

### Zastosowanie 2-metoksyestradiolu w leczeniu mastocytozy

5           Przedmiotem wynalazku jest zastosowanie 2-metoksyestradiolu w leczeniu mastocytozy.

Mastocyza jest heterogenną grupą chorób związanych z patologiczną akumulacją mastocytów (mast cells, dalej jako MC lub MCs) w różnych narządach, najczęściej w szpiku kostnym i skórze. Zasadniczą molekularną przyczyną choroby jest 10 somatyczna mutacja pD816V genu *c-KIT* kodującego błonowy receptor dla czynnika wzrostu komórek pnia (stem cells factor, dalej jako SCF). Mutacja ta uniezależnia aktywację MC od SCF oraz czyni je nadwrażliwymi na działanie czynników stymulujących i wpływa na obniżenie procesu ich apoptozy. Mutację pD816V obserwuje się u ponad 90% pacjentów dorosłych chorujących na 15 układową postać mastocytozy oraz u około 50% chorych dzieci.

Nowotworowe MCs, naciekające tkanki w przebiegu tej choroby wykazują atypową morfologię i zmieniony immunofenotyp (obecność na powierzchni antygenów CD4 i CD25), które to cechy są istotnymi kryteriami diagnostycznymi. Mastocytoza charakteryzuje się szerokim spektrum postaci klinicznych, 20 związanych z uwalnianiem przez MC mediatorów reakcji zapalnych, enzymów proteolitycznych degradujących tkanki, czynników wzrostu, cytokin i chemokin [1–3]. Do objawów skórnych zaliczamy plamisto-grudkową osutkę z typowym dla tej choroby objawem Dariera, świąd oraz występowanie pęcherzy. Mastocytoza jest także związana z ryzykiem wystąpienia anafilaksji, osteoporozy oraz objawów 25 agresywnych związanych z upośledzeniem funkcji narządów wewnętrznych [4–6].

W dotychczasowych zgłoszeniach patentowych opisano różne sposoby hamowania aktywności komórek tłuszczowych (mastocytów) oraz leczenia chorób wywołanych ich aktywacją, jednak żaden z nich nie dotyczy działania pochodnych hormonów sterydowych na te komórki.

30           W międzynarodowym zgłoszeniu wynalazku WO2014188423A1 ujawniono sposoby hamowania aktywacji komórki tłuszczowej i / lub leczenia choroby wywołanej

- 5 poprzez wpływ na kontaktowanie się rakowej komórki tucznej ze skuteczną ilością wielowartościowego związku, który wiąże i aktywuje białko błonowe - lektynę Siglec-7 (Sialic acid-binding Ig-like lectin 7), hamując w ten sposób aktywację rakowej komórki tucznej.

W patencie PL201879B wykazano, że hybrydowe białko, które wiąże się z  
10 komórkami tuczными i/lub granulocytami zasadochłonnymi i/lub jest wchłaniane przez te komórki oraz z proteazy, która rozszczepia białka aparatu wydzielniczego komórek tucznych lub granulocytów zasadochłonných. Białko hybrydowe składa się z IgE lub jego fragmentu Fc albo przeciwciała przeciwko receptorowi IgE komórek tucznych i/lub granulocytów zasadochłonných oraz nieaktywnego ale  
15 wiążącego peptyd MCD oraz proteazy. Białko według zgłoszenia patentowego może być zastosowane do wytwarzania leku do hamowania degranulacji komórek tucznych.

W patencie EP1410802B1 ujawniono białko fuzyjne hamujące wzrost mastocytów i indukujące ich apoptozę. Białko fuzyjne zawiera domenę transdukcji  
20 białka (PTD) i wariant czynnika, transkrypcyjnego MITF związanego z mikroftalnią (MITF- Microphthalmia-associated transcription factor). Zmniejszenie liczby mastocytów potwierdzano obniżeniem ilości histaminy i zmniejszeniem aktywności enzymu MC, chymazy.

W patencie EP95909451B1 opisano nowy lek blokujący aktywność  
25 mastocytów będący heterocyklicznym antagonistą receptora H1 histaminy. Preparat ten może mieć potencjalne zastosowanie w wywołanych chorobach wywołanych degranulacją mastocytów jak zespół jelita nadwrażliwego, migrena brzuszna, alergia pokarmowa i innych chorobach związanych z aktywacją mastocytów

30 Niewyjaśnionym dotychczas zagadnieniem, dotyczącym patogenezy mastocytozy jest obserwacja kliniczna regresji, niekiedy całkowitej, zwłaszcza w okresie pokwitania, u większości chorujących dzieci. Natomiast u dorosłych

5 pacjentów, u których choroba ma charakter przewlekły w części przypadków przechodzi w postać agresywną (agressive systemic mastocytosis - ASM).

Choć obserwowana u dzieci w okresie około pokwitaniowym tendencja do spontanicznej regresji choroby mogłaby sugerować wpływ działania hormonów płciowych, jednak dotychczas żaden zespół badawczy nie wykazał i nie udowodnił  
10 tego jaki hormon potencjalnie wpływa na ten proces.

We wczesnych etapach badań nad patogenezą mastocytozy był brak odpowiednich modeli komórkowych choroby *in vitro*.

Rozwiązaniem tego problemu było wyizolowanie od pacjenta z białaczką mastocytarną dwóch długowiecznych linii ludzkich MC : linii HMC 1.1 i HMC 1.2  
15 oraz doświadczalne wyprowadzenie dwóch linii komórkowych ROSA. Linie ROSA uzyskano po transformacji MC izolowanych z krwi pępowinowej przy pomocy lentiwirusa zawierającym w genomie mutację KIT p.D816V. Linie te pozwoliły na efektywne poszukiwanie kandydatów leków do leczenia i monitorowania stanów chorobowych takich jak alergia, stan zapalny, choroba autoimmunologiczna czy  
20 mastocytoza.

### Charakterystyka linii HMC i ROSA

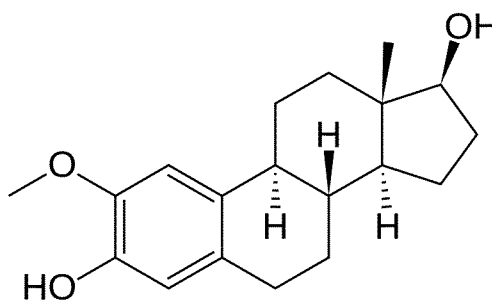
Linie **HMC** różnią się występowaniem odmiennych mutacji genu KIT. Linia HMC-1.1 ma w komórkach mutację *KIT* p.V560G, natomiast linia HMC-1.2 charakteryzuje się obecnością dwóch mutacji genu *KIT*: p.V560G i p.D816V.

25 Linia **ROSA** *KIT* pD816V ma mutację p.D816V, natomiast linia ROSA *KIT* WT nie posiada mutacji genu KIT [21–23]. Dodatkowo, informacje na temat linii ROSA ujawniono w patencie EP2773749B oraz linie komórek zdeponowano w CNCM (Francuskiej Narodowej Kolekcji Kultur Mikroorganizmów) w dniu 02/11/2011 pod numerami: CNCM- 1-4551 ROSA-KIT WT; CNCM-1-4552 ROSA KIT D816V; CNCM  
30 1-4553 ROSA KIT Delta 417-419 insY .

5 Twórcy wynalazku przeprowadzili szereg prac badawczych mających na celu opracowanie skutecznej terapii mastocytozy w oparciu o preparaty hormonalne, z wykorzystaniem opisanych powyżej linii komórkowych. Nieoczekiwanie okazało się, że jeden z żeńskich hormonów płciowych jest obiecującym kandydatem do zastosowania jako lek do terapii mastocytozy.

10 Przedmiotem wynalazku jest 2-metoksyestradiol do zastosowania w leczeniu mastocytozy, zwłaszcza jej postaci skórnej i/lub postaci układowej.

2-metoksyestradiol do zastosowania według wynalazku jest środkiem działającym selektywnie cytotoksycznie wobec mastocytów nowotworowych z mutacją genu KIT.



15

2-metoksyestradiol (dalej jako 2-ME) jest związkiem występującym fizjologicznie, jest to metabolit  $17\beta$ -estradiolu (E2), który należy do estrogenów, żeńskich hormonów płciowych [8]. Dodatkowo, wykazano, że 2-ME jest skutecznym środkiem przeciwnowotworowym [9].

20 2-ME, dostępny pod nazwą handlową Panzem, znajduje się w zaawansowanych fazach badań klinicznych dotyczących leczenia licznych nowotworów złośliwych, w tym jelita grubego, piersi, płuc lub kostniakomięsaka [10–13].

Molekularny mechanizm działania 2-ME nie jest jeszcze do końca poznany, jednak wiadomo, że generuje on reaktywne formy tlenu i azotu prowadząc do stresu  
25 nitro-oksydacyjnego wywołującego apoptozę komórek [8].

- 5 Do najważniejszych mechanizmów przeciw proliferacyjnym zalicza się hamowanie dynamiki tworzenia mikrotubul, hamowanie neoangiogenezy oraz regulacja zewnętrznych i wewnętrznych szlaków apoptotycznych [14].

Wykazano, że 2-ME selektywnie indukuje neuronalną syntazę tlenku azotu (nNOS) w linii komórkowej kostniakomięsaka 143B w stężeniach farmakologicznych oraz  
10 fizjologicznych. 2-ME zwiększa lokalizację nNOS w jądrze komórkowym powodując uszkodzenie DNA stresem nitro-oksydacyjnym, co następnie powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego i apoptozę komórek kostniakomięsaka [15–20].

Indukcja nNOS w stężeniach fizjologicznych sugeruje hipotezę, że 2-ME w ludzkim organizmie, nie jest tylko metabolitem aktywnej cząsteczki, ale także samodzielnie  
15 działającym hormonem [16].

W toku przeprowadzonych prac badawczych zaobserwowano, że 2-ME jest selektywnie cytotoksyczny wobec MC nowotworowych, i to tych które miały mutacje genu *KIT* (linie HMC 1.1, HMC 1.2, ROSA KIT D816V), natomiast nie wykazywał tej aktywności w stosunku do prawidłowych MC (linia ROSA KIT WT).

20 Wykazano, że zastosowanie 2-ME w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  przez 48 godzin ogranicza żywotność komórek linii **HMC 1.1** (z mutacją p.V560G) do 71%, podczas, gdy przy stężeniu 2-ME na poziomie 5  $\mu\text{M}$  żywotność komórek spadała do 63%, a przy stężeniu 10  $\mu\text{M}$  2-ME do 67%. W przypadku dla linii komórek **HMC 1.2** (z mutacjami p.V560G i p. D816V) liczba żywych komórek po potraktowaniu 2-ME  
25 przez 48 godzin spadała do poziomów odpowiednio: do 78% dla stężenia 2-ME wynoszącego 1  $\mu\text{M}$ , dla stężenia 5  $\mu\text{M}$  do 76%, natomiast dla stężenia 10  $\mu\text{M}$  do 70%.

W przypadku badań prowadzonych na liniach komórkowych ROSA, efekty spadku żywotności mastocytów pod wpływem 2-ME okazały się być jeszcze  
30 bardziej spektakularne. Linia ROSA KIT D816V (z mutacją p. *KIT* D816V) okazała się być najbardziej podatna na 2-ME, gdyż po potraktowaniu tych komórek 2-ME w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  ich żywotność obniżyła się aż do 56%. Po użyciu wyższych stężeń: 5 i 10  $\mu\text{M}$  liczba żywych komórek spadała odpowiednio do 55% i 51%. W przypadku

- 5 linii ROSA KIT WT (bez mutacji genu *KIT*), przy stężeniu 2-ME 1  $\mu$ M wzrost komórek zahamowany został tylko o 5%, a przy stężeniu 5  $\mu$ M o 12%, natomiast przy stężeniu 10  $\mu$ M odpowiednio o 14%.

Uzyskane wyniki badań mają doniosłe znaczenie dla zrozumienia patogenezy mastocytozy, zwłaszcza u dzieci oraz tłumaczą zjawisko regresji choroby w okresie pokwitania jak również wskazują na potencjalną możliwość opracowania nowych terapii choroby skóry i choroby układowej z zastosowaniem 2-ME.

15 Wyniki badań wskazują także, że linie komórkowe ROSA KIT D816V oraz ROSA KIT WT stanowią bardzo dobre modele do badania wpływu środków aktywnych na mastocyty.

Przedmiot wynalazku uwidoczony jest na figurze rysunku, na której **Fig. 1.** przedstawia wyniki wpływu działania różnych stężeń 2-ME (2-metoksyestradiolu) przez 48 godzin na żywotność komórek linii HMC 1.1, HMC 1.2, ROSA KIT D816V, 20 ROSA KIT WT. oraz komórek kontrolnych.

Przykład realizacji wynalazku przedstawiono w poniżej.

### Przykład 1

25 Do badań użyto cztery linie komórkowe mastocytów:

- HMC-1.1 z mutacją genu *KIT* pV560G;
- HMC-1.2 z mutacjami genu *KIT* pG560V oraz pD816V,
- ROSA KIT D816V z mutacją *KIT* pD816V;
- ROSA KIT WT -linia bez mutacji *KIT* [21–23].

30 Linie HMC otrzymano pozyskano z Department of Allergic Diseases. Mayo Clinic. Rochester. MN, USA

Linie ROSAKIT pozyskano z Centre National de la Recherche Scientifique 3 (Francja), które są zdeponowane w CNCM (Francuskiej Narodowej Kolekcji Kultur

- 5 Mikroorganizmów) od dnia 02/11/2011 pod numerami: CNCM- 1-4551 ROSA-KIT WT; CNCM-1-4552 ROSA KIT D816V.

#### Warunki hodowli dla linii HMC

- Hodowlę prowadzono w inkubatorze komórkowym o temperaturze 37 °C i 5% CO<sub>2</sub>, w warunkach jałowych w komorze z laminarnym przepływem jałowego powietrza.
- 10 Zastosowano pożywkę Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Merck Millipore) suplementowaną 1,2 mM α-tioglicerolu, 50 mL Foetal Bovine Serum (ATCC), oraz 5 mL antybiotyków (PEN./STREP. 100x, Merck Millipore)

#### Warunki hodowli dla linii ROSA KIT

- Hodowlę prowadzono w inkubatorze komórkowym o temperaturze 37 °C i w atmosferze 5% CO<sub>2</sub>. Prace laboratoryjne prowadzono w warunkach jałowych w komorze z laminarnym przepływem jałowego powietrza. Do hodowli zastosowano pożywkę Iscove's Modified Dulbecco's Medium (Merck Millipore) z dodatkiem 50 mL Foetal Bovine Serum (ATCC), oraz 5 mL antybiotyków (PEN./STREP. 100x, Merck Millipore), natomiast dla ROSA KIT WT stosowana pożywka była dodatkowo
- 15
- 20 suplementowana czynnikiem wzrostu komórek macierzystych szpiku rhSCF (R&D Systems, Minneapolis, USA) w końcowym stężeniu 80 ng/ml.

#### Procedura

- Komórki hodowano przez 48 godzin na 96-dołkowej płytce, odpowiednio w stężeniach dla linii HMC 1.1. i HMC 1.2  $5 \times 10^4$  komórek na dołek, oraz dla linii
- 25 ROSA KIT D816V i ROSA KIT WT po  $7,5 \times 10^4$  komórek na dołek.

- Przed wykonaniem doświadczeń, przygotowano roztwór roboczy 2-metoksy-estradolu poprzez rozpuszczenie 5 mg 2-ME (Sigma-Aldrich, USA) w 500 μL jałowego DMSO (dimetylosulfotlenek), tak, aby jego końcowe stężenie wynosiło 33 mM. Następnie roztwór roboczy 2-ME rozcieńczano w 100 μL DMSO, tak aby
- 30 uzyskać końcowe stężenia roztworów, odpowiednio 1, 5, i 10 w 100 μL DMSO.

Kontrolę stanowiły komórki potraktowane odpowiednimi objętościami DMSO bez dodatku 2-ME.

- Po 48 godzinach inkubacji, do każdego dołka zostało dodane 50 μL roztworu XTT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Niemcy), przygotowany według zaleceń producenta. Po 4 godzinach inkubacji komórek z XTT odczytano poziom
- 35 absorbancji za pomocą czytnika Cytation 3 Imaging Reader (BioTek, USA) przy długości fali 560 nm.

5 Wyniki przedstawiono na Fig.1.

Po stosowaniu przez 48 godzin 2-ME w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  na linię HMC 1.1, proliferacja komórek została zahamowana w 29%. W przypadku stężenia 5  $\mu\text{M}$  żywotność komórek spadała do 67%, a przy 10  $\mu\text{M}$  do 63%.

10 Liczba żywych komórek linii HMC 1.2. po potraktowaniu 2-ME w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  zmalała do 78%, zaś przy zastosowaniu 5  $\mu\text{M}$  spadła o 24%, a przy 10  $\mu\text{M}$  o 30%.

Linia ROSA KIT D816V okazała się być najbardziej podatna na 2-ME, gdyż po potraktowaniu tych komórek 2-ME w stężeniu 1  $\mu\text{M}$  ich żywotność obniżyła się do 56%. Po użyciu wyższych stężeń 5 i 10  $\mu\text{M}$  liczba żywych komórek spadła odpowiednio do 55% i 51%.

15 W przypadku linii ROSA KIT WT 1  $\mu\text{M}$  2-ME zahamował wzrost komórek tylko o 5%, 5  $\mu\text{M}$  w 12%, natomiast 10  $\mu\text{M}$  w 14%.

*Iwona Płodzich-Hennig*  
rzecznik patentowy

**BIBLIOGRAFIA**

1. Nedoszytko B., Sokołowska-Wojdyło M., Ruckemann-Dziurdzińska K., Roszkiewicz J., Nowicki RJ. Chemokines and cytokines network in the pathogenesis of the inflammatory skin diseases: Atopic dermatitis, psoriasis and skin mastocytosis. Vol. 31, *Postepy Dermatologii i Alergologii*. Termedia Publishing House Ltd.; **2014**. p. 84–91.
2. Broesby-Olsen S., Oropeza AR., Bindslev-Jensen C., Vestergaard H., Møller MB., Siebenhaar F., Kristensen T., Mortz CG. Recognizing mastocytosis in patients with anaphylaxis: Value of KIT D816V mutation analysis of peripheral blood. *J Allergy Clin Immunol*. **2015**;135(1):262–4.
3. Carter MC., Bai Y., Ruiz-Esteves KN., Scott LM., Cantave D., Bolan H., Eisch R., Sun X., Hahn J., Maric I., Metcalfe DD. Detection of KIT D816V in peripheral blood of children with manifestations of cutaneous mastocytosis suggests systemic disease. *Br J Haematol*. **2018**;183(5):775–82.
4. Renke J., Kędzierska-Mieszkowska S., Lange M., Nedoszytko B., Wasilewska E., Liberek A., Renke M., Niedozytko M., Witkowski J., Skórko-Glonek J., Lipińska B. Mast cells in mastocytosis and allergy – Important player in metabolic and immunological homeostasis. Vol. 64, *Advances in Medical Sciences*. Medical University of Białystok; **2019**. p. 124–30.
5. Valent P., Akin C., Bonadonna P., Hartmann K., Brockow K., Niedozytko M., Nedoszytko B., Siebenhaar F., Sperr WR., Oude Elberink JNG., Butterfield JH., Alvarez-Twose I., Sotlar K., Reiter A., Kluijn-Nelemans HC., Hermine O., Gotlib J., Broesby-Olsen S., Orfao A., Horny HP., Triggiani M., Arock M., Schwartz LB., Metcalfe DD. Proposed Diagnostic Algorithm for Patients with Suspected Mast Cell Activation Syndrome. Vol. 7, *Journal of Allergy and Clinical Immunology: In Practice*. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology; **2019**. p. 1125-1133.e1.
6. Romantowski J., Górka A., Lange M., Nedoszytko B., Gruchała-Niedozytko M., Niedozytko M. How to diagnose Mast Cell Activation Syndrome? Practical considerations. *Polish Arch Intern Med*. **2020**;130(4):317–23. 10.20452/pamw.15212
7. Matito A., Azaña JM., Torrelo A., Alvarez-Twose I. Cutaneous Mastocytosis in Adults and Children: New Classification and Prognostic Factors. Vol. 38, *Immunology and Allergy Clinics of North America*. W.B. Saunders; **2018**. p. 351–63.

- 8.** Parada-Bustamante A., Valencia C., Reuquen P., Diaz P., Rincion-Rodriguez R., Orihuela P. Role of 2-methoxyestradiol, an Endogenous Estrogen Metabolite, in Health and Disease. *Mini-Reviews Med Chem.* **2015**;15(5):427–38. 10.2174/1389557515666150226121052
- 9.** Mooberry SL. New insights into 2-methoxyestradiol, a promising antiangiogenic and antitumor agent [Internet]. Vol. 15, Current Opinion in Oncology. **2003**. p. 425–30. 10.1097/00001622-200311000-00004
- 10.** Harrison MR., Hahn NM., Pili R., Oh WK., Hammers H., Sweeney C., Kim K., Perlman S., Arnott J., Sidor C., Wilding G., Liu G. A phase II study of 2-methoxyestradiol (2ME2) NanoCrystal® dispersion (NCD) in patients with taxane-refractory, metastatic castrate-resistant prostate cancer (CRPC). *Invest New Drugs.* **2011**;29(6):1465–74. 10.1007/s10637-010-9455-x
- 11.** LaVallee TM., Burke PA., Swartz GM., Hamel E., Agoston GE., Shah J., Suwandi L., Hanson AD., Fogler WE., Sidor CF., Treston AM. Significant antitumor activity in vivo following treatment with the microtubule agent ENMD-1198. *Mol Cancer Ther.* **2008**;7(6):1472–82.
- 12.** Tevaarwerk AJ., Holen KD., Alberti DB., Sidor C., Arnott J., Quon C., Wilding G., Liu G. Phase I trial of 2-methoxyestradiol NanoCrystal dispersion in advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res.* **2009**;15(4):1460–5.
- 13.** Kumar BS., Raghuvanshi DS., Hasanain M., Alam S., Sarkar J., Mitra K., Khan F., Negi AS. Recent Advances in chemistry and pharmacology of 2-methoxyestradiol: An anticancer investigational drug. Vol. 110, Steroids. Elsevier Inc.; **2016**. p. 9–34.
- 14.** Mueck AO., Seeger H. 2-methoxyestradiol - Biology and mechanism of action. Vol. 75, Steroids. **2010**. p. 625–31.
- 15.** Gorska M., Kuban-Jankowska A., Slawek J., Wozniak M. New Insight into 2-Methoxyestradiol- a Possible Physiological Link between Neurodegeneration and Cancer Cell Death. *Curr Med Chem.* **2016**;23(15):1513–27.
- 16.** Gorska M., Kuban-Jankowska A., Zmijewski M., Gammazza AM., Cappello F., Wnuk M., Gorzynik M., Rzeszutek I., Daca A., Lewinska A., Wozniak M. DNA strand breaks induced by nuclear hijacking of neuronal NOS as an anti-cancer effect of 2-methoxyestradiol. *Oncotarget.* **2015**;6(17):15449–63. 10.18632/oncotarget.3913
- 17.** Gorska-Ponikowska M., Kuban-Jankowska A., Daca A., Nussberger S. 2-Methoxyestradiol Reverses the Pro-Carcinogenic Effect of L-Lactate in Osteosarcoma 143B Cells. *Cancer Genomics Proteomics.* **2017**;14(6):483–93.

- 18.** Gorska M., Kuban-Jankowska A., Milczarek R., Wozniak M. Nitro-oxidative Stress Is Involved in Anticancer Activity of 17beta-Estradiol Derivative in Neuroblastoma Cells. *Anticancer Res.* **2016**;36(4):1693–8.
- 19.** Gorska M., Kuban-Jankowska A., Zmijewski M., Gorzynik M., Szkatula M., Wozniak M. Neuronal Nitric Oxide Synthase Induction in the Antitumorigenic and Neurotoxic Effects of 2-Methoxyestradiol. **2014**;19(9):13267–81. 10.3390/molecules190913267
- 20.** Gorska-Ponikowska M., Perricone U., Kuban-Jankowska A., Lo Bosco G., Barone G. 2-methoxyestradiol impacts on amino acids-mediated metabolic reprogramming in osteosarcoma cells by its interaction with NMDA receptor. *J Cell Physiol.* **2017**;232(11):3030–49.
- 21.** NILSSON G., BLOM T., KUSCHE-GULLBERG M., KJELLEN L., BUTTERFIELD JH., SUNDSTRÖM C., NILSSON K., HELLMAN L. Phenotypic Characterization of the Human Mast-Cell Line HMC-1. *Scand J Immunol.* **1994**;39(5):489–98.
- 22.** Sundström M., Vliagoftis H., Karlberg P., Butterfield JH., Nilsson K., Metcalfe DD., Nilsson G. Functional and phenotypic studies of two variants of a human mast cell line with a distinct set of mutations in the c-kit proto-oncogene. *Immunology.* **2003**;108(1):89–97.
- 23.** Furitsu T., Tsujimura T., Tono T., Ikeda H., Kitayama H., Koshimizu U., Sugahara H., Butterfield JH., Ashman LK., Kanayama Y., Matsuzawa Y., Kitamura Y., Kanakura Y. Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product. *J Clin Invest.* **1993**;92(4):1736–44.