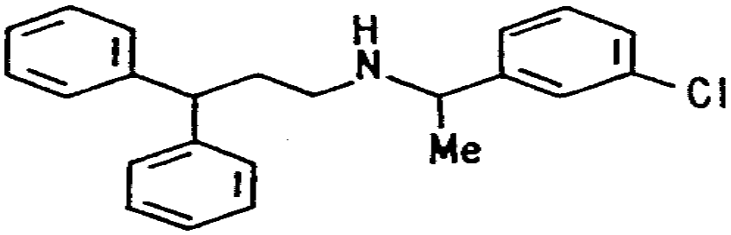


556

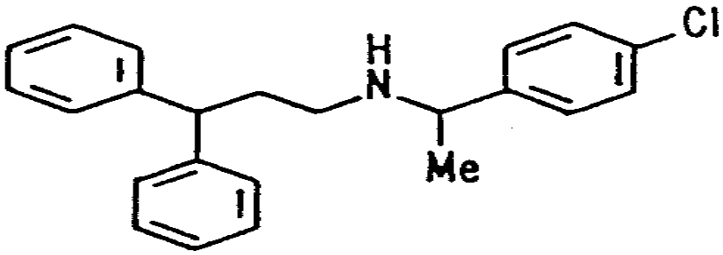
도면 36h



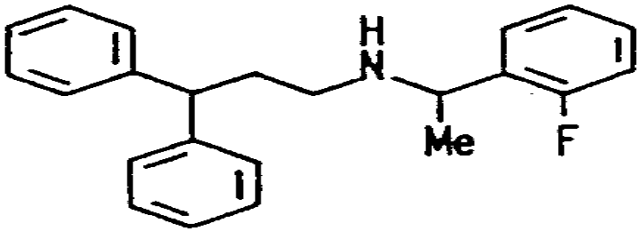
NPS #
557



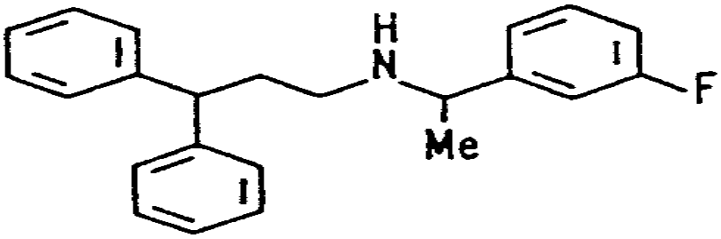
558



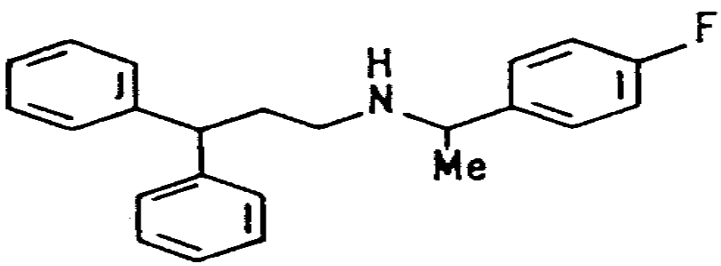
559



560

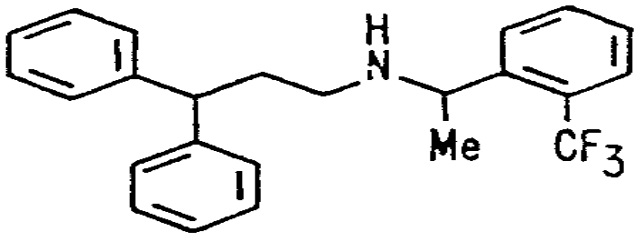


561



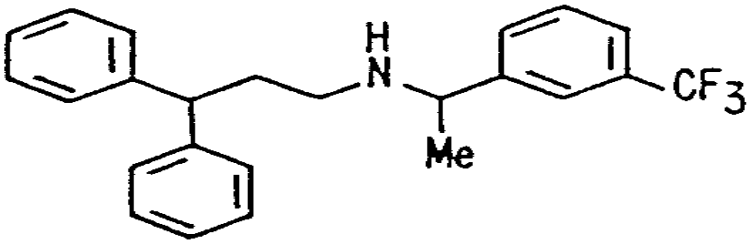
562

도면 36i

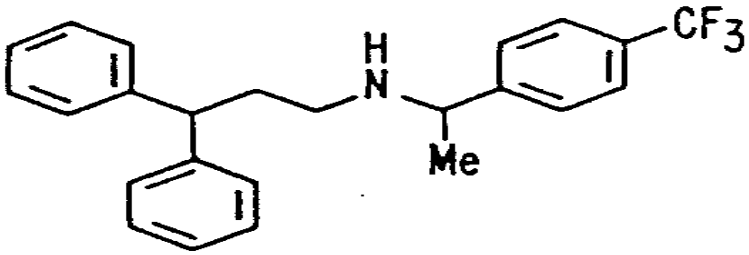


NPS #

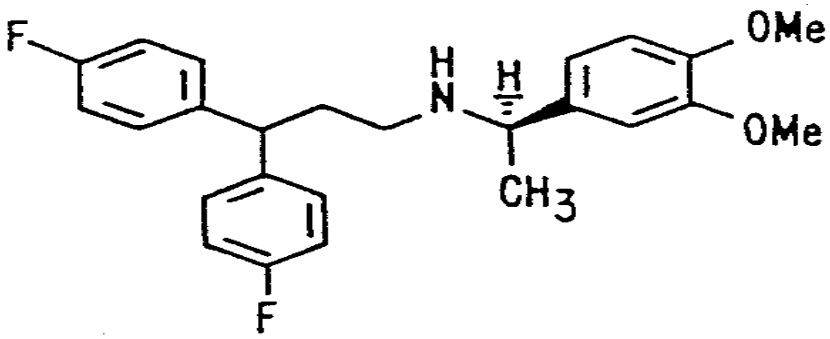
563

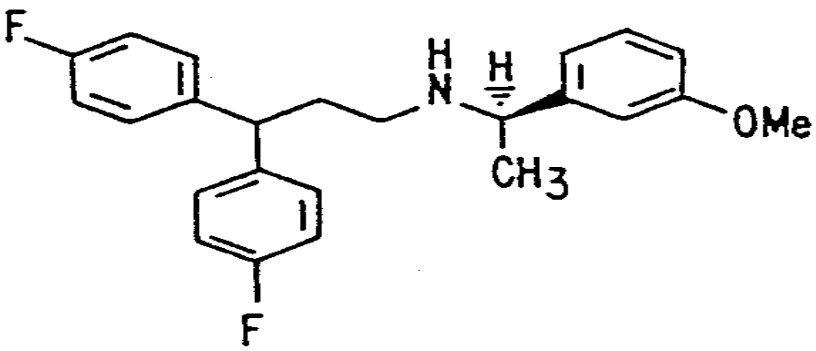


564



565

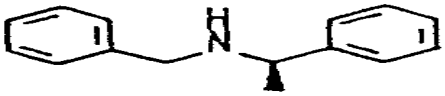




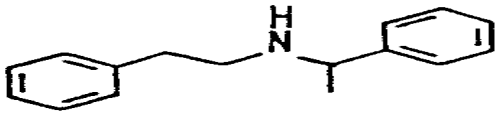
606

도면 36j

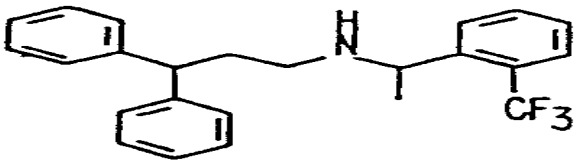
NPS #



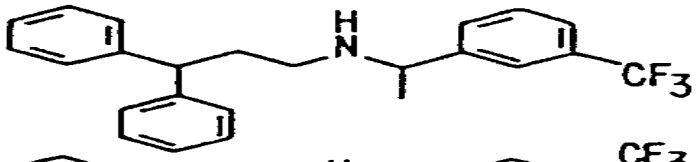
457



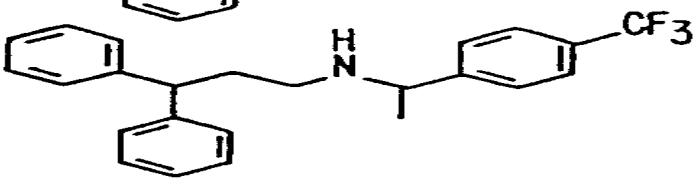
458



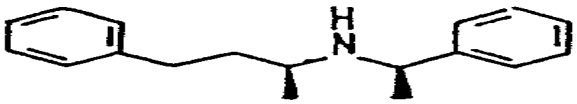
563



564



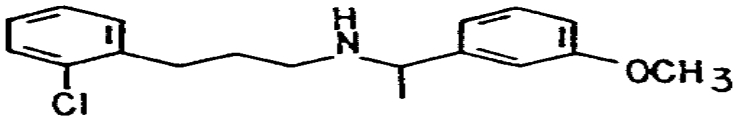
565



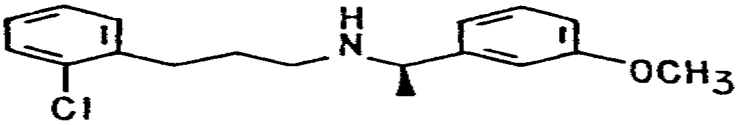
566

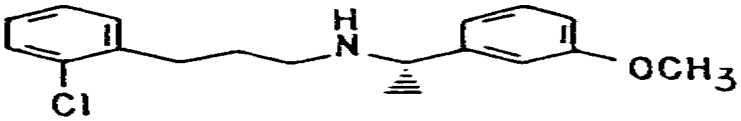


567

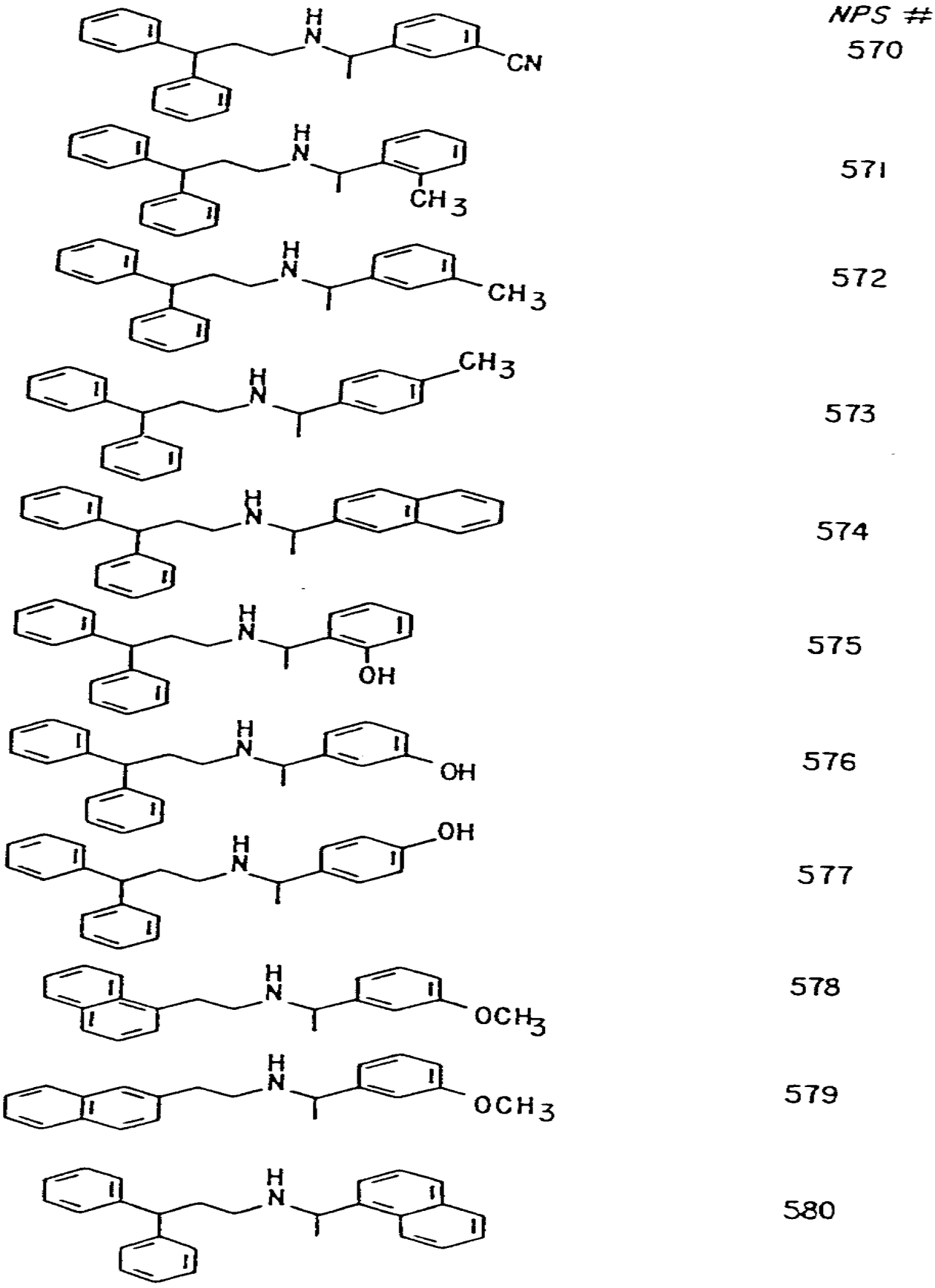


568



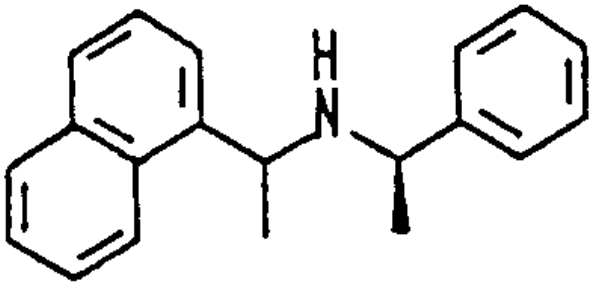


도면 36k

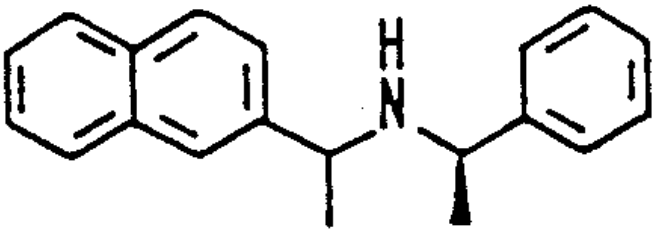


도면 36l

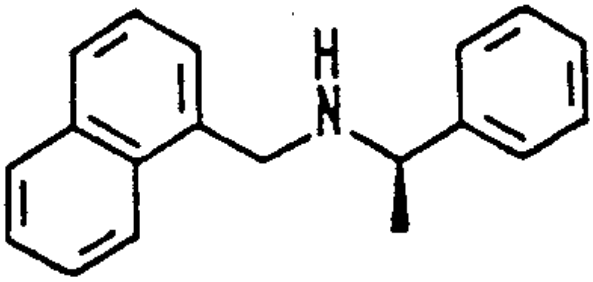
NPS #



592

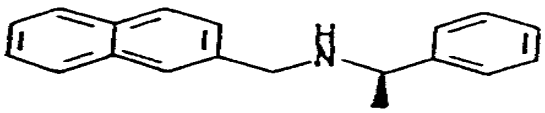


593



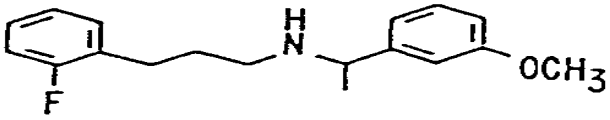
594

도면 36m

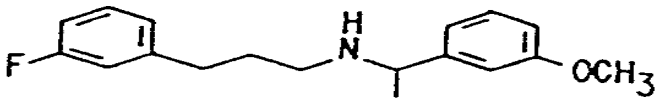


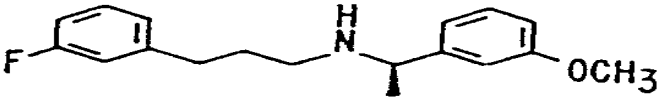
NPS #

595

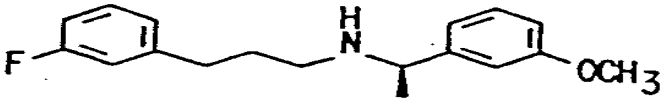


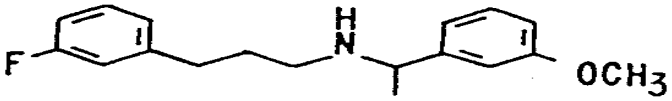
601



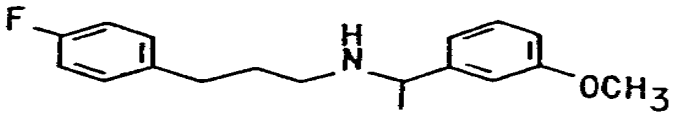


602

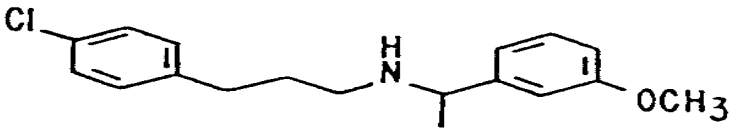




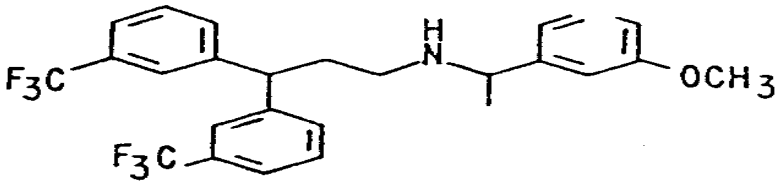
603



604



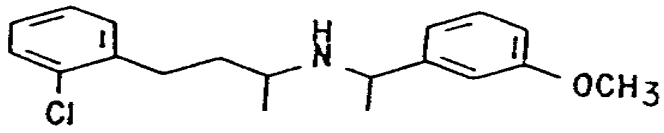
605



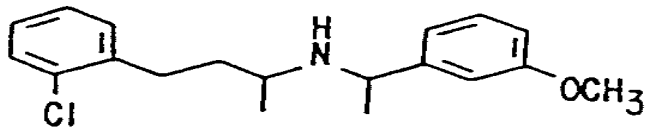
607

도면 36n

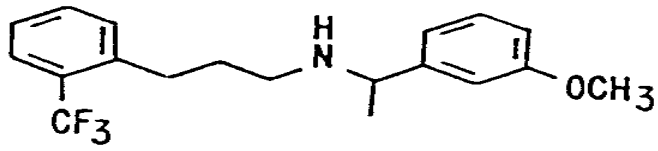
NPS #



609



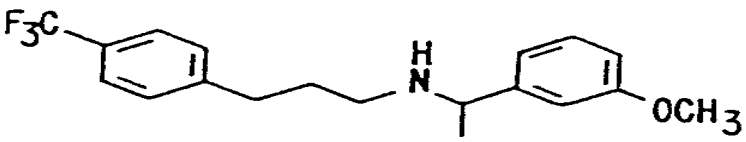
610



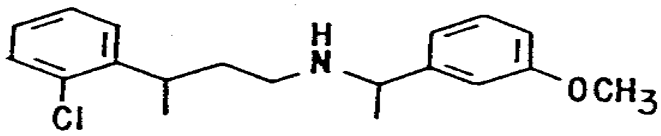
611



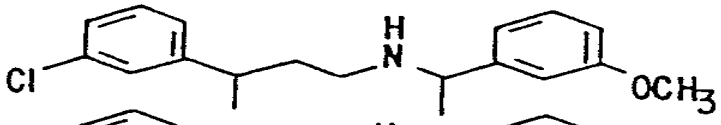
612



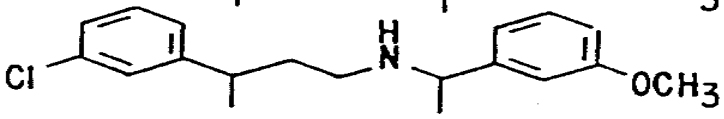
613



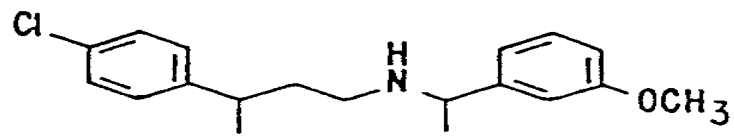
614



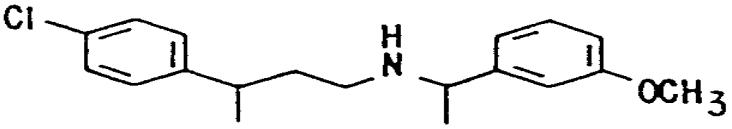
615



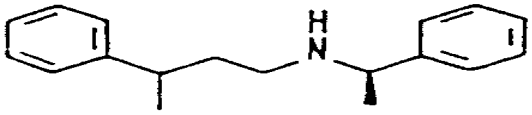
616



617

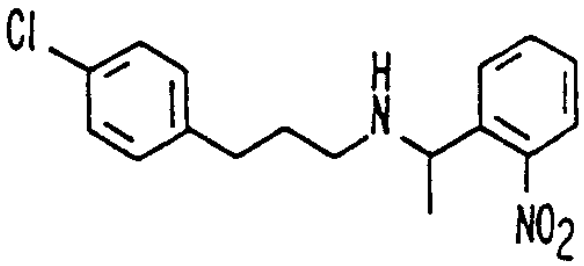


618

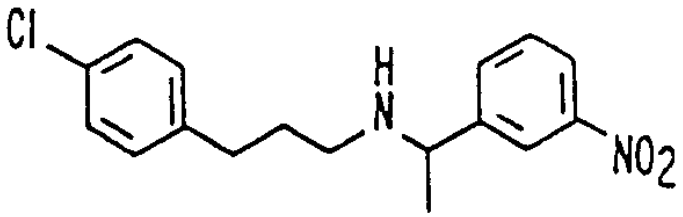


620

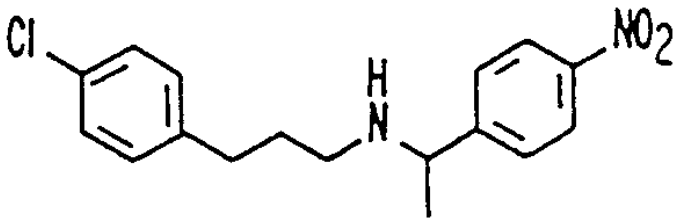
도면 36o



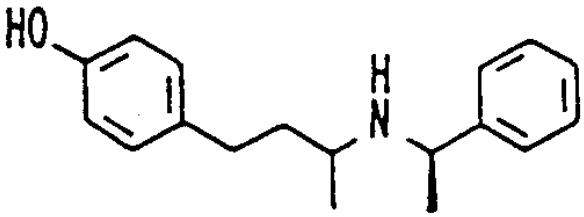
NPS #
623



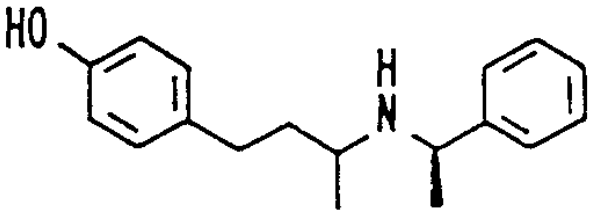
624



625



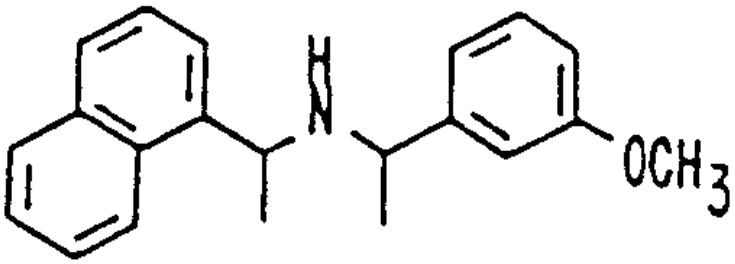
631



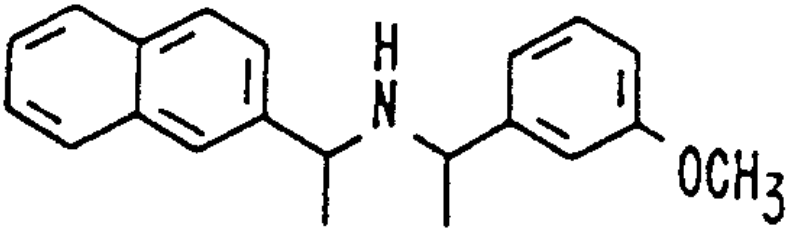
632

도면 36p

NPS #

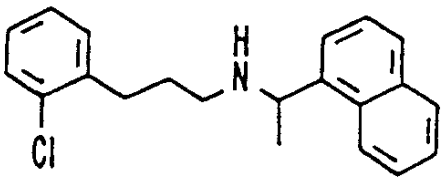


641



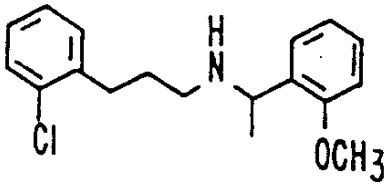
642

도면 36q

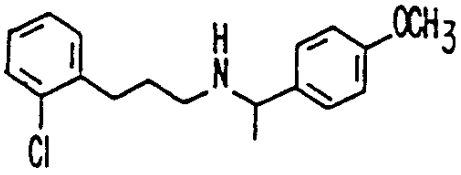


NPS #

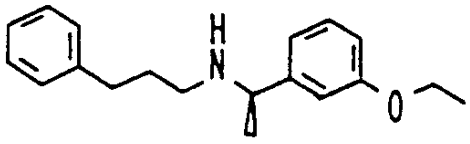
646

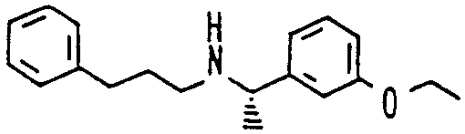


650

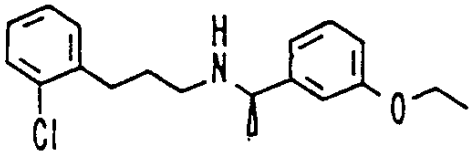


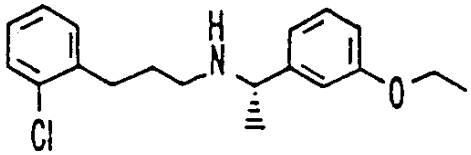
652



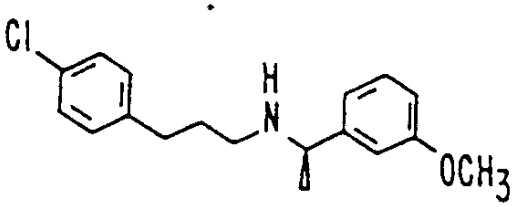


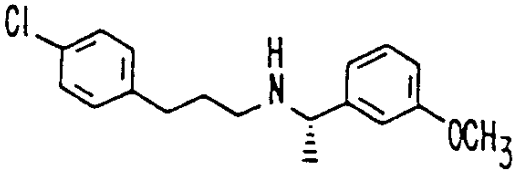
653





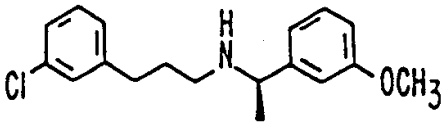
654





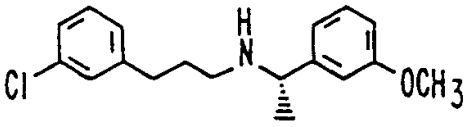
655

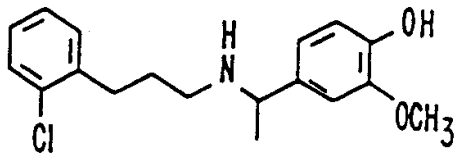
도면 36r



NPS ☆

656

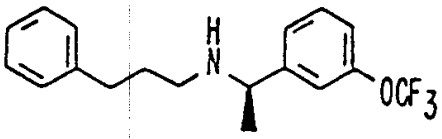




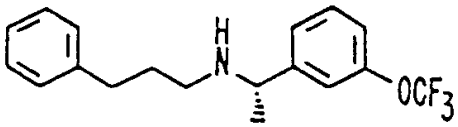
684

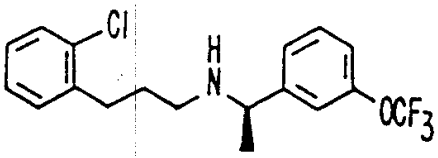
도면 36s

NPS #

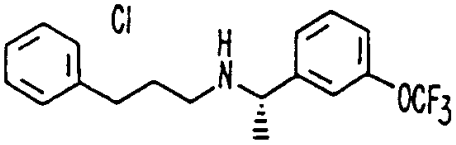


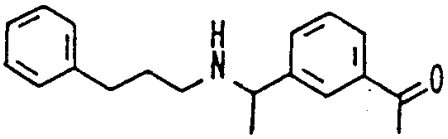
689



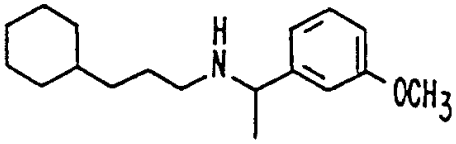


691

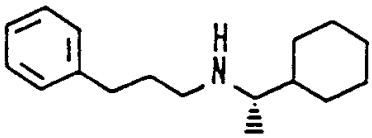




706



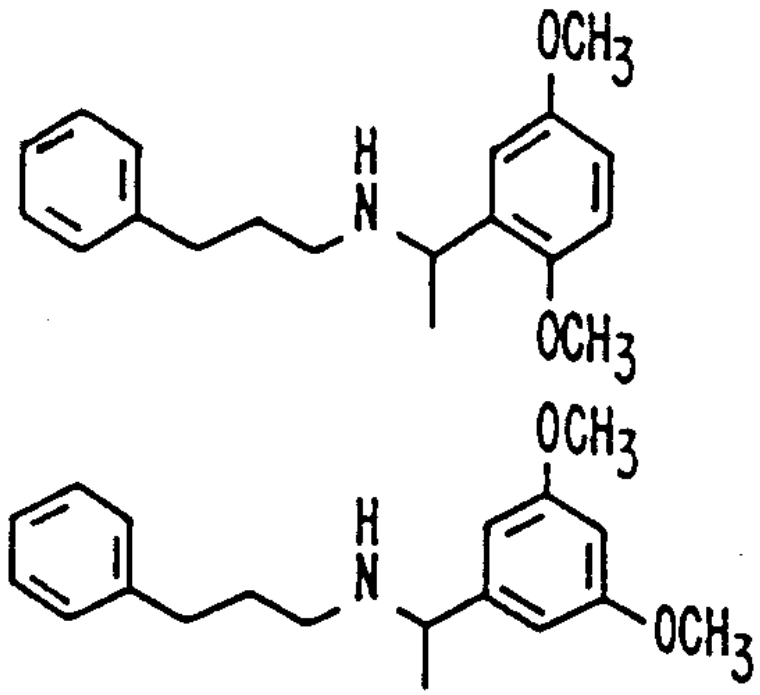
708



709

도면 36t

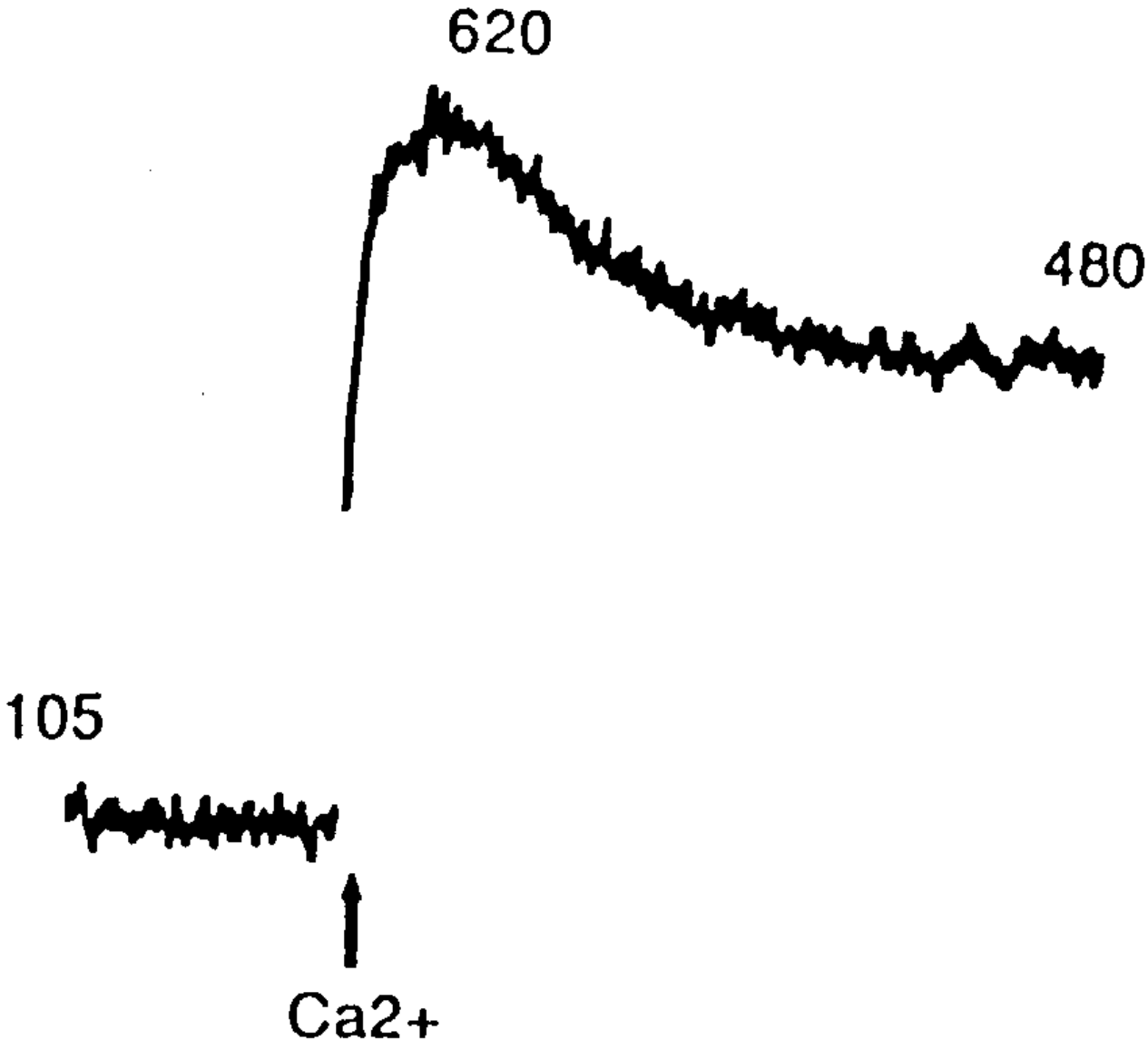
NPS #



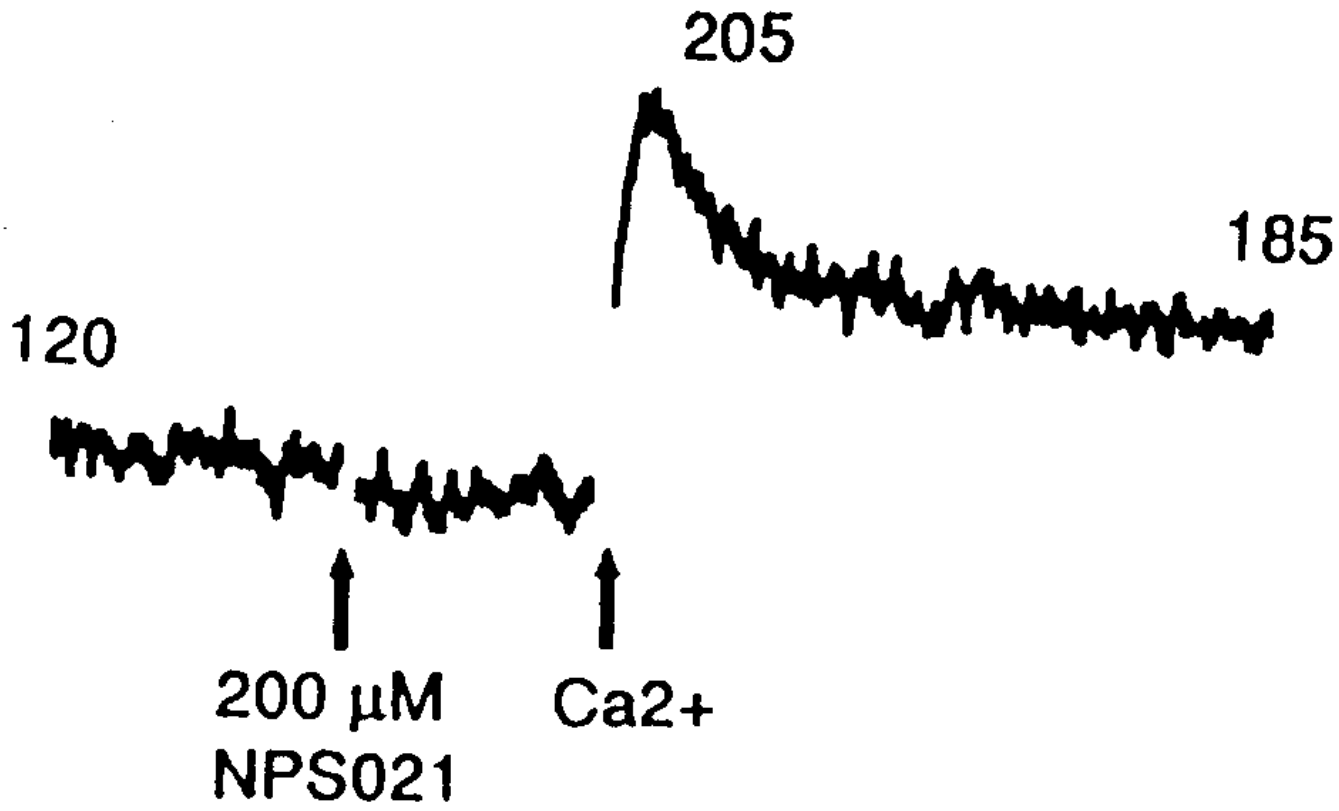
710

711

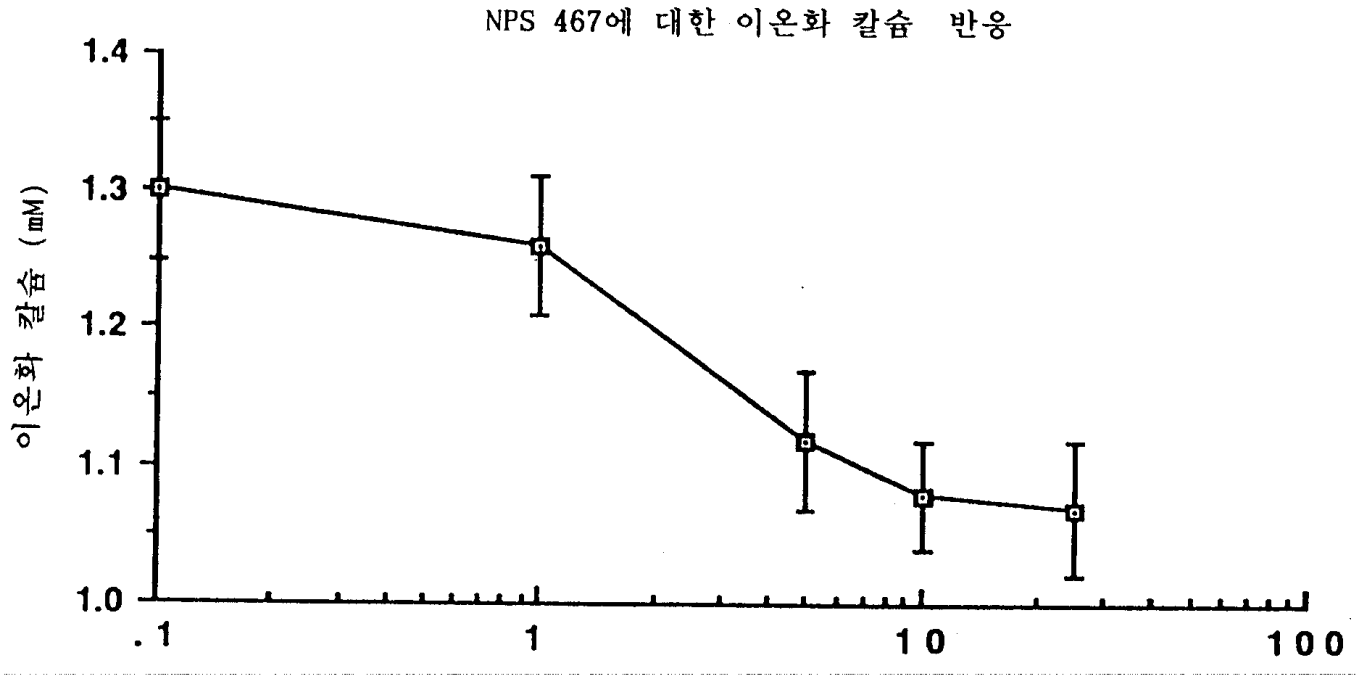
도면 37a



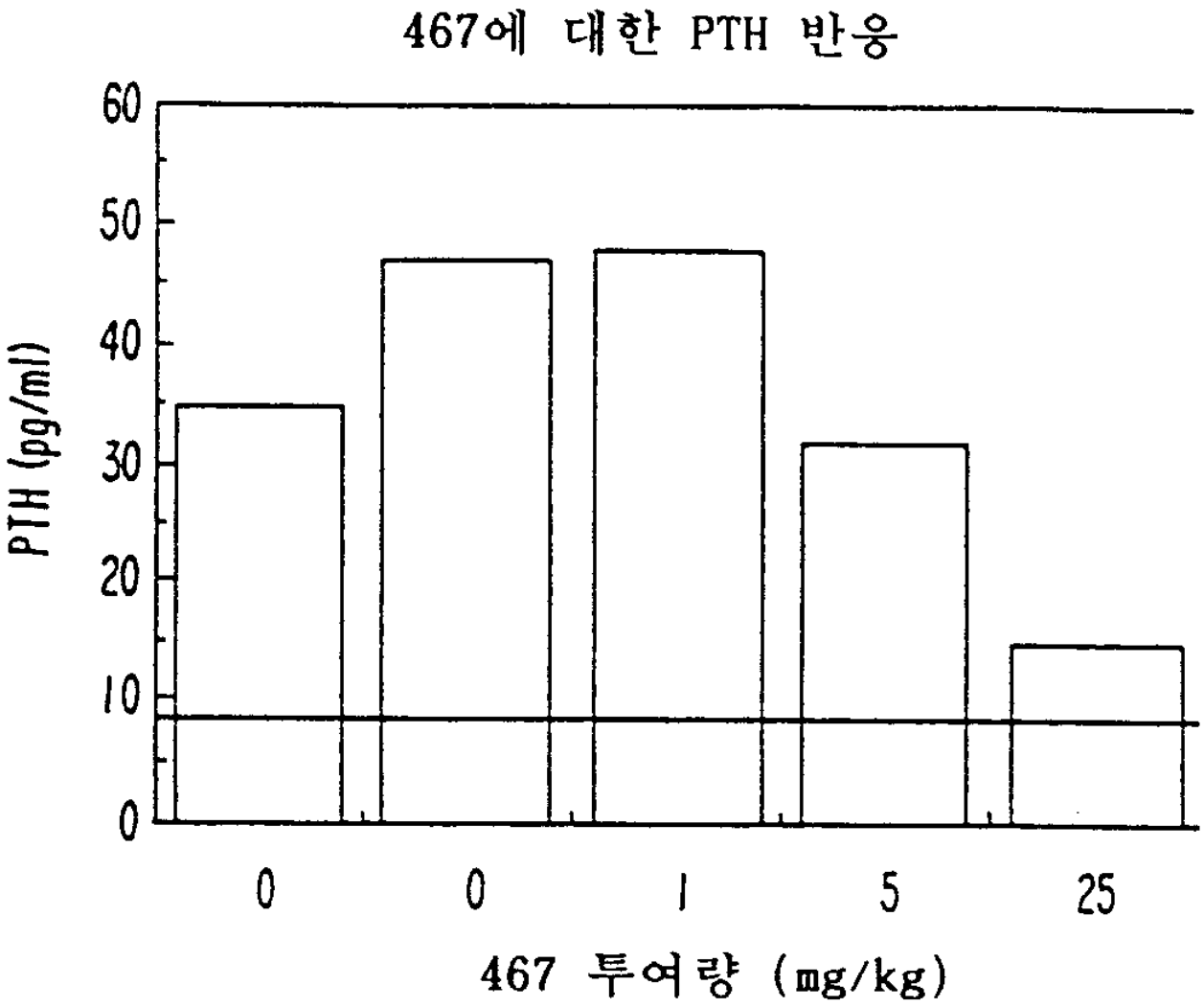
도면 37b


205
185
120
200 μM
NPS021
Ca2+

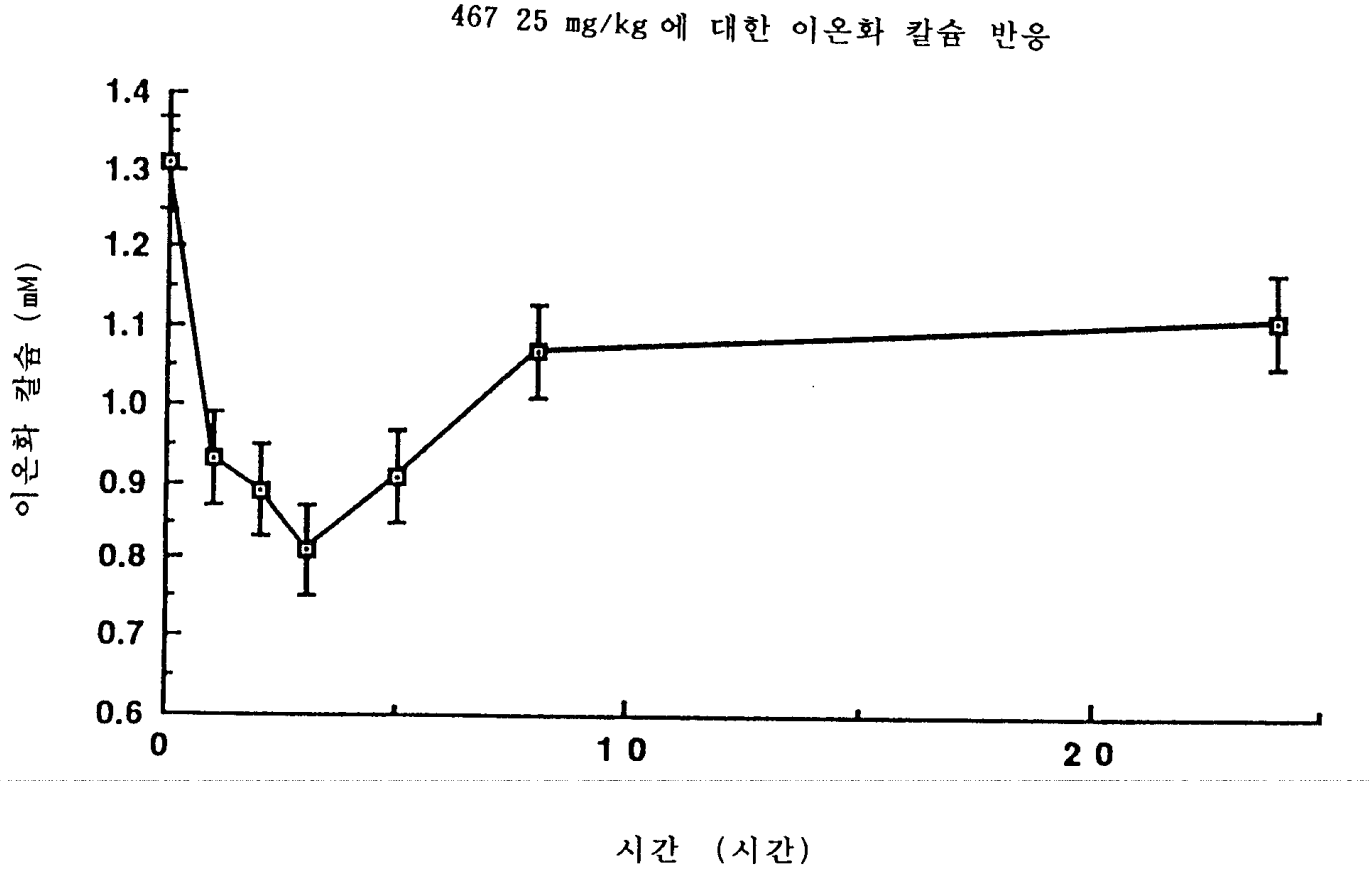
도면 38


NPS 467에 대한 이온화 칼슘 반응
이온화 칼슘 (mM)
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
.1
1
10
100
467 투여량 (mg/kg)

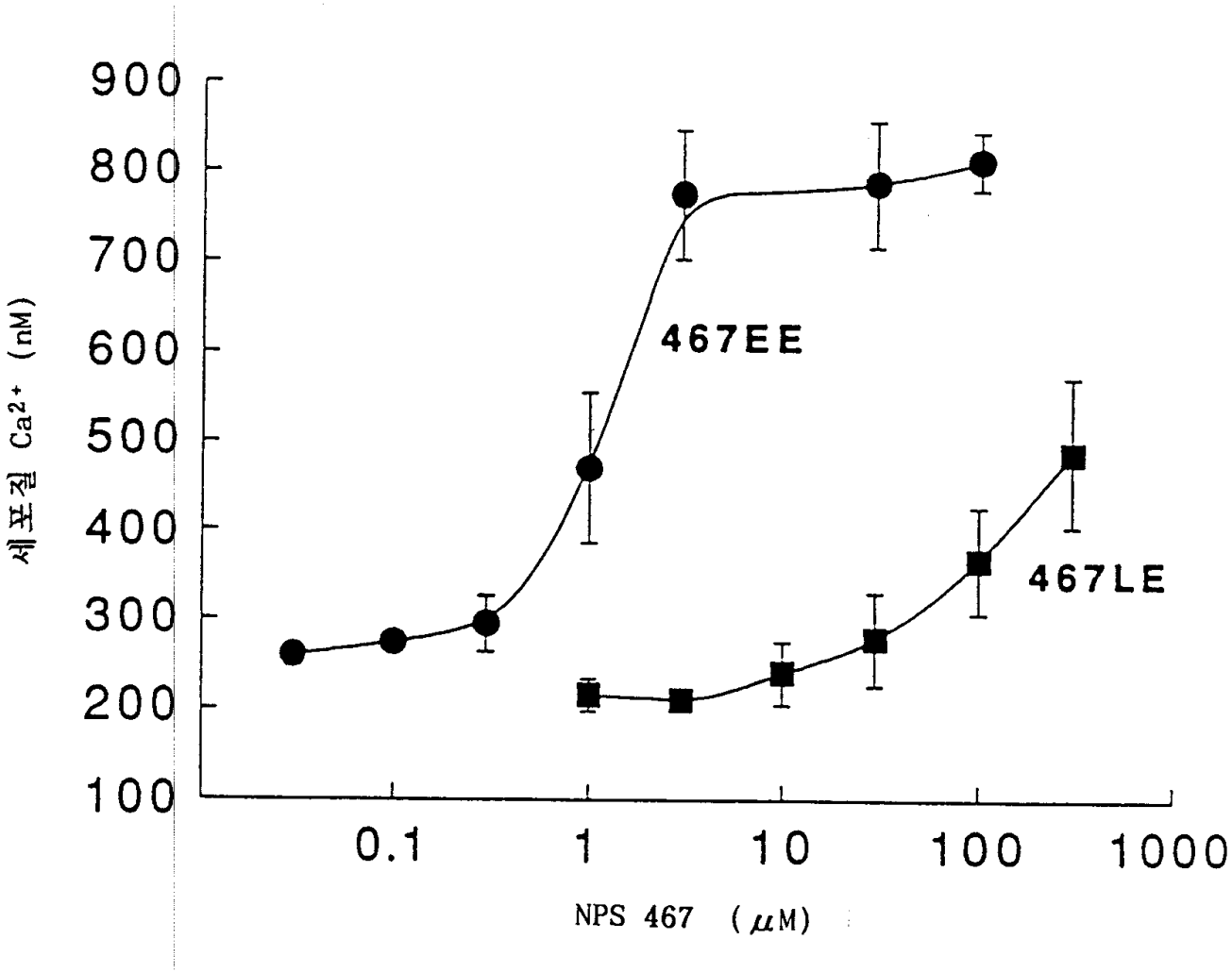
도면 39



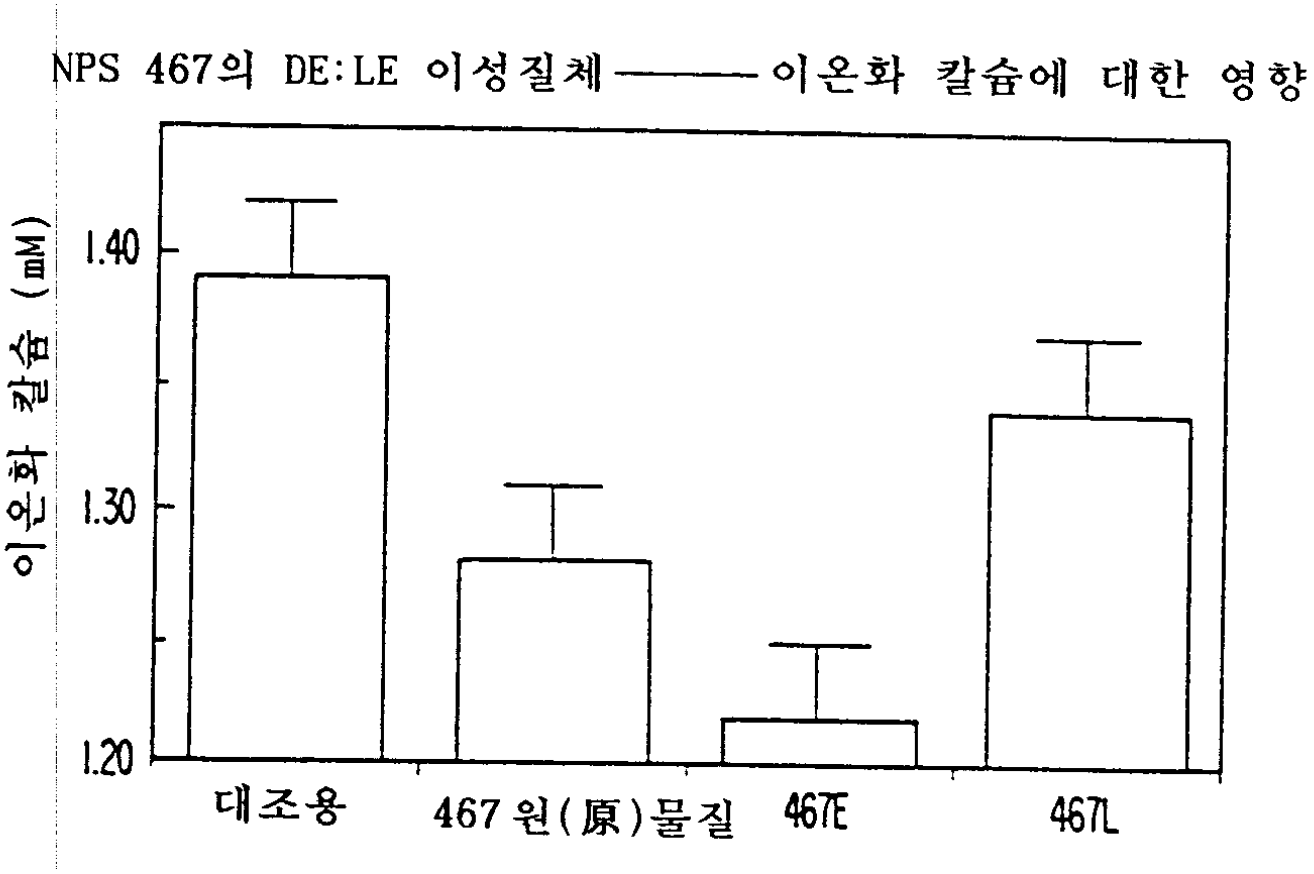
도면 40


467 25 mg/kg 에 대한 이온화 칼슘 반응
이온화 칼슘 (mM)
1.4
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0
10
20
시간 (시간)

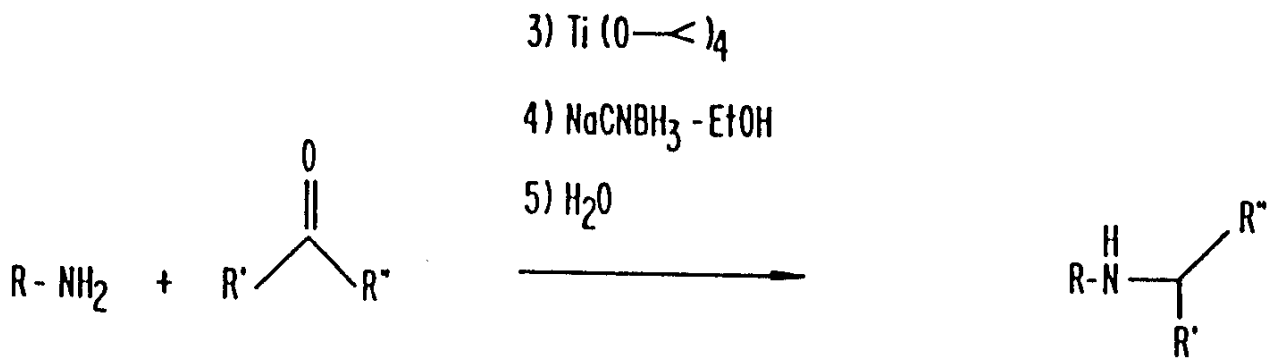
도면 41


900
800
700
600
500
400
300
200
100
세포질 Ca2+ (nM)
467EE
467LE
0.1
1
10
100
1000
NPS 467 (μM)

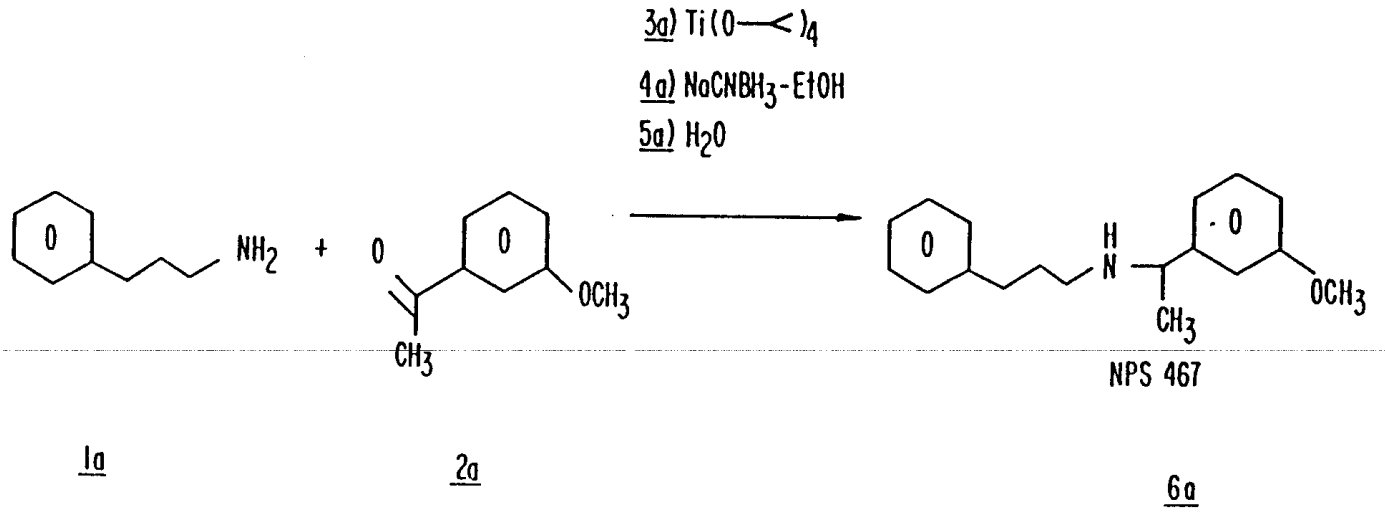
도면 42


NPS 467의 DE:LE 이성질체 ——— 이온화 칼슘에 대한 영향
이온화 칼슘 (mM)
1.40
1.30
1.20
대조용
467 원(原)물질
467E
467L

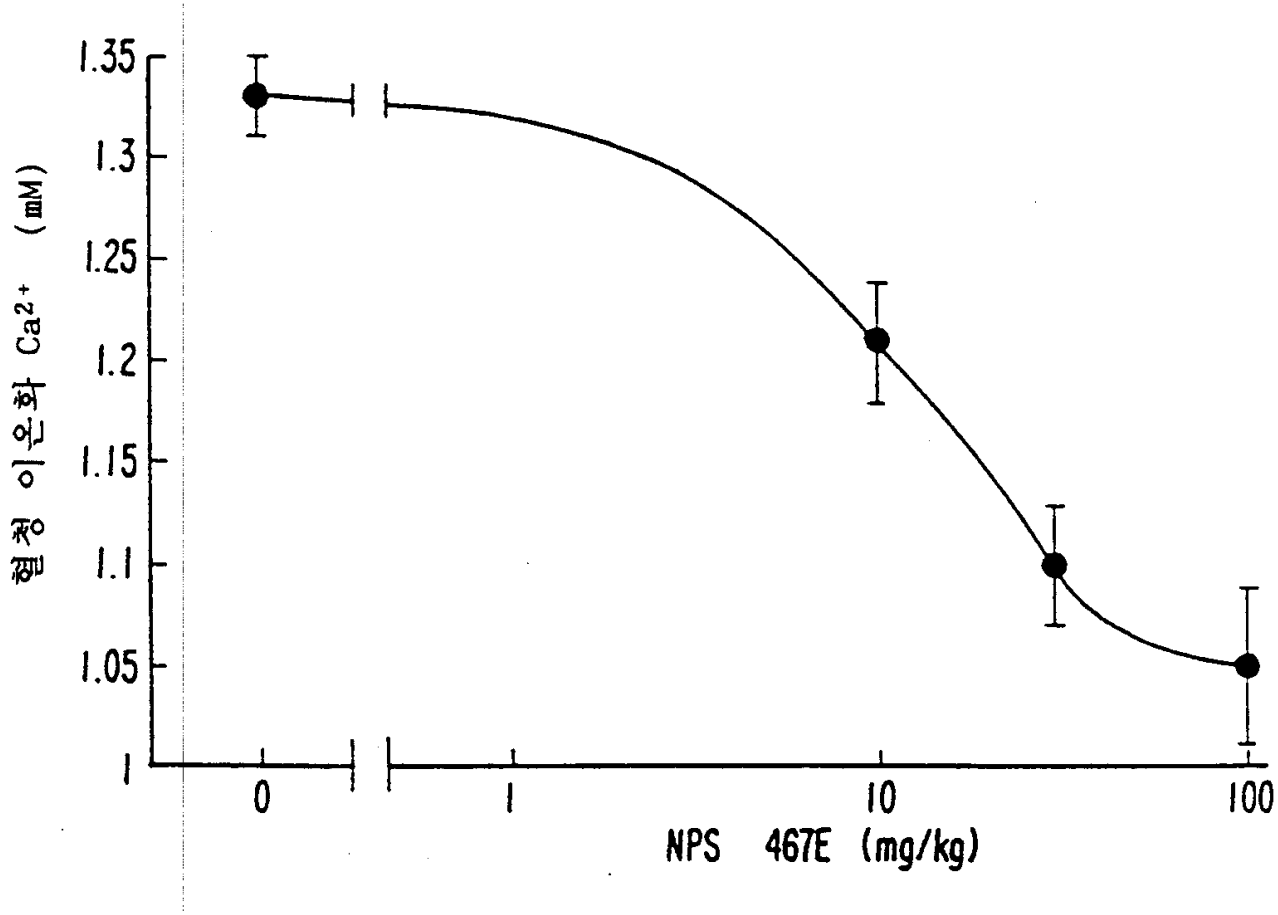
도면 43a


3) Ti(O—<)4
4) NaCNBH3 - EtOH
5) H2O
R - NH2
+
O
R'
R"
R-N
H
R"
R'
1
2
6

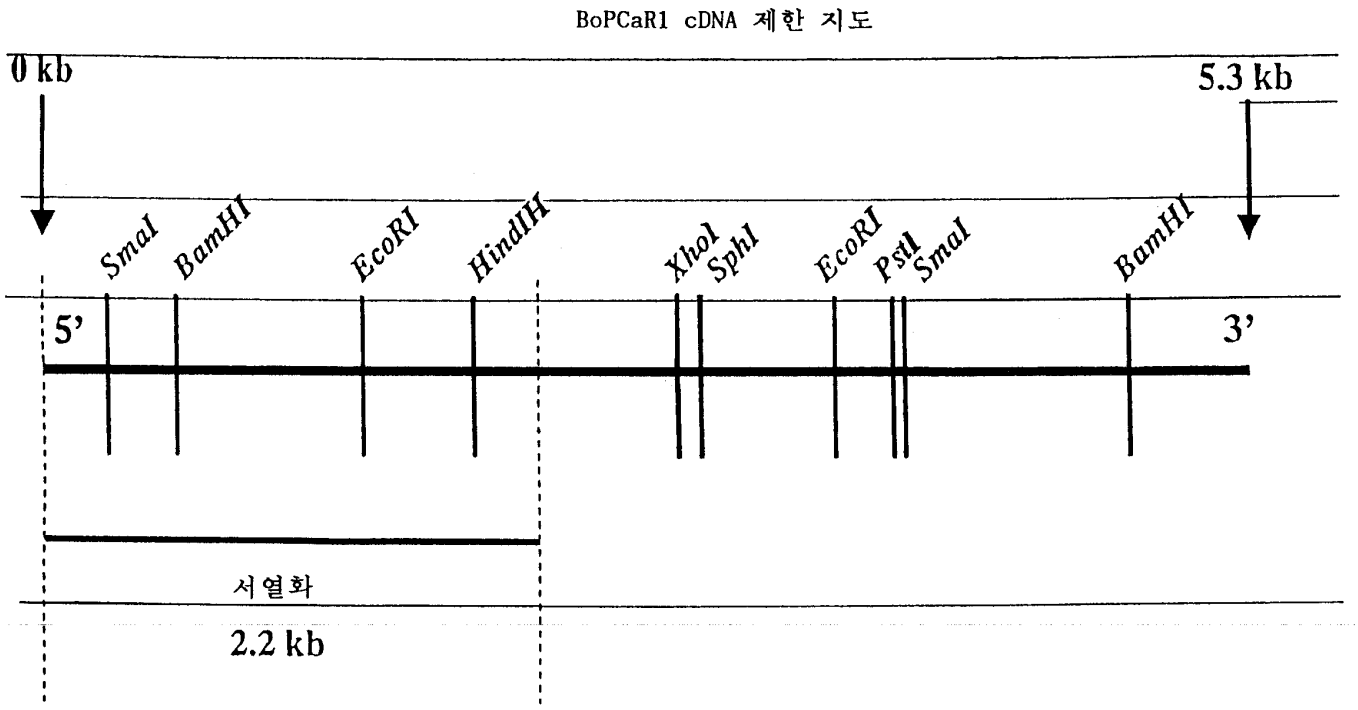
도면 43b


3a) Ti(O—<)4
4a) NaCNBH3-EtOH
5a) H2O
NH2
OCH3
CH3
H
N
NPS 467
1a
2a
6a

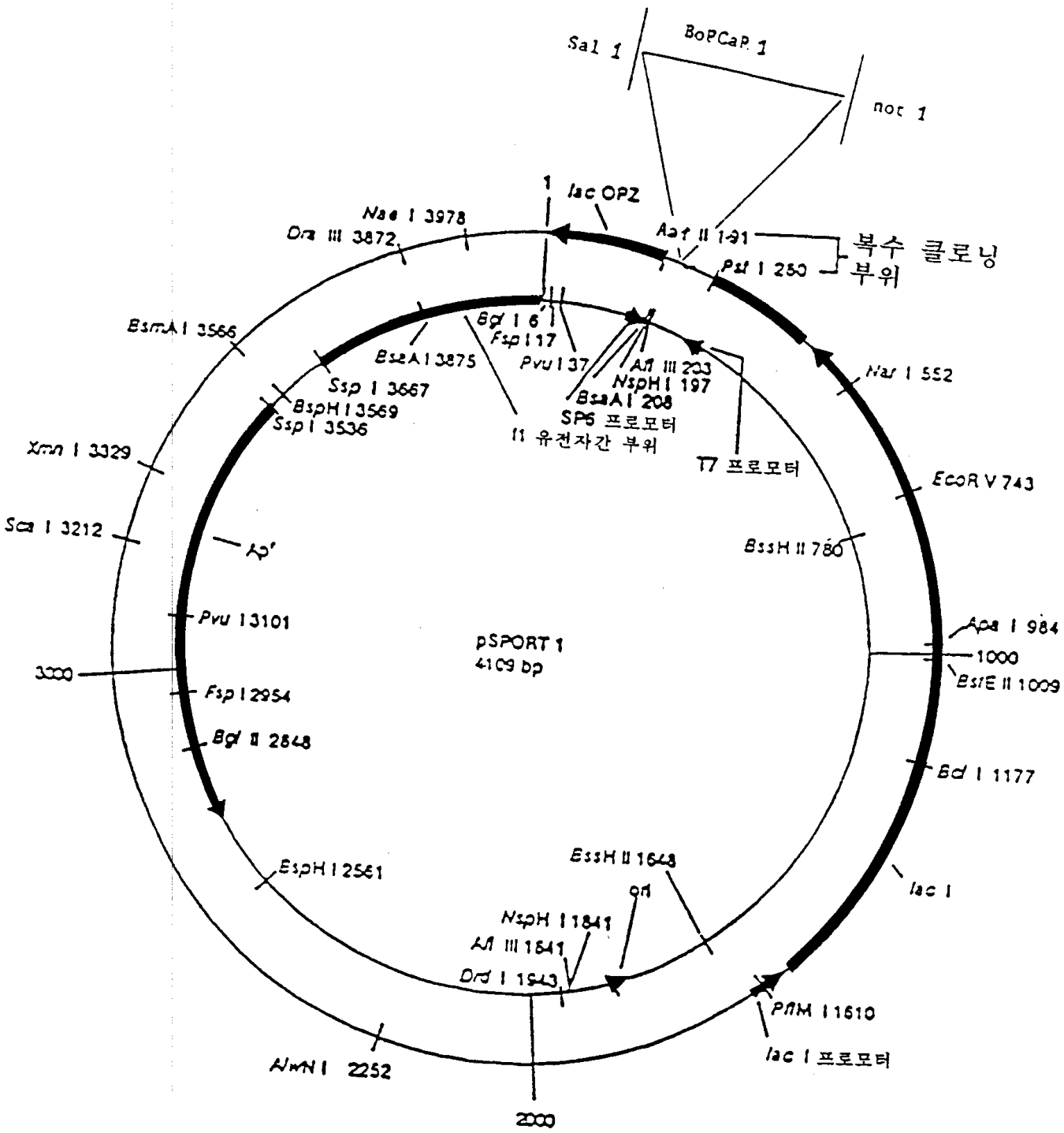
도면 44


혈청 이온화 Ca2+ (mM)
1.35
1.3
1.25
1.2
1.15
1.1
1.05
1
0
1
10
100
NPS 467E (mg/kg)

도면 45


BoPCaR1 cDNA 제한 지도
0 kb
5.3 kb
SmaI
BamHI
EcoRI
HindIII
XhoI
SphI
EcoRI
PstI
SmaI
BamHI
5'
3'
서열화
2.2 kb

도면 46


Sal 1
BoPCaP 1
not 1
1
lac OPZ
Nae I 3978
Dra III 3872
Aat II 191
Pst I 250
복수 클로닝 부위
BsmA I 3566
Bgl I 6
Fsp I 17
Pvu I 37
Afl III 203
NspH I 197
BsaA I 208
SP6 프로모터
BseA I 3875
Ssp I 3667
BspH I 3569
Ssp I 3536
f1 유전자간 부위
T7 프로모터
Nar I 552
Xmn I 3329
EcoR V 743
Sca I 3212
Ap'
BssH II 780
Pvu I 3101
pSPORT 1
4109 bp
Apa I 984
3000
1000
BstE II 1009
Fsp I 2954
Bgl II 2848
Bcl I 1177
EspH I 2561
BssH II 1648
ori
lac I
NspH I 1841
Afl III 1841
Dra I 1843
PflM I 1610
lac I 프로모터
AlwN I 2252
2000

도면 47

```
   1 CCACGCGTCCGCGGA AAAAAAAAAAAAGTT CCCCACTCTAGTACA GAGAAGGTTGGCAGA

  60 GTCGTAAGCCCCCAA CCTCTTAAACTTCTC TGCATCTCCAAGGAG AAGGAGGGAAGAGGG
 120 GTTCTTTCCGACCTG AGGAGCTGGATCTGG GGTCCGAGAACCCCA AGGTAGCACCGGAAA
 180 GAACAGCACAGGAGG CGAGAGCGTGCGGTG GCCGGTKGGCGGGAG AACCAGACCCGACKY
 240 CGCGGTCCTCGGYGC TGCCGGGKYCCSGGG ACTCAGCTCAGCACG ACTGGGAAGCCGAAA
 300 GTACTACACACGGTC TCTGCATGATGTGAC TTCTGAAGACTCAAG AGCCACCCACTTCAC
 360 TAGTCTGCAATGGAG AAGGCAGAAATGGAA AGTCAAACCCCACGG TTCCATTCTATTAAT
 420 TCTGTAGACATGTGC CCCCACTGCAGGGAG TGAGTCGCACCAAGG GGGAAAGTCCTCAGG
 480 GGCCCCCAGACCACC AGCGCTTGAGTCCCT CTTCCTGGAGAGAAA GCAGAACTATGGCAC
 540 TTTATAGCTGCTGTT GGATCCTCTTGGCTT TTTTCTACCTGGTGC ACTTCCGCCTATGGG
 600 CCTGACCAGCGAGCC CAAAAGAAAGGGGAC ATTATCCTCGGGGGG CTCTTTCCTATTCAT
 660 TTTGGGGTTGMMGTG AAAGATCAGGATCTA AAGTCGAGGCCGGAG TCCGTGGAGTGTATC
 720 AGGTATAATTTCCGA GGATTTCGCTGGTTA CAAGCTATGATATTT GCCATAGAGGAAATA
 780 AACAGCAGTCCAGCC CTTCTTCCCAACATG ACCCTGGGATACAGG ATATTCGACACTTGT
 840 AACACCGTCTCTAAA GCCTTGGAGGCCACC CTGAGTTTTGTGGCC CAGAACAAAATTGAC
 900 TCTTTGAACCTTGAT GAGTTCTGCAACTGC TCAGAGCACATCCCC TCTACCATCGCAGTG
 960 GTGGGAGCTACTGGC TCGGGCATCTCCACA GCAGTGGCCAACCTG CTGGGGCTCTTCTAC
1020 ATCCCCCAGGTCAGC TATGCCTCCTCCAGC AGACTCCTCAGCAAC AAGAATCAATTCAAG
1080 TCCTTCCTCCGCACC ATACCCAATGATGAA CACCAGGCCACGGCC ATGGCTGACATCATC
1140 GAGTACTTCCGCTGG AACTGGGTGGGCACA ATTGCAGCTGACGAT GACTATGGCCGGCCA
1200 GGGATCGAGAAGTTT CGAGAGGAAGCTGAG GAGAGGGACATCTGC ATCGACTTCAGCGAG
1260 CTCATCTCCCAATAC TCTGATGAGGAAAAG ATCCAGCAGGTGGTG GAGGTGATCCAGAAT
1320 TCCACCGCCAAAGTC ATTGTCCGTCTTCTC CAGCGGCCCAGACCT GGAACCCCTCATCAA
1380 AGAGATCGTCCGGCG CAATATCACAGGCAG GATCTGGCTGGCCAG CGAGSCTGGSCAGCT
1440 CTTCCCTGATTGCTA TGCCCGAGTATTTCC ATGTGGTCGGAGGCA CCATTGGGTTTGGTT
1500 TGAAAGCTGGGCAGA TCCCAGGCTTCCGGG AATTCCTGCAGAAAG TCCACCCCAGGAAGT
1560 CTGTCCACAATGGTT TTGCCAAGGAGTTTT GGGAAGAAACATTTA ACTGCCACCTGCAAG
1620 AGGGTGCTAAAGGCC CATTACCGGTGGACA CCTTCCTGAGAGGTC ACGAAGAAGGAGGTG
1680 CCAGGTTAAGCAACA GTCCCACTGCCTTCC GACCTCTGTGCACTG GGGAGGAGAACATCA
1740 GCAGTGTCGAGACTC CTTACATGGATTATA CACATTTACGGATAT CCTACAACGTCTACT
1800 TAGCCGTCTACTCCA TTGCTCATGCCCTAC AAGATATATACACCT GCATACCTGGGAGAG
1860 GGCTCTTCACCAACG GTTCCTGCGCAGATA TCAAGAAGGTTGAAG CTTGGCAGGTCCTGA
1920 AACACCTGCGGCACC TAAATTTTACCAGCA ATATGGGGGAGCAAG TAACTTTCGATGAAT
1980 GTGGAGACCTGGCAG GGAACTATTCCATCA TCAACTGGCACCTCT CCCCAGAGGACGGCT
2040 CCATAGTGTTTAAGG AAGTTGGATATTACA ATGTCTATGCCAAGA AAGGAGAGAGACTCT
2100 TCATCAATGATGAAA AAATTCTGTGGAGTG GATTCTCAAGGGAGG TGC 2148
```