

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) Int. Cl.⁶
A61K 45/06

(11) 공개번호 특1999-0077183
(43) 공개일자 1999년10월25일

(21) 출원번호	10-1998-0705324	(87) 국제공개번호	WO 1997/25063
(22) 출원일자	1998년07월11일	(87) 국제공개일자	1997년07월17일
번역문제출일자	1998년07월11일		
(86) 국제출원번호	PCT/CA1997/00019		
(86) 국제출원출원일자	1997년01월13일		
(81) 지정국	AP ARIP0특허 : 케냐 레소토 말라위 수단 스와질랜드 케냐 EA 유라시아특허 : 아르메니아 아제르바이잔 벨라루스 EP 유럽특허 : 오스트리아 벨기에 스위스 독일 덴마크 스페인 프랑스 영국 그리스 이탈리아 룩셈부르크 모나코 네덜란드 포르투갈 스웨덴 오스트리아 스위스 독일 덴마크 스페인 핀란드 영국 국내특허 : 아일랜드 알바니아 오스트레일리아 보스니아-헤르체고비나 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 쿠바 체코 에스토니아 그 루지야 헝가리 이스라엘 아이슬란드 일본		
(30) 우선권주장	8/584,000 1996년01월11일 미국(US)		
(71) 출원인	더 웰레슬레이 호스피탈 파운데이션 캐나다 온타리오 엠4와이 1제이3 토론토 웰레슬레이 스트리트 이스트160		
(72) 발명자	베르거 스투어트 알란 캐나다 온타리오 엠6씨 1에스4 토론토 스트라썬안 로드 220 곰머만 제니퍼 린 캐나다 온타리오 엠5에스 1씨9 토론토 윌콕스 스트리트 89		
(74) 대리인	백덕열, 손창규, 이태희		

심사청구 : 없음

(54) 세포 성장을 억제하기 위한 칼슘 유입 차단제를 포함하는 조성물

요약

본 발명의 일반적 특징은 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 자극된 세포의 사멸을 유도하는데 있다. 본 발명은 포유류, 예컨대 사람에게 치료 목적을 위해 조성물을 투여하는 것을 포함하는 세포 사멸을 유발하는 조성물을 투여하는 방법; 조성물, 예컨대 Ca^{2+} 유입 차단제 및 세포 사멸이 유발될 세포를 정상적으로 자극하는 약제를 갖는 조성물; 조성물의 키트, 예컨대 Ca^{2+} 유입 차단제 및 세포 사멸이 유발될 세포를 정상적으로 자극하는 약제를 포함하는 키트; 이러한 조성물 또는 조성물의 키트의 항염증제 및/또는 항증식제로서의 용도; 및 세포 사멸을 유발하는데 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제의 용도 또는 Ca^{2+} 유입 차단제 및 약제의 용도를 포함한다. 본 발명은 또한 Ca^{2+} 유입 차단제 또는 Ca^{2+} 유입 차단제와 세포 사멸을 유발하도록 세포를 정상적으로 자극하는 약제의 조합물을 사용한 처리에 대한 병든 동물의 감수성을 진단하는 방법을 포함한다. 본 발명은 또한 Ca^{2+} 유입 차단제로서 강력한 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다.

대표도

도1

명세서

기술분야

본 발명은 증식성 질병을 치료하는 방법을 포함한, 자극된 세포의 사멸을 유도하는 Ca^{2+} 유입 차단제의 용도에 관한 것이다.

배경기술

암 치료는 대부분 정상 조직에 해를 끼치지 않으면서 암 세포의 성장을 막거나 제어하는 것을 목적으로 한다. 따라서, 암 세포를 정상 세포로부터 구별짓는 특징들을 확인하여 이들 차이점에 특정 치료제를 적

용시키려하는 연구가 실행되어 왔다.

대부분, 정상적인 세포의 성장 및 발육은 가용성의, 분비 리간드와 자극된 세포의 표면에 존재하는 특정 수용체간의 상호 작용에 의해 조절된다(Cell, 61:203-12[1990]). 세포 성장의 조절에 있어서 이들의 중요한 역할을 고려할 때, 다수의 성장 인자 또는 이들의 수용체는 neu, EGF^R(v-erb-b), c-fms(CSF-1^R) 및 c-Kit를 포함한 원종양유전자로 공지되어 있고, 이들 예에서 정상적인 성장 자극과 및 비정상적인 성장 자극간의 밀접한 관계를 나타낸다. 성장 인자 또는 이들 수용체가 종양 세포의 발생 및/또는 유지에 관계되어 있으므로, 상기 분자는 이들의 자극 활성을 상쇄시키거나 중화시키는 것을 목적으로 하는 특정 치료제의 유효한 타겟으로 여겨질 수 있다.

c-Kit 수용체는 부적합한 발현 또는 돌연변이가 다수의 종양과 관련되어 있는 예이다. 골수성 백혈병(Siitonen 일행, 1994)에서 흔히 발견되는 이외에, c-Kit는 소세포 폐암(Hida 일행, 1994), 여성 생식기관의 종양(Inoue 일행, 1994) 및 유방암(Hines 일행, 1995)에서 높은 비율로 발견된다. 이러한 많은 경우, 종양 세포는 c-Kit 및 SLF를 발현하여 종양 형성에 기여하는 오토크린(autocrine) 자극을 일으킨다. 또한, c-Kit에서 일반적인 우세한 활성화 돌연변이는 인간, 마우스 및 레트의 비만 세포에서 확인되었다(Tsujimura 일행, 1994; Tsujimura 일행, 1995; Kanakura 일행, 1994; Kitayama 일행, 1995).

여성-전이 종양 유전자 및 종양 억제제 기능 손실이 많은 형태의 암에 관련되어 있다. 예컨대, 몇몇 연구는 초기 유방암 세포에서 성장 인자 수용체의 돌연변이, 부적합한 발현, 과도발현 및 오토크린 자극을 제시하고 있다(Lupu 일행, 1992; Ethier 일행, 1995; LeJeune 일행, 1993). 결과적으로 많은 연구자들은 이들 분자를 특정 타겟으로 한 혁신적인 방법을 추구하고 있다(Kopreski 일행, 1996; Fry 일행, 1995; Levitzki 일행, 1995). 종양 억제제 기능 손실이 세포 사멸의 생리학적 메카니즘에 더 이상 종속되지 않는 세포 생성을 통한 암 세포 형성에 기여할 수 있다는 것은 명확하다. 종양 억제제 기능의 손실은 유방암에서도 널리 입증되고 있다(Horak 일행, 1991; Thor 일행, 1992; Wang 일행, 1993; Bargou 일행, 1995; Krajewski 일행, 1995; Lee 일행, 1995). 종양 억제제 기능 손실의 중요한 결과는 통상적인 형태의 항암 치료를 견딜 수 있는 것이다(Lu 일행, 1996; Korsmeyer, 1995).

다수의 항증식제가 현재 암 치료에 사용되고 있다. 대부분, 이들은 빠르게 분열하는 세포에 특이적으로 작용되게 고안되었다. 그러나, 세포 분열은 신체의 많은 세포 유형에서 정상적으로 생기는 것이므로, 정상 조직에 대한 독성이 흔히 발견되어, 이들 약품의 용도 및 유효성이 제한된다.

이와 유사하게, 비정상적인 또는 과도한 세포의 활성 및 증식은 많은 염증 상태의 특징이기도 하다. 예컨대, 자가면역 질병은 면역계의 세포가 병에 걸린 개체에 존재하는 자가항원을 인식하여 반응하는 상황을 나타낸다. 현재 치료는 불특정 방식으로 면역 세포 반응을 약화시키는 경향이 있어, 감염 및 기타 바람직하지 않은 결과를 초래한다.

알레르기성 질병은 부적합한 활성화 신호가 중요한 이환상태를 야기하는 또 다른 상황을 나타낸다.

따라서, 이러한 또는 기타 상황에서, 특정 성장 또는 활성화 신호에 반응하는 세포에 대해 우수한 특이성을 갖는 치료법이 요청되고 있다.

세포내 저장으로부터 Store-Operated Channels(I_{crac} 채널로 칭함)을 통한 세포외 Ca²⁺의 유입에 따른 Ca²⁺의 이동(Hoth 일행, 1992; Hoth 일행, 1993; Penner 일행, 1993)은 많은 성장 인자, 항원, Fc 및 G-단백질-결합 수용체에 의해 개시되는 통상적인 신호이다. 상기 신호는 다양한 동형 포스포리파제 C(PLC)의 활성화 결과로서, 제 2 메신저인 IP₃ 및 디아실글리세롤의 형성을 야기한다(Rhee, 1991). 세포내 Ca²⁺의 빠른 증가에 이은 점진적인 감소는 유사분열촉진, 활성화 및 세포 이동을 포함하는 다수의 세포 작용에 관련되어 있다(Lewis 일행, 1995).

Ca²⁺ 유입이 아포프토시스의 조절 또는 다수의 세포 유형에서의 예정된 세포 사멸과 관련되어 있지만, 아포프토시스에서 Ca²⁺ 유입의 정확한 역할은 밝혀지지 않았다(Orrenius 일행, 1992; Nicotera 일행, 1994; Dowd 일행, 1995). Ca²⁺ 이온노포어에 의한 유도와 같은 과도한 세포내 Ca²⁺의 수준은 다수의 실험계에서, 아포프토시스를 유도하는 것으로 알려져 있다(Kizaki 일행, 1989; Tadakuma 일행, 1990). 비장세포(splenocytes)에서의 아포프토시스는 Ca²⁺-의존 엔도뉴클레아제와 관련되어 있음을 나타내고(Ribeiro 일행, 1993), 세포내 Ca²⁺의 증가는 활성화된 T-세포 하이브리도마(Mercep 일행, 1989) 및 미성숙 흉선세포(MeConkey 일행, 1989)의 아포프토시스와 관련되어 있다. 최근에 Takata 일행(Takata 일행, 1995)은 B-세포의 표면-IgM-매개 아포프토시스가 PLC-γ 부재하에 감소되며, 이러한 형태의 아포프토시스는 Ca²⁺ 이동과 관련되어 있음을 밝혔다. 이러한 관찰과는 대조적으로, 어떤 세포는 Ca²⁺ 유입에 의해 아포프토시스로부터 보호되는 것 같다. 예컨대, IL-3 의존 비만 세포 및 세포주는 Ca²⁺ 이온노포어의 부가에 의한 성장 인자 제거로 매개된 아포프토시스로부터 보호되어지고(Rodriguez-Tarduchy 일행, 1992), 예정된 신경의 사멸도 또한 세포내 Ca²⁺의 증가에 의해 억제된다(Lampe 일행, 1995).

아포프토시스에 대한 긍정적인 및 부정적인 효과와 관련된 특정 단백질은 확인되어 있다. Bcl-2는 C. elegans ced-9가 원형인 관련 단백질 군의 일원이다. 일계 군의 계통(Bcl-2 포함)이 아포프토시스 신호로부터 세포를 보호하는 반면, 다른 계통(bax, 상기 군의 프로-아포프토시스성 멤버를 포함)은 아포프토시스를 증진시킨다. 이는 이들 두 계통간의 균형이 세포가 아포프토시스로 사멸하거나 생존하는지의 여부를 결정하는 것임을 제시한다(Oltvai 일행, 1993).

Bcl-2 단백질의 과도한 발현은 방사선, 화학요법약제, 산화제 및 스테로이드 제제를 포함하는 다양한 약품에 의해 유도되는 아포프토시스로부터의 보호를 유도한다(Korsmeyer, 1995). 그러나, 기타 아포프토시스성 신호는 Bcl-2에 영향을 받지 않는 것으로 나타난다. 이들은 TNF, Fas 활성화, 활성화-유도 세포 사멸, WEHI-231 세포의 항-IgM 치료 및 초항원-매개 클론의 결실에 의해 유도된 세포 사멸을 유도한다

(Ashwell 일행, 1987; Smith 일행, 1989; Jones 일행, 1990; Sentman 일행, 1991; Brown 일행, 1992; Cuende 일행, 1993; Memon 일행, 1995; Miura 일행, 1995). 어떤 경우에는, 이들 아포프토시스성 신호가 아포프토시스에서 이들 효소의 관련이 제시되는 프로테아제의 인터류킨-1 β 전환 효소(ICE)군의 억제제에 의해 중화될 수 있다고 알려져 있다(Enari 일행, 1995; Chinnaiyan 일행, 1996).

Ca²⁺ 유입 차단제로 공지된 케토티펜(ketotifen)은 고농도에서 비만 세포의 활성화 및 단핵성 세포의 증식을 억제한다고 보고되었다(Gushchin 일행, 1985). 케토티펜은 신경성유종에서 비만 세포-관련 증상을 조절하는데 사용될 수 있다고 알려져 있다(Riccardi 일행, 1987; Riccardi 일행, 1993). 케토티펜은 또한 전신성 비만 세포증의 증상을 억제하는데 유효하다고 알려져 있다(Povoa 일행, 1991). 케토티펜은 PHA 또는 파상풍 독소를 제외한 항원의 T-세포 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다(Kondo 일행, 1994). 케토티펜은 유사분열촉진인자-자극 림프구 증식을 억제할 수 있다고 보고되었다(Petrasch 일행 1993). 고농도의 케토티펜은 또한 T-림프구 유사분열촉진 인자를 억제하였고, 삼인산 아데노신은 림프구 및 U937 인간 단구 전구체 세포주 각각에서 세포내 Ca²⁺의 증가를 자극하였다. 그러나, 생체내 실험에서, 1mg의 케토티펜을 1일 2회, 7일 동안 건강한 지원자에게 치료했을 때, 순환 림프구의 갯수나 조성은 변화하지 않았다.

또 다른 Ca²⁺ 유입 차단제인 에코나졸(Econazole)은 1 μ g/ml에서 NS1/Ag4 골수종 세포의 세포 생존력 및 세포 갯수를 감소시키는 것으로 드러났다(denyer 일행, 1985).

Ca²⁺ 유입 억제 특성을 갖는 CAI 화합물은 종양 세포의 성장과 FSF에 대응한 HUVECs의 성장을 억제하는 것으로 보고되었다(Kohn 일행 1992; Kohn 일행 1994a; Kohn 일행 1994b).

칼슘 채널 차단제 화합물을 사용하여 종양 성장 및 전이를 억제시키는 것은 미국 특허 제 4,690,935호에 기재되어 있다(Taylor 일행, 1987). 종양 성장 및 전이를 억제시키기 위해 칼슘 채널 차단제 화합물 및 백금 배위 화합물을 투여하는 것은 미국 특허 제 4,906,646호에 기재되어 있다(Honn 일행, 1990).

클로트리마졸(Clotrimazole)은 시험관에서 3T3 세포의 세포내 저장으로부터 세포 증식을 억제하는 수준으로 Ca²⁺를 방출하는 것으로 나타났다. Ca²⁺ 풀(pool)에 대한 클로트리마졸의 효과는 가역적인 것으로 나타났다. 클로트리마졸은 인간 흑색종 세포에 의해 SCID 마우스에서 생긴 실험적 폐 전이의 수에 대해 억제 효과를 갖는 것으로 밝혀졌다(Benzaquen 일행, 1995).

발명의 요약

일반적으로 본 발명은 Ca²⁺ 유입 차단제에 의해 자극된 세포의 사멸을 유도하는 것을 특징으로 한다. 다양한 측면에서, 본 발명은 치료를 목적으로 인간과 같은 포유 동물에 대해 조성물을 투여하는 방법; 조성물, 예컨대, Ca²⁺ 유입 차단제 및 세포 사멸이 유도될 세포를 정상적으로 자극시키는 약제를 갖는 조성물; 조성물 키트, 예컨대, Ca²⁺ 유입 차단제 및 세포 사멸이 유도될 세포를 정상적으로 자극시키는 약제를 갖는 키트; 항염증제 및/또는 항증식제로서 이러한 조성물 또는 키트 조성물의 용도; 및 세포 사멸을 유도하는 데 사용하기 위한 약물 제조에 있어서 Ca²⁺ 유입 차단제의 용도 또는 Ca²⁺ 유입 차단제 및 약제의 용도를 포함한다. 본 발명은 Ca²⁺ 유입 차단제 또는 Ca²⁺ 유입 차단제와 세포 사멸을 유발하도록 세포를 정상적으로 자극하는 약제의 조성물을 사용한 질병에 걸린 동물의 처리 용이도를 진단하는 방법을 포함한다. 본 발명은 Ca²⁺ 유입 차단제로서 강력한 화합물을 스크리닝하는 방법을 포함한다.

발명의 상세한 설명

본 발명에서, 세포 또는 세포 수용체를 정상적으로 자극하는 약제 또는 인자 또는 리간드 또는 작용물질은 세포 또는 수용체를 자극하는 것이다. 이러한 자극은 일반적으로 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시킨다. 즉, 본 발명에 따르면, 세포 사멸은 실제로 자극된 세포에서 유도된다. 이하에 기술되는 상세한 특정 실시예에 따르면, SLF 존재하에서 배양될 때, 정상적으로 자극되는 비만 세포는 SLF 및 Ca²⁺ 유입 차단제의 조합물의 존재하에서 배양될 때, 사멸이 유도된다. 일반적으로, 이러한 정상적인 자극은 세포로의 Ca²⁺ 유입에 의해 이루어진다.

바람직한 Ca²⁺ 유입 차단제는 비전압 게이팅 유입 차단제이다.

바람직한 치료 대상은 인간이다.

본 발명의 바람직한 방법은 유효량의 Ca²⁺ 유입 차단제 및 Ca²⁺ 유입을 수반하는 유효량의 인자를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, Ca²⁺ 유입을 수반하는 인자에 의해 자극될 수 있는 사멸시킬 필요가 있는 포유 동물 세포의 사멸을 유도하는 방법이다.

본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명은 Ca²⁺ 유입을 수반하는 약제로써 세포 수용체의 리간드에 의해 자극되는 세포를 갖는 포유 동물에서, 유효량의 Ca²⁺ 유입 차단제 및 유효량의 리간드를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, 세포의 사멸을 유도하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명은 유효량의 Ca²⁺ 유입 차단제 및 유효량의 약제를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, 상기 약제와 결합시 세포로 칼슘 유입 및 포스포리파제 C의 활성화를 유도하는 수용체를 갖는 사멸시킬 필요가 있는 포유 동물 세포의 사멸을 유발하는 방법에 관한 것이다.

본 발명의 다른 구체예에 따르면, 본 발명은 유효량의 비전압 게이팅 Ca²⁺ 유입 차단제 및 유효량의 Ca²⁺

유입을 수반하는 인자를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, Ca^{2+} 유입을 수반하는 인자에 의해 자극될 수 있는 사멸시킬 필요가 있는 포유 동물 세포의 사멸을 유도하는 방법에 관한 것이다.

인자 또는 억제제는 예컨대, 세포의 수용체에 대한 작용 물질성 항체 또는 세포 수용체의 천연 리간드일 수 있다.

세포는 비만 세포, 단구, 대식세포, 섬유아세포, T세포, B세포, 호염기구 또는 암세포일 수 있다.

포유 동물은 증식성 질병 치료가 필요할 수 있고, 예컨대, 암, 특히 유방암에 걸린 사람, 또는 알레르기 또는 자가면역 장애에 걸린 환자일 수 있다.

사멸이 유도되는 세포(또는 세포의 군)는 예컨대, c-Kit 수용체 또는 돌연변이 c-Kit 수용체, T세포 수용체, CD3, $\text{Fc}\gamma\text{RII}$, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$, G-단백질-결합 수용체, 붐베신 수용체, 가스트린 방출 펩티드 수용체, 브라디키닌 수용체, 카르바콜 수용체, 무스카린성 분자 수용체, CCK-8 수용체, 바소프레신 수용체, 뉴로키닌 수용체, P 물질 수용체, 퓨린성 분자 수용체, $\text{TGF-}\alpha$ 수용체, EGF 수용체, 헤레굴린 수용체, ebrB1 수용체, ebrB2 수용체, ebrB3 수용체, ebrB4 수용체, PDGF 수용체, SLF 수용체, FLT-3 리간드 수용체, 염기성 FGF 수용체, 산성 FGF 수용체, 에노텔린 수용체, NGF 수용체, VEGF 수용체 및 HGF 수용체로 구성된 군으로부터 선택된 표면 수용체를 갖는다.

상기 세포에 투여되는 억제 또는 인자는 SLF, $\text{TGF-}\alpha$, EGF, 헤레굴린, ebrB1에 대한 작용물질, ebrB2에 대한 작용물질, ebrB3에 대한 작용물질, ebrB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 수용체에 대한 작용물질, $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 수용체에 대한 작용물질, $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 수용체에 대한 작용물질, G-단백질-결합 수용체에 대한 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체에 대한 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체에 대한 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시 비타민 D_3 및 이들의 결합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

세포는 기능항진 면역 세포일 수 있고, 방법은 항체를 포함할 수 있으며, 인자는 예컨대 항체에 대한 항원일 수 있다. 세포는 IgE가 세포에 결합된 기능항진 면역 세포일 수 있고, 또 인자는 예컨대 IgE의 작용물질일 수 있다.

세포는 IgE 수용체를 포함할 수 있고, 또 인자는 수용체에 대한 항체일 수 있다.

세포는 호염기구 또는 비만 세포일 수 있다.

Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자, 리간드 등은 별도로 투여될 수 있다.

바람직한 구체예에 따르면, Ca^{2+} 유입 차단제는 억제보다 먼저 투여된다.

다른 바람직한 구체예에 따르면, 억제/인자 등 및 Ca^{2+} 유입 차단제는 단일 단계로 투여된다.

바람직하게, Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에서, 이러한 억제에 의한 세포의 자극은 일반적으로 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시킨다.

특히 구체예로서, 세포는 c-Kit 수용체를 발현시키고, 이때 방법은 포유 동물에 대해 유효량의 c-Kit 리간드를 투여하는 것을 포함한다.

환자는 백혈병, 종양 성장 또는 폐암에 걸린 환자일 수 있다.

본 발명의 인자는 세포의 수용체에 결합되어 통상적으로 세포의 증식을 야기하는 성장 인자일 수 있다.

환자는 암 또는 과형성증에 걸린 환자일 수 있다.

인자는 단백질일 수 있다.

인자는 상기 세포의 수용체에 결합되어 Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에서, 통상적으로 세포의 수명을 연장시키는 생존 인자일 수 있다.

특정 구체예에 따르면, 세포는 조혈 전구 세포이다.

인자는 상기 세포의 수용체에 결합되어 Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에서, 통상적으로 세포의 활성화를 야기하는 활성화 인자일 수 있다.

Ca^{2+} 유입 차단제는 하나 이상의 Ni^{2+} , 케토티펜, 에코나졸, 테니렘, CAI, Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , SKF-96365 및 크로몰린 또는 이들의 조합물일 수 있다.

특정 구체예에 따르면, 본 발명은 유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, 포유 동물의 구성적으로 활성화된 사멸시킬 필요가 있는 세포의 사멸을 유발하는 방법에 관한 것이다. 바람직하게는, 이러한 활성화는 비활성화된 상태일 때, 상기 세포에서의 Ca^{2+} 농도 이상으로 Ca^{2+} 농도의 상승을 야기한다. 구성적 활성화는 돌연변이 c-Kit 수용체의 존재로 인한 것일 수 있다. 환자는 비만 세포증에 걸린 환자일 수 있다.

다른 구체예에 따르면, 본 발명은 유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제를 포유 동물에 투여하는 것을 포함하는, 오토크린 자극되는 사멸시킬 필요가 있는 포유 동물 세포의 사멸을 유발하는 방법에 관한 것이다. Ca^{2+} 유입 차단제는 Ni^{2+} 일 수 있다.

다른 구체예에 따르면, 본 발명은 Ca^{2+} 유입 차단제 및 세포의 수용체에 정상적으로 결합되어 세포내로 Ca^{2+} 유입을 야기시키는 인자를 포함하는, 세포 성장을 저해하는 항증식성 약제로서 포유 동물에 투여하기 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

상기 조성물은 이러한 인자가 수용체에 정상적으로 결합하여 포스포리파제 C의 활성화를 야기하는 것일 수 있다. 조성물은 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제인 Ca^{2+} 유입 차단제를 포함할 수 있다. 상기 인자는 수용체에 대한 작용물질성 항체일 수 있다. 인자는 수용체의 천연 리간드일 수 있다. 인자는 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, ebrB1에 대한 작용물질, ebrB2에 대한 작용물질, ebrB3에 대한 작용물질, ebrB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질-결합 수용체에 대한 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체에 대한 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체에 대한 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시 비타민 D₃ 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 특히, 조성물은 인자로서 SLF를 포함한다.

조성물은 면역 세포의 표면 항체의 항원을 포함할 수 있다.

조성물은 IgE에 대한 작용물질인 인자를 포함할 수 있다.

조성물은 상기 Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에서 통상적으로 수용체에 결합하여 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 인자를 포함할 수 있다.

다른 요지에 따르면, 본 발명은 Ca^{2+} 유입 차단제 및 통상적으로 세포의 수용체에 결합하여 세포 내로 Ca^{2+} 유입을 야기시키는 인자를 포함하는, 포유 동물에서 세포 성장을 억제하는 데 사용하기 위한 약제학적 조성물의 키트에 관한 것이다. 인자는 통상적으로 수용체에 결합하여 포스포리파제 C의 활성화를 야기하는 것일 수 있다.

Ca^{2+} 유입 차단제는 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제일 수 있다.

조성물의 인자는 수용체에 대한 작용물질성 항체일 수 있다. 인자는 수용체의 천연 리간드일 수 있다. 인자는 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, ebrB1에 대한 작용물질, ebrB2에 대한 작용물질, ebrB3에 대한 작용물질, ebrB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질-결합 수용체에 대한 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체에 대한 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체에 대한 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시 비타민 D₃ 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 특히, 인자는 SLF일 수 있다.

인자는 면역 세포의 표면 항체의 항원일 수 있다.

인자는 IgE에 대한 작용물질일 수 있다.

인자는 상기 Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에서 통상적으로 수용체에 결합하여 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 인자일 수 있다.

다른 구체예로서, 본 발명은 항증식제 또는 항염증제로서 본 발명의 약제학적 조성물의 용도를 포함한다.

본 발명의 약제학적 조성물의 키트는 항증식제 또는 항염증제로서 사용될 수 있다.

본 발명은 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, Ca^{2+} 유입 차단제 및 통상적으로 세포의 수용체에 결합하여 세포 내로 Ca^{2+} 유입을 야기시키는 인자의 용도를 포함한다.

본 발명은 상기 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 수용체에 결합하여 통상적으로 포스포리파제 C의 활성화를 야기하는 인자의 용도를 포함한다.

본 발명은 상기 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도를 포함하고, 이때, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제는 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제이다.

특정 구체예에 따르면, 본 발명은 상기 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 수용체에 대한 작용물질성 항체인 인자의 용도를 포함한다.

특정 구체예는 상기 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 수용체의 천연 리간드인 인자의 용도를 포함한다.

특정 구체예는 상기 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, ebrB1에 대한 작용물질, ebrB2에 대한 작용물질, ebrB3에 대한 작용물질, ebrB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질-결합 수용체에 대한 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체에 대한 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체에 대한 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시 비타민 D₃ 및 이들의 조합물로 구성된 군으로부터 선택된 인자의 용도를 포함한다.

인자는 특히 SLF일 수 있다.

바람직한 구체예는 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 면역 세포 표면 항체의 항원인 인자의 용도를 포함한다.

특정 구체예는 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 IgE에 대한 작용물질인 인자의 용도를 포함한다.

특정 구체예는 세포 성장을 억제하는 약제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서, 본 발명의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 수용체에 통상 결합하여 상기 Ca^{2+} 유입 차단제의 부재하에 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 인자의 용도를 포함한다.

다른 구체예에 따르면, 본 발명은 조직 샘플이 정상 조직과 비교하여 상승된 PLC 활성 정도를 갖는지를 분석하는 단계를 포함하며, 활성화된 PLC의 상승 정도는 세포가 상기 처리에 감수성이라는 것을 나타내는 것을 특징으로 하는 병든 포유 동물 세포가 Ca^{2+} 유입 차단제 또는 세포의 수용체를 더욱 활성화시키는 인자 및 차단제에 처리되는 감수성을 진단하는 방법에 관한 것이다.

이러한 방법은 또한 병든 조직 샘플을 수득하는 것을 포함할 수 있다.

또한 이 방법은 소정 양의 상기 조직으로부터 수득되는 PLC의 존재하에 반응하는 PLC 기질의 양을 조절하는 것을 포함하는 분석 단계를 포함할 수 있다. 이 방법은 효소-결합 면역 흡착법에 의해 소정 양의 상기 조직으로부터 PLC를 분리하는 것을 포함할 수 있다. PLC 기질은 $[\text{H}]-\text{PIP}_2$ 일 수 있다.

또 다른 구체예에서, 본 발명은

약제의 존재하에, 세포 내로 Ca^{2+} 의 유입을 증진시키는 활성화 수용체를 갖는 제 1군 세포를 배양하는 단계;

약제의 존재하에, 제 2군 세포 내로 Ca^{2+} 의 유입을 증진시키는 활성화 수용체가 결핍된 제 2군 세포를 배양하는 단계;

약제의 부재하에, 제 1군 세포의 성장이 제 1군 세포에 상응하는 제 1 소정 수준 미만인지의 여부를 확인하는 단계; 및

약제의 부재하에, 제 2군 세포의 성장이 제 2군 세포에 상응하는 제 2 소정 수준과 실질적으로 동일한지의 여부를 확인하는 단계를 포함하며,

여기서, 제 1군 세포의 성장이 제 1 소정 수준 미만이고, 제 2군 세포의 성장이 제 2 소정 수준과 실질적으로 동일하다는 것은 상기 약제가 Ca^{2+} 차단제임을 나타내는 것을 포함하는 Ca^{2+} 유입 차단제인 약제를 스크리닝하기 위한 방법에 관한 것이다.

제 1군 세포의 수용체는 구성적으로 활성화될 수 있거나, 또는 제 1군 세포의 수용체는 오토크린 자극 처리되거나, 또는 제 1군 세포의 수용체는 외래 물질에 의해 활성화된다.

이 물질은 제 1군 세포의 수용체의 천연 리간드일 수 있다. 제 1군 세포의 수용체 및 제 2군 세포의 수용체는 동일한 수용체일 수 있다.

특별한 구체예에서, 수용체는 c-키트 수용체, EGF에 대한 수용체 및 FGF에 대한 수용체로 구성된 군으로부터 선정된다.

바람직하게는, 제 1군 세포 및 제 2군 세포는 인체 세포이다.

바람직하게는 제 1군 세포는 비만 세포이고, 제 2군 세포는 비만 세포이며, 수용체는 c-키트 수용체이고 또 제 1군 세포는 SLF의 존재하에서 배양된다.

특별한 구체예에 따르면, 제 1군 세포는 제 1군 세포의 상기 수용체와 형질감염된다.

도면의 간단한 설명

도 1A 내지 1F는 Ca^{2+} 유입 차단제를 사용한 성장 또는 활성화 신호의 조합을 통해 BMMC의 사멸 유도를 도시하고 있다. '재료 및 방법'에 기재된 바와 같이, 세포독성 시험을 실시하였다. 도 1A 내지 1C에서, BMMC를 지시량의 케토티펜(도 1A), 에코나졸(도 1B) 또는 Ni^{2+} (도 1C)을 갖는 SLF(모든 경우, 500 ng/mL) 또는 IL-3(모든 경우, 25% WEHI-3 조건화 배지)과 함께 배양하였다. 도 1D에서는 BMMC를 IL-3, 및 지시량의 SLF와 함께 배양하였다. 도면 중 원형 표시는 Ni^{2+} 2.5 밀리몰을 포함하고 또 사각형 표시는 Ni^{2+} 를 포함하지 않는 것이다. 도 1E에서는 BMMC를 IgE 항-DNP 단클론성 SPE-7로 도포한 다음, IL-3와 지시량의 DNP-HSA(Ag), 5 μM 에코나졸(원형 표시) 또는 에코나졸없이(사각형 표시) 배양하였다. 도 1F에서는 BMMC를 IL-3과 지시량의 P 물질, 5 μM 의 에코나졸(원형 표시) 또는 에코나졸 없이(사각형 표시) 배양하였다. 모든 경우에서, 사멸 세포의 비율은 배양 24시간 후, 트립판 블루 배제 가능여부에 따른 세포를 계산함으로써 측정하였다. 오차 막대표시는 3번 측정함으로써 결정된 표준 오차를 의미한다.

도 2A 및 2B는 32D-키트 또는 SLF와 Ca^{2+} 유입 차단제를 가진 p815 세포에서 세포 사멸 유도를 도시하고 있다. 32D-키트(도 2A) 또는 p815(도 2B)세포를 SLF(굵은 막대) 또는 IL-3(줄무늬 막대)과 지시 농도의 Ca^{2+} 유입 차단제와 함께 배양하였다. 배양 18시간 후 트립판 블루 배제에 의해 세포 사멸을 측정하였다.

도 3A 내지 3E는 다양한 인자 및 Ca^{2+} 유입 차단제와 배양된 32D-키트 세포의 모양을 도시하고 있다.

32D-키트 세포를 SLF 단독(도 3A), IL-3 단독(도 3B), 5 μ M 에코나졸 및 SLF(도 3C), 또는 5 μ M 에코나졸 및 IL-3(도 3D)과 18시간 동안 배양하였다. 도 3E는 세포를 부가 인자 없이 배양한 것이다. 세포를 400배 배율의 위상차하에서 촬영하였다.

도 4는 세포성 DNA 함량의 함수로서 32D-키트 세포의 상대적인 수(y-축)의 관계를 도시하고 있다. 32D-키트 세포를 SLF 단독(도 4A), IL-3 단독(도 4B), 8 μ M 에코나졸 및 SLF에서(도 4C), 또는 8 μ M 에코나졸 및 IL-3(도 4D)과 18시간 동안 배양하였다. 도 4E에서는 세포를 부가된 인자없이 배양하였다. 세포를 '재료 및 방법'에서 기재한 바와 같이 프로피듐 요오드로 염색한 다음, 유동 세포계산법(flow cytometry)에 의해 DNA 함량을 분석하였다.

도 5는 SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 32D-키트 세포의 올레산 보호를 도시하고 있다. 32D-키트 세포를 SLF 및 5 μ M 에코나졸 및 올레산(굵은 막대), 또는 SLF 및 5 μ M 에코나졸 및 엘라이딘산(평행선 무늬 막대), 또는 IL-3 및 5 μ M 에코나졸 및 올레산(점무늬 막대)과 18시간 동안 배양하였다. 사멸 세포의 비율을 트립판 블루 배제에 의해 측정하였다.

도 6A 및 6B는 SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스에 대한 이오노마이신의 효과를 도시하고 있다. 도 6A에서는 32D-키트 세포를 SLF (원형 표시) 또는 IL-3(사각형 표시)의 존재하에서 5 μ M 에코나졸 및 지시량의 이오노마이신과 18시간 동안 배양한 것이다. 도 6B에서는 32D-키트-Bcl-2 세포를 SLF (원형 표시) 또는 IL-3(사각형 표시)의 존재하에서 5 μ M 에코나졸 및 지시량의 이오노마이신과 18시간 동안 배양한 것이다. 사멸 세포의 비율을 트립판 블루 배제에 의해 측정하였다.

도 7A는 32D-키트(레인 1) 또는 32D-키트-Bcl-1(레인 2) 세포로부터 세포 용균물의 웨스턴 블롯을 도시하고 있다. 세포를 '재료 및 방법'에 기재한 바와 같이 용균화하고 SDS-PAGE에 의해 분리하고, 니트로셀룰로오스로 이송하고 또 항-Bcl-2 항체로 검사하였다.

도 7B는 SLF와 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스에 대한 Bcl-2의 과발현 효과를 도시하고 있다. 32D-키트(굵은 막대) 또는 32D-키트-Bcl-2(줄무늬 막대) 세포를 SLF 또는 IL-3와 2.5, 5 또는 10 μ M의 에코나졸과 18시간 동안 배양하고 또 사멸 세포의 비율을 트립판 블루 배제에 의해 측정하였다. 부가적인 배양에서는, IL-3 단독 또는 어떠한 인자도 부가되지 않았고 또 세포 생존성을 유사하게 시험하였다. 25 또는 250 μ M의 YVAD-CHO를 부가했을 때 세포 생존성에 대한 효과는 어떠한 부가적인 인자가 부가되지 않은 별도의 배양으로 평가하였다.

도 8은 SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스에 대한 YVAD-CHO의 효과를 도시하고 있다. 32D-키트 세포를 YVAD-CHO의 부재하에서 SLF(원형 표시), 또는 25 μ M의 YVAD-CHO 존재하에서 SLF(삼각형 표시), 지시량의 에코나졸을 갖는 IL-3(사각형 표시)과 배양하였다. 사멸 세포의 비율을 배양 18시간 후 트립판 블루 배제에 의해 측정하였다.

도 9A는 연속적으로 활성화된 수용체를 갖는 암세포에서 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스를 도시하고 있다. 2.5×10^4 개의 SK-BR3 세포(ATCC cat.# HTB-30)를 10 ng/ml의 EGF가 있거나(원형 표시) 또는 없이(사각형 표시) 또 지시 농도의 에코나졸을 갖는 0.1ml의 RTM1와 0.5%의 FBS가 있는 96-웰 플레이트의 웰에서 18시간 동안 배양하였다. 사멸 세포의 비율을 18시간 동안 배양한 후, 트립판 블루에 의해 평가하였다.

도 9B는 다양한 조건하에서 오토크린 자극된 MDA-MB-231 유방암 세포에서 Ca^{2+} 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스를 도시하고 있다. 막대 1: 대조용; 막대 2: 에코나졸 20 μ M; 막대 3: 에코나졸 20 μ M 및 YVAD-CHO(ICE 억제제) 10 μ M; 막대 4: 에코나졸 20 μ M 및 YVAD-CHO 100 μ M; 막대 5: 에코나졸 20 μ M 및 이오노마이신 0.1 나노몰(칼슘 이온운반체); 막대 6: 에코나졸 20 μ M 및 이오노마이신 10 나노몰; 막대 7: 에코나졸 20 μ M 및 이오노마이신 1 μ M; 막대 8: 에코나졸 20 μ M 및 올레산 10 μ M(PLC 활성 억제제); 및 막대 9: 에코나졸 20 μ M 및 올레산 100 μ M이다.

도 10은 인간의 유방암으로부터 유도된 세포에서 EGF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스를 도시하고 있다. 2.5×10^4 개의 MCF-7 세포를 10 ng/ml의 EGF가 있거나(원형 표시) 또는 없이(사각형 표시) 또 지시 농도의 에코나졸을 갖는 0.1 ml의 DMEM과 0.5%의 FBS가 있는 96-웰 플레이트의 웰에서 18시간 동안 배양하였다. 사멸 세포의 비율을 18시간 동안 배양한 후, 트립판 블루 배제에 의해 평가하였다.

도 11A는 SLF를 정맥 투여한 마우스의 백혈병 세포에 대한 Ca^{2+} 유입 차단제 및 활성 인자의 효과를 도시하고 있다. 마우스를 1×10^7 개의 G418-내성 32D-키트 세포로 정맥 접종하였다. 배양 3 내지 5주 후(실험 1 및 3; 5주, 실험 2; 3주), 마우스에게 구강 튜브를 통해 케토티펜 100 mg/kg를 투여하였다. 케토티펜 처리한 4시간 후, 15 μ g의 SLF를 마우스에게 정맥 주사하였다. 2시간 후, 마우스에게 케토티펜 100 mg/kg를 더 구강 투여하였다. 다음날, 비장을 제거하고 또 20% WEHI-3 조건화 배지 및 검출을 G418-내성 백혈병 세포로 한정하기 위해 1 mg/ml의 G418를 함유하는 성장 배지에 있는 0.3% 한천에서 세포를 평판배양하여 백혈병 세포의 존재에 대해서 검사하였다. 7일 후, 콜로니를 조사하였다.

도 11B는 도11A와 유사하지만, 이 경우 비장 세포를 IL-3에 반응하는 한천에서 콜로니를 생성할 수 있는 백혈병 세포 뿐만 아니라 정상세포를 포함하는 모든 세포의 존재에 대해 조사하였다.

도 12는 SLF가 피하 투여된 마우스의 백혈병 세포에 대한 Ca^{2+} 유입 차단제 및 활성 인자의 효과를 도시하고 있다. 마우스에 1×10^7 개의 32D-키트 세포를 정맥 접종하였다. 접종 3주 후, 구강 튜브를 통해 케토티펜 100 mg/kg를 마우스에게 투여하였다. 케토티펜 처리한지 4시간 후, 마우스에게 15 μ g의 SLF를 피하 주사하였다. 주사한지 2시간 후, 마우스에게 케토티펜 100 mg/kg를 더 구강 투여하였다. 다음날, 비장

을 제거하고 또 20% WEHI-3 조건화 배지 및 검출을 G418-내성 백혈병 세포로 한정하기 위해 1 mg/ml의 G418를 함유하는 성장 배지에 있는 0.3% 한천에서 세포를 평판배양하여 백혈병 세포의 존재에 대해서 검사하였다. 7일 후, 콜로니를 조사하였다.

바람직한 실시예의 설명

재료 및 방법

세포. 이미 기재된 바와 같이(베르거 일행, 1994년), 골수에서 유도된 비만 세포(BMMC)를 생성시켰다. 이들을 IL-3의 원천으로서 열-불활성된 10% FBS 및 2% WEHI-3 상청액을 보충한 OPTI-MEN(김코사, 버링톤, 오리곤 소재)에서 배양하였다. 32D-키트 세포(온타리오 암 협회의 마르크 민덴 박사로 부터 구입)는 IL-3-의존적인 골수 단핵세포의 세포주 발현 c-키트 (후 일행, 1995년)이었다. 32D-키트 세포를 열-불활성화한 10% FBS, 2% WEHI-3 상청액, 및 1 mg/ml의 G418(김코사)를 보충한 RPMI(김코사)에서 성장시켰다. p815 세포주는 쥐의 비만세포의 세포주이다. P815 세포를 열-불활성화한 FBS로 보충한 RPMI에서 성장시켰다. Bcl-2 gp+e NIH 3T3 포장 세포를 돌베코의 변형 이글 배지(DMEM-김코)에서 성장시키고 또 10% FBS 및 2 µg/ml의 퓨로마이신(시그마사, 세인트루이스, 미주리 소재)을 보충하였다. 모든 세포 배양물은 55 µM의 β-메르캅토에탄올(시그마사) 및 항생물질(시그마사)을 함유하였다. SK-BR3, MDA-MB231 및 ACF-7 세포를 ATCC로부터 얻었다. SK-BR3 및 MDA-MB231 세포를 열-불활성화한 10% 우태아 혈청을 보충한 RPMI 배지에서 배양하였다. MCF-7 세포를 열-불활성화한 10% 우태아 혈청 및 10 µg/ml의 인간 인슐린(시그마사)를 보충한 DMEM 배지에서 배양하였다.

32D-키트 세포를 과발현시키는 Bcl-2의 생성. gp+e bcl-2 레트로바이러스 제조 세포를 Y. 벤-데이비드 박사(토론토)로부터 구입하였으며 또 이것은 퓨로마이신 내성 및 쥐의 bcl-2에 대한 유전자를 발현시키는 LXSN-기재 레트로바이러스 벡터를 함유한다. 감염시키기 위해, gp+e 포장 세포의 융합충을 24시간 동안 32D-키트 세포로 공-배양하였다. 이후, 비-부착 32D-키트 세포를 제거하고, 48시간 동안 배양한 다음, 2 µg/ml의 퓨로마이신 존재하에서 세포를 과발현시키는 bcl-2에 대해 선택하였다.

재조합체 SLF의 제조. 재조합체 쥐의 스틸 팩터(SLF)를 pFLAG.ATS, IPTG-유도성 분비 발현 벡터(인터사이언스사, 마크함, 오리곤 소재)를 사용하여 대장균에서 용해형태로 제조하였다. 이 벡터는 8개의 아미노산 N-말단 FLAG 에피토프(인터사이언스사)를 포함한다. pFLAG.ATS.SLF 플라스미드를 함유하는 대장균을 100 µg/ml의 암피실린(시그마사)과 함께 37°C의 루리아 브로스(Luria Broth, 김코사)에서 밤새 배양하였다. 이후, 이 배양물을 20배로 희석시키고 또 33 mg/리터의 IPTG (김코사)로 유도되기 전에 0.4 내지 0.5의 OD₆₀₀까지 성장시켰다. 이후, 이 배양물을 37°C에서 밤새 배양시키고, 또 이 세포를 20분 동안 10,000 rpm에서 펠렛화하였다. 박테리아 상청액을 0.22 마이크론 여과기로 통과시키고 또 1 mM CaCl₂ 및 100 µM의 PMSF와 함께 -80°C에서 저장하였다. FLAG-SLF를 아가로오스 겔(인터사이언스사)에 공유 결합된 항-FLAG M1 마우스 단클론성 항체의 칼럼상에서 친화성-정제하였다. 이 단클론성 항체는 과량의 Ca²⁺를 EDTA와 킬레이트에 의해 용출 수 있는 Ca²⁺-의존적 방식으로 FLAG 에피토프와 결합한다. 먼저, 이 칼럼을 30ml의 PBS + 1 mM의 CaCl₂로 평형화하고 또 박테리아 상청액을 칼럼상에서 3번 통과시켰다. 이 칼럼을 PBS + 1 mM의 CaCl₂로 광범위하게 세척하고 또 FLAG-SLF 융합 단백질을 1 ml의 PBS + 2 mM의 EDTA 6분 획으로 용출하였다. 이들을 수집하고, 농축시키며, PBS에 대해 투석하고 또 은 염색을 통해 순도에 대해 조사하였다.

다른 억제제. 단클론성 쥐의 디니트로페닐(DNP) - 특정 IgE, 클론 SPE-7 뿐만 아니라 알부민- 인간 DNP-HSA 항원을 시그마사로부터 구입하였다. P 물질, 모든 Ca²⁺ 채널 차단제, 이오노마이신, 올레산- 및 엘라지딘 산 EGF, 및 bFGF를 시그마사로부터 구입하였다. 이오노마이신을 -20°C의 DMSO에서 1 mM 용액으로서 저장하였다. 올레산- 및 엘라지딘 산을 각각 1몰 및 100 mM 농도의 탈기된 에탄올 용액으로 저장하고, 질소 기체하에서 밀봉하며 또 -20°C에서 저장하였다. YVAD-CHO ICE 프로테아제 억제제 펩티드를 아메르삼사(알링턴 하이츠, 일리노이 소재)로부터 구입하였고 또 -20°C의 DMSO에서 1 mM 용액으로서 저장하였다.

세포 사멸 조사. 2.5×10^4 개의 BMMC, 32D-키트 또는 P815 세포를 0.5%의 FBS를 함유하는 RPMI 부피 0.1ml가 있는 96-웰 평면 바닥 플레이트에 두었다. 세포에 SLF, P 물질 또는 IL3와 Ca²⁺ 채널 차단제를 보충하였다. IgE를 추가하는 경우, 세포를 4°C에서 45분 동안 10 µg/ml의 SPE-7와 배양한 후, 96웰 플레이트에서 평판배양 및 100 ng/ml의 DNP-HSA 부가 이전에 RPMI, 0.5% FBS로 3번 세척하였다. 18 또는 24 시간 동안 배양한 후, 사멸 세포 비율을 트립판 블루의 배제가능 여부에 따른 세포를 계산함으로써 측정하였다.

DNA 함량 분석. 상술한 바와 같이 1.25×10^6 개의 세포를 18 또는 24시간 동안 배양하였다. 세포를 스핀 다운(spin down)시키고 빈델로프 시약[3.4 mM 트리스-pH8, 75 µM 프로피듐 요오드(시그마사), 0.1% NP-40, 700 µ/리터 RNase(시그마) 및 100 mM NaCl]에 재현탁시켰다. 이후, 세포를 유동 세포계산법에 의해 분석하였다.

웨스턴 블로팅. 1×10^6 개의 32D-키트 및 32D-키트-bcl2 세포를 PBS에서 세척하고 또 억제제[500 µM 나트륨-오르토바나데이트(시그마사), 10 µg/ml 아프로티닌(시그마사), 10 µg/ml 류페틴(시그마사) 및 1 mM PMSF (시그마사)]가 있는 TBS중에 NP-40 1%, 글리세롤 10%를 함유하는 용균 완충 용액에서 재현탁하고 또 4°C에서 20분동안 배양하였다. 용균물을 12,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하고 또 c 상청액을 β2-메르캅토에탄올을 가진 동일한 부피의 샘플 완충용액에 부가하였다. 샘플을 12% SDS-PAGE 에 의해 분리하고 또 니트로셀룰로오스로 이송하였다. 블롯을 PBS에서 5% 탈지유 분말, 0.1% TWEEN-20(ICN사, 오로라 오하이오 소재)로 차단하고 또 항-bcl-2 항체(U.B.I.,레이크 플레시드, 뉴욕 소재)로 검사하였다. 웨스턴 블롯을 화학발광제(아메르삼사)로 현상하였다.

마우스. 생체내 32D-키트 실험을 위해, 마우스는 생후 6 내지 8주가 지난 수컷 C3H/he이었고 또 메사추세

츠 보스톤 소재 찰스 리버 연구소로부터 구하였다. 마우스에게 1×10^7 개의 백혈병 세포를 정맥 접종하였다. 접종한 지 3 내지 5주 후, 물 부피 0.4ml 중의 100 mg/kg 케토티펜(시그마사)을 구강 튜브를 통해 마우스에게 투여하였다. 첫 번째 케토티펜 처리 후, 마우스에게 PBS중의 $15 \mu\text{g}$ SLF를 정맥 또는 피하 주사하였다. SLF 투여 후, 두 번째 케토티펜 처리하였다.

실험 1: Ca^{2+} 채널 차단제는 활성화 신호를 사멸 신호로 변환시킨다

비만 세포를 증식시키기 위해 통상적으로 c-키트 수용체 티로신 키나아제에 대한 리간드인 SLF로 자극하였다. 그러나, 도 1A 내지 1C에 도시된 바와 같이, 세포를 케토티펜, 에코나졸 또는 Ni^{2+} 와 같은 Ca^{2+} 유입 차단제와 공-배양하면, 이 증식 신호는 사멸 신호로 변환되었다. 반대로, 비만 세포가 Ca^{2+} 유입 차단제 및 IL-3과 배양되면 사멸은 관찰되지 않았다. 비만 세포를 SLF, Ca^{2+} , 유입 차단제, 및 IL-3과 동시에 배양하면 세포 사멸을 초래하며(도 1D), 이것은 IL-3이 이러한 특별한 사멸 신호에 대해 보호성이 없다는 것을 의미한다. Ca^{2+} 유입 차단제 그 자체는 성장 또는 생존 인자의 제거에 의해 비만 세포 사멸을 촉진하지 않았다(도시하지 않음). SLF와 Ca^{2+} 유입 차단제에 의한 세포 사멸의 유도는 SLF의 농도가 증가하면서 증가하였다. 이것은 IL-3이 아닌, SLF와 관련된 신호 특성이 있고, 이것은 차단제와 함께 세포 사멸 형태로 유도하는데 필요하다는 것을 의미한다. Ca^{2+} 유입 차단제의 효과는 SLF의 자극 특성을 단순히 상쇄하거나 중화시키는 것은 아니다. 다시 말해, 차단제는 SLF에 의해 발생한 임계 신호와 조합하여 활성화 경로를 세포 사멸경로로 변환시킨다.

SLF 및 IL-3이 비만 세포에 대한 유사분열촉진제(mitogenic)이지만, SLF만이 Ca^{2+} 유입을 유도한다(콜롬보 일행, 1994년; 라오 일행, 1994년). 비만 세포에서 Ca^{2+} 를 이동시키는 것으로 공지된 2개의 다른 신호의 세포 생존성 효과를 조사하였다. IgE에 대해 친화성이 큰 수용체와 항원의 교차 결합은 PLC- γ 활성화 및 Ca^{2+} 이동을 포함하는 일련의 신호 이벤트를 개시하며, 이것은 비만 세포를 탈과립시킨다(주빈 일행, 1995년). Ca^{2+} 유입 차단제의 존재하에서 Ag와 IgE으로 비만 세포를 자극하는 세포 생존성에 관한 효과도 1E에 도시되어 있다. 도시된 바와 같이, 비만 세포를 에코나졸의 존재하에서 IgE와 항원으로 자극할 때, 세포 사멸이 유도되지만, 항원 자극 단독 또는 에코나졸 단독으로는 세포 생존성에 대한 어떠한 효과도 없었다. 또한, Ni^{2+} 및 케토티펜은 IgE 수용체 교차 결합과 조합하여 세포 사멸을 유도하였다(도시안 됨).

또한, 비만 세포는 P 물질과 같은 양쪽성 양이온 펩티드과 반응한다(부엨 일행, 1990년; 무슬리 일행, 1990년). 이들 분자는 PLC- β 활성화, Ca^{2+} 이동 및, 적정 이하 수준의 항원과 IgE의 존재하에서 비만 세포 탈과립을 일으키는 이형삼합체 G-단백질을 직접 자극한다. 도 1F에 도시된 바와 같이, 비만 세포를 에코나졸의 존재하에서 P 물질로 자극할 때, 세포 사멸이 유도되었다. SLF와 마찬가지로, Ca^{2+} 유입 차단제의 존재하에서 세포 사멸 정도는 Ag 또는 P 물질의 농도가 증가하면서 증가하였다. 이들 모든 3개의 신호(IL-3은 아님)는 Ca^{2+} 를 이동시켜 Ca^{2+} 유입을 유도시키기 때문에, Ca^{2+} 이동은 Ca^{2+} 유입 차단제와 조합하여 세포 사멸의 유도에 대해 필요한 신호로 추정된다.

또한, 비만 세포 이외의 세포에서 활성화 신호와 Ca^{2+} 유입 차단제를 조합함으로써 세포 사멸의 유도를 검사하였다. 32D 세포는 인자를 제거하면 아포프토시스성으로 소멸하는 c-키트 네가티브, IL-3-의존적 골수 단일세포이다. 이들 세포에서 c-키트의 이송 및 발현은 이들을 시험관 실험에서는 SLF와 반응하게 하고 또 이들을 생체내 실험에서는 종양을 형성하게 한다(후 일행, 1995년). 도 2A에 도시된 바와 같이, c-키트의 발현은 이들 세포가 SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의한 세포 사멸의 유도에 민감하게 하였다.

성장 인자 수용체의 구조적인 활성화 또는 오토크린 자극에 의해 변형되는, 다수의 인자에 독립적인 종양이 기재되어 있다. 인자에 독립적인 종양의 예는 돌연변이된, 구조적으로 활성화된 c-키트 수용체의 존재에 의해 부가 인자의 부재하에서 성장하는 비만 세포 p815이다. 도 2B에 도시된 바와 같이, Ca^{2+} 유입 차단제는 단독으로 부가 SLF 자극의 부재하에서 p815 세포의 세포 사멸을 유도하기에 충분하다. 이것은 p815 c-키트 수용체를 통한 신호의 리간드-독립성 및 세포 사멸을 유도하는 Ca^{2+} 유입 차단제와 조합하는 능력을 반영하는 것으로 추정된다. 이들 결과는 SLF와 Ca^{2+} 유입 차단제에 의한 세포 사멸의 유도는 비만 세포에 한정하지 않고, 다른 유형의 세포, 특히 매우 활성화된 수용체를 가진 세포에서도 관찰될 수 있다.

실험 2: BMMC 및 32D-키트 세포에 의해 유도된 사멸은 아포프토시스성이다. SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제로 처리한 후, 비만 세포 및 32D-키트 세포의 육안 검사는 핵 응고화 및 막 수포화를 포함하는 아포프토시스성을 나타내었다(도 3C). 또한, 아포프토시스 중에 특징적으로 단편화하고 또 감소하는 DNA 함량을 측정하였다. 도 4A 및 4B에 도시되고 또 표 1에 요약된 바와 같이, 32D-키트 세포를 SLF 또는 IL-3 단독으로 18시간 동안 처리했더니, 서브 이배체 DNA 함량을 가진 일군의 세포가 생성되지 않는 반면, IL-3이 없는 에코나졸과 SLF로 처리했더니, 서브 이배체 DNA를 가진 일군의 세포가 생성되었다(도 4C 및 4D). 이들로부터 성장 인자를 제거하면, 32D-키트 세포는 아포프토시스를 겪는다는 것이 공지되어 있다. 성장 인자를 제거한 18시간 후, 32D-키트 세포는 서브 이배체 DNA 함량을 가진 세포의 완전한 비율을 보였다.

인자를 제거한 24시간 후, 이 개체는 실질적으로 증가하였다(도시안됨). 따라서, Ca^{2+} 유입 차단제와 SLF에 의해 유도되는 아포프토시스 과정은 인자 제거로부터 관찰되는 아포프토시스성에 비해 보다 빠르다. 또한, SLF와 Ca^{2+} 유입 차단제로 처리한 후, 비만 세포는 서브 이배체 DNA 함량을 보였으며(표 1), 이것은 아포프토시스 메카니즘에 의한 세포 사멸 유도와 일치하였다.

[표 1]

에코나졸과 인자로 처리된 BMMC 또는 32D-키트 세포의 서브 G1 DNA 함량						
서브 G1 함량(%)		에코나졸 없음 8 μ M의 에코나졸				
BMMC	IL-3	25.4	20.4	SLF	6.8	
66.8	인자 제거	6.18	n.d.			
32D-키트	IL-3	1.6	4.8	SLF	2.3	
35	인자 제거	9.2	n.d.			

(1) BMMC를 8 μ M의 에코나졸과 IL-3(25% WEHI 조건화배지), SLF(500 ng/ml), 또는 어떠한 인자 없이 24 시간 동안 배양하고, 프로피듐 요오드로 염색하며, 또 DNA 함량에 대해 분석하였다.

(2) 32D-키트 세포를 분석 전에 18시간 동안 유사하게 배양하였다. n.d.: 관찰 안됨.

실험 3: SLF-Ca²⁺ 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 올레산에 의한 세포 보호

Ca²⁺ 이동 신호가 Ca²⁺ 유입 차단제와 조합하여 아포프토시스를 유도할 수 있다는 관찰은 이 효과가 포스포리파아제 C의 활성화에 의해 중개됨을 의미한다. PLC 활성화가 세포 사멸에 대해 중요한지를 측정하기 위해, 표피 성장 인자(EGF) 자극에 반응하는 PLC 활성화를 억제하는 것으로 보여지는 아포프토시스 유도에 대한 올레산의 효과(카사비엘 일행, 1993년)를 조사하였다. EGF 결합 또는 EGF 수용체 티로신 키나아제 활성을 변경하지 않는 상기 억제 효과는 시스-9-옥타데센산(올레산)에서 관찰되지만, 트랜스-9-옥타데센산(엘라이딘산)에서는 관찰되지 않는다(카사비엘 일행, 1991년). 32D-키트 세포를 올레산 또는 엘라이딘산의 존재하에서 에코나졸 및 SLF 또는 IL-3과 배양하였다. 도 5에 도시된 바와 같이, SLF 및 Ca²⁺ 채널 차단제로 처리된 32D-키트는 올레산에 의해 세포 사멸로부터 보호되지만, 엘라이딘산에 의해서는 보호되지 않았다. 올레산의 유효 범위는 PLC 억제에 필요한 농도에 상응하는 1 내지 100

μ M이었다(카사비엘, 주가자, 1993년). 이러한 결과는 Ca²⁺ 유입 차단제와 조합하는 아포프토시스의 유도에 있어서 포스포리파아제 C의 활성화에 대한 요건과 일치한다.

실험 4: SLF-Ca²⁺ 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 이오노마이신에 의한 세포 보호

Ca²⁺ 유입에 의한 수용체 활성화는 Store Operated Ca²⁺ 채널의 개구에 의해 중개된다(페너 일행, 1993년). 3개의 화합물, 케토티펜, 에코나졸 및 Ni²⁺이 이크락을 억제하는 이들의 능력과 상호관련된 SLF와 조합하여 세포 사멸을 유도하는 효능이 있기 때문에 이크락 채널의 억제 표적인 것으로 추정된다(프란지우스 일행, 1994년). 또한, 전압 게이팅된 Ca²⁺ 채널 차단제 베라파밀(verapamil) 및 니페디핀(nifedipine)은 SLF와 조합하면 세포 사멸을 유도하는데 있어 비효과성이 관찰되었다(도시안됨). 이 결과는 SLF와 조합하는 세포 사멸의 유도는 비-전압 게이팅된 Ca²⁺ 유입 차단제에 대해 특이성이 있음을 의미한다.

에코나졸 및 케토티펜에 대한 다른 비-특이성 효과가 보고되었다(프란지우스, 호쓰, 1994년). Ca²⁺ 유입 차단이 세포 사멸 유도에 대해 중요한 것인지 측정하기 위해, 아포프토시스의 유도에 대한 칼슘 이온운반체의 효과를 검사하였다. 도 6A에 도시한 바와 같이, 이오노마이신은 농도-의존 방식으로 SLF와 Ca²⁺ 유입 차단제에 의해 유도되는 사멸로부터 32D-키트 세포를 보호하며, 그 최대 보호 농도는 10

나노몰이었다. Ca²⁺에 대한 이오노마이신의 특이성이 공지되어 있지만(리우 일행, 1978년), 이들 결과는 활성화 신호와 조합하여 아포프토시스 유도에 대해 필요한 Ca²⁺ 유입의 특별한 차단이 있음을 의미한다. 과량의 세포내 Ca²⁺를 발생시키는 고농도의 이오노마이신은 세포 사멸을 회복시켰다. 이것은 세포 활성화와 관련하여, 이 2개의 Ca²⁺의 과다 유입은 세포 사멸을 유도할 수 있음을 증명하고 있다.

실험 5: 32D-키트 세포에서 SLF와 Ca²⁺ 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스에 대한 Bcl-2의 효과

단백질의 Bcl-2군은 다양한 약제의 의해 유도되는 아포프토시스로부터 세포를 보호하는 것과 밀접한 관련이 있다. Bcl-2의 발현은 증식 세포와 상호관련되고(호켄베리 일행, 1991년; 베이스 일행, 1993년), 종양 억제제 p53에 의해 네가티브 조정되고(미야시타 일행, 1994년), 또 Bcl-2의 과발현은 인자를 제거한 후 아포프토시스성 사멸로부터 32D 세포를 보호한다(누네즈 일행, 1990년; 배피, 미야시타 일행, 1993년). 따라서, SLF 및 Ca²⁺ 유입 차단제에 의한 아포프토시스 유도에 대한 Bcl-2 단백질의 과발현 효과를 조사하였다. 32D-키트 세포를 Bcl-2 유전자를 함유하는 레트로바이러스 벡터로 감염시켜 Bcl-2 과발현 세포주를 생성시켰다(도 7A). 이 세포를 아포프토시스에 대한 감수성에 대해 시험하였고 또 Bcl-2 과발현은 인자 제거에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 32D-키트를 보호한다는 것이 밝혀졌다(도 7B). 그러나, 도 7B에 도시된 바와 같이, 32D-키트 세포에서 Bcl-2의 과발현은 SLF 및 에코나졸에 의한 아포프토시스의 유도로부터 이들 세포를 보호할 수 없었다. 이러한 관찰을 통해 SLF와 차단제에 의한 세포 사멸의 유도는 Bcl-2 독립적 방식으로 발생한다는 결론에 이르렀다.

32D키트-Bcl-2 세포는 저수준의 이오노마이신을 가진 SLF와 차단제에 의해 아포프토시스로부터 유사하게 보호되지만, 32D키트 세포는 고수준의 이오노마이신에서의 상당한 세포 사멸을 설명하지 못한다. 따라서, 이러한 결과는 활성화된 세포에 대해, Ca²⁺ 차단에 의해 유도되는 사멸 대 과량의 Ca²⁺ 유입에 의해 유도되는 사멸은 적어도 Bcl-2 민감성 수준에서 상이함을 보이고 있다.

실험 6: Ca²⁺ 유입 차단제 및 SLF-유도되는 세포 사멸 및 인자 제거에 의해 유도되는 세포 사멸에 대한

ICE 프로테아제 억제제의 효과

TNF- α 및 Fas 리간드는 Bcl-2 과발현이 아포프토시스-유도 신호에 대해 보호할 수 없는 2개의 예이다(메론 일행, 1995년; 스트라서 일행, 1995년). 이들 경우에, 프로테아제의 인터류킨-1 β 변환 효소군의 개체에 의해 아포프토시스가 중개된다는 것이 밝혀졌다. ICE-군 프로테아제가 SLF 및 Ca^{2+} 유입 차단제에 의한 아포프토시스의 유도와 관련여부를 측정하기 위해, 세포를 테트라펩티드-알데히드 ICE 억제제 YVAD-CHO와 공-배양하였다(마시마 일행, 1995년; 바실라코스 일행, 1995년). YVAD-CHO가 토포이소머라아제(topoisomerase) 억제제 에토포시드(etoposide)에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 32D-키트 세포를 보호함을 발견하였다(도시안됨). YVAD-CHO가 SLF와 에코나졸에 의해 유도되는 아포프토시스에 대한 내성을 제공하지만(도 8), 인자 제거에 의해 유도되는 아포프토시스로부터 32D-키트 세포를 보호할 수 없다는 것이 밝혀졌다(도 7B). 따라서, 성장 또는 활성화 신호와 Ca^{2+} 유입 차단제의 조합에 의해 유도되는 아포프토시스는 ICE-형 프로테아제에 의해 중개되는 것으로 추정된다.

실험 7: 인간 암 세포에 대한 Ca^{2+} 차단제 및 EGF의 효과

본 연구에서는 유방암에서 성장 인자 수용체의 관련을 설명하고 있다. 예컨대 유방암의 45% 이상이 EGF^R에 대해 양성이었다는 것이 밝혀졌다(폭스 일행, 1994년; 프란지우스 일행, 1994년). EGF^R에 밀접하게 관련된 성장 인자 수용체, erbB2는 모든 유방암의 30 내지 40%에서 과발현되었다(슬라몬 일행, 1989년). Ca^{2+} 유입 차단제와 활성화 신호를 가진 이들 세포에서 세포 사멸이 유도될 수 있는지 측정하기 위해, SK-BR3 세포를 경우에 따라 EGF가 있고 또 에코나졸의 존재하에서 배양하였다. SK-BR3 세포(ATCC cat.#HTB-30)를 인간의 유방 선암으로부터 유도하였다. 이들은 털빠진 마우스에서 종양을 형성하였다. 이들 세포는 돌연변이된 p53 유전자를 함유하고(엘스트너 일행, 1995년), 에스트로겐-수용체 네가티브이며, 또 이 수용체의 연속 활성화를 일으키는 고수준의 erbB2 분자를 발현시킨다(리 일행, 1993년). 도 9A에 도시된 바와 같이, 에코나졸은 경우에 따라 EGF의 존재하에서 SK-BR3 세포의 동일한 수준의 사멸을 유도하였다.

MDA-MB-231 세포주는 상당한 퇴행성 유방암이다. 털빠진 마우스에서도 역시 종양을 형성하지만, 저수준의 erbB2만을 발현하였다. 그러나, 이것은 FGF^R 포지티브이고 또 bFGF에 의해 오토크린식으로 자극하였다(엘 야지디 일행, 1995년). Ca^{2+} 유입 차단제에 대한 MDA-MB-231 세포의 감수성 및 차단제에 의한 세포 사멸의 유도에 대한 올레산, 이오노마이신, 및 YVAD-CHO의 영향을 측정하기 위한 실험을 실시하였다. 이 결과를 도 9B에 함께 요약하였다. 기재된 바와 같이, MDA-MB-231 세포는 Ca^{2+} 유입 차단제, 에코나졸의 노출에 반응하여 아포프토시스를 경험하였다. 더욱이, MDA-MB-231의 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 아포프토시스 메카니즘은 32D-키트 세포와 동일한 특징을 갖는 것처럼 보인다. 이오노마이신, 올레산 및 YVAD-CHO는 Ca^{2+} 유입 차단제에 의해 유도되는 사멸로부터 MDA-MB-231 세포를 보호할 수 있었다.

MCF-7 세포(ATCC cat. #HTB-22)는 인간의 유방암으로 부터 유래된다. 이들은 특히 마우스가 에스트로겐으로 처리될 때(Benz 일행 1993) 또는 세포가 마트리겔에 캡슐화될 때(Noel 일행, 1995), 털빠진 마우스에서 종양형성으로 된다. 이들 세포는 EGF (Godden 일행, 1992)에 의해 자극되는 것으로 보고되었다. 이들 세포가 Ca^{2+} 유입 차단제 및 활성화 신호에 의해 세포 사멸이 용이한지 여부를 측정하기 위해서, 다양한 농도의 에코나졸을 사용하여 MCF-7 세포를 10 ng/ml의 EGF로 18시간 동안 배양하거나 EGF없이 배양하였다. 도 10에 나타난 바와같이, MCF-7 세포는 EGF가 없는 경우보다 10 ng/ml의 EGF 존재 하에서 에코나졸로부터 세포 사멸율이 더 높다. 도 9A, 9B 및 10의 실험결과를 고려해 볼 때, 일부의 유방암 세포는 EGF와 같은 활성화 인자의 존재하에서 차단제에 대한 감수성이 증가될 것이라는 것을 나타낸다.

실험 8: 생체 내에서 32D-키트 백혈병 세포에 미치는 Ca^{2+} 유입 차단제 및 SLF의 효과

생체 내에서 Ca^{2+} 유입 차단제와 활성화 신호의 조합에 관한 효율을 측정하기 위해서, 인자 의존적 및 G418 내성 32D-키트 백혈병 세포로 접종된 마우스를 케토티펜과 SLF의 조합물로 처리하였다. 일련의 실험에서, 비장 세포를 제거하여 20% WEHI-3 조건된(CONDITIONED) 배지 및 검출을 G418-내성 백혈병 세포로 한정하기 위해 1 mg/ml의 G418을 함유하는 성장 배지중의 한천에 세포를 플레이트팅함으로써 백혈병 세포가 존재하는지에 대해 분석하였다. 또 다른 일련의 실험에서, IL-3에 대응하여 한천중에서 콜로니를 형성할 수 있고 백혈병 세포 뿐만 아니라 정상 세포를 포함하는 모든 세포의 존재에 대하여 비장을 분석하였다. 도 11A에 나타난 바와 같이, 각 실험에서 G418-내성 콜로니-형성 세포는 접종된 동물들에서 검출될 수 있다. 접종된 동물의 비장에서 발견된 수준은 동물에 따라 다르지만, 대부분의 동물들은 30 내지 1,000개의 G418-내성 콜로니를 함유한다. 접종되었지만 미처리된 동물로부터 산출된 산술 평균 콜로니 수는 69,938개이지만, 한 동물은 매우 많은 수의 백혈병 세포를 함유하였다. 이 동물이 포함되지 않으면, 산술 평균 콜로니 갯수는 391개이다. 이 그룹으로 부터의 기하학적 평균은 813 콜로니/비장이다. SLF만으로 주사된 동물에서 검출된 G418-내성 콜로니의 수는 65 내지 31,000 콜로니/비장으로서 인자를 수용하지 않은 것보다 더 높은 경향이 있었으며, 산술 평균은 7,399 콜로니/비장이며, 기하학적 평균은 1,545 콜로니/비장이다. 검출 가능한 콜로니 수의 이러한 증가는 SLF에 의한 백혈병 세포의 자극에 의한 것이다. 케토티펜만을 수용하는 마우스에서, 검출 가능한 콜로니의 수는 114 내지 27,645이고, 산술 평균은 5,502이고 기하학적 평균은 849이다. 케토티펜과 SLF로 처리된 동물에서, 검출 가능한 콜로니의 수는 8 내지 5370이고, 산술 평균과 기하학적 평균은 각각 131 및 61 G418-내성 콜로니/비장이다. one-tailed paired 학생의 t-시험을 이용한 상기 데이터를 분석한 결과(log 변환후), 미처리 및 처리된 그룹의 서로 달라질 가능성은 오직 6.2%이라는 것을 나타낸다. 매우 높은 수준의 백혈병 세포를 함유한 미처리 그룹중 한 동물은 상기 분석에 포함되지 않았으며, 미처리 및 처리된 그룹의 서로 달라질 가능성은 8.9%이다.

케토티펜만을 수용한 동물과 케토티펜 및 SLF를 수용한 동물 그룹간에 유사하게 비교한 결과, 이들 그룹이 달라질 가능성은 0.8%이므로 매우 중요하다는 것을 나타낸다. 이러한 결과는, 케토티펜만은 생체 내에서 백혈병 세포에 거의 작용을 하지 못하는 반면 케토티펜과 SLF를 조합하면 백혈병 세포수가 크게 감

소된다는 것은 나타낸다.

[표 2]

A군 및 B군이 상이한 G-418 내성 콜로니가 아닐 확률(%) (1)				
A군B군	32D-키트 단독	32D-키트 + SLF	32D-키트 + 케토티펜	32D-키트 + SLF + 케토티펜
32D-키트 단독		33.7 (2.4)	49.1 (16.6)	6.2 (8.9)
32D-키트 + SLF			35.2	1.9
32D-키트 + 케토티펜				0.8
32D-키트 + SLF + 케토티펜				

(1) one-tailed 학생의 t-시험을 이용하여 도 11A 자료의 로그(log)를 서로 비교하였다. 두 비교 그룹이 서로 다르지 않을 가능성(%)을 나타낸다. 괄호 내의 숫자는 미처리 그룹의 매우 많은 수의 백혈병 세포를 갖는 한 동물이 분석에 포함되지 않은 경우 측정된 동일한 가능성이다.

이들 마우스의 비장에서 콜로니 형성 세포의 총 수에 대해 유사한 분석을 실시하였으며, 그 자료를 도 11B에 나타냈다. 백혈병 세포로 접종되지 않은 마우스로부터의 콜로니 수에 대한 산술 평균은 857이고, 기하학적 평균은 669이다. 접종되었지만 미처리된 동물로부터 산출된 산술 평균 콜로니 수는 84,073이지만, 한 동물은 매우 많은 수의 백혈병 세포를 함유하였다. 이 동물이 포함되지 않으면, 산술 평균 콜로니는 3,448이다. 이 그룹으로 부터의 기하학적 평균은 4,573 콜로니/비장이다. SLF만으로 주사된 동물에서 검출된 IL-3-의존적 콜로니의 인자를 수용하지 않은 것보다 더 높은 경향이 있었으며, 산술 평균과 기하학적 평균은 각각 18,212 및 5,171 콜로니/비장이다. 검출 가능한 콜로니 수의 이러한 증가는 SLF에 의해 백혈병 세포의 자극에 의한 것이다. 케토티펜만을 수용하는 마우스에서, 산술 평균은 7,715이고 기하학적 평균은 2320이다. 케토티펜과 SLF로 처리된 동물에서는, 산술 평균과 기하학적 평균은 각각 793 및 66 IL-3-의존적 콜로니/비장이다. one-tailed paired 학생의 t-시험을 이용한 상기 데이터를 분석한 결과(log 변환후), 미처리 및 처리된 그룹의 서로 다르지 않을 가능성은 2%이라는 것을 나타낸다. 매우 높은 수준의 백혈병 세포를 함유한 미처리 그룹중 한 동물은 상기 분석에 포함되지 않았으며, 미처리 및 처리된 그룹의 서로 다르지 않을 가능성은 5.1%이다. 마찬가지로, SLF 만으로 처리된 그룹이나 케토티펜 만으로 처리된 그룹과 케토티펜 및 SLF로 처리된 그룹간을 비교한 결과, 이들 그룹이 다르지 않을 가능성은 2% 또는 1.6%이라는 것을 나타낸다.

[표 3]

A군 및 B군이 상이한 IL-3 의존성 콜로니가 아닐 확률(%) (1)					
B군	A군	세포 없음	32D-키트 단독	32D-키트 + SLF	32D-키트 + 케토티펜
세포 없음			8	2.4	23.4
32D-키트 단독				46.3 (1.8)	30.9 (34.8)
32D-키트 + SLF					22.8
32D-키트 + 케토티펜					
					1.6

(1) one-tailed 학생의 t-시험을 이용하여 도 11B 자료의 로그(log)를 서로 비교하였다. 두 비교 그룹이 서로 다르지 않을 가능성(%)을 나타낸다. 괄호 내의 숫자는 미처리 그룹의 매우 많은 수의 백혈병 세포를 갖는 한 동물이 분석에 포함되지 않은 경우 측정된 동일한 가능성이다.

32D-키트 세포로 접종시킨 마우스를 피하투여되는 케토티펜 p.o.와 SLF로 처리하는 또 다른 실험을 하였다. 도 12에서 나타난 바와같이 이러한 조건하에서, SLF와 케토티펜을 조합하였더니 처리된 마우스의 비장에서 백혈병 세포 수에 크게 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 이 실험에 의하면, 활성화 인자의 투여 경로와 두 물질의 상대적인 시간은 특수 치료 영역의 효과에 영향을 미칠 수 있다는 것을 나타낸다.

상기 실험 결과는 아포프토시스를 유도하는 신규 방법을 나타낸다. 이 방법은 세포로의 Ca^{2+} 유입 차단, 정상 상태에서 활성화될 때 Ca^{2+} 유입을 유도하는 수용체, 수용체를 활성화하는 인자와의 조합을 포함한다. 특정 실시예에서, 포스포리파제 C의 활성화는 Ca^{2+} 유입과 관련되어 있다.

예를 들면, IL-3를 제외한 SLF, P 물질 및 IgF와 항원은 비만 세포에서 아포프토시스를 유도하기 위해 (비전압 게이팅) Ca^{2+} 유입 차단제와 혼합할 수 있다는 것이 알려져 있다. SLF와 IL-3 모두는 증식성이 있는 반면, P 물질과 항원-IgF는 증식이 약하기 때문에 이 형태의 아포프토시스는 증식 신호를 반드시 요구하지 않는다. 신호가 증가하면 아포프토시스를 증가시키기 때문에, 이러한 형태의 세포 사멸은 Ca^{2+} 유입 차단제가 고활성 수용체와 혼합될 때 가장 효과적이다. 이러한 발견을 뒷받침하는 것으로 구성적으로 활성인 C-키트 수용체를 갖는 p815 비만세포는 Ca^{2+} 유입 차단제에만 감수성을 나타낸다(도 2B). SK-BR3 및 MDA-MB-231세포는 Ca^{2+} 유입 차단제에만 감수성을 나타낸다. 이는 또한 유사한 돌연변이(또는 오토크린

자극을 받는 것)를 갖는 세포는 상기 종류의 의약에 의해 아포프토시스에 감수성일 수 있다는 것을 의미한다.

올레산이 SLF 및 차단제에 의해 아포프토시스 유도를 역전할 수 있다는 것은 적어도 일부 실시예에서 포스포르파제 C의 활성을 가져오는 활성화 신호에 대한 필요성이 있다는 것을 의미한다. 이오노마이신은 SLF 및 차단제 유도 세포 사멸로부터 세포를 보호할 수 있으며, 이는 Ca^{2+} 유입의 특수 차단이 아포프토시스 유도에 필요하다는 것을 나타낸다. SLF 및 차단제에 의해 유도된 아포프토시스는 Bcl-2의 과발현에 둔감하지만, ICE 프로테아제의 억제제에 의해 역전될 수 있으며, 이는 ICEDP 대한 상기 아포프토시스 메카니즘에서의 역할이나 적어도 일부 실시예에서 프로테아제의 ICE 패밀리의 멤버를 의미한다.

특정 증식 세포가 PLC의 활성을 가져오는 고활성화 수용체(도 9A)를 갖는 점에서, 본 발명은 상기 세포를 Ca^{2+} 유입 차단제, 또는 세포의 수용체를 더 활성화시키는 인자에 처리되는 감수성을 진단하는 방법을 포함한다. 이러한 방법은 다음 단계를 포함한다:

병든 조직의 시료를 얻는 단계;

조직이 정상 조직에 비해 상승된 양의 PLC를 함유하는지의 여부를 결정하는 단계;

조직이 상승된 양의 PLC를 함유한다면 PLC가 활성화되는지의 여부를 판단하는 단계.

이러한 상승된 양의 활성화 PLC가 조직에서 발견되면, 세포는 치료될 수 있는 것이며, 즉 Ca^{2+} 유입 차단제 또는 상승된 양의 활성화 PLC를 가져오는 신호를 형성하는 수용체를 더 활성화시키는 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자에 세포를 노출함으로써 세포 사멸이 유도되고, 증식이 감소된다.

항-PLC 특이적 항-혈청은 유방암이 정상 대조군에 비해 상승된 양의 효소를 갖는다는 것을 나타내는 데 사용되었다. 항-포스포티로신 항체에 의한 면역침강후 항-PLC 항체와의 웨스턴 블로팅이 활성화 PLC의 양을 측정하는 데 사용될 수 있는 데, 그 이유는 티로신-포스포릴화된 PLC가 활성화되기 쉽기 때문이다 (Arteaga 일행, 1991).

PLC 효소 작용은 직접 분석될 수 있다(Huang 일행, 1995). 다시 말해서, 분석할 세포를 용해시키고, PLC 특이적 항혈청(Upstate Biotechnology Inc, Lake Placid, New York으로 부터 구입)을 이용하여 PLC 면역침강시킨 다음 50 mM의 트리스(pH 8), 0.1 mM CaCl_2 중의 0.3 mM의 총 지질을 함유하는 완충액에 리포솜(90% DMPM, 10% PIP_2)내의 기질로서 [^3H]- PIP_2 (New England Nuclear, 보스턴, 매사추세츠로 구입)를 사용하여 효소분석하였다. 1M의 HCl에 0.2M의 CaCl_2 를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 침전된 소포를 여과 플레이트(예, Millipore 96-웰 소수성 멀티스크린 DP 플레이트)에 수집하고 유체에 존재하는 반응의 이노시톨 포스페이트 생성물을 신틸레이션 검출기에 의해 정량분석한다.

이오노마이신이 세포 사멸로부터 보호하거나 세포사멸을 유도할 수 있다는 발견은 Ca^{2+} 유입의 양 극한치가 아포프토시스를 유발할 수 있다는 것을 나타낸다. 그러나, 두 경우에, SLF 없이는 최소한의 세포 사멸만이 관찰되었기 때문에 세포 활성화가 필요한 것으로 보인다. Bcl-2 과발현은 고농도의 이오노마이신에 의해 유도된 세포 사멸만을 보호하였는데, 이는 Ca^{2+} 유입의 두 극한치에서 세포 사멸을 일으키는 메카니즘이 적어도 Bcl-2의 민감성 수준에서 동일하지 않다는 것을 의미한다. 그러므로, 고농도의 이오노마이신에서, 세포는 ' Ca^{2+} 과부하' 상태에 놓일 수 있고, 이러한 형태의 독성에 노출된 특정 세포는 Bcl-2(Strasser 등, 1991, Reed, 1994)에 의해 보호되는 것으로 알려져 있다. 높은 Ca^{2+} 사멸의 가능한 매개체는 T세포(시바사키 일행, 1985)와 B세포(Bonnefoy 일행, 1994)에서 아포프토시스를 강화하는 것으로 드러난 Ca^{2+} -의존적 포스파타제 칼시네우린일 수 있다는 것이 가정되었다.

본 명세서에서 기재된 결과(도 7B 및 8)에 의하면, Bcl-2 및 ICE가 서로 다른 아포프토시스 메카니즘의 조절에 관련된다는 것을 나타낸다. 세포가 인자 제거에 의해 유래되는 아포프토시스로부터

Bcl-2(그러나, ICE 억제제는 아님)에 의해 보호되는 반면, ICE 억제제(그러나, Bcl-2는 아님)는 Ca^{2+} 유입 차단제 및 SLF의 조합으로부터 보호된다. 기타 아포프토시스-유발 신호를 이용한 실험은 또한 이들 발견과 일치한다(Cuende 일행, 1993; Memon 일행, 1995; Strasser 일행, 1995; Vasilakos 일행, 1995; Parijs 일행, 1996). 또한, 최근에는 Fas 활성화가 내부 저장으로부터 Ca^{2+} 방출에 영향을 미치지 않고 T 세포에서 항-CD3-매개 Ca^{2+} 유입을 억제한다는 것이 입증되었다(Kovacs 일행, 1995).

케토티펜은 히스타민 H1 수용체 길항작용과 Ca^{2+} 유입 억제 작용을 모두 나타내는 공지된 항알레르기 및 항천식 의약이다(Martinet 일행, 1978; Grant 일행, 1990). 비만 세포 탈과립화에 Ca^{2+} 유입이 관련되는 것을 볼 때, 이 공정의 억제는 항염증 작용에 대하여 인정되는 메카니즘중의 하나로 보여진다. 이와 같이 본 명세서에서 기재된 결과는 Ca^{2+} 유입 차단제, 특히 케토티펜이 알레르기 증상을 치료하기에 적절한 활성화 신호와 함께 공동 투여될 수 있다는 것을 제시한다. Ca^{2+} 유입 차단제는 항증식제로서 제안되어왔다(Riccardi, 1987; Felder 일행, 1991; Kohn 일행, 1992; Estacion 일행, 1993; Petrasch 일행, 1993; Kondo 일행, 1994; Buckley 일행, 1995; De Vries 일행, 1995). 본 명세서에 기재된 결과는 이들 화합물이 강한 증식성 또는 활성화 신호와 결합될 때 더 효과적일 것이라는 것을 나타내고 있다. 그러므로, Ca^{2+} 유입 차단제와 증식성 또는 활성화 신호의 조합은 잠재성이 있으나, 특이적 항증식성 또는 항염증 특성을 갖는다.

본 발명자들은 세포로의 Ca^{2+} 유입이 야기되는 정밀한 메카니즘을 설명하는 어떠한 이론에 의해 얽매이지 않기를 원한다. 그러나, 본 명세서에서 제공된 결과는 Ca^{2+} 유입을 일으키도록 수용체의 정상 상태의 활

생화학에서 세포의 수용체에 결합하는 인자와 Ca^{2+} 유입 차단제의 조합물을 세포에 투여할 때 세포 사멸의 유도 사이의 관계를 나타낸다.

이러한 인자는 수용체의 천연 리간드, 즉 성질상 수용체에 작용하는 리간드, 작용물질성 항체일 수 있다. 적어도 어떤 경우에는, 유입은 PLC의 활성화를 포함한다. 수많은 경우에, 활성화는 '자극'이 세포의 증식, 활성 및/또는 생존을 포함하는 세포의 자극을 포함한다.

도 9A에 나타난 결과는 수용체가 리간드에 의해 통상 활성화된 후 Ca^{2+} 유입되는 구성적으로 활성화되는 세포의 경우에, Ca^{2+} 유입 차단제만의 투여가 세포 사멸을 유도할 수 있다. 이와같이, 본 명세서에 기재된 본 발명은 수용체의 활성화가 세포로의 Ca^{2+} 유입을 증진시키는, 구성적으로 활성화되는 수용체를 갖는 세포의 사멸을 유도하기 위해 Ca^{2+} 유입 차단제를 투여한다.

세포 자체에 의해 생성된 인자에 대응하여 활성화되는 수용체를 갖는 세포는 Ca^{2+} 차단제로 처리되어 세포 사멸을 유도할 수 있다.

특정 공지 인자와 관련하여, SLF, 이를테면 SLF의 변이체, c-키트 수용체 리간드는 또한 세포 사멸을 유도하는 데 효과적일 수 있다. 예를들면, c-키트 수용체에 대한 작용물질성 항체가 당해 기술 분야에서 공지된 방법에 따라 개발될 수 있다. 수용체를 가교시킬 수 있고 Ca^{2+} 유입을 포함하는 기타 작은 분자가 유용하다. SLF 자체는 돌연변이에 의해 변형되어 분자를 안정화시키고 그에 따라 포유동물 체내에서 반감기를 연장할 수 있다. 한편, SLF는 수명을 연장하기 위해서 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 접합시킴으로써 변형될 수 있다.

비만 세포의 경우, IgE 및 항원 대신에, 이를테면 세포성 IgE 수용체 자체에 대한 항체가 사용될 수 있다. IgE 수용체를 가교시킬 수 있는 항체는 Ca^{2+} 유입을 일으키기가 가장 쉽다.

알레르기 환자의 경우에, IgE 류의 알레르겐에 특이적인 면역글로불린은 알레르겐-특이적 T 세포에 의해 생성된다. IgE 항체는 비만 세포나 호염기구의 표면에서 발견된 $\text{Fc}\epsilon\text{R1}$ 으로 불리우는 특이 수용체에 결합할 수 있는 세포의 공간 속으로 B세포에 의해 분비된다. 이들 비만 세포나 호염기구가 그들의 표면에 결합된 IgE에 의해 인식되는 다가 알레르겐과 마주친다면, IgE/수용체는 가교 및 활성화될 수 있어 히스타민과 같은 1이상의 예비 형성된 매개체의 방출을 야기하고, 류코트리엔, 프로스타글란딘 및 시토킨과 같은 기타 염증성 분자의 우발적인 합성과 방출을 야기시킨다. 그러므로, 이 복잡한 반응은 서로 다른 수많은 세포 형태와 분자를 포함하며, 이들 모두는 알레르기 반응을 매개하는데 있어 가능한 표적이다. 이는 알레르겐-특이적 IgE를 생성하는 B 세포, 알레르겐에 특이적인 T 세포 수용체를 발현하는 T 세포, 그리고 비만 세포 및 호염기구를 그들 표면상의 알레르겐-특이적 IgE와 함께 포함한다. 이들 수용체를 통해 전달된 신호는 모두 Ca^{2+} 를 이동시키기 때문에, 이들은 비만 세포상의 IgE 및 항원에 대해 나타낸 바와 같이, 세포 사멸을 유도하기 위해 Ca^{2+} 유입 차단제와 혼합할 수 있는 것이다. 막 IgE를 발현하는 B 세포에 대해서, 특이적 항 IgE 화합물들은 이들 분자를 가교시켜 신호 전달을 가져온다. 이러한 화합물들은, 예를들면 미국특허 5,422,258호; 5,428,133호 또는 4,940,782호에 기재되어 있는 항체이다.

또한, B 세포상의 표면 IgE를 인식하여 가교시키는 $(\text{Fab})_2$ 시약 또는 기타 화합물과 같은 이들 항체의 단편이 이용될 수 있다. B세포가 특이적으로 표적될 때, B 세포 표면상의 IgE를 우선적으로 인식하지만 비만 세포나 호염기구 상에 결합된 IgE는 인식하지 않는 시약을 사용하는 것이 바람직하다.

특수 항원을 인식하는 항체를 생성하는 B 세포를 특이적으로 제거하는 것이 바람직한 경우에, 항원 그 자체는 다가이며 그 양이 충분하다면 Ca^{2+} 유입 차단제와 조합되어 충분한 신호를 제공하여 항체를 생성하는 B 세포는 죽게될 것이다. 한편, B 세포에 의해 생성되는 항체의 가변 영역을 인식하는 항 이디오타입 항체가 사용될 수도 있다. 이러한 처리를 위한 잠재적 표적은 자가항원에 항체를 생성하는 B 세포를 포함하며, 자기면역 질병을 일으킨다.

물론, 수용체를 포함하는 세포 속으로 Ca^{2+} 유입을 가져오는 기타 세포성 수용체 리간드-결합이 있다. 본 발명의 범위 내에 있는 성장 인자 수용체 작용물질은 TGF- α (변환 성장 인자), EGF, 헤레굴린, 및 erb B1,2,3 및 4, PDGF A 및 B의 기타 작용물질(혈소판-유발 성장 인자), SLF, FLT-3(fms형 티로신 키나제-3) 리간드, 염기성 및 산성 FGFs (섬유아세포 성장 인자)(관련 성장 인자의 패밀리), 에노텔린, NGF(신경 성장 인자), VEGF(혈관 내피 성장 인자), HGF(SF)(간 성장 인자, 산란 인자)를 포함한다. 다중 체인 면역 인식 수용체에 대한 작용 물질은 표면 면역글로불린을 가교시키는 항체를 포함하는 B 세포상의 항원 수용체에 대한 작용물질(즉, B 세포에 의해 인식된 특이 항원), 특수 TCRs를 인식하는 항체, 항 CD_3 항체 또는 기타 작용물질성 응집 항체 및 $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ 및 $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ 를 활성화시키는 기타 시약과 같은 T 세포 수용체 작용물질, 및 비만 세포와 호염기구 상의 $\text{Fc}\epsilon\text{RI}$ 수용체에 대한 작용물질을 포함한다. 다음과 같은 G-단백질-결합 수용체의 작용물질도 본 발명의 범위 내에 있다: 붐베신, 가스트린, 펩티드를 방출하는 가스트린, 브라디키닌, 카르바콜 및 기타 무스카린 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, P 물질과 같은 뉴로키닌, ATP 및 아데노신을 포함하는 퓨린성 수용체 작용물질, 1,25-디하이드록시비타민 D_{25} . 또한 Ca^{2+} 유입을 자극하는 수많은 신경 전달물질이 있다. 세포 사멸은 본 명세서에서 기재된 것과 유사한 실험을 이용하여 Ca^{2+} 유입 차단제와 리간드를 세포에 투여한 결과 발생하는 것으로 나타낼 수 있다. 이러한 리간드와 작용물질 수용체 항체의 변종은 실제 사용을 위해 개발될 수 있고 상기와 유사한 실험을 이용하여 시험될 수 있다. 여기서 세포 사멸은 Ca^{2+} 유입 차단제와 함께 상기와 같은 변종의 투여에 대한 반응으로 측정된다.

양호한 실시예와 관련하여 기재된 것 외에 Ca^{2+} 유입 차단제는 테니덱, CaI , Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , SKF-

96365 및 크로몰린이 있다. 물론, 당해 기술 분야에 알려진 것보다 더 많이 있다(Lewis 일행, 1995).

어떤 특별한 경우에, 1 이상의 Ca^{2+} 유입 차단제와 함께 투여된 수용체-결합제의 조합은 소망의 세포 반응을 이끌어내는 데 가장 효과적인 것으로 판명되었다.

본 명세서의 실험에 의해 나타난 바와같이, 세포 사멸이 수용체 리간드(또는 기타 작용물질제)와 Ca^{2+} 유입 차단제의 투여에 의해 유발될 수 있는 지의 여부를 결정하는데 있어 중요한 것은 적절한 수용체 결합 상에 발생된 신호에 대한 세포의 정상 반응과 수용체이다. 그럼에도 불구하고, 본 명세서의 실험에서 사용된 것 이외의 세포 형태가 적어도 그 생명 주기의 어느 점에서 발현된 수용체를 가지며, 이는 본 발명에서 요구되는 정상 세포 반응을 형성하게 된다는 것이 공지되어 있다. c-키트 수용체를 발현하고 SLF에 반응성이 있는 것으로 알려진 기타 세포 형태의 예로는 조혈 전구 세포, 멜라닌 형성세포 및 생식 세포가 있다. 기타 리간드를 결합하고 이 결합이 통상 필연적인 반응을 가져오는 수용체를 발현할 수 있는 세포 형태의 예로는 EGF 및 FGF 수용체를 발현하는 유방암 세포와 PDGF 수용체를 발현하는 직장 암 세포가 있다.

종양형성성, 과형성증 또는 고활성 상태를 나타내는 이러한 세포는 본 발명에 따른 적합한 결합 인자 및 Ca^{2+} 유입 차단제를 투여하는 것에 의해 처리될 수 있다. 따라서 암, 비만증, 자가면역 염증성 질병 또는 알레르기에 걸린 사람을 치료하기 위해 본 발명에 따른 처리물질을 투여할 수 있다.

c-키트 수용체는 백혈병 세포상에서 과발현되고(Muroi 일행, 1995), 소세포 폐암(Hida 일행, 1994) 및 여성의 생식기관의 암(Inoue 일행, 1994) 대부분에서 발견되는 것으로 밝혀져있으며 신경섬유종(Hirota 일행, 1993)의 비만세포 침투에도 관련될 수 있다. 이러한 부위는 본 발명에 따른 치료의 주 대상이다.

본 발명에 따라 표적으로 되는 세포가 구성적으로 활성화되는 경우(제9A도)에는 수용체 결합에 의해 생성되는 신호를 자극하기 위한 약제를 포함할 필요가 없는데 이는 신호가 이미 생성되어 있기 때문이다. 이러한 경우, Ca^{2+} 유입 차단제는 수용체 자극제 없이 투여될 수 있다. 특정 종양 세포는 이러한 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있기 때문에 이러한 방법으로 처리될 수 있다. c-키트 활성화 돌연변이는 사람 및 설치류 기원의 비만세포에서 발견되었다(Kanakura 일행, 1994; Kitayama 일행, 1995). 이것은 Ca^{2+} 차단제와 함께 적합한 인자의 투여에 의해 신호를 강화하는 특정 경우에는 바람직하지 않을 수 있다는 것을 말하는 것은 아니다.

특정 세포 형태가 본 발명에 따른 처리에 감수성인지 여부를 결정하는 첫 단계는 세포막상에서 발현된 수용체의 리간드 결합이 세포내 Ca^{2+} 의 농도를 증가시키는지 여부를 결정하는 것이다. 본 명세서의 실시예의 세포에 대해 기재된 실험과 유사하게, 다양한 농도의 리간드 및 Ca^{2+} 유입 차단제 세포 배양물의 투여를 실시하여 세포 사멸이 유도되는 정도를 측정한다.

특히, 적합한 투여량은 처리될 숙주, 투여형태 및 처리될 환자의 상태와 심각도에 따라 달라진다. 동물 체중 kg당 약 0.1 mg 내지 1 mg을 매일 투여할 때 가장 만족스런 수용체-결합제 결과를 나타내었지만, 이것은 특정 약제 또는 처리될 사람 또는 처리조건에 따라 다를 수 있다. 또한 매일의 투여를 2, 3, 4 또는 그 이상의 투여 횟수로 나누어서 하는 것이 더욱 유리할 수 있다.

약제가 성장인자와 같은 폴리펩티드이면, 이것은 경피, 근육내 또는 정맥 주사에 의해 투여될 수 있다.

본 발명의 수용체 결합 화합물을 함유하는 약제학적 조성물은 적어도 하나의 약제학적으로 허용되는 담체, 희석제, 부형제, 윤활제, 완충액, 항균제, 충전제, 산화방지제 등을 포함할 수 있으며, 이 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합하는 통상의 방식으로 제조될 수 있다. 단위 투여 형태는 예컨대 약 0.025 mg 내지 약 50 mg의 화합물을 함유한다.

공지된 Ca^{2+} 유입 차단제는 약제가 소망하는 표적 세포에 도달하기만 하면 공지 과정에 따라 제조되어 투여될 수 있다.

특정 세포를 표적으로 하기 위해, 예컨대 특정 IgE를 생산하는 B세포, IgE의 표면 일부에 대한 작용물질 항체가 생성될 수 있다. 적합한 Ca^{2+} 유입 차단제는 항체가 표면 IgE에 결합하여 차단제가 작용하려는 특정 세포와 접촉하도록 적합하게 항체에 결합된다(예컨대, 공유결합).

참고 문헌

싱기 인용된 특정 참고 문헌은 다음과 같다. 여기 수록된 참고 문헌은 모드 본 명세서에 참고 서적으로 포함되어 있다.

- Arteaga, C.L., Johnson, M.D., Toddenud, G., Coffey, R.J., Carpenter, G., Page, D.L. (1991) Elevated content of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma 1 in primary human breast carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 10435-9.
- Ashwell, J.D., Cunningham, R.E., Noguchi, P.D. & Hernandez, D. (1987) Cell growth cycle block of T cell hybridomas upon activation with antigen. *J. Exp. Med.*, **165**, 173-194.
- Baffy, G., Miyashita, T., Williamson, J.R. & Reed, J.C. (1993) Apoptosis induced by withdrawal of interleukin-3 (IL-3) from an IL-3-dependent hematopoietic cell line is associated with repartitioning of intracellular calcium and is blocked by enforced Bcl-2 oncoprotein production. *J. Biol. Chem.*, **268**, 6511-9.
- Bargou, R. C., P. T. Daniel, M. Y. Mapara, K. Bommert, C. Wagener, B. Kallinich, H. D. Royer and B. Dorken. (1995) Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int. J. Cancer*. **60**, 854-9.
- Benz, C. C., G. K. Scott, J. C. Sarup, R. M. Johnson, D. Tripathy, E. Coronado, H. M. Shepard and C. K. Osborne. (1993) Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res. & Trtmt.* **24**, 85-95.
- Benzaquen, L. R., C Brugnara, H. R. Byers, S. Gattoni-Celli and J. A. Halpern (1995) Clotrimazole inhibits cell proliferation *in vitro* and *in vivo*. *Nature Medicine* **1**, 534-40.
- Berger, S.A., Mak, T.W. & Paige, C.J. (1994) Leukocyte common antigen (CD45) is required for immunoglobulin E-mediated degranulation of mast cells. *J. Exp. Med.*, **180**, 471-6.
- Bonnefoy, B.N., Genestier, L., Flacher, M. & Revillard, J.P. (1994) The phosphoprotein phosphatase calcineurin controls calcium-dependent apoptosis in B cell lines. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 325-9.
- Brown, D.M., Warner, G.L., Ales-Martinez, J.E., Scott, D.W. & Phipps, R.P. (1992) Prostaglandin E2 induces apoptosis in immature normal and malignant B lymphocytes. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **63**, 221-9.
- Buckley, N.E., Su, Y., Milstien, S. & Spiegel, S. (1995) The role of calcium influx in cellular proliferation induced by interaction of endogenous ganglioside GM1 with the B subunit of cholera toxin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1256**, 275-83.
- Bueb, J.L., Mousli, M., Bronner, C., Rouot, B. & Landry, Y. (1990) Activation of Gi-like proteins, a receptor-independent effect of kinins in mast cells. *Molec. Pharmacol.*, **38**, 816-22.
- Casabiell, X., Pandiella, A. & Casanueva, F. (1991) Regulation of epidermal-growth-factor-receptor signal transduction by cis-unsaturated fatty acids. *Biochem. J.*, **278**, 679-87.
- Casabiell, X., Zugaza, J.L., Pombo, C.M., Pandiella, A. & Casanueva, F.F. (1993) Oleic acid blocks epidermal growth factor-activated early intracellular signals without altering the ensuing mitogenic response. *Exp. Cell Res.*, **205**, 365-73.
- Chang, T-w. Chimeric anti-human IgE-monoclonal antibody which binds to secreted IgE and membrane-bound IgE expressed by IgE-expressing B cells but not to IgE bound to FC receptors. United States Patent No. 5,428,133 issued June 27, 1995.
- Chang, T-w. Methods for producing high affinity anti-human IgE-monoclonal antibodies which bind to IgE on IgE-bearing B cells but not basophils. United States Patent No. 5,422,258 issued June 6, 1995.
- Chinnaiyan, A.M., Orth, K., O'Rourke, K., Duan, H., Poirier, G.G. & Dixit, V.M. (1996) Molecular ordering of the cell death pathway. *J. Biol. Chem.* **271**, 4573-6.
- Columbo, M., Botana, L.M., Horowitz, E.M., Lichtenstein, L.M. & MacGlashan, D.J. (1994) Studies of the intracellular Ca²⁺ levels in human adult skin mast cells activated by the ligand for the human c-kit receptor and anti-IgE. *Biochem. Pharmacol.*, **47**, 2137-45.
- Cuende, E., Ales-Martinez, J.E., Ding, L., Gonzalez-Garcia, M., Martinez-A, C. & Nunez, G. (1993) Programmed cell death by bcl-2-dependent and independent mechanisms in B lymphoma cells. *Embo J.*, **12**, 1555-60.
- Denyer et al. (1985) The effects of econazole on the growth of murine myeloma cells and its use in hybridoma production. *Developments in Biological Standardization*, **60**, 503-8.
- De Vries, G.W., McLaughlin, A., Wenzel, M.B., Perez, J., Harcourt, D., Lee, G., Garst, M. & Wheeler, L.A. (1995) The antiinflammatory activity of topically applied novel calcium-channel antagonists. *Inflammation*, **19**, 261-75.
- Dowd, D.R. (1995) Calcium regulation of apoptosis. *Adv. Second Mess. & Phospho. Prot. Res.*, **30**, 255-80.
- el Yazidi, I. and Y. Boilly Marer. (1995) Production of acidic and basic fibroblast growth factor by the hormone-independent breast cancer cell line MDA-MB-231. *Anticancer Res.* **15**, 783-90.
- Elstner, E., I. M. Linker, J. Said, T. Umieł, V. S. de, I. P. Shintaku, D. Heber, L. Binderup, M. Uskokovic and H. P. Koeffler. (1995) 20-epi-vitamin D3 analogues: a novel class of potent inhibitors of proliferation and inducers of differentiation of human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **55**, 2822-30.
- Enari, M., Hug, H. & Nagata, S. (1995) Involvement of an ICE-like protease in Fas-mediated apoptosis. *Nature*, **375**, 78-81.
- Estacion, M. & Mordan, L.J. (1993) Competence induction by PDGF requires sustained calcium influx by a mechanism distinct from storage-dependent calcium influx. *Cell Calcium*, **14**, 439-54.

- Ethier, S. P. (1995) Growth factor synthesis and human breast cancer progression. [Review]. *J. Natl. Cancer Inst.* **87**, 964-73.
- Felder, C.C., Ma, A.L., Liotta, L.A. & Kohn, E.C. (1991) The antiproliferative and antimetastatic compound L651582 inhibits muscarinic acetylcholine receptor-stimulated calcium influx and arachidonic acid release. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.*, **257**, 967-71.
- Fox, S. B., K. Smith, J. Hollyer, M. Greenall, D. Hastrich and A. L. Harris. (1994) The epidermal growth factor receptor as a prognostic marker: results of 370 patients and review of 3009 patients. *Breast Cancer Res. & Trtmt.* **29**, 41-9.
- Franzius, D., Hoth, M. & Penner, R. (1994) Non-specific effects of calcium entry antagonists in mast cells. *Pflugers Archiv/Eur.J. Physiol.*, **428**, 433-8.
- Fry, D. W. and J. M. Nelson. (1995) Inhibition of basic fibroblast growth factor-mediated tyrosine phosphorylation and protein synthesis by PD 145709, a member of the 2-thioindole class of tyrosine kinase inhibitors. *Anti Cancer Drug Design.* **10**, 607-22.
- Godden, J., R. Leake and D. J. Kerr. (1992) The response of breast cancer cells to steroid and peptide growth factors. *Anticancer Res.* **12**, 1683-8.
- Grant, S.M., Goa, K.L., Fitton, A. & Sorkin, E.M. (1990) Ketotifen. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic use in asthma and allergic disorders. *Drugs*, **40**, 412-48.
- Gushchin et al. (1985) Ketotifen effect on secretion of histamine from basophils and on proliferative response of mononuclear cells of human peripheral blood. *Allergologia et Immunopathologia*, **13**, 111-21.
- Hida, T., R. Ueda, Y. Sekido, K. Hibi, R. Matsuda, Y. Ariyoshi, T. Sugiura, T. Takahashi and T. Takahashi. (1994) Ectopic expression of c-kit in small-cell lung cancer. *Int. J. Cancer. Suppl.* **8**, 108-9.
- Hines, S. J., C. Organ, M. J. Kornstein and G. W. Krystal. (1995) Coexpression of the c-kit and stem cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth & Diff.* **6**, 769-79.
- Hirota, S., S. Nomura, H. Asada, A. Ito, E. Mori and Y. Kitamura. (1993) Possible involvement of c-kit receptor and its ligand in increase of mast cells in neurofibroma tissues. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine.* **117**, 996-9.
- Hockenbery, D.M., Zutter, M., Hickey, W., Nahm, M. & Korsmeyer, S.J. (1991) BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 6961-5.
- Honn, K. V., J. D. Taylor and J. M. Onoda. Method and composition for the treatment of tumors by administering a platinum coordination compound and a calcium channel blocker compound of the dihydropyridine class. United States Patent No. 4,906,646 issued March 6, 1990.

- Horak, E., K. Smith, L. Bromley, S. LeJeune, M. Greenall, D. Lane and A. L. Harris. (1991) Mutant p53, EGF receptor and c-erbB-2 expression in human breast cancer. *Oncogene*, **6**, 2277-84.
- Hoth, M. & Penner, R. (1992) Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, **355**, 353-6.
- Hoth, M. & Penner, R. (1993) Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J. Physiol.*, **465**, 359-86.
- Hu, Q., Trevisan, M., Xu, Y., Dong, W., Berger, S.A., Lyman, S.D. & Minden, M.D. (1995) c-KIT expression enhances the leukemogenic potential of 32D cells. *J. Clin. Invest.*, **95**, 2530-8.
- Huang, P.S., Davis, L., Huber, H., Goodhart, P.J., Wgrzyn, R.E., Oliff, A., & Heimbrosk, D.C. (1995) An SH3 domain is required for the mitogenic activity of microinjected phospholipase C-gamma 1. *FEBS Letters*, **358**, 287-92.
- Inoue, M., S. Kyo, M. Fujita, T. Enomoto and G. Kondoh. (1994) Coexpression of the c-kit receptor and the stem cell factor in gynecological tumors. *Cancer Res.* **54**, 3049-53.
- Jones, L.A., Chin, L.T., Longo, D.L. & Kruisbeek, A.M. (1990) Peripheral clonal elimination of functional T cells. *Science*, **250**, 1728-9.
- Jouvin, M.H., Numerof, R.P. & Kinet, J.P. (1995) Signal transduction through the conserved motifs of the high affinity IgE receptor Fc epsilon RI. *Sem. Immunol.*, **7**, 29-35.
- Kanakura, Y., T. Furitsu, T. Tsujimura, J. H. Butterfield, L. K. Ashman, H. Ikeda, H. Kitayama, Y. Kanayama, Y. Matsuzawa and Y. Kitamura. (1994) Activating mutations of the c-kit proto-oncogene in a human mast cell leukemia cell line. *Leuk. & Suppl* **1**, 18-22.
- Kitayama, H., Y. Kanakura, T. Furitsu, T. Tsujimura, K. Oritani, H. Ikeda, H. Sugahara, H. Mitsui, Y. Kanayama, Y. Kitamura and a. I. et. (1995) Constitutively activating mutations of c-kit receptor tyrosine kinase confer factor-independent growth and tumorigenicity of factor-dependent hematopoietic cell lines. *Blood*, **85**, 790-8.
- Kizaki, H., Tadakuma, T., Odaka, C., Muramatsu, J. & Ishimura, Y. (1989) Activation of a suicide process of thymocytes through DNA fragmentation by calcium ionophores and phorbol esters. *J. Immunol.*, **143**, 1790-4.
- Kohn, E.C., Sandeen, M.A. & Liotta, L.A. (1992) *In vivo* efficacy of a novel inhibitor of selected signal transduction pathways including calcium, arachidonate, and inositol phosphates. *Cancer Res.*, **52**, 3208-12.
- Kohn, E. C., W. Jacobs, Y. S. Kim, R. Alessandro, S.W. Stetler and L. A. Liotta. (1994) Calcium influx modulates expression of matrix metalloproteinase-2 (72-kDa type IV collagenase, gelatinase A). *J. Biol. Chem.* **268**, 21505-11.
- Kohn, E. C., Felder, C. C., Jacobs, W., Holmes, K. A., Day, A., Freer R., and Liotta, L. A. (1994a) Structure-function analysis of signal and growth inhibition by carboxyamido-trizole, CAI. *Cancer Res.*, **54**, 935-42.

- Kondo, N., Fukutomi, O., Kameyama, T., Nishida, T., Li, G.P., Agata, H., Shinbara, M., Shinoda, S., Yano, M. & Orii, T. (1994b) Suppression of proliferative responses of lymphocytes to food antigens by an anti-allergic drug, ketotifen fumarate, in patients with food-sensitive atopic dermatitis. *Int. Arch. Allergy & Immunol.*, **103**, 234-8.
- Kopreski, M. S., A. Lipton, H. A. Harvey and R. Kumar. (1996) Growth inhibition of breast cancer cell lines by combinations of anti-P185HER2 monoclonal antibody and cytokines. *Anticancer Res.* **16**, 433-6.
- Korsmeyer, S.J. (1995) Regulators of cell death. *Trends Genet.*, **11**, 101-5.
- Kovacs, B. & Tsokos, G.C. (1995) Cross-linking of the Fas/Apo-1 antigen suppresses the CD3-mediated signal transduction events in human T lymphocytes. *J. Immunol.*, **155**, 5543-9.
- Krajewski, S., C. Blomqvist, K. Franssila, M. Krajewska, V. M. Wasenius, E. Niskanen, S. Nordling and J. C. Reed. (1995) Reduced expression of proapoptotic gene BAX is associated with poor response rates to combination chemotherapy and shorter survival in women with metastatic breast adenocarcinoma. *Cancer Res.* **55**, 4471-8.
- Lampe, P.A., Cornbrooks, E.B., Juhasz, A., Johnson, E.J. & Franklin, J.L. (1995) Suppression of programmed neuronal death by a thapsigargin-induced Ca^{2+} influx. *J. Neurobiol.*, **28**, 205-12.
- Li, B. D., K. D. Bauer, W. P. Carney and R. B. Duda. (1993) Detection of c-erbB-2 oncoprotein expression in breast tissue by multiparameter flow cytometry. *J. Surg. Res.* **54**, 179-88.
- Lee, E. Y. (1995) Tumor suppressor genes and their alterations in breast cancer. *Sem. Cancer Biol.* **6**, 119-25.
- LeJeune, S., R. Leek, E. Horak, G. Plowman, M. Greenall and A. L. Harris. (1993) Amphiregulin, epidermal growth factor receptor, and estrogen receptor expression in human primary breast cancer. *Cancer Res.* **53**, 3597-602.
- Levitzi, A. and A. Gazit. (1995) Tyrosine kinase inhibition: an approach to drug development. [Review]. *Science*, **267**, 1782-8.
- Lewis, R.S. & Cahalan, M.D. (1995) Potassium and calcium channels in lymphocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, **13**, 623-53.
- Liu, C. & Hermann, T.E. (1978) Characterization of ionomycin as a calcium ionophore. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5892-4.
- Lu, Q. L., P. Abel, C. S. Foster and E. N. Lalani. (1996) bcl-2: role in epithelial differentiation and oncogenesis. [Review]. *Hum. Pathol.* **27**, 102-10.
- Lupu, R., R. B. Dickson and M. E. Lippman. (1992) The role of erbB-2 and its ligands in growth control of malignant breast epithelium. [Review] *J. Ster. Biochem. & Molec. Biol.* **43**, 229-36.

- Martin, U. & Romer, D. (1978) The pharmacological properties of a new, orally active antianaphylactic compound: Ketotifen, a Benzocycloheptathiophene. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **28**, 770-82.
- Mashima, T., Naito, M., Fujita, N., Noguchi, K. & Tsuruo, T. (1995) Identification of actin as a substrate of ICE and an ICE-like protease and involvement of an ICE-like protease but not ICE in VP-16-induced U937 apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **217**, 1185-92.
- McConkey, D.J., Harzell, P., Amador-Perez, J.F., Orrenius, S. & Jondal, M. (1989) Calcium-dependent killing of immature thymocytes by stimulation via the CD3/T cell receptor complex. *J. Immunol.*, **143**, 1801.
- Memon, S.A., Moreno, M.B., Petrak, D. & Zacharchuk, C.M. (1995) Bcl-2 Blocks Glucocorticoid- but not Fas- or Activation-Induced Apoptosis in a T Cell Hybridoma. *J. Immunol.*, **155**, 4644-52.
- Mercep, M., Noguchi, P.D. & Ashwell, J.D. (1989) The cell cycle block and lysis of an activated T cell hybridoma are distinct processes with different Ca²⁺ requirements and sensitivity to Cyclosporine A. *J. Immunol.*, **142**, 4085-92.
- Miura, M., Friedlander, R.M. & Yuan, J. (1995) Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 8318-22.
- Miyashita, T., Krajewski, S., Krajewska, M., Wang, H.G., Lin, H.K., Liebermann, D.A., Hoffman, B. & Reed, J.C. (1994) Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene*, **9**, 1799-805.
- Mousli, M., Bueb, J.L., Bronner, C., Rouot, B. & Landry, Y. (1990) G protein activation: a receptor-independent mode of action for cationic amphiphilic neuropeptides and venom peptides. *Trends Pharmacol. Sci.*, **11**, 358-62.
- Muroi, K., M. Nakamura, Y. Amemiya, T. Suda and Y Miura. (1995) Expression of c-kit receptor (CD117) and CD34 in leukemic cells. [Review]. *Leukemia & Lymphoma*. **16**, 297-305.
- Noel, A., V. Borcy, M. Bracke, C. Gilles, J. Bernard, P. Birembaut, M. Mareel and J. M. Foidart. (1995) Heterotransplantation of primary and established human tumour cells in nude mice. *Anticancer Res.*, **15**, 1-7.
- Nicotera, P., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. (1994) Nuclear calcium transport and the role of calcium in apoptosis. *Cell Calcium*, **16**, 279-88.
- Nunez, G., London, L., Hockenbery, D., Alexander, M., McKearn, J.P. & Korsmeyer, S.J. (1990) Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J. Immunol.*, **144**, 3602-10.
- Oltvai, Z.N., Millman, C.L. & Korsmeyer, S.J. (1993) Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, **74**, 609-619.

- Orrenius, S., Burkitt, M.J., Kass, G.E.N., Dypbukt, J.M. & Nicotera, P. (1992) Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann. Neurol.*, **32**, S33-S42.
- Parijs, L.V., Ibraghimov, A. & Abbas, A.K. (1996) The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity*, **4**, 321-8.
- Penner, R., Fasolato, C. & Hoth, M. (1993) Calcium influx and its control by calcium release. [Review]. *Curr. Op. Neurobiol.*, **3**, 368-74.
- Petrasch, S., van, T.L., Motulsky, H.J., Brodde, O.E. & Michel, M.C. (1993) Effects of ketotifen on human lymphocytes in vitro and in vivo. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.*, **43**, 904-8.
- Povoa et al. (1991) *Journal of Internal Medicine*, **229**, 475-7.
- Rao, P. & Mufson, R.A. (1994) Human interleukin-3 stimulates a phosphatidylcholine specific phospholipase C and protein kinase C translocation. *Cancer Res.*, **54**, 777-83.
- Reed, J.C. (1994) Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.*, **124**, 1-6.
- Rhee, S.G. (1991) Inositol phospholipids-specific phospholipase C: interaction of the gamma 1 isoform with tyrosine kinase. *TIBS*, **16**, 297-301.
- Ribeiro, J.M. & Carson, D.A. (1993) $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -dependent endonuclease from human spleen: purification, properties, and role in apoptosis. *Biochem.*, **32**, 9129.
- Riccardi, V.M. (1987) Mast-cell stabilization to decrease neurofibroma growth. Preliminary experience with ketotifen. *Arch. Dermatol.*, **123**, 1011-6.
- Riccardi, V. M. (1993) A controlled multiphase trial of ketotifen to minimize neurofibroma-associated pain and itching. *Arch. Dermatol.*, **129**, 577-81.
- Rodriguez-Tarduchy, G., Prupiti, M., Lopez-Rivas, A. & Collins, M.K.L. (1992) Inhibition of apoptosis by calcium ionophores in IL-3-dependent bone marrow cells is dependent upon production of IL-4. *J. Immunol.*, **148**, 1416-1422.
- Rupp, B. J., L. E. Kahn. Monoclonal antibodies against IgE-associated determinants, hybrid cell lines producing these antibodies, and use therefor. United States Patent No. 4,940,782 issued July 10, 1990.
- Schwarze, M.M. & Hawley, R.G. (1995) Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res.*, **55**, 2262-5.
- Sentman, C.L., Shutter, J.R., Hockenbery, D., Kanagawa, O. & Korsmeyer, S.J. (1991) bcl-2 inhibits multiple forms of apoptosis but not negative selection in thymocytes. *Cell*, **67**, 879-88.
- Shibasaki, F. & McKeon, F. (1995) Calcineurin functions in Ca^{2+} -activated cell death in mammalian cells. *J. Cell. Biol.*, **131**, 735-43.
- Siitonen, T., E. R. Savolainen and P. Koistinen. (1994) Expression of the c-kit proto-oncogene in myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Leuk.* **8**, 631-7.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. **244**, 707-12.

- Smith, C.A., Williams, G.T., Kingston, R., Jenkinson, E.J. & Owen, J.J.T. (1989) Antibodies to CD3/T cell receptor complex induce apoptosis in immature T cells in thymic cultures. *Nature*, **337**, 181-4.
- Strasser, A., Harris, A.W. & Cory, S. (1991) Bcl-2 transgene inhibits T cell death and perturbs thymic self-censorship. *Cell*, **67**, 889-99.
- Strasser, A., Harris, A.W., Huang, D.C.S., Krammer, P.H. & Cory, S. (1995) Bcl-2 and Fas/APO-1 regulate distinct pathways to lymphocyte apoptosis. *EMBO J.*, **14**, 6136-47.
- Tadakuma, T., Kizaki, H., Odaka, C., Kubota, R., Ishimura, Y., Yagita, H. & Okumura, K. (1990) CD4+CD8+ thymocytes are susceptible to DNA fragmentation induced by phorbol ester, calcium ionophore and anti-CD3 antibody. *Eur. J. Immunol.*, **20**, 779-84.
- Takata, M., Homma, Y. & Kurosaki, T. (1995) Requirement of phospholipase C- γ 2 activation in surface immunoglobulin M-induced B cell apoptosis. *J. Exp. Med.*, **182**, 907-914.
- Taylor, J.D., K. V. Honn. Inhibition of tumor growth and metastasis with calcium channel blocker compounds. United States Patent No. 4,690,935, issued September 1, 1987.
- Thor, A. D., D. I. Moore, S. M. Edgerton, E. S. Kawasaki, E. Reihnsaus, H. T. Lynch, J. N. Marcus, L. Schwartz, L. C. Chen, B. H. Mayall and a. I. et. (1992) Accumulation of p53 tumor suppressor gene protein: an independent marker of prognosis in breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 845-55.
- Tsujimura, T., Furitsu, T., Morimoto, M., Isozaki, K., Nomura, S., Matsuzawa, Y., Kitamura, Y. & Kanakura, Y. (1994) Ligand-independent activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a murine mastocytoma cell line P-815 generated by a point mutation. *Blood*, **83**, 2619-26.
- Tsujimura, T., T. Furitsu, M. Morimoto, Y. Kanayama, S. Nomura, Y. Matsuzawa, Y. Kitamura and Y. Kanakura. (1995) Substitution of an aspartic acid results in constitutive activation of c-kit receptor tyrosine kinase in a rat tumor mast cell line RBL-2H3. *Int. Arch. Allergy & Immunol.* **106**, 377-85.
- Vasilakos, J.P., Ghayur, T., Carroll, R.T., Giegel, D.A., Saunders, J.M., Quintal, L., Keane, K.M. & Shivers, B.D. (1995a) IL-1 beta converting enzyme (ICE) is not required for apoptosis induced by lymphokine deprivation in an IL-2-dependent T cell line. *J. Immunol.*, **155**, 3433-42.
- Veis, D.J., Sentman, C.L., Bach, E.A. & Korsmeyer, S.J. (1993) Expression of the Bcl-2 protein in murine and human thymocytes and in peripheral T lymphocytes. *J. Immunol.*, **151**, 2546-54.
- Wang, N. P., H. To, W. H. Lee and E. Y. Lee. (1993) Tumor suppressor activity of RB and p53 genes in human breast carcinoma cells. *Oncogene*. **8**, 279-88.

(57) 청구의 범위

청구항 1

유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 Ca^{2+} 유입을 수반하는 유효량의 인자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, Ca^{2+} 유입을 수반하는 인자에 의해 자극될 수 있으며 사멸시킬 필요가 있는 포유동물 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 2

Ca^{2+} 유입을 수반하는 약제에 의해 세포 수용체의 리간드에 의해 자극되는 세포를 갖는 포유동물에 있어서, 유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 유효량의 상기 리간드를 상기 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 3

유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제 및 유효량의 약제를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 상기 약제와 결합시 세포로 칼슘 유입과 포스포리파제 C의 활성화를 초래하는 수용체를 갖는 사멸시킬 필요가 있는 포유동물 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 4

유효량의 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제 및 Ca^{2+} 유입을 수반하는 유효량의 인자를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, Ca^{2+} 유입을 수반하는 인자에 의해 자극될 수 있는 사멸시킬 필요가 있는 포유동물 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 5

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 인자가 상기 세포의 수용체에 대한 작용물질성 항체인 방법.

청구항 6

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 인자가 상기 세포의 수용체의 천연 리간드인 방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 리간드가 수용체의 천연 리간드인 방법.

청구항 8

제3항에 있어서, 상기 물질이 수용체에 대한 작용물질성 항체인 방법.

청구항 9

제3항에 있어서, 상기 물질이 수용체의 리간드인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 리간드가 수용체의 천연 리간드인 방법.

청구항 11

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 세포가 비만 세포, 단구, 대식세포, 섬유아세포, T 세포, B 세포, 호염기구 또는 암 세포인 방법.

청구항 12

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 포유동물이 증식성 질병에 걸려있는 방법.

청구항 13

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 포유동물이 암에 걸려있는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 포유동물이 유방암에 걸려있는 방법.

청구항 15

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 포유동물이 알레르기를 앓고 있는 방법.

청구항 16

제1항, 제2항, 제3항, 제4항, 제5항, 제6항, 제7항, 제8항, 제9항 또는 제10항에 있어서, 상기 포유동물이 자가면역 장애가 있는 방법.

청구항 17

제1항, 제4항, 제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 세포가 c-키트 수용체 또는 돌연변이성 c-키트 수용체, T 세포 수용체, CD3, Fc γ RII, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, G-단백질 결합된 수용체, 붐베신 수용체, 가스트린 방출 펩티드 수용체, 브라디키닌 수용체, 카르바콜 수용체, 무스카린 분자 수용체, CCK-8 수용체, 바소프레신 수용체, 뉴로키닌 수용체, P 물질 수용체, 퓨린성 분자 수용체, TGF- α 수용체, EGF 수용체, 헤레굴린 수용체, erbB1 수용체, erbB2 수용체, erbB3 수용체, erbB4 수용체, PDGF 수용체, SLF 수용체, FLT-3 리간드 수용체, 염기성 FGF 수용체, 산성 FGF 수용체, 에노텔린 수용체, NGF 수용체, VEGF 수용체 및 HGF 수용체로 구성된 군으로 부터 선택된 표면 수용체를 갖는 방법.

청구항 18

제2항, 제3항, 제7항, 제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 수용체가 c-키트 수용체 또는 돌연변이성 c-키트 수용체, T 세포 수용체, CD3, Fc γ RII, Fc γ RIII, Fc ϵ RI, G-단백질 결합된 수용체, 붐베신 수용체, 가스트린 방출 펩티드 수용체, 브라디키닌 수용체, 카르바콜 수용체, 무스카린 분자 수용체, CCK-8 수용체, 바소프레신 수용체, 뉴로키닌 수용체, P 물질 수용체, 퓨린성 분자 수용체, TGF- α 수용체, EGF 수용체, 헤레굴린 수용체, erbB1 수용체, erbB2 수용체, erbB3 수용체, erbB4 수용체, PDGF 수용체, SLF 수용체, FLT-3 리간드 수용체, 염기성 FGF 수용체, 산성 FGF 수용체, 에노텔린 수용체, NGF 수용체, VEGF 수용체 및 HGF 수용체로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 19

제1항 또는 제항에 있어서, 상기 인자가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디하이드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 20

제2항에 있어서, 상기 인자가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수

용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 21

제2항에 있어서, 상기 리간드가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 22

제3항에 있어서, 상기 물질이 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 23

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역세포이고 항체를 포함하며 또 상기 인자는 상기 항체에 대한 항원인 방법.

청구항 24

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역세포이고 IgE는 상기 면역세포에 결합되며 또 상기 인자는 IgE에 대한 작용물질인 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 세포가 IgE 수용체를 포함하고 또 상기 인자는 상기 수용체에 대한 항체인 방법.

청구항 26

제2항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역 세포이고 항체를 포함하며 또 상기 리간드가 상기 항체에 대한 항원인 방법.

청구항 27

제2항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역세포이고, IgE는 상기 면역세포에 결합되며 또 상기 리간드는 IgE에 대한 작용물질인 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 세포가 IgE 수용체를 포함하고 또 상기 리간드는 상기 수용체에 대한 항체인 방법.

청구항 29

제3항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역세포이고 항체를 포함하며 또 상기 물질은 항체에 대한 항원인 방법.

청구항 30

제3항에 있어서, 상기 세포가 기능항진성 면역세포이고, IgE가 상기 면역세포에 결합되며 또 상기 약제는 IgE에 대한 작용물질인 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 세포가 IgE 수용체를 포함하고 또 상기 약제는 상기 수용체에 대한 항체인 방법.

청구항 32

제24항, 제27항 또는 제30항에 있어서, 상기 세포가 호염기구인 방법.

청구항 33

제24항, 제27항 또는 제30항에 있어서, 상기 세포가 비만 세포인 방법.

청구항 34

제1항, 제4항, 제5항, 제6항, 제17항, 제23항, 제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 Ca²⁺ 유입 차단제 및 상기 인자가 별도로 투여되는 방법.

청구항 35

제2항, 제7항, 제18항, 제20항, 제21항, 제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 및 상기 리간드가 별도로 투여되는 방법.

청구항 36

제3항, 제8항, 제9항, 제22항, 제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 및 상기 리간드가 별도로 투여되는 방법.

청구항 37

제1항, 제4항, 제5항, 제6항, 제17항, 제23항, 제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 상기 인자 전에 투여되는 방법.

청구항 38

제2항, 제7항, 제18항, 제20항, 제21항, 제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 상기 리간드 전에 투여되는 방법.

청구항 39

제3항, 제8항, 제9항, 제22항, 제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 상기 억제 전에 투여되는 방법.

청구항 40

제1항, 제4항, 제5항, 제6항, 제17항, 제23항, 제24항 또는 제25항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 및 상기 인자가 단일 단계로 투여되는 방법.

청구항 41

제2항, 제7항, 제18항, 제20항, 제21항, 제26항 또는 제27항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 및 상기 리간드가 단일 단계로 투여되는 방법.

청구항 42

제3항, 제8항, 제9항, 제22항, 제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 및 상기 억제제가 단일 단계로 투여되는 방법.

청구항 43

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 상기 인자에 의한 세포의 자극이 통상 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 방법.

청구항 44

제2항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 리간드가 수용체에 결합하여 통상 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 방법.

청구항 45

제3항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 상기 억제제의 결합이 통상 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 방법.

청구항 46

제1항, 제2항, 제3항 또는 제4항에 있어서, 상기 세포는 c-Kit 수용체를 발현하고 이때 방법은 유효량의 c-Kit 리간드를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는 방법.

청구항 47

제1항, 제2항, 제3항, 제4항 또는 제46항에 있어서, 상기 포유동물이 백혈병, 종양 성장 또는 폐암에 걸린 사람인 방법.

청구항 48

제3항에 있어서, 상기 인자는 상기 세포의 수용체에 결합되고 이러한 결합에 의해 세포의 증식을 유발하는 성장인자인 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 포유동물이 암 또는 과형성증에 걸려있는 방법.

청구항 50

제3항에 있어서, 상기 인자가 단백질인 방법.

청구항 51

제3항에 있어서, 상기 인자가 상기 세포의 수용체에 결합되며, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하의 이러한 결합에 의해 세포의 수명을 증가시키는 생존 인자인 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 상기 세포가 조혈 전구세포인 방법.

청구항 53

제3항에 있어서, 상기 인자가 상기 세포의 수용체에 결합되고, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하의 이러한 결합에 의해 세포의 활성화를 유발하는 활성 인자인 방법.

청구항 54

제1항 내지 제53항중 어느 하나에 있어서, 상기 포유동물이 사람인 방법.

청구항 55

제1항 내지 제54항중 어느 하나에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 Ni^{2+} , 케토티펜, 에코나졸, 테니렘, CAI, Cd^{2+} , Co^{2+} , La^{3+} , Mn^{2+} , SKF-96365 및 크로몰린 또는 이들의 결합물로 부터 선택되는 방법.

청구항 56

유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 사멸시킬 필요가 있는 포유동물의 구성적인 활성화 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 활성화는 불활성화 상태일 때 상기 세포에서의 Ca^{2+} 농도 이상의 Ca^{2+} 농도를 초래하는 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 상기 구성적 활성화가 돌연변이성 c-Kit 수용체의 존재 결과인 방법.

청구항 59

제58항에 있어서, 상기 포유동물이 비만세포증에 걸린 사람인 방법.

청구항 60

유효량의 Ca^{2+} 유입 차단제를 포유동물에 투여하는 것을 포함하는, 오토크린(autocrine) 자극되는 사멸시킬 필요가 있는 포유동물 세포의 사멸을 유발하는 방법.

청구항 61

제56항, 제57항, 제58항, 제59항 또는 제60항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 Ni^{2+} 인 방법.

청구항 62

Ca^{2+} 유입 차단제 및 세포로 Ca^{2+} 유입을 유발하기 위해 상기 세포의 수용체에 정상적으로 결합되는 인자를 포함하는, 세포 성장을 억제하기 위해 항증식제로서 포유동물에 투여하기 위한 약제 조성물.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 정상적으로 결합되어 포스포리파제 C의 활성화를 초래하는 조성물.

청구항 64

제62항 또는 제63항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제인 조성물.

청구항 65

제62항, 제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 대한 작용물질성 항체인 조성물.

청구항 66

제62항, 제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 인자가 수용체의 천연 리간드인 조성물.

청구항 67

제62항, 제63항 또는 제64항에 있어서, 상기 인자가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B,

FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 조성물.

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 인자가 SLF인 조성물.

청구항 69

제62항에 있어서, 상기 인자가 면역세포의 표면 항체의 항원인 조성물.

청구항 70

제62항에 있어서, 상기 인자가 IgE에 대한 작용물질인 조성물.

청구항 71

제62항에 있어서, 상기 인자가 Ca²⁺ 유입 차단제 부재하에서 수용체에 정상적으로 결합하여 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 조성물.

청구항 72

Ca²⁺ 유입 차단제 및 세포로 Ca²⁺ 유입을 유발하기 위하여 상기 세포의 수용체에 정상적으로 결합되는 인자를 포함하는, 포유동물에서 세포 성장을 억제하기 위한 약제 조성물의 키트.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 정상적으로 결합하여 포스포리파제 C의 활성화를 초래하는 조성물.

청구항 74

제72항 또는 제73항에 있어서, 상기 Ca²⁺ 유입 차단제가 비전압 게이팅 Ca²⁺ 유입 차단제인 조성물.

청구항 75

제72항, 제73항 또는 제74항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 대한 작용물질성 항체인 조성물.

청구항 76

제72항, 제73항 또는 제74항에 있어서, 상기 인자가 수용체의 천연 리간드인 조성물.

청구항 77

제72항, 제73항 또는 제74항에 있어서, 상기 인자가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노텔린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 붐베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 조성물.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 인자가 SLF인 조성물.

청구항 79

제72항에 있어서, 상기 인자가 면역세포의 표면항체의 항원인 조성물.

청구항 80

제72항에 있어서, 상기 인자가 IgE에 대한 작용물질인 조성물.

청구항 81

제72항에 있어서, 상기 인자가 Ca²⁺ 유입 차단제 부재하에서 수용체에 정상적으로 결합하여 상기 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 조성물.

청구항 82

제62항, 제63항, 제64항, 제65항, 제66항, 제67항, 제68항 또는 제71항에 따른 약제 조성물의 항증식제로서 용도.

청구항 83

제62항, 제63항, 제64항, 제65항, 제66항, 제67항, 제68항 또는 제71항에 따른 약제 조성물의 항염증제로

서 용도.

청구항 84

제72항, 제73항, 제74항, 제75항, 제76항, 제77항, 제78항 또는 제81항에 따른 키트 성분의 항증식제로서 용도.

청구항 85

제72항, 제73항, 제74항, 제75항, 제76항, 제77항, 제78항 또는 제81항에 따른 키트 성분의 항염증제로서 용도.

청구항 86

세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 세포로 Ca^{2+} 유입을 유발하기 위해 세포의 수용체에 정상적으로 결합되는 인자의 용도.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 정상적으로 결합하여 포스포리파제 C의 활성화를 초래하는 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 88

제86항 또는 제87항에 있어서, 상기 Ca^{2+} 유입 차단제가 비전압 게이팅 Ca^{2+} 유입 차단제인 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 89

제86항, 제87항 또는 제88항에 있어서, 상기 인자가 수용체에 대한 작용물질성 항체인 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 90

제86항, 제87항 또는 제88항에 있어서, 상기 인자가 수용체의 천연 리간드인 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 91

제86항, 제87항 또는 제88항에 있어서, 상기 인자가 SLF, TGF- α , EGF, 헤레굴린, erbB1에 대한 작용물질, erbB2에 대한 작용물질, erbB3에 대한 작용물질, erbB4에 대한 작용물질, PDGF A, PDGF B, FLT-3 리간드, 염기성 FGF, 산성 FGF, 에노탈린, NGF, VEGF, HGF, TCR에 대한 작용물질, CD3 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RII 수용체에 대한 작용물질, Fc γ RIII 수용체에 대한 작용물질, Fc ϵ RI 수용체에 대한 작용물질, G-단백질 결합된 수용체의 작용물질, 봄베신, 가스트린, 가스트린 방출 펩티드, 브라디키닌, 카르바콜, 무스카린성 수용체 작용물질, CCK-8, 바소프레신, 뉴로키닌, P 물질, 퓨린성 수용체 작용물질, ATP, 아데노신 및 1,25-디히드록시비타민 D₃ 및 이들의 결합물로 구성된 군으로 부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 인자가 SLF인 것을 특징으로 하는, 세포의 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 93

제86항에 있어서, 상기 인자가 면역세포의 표면 항체의 항원인 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 94

제86항에 있어서, 상기 인자가 IgE에 대한 작용물질인 것을 특징으로 하는, 세포 성장을 억제하기 위한 물질로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 95

제86항에 있어서, 상기 인자가 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 수용체에 정상적으로 결합하여 세포의 성장, 생존 및/또는 활성화를 증진시키는 것을 특징으로 하는, 항증식제로 사용하기 위한 약물의 제조에 있어서 Ca^{2+} 유입 차단제 및 인자의 용도.

청구항 96

조직 샘플이 정상 조직과 비교하여 상승된 PLC 활성 정도를 갖는지를 분석하는 것을 포함하며, 활성화된 PLC의 상승 정도는 세포가 상기 처리되기 쉽다는 것을 나타내는 것을 특징으로 하는, 병든 포유동물 세포가 Ca^{2+} 유입 차단제, 또는 세포의 수용체를 더욱 활성화시키는 인자와 차단제에 처리되는 용이도를 진단하는 방법.

청구항 97

제96항에 있어서, 병든 조직의 샘플을 수득하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 98

제96항 또는 제97항에 있어서, 샘플을 분석하는 단계가 소정량의 상기 조직으로 부터 수득한 PLC 존재하에서 반응하는 PLC 물질의 양을 조정하는 것을 포함하는 방법.

청구항 99

제98항에 있어서, 효소 결합된 면역흡착 분석법에 의해 소정량의 상기 조직으로 부터 PLC를 분리하는 것을 더 포함하는 방법.

청구항 100

제98항 또는 제99항에 있어서, 상기 PLC 물질이 [^3H]-PIP₂인 방법.

청구항 101

Ca^{2+} 가 세포로 유입되는 것을 증진시키는 활성화된 수용체를 갖는 제1군 세포를 Ca^{2+} 유입 차단제 존재하에서 배양하고;

Ca^{2+} 가 세포로 유입되는 것을 증진시키는 활성화된 수용체를 갖지 않는 제2군 세포를 Ca^{2+} 유입 차단제 존재하에서 배양하며;

제1군 세포의 성장이 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 제1군 세포의 성장에 상응하는 소정의 제1 수준 보다 낮은지 여부를 확인하고; 또

제2군 세포의 성장이 Ca^{2+} 유입 차단제 부재하에서 제2군 세포의 성장에 상응하는 소정의 제2 수준과 실질적으로 동일한지 여부를 확인하는 단계를 포함하며;

제1 소정 수준 보다 낮은 제1군의 성장과 제2 소정 수준과 실질적으로 동일한 제2군의 성장은 Ca^{2+} 유입 차단제가 Ca^{2+} 차단제임을 나타내는 것을 특징으로 하는 Ca^{2+} 유입 차단제 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 제1군 세포의 수용체가 구성적으로 활성화되는 방법.

청구항 103

제101항에 있어서, 상기 제1군 세포의 수용체가 오토크린 자극되는 방법.

청구항 104

제101항에 있어서, 제1군 세포의 수용체가 외인성 물질에 의해 활성화되는 방법.

청구항 105

제104항에 있어서, 상기 물질이 제1군 세포의 수용체의 천연 리간드인 방법.

청구항 106

제101항, 제104항 또는 제105항에 있어서, 제1군 세포의 수용체 및 제2군 세포의 수용체가 동일 수용체인 방법.

청구항 107

제101항, 제104항, 제105항 또는 제106항에 있어서, 상기 수용체가 c-키트 수용체, EGF 수용체 및 FGF 수용체로 구성된 군으로 부터 선택되는 방법.

청구항 108

제101항, 제102항, 제103항, 제104항, 제105항, 제106항 또는 제107항에 있어서, 상기 제1군 세포 및 제2군 세포가 사람의 세포인 방법.

청구항 109

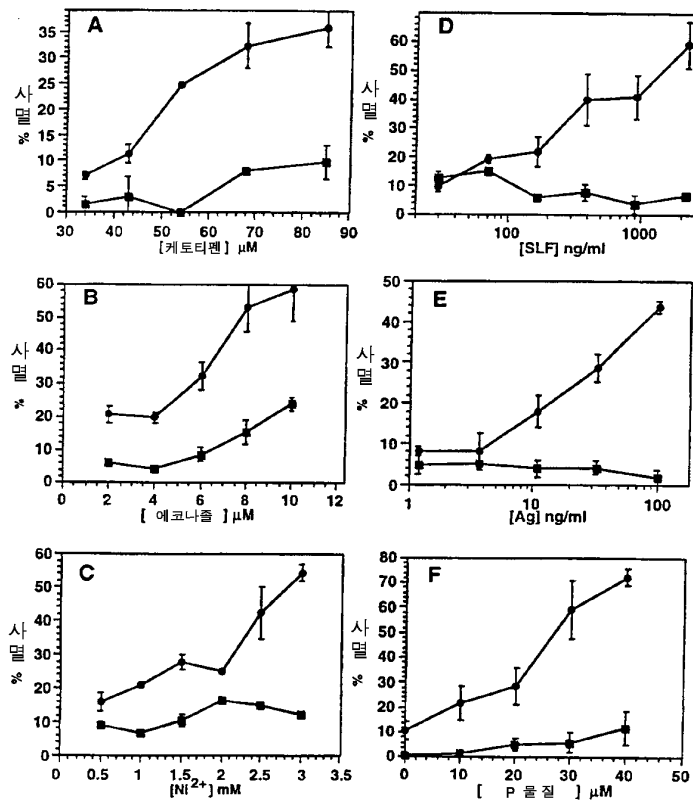
제101항, 제102항, 제103항, 제104항, 제105항, 제106항 또는 제108항에 있어서, 제1군 세포가 비만 세포이고, 제2군 세포가 비만 세포이며, 수용체가 c-키트 수용체이며 또 제1군 세포가 SLF 존재하에서 배양되는 방법.

청구항 110

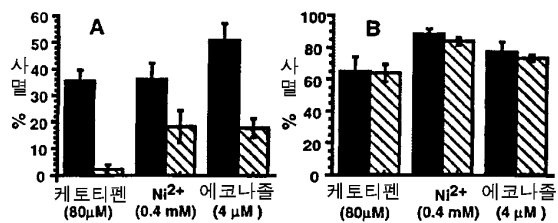
제101항에 있어서, 상기 제1군 세포를 제1군 세포의 상기 수용체로 형질감염시키는 방법.

도면

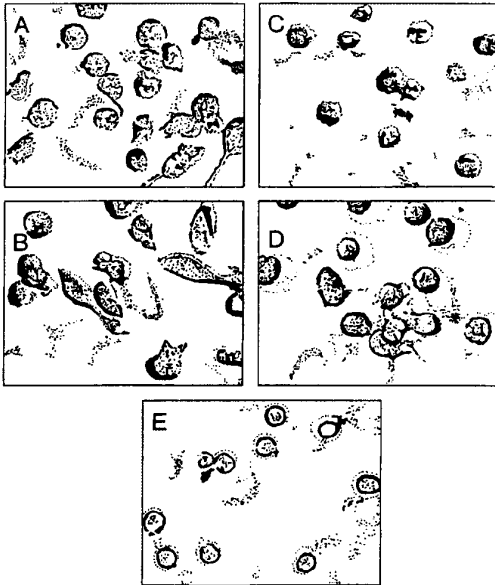
도면1



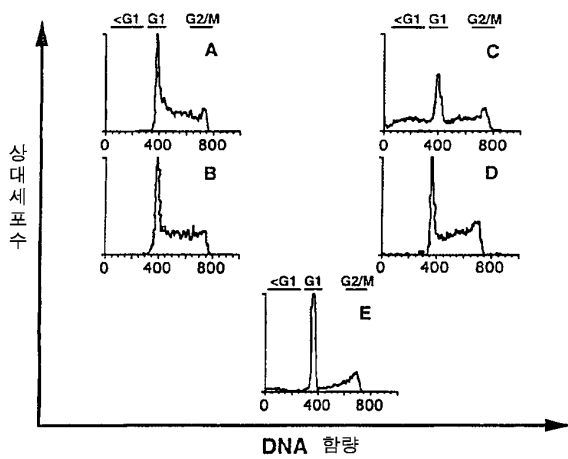
도면2



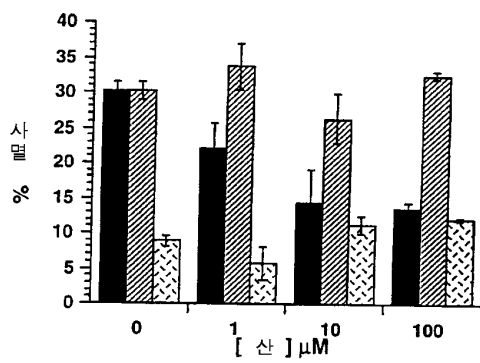
도면3



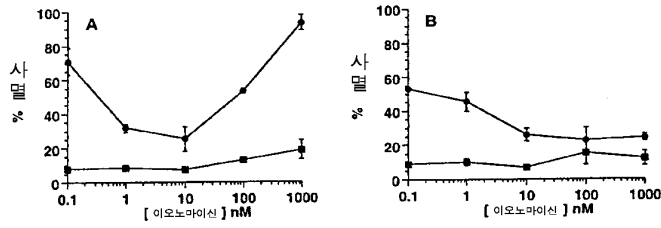
도면4



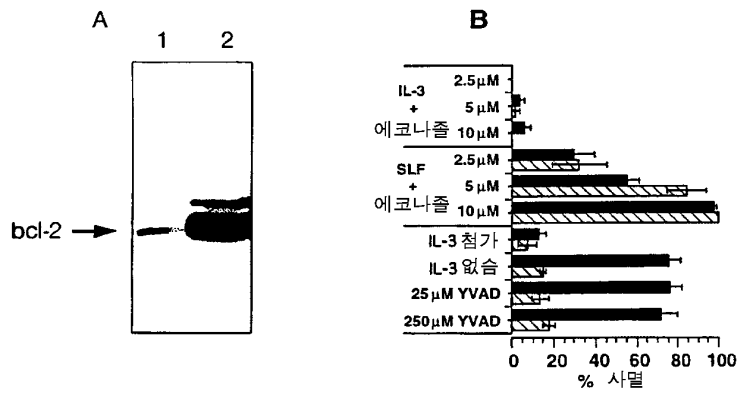
도면5



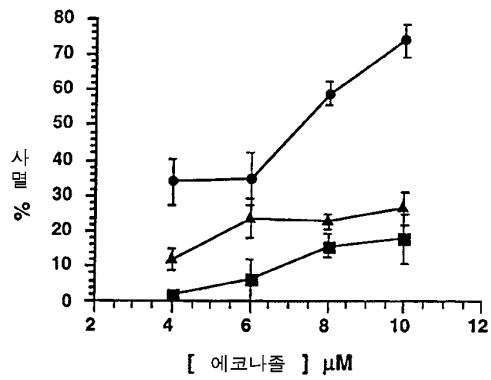
도면6



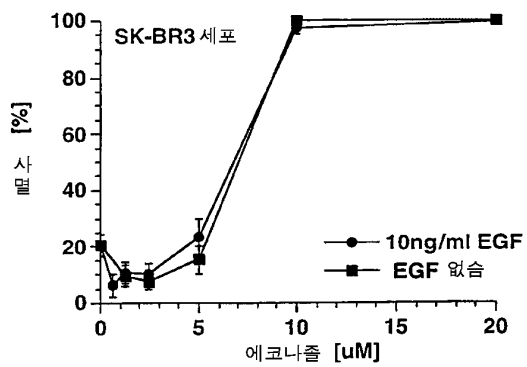
도면7



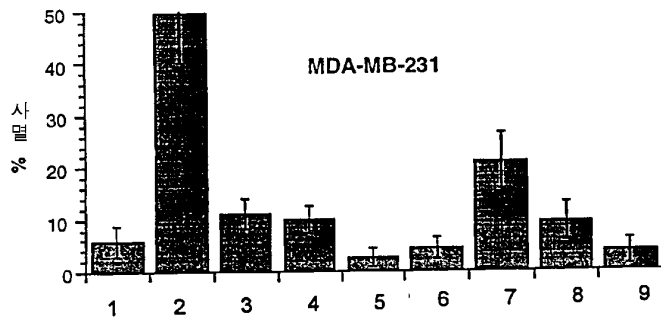
도면8



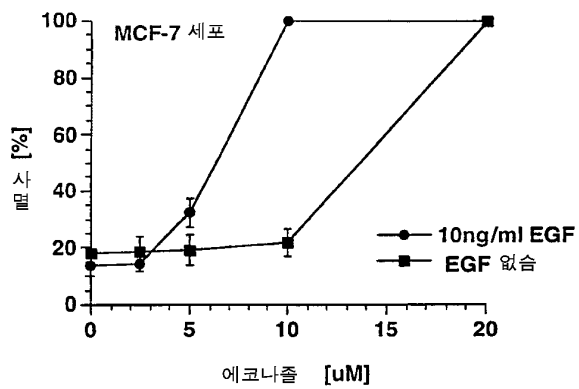
도면9A



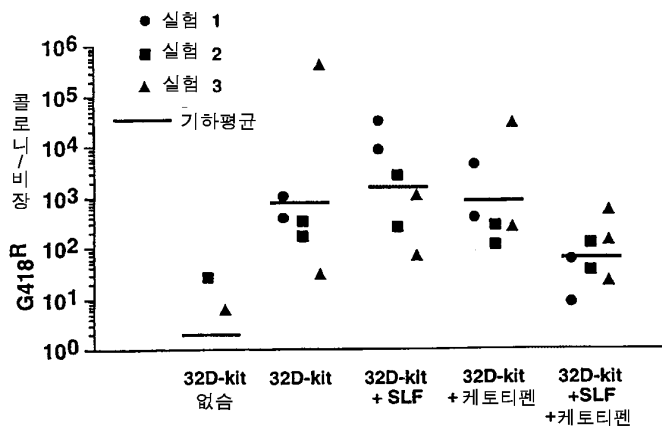
도면98



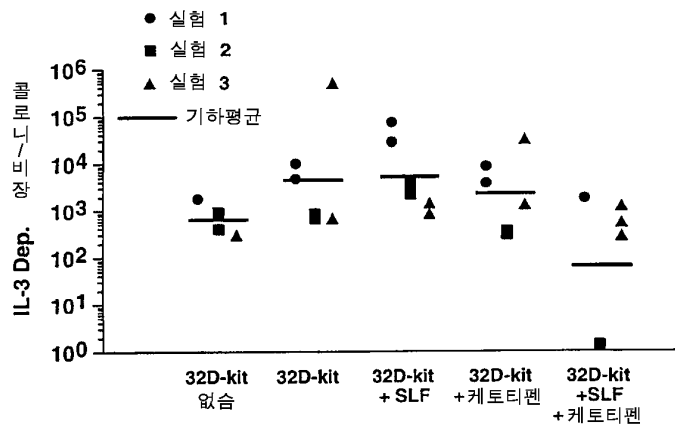
도면10



도면11A



도면118



도면12

