(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475541 A
(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780044255.X

(22)申请日 2017.05.22

(30)优先权数据
15/161,137 2016.05.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.01.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/033843 2017.05.22

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/201532 EN 2017.11.23

(71)申请人 生物医学谷探索股份有限公司
地址 美国密苏里

(72)发明人 S·萨哈 D·威尔施
G·德克雷斯森佐
J·J·罗伊克斯

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.
A61K 31/4439(2006.01)
A61K 31/675(2006.01)
A61P 9/10(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 37/04(2006.01)
A61P 37/06(2006.01)

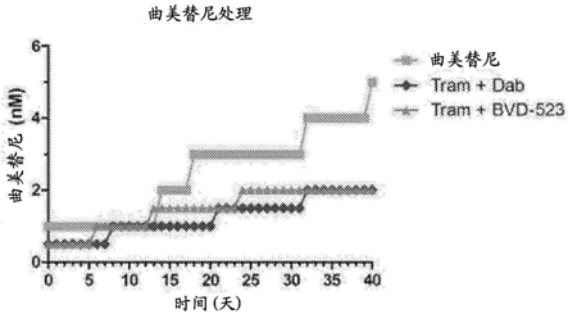
权利要求书1页 说明书81页
序列表139页 附图143页

(54)发明名称

用于治疗非ERK MAPK通路抑制剂抗性癌症的方法和组合物

(57)摘要

本发明特别地提供用于治疗或缓解受试者中癌症的作用的方法、药物组合物和试剂盒，所述癌症对非ERK MAPK途径抑制剂疗法是难治的或抗性的。还提供了用于鉴定将受益于使用ERK抑制剂的疗法的患有癌症的受试者的方法和用于抑制癌细胞中RSK的磷酸化的方法，所述癌细胞对非ERK MAPK途径抑制剂是难治的或抗性的。



CN 109475541 A

1.治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的方法，包括向受试者施用600mg BID的BVD-523或其药学上可接受的盐。

2.根据权利要求1所述的方法，其中所述突变是$BRAF^{V600E}$突变。

3.根据权利要求1所述的方法，其中所述哺乳动物选自人、灵长类动物、农场动物和家养动物。

4.根据权利要求1所述的方法，其中所述哺乳动物是人。

5.根据权利要求1所述的方法，其中所述黑素瘤具有MAPK活性。

6.用于治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的组合物，该组合物包含600mg的BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。

7.根据权利要求6所述的组合物，其中所述受试者是哺乳动物。

8.根据权利要求6的组合物，其中所述哺乳动物选自人、灵长类动物、农场动物和家养动物。

9.根据权利要求6的组合物，其中所述哺乳动物是人。

10.根据权利要求6所述的组合物，其中所述黑素瘤具有MAPK活性。

11.权利要求6的组合物，其中突变是$BRAF^{V600E}$突变。

用于治疗非ERK MAPK通路抑制剂抗性癌症的方法和组合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年5月20日提交的美国专利申请序列号15/161,137的权益,后者是2014年12月19日提交的PCT国际申请号PCT/US2014/071749的部分继续申请,其中PCT国际申请号PCT/US2014/071749要求2013年12月20日提交的美国专利申请序列号61/919,551的权益,所有这些专利申请以引用方式全文并入本文,如同在本文中完整叙述的那样。

技术领域

[0003] 本发明尤其提供用于治疗或改善受试者中癌症的作用的方法、药物组合物和试剂盒,所述癌症对非ERK MAPK途径抑制剂疗法是难治的或抗性的。

[0004] 通过引用并入序列表

[0005] 本申请包含对氨基酸和/或核酸序列的参考,所述氨基酸和/或核酸序列作为2016年5月20日创建的文件大小为351KB的序列表文本文件“0398850pct.txt”已与本文同时提交。依据37C.F.R.§1.52(e)(5),上述序列表在此通过引用整体并入本文。

背景技术

[0006] 靶向促分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号传导途径的组分的药物抑制剂在多种癌症中显示出临床功效,特别是那些在BRAF蛋白激酶中具有突变的癌症。RAF和MEK抑制剂均被批准用于晚期转移性BRAF突变型黑色素瘤中的单一试剂。单独或组合地,BRAF和MEK抑制剂活性在其他癌症中是不可预测的,而在BRAF突变体甲状腺和肺癌中具有很有前景的功效,在BRAF突变体结肠直肠癌中仅具有轻微活性。

[0007] 与其他靶向疗法一样,对RAF和MEK抑制剂的疾病应答模式似乎受到使用药物的癌症中存在的内在遗传异质性的影响。例如,已经显示某些遗传改变,包括激活PI3K细胞生长信号传导途径的PTEN和其他变化,可以预测在用RAF抑制剂维罗非尼(vemurafenib)治疗的BRAF突变型黑色素瘤中初始应答差和/或相对快速的进展。同样,在MEK基因的基因座中的直接突变似乎出现在BRAF、MEK或组合药物治疗后进展的肿瘤中。来自RAS和RAF基因扩增和剪接突变的若干其他实例表明,当致癌多效性遇到靶向药物治疗的选择压力时,会产生获得性药物抗性。

[0008] 鉴于前述内容,需要新的靶向药剂,其将理想地抑制致癌途径的多个节点,并且还通过诱导超过多种癌症基因组的适应能力的选择压力负担而在组合中有效。本申请旨在满足这些和其他需求。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的方法,所述癌症对非ERK MAPK途径抑制剂疗法是难治的或抗性的。所述方法包括向受试者施用有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0011] 本发明的另一个实施方案是治疗或改善受试者中癌症的作用的方法。所述方法包括:

[0012] (a)鉴定患有对BRAF抑制剂疗法、MEK抑制剂疗法或BRAF和MEK抑制剂疗法变得难治或抗性的癌症的患者;和

[0013] (b)给患有所述难治的或抗性癌症的受试者施用有效量的ERK抑制剂,其为BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0014] 本发明的另一个实施方案是治疗或改善受试者中癌症的作用的方法,所述癌症对BRAF抑制剂疗法、MEK抑制剂疗法或两者都是难治的或抗性的。所述方法包括向受试者施用有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0015] 本发明的另一个实施方案是鉴定将受益于使用ERK抑制剂的疗法的患有癌症的受试者的方法。所述方法包括:

[0016] (a)从受试者获得生物样品;和

[0017] (b)筛选样品以确定受试者是否具有以下一种或多种标记物:

[0018] (i)RAF同种型之间的转换,

[0019] (ii)受体酪氨酸激酶(RTK)或NRAS信号传导的上调,

[0020] (iii)有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号传导的再激活,

[0021] (iv)MEK激活突变的存在,

[0022] (v)突变体BRAF的扩增,

[0023] (vi)STAT3的上调,

[0024] (vii)MEK的变构口袋中的突变,其直接阻断抑制剂与MEK的结合或导致组成型MEK活性,

[0025] 其中一种或多种所述标志物的存在证实受试者的癌症对BRAF和/或MEK抑制剂疗法是难治的或抗性的,并且受试者将受益于使用ERK抑制剂的疗法,所述ERK抑制剂是BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0026] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的药物组合物,所述癌症对非ERK MAPK途径疗法是难治的或抗性的。所述组合物包含药学上可接受的载体或稀释剂和有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0027] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的试剂盒,所述癌症对非ERK MAPK途径疗法是难治的或抗性的。所述试剂盒包含根据本发明的任何药物组合物,与其使用说明书一起包装。

[0028] 本发明的另一个实施方案是用于抑制癌细胞中RSK的磷酸化的方法,所述癌细胞对非ERK MAPK途径抑制剂是难治的或抗性的。所述方法包括使癌细胞与有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐接触一段时间,该一段时间足以使癌细胞中的RSK磷酸化得到抑制。

[0029] 本发明的另一个实施方案是治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的方法,包括向受试者施用600mg BID的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0030] 本发明的另一个实施方案是用于治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的组合物,该组合物包含600mg的BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。

[0031] 附图简述

[0032] 本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公开的副本将在请求和支付必要费用后由专利局提供。

[0033] 图1A-图1C显示了第1个月在人恶性黑素瘤细胞系(A375细胞)中剂量递增研究的进展。各种处理(曲美替尼(trametinib)(2型MEK抑制剂),达拉非尼(dabrafenib)(BRAF抑制剂)和BVD-523(ERK1/2抑制剂))如标记所示。

[0034] 图2A-图2H显示了增殖测定法的结果,其追踪在第1个月对递增的试剂的敏感性变化。各种处理(曲美替尼、达拉非尼、BVD-523和紫杉醇)在图的顶部如标记所示。图右侧的标题显示了剂量递增研究产生的各种类型的细胞。例如,“达拉非尼”是指从剂量递增研究的第1个月开始已经用最高剂量的达拉非尼处理的细胞。亲本是指未经药物处理的对照细胞。图2A、图2C和图2G对于对照进行归一化,而图2D、图2F和图2H显示原始数据。

[0035] 图3A-图3D显示了第2个月在A375细胞中剂量递增研究的进展。各种处理(曲美替尼、达拉非尼和BVD-523)如标记所示。

[0036] 图4A-图4H显示了增殖测定法的结果,其追踪在第2个月对递增的试剂的敏感性变化。各种处理(曲美替尼、达拉非尼、BVD-523和紫杉醇)在图的顶部如标记所示。图右侧的标题显示了剂量递增研究产生的各种类型的细胞。例如,“达拉非尼”是指从剂量递增研究的第2个月开始已经用最高剂量的达拉非尼处理的细胞。亲本是指未经药物处理的对照细胞。图4A、图4C和图4G对于对照进行归一化,而图4D、图4F和图4H显示原始数据。

[0037] 图5A-图5H仅显示来自图4A-图4H的亲本和BVD-523细胞系数据。各种处理(曲美替尼、达拉非尼、BVD-523和紫杉醇)如标记所示。图5A、图5C和5G对于对照进行归一化,而图5D、图5F和图5H显示原始数据。

[0038] 图6A-图6D显示了在第3个月人恶性细胞系(A375细胞)中剂量递增研究的进展。各种处理(曲美替尼、达拉非尼和BVD-523)如标记所示。

[0039] 图7是显示应用于来自剂量递增测定法的DMSO对照孔中生长的细胞的增殖测定法结果的直方图。

[0040] 图8A-图8D是一组线图,显示研究第3个月的增殖测定法。各种处理(曲美替尼、达拉非尼、BVD-523和紫杉醇)在图的顶部如标记所示。图右侧的标题显示了剂量递增研究产生的各种类型的细胞。例如,“达拉非尼”是指从剂量递增研究的第3个月开始用最高剂量的达拉非尼处理的细胞。亲本是指未经药物处理的对照细胞。

[0041] 图9A-图9D仅显示来自图8A-图8D的亲本、达拉非尼和BVD-523细胞系数据。

[0042] 图10A是显示使用Alamar Blue细胞活力测定法在A375细胞中曲美替尼/达拉非尼组合的抑制%的剂量矩阵。图10B是显示曲美替尼/达拉非尼组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图10C和图10D显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和曲美替尼单一试剂处理在A375细胞中的活力%。图10E显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和曲美替尼组合处理在A375细胞中的活力%。

[0043] 图11A是显示使用CellTiter-Glo细胞活力测定法在A375细胞中曲美替尼/达拉非尼组合的抑制%的剂量矩阵。图11B是显示曲美替尼/达布拉非尼组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图11C和图11D显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和曲美替尼单一试剂处理在A375细胞中的活力%。图11E显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和曲美替尼组合处理在A375细胞中的活力%。

[0044] 图12A是显示使用Alamar Blue细胞活力测定法在A375细胞中BVD-523/达拉非尼组合的抑制%的剂量矩阵。图12B是显示BVD-523/达拉非尼组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图12C和图12D显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和BVD-523单一试剂处理在A375细胞中的活力%。图12E显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和BVD-523组合处理在A375细胞中的活力%。

[0045] 图13A是显示使用CellTiter-Glo细胞活力测定法在A375细胞中BVD-523/达拉非尼组合的抑制%的剂量矩阵。图13B是显示BVD-523/达拉非尼组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图13C和图13D显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和BVD-523单一试剂处理在A375细胞中的活力%。图13E显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,达拉非尼和BVD-523组合处理在A375细胞中的活力%。

[0046] 图14A是显示使用Alamar Blue细胞活力测定法在A375细胞中曲美替尼/BVD-523组合的抑制%的剂量矩阵。图14B是显示曲美替尼/BVD-523组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图14C和图14D显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,BVD-523和曲美替尼单一试剂处理在A375细胞中的活力%。图14E显示了使用Alamar Blue细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,BVD-523和曲美替尼组合处理在A375细胞中的活力%。

[0047] 图15A是显示使用CellTiter-Glo细胞活力测定法在A375细胞中曲美替尼/BVD-523组合的抑制%的剂量矩阵。图15B是显示曲美替尼/BVD-523组合超过Bliss过量的剂量矩阵。图15C和图15D显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,BVD-523和曲美替尼单一试剂处理在A375细胞中的%存活率。图15E显示了使用CellTiter-Glo细胞活力测定法相对于仅用DMSO处理的对照,BVD-523和曲美替尼组合处理在A375细胞中的活力%。

[0048] 图16A-图16D是显示用各种浓度(以nM计)的BVD 523、达拉非尼(Dab)和曲美替尼(Tram)处理4小时后,在A375细胞中MAPK信号传导的Western印迹分析的一组图像。除非另有说明,否则每个泳道加载40μg总蛋白。在该实验中,收集一式两份样品。图16A和图16B显示了一式两份样品的结果。类似地,图16C和图16D也显示了一式两份样品的结果。在图16A和图16B中,与其他标记物相比,pRSK1在A375细胞中具有相对弱的信号。测试了来自Cell Signaling(目录号11989)的不同pRSK1-S380抗体,但未给出可检测的信号(数据未显示)。在图16C和图16D中,pCRAF-338给出最小信号。

[0049] 图17A-图17D是显示在用各种浓度(以nM计)的BVD-523、达拉非尼(Dab)和曲美替尼(Tram)处理4小时后,在人结直肠癌细胞系(HCT116细胞)中MAPK信号传导的Western印迹分析的一组图像。除非另有说明,否则每个泳道加载40μg总蛋白。在该实验中,收集一式两份样品。图17A和图17B显示了一式两份样品的结果。类似地,图17C和图17D也显示了一式两份样品的结果。在图17A和图17B中,在HCT116细胞中pRSK1水平似乎非常低,并且在图17C和17D中,pCRAF-338信号也很弱。

[0050] 图18A-图18D是显示在用如标记的各种浓度(以nM计)的BVD-523(“BVD523”)、曲美替尼(“tram”)和/或达拉非尼(“Dab”)处理24小时后,在A375黑素瘤细胞中细胞周期和凋亡

信号传导的Western印迹分析的一组图像。除非另有说明，否则每个泳道加载50μg总蛋白。在该实验中，收集一式两份样品。图18A和图18B显示了一式两份样品的结果。类似地，图18C和图18D也显示了一式两份样品的结果。在图18A和图18B中，没有明显对应于切割的PARP(89kDa)的尺寸的条带。

[0051] 图19显示了BVD-523可以在体内治疗对靶向药物的获得性抗性。从用MAPK途径定向疗法治疗10个月后进展的BRAFV600E黑素瘤患者分离患者衍生的系ST052C。离体处理，ST052C表现出对50mg/kg BID的达拉非尼的获得性交叉抗性。同时，BVD-523作为100mg/kg BID的单一试剂在ST052C中有效。

[0052] 图20是显示本文使用的剂量递增方案的流程图。

[0053] 图21显示了促有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)途径的示意图。

[0054] 图22A-图22E显示了单一试剂增殖测定法的结果。显示了用BVD-523(图22A)、SCH772984(图22B)、达拉非尼(图22C)，曲美替尼(图22D)和紫杉醇(图22E)处理的增殖结果。

[0055] 图23A-图23O显示了BVD-523和达拉非尼的组合的结果。图23A显示了剂量矩阵，其显示在RKO亲本细胞中组合的抑制(%)。图23B-图23C显示了图23A中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图23D显示了图23A中组合的Loewe过量，和图23E显示了图23A中组合的Bliss过量。图23F显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆1细胞中组合的抑制(%)。图23G-图23H显示了图23F中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图23I显示了图23F中组合的Loewe过量，和图23J显示了图23F中组合的Bliss过量。图23K显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆2细胞中组合的抑制(%)。图23L-图23M显示了图23K中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图23N显示了图23K中组合的Loewe过量，和图23O显示了图23K中组合的Bliss过量。

[0056] 图24A-图24O显示了SCH772984和达拉非尼的组合的结果。图24A显示了剂量矩阵，其显示在RKO亲本细胞中组合的抑制(%)。图24B-图24C显示了图24A中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图24D显示了图24A中组合的Loewe过量，和图24E显示了图24A中组合的Bliss过量。图24F显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆1细胞中组合的抑制(%)。图24G-图24H显示了图24F中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图24I显示了图24F中组合的Loewe过量，和图24J显示了图24F中组合的Bliss过量。图24K显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆2细胞中组合的抑制(%)。图24L-图24M显示了图24K中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图24N显示了图24K中组合的Loewe过量，和图24O显示了图24K中组合的Bliss过量。

[0057] 图25A-图25O显示了曲美替尼和达拉非尼的组合的结果。图25A显示了剂量矩阵，其显示在RKO亲本细胞中组合的抑制(%)。图25B-图25C显示了图25A中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图25D显示了图25A中组合的Loewe过量，和图25E显示了图25A中组合的Bliss过量。图25F显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆1细胞中组合的抑制(%)。图25G-图25H显示了图25F中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图25I显示了图25F中组合的Loewe过量，和图25J显示了图25F中组合的Bliss过量。图25K显示了剂量矩阵，其显示在RKO MEK1(Q56P/+)-克隆2细胞中组合的抑制(%)。图25L-图25M显示了图25K中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图25N显示了图25K中组合的Loewe过量，和图25O显示了图

25K中组合的Bliss过量。

[0058] 图26A显示了测试的组合的Lowe体积。图26B显示了测试的组合的Bliss体积。图26C显示了测试的组合的协同作用评分。

[0059] 图27A-图27I显示了MEK获得性抗性中MAPK和效应子途径信号传导的变化。将同基因RKO亲本和MEK1(Q56P/+)细胞用化合物处理4或24小时，然后用指定的抗体进行免疫印迹。达拉非尼是BRAF抑制剂，曲美替尼是MEK抑制剂。图27A显示了RKO MEK1(Q56P/+)细胞中增加的信号传导。图27B-图27C显示了在RKO亲本(27B)和RKO MEK1(Q56P/+)(27C)细胞中的实验1(参见实施例7)中4小时处理的结果。图27D-图27E显示了在RKO亲本(27D)和RKO MEK1(Q56P/+)(27E)细胞中的实验2(参见实施例7)中4小时处理的结果。图27F-图27G显示了在RKO亲本(27F)和RKO MEK1(Q56P/+)(27G)细胞中的实验2(参见实施例7)中4小时处理的结果。图27H-图27I显示了RKO亲本(27H)和RKO MEK1(Q56P/+)(27I)细胞中的结果总结。

[0060] 图28A-图28E显示了BVD-523和SCH772984的组合的结果。图28A显示了剂量矩阵，其显示在A375细胞中组合的抑制(%)。图28B-图28C显示了图28A中组合的单一试剂增殖测定法的结果。图28D显示了图28A中组合的Loewe过量。图28E显示了图28A中组合的Bliss过量。

[0061] 图29A-图29F显示了新型ERK1/2抑制剂BVD-523(ulixertinib)的发现和表征。图29A显示了BVD-523以可逆的ATP竞争方式表现出抑制。这通过随着ATP浓度增加而抑制ERK2的IC_{50}值的线性增加得到证明，如图29B所示。图29C显示了剂量-应答曲线的代表性绘图(plot)，图29D显示了IC_{50}随时间的绘图。图29E显示了与阴性对照蛋白p38相比，BVD-523与ERK2和磷酸-ERK2(pERK2)的结合。图29F显示了与ERK抑制剂SCH772984和吡唑基吡咯相比，BVD-523与ERK2的结合。

[0062] 图30A-图30D显示了BVD 523在体外抑制细胞增殖并增强胱天蛋白酶3和胱天蛋白酶7活性。图30A显示了BVD-523在具有MAPK途径突变的细胞中表现出优先活性，如在RAS家族成员和RAF中存在突变所定义。另外，如图30B所示，BVD-523阻断敏感细胞系在细胞周期的G1期。图30C显示了BVD-523在暴露72小时后诱导A375、WM266和LS411N癌细胞系中胱天蛋白酶活性的浓度和时间依赖性增加。图30D显示了MAPK途径和效应子蛋白通过在$BRAF^{V600E}$-突变体A375细胞中的急性(4小时)和延长(24小时)BVD-523处理来调控。

[0063] 图31A-图31C显示了体内BVD-523的抗肿瘤活性。BVD-523单一疗法在(图31A)A375和(图31B)Colo205细胞系异种移植模型中抑制肿瘤生长($^{a}P<0.0001$，与载体对照相比；CPT-11仅在第14天和第18天给药)。缩写:BID，每日两次;CMC，羧甲基纤维素;QD，每天;Q4D，每4天一次。图31C显示了在Colo205异种移植物中，增加的ERK1/2磷酸化与BVD-523浓度相关。

[0064] 图32A显示了ERK1/2抑制剂的信号传导作用。使用RPPA，在用ERK1/2抑制剂BVD-523(BVD)、Vx11e(Vx)、GDC-0994(GDC)或SCH722984(SCH)处理后，在细胞系(A375、AN3Ca、Colo205、HCT116、HT29和MIAPaca2)中测量对蛋白质的作用。图32B显示了与SCH722984相比，ERK抑制剂BVD-523、GDC-0994和Vx11e对磷酸-ERK(ERK 1/2T202 Y204)具有不同的作用;磷酸-RSK(p90 RSK 380)和细胞周期蛋白D1被测试的ERK抑制剂所抑制。缩写:BRAFi，BRAF抑制剂;MEKi，MEK抑制剂。图32C显示了用BVD-523、曲美替尼、SCH722984或达拉非尼处理后来自RKO细胞系的细胞和核级分的western印迹测定法。包括组蛋白H3(核定位蛋白)和

HSP90(细胞质定位蛋白)作为阳性对照以证实核和细胞质级分被适当富集;核级分具有高H3并且细胞质级分具有更高的HSP90。

[0065] 图33显示了ERK抑制剂BVD-523、Vx11、GDC-0994和SCH772984(SCH)显示磷酸-ATK水平的细胞系依赖性变化。缩写:DMSO,二甲基亚砜。

[0066] 图34A-图34D显示了BVD-523在BRAF/MEK抑制的抗性模型中显示出活性。显示了在暴露于增加浓度的药物后$BRAF^{V600E}$ A375细胞中对BVD-523、达拉非尼或曲美替尼的抗性表观。应用一组严格的"标准"来确定何时可以增加剂量以确保处理之间获得抗性的动力学是相当的。参见实施例1。针对IC_{50}的倍数显示时间;绘制线上的每个点表示培养基的变化或细胞分传。图34A显示了在BVD-523存在下使细胞适应生长比使用达拉非尼或曲美替尼更具挑战性。图34B显示了在被培养以获得对组合的BRAF(达拉非尼)+MEK(曲美替尼)抑制的抗性的A375细胞中保留了BVD-523敏感性。在图34C中,用化合物处理细胞96小时,并使用CellTiter-Glo®评估活力。由于$MEK1^{Q56P}$的内源性杂合敲入,在对BRAF(达拉非尼)和MEK(曲美替尼)抑制剂有交叉抗性的$BRAF^{V600E}$ RKO细胞中保留了BVD-523活性。图34D显示了$BRAK^{V600E}$-突变体细胞系RKO中pRSK的BVD-523抑制在$MEK1^{Q56P}$存在下得到维持,该$MEK1^{Q56P}$赋予对MEK和BRAF抑制的抗性。将KRAS突变体等位基因敲入SW48细胞系显著降低了对MEK抑制剂曲美替尼和司美替尼(selumetinib)的敏感度,同时保留了对BVD-523的相对敏感度。

[0067] 图35A显示来自维罗非尼(vemurafenib)复发患者的异种移植物中的BVD-523体内活性。显示单独的BVD-523 100mg/kg BID、单独的达拉非尼50mg/kg BID和BVD-523 100mg/kg BID加达拉非尼50mg/kg BID的平均肿瘤体积(±SEM)。缩写:BID,每日两次;SEM,平均值的标准误差。

[0068] 图36A-图36D显示了组合的BVD-523和BRAF抑制的益处。图36A-图36B显示了在肿瘤起始体积为75-144mm^3的$A375BRAF^{V600E}$-突变体黑素瘤细胞系异种移植模型中,与单独使用任一种试剂的处理相比,BVD-523加达拉非尼的组合显示出优异的抗肿瘤活性。图36C-图36D显示了来自在给药开始时肿瘤体积更大(700-800mm^3)的相同模型的类似数据。对于每个研究呈现平均肿瘤生长(左图)和Kaplan-Meier存活(右图)的绘图。缩写:BID,每日两次;QD,每天一次。

[0069] 图37A显示了在用KRAS等位基因改造的SW48结肠直肠细胞中,与对照相比,对紫杉醇的应答未改变。图37B显示了BVD-523和维罗非尼之间的组合相互作用,其使用Loewe Additivity和Bliss Independence模型使用8×10浓度矩阵进行评估,并用Horizon's Chalice,Bioinformatics Software进行分析。通过显示计算的过量抑制超过在作为热图的剂量矩阵中加成的预期,并通过报告基于Loewe模型的定量"协同作用评分",Chalice可以识别潜在的协同相互作用。结果表明BVD-523和维罗非尼之间的相互作用至少是加成的,并且在一些情况下在携带$BRAF^{V600E}$突变的黑素瘤细胞系中是协同的。图37C显示了BVD-523与达拉非尼组合显著地延迟了在A375 $BRAF^{V600E}$黑素瘤细胞中获得性抗性的发作。评估了响应于浓度递增的达拉非尼单独地或者与BVD-523或曲美替尼组合抗性的时间性获得。关于何时可以增加剂量以确保适应动力学在处理之间是相当的,应用严格的标准。参见实施例1。

[0070] 图38显示了BVD-523抑制人全血中离体PMA刺激的RSK1/2磷酸化。BVD-523浓度数据组的平均值由(—)表示。对于每种浓度的BVD-523,n=20。缩写:PBMC,外周血单核细胞;

RSK,核糖体S6激酶。

[0071] 图39A显示了稳态BVD-523药代动力学(第1周期,第15天)。红色虚线表示EC_{50} 200ng/mL HWB。缩写:AUC,曲线下面积;BID,每天两次;C_{max},最大浓度;EC_{50},50%最大有效浓度;HWB,人类全血;SD,标准差。图39B显示了在人全血中BVD-523对ERK磷酸化的药效学抑制。缩写:BID,每日两次;pRSK,磷酸-RSK;RSK,核糖体S6激酶。

[0072] 图40A显示了用BVD-523治疗的患者中的最佳放射照相应答。包括患有通过RECIST v1.1测量的疾病的所有患者,其接受≥1剂量的研究治疗并且具有>1个治疗中肿瘤评估(25/27;2个未接受两次靶病灶的扫描)。将应答测量为每个靶病灶的最长直径之和与基线的变化。显示的剂量是患者在应答时接受的剂量。虚线表示根据RECIST v1.1的部分响应的阈值。缩写:CRC,结肠直肠癌;NET,神经内分泌肿瘤;NSCLC,非小细胞肺癌;NSGCT,非精原细胞生殖细胞肿瘤;PNET,胰NET;PTC,乳头状甲状腺癌;RECIST v1.1,实体瘤的响应评估标准1.1版;SLD,最大直径之和。图40B显示了用BVD-523治疗的患有BRAF突变黑素瘤的61岁患者中确认的部分应答的计算机断层扫描。

[0073] 图41显示了肿瘤应答和肿瘤进展。显示了用BVD-523治疗的应答可评估患者的肿瘤应答、肿瘤进展和治疗持续时间的游泳者绘图(swimmer plot)。垂直轴的原点对应于随机化日期或参考开始日期。分析截止日期:2015年12月1日。缩写:BID,每日两次。

[0074] 发明详述

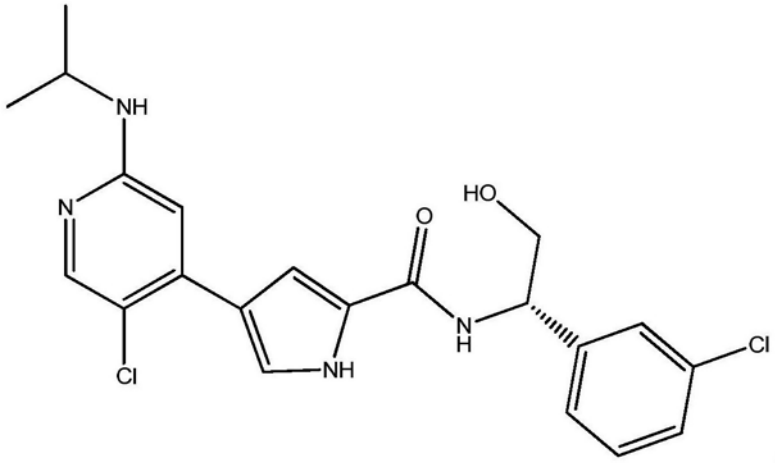
[0075] 本发明的一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的方法,所述癌症对非ERK MAPK途径抑制剂疗法是难治的或抗性的。所述方法包括向受试者施用有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0076] 如本文所用,术语"治疗","处置","处理"及其语法变体是指使个体受试者接受规程、方案、过程或补救,其中期望在该受试者(例如患者)中获得生理应答或结果。特别地,本发明的方法和组合物可用于减缓疾病症状的发展或者延迟疾病或病况的发作,或者停止疾病发展的进展。然而,因为每个受治疗的受试者可能对特定治疗规程、方案、过程或补救无应答,所以治疗不要求在每个受试者或受试者群体(例如患者群体)中实现期望的生理应答或结果。因此,给定受试者或受试者群体(例如,患者群体)可能无法对治疗作出应答或不充分应答。

[0077] 如本文所用,术语"改善","缓解"及其语法变体是指降低受试者中疾病症状的严重性。

[0078] 如本文所用,"受试者"是哺乳动物,优选人。除人类外,本发明范围内的哺乳动物类别包括例如农场动物、家养动物、实验室动物等。农场动物的一些实例包括牛、猪、马、山羊等。家养动物的一些实例包括狗、猫等。实验室动物的一些实例包括灵长类动物、大鼠、小鼠、兔子、豚鼠等。

[0079] 在本发明中,BVD-523对应于根据式(I)的化合物及其药学上可接受的盐:

[0080] 

[0081] BVD-523可根据公开的方法合成，例如美国专利号7,354,939。BVD-523的对映体和两种对映体的外消旋混合物也包括在本发明的范围内。BVD-523是ERK1/2抑制剂，其作用机制据信是例如独特的并且不同于某些其他ERK1/2抑制剂（例如SCH772984）和Hatzivassiliou等人(2012年)使用的嘧啶结构。例如，其他ERK1/2抑制剂(例如SCH772984)抑制ERK的自磷酸化(Morris等人，2013)，而BVD-523允许ERK的自磷酸化同时仍然抑制ERK。(参见，例如，图18)。

[0082] 如本文所用，词语“抗性的”和“难治的”可互换使用。对非ERK MAPK途径抑制剂疗法是“抗性的”是指非ERK MAPK抑制剂在治疗癌症方面的功效降低。

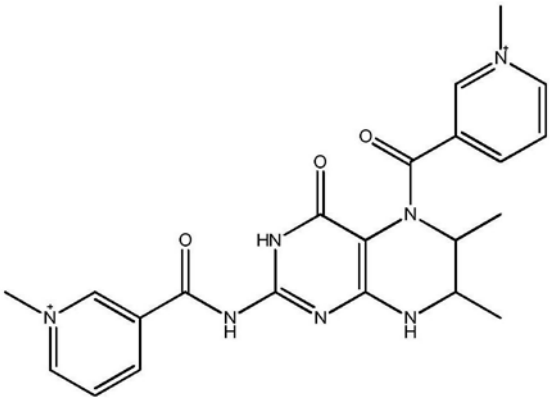
[0083] 如本文所用，“非ERK MAPK抑制剂”是指降低MAPK途径的蛋白质或其他成员的活性、表达或磷酸化(这导致细胞生长的减少或细胞死亡的增加)的任何物质，除ERK1/2抑制剂外。如本文所用，“ERK1/2抑制剂”是指(i)与ERK1和/或ERK2直接相互作用的那些物质，例如通过结合ERK1/2和(ii)降低ERK1和/或ERK2蛋白激酶的表达或活性的那些物质。因此，作用于ERK1/2上游的抑制剂，例如MEK抑制剂和RAF抑制剂，不是根据本发明的ERK1/2抑制剂(但它们是非ERK MAPK抑制剂)。根据本发明的ERK1/2抑制剂的非限制性实例包括AEZS-131(Aeterna Zentaris)、AEZS-136(Aeterna Zentaris)、BVD-523(BioMed Valley Discoveries,Inc.)、SCH-722984(Merck&Co.)、SCH-772984(Merck&Co.)，SCH-900353(MK-8353)(Merck&Co.)，其药学上可接受的盐及其组合。

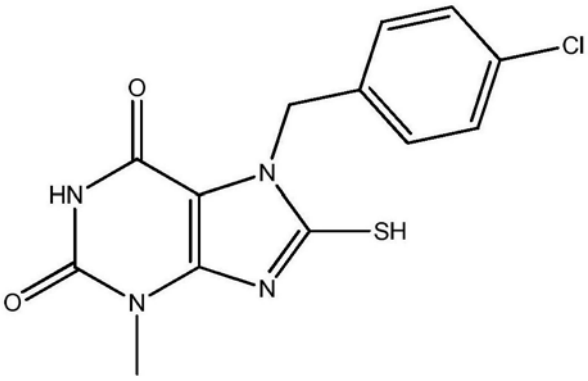
[0084] 哺乳动物MAPK级联的概述显示于图21中。在例如Akinleye等人，2013中综述了MAPK途径。简言之，关于图21中的ERK1/2模块(浅紫色框)，MAPK 1/2信号传导级联通过配体与受体酪氨酸激酶(RTK)的结合而被激活。激活的受体募集并磷酸化衔接子蛋白Grb2和SOS，后者然后与膜结合的GTP酶Ras相互作用并引起其激活。以其激活的GTP结合形式，Ras募集并激活RAF激酶(A-RAF、B-RAF和C-RAF/RAF-1)。激活的RAF激酶激活MAPK 1/2(MKK1/2)，其进而催化ERK1/2的激活序列Thr-Glu-Tyr中苏氨酸和酪氨酸残基的磷酸化。关于JNK/p38模块(图21中的黄色框)，上游激酶MAP3K，例如MEKK1/4、ASK1/2和MLK1/2/3，活化MAP2K3/6(MKK3/6)、MAP2K4(MKK4)和MAP2K7(MKK7)。然后这些MAP2K激活JNK蛋白激酶，包括JNK1、JNK2和JNK3，以及p38α/β/γ/δ。为了执行它们的功能，JNK激活几种转录因子，包括c-Jun、ATF-2、NF-ATc1、HSF-1和STAT3。关于ERK5模块(图21中的蓝框)，MAP2K5(MKK5)上游的激酶是MEKK2和MEKK3。MEK5的最佳表征下游靶是ERK5，也称为大MAP激酶1(BMK1)，因为它是其他MAPK的两倍大小。

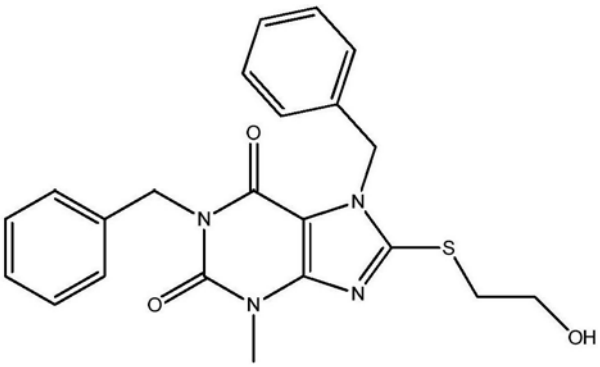
[0085] 根据本发明的非ERK MAPK途径抑制剂的非限制性实例包括RAS抑制剂、RAF抑制剂(例如,A-RAF、B-RAF、C-RAF(RAF-1)的抑制剂)、MEK抑制剂及其组合。优选地,非ERK MAPK途径抑制剂是BRAF抑制剂、MEK抑制剂及其组合。

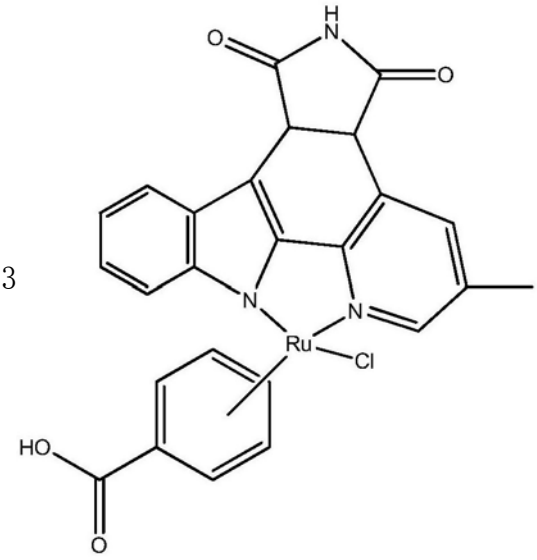
[0086] 如本文所用,“RAS抑制剂”是指(i)与RAS直接相互作用,例如通过与RAS结合和(ii)降低RAS的表达或活性的那些物质。非限制性的示例性RAS抑制剂包括但不限于法呢基转移酶抑制剂(例如,替比法尼(tipifarnib)和洛那法尼(lonafarnib)),含法呢基的小分子(例如salirasib和TLN-4601),DCAI,如Maurer(Maurer等人,2012)所公开的,Kobe0065和Kobe2602,如Shima(Shima等人,2013)所公开的,HBS 3(Patgiri等人,2011)和AIK-4(Allinky)。

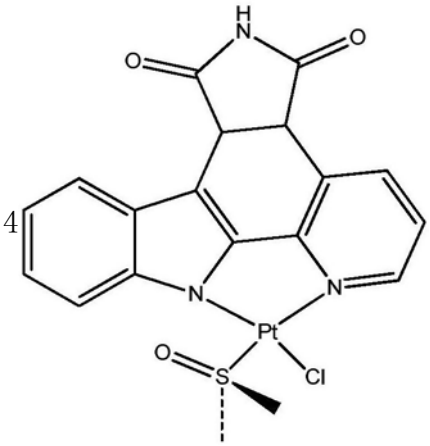
[0087] 如本文所用,“RAF抑制剂”是指(i)与RAF直接相互作用,例如通过结合RAF和(ii)降低RAF例如A-RAF、B-RAF和C-RAF(RAF-1)的表达或活性的那些物质。非限制性的示例性RAF抑制剂,包括BRAF抑制剂,包括:

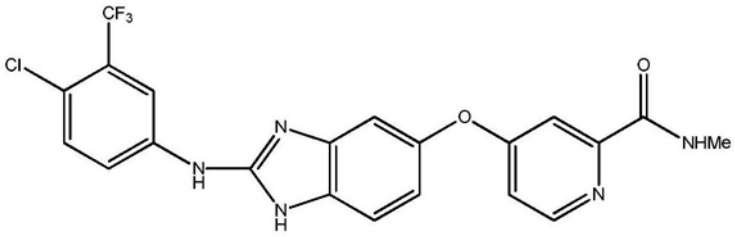
[0088] 化合物7  (Li等人),

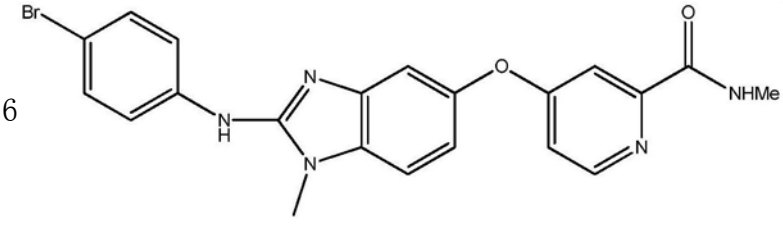
[0089] 化合物9  (同上),

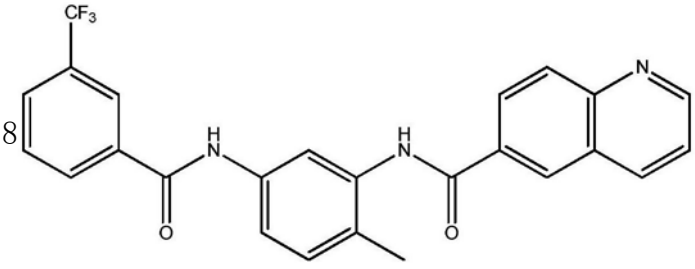
[0090] 化合物10  (同上),

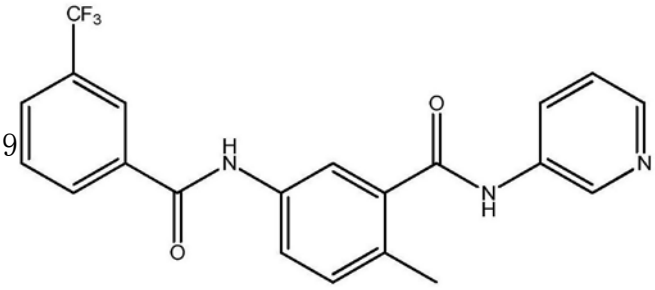
[0091] 化合物13  (同上)，

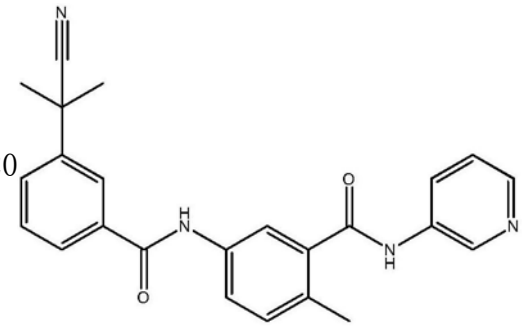
[0092] 化合物14  (同上)，

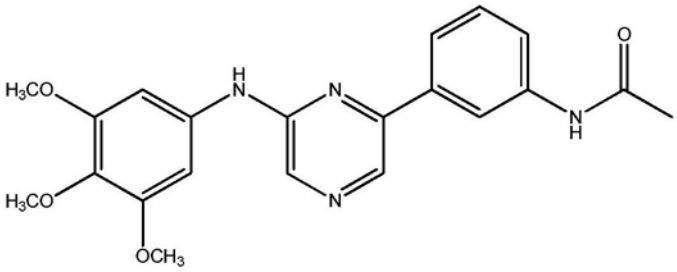
[0093] 化合物15  (同上)，

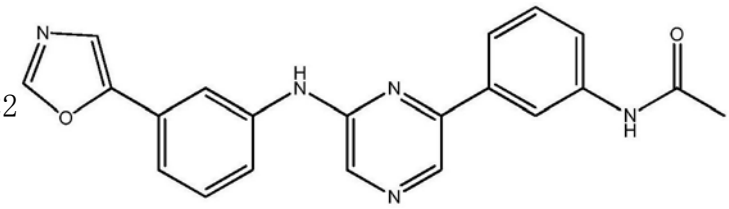
[0094] 化合物16  (同上)，

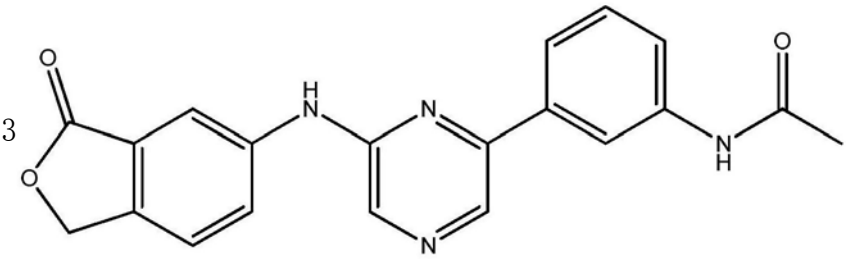
[0095] 化合物18  (同上)，

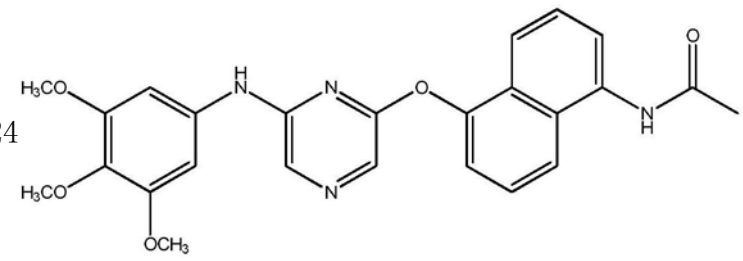
[0096] 化合物19(同上)，

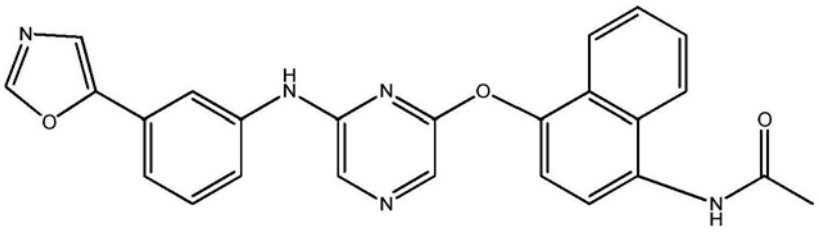
[0097] 化合物20(同上)，

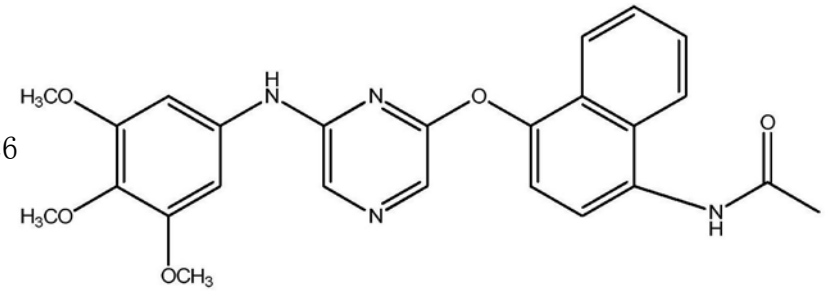
[0098] 化合物21(同上)，

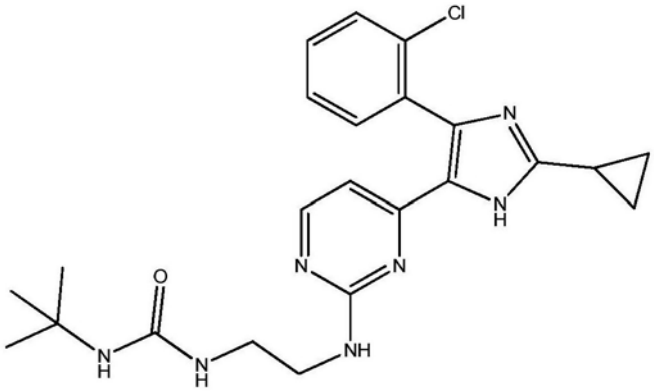
[0099] 化合物22(同上)，

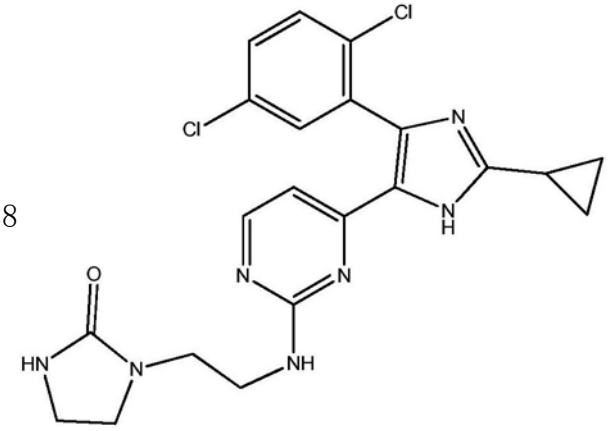
[0100] 化合物23(同上)，

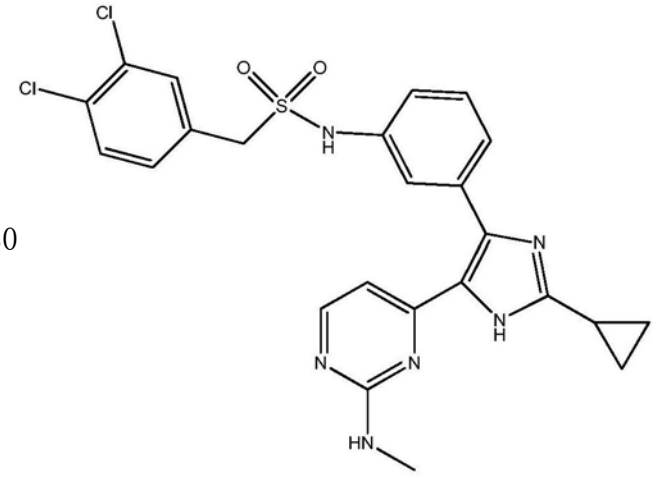
[0101] 化合物24(同上)，

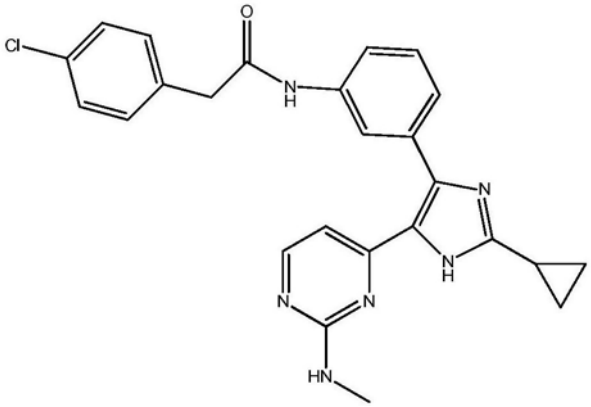
[0102] 化合物25  (同上)，

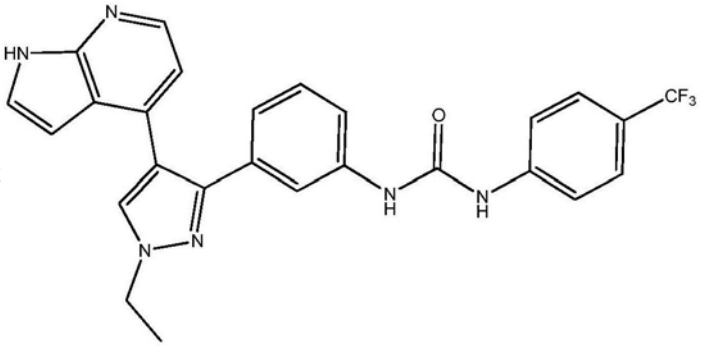
[0103] 化合物26  (同上)，

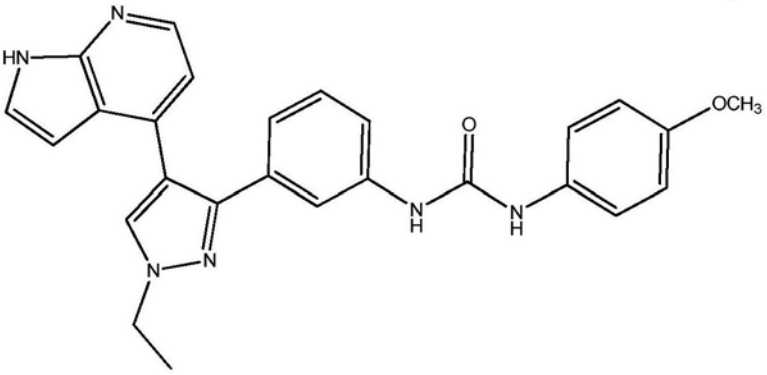
[0104] 化合物27  (同上)，

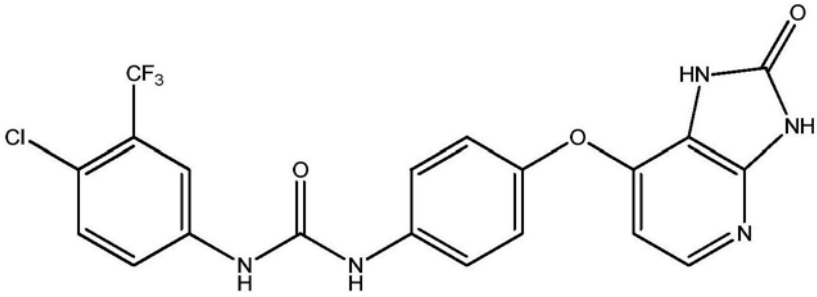
[0105] 化合物28  (同上)，

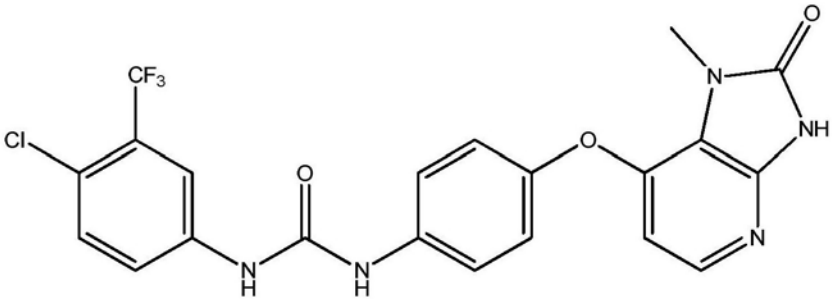
[0106] 化合物30  (同上)，

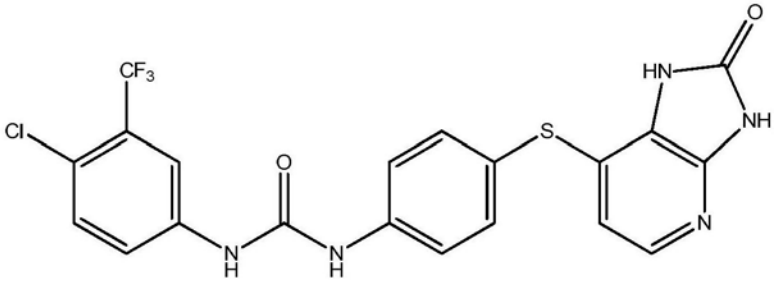
[0107] 化合物31  (同上)，

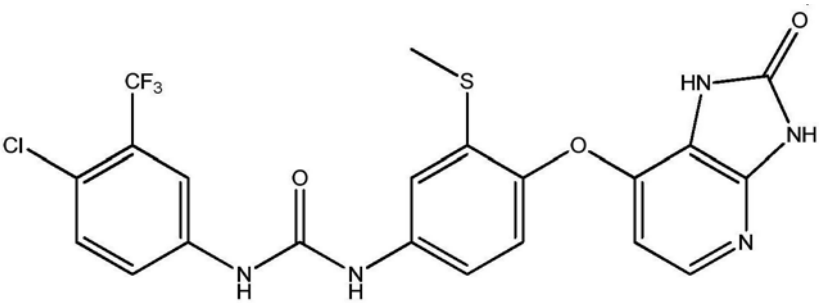
[0108] 化合物32  (同上)，

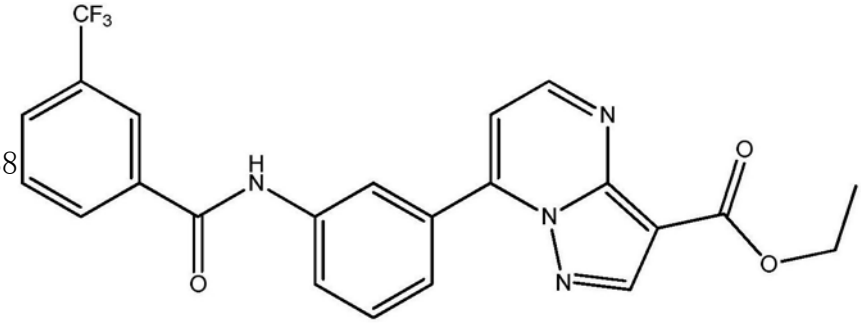
[0109] 化合物33  (同上)，

[0110] 化合物34(同上)，

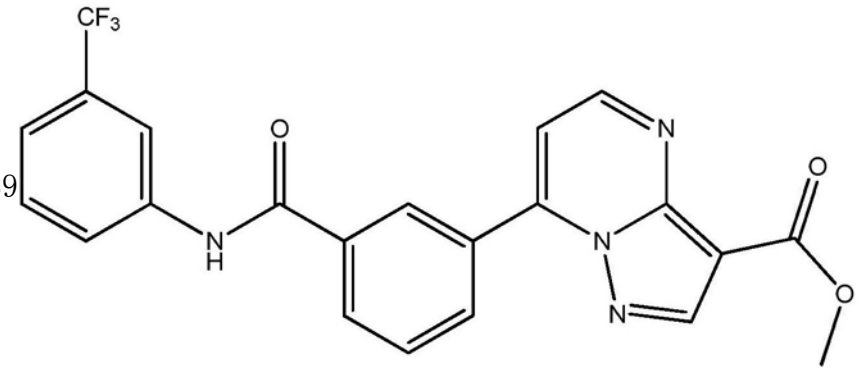
[0111] 化合物35(同上)，

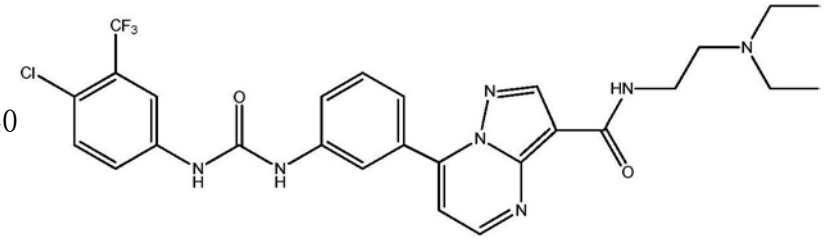
[0112] 化合物36(同上)，

[0113] 化合物37(同上)，

[0114] 化合物38

[0115] (同上)，

[0116] 化合物39  (同上),

[0117] 化合物40  (同上),

[0118] AAL881(诺华);AB-024(Ambit Biosciences),ARQ-736(ArQule),ARQ-761(ArQule),AZ628(Axon Medchem BV),BeiGene-283(BeiGene),BIIB-024(MLN 2480)(Sunesis&Takeda),b-raf抑制剂(Sareum),BRAF激酶抑制剂(Selexagen Therapeutics),BRAF siRNA 313(tacaccagcaagctagatgca)和523(cctatcgttagagtcttcctg)(Liu等人,2007),CTT239065(癌症研究所),达拉非尼(GSK2118436),DP-4978(Deciphera Pharmaceuticals),HM-95573(Hanmi),GDC-0879(Genentech),GW-5074(Sigma Aldrich),ISIS 5132(Novartis),L779450(Merck),LBT613(Novartis),LErafAON(NeoPharm,Inc.),LGX-818(诺华),帕佐帕尼(pazopanib)(GlaxoSmithKline),PLX3202(Plexxikon),PLX4720(Plexxikon),PLX5568(Plexxikon),RAF-265(诺华),RAF-365(诺华),瑞格非尼(regorafenib)(Bayer Healthcare Pharmaceuticals,Inc.),RO 5126766(Hoffmann-La Roche),SB 590885(GlaxoSmithKline),SB699393(GlaxoSmithKline),索拉非尼(Onyx Pharmaceuticals),TAK 632(Takeda),TL-241(Teligene),维罗非尼(RG7204或PLX4032)(Daiichi Sankyo),XL-281(Exelixis),ZM-336372(AstraZeneca),其药学上可接受的盐以及它们的组合。

[0119] 如本文所用,“MEK抑制剂”是指(i)与MEK直接相互作用,例如通过结合MEK,和(ii)降低MEK的表达或活性的那些物质。因此,作用于MEK上游的抑制剂,例如RAS抑制剂和RAF抑制剂,不是根据本发明的MEF抑制剂。MEK抑制剂的非限制性实例包括炭疽毒素,安卓奎诺尔(antroquinonol)(Golden Biotechnology),ARRY-142886(6-(4-溴-2-氯-苯基氨基)-7-氟-3-甲基-3H-苯并咪唑-5-羧酸(2-羟基-乙氧基)-酰胺)(Array BioPharma),ARRY-438162(Array BioPharma),AS-1940477(Astellas),AS-703988(Merck KGaA),bentamapimod(Merck KGaA),BI-847325(Boehringer Ingelheim),E-6201(Eisai),GDC-0623(Hoffmann-La Roche),GDC-0973(考比替尼(cobimetinib))(Hoffmann-La Roche),L783277(Merck),炭疽毒素的致死因子部分,MEK162(Array BioPharma),PD 098059(2-(2’-氨基-3’-甲氧基苯基)-氧杂萘-4-酮)(Pfizer),PD 184352(CI-1040)(Pfizer),PD-0325901(Pfizer),pimasertib(Santhera Pharmaceuticals)),RDEA119(Ardea Biosciences/Bayer),refametinib(AstraZeneca),RG422(Chugai Pharmaceutical Co.),

RO092210(Roche),RO4987655(Hoffmann-La Roche),RO5126766(Hoffmann-La Roche),司美替尼(AZD6244)(AstraZeneca),SL327(Sigma),TAK-733(Takeda),曲美替尼(Japan Tobacco),UO126(1,4-二氨基-2,3-二氰基-1,4-双(2-氨基苯硫基)丁二烯)(Sigma),WX-554(Wilex),YopJ多肽(Mittal等人,2010),其药学上可接受的盐及其组合。

[0120] 在该实施方案的一个方面,在施用BVD-523或其药学上可接受的盐后,核糖体s6激酶(RSK)的基本上所有磷酸化被抑制。如本文在RSK磷酸化的背景下所使用的,"基本上全部"是指减少大于50%的减少,优选大于55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%减少。

[0121] 在该实施方案的另一个方面,癌症具有MAPK活性。如本文所用,具有"MAPK活性"是指ERK下游的蛋白质仍然具有活性,即使ERK上游的蛋白质可能没活性。这种癌症可以是实体肿瘤癌症或血液癌症。

[0122] 在本发明中,癌症包括实体和血液学癌症。实体癌的非限制性实例包括肾上腺皮质癌,肛门癌,膀胱癌,骨癌(例如骨肉瘤),脑癌,乳腺癌,类癌,癌(carcinoma),宫颈癌,结肠癌,子宫内膜癌,食道癌,肝外胆汁导管癌,Ewing癌症家族,颅外生殖细胞癌,眼癌,胆囊癌,胃癌,生殖细胞肿瘤,妊娠滋养细胞肿瘤,头颈癌,下咽癌,胰岛细胞癌,肾癌,大肠癌,喉癌,白血病,唇癌和口腔癌,肝肿瘤/癌,肺肿瘤/癌,淋巴瘤,恶性间皮瘤,Merkel细胞癌,蕈样真菌病,骨髓增生异常综合征,骨髓增生性疾病,鼻咽癌,神经母细胞瘤,口腔癌,口咽癌,骨肉瘤,卵巢上皮癌,卵巢生殖细胞癌,胰腺癌,鼻窦和鼻腔癌,甲状旁腺癌,阴茎癌,垂体癌,浆细胞肿瘤,前列腺癌,横纹肌肉瘤,直肠癌,肾细胞癌,肾盂和输尿管的移行细胞癌,唾液腺癌,Sezary综合征,皮肤癌(如皮肤t细胞淋巴瘤,卡波西氏肉瘤,肥大细胞瘤和黑色素瘤),小肠癌,软组织肉瘤,胃癌,睾丸癌,胸腺瘤,甲状腺癌,尿道癌,子宫癌,阴道癌,外阴癌和肾母细胞瘤。

[0123] 血液学癌症的实例包括但不限于白血病,例如成人/儿童急性淋巴细胞白血病、成人/儿童急性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病和毛细胞白血病,淋巴瘤,例如艾滋病相关淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、成人/儿童霍奇金淋巴瘤、蕈样真菌病、成人/儿童非霍奇金淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤、Sézary综合征、皮肤T细胞淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症,以及其他增殖性疾病,如慢性骨髓增生性疾病、朗格汉斯细胞组织细胞增生症、多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤、骨髓增生异常综合征和骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤。

[0124] 优选地,癌症选自大肠癌、乳腺癌、胰腺癌、皮肤癌和子宫内膜癌。更优选地,癌症是黑素瘤。

[0125] 在该实施方案的另一个方面,所述方法还包括向受试者施用有效治疗或改善癌症的作用的至少一种另外的治疗剂。所述另外的治疗剂可以选自抗体或其片段、细胞毒性剂、毒素、放射性核素、免疫调节剂、光活性治疗剂、放射增敏剂、激素、抗血管生成剂和其组合。

[0126] 如本文所用,"抗体"包括天然存在的免疫球蛋白以及非天然存在的免疫球蛋白,包括例如单链抗体,嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)和异源偶联抗体(例如,双特异性抗体)。抗体的片段包括结合抗原的那些(例如,Fab'、F(ab')$_2$、Fab、Fv和rIgG)。还参见例如Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,IL);Kuby,J.,Immunology,3rd Ed.,W.H.Freeman&Co.,New York(1998)。术语抗体还包括二价或双特

异性分子、双抗体、三抗体和四抗体。术语“抗体”还包括多克隆和单克隆抗体。

[0127] 可用于本发明的治疗性抗体的实例包括利妥昔单抗(Rituxan)、西妥昔单抗(Erbitux)、贝伐单抗(Avastin)和替伊莫单抗(Ibritumomab)(Zevalin)。

[0128] 根据本发明的细胞毒性剂包括DNA损伤剂、抗代谢物、抗微管剂、抗生素剂等。DNA损伤剂包括烷化剂、基于铂的药剂、嵌入剂和DNA复制抑制剂。DNA烷化剂的非限制性实例包括环磷酰胺,氮芥(mechlorethamine),乌拉莫司汀(uramustine),美法仑,苯丁酸氮芥,异环磷酰胺,卡莫司汀,洛莫司汀,链脲霉素,白消安,替莫唑胺,其药学上可接受的盐、前药及其组合。基于铂的药剂的非限制性实例包括顺铂,卡铂,奥沙利铂,奈达铂,沙铂,四硝酸三铂,其药学上可接受的盐、前药及其组合。嵌入剂的非限制性实例包括多柔比星,柔红霉素,伊达比星,米托蒽醌,其药学上可接受的盐、前药和它们的组合。DNA复制抑制剂的非限制性实例包括伊立替康,托泊替康,安吖啶,依托泊苷,磷酸依托泊苷,替尼泊苷,其药学上可接受的盐、前药及其组合。抗代谢物包括叶酸拮抗剂例如甲氨蝶呤和前甲氨喋呤,嘌呤拮抗剂例如6-巯基嘌呤、达卡巴嗪和氟达拉滨,以及嘧啶拮抗剂例如5-氟尿嘧啶、阿拉伯糖基胞嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、地西他滨,其药学上可接受的盐、前药及其组合。抗微管剂包括但不限于长春花生物碱,紫杉醇(**Taxol®**),多西他赛(**Taxotere®**)和伊沙匹隆(**Ixempil®**)。抗生素剂包括但不限于放线菌素,蒽环霉素,戊柔比星(valrubicin),表柔比星,博来霉素,光辉霉素,丝裂霉素,其药学上可接受的盐、前药及其组合。

[0129] 根据本发明的细胞毒性剂还包括PI3K/Akt途径的抑制剂。PI3K/Akt途径的抑制剂的非限制性实例包括A-674563(CAS#552325-73-2),AGL 2263,AMG-319(Amgen,Thousand Oaks,CA),AS-041164(5-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基亚甲基-噻唑烷-2,4-二酮),AS-604850(5-(2,2-二氟-苯并[1,3]二氧杂环戊烯-5-基亚甲基)-噻唑烷-2,4-二酮),AS-605240(5-喹喔啉-6-亚甲基-1,3-噻唑烷-2,4-二酮),AT7867(CAS#857531-00-1),苯并咪唑系列,Genentech(Roche Holdings Inc.,South San Francisco,CA),BML-257(CAS#32387-96-5),CAL-120(Gilead Sciences,Foster City,CA),CAL-129(Gilead Sciences),CAL-130(Gilead Sciences),CAL-253(Gilead Sciences),CAL-263(Gilead Sciences),CAS#612847-09-3,CAS#681281-88-9,CAS#75747-14-7,CAS#925681-41-0,CAS#98510-80-6,CCT128930(CAS#885499-61-6),CH5132799(CAS#1007207-67-1),CHR-4432(Chroma Therapeutics,Ltd.,Abingdon,UK),FPA 124(CAS#902779-59-3),GS-1101(CAL-101)(Gilead Sciences),GSK 690693(CAS#937174-76-0),H-89(CAS#127243-85-0),Honokiol,IC87114(Gilead Science),IPI-145(Intellikine Inc.),KAR-4139(Karus Therapeutics,Chilworth,UK),KAR-4141(Karus Therapeutics),KIN-1(Karus Therapeutics),KT 5720(CAS#108068-98-0),米替福新(Miltefosine),MK-2206二盐酸盐(CAS#1032350-13-2),ML-9(CAS#105637-50-1),盐酸纳曲吲哚(Naltrindole Hydrochloride),OXY-111A(NormOxys Inc.,Brighton,MA),哌立福辛,PHT-427(CAS#1191951-57-1),PI3激酶δ抑制剂,Merck KGaA(Merck&Co.,Whitehouse Station,NJ),PI3激酶δ抑制剂,Genentech(Roche Holdings Inc.),PI3激酶δ抑制剂,Incozen(Incozen Therapeutics,Pvt.Ltd.,Hydrabad,India),PI3激酶δ抑制剂-2,Incozen(Incozen Therapeutics),PI3激酶抑制剂,Roche-4(Roche Holdings Inc.),PI3激酶抑制剂,Roche(Roche Holdings Inc.),PI3激酶抑制剂,Roche-5(Roche Holdings Inc.),PI3-α/δ抑制

剂,Pathway Therapeutics(Pathway Therapeutics Ltd.,South San Francisco,CA),PI3-δ抑制剂,Cellzome(Cellzome AG,Heidelberg,Germany),PI3-δ抑制剂,Intellikine(Intellikine Inc.,La Jolla,CA),PI3-δ抑制剂,Pathway Therapeutics-1(Pathway Therapeutics Ltd.),PI3-δ抑制剂,Pathway Therapeutics-2(Pathway Therapeutics Ltd.),PI3-δ/γ抑制剂,Cellzome(Cellzome AG),PI3-δ/γ抑制剂,Cellzome(Cellzome AG),PI3-δ/γ抑制剂,Intellikine(Intellikine Inc.),PI3-δ/γ抑制剂,Intellikine(Intellikine Inc.),PI3-δ/γ抑制剂,Pathway Therapeutics(Pathway Therapeutics Ltd.),PI3-δ/gamma抑制剂,Pathway Therapeutics(Pathway Therapeutics Ltd.),PI3-γ抑制剂Evotec(Evotec),PI3-γ抑制剂,Cellzome(Cellzome AG),PI3-γ抑制剂,Pathway Therapeutics(Pathway Therapeutics Ltd.),PI3Kδ/γ抑制剂,Intellikine-1(Intellikine Inc.),PI3Kδ/γ抑制剂,Intellikine-1(Intellikine Inc.),pictilisib(Roche Holdings Inc.),PIK-90(CAS#677338-12-4),SC-103980(Pfizer,New York,NY),SF-1126(Semafore Pharmaceuticals,Indianapolis,IN),SH-5,SH-6,Tetrahydro Curcumin,TG100-115(Targegen Inc.,San Diego,CA),Triciribine,X-339(Xcovery,West Palm Beach,FL),XL-499(Evotech,Hamburg,Germany),其药学上可接受的盐及其组合。

[0130] 在本发明中,术语“毒素”是指植物或动物来源的抗原毒物或毒液。一个实例是白喉毒素或其部分。

[0131] 在本发明中,术语“放射性核素”是指施用于患者的放射性物质,例如通过静脉内或口服,之后它通过患者的正常代谢渗透到靶器官或组织中,在那里它短时间内递送局部放射线。放射性核素的实例包括但不限于I-125、At-211、Lu-177、Cu-67、I-131、Sm-153、Re-186、P-32、Re-188、In-114m和Y 90。

[0132] 在本发明中,术语“免疫调节剂”是指通过增强或降低免疫系统产生抗体或致敏细胞的能力来改变免疫应答的物质,所述抗体或致敏细胞识别起始其产生的抗原并与之反应。免疫调节剂可以是重组的、合成的或天然的制剂,并且包括细胞因子、皮质类固醇、细胞毒性剂、胸腺素和免疫球蛋白。一些免疫调节剂天然存在于体内,并且其中某些免疫调节剂可用于药理学制剂中。免疫调节剂的实例包括但不限于粒细胞集落刺激因子(G-CSF),干扰素,咪喹莫特(imiguimod)和来自细菌的细胞膜级分,IL-2,IL-7,IL-12,CCL3,CCL26,CXCL7,和合成的胞嘧啶磷酸鸟苷(CpG)。

[0133] 在本发明中,术语“光激活治疗剂”是指在暴露于光时变得有活性的化合物和组合物。光激活治疗剂的某些实例公开于例如美国专利申请序列号2011/0152230 A1,“用于血压调节和癌症疗法的光活性金属亚硝酰基”中。

[0134] 在本发明中,术语“放射增敏剂”是指使肿瘤细胞对放射疗法更敏感的化合物。放射增敏剂的实例包括(misonidazole)、甲硝唑、替拉扎明(tirapazamine)和反式藏花酸钠。

[0135] 在本发明中,术语“激素”是指由在身体的一部分中的细胞释放的,影响身体另一部分中的细胞的物质。激素的实例包括但不限于前列腺素,白三烯,前列环素,血栓素,淀粉素,抗苗勒管激素,脂联素,促肾上腺皮质激素,血管紧张素原,血管紧张素,加压素,心房肽(atriopeptin),脑利钠肽,降钙素,缩胆囊素,促肾上腺皮质激素释放激素,脑啡肽,内皮素,促红细胞生成素,卵泡刺激素,甘丙肽,胃泌素,胃饥饿素(ghrelin),胰高血糖素,促性腺激素释放激素,生长激素释放激素,人绒毛膜促性腺激素,人胎盘催乳素,生长激素,抑制

素，胰岛素，生长调节素，瘦素，促脂素(liptropin)，促黄体激素，黑素细胞刺激素，胃动素，食欲素(orexin)，催产素，胰多肽，甲状旁腺激素，催乳素，催乳素释放激素，松弛素，肾素，分泌素，生长抑素，促血小板生成素，促甲状腺激素，睾酮，脱氢表雄酮，雄烯二酮，二氢睾酮，醛固酮，雌二醇，雌酮，雌三醇，皮质醇，黄体酮，骨化三醇和骨化二醇。

[0136] 一些化合物干扰某些激素的活性或阻止某些激素的产生。这些激素干扰化合物包括但不限于他莫昔芬(**Nolvadex®**)，阿那曲唑(**Arimidex®**)，来曲唑(**Femara®**)和氟维司群(**Faslodex®**)。这些化合物也在本发明中激素的含义内。

[0137] 如本文所用，“抗血管生成”剂是指减少或抑制新血管生长的物质，例如血管内皮生长因子(VEGF)的抑制剂和内皮细胞迁移的抑制剂。抗血管生成剂包括但不限于2-甲氧基雌二醇，血管抑制素，贝伐单抗，软骨衍生的血管生成抑制因子，内皮抑素，IFN-α，IL-12，伊曲康唑，利诺胺(linomide)，血小板因子-4，催乳素，SU5416，苏拉明，塔斯喹莫德(tasquinimod)，tecogalan，四硫代钼酸盐，沙利度胺，血小板反应蛋白，血小板反应蛋白，TNP-470，ziv-aflibercept，其药学上可接受的盐、前药及其组合。

[0138] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的方法。所述方法包括：

[0139] (a)鉴定患有对BRAF抑制剂疗法、MEK抑制剂疗法或BRAF和MEK抑制剂疗法变得难治或抗性的癌症的受试者；和

[0140] (b)给患有所述难治的或抗性的癌症的受试者施用有效量的ERK抑制剂，其为BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0141] 合适的和优选的受试者如本文所公开。在该实施方案中，所述方法可用于治疗上文公开的癌症。根据本发明，所述癌症具有MAPK活性。

[0142] 在该实施方案的一个方面，鉴定患有对BRAF和/或MEK抑制剂疗法难治的或抗性的癌症的受试者包括：

[0143] (a)从受试者获得生物样品；和

[0144] (b)筛选样品以确定受试者是否已经对选自BRAF抑制剂疗法、MEK抑制剂疗法及其组合的抑制剂疗法变得有抗性。

[0145] 在本发明中，生物样品包括但不限于血液，血浆，尿液，皮肤，唾液和活组织检查样品。通过本领域已知的常规程序和方法从受试者获得生物样品。

[0146] 优选地，筛选对BRAF抑制剂疗法难治的或抗性的癌症可包括，例如，鉴定(i)RAF同种型之间的转换，(ii)RTK或NRAS信号传导的上调，(iii)有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号传导的再激活，(iv)MEK激活突变的存在，及其组合。

[0147] RAF同种型之间的转换可发生在对BRAF抑制剂疗法具有获得性抗性的受试者中。为了检测这种转换，可以从患者中回收BRAF抑制剂抗性肿瘤细胞，并在BRAF抑制剂存在下通过Western印迹对ERK和磷酸-ERK水平进行分析。与用BRAF抑制剂处理的BRAF抑制剂敏感细胞的比较可以揭示BRAF抑制剂抗性肿瘤细胞中更高水平的磷酸-ERK，这意味着发生了转换，其中另一种RAF同种型磷酸化ERK而不是BRAF。确认哪种RAF同种型已经接管可能涉及在暴露于BRAF抑制剂的BRAF抑制剂抗性细胞中对ARAF和CRAF分别地进行sh/siRNA介导的敲低，然后对ERK和磷酸-ERK水平进行随后的Western印迹。例如，如果在暴露于BRAF抑制剂的BRAF抑制剂抗性细胞中的ARAF敲低仍导致高水平的磷酸-ERK，则表明CRAF已接管磷酸化

ERK。同样，如果在暴露于BRAF抑制剂的BRAF抑制剂抗性细胞中的CRAF被敲低，并且ERK仍然高度磷酸化，则意味着ARAF已经接管了ERK磷酸化。RAF同种型转换还可能涉及在BRAF抑制剂存在下，BRAF抑制剂抗性细胞中ARAF和CRAF的同时敲低，有效阻断所有RAF介导的磷酸化。由此导致的ERK磷酸化降低表明BRAF抑制剂抗性细胞具有在RAF同种型之间转换以磷酸化ERK的能力(Villanueva等人，2010)。

[0148] RTK或NRAS信号传导的上调也可能是BRAF抑制剂抗性的原因。检测可以例如首先涉及使用具有磷酸特异性抗体的Western印迹方案来分析下游RAF效应子MEK1/2和ERK1/2的激活。如果BRAF抑制剂抗性细胞在BRAF抑制剂存在下显示出这些蛋白质的高激活水平，则可能RTK或NRAS上调是其原因。与BRAF抑制剂敏感细胞相比，在BRAF抑制剂存在下BRAF抑制剂抗性细胞的基因表达谱(或其他相关方法)可揭示KIT、MET、EGFR和PDGFRβRTK的更高表达水平。关注任何这些基因的实时定量聚合酶链反应实验或其他类似程序可确认更高的表达水平，而磷酸-RTK阵列(R&D Systems，Minneapolis，MN)可显示升高的激活相关酪氨酸磷酸化。备选地，可以通过各种基因测序方案检测NRAS激活。NRAS中的激活突变，尤其是Q61K，可能表明已绕过B-RAF信号传导。在黑素瘤细胞中，激活的NRAS使用C-RAF向MEK-ERK发出信号。因此，激活的NRAS可以在暴露于BRAF抑制剂的BRAF抑制剂抗性细胞中实现类似的旁路途径。在给定的BRAF抑制剂抗性样品中进一步证实这些机制可以通过例如在BRAF抑制剂存在下使用对上调的RTK或激活的NRAS的sh/siRNA介导的敲低来完成。任何显著水平的生长抑制可能表明RTK或NRAS信号传导的上调是该特定样品中BRAF抑制的原因(Nazarian等人，2010)。

[0149] 检测BRAF抑制剂抗性细胞中MAPK信号传导的再激活可指示BRAF抑制剂抗性的另一种旁路机制。已显示COT和C-RAF在暴露于BRAF抑制剂的BRAF V600E背景中上调。定量实时RT-PCR例如可以显示在BRAF抑制剂存在下BRAF抑制剂抗性细胞中增加的COT表达。此外，在BRAF抑制剂存在下BRAF抑制剂抗性细胞中对COT的sh/siRNA介导的敲低可能降低BRAF抑制剂抗性细胞的活力，表明这些特定细胞可以对COT抑制和/或组合BRAF抑制剂/MEK抑制剂治疗敏感(Johannessen等人，2010)。

[0150] 通过激活MEK1中的突变，也可以在BRAF抑制剂抗性背景中完成MAPK信号传导的再激活。对来自BRAF抑制剂抗性肿瘤的基因组DNA的靶向的大规模平行测序可揭示MEK1中的激活突变，例如C121S、G128D、N122D和Y130等。MEK1中的其他无记录突变可以通过例如在BRAF抑制剂敏感细胞系如A375中表达特定突变来分析。测定在暴露于BRAF抑制剂时这些细胞中的生长抑制水平可以表明该MEK1突变是否导致对BRAF抑制疗法的抗性。为了证实这一发现，对异位表达MEK1突变的细胞中升高水平的磷酸-ERK1/2的Western印迹可以表明MEK1突变允许BRAF抑制剂抗性肿瘤绕过BRAF并通过MEK1促进ERK的磷酸化(Wagle等人，2011)。

[0151] 根据本发明，筛选对MEK抑制剂疗法难治的或抗性的癌症可以包括，例如，鉴定(i)突变体BRAF的扩增，(ii)STAT3上调，(iii)MEK的变构口袋中直接阻断抑制剂与MEK的结合或导致组成型MEK活性及其组合的突变。

[0152] 突变体BRAF的扩增可以引起MEK抑制剂抗性。MEK抑制剂抗性通常与在MEK抑制剂存在下高水平的磷酸化的ERK和MEK相关，其可以通过例如Western印迹进行评估。可以通过例如来自抗性细胞系的基因组DNA的荧光原位杂交(FISH)或定量PCR来检测MEK抑制剂抗性细胞系中突变体BRAF的扩增。确认BRAF扩增是MEK抑制剂抗性的主要原因可能需要在抗性

细胞中使用BRAF靶向的sh/siRNA。如果观察到MEK或ERK磷酸化显著降低，则BRAF扩增可能是进一步治疗方法的合适靶。(Corcoran等人，2010)。

[0153] 鉴定STAT3上调可以指示特定肿瘤样品对MEK抑制剂疗法具有抗性。全基因组表达谱可以揭示STAT3途径在肿瘤中上调。其他技术，例如磷酸-STAT3的Western印迹和对STAT途径相关基因JAK1和IL6ST的实时qPCR可揭示上调的STAT3。进一步证实STAT3上调在特定样品中引起MEK抑制剂抗性可包括在样品中使用针对STAT3的sh/siRNA，然后对MEK和ERK激活以及磷酸-STAT3和总STAT3进行适当的Western印迹。生长抑制研究可显示STAT3敲低事先使MEK抑制剂抗性细胞对MEK抑制敏感。如果样品暴露于STAT3抑制剂如JSI-124，则可以看到类似的效果。进一步确认STAT3上调是特定肿瘤中MEK抑制剂抗性的原因可能来自对BIM(包括BIM-EL、BIM-L和BIM-SL)表达的Western印迹。BIM表达导致MEK抑制剂诱导的细胞凋亡，因此STAT3上调可降低BIM水平。已知STAT3调节miR17-92的表达，后者抑制BIM表达。上调的STAT3可导致更高水平的miR17-92，这将降低BIM水平并促进对MEK抑制的抗性。因此，miR17-92水平的实时qPCR也可以帮助评估STAT3上调是否在特定样品中引起MEK抑制抗性。(Dai等人，2011)。

[0154] 可以通过下文公开的方法检测MEK的变构口袋中可以直接阻断抑制剂与MEK的结合或导致组成型MEK活性的突变。Emery及其同事(Emery等人，2009)以及Wang及其同事(Wang等人，2011)先前已经确定了这种突变。其他突变可能影响位于N端负调节螺旋内或邻接的MEK1密码子，例如P124L和Q56P。(同上)。

[0155] 用于鉴定核酸(例如上述鉴定的MEK基因)中突变的方法是本领域已知的。可以从生物样品中获得核酸。在本发明中，生物样品包括但不限于血液、血浆、尿、皮肤、唾液和活组织检查样品。通过本领域已知的常规程序和方法从受试者获得生物样品。

[0156] 用于鉴定突变的方法的非限制性实例包括PCR、测序、杂交捕获、溶液内捕获、分子倒置探针、荧光原位杂交(FISH)测定法及其组合。

[0157] 各种测序方法是本领域已知的。这些包括但不限于Sanger测序(也称为双脱氧测序)和各种边合成边测序(SBS)方法，如例如Metzker 2005中公开的，通过杂交测序，通过连接测序(例如，WO 2005021786)，通过降解测序(例如，美国专利号5,622,824和6,140,053)和纳米孔测序(其可从Oxford Nanopore Technologies，UK商购获得)来获得。在深度测序技术中，在测序过程中，序列中的给定核苷酸被多次读取。深度测序技术公开在例如美国专利公开号20120264632和国际专利公开号WO2012125848中。

[0158] 用于检测突变的基于PCR的方法是本领域已知的并且采用PCR扩增，其中样品中的每个靶序列具有相应的一对独特的序列特异性引物。例如，聚合酶链反应-限制性片段长度多态性(PCR-RFLP)方法允许在通过PCR扩增基因组序列后快速检测突变。通过用特定的限制性内切核酸酶消化来区分突变，并通过电泳鉴定。参见，例如，Ota等人，2007。也可以使用实时PCR检测突变。参见，例如，国际申请公开号WO2012046981。

[0159] 杂交捕获方法是本领域已知的，并公开于例如美国专利公开号20130203632和美国专利号8,389,219和8,288,520中。这些方法基于靶基因组区域与用户设计的寡核苷酸的选择性杂交。杂交可以是与固定化在高密度或低密度微阵列上的寡核苷酸(阵列上捕获)，或与用配体(例如生物素)修饰的寡核苷酸的溶液相杂交，其随后可以固定化到固体表面，例如珠子(在溶液中捕获)。

[0160] 分子倒置探针(MIP)技术是本领域已知的并且公开在例如Absalan等人,2008中。所述方法使用MIP分子,其是用于基因分型的特定“挂锁”探针(Nilsson等人,1994)。MIP分子是线性寡核苷酸,其包含特定区域、通用序列、限制性位点和Tag(索引)序列(16-22bp)。MIP直接在目标遗传标记物/SNP周围杂交。MIP方法还可以使用许多平行与基因组DNA杂交的“挂锁”探针组(Hardenbol等人,2003)。在完美匹配的情况下,通过在构型中进行反转(如技术名称所示)并产生环状分子来连接基因组同源区。在第一次限制后,用通用引物扩增所有分子。再次限制扩增子以确保用于微阵列上杂交的短片段。对生成的短片段加标签,并通过Tag序列与阵列上的cTag(索引的互补链)杂交。在Tag-cTag双链体形成之后,检测到信号。

[0161] 下面的表1、2和3显示了序列表中来自各种动物的野生型BRAF、N-RAS和MEK1的代表性核酸和氨基酸序列的SEQ ID No。这些序列可用于鉴定具有突变体BRAF、N-RAS和MEK1基因型的受试者的方法中。

[0162] 表1-BRAF序列

[0163]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体	其他信息
1	核酸	人	
2	多肽	人	
3	核酸	大鼠 (Rattus norvegicus)	
4	多肽	大鼠 (Rattus norvegicus)	
5	核酸	小鼠, Mus musculus	
6	多肽	小鼠, Mus musculus	
7	核酸	兔, Oryctolagus cuniculus	
8	多肽	兔, Oryctolagus cuniculus	
9	核酸	豚鼠, Cavia porcellus	
10	多肽	豚鼠, Cavia porcellus	
11	核酸	狗, Canis lupus familiaris	变体 x1

[0164]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体	其他信息
12	多肽	狗, Canis lupus familiaris	变体 x1
13	核酸	狗, Canis lupus familiaris	变体 x2
14	多肽	狗, Canis lupus familiaris	变体 x2
15	核酸	猫, Felis catus	
16	多肽	猫, Felis catus	
17	核酸	牛, Bos taurus	变体 X1
18	多肽	牛, Bos taurus	变体 X1
19	核酸	牛, Bos taurus	变体 X2
20	多肽	牛, Bos taurus	变体 X2
21	核酸	牛, Bos taurus	变体 X3
22	多肽	牛, Bos taurus	变体 X3
23	核酸	牛, Bos taurus	变体 X4
24	多肽	牛, Bos taurus	变体 X4
25	核酸	牛, Bos taurus	变体 X5
26	多肽	牛, Bos taurus	变体 X5
27	核酸	牛, Bos taurus	变体 X6
28	多肽	牛, Bos taurus	变体 X6
29	核酸	牛, Bos taurus	变体 X7
30	多肽	牛, Bos taurus	变体 X7
31	核酸	牛, Bos taurus	变体 X8
32	多肽	牛, Bos taurus	变体 X8
33	核酸	牛, Bos taurus	变体 X9
34	多肽	牛, Bos taurus	变体 X9
35	核酸	牛, Bos taurus	变体 X10
36	多肽	牛, Bos taurus	变体 X10
37	核酸	牛, Bos taurus	变体 X11
38	多肽	牛, Bos taurus	变体 X11

[0165]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体	其他信息
39	核酸	牛, Bos taurus	变体 2
40	多肽	牛, Bos taurus	变体 2
41	核酸	马, Equus caballus	
42	多肽	马, Equus caballus	
43	核酸	鸡, Gallus gallus	
44	多肽	鸡, Gallus gallus	

[0166] 表2—N-RAS序列

[0167]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体	其他信息
45	核酸	人	
46	多肽	人	
47	核酸	大鼠 (Rattus norvegicus)	
48	多肽	大鼠 (Rattus norvegicus)	
49	核酸	小鼠, Mus musculus	
50	多肽	小鼠, Mus musculus	
51	核酸	豚鼠, Cavia porcellus	
52	多肽	豚鼠, Cavia porcellus	
53	核酸	豚鼠, Cavia porcellus	变体 X1
54	多肽	豚鼠, Cavia porcellus	变体 X1
55	核酸	狗, Canis lupus familiaris	
56	多肽	狗, Canis lupus familiaris	
57	核酸	猫, Felis catus	
58	多肽	猫, Felis catus	
59	核酸	牛, Bos taurus	
60	多肽	牛, Bos taurus	
61	核酸	鸡, Gallus gallus	

[0168]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体	其他信息
62	多肽	鸡, Gallus gallus	

[0169] 表3——MEK1序列

[0170]

SEQ ID NO.	多肽或核酸序列	生物体
63	核酸	人
64	多肽	人
65	核酸	大鼠 (Rattus norvegicus)
66	多肽	大鼠 (Rattus norvegicus)
67	核酸	小鼠, Mus musculus
68	多肽	小鼠, Mus musculus
69	核酸	兔, Oryctolagus cuniculus
70	多肽	兔, Oryctolagus cuniculus
71	核酸	豚鼠, Cavia porcellus
72	多肽	豚鼠, Cavia porcellus
73	核酸	狗, Canis lupus familiaris
74	多肽	狗, Canis lupus familiaris
75	核酸	猫, Felis catus
76	多肽	猫, Felis catus
77	核酸	牛, Bos taurus
78	多肽	牛, Bos taurus
79	核酸	马, Equus caballus
80	多肽	马, Equus caballus
81	核酸	鸡, Gallus gallus
82	多肽	鸡, Gallus gallus

[0171] 在该实施方案的另一个方面,所述方法还包括施用至少一种另外的治疗剂,优选PI3K/Akt途径的抑制剂,如本文所公开的。

[0172] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的方法,所述癌症对BRAF抑制剂疗法、MEK抑制剂疗法或两者都是难治的或抗性的。所述方法包括向受试者施用有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0173] 合适的和优选的受试者如本文所公开。在该实施方案中，所述方法可用于治疗上文公开的癌症，包括具有上文鉴定的突变背景、抗性谱和MAPK活性的那些癌症。鉴定此类突变的方法也如上所述。

[0174] 在该实施方案的另一个方面，所述方法还包括向受试者施用至少一种另外的治疗剂，优选PI3K/Akt途径的抑制剂，如本文所公开的。

[0175] 本发明的另一个实施方案是用于鉴定将受益于使用ERK抑制剂的疗法的患有癌症的受试者的方法。所述方法包括：

[0176] (a)从受试者获得生物样品；和

[0177] (b)筛选样品以确定受试者是否具有以下一种或多种标记物：

[0178] (i)RAF同种型之间的转换，

[0179] (ii)RTK或NRAS信号传导的上调，

[0180] (iii)有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号传导的再激活，

[0181] (iv)MEK激活突变的存在，

[0182] (v)突变体BRAF的扩增，

[0183] (vi)STAT3上调，

[0184] (vii)MEK的变构口袋中直接阻断抑制剂与MEK的结合或导致组成型MEK活性的突变，

[0185] 其中一种或多种标志物的存在证实受试者的癌症对BRAF和/或MEK抑制剂疗法是难治的或抗性的，并且受试者将受益于使用ERK抑制剂的疗法，所述ERK抑制剂是BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0186] 合适的和优选的受试者如本文所公开。在该实施方案中，所述方法可用于鉴定患有上文公开的癌症的受试者，包括具有上文鉴定的突变背景、抗性谱和MAPK活性的那些癌症。鉴定此类突变的方法也如上所述。

[0187] 在该实施方案的一个方面，所述方法还包括将BVD-523或其药学上可接受的盐施用给具有一种或多种所述标志物的受试者。优选地，所述方法还包括向具有一种或多种所述标志物的受试者施用至少一种另外的治疗剂，优选PI3K/Akt途径的抑制剂，如本文所公开。

[0188] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的药物组合物，所述癌症对非ERK MAPK途径疗法是难治的或抗性的。所述组合物包含药学上可接受的载体或稀释剂和有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0189] 合适的和优选的受试者和非ERK MAPK途径抑制剂疗法的类型如本文所公开。在该实施方案中，所述药物组合物可用于治疗上文公开的癌症，包括具有上文鉴定的突变背景、抗性谱和MAPK活性的那些癌症。鉴定此类突变的方法也如上所述。

[0190] 在该实施方案的一个方面，所述药物组合物还包含至少一种另外的治疗剂，优选PI3K/Akt途径的抑制剂，如本文所公开。

[0191] 本发明的另一个实施方案是用于治疗或改善受试者中癌症的作用的试剂盒，所述癌症对非ERK MAPK途径疗法是难治的或抗性的。所述试剂盒包含根据本发明的任何药物组合物，与其使用说明书一起包装。

[0192] 所述试剂盒还可以包括用于每种药物组合物和其他反应剂(例如缓冲剂、平衡盐

溶液等)的合适的储存容器,例如安瓿、小瓶、管等,用于将药物组合物施用给受试者。所述药物组合物和其他反应剂可以以任何方便的形式存在于试剂盒中,例如以溶液或粉末形式。所述试剂盒可以进一步包括包装容器,任选地具有一个或多个分隔区,用于容纳所述药物组合物和其他任选的试剂。

[0193] 合适的和优选的受试者和非ERK MAPK途径抑制剂疗法的类型如本文所公开。在该实施方案中,所述试剂盒可用于治疗上文公开的癌症,包括具有本文鉴定的突变背景、抗性谱和MAPK活性的那些癌症。鉴定此类突变的方法如上所述。

[0194] 在该实施方案的一个方面,所述试剂盒还包含至少一种另外的治疗剂,优选PI3K/Akt途径的抑制剂,如本文所公开。

[0195] 本发明的另一个实施方案是用于抑制癌细胞中RSK的磷酸化的方法,所述癌细胞对非ERK MAPK途径抑制剂是难治的或抗性的。所述方法包括使癌细胞与有效量的BVD-523或其药学上可接受的盐接触一段时间,所述一段时间足以使癌细胞中的RSK磷酸化得到抑制。在该实施方案中,“接触”是指使BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地一种或多种另外的治疗剂与癌细胞紧密接近。这可以使用向哺乳动物递送药物的常规技术来实现,或者在体外情况下通过例如将BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地其他治疗剂提供给癌细胞所在的培养基来实现。在离体情况下,可以通过例如向癌组织提供BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地其他治疗剂来进行接触。

[0196] 合适和优选类型的非ERK MAPK途径抑制剂如本文所公开。在该实施方案中,可以在具有如上所述的各种突变背景、抗性谱和MAPK活性的癌细胞中实现影响癌细胞死亡。鉴定此类突变的方法也如上所述。

[0197] 可以在体外、离体或体内进行的该实施方案的方法可以用于通过例如在本文公开的癌症类型的细胞中杀死癌细胞来实现癌细胞死亡。

[0198] 在该实施方案的一个方面,抑制大于50%的RSK磷酸化。在该实施方案的另一个方面,抑制大于75%的RSK磷酸化。在该实施方案的另一个方面,抑制大于90%的RSK磷酸化。在该实施方案的另一方面,抑制大于95%的RSK磷酸化。在该实施方案的另一个方面,抑制大于99%的RSK磷酸化。在该实施方案的另一个方面,抑制100%的RSK磷酸化。

[0199] 在该实施方案的另一个方面,癌细胞是哺乳动物癌细胞。优选地,哺乳动物癌细胞获自选自人、灵长类动物、农场动物和家养动物的哺乳动物。更优选地,哺乳动物癌细胞是人癌细胞。

[0200] 在该实施方案的另一个方面,接触步骤包括将BVD-523或药学上可接受的盐施用给从其获得癌细胞的受试者。

[0201] 在本发明中,“有效量”或“治疗有效量”的本文公开的化合物或组合物是这样的化合物或组合物的量,当施用给受试者时,其足以产生如本文所述的有益或所需结果。有效剂型、施用方式和剂量可以凭经验确定,并且进行这样的确定在本领域的技术范围内。本领域技术人员理解,剂量将随施用途径,排泄速率,治疗持续时间,所施用的任何其他药物的特性、哺乳动物(例如人类患者)的年龄、大小和种类,以及在医学和兽医学领域中众所周知的类似因素而变化。通常,根据本发明的化合物或组合物的合适剂量将是这样的组合物的量,其是有效产生所需作用的最低剂量。本发明化合物或组合物的有效剂量可以作为两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量施用,在一天中以适当的间隔分开施用。

[0202] 本文公开的BVD-523和其他抗癌剂的剂量的合适的非限制性实例是每天约1mg/kg至约2400mg/kg，例如每天约1mg/kg至约1200mg/kg，每天75mg/kg至每天约300mg/kg，包括每天约1mg/kg至约100mg/kg。这些试剂的其他代表性剂量包括每天约1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、500mg/kg、600mg/kg、700mg/kg、800mg/kg、900mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg、2000mg/kg、2100mg/kg、2200mg/kg和2300mg/kg。本文公开的BVD-523和其他抗癌剂的有效剂量可以作为两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量施用，在一天中以适当的间隔分开施用。

[0203] 本文公开的BVD-523、其他抑制剂和各种其他抗癌剂，或本发明的药物组合物可以以任何期望和有效的方式施用：用于口服摄入，或作为软膏或滴剂用于对眼睛进行局部施用，或以任何适当的方式进行肠胃外或其他施用，例如腹膜内、皮下、外用、皮内、吸入、肺内、直肠、阴道、舌下、肌肉内、静脉内、动脉内、鞘内或淋巴管内。此外，本文公开的BVD-523、其他抑制剂和各种其他抗癌剂，或本发明的药物组合物可以与其他治疗联合施用。如果需要，可以将BVD-523、其他抑制剂和本文公开的各种其他抗癌剂，或本发明的药物组合物进行包衣或以其他方式保护免受胃或其他的分泌物的影响。

[0204] 本发明的药物组合物包含一种或多种活性成分与一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体以及任选地一种或多种其他化合物、药物、成分和/或材料混合。无论选择何种施用途径，通过本领域技术人员已知的常规方法将本发明的试剂/化合物配制成药学上可接受的剂型。参见，例如，Remington，The Science and Practice of Pharmacy(第21版，Lippincott Williams和Wilkins，Philadelphia，PA)。

[0205] 药学上可接受的稀释剂或载体是本领域熟知的(参见，例如，Remington，The Science and Practice of Pharmacy(第21版，Lippincott Williams和Wilkins，Philadelphia，PA)和The National Formulary(American Pharmaceutical Association，Washington，D.C.))并且包括糖类(如乳糖、蔗糖、甘露醇和山梨糖醇)，淀粉，纤维素制剂，磷酸钙(如磷酸二钙、磷酸三钙和磷酸氢钙)，柠檬酸钠，水，水性溶液(例如，盐水、氯化钠注射液、林格氏注射液、右旋糖注射液、右旋糖和氯化钠注射液、乳酸林格氏注射液)，醇类(如乙醇、丙醇和苯甲醇)，多元醇(如甘油、丙二醇和聚乙二醇)，有机酯(如油酸乙酯和甘油三酯)，生物可降解的聚合物(如聚丙交酯-聚乙交酯、聚(原酸酯)和聚(酸酐))，弹性体基质，脂质体，微球，油(例如玉米、胚芽、橄榄、蓖麻、芝麻棉籽和花生)，可可脂，蜡(例如栓剂蜡)，石蜡，硅酮，滑石粉，硅酸盐等。在与制剂的其他成分相容并且对受试者无害的意义上，用于本发明药物组合物的每种药学上可接受的稀释剂或载体必须是“可接受的”。适用于所选剂型和预期施用途径的稀释剂或载体是本领域熟知的，并且可以使用本领域普通技术确定用于所选剂型和施用方法的可接受的稀释剂或载体。

[0206] 任选地，本发明的药物组合物可含有药物组合物中常用的其他成分和/或材料。这些成分和材料是本领域公知的，包括(1)填充剂或增量剂，如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇和硅酸；(2)粘合剂，如羧甲基纤维素、藻酸盐、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、蔗糖和阿拉伯胶；(3)保湿剂，如甘油；(4)崩解剂，如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、

海藻酸、某些硅酸盐、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和碳酸钠；(5)溶液阻滞剂，如石蜡；(6)吸收剂，如季铵化合物；(7)润湿剂，如鲸蜡醇和甘油单硬脂酸酯；(8)吸收加速剂，如高岭土和膨润土；(9)润滑剂，如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇和十二烷基硫酸钠；(10)悬浮剂，如乙氧基化异硬脂醇、聚氧乙烯山梨糖醇和山梨糖醇酯、微晶纤维素、偏氢氧化铝、膨润土、琼脂和黄蓍胶；(11)缓冲剂；(12)赋形剂，如乳糖、奶糖(milk sugar)、聚乙二醇，动植物脂肪、油、蜡、石蜡、可可脂、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅酮、膨润土、硅酸、滑石、水杨酸盐、氧化锌、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺粉末；(13)惰性稀释剂，如水或其他溶剂；(14)防腐剂；(15)表面活性剂；(16)分散剂；(17)控制释放或吸收延迟剂，例如羟丙基甲基纤维素、其他聚合物基质、生物可降解的聚合物、脂质体、微球、单硬脂酸铝、明胶和蜡；(18)遮光剂；(19)佐剂；(20)润湿剂；(21)乳化和悬浮剂；(22)增溶剂和乳化剂，如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苯甲醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(特别是棉籽、花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、甘油、四氢呋喃醇、聚乙二醇和脱水山梨糖醇的脂肪酸酯；(23)推进剂，如氯氟烃和挥发性未取代的烃，如丁烷和丙烷；(24)抗氧化剂；(25)使制剂与预期接受者的血液等渗的试剂，如糖和氯化钠；(26)增稠剂；(27)包衣材料，如卵磷脂；(28)甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。在与配方的其他成分相容并且对受试者无害的意义上，每种这样的成分或材料必须是“可接受的”。适用于所选剂型和预期施用途径的成分和材料是本领域熟知的，并且可以使用本领域普通技术确定用于所选剂型和施用方法的可接受成分和材料。

[0207] 适于口服施用的本发明药物组合物可以是胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、粉末、颗粒、水性或非水性液体的溶液或悬浮液、水包油或油包水液体乳液、酏剂或糖浆、锭剂、大丸剂、干药糖剂或糊剂。这些制剂可以通过本领域已知的方法制备，例如通过常规的锅包衣、混合、制粒或冻干过程。

[0208] 用于口服施用的固体剂型(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉末、颗粒等)可以通过例如将活性成分与一种或多种药学上可接受的稀释剂或载体以及任选地一种或多种填充料、增量剂、粘合剂、保湿剂、崩解剂、溶液阻滞剂、吸收促进剂、润湿剂、吸收剂、润滑剂和/或着色剂混合来制备。使用合适的赋形剂，可以使用类似类型的固体组合物作为软和硬填充明胶胶囊中的填充剂。片剂可以通过压制或模塑制备，任选地含有一种或多种辅助成分。可以使用合适的粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂、表面活性剂或分散剂制备压制的片剂。模制片剂可以通过在合适的机器中模制来制备。片剂和其它固体剂型，例如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒，可任选地用包衣和外壳进行刻痕或制备，例如肠溶包衣和药物配制领域熟知的其它包衣。它们也可以配制成提供在其中的活性成分的缓慢或控制释放。它们可以通过例如通过细菌截留过滤器的过滤来灭菌。这些组合物还可以任选地含有遮光剂，并且可以是这样的组合物，使得它们仅在或优先地在胃肠道的某一部分释放活性成分，任选以延迟的方式。活性成分也可以是微胶囊形式。

[0209] 用于口服施用的液体剂型包括药学上可接受的乳液、微乳液、溶液、悬浮液、糖浆和酏剂。液体剂型可含有本领域常用的合适的惰性稀释剂。除惰性稀释剂外，口服组合物还可包括佐剂，如润湿剂、乳化和悬浮剂、甜味剂、调味剂、着色剂、芳香剂和防腐剂。悬浮液可能含有悬浮剂。

[0210] 用于直肠或阴道施用的本发明的药物组合物可以作为栓剂存在，其可以通过将一

种或多种活性成分与一种或多种合适的非刺激性稀释剂或载体混合来制备，所述非刺激性稀释剂或载体在室温是固体，但在体温是液体，并因此将在直肠或阴道腔中融化并释放活性化合物。适用于阴道施用的本发明的药物组合物还包括含有本领域已知为适当的药学上可接受的稀释剂或载体的子宫托、棉塞、乳膏、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0211] 用于外用或透皮施用的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏、糊剂、乳膏、洗剂、凝胶、溶液、贴剂、滴剂和吸入剂。活性剂/化合物可以在无菌条件下与合适的药学上可接受的稀释剂或载体混合。软膏、糊剂、乳膏和凝胶可含有赋形剂。粉末和喷雾剂可含有赋形剂和推进剂。

[0212] 适用于肠胃外施用的本发明的药物组合物可包含一种或多种试剂/化合物组合一种或多种药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳剂或者无菌粉末(可以在使用前重构成无菌可注射溶液或分散液)，其可含有合适的抗氧化剂、缓冲剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或者悬浮或增稠剂。例如，通过使用包衣材料，在分散体的情况下通过保持所需的粒度，以及通过使用表面活性剂，可以保持适当的流动性。这些药物组合物还可含有合适的佐剂，如润湿剂、乳化剂和分散剂。还可能需要包含等渗剂。此外，可以通过包含延迟吸收的试剂来延长可注射药物形式的吸收。

[0213] 在一些情况下，为了延长药物(例如药物制剂)的作用，期望减缓其从皮下或肌内注射的吸收。这可以通过使用水溶性差的结晶或无定形材料的液体悬浮液来实现。

[0214] 然后，活性剂/药物的吸收速率取决于其溶解速率，而溶解速率又取决于晶体大小和晶形。备选地，可以通过将活性剂/药物溶解或悬浮在油性媒介物中来实现胃肠外给药的试剂/药物的延迟吸收。可通过在生物可降解的聚合物中形成活性成分的微囊基质来制备可注射的储库形式。取决于活性成分与聚合物的比例和所用特定聚合物的性质，可以控制活性成分释放的速率。还通过将药物包埋在与身体组织相容的脂质体或微乳液中来制备储库可注射制剂。可注射材料可以例如通过细菌截留过滤器的过滤来灭菌。

[0215] 制剂可以在单位剂量或多剂量密封容器(例如安瓿和小瓶)中存在，并且可以在冻干条件下储存，仅需要在使用前即刻添加无菌液体稀释剂或载体，例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可由上述类型的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0216] 本发明提供了对非ERK MAPK途径抑制剂疗法难治的或抗性的癌症的治疗，并公开了显示增强ERK抑制剂的作用的组合。在本文中，申请人还表明，不同ERK抑制剂的组合同样具有协同作用。因此，预期通过使用一种或多种另外的ERK抑制剂可以进一步改善本文所述组合的作用。因此，本发明的一些实施方案包括一种或多种另外的ERK抑制剂。

[0217] 本发明还提供治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的方法，包括向受试者施用600mg BID的BVD-523或其药学上可接受的盐。

[0218] 在本发明的一些实施方案中，所述突变是$BRAF^{V600E}$突变。

[0219] 本发明还提供用于治疗患有不可切除或转移性BRAF600突变阳性黑素瘤的受试者的组合物，所述组合物包含600mg的BVD-523或其药学上可接受的盐和任选地药学上可接受的载体、佐剂或媒介物。

[0220] 提供以下实施例以进一步说明本发明的方法。这些实施例仅是说明性的，并不意图以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0221] 实施例1

[0222] 材料和方法

[0223] 在标准培养基和血清条件下将癌细胞系维持在细胞培养物中。对于剂量递增研究，将A375细胞分传，生长至约40-60％汇合，然后用初始剂量的特定药物处理。表4显示了递增的药物处理的总结。

[0224] 表4-递增的处理的总结

[0225]

处理	抑制剂
1	曲美替尼(MEKi)
2	达拉非尼(BRAFi)
3	BVD-523 (ERKi)
4	达拉非尼 (BRAFi) +曲美替尼(MEKi)

[0226]

5	达拉非尼 (BRAFi) + BVD-523 (ERKi)
6	曲美替尼(MEKi) + BVD-523 (ERKi)

[0227] 基于Little等人，2011进行单一试剂剂量递增，并在图20中概述。然后使细胞生长直至70-90％汇合并分传。分分传比尽可能保持“正常”并且在处理之间合理地保持一致(例如，亲本的正常分传比的最小50％)。培养基每3-4天更新一次。当细胞再次达到约40-60％汇合时，剂量递增。如果错过40-60％的窗口，则细胞再次分传并且一旦它们达到40-60％汇合就开始给药。同样，培养基每3-4天更新一次。根据需要重复该过程(图20)。

[0228] 对于单一试剂处理，起始浓度和剂量增加如下进行：以大约IC_{50}开始，以小增量递增，或者轻微地，对于最初的4-5剂量，使剂量加倍，对于下4个剂量以相同的增量增加，然后后续剂量的浓度增加1.5倍。

[0229] 对于组合处理，起始浓度和剂量增加如下进行：以每种化合物的大约IC_{50}的一半开始(组合测定法表明这将导致约40-70％的抑制范围)，按照单一试剂递增(即进行初始加倍，然后在接下来的4个剂量中增加相同的增量，然后是浓度的1.5倍增加)。表5显示了使用这些方案的预计剂量增加。

[0230] 表5-预计的剂量增加—第一个月

[0231]

				Dab/Tram		Dab/523		Tram/523	
给药	Tram (nM)	Dab (nM)	BVD-523 (μM)	Dab (nM)	Tram (nM)	Dab (nM)	523 (μM)	Tram (nM)	523 (μM)
1	1	5	0.16	2.5	0.5	2.5	0.08	0.5	0.08
2	2	10	0.32	5	1	5	0.16	1	0.16
3	3	15	0.48	7.5	1.5	7.5	0.24	1.5	0.24
4	4	20	0.64	10	2	10	0.32	2	0.32
5	5	25	0.80	12.5	2.5	12.5	0.40	2.5	0.40
6	8	38	1.2	19	4	19	0.6	4	0.6

[0232]

				Dab/Tram		Dab/523		Tram/523	
给药	Tram (nM)	Dab (nM)	BVD-523 (μM)	Dab (nM)	Tram (nM)	Dab (nM)	523 (μM)	Tram (nM)	523 (μM)
7	11	56	1.8	28	6	28	0.9	6	0.9
8	17	84	2.7	42	8	42	1.4	8	1.4
9	25	127	4.1	63	13	63	2.0	13	2.0
10	38	190	6.1	95	19	95	3.0	19	3.0
11	57	285	9.1	142	28	142	4.6	28	4.6
12	85	427	13.7	214	43	214	6.8	43	6.8
13	128	641	20.5	320	64	320	10.3	64	10.3
14	192	961	30.8	481	96	481	15.4	96	15.4
15	288	1442	46.1	721	144	721	23.1	144	23.1
16	432	2162	69.2	1081	216	1081	34.6	216	34.6
17	649	3244	103.8	1622	324	1622	51.9	324	51.9
18	973	4865	155.7	2433	487	2433	77.8	487	77.8
19	1460	7298	233.5	3649	730	3649	116.8	730	116.8
20	2189	10947	350.3	5474	1095	5474	175.2	1095	175.2

[0233] 克隆抗性细胞群通过有限稀释衍生自抗性细胞库。

[0234] 使用增殖测定法以适当的时间间隔(例如每个月,尽管时间取决于可获得的足够的细胞数量)追踪对递增的试剂的敏感性变化。对于增殖测定法,将细胞以每孔3000个细胞接种于96孔板在含有10％FBS的无药物DMEM培养基中,并在加入化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。从DMSO储备液制备化合物,得到最终浓度范围,如图2A-图2H所示。最终的DMSO浓度恒定为0.1％。将测试化合物与细胞在37℃和5％CO_2在湿润气氛中孵育96小时。然后加入Alamar蓝10％(v/v)并孵育4小时,并使用BMG FLUOstar板读取器检测荧光产物。推导出平均仅培养基背景值,并使用GraphPad Prism中的4-参数逻辑方程分析数据。紫杉醇用作阳性对照。

[0235] 使用在表6中所示每种试剂的浓度下生长的细胞,在第28天开始第1个月的增殖测定法。

[0236] 表6-增殖测定法中使用的药物的初始浓度-第1个月

[0237]

细胞系	Dab	Tram	BVD-523
亲本	-	-	-
Tram	-	2nM	-
Dab	15nM	-	-
BVD-523	-	-	0.48μM
Tram+Dab	5nM	1nM	-
Dab+BVD-523	7.5nM	-	0.24μM
Tram+BVD-523	-	1nM	0.16μM

[0238] 使用在表7中所示每种试剂的浓度下生长的细胞,在第56天开始第2个月的增殖测定法。

[0239] 表7-增殖测定法中使用的药物的初始浓度-第2个月

[0240]

细胞系	Dab	Tram	BVD-523
亲本	-	-	-
Tram	-	8nM	-
Dab	127nM	-	-
BVD-523	-	-	0.8μM
Tram+Dab	10nM	2nM	-
Dab+BVD-523	12.5nM	-	0.4μM
Tram+BVD-523	-	2nM	0.32μM

[0241] 在3个月递增期结束时,在最后一轮增殖测定法和可能的单细胞克隆之前,将培养物维持在最高浓度2周。由于增殖测定法/单细胞克隆需要活跃增殖的细胞,对于其中细胞在最高浓度下非常缓慢地增殖或仅最近递增的处理,备用培养物也保持在较低浓度(表8)。对于BVD-523处理,其中细胞似乎几乎完全停止生长并且在最高浓度(1.8μM)看起来特别脆弱,培养物维持在较低浓度持续2周的时间。

[0242] 表8-以固定浓度培养2周的处理细节

[0243]

处理	抑制剂	培养物 1	备用培养物
1	Tram	160 nM	80 nM
2	Dab	3.2 μM	-
3	BVD-523	1.2 μM	0.8 μM
4	Dab + Tram	D: 160 nM T: 30 nM	D: 80 nM T: 16 nM
5	Dab + BVD-523	D: 42 nM 523: 1.4 μM	D: 28 nM 523: 0.9 μM
6	Tram + BVD-523	T: 4 nM 523: 0.6 μM	T: 2.5 nM 523: 0.4 μM

[0244] 第3个月的增殖测定法使用在表9中所示每种试剂的浓度下生长的细胞。

[0245] 表9-增殖测定法中使用的药物的初始浓度-第3个月

[0246]

细胞系	Dab	Tram	BVD-523
亲本	-	-	-
Tram	-	160nM	-
Dab	3.2μM	-	-
BVD-523	-	-	1.2μM
Tram+Dab	80nM	16nM	-
Dab+BVD-523	28nM	-	0.9μM
Tram+BVD-523	-	2.5nM	0.4μM

[0247] 对于组合研究,将A375细胞(ATCC)以3000个细胞/孔的细胞密度接种在一式三份的96孔板中,在DMEM加10%FBS中,并在加入测试化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。使用10x8剂量矩阵测试组合,最终DMSO浓度为0.2%。接着进行96小时的测定法孵育期,随后加入Alamar蓝10%(v/v)并孵育4小时,然后在荧光板读数器上读数。在读取Alamar蓝后,将培养基/Alamar蓝混合物轻弹并加入100μl的CellTiter-Glo/PBS(1:1),并按照制造商(Promega)的说明处理板。在分析数据之前减去仅培养基背景值。然后应用Bliss加合模型。

[0248] 简言之,使用等式C_{bliss}=A+B-(A×B)计算组合抑制的预测的分数抑制值,其中A和B是单独的药物A或单独的药物B在特定浓度下获得的分数抑制。如果两种药物的组合是确切加合的,则C_{bliss}是预期的分数抑制。从实验观察到的分数抑制值中减去C_{bliss}值,得到'超过Bliss的过量'值。超过Bliss的过量值大于0表示协同作用,而小于0的值表示拮抗作用。将超过Bliss的过量值绘制为热图±SD。

[0249] 单一和组合数据也呈现为GraphPad Prism中产生的剂量-应答曲线(使用相对于仅DMSO处理的对照的%活力进行绘制)。

[0250] 对于关注的组合研究,如上文关于组合研究所述进行Alamar蓝活力测定法。备选

地，进行Caspase-Glo 3/7测定法。简言之，将HCT116细胞以5000个细胞/孔的细胞密度一式三份接种在白色96孔板中，在McCoy's 5A加10％FBS中。将A375细胞以5000个细胞/孔的密度接种在DMEM加10％FBS中。在加入测试化合物或媒介物对照之前，使细胞粘附过夜。DMSO的终浓度为0.2％，并且包括800nM星形孢菌素作为阳性对照。使用24和48小时的测定孵育期。然后，加入Caspase-Glo®3/7 50％(v/v)，将平板在轨道振荡器上混合5分钟，并在室温孵育1小时，然后在发光板读数器上读数。在分析数据之前减去仅培养基背景值。

[0251] 对于差示扫描荧光测定法，将SYPRO橙(5,000×溶液，Invitrogen)在缓冲溶液(10mM HEPES，150mM NaCl，pH 7.5)中稀释(1:1,000)。HisX6加标签的蛋白质包括无活性ERK2、活性ERK2(ppERK2)或p38α，终浓度为1μM。将蛋白质/染料溶液和100％DMSO中的化合物加入孔中(2％v/v最终DMSO浓度)以达到所需的最终浓度，混合，并置于RT-PCR仪器中。接下来，以每分钟1℃的速率从25-95℃进行解链曲线，并且在不存在或存在化合物的情况下测定每种蛋白质的解链温度(Tm)。提出了在各种药物浓度存在下Tm的变化(ΔTm)。

[0252] 对于ERK1的Ki测定，将激活的ERK1(10nM)与2.5％(v/v)DMSO中各种浓度的化合物在30℃在0.1M HEPES缓冲液(pH 7.5)，10mM $MgCl_2$，2.5mM磷酸烯醇丙酮酸，200μM烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)，150μg/mL丙酮酸激酶，50μg/mL乳酸脱氢酶和200μM Erktide肽中孵育10分钟。通过加入65μM ATP起始反应。监测降低的吸光度(340nm)并测定IC_{50}作为抑制剂浓度的函数。

[0253] 对于ERK2的Ki测定，使用放射测定法测定BVD-523对ERK2的抑制活性，组分的最终浓度为100mM HEPES(pH 7.5)，10mM $MgCl_2$，1mM二硫苏糖醇(DTT)，0.12nM ERK2，10μM髓磷脂碱性蛋白(MBP)和50μM ^{33}P-γ-ATP。将除ATP和MBP之外的所有反应组分预混合并等分(33μL)到96孔板中。使用化合物在DMSO中的储备溶液制备高达500倍的稀释液；在每个孔中加入1.5μL等分试样的DMSO或DMSO中的抑制剂。通过添加底物^{33}P-γ-ATP和MBP(33μL)起始反应。20分钟后，用含有4mM ATP的20％(w/v)三氯乙酸(TCA)(55μL)淬灭反应，转移至GF/B滤板，并用5％(w/v)TCA洗涤3次。加入Ultimate Gold™闪烁剂(50μL)后，样品在Packard TopCount中计数。从活性对浓度滴定曲线，通过使用Prism软件3.0版将数据拟合至竞争性紧密结合抑制动力学的方程来确定Ki值。

[0254] 对于ERK2的IC_{50}测定，通过标准偶联酶测定法测定活性。最终浓度如下：0.1M HEPES(pH 7.5)，10mM $MgCl_2$，1mM DTT，2.5mM磷酸烯醇丙酮酸，200μM NADH，50μg/mL丙酮酸激酶，10μg/mL乳酸脱氢酶，65μM ATP，和800μM肽(ATGPLSPGPFGRR)。除ATP之外的所有反应组分都与ERK预混合并等分到测定板孔中。将DMSO中的BVD-523引入每个孔中，保持每孔DMSO的浓度恒定。每次滴定时，BVD-523浓度范围为500倍。将测定板在分光光度计(分子装置)的读板室中在30℃孵育10分钟，然后通过加入ATP起始反应。监测340nm处的吸光度变化作为时间的函数；初始斜率对应于反应速率。将BVD-523滴定曲线的速率对比浓度拟合至竞争性紧密结合抑制动力学的等式以确定Ki值或3参数拟合以使用Prism软件3.0版确定IC_{50}。

[0255] 对于细胞凋亡测定法，将细胞以每孔2×10^4个细胞接种在96孔板中，并使其粘附过夜或生长至50％汇合。用在培养基中连续稀释的BVD-523处理细胞(最终体积200μL，浓度范围4-0.25μM)并在37℃CO_2培养箱中孵育48小时。用100μL的PBS洗涤细胞，并加入60μL的放射免疫沉淀测定缓冲液(50mM Tris-HCl，pH 8.0，150mM NaCl，1.0％[w/v]NP-40，0.5％[w/v]脱氧胆酸钠，1％[w/v]SDS)，然后在4℃孵育10分钟以裂解细胞。将30-μL裂解物等分

试样加入到100μL的胱天蛋白酶测定缓冲液(120mM HEPES,12mM EDTA,20mM二硫苏糖醇,12.5μg/mL AC-DEVD-AMC胱天蛋白酶底物)中,并在室温孵育4小时至过夜。在荧光计中读取板(激发波长360nm,发射波长460mm)。使用BioRad蛋白质测定法试剂盒(样品与工作反应剂比率为1:8)分析剩余的30μL裂解物的总蛋白质含量。最终归一化的胱天蛋白酶活性衍生为每μg蛋白质的荧光单位,并且与DMSO对照相比转化为胱天蛋白酶活性的倍数增加。

[0256] 为了测量A375异种移植物中的抗肿瘤活性,用在雌性无胸腺裸鼠中连续皮下移植来维持的A375细胞起始异种移植物。每只测试小鼠接受在右侧皮下植入的A375肿瘤碎片(1mm^3)。一旦肿瘤达到目标大小(80-120mm^3),将动物随机分入治疗组和对照组,并开始药物治疗。

[0257] 为了评价BVD-523单一疗法,口服施用1%(w/v)羧甲基纤维素(CMC)中的BVD-523,口服(p.o.),BID剂量为5、25、50、100或150mg/公斤。口服替莫唑胺作为阳性参照化合物以75或175mg/kg每天一次(QD)施用,总共五次治疗(QD×5)。

[0258] 在随机分成15只的9组和10只的1组(即第10组)的小鼠中评估BVD-523与达拉非尼组合的功效。以50或100mg/kg QD口服施用达拉非尼和以50或100mg/kg BID口服施用BVD-523,单独和组合,直到研究结束;还包括媒介物处理的和替莫唑胺处理的(150mg/kg QD×5)对照组。在第20天停止组合给药以监测肿瘤再生长。单独地监测动物,并当每个肿瘤达到2000mm^{3}的终点体积时,或者最后一天(第45天)(以先到者为准)时,实施安乐死,并计算至终点的中位数时间(TTE)。该组合还在后期的A375模型中进行评估,其中评估了228-1008mm^{3}范围内的较大肿瘤。在这里,将小鼠随机分为14只的1组(第1组)和20只的4组(第2-5组)。在第1天用达拉非尼加BVD-523(25mg/kg达拉非尼+50mg/kg BVD-523或50mg/kg达拉非尼+100mg/kg BVD-523)起始给药,每种试剂口服BID给予,直到研究结束。该研究包括50-mg/kg达布拉非和100-mg/kg BVD-523单一疗法组以及媒介物治疗的对照组。每周两次测量肿瘤。在第42天停止组合给药以监测肿瘤再生长到研究结束(第60天)。治疗结果由%TGD确定,其定义为治疗小鼠对比对照小鼠的中位数TTE的增加百分比,通过对数秩生存分析来分析组之间的差异。对于TGI分析,使用基于以下公式的初始(i)和最终(f)肿瘤测量来计算并报告每个治疗(T)组与对照(C)的%TGI值:%TGI=1-Tf-Ti/Cf-C。还监测小鼠的CR和PR应答。在研究结束时具有CR的动物另外被分类为TFS。

[0259] 为了测量在Colo205异种移植物中的BVD-523活性,在补充有10%(v/v)胎牛血清(FBS),100单位/mL青霉素,100μg/mL链霉素(Invitrogen)和2mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640中培养人Colo205细胞。在植入前将细胞培养少于4次传代。在第0天,将雌性无胸腺裸鼠(19-23g)皮下注射2x10^{6}个Colo205细胞到右侧背腋区域。

[0260] 将具有近似肿瘤体积为200mm^{3}的小鼠随机分成6个实验组。每周制备媒介物对照,即1%CMC(w/v)。将BVD-523以所需浓度悬浮在1%(w/v)CMC中,并在冰上以6,500rpm匀化50分钟。每周制备BVD-523悬浮液并以8或16小时给药方案以每日总剂量为50、100、150和200mg/kg(n=12只/组)口服BID施用,持续13天。使用相同的给药方案施用媒介物对照(n=12)。CPT-11作为阳性参照化合物施用(n=12)。每1mL的CPT-11注射液含有20mg伊立替康、45mg山梨糖醇和0.9mg乳酸。每4天以100mg/kg/天腹膜内施用CPT-11,连续2次给药。

[0261] 为了测量Colo205异种移植物中的ERK1/2加同位素标签的内标(ITIS)质谱,将冷冻的肿瘤在10体积的冰冷裂解缓冲液(10mM TRIS-HCl,pH 8.0,10mM $MgCl_2$,1%(v/v)

Triton X-100,Complete™蛋白酶抑制剂混合物[Roche,目录号1836170],磷酸酶抑制剂混合物I[Sigma,目录号P-2850],磷酸酶抑制剂混合物II[Sigma目录号5726]和benzonase[Novagen目录号70664])中裂解。通过离心(100,000×g,4℃,60分钟)澄清裂解物,并用裂解缓冲液将上清液调节至2 mg/mL。使用琼脂糖偶联和泛抗ERK1(Santa Cruz Biotechnology目录号sc-93ac)抗体对ERK1进行免疫沉淀。通过SDS-PAGE解析免疫沉淀的蛋白质并用SYPRO Ruby(Invitrogen)染色,并且通过剃刀切下ERK条带。将凝胶切片在300μL的20mM NH_4HCO_3中洗涤,切成小块,并置于Page Eraser Tip(The Nest Group目录号SEM0007)中。在胰蛋白酶消化之前,将凝胶片段还原并烷基化。在75μL的50%(v/v)乙腈,0.2%(v/v)三氟乙酸中分离胰蛋白酶解片段,并将所得样品在SpeedVac中浓缩至0-10μL。

[0262] 对于ITIS分析,将消化的样品掺入加重原子标签的肽标准品,并通过偶联的液相色谱-串联质谱(MS)对分级磷酸化进行定量。使用来自Flux Instruments的Rheos 2000二元泵(在1:750分传后提供纳米级流动),LC Packings Inertsil纳米预装柱(C18,5mm,100Å,30mm ID×1mm)和New Objective PicoFrit AQUASIL解析柱(C18,5mm,75/15mm ID×10cm)(其也可用作电喷雾电离(ESI)发射器),进行纳米毛细管色谱。与纳米ESI源耦合的Applied Biosystem API 3000质谱仪用于MS分析。连接到雾化气体源的内部制造的气体喷嘴用于帮助稳定的纳米流动喷雾。数据以多反应监测(MRM)模式获得:雾化气体为3;幕气为7;碰撞气体为5;离子喷射电压为2150伏,出口电位为10伏;Q1/Q3分辨率低/单位;以及所有MRM通道的停留时间为65毫秒。使用来自Applied Biosystem的Analyst软件套件和自定义工具的组合来处理所有原始MS数据。

[0263] 为了评估获得性抗性的细胞系模型中的药物敏感性,在96小时增殖测定法中评估剂量递增的A375细胞和同基因RKO细胞的药物敏感性。将RKO同基因细胞(含有10%[v/v]FBS的McCoy's 5A)或剂量递增的A375细胞(含有10%FBS的DMEM)接种到96孔板中,并在加入化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。注意,在不存在抑制剂的情况下接种剂量递增的A375细胞。从0.1%(v/v)DMSO储备液制备化合物,得到所示的最终浓度。将测试化合物与细胞在37℃在5%CO_2湿润气氛中孵育96小时。对于RKO细胞,根据制造商的说明添加CellTiter-Glo®反应剂(Promega),并使用BMG FLUOstar板读取器检测发光。对于A375测定法,加入Alamar蓝(ThermoFisher)10%(v/v)并孵育4小时,然后使用BMG FLUOstar检测荧光产物。扣除平均仅培养基背景值,并使用GraphPad Prism中的4-参数逻辑方程分析数据。

[0264] 在25μL的最终反应体积中测量ERK1的IC_{50}测定。将ERK1(人)(5-10mU)与25mM Tris(pH 7.5),0.02mM乙二醇四乙酸,250μM肽,10mM乙酸镁和γ-^{33}P-ATP(比活性约500cpm/pmol,根据需要浓缩)一起孵育。加入Mg ATP起始反应。在室温(RT)孵育40分钟后,通过添加5μL的3%(w/v)磷酸溶液来终止反应。然后,将10μL反应物点在P30滤垫上,在75mM磷酸中洗涤3次,持续5分钟,然后在甲醇中洗涤一次,然后干燥并闪烁计数。

[0265] 使用重组AAV介导的基因靶向策略,由Horizon Discovery(Cambridge,UK;#HD106-019)产生RKO MEK1 Q56P同基因细胞。简而言之,在HEK293T细胞中转染合适的靶向载体和辅助载体后产生rAAV病毒,使用AAV纯化试剂盒(Virapur,San Diego,USA)纯化并使用qPCR进行滴定。然后用rAAV病毒感染亲本纯合RKO细胞(MEK1的纯合野生型),并通过G418选择来鉴定已整合选择盒的克隆并扩增。通过PCR和测序鉴定正确靶向的克隆,其对于

MEK1Q56P点突变敲入单个同基因是杂合的。

[0266] 对于敲入突变体KRAS杂合的同基因SW48细胞系(De Roock等人,2010,JAMA,304,1812-1820)获自Horizon Discovery(目录号;HD 103-002,HD 103-006HD 103-007,HD 103-009,HD 103-010,HD 103-011,HD 103-013)。对于增殖测定法,将细胞接种到96孔板中,在补充有10%FBS的McCoy's 5A培养基中,并在加入化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。将测试化合物与细胞在37℃在5%CO_2气氛中孵育96小时。然后使用Alamar蓝评估活力。

[0267] 在Upstate Discovery进行专有的KinaseProfiler测定法,并使用类似于Davies等人所用的放射性检测,用于描述BVD-523对一组70种激酶的选择性。

[0268] 如前所述(Yang等人,2013),使用高通量筛选进行药物敏感性分析作为癌症项目中药物敏感性基因组学的一部分。

[0269] 对于Western印迹分析,将A375细胞接种到10cm培养皿上,在Dulbecco's改良的Eagle's培养基加10%(v/v)FBS中。在加入测试化合物或媒介物之前使细胞粘附过夜。对于使用RKO细胞的实验,将这些细胞接种在具有McCoy's 5A+10%(v/v)FBS的6孔板或10cm培养皿中。然后以所需的浓度和持续时间处理细胞。通过胰蛋白酶消化收获细胞,沉淀并快速冷冻。用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Roche)的RIPA缓冲液制备裂解物,通过以11,000rpm离心10分钟进行澄清,并通过二喹啉甲酸测定法进行定量。通过SDS-PAGE解析样品,印迹到聚偏二氟乙烯膜上,并使用针对所示靶的抗体(即pRB[Ser780],目录号9307;CCND1,目录号ab6152;BCL-xL,目录号2762;PARP,目录号9542;DUSP6,目录号3058S)进行探测。

[0270] 对于反相蛋白质分析(RPPA),将A375、MIAPaCa-2、HCT116、Colo205、HT-29和AN3Ca细胞(ATCC)以80%汇合进行铺板,使其恢复过夜(MIAPaCa-2细胞以30%汇合进行铺板并使其恢复3天),然后用10μM各化合物(即BVD-523、SCH722984、GDC-0994或Vx-11e)在37℃处理6小时。在产生细胞裂解物之前,用0.1%(v/v)的DMSO处理对照孔6小时。然后使用反相蛋白质微阵列技术(Theranostics Health)分析样品。

[0271] 对于分析Colo205异种移植物中的pERK IHC,将异种移植肿瘤在70%至100%分级的乙醇中处理过夜,在两次更换的二甲苯中清洗,用石蜡渗透,并包埋在石蜡块中。然后,切割5-μm切片并置于带正电的载玻片上并在60℃烘烤至少30分钟,但不长于1小时。用抗磷酸p42/p44MAPK抗体(pERK[1:100],CST;目录号9101;批号16)探测来自每个动物和剂量组的单个切片,用苏木精复染,然后用Zeiss Axioplan 2显微镜进行显微镜分析。使用同种型对照(兔,Zymed laboratories,目录号08-6199,批号40186458)作为阴性对照。

[0272] 对于FACS分析,将细胞刮下并以1,500rpm沉淀5分钟,然后重悬于1mL的缓冲液中并在-70℃冷冻。将冷冻的细胞解冻并再次离心,然后在0.25mL的缓冲液A(精胺四盐酸盐去污缓冲液中的胰蛋白酶)中再悬浮10分钟,以解聚细胞团块并消化细胞膜和细胞骨架。在黑暗中加入缓冲液B(在缓冲液中的胰蛋白酶抑制剂和核糖核酸酶I,0.2mL)10分钟。过滤得到的DNA染色的细胞核并通过FACS进行分析。基于n和2n DNA(或更高)含量的存在,分析直方图以确定处在细胞周期的G1、S和G2/M期中细胞的比例。

[0273] 为了测量体外组合活性,将五千个G-361细胞接种到含有McCoy's 5A和10%(v/v)FBS的一式三份96孔板中,并使其粘附过夜。使用10×8剂量矩阵测试维罗非尼/BVD-523组

合。将化合物与细胞在37℃在5％CO_2湿润气氛中孵育72小时。根据制造商的说明添加CellTiter-Glo反应剂，并使用MBG FLUOstar板读取器检测发光。使用Horizon的Chalice组合分析软件，通过Loewe加合性和Bliss独立性模型确定剂量矩阵的相互作用。

[0274] 对于通过剂量递增在体外产生化合物抗性，将A375亲本细胞(ATCC CRL-1619)在补充有10％热灭活的FBS和青霉素/链霉素的Dulbecco's改良的Eagle培养基(DMEM)中生长至～40-60％汇合，然后用初始剂量的BVD-523、曲美替尼或达拉非尼单独或组合处理，以每种化合物的IC_{50}或略低于每种化合物的IC_{50}的浓度；对于组合研究，初始给药是每种化合物的IC_{50}的一半。使细胞生长直至约70-90％汇合并分传；培养基每3-4天更新一次。当细胞再次达到约40-60％汇合时，剂量以相同的增量(等于起始浓度)进行递增，然后浓度增加1.5倍，然后如果细胞继续快速适应，则进一步增加2倍。(例如，达拉非尼递增的前六个剂量为：5、10、15、20、25和37.5nM)。根据需要重复该过程。

[0275] 图30A的细胞活力测定法在高葡萄糖条件下在全血清中的药物中5天后，通过刃天青(Alamar蓝)代谢测定法进行。将细胞以约15％-50％汇合在384孔微量板中接种于含有10％FBS和青霉素/链霉亲和素加高葡萄糖(18-25mM)的培养基中。确定每种细胞系的最佳细胞数以优化药物施用期间的生长。对于粘附细胞系，在过夜孵育后，使用液体处理机器人将细胞用9种浓度的每种化合物(2倍稀释系列)处理，并返回培养箱以在96小时的时间点进行测定。对于悬浮细胞系，在铺板后立即用化合物处理细胞，并返回培养箱用于96小时的时间点。然后将细胞用在无谷胱甘肽培养基中制备的55μg/ml刃天青(Sigma)染色4小时。对于刃天青，使用荧光板读数器在535/595nm的激发和发射波长进行荧光信号强度的定量。对所有筛选板进行严格的质量控制措施。测量对细胞活力的影响，并将曲线拟合算法应用于原始数据集，以得到药物应答的多参数描述，包括半数最大抑制浓度(IC_{50})。IC_{50}以μM的IC_{50}的自然对数表示(LN_IC_{50}；EXP返回以μM的IC_{50})。在产生非常高的值的情况下允许外推IC_{50}。如果需要，通过将IC_{50}值限制在最大测试浓度(和低值的最小测试浓度)，将数据限制在所测试的浓度范围内。

[0276] 对于BVD-523在源自患者的异种移植物(AT052C)中的功效测试，该异种移植物代表来自已经变得对维罗非尼在临床上难治的$BRAF^{V600E}$患者的黑素瘤。从宿主动物收获肿瘤碎片并植入免疫缺陷小鼠中。该研究开始时的平均肿瘤体积约为170mm^3，此时将动物随机分为4组，包括对照组(1％[v/v]CMC口服BID×31)和3个治疗组(BVD-523[100mg/kg]，达拉非尼[50mg/kg]，或BVD-523/达拉非尼[100/50mg/kg]，n＝10/组)；所有治疗药物均口服，以BID×31时间表给药。

[0277] 对于在人全血样品中BVD-523抑制PMA刺激的RSK1磷酸化的IC_{50}测定，确定10名健康供体(年龄22-61岁)的BVD-523抑制PMA刺激的RSK1磷酸化的IC_{50}值，其中使用8点浓度曲线，范围为从10μM到5nM的BVD-523。对照由每个供体的3个未刺激的样品和3个PMA刺激的样品组成。测定磷-RSK(pRSK)和总RSK水平，并使用每种样品的pRSK/RSK水平计算数据。

[0278] 将30毫升血液从每个供体抽取到肝素钠真空采血管中。向每个供体22个2-mL微管中的每一个中加入1mL全血。微管管用供体编号(1到10)和随后的处理名称加标签："A"用于仅PMA刺激(最大)，"B"用于接受PMA刺激的含BVD-523的样品；和"C"表示未受刺激的样品(最小值)。将二甲基亚砜(DMSO)加入到A组和C组的所有管中至终浓度为0.1％。然后在室温轻轻摇动样品。

[0279] 将BVD-523(10mM,在100％DMSO中)以3倍稀释连续稀释到100％DMSO中。然后将这些在100％DMSO中连续稀释的BVD-523样品在含有10％胎牛血清和青霉素/链霉素/谷氨酰胺的Dulbecco's改良的Eagle培养基中稀释10倍,并且对于每种指定的BVD-523浓度,每mL血液中加入10μL每种这些工作溶液。一式两份运行每种浓度的BVD-523,各自两个1mL血液样品,得到16个总样品,用于完整的8点浓度曲线。然后将样品在室温轻轻摇动至少2小时但不长于3小时。

[0280] 在室温用PMA以100nM的终浓度刺激所有供体的组A和B中的人全血样品20分钟。C组中的样品未用PMA处理,但与所有其他样品一样摇动并处理。

[0281] 完成每个样品的PMA处理后,从人全血中分离外周血单核细胞。将来自每个样品的1mL血液轻轻铺在2mL微量离心管中的0.75mL室温Histopaque 1077上。将样品在Eppendorf微量离心机中以16,000×g离心2分钟。取出界面和上层并加入到含有1mL的冷Dulbecco's磷酸盐缓冲盐水(DPBS)的管中。然后将这些样品以16,000×g离心30秒以沉淀细胞。通过抽吸除去缓冲液上清液,将沉淀重悬于1mL的冷DPBS中。然后如上所述将每个样品的沉淀进行重新沉淀。通过抽吸除去缓冲液,并如下所示裂解沉淀。

[0282] 完全裂解缓冲液由Meso Scale Discovery Tris裂解缓冲液,1X Halt蛋白酶抑制剂混合物,1X磷酸酶抑制剂混合物2,1X磷酸酶抑制剂混合物3,2mM苯甲烷磺酰氟和0.1％十二烷基硫酸钠组成。将裂解缓冲液保持在冰上并使每个样品组新鲜制备。通过加入120μL完全裂解缓冲液来裂解最终的细胞沉淀。涡旋样品直至细胞沉淀消失,然后在干冰上快速冷冻。在通过ELISA测量pRSK和总RSK之前,将样品储存在-20℃。

[0283] 对于pRSK ELISA(PathScan),将解冻的裂解物与样品稀释剂(在ELISA试剂盒中提供)以1:1组合:将120μL裂解物加入到圆底96孔板中的120μL样品稀释剂中。然后将该组合以每孔100μL转移至pRSK微孔。对于总RSK ELISA(PathScan),将20μL已经在样品稀释剂中1:1稀释的裂解物在圆底96孔板中的200μL样品稀释剂中进一步稀释。然后将该组合以每孔100μL转移至全部RSK微孔。用平板密封件将平板密封,并在4℃孵育16至18小时,这是显示出产生靶蛋白的最佳检测的时间。根据试剂盒说明书将两种ELISA显色。

[0284] 如果患者具有不可治愈的、组织学证实的转移性或晚期恶性肿瘤;ECOG表现状态为0或1;足够的肾、肝、骨髓和心脏功能;和预期寿命≥3个月,则≥18岁的患者有资格参与。患者可能因其转移性疾病而接受过多达2次前线化疗。排除标准是已知的失控的脑转移;可能损害研究药物吸收的胃肠道疾病;视网膜静脉阻塞或中心性浆液性视网膜病变的病史或当前迹象/风险;和使用已知为CYP1A2,CYP2D6和CYP3A4的强抑制剂或CYP3A4的强诱导剂的药物的同时疗法。所有参与者在开始任何研究程序之前都提供了知情同意书。

[0285] 接受至少一个剂量的BVD-523的患者包括在使用SAS(版本9.3)软件的分析中。截止日期为2016年12月1日。本研究在ClinicalTrials.gov注册,编号为NCT01781429。

[0286] 本发明提供来自开放标签、多中心I期研究的数据,以评估递增剂量的BVD-523在晚期恶性肿瘤患者中的安全性、药代动力学和药效学。给药方案结合加速滴定和标准群组3+3剂量递增方案,其共同用于鉴定晚期实体瘤患者中BVD-523的MTD和RP2D。每个治疗群组中的1至6名患者被指定在21天周期中以BID时间表(12小时间隔)顺序接受更高口服剂量的BVD-523,从10mg BID的剂量开始。BVD-523以下述剂量在21天周期内连续BID施用:10mg(n＝1);20mg(n＝1);40mg(n＝1);75mg(n＝1);150mg(n＝1);300mg(n＝4);600mg(n＝7);

750mg(n＝4)；和900mg(n＝7)。

[0287] 患者接受BID口服剂量直至疾病进展，不可接受的毒性或满足另一个退出标准的临床观察。单个患者群组中剂量递增以高达100％的增量发生，直到1名患者经历≥2级毒性(不包括脱发或腹泻)。然后将群组扩展至每群组至少3名患者，随后的剂量递增增量从高达100％降低至最高50％。当3名患者群组中至少1名患者经历DLT时，以该剂量水平治疗多达3名另外的患者。当在≤6名患者中发生超过1次DLT时，该剂量水平被定义为非耐受剂量并停止剂量递增。允许患者内部剂量递增，条件是接受最高当前剂量的患者已观察至少3周，并且在指定给定剂量的6名患者中少于2名报告了剂量限制性副作用。经历DLT或不可接受的毒性的患者中断他们的治疗直至毒性回到≤1级。然后以下一次测试的较低剂量水平或以20％至30％剂量下降(与胶囊剂量比对)开始恢复BVD-523治疗。

[0288] I期研究的主要目标是通过确定剂量限制性毒性、MTD和RP2D来确定BVD-523的安全性和耐受性。次要目标包括确定BVD-523在晚期恶性肿瘤患者中的药代动力学特征，以及使用RECIST v1.1通过物理或放射学检查评估对肿瘤应答的任何初步临床作用的研究。探索目标包括评估药效标志物(生物标志物)测量和研究由^{18}F-FDG-PET评估的对肿瘤反应的初步临床作用，如所示。

[0289] 为了测定MTD、DLT和RP2D，将MTD定义为最高剂量群组，其中≤33％的患者在治疗的前21天中经历了BVD-523相关的DLT。DLT被定义为治疗前21天的BVD相关毒性，导致≥4级血液学毒性持续>1天；3级血液学毒性伴有并发症(如伴有出血的血小板减少症)；≥3级非血液学毒性，除了未经治疗的恶心、呕吐、便秘、疼痛和皮疹外(如果尽管经过充分治疗，AE仍会持续存在，这些则变为DLT)；或由于BVD-523相关毒性，在第1周期中超过3天的治疗中断(或无法进入第2周期持续>7天)。

[0290] RP2D可以与MTD一样高，并且在与临床研究者、医学监测者和赞助者的讨论中确定。在支持RP2D的基本原理中包括与多次循环后观察到的药代动力学、药效学和任何累积毒性相关的观察结果。

[0291] 关于安全性评估，AE被定义为被施用不一定与BVD-523具有因果关系并且使用MedDRA编码字典进行编码的医药产品的患者中的任何不良医疗事件。SAE是在任何剂量发生的导致死亡、危及生命、需要住院治疗或延长现有住院治疗，或者导致持续或显著的残疾/无能力或先天性异常/出生缺陷的任何不良医疗事件。根据国家癌症研究所不良事件通用术语标准，评分量表，第4版对AE的严重程度进行分级。

[0292] 在第8、15、22、29、36和43天，并且在继续治疗的患者中，每3周或如果有临床指示在之后，在基线进行安全性评估。每项评估包括体格检查和临床实验室研究。如果临床上显著且由研究人员自行决定，则重复心电图。研究人员对AE是否与研究药物有关进行判断并跟踪直至解决或稳定，或AE被判定为不再具有临床意义。

[0293] 对于药代动力学分析，药代动力学群体由接受至少一个剂量的BVD-523并具有血浆和/或尿液的可评估的药代动力学数据的患者组成。在给药前，然后在第1天(第2次访视；基线/治疗开始)和第15天(第4次访问；稳定状态)早晨剂量后的0.5(±5分钟)、1(±5分钟)、2(±10分钟)、4(±10分钟)、6(±10分钟)、8(±10)和12(±2小时)小时收集血液样品。在第22天，在剂量施用之前，收集最终血液样品用于药代动力学分析。在第1天和第15天的给药前和给药后1至6小时和6至12±2小时的间隔收集尿液样品。使用验证的LC/MS/MS方法

分析血浆和尿液样品的BVD-523和代谢物。使用Phoenix WinNonlin(Pharsight)以非隔室方法获得标准药代动力学参数。使用标准最小二乘回归分析计算剂量和暴露之间的关系。

[0294] 对于BVD-523对靶抑制的药效学确认,通过检测作为从晚期实体瘤患者(N=27)获得的人全血样品中的靶生物标志物的pRSK来确定BVD-523的靶向ERK抑制,所述患者在I期研究期间接受不同剂量的BVD-523(10-900mg BID)。BVD-523的活性从4个时间点(基线给药前,基线给药后4小时,第15天给药前和第15天给药后4小时)表示为用BVD-523孵育的PMA刺激的血液的百分比活性(pRSK)。

[0295] 为了测量抗肿瘤应答,基于体格检查的肿瘤测量发生在基线和每个治疗周期的第一天。每2至3个周期进行CT和其他评估。根据RECIST v1.1评估结果:CR定义为所有目标病灶的消失;PR定义为目标病灶最长直径的总和减少≥30%,以基线测量为参考;稳定性疾病定义为既没有足够的收缩够格用于PR,也没有足够的增加够格作为进展性疾病,以基线测量为参考。在接受第一次BVD-523剂量之前和第15天(第4次访视)通过^{18}F-FDG-PET扫描观察肿瘤的^{18}F-葡萄糖摄取来评估代谢应答。

[0296] 实施例2

[0297] 剂量递增和增殖测定法-第一个月

[0298] 剂量递增进展-第一个月

[0299] 使用BVD-523、达拉非尼和曲美替尼作为单一试剂或组合对A375细胞进行剂量递增。在第一个月期间,剂量以小增量增加。除了生长速率的显著降低之外,细胞通常很好地耐受递增,并且计划在第2个月使用更大的增量更积极地递增剂量。图1A-1C显示剂量递增研究的第1个月进展。

[0300] 增殖测定法结果-第一个月

[0301] 进行增殖测定法以评估递增的细胞系对比亲本细胞系对BVD-523、达拉非尼和曲美替尼处理的应答。

[0302] 图2A-2H显示来自研究的第1个月的归一化的和原始的增殖测定的结果。注意,不同处理之间在DMSO对照中的最大信号的差异(图2D、图2F和图2H)表明处理之间的差异生长速率。这些差异可能影响增殖测定法中细胞系对抑制剂的应答。

[0303] 表10显示了研究的第1个月的IC_{50}数据。

[0304] 表10-IC_{50}数据-第1个月

[0305]

化合物	细胞系，相对 IC_{50} (nM)						
	Par*	Tram	Dab	BVD-523	Dab/Tram	Dab/523	Tram/523
达拉非尼	6	29	约161	8	58	68	11
曲美替尼	0.5	2.2	2.5	0.7	3.9	3.1	2.5
BVD-523	189	335	350	268	300	412	263
紫杉醇	2.2	3.0	3.3	3.4	3.5	3.4	3.4

[0306] *Par＝亲本细胞系

[0307] 早期的暗示是，在无论是作为单一试剂还是组合的递增剂量的达拉非尼或曲美替尼存在下生长的细胞，在增殖测定法中表现出对这两种试剂的应答降低。

[0308] 在第2个月的早期阶段，在仅达拉非尼处理中细胞的生长速率相对于第1个月的早期阶段显著增加。这使得进展的速率增加并且表明抗性变得明显。

[0309] 实施例3

[0310] 剂量递增和增殖测定法-第二个月

[0311] 剂量递增进展-第二个月

[0312] 第二个月的研究发现，与初始温和递增阶段相比，大多数处理进入剂量以更大的增量(1.5倍)增加的阶段。达拉非尼和曲美替尼的单一试剂递增最快，细胞生长的浓度相当于100x亲本细胞IC_{50}(图3A和图3B)。与达拉非尼和曲美替尼相比，BVD-523的单一试剂递增进展更慢(图3C)。见图3D用于比较单一试剂递增。与达拉非尼和曲美替尼递增的群体相比，BVD-523递增的细胞具有更“脆弱”的外观并且存在更多数量的漂浮细胞。

[0313] 组合的试剂递增比单试剂处理进展更慢。BVD-523/曲美替尼组合在防止细胞进展方面特别有效。

[0314] 增殖测定法结果-第二个月

[0315] 单一试剂递增的达拉非尼和曲美替尼细胞群体的增殖测定法显示剂量应答曲线的适度变化，表明额外的递增时期将有利于进一步富集抗性细胞。有趣的是，在增殖测定法中，有证据表明暴露于BVD-523的细胞在抑制剂撤出后生长得不太好，这可能表明成瘾水平。

[0316] 图4A-图4H显示了来自研究的第2个月的归一化的和原始的增殖测定的结果。注意，不同处理之间在DMSO对照中的最大信号的差异(图4D、图4F和图4H)表明处理之间的差异生长速率。这些差异可能影响增殖测定法中细胞系对抑制剂的应答。

[0317] 图5A-5H显示了来自研究的第2个月的归一化的和原始的增殖测定的结果，仅关注亲本和BVD-523系数据。

[0318] 表11显示了研究的第2个月的IC_{50}数据。相对IC_{50}由Prism中的4-参数曲线拟合来确定。

[0319] 表11-IC_{50}数据-第2个月

[0320]

化合物	细胞系，相对 IC_{50} (nM)						
	Par*	Tra	Dab	BVD-523	Dab/Tram	Dab/523	Tram/523
达拉非尼	4.1	6.2	11.5	697	256	218	68

[0321]

曲美替尼	0.4	0.7	1.1	24.3	12.6	6.2	4.6
BVD-523	187	252	284	1706	561	678	435
紫杉醇	3.7	8.9	1.9	6.5	4.7	4.2	8.9

[0322] *Par＝亲本细胞系

[0323] 实施例4

[0324] 剂量递增和增殖测定法-第三个月

[0325] 剂量递增进展-第三个月

[0326] 图6A-图6C显示了研究的第3个月的单一和组合试剂递增。图6D显示了单一试剂递增的比较。

[0327] 增殖测定法结果-第三个月

[0328] 图7显示了DMSO对照孔中增殖测定法期间的生长评估。图8A-图8D显示了研究的第3个月的结果。图9A-9D显示研究的第3个月的结果，关注单一处理细胞系。

[0329] 表12显示了研究的第3个月的IC_{50}数据。相对IC_{50}由Prism中的4-参数曲线拟合来确定。由于在测定期间缺乏生长，因此没有确定用曲美替尼递增的细胞系的IC_{50}值(ND:未进行)。

[0330] 表12-IC_{50}数据-第3个月

[0331]

化合物	细胞系，相对 IC_{50} (nM)						
	Par*	Tram	Dab	BVD-523	Dab/Tram	Dab/523	Tram/523
达拉非尼	2.1	ND	2.5	18.4	17.9	337	73
曲美替尼	0.2	ND	0.4	1.7	2.7	90	11.2
BVD-523	129	ND	198	433	323	1151	296
紫杉醇	1.9	ND	1.9	6.5	4.7	4.2	8.9

[0332] *Par＝亲本细胞系

[0333] 图19显示了研究的第3个月的单一和组合试剂递增。获得的细胞系变体可以在达拉非尼或曲美替尼以大于亲本A375细胞中这些试剂的IC_{50}的100倍的浓度存在下生长。相比之下，对BVD-523具有抗性的细胞系只能保持在低于亲本IC_{50}浓度10倍的浓度下。敏感性测

试表明，达拉非尼或曲美替尼抗性细胞系对BVD-523保持相对敏感；在抗性细胞系中BVD-523的IC_{50}“移位”增加比在达拉非尼或曲美替尼处理后相应的IC_{50}增加更为适中。同样地，与达拉非尼或曲美替尼处理相比，当用浓度是其在亲本A375系中的IC_{50}的10倍高的BVD-523处理抗性细胞系时，观察到更完全的细胞生长抑制。总的来说，抗性和交叉敏感性的模式表明BVD-523可能在获得性抗性的情况中保持有效。

[0334] 实施例5

[0335] 组合研究结果

[0336] 如所预期，携带BRAF(V600E)突变的A375细胞对达拉非尼敏感。与使用CellTiter-Glo衍生的那些(图11A-图11E、图13A-图13E和图15A-图15E)相比，使用Alamar蓝计算的单一试剂IC_{50}值(图10A-图10E、图12A-图12E和图14A-图14E)对于达拉非尼和BVD-523通常略低。在72小时CellTiter-Glo测定法中，达拉非尼和曲美替尼的公布IC_{50}值分别为28±16nM和5±3nM(Greger等人，2012;King等人，2013)-本文报道的单一试剂结果与这些一致值。有一些证据表明所有处理都有协同作用的窗口。一式三份之间的变化很小，然而，有一些边缘效应的证据可能解释了在一些处理中对比无药物对照观察到的明显增强的生长(例如在曲美替尼/BVD-523组合中特别明显)。这使得对Bliss分析的解释更具挑战性，因为在某些处理中它可能导致协同作用水平的人为增强。

[0337] 对A375细胞重复组合测定法。单一试剂BVD-523、曲美替尼和达拉非尼效力与本文公开的先前研究中报道的那些一致。

[0338] 总之，综合数据显示，通过用ERK抑制剂BVD-523的处理可以克服MEK和BRAF抗性细胞。

[0339] 实施例6

[0340] BVD-523改变MARK激酶活性的标记物和效应子功能

[0341] 对于Western印迹研究，将HCT116细胞(5×10^6)接种到10cm培养皿中，在McCoy's 5A加10％FBS中。将A375细胞(2.5×10^6)接种到10cm培养皿中，在DMEM加10％FBS中。在加入指定量的测试化合物(BVD-523)或媒介物对照之前，使细胞粘附过夜。在分离全细胞蛋白裂解物之前，将细胞处理4或24小时，如下所述。通过胰蛋白酶消化收获细胞、沉淀并快速冷冻。用RIPA(放射免疫沉淀测定法)缓冲液制备裂解物，通过离心澄清并通过二喹啉甲酸测定法(BCA)测定法进行定量。通过SDS-PAGE电泳解析20-50μg蛋白质，印迹到PVDF膜上，并使用以下表13(用于4小时处理)和表14(用于24小时处理)中详述的抗体进行探测。

[0342] 表13-抗体详情

[0343]

抗原	尺寸 (kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/阻断条件	二抗
pRSK1/2 pS380	90	Cell Signaling	9335	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRSK1/2 pS380	90	Cell Signaling	11989	1:2000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRSK-T359/S363	90	Millipore	04-419	1:40000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 RSK	90	Cell Signaling	9333	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pErk 1/2	42/44	Cell Signaling	9106S	1:500	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠
总 ERK	42/44	Cell Signaling	9102	1:2000	o/n 4°C 5% 奶	抗兔
pMEK1/2	45	Cell Signaling	9154	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 MEK	45	Cell Signaling	9126	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pS6-pS235	32	Cell	2211S	1:3000	o/n 4°C 5%	抗兔

[0344]

抗原	尺寸 (kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/阻断条件	二抗
		Signaling			奶	
总 S6	32	Cell Signaling	2217	1:2000	o/n 4°C 5% 奶	抗兔
DUSP6	48	Cell Signaling	3058S	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 CRAF	73	BD Bio-sciences	610152	1:2000	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠
pCRAF-Ser338	73	Cell Signaling	9427	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRB (Ser780)	105	Cell Signaling	9307	1:2000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
β-肌动蛋白	42	Sigma	A5441	1:500,000	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠

[0345] 表14-抗体详情

[0346]

抗原	尺寸 (kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/阻断条件	二抗
pRB (Ser780)	105	Cell Signaling	9307	1:2000	o/n 4˚C 5% BSA	抗兔
CCND1	34	Abcam	ab6152	1:500	o/n 4˚C 5% 奶	抗小鼠
Bim-EL	23	Millipore	AB17003	1:1000	o/n 4˚C 5% BSA	抗兔
Bim-EL	23	Cell Signaling	2933	1:1000	o/n 4˚C 5% BSA	抗兔
BCL-xL	30	Cell Signaling	2762	1:2000	o/n 4˚C 5% BSA	抗兔

[0347]

抗原	尺寸 (kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/阻断条件	二抗
PARP	116/89	Cell Signaling	9542	1:1000	o/n 4°C 5% 奶	抗兔
裂解的胱天蛋白酶 3	17,19	Cell Signaling	9664X	1:1000	o/n 4°C 5% 奶	抗兔
DUSP6	48	Cell Signaling	3058S	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRSK1/2 pS380	90	Cell Signaling	9335	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRSK1/2 pS380	90	Cell Signaling	11989	1:2000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRSK-T359/S363	90	Millipore	04-419	1:40000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 RSK	90	Cell Signaling	9333	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pErk 1/2	42/44	Cell Signaling	9106S	1:500	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠
总 ERK	42/44	Cell Signaling	9102	1:2000	o/n 4°C 5% 奶	抗兔
B-肌动蛋白	42	Sigma	A5441	1:500,000	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠

[0348] 图16A-图16D、图17A-图17D和图18A-图18B显示了按照以下以各种浓度的BVD-523处理的细胞的Western印迹分析:1)4小时后A375细胞中的MAPK信号传导组分;2)用不同量的BVD-523处理24小时的A375细胞中周期和细胞凋亡信号传导;3)处理4小时的HCT-116细胞中的MAPK信号传导。结果表明,在体外对RAF和RAS突变体癌细胞用BVD-523的紧急和长期处理均影响ERK激酶的底物磷酸化和效应子靶标。诱导这些变化所需的BVD-523浓度通常在低微摩尔范围内。

[0349] 几种特定活性标记物的变化是值得注意的。首先,BVD-523处理后,ERK激酶的缓慢迁移同种型的丰度增加;可以敏锐地观察到适度的变化,并且在长期处理后可以增加。虽然

这可能表明酶促活性、磷酸化形式的ERK增加，但仍然值得注意的是，在BVD-523处理后，受ERK直接和间接调节的多种蛋白质保持“关闭”。首先，RSK1/2蛋白在残基处显示出降低的磷酸化，所述残基严格依赖ERK进行蛋白质修饰(T359/S363)。其次，BVD-523处理诱导MAPK反馈磷酸酶DUSP6的复杂变化，:紧急处理后缓慢迁移的蛋白质同种型减少，而长期BVD-523处理后的总蛋白水平大大降低。这两个发现与ERK激酶的活性降低一致，ERK激酶通过翻译后和转录机制控制DUSP6功能。总体而言，尽管通常被认为具有活性的细胞形式的ERK增加，但在用BVD-523紧急或长期处理后，似乎细胞ERK酶活性可能被完全抑制。

[0350] 与这些观察结果一致，在用BVD-523处理后，需要MAPK途径信号传导的效应子基因发生改变。G1/S细胞周期细胞器(apparatus)通过MAPK信号传导在翻译后和转录水平上受到调节，并且在延长的BVD-523处理后细胞周期蛋白-D1蛋白质水平大大降低。类似地，凋亡效应子的基因表达和蛋白质丰度通常需要完整的MAPK信号传导，并且在延长的BVD-523处理后Bim-EL的总水平增加。然而，如上所述，在A375细胞背景中没有注意到PARP蛋白质裂解和增加的细胞凋亡;这表明其他因素可能影响BVD-523/ERK依赖性效应子信号传导的变化是否转化为确定性事件，如细胞死亡和细胞周期停滞。

[0351] 与BVD-523的细胞活性一致，标记物分析表明ERK抑制改变癌细胞中的多种分子信号传导事件，使得它们易受降低的细胞增殖和存活二者的影响。

[0352] 总之，图16A-图16D、图17A-图17D和图18A-图18D显示了BVD-523抑制MAPK信号传导途径，并且与该情况中的RAF或MEK抑制相比可能更有利。

[0353] 最后，与具有类似活性的其他试剂相比，BVD-523的性质可使其成为用作ERK抑制剂的优选试剂。已知激酶抑制剂药物与其酶靶标显示出独特和特异性的相互作用，并且药物功效受直接抑制模式以及对处理后发生的适应性变化的易感性的强烈影响。例如，ABL、KIT、EGFR和ALK激酶的抑制剂仅在其同源靶标以活性或非活性构型存在时才有效。同样，这些抑制剂中的某些对蛋白质靶标的二级基因突变或翻译后适应性变化是独特敏感的。最后，RAF抑制剂显示出对某些蛋白质复合物和/或亚细胞定位中存在的RAF激酶的不同效力。总之，由于类似地已知ERK激酶以多种多样、可变和复杂的生化状态存在，因此，似乎可能的是，BVD-523可能以与其他试剂不同且非常优选的方式与这些靶标相互作用并抑制这些靶标。

[0354] 实施例7

[0355] BVD-523和基准ERK BRAF和MEK抑制剂对活力和MARK信号传导的作用

[0356] 单一试剂增殖测定法

[0357] 将细胞以表15中所示的密度接种在96孔板中，在含有10％FBS的McCoy’s 5A中，并在加入化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。从DMSO储备液制备化合物，得到所需的最终浓度。最终的DMSO浓度恒定为0.1％。将测试化合物与细胞在37℃，5％CO_2在湿润气氛中孵育96小时。根据制造商的说明添加CellTiter-Glo®反应剂(Promega，Madison，WI)，并使用BMG FLUOstar板读取器(BMG Labtech，Ortenberg，Germany)检测发光。扣除平均仅培养基背景值并使用GraphPad Prism(GraphPad Software，La Jolla，CA)中的4参数逻辑方程分析数据。

[0358] 组合增殖测定法

[0359] 将细胞以表15中所示的密度接种到一式三份96孔板中，在含有10％FBS的McCoy’s

5A中，并在加入测试化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。使用10x8剂量矩阵测试组合。最终的DMSO浓度恒定为0.2％。

[0360] 将测试化合物与细胞一起在37℃，5％CO_2在湿润气氛中孵育96小时。用Hoechst染色对细胞染色，并如上所述检测荧光。扣除平均仅培养基背景值并分析数据。

[0361] 使用Chalice™组合分析软件(Horizon Discovery Group，Cambridge，MA)，通过Loewe加合性和Bliss独立性模型确定剂量矩阵的组合相互作用，如用户手册中所述(可在chalice.horizo ndiscovery.com/chalice-portal/documentation/analyzer/home.jsp获得)。通过比较每个组合点的实验观察到的抑制水平与加合的预期值来确定协同作用，所述预期值是从沿着矩阵边缘的单一试剂应答得到的。通过显示计算的过量抑制超过在作为热图的剂量矩阵中为加合的预测，并且通过基于Loewe模型报告定量‘协同作用评分’，来鉴定潜在的协同相互作用。来自组合测定法板的单一试剂数据表示为在Chalice™中产生的剂量-应答曲线。

[0362] 表15-细胞系接种密度

[0363]

细胞系	接种密度（细胞/孔）		
	96-孔增殖	6-孔 Western	10 cm 培养皿 Western
RKO 亲本	1000	1×10^6	2.9×10^6
RKO MEK1（Q56P/+）克隆 1	1250	未测试	未测试
RKO MEK1（Q56P/+）克隆 2	1000	7.5×10^5	2×10^6

[0364] Western印迹

[0365] 将细胞以表15中所示的密度接种到6孔板(实验1)或10cm培养皿(实验2)中，在含有10％FBS的McCoy’s 5A中，并在加入化合物或媒介物对照之前使其粘附过夜。加入测试化合物并与细胞一起在37℃，5％CO_2在湿润气氛中孵育4或24小时。通过胰蛋白酶消化收获细胞，通过离心沉淀并在干冰上快速冷冻。

[0366] 使用RIPA缓冲液(50mM Tris-盐酸盐，pH 8.0;150mM氯化钠;1.0％Igepal CA-630(NP-40);0.5％脱氧胆酸钠;0.1％十二烷基硫酸钠;1x完全无EDTA蛋白酶抑制剂混合物(Roche，Nutley，NJ;cat 05 892 791 001);1xphosSTOP磷酸酶抑制剂混合物(Roche Nutley，NJ;cat.04 906 837 001))制备裂解物，并通过在台式离心机中以11,000rpm离心10分钟来澄清。

[0367] 根据制造商的说明书(Pierce™ BCA Protein Assay Kit;Thermo Scientific，Waltham，MA;目录号23225)，通过BCA测定法定量裂解物中的总蛋白质，在样品缓冲液(NuPAGE LDS样品缓冲液;(Invitrogen，Carlsbad，CA;cat.NP0007))中煮沸，并储存在-80℃。

[0368] 在NuPAGE 4-12%Bis-Tris凝胶(Invitrogen,Carlsbad,CA;目录号WG1402BOX)上解析等量的蛋白质(40μg),并根据制造商的说明书,在iBlot凝胶转移装置(Invitrogen Carlsbad,CA)上使用iBlot凝胶转移叠层(Invitrogen,Carlsbad,CA,目录号IB4010-01)印迹到PVDF膜上。

[0369] 使用表16中详述的抗体和封闭条件探测印迹。使用Pierce™ ECL2 Western印迹底物(Thermo Scientific,Waltham,MA;目录号80196)显色Western印迹,并使用FluorChem M Western印迹成像仪(ProteinSimple,San Jose,CA)进行成像。

[0370] 表16-抗体和Western印迹条件

[0371]

抗原	尺寸(kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/封闭条件	二抗
pRSK-T359/S363	90	Millipore	04-419	1:20000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 RSK	90	Cell Siganling	9333	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pErk 1/2	42/44	Cell Signaling	9106S	1:500	o/n 4°C 5%奶	抗小鼠
总 ERK	42/44	Cell	9102	1:2000	o/n 4°C 5%	抗兔

[0372]

抗原	尺寸 (kDa)	供应商	目录号	稀释	孵育/封闭条件	二抗
		Signaling			奶	
pMEK1/2	45	Cell Signaling	9154	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
总 MEK	45	Cell Signaling	9126	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
DUSP6	48	Cell Signaling	3058S	1:1000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
pRB (Ser780)	105	Cell Signaling	9307	1:2000	o/n 4°C 5% BSA	抗兔
CCND1	34	Abcam	ab6152	1:500	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠
B-肌动蛋白	42	Sigma	A5441	1:500,000	o/n 4°C 5% 奶	抗小鼠
抗兔 HRP-缀合的二抗	-	Cell Signaling	7074S	1:2000	1h 室温; 阻断匹配一抗	
抗小鼠 HRP-缀合的二抗		Cell Signaling	7076	1:5000	1h 室温; 阻断匹配一抗	

[0373] MEK1(Q56P)突变例示了一类临床相关的MEK1/2激活突变,已知其上调MAPK途径并驱动对BRAF或MEK抑制剂的获得性抗性。

[0374] 该研究使用一对RKO BRAF(V600E)细胞系,其对于MEK1(Q56P)激活突变的存在或不存在是同基因的,以评估激活MEK突变在应答新型ERK抑制剂BVD-523对比其他基准MAPK抑制剂时具有的作用。

[0375] 通过在96小时后使用CellTiter-Glo®定量细胞ATP水平来评估对细胞活力的作用。单一试剂测定法证明双突变体BRAF(V600E)::MEK1(Q56P)细胞对基准临床BRAF(例如达拉非尼)或MEK(例如曲美替尼)抑制剂的抑制相对于亲本BRAF(V600E)细胞显示显著降低的敏感性,证明这种同基因模型适用于在临床中重现已知与此类突变相关的获得性抗性(表17)。

[0376] 表17-单一试剂IC_{50}值

[0377]

化合物	PKO 亲本	RKO MEK1 Q56P/+Cl.1	RKO MEK1 Q56P/+Cl.2
BVD-523	0.20	0.17	0.18
SCH772984	0.04	0.14	0.12
达拉非尼	n.d.	n.d.	n.d.
曲美替尼	0.006	0.093	0.080
紫杉醇	0.002	0.002	0.002

[0378] n.d.＝未测定,仅得到部分剂量应答

[0379] 相反,对BVD-523的应答在亲本和双突变体细胞中都是相同的,表明BVD-523对获得性抗性的这种机制不敏感。

[0380] 这些结果在两个独立衍生的双突变体BRAF(V600E)::MEK1(Q56P)细胞系克隆中是相同的,证实响应对比亲本细胞的这些差异是与MEK1突变的存在特异性相关而不是与不相关克隆人工制品相关(图22A-图22E)。使用第二种机制上不同的基准ERK抑制剂(SCH772984)也观察到类似的结果,其支持这些观察结果与ERK的抑制作用特异性相关而不是由于脱靶作用的观点。

[0381] 使用Loewe加合性或Bliss独立性模型以Horizon的Chalice™组合分析软件,也在这些细胞系中跨浓度矩阵评估BVD-523与BRAF抑制剂(例如达拉非尼)组合的作用(图23-图230和图24A-图240)。然后通过显示计算的过量抑制超过作为热图的剂量矩阵为加合的预期,并且通过计算'体积分数'显示对组合的总体响应是否是协同的(正值)、拮抗的(负值)或加合的(～0),来评估潜在的协同相互作用的存在。

[0382] 结果表明BVD-523::达拉非尼组合在亲本和突变体细胞系中主要是加合的。相反,MEK抑制剂(曲美替尼)加达拉非尼的组合虽然在亲本细胞系中主要是加合的,但在双突变体BRAF(V600E)::MEK1(Q56P)细胞系中显示出强协同作用(图25A-图250)。测试组合的Loewe体积、Bliss体积和协同作用评分分别显示在表18-20中,并在图26A-图26C中以图表示。

[0383] 表18-Loewe体积

[0384]

	RKO 亲本	RKO MEK1（Q56P）-克隆 1	RKO MEK1（Q56P）-克隆 2
BVD-523 x 达拉非尼	3.54	2.88	2.35
达拉非尼 x SCH772984	5.2	6.79	6.14
达拉非尼 x 曲美替尼	5.68	12.6	11.6

[0385] 表19-Bliss体积

[0386]

	RKO 亲本	RKO MEK1（Q56P）-克隆 1	RKO MEK1（Q56P）-克隆 2
BVD-523 x 达拉非尼	-0.894	0.527	1.42
达拉非尼 x SCH772984	0.209	4.3	5.07
达拉非尼 x 曲美替尼	0.353	10.8	9.87

[0387] 表20-协同作用评分

[0388]

	RKO 亲本	RKO MEK1（Q56P）-克隆 1	RKO MEK1（Q56P）-克隆 2
BVD-523 x 达拉非尼	3.18	2.31	1.77
达拉非尼 x SCH772984	4.56	5.57	4.36
达拉非尼 x 曲美替尼	5.58	11	9.83

[0389]

[0390] 通过Western印迹评估对MAPK途径显著的作用。相对于亲本，基础ERK磷酸化水平(DMSO样品)在MEK1(Q56P)表达系中显著上调，进一步证实该同基因模型忠实地概括了MEK激活获得性抗性突变的表达的预期表型。

[0391] 在亲本BRAF(V600E)RKO细胞中，用药理学活性浓度的RAF、MEK和ERK激酶抑制剂紧急处理后，观察到RSK1/2磷酸化的水平降低。相反，同基因双突变体BRAFV600E::MEK1Q56P细胞在BRAF或MEK抑制剂处理后没有表现出降低的RSK磷酸化，而BVD-523在相似浓度仍然

有效(图27A-图27I)。虚线表示经曲美替尼处理的样品(加上匹配的DMSO对照)和印迹是来自对BRAFi和BVD-523处理的样品的单独实验。

[0392] 在延长的抑制剂处理后,观察到与细胞生长抑制模式一致的效应子基因信号传导的变化。在亲本RKO系中,在延长的MEK和ERK抑制剂处理后,观察到磷酸化的pRB水平降低。在pRB调控水平,MEK1突变体系似乎对低浓度MEK抑制剂处理不敏感,而较高浓度仍然有效。关键的是,BVD-523针对pRB活性的效力似乎不受MEK突变的强烈影响。令人惊讶的是,尽管在亲本和MEK突变体背景中有效抑制上游信号传导,但RAF抑制剂处理不影响pRB状态。

[0393] 总之,这些结果显示BVD-523不易受MEK激活突变(例如MEK1(Q56P))驱动的获得性抗性的影响。此外,他们提出,无论是否存在MEK激活突变,在组合中BVD-523和BRAFi(例如达拉非尼)之间的相互作用都是加合的。

[0394] 实施例8

[0395] 在ERK抑制剂之间的组合相互作用

[0396] 将RAF突变体黑素瘤细胞系A375细胞培养在含有10%FBS的DMEM中,并以每孔2000个细胞的初始密度接种到一式三份的96孔板中。如上文实施例4中所述,在72小时后分析ERK抑制剂BVD-523和SCH772984之间的组合相互作用。根据制造商的说明使用CellTiter-Glo®反应剂(Promega,Madison,WI)测定活力,并使用BMG FLUOstar读板器(BMG Labtech,Ortenberg,Germany)检测发光。

[0397] Loewe和Bliss‘过量抑制’热图的可视化表明BVD-523和SCH772984的组合主要是加合的,并在中等范围剂量中具有潜在协同作用的窗口(图28A-图28E)。

[0398] 总之,这些结果表明BVD-523和SCH772984之间的相互作用至少是加合的,并且在某些情况下是协同的。

[0399] 实施例9

[0400] 靶向癌症中的MAPK信号传导通路:使用新型选择性ERK1/2抑制剂BVD-523(Ulixertinib)的有希望的活性

[0401] 癌症的治疗策略已经从经典的基于细胞毒性的方法演变为抵消遗传病灶的作用的试剂,所述遗传病灶驱动对肿瘤增殖和存活必需的异常信号传导。例如,除了途径组分组如RAS和BRAF的组成型激活突变(Gollob等人,2006),有丝分裂原激活蛋白激酶(MAPK)信号传导级联(RAS-RAF-MEK-ERK)(Cargnello和Rouxx 2011)的ERK模块可以有几种受体酪氨酸激酶(例如,EGFR和ErbB-2)所参与。通过ERK信号传导的异常激活,RAS或BRAF中的遗传改变导致肿瘤快速生长,细胞存活增加和对细胞凋亡的抗性(Poulikakos等人,2011,Corcoran等人,2010,Nazarian等人,2010,Shi等人,2014,Wagle等人,2011)。RAS家族成员KRAS和NRAS的激活突变在所有人类癌症中约占30%,在胰腺癌(Kanda等人,2012)和结肠直肠癌(Arrington等人,2014)中发生率特别高。在黑素瘤、甲状腺癌、结肠直肠癌和非小细胞肺癌中观察到正常编码在氨基酸600处的缬氨酸的BRAF基因中的组成型激活突变(Hall等人,2014)。还报道了携带导致下游组分ERK和MEK变化的基因突变的癌症(Ojesina等人,2014,Arcila等人,2015)。激活MAPK途径的改变在靶向疗法的抗性情况中也很常见(Groenendijk等人,2014)。因此,靶向MAPK途径末端主激酶(ERK1/2)是用于具有这种途径激活改变(例如,BRAF、NRAS和KRAS)的肿瘤的有希望的策略。

[0402] 三种MAPK途径靶向药物已经被美国食品和药物管理局(FDA)批准用于单一试剂治

疗具有$BRAF^{V600}$突变的不可切除或转移性皮肤黑素瘤:BRAF抑制剂维罗非尼和达拉非尼以及MEK抑制剂曲美替尼。此外,达拉非尼和曲美替尼的组合也被批准用于该适应症(Queirolo等人,2015和Massey等人,2015)。另外的MEK抑制剂考比替尼(cobimetinib)被批准作为与BRAF抑制剂的组合方案的一部分用于该适应症中。使用这些药物的临床经验证实MAPK途径是治疗靶标。在$BRAF^{V600}$突变体黑色素瘤患者的III期试验中,单一试剂维罗非尼和达拉非尼表现出优异的应答率(约50%对比5-19%)和中位数无进展生存期(PFS,5.1-5.3个月对比1.6-2.7个月),超过细胞毒性化学疗法(达卡巴嗪)(Chapman等人,2011和Hauschild等人,2012)。此外,伴随BRAF-加MEK靶向疗法的临床应用已经证明,同时靶向MAPK途径中的不同节点可以增强响应的幅度和持续时间。与单一试剂BRAF抑制相比,BRAF加MEK-靶向试剂(达拉非尼/曲美替尼或考比替尼/维罗非尼)的一线使用进一步改善了中位数总生存期(Robert等人,2015,Long等人,2015,Larkin等人,2014)。因此,对于具有$BRAF^{V600}$突变的转移性黑素瘤患者,组合的BRAF-/MEK-靶向疗法是有价值的治疗选择。

[0403] 尽管使用BRAF-/MEK-抑制剂组合疗法观察到临床结果的改善,但持久益处受到获得性抗性和随后疾病进展的最终发展的限制,中位数PFS范围是约9-11个月。(Robert等人,2015,Long等人,2015,Larkin等人,2014以及Flaherty等人,2012)。已经深入研究了对单一试剂BRAF抑制的获得性抗性的遗传机制,并且鉴定抗性机制包括BRAF的剪接变体(Poulikakos等人,2011),$BRAF^{V600E}$扩增(Corcoran等人,2010),MEK突变(Wagle等人,2014),NRAS突变和RTK激活(Nazarian等人,2010和Shi等人,2014)。BRAF-/MEK-抑制剂组合疗法情况中的抗性机制开始出现,并且反映了BRAF单一试剂抗性的机制(Wagle等人,2014和Long等人,2014)。这些遗传事件都共有再激活ERK信号传导的能力。实际上,通过ERK转录靶标测量的再激活的MAPK途径信号传导在来自BRAF抑制剂抗性患者的肿瘤活组织检查中是常见的(Rizos等人,2014)。此外,在没有抗性遗传机制的情况下观察到ERK1/2再激活(Carlino等人,2015)。因此,寻求实现持久的临床益处使研究人员专注于评估靶向下游MAPK组分ERK1/2的其他试剂。抑制ERK可为对BRAF/MEK抑制具有获得性抗性的患者提供重要的临床益处。ERK家族激酶已经显示出在临床前癌症模型中作为治疗靶标的前景,包括那些对BRAF或MEK抑制剂具有抗性的癌症(Morris等人,2013和Hatzivassiliou等人,2012)。然而,这种ERK1/2抑制剂的潜在用途扩展到黑素瘤的获得性抗性之外。

[0404] 靶向ERK1/2是在携带MAPK的已知驱动因子的任何肿瘤类型中的合理策略,不仅是BRAF/MEK治疗复发患者。由于ERK1和ERK2位于该途径的下游,它们代表了MAPK级联中特别有吸引力的治疗策略,其可以避免上游抗性机制。在此,报道了在MAPK途径依赖性癌症模型中BVD-523(ulixertinib)的临床前特征,所述MAPK途径依赖性癌症模型包括药物首次治疗和BRAF/MEK疗法获得性抗性模型。BVD-523的I期剂量发现研究的结果作为该期刊的伴随出版物被包括在内。参见实施例17-24。

[0405] 在本发明中,BVD-523显示为具有体外和体内抗癌活性的ERK1/2的有效、高选择性、可逆的小分子ATP竞争性抑制剂。

[0406] 鉴定BVD-523(ulixertinib)并表征为具有高功效和ERK1/2选择性的新型可逆的ATP竞争性ERK1/2抑制剂。BVD-523引起增殖减少和胱天蛋白酶活性增强,在携带MAPK(RAS-RAF-MEK)途径突变的细胞中最明显。在体内$BRAF^{V600E}$异种移植研究中,BVD-523显示剂量依赖性生长抑制和肿瘤消退。有趣的是,尽管ERK1/2的磷酸化增加,但BVD-523抑制靶底物的

磷酸化。BVD-523还在对单一试剂和组合BRAF/MEK靶向疗法的获得性抗性模型中表现出抗肿瘤活性。当BVD-523与BRAF抑制组合使用时，还证实了$BRAF^{V600E}$-突变体黑素瘤细胞系异种移植模型中的协同抗增殖作用。这些研究表明，BVD-523有望作为ERK依赖性癌症的治疗方法，包括肿瘤对靶向MAPK途径上游节点的其他治疗具有获得性抗性的那些癌症。

[0407] 实施例10

[0408] 新型ERK1/2抑制剂BVD-523(Ulixertinib)的发现和初步表征

[0409] 在对使用高通量小分子筛选(Aronov等人，2009)最初鉴定的线索的广泛优化之后，鉴定了新型三磷酸腺苷(ATP)竞争性ERK1/2抑制剂BVD-523(ulixertinib)(图29A)。BVD-523是一种有效的ERK抑制剂，对ERK2的Ki为0.04±0.02nM。它显示为ATP的可逆的竞争性抑制剂，因为ERK2抑制的IC_{50}值随着ATP浓度的增加而线性增加(图29B和图29C)。对于孵育时间≥10分钟，IC_{50}几乎保持恒定，表明BVD-523与ERK2的快速平衡和结合(图29D)。BVD-523也是重组ERK1的紧密结合抑制剂(Rudolph等人，2015)，显示Ki<0.3nM。

[0410] 使用量热研究证明BVD-523与ERK2的结合，并与使用ERK抑制剂SCH772984和吡唑基吡咯产生的数据进行比较(Arovov等人，2007)。所有化合物以增加的浓度结合并稳定化无活性的ERK2，如正ΔTm值所示(图29E)。使用BVD-523和SCH-772984观察到的ΔTm中10到15度变化与具有低纳摩尔结合亲和力的化合物一致(Fedorov等人，2012)。BVD-523显示出对磷酸化的活性ERK2(pERK2)和无活性的ERK2的强结合亲和力(图29F)。观察到与无活性ERK2相比对pERK2的更强亲和力。BVD-523不与阴性对照蛋白p38αMAP激酶相互作用(图29F)。

[0411] 除了ERK1和ERK2之外，BVD-523基于针对75种激酶的生物化学反筛选显示出优异的ERK1/2激酶选择性。在所有测定法中ATP浓度约等于K_m。被2μM BVD-523抑制大于50％的激酶被重新测试以产生K_i值(或表观K_i;表21)。14种激酶中的12种具有<1μM的K_i。除了ERK1之外，BVD-523对ERK2的选择性对于所有测试的激酶都是>7000倍，ERK1被抑制的Ki<0.3nM(10倍)。因此，BVD-523是ERK1/2的高效选择性抑制剂。

[0412] 表21-BVD-523显示对ERK1和ERK2激酶的选择性。

[0413]

激酶	Ki（μM）
CDK1/细胞周期蛋白 B	0.07[a]
CDK2/细胞周期蛋白 A	0.36
CDK5/p35	0.09[a]
CDK6/细胞周期蛋白 D3	0.09[a]
ERK1	0.0003
ERK2	0.00004
GSK3b	0.32
JNK2α	0.65[a]
JNK3	1.3
P38γ	0.45[a]
P38δ	0.24[a]
ROCKI	11.1
ROCKII	0.27[a]
RSK3	0.45
[a]表观 在 2 μM 的<50%抑制: ABL, AKT3, AMPK, AUR1, AUR2, AXL, BLK, CAMKII, CAMKIV, CHK1, CHK2, CK1, CK2, CSK, EGFR, EPHB4, FES, FGFR3, FLT3, FYN, IGF1R, IKKα, IKKβ, IKKi, IRAK4, IRTK, ITK, JAK3, JNK1α1, KDR, LCK, LYN, cMET, MKK4, MKK6, MKK7β, MLK2, MSK1, MST2, NAK, NEK2, p38α, p38β,	

[0414]

p70S6K, PAK2, PDGFRα, PDK1, PKA, PKCα, PKCβII, PKCγ, PKCi, PKCθ, PRAK, PRK2, cRAF, SGK, SRC, SYK, TAK1, TIE2, ZAP70

[0415] 实施例11

[0416] BVD-523在具有MAPK途径激活突变的癌细胞系中体外优先抑制细胞增殖并增强胱天蛋白酶-3/7活性

[0417] 在一组不同谱系和遗传背景的约1,000种癌细胞系中评估BVD-523细胞活性(图

30A和表22)。根据RAS家族成员和BRAF中突变的缺失或存在,将细胞系分类为MAPK野生型(wt)或突变体。尽管一些MAPK-wt细胞系对BVD-523敏感,但通常BVD-523在具有MAPK途径改变的细胞中优先抑制增殖。

[0418] 接下来,表征BVD-523处理对敏感细胞的生长和存活影响。在用BVD-523以500nM或2000nM处理24小时后,在$BRAF^{V600E}$-突变体黑素瘤细胞系UACC-62上进行荧光激活细胞分选(FACS)分析。处理的细胞以浓度依赖性方式停滞在细胞周期的G1期(图30B)。

[0419] 此外,分析胱天蛋白酶-3/7活性作为多种人癌细胞系中细胞凋亡的量度。在用BVD-523处理72小时后观察到胱天蛋白酶3/7的浓度和细胞系依赖性增加(图30C)。BVD-523处理在携带$BRAF^{V600}$突变的MAPK活化细胞系子集(A375、WM266和LS411N)中导致显著的胱天蛋白酶-3/7诱导。这与先前关于BVD-523在MAPK途径-突变体癌细胞系中优先抑制增殖的观察结果一致(图30A)。

[0420] 为了进一步表征作用机制和对BVD-523引发的信号传导的作用,在BVD-523处理的$BRAF^{V600E}$-突变体A375黑素瘤细胞中评估了各种效应子蛋白和MAPK相关蛋白的水平(图30D)。在BVD-523处理的4和24小时后,磷酸-ERK1/2水平以浓度依赖性方式增加。尽管用2μM BVD-523处理观察到pERK1/2的突出浓度依赖性增加,但ERK1/2靶标RSK1/2的磷酸化在4小时和24小时均降低,这与持续抑制一致。DUSP6(ERK1/2活性的远端标记物)的总蛋白水平也在4和24小时时减弱。用BVD-523处理24小时后,凋亡标记物BIM-EL以剂量依赖性方式增加,而细胞周期蛋白D-1和pRB在2μM减弱。所有作用均与靶向ERK1/2抑制一致。

[0421] 实施例12

[0422] BVD-523在$BRAF^{V600E}$突变体癌细胞系异种移植模型中显示体内抗肿瘤活性

[0423] 基于我们的以下体外发现,即BVD-523以浓度依赖性方式减少增殖和诱导细胞凋亡,通过口服强饲法施用BVD-523以证明其在MAPK/ERK途径依赖性的模型中具有体内抗肿瘤活性。使用黑素瘤(细胞系A375)和结肠直肠癌(细胞系Colo205)的异种移植模型,两者都携带$BRAF^{V600E}$突变。

[0424] 在A375细胞系异种移植物中,在处理14天后,将BVD-523功效与对照细胞毒性烷化剂替莫唑胺进行比较。BVD-523从50mg/kg每天两次(BID)开始,表现出显著的剂量依赖性抗肿瘤活性(图31A)。50和100mg/kg BID的剂量显著减弱肿瘤生长,肿瘤生长抑制(TGI)分别为71%(P=0.004)和99%(P<0.001)。在100mg/kg BID组中注意到7个部分消退(PR);在任何其他组中均未发现消退应答。观察到的功效优于替莫唑胺,后者当以75和175mg/kg施用时,分别导致适度的剂量依赖性TGI为34%(P>0.05)和78%(P=0.005)。

[0425] 另外,BVD-523在Colo205人结肠直肠癌细胞系异种移植模型中显示出抗肿瘤功效(图31B)。BVD-523在剂量为50、75和100mg/kg BID时再次显示出显著的剂量依赖性肿瘤消退,平均肿瘤消退T/Ti(T=治疗结束,Ti=治疗开始)分别为-48.2%、-77.2%和-92.3%(均P<0.0001)。在最低剂量的BVD-523(25mg/kg BID)未观察到消退;然而,观察到显著的肿瘤生长抑制,T/C(T=治疗,C=对照)为25.2%(P<0.0001)。尽管耐受性不好,但阳性对照化学治疗剂伊立替康(CPT-11)显示出显著的抗肿瘤活性,抑制Colo205肿瘤生长的T/C为6.4%(P<0.0001)。然而,即使以其在小鼠中的最大耐受剂量使用,CPT-11在50、75或100mg/kg BID剂量也不如BVD-523有效。

[0426] 为了建立药代动力学和药效学之间的关系,将BVD-523血浆浓度与通过免疫组织

化学和加同位素标签的内标质谱法在肿瘤中测量的pERK1/2水平在单次100mg/kg口服剂量的BVD-523后的24小时期间进行比较(图31C)。在未治疗的肿瘤中,ERK1/2的磷酸化低(0小时)。在用BVD-523处理后,ERK1/2磷酸化从给药后1小时稳定增加至给药后8小时的最大水平,然后在24小时后回到给药前水平。pERK1/2的这种增加与BVD-523药物血浆浓度相关。用BVD-523处理的pERK1/2增加的体内观察与早期的体外发现一致(图30D)。

[0427] 实施例13

[0428] 尽管ERK1/2磷酸化增加,但BVD-523导致ERK1/2底物抑制

[0429] 为了检查BVD-523相对于其他已知的ERK1/2抑制剂(SCH772984、GDC-0994和Vx-11e)(Morris等人,2013和Liu等人,2015)对信号传导的作用,大约40种蛋白质的大规模反相蛋白质阵列(RPPA)用于对ERK抑制敏感的多种细胞系。测定具有BRAF和RAS中常见改变的细胞系:$BRAF^{V600E}$突变体系A375、Colo205和HT29;$KRAS^{G12C}$-突变体细胞系MIAPACa-2;$KRAS^{G13D}$-突变体细胞系HCT116;和具有非典型$HRAS^{F82L}$突变的AN3Ca。蛋白质水平的变化显示为相比于二甲基亚砜(DMSO)处理的亲本对照的百分比变化(图32A和表23)。除ERK1/2的磷酸化(pERK1/2[ERK1/2-T202,-Y204])外,所有ERK抑制剂均引发定性上相似的蛋白质作用;SCH7722984抑制所有细胞系中的pERK1/2,而BVD-523、GDC-0994和Vx-11e显著增加pERK1/2。分别是pERK1/2的近端和远端靶的磷酸-p90RSK(pRSK1)和细胞周期蛋白D1被所有测试的抑制剂类似地抑制,而无论ERK1/2磷酸化的程度如何(图32B)。BVD-523的这些独立发现与显示ERK1/2底物RSK1/2的磷酸化仍受抑制的研究一致,尽管在A375细胞中通过Western印迹显著升高的pERK1/2(图32D),此外还有蛋白结合研究证明BVD-523结合并稳定化pERK1/2和无活性的ERK1/2(图29E和图29F)。因此,测量增加的pERK1/2水平可以被认为是BVD-523的临床药效学生物标志物,同时量化对ERK1/2靶如pRSK1和DUSP6的抑制也可以起到类似的作用。

[0430] 在该RPPA数据组中注意到额外的蛋白质变化(图32A)。降低的pS6-核糖体蛋白似乎是ERK1/2抑制的另一种药效学标志物,如在使用所有化合物的所有细胞系中所证明的(图32B)。此外,pAKT的显著诱导似乎是细胞系依赖性观察,其中每种ERK1/2抑制剂在细胞系A375和AN3CA细胞中诱导pAKT(图33)。有趣的是,存活标记物pBAD的抑制程度似乎在化合物之间不同,与测试的其他ERK1/2抑制剂相比,GDC-0994仅对pBAD有适度的抑制(图32A)。

[0431] 接下来研究了BVD-523如何影响$BRAF^{V600E}$-突变体RKO结肠直肠细胞系中ERK1/2和下游靶pRSK的细胞定位(图32C)。在静息细胞中,ERK1/2定位于细胞质,并且一旦受到刺激,pERK1/2就迁移到靶细胞器,特别是转录靶被激活的细胞核(Wainstein等人,2016)。在DMSO处理的对照细胞中,pERK1/2在核和细胞质级分中都很明显,由于在该细胞系中存在$BRAF^{V600E}$,这可能反映了MAPK途径活性。与DMSO处理的细胞相比,用BVD-523处理导致细胞核和细胞质中的pERK1/2升高以及核总ERK1/2适度增加,表明化合物诱导的pERK1/2稳定化刺激了一些核转位。尽管两个区室中pERK1/2均增加,但与DMSO对照相比,细胞质和核区室中的pRSK水平较低。比较物MAPK信号传导抑制剂(即曲美替尼、SCH7722984、达拉非尼)抑制ERK1/2和RSK的磷酸化,如核和细胞质区室中的较低水平所反映的。这些数据再次表明,BVD-523相关的pERK1/2增加在细胞质和细胞核中都明显;然而,这并不意味着靶底物的激活。这与图30D和图32A中呈现的数据一致。

[0432] 实施例14

[0433] BVD-523在BRAF和MEK抑制剂抗性的体外模型中显示活性

[0434] 对BRAF和MEK抑制剂的抗性的出现限制了它们的临床功效。在这里，实验试图在体外模拟和比较对BRAF(达拉非尼)、MEK(曲美替尼)和ERK1/2(BVD-523)抑制的抗性的发展。在几个月内，$BRAF^{V600E}$-突变体A375细胞在逐渐增加浓度的每种抑制剂中培养。在高浓度的曲美替尼或达拉非尼中生长后容易地获得了抗药性A375细胞系，而开发对BVD-523具有抗性的细胞系证明是具有挑战性的(图34A)。总之，这些体外数据表明，在产生类似靶抑制的浓度下，与达拉非尼或曲美替尼相比，对BVD-523的抗性延迟，可能解释为为临床中的持久应答。

[0435] 对ERK1/2信号传导的再激活和依赖性是对BRAF/MEK抑制的获得性抗性的共同特征(Morris等人，2013和Hatzivassiliou等人，2012)；因此，评估了BVD-523在获得性抗性的体外模型中的活性。首先，使用所述的增加浓度方法获得达拉非尼和曲美替尼组合抗性A375群体。表24中显示了BRAF/MEK组合抗性群体中达拉非尼、曲美替尼和BVD-523的IC_{50}和相比于亲本A375的IC_{50}倍数变化。BVD-523 IC_{50}适度移位(2.5倍)，而达拉非尼和曲美替尼更显著地移位(分别为8.5倍和13.5倍)(表24)。测试细胞毒性剂紫杉醇作为对照，仅观察到功效的适度变化。这些数据支持在BRAF/MEK疗法抗性的情况下对BVD-523的研究，尽管该细胞群中的抗性机制仍然待表征。

[0436] 表24-BRAF/MEK抑制的模型中的BVD-523活性

[0437]

细胞系	达拉非尼	曲美替尼	BVD-523	紫杉醇
亲本（IC_{50}nM）	2.1	0.2	129	1.9
BRAFi-+MEKi-抗性（IC_{50}nM）	17.9	2.7	323	3.5
倍数变化	+8.5	+13.5	+2.5	+1.8

[0438] 为了进一步研究在具有已知BRAF抑制剂抗性机制的模型中ERK1/2抑制的易处理性，使用AAV介导的基因靶向来产生一对RKO $BRAF^{V600E}$-突变体细胞系，其对于$MEK1^{Q56P}$激活突变的工程化杂合敲入的存在或不存在是同基因的(Trunzer等人，2013和Emery等人，2009)。包括$MEK1^{Q56P}$在内的MEK1/2突变与在患者中的单一试剂BRAF和组合BRAF/MEK疗法获得性抗性有关(Wagle等人，2011，Wagle等人，2014，Emery等人，2009和Johnson等人，2015)。单一试剂测定法证明，相对于亲本$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{wt}$细胞，双突变体$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{Q56P}$细胞显示出对BRAF抑制剂维罗非尼和达拉非尼以及MEK抑制剂曲美替尼的显著降低的敏感性(图34B)。相反，对BVD-523的应答在亲本和$MEK1^{Q56P}$突变体细胞中基本相同，表明BVD-523对这种获得性抗性的机制不敏感。这些结果在2个独立衍生的双突变体$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{Q56P}$细胞系克隆中得到与一个证实，因此验证了结果与$MEK1^{Q56P}$突变的存在特异性相关，而不是不相关的克隆假象不相关(数据未显示)。用第二种机制不同的ERK1/2抑制剂(SCH772984)也观察到类似的结果，支持了这些观察结果与ERK1/2的机制抑制特异性相关、而不是由于脱

靶化合物作用的预期。

[0439] 为了进一步表征BVD-523对$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{Q56P}$细胞系中MAPK途径信号传导的机制作用，通过Western印迹评估蛋白质水平(图34C)。在亲本$BRAF^{V600E}$ RKO细胞中，在用药理学活性浓度的BRAF(维罗非尼)、MEK(曲美替尼)或ERK1/2(BVD-523)抑制剂处理4小时后观察到pRSK1/2水平降低。相反，同基因双突变体$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{Q56P}$细胞在BRAF或MEK抑制剂处理后没有表现出降低的RSK磷酸化，而BVD-523仍然有效抑制pRSK1/2至与亲本RKO相当的水平。类似地，在亲本RKO和$BRAF^{V600E}$::$MEK1^{Q56P}$中，24小时的BVD-523处理使得pRB降低，指示G0/G1停滞。

[0440] 获得性KRAS突变也是MAPK途径抑制剂抗性的已知驱动因子。为了理解BVD-523对这种抗性机制的易感性，使用了结肠直肠细胞系SW48中临床相关KRAS突变的同基因组。将对BVD-523的敏感性与MEK抑制剂司美替尼(selumetini)和曲美替尼进行比较(图34D)。对紫杉醇的敏感性未改变(图37A)。虽然几个突变体KRAS等位基因赋予对MEK抑制的强健至中等水平的抗性，但是大多数等位基因没有改变对BVD-523的敏感性，并且当观察到灵敏度的移位时，其未达到用曲美替尼或司美替尼观察到的程度。总之，这些数据表明BVD-523在这方面比MEK抑制剂更有效。

[0441] 实施例15

[0442] BVD-523在BRAF抑制剂抗性患者衍生的黑素瘤异种移植模型中显示体内活性

[0443] 为了证实和扩展在BRAF-/MEK-获得性抗性的体外模型中观察到的BVD-523的抗肿瘤作用，使用源自对维罗非尼具有抗性的患者的BRAF抗性异种移植模型。BVD-523通过口服强饲法以100mg/kg BID给药28天，包括单独和与50mg/kg BID的达拉非尼组合(图35)。如所预期的，单一试剂达拉非尼显示出最低的抗肿瘤活性(22％TGI)。与媒介物对照相比，BVD-523活性显著($P \leq 0.05$)，TGI为78％。在该模型中，将BVD-523与达拉非尼组合使得TGI为76％($P \leq 0.05$)；因此，与单一试剂BVD-523相比，在这种BRAF获得性抗性模型中，组合未获得进一步的益处。

[0444] 实施例16

[0445] 使用BVD-523和BRAF抑制剂的组合疗法提供有希望的抗肿瘤活性

[0446] 具有BRAF突变体癌症的患者可能获得对组合的BRAF/MEK疗法的抗性(Wagle等人，2014)，从而需要考虑MAPK途径内的其他组合方法。在$BRAF^{V600E}$-突变体黑素瘤细胞系G-361中评估了组合BVD-523与BRAF抑制剂维罗非尼的抗增殖作用。如所预期的，单一试剂BVD-523和维罗非尼都是有活性的，并且当组合时观察到适度的协同作用(图37B)。这表明BVD-523与BRAF抑制剂组合在携带$BRAF^{V600E}$突变的黑素瘤细胞系中至少是加成的并且潜在地具有协同作用。此外，在BRAF抑制剂加BVD-523中连续培养$BRAF^{V600E}$突变体细胞系(A375)后在体外产生获得性抗性具有挑战性。相反，产生对单独达拉非尼的抗性相对快速地发生(图37C)。甚至对组合的达拉非尼和曲美替尼的抗性出现在达拉非尼加曲美替尼之前。

[0447] 在其中浓度不受耐受性限制的体外组合研究中可能无法完全实现组合的BRAF和ERK抑制的益处。为了理解该组合的益处，使用$BRAF^{V600E}$-突变体人黑素瘤细胞系A375的异种移植物在体内评估功效。由于对组合治疗值得注意的应答，在第20天停止组合组中的给药以监测肿瘤再生长，并在第42天重新开始(图36A)。每周两次测量肿瘤直至研究在第45天终止。对照的至终点的中位数时间(TTE)为9.2天，并且35.8天的最大可能肿瘤生长延迟(TGD)

定义为100％。替莫唑胺治疗导致TGD为1.3天(4％)且无消退。50和100mg/kg达拉非尼单一疗法产生的TGD分别为6.9天(19％)和19.3天(54％)，表现出显著的存活益处(P<0.001)和100mg/kg组中的1PR。100mg/kg BVD 523单一疗法导致9.3天的TGD(26％)，表现出显著的存活益处(P<0.001)和2个持久的完全应答。达拉非尼与BVD-523的组合各自产生最大可能的100％TGD，具有值得注意的消退应答，并且与其相应的单一疗法相比具有统计学上更高的总体存活率(P<0.001)。最低剂量组合产生了值得注意的7/15无肿瘤存活者(TFS)，并且3个较高剂量组合产生了总共43/44TFS，与治愈性或接近治愈性活性一致(图36B)。总之，达拉非尼与BVD-523的组合产生了更多数量的TFS和优于单一药剂的功效。

[0448] 基于BVD-523加达拉非尼在具有约75-144mm^3的起始肿瘤体积的A375异种移植模型中的活性，进行后续实验以确定组合疗法在“后期”A375异种移植物(平均肿瘤起始体积，700-800mm^3)中的功效(图36C)。对照的中位数TTE为6.2天，确定了最大可能TGD为53.8天，其定义为60天研究的100％TGD。BVD-523 100mg/kg单一疗法产生的TGD可忽略不计(0.7天，1％)，与对照组无显著生存差异(P>0.05)。TTE和2个PR的分布表明，对单独使用BVD-523的处理可能有一部分应答者。达拉非尼50mg/kg单一疗法有效，与对照组相比，TGD为46.2天(86％)并具有显著的生存益处(P<0.001)。该组在11只可评估的小鼠中具有5个PR和5个CR，包括3个TFS(图36D)。与对照组相比，达拉非尼与BVD-523的两种组合产生最大100％TGD和显著的存活益处(P<0.001)。尽管消退活性存在差异，但每种组合在可评估小鼠中产生100％消退应答。25-mg/kg达拉非尼和50-mg/kg BVD-523组合具有2个PR和8个CR，具有6/10 TFS，而50-mg/kg达拉非尼和100-mg/kg BVD-523组合在第60天具有11/11TFS(图36D)。总体而言，这些数据支持BVD-523与BRAF靶向治疗的前线组合在$BRAF^{V600}$突变黑色素瘤中的基本原理，并且这可能扩展到携带这种改变的其他肿瘤类型。

[0449] 讨论

[0450] BVD-523是ERK1/2的有效、高选择性、可逆的小分子ATP竞争性抑制剂，其在体内和体外癌症模型中具有活性。在体外，BVD-523显示出对几种人肿瘤细胞系的有效抑制，特别是那些携带MAPK信号传导途径中的激活突变的细胞系，与其作用机制一致。BVD-523引起下游靶蛋白和效应子蛋白的变化，包括抑制ERK1/2的直接底物(pRSK)和总DUSP6蛋白水平。这些发现与之前对其他ERK1/2抑制剂的研究结果一致，后者证明了ERK1/2抑制对pRSK的有效压制(Morris等人，2013和Hatzivassiliou等人，2012)。有趣的是，BVD-523处理导致体外和体内ERK1/2磷酸化的显著增加。与我们的研究结果相似，采用ERK1/2抑制剂Vx11e报道了pERK1/2增加；相反，伴随SCH772984发生了pERK1/2抑制(Morris等人，2013)。尽管在所测试的各种ERK1/2抑制剂中观察到pERK1/2水平的差异，但是下游效应子(即pRSK1和总DUSP6)被类似地抑制。这些发现表明定量ERK1/2靶底物，例如pRSK1，可以作为BVD-523介导的ERK1/2活性抑制的可靠药效生物标志物。

[0451] 虽然BRAF(达拉非尼、维罗非尼)和MEK(曲美替尼、考比替尼)抑制剂验证了MAPK途径作为治疗靶标，特别是在具有$BRAF^{V600}$突变的患者中，抗肿瘤应答受到获得性抗性的出现和随后的疾病进展的限制。抗性被归因于补偿性信号传导分子的上调和激活(Nazarian等人，2010，Villanueva等人，2010，Johannessen等人，2010和Wang等人，2011)，靶基因的扩增(Corcoran等人，2010)和途径组分(例如，RAS，MEK)的激活突变(Wagle等人，2011，Emery等人，2009和Wang等人，2011)。ERK1/2途径的再激活是获得性抗性机制的一个常见后果。当引

入$BRAF^{V600E}$-突变体黑素瘤细胞系A375时，MEK^{Q56P}赋予对MEK和BRAF抑制的抗性(Wagle等人，2011)。相反，BVD-523在工程化的MEK^{Q56P}细胞系中保留其有效的抑制活性，表明ERK1/2抑制在上游激活改变情形中是有效的，所述上游激活改变可对BRAF/MEK处理应答而产生。作为BVD-523在获得性抗性情形中的作用的进一步证据，BVD-523的功效在来自其疾病在维罗非尼上进展的患者的肿瘤样品的异种移植模型中是明显的；BRAF抑制剂达拉非尼在该模型中无效。这些数据支持在BRAF/MEK抗性的情况中靶向ERK1/2的作用，并补充了先前公布的发现(Morris等人，2013和Hatzivassiliou等人，2012)。为了进一步表征对MAPK途径的抑制剂的抗性，研究了对BVD-523本身的抗性的出现。发现与靶向上游MAPK信号传导组分的其他试剂(即，达拉非尼、曲美替尼)相比，用BVD-523对癌细胞进行单一试剂处理是持久的并且对于发展抗性更具挑战性。这可能表明获得对ERK1/2靶向剂的抗性比获得对BRAF或MEK疗法的抗性更难实现，这可能是由于BVD-523优先靶向ATP结合位点的更保守的活性构型的事实。然而，用其他ERK1/2抑制剂进行的体外研究已经确定了ERK1/2中驱动抗性的特定突变体(Jha等人，2016和Goetz等人，2014)；这些特定突变尚未在ERK1/2抑制剂复发患者的临床样品中鉴定到。

[0452] BVD-523对ERK1/2抑制的潜在临床益处超出了BRAF/MEK疗法抗性患者的情况。由于ERK1/2是该MAPK途径中的下游主节点，其抑制在其中肿瘤生长依赖于MAPK信号传导的许多癌症情况中是有吸引力的。所有癌症的大约30％携带RAS突变；因此，用BVD-523靶向下游ERK1/2是这些癌症的合理治疗方法。此外，Hayes等人的研究结果表明KRAS突变体胰腺癌中延长的ERK1/2抑制与衰老样生长抑制有关(Hayes等人，2016)。然而，在RAS突变的情况中，可能需要组合方法来最大限度的并持久的衰减MAPK信号传导。例如，KRAS突变体结肠直肠癌细胞中的MEK抑制导致ErbB家族激活的适应性应答，这抑制了对MEK抑制的应答(Sun等人，2014)。在用BVD-523进行ERK1/2抑制后，可能发生类似的背景特异性适应性应答。各种遗传谱和癌症组织学的最佳治疗组合是正在进行的研究的主题。除$BRAF^{V600}$和RAS突变外，其他驱动MAPK的改变正在出现。例如，新的RAF融合和促进RAF二聚化的非典型非V600 BRAF突变激活MAPK途径(Yao等人，2015)。已显示抑制$BRAF^{V600}$-突变体单体蛋白的BRAF抑制剂如维罗非尼和达拉非尼在非典型RAF改变中无活性，所述非典型RAF改变以二聚化依赖性方式驱动MAPK信号传导(Yao等人，2015)。然而，用BVD-523的治疗靶向这些肿瘤中的下游ERK1/2可能是解决这种未满足的医学需求的新方法。

[0453] 在$BRAF^{V600}$-突变黑素瘤肿瘤的情况下，组合的BRAF和MEK抑制示例了靶向相同途径的不同节点的试剂如何能够改善治疗应答和持续时间。我们在人黑色素瘤细胞系A375的$BRAF^{V600}$-突变体异种移植物中的组合研究为使用BVD-523和BRAF抑制剂的组合疗法提供了支持。该组合相对于单一试剂治疗显示出优越的益处，包括与治愈应答一致的结果。组合的BRAF/BVD-523疗法的临床功效和耐受性仍有待确定。期望BRAF/ERK1/2组合至少在功效上与靶向的BRAF/MEK组合相当不会是不合理的。此外，与其他MAPK途径抑制剂相比而言对BVD-523的获得性抗性更有挑战性的体外观察表明BRAF/BVD-523抑制剂组合具有提供更持久响应的潜力。

[0454] 使用针对黑素瘤的免疫疗法也已经取得了显著进展。美国FDA已经批准了各种免疫检查点抑制剂用于治疗晚期黑色素瘤，包括细胞毒性T淋巴细胞抗原-4靶向试剂伊匹单抗(ipilimumab)和程序性死亡-1抑制剂派姆单抗(pembrolizumab)和纳武单抗

(nivolumab)。将BVD-523与这些免疫疗法相组合是一种有吸引力的治疗选择;需要进一步调查以探索给药时间表并评估是否可以实现协同应答。

[0455] 基于临床前数据,BVD-523可以有望用于治疗患有依赖于MAPK信号传导的恶性肿瘤的患者,包括其肿瘤已经获得对其他治疗的抗性的那些。BVD-523的临床开发描述如下。参见实施例17-24

[0456] 实施例17

[0457] 同类首选新型口服ERK1/2激酶抑制剂BVD-523(ulixertinib)在晚期实体瘤患者中的I期剂量递增研究

[0458] 本发明描述了用于治疗晚期实体瘤患者的ERK1/2抑制剂的第一次人体中剂量递增研究。BVD-523具有可接受的安全性谱,具有良好的药代动力学和临床活性的早期证据。

[0459] 通过RAS-RAF-MEK-ERK级联的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号传导在肿瘤发生中起关键作用;因此作为治疗靶引起了极大的兴趣。这种普遍存在的途径由蛋白激酶RAF、MEK1/2和ERK1/2的级联的上游RAS组成。RAS通过GTP结合而被激活,其进而导致每种蛋白激酶的顺序激活。虽然它们似乎是MEK1/2的唯一生理学底物,但ERK1/2在细胞质和细胞核中有许多靶,包括转录因子Elk1、c-Fos、p53、Ets1/2和c-Jun(Shaul等人,2007)。ERK1/2激活和激酶活性通过多种机制影响细胞增殖、分化和存活(Rasola等人,2010),包括激活核糖体S6激酶(RSK)家族成员(Romeo等人,2012)。

[0460] 已经鉴定了RAS-RAF-MEK1/2-ERK1/2信号传导途径的组成型异常激活,并且涉及许多癌症的发展或维持(Schubbert等人,2007和Gollob等人,2006)。RAS家族基因(如KRAS、NRAS和HRAS)中的突变是最常见的,其中激活性RAS突变发生在约30%的人类癌症中(Schubbert等人,2007)。KRAS突变在以下中普遍存在:胰腺癌(>90%)(Kanda等人,2012),胆管癌(3%-50%)(Hezel等人,2014),结肠直肠癌(30%-50%)(Arrington等人,2012)),肺癌(27%)(Pennycuick等人,2012),卵巢癌(15%-39%)(Dobrzycka等人,2009),和子宫内膜样子宫内膜癌(18%)(O'Hara和Bell,2012);NRAS突变在黑色素瘤(20%)(Khattak等人,2013)和髓样白血病(8%-13%)(Yohe 2015)中普遍存在;并且HRAS突变在膀胱癌(12%)中普遍存在(Fernández-Medarde和Santos,2011)。RAF家族基因(最特别是BRAF)的突变经常发生,特别是在黑色素瘤中。已经在66%的恶性黑色素瘤和～7%的其他癌症中发现了BRAF突变(Davies等人,2002),而MEK突变较罕见,在黑素瘤中发生的总体频率为8%(Nikolaev等人,2012)。相比之下,迄今为止很少报道导致肿瘤发生的ERK突变(Deschenes-Simard等人,2014)。

[0461] 美国食品和药物管理局(FDA)已经批准了两种选择性BRAF抑制剂,即维罗替尼和达拉替尼,作为$BRAF^{V600}$-突变体转移性黑素瘤患者的单一疗法(Taflinar[包装插页]和Zelboraf[包装说明书])。虽然这些靶向疗法的应答率在具有$BRAF^{V600}$突变的患者中可高达50%,但应答持续时间通常以数月而不是数年来衡量(Hauschild等人,2012和McArthur等人,2014)。MEK1/2抑制剂曲美替尼也被批准作为在这种情况中的单一疗法(Mekinist[包装说明]),但更常用于与BRAF抑制剂达拉替尼组合使用。与维罗替尼单一疗法相比,与达拉替尼组合施用的曲美替尼的一线使用提供了整体存活率的更大改善而没有增加总体毒性(Robert等人,2015),突出了同时靶向该MAPK信号传导途径的多种蛋白质的潜在效用。与单独的每种药物相比,这种治疗组合还与MEK抑制剂相关的皮疹和BRAF抑制剂诱导的过度增

殖性皮肤病灶的较低发生率相关(Flaherty等人,2012)。最近,III期试验也显示在$BRAF^{V600E/K}$突变阳性黑素瘤患者中使用达拉替尼加曲美替尼对比单独使用达拉替尼的总体生存率(25.1对比18.7个月,风险比[HR]0.71,P=0.0107),无进展生存期(PFS)(11.0对比8.8个月,HR 0.67,P=0.0107),和总体应答(69%对比53%;P=0.0014)的显著改善(Long等人,2015)。相似地,已证实考比替尼加维罗替尼的组合与单独维罗替尼相比,PFS(9.9对比6.2个月,HR 0.51,P<0.001)和完全应答率(CR)或部分应答率(PR)(68%对比45%;P<0.001)的显著改善(Larkin等,2014)。为此,FDA最近批准了维罗替尼和考比替尼的组合用于$BRAF^{V600E/K}$突变的黑素瘤。基于这些和相关的发现,BRAF抑制剂加MEK抑制剂的组合已成为含有$BRAF^{V600E/K}$突变的转移性黑素瘤患者的标准靶向治疗选择。

[0462] 尽管已经证明BRAF/MEK靶向的组合疗法提供了超过单一试剂选择的显著的额外益处,但是大多数患者在约12个月后最终发展出抗性和疾病进展(Robert等人,2015,Flaherty等人,2012和Long等人,2015)。已经鉴定了单一试剂或组合疗法后获得性抗性的几种机制,包括BRAF剪接变体的产生,BRAF扩增,NRAS或MEK突变的发展以及旁路途径的上调(Poulikakos等人,2011,Corcoran等人,2010,Nazarian等人,2010,Shi等人,2014,Johannessen等人,2010,Wagle等人,2011,Wagle等人,2014和Ahronian等人,2015)。许多这些抗性机制的核心是ERK信号传导的再激活,其能够快速恢复MAPK途径信号传导和肿瘤细胞从单一试剂BRAF或组合BRAF/MEK抑制剂疗法中逃逸(Paraiso等人,2010)。ERK抑制可提供避免或克服来自上游机制的抗性的机会,因为它是该MAPK信号传导途径的最远端主激酶。这得到临床前证据的支持,即小分子抑制剂对ERK的抑制作用既抑制抗性的出现又克服对BRAF和MEK抑制剂的获得性抗性(Morris等人,2013和Hatzivassiliou等人,2012)。

[0463] BVD-523是一种高效、选择性、可逆的ATP竞争性ERK1/2抑制剂,已显示其在BRAF和RAS突变异种移植模型中减少肿瘤生长并诱导肿瘤消退。此外,单一试剂BVD-523抑制对BRAF和MEK抑制剂两者有交叉抗性的人异种移植模型。参见实施例9-16。因此,进行了口服BVD-523的开放标签、首次人体研究(Clinicaltrials.gov标识符,NCT01781429),以确定最大耐受剂量和推荐剂量以供进一步研究。本研究还旨在评估晚期癌症患者的药代动力学和药效学特性以及初步疗效。

[0464] 实施例18

[0465] 患者特征

[0466] 从2013年4月4日到2015年12月1日,总共27名患者参加并接受至少一个剂量的研究药物。基线人口统计学和疾病特征显示在表25中。中位数患者年龄为61岁(范围,33-86岁)。百分之五十二(14/27)的患者为男性,并且63%(17/27)的患者的东部肿瘤协作组(ECOG)状态评分为1。黑色素瘤是最常见的癌症(30%;BRAF突变存在于这些患者的7/8中)。其余患者有结肠直肠癌(19%;5/27),甲状腺乳头状癌(15%;4/27)或非小细胞肺癌(NSCLC)(7%;2/27),以及8例(30%)被分类为患有其他癌症(2个胰腺,1个阑尾,1个非精原细胞生殖细胞,1个卵巢和3个未知原发)。大多数患者接受过2线或更多线的先前全身治疗,其中41%(11/27)接受2至3线,48%(13/27)接受>3线先前全身治疗。

[0467] 表25-患者的基线人口统计学和临床特征

[0468]

参数	N = 27
中位数年龄，岁（范围）	61 (33–86)
性别，n (%)	
女性	13 (48)
男性	14 (52)
种族，n (%)	
非西班牙裔/拉丁裔	27 (100)
ECOG 状态评分	
0	10 (37)
1	17 (63)
癌症类型 n (%)	
黑素瘤 [a]	8 (30)
结肠直肠癌	5 (19)
乳头状甲状腺癌	4 (15)
非小细胞肺癌	2 (7)
其他 [b]	8 (30)
分子异常，n (%)[c]	
BRAF 突变体	13 (48)
KRAS 突变体	6 (22)
NRAS 突变体 t	2 (7)
其他 [d]	7 (26)
未知	4 (15)
在先全身性抗癌方案的次数，n (%)	
0	1 (4)
1	2 (7)
2–3	11 (41)
>3	13 (48)
在先 BRAF/MEK-靶向疗法 [e], n (%)	11 (41)

[0469]

BRAF	**5 (19)**
MEK	**6 (22)**
BRAF/MEK	**2 (7)**

[0470] [a]7个是BRAF突变体,1个未知。

[0471] [b]两个胰腺,1个阑尾,1个非精原细胞生殖细胞,1个卵巢,3个未知的原发性。

[0472] [c]患者可能有超过1个分子异常。

[0473] [d]其他分子异常包括ERCC1、RRM1、胸苷酸合成酶、GNAS、MEK1、TP53、CREBBP、ROS1、PTEN、AKT3和PIK3CA。

[0474] [e]一些患者接受了使用一种以上的BRAF抑制剂的治疗。

[0475] 缩写:ECOG,东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group)。

[0476] 实施例19

[0477] BVD-523对RSK1/2磷酸化的离体影响

[0478] 开发了可用于支持临床研究的离体生物标志物测定法,以证明BVD-523对ERK活性的抑制作用。该测定法扩展了临床前细胞数据,其中MAPK信号传导的抑制剂,例如BVD-523、达拉非尼、曲美替尼和维罗替尼,已显示在BRAF突变体癌细胞系中作为抑制剂浓度的函数抑制RSK磷酸化。参见实施例9-16。具体地,在全血中对ERK底物RSK1的佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯(PMA)刺激的磷酸化的ERK抑制剂依赖性抑制被用作靶标记物。当BVD-523直接添加到来自健康志愿者的全血中时,PMA刺激的RSK磷酸化随着BVD-523浓度的增加而降低(图38)。BVD-523的累积数据的平均IC_{50}为461±20nM,在10μM BVD-523时最大抑制为75.8±2.7%。最大抑制定义为在10μM BVD-523存在下测量的RSK磷酸化。在临给药前或在用BVD-523给药后的确定时间点收集的患者衍生的全血样品被类似地处理并定量RSK磷酸化水平。

[0479] 实施例20

[0480] 剂量递增、剂量限制毒性(DLT)、最大耐受剂量(MTD)和推荐的II期剂量(RP2D)

[0481] 根据方案,5个单患者群组(每天两次[BID]10至150mg)进展而没有DLT的迹象。将300mg BID群组扩展以更完全表征BVD-523暴露。给予600mg BID的6名患者中的一名经历了3级皮疹的DLT。900mg BID剂量超过MTD,一名患者经历3级瘙痒和天冬氨酸氨基转移酶(AST)升高,另一名患者经历3级腹泻、呕吐、脱水和肌酐升高(表26)。随后的750mg BID中间剂量也超过了MTD,1名患者的DLT为3级皮疹和2级腹泻,另1名患者为2级低血压,肌酐升高和贫血。因此,MTD和RP2D被确定为600mg BID。

[0482] 表26-第1轮(21天)的剂量限制毒性

[0483]

剂量，mg (BID)	DLT 频率	DLT 描述
10	0/1	N/A
20	0/1	N/A
40	0/1	N/A
75	0/1	N/A
150	0/1	N/A
300	0/4	N/A
600	1/8	皮疹（3 级）
750[a]	2/4	皮疹（3 级）、腹泻（2 级）、低血压（2 级）、升高的肌酐（2 级）、贫血症（2 级），延迟至第二轮给药
900	2/7	瘙痒（3 级）、升高的 AST（3 级） 腹泻（3 级）、呕吐（3 级）、脱水（3 级）、升高的肌酐（3 级）

[0484] [a]中间剂量。

[0485] 缩写:AST,天冬氨酸转氨酶,BID,每日两次;DLT,剂量限制性毒性;N/A,不适用。

[0486] 实施例21

[0487] 不良事件(AE)

[0488] 在27名患者中的26名(96%)中注意到任何等级的研究者评估的治疗相关AE。最常见的治疗相关AE(>30%)是皮疹(主要是痤疮)(70%)、疲劳(59%)、腹泻(52%)和恶心(52%)(表27)。没有患者经历4级或5级治疗相关AE或由于治疗相关的AE而停止治疗。大多数事件为1至2级,在27名患者中有13名(48%)注意到与治疗相关的3级事件。≥10%的患者中存在的唯一3级治疗相关事件是腹泻(15%)和肝功能检查增加(11%),所有这些都发生在600-mg BID剂量之上。

[0489] 表27-≥10%的患者中可能/明确与BVD-523相关的不良事件

[0490]

	N=27		
事件	任何级别，n (%)	1 或 2 级，n (%)	3 级 [a]，n (%)
皮疹	20 (74)	18 (67)	2[b] (7)
疲劳	17 (63)	16 (59)	1 (4)
腹泻	16 (59)	12 (44)	4 (15)
恶心	14 (52)	14 (52)	0
呕吐	8 (30)	7 (26)	1 (4)
厌食	6 (22)	6 (22)	0
瘙痒	6 (22)	6 (22)	0
贫血	5 (19)	3 (11)	2 (7)
增加的肌酐	5 (19)	4 (15)	1 (4)
脱水	5 (19)	3 (11)	2 (7)
外周水肿	4 (15)	4 (15)	0
增加的 LFT (ALT 和 AST)	4 (14)	1 (4)	3 (11)
视线模糊/变暗 [c]	3 (11)	3 (11)	0

[0491]

便秘	3 (11)	3 (11)	0
发热	3 (11)	3 (11)	0

[0492] [a]没有患者经历可能或明确与BVD-523治疗相关的4级或5级AE。

[0493] [b]腋窝和斑丘疹。

[0494] [c]一例相关中心性浆液性视网膜病变1级事件。

[0495] 分析截止日期:2015年12月1日。

[0496] 缩写:AE,不良事件;ALT,丙氨酸转氨酶;AST,天冬氨酸转氨酶;LFT,肝功能检查。

[0497] 14名患者经历了总共28个严重的AE(SAE)。其中9例被研究者认为与BVD-523有关或可能有关,其中包括脱水、腹泻或肌酐升高(每例2名患者)、呕吐、恶心和发热(每例1名患者)。所有其他SAE被认为与使用BVD-523的治疗无关。在研究期间3名患者中发生由AE引起的剂量减少:1名患者从600mg BID减少至300mg BID,并且2名患者从900mg BID减少至600mg BID。

[0498] 实施例22

[0499] 药代动力学

[0500] BVD-523的单一剂量和稳态药代动力学总结于图39A和表28中。一般而言，口服施用的BVD-523在晚期恶性肿瘤患者中被缓慢吸收。在达到最大浓度(C_{max})后，血浆BVD-523水平保持持续约2至4小时。随后，血浆药物浓度缓慢下降。由于血浆药物浓度仅在早晨剂量后多至12小时测量，因此不可能计算有效或末期消除速率。当施用高至600mg BID时，BVD-523药代动力学是线性的并且就C_{max}和曲线下面积(AUC)而言与剂量成比例。当剂量从600mg增加至900mg BID时，未观察到暴露的进一步增加。对于20mg BID以上的所有剂量，基于离体全血测定法C_{max}达到EC_{50}的水平(≈200ng/mL)。此外，在整个给药期间，对于剂量水平≥150mg BID，稳态暴露保持在靶EC_{50}或高于靶EC_{50}。在第15天，在较低(<75mg BID)剂量水平观察到BVD-523及其代谢物的最小血浆积聚，而较高剂量水平下累积范围从约1.3倍到4.0倍。第22天的给药前浓度通常与第15天的相似，表明在第15天已经达到稳态(数据未显示)。血浆暴露于BVD-523及其代谢物的患者间变化程度被认为是中等程度且没有问题。

[0501] 表28-稳态BVD-523药代动力学(第1轮，第15天)

[0502]

		C_{max}, ng/ml±SD		AUC_{0-12}, ng·hr/ml±SD	
剂量，mg[a]	n =	第 1 天	第 15 天	第 1 天	第 15 天
10	1	48.2	45.7	220	234
20	1	14.9	15.8	91.7	98.7
40	1	100	191	614	999
150	1	133	326	817	2770
300	4[b]	765 ± 234	586 ± 257	4110 ± 1140	4460 ± 2460
600[c]	7[d]	1110 ±589	2750 ±1740	2750 ± 1740	24400 ± 16200
750	4[b]	1450 ± 539	2290 ± 1790[f]	10700 ± 1120[g]	23300 ± 19800 [f]
900	7[e]	1430 ± 1010	1720 ± 328	10800 ±6320[h]	15900 ± 1300[g]

[0503] [a]每天两次施用的剂量水平；[b]在第15天n＝3；[c]在600mg剂量水平第15天的受试者数量包括开始在第1天以900mg给药并随后降低至600mg的两名受试者；[d]在第15天n＝4；[f]一名受试者开始在第一天以750mg给药并最后降低至450mg；用于该研究的第15天参数反应了以450mg/剂量的至少10个连续剂量。个别第15天参数是1300ng/mL的C_{max}和10700的AUC_{0-12}；[g]n＝3；[h]n＝5。

[0504] 在给药后12小时内的所有剂量水平下，在BVD-523的第一剂量后和稳态的尿排泄可忽略不计(剂量的<0.2%)，并且在该非常低的百分比范围内不是剂量相关的。肾清除率似乎与剂量无关。个体肾清除值范围为0.128至0.0895L/hr(其中n＝1/剂量水平)，平均值范围为0.0149至0.0300L/hr(其中n≥3)。

[0505] 实施例23

[0506] 对BVD-523的靶向抑制的药效学确认

[0507] 为了确认BVD-523的靶向和途径抑制，检查RSK-1磷酸化作为来自接受BVD-523的实体瘤患者的人全血样品中的靶生物标记物。在第15天给药前从BVD-523治疗的患者收集的稳态全血样品显示对PMA刺激的ERK活性的浓度依赖性抑制(图39B)，范围为以10mg BID给药BVD-523的0％ERK抑制至以900mg BID给药的93±8％ERK抑制。无论BVD-523是直接掺入健康志愿者血浆还是口服给药于患者后存在，产生50％ERK磷酸化抑制的BVD-523血浆浓度是相似的。

[0508] 实施例24

[0509] 抗肿瘤作用

[0510] 使用Solid Tumors 1.1版(RECIST v1.1)中的响应评估标准，在25名可评估的患者中评估对BVD-523的肿瘤应答；2名患者未接受靶病灶的两次扫描并因此未使用RECIST v1.1进行评估。没有患者获得完全应答，但3名患者(所有患者具有含$BRAF^{V600}$突变的黑色素瘤)均获得部分应答(129天[未经BRAF/MEK-抑制剂处理]，294天进行中[对现有BRAF/MEK抑制剂难治的]，313天进行中至数据截止日期[不耐受其他BRAF/MEK抑制剂](图40A)。有趣的是，所有3名部分应答者都患有BRAF突变体黑色素瘤。一名以450mg BID剂量接受BVD-523的部分应答者中靶病灶总数从基线减少约70％，而其他部分应答者显示减少47.0％和33.6％。在18名患者中证实了稳定的疾病，其中6名患者病情稳定超过6个月，另外6名患者病情稳定超过3个月。在这项研究中，4名患者在第一次评估时表现出进行性疾病。

[0511] 图40B显示了在先前的维罗替尼和随后的达拉非尼/曲美替尼治疗上有进展的3个部分应答者中的1个(RECIST v1.1)的计算机断层(CT)扫描；在给药BVD-523 600mg BID>300天后观察到持久的部分应答。在16名可评估患者中的5名中，BVD-523与使用氟脱氧葡萄糖阳性发射断层扫描(^{18}F-FDG-PET)的代谢应答相关。

[0512] 图41描绘了研究群体中的响应时间和响应持续时间。两名对BVD-523有应答的患者仍在研究中，并继续进行BVD-523治疗至研究截止日期(>500天)；另外，一名支气管肺泡NSCLC患者(用于分子谱分析的组织不足)已经治疗了>700天，疾病稳定。27名患者中有24名(90％)因进行性疾病(22/27，82％)或其他原因(2/27，7％)停止治疗。停止治疗前BVD-523治疗的平均持续时间为4.7个月。

[0513] 讨论

[0514] 本发明提供了评估BVD-523在27名晚期实体瘤患者中的安全性、药代动力学、药效学和初步功效的第一次人体中研究的结果。在这项剂量递增研究中，BVD-523的口服治疗在一些患者中产生了通过RECIST v1.1的放射照相应答(3个部分应答)和延长的疾病稳定性，其中大多数患者已经接受了≥2次在先的全身治疗。通过对^{18}F-葡萄糖的肿瘤摄取进行成像，在一部分患者中建立了肿瘤中代谢应答的BVD-523依赖性抑制的证据。药物暴露随着剂量增加至600mg BID而线性增加，其中暴露于600mg BID在离体全血测定法中提供了对ERK

依赖性底物(RSK-1)磷酸化的接近完全24/7的抑制。此外,当施用高至其MTD和RP2D时(确定为600mg BID),对BVD-523的耐受性是可控的。

[0515] BVD-523通常是良好耐受性的,具有可控和可逆的毒性。最常见的AE是皮疹(通常是痤疮)、疲劳和胃肠道副作用,包括恶心、呕吐和腹泻。BVD-523的安全性与其对MAPK途径的选择性抑制一致;AE特征显示与MEK抑制剂经历相当重叠。然而,与任何靶向疗法相关的毒性可能包括对特定机制和靶抑制程度两者的依赖以及任何脱靶效应(Zelboraf[包装插页]和Hauschild等人,2012)。正在进行的和未来的研究将扩展本剂量递增研究中证明的功效和安全性,并将指导ERK抑制剂BVD-523的独特特征可以如何用作单一试剂或与其他试剂组合使用。

[0516] RAF和MEK抑制剂的持久应答通常受到内在的和最终的获得性抗性的限制,其共同特征通常涉及ERK途径的再激活(Poulikakos等人,2011,Corcoran等人,2010,Nazarian等人,2010,Shi等人,2014,Johannessen等人,2010,Wagle等人,2011,Wagle等人,2014,Ahronian等人,2015和Paraiso等人,2010)。因此,BVD-523单独或与其他MAPK信号传导途径抑制剂组合的ERK抑制有可能延迟对现有疗法的抗性的发展并使更广泛的患者群体受益。包括BVD-523在内的ERK抑制剂在BRAF-和MEK-抗性细胞系中保留其功效,为在对标准治疗(BRAF/MEK组合疗法)具有获得性抗性的患者中使用ERK抑制剂提供了临床前证据。参见,例如实施例9-16。重要的是,在这项研究中,在最初接受BRAF抑制剂(维罗非尼)并且随后接受BRAF和MEK抑制剂(达拉非尼/曲美替尼)组合的治疗后病情稳定后癌症进展的患者在接受单一试剂BVD-523时有部分应答。截至本文报道的研究截止日期,该患者一直在研究中共708天。部分基于在该患者中观察到的抗肿瘤作用,FDA已指定BVD-523用于治疗患有不可切除或转移性$BRAF^{V600}$突变阳性黑色素瘤的患者的快速通道发展计划,该黑色素瘤对用BRAF和/或MEK抑制剂的治疗是难治的或在用BRAF和/或MEK抑制剂的治疗后已经发展。准确定义BVD-523如何最好地支持患者护理(例如,作为单一试剂或以各种组合)需要额外的临床研究。

[0517] 总之,本实施例提供来自评估BVD-523,一种新型的同类首次ERK抑制剂,作为晚期癌症患者的治疗的I期研究的剂量递增部分的初始数据的数据。用BVD-523连续、每日两次口服治疗在几个患者中产生抗肿瘤作用,包括对已有的MAPK途径靶向疗法未接受过或有进展的患者。在这种晚期癌症患者群体中,BVD-523通常耐受良好且毒性可控;MTD和RP2D为600mg BID。BVD-523暴露线性增加至RP2D,并且在该剂量水平下强健的药效学作用是明显的。目前正在进行这项I期临床研究的扩展,以确认和扩展在剂量递增阶段所做的观察。具体地,患者正在参与跨各种肿瘤组织学的分子分类的扩增群组(例如,NRAS、BRAF、MEK或ERK改变)。此外,扩展群组正在评估BVD-523在癌症患者中的应用,这些患者未接受过可供利用的MAPK途径疗法,或者是那些在这些治疗中疾病进展的患者。

[0518] 文献

[0519] ABSALAN,Farnaz,Mostafa Ronaghi(2008).Molecular Inversion Probe Assay.Methods in Molecular Biology 396.Humana Press.pp.315-330.

[0520] AHRONIAN LG,Sennott EM,Van Allen EM,Wagle N,Kwak EL,Faris JE,et al.Clinical acquired resistance to RAF inhibitor combinations in BRAF-mutant colorectal cancer through MAPK pathway alterations.Cancer Discov 2015;5:358-

67.

[0521] ARCILA ME,Drilon A,Sylvester BE,Lovly CM,Borsu L,Reva B,et al.MAP2K1 (MEK1)mutations define a distinct subset of lung adenocarcinoma associated with smoking.Clin Cancer Res 2015;21:1935-43.

[0522] ARONOV AM,Baker C,Bemis GW,Cao J,Chen G,Ford PJ,et al.Flipped out: structure-guided design of selective pyrazolylpyrrole ERK inhibitors.J Med Chem 2007;50:1280-7.

[0523] ARONOV AM,Tang Q,Martinez-Botella G,Bemis GW,Cao J,Chen G,et al.Structure-guided design of potent and selective pyrimidylpyrrole inhibitors of extracellular signal-regulated kinase(ERK)using conformational control.J Med Chem 2009;52:6362-8.

[0524] ARRINGTON AK,Heinrich EL,Lee W,Duldulao M,Patel S,Sanchez J,et al.Prognostic and predictive roles of KRAS mutation in colorectal cancer.Int J Mol Sci 2012;13:12153-68.

[0525] CARGNELLO M,Roux PP.Activation and function of the MAPKs and their substrates,the MAPK-activated protein kinases.Microbiol Mol Biol Rev 2011;75: 50-83.

[0526] CARLINO MS,Fung C,Shahheydari H,Todd JR,Boyd SC,Irvine M,et al.Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients.Clin Cancer Res 2015;21:98-105.

[0527] CHAPMAN PB,Hauschild A,Robert C,Haanen JB,Ascierto P,Larkin J,et al.Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation.N Engl J Med 2011;364:2507-16.

[0528] CORCORAN,R.B.,et al.BRAF gene amplification can promote acquired resistance to MEK inhibitors in cancer cells harboring the BRAF V600E mutation.Sci Signal(2010);3(149):ra84.

[0529] DAI,B.,et al.STAT3 mediates resistance to MEK inhibitor through microRNA miR-17.Cancer Res(2011);71:3658-3668.

[0530] DAVIES H,Bignell GR,Cox C,Stephens P,Edkins S,Clegg S,et al.Mutations of the BRAF gene in human cancer.Nature 2002;417:949-54.

[0531] DESCHENES-SIMARD X,Kottakis F,Meloche S,Ferbeyre G.ERKs in cancer: friends or foes?Cancer Res 2014;74:412-9.

[0532] DOBRZYCKA B,Terlikowski SJ,Kowalczuk O,Niklinska W,Chyczewski L, Kulikowski M.Mutations in the KRAS gene in ovarian tumors.Folia Histochem Cytobiol 2009;47:221-4.

[0533] EMERY,C.M.,et al.MEK1 mutations confer resistance to MEK and B-RAF inhibition.PNAS(2009);106(48):20411-6.

[0534] FEDOROV O,Niesen FH,Knapp S.Kinase inhibitor selectivity profiling using differential scanning fluorimetry.Methods Mol Biol 2012;795:109-18.

[0535] FERNÁNDEZ-MEDARDE A,Santos E.Ras in cancer and developmental diseases.Genes Cancer 2011;2:344-58.

[0536] FLAHERTY KT,Infante JR,Daud A,Gonzalez R,Kefford RF,Sosman J,et al.Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations.N Engl J Med 2012;367:1694-703.

[0537] GOETZ EM,Ghandi M,Treacy DJ,Wagle N,Garraway LA.ERK mutations confer resistance to mitogen-activated protein kinase pathway inhibitors.Cancer Res 2014;74:7079-89.

[0538] GOLLOB JA,Wilhelm S,Carter C,Kelley SL.Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway.Semin Oncol 2006;33:392-406.

[0539] GREGER,James G.,et al."Combinations of BRAF,MEK,and PI3K/mTOR inhibitors overcome acquired resistance to the BRAF inhibitor GSK2118436 dabrafenib,mediated by NRAS or MEK mutations."Molecular cancer therapeutics 11.4(2012):909-920.

[0540] GROENENDIJK FH,Bernards R.Drug resistance to targeted therapies:deja vu all over again.Mol Oncol 2014;8:1067-83.

[0541] HALL RD,Kudchadkar RR.BRAF mutations:signaling,epidemiology,and clinical experience in multiple malignancies.Cancer Control 2014;21:221-30.

[0542] HARDENBOL,P.,et al.Multiplexed genotyping with sequence-tagged molecular inversion probes.Nat.Biotechnol.2003,no.21,p.673-678.

[0543] HATZIVASSILIOU,Georgia,et al."RAF inhibitors prime wild-type RAF to activate the MAPK pathway and enhance growth."Nature 464.7287(2010):431-435.

[0544] HATZIVASSILIOU G,Liu B,O'Brien C,Spoerke JM,Hoeflich KP,Haverty PM,et al.ERK inhibition overcomes acquired resistance to MEK inhibitors.Mol Cancer Ther 2012;11:1143-54.

[0545] HAUSCHILD A,Grob J-J,Demidov LV,Jouary T,Gutzmer R,Millward M,et al.Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma:a multicentre,open-label, phase 3 randomised controlled trial.Lancet 2012;380:358-65.

[0546] HAYES TK,Neel NF,Hu C,Gautam P,Chenard M,Long B,et al.Long-Term ERK Inhibition in KRAS-Mutant Pancreatic Cancer Is Associated with MYC Degradation and Senescence-like Growth Suppression.Cancer Cell 2016;29:75-89.

[0547] HEZEL AF,Noel MS,Allen JN,Abrams TA,Yurgelun M,Faris JE,et al.Phase II study of gemcitabine,oxaliplatin in combination with panitumumab in KRAS wild-type unresectable or metastatic biliary tract and gallbladder cancer.Br J Cancer 2014;111:430-6.

[0548] JHA S,Morris EJ,Hruza A,Mansueto MS,Schroeder G,Arbanas J,et al.Dissecting therapeutic resistance to ERK inhibition.Mol Cancer Ther 2016; 15:548-59.

[0549] JOHANNESSEN,C.M.,et al.COT/MAP3K8 drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation.Nature(2010);468(7326):968-972.

[0550] JOHNSON DB,Menzies AM,Zimmer L,Eroglu Z,Ye F,Zhao S,et al.Acquired BRAF inhibitor resistance:A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies,clinical behaviour,and phenotypic associations of resistance mechanisms.Eur J Cancer 2015;51:2792-9.

[0551] KANDA M,Matthaei H,Wu J,Hong SM,Yu J,Borges M,et al.Presence of somatic Mutations in most early-stage pancreatic intraepithelial neoplasia.Gastroenterology 2012;142:730-733.

[0552] KHATTAK M,Fisher R,Turajlic S,Larkin J.Targeted therapy and immunotherapy in advanced melanoma:an evolving paradigm.Ther Adv Med Oncol 2013;5:105-18.

[0553] KING,Alastair J.,et al."Dabrafenib;preclinical characterization, increased efficacy when combined with trametinib,while BRAF/MEK tool combination reduced skin lesions."PloS one 8.7(2013):e67583.

[0554] LARKIN J,Ascierto PA,Dréno B,Atkinson V,Liszkay G,Maio M,et al.Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma.N Engl J Med 2014;371:1867-76.

[0555] LITTLE,A.S.,et al.,Amplification of the Driving Oncogene,KRAS or BRAF,Underpins Acquired Resistance to MEK1/2 Inhibitors in Colorectal Cancer Cells.Sci.Signal.4,ra17(2011).

[0556] LIU,Dingxie,et al."BRAF V600E maintains proliferation,transformation, and tumorigenicity of BRAF-mutant papillary thyroid cancer cells."Journal of Clinical Endocrinology&Metabolism 92.6(2007):2264-2271.

[0557] LIU B,Fu L,Zhang C,Zhang L,Zhang Y,Ouyang L,et al.Computational design,chemical synthesis,and biological evaluation of a novel ERK inhibitor (BL-EI001)with apoptosis-inducing mechanisms in breast cancer.Oncotarget 2015;6:6762-75.

[0558] LONG GV,Fung C,Menzies AM,Pupo GM,Carlino MS,Hyman J,et al.Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma.Nat Commun 2014;5:5694.

[0559] LONG GV,Stroyakovskiy D,Gogas H,Levchenko E,de Braud F,Larkin J,et al.Dabrafenib and trametinib versus dabrafenib and placebo for Val600 BRAF-mutant melanoma:a multicentre,double-blind,phase 3 randomised controlled trial.Lancet 2015;386:444-51.

[0560] MANANDHAR SP,Hildebrandt ER,Schmidt WK.Small-molecule inhibitors of the Rce1p CaaX protease.J Biomol Screen.2007;12(7):983-993.

[0561] MASSEY PR,Prasad V,Figg WD,Fojo T.Multiplying therapies and reducing toxicity in metastatic melanoma.Cancer Biol Ther 2015;16:1014-8.

[0562] MAURER,T,Garrenton,LS,Oh,A,Pitts,K,Anderson,DJ,Skelton,NJ,Fauber,BP,Pan,B,Malek,S,Stokoe,D,Ludlam,MJC,Bowman,KK,Wu,J,Giannetti,AM,Starovasnik,MA,Mellman,I,Jackson,PK,Rudolph,J,Wang,W,Fang,G.Small-molecule ligands bind to a distinct pocket in Ras and inhibit SOS-mediated nucleotide exchange activity.PNAS.2012;109(14):5299-304.

[0563] MCARTHUR GA,Chapman PB,Robert C,Larkin J,Haanen JB,Dummer R,et al.Safety and efficacy of vemurafenib in $BRAF^{V600E}$ and $BRAF^{V600K}$ mutation-positive melanoma(BRIM-3):extended follow-up of a phase 3,randomised,open-label study.Lancet Oncol 2014;15:323-32.

[0564] MEKINIST[package insert].Research Triangle Park,NC:GlaxoSmithKline;2014.

[0565] METZKER,Emerging technologies in DNA sequencing Genome Res.2005.15:1767-1776.

[0566] MITTAL,Rohit et al."The acetyltransferase activity of the bacterial toxin YopJ of Yersinia is activated by eukaryotic host cell inositol hexakisphosphate."Journal of Biological Chemistry 285.26(2010):19927-19934.

[0567] MORRIS EJ,Jha S,Restaino CR,Dayananth P,Zhu H,Cooper A,et al.Discovery of a novel ERK inhibitor with activity in models of acquired resistance to BRAF and MEK inhibitors.Cancer Discov 2013;3:742-50.

[0568] NAZARIAN,R.,et al.Melanomas acquire resistance to B-RAF(V600E) inhibition by RTK or N-RAS upregulation.Nature.2010;468(7326):973-977.

[0569] NIKOLAEV SI,Rimoldi D,Iseli C,Valsesia A,Robyr D,Gehrig C,et al.Exome sequencing identifies recurrent somatic MAP2K1 and MAP2K2 mutations in melanoma.Nat Genet 2012;44:133-9.

[0570] NILSSON,M.,et al.Padlock probes:circularizing oligonucleotides for localized DNA detection.Science.1994,no.265,p.2085-2088.

[0571] O'HARA AJ,Bell DW.The genomics and genetics of endometrial cancer.Adv Genomics Genet 2012;2012:33-47.

[0572] OJESINA AI,Lichtenstein L,Freeman SS,Pedamallu CS,Imaz-Rosshandler I,Pugh TJ,et al.Landscape of genomic alterations in cervical carcinomas.Nature 2014;506:371-5.

[0573] OTA et al.,Single nucleotide polymorphism detection by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism.Nat Protoc.2007;2(11):2857-64.

[0574] PARAISO KHT,Fedorenko IV,Cantini LP,Munko AC,Hall M,Sondak VK,et al.Recovery of phospho-ERK activity allows melanoma cells to escape from BRAF inhibitor therapy.Br J Cancer 2010;102:1724-30.

[0575] PATGIRI A,Yadav,KK,Arora,PS,Bar-Sagi,D.An orthosteric inhibitor of the Ras-Sos interaction.Nat Chem Biol.2011;7:585-587.

[0576] PENNYCUICK A,Simpson T,Crawley D,Lal R,Santis G,Cane P,et al.Routine EGFR and KRAS mutation analysis using COLD-PCR in non-small cell lung cancer.Int J Clin Pract 2012;66:748-52.

[0577] PORTER SB,Hildebrandt ER,Breevoort SR,Mokry DZ,Dore TM,Schmidt WK.Inhibition of the CaaX proteases Rce1p and Ste24p by peptidyl(acyloxy) methyl ketones.Biochim Biophys Acta.2007;1773(6):853-862.

[0578] POULIKAKOS PI,Persaud Y,Janakiraman M,Kong X,Ng C,Moriceau G,et al.RAF inhibitor resistance is mediated by dimerization of aberrantly spliced BRAF(V600E).Nature 2011;480:387-90.

[0579] QUEIROLO P,Picasso V,Spagnolo F.Combined BRAF and MEK inhibition for the treatment of BRAF-mutated metastatic melanoma.Cancer Treat Rev 2015;41: 519-26.

[0580] RASOLA A,Sciacovelli M,Chiara F,Pantic B,Brusilow WS,Bernardi P.Activation of mitochondrial ERK protects cancer cells from death through inhibition of the permeability transition.Proc Natl Acad Sci U S A 2010;107: 726-31.

[0581] RIZOS H,Menzies AM,Pupo GM,Carlino MS,Fung C,Hyman J,et al.BRAF inhibitor resistance mechanisms in metastatic melanoma:spectrum and clinical impact.Clin Cancer Res 2014;20:1965-77.

[0582] ROBERT C,Karaszewska B,Schachter J,Rutkowski P,Mackiewicz A, Stroiakovski D,et al.Improved overall survival in melanoma with combined dabrafenib and trametinib.N Engl J Med 2015;372:30-9.

[0583] ROMEO Y,Zhang X,Roux PP.Regulation and function of the RSK family of protein kinases.Biochem J 2012;441:553-69.

[0584] RUDOLPH J,Xiao Y,Pardi A,Ahn NG.Slow inhibition and conformation selective properties of extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 inhibitors.Biochemistry 2015;54:22-31.

[0585] SHAUL YD,Seger R.The MEK/ERK cascade:from signaling specificity to diverse functions.Biochim Biophys Acta 2007;1773:1213-26.

[0586] SHI H,Hugo W,Kong X,Hong A,Koya RC,Moriceau G,et al.Acquired resistance and clonal evolution in melanoma during BRAF inhibitor therapy.Cancer Discov 2014;4:80-93.

[0587] SHIMA,F,Yoshikawa,Y,Ye,M,Araki,M,Matsumoto,S,Liao,J,Hu,L,Sugimoto,T, Ijiri,Y,Takeda,A,Nishiyama,Y,Sato,C,Muraoka,S,Tamura,A,Osoda,T,Tsuda,K-I, Miyakawa,T,Fukunishi,H,Shimada,J,Kumasaka,Yamamoto,M,Kataoka,T.In silico discovery of small-molecule Ras inhibitors that display antitumor activity by blocking the Ras-effector interaction.PNAS.2013;110(20):8182-7.

[0588] SCHUBBERT S,Shannon K,Bollag G.Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer.Nat Rev Cancer 2007;7:295-308.

[0589] Sun C,Hobor S,Bertotti A,Zecchin D,Huang S,Galimi F,et al.Intrinsic resistance to MEK inhibition in KRAS mutant lung and colon cancer through transcriptional induction of ERBB3.Cell Rep 2014;7:86-93.

[0590] TAFLINAR[package insert].Research Triangle Park,NC:GlaxoSmithKline; 2015.

[0591] TRUNZER K,Pavlick AC,Schuchter L,Gonzalez R,McArthur GA,Hutson TE,et al.Pharmacodynamic effects and mechanisms of resistance to vemurafenib in patients with metastatic melanoma.J Clin Oncol 2013;31:1767-74.

[0592] VILLANUEVA,J.,et al.Acquired resistance to BRAF inhibitors mediated by a RAF kinase switch in melanoma can be overcome by cotargeting MEK and IGF-1R/PI3K.Cancer Cell.2010;18:683-695.

[0593] WAGLE,N.,et al.Dissecting therapeutic resistance to RAF inhibition in melanoma by tumor genomic profiling.Journal of Clinical Oncology 2011;29(22): 3085-3096.

[0594] WAGLE N,Van Allen EM,Treacy DJ,Frederick DT,Cooper ZA,Taylor-Weiner A,et al.MAP kinase pathway alterations in BRAF-mutant melanoma patients with acquired resistance to combined RAF/MEK inhibition.Cancer Discov 2014;4:61-8.

[0595] Wainstein E,Seger R.The dynamic subcellular localization of ERK: mechanisms of translocation and role in various organelles.Curr Opin Cell Biol 2016;39:15-20.

[0596] WANG,H.,et al.Identification of the MEK1(F129L)activating mutation as a potential mechanism of acquired resistance to MEK inhibition in human cancers carrying the B-RAF V600E mutation.Cancer Res(2011);71(16):5535-45.

[0597] Yang W,Soares J,Greninger P,Edelman EJ,Lightfoot H,Forbes S,et al.Genomics of Drug Sensitivity in Cancer(GDSC):a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells.Nucleic Acids Res 2013;41:D955-D961.

[0598] Yao Z,Torres NM,Tao A,Gao Y,Luo L,Li Q,et al.BRAF Mutants Evade ERK-Dependent Feedback by Different Mechanisms that Determine Their Sensitivity to Pharmacologic Inhibition.Cancer Cell 2015;28:370-83.

[0599] Yohe S.Molecular genetic markers in acute myeloid leukemia.J Clin Med 2015;4:460-78.

[0600] Zelboraf[package insert].South San Francisco,CA:Genentech USA,

[0601] Inc.;2015.

[0602] 本申请中引用的所有文献均通过引用并入到本文中,如同在本文中完整引用一样。

[0603] 尽管本文已经描述了本发明的说明性实施方案,但是应该理解,本发明不限于所描述的那些,并且本领域技术人员可以在不脱离本发明的范围或精神的情况下进行各种其他改变或修改。

序列表

<110> SAHA, Saurabh

<120> 用于治疗非ERK MAPK通路抑制剂抗性癌症的方法和组合物

<130> C065272/0398850pct

<150> 15/161,137

<151> 2016-05-20

<150> PCT/US14/71749

<151> 2014-12-19

<150> US 61/919,551

<151> 2013-12-20

<160> 82

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2949

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

cgcctccctt ccccctcccc gcccgacagc ggccgctcgg gccccggctc tcggttataa 60
gatggcggcg ctgagcggtg gcggtggtgg cggcgcggag ccgggccagg ctctgttcaa 120
cggggacatg gagcccgagg ccggcgccgg cgccggcgcc gcggcctctt cggctgcgga 180
ccctgccatt ccggaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga cacaggaaca 240
tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa tatatctgga 300
ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgcactccaa caaagagaac aacagttatt 360
ggaatctctg gggaacggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa tggataccgt 420
tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctaccttca tctctttcag tttttcaaaa 480
tcccacagat gtggcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg ttagagtctt 540
cctgcccaac aaacagagga cagtggtacc tgcaaggtgt ggagttacag tccgagacag 600
tctaaagaaa gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg tttacagaat 660
tcaggatgga gagaagaaac caattggttg ggacactgat atttcctggc ttactggaga 720
agaattgcat gtggaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact ttgtacgaaa 780
aacgtttttc accttagcat tttgtgactt ttgtcgaaag ctgcttttcc agggtttccg 840
ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaagttc cactgatgtg 900
tgttaattat gaccaacttg atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac accacccaat 960
accacaggaa gaggcgtcct tagcagagac tgccctaaca tctggatcat ccccttccgc 1020
acccgcctcg gactctattg ggccccaaat tctcaccagt ccgtctcctt caaaatccat 1080
tccaattcca cagcccttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcaat ttgggcaacg 1140
agaccgatcc tcatcagctc ccaatgtgca tataaacaca atagaacctg tcaatattga 1200
tgacttgatt agagaccaag gatttcgtgg tgatggagga tcaaccacag gtttgtctgc 1260

tacccccct gcctcattac ctggctcact aactaacgtg aaagccttac agaaatctcc 1320
aggacctcag cgagaaagga agtcatcttc atcctcagaa gacaggaatc gaatgaaaac 1380
acttggtaga cgggactcga gtgatgattg ggagattcct gatgggcaga ttacagtggg 1440
acaaagaatt ggatctggat catttggaac agtctacaag ggaaagtggc atggtgatgt 1500
ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa 1560
tgaagtagga gtactcagga aaacacgaca tgtgaatatc ctactcttca tgggctattc 1620
cacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagct tgtatcacca 1680
tctccatatc attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacgacagac 1740
tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc tcaagagtaa 1800
taatatattt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc tagctacagt 1860
gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat 1920
ggcaccagaa gtcatcagaa tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata 1980
tgcatttgga attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa 2040
caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa 2100
ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa 2160
aagagatgag agaccactct ttccccaaat tctcgcctct attgagctgc tggcccgctc 2220
attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac 2280
agaggatttt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg caggggggata 2340
tggtgcgttt cctgtccact gaaacaaatg agtgagagag ttcaggagag tagcaacaaa 2400
aggaaaataa atgaacatat gtttgcttat atgttaaatt gaataaaata ctctcttttt 2460
ttttaaggtg aaccaaagaa cacttgtgtg gttaaagact agatataatt tttccccaaa 2520
ctaaaattta tacttaacat tggatttta acatccaagg gttaaaatac atagacattg 2580
ctaaaaattg gcagagcctc ttctagaggc tttactttct gttccgggtt tgtatcattc 2640
acttggttat tttaagtagt aaacttcagt ttctcatgca acttttgttg ccagctatca 2700
catgtccact agggactcca gaagaagacc ctacctatgc ctgtgtttgc aggtgagaag 2760
ttggcagtcg gttagcctgg gttagataag gcaaactgaa cagatctaat ttaggaagtc 2820
agtagaattt aataattcta ttattattct taataatttt tctataacta tttcttttta 2880
taacaatttg gaaaatgtgg atgtctttta tttccttgaa gcaataaact aagtttcttt 2940
ttataaaaa 2949

<210> 2
<211> 765
<212> PRT
<213> 人
<400> 2

Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln Ala
1 5 10 15
Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn

35 40 45

Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60

Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80

Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95

Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125

Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ala
130 135 140

Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160

Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190

Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205

Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220

Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240

Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255

Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270

Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285

Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300

Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320

Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335

Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350

Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr

660 665 670

Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met

675 680 685

Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro

690 695 700

Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu

705 710 715 720

Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly

725 730 735

Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr

740 745 750

Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His

755 760 765

<210> 3

<211> 3906

<212> DNA

<213> 大鼠(Rattus norvegicus)

<400> 3

atggcggcgc tgagtggcgg cggtggcagc agcagcggtg gcggtggcgg cggcggcggc 60

ggcggtggtg gcggcggcgg cggcggcgcc gaacagggac aggctctgtt caatggcgac 120

atggagccgg aggccggcgc tggcgccgcg gcctcttcgg ccgcggaccc ggccattcct 180

gaagaggtgt ggaatatcaa gcaaatgatt aagttgacac aggaacatat agaggcccta 240

ttggacaagt ttggtgggga gcataaccca ccgtcaatat acctggaggc ctatgaagag 300

tacaccagca agctagatgc ccttcagcag agagagcagc agctgttgga atccctggtt 360

tttcaaactc ccacagatgt atcacggaac aaccccaagt caccacagaa acctatcgtt 420

cgtgtcttcc tgcccaacaa acagaggaca gtggtgcccg caagatgtgg tgtaacggtc 480

cgagacagtc taaagaaagc actaatgatg aggggtctca tcccagagtg ctgtgctgtt 540

tacagaattc aggacggaga gaagaaacca attggctggg acactgacat ttcctggctt 600

actggagagg agctacatgt tgaagtacta gagaatgttc ctctgacaac ccacaacttc 660

gtacggaaaa ctttttcac cttagcattt tgtgactttt gccgaaagct gcttttccag 720

ggtttccgct gtcaaacatg tggttataag tttcaccagc gttgtagtac agaggttcca 780

ctgatgtgtg ttaattatga ccaacttgat ttgctgtttg tctccaagtt ctttgagcat 840

cacccagtac cacaggagga ggccttctca gcagagacta cccttccatc tggatgctct 900

tccgcacccc cctcagactc tattgggccc caaatcctca ccagtccatc tccttcaaaa 960

tccattccaa ttccacagcc cttccggcca gcagatgaag atcatcgcaa tcagtttggg 1020

caacgagacc gctcctcctc cgctcccaat gttcatataa acacaatcga acctgtcaat 1080

attgatgaaa aattcccaga agtggaatta caggatcaaa gggatttgat tagagaccag 1140

gggtttcgtg gggatggagc ccctttgaac cagctgatgc gctgtcttcg gaaataccaa 1200

tcccggactc ccagcccccc cctccattct gtccccagtg aaatagtgtt tgattttgag 1260

cctggcccag tgttcagagg gtcaaccaca ggcttgtcgg ccaccccacc tgcctcatta 1320
cctggctcac tcactaacgt gaaagcctta cagaaatctc caggacctca gcgggaaagg 1380
aagtcctcct cctcctcctc ctccacggaa gacagaagtc ggatgaaaac acttggtaga 1440
agagattcaa gtgatgattg ggagattcct gatggacaga ttacagtggg acagagaatt 1500
ggatctgggt cctttggaac tgtctacaag ggaaagtggc atggcgacgt ggcagtgaaa 1560
atgctgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg ccttcaaaaa cgaagtcgga 1620
gtactcagga aaactcgaca tgtgaacatc ctccttttca tgggctattc tacaaagcca 1680
cagctggcta ttgttacaca gtggtgtgaa ggctccagct tatatcacca tctccacatc 1740
attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacggcagac tgcacagggc 1800
atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc tcaagagtaa taatatattt 1860
cttcatgaag acctcacggt aaaaataggt gactttggtt tagccacagt gaagtcccga 1920
tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcta ttttgtggat ggcacccgaa 1980
gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt cagacgtgta tgcatttggg 2040
attgttctgt atgaactgat gactggtcag ctaccttatt caaacatcaa caacagggat 2100
cagataattt ttatggtggg acgaggatac ctatctccag atctcagtaa ggtacggagt 2160
aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa aagagacgag 2220
agaccactct ttccccaaat tctcgcctct attgagctgc tggcccgctc attgccaaaa 2280
attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg gtttccaaac agaagatttt 2340
agtctgtatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccaag caggggggata tggagaattt 2400
gcagccttca agtagccact ccatcatggc agcatctact ctttatttct taagtcttgt 2460
gttcatacaa tttgttaaca tcaaaacaca gttctgttcc tcaaattttt tttaaagata 2520
caaaattttc aatgcataag ctcgtgtgga acagaatgga atttcctatt caacaaaaga 2580
gggaagaatg ttttaggaac cagaattctc tgctgcccgt gtttcttctt caacacaaat 2640
atcatgtgca tacaactctg cccattccca agaagaaaga ggagagaccc cgaattctgc 2700
ccttttggtg gtcaggcatg atggaaagaa tttgctgctg cagcttggga aaaattgcta 2760
tggaaagtct gccagtcaac tttgcccttc taaccaccag atccatttgt ggctggtcat 2820
ctgatggggc gatttcaatc accaagcatc gttcttgcct gttgtgggat tatgtcgtgg 2880
agcactttcc ctatccacca ccgttaattt ccgagggatg gagtaaatgc agcataccct 2940
ttgtgtagca cctgtccagt cctcaaccaa tgctatcaca gtgaagctct ttaaatttaa 3000
gtggtgggtg agtgttgagg agagactgcc ttgggggcag agaaaagggg atgctgcatc 3060
ttcttcctca cctccagctc tctcacctcg ggttgccttg cacactgggc tccgcctaac 3120
cactcgggct gggcagtgct ggcacacatt gccgcctttt ctcattgggt ccagcaattg 3180
agcagagggt tgggggattg tttcctccac aatgtagcaa attctcagga aaatacagtc 3240
catatcttcc tctcagctct tccagtcacc aaatacttac gtggctcctt tgtccaggac 3300
ataaaacacc gtggacaaca cctaattaaa agcctacaaa actgcttact gacagttttg 3360
aatgtgagac atttgtgtaa tttaaatgta aggtacaggt cttaatttct tctattaagt 3420
ttcttctatt tttatttaaa cgaagaaaat aattttcagg tttaattgga ataaacgaat 3480
acttcccaaa agactatata ccctgaaaat tatatttttg ttaattgtaa acaactttta 3540
aaaaatggtt attatccttt tctctaccta aaattatggg aaatcttagc ataatgacaa 3600

ttatttatac tttttaaata aatggtactt gctggatcca cactaacatc tttgctaaca 3660
ttcccattgt ttcttccaac ttcactccta cactacatcc tccatcctct ttctagtctt 3720
ttatctataa tatgcaacct aaaataaaag tggtggtgtc tccattcatt cttcttcttc 3780
ctttttttccc caagcctggt cttcaaaagg ttgggtaatt tagtagctga gttccctagg 3840
tagaaataga actattaggg acattggggt tgtaggaaag cgtgaggcct gtcaccagtt 3900
gttctt 3906

<210> 4
<211> 804
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 4

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gln
20 25 30
Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly
35 40 45
Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
50 55 60
Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
65 70 75 80
Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
85 90 95
Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
100 105 110
Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Val Phe Gln Thr Pro Thr Asp Val Ser
115 120 125
Arg Asn Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
130 135 140
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
145 150 155 160
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
165 170 175
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
180 185 190
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
195 200 205
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
210 215 220

Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
225 230 235 240
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
245 250 255
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
260 265 270
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Val Pro Gln Glu Glu Ala
275 280 285
Phe Ser Ala Glu Thr Thr Leu Pro Ser Gly Cys Ser Ser Ala Pro Pro
290 295 300
Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys
305 310 315 320
Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg
325 330 335
Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His
340 345 350
Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Glu Lys Phe Pro Glu Val
355 360 365
Glu Leu Gln Asp Gln Arg Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg Gly
370 375 380
Asp Gly Ala Pro Leu Asn Gln Leu Met Arg Cys Leu Arg Lys Tyr Gln
385 390 395 400
Ser Arg Thr Pro Ser Pro Leu Leu His Ser Val Pro Ser Glu Ile Val
405 410 415
Phe Asp Phe Glu Pro Gly Pro Val Phe Arg Gly Ser Thr Thr Gly Leu
420 425 430
Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys
435 440 445
Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser
450 455 460
Ser Ser Ser Ser Thr Glu Asp Arg Ser Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg
465 470 475 480
Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val
485 490 495
Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys
500 505 510
Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr
515 520 525
Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys

530 535 540
Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro
545 550 555 560
Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His
565 570 575
His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp
580 585 590
Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser
595 600 605
Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp
610 615 620
Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg
625 630 635 640
Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp
645 650 655
Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe
660 665 670
Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr
675 680 685
Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe
690 695 700
Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser
705 710 715 720
Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys
725 730 735
Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu
740 745 750
Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro
755 760 765
Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala
770 775 780
Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Glu Phe
785 790 795 800
Ala Ala Phe Lys

<210> 5
<211> 9728
<212> DNA
<213> 小鼠(Mus musculus)
<400> 5

ccctcaggct cggctgcgcc ggggccgccg gcgggttcca gaggtggcct ccgccccggc 60
cgctccgccc acgccccccg cgcctccgcg cccgcctccg cccgccctgc gcctcccttc 120
cccctccccg ccccgcggcg gccgctcggc ccggctcgcg cttcgaagat ggcggcgctg 180
agtggcggcg gtggcagcag cagcggtggc ggcggcggcg gtggcggcgg cggtggcggt 240
ggcgacggcg gcggcggcgc cgagcagggc caggctctgt tcaatggcga catggagccg 300
gaggccggcg ctggcgccgc ggcctcttcg gctgcggacc cggccattcc tgaagaggta 360
tggaatatca agcaaatgat taagttgaca caggaacata tagaggccct attggacaaa 420
tttggtggag agcataaccc accatcaata tacctggagg cctatgaaga gtacaccagc 480
aagctagatg cccttcagca aagagaacag cagcttttgg aatccctggt ttttcaaact 540
cccacagatg catcacggaa caaccccaag tcaccacaga aacctatcgt tagagtcttc 600
ctgcccaaca aacagaggac agtggtaccc gcaagatgtg gtgttacagt tcgagacagt 660
ctaaagaaag cactgatgat gagaggtctc atcccagaat gctgtgctgt ttacagaatt 720
caggatggag agaagaaacc aattggctgg gacacggaca tttcctggct tactggagag 780
gagttacatg ttgaagtact ggagaatgtc ccacttacaa cacacaactt tgtacggaaa 840
actttttca ccttagcatt ttgtgacttt tgccgaaagc tgcttttcca gggtttccgt 900
tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgttgtagta cagaggttcc actgatgtgt 960
gtaaattatg accaacttga tttgctgttt gtctccaagt tctttgagca tcacccagta 1020
ccacaggagg aggcctcctt cccagagact gcccttccat ctggatcctc ttccgcaccc 1080
ccctcagact ctactgggcc ccaaatcctc accagtccat ctccttcaaa atccattcca 1140
attccacagc ccttccgacc agcagatgaa gatcatcgca atcagtttgg gcaacgagac 1200
cggtcctcct cagctcccaa tgttcatata aacacaattg agcctgtgaa tatcgatgaa 1260
aaattcccag aagtggaatt acaggatcaa agggatttga ttagagacca ggggtttcgt 1320
ggtgatggag ccccccttgaa ccaactgatg cgctgtcttc ggaaatacca atcccggact 1380
cccagccccc tcctccattc tgtccccagt gaaatagtgt ttgattttga gcctggccca 1440
gtgttcagag ggtcaaccac aggcttgtcc gccacccccgc ctgcctcatt acctggctca 1500
ctcactaacg tgaaagcctt acagaaatct ccaggtcctc agcgggaaag gaagtcatct 1560
tcttcctcat cctcggagga cagaagtcgg atgaaaacac ttggtagaag agattcaagt 1620
gatgactggg agattcctga tggacagatt acagtgggac agagaattgg atctgggtca 1680
tttggaactg tctacaaggg aaagtggcat ggtgatgtgg cagtgaaaat gttgaatgtg 1740
acagcaccca cacctcaaca gctacaggcc ttcaaaaatg aagtaggagt gctcaggaaa 1800
actcgacatg tgaatatcct ccttttcatg ggctattcta caaagccaca actggcaatt 1860
gttacacagt ggtgtgaggg ctccagctta tatcaccatc tccacatcat tgagaccaaa 1920
tttgagatga tcaaacttat agatattgct cggcagactg cacagggcat ggattactta 1980
cacgccaagt caatcatcca cagagacctc aagagtaata atatatttct tcatgaagac 2040
ctcacggtaa aaataggtga ctttggtcta gccacagtga aatctcggtg gagtgggtcc 2100
catcagtttg aacagttgtc tggatctatt ttgtggatgg caccagaagt aatcagaatg 2160
caagataaaa acccgtatag ctttcagtca gacgtgtatg cgtttgggat tgttctgtac 2220
gaactgatga ccggccagct accttattca aacatcaaca acagggatca gataattttt 2280
atggtgggac gaggatacct atctccagat ctcagtaagg tacggagtaa ctgtccaaaa 2340

gccatgaaga gattaatggc agagtgcctc aaaaagaaaa gagacgagag accactcttt 2400
ccccaaattc tcgcctccat tgagctgctg gcccgctcat tgccaaaaat tcaccgcagt 2460
gcatcagaac cttccttgaa tcgggctggt ttccaaacag aagattttag tctgtatgct 2520
tgtgcttctc cgaaaacacc catccaagca gggggatatg gagaatttgc agccttcaag 2580
tagccagtcc atcatggcag catctactct ttatttctta agtcttgtgt tcatacagtt 2640
tgttaacatc aaaacacagt tctgttcctc aaaaaatttt ttaaagatac aaaattttca 2700
atgcataagt tcatgtggaa cagaatggaa tttcctattc aacaaaagag ggaagaatgt 2760
tttaggaacc agaattctct gctgcccgtg tttcttcttc aacataacta tcacgtgcat 2820
acaagtctgc ccattcccaa gaagaaagag gagagaccct gaattctgcc cttttggtgg 2880
tcaggcatga tggaaagaat ttgctgctgc agcttgggaa aattgctatg gaaagtctgc 2940
cagtcgactt tgcccttcta accaccagat cagcctgtgg ctggtcatct gatggggcga 3000
tttccatcac caagcatcgt tcttgcctat tctgggatta tgttgtggag cactttccct 3060
gtccagcacc gttcatttct gagggatgga gtaaatgcag cattcccttg tgtagcgcct 3120
gttcagtcct cagcagctgc tgtcacagcg aagctttta cagttaagtg gtgggggaga 3180
gttgaggaga gcctgcctcg gggcagagaa aaggggtgc tgcatcttct tcctcacctc 3240
cagctctctc acctcgggtt gccttgctca ctgggctccg cctaaccact caggctgctc 3300
agtgctggca cacattgcct tcttttctca ttgggtccag caattgagga gagggttggg 3360
ggattgtttc ctcctcaatg tagcaaattc tcaggaaaat acagtccata tcttcctctc 3420
agctcttcca gtcaccaaat acttacgtgg ctcctttgtc caggacataa aacaccgtgg 3480
acaacaccta attaaaagcc tacaaaactg cttactgaca gttttgaatg tgagacactt 3540
gtgtaattta aatgtaaggt acaggtttta atttctgagt ttcttctatt tttatttaaa 3600
agaagaaaat aattttcagt tttaattgga ataaatgagt acttcccaca agactatata 3660
ccctgaaaat tatatttttg ttaattgtaa acaactttta aagaataatt attatccttt 3720
tctctaccta aaaattatgg ggaatcttag cataatgaca attatttata ctttttaaat 3780
aaatggtact tgctggatcc acactaacat ctttgctaac aatcccattg tttcttccaa 3840
cttaactcct acactacatc ctacatcctc tttctagtct tttatctata atatgcaacc 3900
taaaataaac gtggtggcgt ctccattcat tctccctctt cctgttttcc ccaagcctgg 3960
tcttcaaaag gttgggtaat cggtccctga gctccctagc tggcaatgca actattaggg 4020
acattggagt tgcaggagag caggaagcct gtccccagct gttcttctag aaccctaaat 4080
cttatctttg cacagatcaa aagtatcacc tcgtcacagt tctccttagc ctttacttac 4140
aggtaatata aataaaaatc accatagtag taaagaaaac aactggatgg attgatgacc 4200
agtacctctc agagccagga atcttgaatc tccaggattt atacgtgcaa atttaaggag 4260
atgtacttag caacttcaag ccaagaactt ccaaaatact agcgaatcta aaataaaatg 4320
gaattttgag ttatttttaa agttcaaatt ataattgata ccactatgta tttaagccta 4380
ctcacagcaa gttagatgga ttttgctaaa ctcattgcca gactgtggtg gtggtggtgg 4440
tagtgtgcac ctttaatcca agcaactcag caatcagaat gaggtaaatc tctgtgaata 4500
caaggcctgc ctagtctgca gcgctagttc caggatagcc agggctacac acacaaaaac 4560
cctctctcaa aaaaaacaaa attaattagt tgataataaa aaataactaa agtatcatca 4620
aaggaaggcc tactggaagt tttatatatt cccagtaaat tgaaaaatat tctgaagtta 4680

ttaaccagtt agcaacaatg tgtttttaag tcttacataa acagagcaaa gtcttcaaat 4740
gtttcagagc tgagaagata attgtgcttg atatgaaaaa tagcctctcc atatgatgtg 4800
ccacattgaa aggcgtcatt acccttttaa atacttctta atgtggcttt gttcccttta 4860
cccaggatta gctagaaaga gctaggtagg cttcggccac agttgcacat ttcgggcctg 4920
ctgaagaatg ggagctttga aggctggcct tggtggagga gcccctcagt gctggagggt 4980
ggggcgtgta cgcagcatgg aagtggtcta gacagagtgc aaagggacag acttctttct 5040
cattttagta tagggtgatg tctcacttga aatgagaaag tagagttgat attaaacgaa 5100
gctgtgccca gaaaccaggc tcagggtatt gtgagatttt ctttttaaat agagaatata 5160
aaagatagaa ataaatattt aaaccttcct tcttattttc tatcaaatag attttttta 5220
tcatttgcaa acaacataaa aaaaggtttc ttttgtgggg ttttctttcc ttctttttt 5280
ttttttttt tttttaagac tgcagataat cttgttgagc tcctcggaaa atacaaggaa 5340
gtccgtgttt gtgcagagcg ctttatgagt aactgtatag acagtgtggc tgcttcactc 5400
atcccagagg gctgcagctg tcggcccatg aagtggctgc agtgcctcgt gagatctgct 5460
ttgttttgtt tggagtgaag tctttgaaag gtttgagtgc aactatatag gactgttttt 5520
aaataagtag tattcctcat gaactttctc attgttaagc tacaggaccc aaactctacc 5580
actaagatat tattaacctc aaaatgtagt ttatagaagg aatttgcaaa tagaatatcc 5640
agttcgtact tatatgcatc ttcaacaaag attctctgtg acttgttgga tttggttcct 5700
gaacagccca tttctgtatt tgaggttagg agggcataat gaggcatcct aaaagacaat 5760
ctgatataaa ctgtatgcta gatgtatgct ggtaggggag aaagcattct gtaaagacat 5820
gatttaagac ttcagctctg tcaaccagaa accttgtaaa tacttcctgt cttggtgcag 5880
ccccgccccc ttgatcacac gatgttgtct tgtgcttgtc agacactgtc agagctgctg 5940
ttcgtccctc tgcagatctc acctgtcccc actgcacacc cacctcctgc ctcttgcaga 6000
cctcagcatc tagctttagt tggaaacagt tcagggttca ggtgacttct taaaaaaaaa 6060
aaaaaaccct acctcctcag aatgaggtaa tgaatagtta tttatttaaa gtatgaagag 6120
tcaggagcgc tcgaacatga aggtgattta agatggttcc tttcgtgtgt attgtagctg 6180
agcacttgtt tttgtcctaa agggcattat acatttaagc agtgattctg tttaaagatg 6240
tttttcttta aaggtgtagc tcagagtatc tgttgttgga attggtgcca gagtctgctt 6300
aatagatttc agaatcctaa gcttaagtca gtcgcatgaa gttaagtagt tatggtaaca 6360
ctttgctagc catgatataa ttctactttt taggagtagg tttggcaaaa ctgtatgcct 6420
tcaaagtgag ttggccacag ctttgtcaca tgcacagata ctcatctgaa gagactgccc 6480
agctaagagg gcggaaggat acccttttt cctacgattc gcttctttgt ccacgttggc 6540
attgttagta ctagtttatc agcaccttga ccagcagatg tcaaccaata agctattttt 6600
aaaaccatag ccagagatgg agaggtcact gtgagtagaa acagcaggac gcttacagga 6660
gtgaaatggt gtagggaggc tctagaaaaa tatcttgaca atttgccaaa tgatcttact 6720
gtgccttcat gatgcaataa aaaagctaac attttagcag aaatcagtga tttacgaaga 6780
gagtggccag tctggtttaa ctcagctggg ataatatttt tagagtgcaa tttagactgc 6840
gaagataaat gcactaaaga gtttatagcc aattcacatt tgaaaaataa gaaaatggta 6900
aattttcagt gaaatatttt tttaaagcac ataatcccta gtgtagccag aaatatttac 6960
cacatagagc agctaggctg agatacagtc cagtgacatt tctagagaaa ccttttctac 7020

tcccacgggc tcctcaaagc atggaaattt tatacaaaat gtttgacatt ttaagatact 7080
gctgtagttt agttttgaaa tagtatgtgc tgagcagcaa tcatgtacta actcagagag 7140
agaaaacaac aacaaattgt gcatctgatt tgttttcaga gaaatgctgc caacttagat 7200
actgagttct cagagcttca agtgtaaact tgcctcccaa gtcctgtttg caaatgaagt 7260
tggctagtgc tactgactgc tccagcacat gatggaaggc agggggctgt ctctgaagtg 7320
tcttctataa agggacaata gaatagtgag agacctggtc agtgtgtgtc agctggacac 7380
tccatgctat gggacttgca tcttctgtcc tcaccatccc caagacattg tgctttcctc 7440
agttgtcctc tagctgtttc actcagacac caagatgaat tactgatgcc agaaggggcc 7500
aaaatggcca gtgtgttttg ggggttgtat cagttgactg gacaataact ttaatagttt 7560
cagatcattt atttttactt ccattttgac agacatttaa atggaaattt agtcctaact 7620
tttgtcattt gaaaggaaaa attaacagtt cctataagat acttttgagg tggaatctga 7680
catcctaatt ttttttcttt tcagtgggtt tgcagcgagg gtcttgtatg cactaggcaa 7740
gggttctacc actaagccac atttcccagg aaataaaatg ttaacagtta aaacatacac 7800
acaaatacac aaacacctta ttaccacttt agtaaagtga gagatgtgcg tcctttgtct 7860
cagtctccac gatttcagct gccccttgta tgaataactc agtctcgcta aactgtttac 7920
ttttatttac ctggtttgac tagttgcagc tatataacca gttgtgcatg aggacaacag 7980
ccagtgtgtt tgttttgttt ttggtttttt gtggtacatt ttttgtaaag aattctgtag 8040
attgaagtgc tctttgaaaa cagaactgag atatatttat tcttgttagc atcaaaaaac 8100
attttgtgca aatgatttgc ttttcctggc aggctgagta ccatatccag cgcccacaat 8160
tgcgggttcc catctaccat gtccacaggg gagacagacg ggaagcacat gaggggtgtg 8220
tttacagagt tgtaggagtt atgtagttct cttgttgcct tggaaatcac tgttgtttta 8280
agactgttga acccgtgtgt ttggctgggc tgtgagttac atgaagaaac tgcaaactag 8340
catatgcaga caaagctcac agactaggcg taaatggagg aaaatggacc aaaataaggc 8400
agggtgacac ataaaccttg ggcttcggag aaaactaagg gtggagatga actataatca 8460
cctgaataca atgtaagagt gcaataagtg tgcttattct aagctgtgaa cttcttttaa 8520
atcattcctt tctaatacat ttatgtatgt tccattgctg actaaaacca gctatgagaa 8580
catatgcctt tttattcatg ttaactacca gtttaagtgg ctaaccttaa tgtcttattt 8640
atcttcattt tgtattagtt tacataccag gtatgtgtgt gtgctgtact cttcttccct 8700
ttatttgaaa acacttttca ctgggtcatc tccttggcca ttccacaaca caactttggt 8760
ttggctttca atgtcacctt atttgatggc ctgtgtccca gtagcagaat ttatggtatt 8820
cccattgctg gctgctcttc cgacccttg cttctacagc acttgtctct cctaagatag 8880
tcagaaacta actgatcagg ggatggactt caccattcat cgtgtctctt caattctatt 8940
aaatagacca ctcttgggct ttagaccagg aaaaaggaga cagctctagc catctaccaa 9000
gcctcaccct aaaaggtcac ccgtacttct tggtctgagg acaagtctcc actccagtaa 9060
gggagagggg aggaaatgct tcctgtttga aatgcagtga attcctatgg ctcctgtttc 9120
accacccgca cctatggcaa cccatataca ttcctcttgt ctgtaactgc caaaggttgg 9180
gtttatgtca cttcagttcc actcaagcat tgaaaaggtt ctcatggagt ctggggtgtg 9240
cccagtgaaa agatggggac tttttcatta tccacagacc tctctatacc tgctttgcaa 9300
aaattataat ggagtaacta tttttaaagc ttatttttca attcataaga aaaagacatt 9360

tattttcaat caaatggatg atgtctctta tcccttatcc ctcaatgttt gcttgaattt 9420
tgtttgttcc ctatacctac tccctaattc tttagttcct tcctgctcag gtcccttcat 9480
ttgtactttg gagtttttct catgtaaatt tgtataatgg aaaatattgt tcagtttgga 9540
tagaaagcat ggagaaataa ataaaaaaag atagctgaaa atcaaattga agaaatttat 9600
ttctgtgtaa agttatttaa aaactctgta ttatatttaa agaaaaaagc ccaacccccc 9660
aaaaagtgct atgtaattga tgtgaatatg cgaatactgc tataataaag attgactgca 9720
tggagaaa 9728

<210> 6
<211> 804
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 6

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Asp Gly Gly Gly Gly Ala Glu
20 25 30
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
35 40 45
Gly Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val
50 55 60
Trp Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala
65 70 75 80
Leu Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu
85 90 95
Glu Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg
100 105 110
Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Val Phe Gln Thr Pro Thr Asp Ala
115 120 125
Ser Arg Asn Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
130 135 140
Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
145 150 155 160
Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
165 170 175
Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
180 185 190
Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
195 200 205
Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys

210 215 220
Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
225 230 235 240
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
245 250 255
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
260 265 270
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Val Pro Gln Glu Glu
275 280 285
Ala Ser Phe Pro Glu Thr Ala Leu Pro Ser Gly Ser Ser Ser Ala Pro
290 295 300
Pro Ser Asp Ser Thr Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
305 310 315 320
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
325 330 335
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
340 345 350
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Glu Lys Phe Pro Glu
355 360 365
Val Glu Leu Gln Asp Gln Arg Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg
370 375 380
Gly Asp Gly Ala Pro Leu Asn Gln Leu Met Arg Cys Leu Arg Lys Tyr
385 390 395 400
Gln Ser Arg Thr Pro Ser Pro Leu Leu His Ser Val Pro Ser Glu Ile
405 410 415
Val Phe Asp Phe Glu Pro Gly Pro Val Phe Arg Gly Ser Thr Thr Gly
420 425 430
Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val
435 440 445
Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser
450 455 460
Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Ser Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg
465 470 475 480
Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val
485 490 495
Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys
500 505 510
Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr
515 520 525

Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys
530 535 540
Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro
545 550 555 560
Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His
565 570 575
His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp
580 585 590
Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser
595 600 605
Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp
610 615 620
Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg
625 630 635 640
Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp
645 650 655
Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe
660 665 670
Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr
675 680 685
Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe
690 695 700
Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser
705 710 715 720
Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys
725 730 735
Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu
740 745 750
Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro
755 760 765
Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala
770 775 780
Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Glu Phe
785 790 795 800
Ala Ala Phe Lys

<210> 7

<211> 2232

<212> DNA

<213> 兔(Oryctolagus cuniculus)

<400> 7

atggggaatg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga cacaggagca tatagaggcc 60
ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa tatatctgga ggcctacgaa 120
gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac agcagttatt ggaatcccta 180
gtttttcaaa atcccacaga tgtgtcacgg agcaacccca agtcaccaca aaaacctatt 240
gttagagtct tcctgcccaa caaacagagg acagtggtac ctgcaagatg tggagttacg 300
gttcgagaca gtctaaagaa agcgctgatg atgagaggtc tgatcccaga atgctgtgct 360
gtttacagaa ttcaggatgg agagaagaag ccaattggct gggacactga tatttcctgg 420
ctcactggag aagagctgca tgtggaagtg ttagagaatg tcccactcac cacacataac 480
tttgtacgga aaacttttt caccttagca ttttgtgact tctgtagaaa gctgcttttc 540
cagggtttcc gctgtcaaac atgtggctac aaatttcacc agcgttgtag tacggaagtt 600
ccactgatgt gtgttaatta tgaccaactt gatttgctgt ttgtctccaa gttctttgaa 660
caccacccag taccacagga ggaggcctcc ttagcagaga ctgccctcac atctgggtca 720
tcgccttccg cacctccctc agactctatt gggcaccaaa ttctcaccag tccgtcccct 780
tcaaaatcca ttccgattcc acagtccttc cgaccagcag atgaagatca tcgaaatcag 840
tttgggcaac gagaccggtc ttcatcagcg cctaatgttc acattaacac aatagaacct 900
gtcaatattg atgaaaaatt cccagaagtg gaattacagg atcaaaggga cttgattaga 960
gaccaagggt ttcgtggtga tggagcccct ttgaaccagc tgatgcgctg tcttcggaaa 1020
taccaatccc ggactcccag tcccctccta ccttctgtcc ccagtgacat agtgtttgat 1080
tttgagcctg gcccagtgtt cagaggatcg accacgggtt tgtctgccac tccccctgcc 1140
tcattacctg gctcactcac tagtgtgaaa gctgtacaga gatccccagg acctcagcga 1200
gagaggaagt cgtcttcctc ctcagaagac aggaatcgaa tgaaaactct tggtagacgg 1260
gattcaagtg atgattggga gattcctgat gggcagatca ccgtgggaca gagaattgga 1320
tctggatcat ttggaaccgt ctacaaggga aaatggcacg gtgatgtggc agtaaaaatg 1380
ttgaatgtga cagcacctac acctcagcag ttacaggcct tcaaaaatga agtaggagta 1440
ctcaggaaaa cacgacatgt gaatatccta cttttcatgg gctattccac aaagccacag 1500
ctggctattg ttacccagtg gtgtgagggc tccagtttat atcaccatct ccacatcatt 1560
gagaccaaat tcgagatgat caaacttata gatattgcac ggcagactgc acagggcatg 1620
gattacttac acgccaagtc aatcatccac agagacctca agagtaataa tatatttctt 1680
catgaagacc tcacagtaaa aataggtgat tttggtctag ccacagtgaa atctcgatgg 1740
agtgggtccc atcagtttga acaattgtct ggatccattt tgtggatggc accagaagta 1800
atcagaatgc aagacaaaaa cccatatagc tttcagtcag atgtatatgc atttgggatt 1860
gttctgtatg aattgatgac tgggcagtta ccttactcaa acatcaacaa cagggaccag 1920
atcattttta tggtgggacg tggctacctg tctccagacc tcagtaaggt acggagtaac 1980
tgtccgaaag ccatgaagag attaatggca gagtgcctca aaaagaaaag agatgagaga 2040
ccactctttc cccaaattct cgcctccatt gagctgctgg cccgctcatt gccaaaaatc 2100
caccgcagtg catcagaacc ctccttgaat cgggctggtt tccagacaga ggattttagt 2160
ctatatgctt gtgcttctcc aaaaacaccc atccaggcag ggggatatgg agaatttgca 2220
gccttcaagt ag 2232

<210> 8
<211> 743
<212> PRT
<213> 兔
<400> 8

Met Gly Asn Val Trp Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu
1 5 10 15
His Ile Glu Ala Leu Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro
20 25 30
Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala
35 40 45
Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Val Phe Gln Asn
50 55 60
Pro Thr Asp Val Ser Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile
65 70 75 80
Val Arg Val Phe Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg
85 90 95
Cys Gly Val Thr Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg
100 105 110
Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu
115 120 125
Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu
130 135 140
Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn
145 150 155 160
Phe Val Arg Lys Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg
165 170 175
Lys Leu Leu Phe Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe
180 185 190
His Gln Arg Cys Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp
195 200 205
Gln Leu Asp Leu Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Val
210 215 220
Pro Gln Glu Glu Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser
225 230 235 240
Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ser Asp Ser Ile Gly His Gln Ile Leu Thr
245 250 255
Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Ser Phe Arg Pro
260 265 270

Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser
275 280 285
Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp
290 295 300
Glu Lys Phe Pro Glu Val Glu Leu Gln Asp Gln Arg Asp Leu Ile Arg
305 310 315 320
Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Ala Pro Leu Asn Gln Leu Met Arg
325 330 335
Cys Leu Arg Lys Tyr Gln Ser Arg Thr Pro Ser Pro Leu Leu Pro Ser
340 345 350
Val Pro Ser Asp Ile Val Phe Asp Phe Glu Pro Gly Pro Val Phe Arg
355 360 365
Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly
370 375 380
Ser Leu Thr Ser Val Lys Ala Val Gln Arg Ser Pro Gly Pro Gln Arg
385 390 395 400
Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr
405 410 415
Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln
420 425 430
Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr
435 440 445
Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr
450 455 460
Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val
465 470 475 480
Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser
485 490 495
Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser
500 505 510
Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys
515 520 525
Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His
530 535 540
Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu
545 550 555 560
His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
565 570 575
Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser

580 585 590

Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro
595 600 605

Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu
610 615 620

Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln
625 630 635 640

Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys
645 650 655

Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys
660 665 670

Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala
675 680 685

Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala
690 695 700

Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser
705 710 715 720

Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr
725 730 735

Gly Glu Phe Ala Ala Phe Lys
740

<210> 9

<211> 2186

<212> DNA

<213> 豚鼠(Cavia porcellus)

<400> 9

atggcggcgc tcagcggcgg cggtggcgcg gagcagggcc aggctctgtt caacggggac 60

atggagctcg aggccggcgc cggcgccgca gcctcttcgg ctgcagaccc tgccattccc 120

gaggaggtat ggaatatcaa acaaatgatt aagttgacgc aggaacacat agaggcccta 180

ttggacaaat ttggtggaga gcataatcca ccatcaatat acctggaggc ctatgaagaa 240

tacaccagca aactagatgc cctccaacaa agagaacagc agttactgga atccctcggg 300

aatggaactg atttttctgt ttctagctct gcatcactgg acaccgttac atcttcttct 360

tcttctagcc tttcagtact accttcatct ctttcagttt ttcaaaatcc tacagatgtg 420

tcacggagca accccaaatc accacaaaaa cctattgtta gagtcttcct gcccaacaaa 480

cagaggacag tggtacctgc aaggtgtgga gttacagtcc gagacagtct gaagaaagca 540

ctcatgatga gaggtcttat cccagagtgc tgtgctgtgt acagaattca ggatggagaa 600

aagaaaccaa ttggctggga cactgacatt tcctggctta ctggggaaga attacatgta 660

gaagtattgg agaatgttcc acttacaaca cacaattttg tatgtatctt tatatttttt 720

ttgctgtttg tctccaagtt ctttgaacac cacccaatac cacaggagga ggcttcctta 780

gcagagacca cccttacatc tggatcatcc ccttctgcac ccccctcaga gtccattggg 840
cccccaattc tcaccagccc atctccttca aaatccattc caattccaca gcctttccgg 900
ccaggagagg aagatcatcg aaatcaattt gggcagcgag accggtcctc atctgctccc 960
aatgtgcata taaacacaat agaacctgtc aatattgatg atttgattag agaccaaggg 1020
tttcgtagtg atggaggatc aactacaggt ttgtctgcca ccccacctgc ctcattacct 1080
ggctcactca ctaatgtgaa agccttacag aaatctccag gacctcagcg agaaaggaag 1140
tcatcttcat cctcagaaga cagaaatcga atgaaaacgc ttggtagacg ggactcaagt 1200
gatgattggg agattcctga tgggcagatt acagtgggac aaagaattgg atctgggtca 1260
tttggaacag tctacaaggg gaagtggcat ggtgacgtgg cagtgaaaat gttgaatgtg 1320
acagcaccca cacctcaaca gttacaggcc ttcaaaaatg aagtaggagt actcaggaaa 1380
acacgacatg tgaatatcct actcttcatg ggctattcca caaagccaca gctagctatt 1440
gttacccagt ggtgtgaggg ctccagctta taccaccatc tccacatcat cgagaccaaa 1500
tttgagatga tcaaacttat agatattgca cgacagactg cccagggcat ggattactta 1560
cacgccaagt caatcatcca cagagacctc aagagtaata atatatttct tcacgaagac 1620
ctcacggtta aaataggtga ttttggtcta gccacagtga aatctcgatg gagtgggtcc 1680
catcagtttg aacagttgtc tggatccatt ttgtggatgg caccagaagt aatcagaatg 1740
cgagataaaa acccatacag ttttcagtcc gatgtatatg catttgggat tgttctatat 1800
gaattgatga ctgggcagtt accctattca aatatcaaca acagggacca gataattttt 1860
atggtgggac gaggatatct atctccagat ctcagcaagg tacggagtaa ctgtccaaaa 1920
gccatgaaga ggttaatggc ggagtgcctc aaaaagaaaa gagatgagag accactcttt 1980
ccccaaattc tcgcctctat tgagctgctg gcccgctcat tgccaaaaat tcaccgcagt 2040
gcatcagaac cctccttgaa tcgggctggt ttccaaacag aggattttag tctctatgct 2100
tgtgcttctc caaaaacacc catccaggca gggggatatg gtgcgtttcc tgtccactga 2160
tgcaaattaa atgagtgaga aataaa 2186

<210> 10
<211> 719
<212> PRT
<213> 豚鼠
<400> 10

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gln Gly Gln Ala Leu
1 5 10 15
Phe Asn Gly Asp Met Glu Leu Glu Ala Gly Ala Gly Ala Ala Ala Ser
20 25 30
Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn Ile Lys Gln
35 40 45
Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu Asp Lys Phe
50 55 60
Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr Glu Glu
65 70 75 80

Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Leu Leu
85 90 95
Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser Ser Ala Ser
100 105 110
Leu Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Val Leu Pro
115 120 125
Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser Arg Ser Asn
130 135 140
Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu Pro Asn Lys
145 150 155 160
Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg Asp Ser
165 170 175
Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala
180 185 190
Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr
195 200 205
Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu
210 215 220
Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Cys Ile Phe Ile Phe Phe
225 230 235 240
Leu Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu
245 250 255
Glu Ala Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser
260 265 270
Ala Pro Pro Ser Glu Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser
275 280 285
Pro Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Gly Glu Glu
290 295 300
Asp His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro
305 310 315 320
Asn Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile
325 330 335
Arg Asp Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser
340 345 350
Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala
355 360 365
Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser
370 375 380
Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser

385 390 395 400
Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile
405 410 415
Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp
420 425 430
Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu
435 440 445
Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val
450 455 460
Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile
465 470 475 480
Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile
485 490 495
Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln
500 505 510
Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg
515 520 525
Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys
530 535 540
Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser
545 550 555 560
His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu
565 570 575
Val Ile Arg Met Arg Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val
580 585 590
Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro
595 600 605
Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg
610 615 620
Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys
625 630 635 640
Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu
645 650 655
Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg
660 665 670
Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg
675 680 685
Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro
690 695 700

Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
705 710 715

<210> 11

<211> 3229

<212> DNA

<213> 狗(Canis familiaris)

<400> 11

gtaatgctgg attttcatgg aataagtttg acctgtgctg cagtggcctc cagcaaggta 60
cccgcaagat gtggagttac agtccgggac agtctaaaga aagctctgat gatgagaggt 120
ctaatcccag agtgctgtgc tgtttacaga attcaggatg gagagaagaa accgattggc 180
tgggacactg atatttcctg gctcactgga gaggaattgc atgtagaagt gttggaaaat 240
gttccgctta ccacacacaa ctttgtacgg aaaacttttt tcaccttagc attttgtgac 300
ttttgtcgaa agctgctttt ccagggtttt cgctgtcaaa catgtggtta taaatttcac 360
cagcgttgta gtacagaggt tccactgatg tgtgttaatt atgaccaact tgatttgctg 420
tttgtctcca agttctttga acaccaccca ataccacagg aggaggcctc catagcagag 480
actgccctta cgtctggatc atcccttct gctcccccct ccgattctcc tgggccccca 540
attctgacca gtccgtctcc ttcaaaatcc attccaattc cacagccttt ccgaccagca 600
gatgaagatc atcgaaatca gtttggacaa cgagaccggt cctcatcagc tccaaatgtg 660
catataaaca caatagaacc cgtcaacatt gatgacttga ttagagacca agggtttcgt 720
agtgatggag gatcaaccac aggtttgtct gccacccccc ctgcctcatt gcctggctca 780
ctcactaatg taaaagcatt acagaaatct ccaggacctc agcgggaaag aaaatcatct 840
tcatcctcag aagataggaa tcgaatgaaa acacttggta gacgggattc aagtgatgat 900
tgggagatac ctgatgggca gatcacagtg ggacagagaa ttggatccgg gtcatttggg 960
acagtctaca agggaaagtg gcatggtgac gtggcagtga aaatgttgaa tgtgacagca 1020
cccacacctc agcagttaca ggccttcaaa aatgaagtag gagtactcag gaaaactcga 1080
catgtgaata tcctactctt tatgggctat tcaacaaagc cccaactggc tattgttacc 1140
cagtggtgtg agggctccag cttatatcac catctccaca tcattgagac caaatttgag 1200
atgataaagc ttatagatat tgcacggcag actgcacagg gcatggatta cttacacgcc 1260
aagtcaatca tccacagaga cctcaagagt aataatattt ttcttcatga agacctcaca 1320
gtaaaaatag gtgattttgg tctagccaca gtgaaatctc gatggagtgg gtcccatcag 1380
tttgaacagt tgtctggatc cattttgtgg atggcaccag aagtgatccg aatgcaagac 1440
aaaaacccat atagcttcca gtcagatgta tacgcatttg ggattgttct atatgaattg 1500
atgacagggc agttacctta ttcaaacatc aacaacaggg accagataat ttttatggtg 1560
ggacgaggat atctttctcc agatctcagt aaggtacgga gtaactgtcc aaaagccatg 1620
aagagattga tggcagagtg cctaaaaaag aaaagagatg agaggccact ctttccccaa 1680
attctcgcct ctattgagct gctggcccgc tcattgccaa aaattcaccg cagtgcatca 1740
gaaccctcct tgaatcgggc tggcttccaa acagaggatt ttagtctcta tgcttgcgct 1800
tctccaaaaa cacccatcca ggcaggggga tacggagaat ttgcagcctt caagtagcca 1860
caccatcatg gcaacaacta ctcttatttc ttaagtcttg tgttcgtaca atttgttaac 1920

atcaaaacac agttctgttc ctcaaatctt tttttaaaga tacagaattt tcaatgcata 1980
agctggtgtg gaacagaatg gaatttccca tccaacaaaa gagggaagaa tgttttagga 2040
accagaattc tctgctgcca gtgtttcttc ttcaacacaa ataccacgtg catacaagtc 2100
tgcccactcc caggaaggaa gaggagagcc tgagttctga ccttttgatg gtcaggcatg 2160
atggaaagaa actgctgcta cagcttggga gattggctgt ggagagcctg cccgtcagct 2220
ctgcccttct aaccgccaga tgagtgtgtg gctggtcacc tgacagggca gctgcaatcg 2280
ccaagcatcg ttctctttcc tgtcctggga ttttgtcgtg gagctctttc cccctagtca 2340
ccaccggttc atttctgagg gatggaacaa aaatgcagca tggcctttct gtgtggtgca 2400
tgtccggtct ttgacaaatt tttatcaagt gaagctcttg tatttaaatg gagaatgaga 2460
ggcgaggggg ggggatcacg ttttggtgta ggggcaaagg gaatgctgca tctttttcct 2520
gacccactgg gtttctggcc tttgtttcct tgctcactga gggtgtctgc ctataaccac 2580
gcaggctgga aagtgctggc acacattgcc ttctcttctc actgggtcca gcaatgaaga 2640
caagtgttgg ggatttttt ttttgccctc cacaatgtag caagttctca ggaaaataca 2700
gttaatatct tcctcctaag ctcttccagt catcaagtac ttatgtggct actttgtcca 2760
gggcacaaaa tgccatggcg gtatccaatt aaaagcctac aaaactgctt gataacagtt 2820
ttgaatgtgt gagacattta tgtaatttaa atgtaaggta caagttttaa tttctgagtt 2880
tctctattat atttttatta aaaagaaaat aattttcaga tttaattgaa ttggaataaa 2940
ataatacttc ccaccagaat tatatatcct ggaaaattgt atttttgtta tataaacaac 3000
ttttaaagaa agatcattat ccttttctct acctaaatat ggggagtctt agcataatga 3060
cagatattta taatttttaa attaatggta cttgctggat ccacactaac atctttgcta 3120
atatctcatg ttttcctcca acttactcct acactacatc ctccatcctc tttccagtct 3180
tttatctaga atatgcaacc taaaataaaa atggtggtgt ctccattca 3229

<210> 12
<211> 617
<212> PRT
<213> 狗
<400> 12

Met Leu Asp Phe His Gly Ile Ser Leu Thr Cys Ala Ala Val Ala Ser
1 5 10 15
Ser Lys Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg Asp Ser Leu Lys
20 25 30
Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala Val Tyr
35 40 45
Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr Asp Ile
50 55 60
Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu Asn Val
65 70 75 80
Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe Phe Thr Leu Ala
85 90 95

Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly Phe Arg Cys Gln
100 105 110
Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr Glu Val Pro Leu
115 120 125
Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe Val Ser Lys Phe
130 135 140
Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala Ser Ile Ala Glu Thr
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ser Asp Ser Pro
165 170 175
Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile Pro Ile
180 185 190
Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln Phe Gly
195 200 205
Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn Thr Ile
210 215 220
Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg Ser
225 230 235 240
Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu
245 250 255
Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro
260 265 270
Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met
275 280 285
Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp
290 295 300
Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr
305 310 315 320
Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn
325 330 335
Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val
340 345 350
Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly
355 360 365
Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly
370 375 380
Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met
385 390 395 400
Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr

405 410 415
Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile
420 425 430
Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala
435 440 445
Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser
450 455 460
Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys
465 470 475 480
Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu
485 490 495
Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg
500 505 510
Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu
515 520 525
Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala
530 535 540
Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile
545 550 555 560
Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg
565 570 575
Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp
580 585 590
Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly
595 600 605
Gly Tyr Gly Glu Phe Ala Ala Phe Lys
610 615

<210> 13
<211> 1889
<212> DNA
<213> 狗(Canis familiaris)
<400> 13
ggaatatcaa acaaatgatt aagttgacac aggaacatat agaagcccta ttggacaagt 60
ttggtgggga gcataatcca ccatcaatat atctggaggc ctatgaagaa tacaccagca 120
aactagatgc cctccaacag cgagaacaac agttattgga atccctgggg aatggaactg 180
atttttctgt ttctagctct gcatcaacgg acaccgttac atcttcttcc tcttctagcc 240
tttcagtgct accttcatct ctttcagttt ttcaaaatcc cacagatata tcacggagca 300
atcccaagtc accacaaaaa cctatcgtta gagtcttcct gcccaataaa cagaggacgg 360
tggtacccgc aagatgtgga gttacagtcc gggacagtct aaagaaagct ctgatgatga 420

gaggtctaat cccagagtgc tgtgctgttt acagaattca ggatggagag aagaaaccga 480
ttggctggga cactgatatt tcctggctca ctggagagga attgcatgta gaagtgttgg 540
aaaatgttcc gcttaccaca cacaactttg tacggaaaac ttttttcacc ttagcatttt 600
gtgacttttg tcgaaagctg cttttccagg gttttcgctg tcaaacatgt ggttataaat 660
ttcaccagcg ttgtagtaca gaggttccac tgatgtgtgt taattatgac caacttgatt 720
tgctgtttgt ctccaagttc tttgaacacc acccaatacc acaggaggag gcctccatag 780
cagagactgc ccttacgtct ggatcatccc cttctgctcc cccctccgat tctcctgggc 840
ccccaattct gaccagtccg tctccttcaa aatccattcc aattccacag cctttccgac 900
cagcagatga agatcatcga aatcagtttg gacaacgaga ccggtcctca tcagctccaa 960
atgtgcatat aaacacaata gaacccgtca acattgatga cttgattaga gaccaagggt 1020
ttcgtagtga tggaggatca accacaggtt tgtctgccac ccccccctgcc tcattgcctg 1080
gctcactcac taatgtaaaa gcattacaga aatctccagg acctcagcgg gaaagaaaat 1140
catcttcatc ctcagaagat aggaatcgaa tgaaaacact tggtagacgg gattcaagtg 1200
atgattggga gatacctgat gggcagatca cagtgggaca gagaattgga tccgggtcat 1260
ttgggacagt ctacaaggga aagtggcatg gtgacgtggc agtgaaaatg ttgaatgtga 1320
cagcacccac acctcagcag ttacaggcct tcaaaaatga agtaggagta ctcaggaaaa 1380
ctcgacatgt gaatatccta ctctttatgg gctattcaac aaagccccaa ctggctattg 1440
ttacccagtg gtgtgagggc tccagcttat atcaccatct ccacatcatt gagaccaaat 1500
ttgagatgat aaagcttata gatattgcac ggcagactgc acagggcatg gattacttac 1560
acgccaagtc aatcatccac agagacctca agagtaataa tatttttctt catgaagacc 1620
tcacagtaaa aataggtgat tttggtctag ccacagtgaa atctcgatgg agtgggtccc 1680
atcagtttga acagttgtct ggatccattt tgtggatggc accagaagtg atccgaatgc 1740
aagacaaaaa cccatatagc ttccagtcag atgtatacgc atttgggatt gttctatatg 1800
aattgatgac agggcagtta ccttattcaa acatcaacaa cagggaccag ctcagatcat 1860
gatcacggtg tcatgagatc aagccccac 1889

<210> 14
<211> 615
<212> PRT
<213> 狗
<400> 14

Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu Asp Lys Phe
1 5 10 15
Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr Glu Glu
20 25 30
Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Leu Leu
35 40 45
Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser Ser Ala Ser
50 55 60
Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Val Leu Pro

65 70 75 80
Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Ile Ser Arg Ser Asn
85 90 95
Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu Pro Asn Lys
100 105 110
Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg Asp Ser
115 120 125
Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala
130 135 140
Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr
145 150 155 160
Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu
165 170 175
Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe Phe Thr
180 185 190
Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly Phe Arg
195 200 205
Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr Glu Val
210 215 220
Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe Val Ser
225 230 235 240
Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala Ser Ile Ala
245 250 255
Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ser Asp
260 265 270
Ser Pro Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile
275 280 285
Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln
290 295 300
Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn
305 310 315 320
Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe
325 330 335
Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala
340 345 350
Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro
355 360 365
Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn
370 375 380

Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile
385 390 395 400
Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe
405 410 415
Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met
420 425 430
Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn
435 440 445
Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe
450 455 460
Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys
465 470 475 480
Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe
485 490 495
Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met
500 505 510
Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn
515 520 525
Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly
530 535 540
Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln
545 550 555 560
Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln
565 570 575
Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile
580 585 590
Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn
595 600 605
Asn Arg Asp Gln Leu Arg Ser
610 615

<210> 15
<211> 3521
<212> DNA
<213> 猫(Felis catus)
<220>
<221> misc_feature
<222> (630)..(649)
<223> n是a, c, g,或t
<400> 15

atgcctaacc tcagtctctg ccaccacggc caatttgctc atgtgcccac tgtgtcggca 60
ctgggatatt ttgtgatttg ccttggccat tgtccactgt ccttgacatt gcctgaagga 120
gaaccactga tgctaatgtt gaaggtgacc tttgcaggct ctccactact cataccaaag 180
atgcggcccc ctgataatcc cagagccact gtctgcacat gggcaaaaca ggctacattc 240
tgtgcagact ggggagaaag gttccaagaa cacagtgcca tagttttggg cagagagttt 300
caacacagca tagtgtctat ggcagtatct ggatttggcc gggggaagtg cccaagagga 360
gacagtcagg ctgtgtccta cggccaagga cctgcactta tttttgcatg cagtggttta 420
gcacagggaa gagaacgaag taggaaatcg gagccatgga aacggcagag cggaggaaac 480
gtgcacgcgc gagggtgggc acgaaaggaa agaaccctcc ccagaagact gcgcgagggc 540
gctcctagga ttacgtcacg caccccgcga aaactgaaat gtactgtgtg tggtctttta 600
attgaactat cttccttatg tgcacttaan nnnnnnnnnn nnnnnnnnng cggcggcggc 660
ggtggcgcgg agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga agccggcgcc 720
gcggcctctt cggctgcgga ccctgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg 780
attaagttga cacaggaaca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat 840
ccaccatcaa tatatctaga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa 900
cagagagaac aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc 960
tctgcatcaa cagacaccgt tacatcttcc tcctcttcta gcctttcagt gctaccttca 1020
tctctttcag tttttcaaaa ccccacagat gtgtcacgga gcaatcccaa gtcaccacag 1080
aaacctatcg ttagagtctt cctgcctaat aaacagagga cagtggtacc tgcaagatgt 1140
ggagttacag tccgggacag tctaaagaaa gctctgatga tgagaggtct aatccctgag 1200
tgctgtgctg tttacagaat tcaggatgga gagaagaaac caattggctg ggacactgat 1260
atctcctggc tcaccggaga ggaattgcat gtagaagtgt tggaaaatgt tccacttaca 1320
actcacaact ttgtatgtac ggaaaacgtt ttcaccttag catttgtga cttttgtcga 1380
aagctgcttt tccaaggttt tcgctgtcaa acgtgtggtt ataaatttca ccagcgttgt 1440
agtacagagg ttccactgat gtgtgttaat tatgaccaac ttgatttgct gtttgtctcc 1500
aagttctttg aacaccaccc aataccacag gaggaggcct ccatagcaga gactgcccta 1560
acgtctggat cgtccccttc tgccccccc tccgattcta ctgggcccca aattctcacc 1620
agtccgtctc cttcaaaatc cattccaatt ccacagcctt tccgaccagc agatgaagat 1680
catcgaaatc aatttggaca gcgagaccgg tcctcatcag ctccaaatgt gcatataaat 1740
acaatagaac ctgtcaatat tgatgacttg attagagacc aggggtttcg tagtgatgga 1800
ggatcaacca caggcttgtc tgccaccccc cctgcctcat tgccgggctc tctcactaat 1860
gtaaaagcat tacagaaatc tccagggcct cagcgggaaa ggaaatcttc ttcatcctca 1920
gaagatagga atcgaatgaa aacacttggt agaagggatt caagtgatga ttgggagatt 1980
cctgatgggc agatcacagt gggacagaga attggatccg ggtcatttgg gacagtctac 2040
aagggaaagt ggcatggtga tgtggcagtg aaaatgttga atgtgacagc acccacacct 2100
cagcagttac aggccttcaa aaatgaagta ggagtactca ggaaaactcg gcatgtgaac 2160
atcctgctct tcatgggcta ttcaacaaag ccccagctgg ctattgtcac ccagtggtgt 2220
gagggctcca gcttatacca ccatctccac atcatcgaga ccaaattcga gatgatcaag 2280
ctgatagata ttgctcggca gactgcgcag ggcatggatt acttacacgc caagtcaatc 2340

atccacagag acctcaagag taataatatt tttcttcacg aagacctcac agtaaaaata 2400
ggtgattttg gtctagccac agtgaaatct cgatggagtg ggtcccatca gtttgaacag 2460
ttgtctggat ccattttgtg gatggcacca gaagtaattc gaatgcaaga taaaaaccca 2520
tatagctttc agtcagatgt atatgcattt gggattgttc tatatgaatt gatgactgga 2580
cagttacctt attcaaacat caacaacagg gaccagataa tttttatggt gggacgagga 2640
tatctttctc cagatctcag taaggtacga agtaactgtc caaaagccat gaagagattg 2700
atggcagagt gcctaaaaaa gaaaagagat gagaggccac tgtttcccca aattcttgcc 2760
tctattgagc tgctggcccg ctcattgcca aaaattcacc gcagtgcatc agaaccctcc 2820
ttgaatcggg ctggcttcca gacagaggat tttagtctct atgcttgtgc ttctccaaaa 2880
acacccatcc aggcaggggg atatggtgcg tttcccgtcc actgagataa gttagatgag 2940
tgcgcgagtg caggggggccg gggccaagga ggtggaaatg tgcgtgcttc tgtactaagt 3000
tggatagcat cttctttttt aaaaaaagat gaaccaaaga atgtgtatgt ttttaaagac 3060
tagatataat tatttcctga tctaaaatgt atacttagct ttggattttc aatatccaag 3120
ggttttcaaa atgcacagac attgctgaac atttgcagta cctcttctgg aggctttact 3180
tcctgttaca aattggtttt gtttactggc ttatcctaat tattaaactt caattaaact 3240
tttctcctgc acctttttgtt atgagctatc acatgtccct tagggactcg caagagcagt 3300
actgcccccg tgtacgggct tgcaggtaga aaggggatga cgggttttaa cacctgtgtg 3360
aggcaaggca gtccgaacag atctcattta ggaagccacg agagttgaat aagttatttt 3420
tattcttagt atttttttctg taactacttt ttattataac ttggaaaata tggatgtcct 3480
ttatacacct tagcaataga ctgaatttct ttttataaat t 3521

<210> 16
<211> 974
<212> PRT
<213> 猫
<220>
<221> misc_feature
<222> (210)..(217)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 16

Met Pro Asn Leu Ser Leu Cys His His Gly Gln Phe Ala His Val Pro
1 5 10 15
Thr Val Ser Ala Leu Gly Tyr Phe Val Ile Cys Leu Gly His Cys Pro
20 25 30
Leu Ser Leu Thr Leu Pro Glu Gly Glu Pro Leu Met Leu Met Leu Lys
35 40 45
Val Thr Phe Ala Gly Ser Pro Leu Leu Ile Pro Lys Met Arg Pro Pro
50 55 60
Asp Asn Pro Arg Ala Thr Val Cys Thr Trp Ala Lys Gln Ala Thr Phe
65 70 75 80

Cys Ala Asp Trp Gly Glu Arg Phe Gln Glu His Ser Ala Ile Val Leu
85 90 95
Gly Arg Glu Phe Gln His Ser Ile Val Ser Met Ala Val Ser Gly Phe
100 105 110
Gly Arg Gly Lys Cys Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ala Val Ser Tyr Gly
115 120 125
Gln Gly Pro Ala Leu Ile Phe Ala Cys Ser Gly Leu Ala Gln Gly Arg
130 135 140
Glu Arg Ser Arg Lys Ser Glu Pro Trp Lys Arg Gln Ser Gly Gly Asn
145 150 155 160
Val His Ala Arg Gly Trp Ala Arg Lys Glu Arg Thr Leu Pro Arg Arg
165 170 175
Leu Arg Glu Gly Ala Pro Arg Ile Thr Ser Arg Thr Pro Arg Lys Leu
180 185 190
Lys Cys Thr Val Cys Gly Leu Leu Ile Glu Leu Ser Ser Leu Cys Ala
195 200 205
Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
210 215 220
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
225 230 235 240
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
245 250 255
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
260 265 270
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
275 280 285
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
290 295 300
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
305 310 315 320
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
325 330 335
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
340 345 350
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
355 360 365
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
370 375 380
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu

385 390 395 400
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
405 410 415
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
420 425 430
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Cys Thr Glu
435 440 445
Asn Val Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
450 455 460
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
465 470 475 480
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
485 490 495
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu
500 505 510
Ala Ser Ile Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala
515 520 525
Pro Pro Ser Asp Ser Thr Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro
530 535 540
Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
545 550 555 560
His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
565 570 575
Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
580 585 590
Asp Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala
595 600 605
Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu
610 615 620
Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser
625 630 635 640
Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp
645 650 655
Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly
660 665 670
Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val
675 680 685
Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln
690 695 700

Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn
705 710 715 720
Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val
725 730 735
Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile
740 745 750
Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr
755 760 765
Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp
770 775 780
Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile
785 790 795 800
Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His
805 810 815
Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val
820 825 830
Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr
835 840 845
Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr
850 855 860
Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly
865 870 875 880
Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
885 890 895
Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
900 905 910
Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
915 920 925
Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
930 935 940
Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
945 950 955 960
Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
965 970

<210> 17
<211> 3853
<212> DNA
<213> 牛(Bos taurus)
<400> 17

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctccccccgc cctcagcctc ccttcccccc ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccc gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaaat tctcgcctct attgagctgc 2340

tggcccgctc attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg 2400
gcttccaaac agaggatttt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccattcagg 2460
caggggata tggtacgttt cctgttcact gaaacaaacc gagtgagtga cagcatgtag 2520
gagggtaggg acaaaagaaa gtgaacaaat gtttgcttat atatttgtta aattgaatag 2580
gattttcttt ttctttaaag gtgaacaaga gaacatgtgt gtttttaaag tttggatata 2640
gttttcttcc cagtctaaaa cccatagtta gcattacatt ttcaacatcg aatttttttt 2700
taattcatag acattgctga aaatttataa tacctttcc agaggcttta cttcccattc 2760
caagtttgtt ttgtttactt ggttagtcta atcattaaac tttaaacttt ccccacctac 2820
cttttgctgt tagctatccc gcatccatta ggggctccaa gaacagcact gtctgcgtgt 2880
gtgtgttggc aggtgggaag ctgatggtaa gttaggctgt gttagtgaag gtaaactgac 2940
caggtctaat taggagtcac tagaattgaa taagcttatt tttattaata ttttttctta 3000
taactatttc tttttgtaat aatttagaaa atataattgt tctttattcc cttacagcag 3060
tataaattat tggtgcaggt aaccaaagat attactgagg agtggcatgt ttgacatgag 3120
tgacatggtt taactttgga tttttagtta atatttcttt atatattaag gatgtcttac 3180
acattataga agtcaaattt actgacaaag gtattgcctc ctcttcctcc ccaaaaacac 3240
agcaaaattc tctgggaact cgtagcattg ttggttttct tttggatgac tatggttgcc 3300
aaacaaccaa gtaattgatt ttttttaaat tattattgct ttagattata ctcacctctc 3360
atgatgcctg ttagcaatca cctttatcca tgtgtcttgt aaaatatctt tcctccttat 3420
attctttgcc caacaagagt ctacttgtta tgaatgagta ctattttctt tttttgattc 3480
cccagtataa ttagtatgtt tagtgctttc taggacttcc actttcttat gttaaaaaaa 3540
aaaacaaact aatgtggcag tcagtatatt cttactgtga atcagagtct ttactgggaa 3600
tcaaagtgaa agaagcagct gttctgactt cagagtcagc ctagggacca aaaccagcct 3660
cttaaataca ccttcattta ttcagtttgg atttgtgatg attttcatta tagctgacag 3720
ttcaaggtta ttcagtggca cacagatagc atctgcataa atgcctttct tcttgaaaat 3780
aaaggagaaa attgggaaga ctttacacca atagtttagt ctttaagtac cacagataac 3840
acacaccata aat 3853

<210> 18
<211> 764
<212> PRT
<213> 牛
<400> 18

Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gln
1 5 10 15
Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Ala
20 25 30
Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn Ile
35 40 45
Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu Asp
50 55 60

Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr
65 70 75 80
Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln
85 90 95
Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser Ser
100 105 110
Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Val
115 120 125
Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser Arg
130 135 140
Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu Pro
145 150 155 160
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg
165 170 175
Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys
180 185 190
Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp
195 200 205
Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val
210 215 220
Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe
225 230 235 240
Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly
245 250 255
Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr
260 265 270
Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe
275 280 285
Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala Ser
290 295 300
Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro
305 310 315 320
Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys
325 330 335
Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg
340 345 350
Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His
355 360 365
Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln

370 375 380
Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro
385 390 395 400
Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys
405 410 415
Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
420 425 430
Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp
435 440 445
Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly
450 455 460
Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val
465 470 475 480
Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe
485 490 495
Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu
500 505 510
Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln
515 520 525
Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr
530 535 540
Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln
545 550 555 560
Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys
565 570 575
Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp
580 585 590
Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe
595 600 605
Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg
610 615 620
Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe
625 630 635 640
Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn
645 650 655
Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu
660 665 670
Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys
675 680 685

Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu
690 695 700
Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro
705 710 715 720
Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe
725 730 735
Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro
740 745 750
Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Thr Phe Pro Val His
755 760

<210> 19
<211> 4936
<212> DNA
<213> 牛
<400> 19

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctcccccccgc cctcagcctc ccttcccccct ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440

agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaagt aggaaagact ctcctaagca 2340
agagacaaaa ttcagaagtt atcagggaaa aagataagca gattctcgcc tctattgagc 2400
tgctggcccg ctcattgcca aaaattcacc gcagtgcatc agaaccctcc ttgaatcggg 2460
ctggcttcca aacagaggat tttagtctat atgcttgtgc ttctccaaaa acacccattc 2520
aggcaggggg atatgaagca gatttggctc ttacatcaaa taaaaataga gtagaagttg 2580
ggatttagag atttcctgac atgcaagaag gaataagcaa gaaaaaaagg tttgttttcc 2640
ccaaatcata tctattgtct tttacttcta ttttttctta aatttttgt gatttcagag 2700
acatgtagag ttttattgat acctaaacta tgagttcttt ttttttttt tttttcatta 2760
ttttgatttt tttggccaag aggcatatgg gatcttagct tgagaaagca acaattttct 2820
tgatgtcatt ttgggtgagg gcacatattg ctgtgaacag tgtggtgata gccaccaggg 2880
accaaactca cacccgctgc attgaaaggt gaagtcttaa acactggacc agcagagaaa 2940
ttcctactct atgagttctt tttgtcatcc cctccccgca ccctccaccc ccaacctaaa 3000
gtctgatgat gaaatcaaca actattccat tagaagcagt agattctggt agcatgatct 3060
ttagtttgtt agtaagattt tgtgctttgt ggggttgtgt cgttttaagg ctaatattta 3120
agtttgtcaa atagaatgct gttcagattg taaaaatgag taataaacat ctgaagtttt 3180
ttttaagtta tttttaacat ggtatataca gttgagctta gagtttatca ttttctgata 3240
ttctcttact tagtagatga attctagcca ttttttataa agatttctgt taagcaaatc 3300
ctgttttcac atgggcttcc tttaagggat tttagattct gctggatatg gtgactgctc 3360
ataagactgt tgaaaattac ttttaagatg tattagaata cttctgaaaa aaaatagcaa 3420
ccttaaaacc ataagcaaaa gtagtaaggg tgtttataca tttctagagt ccctgtttag 3480
gtaatagcct cctatgattg tactttaaat gttttgctct ccaaggtttt agtaacttgg 3540
ctttttttct aatcagtgcc aaactccccc agtttttta actttaaata tgaggtaata 3600
aatcttttac ccttccttga tcttttgact tataatacct tggtcagttg tttcttaaaa 3660
ggaatcctta aatggaaaga gacaatatca ctgtctgcag ttctgattag tagttttatt 3720
cagaatggaa aaacagatta ttcatttttg aaaattgttc aggggtatgt tcattgttag 3780

gaccttggac tttggagtca gtgcctagct atgcattcca ggtctgccat tttctggctg 3840
tgaaattttg gacaagttac ttaaccactt taaaccccag ctttaagaag taaattaacc 3900
ccagtaaatt aagaagtaat agcagccact tcgtagagtt gttatgaggc tcagatgcag 3960
tgcaaatgtg tataaagtat tcagggagtc acctggtata ctataataga cactagaata 4020
gttgccaata ttatcagcat acaatctgag gattctgtca gccaatcatt agcaatctgt 4080
tgtttgttgg gacatgccag tgttctccag ttgaaatcag tagcaatcta aaaatggata 4140
gattattcct catttaaata gtgtgttcat ataagtgatt gcttggatcc ttatcagaag 4200
ttgctgttac tgaaaaatga taaggctgac taaattgtga tagttgtcag ttactaacca 4260
actcccagaa atgaataaga ggaacctatc tctagttcct agtagaaggt atggacaaaa 4320
tagtaggtga aaaataatgt cttgaacccc caaattaagt aagctttaaa gagtacaata 4380
cctcaaaggg tctttgcggt ttaaaatttg tatgctgaga atgatgttca ttgacatgtg 4440
cctatatgta atttttgat agtttaaaag gtgaaatgaa ctacagatgg gagaggtctg 4500
aattttcttg ccttcagtca aatgtgtaat gtggacatat tatttgacct gtgaatttta 4560
tcttttaaaa aagattaatt cctgcttctt ccttcctaat agttgcatta taataatgaa 4620
aatgagttga taatttgggg ggaaagtatt ctacaaatca accttattat tttaccattg 4680
gtttctgaga aattttgttc atttgaaccg tttatagctt gattagaatc atagcatgta 4740
aaacccaact gagggattat ctgcagactt aatgtagtat tatgtaagtt gtcttctttc 4800
atttcgacct tttttgcttt tgttgttgct agatctgtag tatgtagcta gtcacctttc 4860
agcgaggttt cagcgaggct tttctgtgtc tctaggttat ttgagataac ttttttaaaa 4920
ttagctcttg tcctcc 4936

<210> 20
<211> 797
<212> PRT
<213> 牛
<400> 20

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300
Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu

420 425 430

Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp

435 440 445

Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser

450 455 460

Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala

465 470 475 480

Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala

485 490 495

Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile

500 505 510

Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr

515 520 525

Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu

530 535 540

Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala

545 550 555 560

Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu

565 570 575

Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly

580 585 590

Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln

595 600 605

Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile

610 615 620

Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala

625 630 635 640

Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser

645 650 655

Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr

660 665 670

Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met

675 680 685

Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro

690 695 700

Leu Phe Pro Gln Val Gly Lys Thr Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser

705 710 715 720

Glu Val Ile Arg Glu Lys Asp Lys Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu

725 730 735

Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser
740 745 750
Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys
755 760 765
Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Glu Ala Asp Leu
770 775 780
Ala Leu Thr Ser Asn Lys Asn Arg Val Glu Val Gly Ile
785 790 795

<210> 21
<211> 4154
<212> DNA
<213> 牛
<400> 21

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctccccccgc cctcagcctc ccttcccccc ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaacccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560

tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaagt aggaaagact ctcctaagca 2340
agagacaaaa ttcagaagtt atcagggaaa aagataagca gattctcgcc tctattgagc 2400
tgctggcccg ctcattgcca aaaattcacc gcagtgcatc agaaccctcc ttgaatcggg 2460
ctggcttcca aacagaggat tttagtctat atgcttgtgc ttctccaaaa acacccattc 2520
aggcaggggg atatggctga gcacattgtc catcacccac aagtggctgg ttctcatcgc 2580
agaatctacg tagggaatcg ggcgtgaaat tcacttaaga gatagagcag aggaagtgtt 2640
ctgtttacag gaatggagat gagagttatg agtaagttgc ttagtcagtt ggctttgttt 2700
tgaaaattat tgtgttatat ttgtgttaac ctacttgtgt tttgacagta tatgtcacat 2760
aggaagaaac ctcagactag cataataaca aagctcagac taggcacaga tgtacacaga 2820
atggaccaaa atgggatggg ggaaggtatg ggaataagtc taggggtagg gaaaaattga 2880
tgtgagggtg ggaaataaac tgtaattacc tgaaataaaa tgtaagagtg caataagtgt 2940
gctttttatt ctaagctgtg aatgggtttt ttaaaaaaag cattccttcc caatgcattt 3000
gcctatgttc catagctgat taaaaccagc tatataaaca tatgcctttt tattcatgtt 3060
aattaccaat ataaatggct aacctttacg tcttatttat cttcatgtta tgttagttta 3120
catacaggga tgtgtgtgtg tgtgtatgct ataaattttc cctccttcgt ttaaaaacgc 3180
gtttgttgga tcctctctgt ttccttaggc catgccacag ctcatagtct cagcttggcc 3240
ttcctgtcac ctgatctgaa ggactatcac agtgacgtag ctcgttcatt ggttgtacac 3300
actctaaccc ttttccttgc tcagcaatta ctgtgtcttc taaaacagga gtgtacaacc 3360
atgagattgc aattaattgt ttgacatatg tccctttgaa ttctatttat tagttatgat 3420
tgattgctct ttggtttgga ccaagaaaaa cgaaatccca cctccccacc ttttcactta 3480
tttcttactt tgaggacaat tctgtaagag agaggaaagg gaactccttc atgtttaac 3540
tgcagcaagt taatggccct ggtttacacc aaacattatg gtgattcaca ttcacattcc 3600
tctcctctct tgctgccaga ggtttgggtt ttgttcagtt ctgctcaagc actgaaaaag 3660
ttttcatgga gtctggagag tgcccagtga aaagatggtt tttaattgtc cacagacctt 3720
tctgttcctg ctttgcaaaa attacaaagg agtaactatt tttaaagctt atttttcaat 3780
tcataaaaaa gacatttatt ttcagtcaga tgatgtctcc ttgtccctta atcctcaatg 3840
tttgcttgaa tctttttttt ttttctgatt ttctcccatc cccacttctt gatacttctt 3900

gagttctctt tcctgctcag gtcctttcat ttgtactttg gagtttttc tcatgtaaat 3960
ttgtacaatg gaaaatattg ttcagtttgg atagaacgca tggagaatta aataaaaaag 4020
atagctgaaa ttcagattga aatttatttg tgtaaagtta tttaaaaact ctgtactata 4080
taaaaggcaa aaaaagttct atgtacttga tgtgaatatg cgaatactgc tataataaag 4140
attgactgca tgga 4154

<210> 22
<211> 781
<212> PRT
<213> 牛
<400> 22

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr

225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300
Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540

Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr
660 665 670
Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met
675 680 685
Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro
690 695 700
Leu Phe Pro Gln Val Gly Lys Thr Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser
705 710 715 720
Glu Val Ile Arg Glu Lys Asp Lys Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu
725 730 735
Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser
740 745 750
Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys
755 760 765
Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly
770 775 780

<210> 23
<211> 7914
<212> DNA
<213> 牛
<400> 23

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctcccccccgc cctcagcctc ccttcccccct ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240

agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaaat tctcgcctct attgagctgc 2340
tggcccgctc attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg 2400
gcttccaaac agaggatttt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccattcagg 2460
caggggggata tggagaattt gcagccttca agtagccaca ccatcatgac agcatctact 2520
cttatttctt aagtcttgtg ttcgtacaat ttgttaacat caaaacacag ttctgttcct 2580

caactctttt taaagttaaa atttttcagt gcataagctg gtgtggaaca gaaggaaatt 2640
tcccatccaa caaaagaggg aagaatgttt taggaaccag aattctctgc tgccagtgtt 2700
tcttcttcaa cacaaatatc acaagtctgc ccactcccag gaagaaagag gagagaccct 2760
gagttctgac cttttgatgg tcaggcatga tggaaagaaa ctgctgctac agcttgggag 2820
atttgctctg ggaagtctgc cagtcaactt tgcccttcta accaccagat caatatgtgg 2880
ctgatcatct gatggggcag ttgcaatcac caagccttgt tctctttcct gttctgggat 2940
tgtgttgtgg aacccttttc cctagccacc accagttcat ttctgaggga tggaacaaaa 3000
atgcagcatg cccttcctgt gtggtgcatg ttcagtcctt gacaaatttt taccaaaatg 3060
aagctacttt atttaaaagg agggtgagag gtgaggaggt cactttgggt gtggcggaaa 3120
gggaatgctg catctttttc ctgggctgct ggggctctgg ccttggcttg ccagccggaa 3180
gcgctggcac gcatcgcctt cttttcccat tgggtccagc aatgaagacg agtgtttggg 3240
gtttttttt tctccaccat gtagcaagtt ctcaggaaaa tacaattgat atcttcctcc 3300
taagctcttc caatcagtca ccaagtactt atgtggttac tttgtccagg gcacaaaatg 3360
cctgtatcta attaaaagcc tacaaaactg cttgataaca gttttgaatg tgagacattt 3420
atgtaattta aatgtaaggt acaagtttta atttctgagt ttcttctatt atatttttat 3480
taaaaaaaga aaataatttt cagattgaat tggagtaaaa taatattact tcccactaga 3540
attatatatc ctggaaaatt gtatttttgt tacataagca gcttttaaag aaagatcatt 3600
acccttttct ctacataaat atatggggag tcttagccta atgacaaata tttataattt 3660
ttaaattaat ggtacttgct ggatccatac taacatcttt actaatacct cattgtttct 3720
tccaacttac tcctacacta catcctacat cttcttccta gtcttttatc tagaatatgc 3780
aacctcaaat aaaaatggtg gtgtcctcat tcattctcct ccttcctttt ttcccaagcc 3840
tgatcttcaa aaggttggtt aatttggcag ctgagttcct ccccaggcag agaatagacc 3900
aattttaggt gtattgggac tgagggagga tgtgtaaaga ttaacatcag taaagaaccg 3960
ctgtggagta attaagaact ttgttcttta taactggaga atataaccta accctaacat 4020
ccctcagcct ttactaaagt gtggcgtaaa tcacagtagt agcaaagaaa gtgactctgg 4080
atgtgttcct ggccagtacc tcccttatca tgaatgtaga ctctctcatc aagatttagg 4140
aatataaatc aaatcaaatg tgcccagcca agctatgtag taagggactt gaacaatatt 4200
aggcagaacc tataaaataa atcagggaat tagaaattat ttaaagtttt caaattgtaa 4260
attgccccgg tgtctttcag cctactgcca ttatttttgc tacaatacct acatttcaga 4320
ggagggccta ctgaaaattc catgcaagtg gaaaataatc ctcaagttat taatgagttt 4380
gaaaagcaat gagttcttaa gtctttgtga gtagagcaag atcctacaaa attcagaaat 4440
agtaaaaatg gattcatgct gatttgaaga gcatctgtgt gcataatata atgctgcatc 4500
tcttttaaaa gcagtctatt tttcttttta aatttgtccc catagatgct tttgaacatg 4560
aacatgctta tgttaccttt tccgaggttg ggaagagcca ggagctctca ggcagggccc 4620
cctccctcag ctgggcagga gctgctcagg aggagctagt tatagaggaa gcttagcgtt 4680
ggcattttca aaattcaagg tgataacgct ttcttcttcc tttctgtttt agaatagatt 4740
gctgtctgat ttgaaaaagg gaaatagatt tgatctcaaa tgaatctgtg cccagaagcc 4800
aggctcaggg tattcagaga tttgtatagt gccctcaaaa aataacaaaa ttttagcttt 4860
ccttttttct tcttttctcc atcaaattct tttttctcta gtttacaaat gacatggaaa 4920

aggaatttcc cctgagtttt gtatgccttt ttttttttgg cttagactat agataggcgt 4980
gttgagctcc taagaaaata caaggaggaa ctctttgttg tgcagagcac tttatgagta 5040
gtttgtgtgg ataatatgtg actgcttccc tgacgagctt gtgaggctgt acttatgtct 5100
ttcctgtaag gcagcttcag tgccttctgt agtgtatata aggaaagatt acgccttctg 5160
aaaaatctca gagcaaccat aagattattt taaaatatgt agtatgactg atggactttt 5220
tcatcattaa attagtctag catctaaact tttaccactg aaataatatt gaccaaaaag 5280
caatttataa aaggtatttg tgaatagaaa atacaatgtg atcatttgta cttatgtgca 5340
ccttaaaaga ggaattctgt ctagctgtca aattctggtt ccttaacatc cagtccttga 5400
ttgtgattga gatctggtag gacgtgctgg ggcacgctag cagataaaat cccgtatact 5460
ttaggataga tgttacattt atgtcagtgt tggcaaagag cattgtgtag taataaagaa 5520
ttcaagactt cagcaatgtc aacctgaaac tttgtaaata tttcctagat tgttatttga 5580
tgcagtcaca gctctttatc acacaatgtt gtctttccct catcaggcaa ttttagaact 5640
gctgcacacc cctcctcaga tctcacctgc ccctcctgta cattcacctc tccagccttg 5700
tgcacacctc atttagcttt agtttgaaac acattgcagg gttcaggtga cctcttcaaa 5760
aactacctcc tcagaatgag gtaatgaata gttatttatt ttaaaatatg aaaagtcagg 5820
agctctagaa tatgaagatg atctaagatt ttaactttta tgtatacttg ttgagcactc 5880
tccttttgtc ctaaagggca ttatacattt aagcagtaat actgaaaaat gtagctcaga 5940
gtaactgaat gttgttgaaa gtggtgccag aatctgtttt aggggtacgt atcagaatct 6000
taatcttaaa tcggttacat gaaattaaat agttaatggt aacacttgac taacagatat 6060
aattttaatt ttcggtaggc ttttagcaag acagtaagta catcttcata atgagttagc 6120
cacagcttca tcacatgcac agattttcct gttgagagac tgcccagtta agagggtaga 6180
atgatgaacc atttttcagg attctcttct ttgtccaaac tggcattgtg agtgctagaa 6240
tatcagcact ttcaaactag tgattccaac tattaggcta ttaaaaagca aaacaaacca 6300
aacaaaccat agccagacat gggaagttta ctatgagtat aaacagcaaa tagcttacag 6360
gtcatacatt gaaatggtgt aggtaaggcg ttagaaaaat accttgacaa tttgccaaat 6420
gatcttactg tgccttcatg atgcaataaa aaaaaaaaaa atttagcata aatcagtgat 6480
ttgtgaagag agcagccacc ctggtctaac tcagctgtgt taatattttt tagcgtgcaa 6540
tttagactgc aaagataaat gcactaaaga gtttatagcc aaaatcacat ttaaaaaatg 6600
agagaaaaca caggtaaatt ttcagtgaac aaaattattt ttttaaagta cataatccct 6660
agtatagtca gatatattta tcacatagag caaataggtt gaaatcacaa ttcagtgaca 6720
tttctagaga aacttttttct actcccatag gttcttcaaa gcatggaact tttatataac 6780
agaaatgtgt gacggtcatt ttaaattgct gtagtttggg gctgaagtac tgtgtgctgg 6840
gcagcaatca catgtattaa ctagtgagaa aggagaaatt aagatatagg acagaatttg 6900
attttcttgt tcccagatta ctgctgccaa cctagacact gagtttccag aggctgaaac 6960
gtaaacttgc agctcagcaa ctgttttgca aagttagtgg gactgtcctg cttatgctgt 7020
tcaaaaatgc tctgagggcc aggtggggcc tccaggggct cctctctgag gggacatcag 7080
actagctaac gacctggcgg gcggatgtga accggacaca ctccatggtg tgcttcttgt 7140
atcggtccct cgccaccctc aagaaaggct tcagcgggtt ctctagacgt ctccactaag 7200
gtgtgttact aacagccatg ggttgttgag cacccgagga gtgcaatagc atctctgcat 7260

gattgtatat tggcccgaag agaatgaagt ggccagtgta ctcatgttcc atgttgctag 7320
ctctggtaaa ctgaaaatac tggtaagatt tttgttttat cagtacacta gagagtaagc 7380
tttgttttgt tgtttttaga taatgttttc acttccattt ggaaagacat ttaaattgag 7440
tttcagtcct aaattttgcc agtcatggta attagcagtt tctatcaggt atttttaagg 7500
tagaagagga tagaaacata agttctaaaa gcttaaggta accgtggttt attttaaaat 7560
gtttaggggt ggttagtctc tacctcaaaa aaagtgagtg aatcttttat ttcagcattc 7620
acaagttcgg ctgttgtttt tgtaatacat ttttttttta acctttgac ccccctttac 7680
ctaagtgtca atgtagtttt attaattact aagtcagttt cattaaaatg tttatttagc 7740
agttttgact aattgcaatg attaatatag ccagttgtgc atgaggacac agccagtgag 7800
tatatctggg tttttttgt gatgcttttt ttcttaagac ttctgtagat ttatgaagta 7860
ctcattgaaa acaactaaaa tacgtttatt cgtgttaata tggaaaaaaa aaaa 7914

<210> 24
<211> 766
<212> PRT
<213> 牛
<400> 24

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu

180 185 190

Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly

195 200 205

Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu

210 215 220

Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr

225 230 235 240

Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln

245 250 255

Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser

260 265 270

Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu

275 280 285

Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala

290 295 300

Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro

305 310 315 320

Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser

325 330 335

Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His

340 345 350

Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val

355 360 365

His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp

370 375 380

Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr

385 390 395 400

Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln

405 410 415

Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu

420 425 430

Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp

435 440 445

Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser

450 455 460

Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala

465 470 475 480

Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala

485 490 495

Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr
660 665 670
Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met
675 680 685
Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro
690 695 700
Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu
705 710 715 720
Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly
725 730 735
Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr
740 745 750
Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Glu Phe Ala Ala Phe Lys
755 760 765

<210> 25
<211> 4670
<212> DNA
<213> 牛
<400> 25

ggtgtgtcat agtgcagcag attgaatgca gaagatatga aaattcagat gtcttctgtt 60
aaggtgtgga atatcaaaca aatgattaag ttgacacagg agcatataga ggccctattg 120
gacaaatttg gtggggagca taatccacca tcaatatatc tggaggccta tgaagaatac 180
accagcaagc tagatgccct ccaacaaaga gaacaacagt tattggaatc cctggggaat 240
ggaactgatt tttctgtttc tagctctgca tcaacggaca ccgttacatc ttcttcctct 300
tctagccttt cagtgctgcc ttcatctctt tcagtttttc aaaatcccac agatgtgtca 360
cggagcaacc ccaagtcacc acaaaaacct atcgttagag tcttcctgcc caataaacag 420
aggacagtgg tacctgcacg gtgtggagtc acagtccggg acagcctgaa gaaggcactg 480
atgatgagag gtctaatccc agagtgctgt gctgtttaca gaattcagga tggggagaag 540
aaaccaattg gctgggacac tgatatttcc tggcttactg gagaggagtt gcatgtagaa 600
gtgttggaga atgttccact tacaacacac aactttgtac ggaaaacttt tttcacctta 660
gcattttgtg acttctgtag aaagctgctt ttccagggat tccgctgtca aacatgtggt 720
tataaatttc accagcgttg tagtacagag gttccactga tgtgtgttaa ttatgaccaa 780
ctagatttgc tgtttgtctc caagttcttt gaacaccacc caataccaca ggaggaggcc 840
tccttagcag agactaccct tccatgtggc tcatcccctt ctgcaccccc ctccgattct 900
attgggcccc caattctcac cagtccatct ccttcaaaat ccattccaat tccacagcct 960
ttccgaccag cagatgaaga tcatcgaaat cagtttggac aacgagaccg gtcctcatca 1020
gctccaaatg tgcatataaa cacaatagaa cccgtcaata ttgatgactt gattagagac 1080
caagggtttc gtagtgatgg aggatcaacc acaggtttat ccgccacacc ccctgcctca 1140
ttacctggct cactctctaa tgtgaaagca ttgcagaaat ctccaggacc tcagcgagaa 1200
agaaagtcct cttcatcctc agaagacagg aatcgaatga aaacgcttgg tagacgggat 1260
tcaagtgacg attgggagat tcctgatgga cagatcacag tgggacaaag aattggatca 1320
gggtcatttg ggacagtcta caagggaaag tggcatggtg atgtggcagt gaaaatgttg 1380
aatgtgacag cacccacacc tcagcagtta caggccttca aaaatgaagt aggagtactc 1440
aggaaaacgc gacatgtgaa tatcctcctc ttcatgggtt attcaacaaa gccacaactg 1500
gctattgtta cccagtggtg tgagggctcc agtttatatc atcatctcca catcattgag 1560
accaaattcg agatgatcaa acttatagat attgcacggc agactgcaca gggcatggat 1620
tacttacacg ccaagtcaat catccacaga gacctcaaga gtaataatat ttttcttcat 1680
gaagacctca cagtaaaaat aggtgatttt ggtctagcca cagtgaaatc tcgatggagt 1740
gggtcccatc agtttgaaca gttgtctgga tccattttgt ggatggcacc agaagtaatc 1800
agaatgcaag ataaaaaccc atatagcttt cagtcagatg tatatgcatt tgggattgtt 1860
ctgtatgaat tgatgaccgg acagttacct tattcaaata tcaacaacag ggaccagata 1920
atttttatgg tgggacgagg atatctgtct ccagatctca gtaaggtacg gagtaactgt 1980
ccaaaagcca tgaagagatt aatggcagag tgcctaaaaa agaaaagaga tgaaagacca 2040
ctctttcccc aagtaggaaa gactctccta agcaagagac aaaattcaga agttatcagg 2100
gaaaaagata agcagattct cgcctctatt gagctgctgg cccgctcatt gccaaaaatt 2160
caccgcagtg catcagaacc ctccttgaat cgggctggct tccaaacaga ggattttagt 2220
ctatatgctt gtgcttctcc aaaaacaccc attcaggcag ggggatatga agcagatttg 2280
gctcttacat caaataaaaa tagagtagaa gttgggattt agagatttcc tgacatgcaa 2340

gaaggaataa gcaagaaaaa aaggtttgtt ttccccaaat catatctatt gtcttttact 2400
tctatttttt cttaaatttt ttgtgatttc agagacatgt agagttttat tgatacctaa 2460
actatgagtt ctttttttt ttttttttc attattttga ttttttggc caagaggcat 2520
atgggatctt agcttgagaa agcaacaatt ttcttgatgt cattttgggt gagggcacat 2580
attgctgtga acagtgtggt gatagccacc agggaccaaa ctcacacccg ctgcattgaa 2640
aggtgaagtc ttaaacactg gaccagcaga gaaattccta ctctatgagt tctttttgtc 2700
atcccctccc cgcaccctcc acccccaacc taaagtctga tgatgaaatc aacaactatt 2760
ccattagaag cagtagattc tggtagcatg atctttagtt tgttagtaag attttgtgct 2820
ttgtggggtt gtgtcgtttt aaggctaata tttaagtttg tcaaatagaa tgctgttcag 2880
attgtaaaaa tgagtaataa acatctgaag tttttttaa gttattttta acatggtata 2940
tacagttgag cttagagttt atcattttct gatattctct tacttagtag atgaattcta 3000
gccatttttt ataaagattt ctgttaagca aatcctgttt tcacatgggc ttcctttaag 3060
ggattttaga ttctgctgga tatggtgact gctcataaga ctgttgaaaa ttacttttaa 3120
gatgtattag aatacttctg aaaaaaaata gcaaccttaa aaccataagc aaaagtagta 3180
agggtgttta tacatttcta gagtccctgt ttaggtaata gcctcctatg attgtacttt 3240
aaatgttttg ctctccaagg ttttagtaac ttggcttttt ttctaatcag tgccaaactc 3300
ccccagtttt tttaacttta aatatgaggt aataaatctt ttacccttcc ttgatctttt 3360
gacttataat accttggtca gttgtttctt aaaaggaatc cttaaatgga aagagacaat 3420
atcactgtct gcagttctga ttagtagttt tattcagaat ggaaaaacag attattcatt 3480
tttgaaaatt gttcaggggt atgttcattg ttaggacctt ggactttgga gtcagtgcct 3540
agctatgcat tccaggtctg ccattttctg gctgtgaaat tttggacaag ttacttaacc 3600
actttaaacc ccagctttaa gaagtaaatt aaccccagta aattaagaag taatagcagc 3660
cacttcgtag agttgttatg aggctcagat gcagtgcaaa tgtgtataaa gtattcaggg 3720
agtcacctgg tatactataa tagacactag aatagttgcc aatattatca gcatacaatc 3780
tgaggattct gtcagccaat cattagcaat ctgttgtttg ttgggacatg ccagtgttct 3840
ccagttgaaa tcagtagcaa tctaaaaatg gatagattat tcctcattta aatagtgtgt 3900
tcatataagt gattgcttgg atccttatca gaagttgctg ttactgaaaa atgataaggc 3960
tgactaaatt gtgatagttg tcagttacta accaactccc agaaatgaat aagaggaacc 4020
tatctctagt tcctagtaga aggtatggac aaaatagtag gtgaaaaata atgtcttgaa 4080
cccccaaatt aagtaagctt taaagagtac aatacctcaa agggtctttg cggtttaaaa 4140
tttgtatgct gagaatgatg ttcattgaca tgtgcctata tgtaattttt tgatagttta 4200
aaaggtgaaa tgaactacag atgggagagg tctgaatttt cttgccttca gtcaaatgtg 4260
taatgtggac atattatttg acctgtgaat tttatctttt aaaaaagatt aattcctgct 4320
tcttccttcc taatagttgc attataataa tgaaaatgag ttgataattt ggggggaaag 4380
tattctacaa atcaacctta ttattttacc attggtttct gagaaatttt gttcatttga 4440
accgtttata gcttgattag aatcatagca tgtaaaaccc aactgaggga ttatctgcag 4500
acttaatgta gtattatgta agttgtcttc tttcatttcg acctttttttg cttttgttgt 4560
tgctagatct gtagtatgta gctagtcacc tttcagcgag gtttcagcga ggcttttctg 4620
tgtctctagg ttatttgaga taacttttt aaaattagct cttgtcctcc 4670

<210> 26
<211> 761
<212> PRT
<213> 牛
<400> 26

Met Lys Ile Gln Met Ser Ser Val Lys Val Trp Asn Ile Lys Gln Met
1 5 10 15
Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu Asp Lys Phe Gly
20 25 30
Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr Glu Glu Tyr
35 40 45
Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln Leu Leu Glu
50 55 60
Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser Ser Ala Ser Thr
65 70 75 80
Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Val Leu Pro Ser
85 90 95
Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser Arg Ser Asn Pro
100 105 110
Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu Pro Asn Lys Gln
115 120 125
Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg Asp Ser Leu
130 135 140
Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala Val
145 150 155 160
Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr Asp
165 170 175
Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu Asn
180 185 190
Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe Phe Thr Leu
195 200 205
Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly Phe Arg Cys
210 215 220
Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr Glu Val Pro
225 230 235 240
Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe Val Ser Lys
245 250 255
Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala Ser Leu Ala Glu
260 265 270

Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ser Asp Ser
275 280 285
Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile Pro
290 295 300
Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln Phe
305 310 315 320
Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn Thr
325 330 335
Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg
340 345 350
Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser
355 360 365
Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly
370 375 380
Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg
385 390 395 400
Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro
405 410 415
Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly
420 425 430
Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu
435 440 445
Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu
450 455 460
Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met
465 470 475 480
Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu
485 490 495
Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu
500 505 510
Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp
515 520 525
Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn
530 535 540
Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu
545 550 555 560
Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu
565 570 575
Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp

580 585 590

Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val

595 600 605

Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn

610 615 620

Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp

625 630 635 640

Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met

645 650 655

Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln

660 665 670

Val Gly Lys Thr Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser Glu Val Ile Arg

675 680 685

Glu Lys Asp Lys Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser

690 695 700

Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala

705 710 715 720

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys

725 730 735

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Glu Ala Asp Leu Ala Leu Thr Ser

740 745 750

Asn Lys Asn Arg Val Glu Val Gly Ile

755 760

<210> 27

<211> 4816

<212> DNA

<213> 牛

<400> 27

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60

cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120

ctcccccccgc cctcagcctc ccttcccccct ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180

ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240

agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300

cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360

cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420

tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480

aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540

cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600

tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660

ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag agcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1080
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1140
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1200
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1260
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1320
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1380
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1440
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1500
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1560
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1620
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1680
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1740
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1800
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1860
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 1920
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 1980
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2040
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2100
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2160
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaagt aggaaagact ctcctaagca 2220
agagacaaaa ttcagaagtt atcagggaaa aagataagca gattctcgcc tctattgagc 2280
tgctggcccg ctcattgcca aaaattcacc gcagtgcatc agaaccctcc ttgaatcggg 2340
ctggcttcca aacagaggat tttagtctat atgcttgtgc ttctccaaaa acacccattc 2400
aggcaggggg atatgaagca gatttggctc ttacatcaaa taaaaataga gtagaagttg 2460
ggatttagag atttcctgac atgcaagaag gaataagcaa gaaaaaaagg tttgttttcc 2520
ccaaatcata tctattgtct tttacttcta ttttttctta aatttttgt gatttcagag 2580
acatgtagag ttttattgat acctaaacta tgagttcttt ttttttttt tttttcatta 2640
ttttgatttt tttggccaag aggcatatgg gatcttagct tgagaaagca acaattttct 2700
tgatgtcatt ttgggtgagg gcacatattg ctgtgaacag tgtggtgata gccaccaggg 2760
accaaactca cacccgctgc attgaaaggt gaagtcttaa acactggacc agcagagaaa 2820
ttcctactct atgagttctt tttgtcatcc cctccccgca ccctccaccc ccaacctaaa 2880
gtctgatgat gaaatcaaca actattccat tagaagcagt agattctggt agcatgatct 2940
ttagtttgtt agtaagattt tgtgctttgt ggggttgtgt cgttttaagg ctaatattta 3000

agtttgtcaa atagaatgct gttcagattg taaaaatgag taataaacat ctgaagtttt 3060
ttttaagtta tttttaacat ggtatataca gttgagctta gagtttatca ttttctgata 3120
ttctcttact tagtagatga attctagcca ttttttataa agatttctgt taagcaaatc 3180
ctgttttcac atgggcttcc tttaagggat tttagattct gctggatatg gtgactgctc 3240
ataagactgt tgaaaattac ttttaagatg tattagaata cttctgaaaa aaaatagcaa 3300
ccttaaaacc ataagcaaaa gtagtaaggg tgtttataca tttctagagt ccctgtttag 3360
gtaatagcct cctatgattg tactttaaat gttttgctct ccaaggtttt agtaacttgg 3420
ctttttttct aatcagtgcc aaactccccc agtttttta actttaaata tgaggtaata 3480
aatcttttac ccttccttga tcttttgact tataatacct tggtcagttg tttcttaaaa 3540
ggaatcctta aatggaaaga gacaatatca ctgtctgcag ttctgattag tagttttatt 3600
cagaatggaa aaacagatta ttcatttttg aaaattgttc aggggtatgt tcattgttag 3660
gaccttggac tttggagtca gtgcctagct atgcattcca ggtctgccat tttctggctg 3720
tgaaattttg gacaagttac ttaaccactt taaaccccag ctttaagaag taaattaacc 3780
ccagtaaatt aagaagtaat agcagccact tcgtagagtt gttatgaggc tcagatgcag 3840
tgcaaatgtg tataaagtat tcagggagtc acctggtata ctataataga cactagaata 3900
gttgccaata ttatcagcat acaatctgag gattctgtca gccaatcatt agcaatctgt 3960
tgtttgttgg gacatgccag tgttctccag ttgaaatcag tagcaatcta aaaatggata 4020
gattattcct catttaaata gtgtgttcat ataagtgatt gcttggatcc ttatcagaag 4080
ttgctgttac tgaaaaatga taaggctgac taaattgtga tagttgtcag ttactaacca 4140
actcccagaa atgaataaga ggaacctatc tctagttcct agtagaaggt atggacaaaa 4200
tagtaggtga aaaataatgt cttgaacccc caaattaagt aagctttaaa gagtacaata 4260
cctcaaaggg tctttgcggt ttaaaatttg tatgctgaga atgatgttca ttgacatgtg 4320
cctatatgta atttttgat agtttaaaag gtgaaatgaa ctacagatgg gagaggtctg 4380
aattttcttg ccttcagtca aatgtgtaat gtggacatat tatttgacct gtgaatttta 4440
tcttttaaaa aagattaatt cctgcttctt ccttcctaat agttgcatta taataatgaa 4500
aatgagttga taatttgggg ggaaagtatt ctacaaatca accttattat tttaccattg 4560
gtttctgaga aattttgttc atttgaaccg tttatagctt gattagaatc atagcatgta 4620
aaacccaact gagggattat ctgcagactt aatgtagtat tatgtaagtt gtcttctttc 4680
atttcgacct tttttgcttt tgttgttgct agatctgtag tatgtagcta gtcacctttc 4740
agcgaggttt cagcgaggct tttctgtgtc tctaggttat ttgagataac ttttttaaaa 4800
ttagctcttg tcctcc 4816

<210> 28
<211> 757
<212> PRT
<213> 牛
<400> 28

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala

20 25 30

Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45

Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60

Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80

Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95

Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125

Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140

Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160

Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190

Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205

Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220

Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240

Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255

Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270

Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Glu Pro Pro
275 280 285

Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro
290 295 300

Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp
305 310 315 320

Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val
325 330 335

Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly
340 345 350
Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser
355 360 365
Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu
370 375 380
Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu
385 390 395 400
Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile
405 410 415
Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys
420 425 430
Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala
435 440 445
Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu
450 455 460
Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr
465 470 475 480
Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu
485 490 495
Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu
500 505 510
Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala
515 520 525
Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His
530 535 540
Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys
545 550 555 560
Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile
565 570 575
Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr
580 585 590
Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu
595 600 605
Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile
610 615 620
Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val
625 630 635 640
Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu

645 650 655
Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Val Gly Lys Thr
660 665 670
Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser Glu Val Ile Arg Glu Lys Asp Lys
675 680 685
Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile
690 695 700
His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr
705 710 715 720
Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln
725 730 735
Ala Gly Gly Tyr Glu Ala Asp Leu Ala Leu Thr Ser Asn Lys Asn Arg
740 745 750
Val Glu Val Gly Ile
755

<210> 29
<211> 2499
<212> DNA
<213> 牛
<400> 29

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctccccccgc cctcagcctc ccttcccccc ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140

ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaagt aggaaagact ctcctaagca 2340
agagacaaaa ttcagaagtt atcagggaaa aagataagca ggaaaagtat gtttctttag 2400
tacattccag gcatttggga ttacagtaaa aacaatattc tcgcctctat tgagctgctg 2460
gcccgctcat tgccaaaaat tcaccgcagt gcatcagaa 2499

<210> 30
<211> 744
<212> PRT
<213> 牛
<400> 30

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln

85 90 95

Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125

Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140

Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160

Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190

Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205

Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220

Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240

Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255

Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270

Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285

Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300

Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320

Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335

Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350

Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365

His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380

Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400

Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr
660 665 670
Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met
675 680 685
Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro
690 695 700
Leu Phe Pro Gln Val Gly Lys Thr Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser

705 710 715 720

Glu Val Ile Arg Glu Lys Asp Lys Gln Glu Lys Tyr Val Ser Leu Val

725 730 735

His Ser Arg His Leu Gly Leu Gln

740

<210> 31

<211> 2404

<212> DNA

<213> 牛

<400> 31

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctccccccgc cctcagcctc ccttcccccc ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccc gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740

tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac cagataattt ttatggtggg acgaggatat ctgtctccag 2220
atctcagtaa ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc 2280
taaaaaagaa aagagatgaa agaccactct ttccccaaga tctctcttcc caccatagac 2340
acaaaaattt cagatggcta caggtttaca tgtaaaaaac agaattataa caaatgattt 2400
ttat 2404

<210> 32
<211> 726
<212> PRT
<213> 牛
<400> 32

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175

Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300
Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala

485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr
660 665 670
Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met
675 680 685
Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro
690 695 700
Leu Phe Pro Gln Asp Leu Ser Ser His His Arg His Lys Asn Phe Arg
705 710 715 720
Trp Leu Gln Val Tyr Met
725

<210> 33
<211> 2331
<212> DNA
<213> 牛
<400> 33
ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc cccccgtcct ccgcctccgc 120
ctcccccccgc cctcagcctc ccttcccccct ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180

ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccc gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440
agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac caggtgcttt gtcctccatg ggagtgtaat aaatgctgtg 2220
caagggctta cttcccatga gagaagtgag tgaccaacag aaggataatt tttatggtgg 2280
gacgaggata tctgtctcca gatctcagta aggtacggag taactgtcca a 2331

<210> 34
<211> 681
<212> PRT

<213> 牛

<400> 34

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala

290 295 300

Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320

Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335

Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350

Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365

His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380

Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400

Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415

Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430

Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445

Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460

Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480

Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495

Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510

Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525

Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540

Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560

Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575

Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590

Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605

Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Val Leu Cys Pro Pro Trp Glu Cys Asn
660 665 670
Lys Cys Cys Ala Arg Ala Tyr Phe Pro
675 680

<210> 35
<211> 2319
<212> DNA
<213> 牛
<400> 35

ctcagctgcg ccgggtctca caagacggtt cccgaggtgg cccaggcgcc gtcccaccgc 60
cgacgccgcc cgggccgccc gggccgtccc tccccgctgc ccccccgtcct ccgcctccgc 120
ctcccccccgc cctcagcctc ccttcccccct ccccgcccag cagcggtcgc tcgggcccgg 180
ctctcggtta taagatggcg gcgctgagtg gcggcggcgg cggcggcggc ggtggcgcgg 240
agcagggcca ggctctgttc aacggggaca tggagcccga ggccggcgcc gcggcctctt 300
cggctgcgga ccccgccatt cccgaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagttga 360
cacaggagca tatagaggcc ctattggaca aatttggtgg ggagcataat ccaccatcaa 420
tatatctgga ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgccctccaa caaagagaac 480
aacagttatt ggaatccctg gggaatggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa 540
cggacaccgt tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctgccttca tctctttcag 600
tttttcaaaa tcccacagat gtgtcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg 660
ttagagtctt cctgcccaat aaacagagga cagtggtacc tgcacggtgt ggagtcacag 720
tccgggacag cctgaagaag gcactgatga tgagaggtct aatcccagag tgctgtgctg 780
tttacagaat tcaggatggg gagaagaaac caattggctg ggacactgat atttcctggc 840
ttactggaga ggagttgcat gtagaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact 900
ttgtacggaa aacttttttc accttagcat tttgtgactt ctgtagaaag ctgcttttcc 960
agggattccg ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaggttc 1020
cactgatgtg tgttaattat gaccaactag atttgctgtt tgtctccaag ttctttgaac 1080
accacccaat accacaggag gaggcctcct tagcagagac tacccttcca tgtggctcat 1140
ccccttctgc acccccctcc gattctattg ggcccccaat tctcaccagt ccatctcctt 1200
caaaatccat tccaattcca cagcctttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcagt 1260
ttggacaacg agaccggtcc tcatcagctc caaatgtgca tataaacaca atagaacccg 1320
tcaatattga tgacttgatt agagaccaag ggtttcgtag tgatggagga tcaaccacag 1380
gtttatccgc cacacccccct gcctcattac ctggctcact ctctaatgtg aaagcattgc 1440

agaaatctcc aggacctcag cgagaaagaa agtcctcttc atcctcagaa gacaggaatc 1500
gaatgaaaac gcttggtaga cgggattcaa gtgacgattg ggagattcct gatggacaga 1560
tcacagtggg acaaagaatt ggatcagggt catttgggac agtctacaag ggaaagtggc 1620
atggtgatgt ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc cacacctcag cagttacagg 1680
ccttcaaaaa tgaagtagga gtactcagga aaacgcgaca tgtgaatatc ctcctcttca 1740
tgggttattc aacaaagcca caactggcta ttgttaccca gtggtgtgag ggctccagtt 1800
tatatcatca tctccacatc attgagacca aattcgagat gatcaaactt atagatattg 1860
cacggcagac tgcacagggc atggattact tacacgccaa gtcaatcatc cacagagacc 1920
tcaagagtaa taatattttt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttggtc 1980
tagccacagt gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca 2040
ttttgtggat ggcaccagaa gtaatcagaa tgcaagataa aaacccatat agctttcagt 2100
cagatgtata tgcatttggg attgttctgt atgaattgat gaccggacag ttaccttatt 2160
caaatatcaa caacagggac caggtgcttt gtcctccatg ggagtgtaat aaatgctgtg 2220
caagggctta cttcccatga gagaagtgag tgaccaacag aaggtctgtg caaggaaaag 2280
agacaaagcc acggatcaga agcacatggc cataactga 2319

<210> 36
<211> 681
<212> PRT
<213> 牛
<400> 36

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu

145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270
Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300
Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460

Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly
580 585 590
Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
595 600 605
Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile
610 615 620
Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala
625 630 635 640
Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser
645 650 655
Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Val Leu Cys Pro Pro Trp Glu Cys Asn
660 665 670
Lys Cys Cys Ala Arg Ala Tyr Phe Pro
675 680

<210> 37
<211> 2661
<212> DNA
<213> 牛
<400> 37
tcagctgcgc cgggtctcac aagacggttc ccgaggtggc ccaggcgccg tcccaccgcc 60
gacgccgccc gggccgcccg ggccgtccct ccccgctgcc ccccgtcctc cgcctccgcc 120
tccccccgcc ctcagcctcc cttccccctc cccgcccagc agcggtcgct cgggcccggc 180
tctcggttat aagatggcgg cgctgagtgg cggcggcggc ggcggcggcg gtggcgcgga 240
gcagggccag gctctgttca acggggacat ggagcccgag gccggcgccg cggcctcttc 300
ggctgcggac cccgccattc ccgaggaggt gtggaatatc aaacaaatga ttaagttgac 360

acaggagcat atagaggccc tattggacaa atttggtggg gagcataatc caccatcaat 420
atatctggag gcctatgaag aatacaccag caagctagat gccctccaac aaagagaaca 480
acagttattg gaatccctgg ggaatggaac tgatttttct gtttctagct ctgcatcaac 540
ggacaccgtt acatcttctt cctcttctag cctttcagtg ctgccttcat ctctttcagt 600
ttttcaaaat cccacagatg tgtcacggag caaccccaag tcaccacaaa aacctatcgt 660
tagagtcttc ctgcccaata aacagaggac agtggtacct gcacggtgtg gagtcacagt 720
ccgggacagc ctgaagaagg cactgatgat gagaggtcta atcccagagt gctgtgctgt 780
ttacagaatt caggatgggg agaagaaacc aattggctgg gacactgata tttcctggct 840
tactggagag gagttgcatg tagaagtgtt ggagaatgtt ccacttacaa cacacaactt 900
tgtacggaaa actttttca ccttagcatt ttgtgacttc tgtagaaagc tgcttttcca 960
gggattccgc tgtcaaacat gtggttataa atttcaccag cgttgtagta cagaggttcc 1020
actgatgtgt gttaattatg accaactaga tttgctgttt gtctccaagt tctttgaaca 1080
ccacccaata ccacaggagg aggcctcctt agcagagact acccttccat gtggctcatc 1140
cccttctgca ccccctccg attctattgg gcccccaatt ctcaccagtc catctccttc 1200
aaaatccatt ccaattccac agcctttccg accagcagat gaagatcatc gaaatcagtt 1260
tggacaacga gaccggtcct catcagctcc aaatgtgcat ataaacacaa tagaacccgt 1320
caatattgat gacttgatta gagaccaagg gtttcgtagt gatggaggat caaccacagg 1380
tttatccgcc acacccccctg cctcattacc tggctcactc tctaatgtga aagcattgca 1440
gaaatctcca ggacctcagc gagaaagaaa gtcctcttca tcctcagaag acaggaatcg 1500
aatgaaaacg cttggtagac gggattcaag tgacgattgg gagattcctg atggacagat 1560
cacagtggga caaagaattg gatcagggtc atttgggaca gtctacaagg gaaagtggca 1620
tggtgatgtg gcagtgaaaa tgttgaatgt gacagcaccc acacctcagc agttacaggc 1680
cttcaaaaat gaagtaggag tactcaggaa aacgcgacat gtgaatatcc tcctcttcat 1740
gggttattca acaaagccac aactggctat tgttacccag tggtgtgagg gctccagttt 1800
atatcatcat ctccacatca ttgagaccaa attcgagatg atcaaactta tagatattgc 1860
acggcagact gcacagggca tggattactt acacgccaag tcaatcatcc acagagacct 1920
caagagtaat aatatttttc ttcatgaaga cctcacagta aaaataggtg attttggtct 1980
agccacagtg aaatctcgat ggagtgggtc ccatcagttt gaacagttgt ctggatccat 2040
tttgtggatg gcaccagaag taatcagaat gcaagataaa aacccatata gctttcagtc 2100
agatgtatat gcatttggga ttgttctgta tgaattgatg accggacagt taccttattc 2160
aaatatcaac aacagggacc agtctgtgca aggaaaagag acaaagccac ggatcagaag 2220
cacatggcca taactgaaga ttttgtgaac tctcacaagg aaaaaatttg ctctttgaac 2280
aataagaagg aactcactaa aatgtaactg agaactgttc aacaggttga aagctgaaag 2340
atgccattgg aactgacaaa atgtttctta aacataaatg atgaaacagt gaaactacat 2400
aatatctcct ctggctgaaa cattcaagaa gtttaaaatg cttaagttaa aaataaaatc 2460
ctagtaaaca atggacttac tgtgcaacat agagaatatc ttacgataac ctgtaatgga 2520
aaagaatctg aaaaagaatg tatataactg aatcactttg ctgtaaacta gaatctgaca 2580
caacactgta aatcactaca cttttctgtt gcatgccaaa gattatttaa taacgtcatt 2640
aaaaaattat tttaataatt a 2661

<210> 38
<211> 679
<212> PRT
<213> 牛
<400> 38

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu
1 5 10 15
Gln Gly Gln Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala
20 25 30
Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn
35 40 45
Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu
50 55 60
Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala
65 70 75 80
Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln
85 90 95
Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser
100 105 110
Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser
115 120 125
Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser
130 135 140
Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu
145 150 155 160
Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val
165 170 175
Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu
180 185 190
Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly
195 200 205
Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu
210 215 220
Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr
225 230 235 240
Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln
245 250 255
Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser
260 265 270

Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu
275 280 285
Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala
290 295 300
Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro
305 310 315 320
Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser
325 330 335
Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His
340 345 350
Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val
355 360 365
His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp
370 375 380
Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr
385 390 395 400
Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln
405 410 415
Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu
420 425 430
Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp
435 440 445
Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser
450 455 460
Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala
465 470 475 480
Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala
485 490 495
Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile
500 505 510
Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr
515 520 525
Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu
530 535 540
Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala
545 550 555 560
Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu
565 570 575
Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly

580 585 590

Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln

595 600 605

Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile

610 615 620

Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala

625 630 635 640

Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser

645 650 655

Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ser Val Gln Gly Lys Glu Thr Lys Pro

660 665 670

Arg Ile Arg Ser Thr Trp Pro

675

<210> 39

<211> 7434

<212> DNA

<213> 牛

<400> 39

acaccgttac atcttcttcc tcttctagcc tttcagtgct gccttcatct ctttcagttt 60

ttcaaaatcc cacagatgtg tcacggagca accccaagtc accacaaaaa cctatcgtta 120

gagtcttcct gcccaataaa cagaggacag tggtacctgc acggtgtgga gtcacagtcc 180

gggacagcct gaagaaggca ctgatgatga gaggtctaat cccagagtgc tgtgctgttt 240

acagaattca ggatggggag aagaaaccaa ttggctggga cactgatatt tcctggctta 300

ctggagagga gttgcatgta gaagtgttgg agaatgttcc acttacaaca cacaactttg 360

tacggaaaac ttttttcacc ttagcatttt gtgacttctg tagaaagctg cttttccagg 420

gattccgctg tcaaacatgt ggttataaat ttcaccagcg ttgtagtaca gaggttccac 480

tgatgtgtgt taattatgac caactagatt tgctgtttgt ctccaagttc tttgaacacc 540

acccaatacc acaggaggag gcctccttag cagagactac ccttccatgt ggctcatccc 600

cttctgcacc cccctccgat tctattgggc ccccaattct caccagtcca tctccttcaa 660

aatccattcc aattccacag cctttccgac cagcagatga agatcatcga aatcagtttg 720

gacaacgaga ccggtcctca tcagctccaa atgtgcatat aaacacaata gaacccgtca 780

atattgatga cttgattaga gaccaagggt ttcgtagtga tggaggatca accacaggtt 840

tatccgccac acccccctgcc tcattacctg gctcactctc taatgtgaaa gcattgcaga 900

aatctccagg acctcagcga gaaagaaagt cctcttcatc ctcagaagac aggaatcgaa 960

tgaaaacgct tggtagacgg gattcaagtg acgattggga gattcctgat ggacagatca 1020

cagtgggaca aagaattgga tcagggtcat ttgggacagt ctacaaggga aagtggcatg 1080

gtgatgtggc agtgaaaatg ttgaatgtga cagcacccac acctcagcag ttacaggcct 1140

tcaaaaatga agtaggagta ctcaggaaaa cgcgacatgt gaatatcctc ctcttcatgg 1200

gttattcaac aaagccacaa ctggctattg ttacccagtg gtgtgagggc tccagtttat 1260

atcatcatct ccacatcatt gagaccaaat tcgagatgat caaacttata gatattgcac 1320
ggcagactgc acagggcatg gattacttac acgccaagtc aatcatccac agagacctca 1380
agagtaataa tatttttctt catgaagacc tcacagtaaa aataggtgat tttggtctag 1440
ccacagtgaa atctcgatgg agtgggtccc atcagtttga acagttgtct ggatccattt 1500
tgtggatggc accagaagta atcagaatgc aagataaaaa cccatatagc tttcagtcag 1560
atgtatatgc atttgggatt gttctgtatg aattgatgac cggacagtta ccttattcaa 1620
atatcaacaa cagggaccag ataattttta tggtgggacg aggatatctg tctccagatc 1680
tcagtaaggt acggagtaac tgtccaaaag ccatgaagag attaatggca gagtgcctaa 1740
aaaagaaaag agatgaaaga ccactctttc cccaagtagg aaagactctc ctaagcaaga 1800
gacaaaattc agaagttatc agggaaaaag ataagcagat tctcgcctct attgagctgc 1860
tggcccgctc attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga accctccttg aatcgggctg 1920
gcttccaaac agaggatttt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccattcagg 1980
caggggata tggagaattt gcagccttca agtagccaca ccatcatgac agcatctact 2040
cttatttctt aagtcttgtg ttcgtacaat ttgttaacat caaaacacag ttctgttcct 2100
caactctttt taaagttaaa atttttcagt gcataagctg gtgtggaaca gaaggaaatt 2160
tcccatccaa caaaagaggg aagaatgttt taggaaccag aattctctgc tgccagtgtt 2220
tcttcttcaa cacaaatatc acaagtctgc ccactcccag gaagaaagag gagagaccct 2280
gagttctgac cttttgatgg tcaggcatga tggaaagaaa ctgctgctac agcttgggag 2340
atttgctctg ggaagtctgc cagtcaactt tgcccttcta accaccagat caatatgtgg 2400
ctgatcatct gatggggcag ttgcaatcac caagccttgt tctctttcct gttctgggat 2460
tgtgttgtgg aacccttttc cctagccacc accagttcat ttctgaggga tggaacaaaa 2520
atgcagcatg cccttcctgt gtggtgcatg ttcagtcctt gacaaatttt taccaaaatg 2580
aagctacttt atttaaaagg agggtgagag gtgaggaggt cactttgggt gtggcggaaa 2640
gggaatgctg catctttttc ctgggctgct ggggctctgg ccttggcttg ccagccggaa 2700
gcgctggcac gcatcgcctt cttttcccat tgggtccagc aatgaagacg agtgtttggg 2760
gttttttttt tctccaccat gtagcaagtt ctcaggaaaa tacaattgat atcttcctcc 2820
taagctcttc caatcagtca ccaagtactt atgtggttac tttgtccagg gcacaaaatg 2880
cctgtatcta attaaaagcc tacaaaactg cttgataaca gttttgaatg tgagacattt 2940
atgtaattta aatgtaaggt acaagtttta atttctgagt ttcttctatt atatttttat 3000
taaaaaaaga aaataatttt cagattgaat tggagtaaaa taatattact tcccactaga 3060
attatatatc ctggaaaatt gtatttttgt tacataagca gcttttaaag aaagatcatt 3120
acccttttct ctacataaat atatggggag tcttagccta atgacaaata tttataattt 3180
ttaaattaat ggtacttgct ggatccatac taacatcttt actaatacct cattgtttct 3240
tccaacttac tcctacacta catcctacat cttcttccta gtcttttatc tagaatatgc 3300
aacctcaaat aaaaatggtg gtgtcctcat tcattctcct ccttcctttt ttcccaagcc 3360
tgatcttcaa aaggttggtt aatttggcag ctgagttcct ccccaggcag agaatagacc 3420
aattttaggt gtattgggac tgagggagga tgtgtaaaga ttaacatcag taaagaaccg 3480
ctgtggagta attaagaact ttgttcttta taactggaga atataaccta accctaacat 3540
ccctcagcct ttactaaagt gtggcgtaaa tcacagtagt agcaaagaaa gtgactctgg 3600

atgtgttcct ggccagtacc tcccttatca tgaatgtaga ctctctcatc aagatttagg 3660
aatataaatc aaatcaaatg tgcccagcca agctatgtag taagggactt gaacaatatt 3720
aggcagaacc tataaaataa atcagggaat tagaaattat ttaaagtttt caaattgtaa 3780
attgccccgg tgtctttcag cctactgcca ttatttttgc tacaatacct acatttcaga 3840
ggagggccta ctgaaaattc catgcaagtg gaaaataatc ctcaagttat taatgagttt 3900
gaaaagcaat gagttcttaa gtctttgtga gtagagcaag atcctacaaa attcagaaat 3960
agtaaaaatg gattcatgct gatttgaaga gcatctgtgt gcataatata atgctgcatc 4020
tcttttaaaa gcagtctatt tttcttttta aatttgtccc catagatgct tttgaacatg 4080
aacatgctta tgttaccttt tccgaggttg ggaagagcca ggagctctca ggcagggccc 4140
cctccctcag ctgggcagga gctgctcagg aggagctagt tatagaggaa gcttagcgtt 4200
ggcattttca aaattcaagg tgataacgct ttcttcttcc tttctgtttt agaatagatt 4260
gctgtctgat ttgaaaaagg gaaatagatt tgatctcaaa tgaatctgtg cccagaagcc 4320
aggctcaggg tattcagaga tttgtatagt gccctcaaaa aataacaaaa ttttagcttt 4380
ccttttttct tcttttctcc atcaaattct tttttctcta gtttacaaat gacatggaaa 4440
aggaatttcc cctgagtttt gtatgccttt tttttttgg cttagactat agataggcgt 4500
gttgagctcc taagaaaata caaggaggaa ctctttgttg tgcagagcac tttatgagta 4560
gtttgtgtgg ataatatgtg actgcttccc tgacgagctt gtgaggctgt acttatgtct 4620
ttcctgtaag gcagcttcag tgccttctgt agtgtatata aggaaagatt acgccttctg 4680
aaaaatctca gagcaaccat aagattattt taaaatatgt agtatgactg atggactttt 4740
tcatcattaa attagtctag catctaaact tttaccactg aaataatatt gaccaaaaag 4800
caatttataa aaggtatttg tgaatagaaa atacaatgtg atcatttgta cttatgtgca 4860
ccttaaaaga ggaattctgt ctagctgtca aattctggtt ccttaacatc cagtccttga 4920
ttgtgattga gatctggtag gacgtgctgg ggcacgctag cagataaaat cccgtatact 4980
ttaggataga tgttacattt atgtcagtgt tggcaaagag cattgtgtag taataaagaa 5040
ttcaagactt cagcaatgtc aacctgaaac tttgtaaata tttcctagat tgttatttga 5100
tgcagtcaca gctctttatc acacaatgtt gtctttccct catcaggcaa ttttagaact 5160
gctgcacacc cctcctcaga tctcacctgc ccctcctgta cattcacctc tccagccttg 5220
tgcacacctc atttagcttt agtttgaaac acattgcagg gttcaggtga cctcttcaaa 5280
aactacctcc tcagaatgag gtaatgaata gttatttatt ttaaaatatg aaaagtcagg 5340
agctctagaa tatgaagatg atctaagatt ttaactttta tgtatacttg ttgagcactc 5400
tccttttgtc ctaaagggca ttatacattt aagcagtaat actgaaaaat gtagctcaga 5460
gtaactgaat gttgttgaaa gtggtgccag aatctgtttt aggggtacgt atcagaatct 5520
taatcttaaa tcggttacat gaaattaaat agttaatggt aacacttgac taacagatat 5580
aattttaatt ttcggtaggc ttttagcaag acagtaagta catcttcata atgagttagc 5640
cacagcttca tcacatgcac agattttcct gttgagagac tgcccagtta agagggtaga 5700
atgatgaacc atttttcagg attctcttct ttgtccaaac tggcattgtg agtgctagaa 5760
tatcagcact ttcaaactag tgattccaac tattaggcta ttaaaaagca aaacaaacca 5820
aacaaaccat agccagacat gggaagttta ctatgagtat aaacagcaaa tagcttacag 5880
gtcatacatt gaaatggtgt aggtaaggcg ttagaaaaat accttgacaa tttgccaaat 5940

gatcttactg tgccttcatg atgcaataaa aaaaaaaaaa atttagcata aatcagtgat 6000
ttgtgaagag agcagccacc ctggtctaac tcagctgtgt taatattttt tagcgtgcaa 6060
tttagactgc aaagataaat gcactaaaga gtttatagcc aaaatcacat ttaaaaaatg 6120
agagaaaaca caggtaaatt ttcagtgaac aaaattattt ttttaaagta cataatccct 6180
agtatagtca gatatattta tcacatagag caaataggtt gaaatcacaa ttcagtgaca 6240
tttctagaga aacttttttct actcccatag gttcttcaaa gcatggaact tttatataac 6300
agaaatgtgt gacggtcatt ttaaattgct gtagtttggg gctgaagtac tgtgtgctgg 6360
gcagcaatca catgtattaa ctagtgagaa aggagaaatt aagatatagg acagaatttg 6420
attttcttgt tcccagatta ctgctgccaa cctagacact gagtttccag aggctgaaac 6480
gtaaacttgc agctcagcaa ctgttttgca aagttagtgg gactgtcctg cttatgctgt 6540
tcaaaaatgc tctgagggcc aggtggggcc tccaggggct cctctctgag gggacatcag 6600
actagctaac gacctggcgg gcggatgtga accggacaca ctccatggtg tgcttcttgt 6660
atcggtccct cgccaccctc aagaaaggct tcagcgggtt ctctagacgt ctccactaag 6720
gtgtgttact aacagccatg ggttgttgag cacccgagga gtgcaatagc atctctgcat 6780
gattgtatat tggcccgaag agaatgaagt ggccagtgta ctcatgttcc atgttgctag 6840
ctctggtaaa ctgaaaatac tggtaagatt tttgttttat cagtacacta gagagtaagc 6900
tttgttttgt tgtttttaga taatgttttc acttccattt ggaaagacat ttaaattgag 6960
tttcagtcct aaattttgcc agtcatggta attagcagtt tctatcaggt atttttaagg 7020
tagaagagga tagaaacata agttctaaaa gcttaaggta accgtggttt attttaaaat 7080
gtttaggggt ggttagtctc tacctcaaaa aaagtgagtg aatcttttat ttcagcattc 7140
acaagttcgg ctgttgtttt tgtaatacat ttttttttta acctttgac ccccctttac 7200
ctaagtgtca atgtagtttt attaattact aagtcagttt cattaaaatg tttatttagc 7260
agttttgact aattgcaatg attaatatag ccagttgtgc atgaggacac agccagtgag 7320
tatatctggg tttttttgt gatgcttttt ttcttaagac ttctgtagat ttatgaagta 7380
ctcattgaaa acaactaaaa tacgtttatt cgtgttaata tggaaaaaaa aaaa 7434

<210> 40
<211> 603
<212> PRT
<213> 牛
<400> 40

Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln
1 5 10 15
Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu
20 25 30
Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr
35 40 45
Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp
50 55 60
Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly

65 70 75 80
Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val
85 90 95
Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His
100 105 110
His Pro Ile Pro Gln Glu Glu Ala Ser Leu Ala Glu Thr Thr Leu Pro
115 120 125
Cys Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro Ser Asp Ser Ile Gly Pro Pro
130 135 140
Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro
145 150 155 160
Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp
165 170 175
Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val
180 185 190
Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly
195 200 205
Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser
210 215 220
Leu Ser Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu
225 230 235 240
Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu
245 250 255
Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile
260 265 270
Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys
275 280 285
Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala
290 295 300
Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu
305 310 315 320
Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr
325 330 335
Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu
340 345 350
Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu
355 360 365
Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala
370 375 380

Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His
385 390 395 400
Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys
405 410 415
Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile
420 425 430
Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr
435 440 445
Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu
450 455 460
Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile
465 470 475 480
Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val
485 490 495
Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu
500 505 510
Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Val Gly Lys Thr
515 520 525
Leu Leu Ser Lys Arg Gln Asn Ser Glu Val Ile Arg Glu Lys Asp Lys
530 535 540
Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile
545 550 555 560
His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr
565 570 575
Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln
580 585 590
Ala Gly Gly Tyr Gly Glu Phe Ala Ala Phe Lys
595 600

<210> 41
<211> 2295
<212> DNA
<213> 马(Equus caballus)
<220>
<221> misc_feature
<222> (79)..(79)
<223> n是a, c, g,或t
<400> 41
atgaagacgc tgagcggcgg cggcggcggc gcggagcagg gccaggctct gttcaacggg 60
gacatggaac ccggaggcnc cgcgccggcg cccgcggcct cgtcggccgc ggaccctgcc 120

attcccgagg aggtatggaa tatcaaacaa atgattaaat tgacacagga acatatagag 180
gccctattgg acaaatttgg tggggagcat aatccaccat caatatatct ggaggcctat 240
gaagaataca ccagcaagct agatgccctc caacaaagag aacaacagtt attggaatcc 300
ctggggaatg gaactgattt ttctgtttct agttctgcat caacggacac cgttacatct 360
tcttcctctt ctagcctttc agtgctacct tcatctcttt cagttttca aaatcccaca 420
gatgtgtcac ggagcaaccc taagtcacca caaaaaccta tcgttagagt cttcctgccc 480
aacaaacaga ggacagtggt acctgcaagg tgtggcgtta cagtccggga cagtctaaag 540
aaagcactga tgatgagagg tctaatccca gagtgctgtg ctgtttacag aattcaggat 600
ggagagaaga aaccaattgg ctgggacact gatatttcct ggctcactgg agaggaattg 660
catgtagaag tgttggagaa tgttccactt acaacacaca actttgtacg gaaaactttt 720
ttcaccttag cattttgtga cttttgtcga aagctgcttt tccagggttt ccgctgtcaa 780
acatgtggtt ataaatttca ccagcgttgt agtacagagg ttccactgat gtgtgttaat 840
tatgaccaac ttgatttgct gtttgtctcc aagttctttg aacaccaccc agtatcacag 900
gaggaggcct ccttagcaga gactgccctt acatctggat catccccttc tgcacccccc 960
tccgattcca ttgggcccca aattctcacc agtccatctc cttcaaaatc cattccaatt 1020
ccacagcctt tccgaccagc agatgaagat catcgaaatc agtttggaca acgagaccgg 1080
tcctcatcag ctccaaatgt acatataaac acaatagaac ctgtcaatat tgatgacttg 1140
attagagacc aagggtttcg tagtgatgga ggatcaacca caggtttatc tgccaccccc 1200
cctgcctcat tacctggctc actcactaat gtgaaggcat tacagaaatc tccaggacct 1260
caacgggaaa ggaaatcatc ttcatcctca gaagacagga atcgaatgaa aactcttggt 1320
agacgggatt caagtgacga ttgggagatt cctgatgggc agatcacagt gggacaaaga 1380
attggatctg ggtcatttgg gacagtctac aagggaaagt ggcatggtga tgtggcagtg 1440
aaaatgttga atgtgacagc acccacacct cagcagttac aggccttcaa aaatgaagta 1500
ggagtactca ggaaaactcg acatgtgaat atcctactct tcatgggcta ttcaacaaag 1560
ccacaactgg ctattgttac ccagtggtgt gagggctcca gcttatatca ccatctccac 1620
atcattgaga ccaaatttga gatgatcaaa cttatagata ttgctcggca aactgcacag 1680
ggcatggatt acttacacgc caagtcaatc atccacagag acctcaagag taataatatt 1740
tttcttcatg aagacctcac agtaaaaata ggtgattttg gtctagccac agtgaaatct 1800
cgatggagtg ggtcccatca gtttgaacag ttgtctggat ccattttgtg gatggcacca 1860
gaagtaatca gaatgcaaga taaaaacccg tatagctttc aatcagatgt atatgccttt 1920
gggattgttc tgtatgaatt gatgactgga cagttacctt attcaaacat caacaacagg 1980
gaccagataa tttttatggt gggaagagga tatctatctc cagatctcag taaggtacgg 2040
agtaactgtc caaaagccat gaagagatta atggcagagt gcctaaaaaa gaaaagagac 2100
gagagaccac tcttccccca aattctcgcc tctattgagc tgctggcccg ctcattgcca 2160
aaaattcacc gcagtgcatc agagccctcc ttgaatcggg ctggcttcca gacagaggat 2220
tttagtctat atgcttgtgc ttctccgaaa acacccatcc aggcaggggg atatggtgcg 2280
tttcctgtcc actga 2295

<210> 42

<211> 764

<212> PRT
<213> 马
<220>
<221> misc_feature
<222> (27)..(27)
<223> Xaa可以是任何天然存在的氨基酸
<400> 42

```
Met Lys Thr Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Gln Gly Gln Ala
1               5                  10                  15
Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Gly Gly Xaa Ala Pro Ala Pro Ala
            20                  25                  30
Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp Asn Ile
        35                  40                  45
Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu Leu Asp
    50                  55                  60
Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu Gln Gln
                85                  90                  95
Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser Ser Ser
            100                 105                 110
Ala Ser Thr Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu Ser Val
        115                 120                 125
Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val Ser Arg
    130                 135                 140
Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe Leu Pro
145                 150                 155                 160
Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr Val Arg
                165                 170                 175
Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro Glu Cys
            180                 185                 190
Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile Gly Trp
        195                 200                 205
Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val Glu Val
    210                 215                 220
Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys Thr Phe
225                 230                 235                 240
Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe Gln Gly
                245                 250                 255
```

Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys Ser Thr
260 265 270
Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu Leu Phe
275 280 285
Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Val Ser Gln Glu Glu Ala Ser
290 295 300
Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala Pro Pro
305 310 315 320
Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro Ser Lys
325 330 335
Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp His Arg
340 345 350
Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn Val His
355 360 365
Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg Asp Gln
370 375 380
Gly Phe Arg Ser Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala Thr Pro
385 390 395 400
Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys
405 410 415
Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp
420 425 430
Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp
435 440 445
Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly
450 455 460
Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val
465 470 475 480
Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe
485 490 495
Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu
500 505 510
Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln
515 520 525
Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr
530 535 540
Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln
545 550 555 560
Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys

565 570 575
Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp
580 585 590
Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe
595 600 605
Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg
610 615 620
Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe
625 630 635 640
Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn
645 650 655
Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu
660 665 670
Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys
675 680 685
Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu
690 695 700
Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro
705 710 715 720
Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe
725 730 735
Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro
740 745 750
Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
755 760

<210> 43
<211> 2678
<212> DNA
<213> 鸡(Gallus gallus)
<400> 43
tccccctccc tcgccccagc gcttcgatcc aagatggcgg cgctgagcag cggcagcagc 60
gccgaggggg cctcgctctt caacggggac atggagcccg agccgccgcc gcccgtgctg 120
ggcgcctgct acgccgggag cggcggcggc gacccggcca tcccggagga ggtgtggaat 180
atcaaacaga tgattaaatt aacacaagaa catatagaag cgctgttaga caagtttgga 240
ggagagcata acccaccatc aatatattta gaggcctatg aggagtacac cagcaaacta 300
gatgctctac agcagagaga acagcagtta ttggaatcca tgggaaatgg aactgatttc 360
tctgtttcca gttcagcttc aacggacaca gttgcatcat cttcctcctc tagcctctct 420
gtagcacctt catccctttc agtttatcaa aatcctactg atatgtcgcg gaataaccct 480
aagtctccac agaagcctat tgttagagtc ttcctgccca acaagcaaag gactgtggtt 540

ccggcaagat gtggggtgac agtccgagac agcctgaaga aagctctgat gatgagaggt 600
cttattccag aatgctgtgc tgtttacaga atacaggatg gagagaagaa gccaattggc 660
tgggacactg acatttcctg gctaaccgga gaggagttac acgtggaggt cttggagaat 720
gtgccactca caacacacaa ttttgtacga aaaacattct tcacgttagc gttctgcgac 780
ttctgtcgaa agctgctttt ccagggattc cgatgccaga catgtggcta caaatttcac 840
cagcgctgta gcacagaagt gccactgatg tgtgttaact acgaccaact cgatttgctg 900
tttgtctcca agttctttga acatcacccc atatcgcagg aggagaccac cttaggagag 960
accaccccgg catcgggatc gtacccctca gtgcccccat cagattctgt tggaccacca 1020
attctcccta gtccttctcc ttcaaaatcc attccaatcc cacagccctt ccgaccagca 1080
gatgaagacc atcggaatca gtttgggcaa cgcgaccgat cctcttcagc tcccaatgtt 1140
cacatcaata caattgagcc agtcaatatt gatgacttga ttagagacca gggtgtacga 1200
ggagagggag ccccttttgaa ccagctgatg cgctgtcttc ggaaatacca atcccggact 1260
cccagtcccc tccttcattc tgtccccagt gaaatagtgt ttgattttga gcctggccca 1320
gtgttcagag gttcaactgc aggtttgtct gcaacacctc ctgcatcttt gcctgggtca 1380
cttaccaatg tgaaagcatt acagaaatca ccaggccccc aacgggaaag gaaatcatcc 1440
tcatcctcag aagacagaaa taggatgaaa acccttggtc gacgagattc aagtgatgat 1500
tgggaaatac cagatgggca gatcacagtt ggacaaagga taggatctgg atcatttgga 1560
acagtctaca aaggaaagtg gcatggtgac gtggcagtga aaatgttgaa tgttacagca 1620
cccacacctc aacagttaca ggctttcaaa aatgaagtag gagtgctcag gaaaacacgg 1680
catgtgaata tcctactttt tatgggttat tcaacaaaac ctcagttggc tattgttaca 1740
cagtggtgtg aggggtccag cttatatcac catctgcaca taattgagac caagtttgaa 1800
atgatcaaac taattgatat tgcacgacag actgcacaag gcatggatta tttgcatgcc 1860
aagtcaatca tccacagaga cctcaagagt aataatattt ttcttcatga agacctcaca 1920
gtaaaaatag gtgacttcgg tctggctaca gtgaaatcac gatggagtgg atctcatcaa 1980
tttgaacagt tatctggatc aattctatgg atggcaccgg aagtgatcag gatgcaagac 2040
aaaaacccat atagctttca gtcagatgtg tatgcattcg ggattgtgct ttatgaactg 2100
atgactggac agttaccata ctcaaacatc aacaacaggg accagataat ttttatggtg 2160
ggacgaggat atctatctcc agacctcagt aaagtaagaa gtaactgtcc aaaagctatg 2220
aagagactaa tggcagaatg cttgaaaaag aaaagagatg agagacctct ttttccacag 2280
attcttgcct ccattgagct tctggcccgg tcgttgccaa aaattcaccg cagtgcatct 2340
gagccgtcac taaaccgggc tggcttccag accgaggatt tcagtctgta tgcttgtgct 2400
tctccaaaaa cgcccatcca agcaggggga tacggtgggt ttccagtaca ctgaaaagaa 2460
atgtgaaagc gtgtgcctgt ttgctcatgt gctggtgtgt tcctgtgtgt gcaacgcata 2520
cgtacgttct cagttcctac cagcgacttt ttaaggttta ctgagggaat gaagactcat 2580
ttcctaacat ggggcattga acgtcctgag cacaagtcag tgctggtaag gaatgtcttg 2640
ggaacagctg gcaagaagaa ttagaaggta cttaaagg 2678

<210> 44
<211> 806
<212> PRT

<213> 鸡

<400> 44

Met Ala Ala Leu Ser Ser Gly Ser Ser Ala Glu Gly Ala Ser Leu Phe
1 5 10 15
Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Pro Pro Pro Pro Val Leu Gly Ala Cys
20 25 30
Tyr Ala Gly Ser Gly Gly Gly Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp
35 40 45
Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu
50 55 60
Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu
65 70 75 80
Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu
85 90 95
Gln Gln Leu Leu Glu Ser Met Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser
100 105 110
Ser Ser Ala Ser Thr Asp Thr Val Ala Ser Ser Ser Ser Ser Ser Leu
115 120 125
Ser Val Ala Pro Ser Ser Leu Ser Val Tyr Gln Asn Pro Thr Asp Met
130 135 140
Ser Arg Asn Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe
145 150 155 160
Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr
165 170 175
Val Arg Asp Ser Leu Lys Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro
180 185 190
Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile
195 200 205
Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val
210 215 220
Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys
225 230 235 240
Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe
245 250 255
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys
260 265 270
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu
275 280 285
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Ser Gln Glu Glu

290 295 300

Thr Thr Leu Gly Glu Thr Thr Pro Ala Ser Gly Ser Tyr Pro Ser Val
305 310 315 320

Pro Pro Ser Asp Ser Val Gly Pro Pro Ile Leu Pro Ser Pro Ser Pro
325 330 335

Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp
340 345 350

His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn
355 360 365

Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg
370 375 380

Asp Gln Gly Val Arg Gly Glu Gly Ala Pro Leu Asn Gln Leu Met Arg
385 390 395 400

Cys Leu Arg Lys Tyr Gln Ser Arg Thr Pro Ser Pro Leu Leu His Ser
405 410 415

Val Pro Ser Glu Ile Val Phe Asp Phe Glu Pro Gly Pro Val Phe Arg
420 425 430

Gly Ser Thr Ala Gly Leu Ser Ala Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly
435 440 445

Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg
450 455 460

Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr
465 470 475 480

Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln
485 490 495

Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr
500 505 510

Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr
515 520 525

Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val
530 535 540

Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser
545 550 555 560

Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser
565 570 575

Leu Tyr His His Leu His Ile Ile Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys
580 585 590

Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His
595 600 605

Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu
610 615 620
His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val
625 630 635 640
Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser
645 650 655
Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro
660 665 670
Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu
675 680 685
Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln
690 695 700
Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys
705 710 715 720
Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys
725 730 735
Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala
740 745 750
Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala
755 760 765
Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser
770 775 780
Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr
785 790 795 800
Gly Gly Phe Pro Val His
805

<210> 45
<211> 4454
<212> DNA
<213> 人
<400> 45

gaaacgtccc gtgtgggagg ggcgggtctg ggtgcggcct gccgcatgac tcgtggttcg 60
gaggcccacg tggccggggc ggggactcag gcgcctgggg cgccgactga ttacgtagcg 120
ggcggggccg gaagtgccgc tccttggtgg gggctgttca tggcggttcc ggggtctcca 180
acatttttcc cggctgtggt cctaaatctg tccaaagcag aggcagtgga gcttgaggtt 240
cttgctggtg tgaaatgact gagtacaaac tggtggtggt tggagcaggt ggtgttggga 300
aaagcgcact gacaatccag ctaatccaga accactttgt agatgaatat gatcccacca 360
tagaggattc ttacagaaaa caagtggtta tagatggtga aacctgtttg ttggacatac 420
tggatacagc tggacaagaa gagtacagtg ccatgagaga ccaatacatg aggacaggcg 480

aaggcttcct ctgtgtattt gccatcaata atagcaagtc atttgcggat attaacctct 540
acagggagca gattaagcga gtaaaagact cggatgatgt acctatggtg ctagtgggaa 600
acaagtgtga tttgccaaca aggacagttg atacaaaaca agcccacgaa ctggccaaga 660
gttacgggat tccattcatt gaaacctcag ccaagaccag acagggtgtt gaagatgctt 720
tttacacact ggtaagagaa atacgccagt accgaatgaa aaaactcaac agcagtgatg 780
atgggactca gggttgtatg ggattgccat gtgtggtgat gtaacaagat acttttaaag 840
ttttgtcaga aaagagccac tttcaagctg cactgacacc ctggtcctga cttccctgga 900
ggagaagtat tcctgttgct gtcttcagtc tcacagagaa gctcctgcta cttccccagc 960
tctcagtagt ttagtacaat aatctctatt tgagaagttc tcagaataac tacctcctca 1020
cttggctgtc tgaccagaga atgcacctct tgttactccc tgttattttt ctgccctggg 1080
ttcttccaca gcacaaacac acctctgcca ccccaggttt ttcatctgaa aagcagttca 1140
tgtctgaaac agagaaccaa accgcaaacg tgaaattcta ttgaaaacag tgtcttgagc 1200
tctaaagtag caactgctgg tgatttttt tttctttta ctgttgaact tagaactatg 1260
ctaatttttg gagaaatgtc ataaattact gttttgccaa gaatatagtt attattgctg 1320
tttggtttgt ttataatgtt atcggctcta ttctctaaac tggcatctgc tctagattca 1380
taaatacaaa aatgaatact gaattttgag tctatcctag tcttcacaac tttgacgtaa 1440
ttaaatccaa ctttcacagt gaagtgcctt tttcctagaa gtggtttgta gacttccttt 1500
ataatatttc agtggaatag atgtctcaaa aatccttatg catgaaatga atgtctgaga 1560
tacgtctgtg acttatctac cattgaagga aagctatatc tatttgagag cagatgccat 1620
tttgtacatg tatgaaattg gttttccaga ggcctgtttt ggggctttcc caggagaaag 1680
atgaaactga aagcacatga ataatttcac ttaataattt ttacctaatc tccacttttt 1740
tcataggtta ctacctatac aatgtatgta atttgtttcc cctagcttac tgataaacct 1800
aatattcaat gaacttccat ttgtattcaa atttgtgtca taccagaaag ctctacattt 1860
gcagatgttc aaatattgta aaactttggt gcattgttat ttaatagctg tgatcagtga 1920
ttttcaaacc tcaaatatag tatattaaca aattacattt tcactgtata tcatggtatc 1980
ttaatgatgt atataattgc cttcaatccc cttctcaccc caccctctac agcttccccc 2040
acagcaatag gggcttgatt atttcagttg agtaaagcat ggtgctaatg gaccagggtc 2100
acagtttcaa aacttgaaca atccagttag catcacagag aaagaaattc ttctgcattt 2160
gctcattgca ccagtaactc cagctagtaa ttttgctagg tagctgcagt tagccctgca 2220
aggaaagaag aggtcagtta gcacaaaccc tttaccatga ctggaaaact cagtatcacg 2280
tatttaaaca ttttttttc ttttagccat gtagaaactc taaattaagc caatattctc 2340
atttgagaat gaggatgtct cagctgagaa acgttttaaa ttctctttat tcataatgtt 2400
ctttgaaggg tttaaaacaa gatgttgata aatctaagct gatgagtttg ctcaaaacag 2460
gaagttgaaa ttgttgagac aggaatggaa aatataatta attgatacct atgaggattt 2520
ggaggcttgg cattttaatt tgcagataat accctggtaa ttctcatgaa aaatagactt 2580
ggataacttt tgataaaaga ctaattccaa aatggccact ttgttcctgt ctttaatatc 2640
taaatactta ctgaggtcct ccatcttcta tattatgaat tttcatttat taagcaaatg 2700
tcatattacc ttgaaattca gaagagaaga aacatatact gtgtccagag tataatgaac 2760
ctgcagagtt gtgcttctta ctgctaattc tgggagcttt cacagtactg tcatcatttg 2820

taaatggaaa ttctgctttt ctgtttctgc tccttctgga gcagtgctac tctgtaattt 2880
tcctgaggct tatcacctca gtcatttctt ttttaaatgt ctgtgactgg cagtgattct 2940
ttttcttaaa aatctattaa atttgatgtc aaattaggga gaaagatagt tactcatctt 3000
gggctcttgt gccaatagcc cttgtatgta tgtacttaga gttttccaag tatgttctaa 3060
gcacagaagt ttctaaatgg ggccaaaatt cagacttgag tatgttcttt gaatacctta 3120
agaagttaca attagccggg catggtggcc cgtgcctgta gtcccagcta cttgagaggc 3180
tgaggcagga gaatcacttc aacccaggag gtggaggtta cagtgagcag agatcgtgcc 3240
actgcactcc agcctgggtg acaagagaga cttgtctcca aaaaaaaagt tacacctagg 3300
tgtgaatttt ggcacaaagg agtgacaaac ttatagttaa aagctgaata acttcagtgt 3360
ggtataaaac gtggttttta ggctatgttt gtgattgctg aaaagaattc tagtttacct 3420
caaaatcctt ctctttcccc aaattaagtg cctggccagc tgtcataaat tacatattcc 3480
ttttggtttt tttaaaggtt acatgttcaa gagtgaaaat aagatgttct gtctgaaggc 3540
taccatgccg gatctgtaaa tgaacctgtt aaatgctgta tttgctccaa cggcttacta 3600
tagaatgtta cttaatacaa tatcatactt attacaattt ttactatagg agtgtaatag 3660
gtaaaattaa tctctatttt agtgggccca tgtttagtct ttcaccatcc tttaaactgc 3720
tgtgaatttt tttgtcatga cttgaaagca aggatagaga aacactttag agatatgtgg 3780
ggtttttta ccattccaga gcttgtgagc ataatcatat ttgctttata tttatagtca 3840
tgaactccta agttggcagc tacaaccaag aaccaaaaaa tggtgcgttc tgcttcttgt 3900
aattcatctc tgctaataaa ttataagaag caaggaaaat tagggaaaat attttatttg 3960
gatggtttct ataaacaagg gactataatt cttgtacatt atttttcatc tttgctgttt 4020
ctttgagcag tctaatgtgc cacacaatta tctaaggtat ttgttttcta taagaattgt 4080
tttaaaagta ttcttgttac cagagtagtt gtattatatt tcaaaacgta agatgatttt 4140
taaaagcctg agtactgacc taagatggaa ttgtatgaac tctgctctgg agggagggga 4200
ggatgtccgt ggaagttgta agacttttat ttttttgtgc catcaaatat aggtaaaaat 4260
aattgtgcaa ttctgctgtt taaacaggaa ctattggcct ccttggccct aaatggaagg 4320
gccgatattt taagttgatt attttattgt aaattaatcc aacctagttc tttttaattt 4380
ggttgaatgt tttttcttgt taaatgatgt ttaaaaaata aaaactggaa gttcttggct 4440
tagtcataat tctt 4454

<210> 46
<211> 189
<212> PRT
<213> 人
<400> 46

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 47
<211> 1326
<212> DNA
<213> 大鼠
<400> 47

gccgttcatg gcggtttcgg ggtctccaac agcttctcag gttgaaatcc aaaagcctcc 60
cgaggcgggg tctgcggagt ttgagatttt tgcaggtgtg aaatgactga gtacaaactg 120
gtggtggttg gagcaggtgg cgttgggaaa agtgctttga caatccagct aatccagaac 180
cactttgtgg atgaatatga tcccaccata gaggattctt accgaaaaca agtggtgatt 240
gacggtgaga cctgtctact ggacatactg gacacagctg gacaagagga gtacagtgcc 300
atgagagacc aatacatgag gacaggcgaa gggttcctct gtgtgtttgc catcaataat 360
agcaaatcct ttgcagatat taacctctac agggagcaaa ttaagcgcgt gaaagactct 420
gatgatgtac ccatggtgct ggtagggaac aagtgtgact tgccaacaag gacagttgac 480
acaaagcaag cccacgagct ggccaagagt tatggaattc cattcattga aacctcagcc 540
aagacccgac agggtgtgga ggatgccttt tacacgcttg taagggagat acgccagtac 600
cggatgaaga agctcaacag cagtgaggat ggcactcaag gctgtatggg gctgccctgt 660
gtggtgatgt agtaagaccc tttaaaagtt ctgtcatcag aaacgagcca ctttcaagcc 720
tcactgatgc cctggttctg acatccctgg aggagacgtg tttctgctgc tctctgcatc 780
tcagagaagc tcctgcttcc tgcttcccca acttagttac tgagcacagc catctaacct 840
gagacctctt cagaataact acctcctcac tcggctgtcc gaccagagaa atgaacctgt 900
ttctccccag tagttctctg ccctgggttt cccctagaaa caaacacacc tgccagctgg 960

ctttgtcctc cgaaaagcag tttacattga tgcagagaac caaactatag acaagcaatt 1020
ctgttgtcaa cagtttctta agctctaagg taacaattgc tggtgatttc ccccttgcc 1080
cccaactgtt gaacttggcc ttgttagttt tgggggaaat gtcaaaaatt aatctcttcc 1140
cgagaataga attagtgttg ctgattgcct gatttgcaat gtgatcagct atattctata 1200
agctggcgtc tgctctgtat tcataaatgc aaacatgagt actgacgtaa gtgcatccct 1260
agtcttctca gctgcatgca attaaatcca acgttcacaa caaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1320
aaaaaa 1326

<210> 48
<211> 189
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 48

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Glu Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 49
<211> 4470
<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 49

gggactgggg cgccttgggc gcctagtgat tacgtagcgg gtggggccgg aagtgccgct 60
ccctggcggg ggctgttcat ggcggtttcg gggtctccaa cagcttctca ggttgaagtc 120
caaaagcctc ccgaggcggg gtctgcggag tttgaggttt ttgctggtgt gaaatgactg 180
agtacaaact ggtggtggtt ggagcaggtg gtgttgggaa aagcgccttg acgatccagc 240
taatccagaa ccactttgtg gatgaatatg atcccaccat agaggattct taccgaaagc 300
aagtggtgat tgatggtgag acctgcctgc tggacatact ggacacagct ggacaagagg 360
agtacagtgc catgagagac cagtacatga ggacaggcga agggttcctc tgtgtatttg 420
ccatcaataa tagcaaatca tttgcagata ttaacctcta cagggagcaa attaagcgtg 480
tgaaagattc tgatgatgtc cccatggtgc tggtaggcaa caagtgtgac ttgccaacaa 540
ggacagttga cacaaagcaa gcccacgaac tggccaagag ttacggaatt ccattcattg 600
agacctcagc caagacccga cagggtgtgg aggatgcctt ttacacactg gtaagggaga 660
tacgccagta ccgaatgaaa aagctcaaca gcagtgacga tggcactcaa ggttgtatgg 720
ggctgccctg tgtgctgatg tagtaagaca ctttgaaagt tctgtcatca gaaaagagcc 780
actttgaagc tgcactgatg ccctggttct gacatccctg gaggagacct gttcctgctg 840
ctctctgcat ctcagagaag ctcctgcttc ctgcttcccc gactcagtta ctgagcacag 900
ccatctaacc tgagacctct tcagaataac tacctcctca ctcggctgtc tgaccagaga 960
aatagacctg tctctcccgg tcgttctctg ccctgggttc ccctagaaac agacacagcc 1020
tccagctggc tttgtcctct gaaaagcagt ttacattgat gcagagaacc aaactagaca 1080
tgccattctg ttgacaacag tttcttatac tctaaggtaa caactgctgg tgattttccc 1140
ctgcccccaa ctgttgaact tggccttgtt ggtttggggg gaaaatgtca taaattactt 1200
tcttcccaaa atataattag tgttgctgat tgatttgtaa tgtgatcagc tatattccat 1260
aaactggcat ctgctctgta ttcataaatg caaacacgaa tactctcaac tgcatgcaat 1320
taaatccaac attcacaaca aagtgccttt ttcctaaaag tgctctgtag gctccattac 1380
agtttgtaat tggaatagat gtgtcaagaa ccattgtata ggaaagtgac tctgagccat 1440
ctacctttga gggaaaggtg tatgtacctg atggcagatg ctttgtgtat gcacatgaag 1500
atagtttccc tgtctgggat tctcccagga gaaagatgga actgaaacaa ttacaagtaa 1560
tttcatttaa ttctagctaa tctttttttt ttttttttt ttttttggta gactatcacc 1620
tataaatatt tggaatatct tctagcttac tgataatcta ataattaatg agcttccatt 1680
ataatgaatt ggttcatacc aggaagccct ccatttatag tatagatact gtaaaaattg 1740
gcatgttgtt actttatagc tgtgattaat gattcctcag accttgctga gatatagtta 1800
ttagcagaca ggttatatct ttgctgcata gtttcttcat ggaatatata tctatctgta 1860
tgtggagaga acgtggccct cagttccctt ctcagcatcc ctcatctctc agcctagaga 1920
agttcgagca tcctagaggg gcttgaacag ttatctcggt taaaccatgg tgctaatgga 1980
ccgggtcatg gtttcaaaac ttgaacaagc cagttagcat cacagagaaa cagtccatcc 2040
atatttgctc cctgcctatt attcctgctt acagactttt gcctgatgcc tgctgttagt 2100
gctacaagga taaagcttgt gtggttctca ccaggactgg aagtacctgg tgagctctgg 2160
ggtaagccta gatatcttta cattttcaga cccttattct tagccacgtg gaaactgaag 2220

ccagagtcca tacctccatc tccttccccc cccaaaaaaa ttagattaat gttctttata 2280
tagctttttt aaagtattta aaacatgtct ataagttagg ctgccaacta acaaaagctg 2340
atgtgtttgt tcaaataaag aggtatcctt cgctactcga gagaagaatg taaaatgcca 2400
ttgattgttg tcacttggag gcttgatgtt tgccctgata attcattagt gggttttgtt 2460
tgtcacatga tacctaagat gtaactcagc tcagtaattc taatgaaaac ataaattgga 2520
taccttaatt gaaaaaagca aacctaattc caaaatggcc attttctctt ctgatcttgt 2580
aatacctaaa attctgaggt ccttgggatt cttttgttta taacaggatc ttgctgtgta 2640
gtcctagctg gcctcaaact cacaatactc ttcctggatc aatctcccaa gtgctgggat 2700
tacaggcaca ttccaccaca cacacctgac tgagctcgtt cctaatgagt tttcattaag 2760
caaattcccc atcaccttga aactaatcag aaggggggaag aaacatttgc tatgctcctg 2820
agtgctaaca ctgggatcat tcacatgggg tttgcattcc taggcaaact aaactgctgc 2880
cttttacaac aaggctcagt catcttcctg aagctgctga gaccagcact tggtcttgtt 2940
ttgttttaat atgtctatat gactggtggt ggatccctaa atagtttatt aattaaactc 3000
cagttaagga gaaagttact caccttgacc cgtttgacca tatcccgtgt gtgtgtgtgt 3060
gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgtgtgtgt gtgcacgcgt atgtacgtac gtatgtatgt 3120
aggtatgtag gtggtttcca gtataaacac agaaacaaat ggagccaatt caggtttcag 3180
atgcccttac taacatatat tcccacgggg tgtgggtttt ggcacaacag tgacaaactt 3240
aaaagccaag taagagccgg gcgtggtggc gcacgccttt aatcccagca cttgggaggc 3300
agaggcaggc ggatttctga gttctaggcc atcctggtct acagtgagtt ccaggacagc 3360
cagtgctaca cagagaaacc ctgtctcgaa aagccaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3420
aaaagccaag taggtccagt tggtatagta tcaaagtgtt tttagagtaa ttagtgaagg 3480
tctgctttac ctcaaagttg cagagcctct cttcctgagt ttaagtgcct ggccggcagt 3540
cacaaattaa catgttgctg taaggcagtt agttgaagct ttgttcacac attggagagt 3600
atgaaaataa agtgttctaa gagcgctgat actggatctg tgtaaacctg gtaaatgccg 3660
tttgtccagg acttagcgtg tgtgagttgg tagctcagta cgagtttact agttccgcag 3720
tgtgtacaat ggaggcgggt ttgttttagc tggccacctg tagaatcagc ctttaaactg 3780
ctgtgaactt tgtcatgact tgaatatgaa gatagacaaa aactctgtaa agacaaatgt 3840
ttgttttccc ccttacagaa cgtgtgagct tggttttatc ttcctttgta tttagtcata 3900
acctctcaag ctggcagctc cgaccaagga tcagaagctg tgtgcgttcc acctggtgga 3960
attagctcag ctctatatga gaagtggagt taatggaaaa cgtgttgact gggtggtttc 4020
tatttaaaag agtgatgata attcttgaac agtagttttt attttgctat ttctttaagc 4080
tgactgatgt gccacaaaat tattttaagg tatttgtgtt ttaagagtgt tctcatgaga 4140
ttagttgtag atatttttta aaatacaact ggtttttaaa atctgagtat tgctctaagc 4200
aagtgtttag actcttacgg gaaggtgggt ggaagttgtt tggcttccgt atttccatgc 4260
gtgccgtcag acataggtca gaacgccaac tgtgcatcct gctgtttaaa gacctcttgg 4320
cctctgtgac cctcatgaag gggctgatat tttaagttga ctgtttgatt gtaaattaat 4380
cctttctaat ttttaaagac ttgcttgact gttttccttg ttaaataatt ttaaaaaaat 4440
aaaaaactgg aagttctttg cttaactgta 4470

<210> 50

<211> 189
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 50

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Leu Met
180 185

<210> 51
<211> 570
<212> DNA
<213> 豚鼠
<400> 51

atgactgagt ataaactggt ggtggttgga gcaggtggtg tcgggaaaag tgcactgacc 60
atccagctaa ttcagaacca ctttgtcgat gaatatgatc ccaccataga ggattcttac 120
cgaaaacagg tggttataga tggtgaaact tgtctgttgg atattctgga tacagctgga 180
caagaggagt acagtgccat gagagaccaa tacatgagga caggcgaagg cttcctctgt 240
gtgtttgcca tcaataatag caaatcattt gcagatatta acctctacag ggagcagatt 300
aaacgagtaa aagactcaga tgatgtacct atggtgctgg tagggaacaa gtgtgatttg 360

ccaacaagga ctgttgacac aaaacaagcc catgaactgg ccaagagtta cgggattcca 420
ttcattgaaa cctcagccaa gaccagacag ggtgttgaag atgcatttta cacactcgta 480
agagaaatac gccagtacag aatgaaaaaa ctcaacagca atgatgatgg gactcaaggt 540
tgtatggggt tgccatgtgt ggtgatgtaa 570

<210> 52
<211> 189
<212> PRT
<213> 豚鼠
<400> 52

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Asn Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 53
<211> 1220
<212> DNA
<213> 豚鼠
<400> 53

gttccggggt cctcaacgtt tctcagggtt gagattctat atccttttga agctggggcg 60

gcagagcttg aggttcttgc tggtgtgaaa tgactgagta taaactggtg gtggttggag 120
caggtggtgt cgggaaaagt gcactgacca tccagctaat tcagaaccac tttgtcgatg 180
aatatgatcc caccatagag gattcttacc gaaaacaggt ggttatagat ggtgaaactt 240
gtctgttgga tattctggat acagctggac aagaggagta cagtgccatg agagaccaat 300
acatgaggac aggcgaaggc ttcctctgtg tgtttgccat caataatagc aaatcatttg 360
cagatattaa cctctacagg gagcagatta aacgagtaaa agactcagat gatgtaccta 420
tggtgctggt agggaacaag tgtgatttgc caacaaggac tgttgacaca aaacaagccc 480
atgaactggc caagagttac gggattccat tcattgaaac ctcagccaag accagacagg 540
gtgttgaaga tgcattttac acactcgtaa gagaaatacg ccagtacaga atgaaaaaac 600
tcaacagcaa tgatgatggg actcaaggtt gtatggggtt gccatgtgtg gtgatgtaac 660
aagatattta acaaagttct atcagaaaag agccactttc aagctgcact gataccctgg 720
tcctgacttc cctggaggag aagtatccct gttgctctct tcatctcaga gaagctcctg 780
ctgtttgtcc acctctcagt gtatgagcac agtctctgct tgagaacttc tcagaataac 840
tacctcctca cttggttgtc tgaccagaga aatgcacctc ttgttaattc cccaataatt 900
ttctgccctg ggctctcccc aacaaaaaac aaacacttct gccatccaaa aagcaacttg 960
gtctgaaaca gaaccaaact gtagattgaa attctcttaa aaagtcttga gctctaaagt 1020
tagcaaccgc tggtgatttt tattttcctt tttatttttg aacttggaac tgacctatgt 1080
tagattttgg agaaatgtca taaagtactg ttgtgccaag aagataatta tgttgctgaa 1140
tggttgattt atagtgttat cagctatatt ttacaaactg gcatctgctc tgtattcata 1200
aatacaaaaa tgaagccagg 1220

<210> 54
<211> 189
<212> PRT
<213> 豚鼠
<400> 54

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Asn Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 55
<211> 1307
<212> DNA
<213> 狗
<400> 55
tgattacgta gcgggcgggg ccggaagtgc cgctccctag tgggggctgt tcatggcggt 60
tccggggtct ccaacctttc tcctagttgt ggtcctaaat acgtcggaag cggaggcggc 120
gaagcttgag gttcttgctg gtgtgaaatg actgagtaca aactggtggt ggttggagca 180
ggtggtgttg ggaaaagcgc actgacaatc cagctaatcc agaaccactt tgtagatgaa 240
tatgatccca ccatagagga ttcttaccga aaacaggtgg ttatagacgg tgaaacctgt 300
ctgttggata tactggatac agctggtcaa gaagagtaca gtgccatgag agaccaatac 360
atgaggacag gcgaaggctt cctctgtgta tttgccatca ataatagcaa atcatttgca 420
gacattaacc tctacaggga acagattaag cgagtaaaag attcagatga tgtacctatg 480
gtgctagtag gaaacaagtg tgatttgcca acaaggacag ttgacacaaa acaagcccat 540
gaactggcca agagttatgg gattccattc attgaaacct cagccaagac cagacagggt 600
gtcgaggatg ccttttacac actggtaaga gaaatacgtc agtaccgaat gaagaaactc 660
aacagcagtg atgatgggac tcaaggttgt atggggttac catgtgtggt gatgtaacaa 720
gacactttta aagttctagc atcagaaaag agccactgtc aagctgcact gacaccctgg 780
tcctgacttc cctggaggag aagtattcct gttgctatct tcagtctcac aaagaagctc 840
ctgctacttc cccaactctc agtagatcag tacaatgttc tctatttgag aagttctccg 900
aacaactacc tcctcacttg gttgtctgac cagagaaatg aacctcttgt tccttcccgc 960
tgtttttcca ccctgaattc tcccccaaca cacataaaca aacctctgcc atcccaggtt 1020
tttcatctga aaaataattc atgctctgaa acagagaaca aaactgtaga catgaaattc 1080
tgtaggaaac aaggtcttga gctcaaaagt agcaactgct ggtgaccttt ttttcccccc 1140
tttttactgt tgaacttgga actatgttgg tttttggaga aatgtcataa gttactgttt 1200
tgctgagaat atagttaagt tgacatttgg tttgtttgta atatcattag ctattttcta 1260
taaattggca tctgctctgc attcataaat acacgagtga attctga 1307
<210> 56
<211> 189

<212> PRT
<213> 狗
<400> 56

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 57
<211> 3104
<212> DNA
<213> 猫
<400> 57

aaaaaataaa taaatttaag aaaccatttt aaaattatgc acagttgcag cctggaaaac 60
ttaaggtggc gccttatagt atcaatctta ggagctttat ttggtgcatt taacgcaact 120
ggtaattgca aaatccactt cgcctgtgta agtgaaaaat atagactgtt atcttgttgg 180
ccctatgaaa ttctgcactt ggtatttagc atatactcta ccttcattac tatctggcaa 240
gatgttctgc cttagcactc agttgcattc ttttcctttt ctttcctgtt cattatgctt 300
taattctgag gaccatatga gggtagaata tattaaaaat tacaaaaatt ataaaaattt 360
gtataggcaa accatttcct taagttgatg gccaaatgtt aaaatgttat ttttcatatc 420

atttataatc ttgtcacagt ccacttaacg aagtttggtt agatttcagt gaaaattatc 480
ttccagagta gtttttttt ttttttcctg ggattaggga gggggtaac tttactgcaa 540
ttagtatgta tggtgcagaa tttcatgcaa atgaggtgtg ccagcagtgt ggtaatttaa 600
tcgtatttaa acaaaaacaa acaaaaaaaa aacgaatgca caaacttgct gctgcttaga 660
tcactgcagc ttctaggacc cagtttcttt tactgatttc aaaacaaaac aaaacaaaaa 720
aataaaaaaa gttgtgcctg aaatgaatct tgtttttttt ataagtagcc gcctggttcc 780
tgtgtcctgt gaaatacagg cacttgaccc ttggtgtagc ttctgttcga ctttatatca 840
cgggaatgga ttggtctgat ttcttggccc tcatcttgaa ttggccacat ccagggtccc 900
tggccagtgg actgaaggct ttgtctaaga ggacaagggc agctcagggg atgtgggga 960
gggcgctttt atcttccccg ttgtcgtttg aggttttgat cttctctggg taaagaggcc 1020
gtttatcttt gtaaacacaa aacatttttg ctttctccag ttttctgtta atggcgaaag 1080
aatggaagcg aataaagttt tactgatttt tgagactcta gcacctagcg ctttcatttt 1140
tgaaacgtcc tgtgtgggag gggcgggtct gggtgcggcc cgccgcgtga ctcctgagtc 1200
gggggcccac gtggctgggg cggggactcg gacgccccgg gcgccgactg attacgtagc 1260
gggcggggcc ggaagtgccg ctccctagtg ggggctgttc atggcggttc cggggtctcc 1320
atccttttc ccagttgttc taaatcagtc ggaagcggag gcagcgaagt ttgaggttct 1380
cgctggtgtg aaatgactga gtacaaactg gtggtggttg gagcaggtgg tgttgggaaa 1440
agcgcactga caatccagct aatccagaac cactttgtag atgaatatga tcccaccata 1500
gaggattctt accgaaaaca ggtggttata gacggtgaaa cctgtctgtt ggacatactg 1560
gatacagctg gtcaagaaga gtacagtgcc atgagagacc aatacatgag gacaggcgaa 1620
ggcttcctct gtgtatttgc catcaacaat agcaaatcat ttgcagatat taacctttac 1680
agggaacaga ttaagcgagt aaaagactcc gatgatgtac ctatggtgct agtaggaaac 1740
aagtgtgatt tgccaacaag gaccgtcgac acaaaacaag cccacgaact ggccaagagt 1800
tatgggattc cattcattga aacctcagcc aagaccagac agggtgttga agatgccttt 1860
tacacactgg taagagaaat acgtcagtac cgaatgaaga aactcaacag cagtgatgac 1920
gggactcaag gttgtatggg gttaccgtgt gtggtgatgt aacaagatac ttttaaagtt 1980
ctagcatcag aaaagagcca ctgtcaagct gcactgacac cctggtcctg acttccctgg 2040
aggagaagcg ttcctgttgc tattttcagt ttcacaaaga agctcctgct atttccccaa 2100
ctctccgtag atcagtacat tattctctgt ttgagaagtt ctccgaataa ctacctcctc 2160
acttggttgt ctgaccagag aaatgaacct cttgttactc cccactgttt ttccaccctg 2220
gttctccccc agcacatata aacaaacctc ccaggttttt catctgaaaa gtaattcatg 2280
ctctgaaaca gagaaccaaa ctgtagacat gaaattctgt aggaaacaat gtcttgagct 2340
ctaaagtagc aactgctggt gacttttttt ttttttttt ccttttact gttgaacttg 2400
gaactatgtt ggtttttgga gaaatgtcgt aagttactgt tttgctgagt atatagttaa 2460
gtttaccatt cggtttgttt gtaatgtcat tggctatact ctgtacctgg catctgctct 2520
gcattcataa atacaaaagt gaattctgac ttttgagtct atcctagtgt tctcaacttc 2580
cacataatta aatctaactt ttgcagcaaa gtgccttttt cctagaagtg gtttgtagat 2640
ttgctttata atactttggt ggaatagatg tctcaaaaac cattatacat gaaaatgaat 2700
gtctgagata cgtctatgat ctgtctacct ttgagggaaa aatataccga cataatagca 2760

gatgccatgt cttacgtgta tgaagttgga tttccagaga cctgatttgg gtctcttcca 2820
agagaaagat gaaactggaa acaattatga ataacttcac ttaattttta cctaatctct 2880
acttcggggt gggagggcag ggagtaggtt accacttaca aaatatatgc aatttgtttc 2940
ttctagctta ctgataatga acttccattc ttatttaaat ttaggtcata tcctaaagct 3000
ttacatttgc aggtgttcga aattgtaagt ttaatgcagt tttatttaat agctatgatc 3060
aatgattttc aagcctcaga tgtattaacg gacacatttt cact 3104

<210> 58
<211> 189
<212> PRT
<213> 猫
<400> 58

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 59
<211> 4283
<212> DNA
<213> 牛

<400> 59

ggccgctccc tagtgggggc tgttcatggc ggttccgggg tctcccaaca attttcccgg 60
ttgtggtcgt aatctatccg aagtggaggc agtggagcta gaggttcttg ctggtgtgaa 120
atgactgagt acaaactggt ggtggttgga gcaggtggtg ttgggaaaag tgcactgaca 180
atccagctaa tccagaacca ctttgtagat gaatatgatc ccaccataga ggattcctac 240
cgaaaacagg tggttataga tggtgaaacc tgtctgttgg acatactgga tacagctgga 300
caagaggagt acagtgccat gagagaccaa tacatgagga caggcgaagg cttcctttgt 360
gtgtttgcca tcaataatag caaatcattt gcagatatta acctctacag ggaacagata 420
aagcgtgtaa aggactcgga tgatgtacct atggtgctag taggaaacaa gtgtgatttg 480
ccaacaagga cagttgacac aaaacaagcc catgaactgg ccaaaagtta tgggattcca 540
ttcattgaaa cctcagccaa gaccagacag ggtgttgaag atgcctttta cacactggta 600
agagaaatac gtcagtaccg aatgaaaaag ctcaacagca gtgatgatgg cactcaaggc 660
tgtatggggt tgccgtgtgt ggtgatgtaa caagatactt ttaaagttct cacatcagaa 720
aagagccact gtcaagctgc actgacaccc tggtcctgac ttccctggag gagaagtatt 780
cctgttgcta tcttcagttt caaaaagaag ctcctgctat ttccccaact ctcagtagat 840
caatataata ttctctattt gagaagttct caagaataac tacctcctca cttggttgtc 900
tgaccagaga attgaacctc ttgttactcc cagtattttt ccaccctggg ttctccccca 960
gcacacacaa acgcacctct gccacccagg tttttcatct gaaaagcaat taatactctg 1020
aaacagagaa ccaaactgta gaaacatgaa attctgtaga aaacaatgtc ttgagctcta 1080
aagtagcaac tgctggtgat ttttttttt ttttttcct ttttattgtt gaacttggaa 1140
ctatgttggt ttgtggagaa atgtcataaa ttactgtttt gctgagaata tagttaatgt 1200
tgctctctgg tttgtttgta atgttatcag ctatattcta taaactggca tctactctgt 1260
atttagaaat acaaaaatga atactgacct tttgagtcta ccctcatctt ctcgactttc 1320
ttgtaattaa atgtaacttt cacgatgaag tgccttttgc ctgggagtga ctcgtagact 1380
tcctttaaaa tacttcagtg gaatagatgt ctcagaaact gttatacata agaataaatg 1440
tctgagatat gtctatgacc catctagctt tgagggaaag atataccaat atgatagcag 1500
atgccatttc ttacatctat aacgttgatt ttctggagac ctattttggg gctctccgag 1560
agaaagatga gactataaat gattaggaat aatttcactt aatttttaca taacctccac 1620
tttttgtttt gtagtttact acctgcaaaa catataattt gattcctttt agcttacaga 1680
taatctaatg ttaaatgaac ttccattcat attttaattt ggatcatatc aggaagtcta 1740
catttgcagg tgttcaaaaa ttgtaaaagt gtgatgcagt tttatttaat agctgtgatc 1800
aatgattttc aagcctcaaa tatgttaata gacacatttt cactgtatat catggtatta 1860
ataattattg atgtatataa ttgtccttgg tccccttctc tgttcatcac ctcatggcaa 1920
tggcttgatt aattatttca gctgagtaaa gcatggtgct aatagaccag ggtcacagtg 1980
tcaaaacttc agtgagccag taagcatcac agagaaagaa attctttcac atttgctcac 2040
cattaactcc agctaatagt tttgccagat gtgtgtggtt agtcctgcaa ggaaaggaga 2100
agtcagttaa tacaaattct taaccaggac tggaaaaact tgttttcctg agaagggtca 2160
gcttagaagt ctttatctgg actctatttt tagccacatg gaaatcaaat taagctgatc 2220
ttttttctca agtttttgag agtgaggatg cctcagatca acatttttaa aatattcttt 2280

attcttacgt tcttttaagg gtttaaaaca acgttgagta attagtctgg gcataccagg 2340
taacaagctg ataagtttgt gctgaacaag aagtagcctt tggattgaaa ttgctgtttt 2400
gagaagggat agaaaatata attaataatt atgagacttg acttttctat ttgcagataa 2460
tatcctgata attctgatga aaatagactt ggataatttt tgataaaaga atcgttccaa 2520
aatggccact tgctgttctt gtcttctaat gtgtaaatac ttactgaggt cctcttctaa 2580
tatgagttgt catttattaa gcaaattcca cattgccttg aaatgaattc ggaagagaag 2640
aaaaagtcat agtataccca gagaatgaaa aatccagaga attgtgctcc ttagtgttaa 2700
ttctgaagcc ttcgtagtcc acacccatag acagaaactc tctgccactt tgcttctgct 2760
cctcttggag cattgcgctg tcatttcctt gaggatagat tgaggcttgt caactcagtt 2820
gtattgtctt cctcctcttc ctcttgtctg tgtgactgac agtgtgactc ttactaatgt 2880
cagatgcggg gatgcgggga ggtgggggggg agtagctcat tttaggctct tgcacccttt 2940
accgttgtat gtgtgtgtct tttagttttc tcaagaatgt tctaagcaca gaagtatcta 3000
aatggggcca aaattcagac ttgaaaatgt tcttttaata gcttcttaaa aagttacact 3060
ttggtgtgaa ttttggcagg atagagtgac aaactcttaa acgctgaata acttcagtta 3120
gtgtgttata gtttttagaa tatgtttgtg attgctgaaa acaattatag tttacctcaa 3180
aatctgaaag tctctttccc caagttaagt gcctggccag ctgtcaaaga ttacatatta 3240
ctttatgttt gtttgttttt taaaggttgc acattcaaga ttgtgaaaat aaggtgttct 3300
gtctgaaagc taccatgcct gtctgtaaat gaatccactg agtgctgtac ttgttccaac 3360
agcttactac agaatgctac ttggtaatat catactcgtt acagttttca cttcaggagt 3420
gtactaggta gaatgatcct gtgtgtattg tagtgggctc catgtttagt cttttcagca 3480
tcctttaaac tgctgtgaat ttttgtcttg acttgaaagc aaggatagag aaacacttta 3540
aagagatact ttgggttttt ttccattcca gaattggtga gcatagttag attttgcttt 3600
acatttacag tcatgaactc ttaagctggc agctacaacc aagaaccaaa agagggtgca 3660
ttctgcttct tgtaattcat ctttgctaat aaattatgag aagcaaagat aattaattag 3720
agaaactatt ttatttgggt ggtttctata aacaagggac tataattctt aaacattatt 3780
tttcattttt gctgtttctt taagaaacct aatgtgccac aacattattt taaggtgttt 3840
cttaaaagaa ttgtttttaa aagtgttctc attttcagag taattgtaga tatatttcaa 3900
aatataactg ataatttta aaggcctgag tactgaccta agaagcagtt gtatgaattc 3960
tctgggggga agggaggagc tcagtgaaag ttgtatgact tttatatttc tgtgccatca 4020
aataaaggta aaaatgtctt ttgtgcagtt ttgctgttca aacagaaact attggcctcc 4080
ttggccctaa atgaaagggc tggtatttta agttgactat tttattgtaa attaatccat 4140
cttaattttt ttaaatttgg ttgaatgttc tcttgttaaa tgtttaaaaa ataaaaactg 4200
gaagttcttt gcttagtcat aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4260
aaaaaaataa aaaaaaaaaa aaa 4283

<210> 60
<211> 189
<212> PRT
<213> 牛
<400> 60

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15
Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp
165 170 175
Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met
180 185

<210> 61
<211> 4825
<212> DNA
<213> 鸡(Gallus gallus)
<400> 61

gcgccgggac cggaagccgg aagctttgca gaagggtgtt ccgcgttcgc ggtgcgggag 60
cggtcagccg gggtggcggg gctggggccg gccggggcag gcggctccgc gctccgcact 120
gggccgctgg gagggcgatg actgaataca agctggtggt ggtgggagct ggcggcgtcg 180
ggaagagcgc gttgaccatc cagctcatcc agaaccactt cgtggacgag tacgacccca 240
ccatcgagga ttcgtacaga aagcaggttg tcatcgatgg agagacgtgc ttgttggaca 300
ttctggacac tgcaggacag gaagaataca gtgctatgcg tgatcagtac atgagaactg 360
gggaaggatt cctttgtgtg tttgccatta acaacagtaa atcattcgct gatattaacc 420
tttacagaga gcaaatcaag agagtgaaag attcagacga tgtgccaatg gtgctggtgg 480
ggaataagtg cgatttgcca acaaggacag tagacaccaa acaggctcaa gagttagcaa 540
aaagctacgg cattcccttc atagagacat cagccaaaac gagacagggt gtggaagatg 600

cgttttacac actggtgagg gagattcggc agtaccggat gaaaaagctc aacagcaacg 660
aagatgggaa tcagggctgt atggggttgt cctgcattgt gatgtgataa gatgccaggt 720
tcagatgtag ctgctggaca agtctcgatg ctactgtatt gtgtctcatg ctgatgccct 780
gcagtatttt ggtgccagcg accagactct tggtaccagt taattagctc aggatccttt 840
cctgtgctcc atctgaagaa aacatctctg gtatctacct ccttgctcag ctcacagagc 900
agtcatatct cttggtgtac tgggattctt ttctagctgt gttgtctggg tttgttcaag 960
aagaaaacca gtcacaagaa aagtgaatta cagagactaa atgctgtgaa aaagatcaca 1020
ctttacctcc agagtaaaag ctagaagtgg cgtttgaccc ctttgcattg gattcagatt 1080
tgcggtgttg tcagaggagt ggcagaagta attttgccat tacaaaggtt tctgtcacca 1140
gtcggattgg tatctgctgt ctgtgcaccc acacagtgta tctgcaacat ctgcattgtg 1200
ccagaagtat cacttaactg atgaactgat cctttatttt tctgtaataa aaaggagata 1260
tctttgctaa cttaagtgcc tgtttgctca gaaggttgga ggttgtatgc tgttcccttg 1320
ggctgaggag aaccccaagg atgaatttct tgggtgctca ttgtcttgag caggcaagtt 1380
ttgtgtgggt gatctctttt catggcagga tattaaaatg ggaatttgta gtctggaaga 1440
tggagcagct gtttgtgaga ctcttgagtt agggagagaa atgtatacca cgtctgttct 1500
cgatccatca gaatggatcc atccacctct ttgtgtgtgg aactgtgtat agtctgtatt 1560
ggttttctac agcacttgga tctctttgga ccaaattagc gagctgttca ttttaacata 1620
actgccagta tttatagaca atttcttacg gacagataat gaatttagaa actggaggtt 1680
actttgggca gctgttcctc agctctgtct gtaacttgca aattattctg agttattttc 1740
tgcagaacct ccttccttat cacgggagga gcctgggagt tgaggttgac tgtaattggg 1800
tcaatggttg tcacagactt aaggtgtcca ggctgattgg aggaggcact gagccctaac 1860
agagcactga gctgacttct aattgcagca tccttgcaaa atgaggaagg gagttcagtg 1920
atgtctgcac tgaagatgta tgatacactg atagcagttc tgggtatgtt gtaacagctt 1980
caaagtagaa ccgcagtact gcgtgagctg tgtgacttct tcctagaaca cagcactgtc 2040
accccatatg gttgggacgt gcaggtgaga ccaacaccta ccaggttccc tggcgtaccg 2100
tggccttctc agttcttgtg ccagtgatac tgggttctgt tctgtggtgt cagacagcgt 2160
cctgtagcaa agctgaattc ccacttagtc tggtgagaga ataaagagcc atcagccaac 2220
agagggagcg ttcattctgc tggagcagtg cgagctgtaa gcattacgag aggcgtagtt 2280
tcagtttgtt gcagtcaggt tcctatattt tcaaagctga aatcagaaat aagtaaatac 2340
ggagaaaata agctgttgct tttaatgctc tttcctccac taattgtact cttaattttc 2400
ttcttgggag gccgaggatc catctgcata actttagctg tgatgctcca gataagtgtt 2460
tagaattcat tttatctttg actgatggga ctgataagaa gttaacgcac aatattttta 2520
catacaacat cgttttccag tgacctcctg agcggtggga agcattatgg gatagcaccg 2580
gctgtgactc gagttcattt gaaggcgatc tcttgcctgc aggttaaatg ggacggagtc 2640
agaatcactg tgagccgtct gtaatcagca aacagtctgt gggcttttct tactgtgttc 2700
tctctgtttg ccttagtttg gtgcaggaag agttccttgt gacagcgtcc tttgaggtgt 2760
gttgcaggag ctgaccattt gctccttgag ctgtgtgatg aactgttgtc cacttaatgg 2820
agttacagaa gcagcttctg ggagtcgcat ctggtcgcat acattcagtg ttttgggaag 2880
ctgtcagtgt ggtgtttgca ctgtgtttga atggtgttca tggtgggtct gttatgctcc 2940

tggatgattt ggggagatgt ggggctgctt ccgtggcaga caggatcagc tcagggcgct 3000
gctgcctatg gctgtgggaa acctcacagt tggtgtttga atagtggcca agtatgtcaa 3060
ttaaaaatac attttgaagg gaggtttgtc atagctctgt actttggcat gctctgctta 3120
ctgaaaacat actagctgta gctcaaaaaa agttgtgaat cctcagaata atacaggagc 3180
tggcaattgt ggctgctttc tctttgtgtt ccttttctct tgggttggat gaagctttaa 3240
aaaggaagga gccctggtga gggttggtca gtgtgcattt cattcttgga accagagagg 3300
aagttgcatc aactttcagg acgctgcaga gctcacttgc acaggtggtg ctccagtcta 3360
tgtgattttt ggggtcaaat cttgagatga tcttacaaaa tcagattttg tacccatcat 3420
gagcatgagg tgagtggttg tgctcggttt ctagctgcat gtatgtatac agacacgtgt 3480
atgcagacat gtctatgtgt gagtagttcg agtcagtcaa ggttactggc agcacctaaa 3540
gcgtatgcac cacataatgc atgcaggcaa aagtcctatc ttaggagcca tctcttcatg 3600
ggtttgggtt tatataggca gtatttttaa acagaatatc cgaagcactt tctggagttc 3660
tgtggtaatg cagtgacacc tatttggatg aaggaagatg tgtctgagga gcacgtaagc 3720
agatttgctg ccctaacaga gaggttttgg taaccgtgga aaaggttttc tcctggatct 3780
gtgtgtgctc ttggtgagct gcaatccatg acagggcaca accagatgag aaggaaaccc 3840
ggccatccca tgcttgagca cagctctgac tcagtagttc caccagatgt gcccttcag 3900
tcaaagtgtt ctgatctctt agagctttct gtagttcaag ttaccactca ctctccagct 3960
tgctcggtta atgtctgttg gcggcgttga gttggacttg ggaaaggtgt gtgtggtagg 4020
aacaagcaga gtgtgatgtg cttctgttat caggacttaa gctagagtgg ttggcagata 4080
ggaaatgcag ctattccttg aaagcaagca gatcatggat ggtcagccaa actgccctgg 4140
ctttggtggg agctgcactg cagaaggacc aaaccccaac aagatttggc acatttgttt 4200
agaagataag cacagatggt tttgcacaag gcagctcctc ataatggtgg ctttgtagat 4260
ttagtccaaa tgttcttatt tagatctagc agcacatcac tgtgtccgtg cccatctaac 4320
ctcgctatcc taagtagagc agaccccaaa caaccttgtt caaaaactac cagtgcaaat 4380
aactgaacta aatatttgtt actgctgact gagaacagct gttcgagtgt agcattgtgg 4440
cttgttaatg tgagtgcccc aactctatgg tcttattaaa gaaacccaaa cattgctcag 4500
attttgttct tattgtcatc ataagacttg aatagtgatg gtaatgctta cgtagacgtg 4560
tcttgtgagt gcacttcagt gatttagaaa gaactggatt tcaagcaact ttggacctgt 4620
ggggggaggg agattaatga aggtttgaat cacattctaa ttctatgtac agtccttcat 4680
tactccacaa gcctaaatcc tatacagcct ccaggatagc tggaaactgt tgagatctgg 4740
actttttttt tttaatccaa gggctaactt gttgtaactt ggtataatta tctgctttcg 4800
gaaatgcatc tctgttggtt tgaaa 4825

<210> 62
<211> 189
<212> PRT
<213> 鸡
<400> 62

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
20 25 30
Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
35 40 45
Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
50 55 60
Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
65 70 75 80
Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr
85 90 95
Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val
100 105 110
Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys
115 120 125
Gln Ala Gln Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
130 135 140
Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
145 150 155 160
Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Asn Glu Asp
165 170 175
Gly Asn Gln Gly Cys Met Gly Leu Ser Cys Ile Val Met
180 185

<210> 63
<211> 2603
<212> DNA
<213> 人
<400> 63

aggcgaggct tccccttccc cgcccctccc ccggcctcca gtccctccca gggccgcttc 60
gcagagcggc taggagcacg gcggcggcgg cactttcccc ggcaggagct ggagctgggc 120
tctggtgcgc gcgcggctgt gccgcccgag ccggagggac tggttggttg agagagagag 180
aggaagggaa tcccgggctg ccgaaccgca cgttcagccc gctccgctcc tgcagggcag 240
cctttcggct ctctgcgcgc gaagccgagt cccgggcggg tggggcgggg gtccactgag 300
accgctaccg gcccctcggc gctgacggga ccgcgcgggg cgcacccgct gaaggcagcc 360
ccggggcccg cggcccggac ttggtcctgc gcagcgggcg cggggcagcg cagcgggagg 420
aagcgagagg tgctgccctc cccccggagt tggaagcgcg ttacccgggt ccaaaatgcc 480
caagaagaag ccgacgccca tccagctgaa cccggccccc gacggctctg cagttaacgg 540
gaccagctct gcggagacca acttggaggc cttgcagaag aagctggagg agctagagct 600
tgatgagcag cagcgaaagc gccttgaggc ctttcttacc cagaagcaga aggtgggaga 660
actgaaggat gacgactttg agaagatcag tgagctgggg gctggcaatg gcggtgtggt 720

gttcaaggtc tcccacaagc cttctggcct ggtcatggcc agaaagctaa ttcatctgga 780
gatcaaaccc gcaatccgga accagatcat aagggagctg caggttctgc atgagtgcaa 840
ctctccgtac atcgtgggct tctatggtgc gttctacagc gatggcgaga tcagtatctg 900
catggagcac atggatggag gttctctgga tcaagtcctg aagaaagctg gaagaattcc 960
tgaacaaatt ttaggaaaag ttagcattgc tgtaataaaa ggcctgacat atctgaggga 1020
gaagcacaag atcatgcaca gagatgtcaa gccctccaac atcctagtca actcccgtgg 1080
ggagatcaag ctctgtgact ttggggtcag cgggcagctc atcgactcca tggccaactc 1140
cttcgtgggc acaaggtcct acatgtcgcc agaaagactc caggggactc attactctgt 1200
gcagtcagac atctggagca tgggactgtc tctggtagag atggcggttg ggaggtatcc 1260
catccctcct ccagatgcca aggagctgga gctgatgttt gggtgccagg tggaaggaga 1320
tgcggctgag accccaccca ggccaaggac ccccgggagg ccccttagct catacggaat 1380
ggacagccga cctcccatgg caatttttga gttgttggat tacatagtca acgagcctcc 1440
tccaaaactg cccagtggag tgttcagtct ggaatttcaa gattttgtga ataaatgctt 1500
aataaaaaac cccgcagaga gagcagattt gaagcaactc atggttcatg cttttatcaa 1560
gagatctgat gctgaggaag tggattttgc aggttggctc tgctccacca tcggccttaa 1620
ccagcccagc acaccaaccc atgctgctgg cgtctaagtg tttgggaagc aacaaagagc 1680
gagtcccctg cccggtggtt tgccatgtcg cttttgggcc tccttcccat gcctgtctct 1740
gttcagatgt gcatttcacc tgtgacaaag gatgaagaac acagcatgtg ccaagattct 1800
actcttgtca tttttaatat tactgtcttt attcttatta ctattattgt tcccctaagt 1860
ggattggctt tgtgcttggg gctatttgtg tgtatgctga tgatcaaaac ctgtgccagg 1920
ctgaattaca gtgaaatttt ggtgaatgtg ggtagtcatt cttacaattg cactgctgtt 1980
cctgctccat gactggctgt ctgcctgtat tttcgggatt ctttgacatt tggtggtact 2040
ttattcttgc tgggcatact ttctctctag gagggagcct tgtgagatcc ttcacaggca 2100
gtgcatgtga agcatgcttt gctgctatga aaatgagcat cagagagtgt acatcatgtt 2160
attttattat tattatttgc ttttcatgta gaactcagca gttgacatcc aaatctagcc 2220
agagcccttc actgccatga tagctggggc ttcaccagtc tgtctactgt ggtgatctgt 2280
agacttctgg ttgtatttct atatttattt tcagtatact gtgtgggata cttagtggta 2340
tgtctcttta agttttgatt aatgtttctt aaatggaatt attttgaatg tcacaaattg 2400
atcaagatat taaaatgtcg gatttatctt tccccatatc caagtaccaa tgctgttgta 2460
aacaacgtgt atagtgccta aaattgtatg aaaatccttt taaccatttt aacctagatg 2520
tttaacaaat ctaatctctt attctaataa atatactatg aaataaaaaa aaaaggatga 2580
aagctaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2603

<210> 64
<211> 393
<212> PRT
<213> 人
<400> 64

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15

Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp

325 330 335

Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350

Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365

Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390

<210> 65

<211> 2151

<212> DNA

<213> 大鼠

<400> 65

cggccgcgcg ctccctgctg agttgcaggc tgtttcccgg ctgcaagatg cccaagaaga 60
agccgacgcc catccagctg aacccggccc ccgatggctc cgcggttaac gggaccagct 120
cggccgagac caacctggag gccttgcaga agaagctgga ggagctggag ctggacgagc 180
agcagcggaa gcgccttgag gcctttctga cgcagaagca gaaggtggga gagttgaagg 240
atgatgactt tgagaagatc agtgaactgg gggctggcaa tggtggagtg gtgttcaagg 300
tctcccacaa gccatctggc ctggttatgg ctaggaagct aattcacctg gagatcaaac 360
ccgcaatccg gaaccagatc atccgggagc tgcaggtgct gcatgagtgc aactccccgt 420
acatagtggg cttctacggg gccttctaca gtgacggcga gatcagcatc tgcatggagc 480
acatggatgg tgggtccttg gatcaagtgc tgaagaaagc tggaagaatt cctgagcaaa 540
ttttaggaaa agtcagcatc gctgtgataa aaggcctgac atatctacga gagaagcaca 600
agattatgca cagagatgtc aagccttcca acattctagt gaactcacgt ggggagatca 660
aactctgcga ttttggggtc agcgggcagc taattgactc catggccaac tccttcgtgg 720
gaacaaggtc ctacatgtcg cctgagagac tccaggggac tcactactct gtgcagtcgg 780
acatctggag catggggctc tctctggtgg agatggcagt tggaagatac cccattcctc 840
ctcctgatgc caaggagctg gagctgctgt ttggatgcca ggtggaagga gacgcggccg 900
aaacgccacc caggccaagg acccctggga ggcccctcag ctcatatgga atggatagcc 960
gacctcccat ggcaattttt gagttgttgg attacatcgt caatgagcct cctccaaaac 1020
tgcccagtgg agtattcagt ctggaatttc aggattttgt gaataagtgc ttaataaaga 1080
accctgcaga gagagcagat ctgaagcagc tcatggtaca tgctttcatc aagagatctg 1140
atgccgagga ggtagacttc gcaggctggc tctgctccac cattgggctt aaccagccca 1200
gcacaccaac ccacgctgcc agcatctgag cctttgggaa gcagcagaga ggaatcctct 1260
gcccagtggc atgccatgtt gctttcaggc ctctcccatg cttgtctatg ttcagatgtg 1320
catctcatct gtgacaaagg atgaagaaca cagcatgtgc caaatcgtac ttgtgtcatt 1380
tttaatattg tctttatcgc tatggttact cccctaagtg gattggcttt gtgcttgggg 1440
ctatttgtct gttcatcaaa tacatgccag gttgaactac agtgaaaccc tggtgacctg 1500

ggtggtcttc ttactgatgt ttgcgctgct gttcatcgtg actcactagc tggctgcctg 1560
tattgtcagg attctcggac ccttggtact tcactcttgc tggtgacctc tcagtctgag 1620
gagaggggc cttctgagac ccttcacagg cagtgcatgc atgaaaagca tgctttgctg 1680
ctactgaaat gagcaccaga acgtgtacat catggtattt tatttttgct tttggtatag 1740
aactcagcag ttcccattta aaaaaaaaat ctaaccagag cccatcactg ccatgatagc 1800
tggggcttca gtctgtctac tgtggtgatt tttagacttc tggttgtatt tctatattta 1860
tttttaaata tactgtgtgg gatacttagt ggtatatgtc tctgagtttg gattagtgtt 1920
tctaaattgg tagttatttt gaatgtcaca aatggattaa ggaatcaacg tatcaagagt 1980
tctatctttc ttccagtcta agtaccaatg ctattgtaaa cgtgtatagt gcctacaaat 2040
tgtatgaaaa ccctttaac cactttactc aagatgttta tcaaatctaa tctcttattc 2100
taataaaaat actatcaagt taaagtaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa a 2151

<210> 66
<211> 393
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 66

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys

180 185 190

Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205

Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220

Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240

Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255

Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270

Leu Leu Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285

Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300

Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320

Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335

Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350

Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365

Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380

Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Ser Ile
385 390

<210> 67

<211> 2387

<212> DNA

<213> 小鼠

<400> 67

agtccctcac tgggacgtct gtgcgcggcg tctcggagcg ccggagcagc ggtggccgca 60

ctttctccaa gctggggctg tagctgagct gtgggtagtg cgcagggagc cgtccgagcc 120

cgaggaaccg gtgtgctgag gcgagagttc ccggccggcg agcgcgcgca gctggttctc 180

cgcgtgggtt gggcggaggg tcccaggagc gcggcgttga tcgagccgcc ccgactctgg 240

gcagagccga gggaggaagc gagaagcggc cgcgcgctcc ctgctgagtt gcaggctctt 300

tcccggctgc aagatgccca agaagaagcc gacgcccatc cagctgaacc cggcccccga 360

tggctcggcg gttaacggga ccagctcggc cgagaccaac ctggaggcct tgcagaagaa 420

gctggaggag ctggagcttg acgagcagca gcggaagcgg ctcgaggcct ttctgacgca 480
gaagcagaag gtgggggaac tgaaggatga tgactttgag aagatcagcg aactgggagc 540
tggcaacggt ggagtggtct tcaaggtctc ccacaagcca tctggcctgg ttatggctag 600
aaagctgatc cacctggaga tcaaacccgc aatccggaac cagatcatcc gggagctgca 660
ggtactgcac gagtgcaact ccccgtacat cgtgggcttc tacggggcct tctacagcga 720
cggcgagatc agcatctgca tggagcacat ggatggtggg tccttggatc aagttctgaa 780
gaaagctgga agaattcctg agcaaatttt aggaaaagtt agcattgctg tgataaaagg 840
cctgacctat cttcgggaga agcacaagat tatgcacaga gatgtcaagc catccaacat 900
tctagtgaac tcacgtgggg agatcaaact ctgtgatttt ggggtcagcg ggcagctaat 960
tgactctatg gccaactcct tcgtgggcac gagatcctac atgtcgcctg agagactcca 1020
ggggactcac tactctgtgc agtcggacat ctggagcatg gggctctctc tggtggagat 1080
ggcagttggg agatacccca ttcctcctcc tgatgccaag gagctggagc tactgtttgg 1140
atgccatgtg gaaggagacg cagccgaaac accacccagg ccaaggaccc ctgggaggcc 1200
tctcagctca tatggaatgg acagccgacc tcccatggca atttttgagt tgttggatta 1260
cattgtcaat gagcctcctc caaaactgcc cagtggagta ttcagtctgg agtttcagga 1320
ttttgtgaat aaatgcttaa taaagaaccc tgcagagaga gcagatctga agcagctcat 1380
ggtacatgct ttcatcaaaa gatctgacgc cgaggaggta gacttcgcag gctggctctg 1440
ctccaccatt gggcttaacc agcccagcac accaacccac gctgccagca tctgagcctt 1500
taggaagcag caaagaggaa ttctctgccc agtggcatgc catgttgctt tcaggcctct 1560
cccatgcttg tctatgttca gacgtgcatc tcatctgtga caaaggatga agaacacagc 1620
atgtgccaaa ttgtacttgt gtcatttta atatcattgt ctttatcact atggttactc 1680
ccctaagtgg attggctttg tgcttggggc tatttgtctg ttcatcaaac acatgccagg 1740
ctgaactaca gtgaaaccct agtgacctgg gtggtcgttc ttactgatgt ttgcactgct 1800
gttcatcgtg actcactagc tggctgcctg tattgtcagg attctcggac cttggtactt 1860
cactcttgct ggtgacctct cagtctgaga gggagccttg tgagaccctt cacaggcagt 1920
gcatgcatgg aaagcatgct ttgctgctac tgaaatgagc atcagaacgt gtacgtcatg 1980
gtatttttat tttttgcttt tggtatagaa ctcagcaatt cccatcaaaa aaacctaagc 2040
agagcccatc actgccatga tagctgggct tcagtctgtc tactgtggtg atttttagac 2100
ttctggttgt atttctatat ttatttttaa atatacagtg tgggatactt agtggtgtgt 2160
gtctctaagt ttggattagt gtttctaaat tggtggttat tttgaatgtc acaaatggat 2220
taaagcatca atgtatcaag agttctatct ttcttccagt ctaagtacca atgctattgt 2280
aaacaacgtg tatagtgcct acaaattgta tgaaacccct tttaaccact ttaatcaaga 2340
tgtttatcaa atctaatctc ttattctaat aaaaatacta tcaagtt 2387

<210> 68
<211> 393
<212> PRT
<213> 小鼠
<400> 68

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp

1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Leu Phe Gly Cys His Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320

Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380
Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Ser Ile
385 390

<210> 69
<211> 1182
<212> DNA
<213> 兔
<400> 69
atgccaaaga agaagcccac ccccatccag ctgaatcctg cccctgacgg ctcggcggtg 60
aatggtacca gctcggcgga gaccaacctg gaggccttgc agaagaagct ggaggagctg 120
gagcttgacg agcagcagcg gaagcgcctg gaggccttcc tcacccagaa gcagaaagtg 180
ggagagctga aggacgatga cttcgagaag atcagtgagc tgggagccgg caacggcggc 240
gtggtgttca aggtctccca caagcccagt ggcctggtga tggccagaaa gcttattcac 300
ctggagatca aacctgctat ccggaaccag atcataaggg agctgcaggt tctgcacgag 360
tgcaactccc cgtacatcgt gggcttctac ggggcattct acagcgatgg cgagatcagc 420
atctgcatgg agcacatgga cgggggttcc ttggatcaag tcctgaagaa agctggacgg 480
attcccgagc aaattttggg gaaagttagc attgctgtga tcaagggcct gacgtatctg 540
agggagaagc acaagatcat gcacagagat gtgaagccct ccaacatcct ggtcaactcc 600
cgcggggaga tcaagctctg tgacttcggg gtcagtgggc agctcatcga ctccatggcc 660
aactccttcg tgggcaccag gtcttatatg tcgcccgaga gactccaggg gacacactac 720
tctgtgcagt cggacatctg gagcatgggg ctgtccctgg tggagatggc ggtggggcgg 780
taccccatcc cgccccccga cgccaaggag ctggagctga tgtttgggtg ccaggtggag 840
ggcgatgcgg ccgagactcc gcccaggccc aggacccctg ggcggcccct cagctcgtat 900
ggaatggata gccggcctcc catggcgatt tttgagctgc tggattacat cgtcaatgag 960
cctcctccga aactccccag cgcagtcttc agcctggagt ttcaagattt tgtgaataaa 1020
tgcttaataa aaaaccccgc cgagagagca gacttgaagc agctcatggt tcatgctttt 1080
atcaagaggt ctgatgccga ggaggtggat tttgctggtt ggctgtgctc caccatcggc 1140
cttaaccagc ccagcacgcc gacgcacgcg gccggtgtgt ga 1182

<210> 70
<211> 393
<212> PRT
<213> 兔

<400> 70

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300

Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Ala Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380
Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390

<210> 71
<211> 1872
<212> DNA
<213> 豚鼠
<400> 71

cgtgtcttcg tcgggaccgc cctcctcctt gagtcctccc cccaccggga cggccgagtg 60
gagaggccgg acgaaggcgg cggccccggc ggcggctttt cctcggcttc gctgtgcagc 120
gtgcgcggcg aggttgaccg cccgcgagcg cccgtgactg agggaacagg gagagagctc 180
gggcggccga gcgcgcagcc ctccgtgggc attgccgcct ggacctcccg gaaggcaccc 240
cgggccgcgg ccgccacccg tcccgccctc gttcggagct gagacgccgt cgccgcgcaa 300
gatgcccaag aagaagccga cgcccatcca gctgaacccg gcccccgacg gctcggcggt 360
gaacgggacc agctcggccg agaccaacct agaggctttg cagaagaagc tggaggagct 420
ggagctggat gagcagcagc ggaagcgcct cgaagctttc ctgacacaga agcagaaggt 480
gggcgagctg aaggacgatg actttgagaa gatcagtgag ctgggtgccg gcaatggcgg 540
tgtggtgttc aaggtctccc acaagccatc tggcctggtc atggcccgaa agcttatcca 600
cctggagatc aagccagcca tccgcaatca gatcatccgt gagctgcagg ttctgcacga 660
gtgcaactcg ccctacattg tgggcttcta tggggccttc tacagtgatg gcgagatcag 720
catctgcatg gagcacatgg atggaggttc cttggatcaa gtcctgaaga aagctggaag 780
aattcctgag caaattttag gaaaagttag cattgctgtg atcaaaggcc tgacatacct 840
gagggagaag cacaagatta tgcacagaga tgtcaagccc tccaacatcc tggtcaactc 900
ccgcggggag atcaagctct gtgactttgg ggtcagcggg cagctcatcg attccatggc 960
caactccttc gtgggcaccc ggtcctacat gtcgccagag agactgcagg gcacacacta 1020
ctcagtgcag tcggacatct ggagcatggg actgtcactg gtggagatgg cggttgggag 1080
gtaccccatc ccccctccag atgccaagga gctggagctg gtgttcgggt gccaggtgga 1140
aggagatgca gctgagatgc cgcccaggcc caggaccccc ggaagacccc tgagctcata 1200
tggaatggac agccggcctc ccatggcgat tttcgagctg ttggattaca tagtcaacga 1260
gccacctccc aaactgccca gtggagtctt cagtctggaa ttccaggact ttgtaaataa 1320

atgcttaata aagaaccctg cggagagagc agacttgaag cagctcatgg ttcatgcctt 1380
catcaagcgc tctgatgctg aggaggtgga cttcgcaggt tggctctgtg ccaccatcgg 1440
ccttaaccag cccagtaccc cgacccacgt ggccagcatc tgagctgcgg cccggcccag 1500
acgtgctctg ccagcagccg ctatgctctg gcctctccct cgcttctctt cagacgtgcg 1560
tttcacctcc gaccagggtg cagacacagc atgtgccaag ctgtatttgt gttccttttc 1620
agtctttatt gccaccgtgt cacccgagtg gatttgcttt gtgcttaggg ctgtttgtgc 1680
tgatgatcac acacacgctg agctgaacag tgacacttgg tgatgtggtt gtcactgttc 1740
tcactccatg tggctggcct gttgcctcca gtgtctccag acttggggat gtctggtggc 1800
acttcccctg ccagggcatc tcctcagcag agagggaggc ctctgggccc ttgtccttgg 1860
cagtgcaagt ga 1872

<210> 72
<211> 393
<212> PRT
<213> 豚鼠
<400> 72

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190

Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Val Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Met Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ala Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380
Ser Thr Pro Thr His Val Ala Ser Ile
385 390

<210> 73
<211> 1257
<212> DNA
<213> 狗
<400> 73
ggagagcgag acacgggccg ctctccgctc ggagccggac gcgccttccc gcgtccaaaa 60
tgcccaagaa gaagccgacg cccatccagc tgaacccggc ccccgacggc tcggcggtga 120
acgggaccag ctcggcggag accaacctgg aggccttgca gaagaagctg gaggagctgg 180
agcttgatga gcagcagcgg aagcgccttg aggcctttct cacccagaag cagaaggtcg 240
gggaactgaa ggatgacgac ttcgagaaga tcagtgagct gggtgctggc aacggtggcg 300
tggtgttcaa ggtctcccac aagccgtccg gcctagtcat ggccagaaag ctaattcacc 360
tggagatcaa acctgcaatc cggaaccaga tcataaggga gctacaggtt ctacatgagt 420
gcaactcccc gtacatcgtg ggcttctatg gtgcattcta cagcgatggc gagatcagta 480

tctgcatgga gcacatggat gggggttcct tggatcaagt cctgaagaaa gctggaagaa 540
ttcctgaaca aattctagga aaagttagca tcgctgtaat aaaaggtctg acatacctga 600
gagagaagca caagattatg cacagagatg tcaagccttc caacatcctc gtgaactccc 660
gtggggagat caagctctgt gactttgggg tcagcgggca gctcattgac tccatggcca 720
actccttcgt gggcacaagg tcctacatgt cgccagaaag actccagggg actcattact 780
ccgtgcagtc ggacatctgg agcatggggc tctctctggt ggagatggca gttgggaggt 840
atcccatccc tcctccggat gccaaggagc tggagctgat gtttgggtgc caagtggagg 900
gagacgtggc tgagacccca cccagaccaa ggaccccggg aagacccctt agctcttatg 960
gaatggacag ccgaccgccc atggcaattt ttgagctgtt ggattacata gtcaacgagc 1020
cccctccaaa actgcccagt ggagtattca gtctggaatt tcaagatttt gtgaataaat 1080
gcttaataaa aaacccagca gagagagcag atctgaagca actcatggtt catgccttca 1140
tcaagagatc tgacggtgaa gaagtggatt ttgcaggttg gctctgctcc ccccattggc 1200
cttaaccagc ccagcacgcc gacccacgca gctggcgtct aactcgagtc tagagat 1257

<210> 74
<211> 381
<212> PRT
<213> 狗
<400> 74

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly

165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Val Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Gly Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Pro His Trp Pro
370 375 380

<210> 75
<211> 2095
<212> DNA
<213> 猫
<400> 75

agccggcaag gagttgagcg tgcggggtgc ataggcgcgg gtcgtgggag atgaagctgg 60
agaggaccaa cctggaggcc ttgcagaaga agctggagga gctggagctc gatgagcagc 120
aacggaagcg cctggaggcc tttcttaccc agaagcagaa ggtcggggaa ttgaaggatg 180
acgacttcga gaagatcagc gagctgggcg ctggcaacgg tggtgtggtg ttcaaggtct 240
cccataagcc gtctggcctg gtcatggcca gaaagctaat tcacctggag atcaaacctg 300
caatccggaa ccagatcata agggagctgc aggttctaca tgagtgcaac tccccataca 360
tcgtgggctt ctatggcgcg ttctacagcg acggcgagat cagtatctgt atggagcaca 420

tggatggggg ttccttggat caagtcctga agaaagctgg aagaattcct gaacaaattt 480
taggaaaagt tagcattgct gtaataaaag gtctgacata cctgagggag aagcacaaga 540
ttatgcacag agatgtcaag ccttccaaca tcctagtgaa ctctcgtggg gagatcaagc 600
tctgtgactt tggggtcagc gggcagctca tcgactccat ggccaactcc ttcgtgggca 660
caaggtccta catgtcgcca gaaagactcc aggggactca ttactccgtg cagtcggaca 720
tctggagcat ggggctatct ctggttgaga tggcagtcgg gaggtatccc atccctcctc 780
ccgatgccaa ggagctggag ctgatgtttg ggtgccaagt ggagggagat gcggctgaga 840
cgccacccag gccgaggacc cccggaaggc ccctcagctc gtatggaatg gacagccgac 900
ctcccatggc aatttttgag ttgttggatt acatagtcaa cgagcctcct ccaaagctgc 960
ccagtggagt attcagtctg gaatttcaag attttgtgaa taaatgcctc ataaaaaacc 1020
cagcagagag agcagatctg aaacaactca tggttcatgc ctttatcaag agatctgatg 1080
gtgaggaagt ggattttgca ggttggctct gctccaccat cggccttaac cagcccagca 1140
caccgaccca cgcggccggc gtctaagtat ctgggaagca gcaaagagcg agtcccctgc 1200
ccagtggtgt gccattgtcg ctttcaggcc tctttgccat gcctgtctcc gttcagacgt 1260
gcatttcgcc tacgacaaag gatgaagaac acagcatgtg ccaaaattct atttgtgtct 1320
tttttaatat tactgtcatt tattctgtta tttccctaag tggattggct ttgtgcttgg 1380
ggctattttt gtgtatgttg atccaaacat gcgcaacgtt cagttacagt gaaaccttgg 1440
tgactgtggg tagtcattct tactgaaaat tgcactgctc ttcccccacc gtgactggct 1500
agctgcctgt agttttggga ttcttttgac acttggtggt actgcattct tgccgggcgc 1560
accttccttc tgttggggta ggagccttgt aagatccttc acaggcactg catgtgaagc 1620
atgctttgct gctatgaaaa agaacatcag aaagtataga tcttgttatt ttattatatt 1680
tttgcttttg gtgtagaatg aagcaatttc tgtcaaaatc tagccagagc ccttcactgc 1740
cacgatagct ggggcttcac cagtctgtct actgtgatga tttgtagact tctggttgta 1800
tttctatatt tattttaaaa tatattatgt gggatattta gtggtatgtg tctctttaag 1860
tttgaattag tgtttctaaa atgatggtta ctttgaatgt tacaaatgga tcaaggcatt 1920
aaaatgtatg agatttatct ttccccaaat ccaagtaccg atgctattgt aaacaacagt 1980
gtgtatagtg cctaagaatt gtatgaaaat ccttttaacc atttcaaccc agatgtttaa 2040
caaatctaat ctcttattct aataaatata ctatcaagtt aaaaggatga aaaaa 2095

<210> 76
<211> 371
<212> PRT
<213> 猫
<400> 76

Met Lys Leu Glu Arg Thr Asn Leu Glu Ala Leu Gln Lys Lys Leu Glu
1 5 10 15
Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys Arg Leu Glu Ala Phe Leu
20 25 30
Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Lys
35 40 45

Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly Val Val Phe Lys Val Ser
50 55 60
His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg Lys Leu Ile His Leu Glu
65 70 75 80
Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile Arg Glu Leu Gln Val Leu
85 90 95
His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr
100 105 110
Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu His Met Asp Gly Gly Ser
115 120 125
Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg Ile Pro Glu Gln Ile Leu
130 135 140
Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Arg Glu
145 150 155 160
Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Val
165 170 175
Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Val Ser Gly Gln
180 185 190
Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val Gly Thr Arg Ser Tyr Met
195 200 205
Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr Ser Val Gln Ser Asp Ile
210 215 220
Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met Ala Val Gly Arg Tyr Pro
225 230 235 240
Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu Leu Met Phe Gly Cys Gln
245 250 255
Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro Arg Pro Arg Thr Pro Gly
260 265 270
Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser Arg Pro Pro Met Ala Ile
275 280 285
Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu Pro Pro Pro Lys Leu Pro
290 295 300
Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp Phe Val Asn Lys Cys Leu
305 310 315 320
Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu Lys Gln Leu Met Val His
325 330 335
Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Gly Glu Glu Val Asp Phe Ala Gly Trp
340 345 350
Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro Ser Thr Pro Thr His Ala

355 360 365

Ala Gly Val
370

<210> 77
<211> 2405
<212> DNA
<213> 牛
<400> 77

ccggttgact gagggagagt gggagggaat cccgggctgc cgagctgcgc cggcggggaa 60
gcccttcggt tccctgtgca ctgagcaagt gggccggggg gttcccccag accgccactg 120
gccctttggc cctgacggga ccgcgcaggg cgcgcccccc gaaggcagcc ttcgggcttg 180
cggcccagac ttggccccgc gaggccggcg cggggcagct cagagggagg aagctagagg 240
ggccgccctc agagttggga gcgcctttcc tgggtccaaa atgcccaaga agaagccgac 300
gcccatccag ctgaacccgg ccccggacgg ctccgcggtt aacgggacca gctcggcgga 360
gaccaacctg gaggccttgc agaagaagct ggaggagctg gagctcgatg aacagcagcg 420
gaagcgcctc gaggcctttc tgacccagaa gcagaaggtg ggggaactga aggatgatga 480
ctttgagaag atcagtgagc tgggtgccgg caatggaggt gtggtgttca aggtctccca 540
caagccgtcc ggacttgtta tggccagaaa gctaattcac ctggagatca aacctgccat 600
ccggaaccag atcataaggg agctgcaggt tctccatgag tgcaactcgc cttatatcgt 660
gggcttctac ggggcgttct acagcgacgg cgagatcagc atctgcatgg agcacatgga 720
tgggggttcc ttggatcaag ttctgaagaa agctggaaga attcctgaac aaattttagg 780
aaaagttagc attgctgtaa taaaaggcct gacatacctg agggagaagc acaagattat 840
gcacagagat gtcaagccgt ccaacatcct agtgaacagc cgtggagaga tcaagctctg 900
tgactttggg gtcagcgggc agctcatcga ctccatggcc aactccttcg tgggcaccag 960
gtcctacatg tcgccagagc gactccaggg gacccattac tccgtgcagt cggacatctg 1020
gagcatgggg ctctctctgg ttgagatggc tgtcgggagg tatcccatcc ctcctccaga 1080
tgccaaggag ctggagctga tgtttgggtg ccaggtggag ggagatgcgg ctgagacccc 1140
gcccaggcca aggacccccg ggaggcccct cagctcttat ggaatggaca gccgacctcc 1200
aatggcaatt tttgagttgt tggattacat agtcaatgag cctcctccaa aactgcccag 1260
tggagtattc agtctggaat ttcaagattt tgtgaataaa tgcttaataa aaaacccccgc 1320
agagagagca gatttgaagc aactcatggt tcatgctttt atcaagagat ctgatgctga 1380
ggaagtggat tttgcaggtt ggctctgctc caccatcggc cttaaccaac ccagcacacc 1440
cacccatgcg gctggcgtct aagtggttgg gaagcagcag tccctgccca agggcatgca 1500
ctgttgcttc cgggcagcct tcccatgcct gtctctgttc agacgtgcat ttcacctatg 1560
acaaaggatg aagaacacag catgtgccaa aattctattt gtgtcatttt caatattatc 1620
atctttactc ttattactat tgttattccc ctaagtggat tggctttgtg cttggggcta 1680
tttttgtgta tattgatgat gaagacatgt gcaatgtaga attacagtga aactctggtg 1740
actgtgggta gtcattctta ctgaaaactg cactgctttc ccacaccatg aactggctgg 1800
tcgcctctat tttcgggatt ctttgacact tggtggtact tcattcttgc caggcatacc 1860

ttctaactga gtaggaagga gccttgtaag atccttcaca ggcagtgcat gtgaagcatg 1920
ctttgctgct ataaaaatga gcatcagaaa gtgtgtatca tgttatttta ttatgttctt 1980
gcttttggtg tagaattcag caaattttca tcaaaatcta gccagagccc ttcactgcca 2040
tgatagctgg ggcttcacca gtctgtctac tgtgatgatt tgtagacttc tggttgtatt 2100
tctgtattta tttttaaatc taccgtgtgg atatttagtg ctatgtctct ttaagtttgg 2160
attagtgttt ctaaaatggt ggagttgctc tgaatgttac aaatggatca aggcattaaa 2220
atgaatgaga tctacctttc accaagtact gatgctattg taaacaacag tgtgtatagt 2280
gcctaacaac tgtatgaaaa tccttttacc attttaatcc agatgtttaa caagcctaat 2340
ctcttactct aataaatata ctatcaaatt caaaggaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2400
aaaaa 2405

<210> 78
<211> 393
<212> PRT
<213> 牛

<400> 78

Met Pro Lys Lys Lys Pro Thr Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190

Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val
210 215 220
Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240
Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255
Ala Val Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu
260 265 270
Leu Met Phe Gly Cys Gln Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro
275 280 285
Arg Pro Arg Thr Pro Gly Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser
290 295 300
Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu
305 310 315 320
Pro Pro Pro Lys Leu Pro Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp
325 330 335
Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu
340 345 350
Lys Gln Leu Met Val His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu
355 360 365
Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro
370 375 380
Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390

<210> 79
<211> 2146
<212> DNA
<213> 马(Equus caballus)
<400> 79
caagtgggaa agcttgggat gcgtggagga gccagctact agtttagtgt gctgggtgcg 60
tcggtgcagg tcgcaggaga tgaagccgga gaggaccaac ctggaggcct tgcagaagaa 120
gctggaggag ctggagctcg atgaacagca gcgaaagcgc cttgaggcct ttcttactca 180
gaagcagaag gttggggaac tgaaggatga tgactttgag aagatcagtg agctgggtgc 240
tggcaatggt ggtgtggtat tcaaggttgc ccacaaaccg tctggtttgg tcatggccag 300
aaagctaatt cacctggaga tcaagcctgc aatccggaac cagatcataa gggagctgca 360
ggttctacat gagtgcaact ccccatatat tgtgggcttc tatggcgcat tctacagcga 420
tggtgagatc agcatctgca tggagcacat ggatgggggt tccttggatc aagtcctaaa 480

gaaagctgga agaattcctg agcaaatttt aggaaaagtt agcattgctg taataaaagg 540
cctgacgtat ctgagggaga agcacaagat tatgcacaga gatgtcaagc cctccaacat 600
cctagtgaac tcccgtgggg agatcaagct gtgtgatttt ggggtcagcg ggcagctcat 660
cgactccatg gccaactcct tcgtgggcac aaggtcttac atgtcgccgg aaagactcca 720
ggggactcat tattcagtgc agtcggacat ctggagcatg gggctctctc tggttgagat 780
ggcggtcggg aggtatccca tccctcctcc agatgccaag gagctggagc tgatgtttgg 840
gtgccaagtg gagggagatg cggctgagac tccgcctagg ccaaggaccc ctggaagacc 900
cctcagctct tatggaatgg acagccgacc tcctatggca atttttgagt tactggatta 960
catagtcaac gagcctcctc ccaagctgcc cagtggagta ttcagtctgg aatttcagga 1020
ttttgtgaat aaatgcttaa tcaaaaaccc tgcagagaga gcagatttga agcaactcat 1080
ggttcacgct tttatcaaga gatctgatgc cgaggaagtg gattttgcag gttggctctg 1140
ctccaccatt ggccttaacc agcccagcac accaacccac gcggctggcg tctaagcgtt 1200
tgggaagcag caaaaagcga gccccctgcc gcgtggtgtg ccatgttgct ttcgggcctc 1260
cttcccatgc ctgtctgttc acacgtgcat ttcacctgtg acaaaggatg aagaacacag 1320
catgtgccaa aattctattt gtgtcatttt taatagtact gtctttattc ttattactat 1380
tgttattccc ctaagtggat tggctttgtg cttgggacta ttttgtgtat gttgatgatc 1440
aaaacatgcg caatgttgaa ttaccgtgaa actggtgact gtgggtagtc cttcttattg 1500
aaaattgcac tgctcttccc tccctgtcac tggctggctg cctgtatttc tggggttctt 1560
tgacacttgg tggtacttca ttcttgcagg gcatacctcc tattcgagta ggaaggagcc 1620
tttaagatcc ttcacaggca gtgcatgtga agcatgcttt gctgctatga aaatgagcat 1680
cagaaagtgt atatcatgtt attttattat tattatgttt ttgcttttgg tgtagaattc 1740
agcaatttcc atcaagatct agccagagcc cttcactgcc atgatagctg gggcttcacc 1800
agtctgccta ctgtgatgat ttgtagactt ctggttgtat ttctatattt atttttaaat 1860
atactgtgtg ggatatttag tggtatatgt ctctctaagt ttggagtggt gtttctaaaa 1920
tggagttact ttgaatgtta tagatggatc aaggcataaa atgtatgaga tttatttttc 1980
cccaaatcca aatactgatg ctattgtaaa caacaaacag tgtgtatagt gcctaaaaat 2040
tgtatgaaag tccttttaac cattttaatc cagatgttta acaaatctaa tctcttattc 2100
taataaatat actatcaagt taaacggaca aaagatttct actttc 2146

<210> 80
<211> 371
<212> PRT
<213> 马
<400> 80

Met Lys Pro Glu Arg Thr Asn Leu Glu Ala Leu Gln Lys Lys Leu Glu
1 5 10 15
Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys Arg Leu Glu Ala Phe Leu
20 25 30
Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys Asp Asp Asp Phe Glu Lys
35 40 45

Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly Val Val Phe Lys Val Ala
50 55 60
His Lys Pro Ser Gly Leu Val Met Ala Arg Lys Leu Ile His Leu Glu
65 70 75 80
Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile Arg Glu Leu Gln Val Leu
85 90 95
His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr
100 105 110
Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu His Met Asp Gly Gly Ser
115 120 125
Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg Ile Pro Glu Gln Ile Leu
130 135 140
Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly Leu Thr Tyr Leu Arg Glu
145 150 155 160
Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro Ser Asn Ile Leu Val
165 170 175
Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp Phe Gly Val Ser Gly Gln
180 185 190
Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val Gly Thr Arg Ser Tyr Met
195 200 205
Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr Ser Val Gln Ser Asp Ile
210 215 220
Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met Ala Val Gly Arg Tyr Pro
225 230 235 240
Ile Pro Pro Pro Asp Ala Lys Glu Leu Glu Leu Met Phe Gly Cys Gln
245 250 255
Val Glu Gly Asp Ala Ala Glu Thr Pro Pro Arg Pro Arg Thr Pro Gly
260 265 270
Arg Pro Leu Ser Ser Tyr Gly Met Asp Ser Arg Pro Pro Met Ala Ile
275 280 285
Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val Asn Glu Pro Pro Pro Lys Leu Pro
290 295 300
Ser Gly Val Phe Ser Leu Glu Phe Gln Asp Phe Val Asn Lys Cys Leu
305 310 315 320
Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala Asp Leu Lys Gln Leu Met Val His
325 330 335
Ala Phe Ile Lys Arg Ser Asp Ala Glu Glu Val Asp Phe Ala Gly Trp
340 345 350
Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn Gln Pro Ser Thr Pro Thr His Ala

355 360 365

Ala Gly Val

370

<210> 81

<211> 2274

<212> DNA

<213> 鸡

<400> 81

ctaaccaggc gggagctgtc ggtgcggagc tcggtgtcgc tccgccgggc aggccgggtc 60
gacggccgcg ctgtgccgga gcggcagcgt cgcgggctcg gctccttctc ggggaggcgg 120
ccgcgcgctg ctccggcgct gaggggcggc cccgaagttt gcttcgcgtc gggaagtccg 180
tcggacctgg ccgaagtggg gccgcggccg ctccgtccgt cacgctctgc gctggccggg 240
gggcaacatg cccaagaaga agccagggcc gatccagctc aaccccgctc cggatggctc 300
cgccgtcaac gggaccagct ctgccgagac aaacttggaa gctcttcaga agaagctgga 360
agagctagag ctggatgaac agcaaaggaa gcgccttgaa gctttcctta cccagaaaca 420
aaaagttggg gagctgaagg atgatgactt cgagaagatc agtgagctgg gagcagggaa 480
tggcggggtg gtgttcaaag tatctcacaa gccttctggc ctcatcatgg caagaaaatt 540
gattcatcta gaaatcaagc cagctattcg aaaccagatc atccgtgagc tgcaggttct 600
acatgagtgc aattcaccat acatagtggg cttttatgga gctttttaca gtgatgggga 660
aatcagcatt tgcatggaac acatggatgg tggctcattg gatcaagtgc tgaaaaaggc 720
tggaagaatt ccagagcaga tactgggcaa agtcagcatt gcagtaataa aaggactcac 780
atatctgaga gaaaagcata aaataatgca cagagatgtt aaaccatcta acatcttggt 840
aaactctaga ggtgagatca agctttgtga ttttggtgtc agtggacaac tgatagattc 900
tatggcaaac tcatttgttg gcacgcgctc ctacatgtct ccggaaagac tgcagggaac 960
tcattattca gtgcagtcag atatatggag tatggggctg tctctggtag aaatggccat 1020
tggcagatac ccgattcctc ctcctgactc taaggagctc gagttgatgt ttggctgccc 1080
ggtagaggga gattctccag tcacagagac ctcacccagg caaagaacac ctggtcgacc 1140
aatgagctcc tatggaccag acagcagacc cccgatggca atctttgaac ttctggatta 1200
catcgtcaat gagccacctc caaaactgcc caatggtgtc tttggttctg aatttcaaga 1260
ttttgttaac aaatgtttaa ttaaaaatcc tgctgagaga gctgatttga agcagctgat 1320
gattcacgct ttcattaaga gatctgaagc agaggaggtg gattttgcag gatggctttg 1380
ctcaaccata ggccttaacc aaccgagtac acccacgcat gctgctggag tctgaatgtg 1440
gaagagcaaa tcctgtcccg tacatctgtt aacagcgcta ctttggtcct atttcctaag 1500
cttgtacctg ttcaaacatg tatttcacct cttaaggaag aatgtcttta tagcatgtgc 1560
caaattgttt tcaattttgt catcaactaa ttggtattgt actgggttac atttgtttgc 1620
tgaccaaaat gtaaaatgtt taagttacag tgcttgctga ttttaagtga ttatggaatt 1680
atggatattc tttcttaatg aaaatatcac tgggggggaa tttacccctg gattgtttga 1740
actttatcaa gactctttgt aaactgttgg tacttcagtc atgcttacct aatctcccat 1800
gcaaaaaaag gggtagggat gctccaaaac tgtatctgtt gagcatgctt ttgctgctgc 1860

caaactgtat cttggaagtt aggcctaatg gttccaattt ggtgttgtgt agagatcact 1920
ctttccaggt aaagaaggta agagctctgc attccttggg atggacaggg cagtatccta 1980
cttgtagact tgttcatatt tctatattta tttttaaaat gtatcatcat acttggattt 2040
agtgatatat gtctttccaa ttgatttta aaggttagct ctcagaagcg tcctacagaa 2100
tcatgacaaa gatctgggct ttcttttaac cttaagattc atgacagctg tgtttggtgt 2160
ctaaaatgta tgaagatcct ctattgtttt attctctcag atgtttagca atggtttctc 2220
ttaataaata tattatcaag taaaaaaaaa aaaaaaataa aaaaaaaaaa aaaa 2274

<210> 82
<211> 395
<212> PRT
<213> 鸡
<400> 82

Met Pro Lys Lys Lys Pro Gly Pro Ile Gln Leu Asn Pro Ala Pro Asp
1 5 10 15
Gly Ser Ala Val Asn Gly Thr Ser Ser Ala Glu Thr Asn Leu Glu Ala
20 25 30
Leu Gln Lys Lys Leu Glu Glu Leu Glu Leu Asp Glu Gln Gln Arg Lys
35 40 45
Arg Leu Glu Ala Phe Leu Thr Gln Lys Gln Lys Val Gly Glu Leu Lys
50 55 60
Asp Asp Asp Phe Glu Lys Ile Ser Glu Leu Gly Ala Gly Asn Gly Gly
65 70 75 80
Val Val Phe Lys Val Ser His Lys Pro Ser Gly Leu Ile Met Ala Arg
85 90 95
Lys Leu Ile His Leu Glu Ile Lys Pro Ala Ile Arg Asn Gln Ile Ile
100 105 110
Arg Glu Leu Gln Val Leu His Glu Cys Asn Ser Pro Tyr Ile Val Gly
115 120 125
Phe Tyr Gly Ala Phe Tyr Ser Asp Gly Glu Ile Ser Ile Cys Met Glu
130 135 140
His Met Asp Gly Gly Ser Leu Asp Gln Val Leu Lys Lys Ala Gly Arg
145 150 155 160
Ile Pro Glu Gln Ile Leu Gly Lys Val Ser Ile Ala Val Ile Lys Gly
165 170 175
Leu Thr Tyr Leu Arg Glu Lys His Lys Ile Met His Arg Asp Val Lys
180 185 190
Pro Ser Asn Ile Leu Val Asn Ser Arg Gly Glu Ile Lys Leu Cys Asp
195 200 205
Phe Gly Val Ser Gly Gln Leu Ile Asp Ser Met Ala Asn Ser Phe Val

210 215 220

Gly Thr Arg Ser Tyr Met Ser Pro Glu Arg Leu Gln Gly Thr His Tyr
225 230 235 240

Ser Val Gln Ser Asp Ile Trp Ser Met Gly Leu Ser Leu Val Glu Met
245 250 255

Ala Ile Gly Arg Tyr Pro Ile Pro Pro Pro Asp Ser Lys Glu Leu Glu
260 265 270

Leu Met Phe Gly Cys Pro Val Glu Gly Asp Ser Pro Val Thr Glu Thr
275 280 285

Ser Pro Arg Gln Arg Thr Pro Gly Arg Pro Met Ser Ser Tyr Gly Pro
290 295 300

Asp Ser Arg Pro Pro Met Ala Ile Phe Glu Leu Leu Asp Tyr Ile Val
305 310 315 320

Asn Glu Pro Pro Pro Lys Leu Pro Asn Gly Val Phe Gly Ser Glu Phe
325 330 335

Gln Asp Phe Val Asn Lys Cys Leu Ile Lys Asn Pro Ala Glu Arg Ala
340 345 350

Asp Leu Lys Gln Leu Met Ile His Ala Phe Ile Lys Arg Ser Glu Ala
355 360 365

Glu Glu Val Asp Phe Ala Gly Trp Leu Cys Ser Thr Ile Gly Leu Asn
370 375 380

Gln Pro Ser Thr Pro Thr His Ala Ala Gly Val
385 390 395

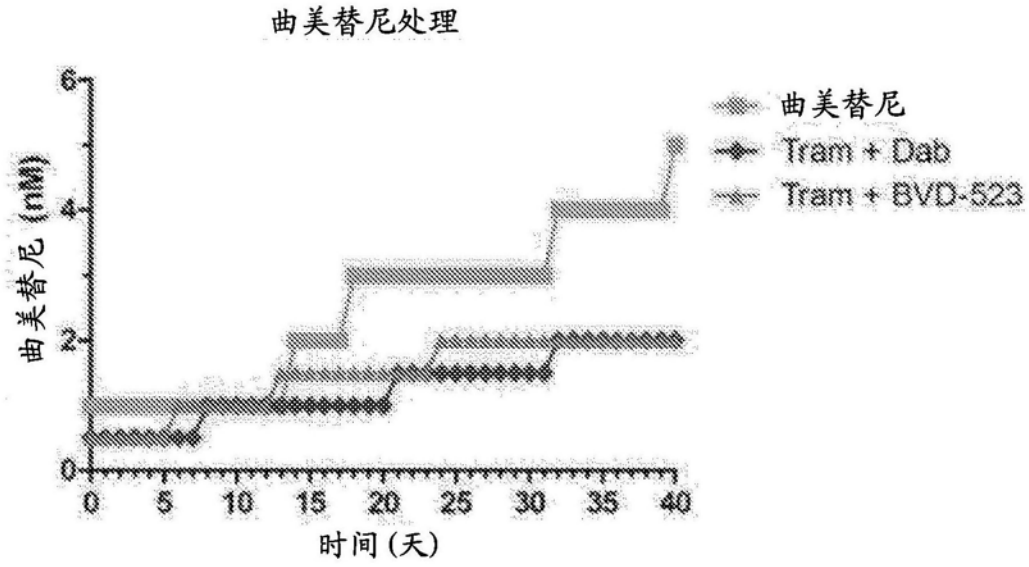

曲美替尼处理
曲美替尼
Tram + Dab
Tram + BVD-523
曲美替尼 (nM)
0
2
4
6
0 5 10 15 20 25 30 35 40
时间(天)

图1A

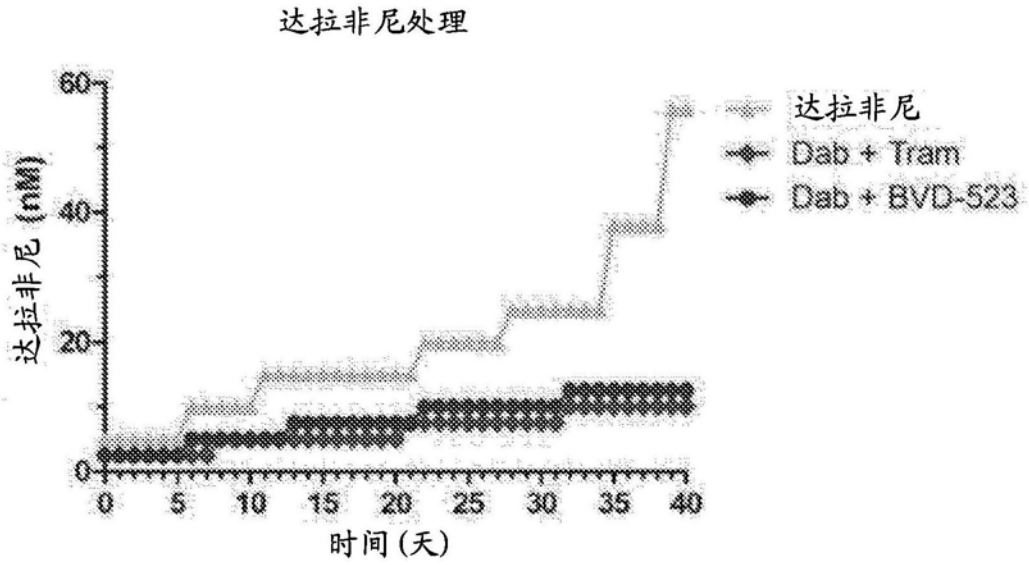

达拉非尼处理
达拉非尼
Dab + Tram
Dab + BVD-523
达拉非尼 (nM)
0
20
40
60
0 5 10 15 20 25 30 35 40
时间(天)

图1B

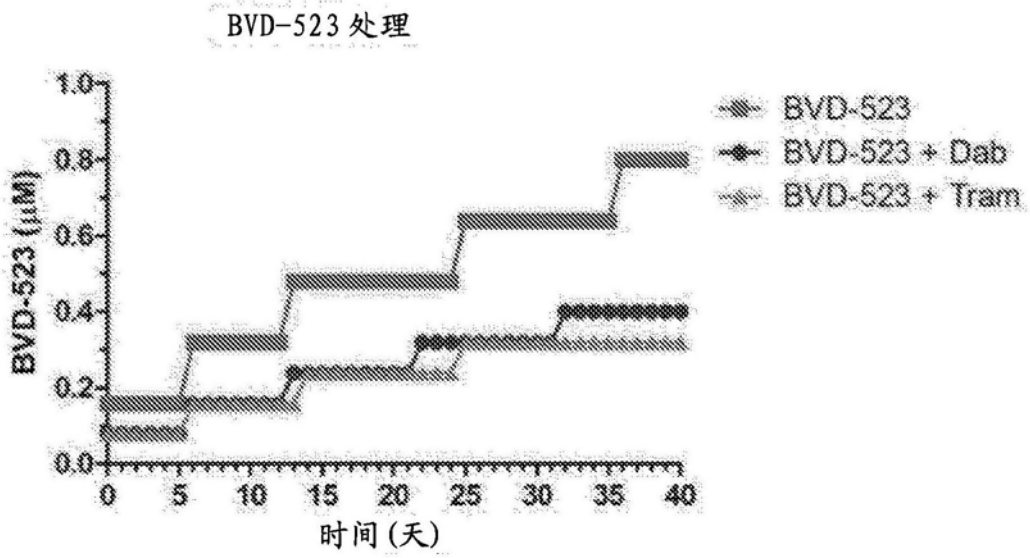

BVD-523 处理
BVD-523
BVD-523 + Dab
BVD-523 + Tram
BVD-523 (μM)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
时间 (天)

图1C

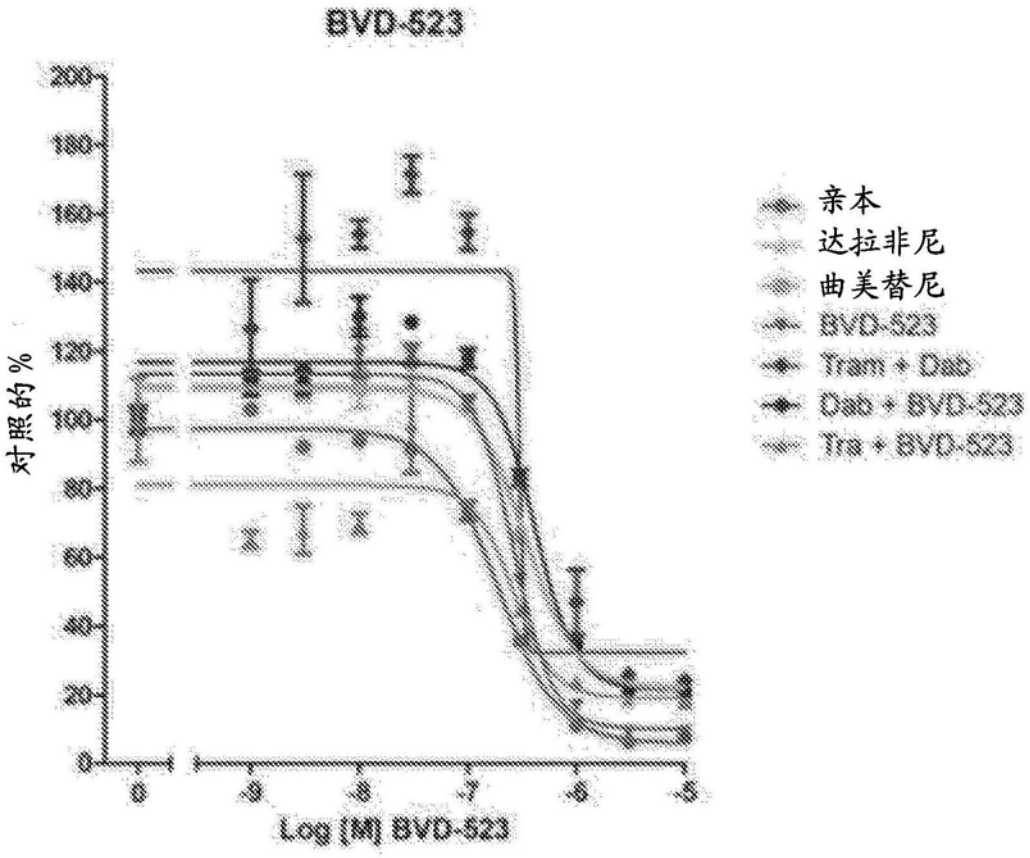

BVD-523
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2A

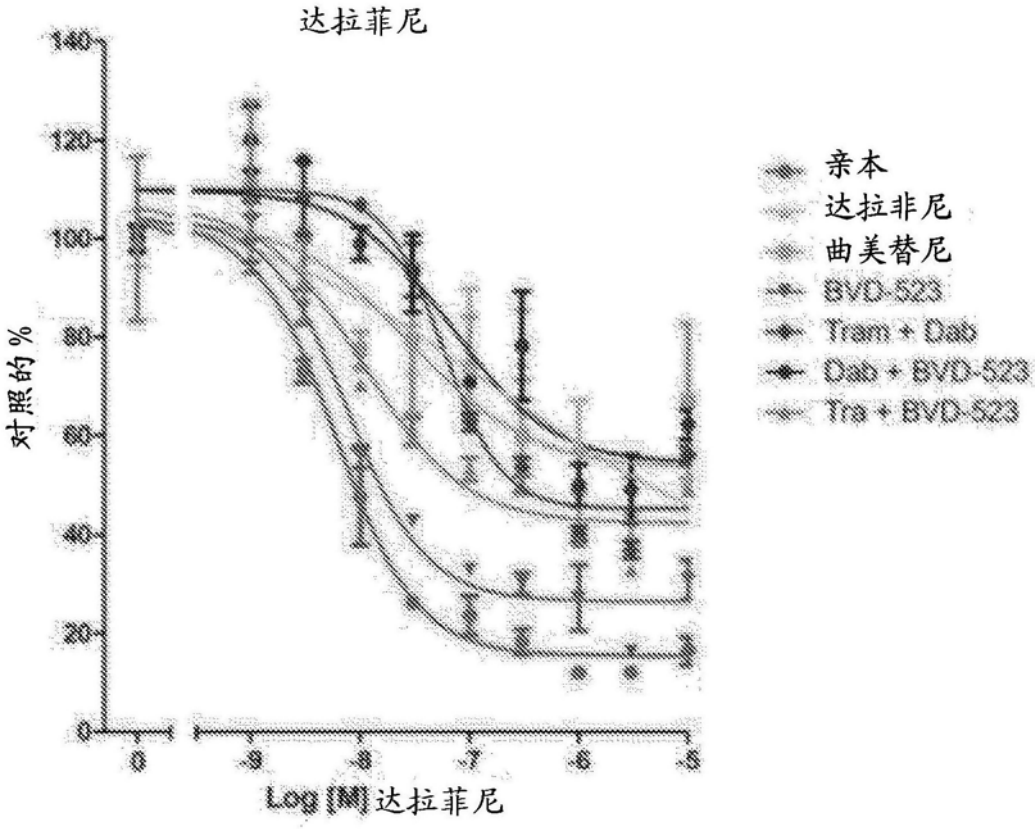

达拉菲尼
对照的 %
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M]达拉菲尼
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2B

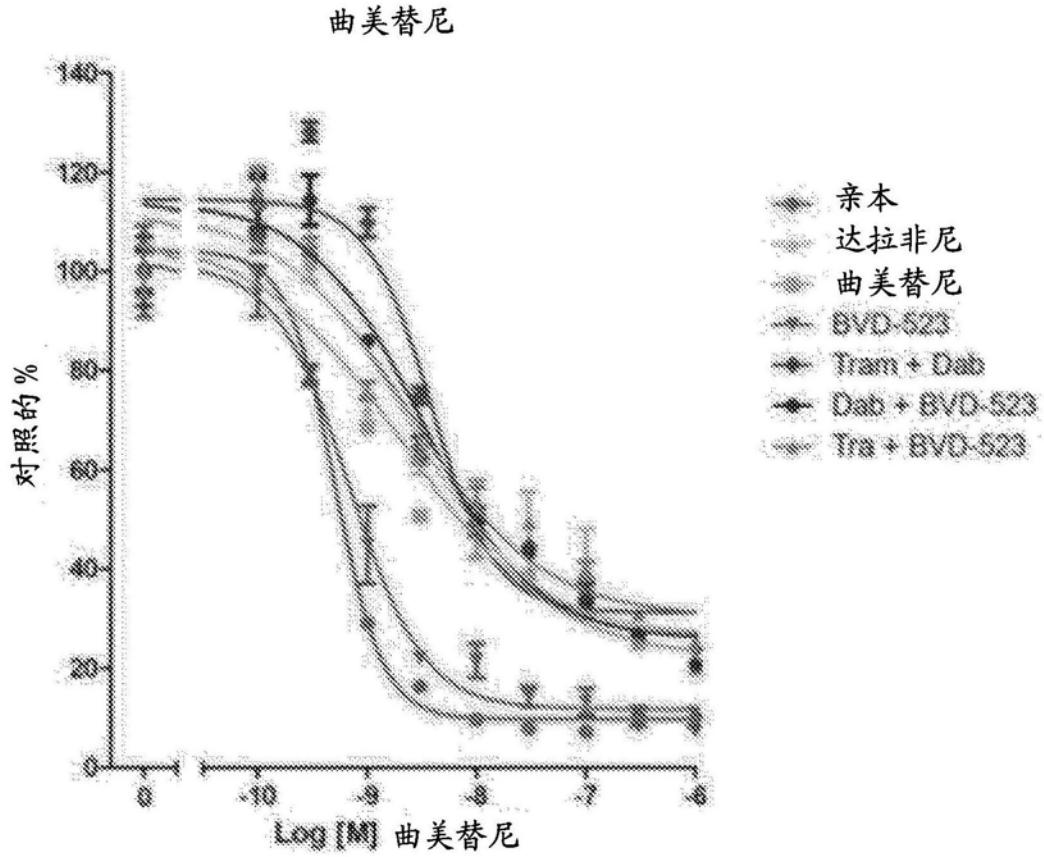

曲美替尼
对照的 %
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2C

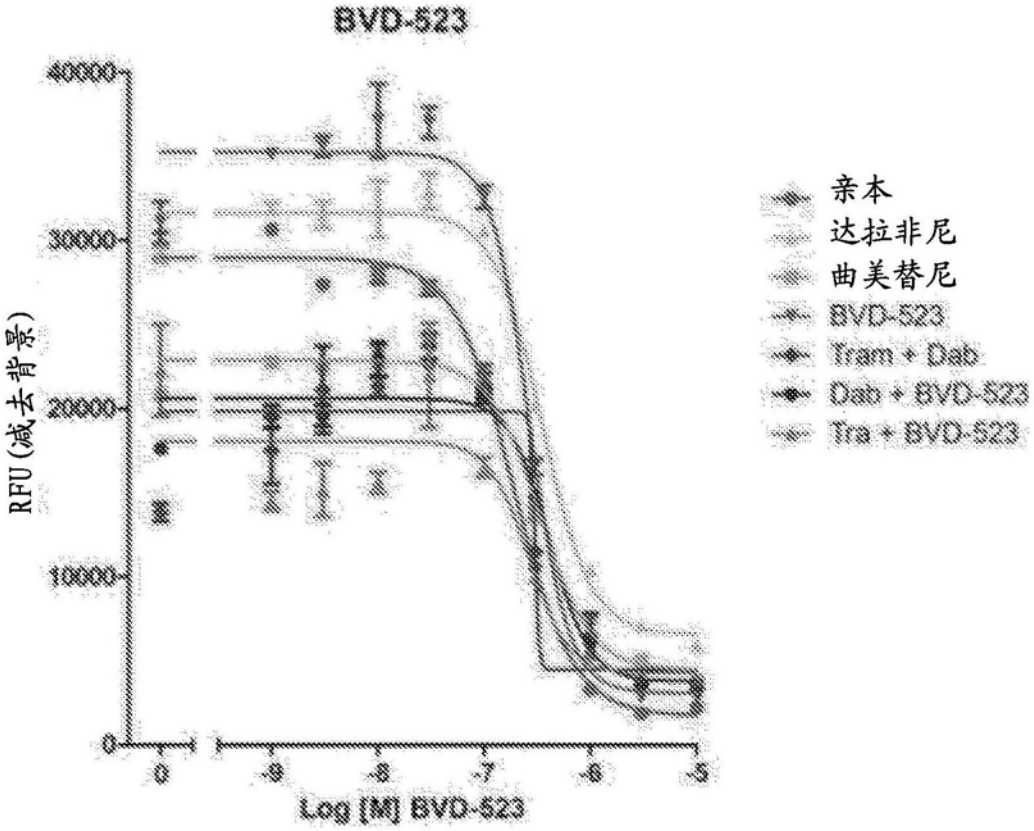

BVD-523
40000
30000
20000
10000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2D

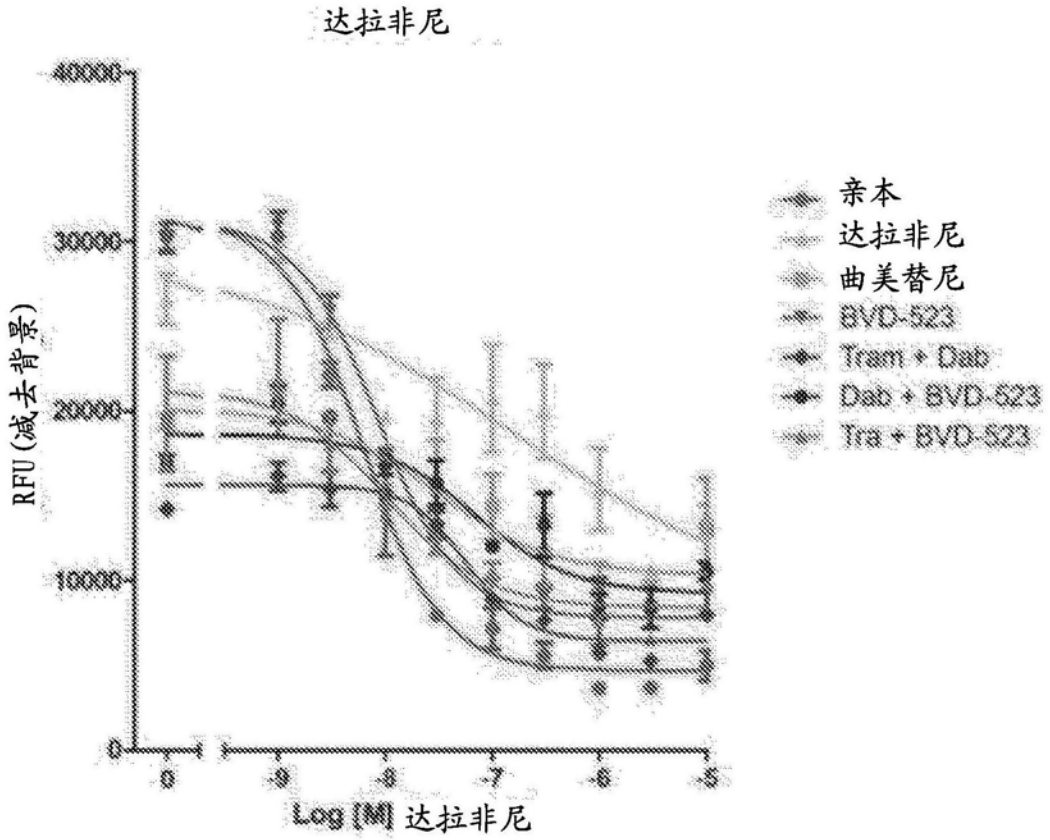

达拉非尼
40000
30000
20000
10000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2E

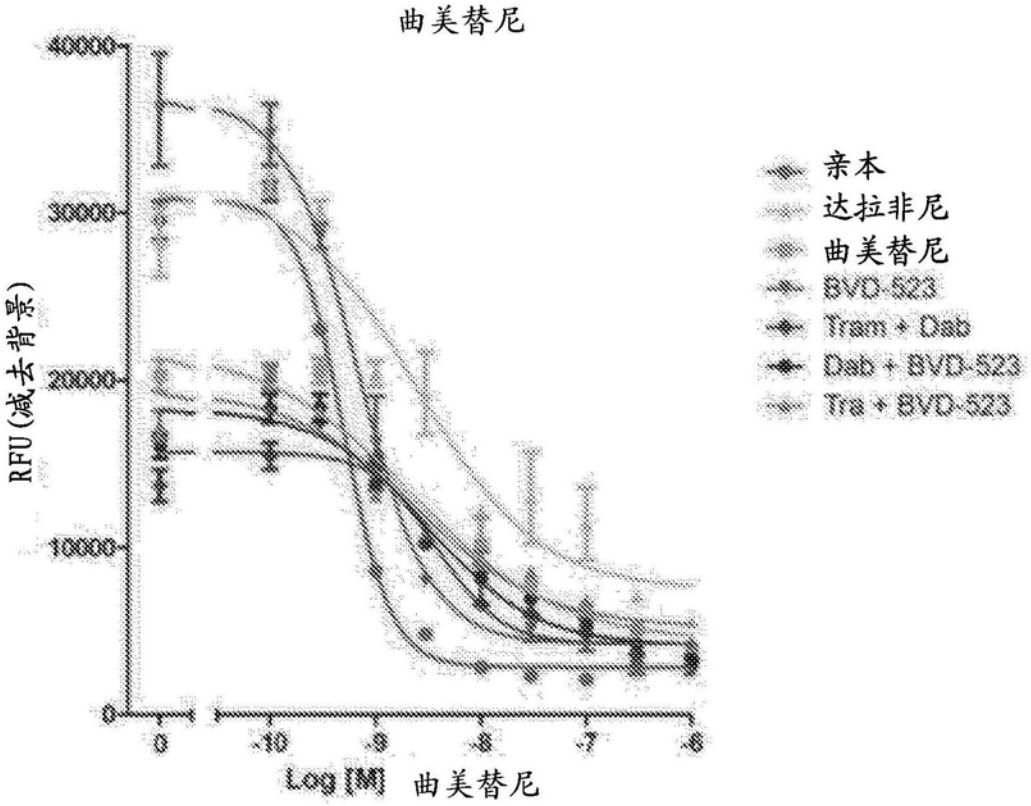

曲美替尼
40000
30000
20000
10000
0
RFU(减去背景)
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M]
曲美替尼
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2F

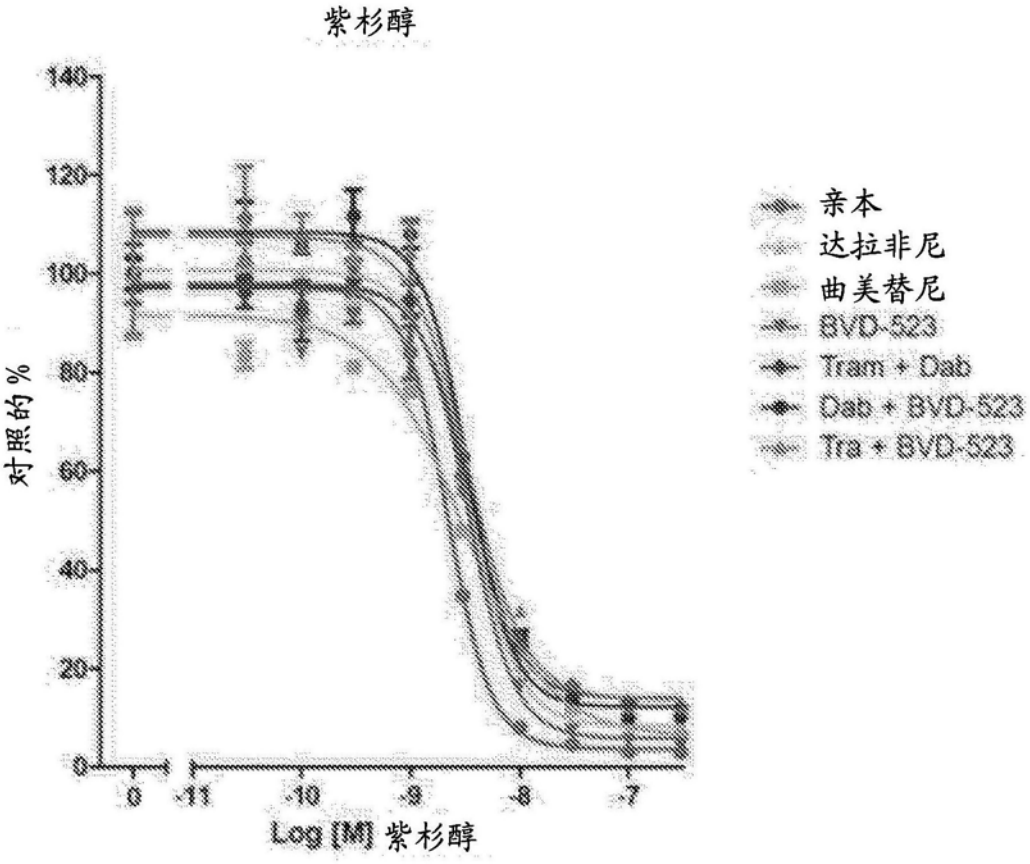

紫杉醇
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2G

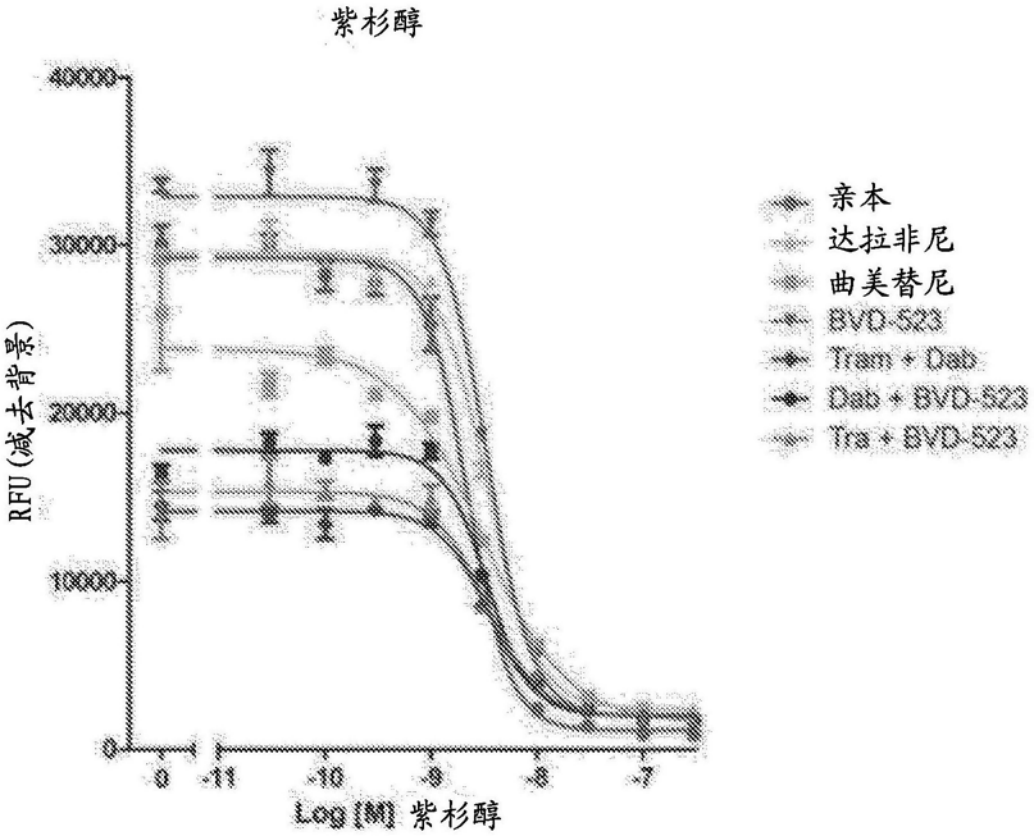

紫杉醇
RFU(减去背景)
40000
30000
20000
10000
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图2H

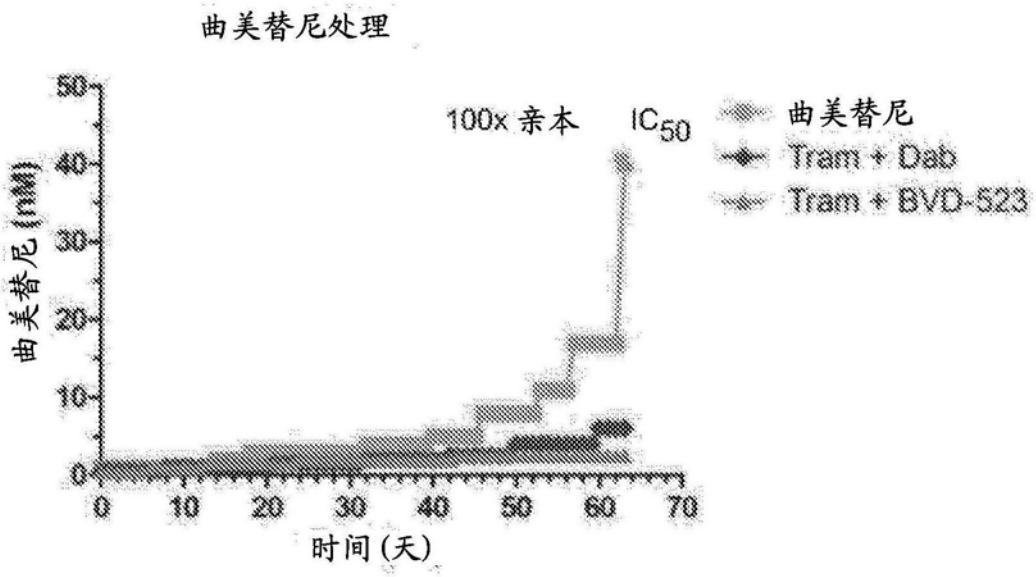

曲美替尼处理
曲美替尼 (nM)
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
40
50
60
70
时间 (天)
100x 亲本
IC50
曲美替尼
Tram + Dab
Tram + BVD-523

图3A

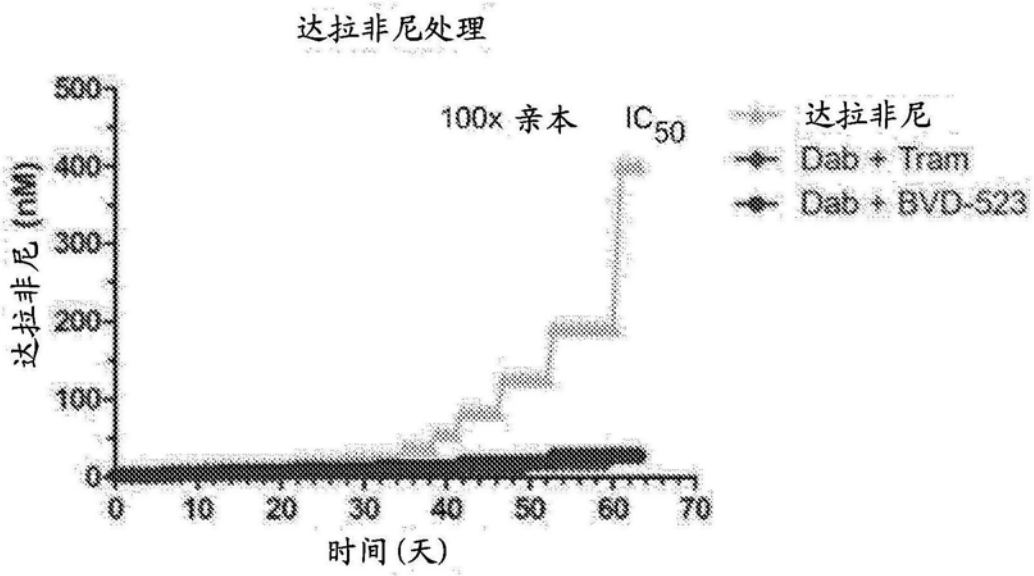

达拉非尼处理
100x 亲本 IC50
达拉非尼
Dab + Tram
Dab + BVD-523
达拉非尼 (nM)
500
400
300
200
100
0
0 10 20 30 40 50 60 70
时间 (天)

图3B

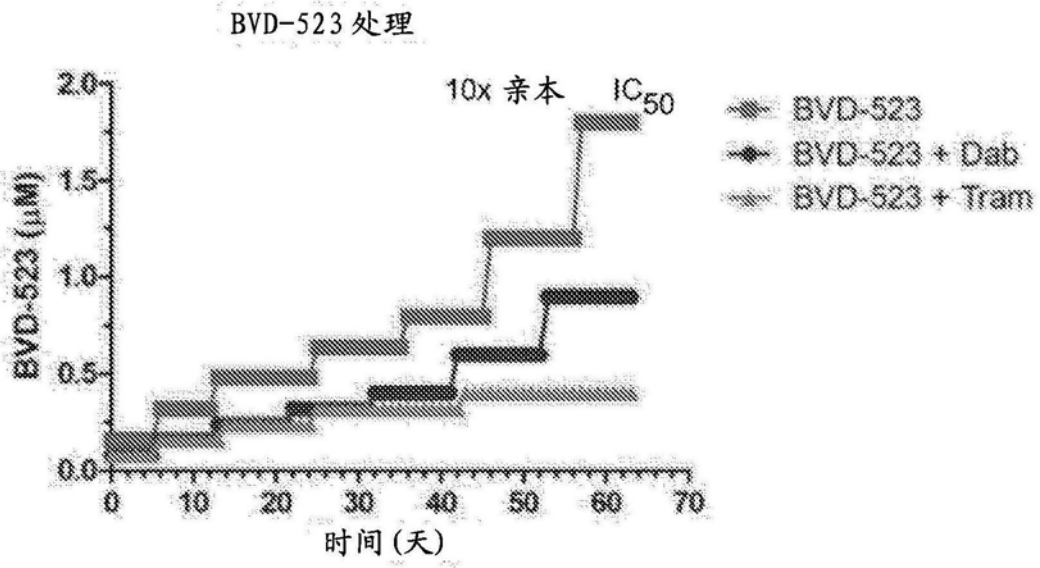

BVD-523 处理
10x 亲本 IC50
BVD-523
BVD-523 + Dab
BVD-523 + Tram
BVD-523 (μM)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70
时间 (天)

图3C

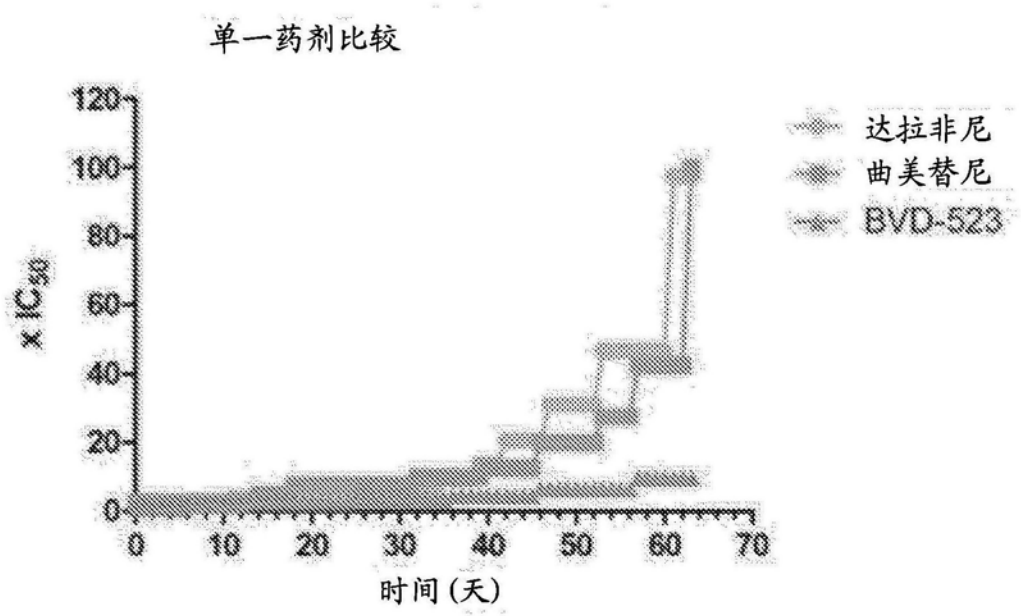

单一药剂比较
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
x IC50
120
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
60
70
时间(天)

图3D

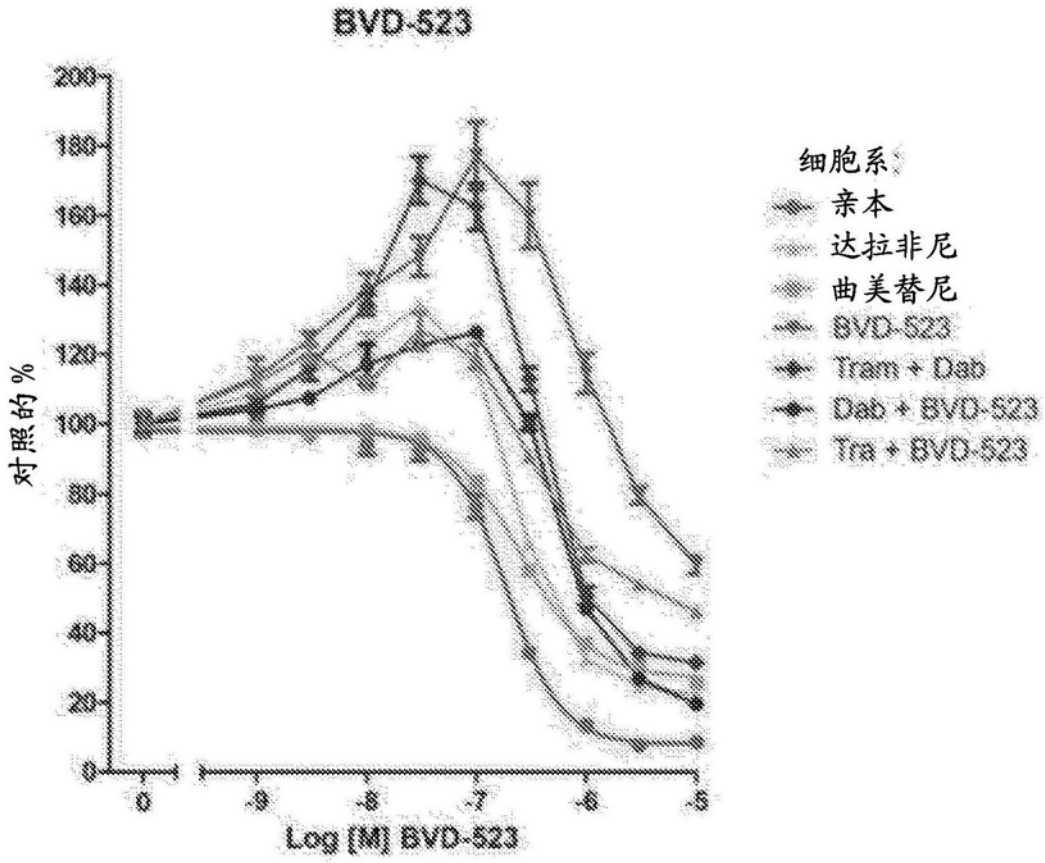

BVD-523
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523

图4A

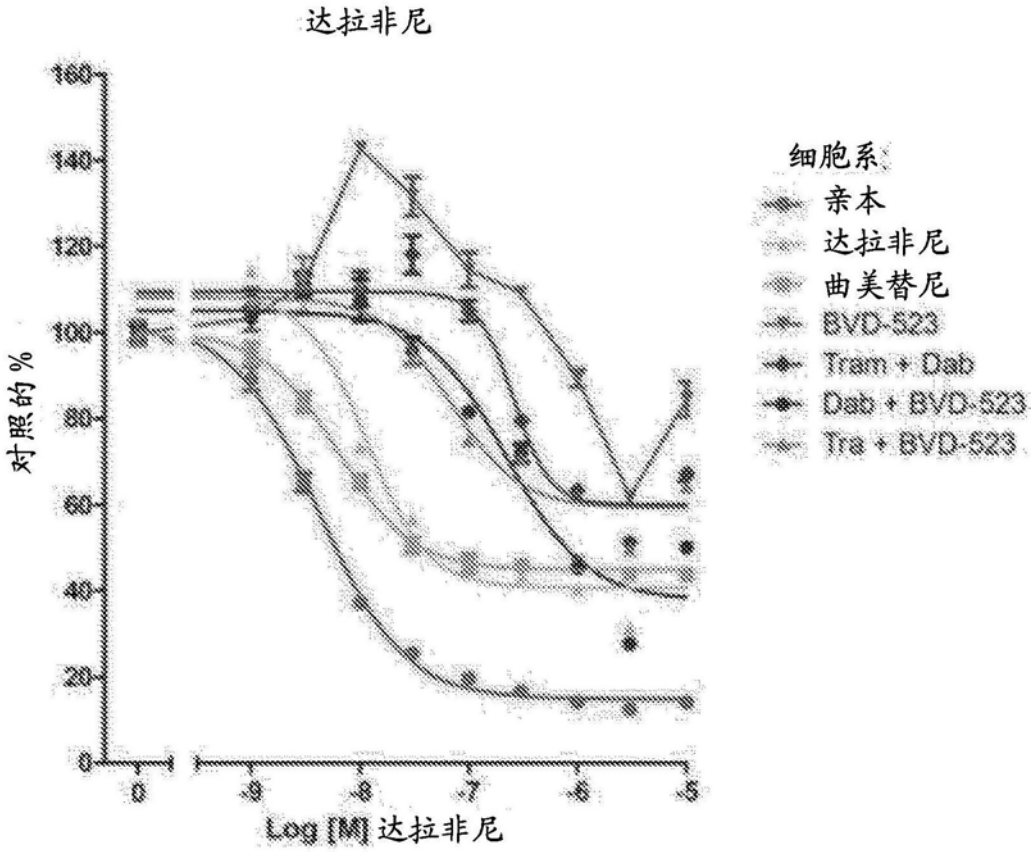

达拉非尼
对照的 %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
细胞系
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4B

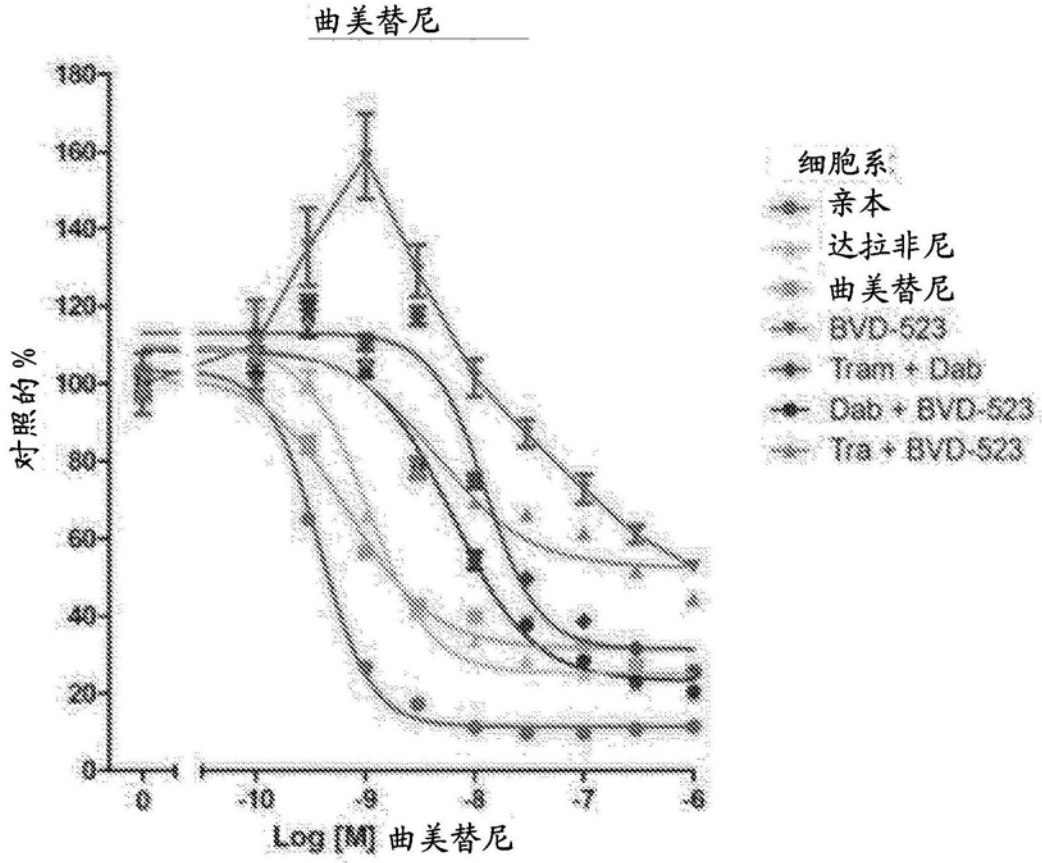

曲美替尼
对照的 %
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
细胞系
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4C

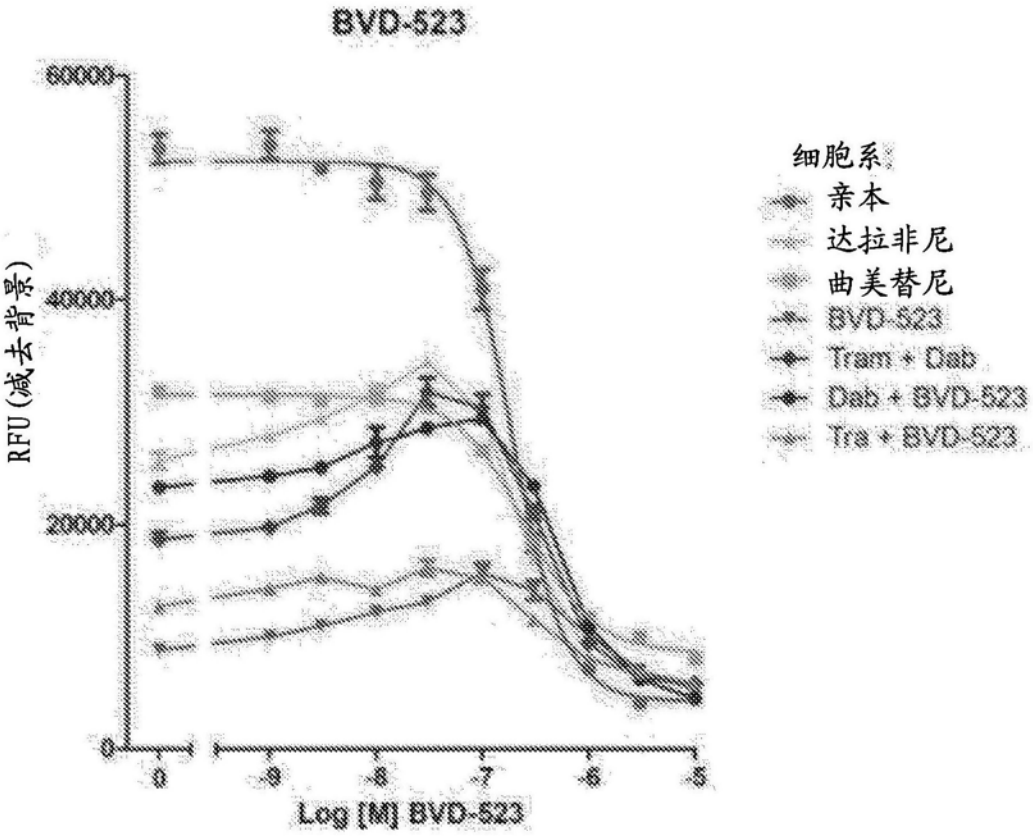

BVD-523
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4D

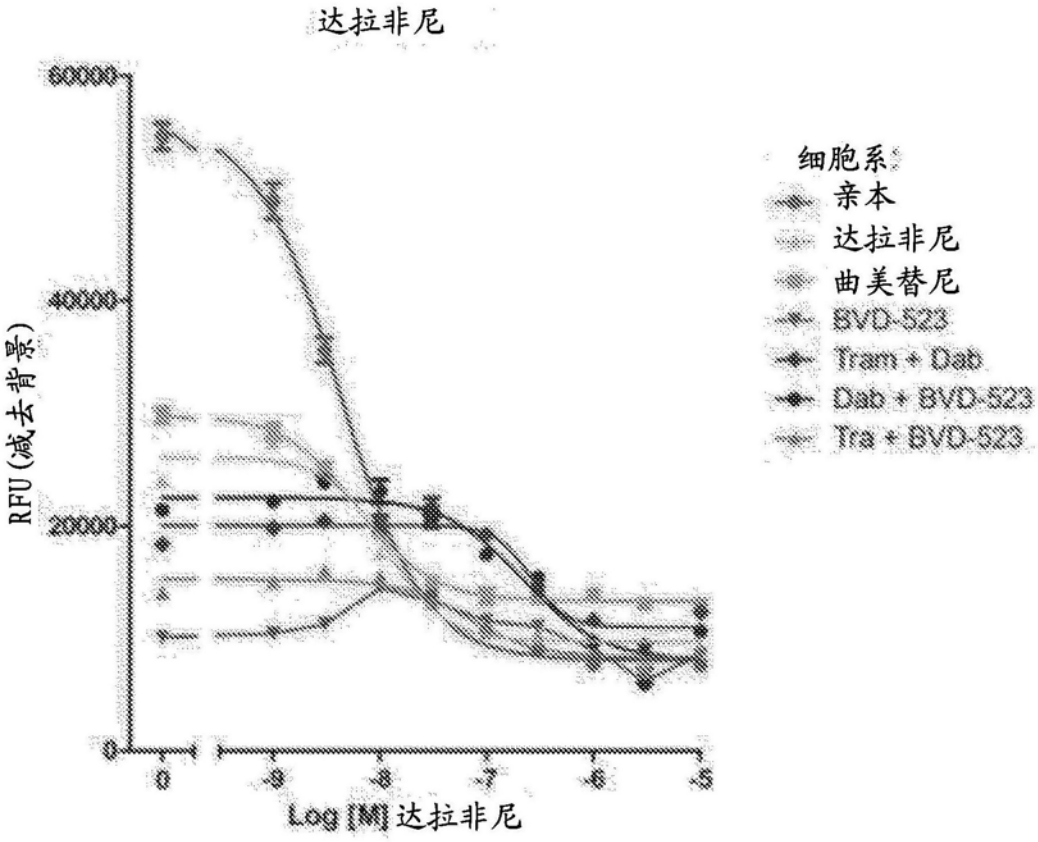

达拉非尼
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4E

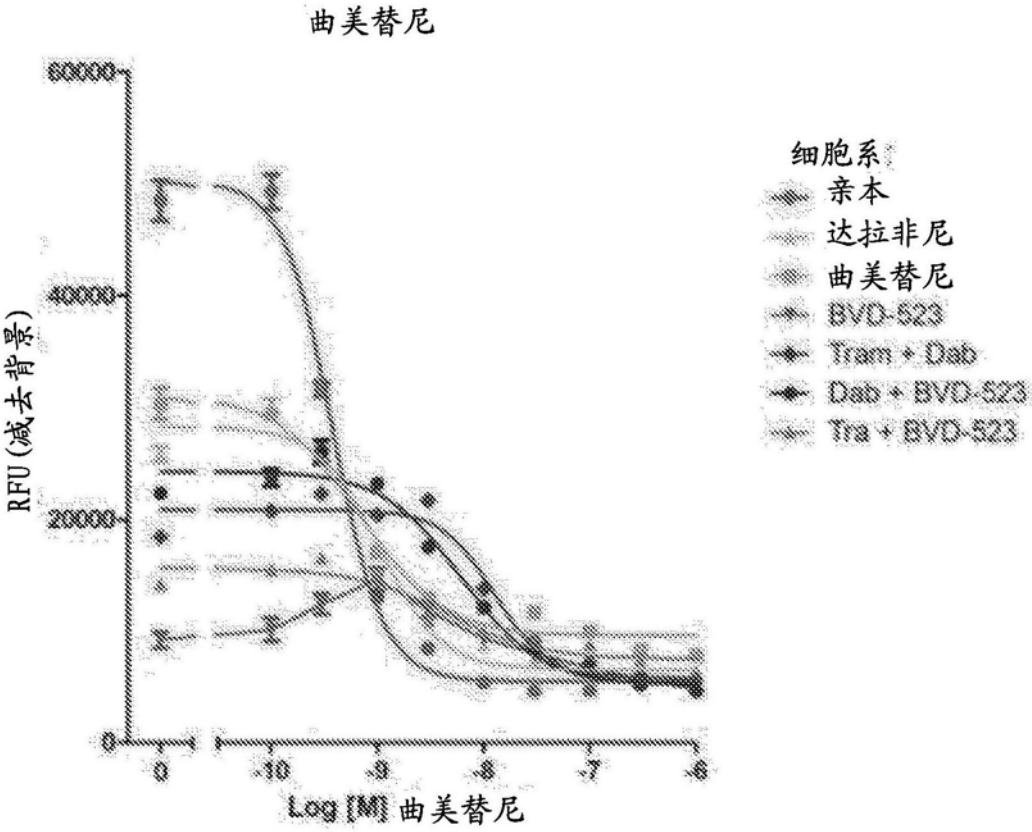

曲美替尼
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4F

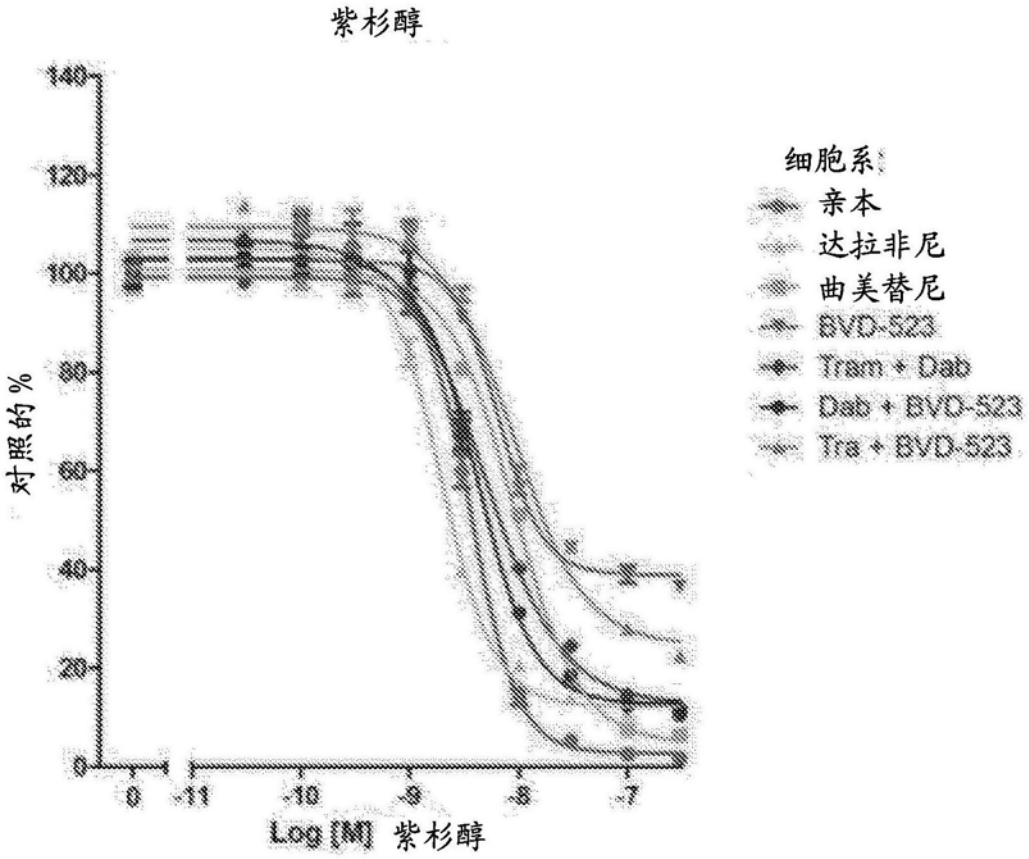

紫杉醇
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4G

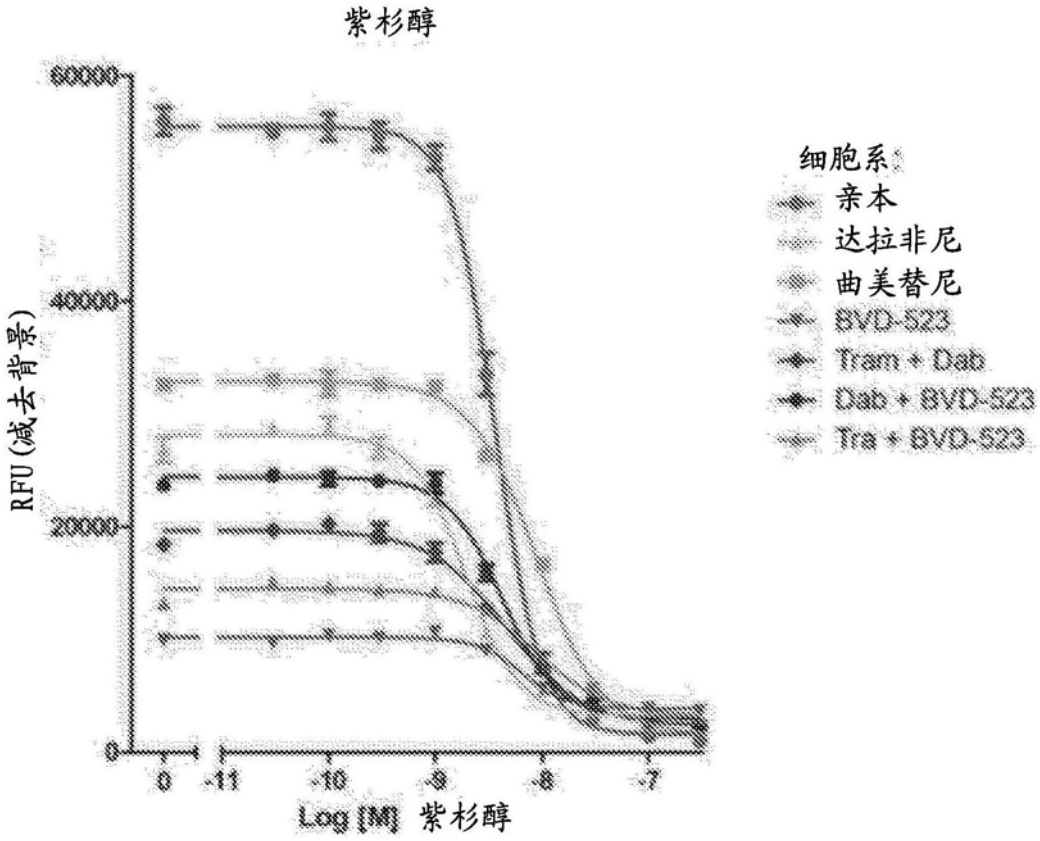

紫杉醇
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图4H

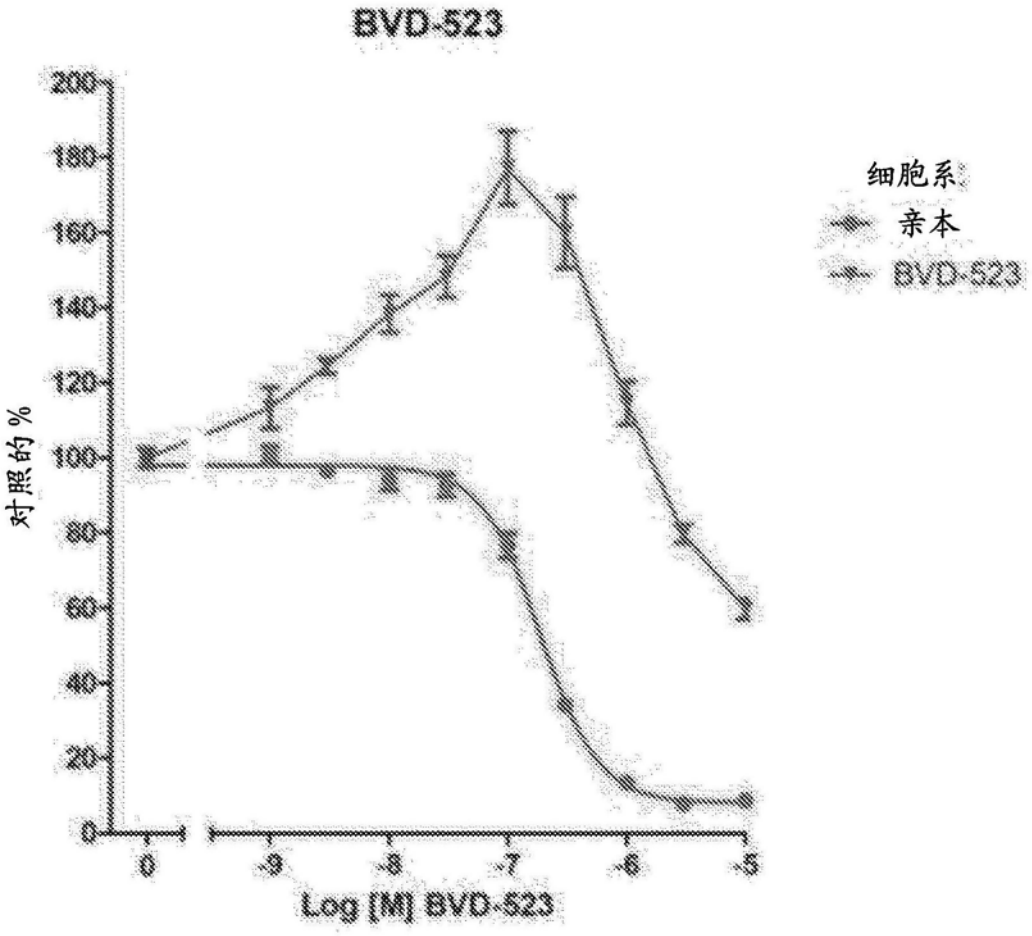

BVD-523
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
细胞系:
亲本
BVD-523

图5A

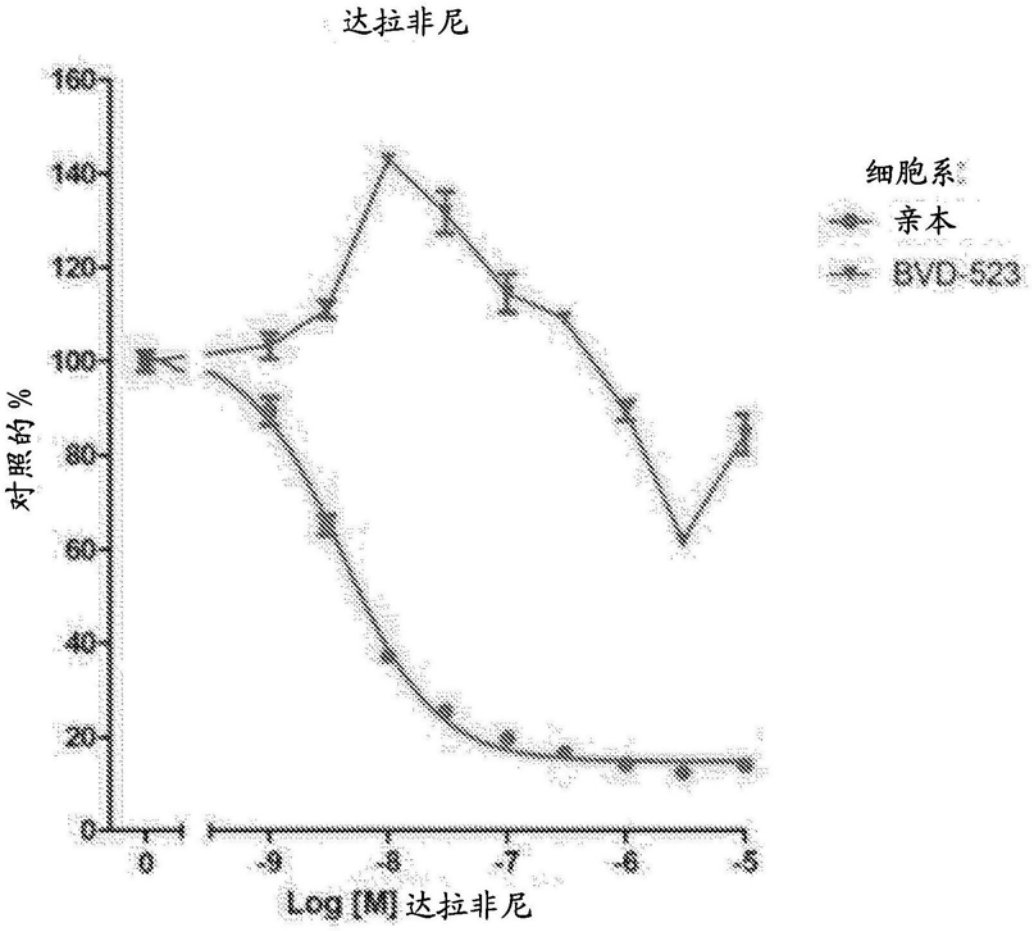

达拉非尼
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
细胞系:
亲本
BVD-523

图5B

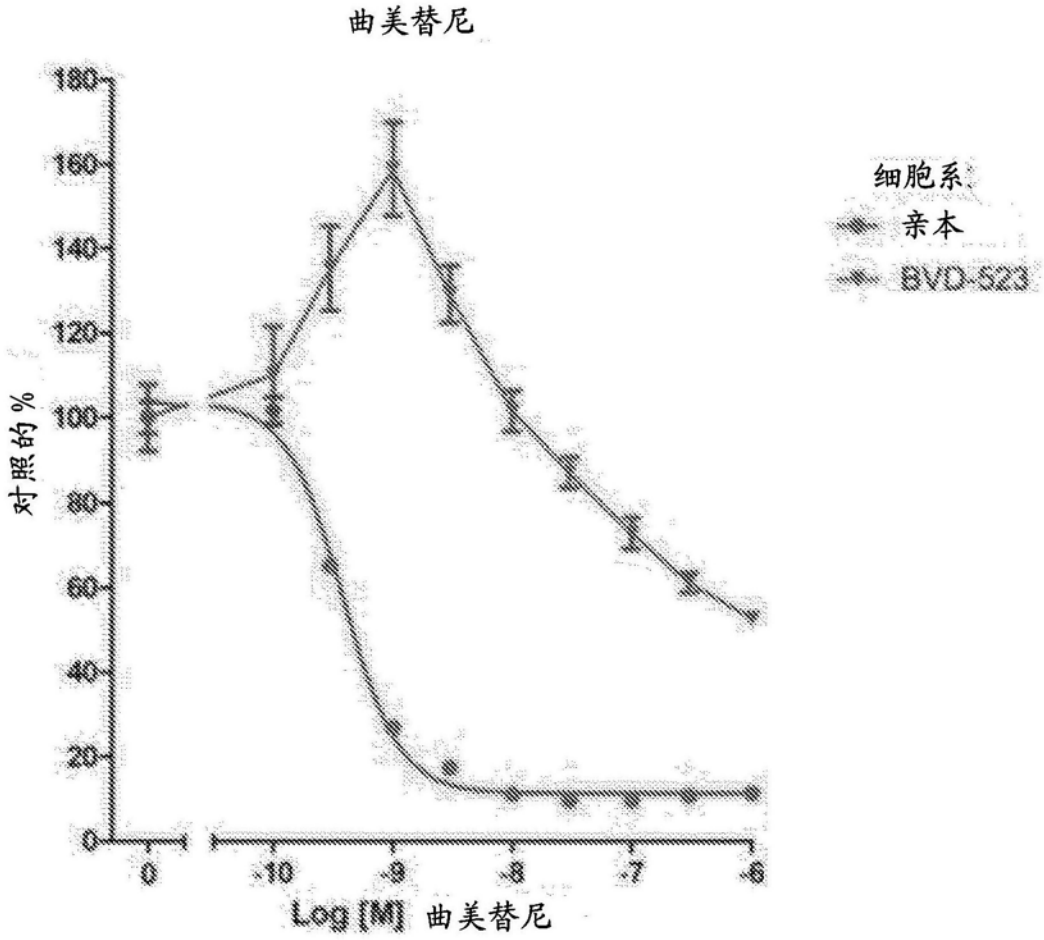

曲美替尼
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
细胞系
亲本
BVD-523

图5C

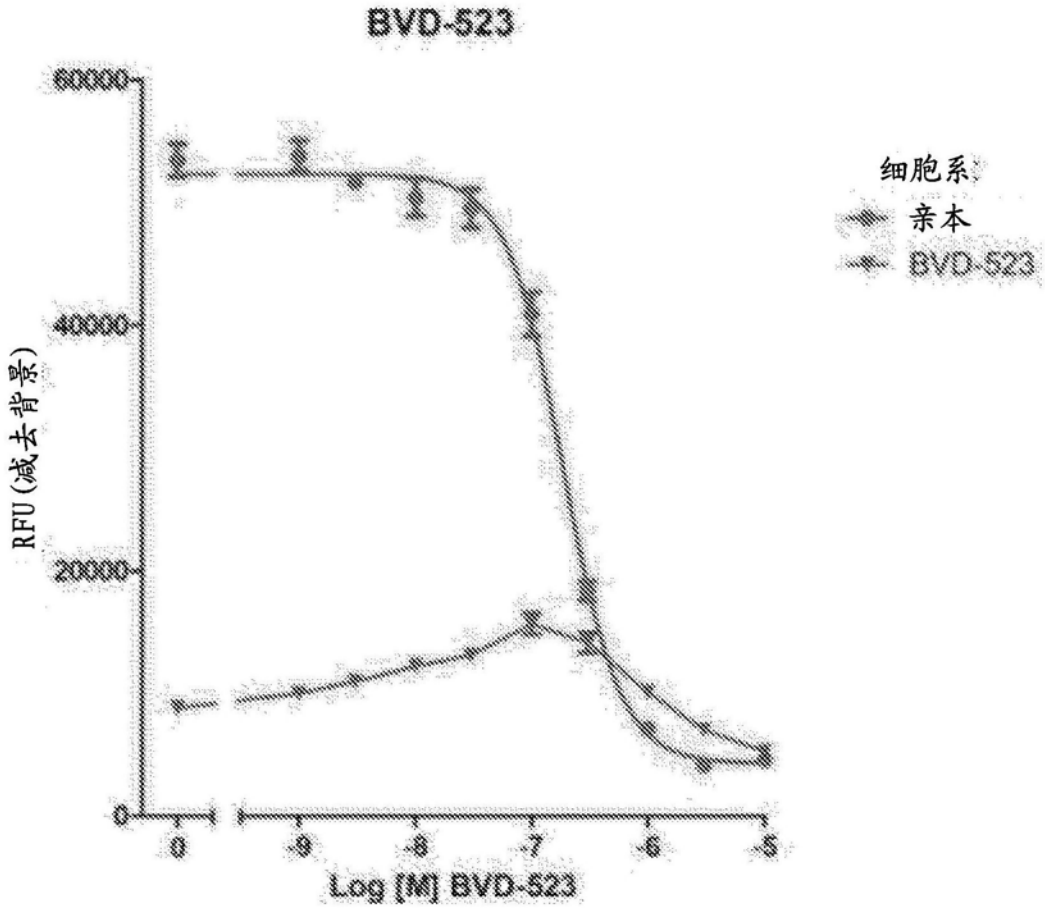

BVD-523
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
细胞系:
亲本
BVD-523

图5D

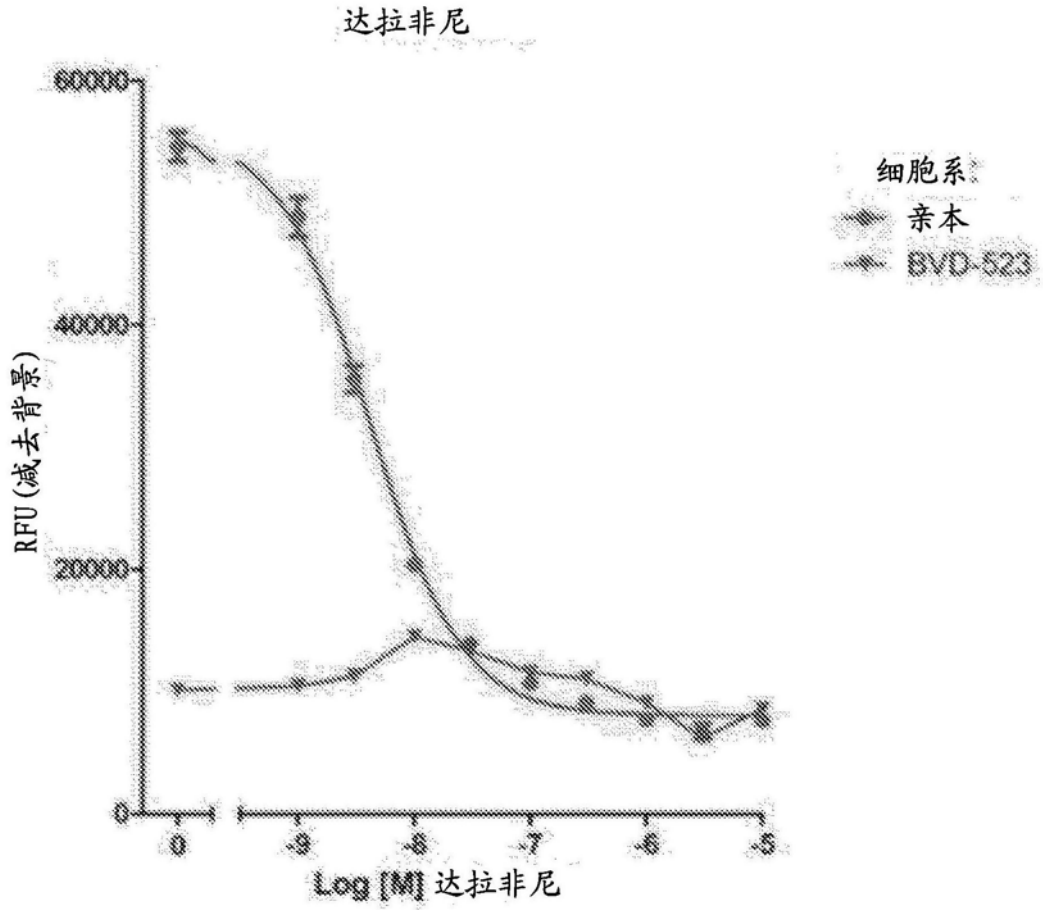

达拉非尼
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
细胞系:
亲本
BVD-523

图5E

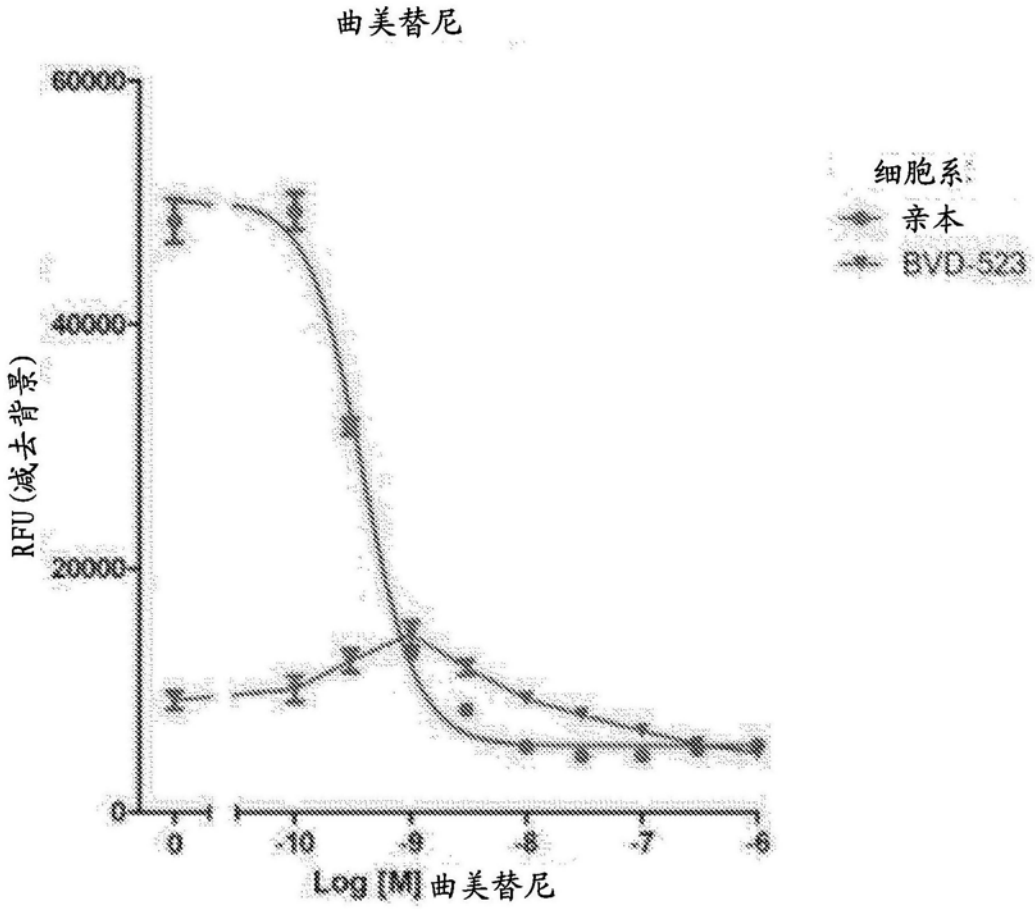

曲美替尼
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M]曲美替尼
细胞系
亲本
BVD-523

图5F

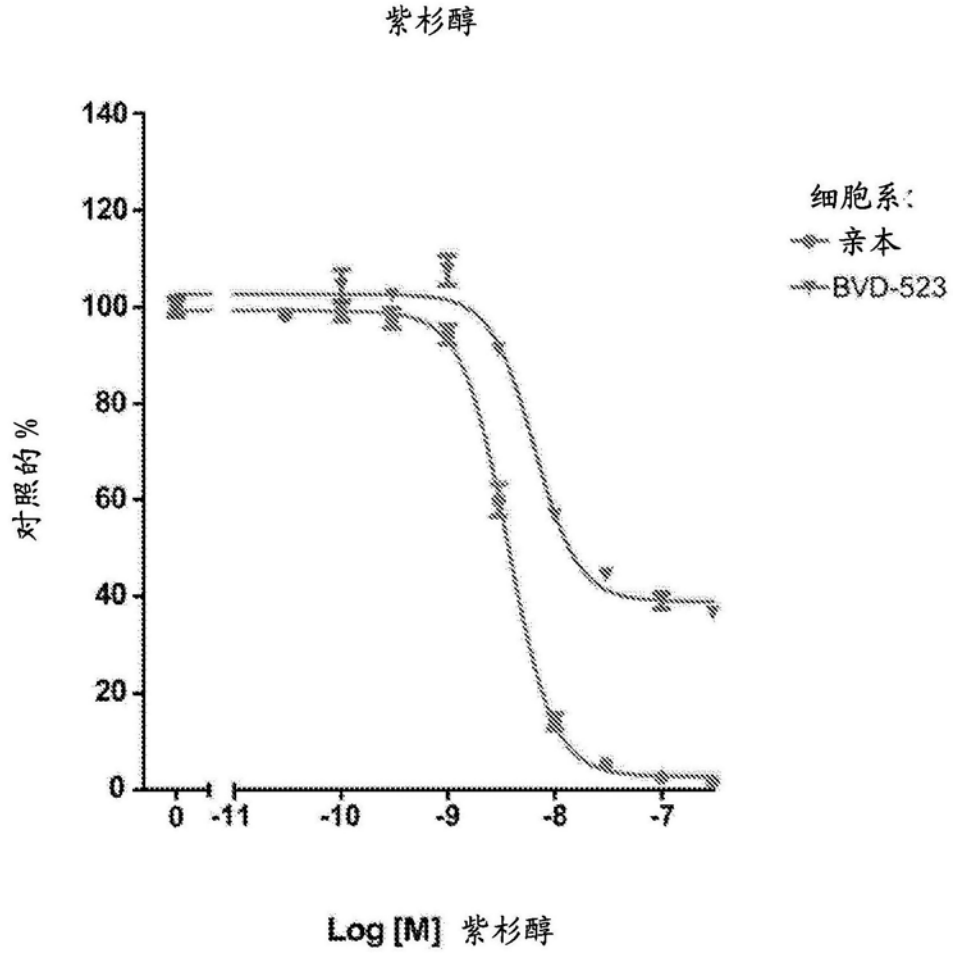

紫杉醇
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
BVD-523

图5G

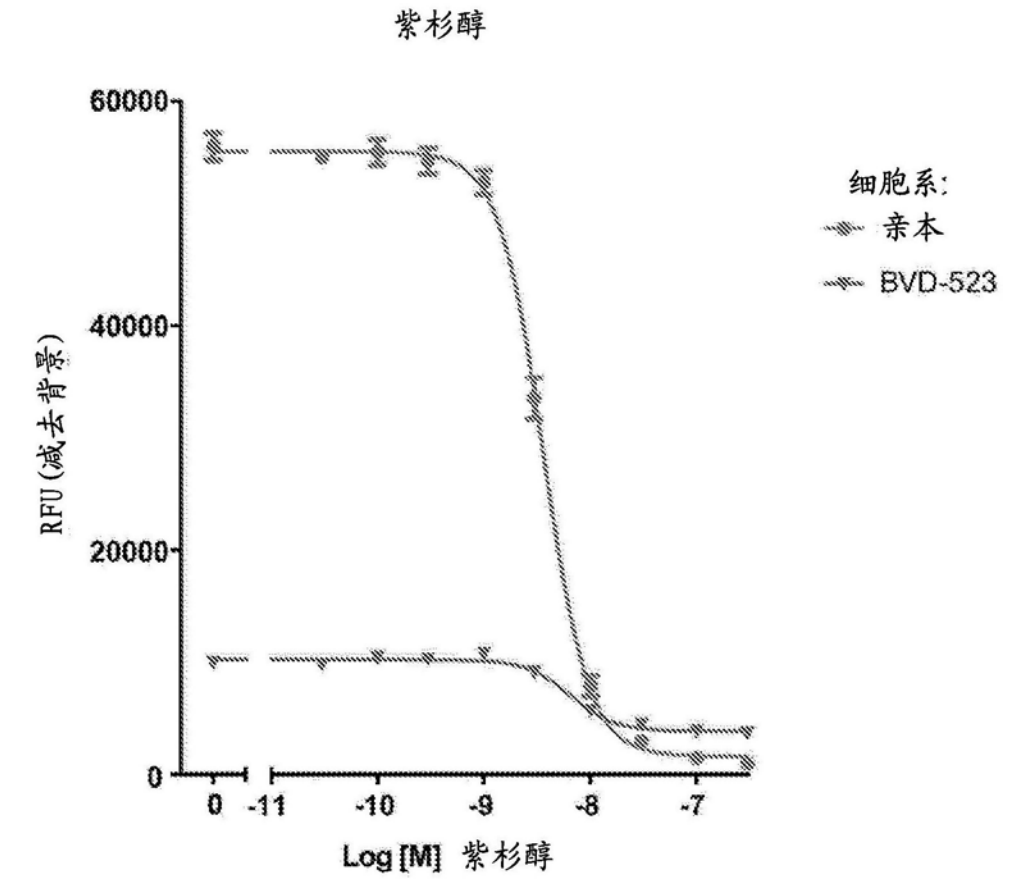

紫杉醇
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
0 -11 -10 -9 -8 -7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
BVD-523

图5H

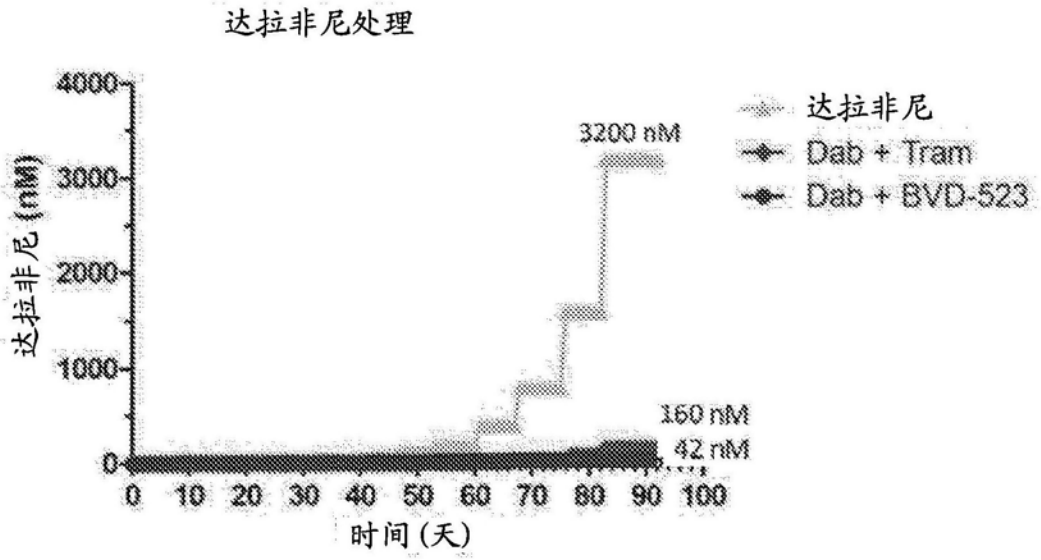

达拉非尼处理
4000
3000
2000
1000
0
达拉非尼(nM)
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间(天)
3200 nM
160 nM
42 nM
达拉非尼
Dab + Tram
Dab + BVD-523

图6A

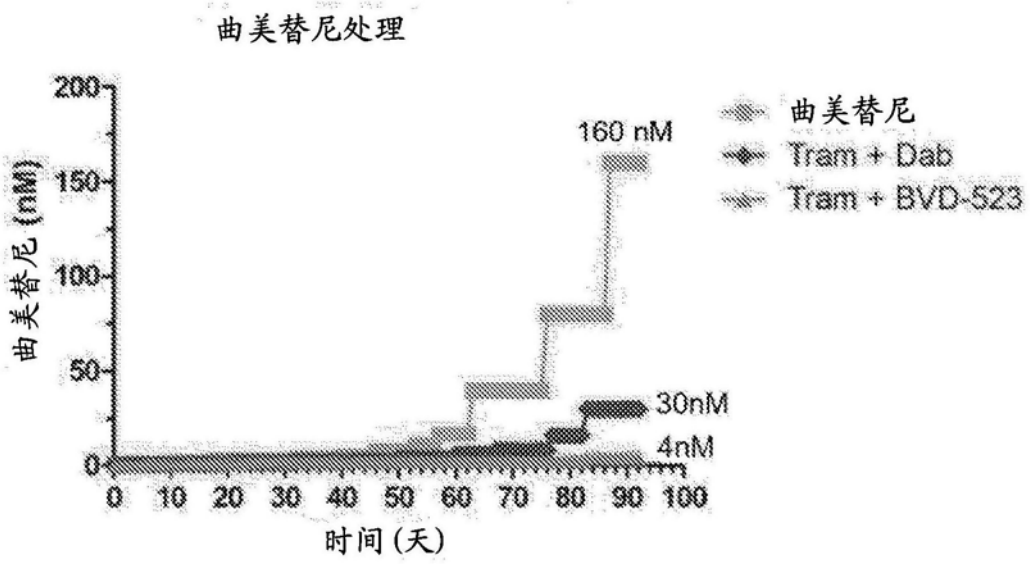

曲美替尼处理
曲美替尼 (nM)
200
150
100
50
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间 (天)
160 nM
30nM
4nM
曲美替尼
Tram + Dab
Tram + BVD-523

图6B

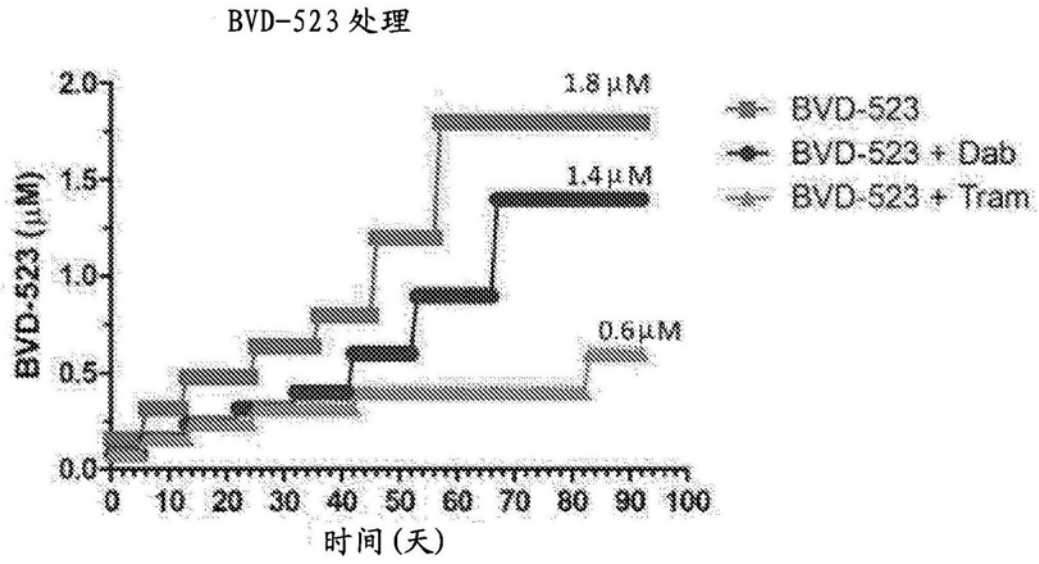

BVD-523 处理
BVD-523 (μM)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间 (天)
1.8 μM
1.4 μM
0.6μM
BVD-523
BVD-523 + Dab
BVD-523 + Tram

图6C

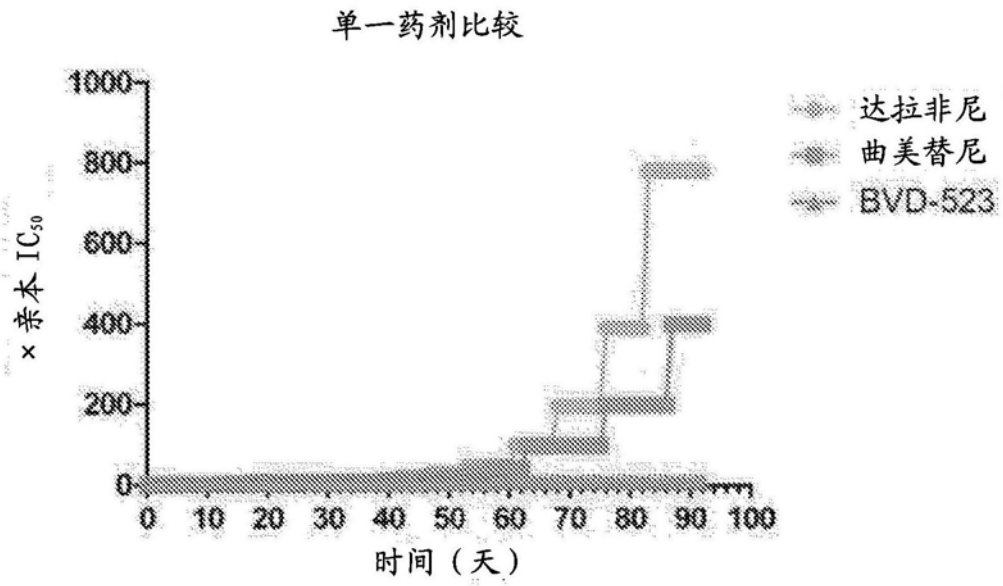

单一药剂比较
1000
800
600
400
200
0
× 亲本 IC_{50}
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间（天）
达拉非尼
曲美替尼
BVD-523

图6D

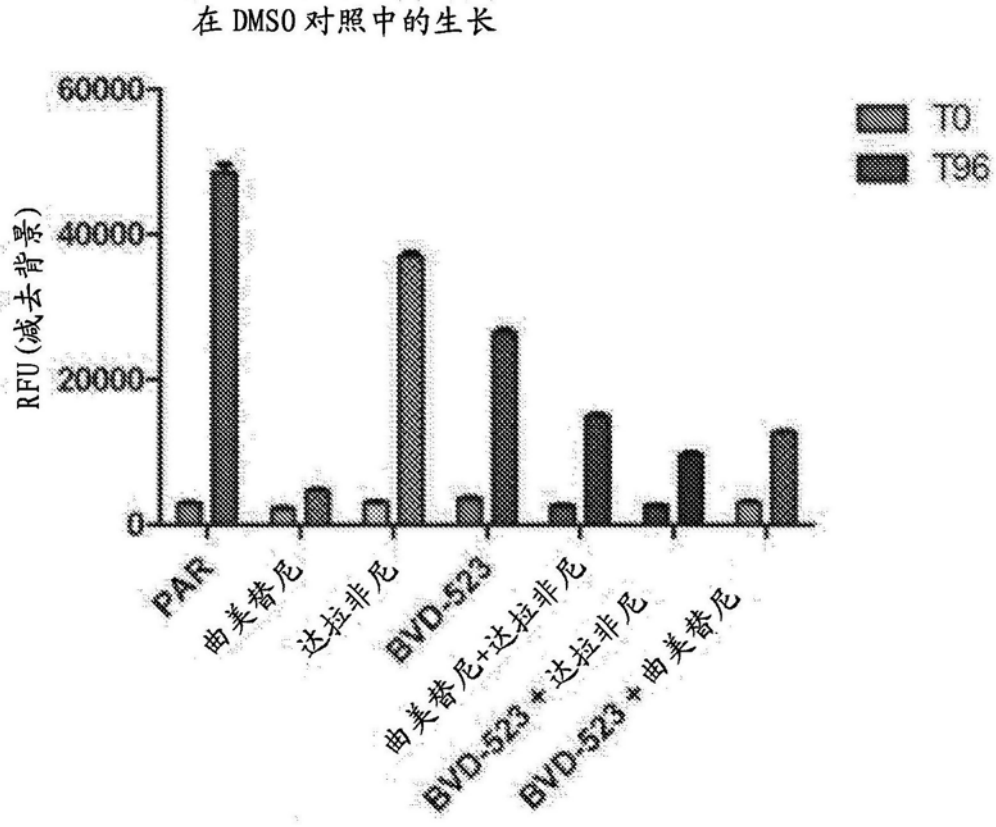

在 DMSO 对照中的生长
60000
40000
20000
0
RFU(减去背景)
T0
T96
PAR
曲美替尼
达拉非尼
BVD-523
曲美替尼+达拉非尼
BVD-523 + 达拉非尼
BVD-523 + 曲美替尼

图7

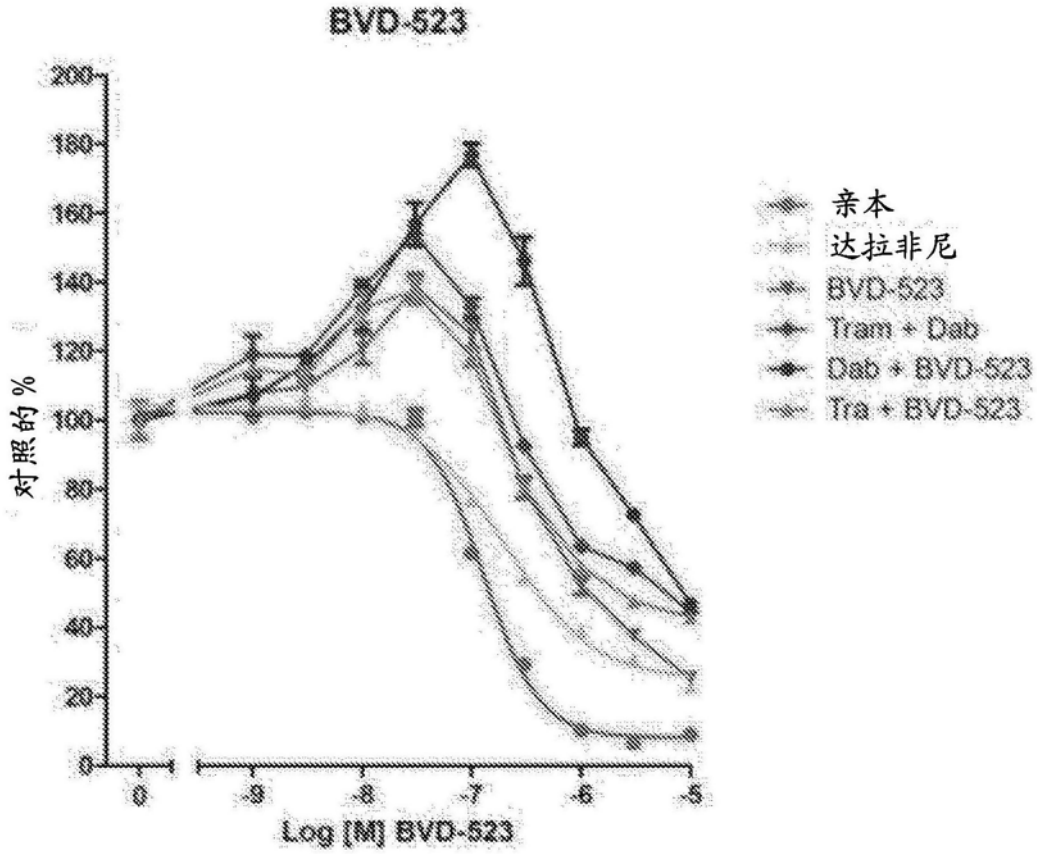

BVD-523
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
亲本
达拉非尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图8A

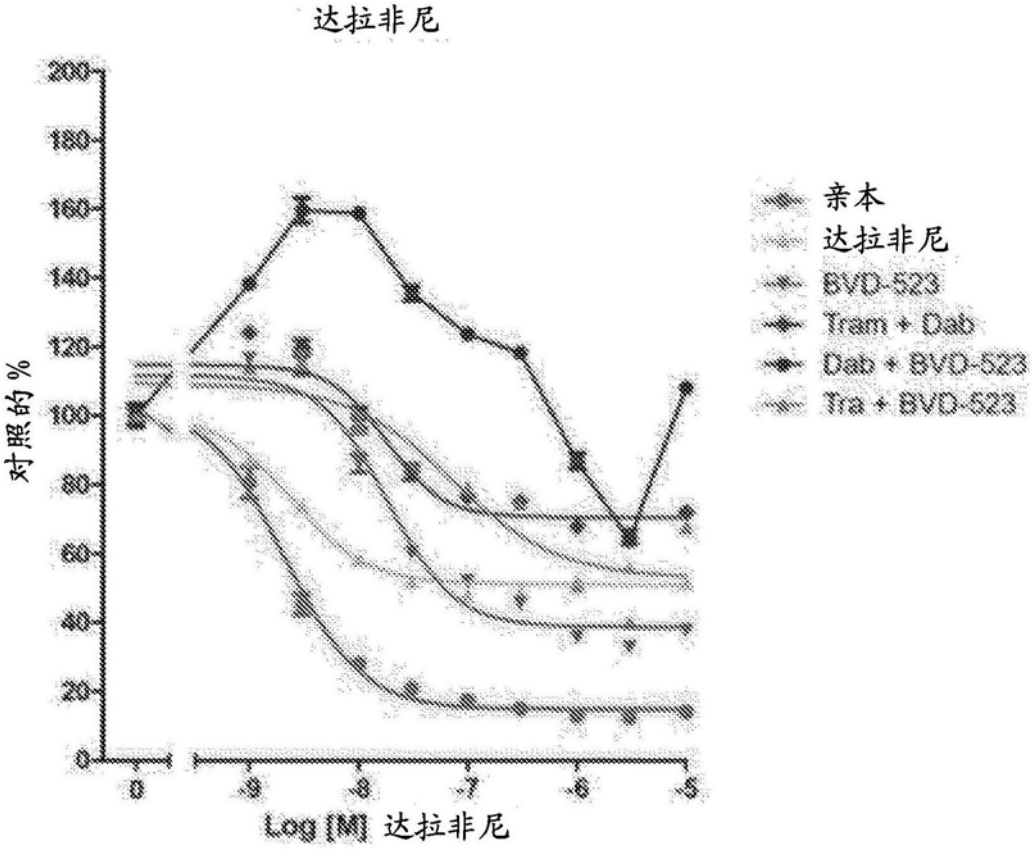

达拉非尼
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼
亲本
达拉非尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图8B

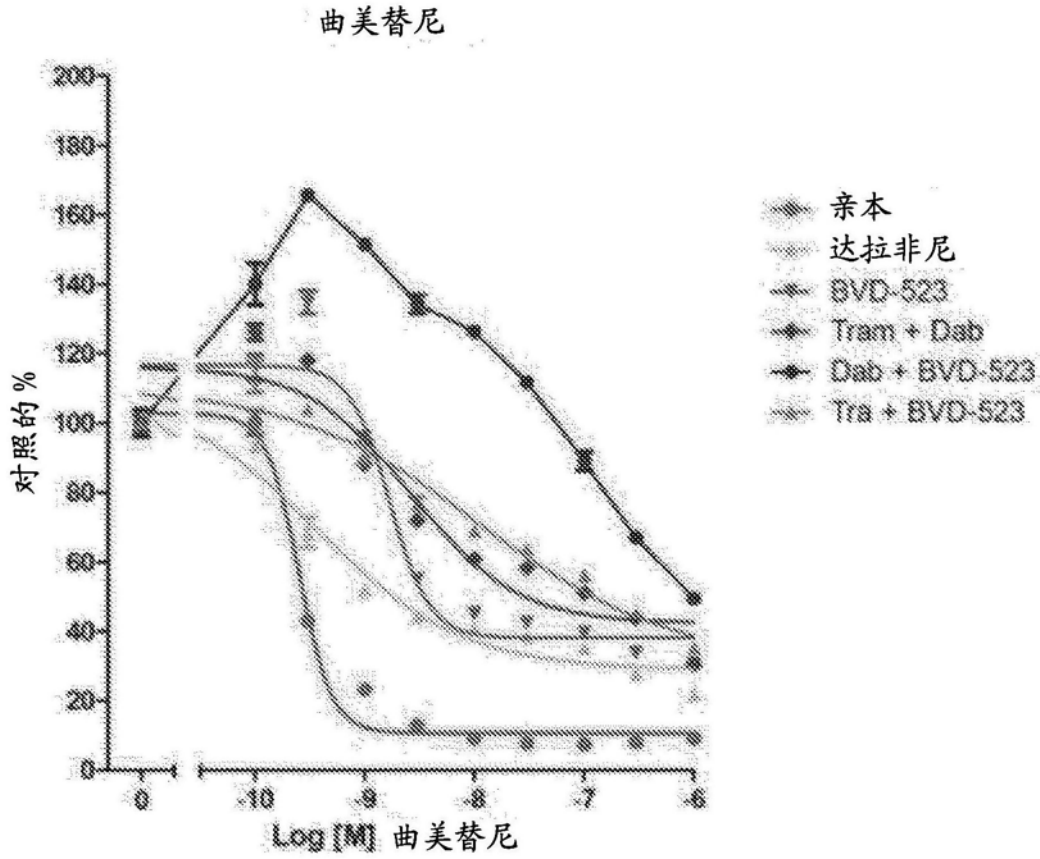

曲美替尼
对照的 %
200
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
亲本
达拉非尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图8C

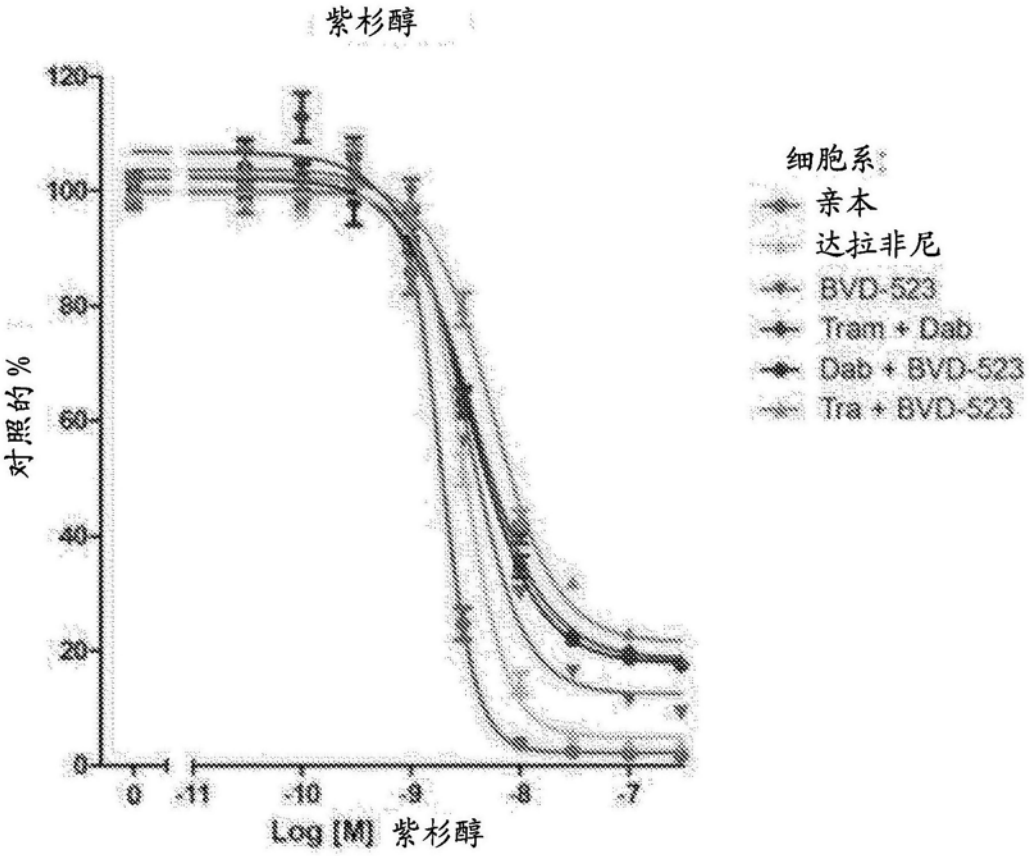

紫杉醇
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
达拉非尼
BVD-523
Tram + Dab
Dab + BVD-523
Tra + BVD-523

图8D

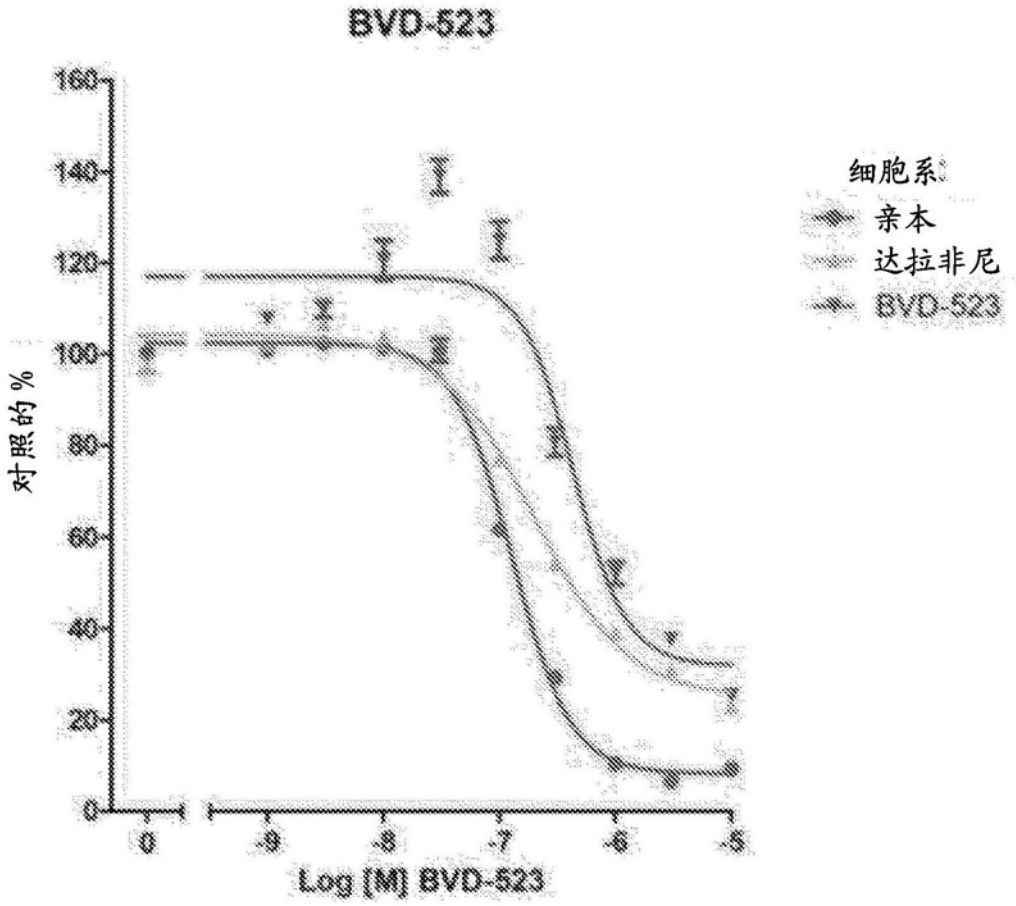

BVD-523
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-523
细胞系:
亲本
达拉非尼
BVD-523

图9A

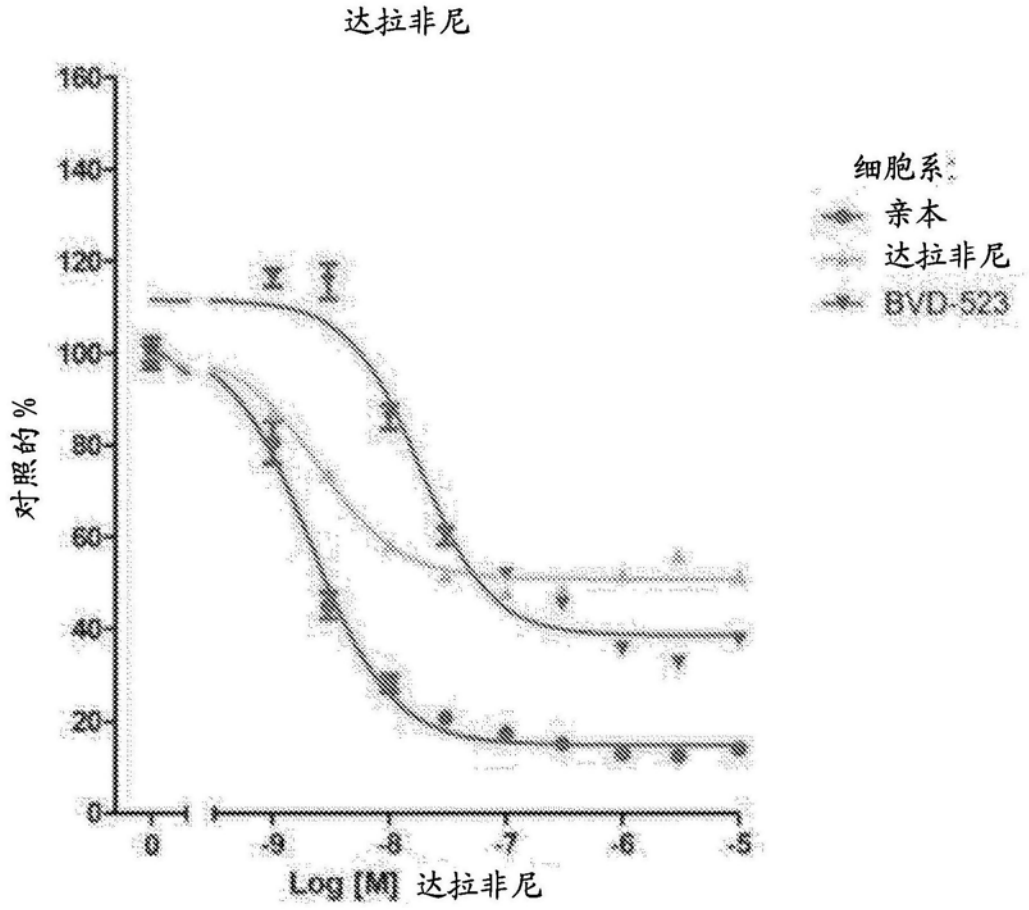

达拉非尼
细胞系:
亲本
达拉非尼
BVD-523
对照的 %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图9B

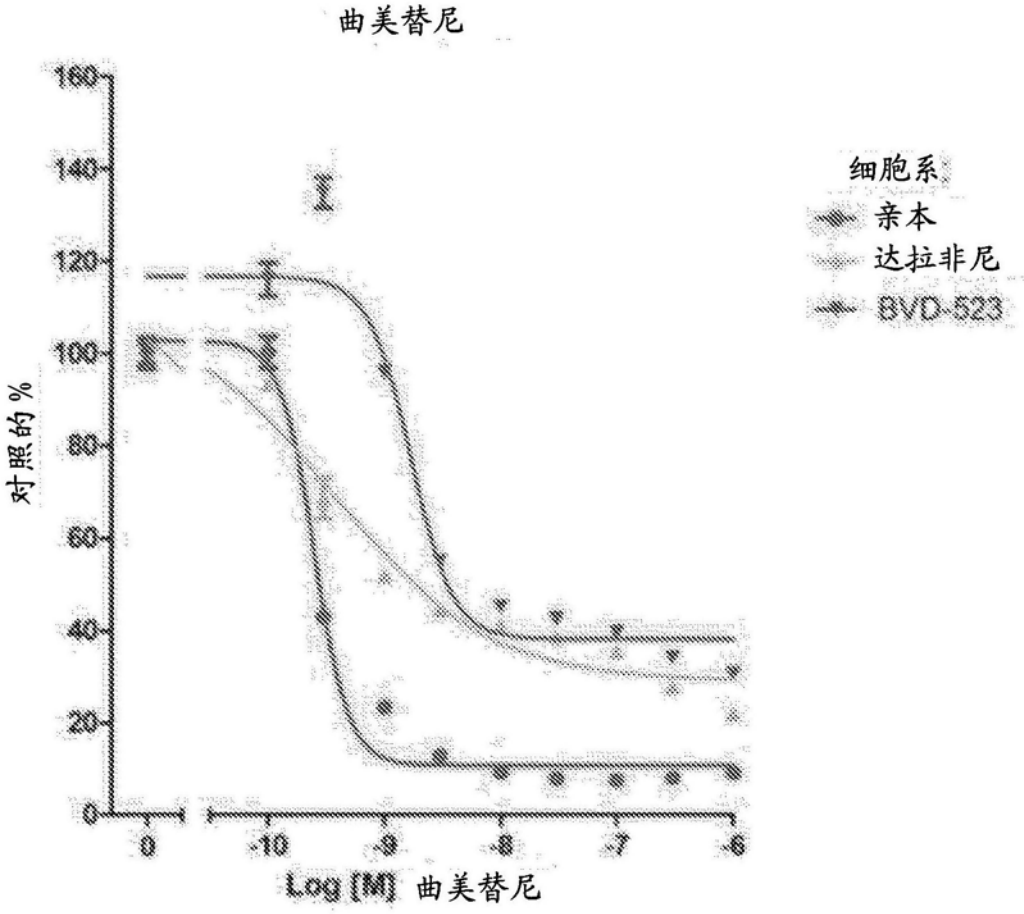

曲美替尼
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-10
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼
细胞系:
亲本
达拉非尼
BVD-523

图9C

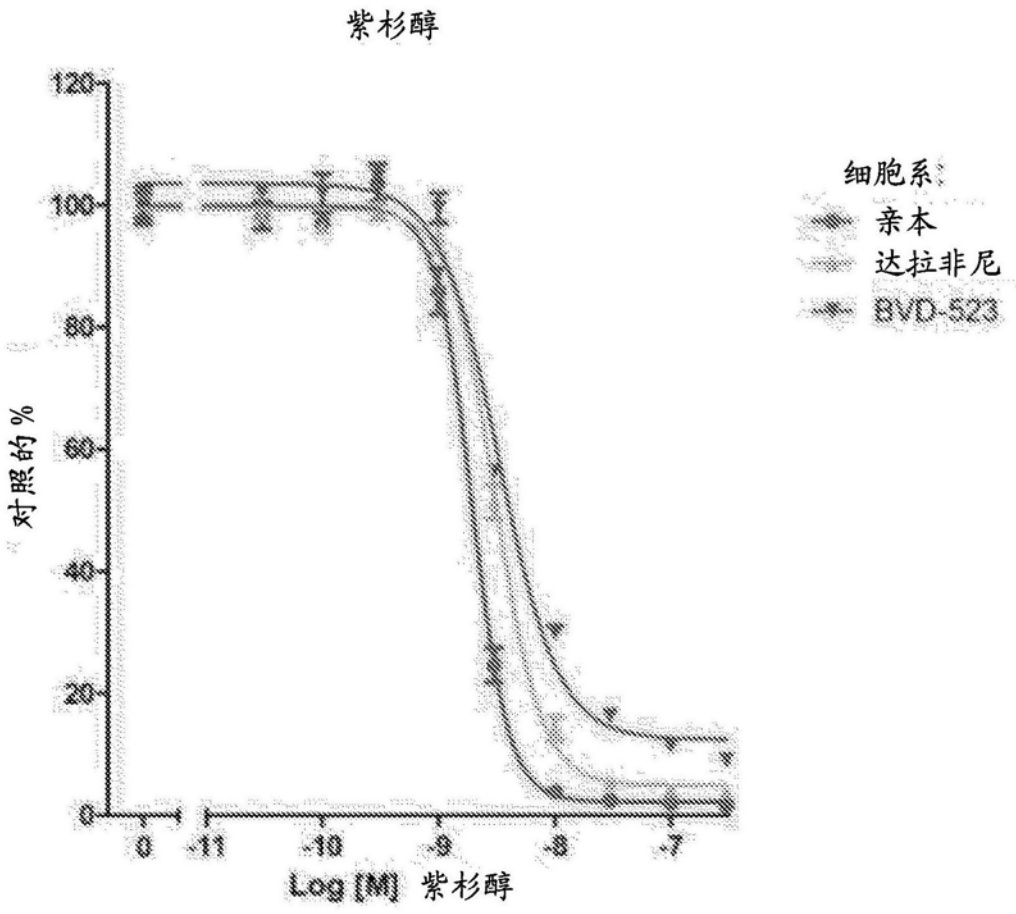

紫杉醇
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-11
-10
-9
-8
-7
Log [M] 紫杉醇
细胞系:
亲本
达拉非尼
BVD-523

图9D

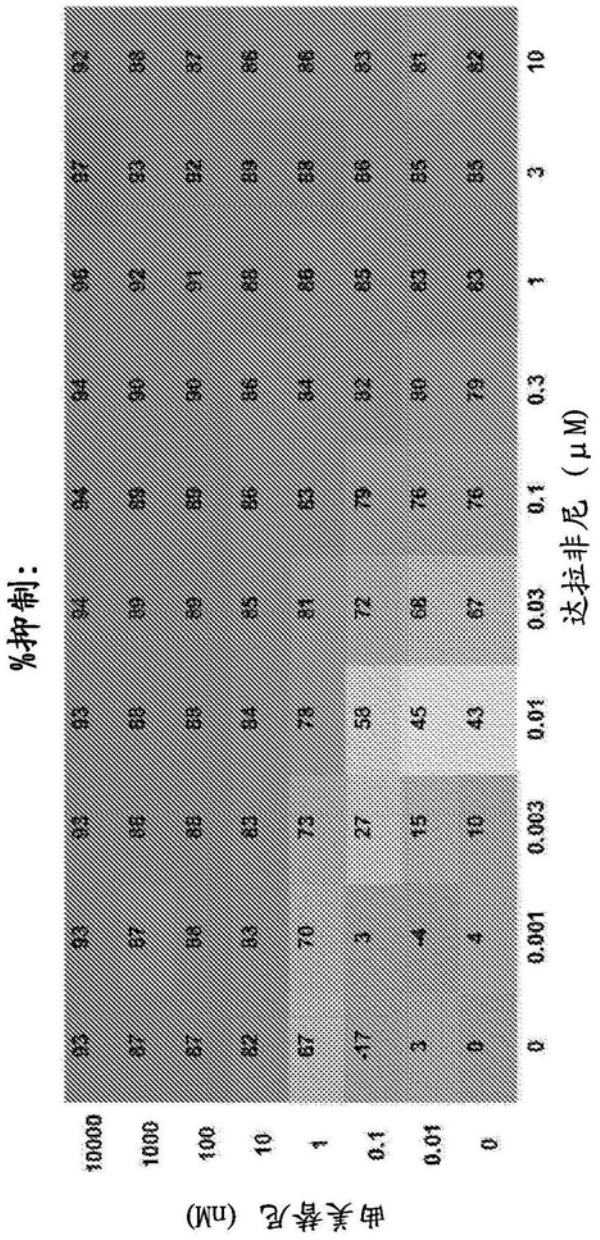

%抑制：
曲美替尼 (nM)
达拉非尼 (μM)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
0
0.001
0.003
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10

图10A

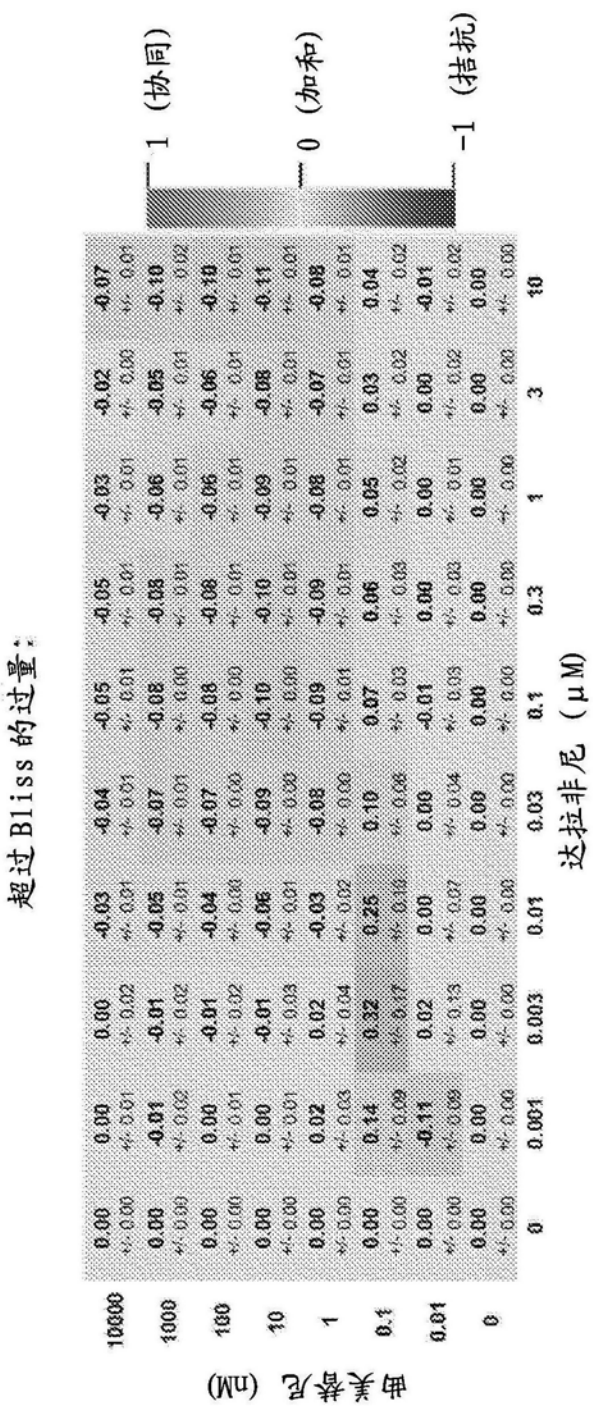

超过 Bliss 的过量：
1 (协同)
0 (加和)
-1 (拮抗)
曲美替尼 (nM)
达拉非尼 (μM)
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
0
0.001
0.003
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10

图10B

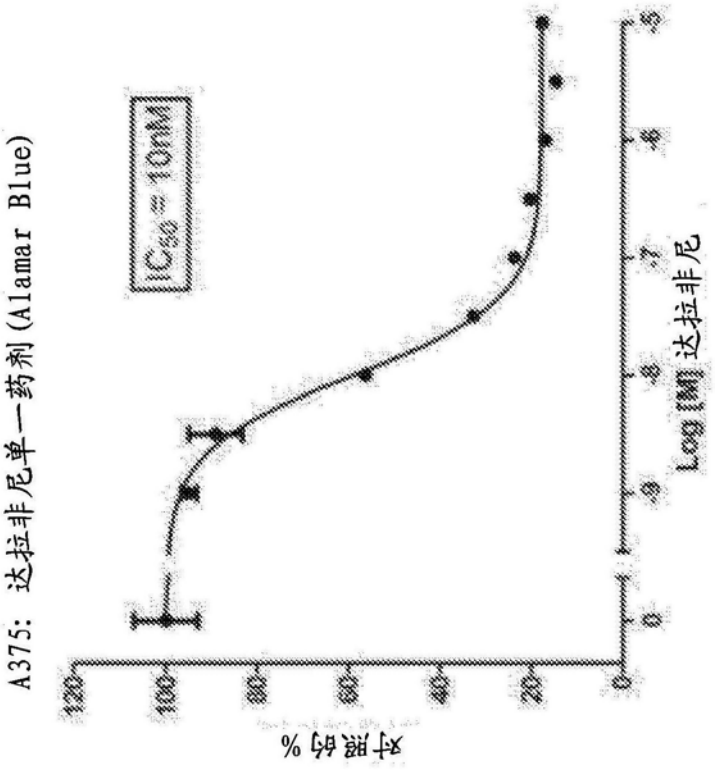

A375: 达拉非尼单一药剂(Alamar Blue)
IC50 = 10nM
对照的 %
Log [M] 达拉非尼

图10C

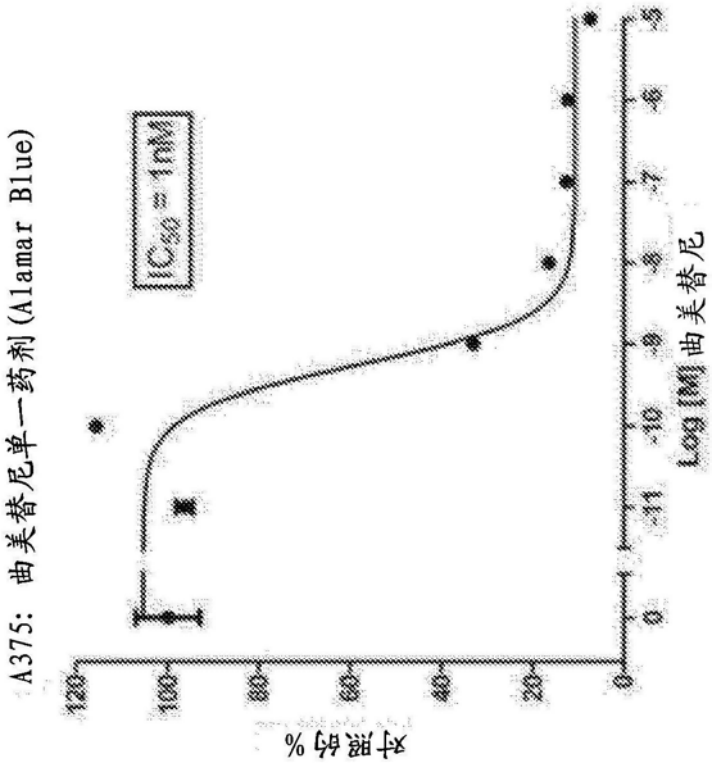

A375: 曲美替尼单一药剂(Alamar Blue)
IC50 = 1nM
对照的 %
Log [M] 曲美替尼

图10D

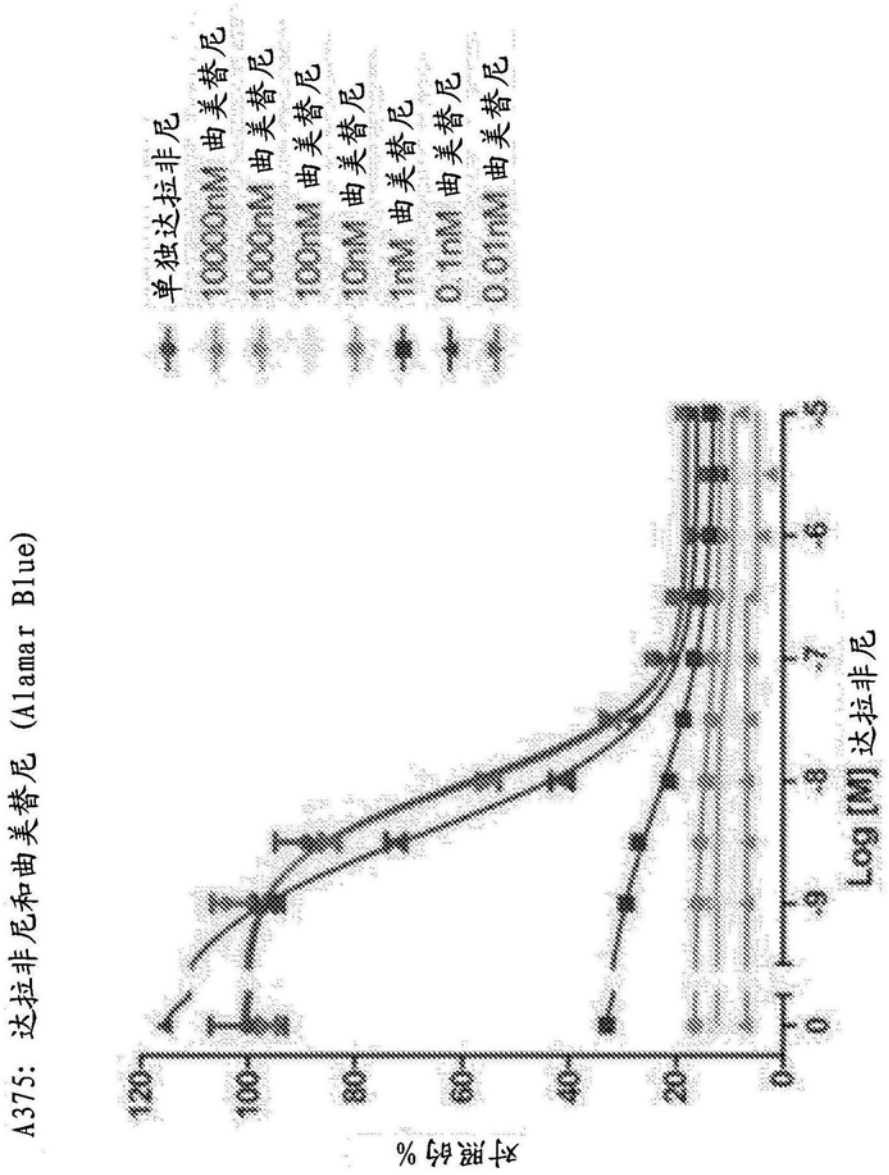

A375: 达拉非尼和曲美替尼 (Alamar Blue)
单独达拉非尼
1000nM 曲美替尼
100nM 曲美替尼
10nM 曲美替尼
1nM 曲美替尼
0.1nM 曲美替尼
0.01nM 曲美替尼
存活的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-5
-6
-7
-8
-9
Log [M] 达拉非尼

图10E

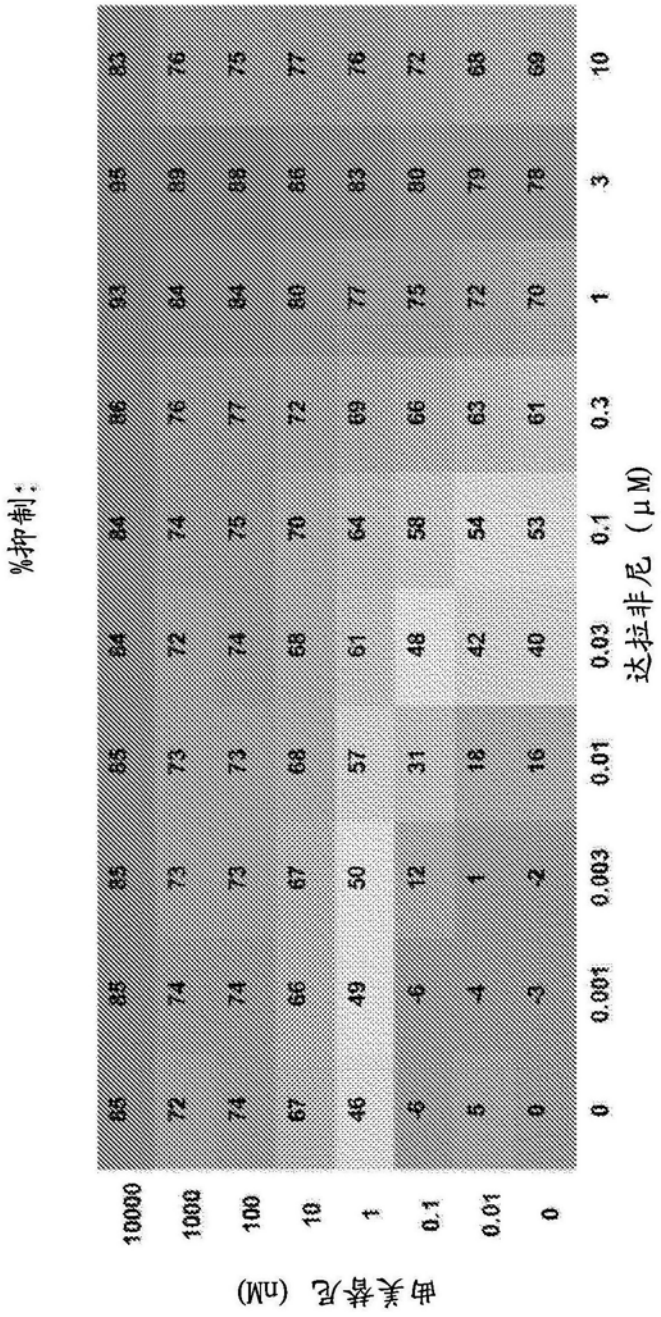

%抑制:
曲美替尼 (nM)
达拉非尼 (μM)
10000 85 85 85 85 84 84 86 86 93 85 83
1000 72 74 73 73 72 74 76 76 84 89 76
100 74 74 73 73 74 75 77 77 84 88 75
10 67 66 67 68 68 70 72 72 80 86 77
1 46 49 50 57 61 64 69 69 77 83 76
0.1 -6 -6 12 31 48 58 66 66 75 80 72
0.01 5 -4 1 18 42 54 63 63 72 79 68
0 0 -3 -2 16 40 53 61 61 70 78 69
0 0.001 0.003 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 10

图11A

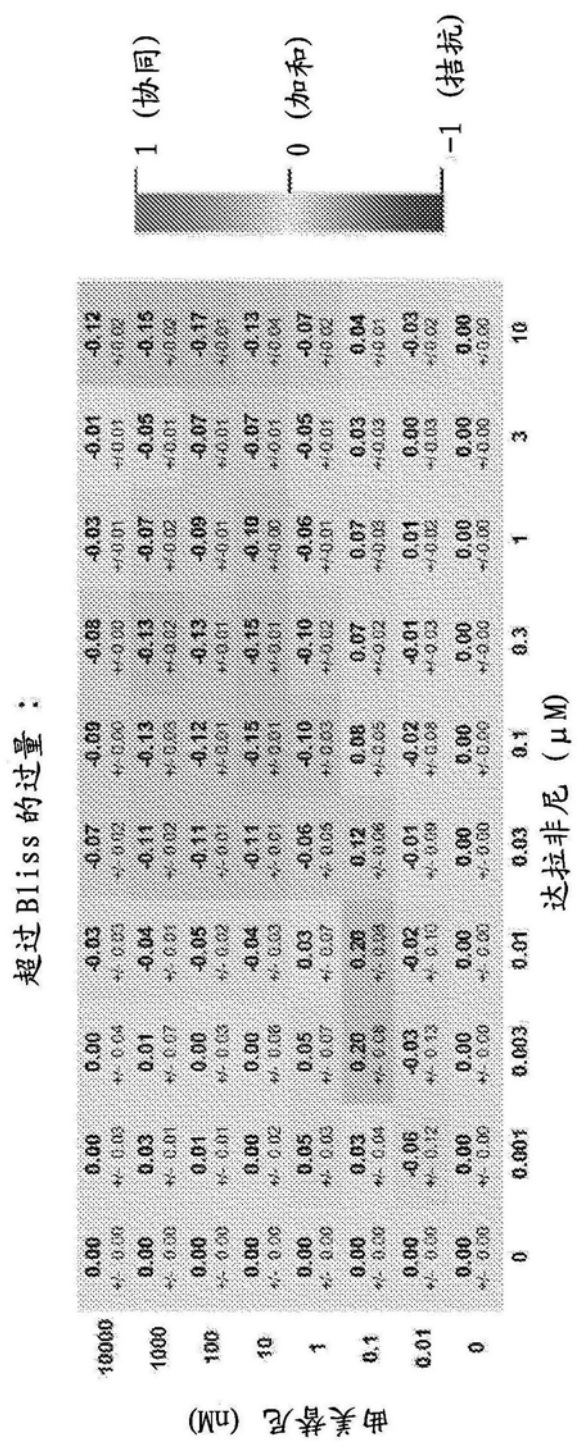

超过Bliss的过量：
1（协同）
0（加和）
-1（拮抗）
曲美替尼（nM）
达拉非尼（μM）
10000
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
0
0.001
0.003
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10

图11B

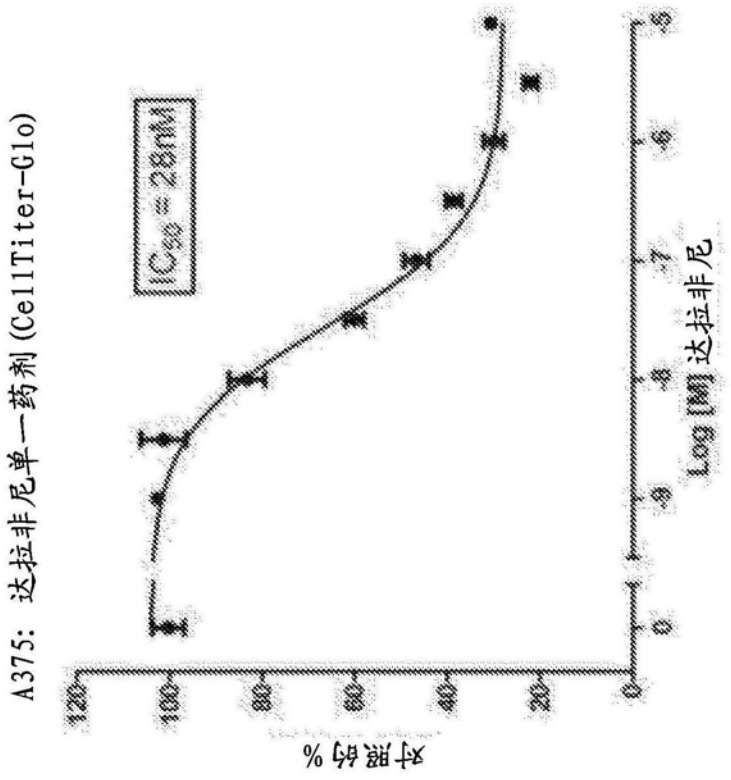

A375: 达拉非尼单一药剂 (CellTiter-Glo)
IC50 = 28nM
对照的 %
Log [M] 达拉非尼

图11C

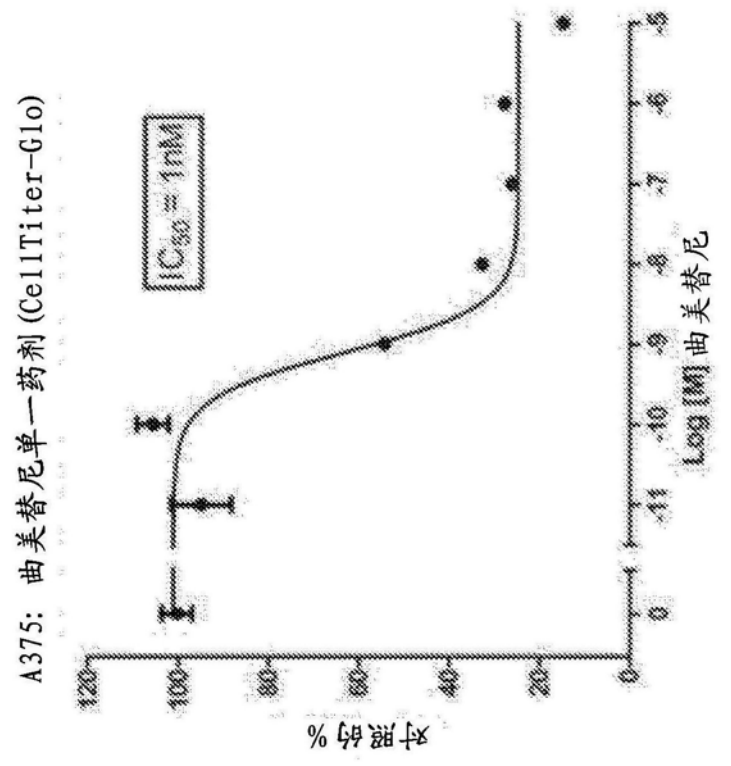

A375: 曲美替尼单一药剂 (CellTiter-Glo)
IC50 = 1nM
对照的 %
Log [M] 曲美替尼

图11D

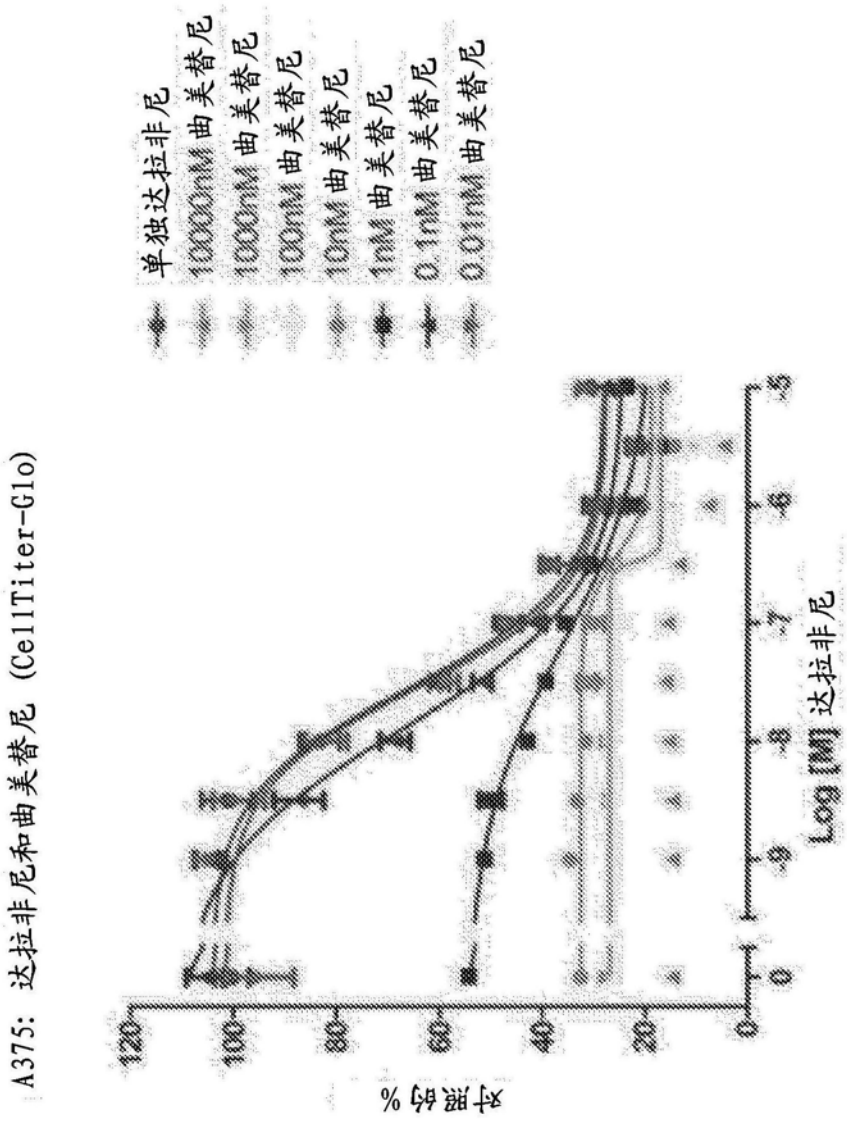

A375：达拉非尼和曲美替尼（CellTiter-Glo）
单独达拉非尼
1000nM曲美替尼
100nM曲美替尼
10nM曲美替尼
1nM曲美替尼
0.1nM曲美替尼
0.01nM曲美替尼
对照的%
120
100
80
60
40
20
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图11E

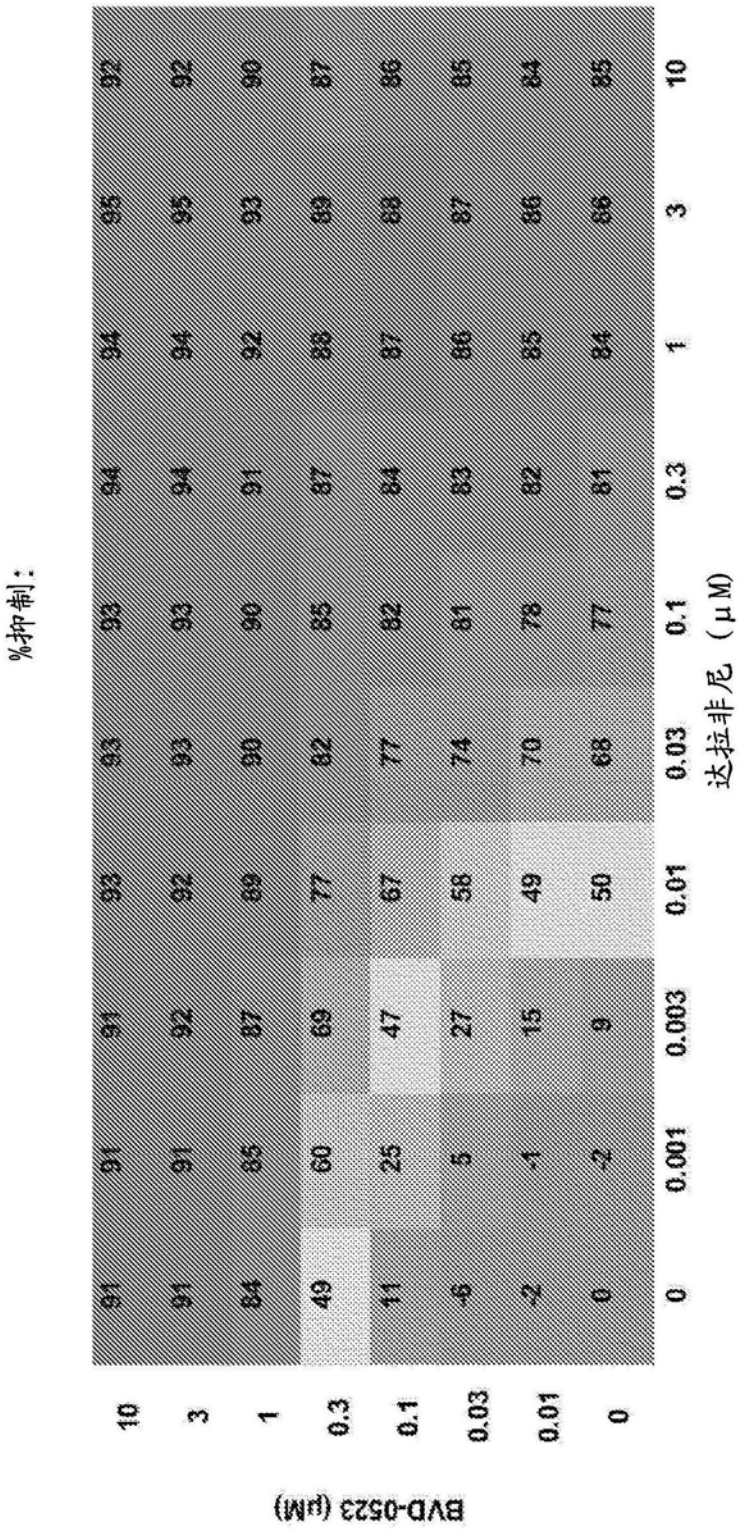

%抑制：
BVD-0523 (μM)
10 91 91 91 91 93 93 93 94 94 94 95 92
3 91 91 92 87 92 93 93 94 94 94 95 92
1 84 85 87 69 89 90 90 91 92 93 93 90
0.3 49 60 69 47 77 82 85 87 88 88 89 87
0.1 11 25 47 27 67 77 82 84 87 88 88 86
0.03 -6 5 27 15 58 74 81 83 86 87 87 85
0.01 -2 -1 15 9 49 70 78 82 85 86 86 84
0 0 -2 9 50 68 77 81 84 84 86 86 85
0 0.001 0.003 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 10
达拉非尼（μM）

图12A

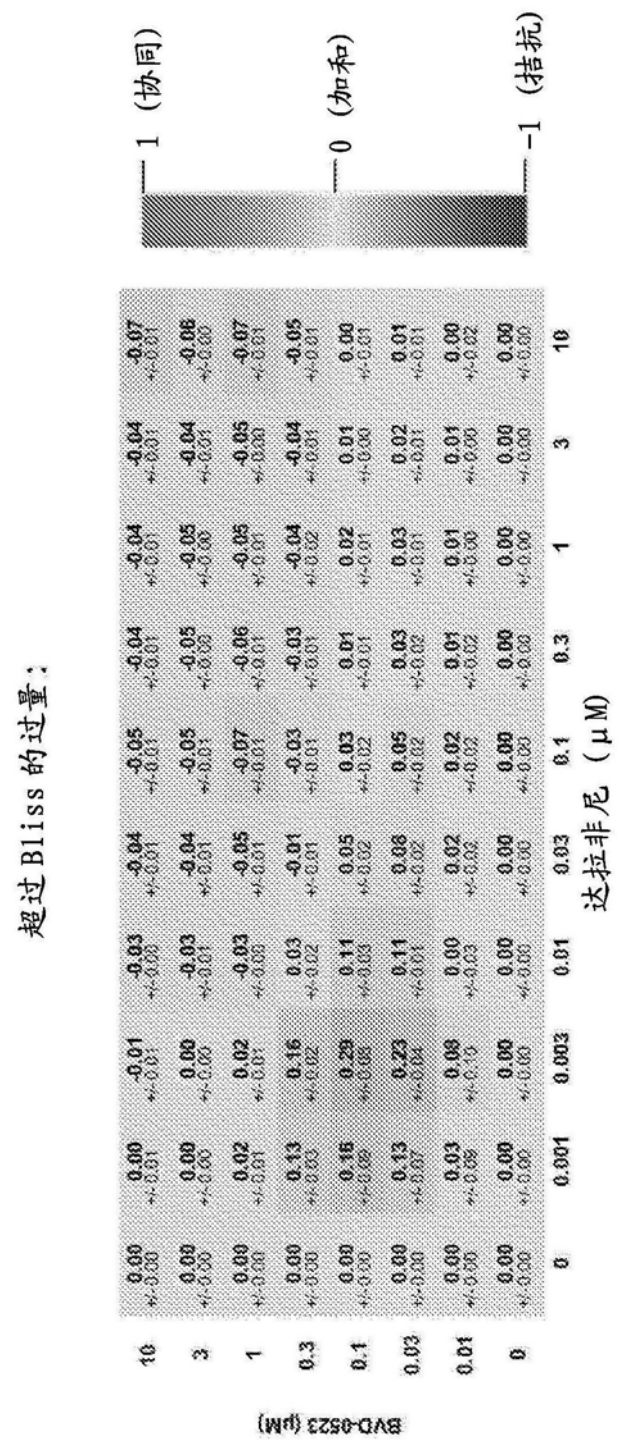

超过Bliss的过量：
1（协同）
0（加和）
-1（拮抗）
BVD-8523（μM）
达拉非尼（μM）
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
0
0.0001
0.003
0.01
0.03
0.1
0.3
1
3
10

图12B

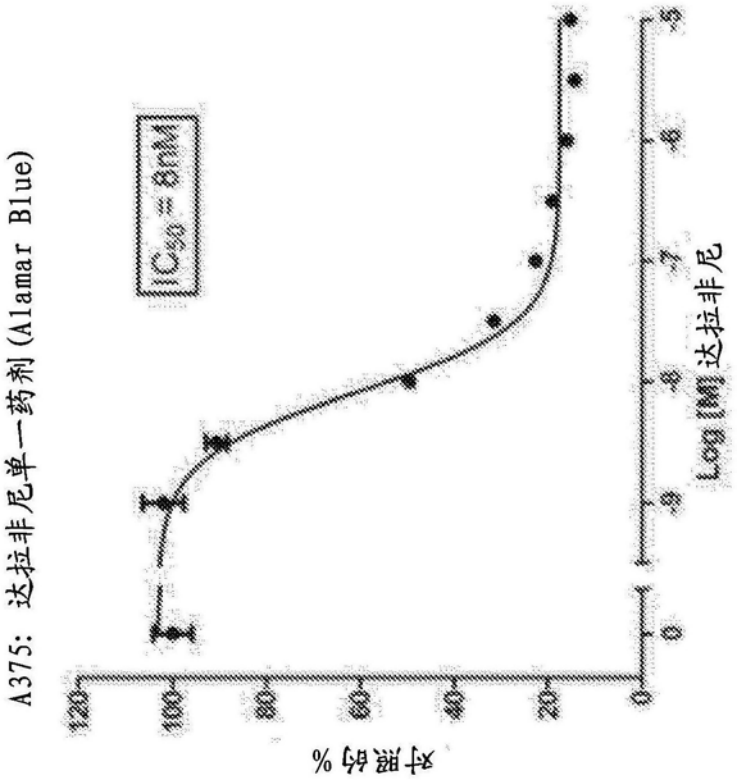

A375：达拉非尼单一药剂(Alamar Blue)
IC50 = 8nM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
-5
-6
-7
-8
-9
0
Log [M] 达拉非尼

图12C

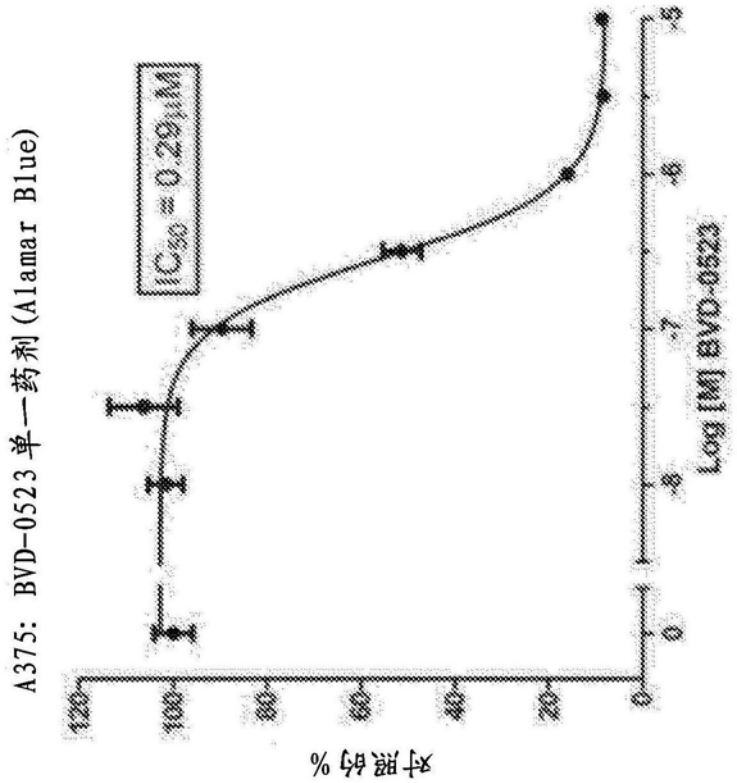

A375：BVD-0523单一药剂(Alamar Blue)
IC50 = 0.29μM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
-5
-6
-7
-8
0
Log [M] BVD-0523

图12D

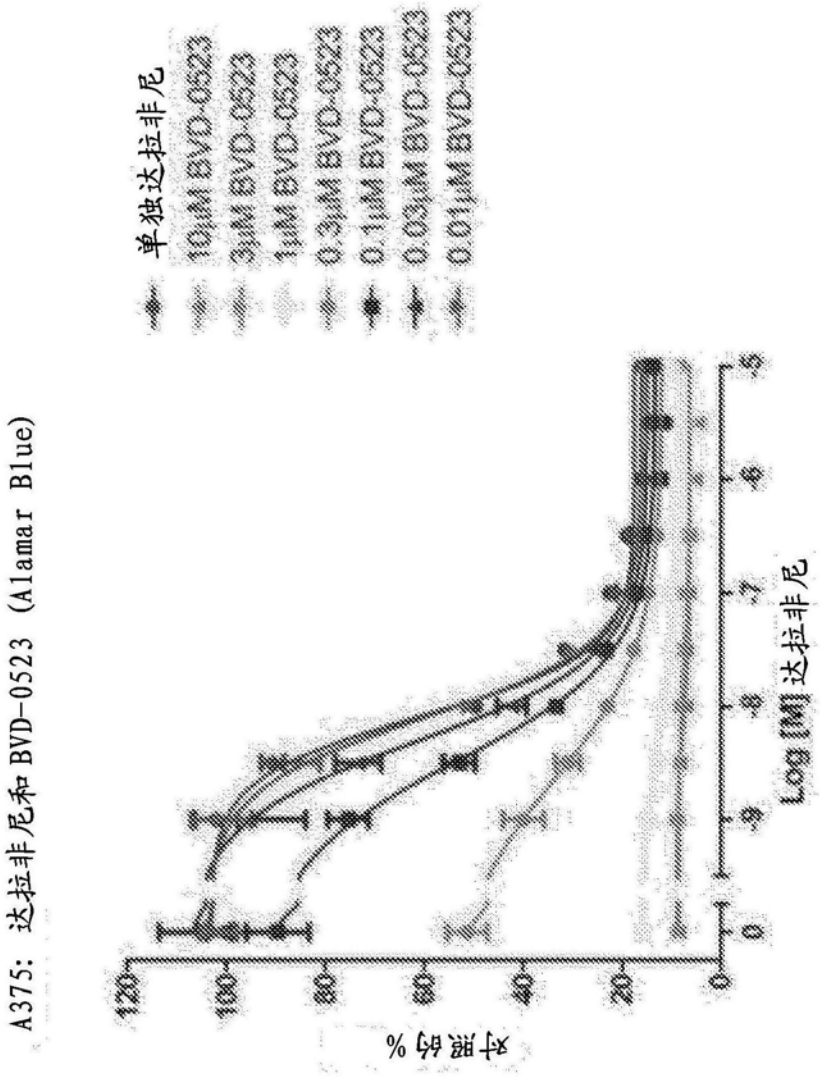

A375：达拉非尼和 BVD-0523 (Alamar Blue)
单独达拉非尼
10μM BVD-0523
3μM BVD-0523
1μM BVD-0523
0.3μM BVD-0523
0.1μM BVD-0523
0.03μM BVD-0523
0.01μM BVD-0523
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图12E

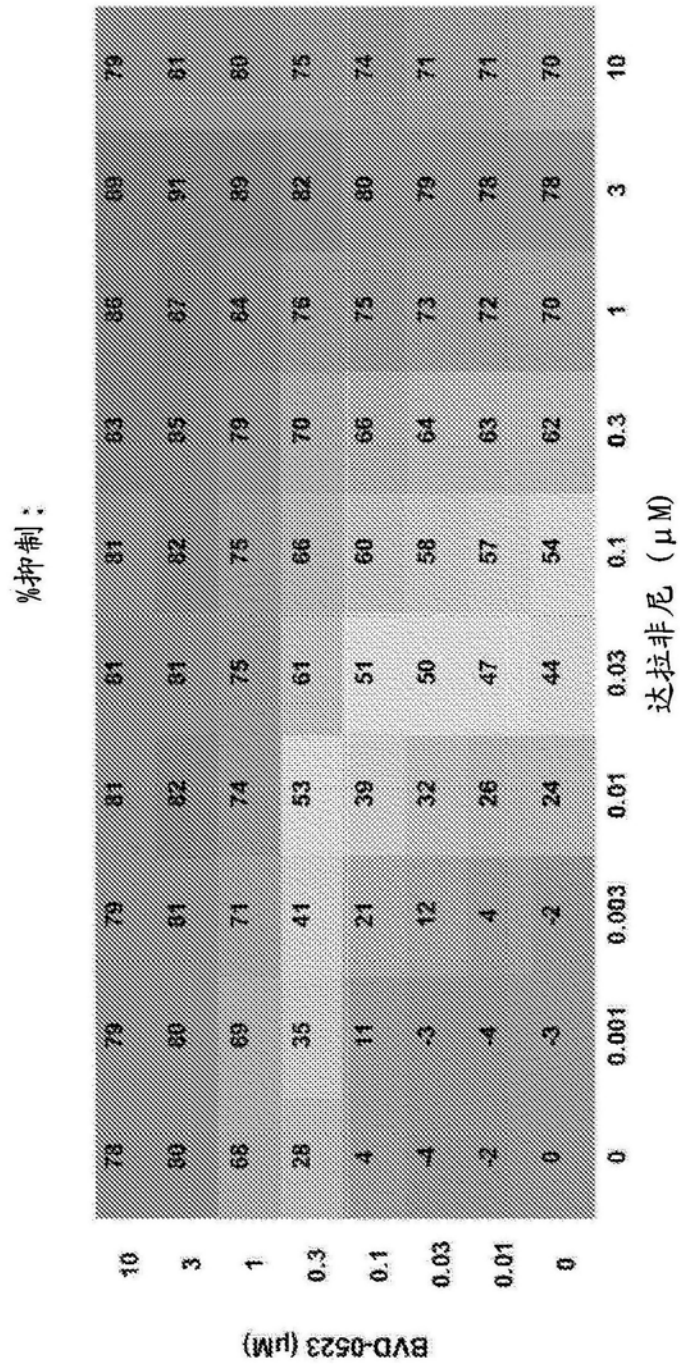

%抑制：
BVD-0523 (μM)
达拉非尼（μM）
10 78 80 68 28 4 -4 -2 0 79 80 69 35 11 -3 -4 -3 79 81 71 41 21 12 4 -2 81 82 74 53 39 32 26 24 81 81 75 61 51 50 47 44 82 82 75 66 60 58 57 54 83 85 79 70 66 64 63 62 86 87 84 76 75 73 72 70 89 91 89 82 80 79 78 78 79 81 80 75 74 71 71 70
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
0 0.001 0.003 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 10

图13A

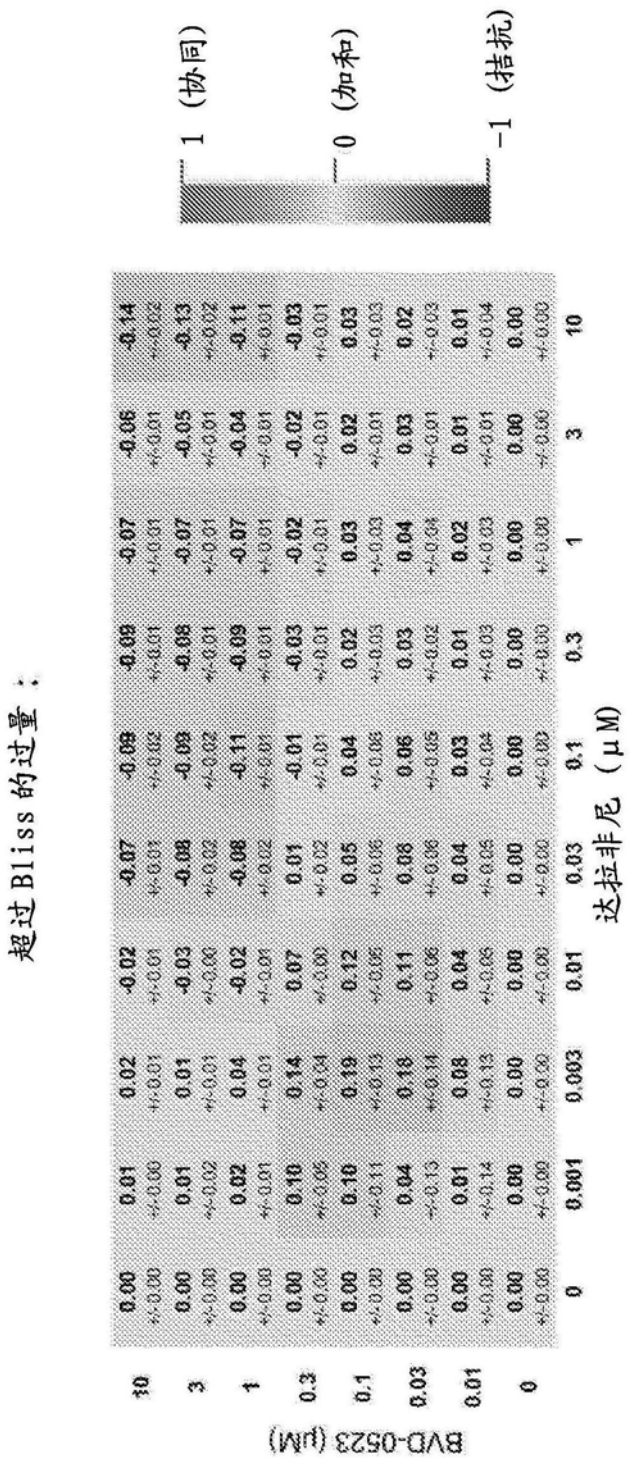

超过Bliss的过量：
1 (协同)
0 (加和)
-1 (拮抗)
BVD-0523 (μM)
达拉非尼 (μM)
0 0.001 0.003 0.01 0.03 0.1 0.3 1 3 10
10 0.00 0.01 0.02 -0.02 -0.07 -0.09 -0.09 -0.07 -0.06 -0.14
3 0.00 0.01 0.01 -0.03 -0.08 -0.09 -0.08 -0.07 -0.05 -0.13
1 0.00 0.02 0.04 -0.02 -0.08 -0.11 -0.09 -0.07 -0.04 -0.11
0.3 0.00 0.10 0.14 0.07 0.01 -0.01 -0.03 -0.02 -0.02 -0.03
0.1 0.00 0.10 0.19 0.12 0.05 0.04 0.02 0.03 0.02 0.03
0.03 0.00 0.04 0.18 0.11 0.08 0.06 0.03 0.04 0.03 0.02
0.01 0.00 0.01 0.08 0.04 0.04 0.03 0.01 0.02 0.01 0.01
0 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00 0.00

图13B

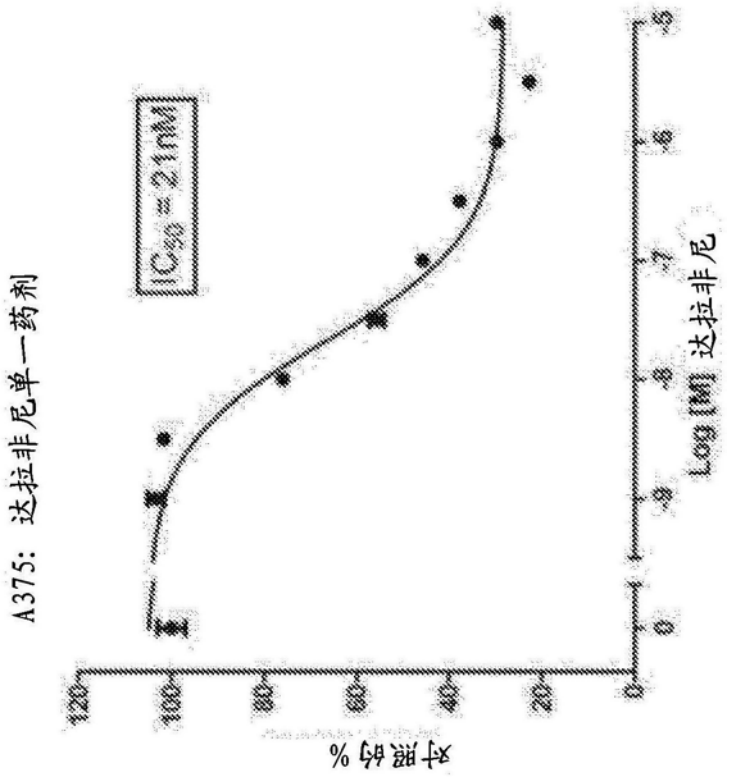

A375: 达拉非尼单一药剂
IC50 = 21nM
对照的 %
Log [M] 达拉非尼

图13C

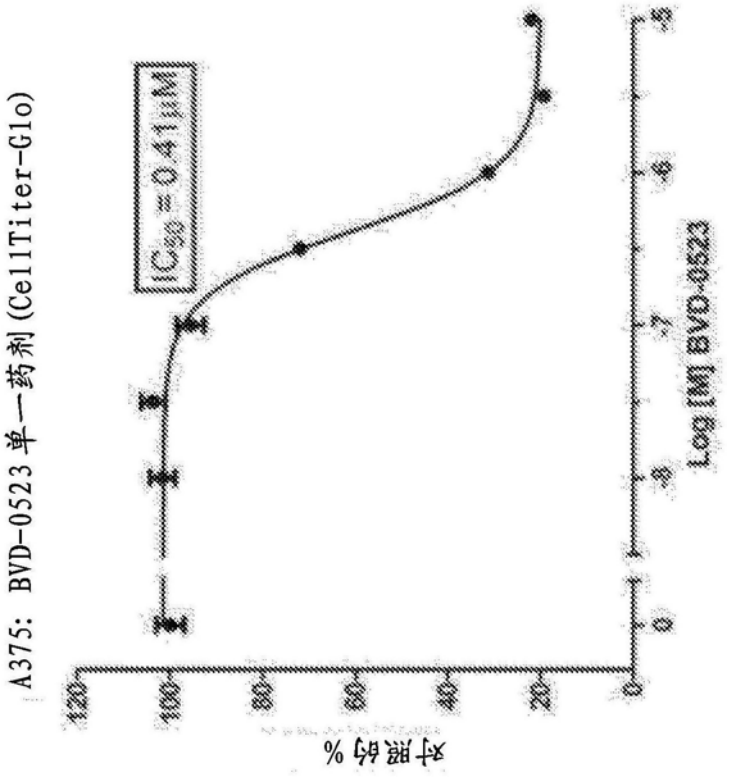

A375: BVD-0523 单一药剂 (CellTiter-Glo)
IC50 = 0.41μM
对照的 %
Log [M] BVD-0523

图13D

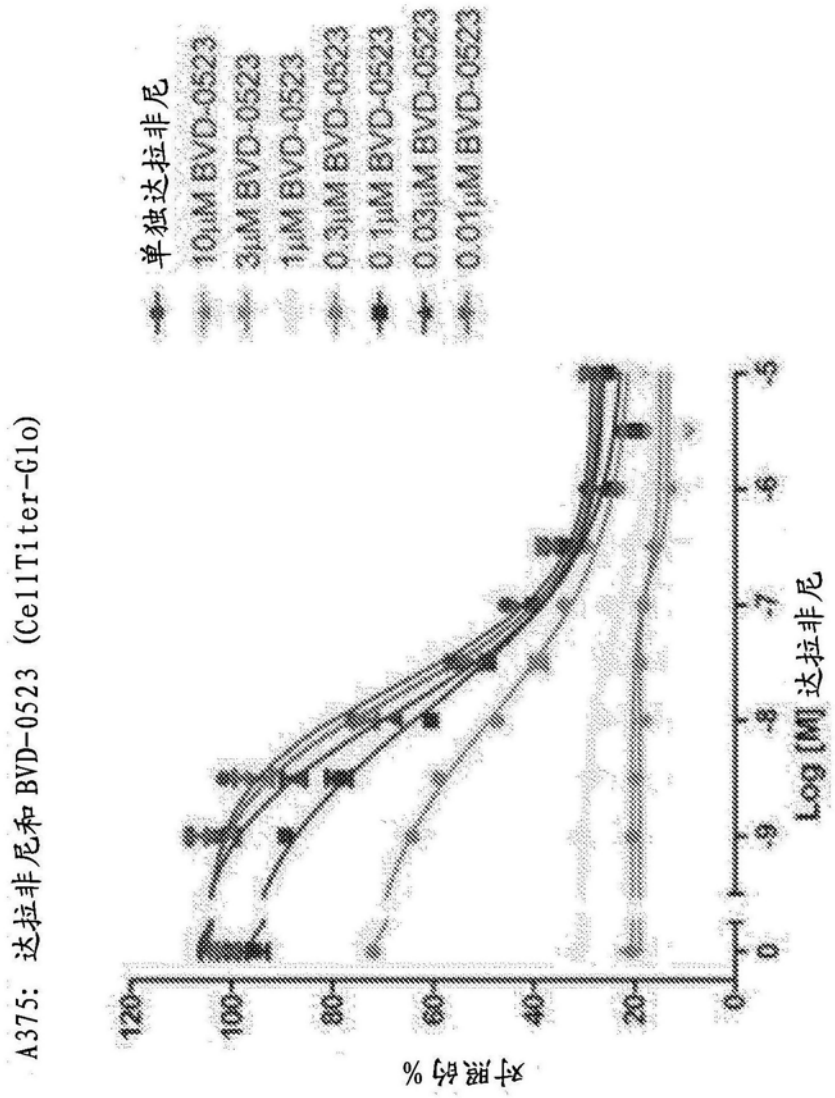

A375: 达拉非尼和 BVD-0523 (CellTiter-Glo)
单独达拉非尼
10μM BVD-0523
3μM BVD-0523
1μM BVD-0523
0.3μM BVD-0523
0.1μM BVD-0523
0.03μM BVD-0523
0.01μM BVD-0523
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图13E

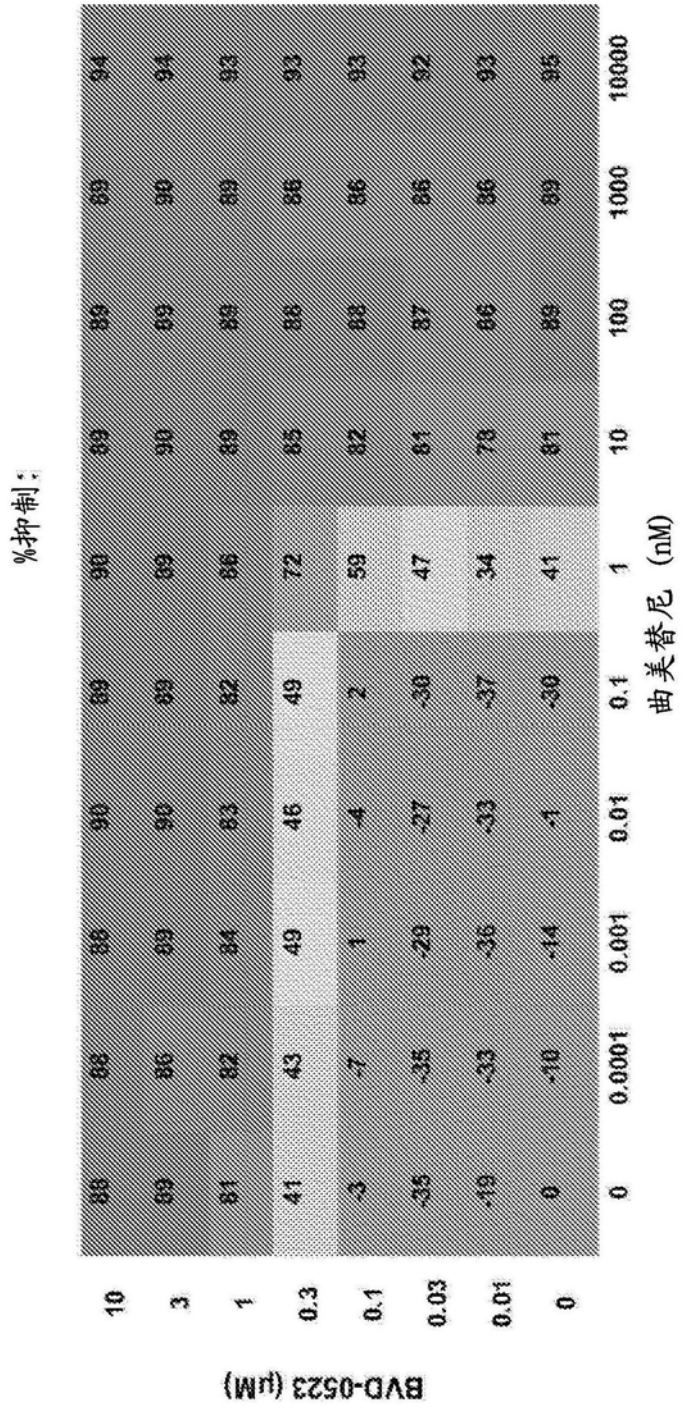

%抑制：
BVD-0523 (μM)
曲美替尼 (nM)
10 88 88 86 88 90 89 90 89 89 89 94
3 69 86 83 89 90 89 90 90 89 90 94
1 81 82 84 83 83 82 86 89 88 89 93
0.3 41 43 49 46 49 72 85 88 86 86 93
0.1 -3 -7 1 -4 2 59 82 88 86 86 93
0.03 -35 -35 -29 -27 -30 47 81 87 86 86 92
0.01 -19 -33 -36 -33 -37 34 78 86 86 86 93
0 0 -10 -14 -1 -30 41 81 89 89 89 95
0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000

图14A

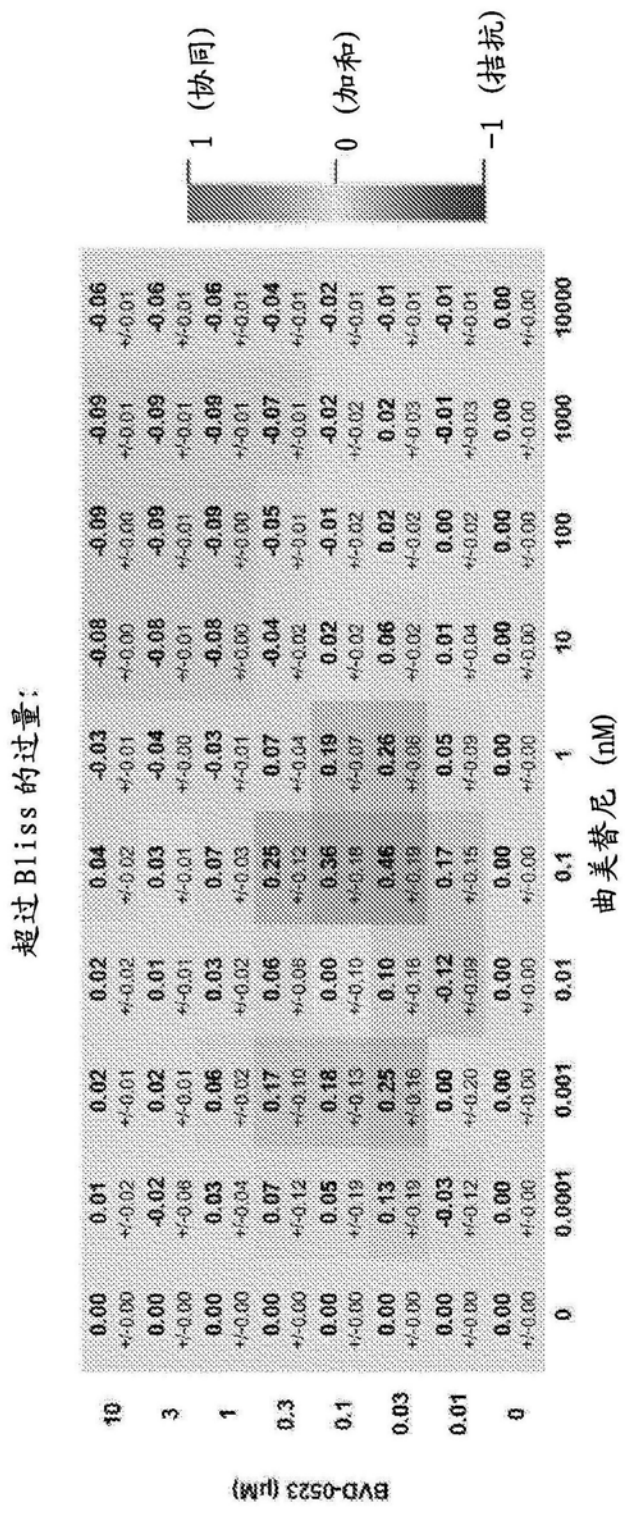

超过 Bliss 的过量:
1 (协同)
0 (加和)
-1 (拮抗)
BVD-523 (μM)
曲美替尼 (nM)
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
0
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000

图14B

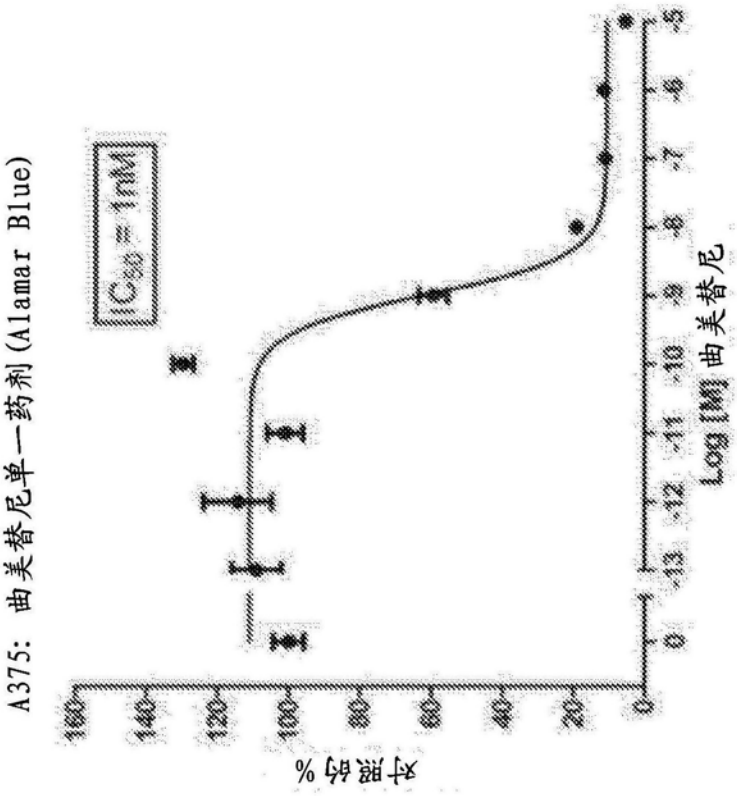

A375: 曲美替尼单一药剂(Alamar Blue)
IC_{50} = 1nM
对照的 %
Log [M] 曲美替尼

图14C

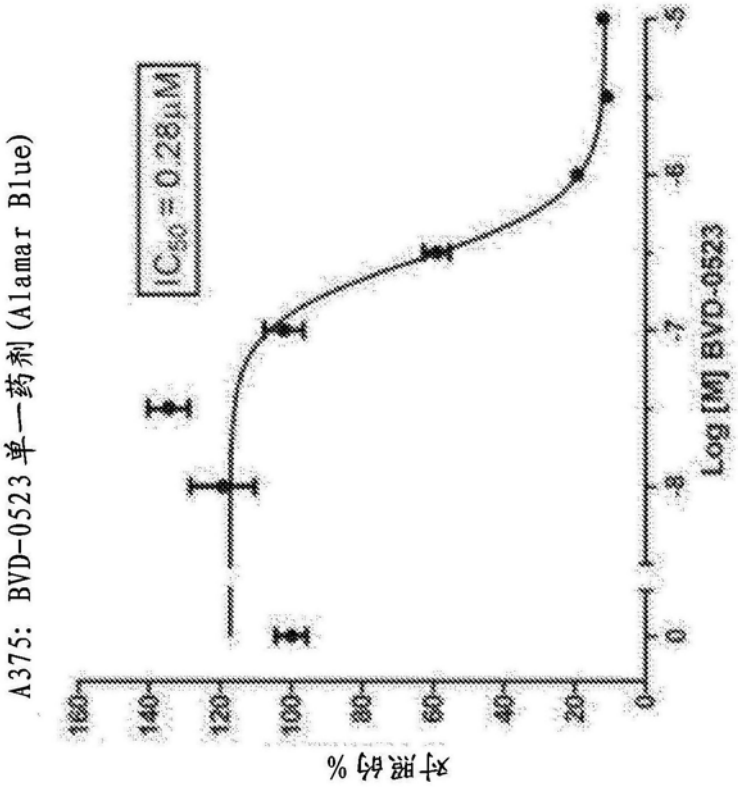

A375: BVD-0523 单一药剂(Alamar Blue)
IC_{50} = 0.28μM
对照的 %
Log [M] BVD-0523

图14D

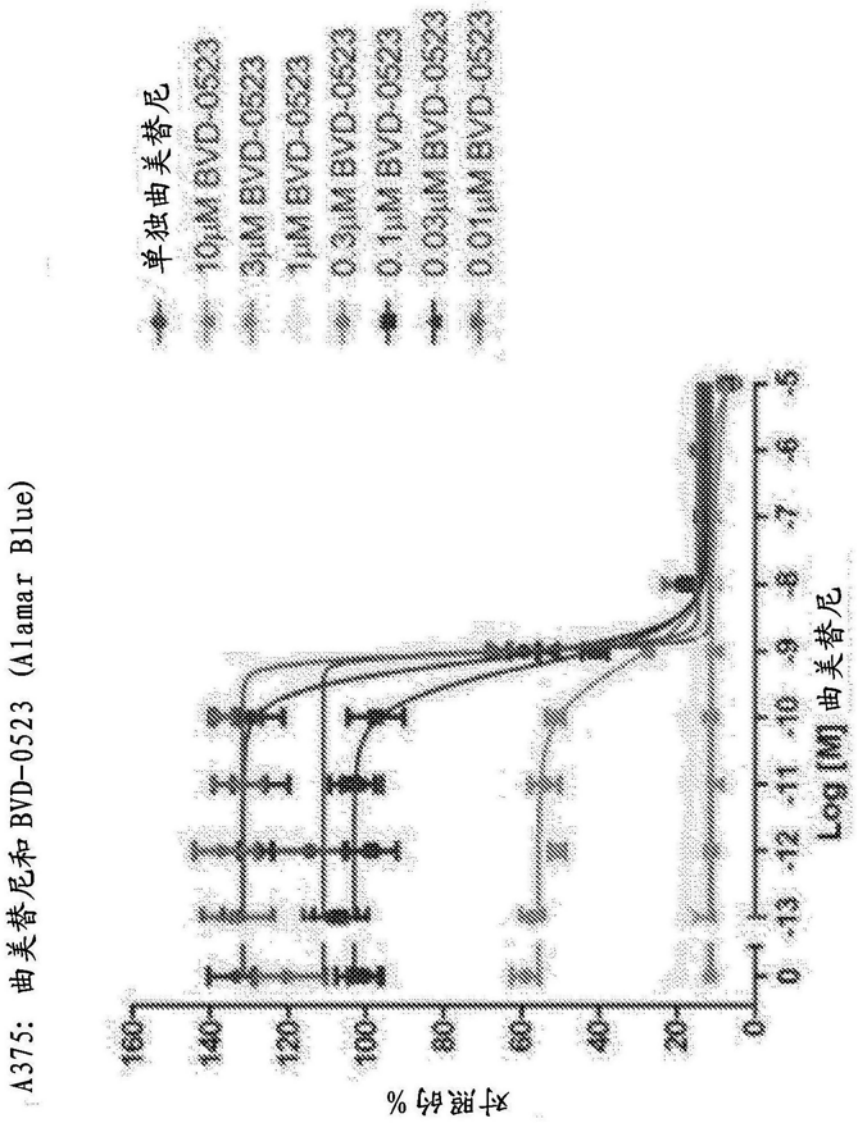

A375：曲美替尼和 BVD-0523 (Alamar Blue)
单独曲美替尼
10μM BVD-0523
3μM BVD-0523
1μM BVD-0523
0.3μM BVD-0523
0.1μM BVD-0523
0.03μM BVD-0523
0.01μM BVD-0523
对照的 %
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
Log [M] 曲美替尼

图14E

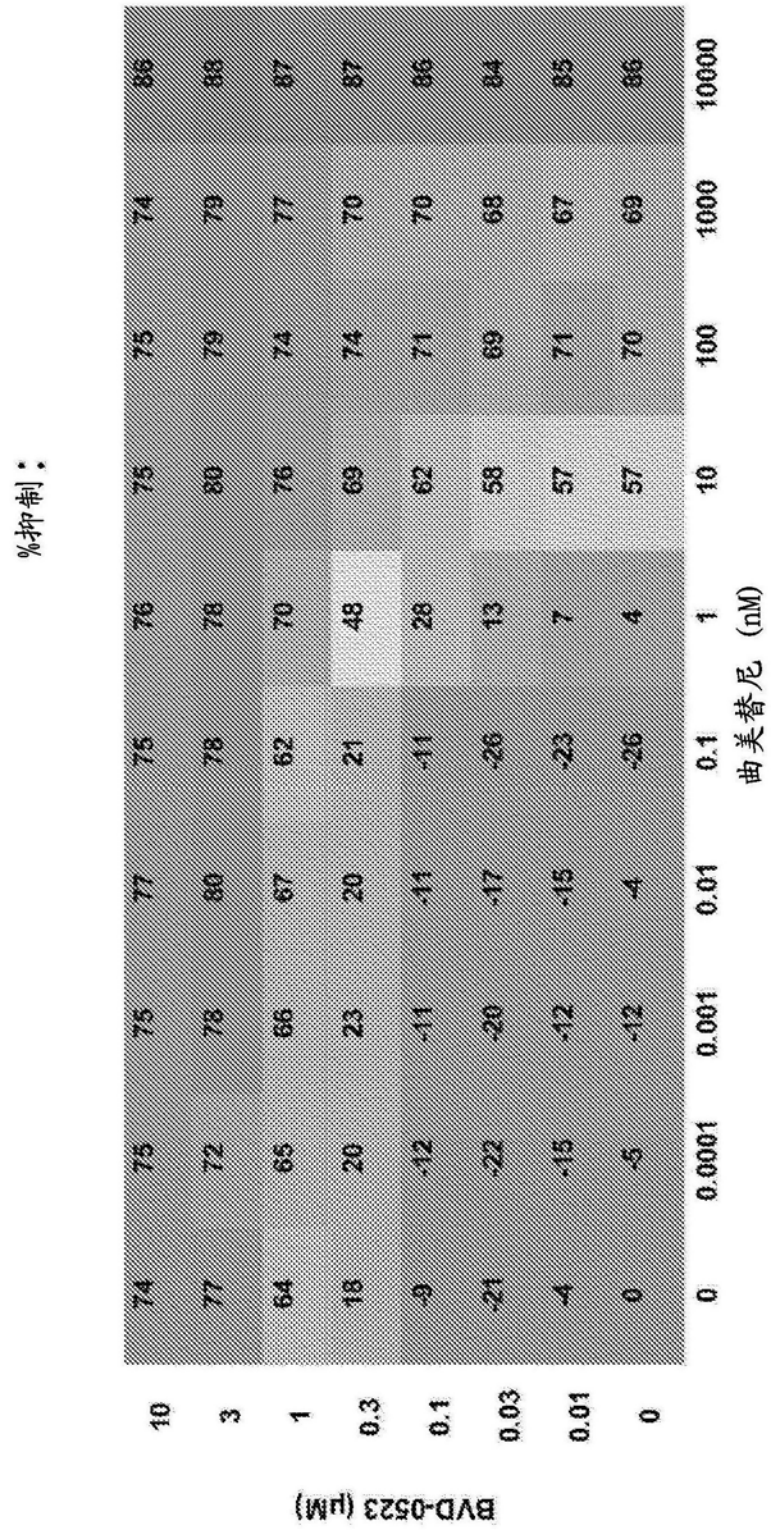

%抑制：
BVD-0523 (μM)
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
曲美替尼 (nM)
0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
74 75 75 77 75 76 75 75 74 86
77 72 78 80 78 78 80 79 79 88
64 65 66 67 62 70 76 74 77 87
18 20 23 20 21 48 69 74 70 87
-9 -12 -11 -11 -11 28 62 71 70 86
-21 -22 -20 -17 -26 13 58 69 68 84
-4 -15 -12 -15 -23 7 57 71 67 85
0 -5 -12 -4 -26 4 57 70 69 86

图15A

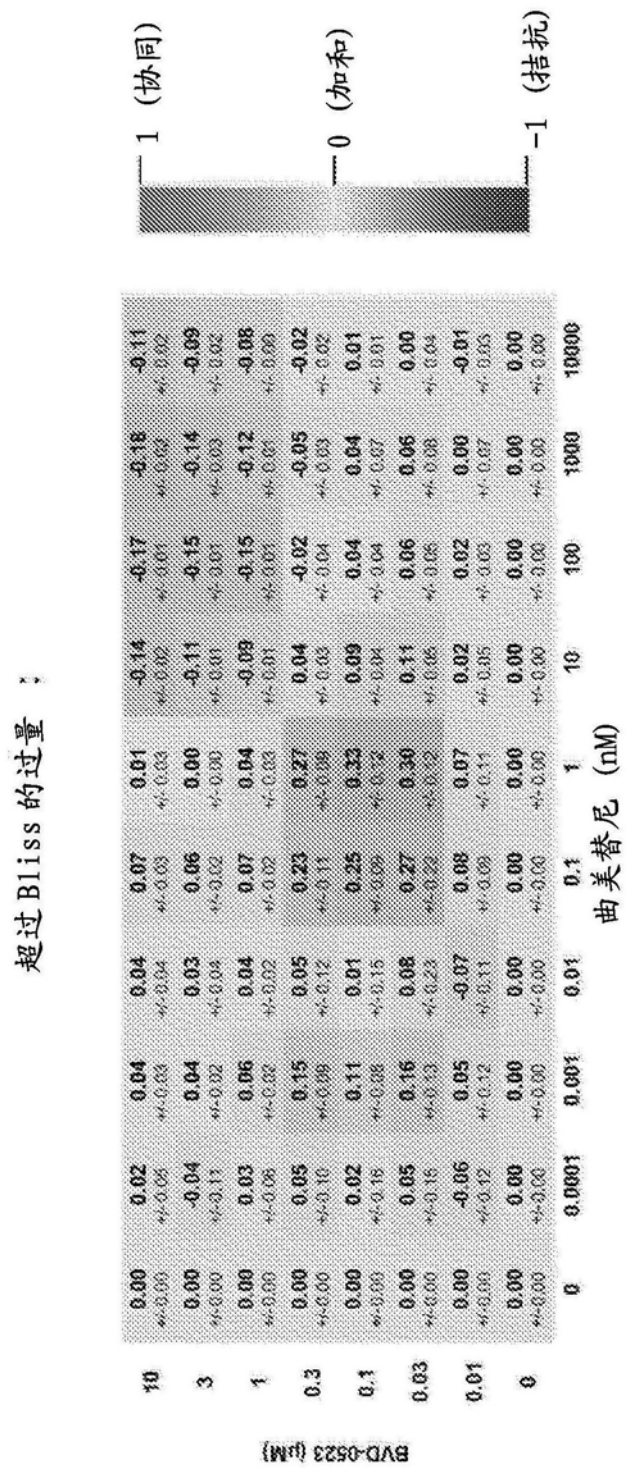

1 (协同)
0 (加和)
-1 (拮抗)
超过 Bliss 的过量：
BVD-0523 (μM)
10
3
1
0.3
0.1
0.03
0.01
0
0 0.0001 0.001 0.01 0.1 1 10 100 1000 10000
曲美替尼 (nM)

图15B

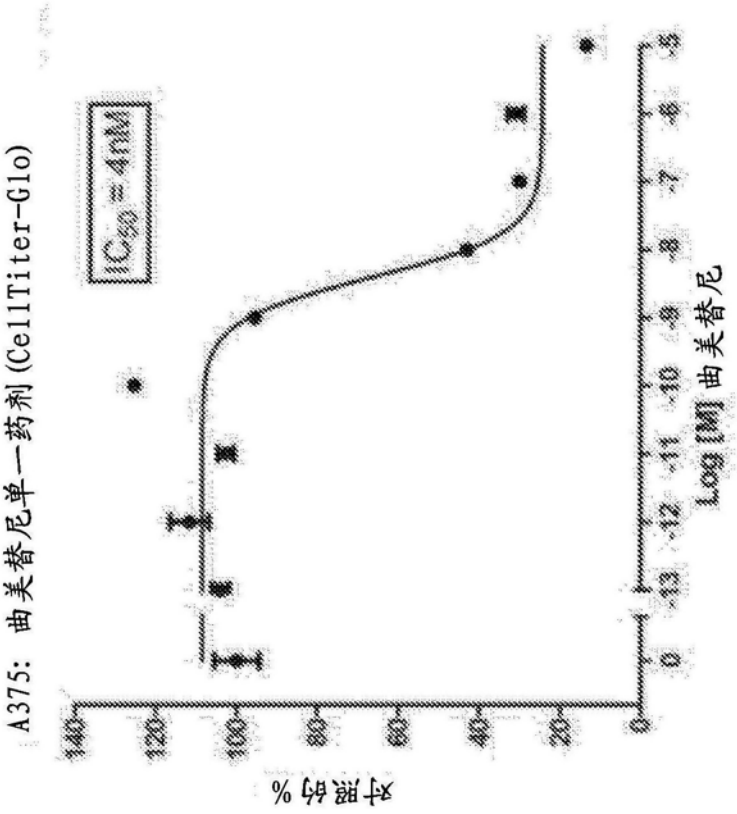

A375: 曲美替尼单一药剂 (CellTiter-Glo)
IC_{50} = 4nM
对照的 %
Log [M] 曲美替尼

图15C

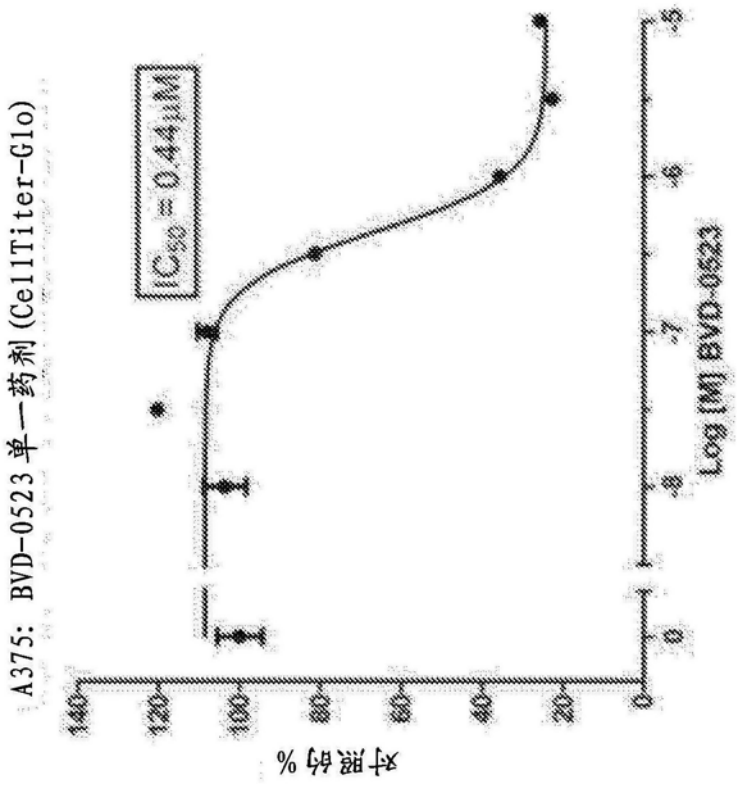

A375: BVD-0523 单一药剂 (CellTiter-Glo)
IC_{50} = 0.44μM
对照的 %
Log [M] BVD-0523

图15D

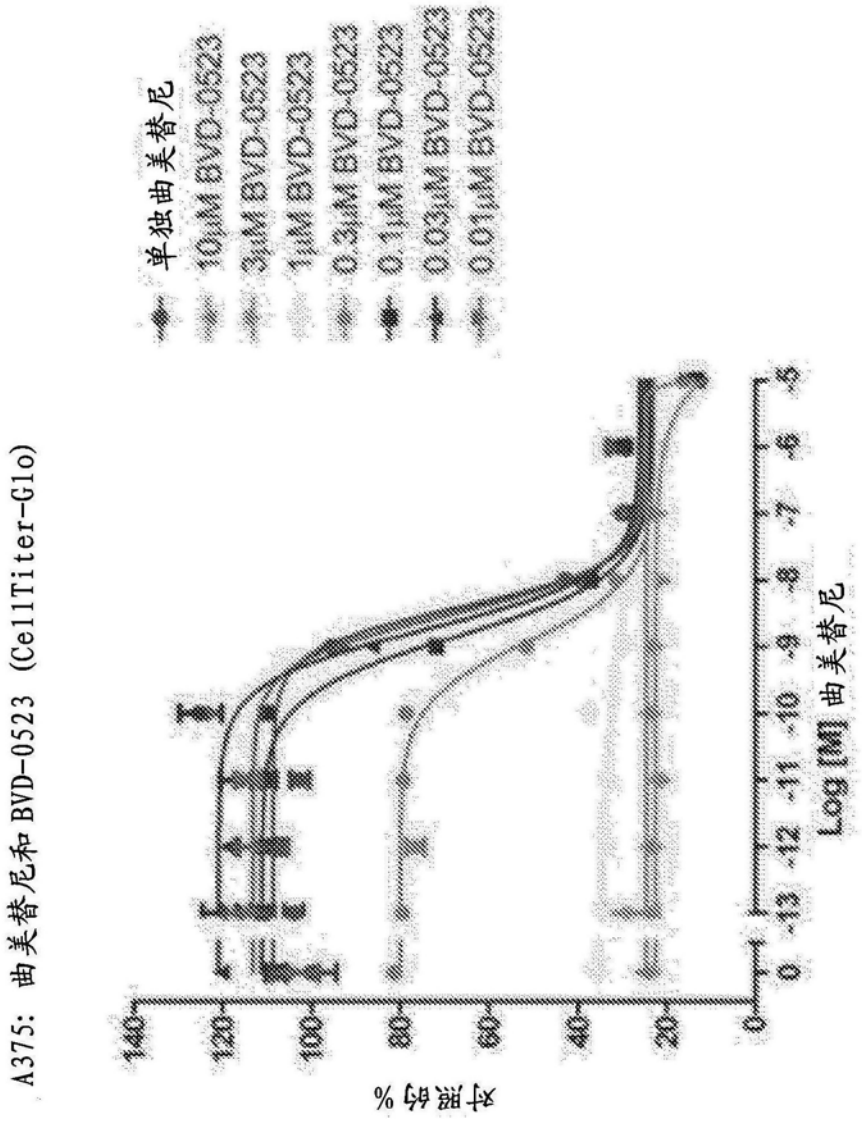

A375: 曲美替尼和 BVD-0523 (CellTiter-Glo)
单独曲美替尼
10μM BVD-0523
3μM BVD-0523
1μM BVD-0523
0.3μM BVD-0523
0.1μM BVD-0523
0.03μM BVD-0523
0.01μM BVD-0523
对照的 %
140
120
100
80
60
40
20
0
0 -13 -12 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5
Log [M] 曲美替尼

图15E

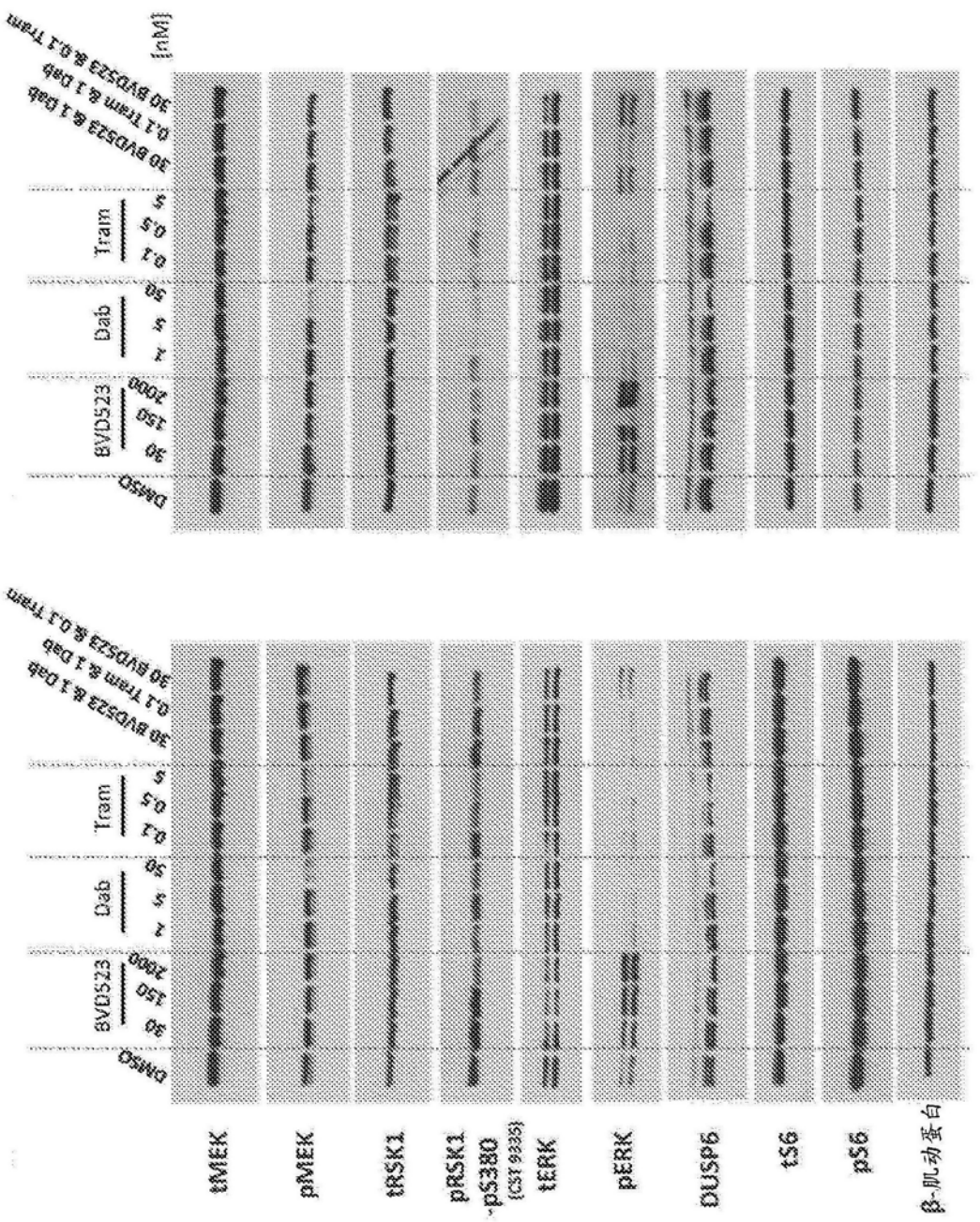

tMEK
pMEK
tRSK1
pRSK1 -pS380 (CST 9335)
tERK
pERK
DUSP6
tS6
pS6
β-肌动蛋白
DMSO
BVD523
30
150
2000
Dab
1
5
50
Tram
0.1
0.5
5
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram
{nM}

图16A

图16B

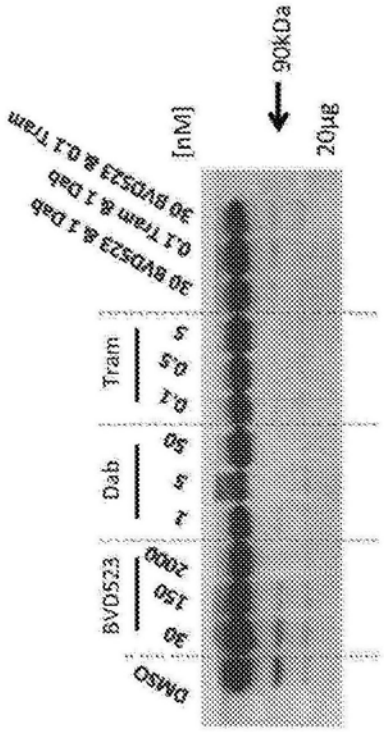

90KDa
20μg
[nM]
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram
Tram
0.1
0.5
5
Dab
1
5
50
BVD523
30
150
2000
DMSO

图16D

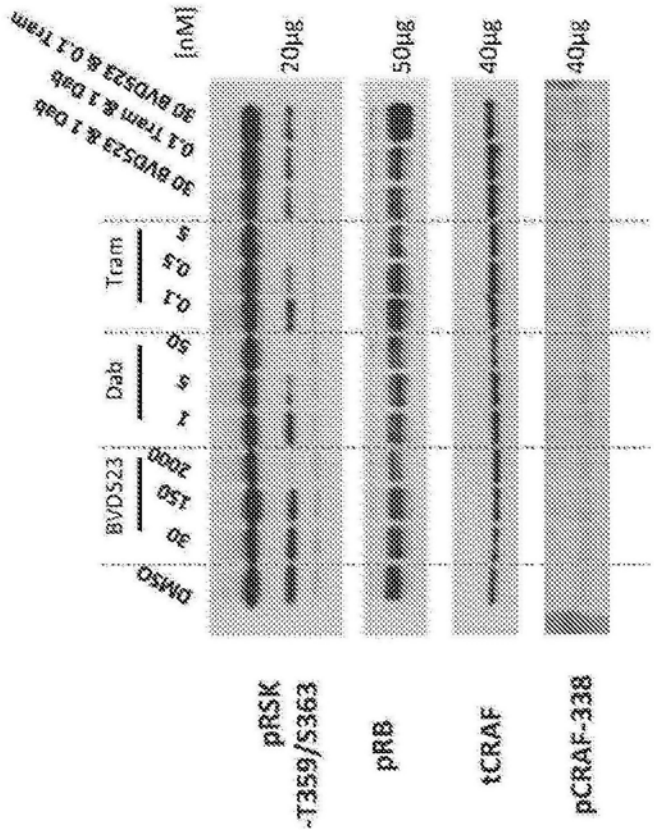

[nM]
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram
Tram
0.1
0.5
5
Dab
1
5
50
BVD523
30
150
2000
DMSO
20μg
50μg
40μg
40μg
pRSK
-T359/S363
pRB
tCRAF
pCRAF-338

图16C

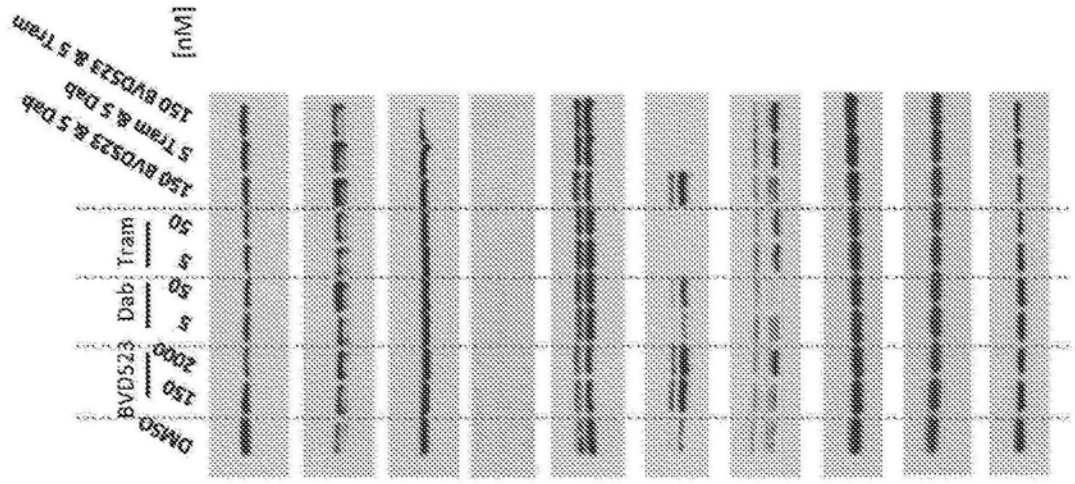

[nM]
150 BVD523 & 5 Tram
5 Tram & 5 Dab
150 BVD523 & 5 Dab
Tram
Dab
BVD523
DMSO
50
5
50
5
2000
150
tMEK
pMEK
tRSK1
pRSK1 -S380 (CST 9335)
tERK
pERK
DUSP6
tS6
pS6
β-肌动蛋白

图17B

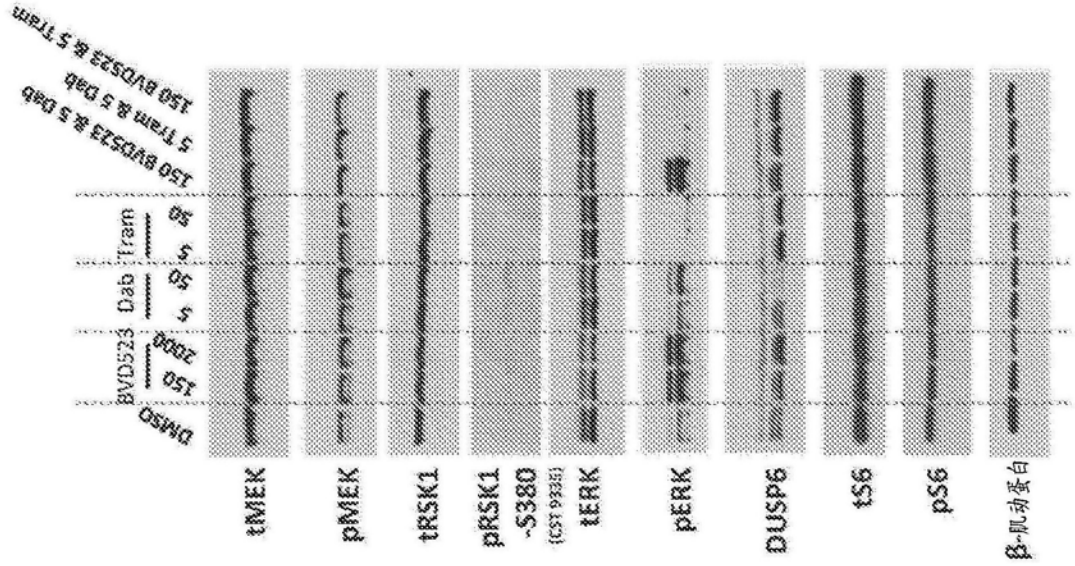

150 BVD523 & 5 Tram
5 Tram & 5 Dab
150 BVD523 & 5 Dab
Tram
Dab
BVD523
DMSO
50
5
50
5
2000
150
tMEK
pMEK
tRSK1
pRSK1 -S380 (CST 9335)
tERK
pERK
DUSP6
tS6
pS6
β-肌动蛋白

图17A

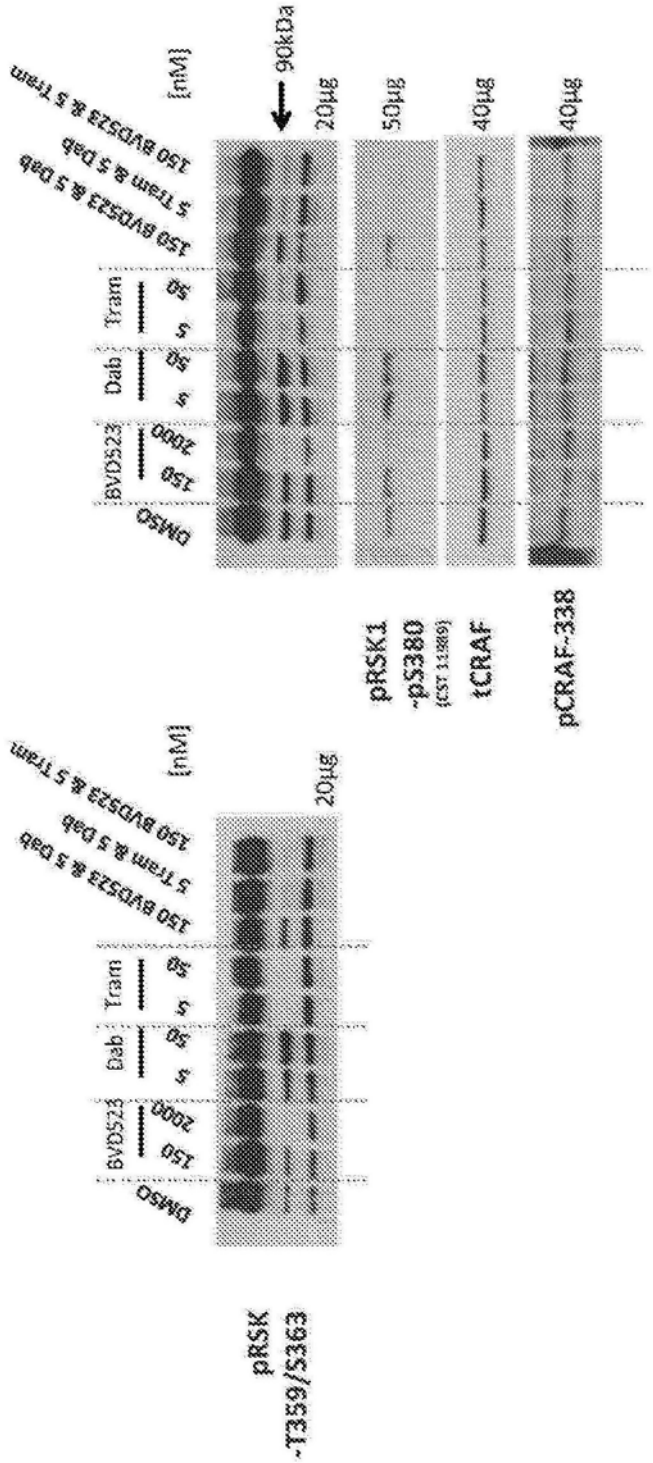

pRSK
-T359/S363
pRSK1
-pS380
(CST 11989)
tCRAF
pCRAF-338
90kDa
[nM]
DMSO
BVD523
Dab
Tram
150 BVD523 & 5 Dab
5 Tram & 5 Dab
150 BVD523 & 5 Tram
20µg
50µg
40µg

图17C

图17D

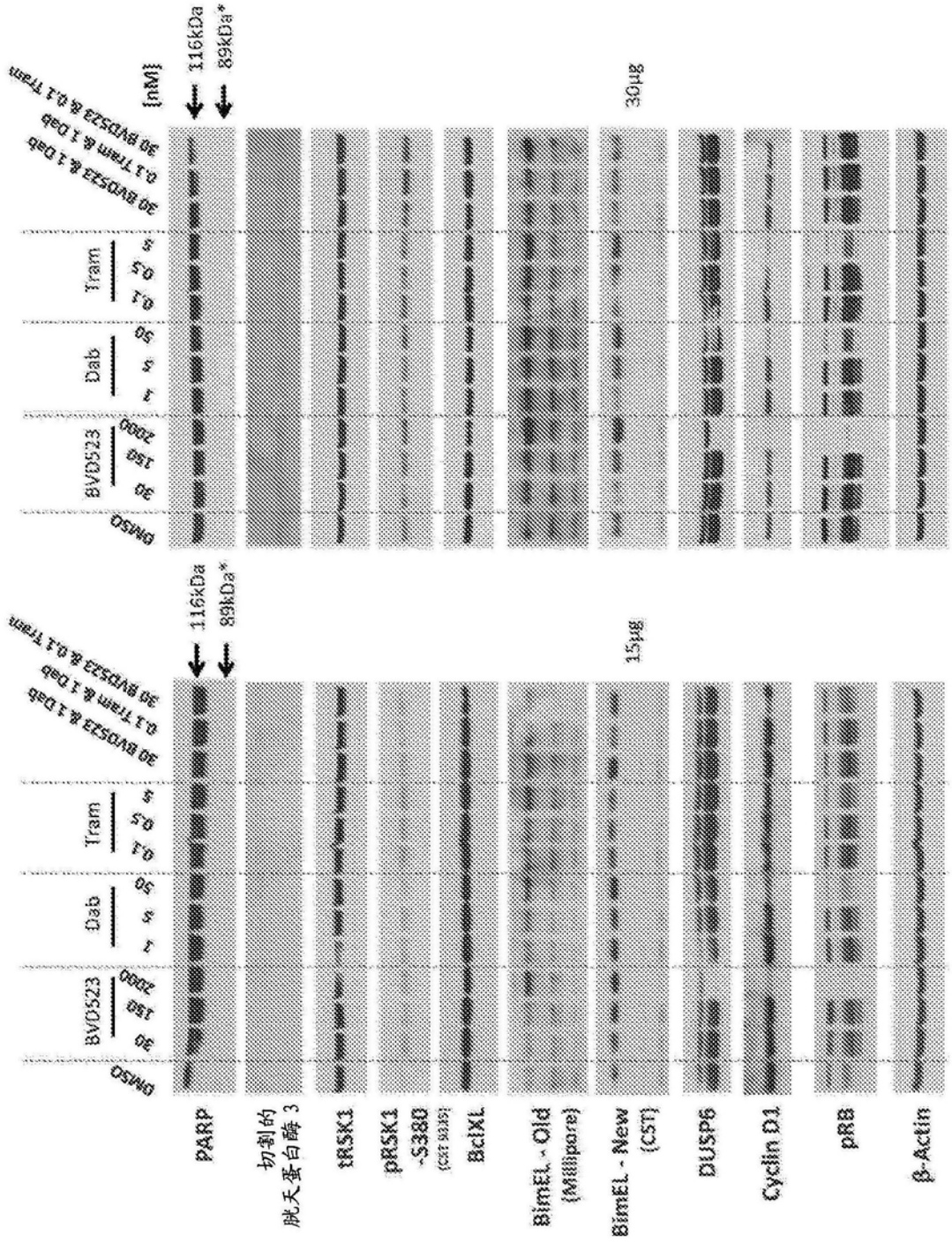

DMSO
BVD523
30
150
2000
Dab
1
5
50
Tram
0.1
0.5
5
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram
[nM]
116kDa
89kDa*
15μg
30μg
PARP
切割的
胱天蛋白酶 3
tRSK1
pRSK1
-S380
(CST 9335)
BclXL
BimEL - Old
(Millipore)
BimEL - New
(CST)
DUSP6
Cyclin D1
pRB
β-Actin

图18A

图18B

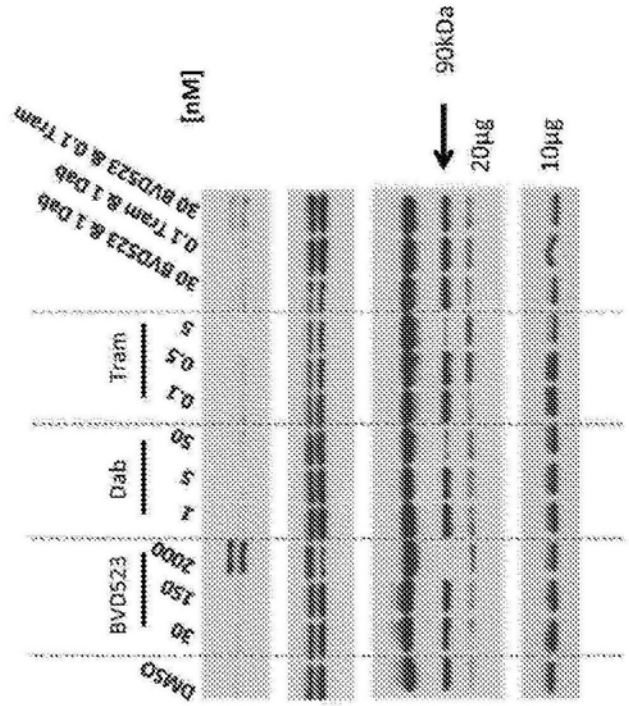

90kDa
20μg
10μg
[nM]
DMSO
BVD523
30
150
2000
Dab
1
5
50
Tram
0.1
0.5
5
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram

图18D

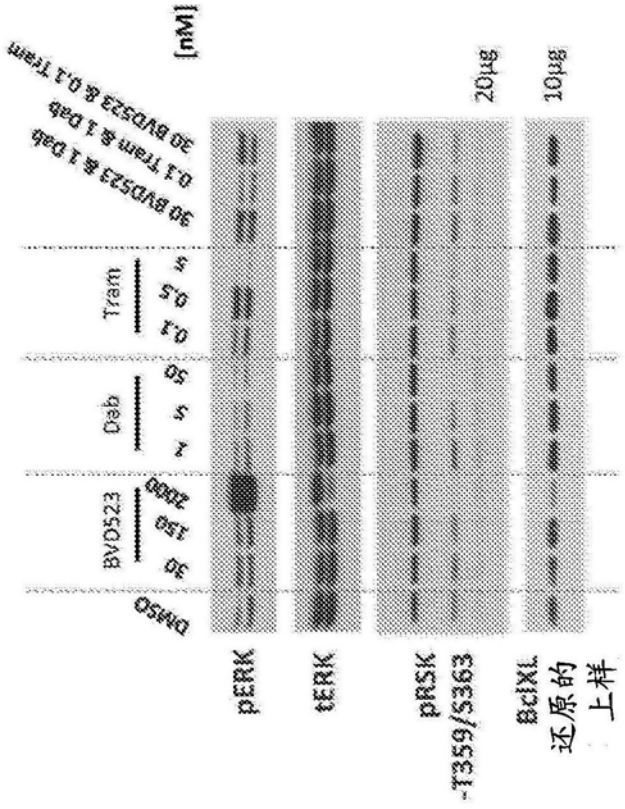
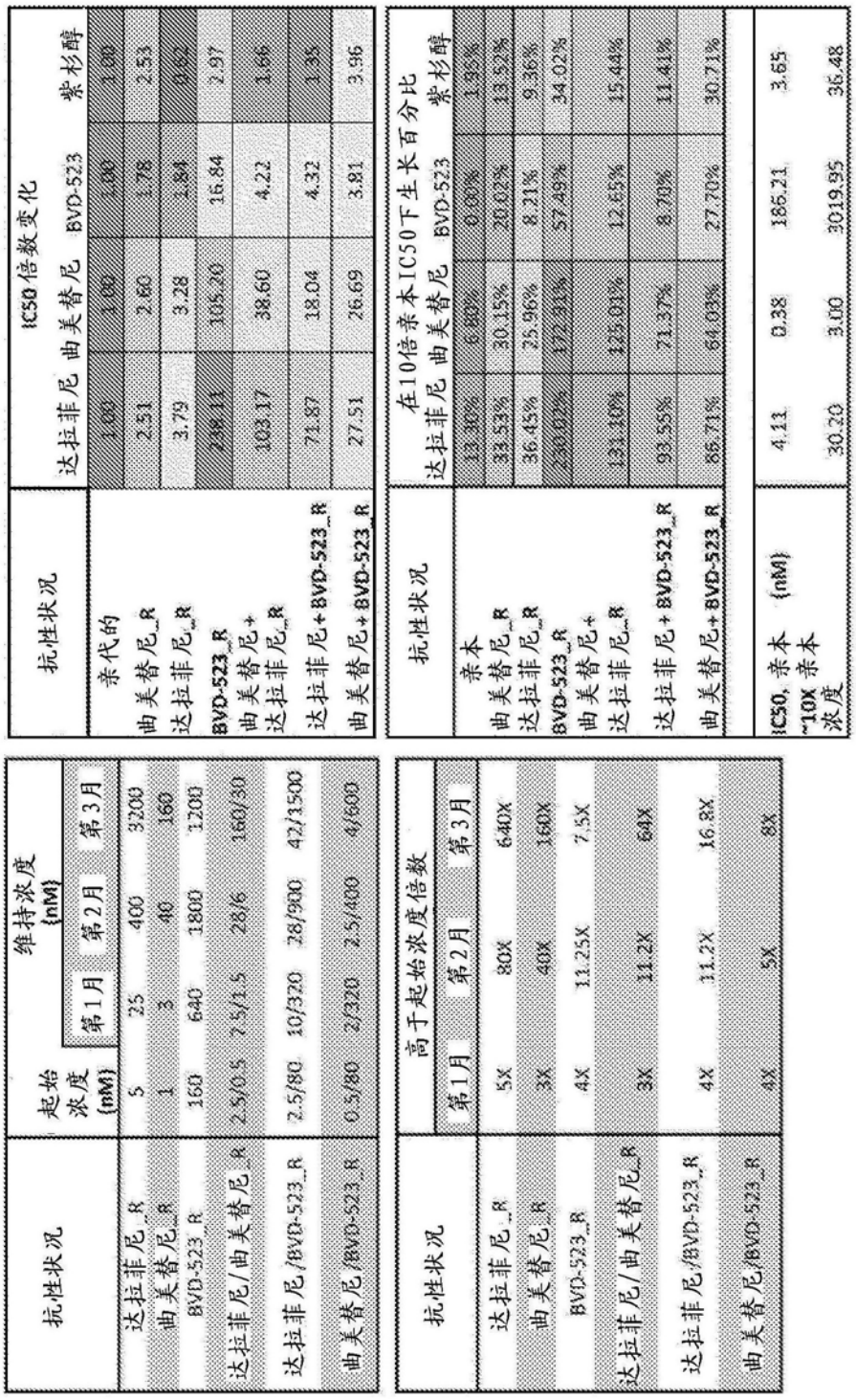

pERK
tERK
pRSK
-T359/S363
BclXL
还原的
上样
20μg
10μg
[nM]
DMSO
BVD523
30
150
2000
Dab
1
5
50
Tram
0.1
0.5
5
30 BVD523 & 1 Dab
0.1 Tram & 1 Dab
30 BVD523 & 0.1 Tram

图18C



抗性状况	起始浓度 (nM)	维持浓度 (nM) 第1月	第2月	第3月
达拉菲尼_R	5	25	400	3200
曲美替尼_R	1	3	40	160
BVD-523_R	160	640	1800	1200
达拉菲尼/曲美替尼_R	2.5/0.5	7.5/1.5	28/6	160/30
达拉菲尼/BVD-523_R	2.5/80	10/320	28/900	42/1500
曲美替尼/BVD-523_R	0.5/80	2.5/320	2.5/400	4/600

抗性状况	高于起始浓度倍数 第1月	第2月	第3月
达拉菲尼_R	5X	80X	640X
曲美替尼_R	3X	40X	160X
BVD-523_R	4X	11.25X	7.5X
达拉菲尼/曲美替尼_R	3X	11.2X	64X
达拉菲尼/BVD-523_R	4X	11.2X	16.8X
曲美替尼/BVD-523_R	4X	5X	8X

抗性状况	IC50倍数变化 达拉菲尼	曲美替尼	BVD-523	紫杉醇
亲代的	1.00	1.00	1.00	1.00
曲美替尼_R	2.51	2.60	1.78	2.53
达拉菲尼_R	3.79	3.28	1.84	3.62
BVD-523_R	238.11	105.20	16.84	2.97
曲美替尼+达拉菲尼_R	103.17	38.60	4.22	1.66
达拉菲尼+BVD-523_R	71.87	18.04	4.32	1.35
曲美替尼+BVD-523_R	27.51	26.69	3.81	3.96

抗性状况	在10倍亲本IC50下生长百分比 达拉菲尼	曲美替尼	BVD-523	紫杉醇
亲本	13.30%	6.80%	6.00%	1.95%
曲美替尼_R	33.53%	30.15%	20.62%	13.52%
达拉菲尼_R	36.45%	25.96%	8.21%	9.36%
BVD-523_R	230.02%	172.31%	57.49%	34.02%
曲美替尼+达拉菲尼_R	131.10%	125.01%	12.65%	15.44%
达拉菲尼+BVD-523_R	93.55%	71.37%	8.70%	11.41%
曲美替尼+BVD-523_R	86.71%	64.03%	27.70%	30.71%

IC50, 亲本 (nM)	4.11	0.38	186.21	3.65
~10X 亲本浓度	30.20	3.00	3019.95	36.48

图19

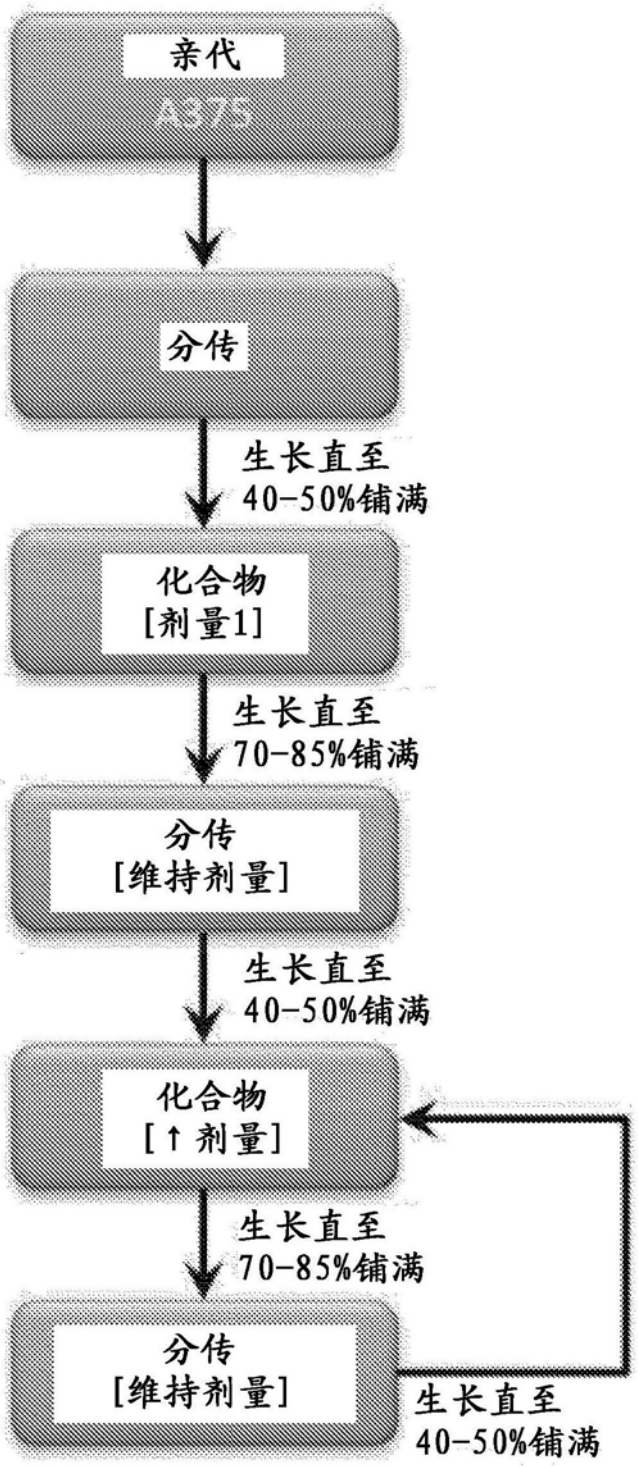

亲代
A375
分传
生长直至
40-50%铺满
化合物
[剂量1]
生长直至
70-85%铺满
分传
[维持剂量]
生长直至
40-50%铺满
化合物
[↑剂量]
生长直至
70-85%铺满
分传
[维持剂量]
生长直至
40-50%铺满

图20

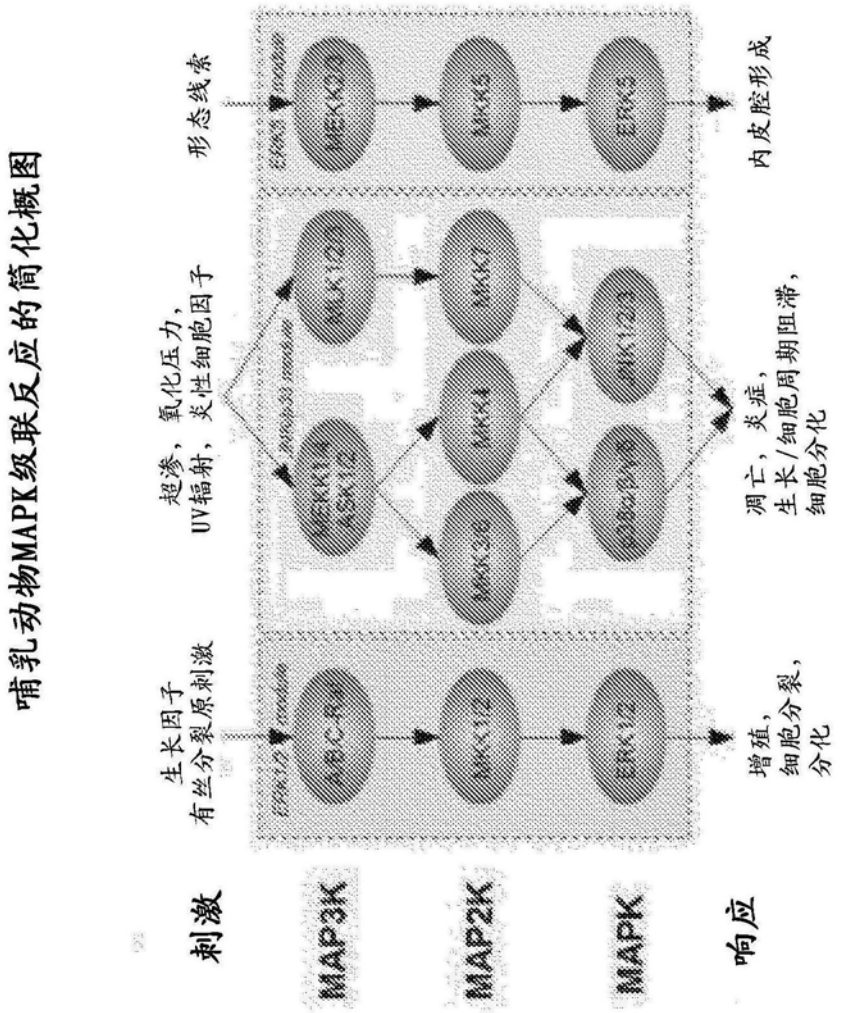

哺乳动物MAPK级联反应的简化概图
刺激
生长因子
有丝分裂原刺激
超渗，氧化压力，
UV辐射，炎性细胞因子
形态线索
MAP3K
MAP2K
MAPK
响应
增殖，
细胞分裂，
分化
凋亡，炎症，
生长/细胞周期阻滞，
细胞分化
内皮腔形成

图21

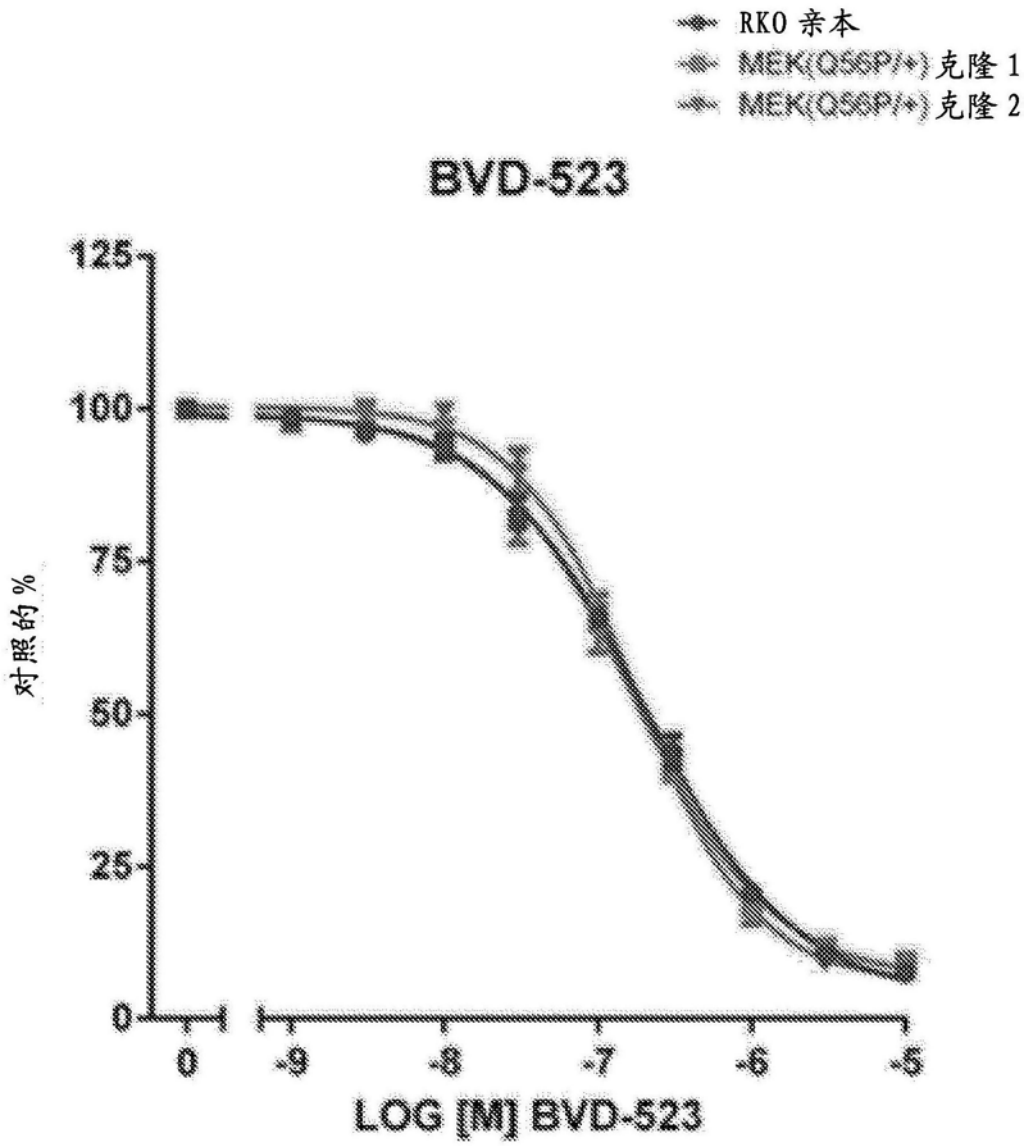

RKO 亲本
MEK(Q56P/+)克隆 1
MEK(Q56P/+)克隆 2
BVD-523
125
100
75
50
25
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
LOG [M] BVD-523

图22A

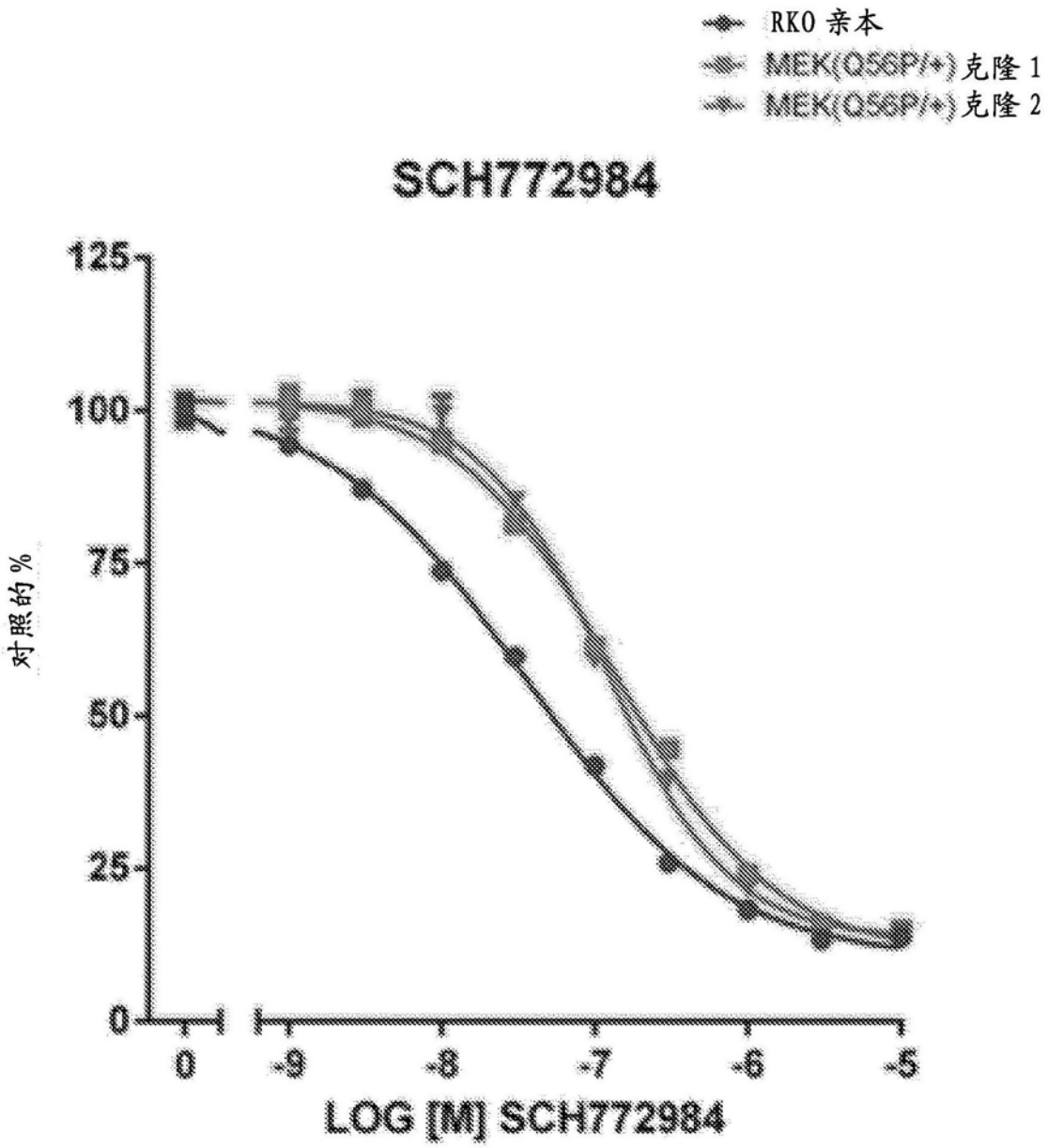

RKO 亲本
MEK(Q56P/+)克隆 1
MEK(Q56P/+)克隆 2
SCH772984
125
100
75
50
25
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
LOG [M] SCH772984

图22B

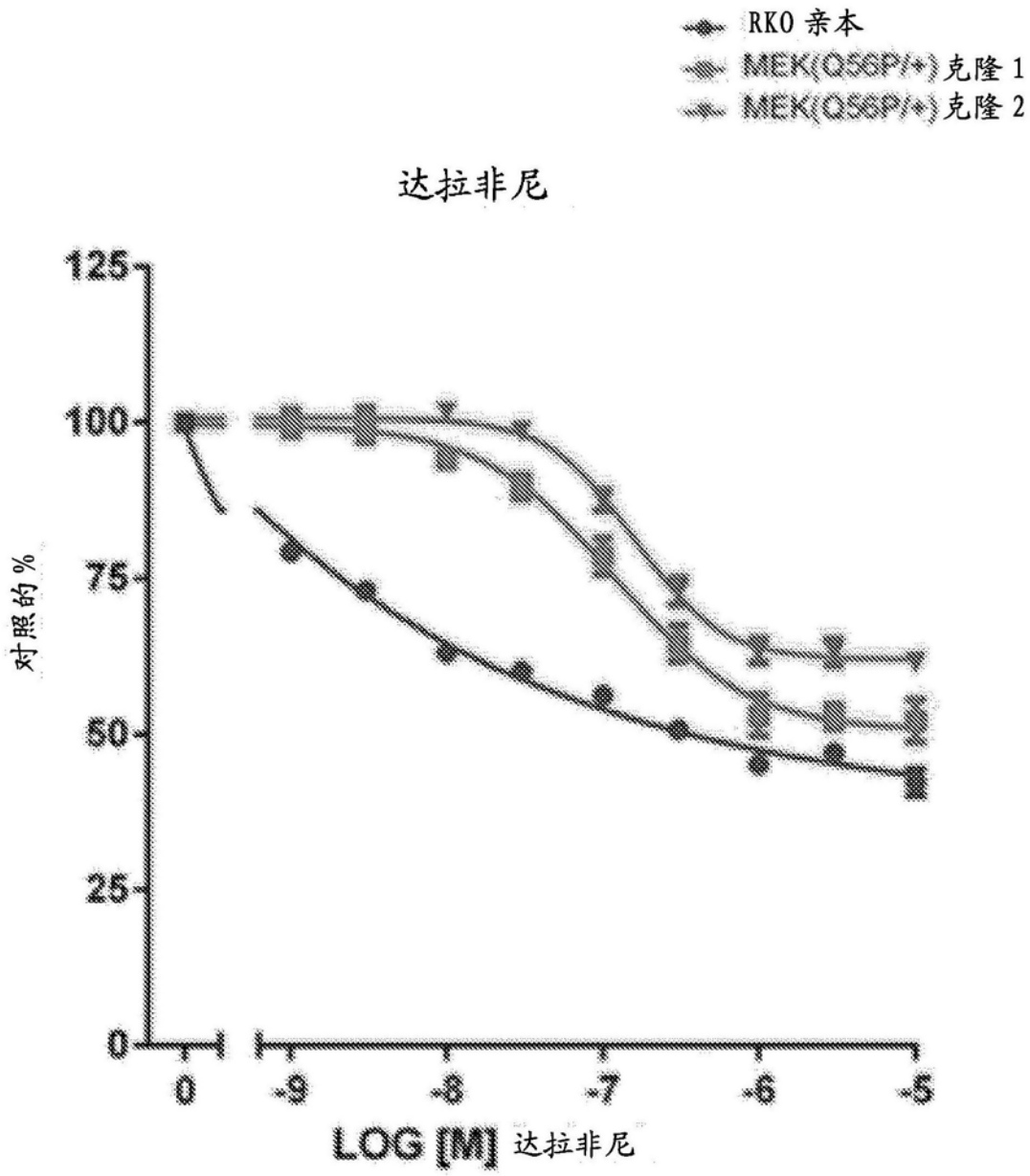

RKO 亲本
MEK(Q56P/+)克隆 1
MEK(Q56P/+)克隆 2
达拉非尼
125
100
75
50
25
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
LOG [M] 达拉非尼

图22C

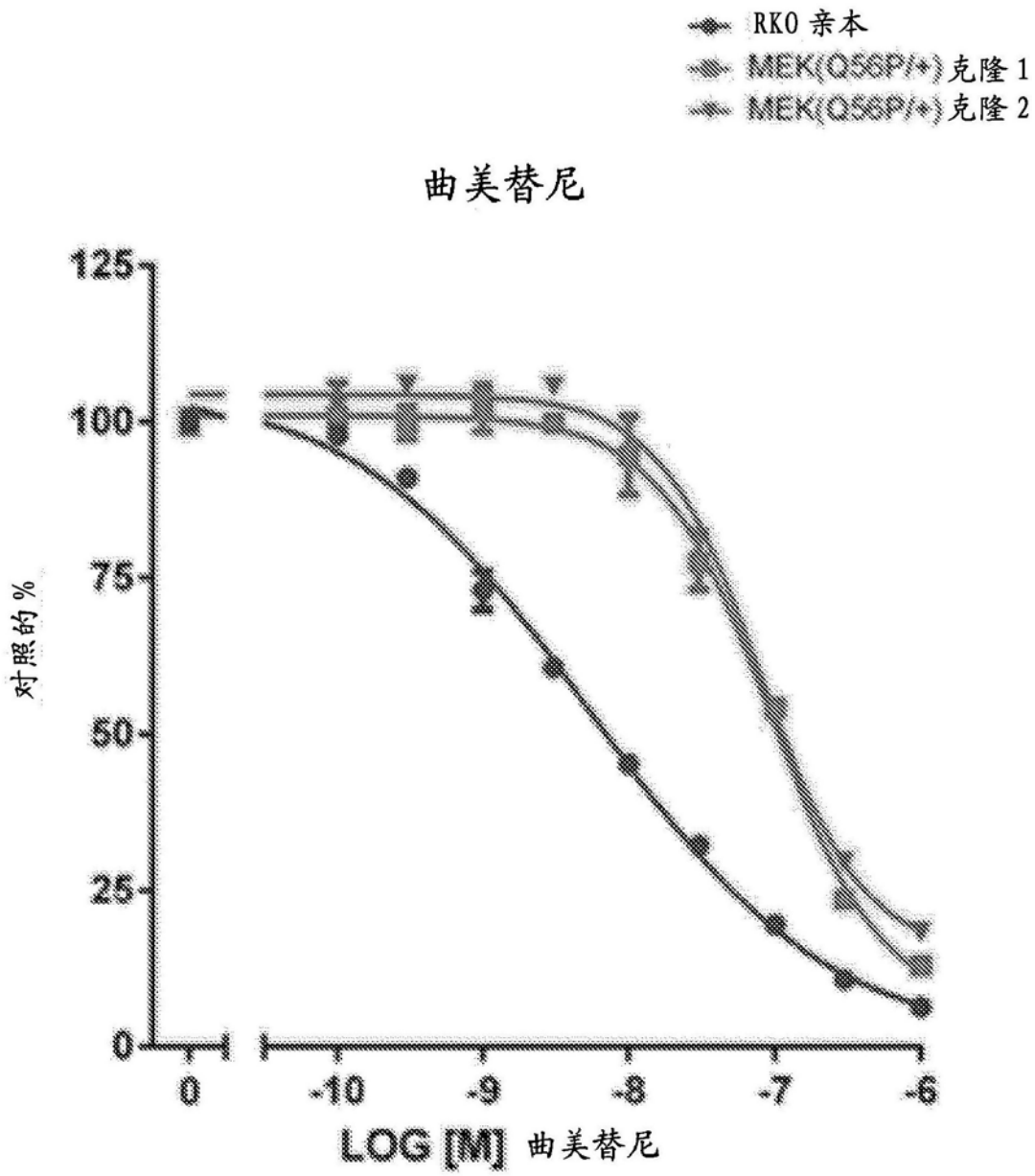

RKO 亲本
MEK(Q56P/+)克隆 1
MEK(Q56P/+)克隆 2
曲美替尼
125
100
75
50
25
0
对照的 %
0
-10
-9
-8
-7
-6
LOG [M] 曲美替尼

图22D

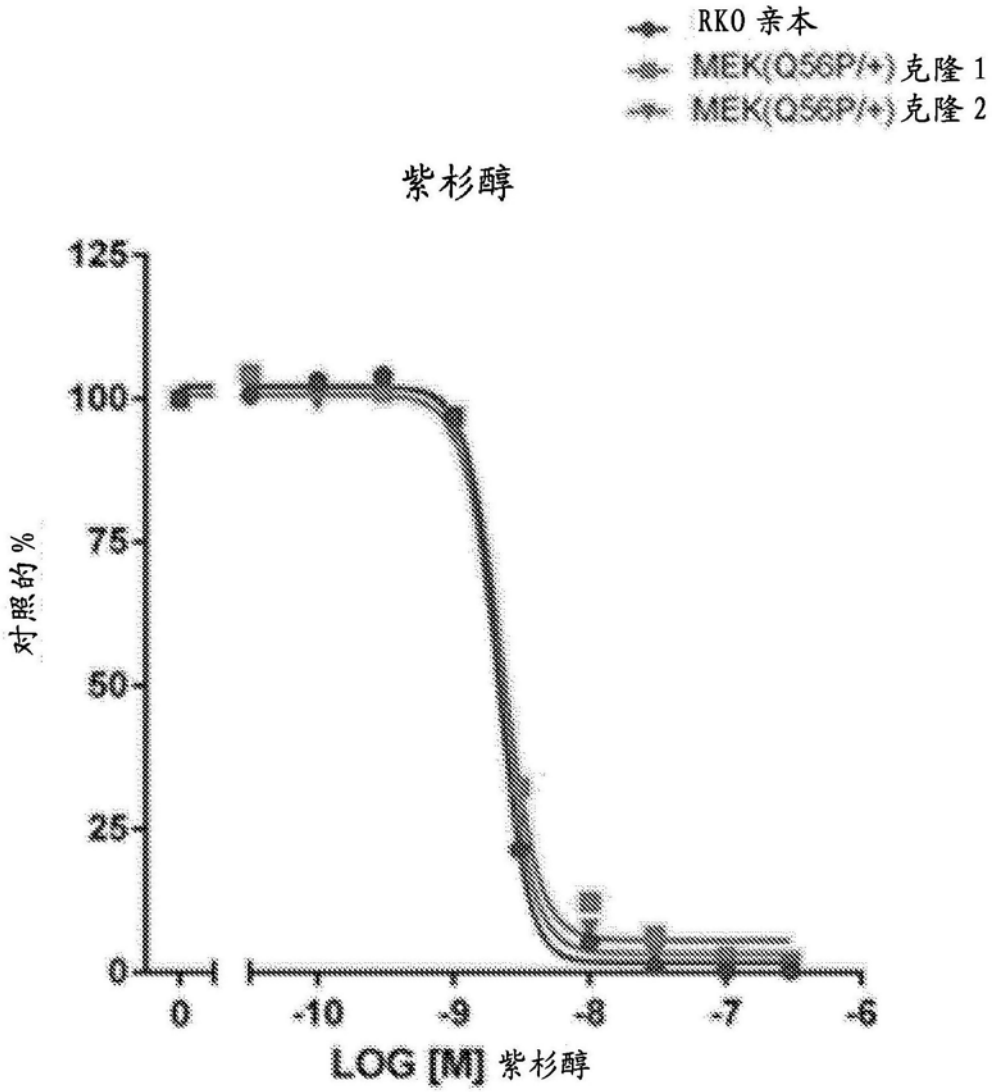

RKO 亲本
MEK(Q56P/+)克隆 1
MEK(Q56P/+)克隆 2
紫杉醇
125
100
75
50
25
0
对照的 %
0
-10
-9
-8
-7
-6
LOG [M] 紫杉醇

图22E

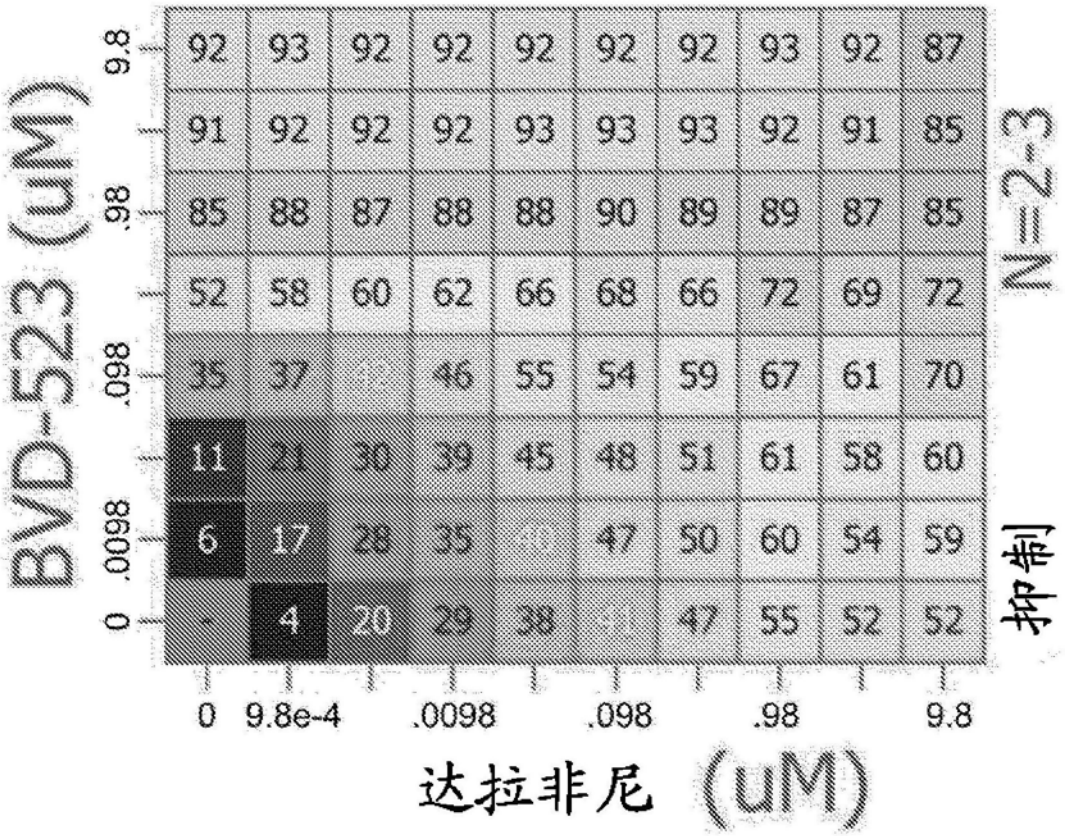

BVD-523 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
0
92 93 92 92 92 92 92 93 92 87
91 92 92 92 93 93 93 92 91 85
85 88 87 88 88 90 89 89 87 85
52 58 60 62 66 68 66 72 69 72
35 37 42 46 55 54 59 67 61 70
11 21 30 39 45 48 51 61 58 60
6 17 28 35 40 47 50 60 54 59
- 4 20 29 38 41 47 55 52 52
N=2-3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图23A

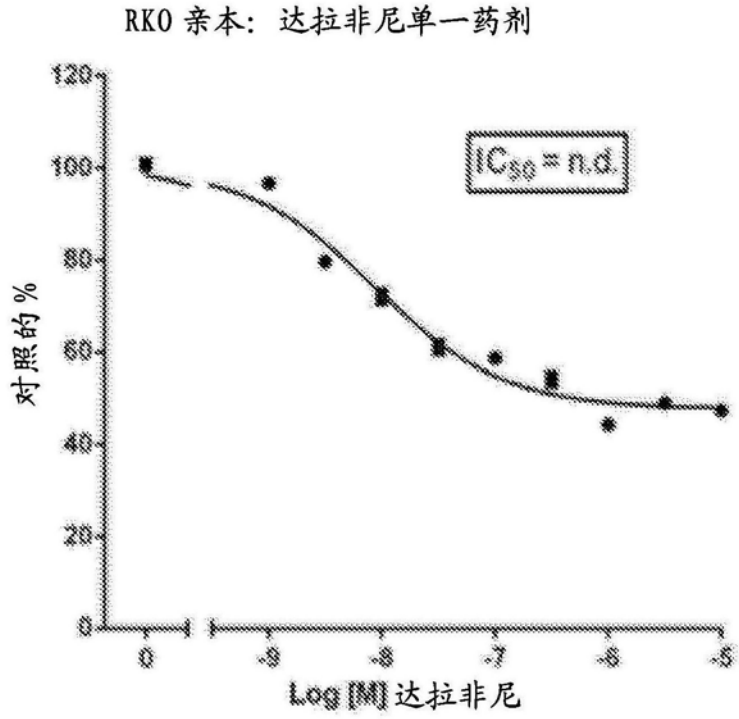

RKO 亲本: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图23B

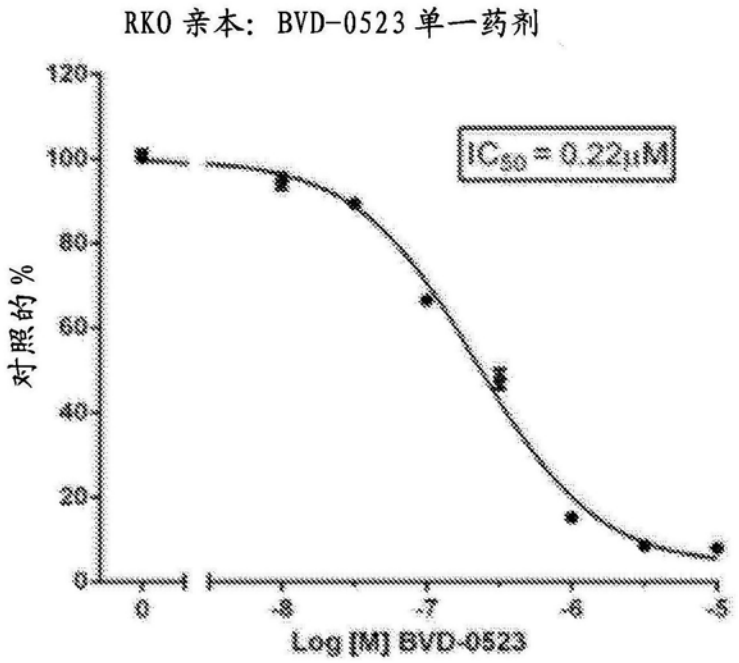

RKO 亲本：BVD-0523 单一药剂
IC50 = 0.22μM
对照的 %
Log [M] BVD-0523

图23C

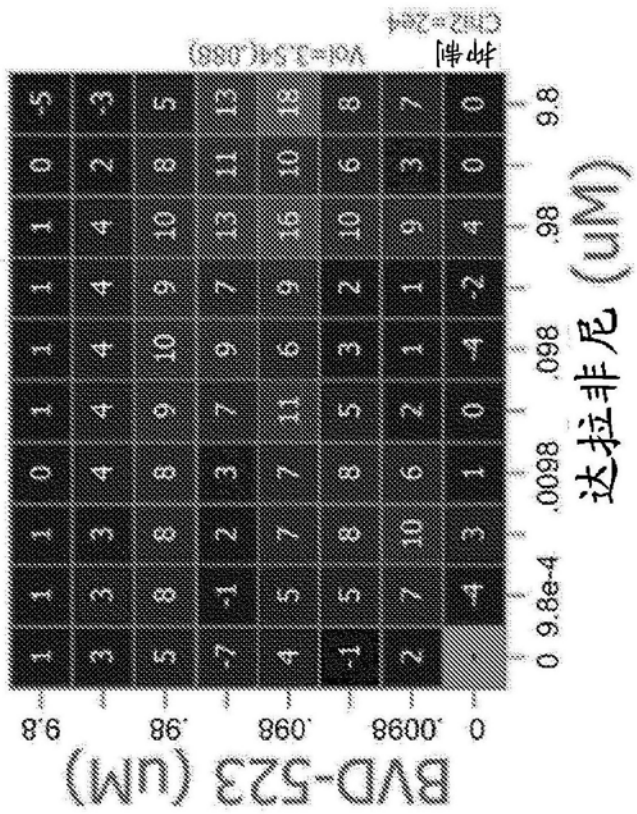

达拉非尼 (uM)
BVD-523 (uM)

图23D

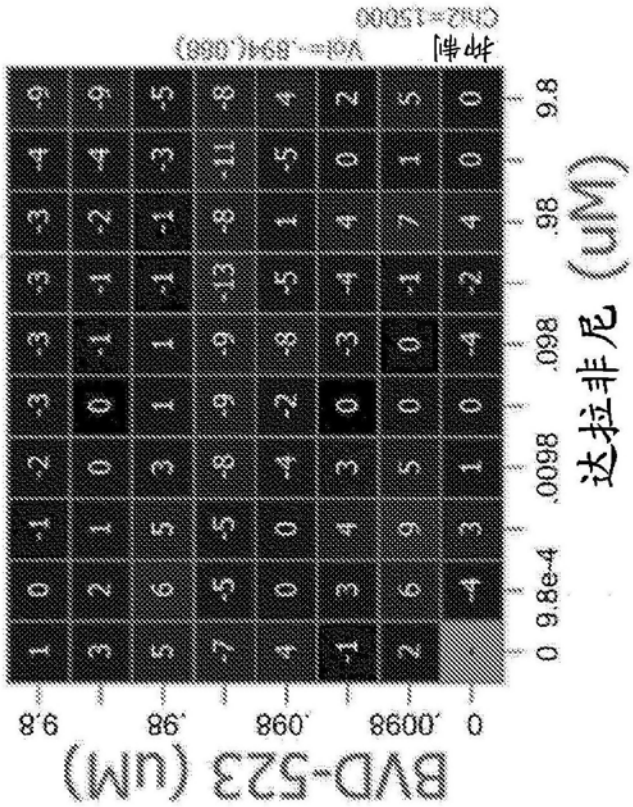

抑制
CN2=15000
BVD-523 (uM)
0 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8

图23E

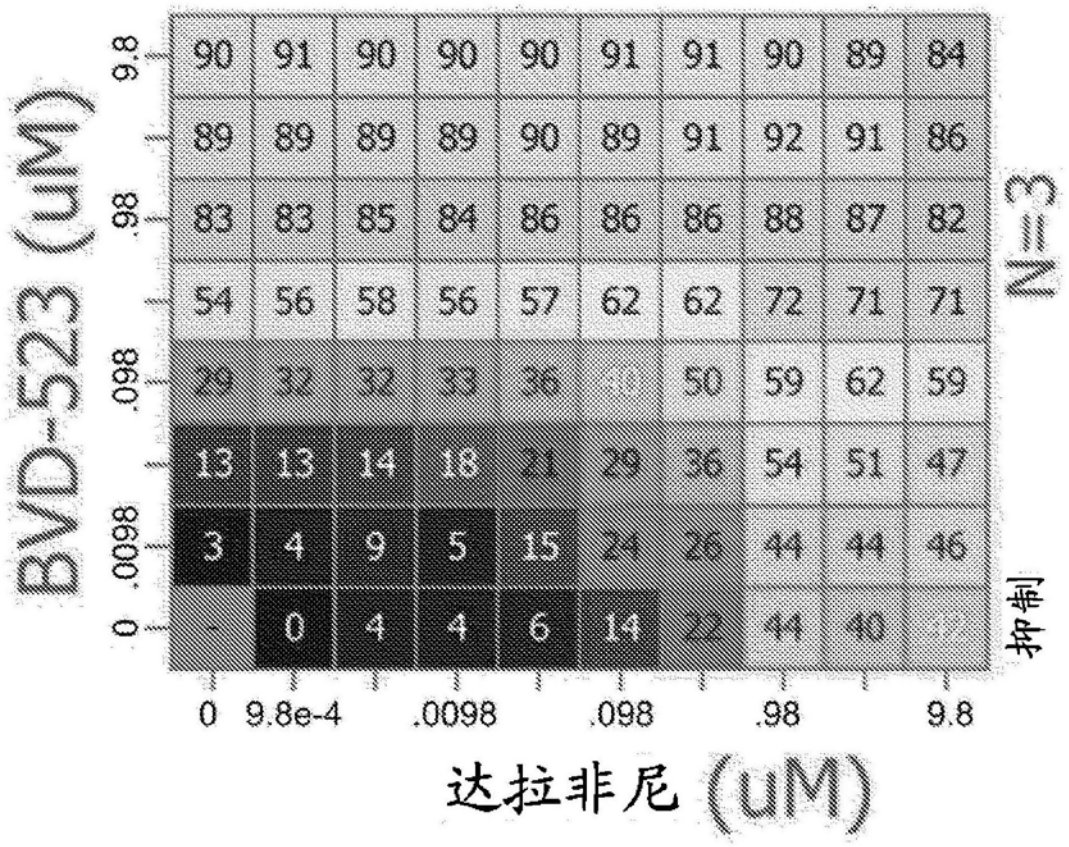

BVD-523 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
0
90 91 90 90 90 91 91 90 89 84
89 89 89 89 90 89 91 92 91 86
83 83 85 84 86 86 86 88 87 82
54 56 58 56 57 62 62 72 71 71
29 32 32 33 36 40 50 59 62 59
13 13 14 18 21 29 36 54 51 47
3 4 9 5 15 24 26 44 44 46
- 0 4 4 6 14 22 44 40 42
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图23F

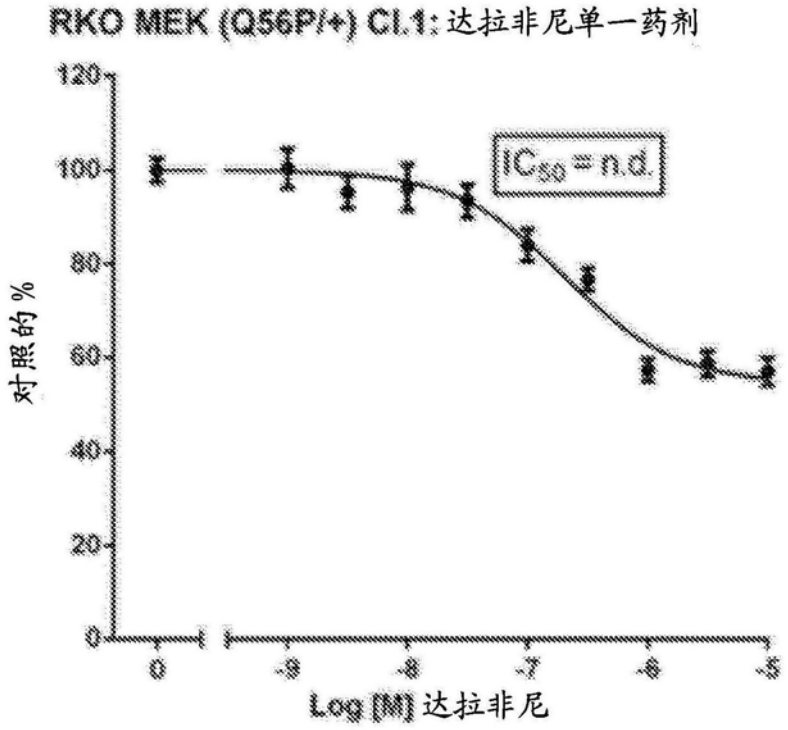

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0 -9 -8 -7 -6 -5
Log [M] 达拉非尼

图23G

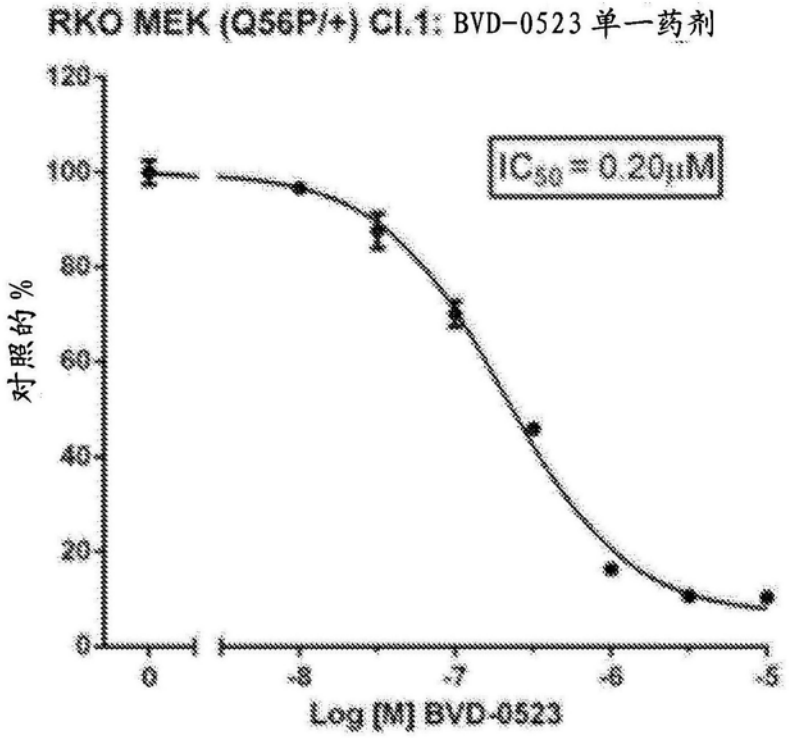

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: BVD-0523 单一药剂
IC50 = 0.20μM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-0523

图23H

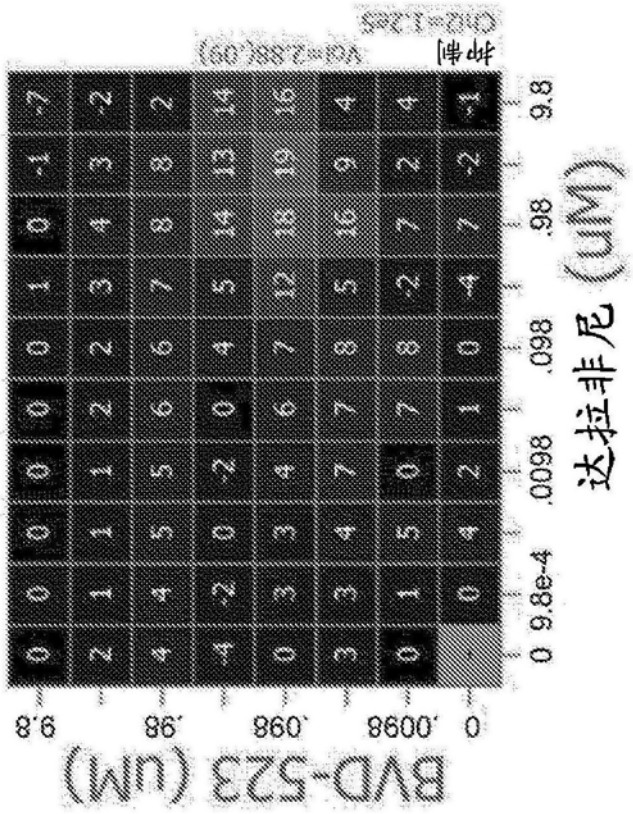

达拉非尼 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
BVD-523 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
0

图23I

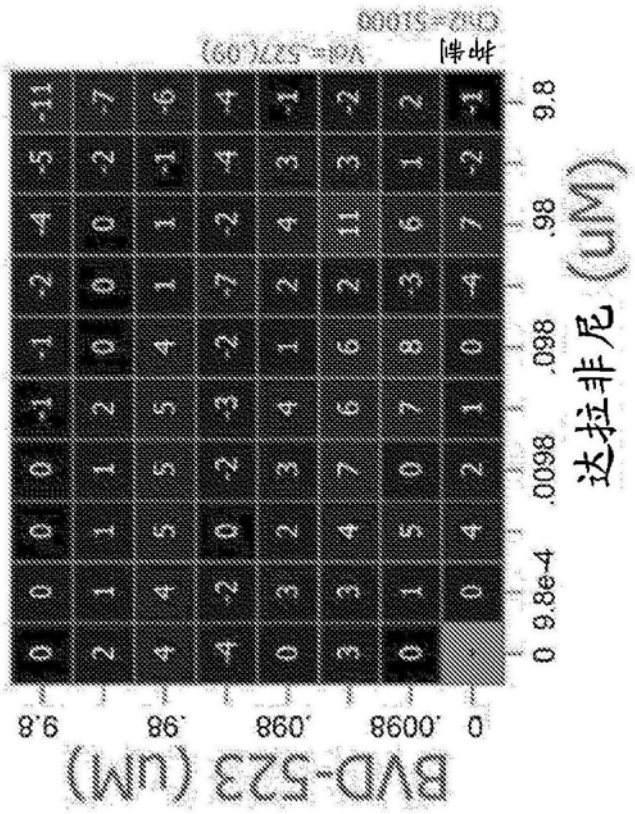

抑制
VA=.527(.09)
CM2=5100
BVD-523 (uM)
0 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8

图23J

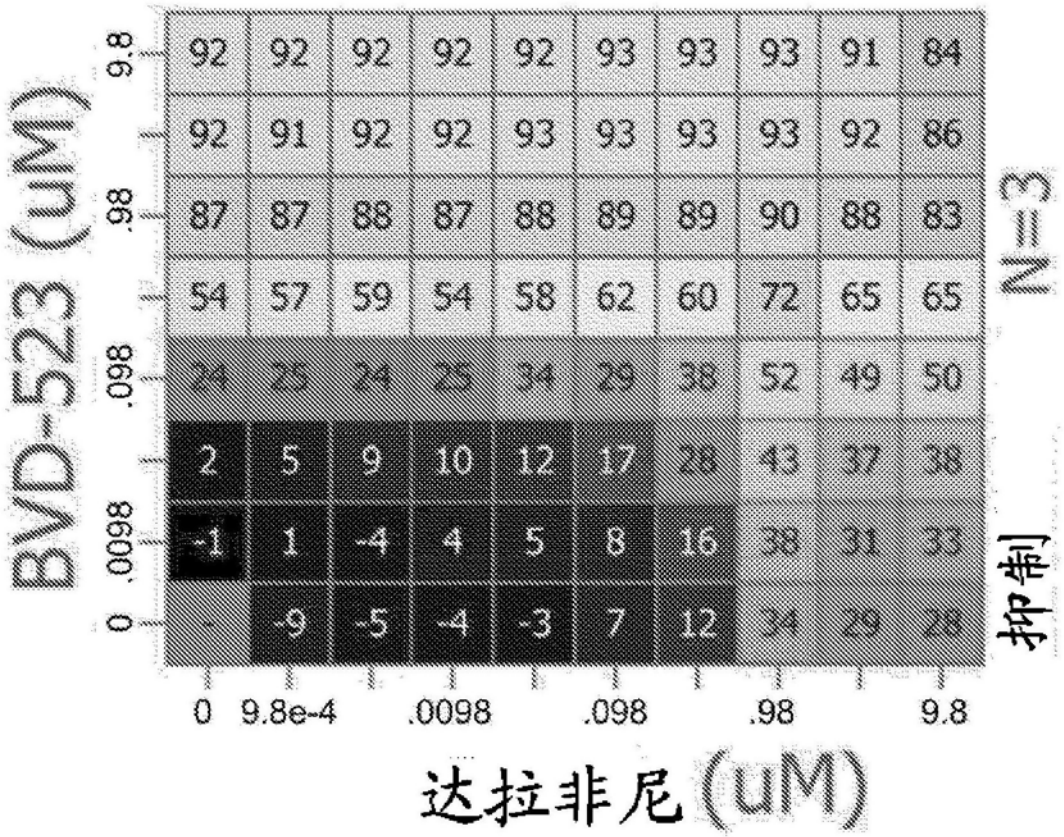

BVD-523 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
0
92 92 92 92 92 93 93 93 91 84
92 91 92 92 93 93 93 93 92 86
87 87 88 87 88 89 89 90 88 83
54 57 59 54 58 62 60 72 65 65
24 25 24 25 34 29 38 52 49 50
2 5 9 10 12 17 28 43 37 38
-1 1 -4 4 5 8 16 38 31 33
- -9 -5 -4 -3 7 12 34 29 28
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)
N=3
抑制

图23K

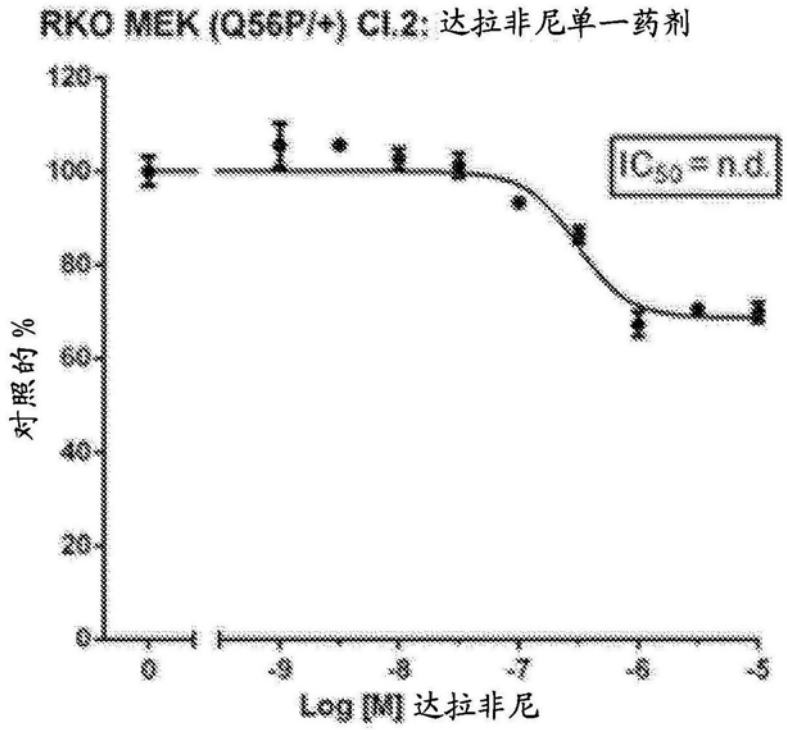

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: 达拉非尼单一药剂
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
IC50 = n.d.
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图23L

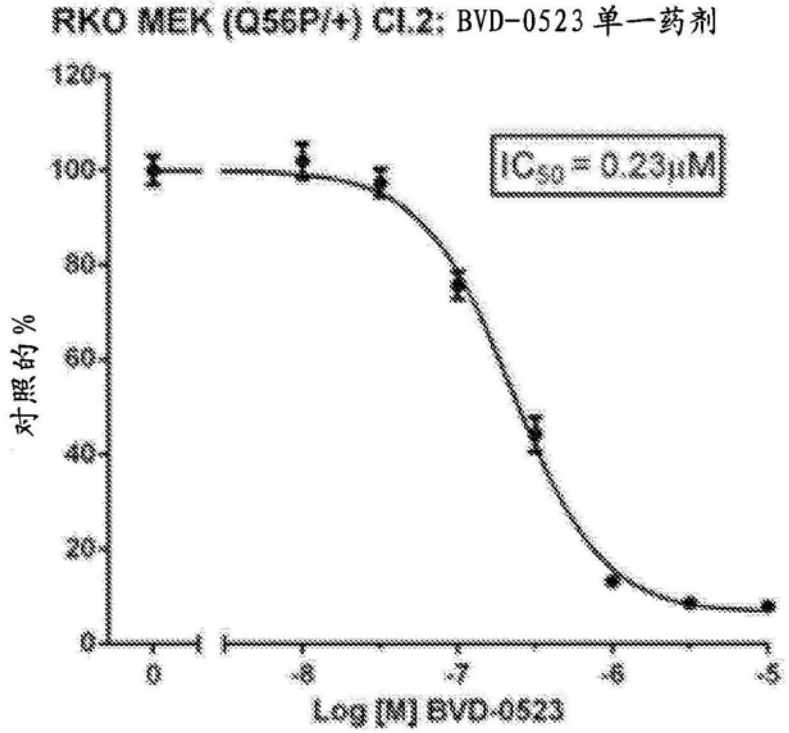

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: BVD-0523 单一药剂
IC50 = 0.23μM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-8
-7
-6
-5
Log [M] BVD-0523

图23M

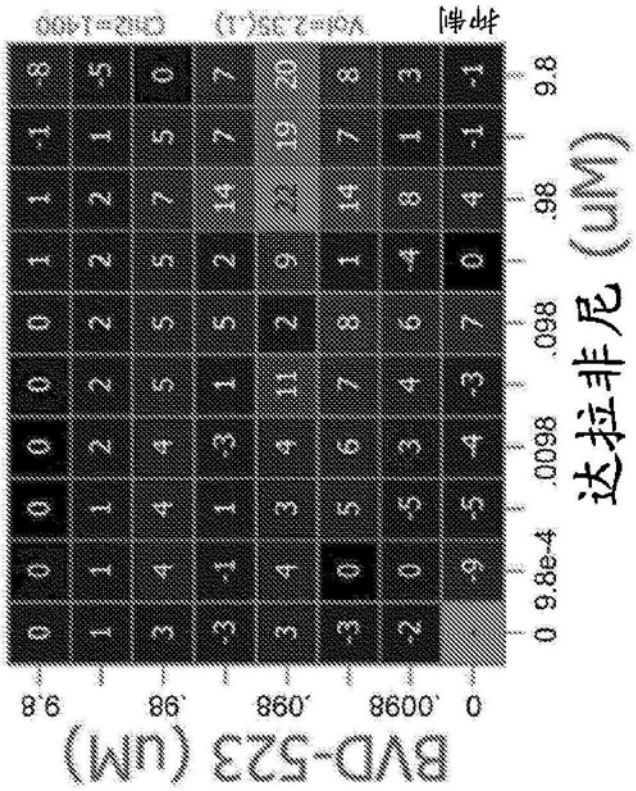

抑制
达拉非尼 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
BVD-523 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
0

图23N

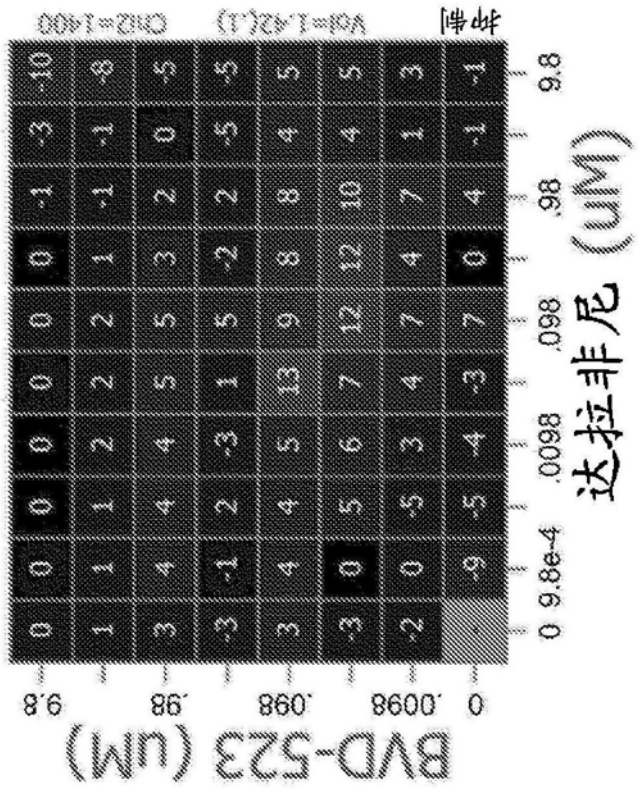


图230

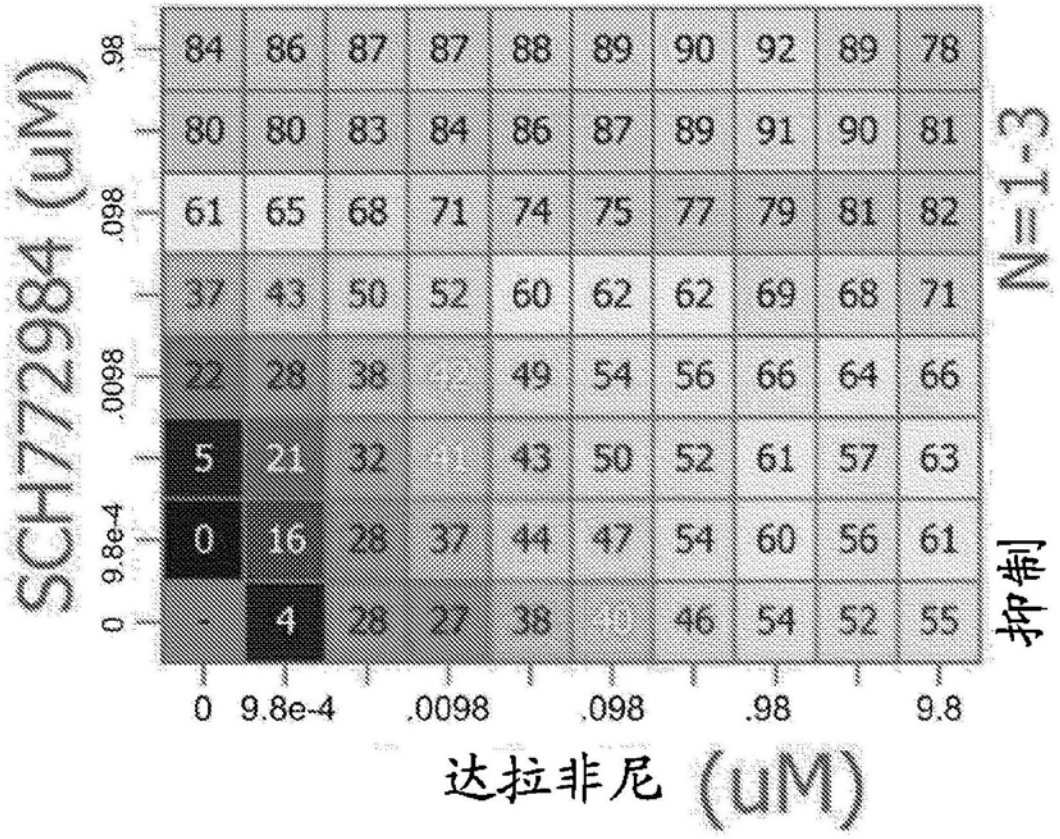

SCH772984 (uM)
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
84 86 87 87 88 89 90 92 89 78
80 80 83 84 86 87 89 91 90 81
61 65 68 71 74 75 77 79 81 82
37 43 50 52 60 62 62 69 68 71
22 28 38 49 54 56 66 64 66
5 21 32 43 50 52 61 57 63
0 16 28 37 44 47 54 60 56 61
- 4 28 27 38 46 54 52 55
N=1-3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图24A

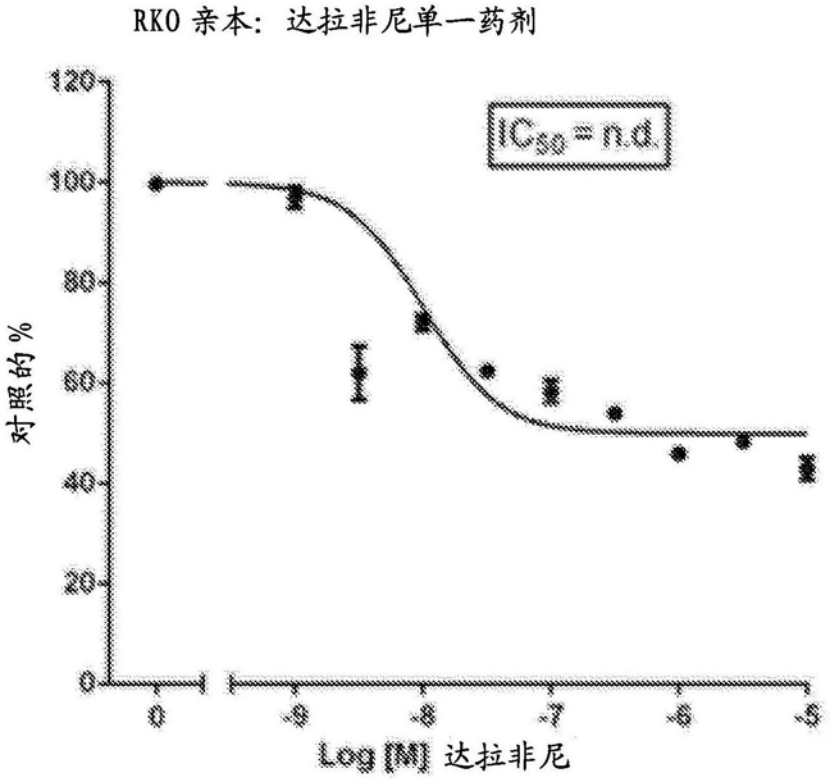

RKO 亲本：达拉非尼单一药剂
IC_{50} = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图24B

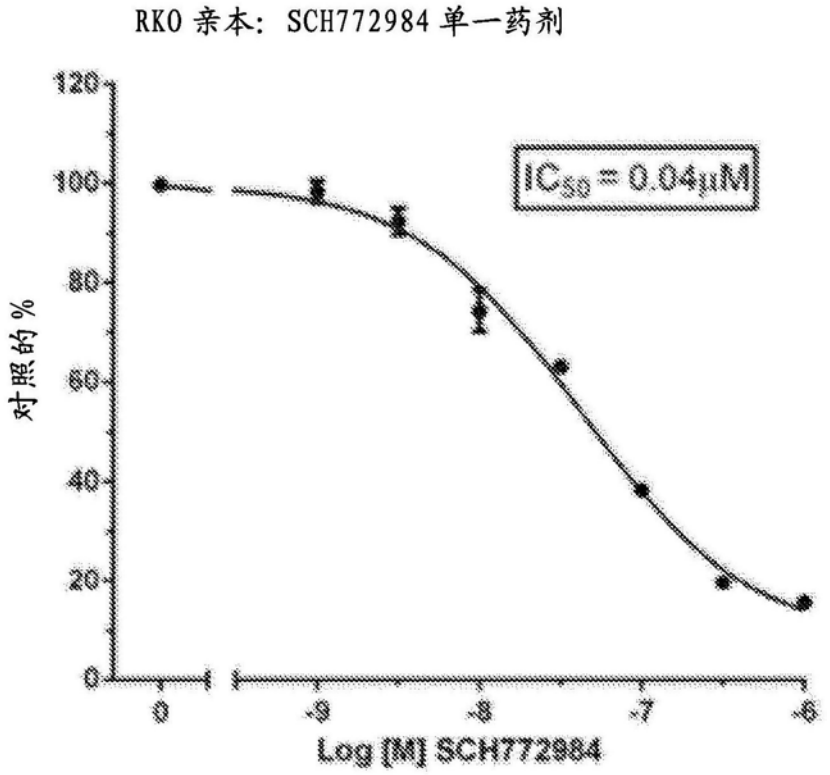

RKO 亲本：SCH772984 单一药剂
IC_{50} = 0.04μM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
Log [M] SCH772984

图24C

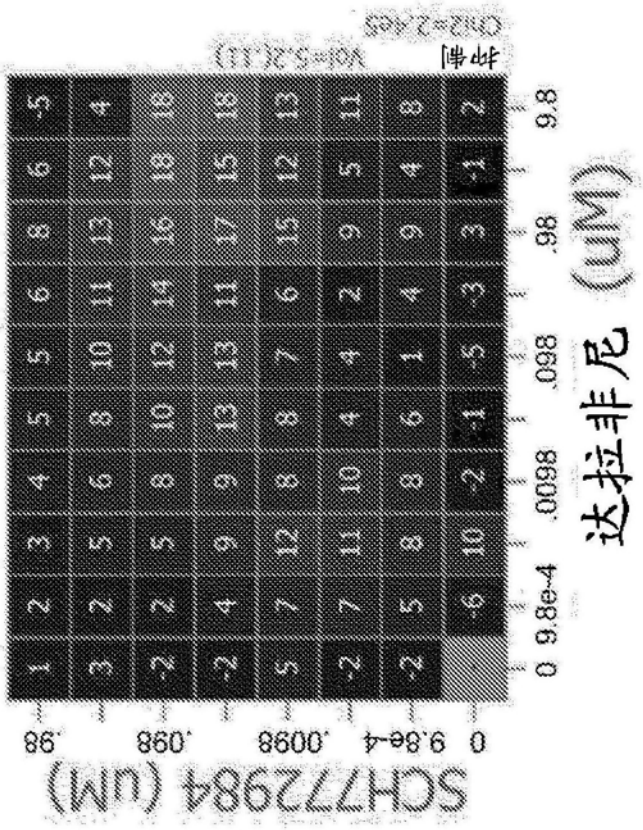

抑制
Vol=5.2(.1)
CH2=2.4e3
SCH772984 (uM)
0
9.8e-4
.0098
.098
.98
达拉非尼 (uM)
0
9.8e-4
.0098
.098
.98

图24D

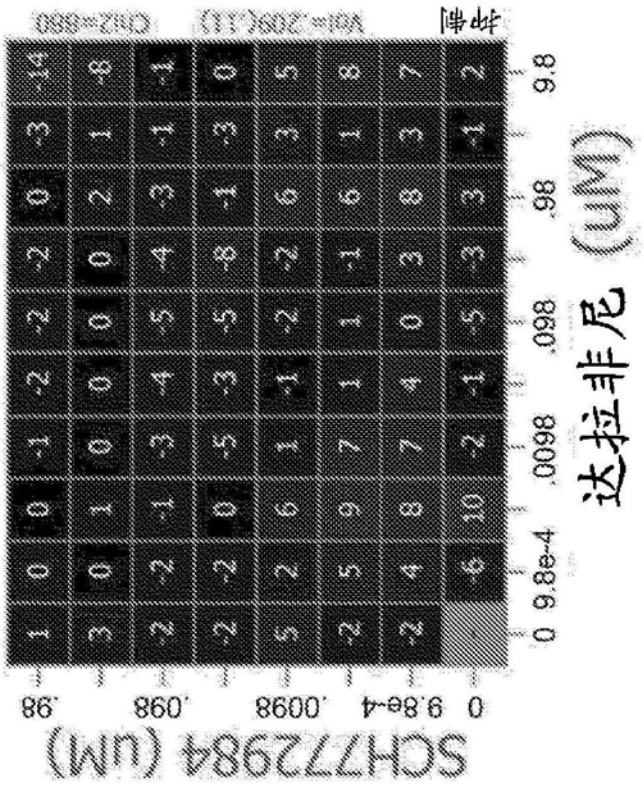


图24E

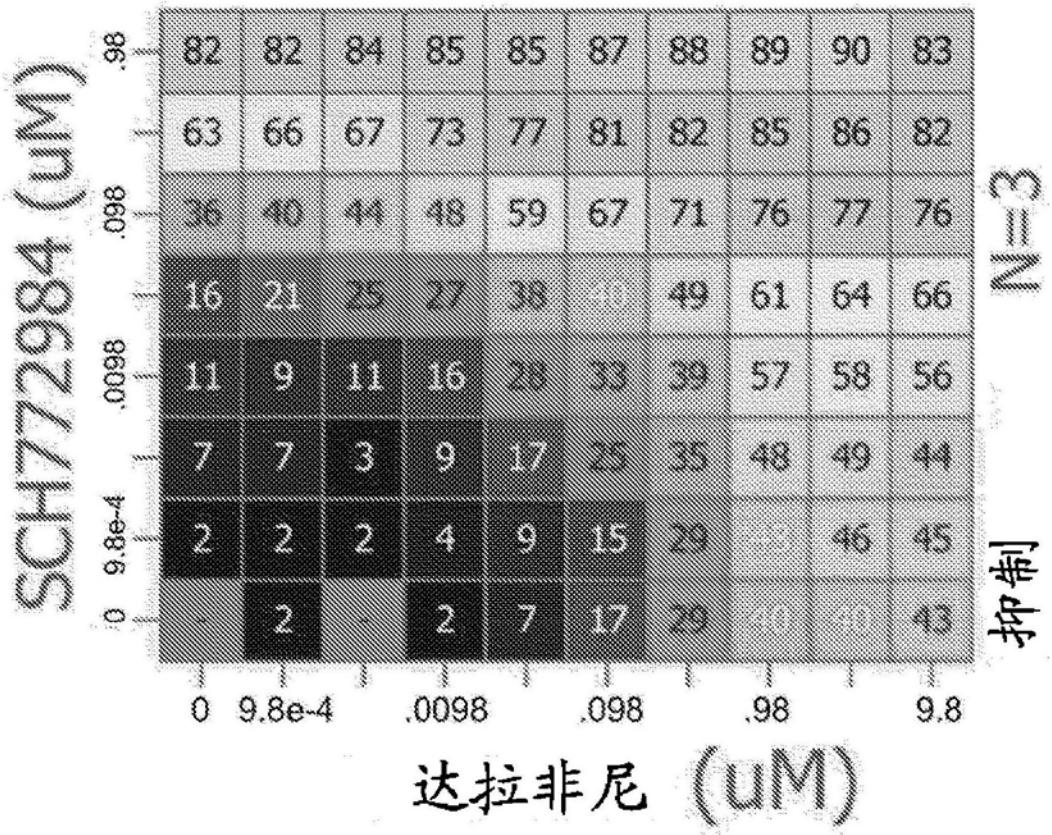

SCH772984 (uM)
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
82 82 84 85 85 87 88 89 90 83
63 66 67 73 77 81 82 85 86 82
36 40 44 48 59 67 71 76 77 76
16 21 25 27 38 40 49 61 64 66
11 9 11 16 28 33 39 57 58 56
7 7 3 9 17 25 35 48 49 44
2 2 2 4 9 15 29 46 45
2 2 7 17 29 43
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图24F

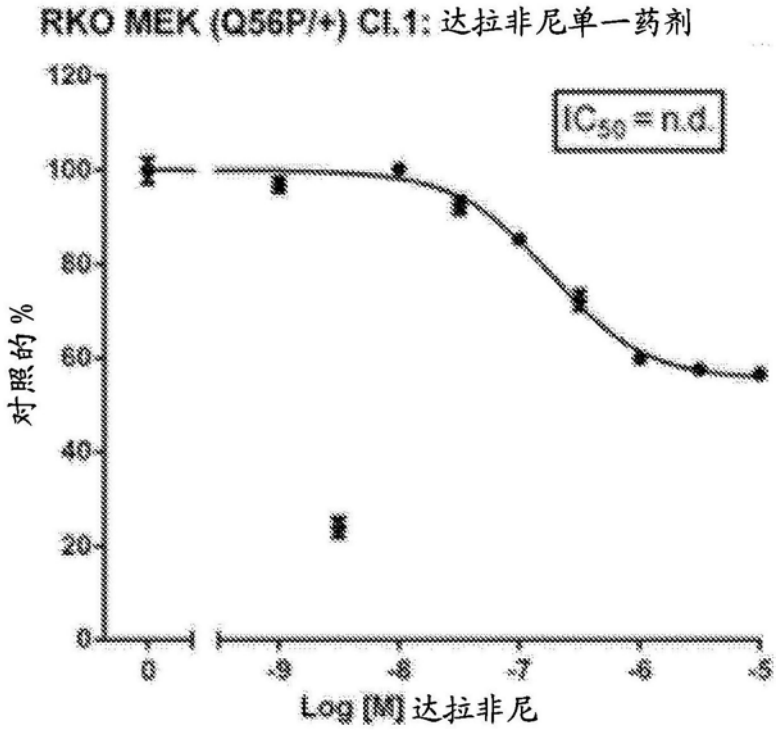

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图24G

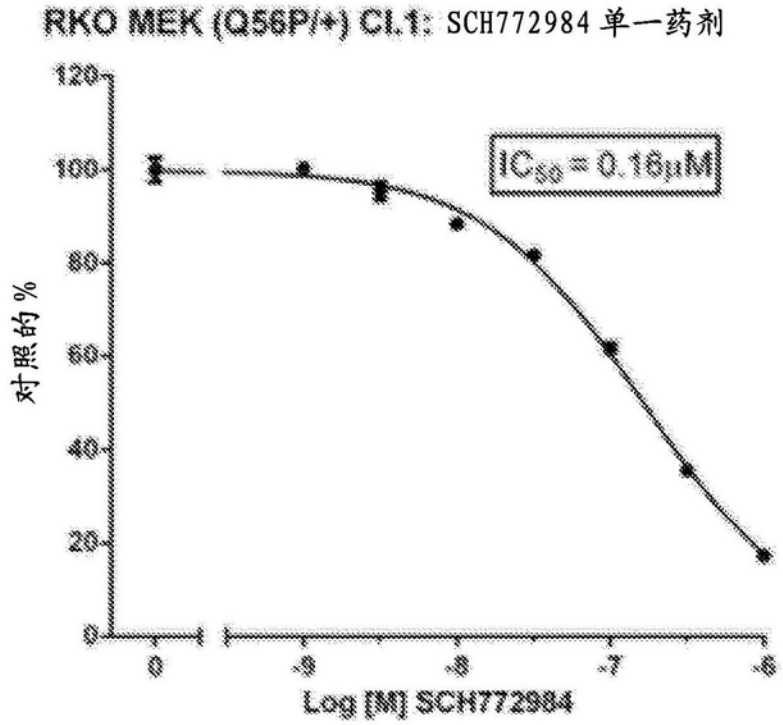

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: SCH772984 单一药剂
IC50 = 0.16μM
对照的 %
Log [M] SCH772984

图24H

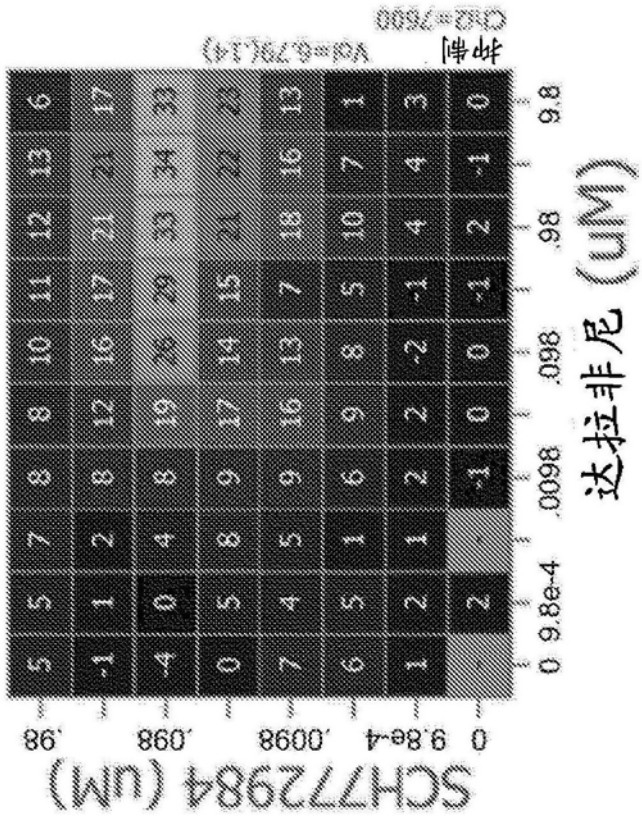

抑制
达拉非尼 (uM)
SCH772984 (uM)

图24I

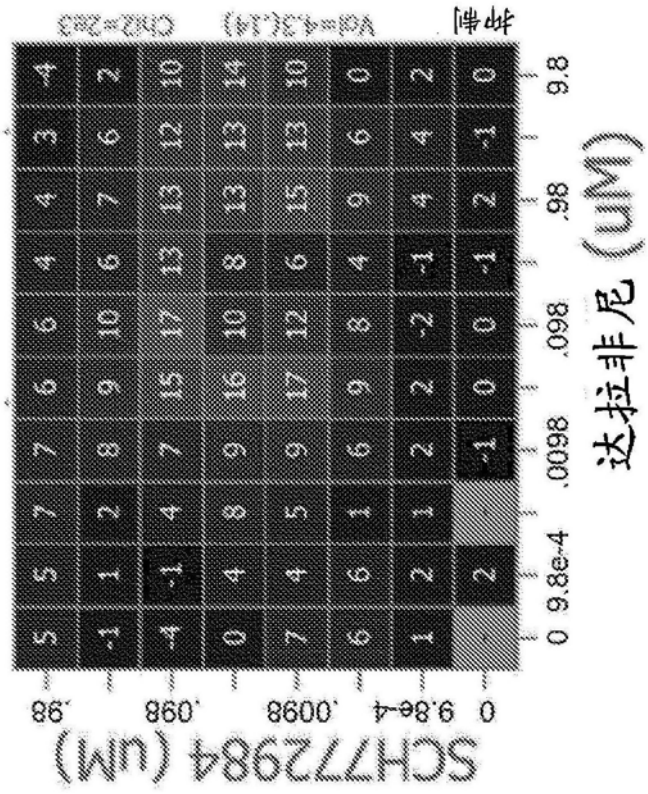

SCH772984 (uM)
0
9.8e-4
.0098
.098
.98
达拉非尼 (uM)
0
9.8e-4
.0098
.098
.98
抑制
VC=4.3(.14)
CH2=2E3

图24J

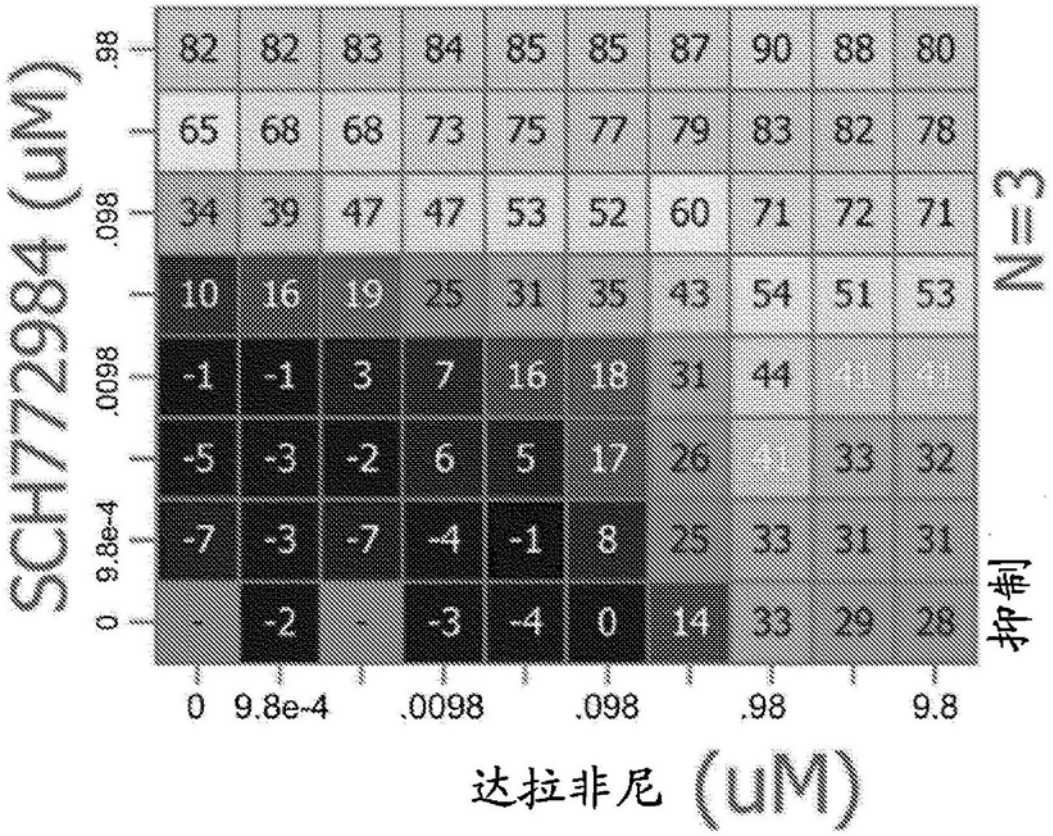

SCH772984 (uM)
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
82 82 83 84 85 85 87 90 88 80
65 68 68 73 75 77 79 83 82 78
34 39 47 47 53 52 60 71 72 71
10 16 19 25 31 35 43 54 51 53
-1 -1 3 7 16 18 31 44 41 41
-5 -3 -2 6 5 17 26 41 33 32
-7 -3 -7 -4 -1 8 25 33 31 31
- -2 - -3 -4 0 14 33 29 28
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图24K

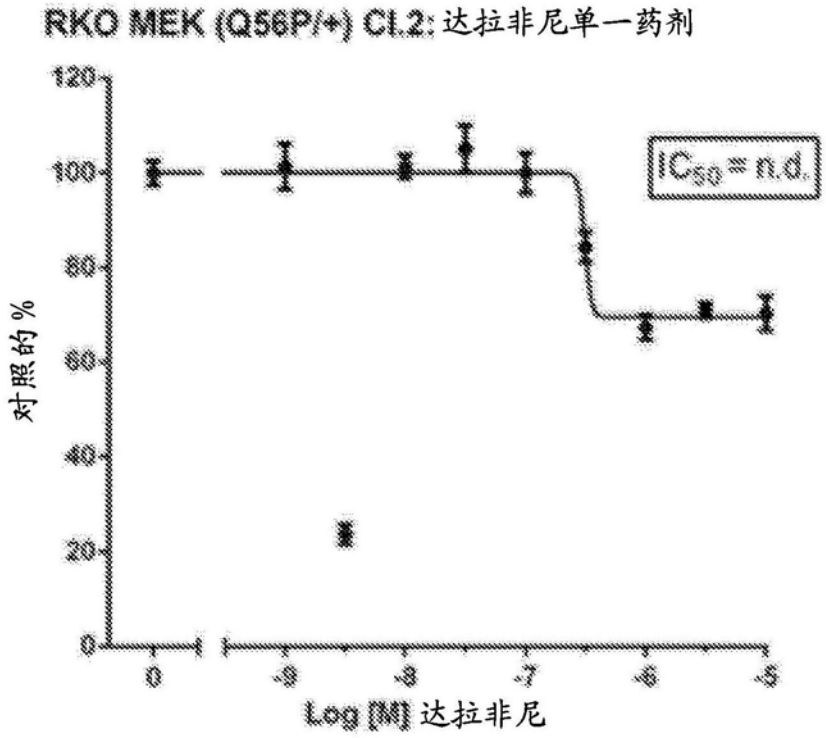

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0 -9 -8 -7 -6 -5
Log [M] 达拉非尼

图24L

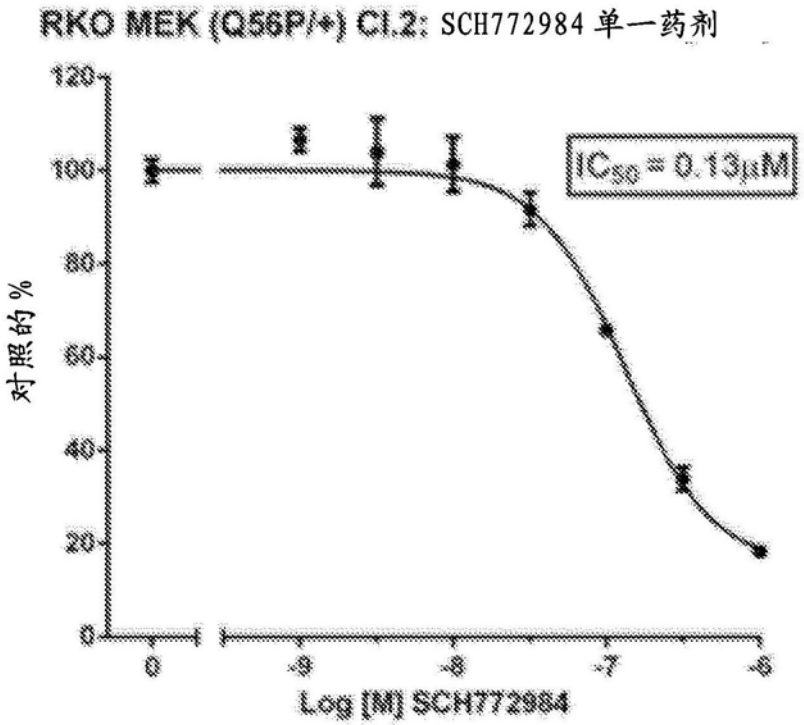

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: SCH772984 单一药剂
IC50 = 0.13μM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
Log [M] SCH772984

图24M

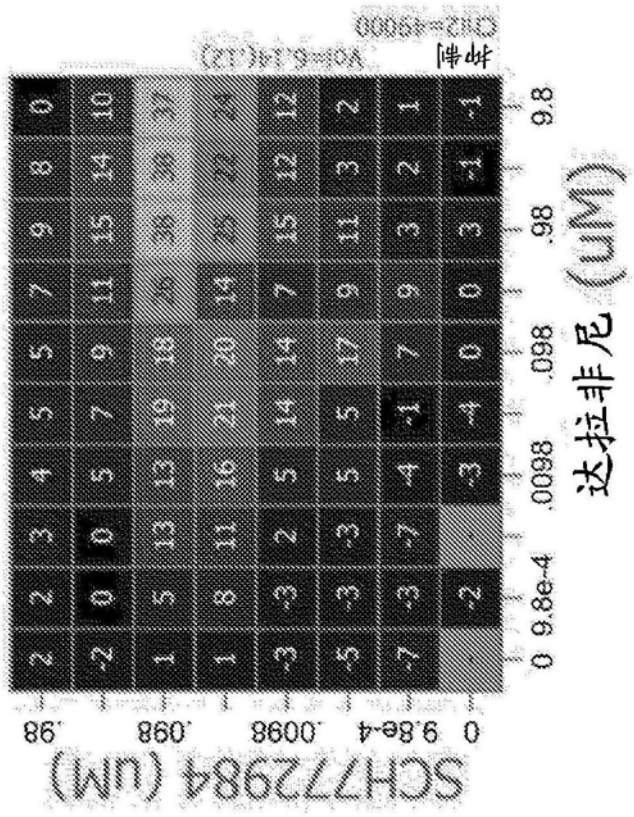

抑制
达拉非尼 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
SCH772984 (uM)

图24N

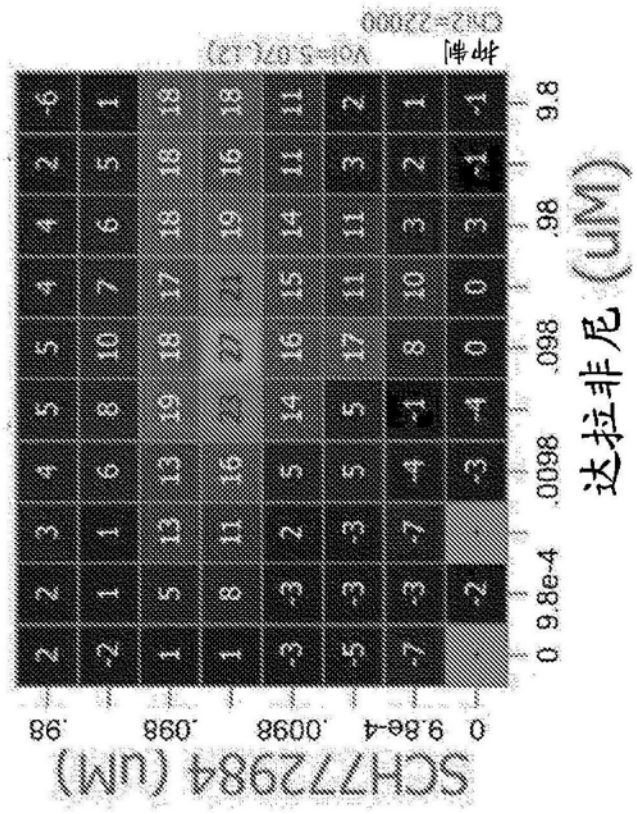


图240

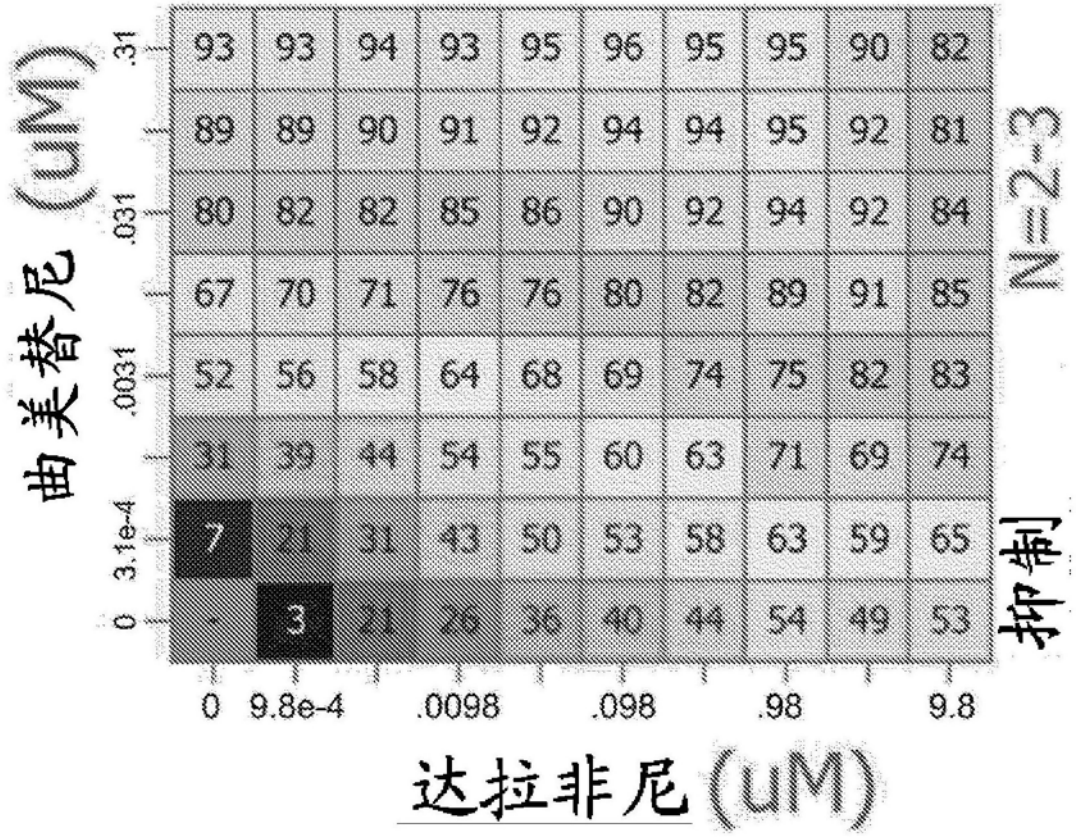

曲美替尼 (uM)
.31
.031
.0031
3.1e-4
0
93 93 94 93 95 96 95 95 90 82
89 89 90 91 92 94 94 95 92 81
80 82 82 85 86 90 92 94 92 84
67 70 71 76 76 80 82 89 91 85
52 56 58 64 68 69 74 75 82 83
31 39 44 54 55 60 63 71 69 74
7 21 31 43 50 53 58 63 59 65
- 3 21 26 36 40 44 54 49 53
N=2-3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图25A

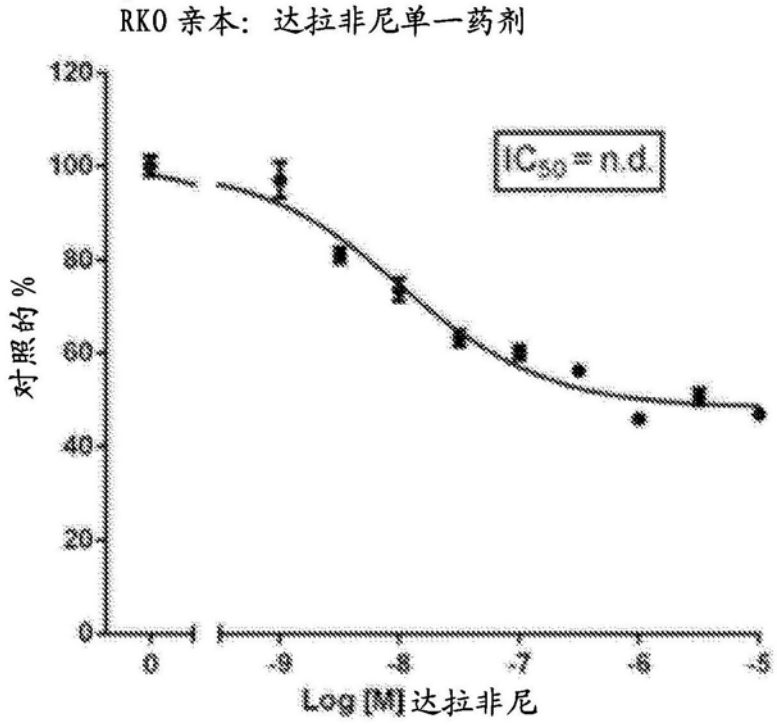

RKO 亲本: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图25B

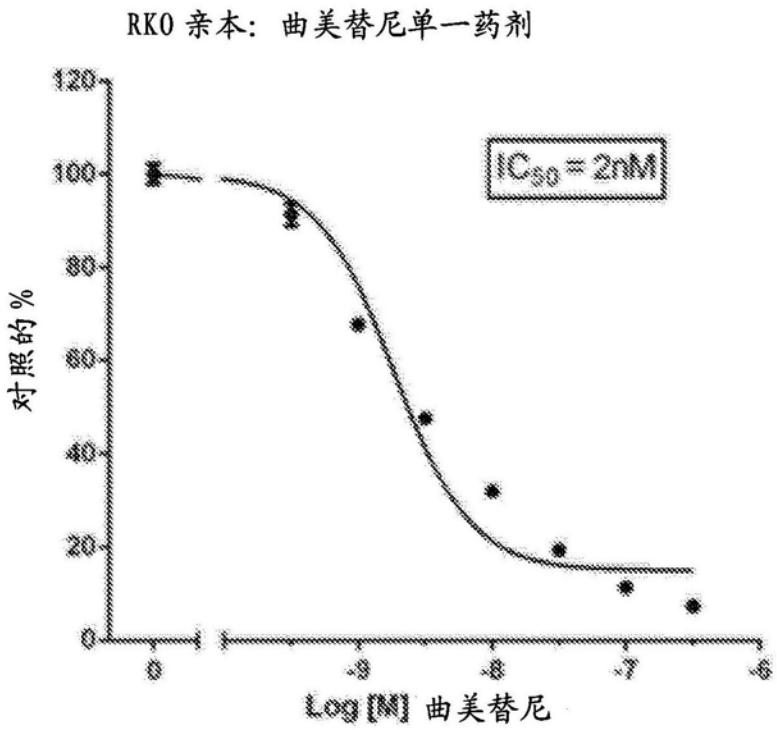


图25C

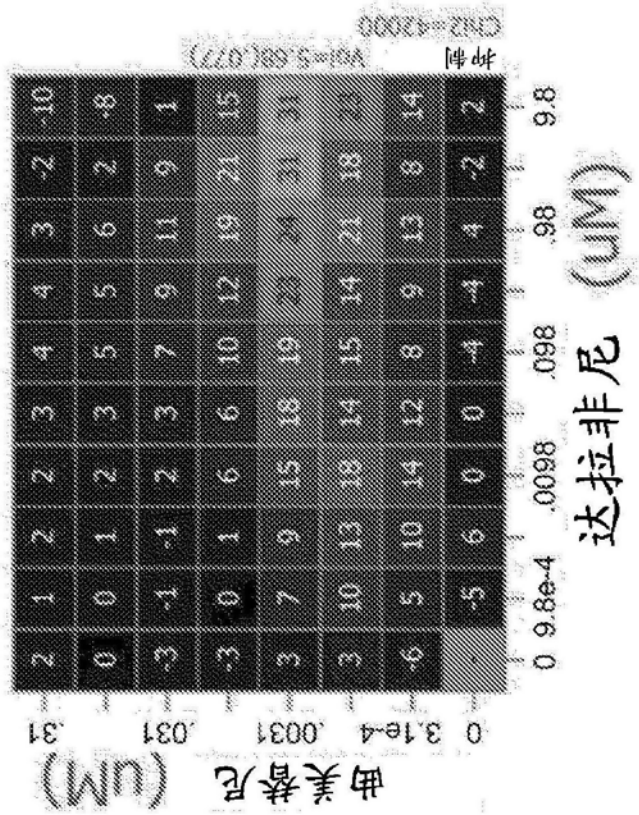


图25D

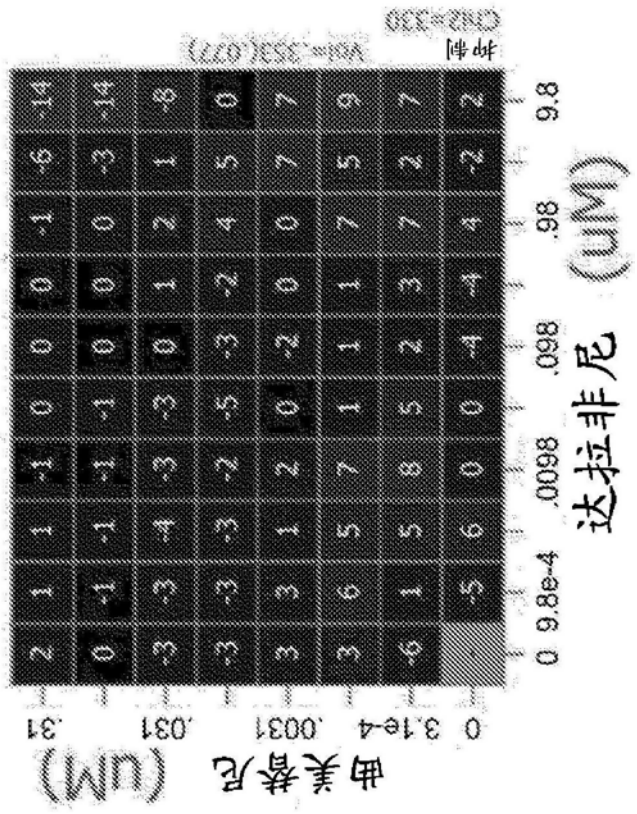


图25E

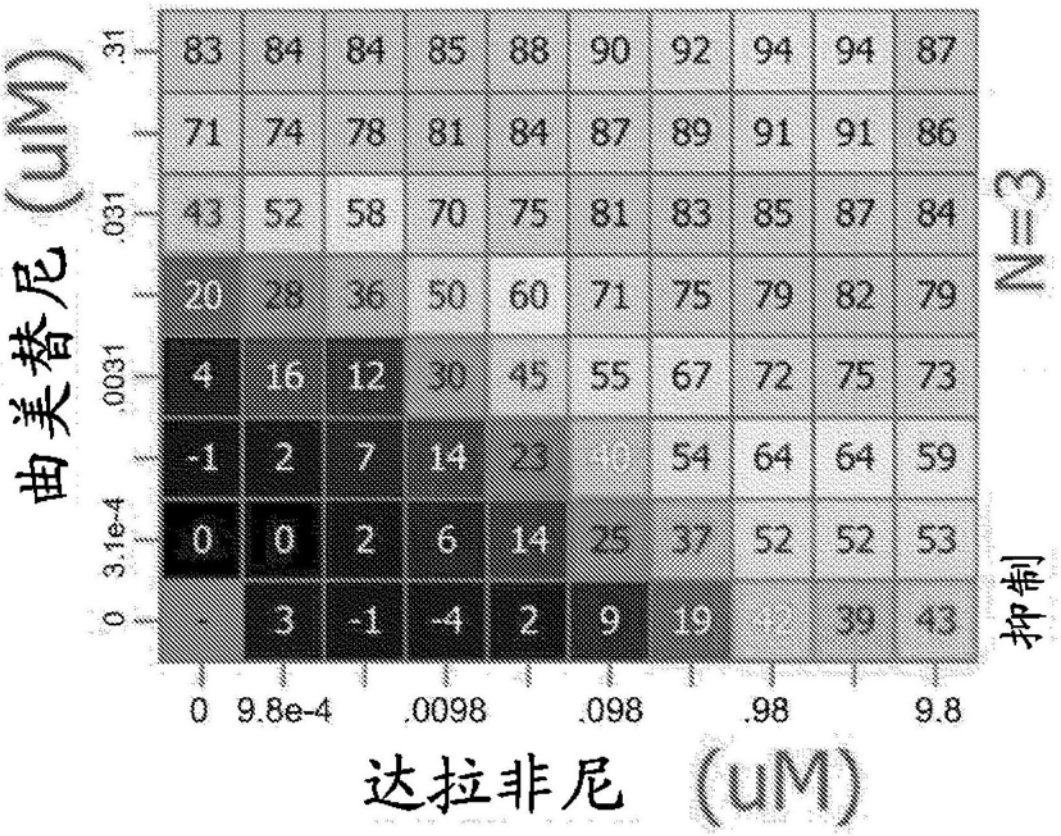

曲美替尼 (uM)
.31
.031
.0031
3.1e-4
0
83 84 84 85 88 90 92 94 94 87
71 74 78 81 84 87 89 91 91 86
43 52 58 70 75 81 83 85 87 84
20 28 36 50 60 71 75 79 82 79
4 16 12 30 45 55 67 72 75 73
-1 2 7 14 23 40 54 64 64 59
0 0 2 6 14 25 37 52 52 53
- 3 -1 -4 2 9 19 32 39 43
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图25F

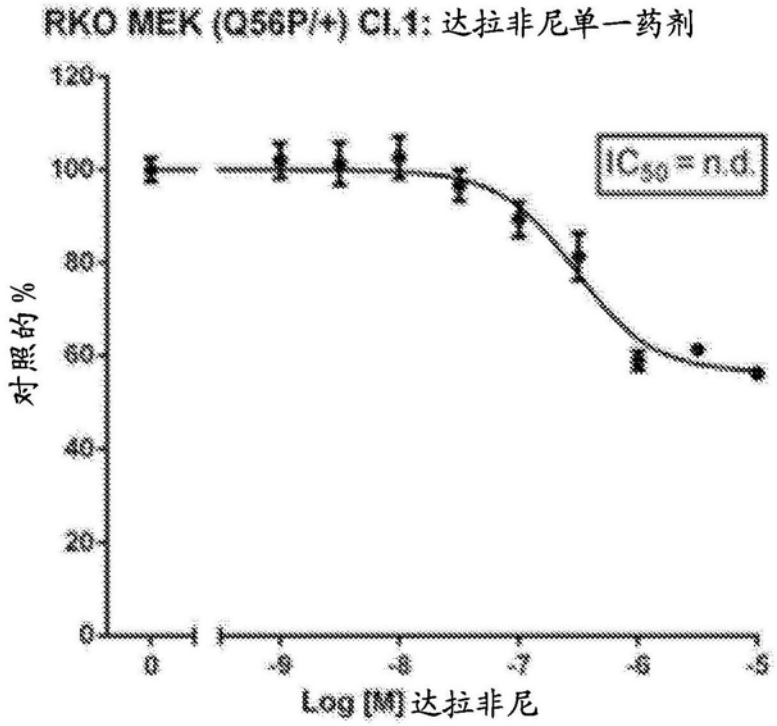

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: 达拉非尼单一药剂
IC50 = n.d.
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图25G

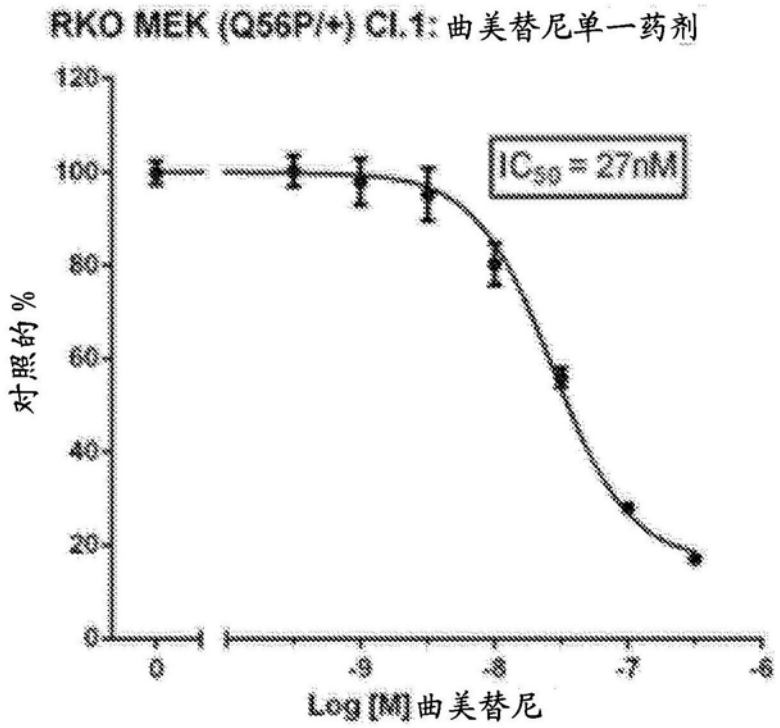

RKO MEK (Q56P/+) Cl.1: 曲美替尼单一药剂
IC50 = 27nM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼

图25H

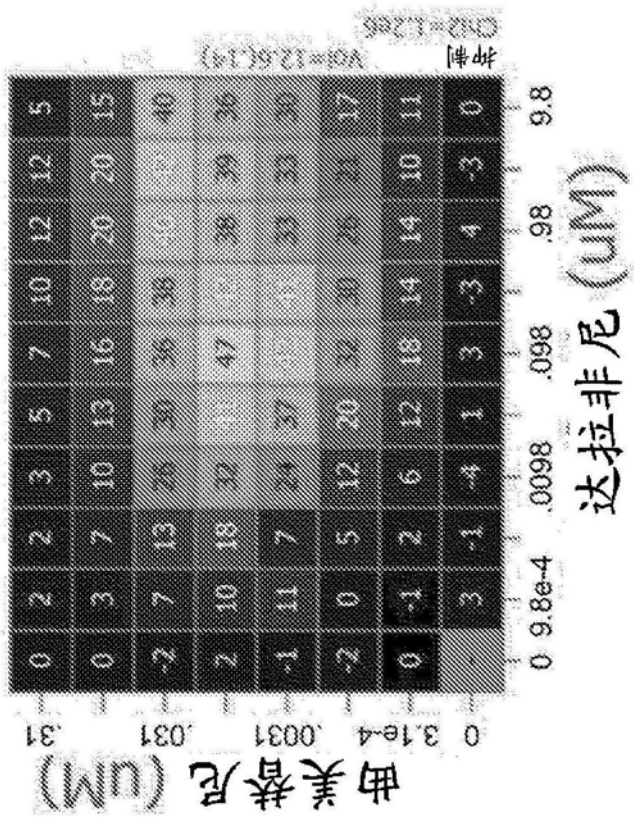

抑制
达拉非尼 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
曲美替尼 (uM)
3.1e-4
.0031
.031
.31

图25I

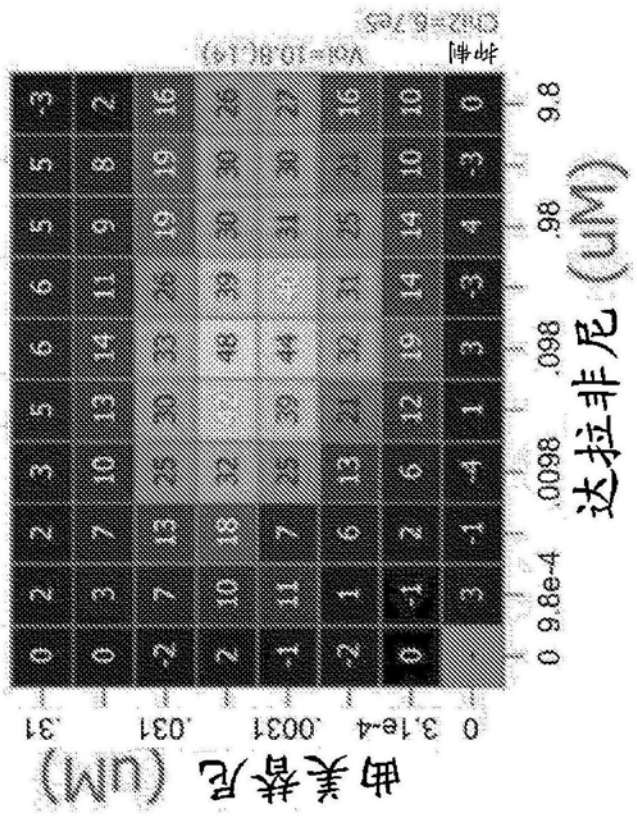

抑制
Vdi=10.8(14)
Cm2=6.7e5
达拉非尼 (uM)
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
曲美替尼 (uM)
0 3.1e-4 .0031 .031 .31

图25J

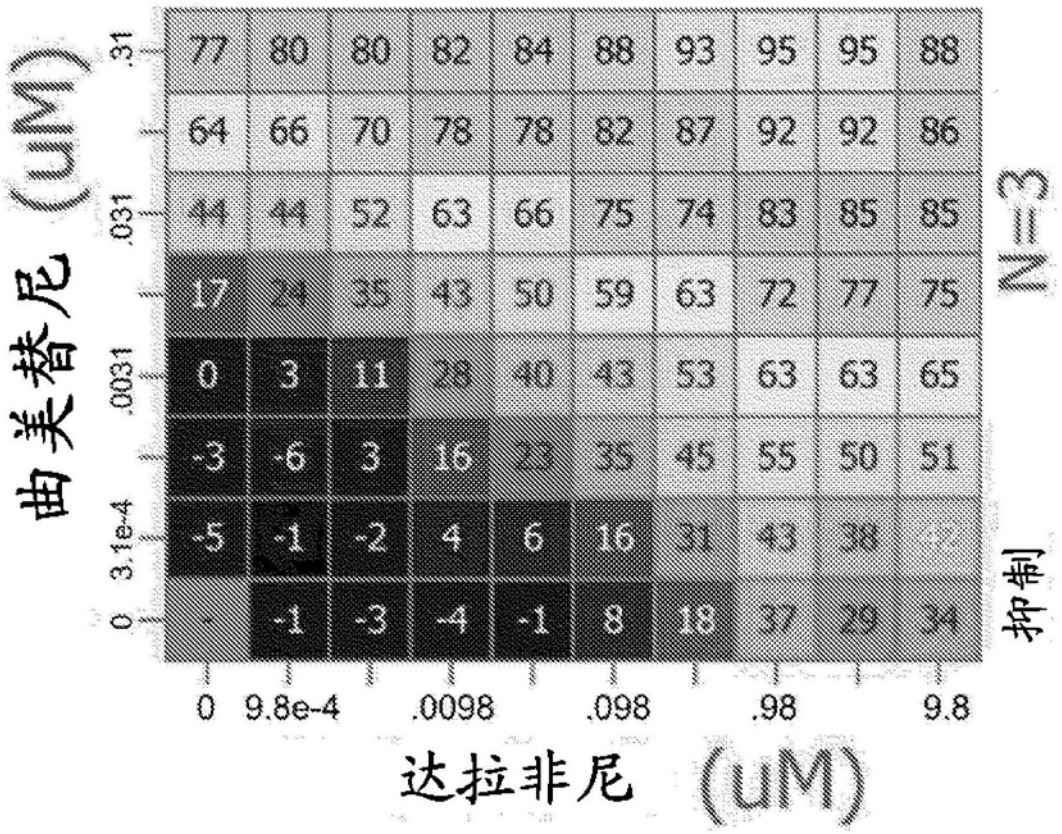

曲美替尼 (uM)
.31
.031
.0031
3.1e-4
0
77 80 80 82 84 88 93 95 95 88
64 66 70 78 78 82 87 92 92 86
44 44 52 63 66 75 74 83 85 85
17 24 35 43 50 59 63 72 77 75
0 3 11 28 40 43 53 63 63 65
-3 -6 3 16 23 35 45 55 50 51
-5 -1 -2 4 6 16 31 43 38 42
- -1 -3 -4 -1 8 18 37 29 34
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
达拉非尼 (uM)

图25K

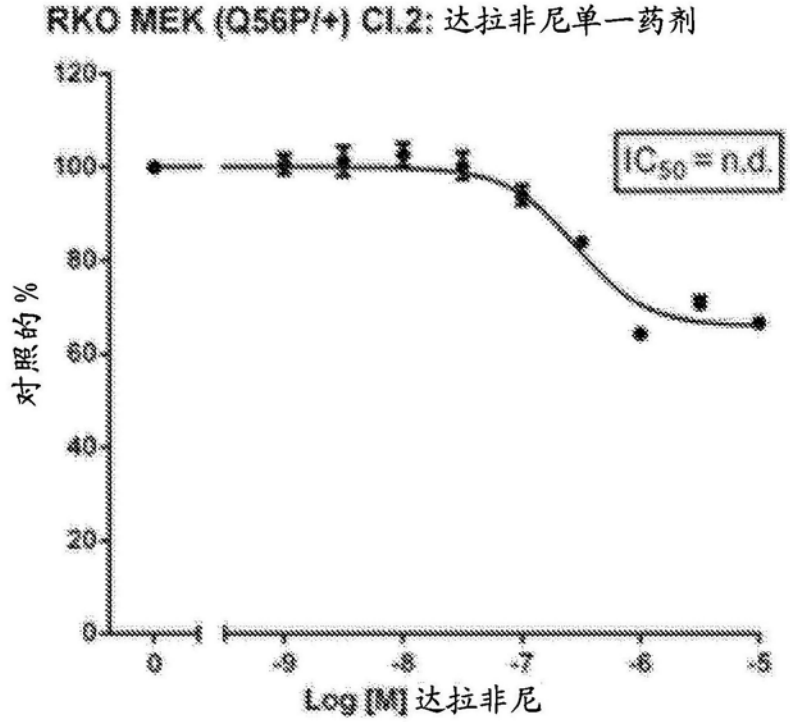

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: 达拉非尼单一药剂
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
IC50 = n.d.
0
-9
-8
-7
-6
-5
Log [M] 达拉非尼

图25L

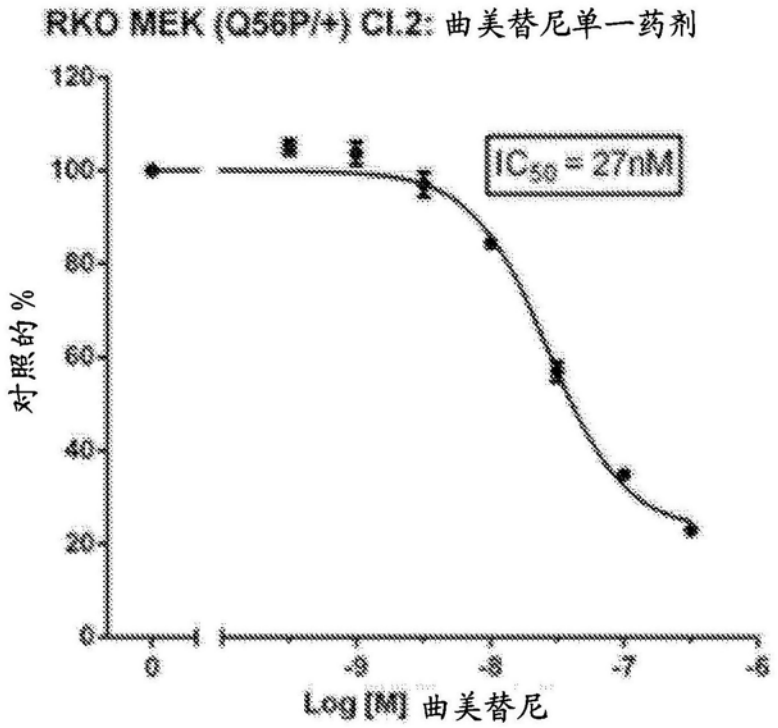

RKO MEK (Q56P/+) Cl.2: 曲美替尼单一药剂
IC50 = 27nM
对照的 %
120
100
80
60
40
20
0
0
-9
-8
-7
-6
Log [M] 曲美替尼

图25M

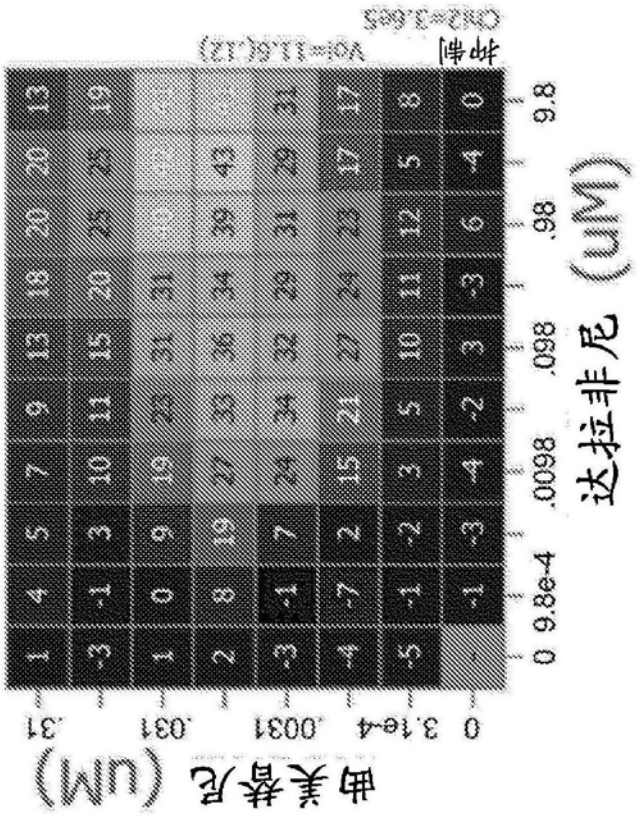

抑制
达拉非尼 (uM)
9.8
.98
.098
.0098
9.8e-4
0
曲美替尼 (uM)
.31
.031
.0031
3.1e-4
0

图25N

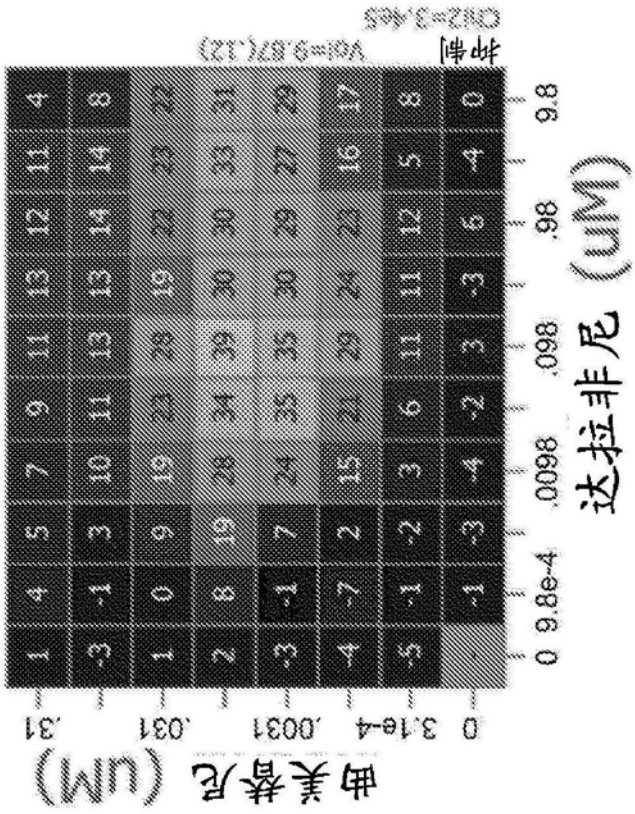

抑制
Vol=9.87(.12)
CI(2)=3.4e5
达拉非尼 (uM)
0
9.8e-4
.0098
.098
.98
9.8
曲美替尼 (uM)
0
3.1e-4
.0031
.031
.31

图250

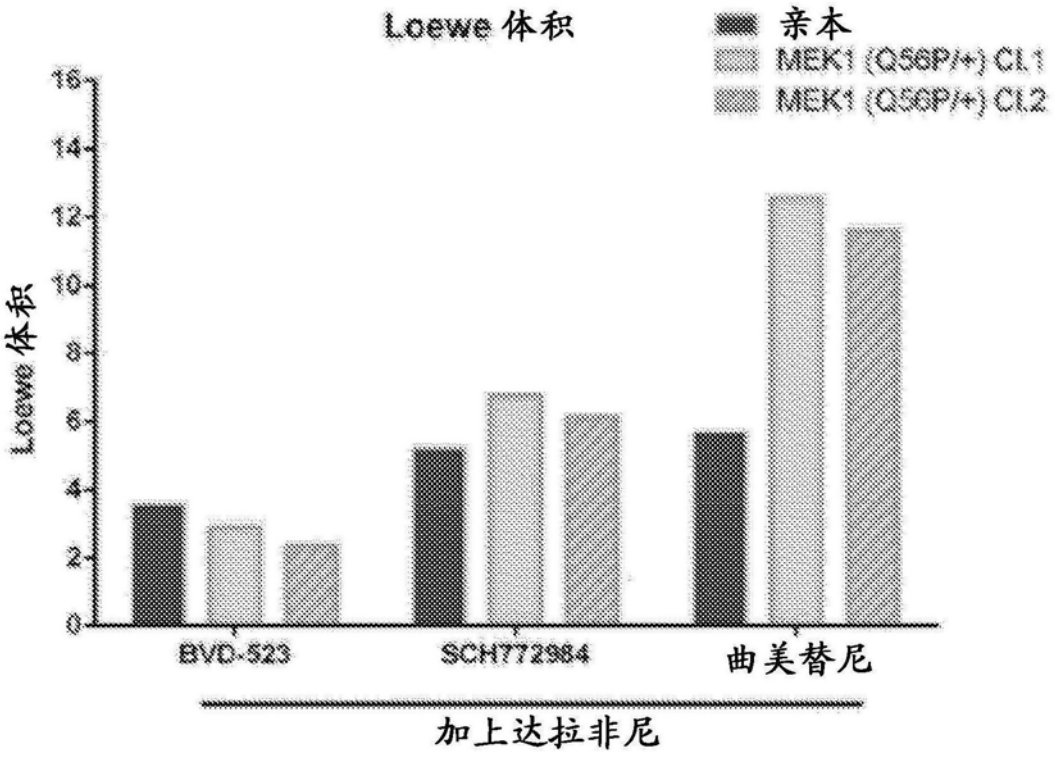

Loewe 体积
亲本
MEK1 (Q56P/+) CL1
MEK1 (Q56P/+) CL2
Loewe 体积
0
2
4
6
8
10
12
14
16
BVD-523
SCH772984
曲美替尼
加上达拉非尼

图26A

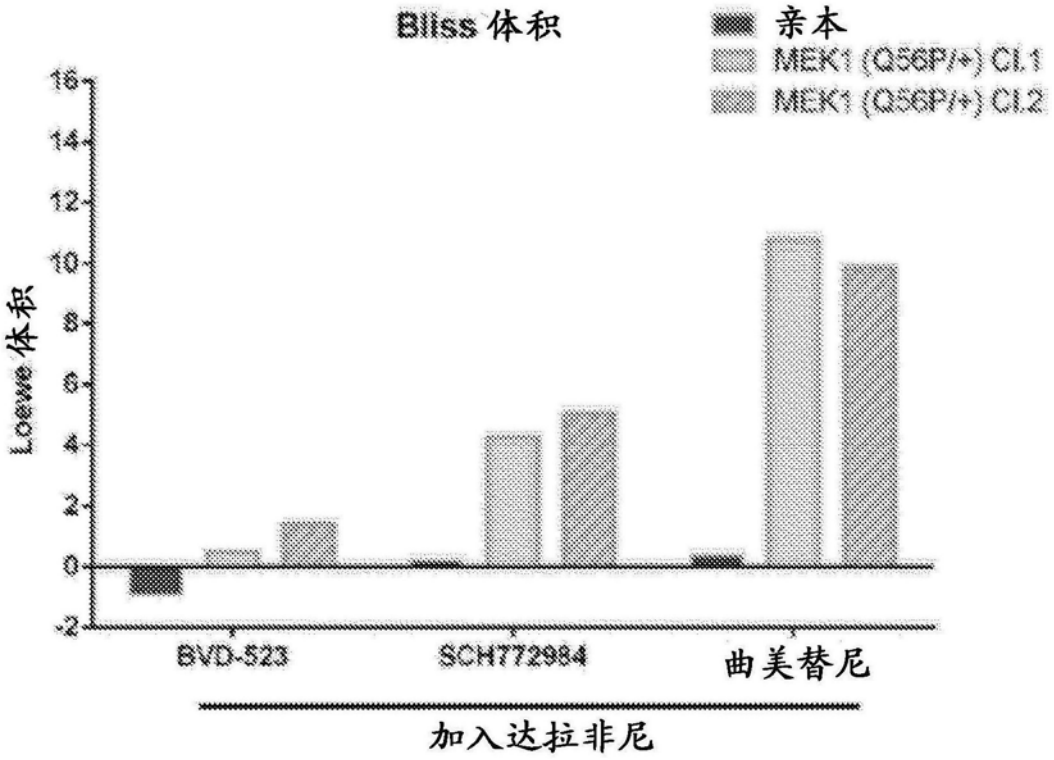

Bliss 体积
亲本
MEK1 (Q56P/+) Cl.1
MEK1 (Q56P/+) Cl.2
Loewe 体积
16
14
12
10
8
6
4
2
0
-2
BVD-523
SCH772984
曲美替尼
加入达拉非尼

图26B

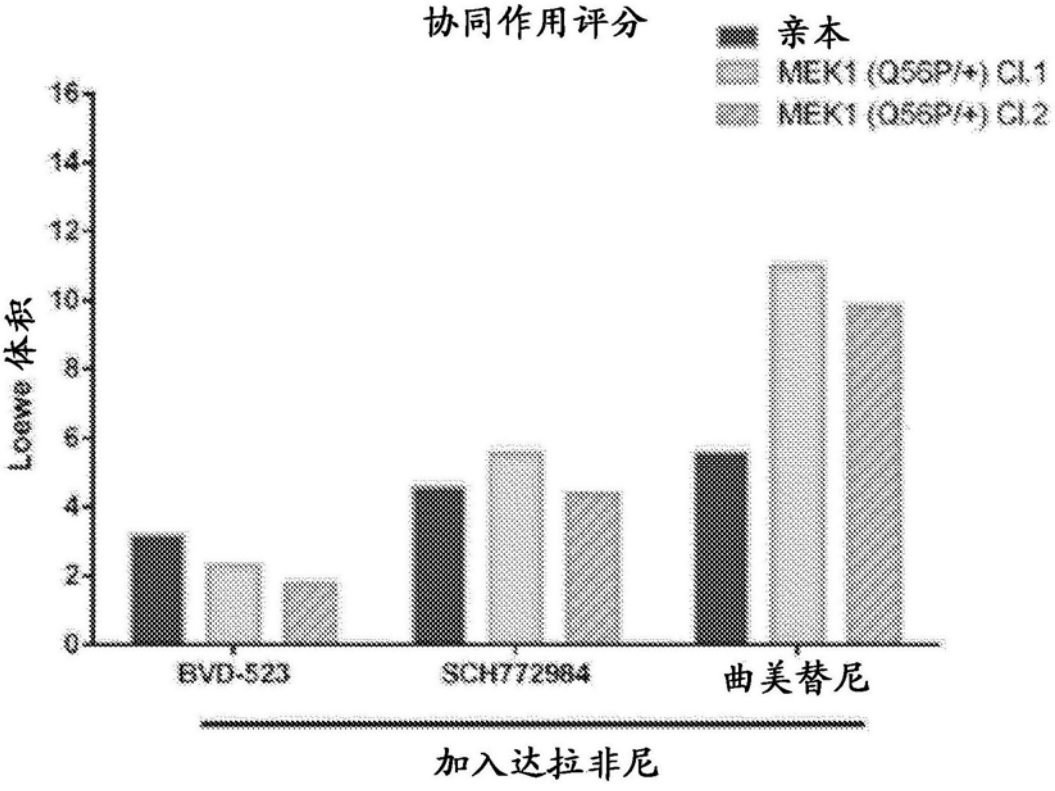

协同作用评分
亲本
MEK1 (Q56P/+) Cl.1
MEK1 (Q56P/+) Cl.2
Loewe 体积
16
14
12
10
8
6
4
2
0
BVD-523
SCH772984
曲美替尼
加入达拉非尼

图26C

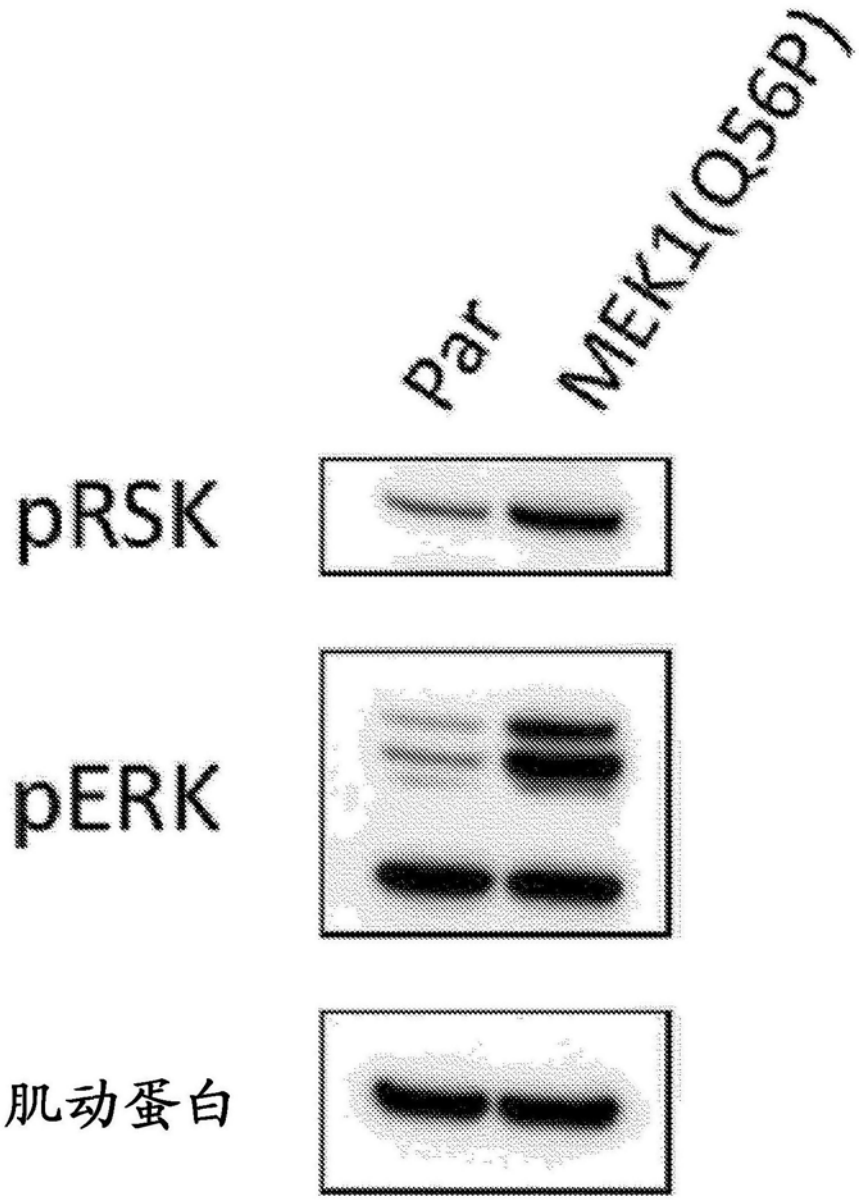


图27A

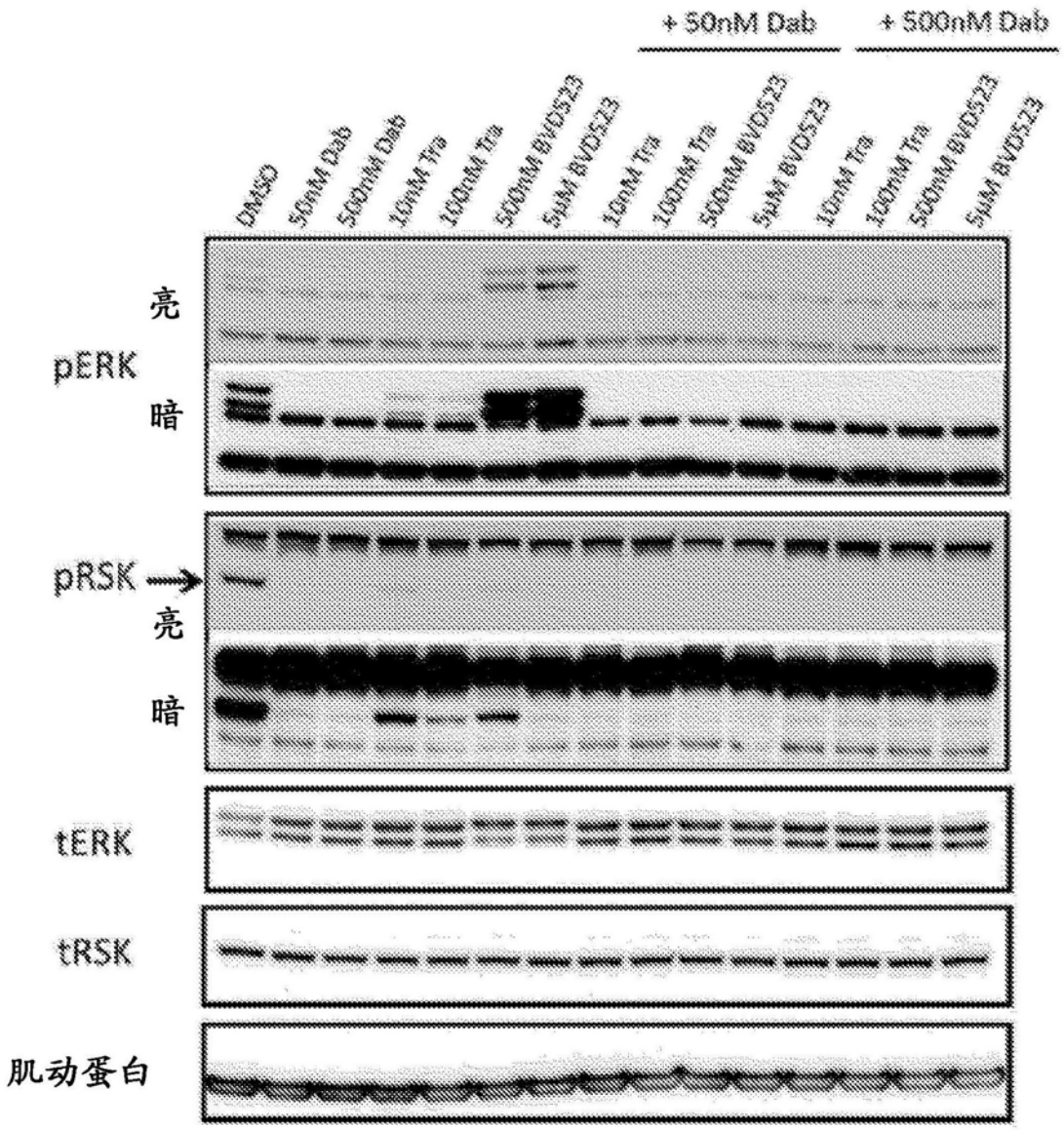

+ 50nM Dab
+ 500nM Dab
DMSO
50nM Dab
500nM Dab
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
pERK
亮
暗
pRSK
亮
暗
tERK
tRSK
肌动蛋白

图27B

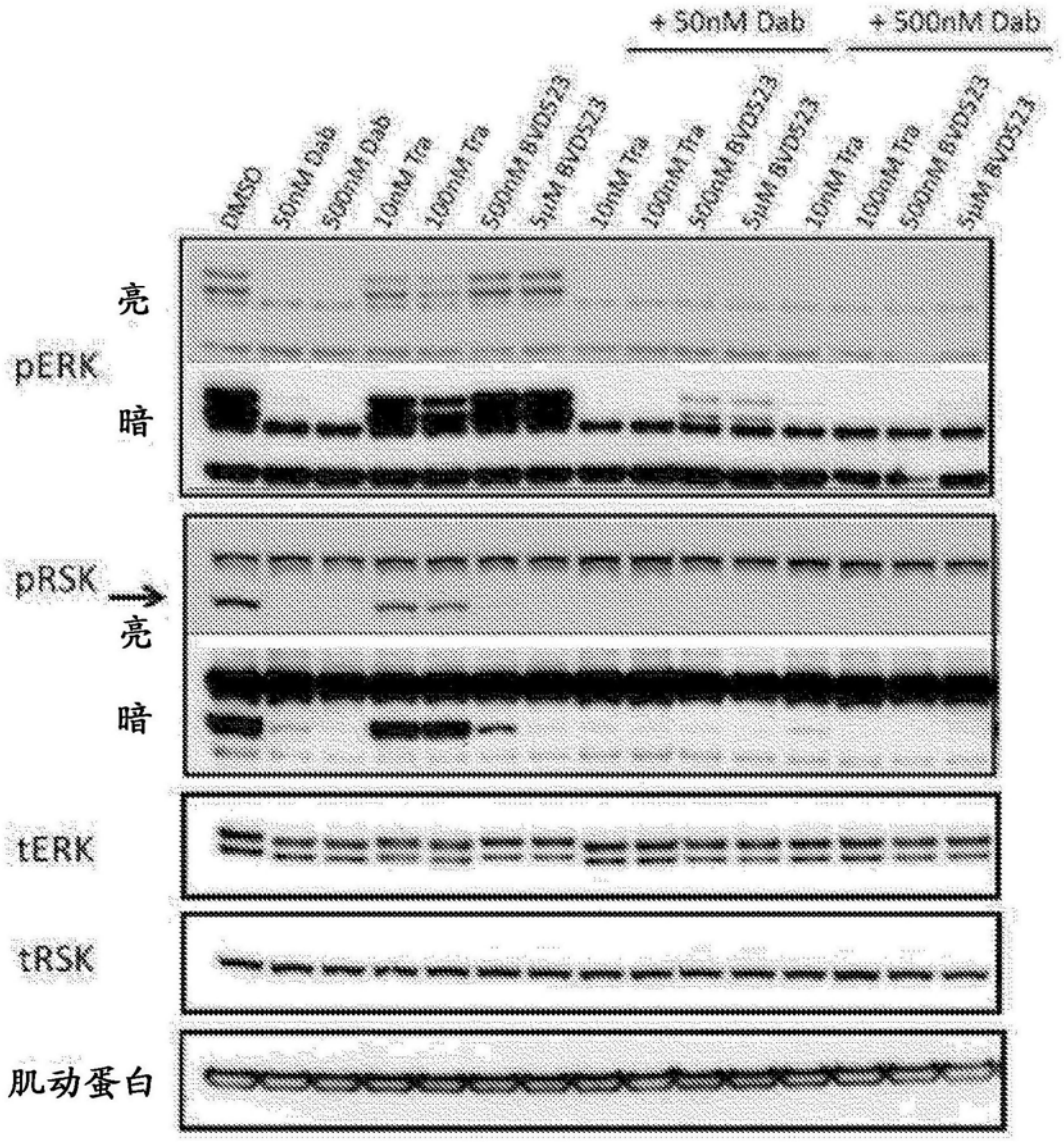

+ 50nM Dab
+ 500nM Dab
DMSO
50nM Dab
500nM Dab
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
10nM Tra
100nM Tra
500nM BVD523
5μM BVD523
pERK
亮
暗
pRSK
亮
暗
tERK
tRSK
肌动蛋白

图27C

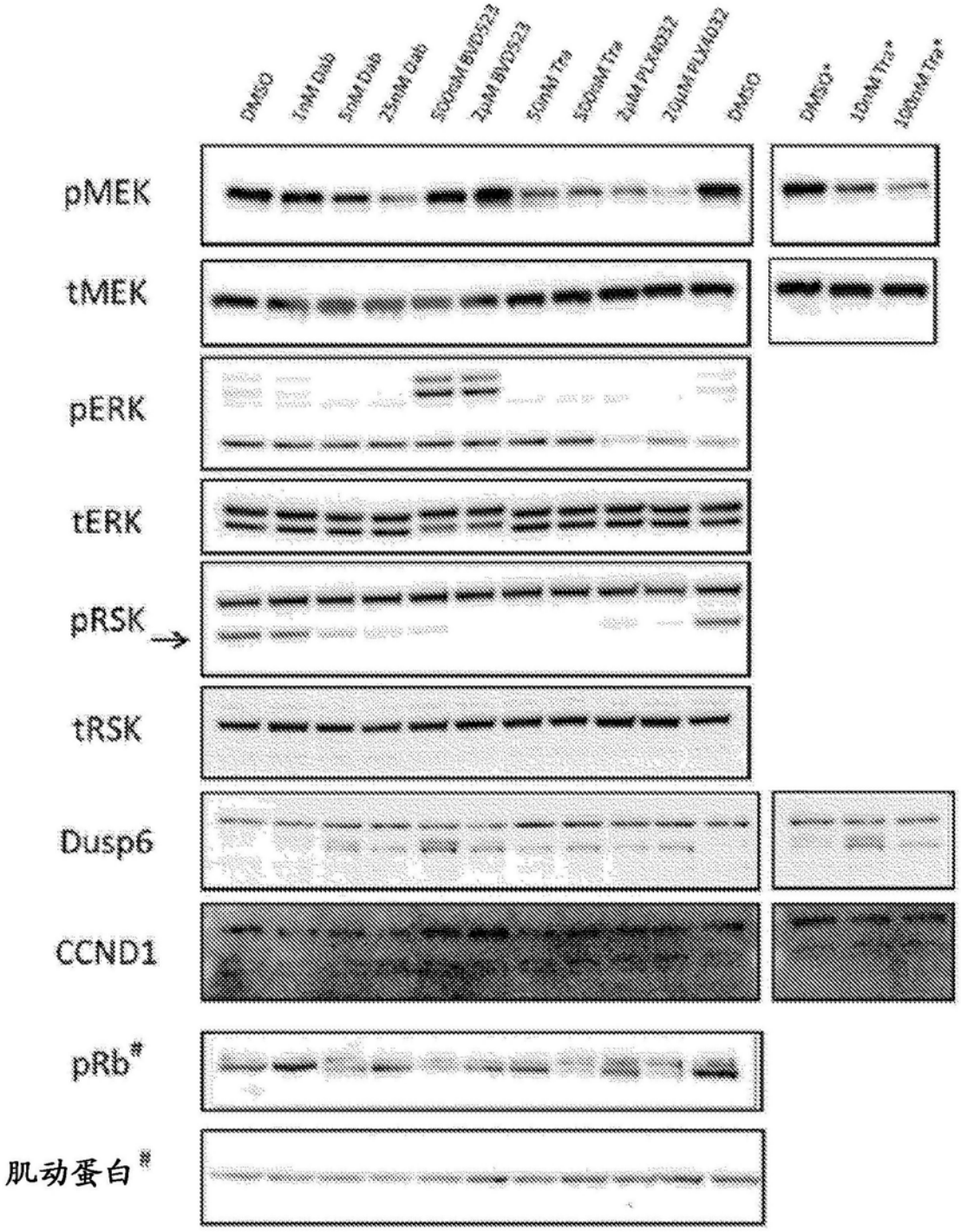

DMSO
1nM Dab
5nM Dab
25nM Dab
500nM BVD523
2μM BVD523
50nM Tra
500nM Tra
2μM PLX4032
20μM PLX4032
DMSO
DMSO*
10nM Tra*
100nM Tra*
pMEK
tMEK
pERK
tERK
pRSK
tRSK
Dusp6
CCND1
pRb#
肌动蛋白#

图27D

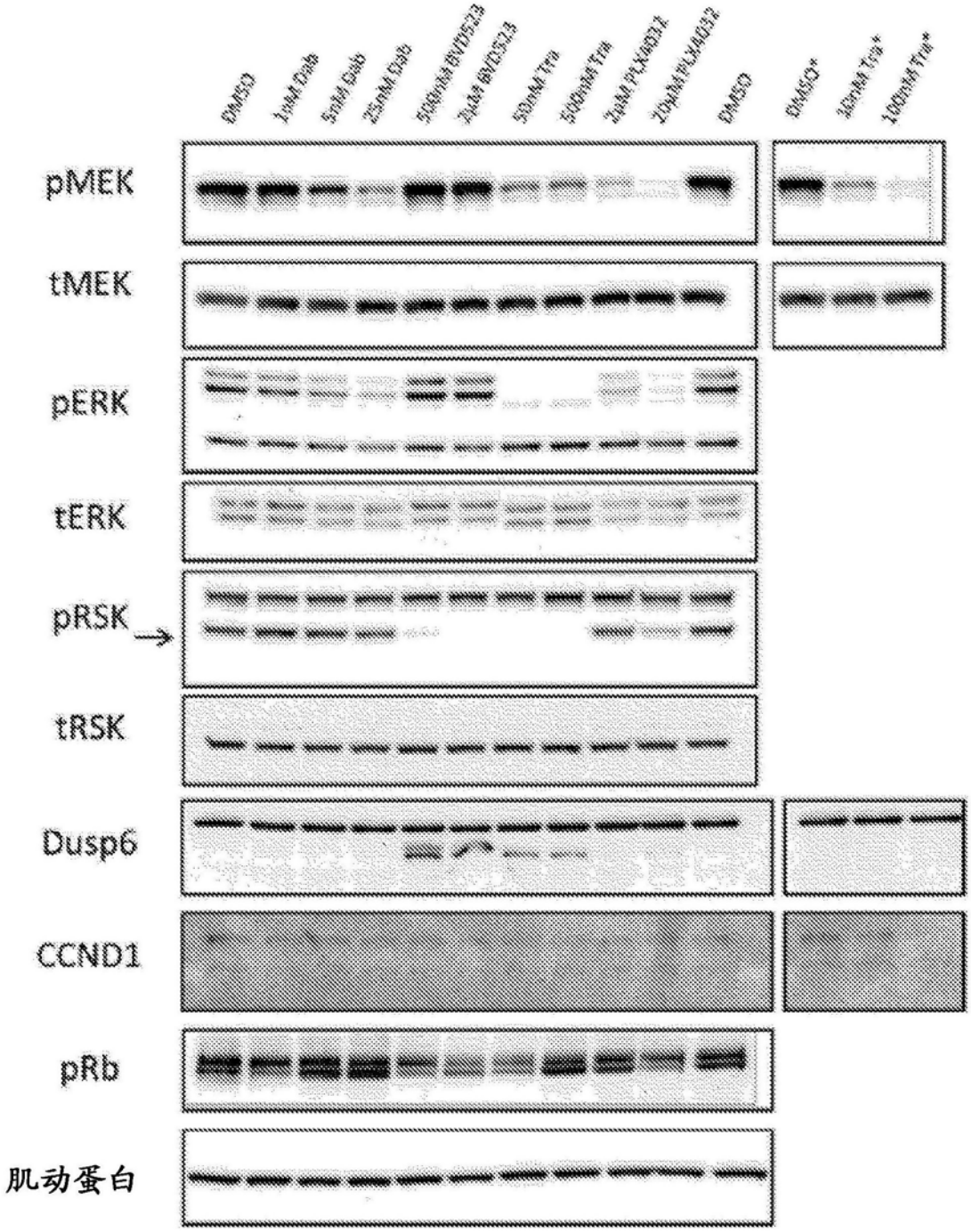

DMSO
1nM Dab
5nM Dab
25nM Dab
500nM GDC523
2uM GDC523
50nM Tra
500nM Tra
2uM PLX4032
20uM PLX4032
DMSO
DMSO*
10nM Tra*
100nM Tra*
pMEK
tMEK
pERK
tERK
pRSK
tRSK
Dusp6
CCND1
pRb
肌动蛋白

图27E

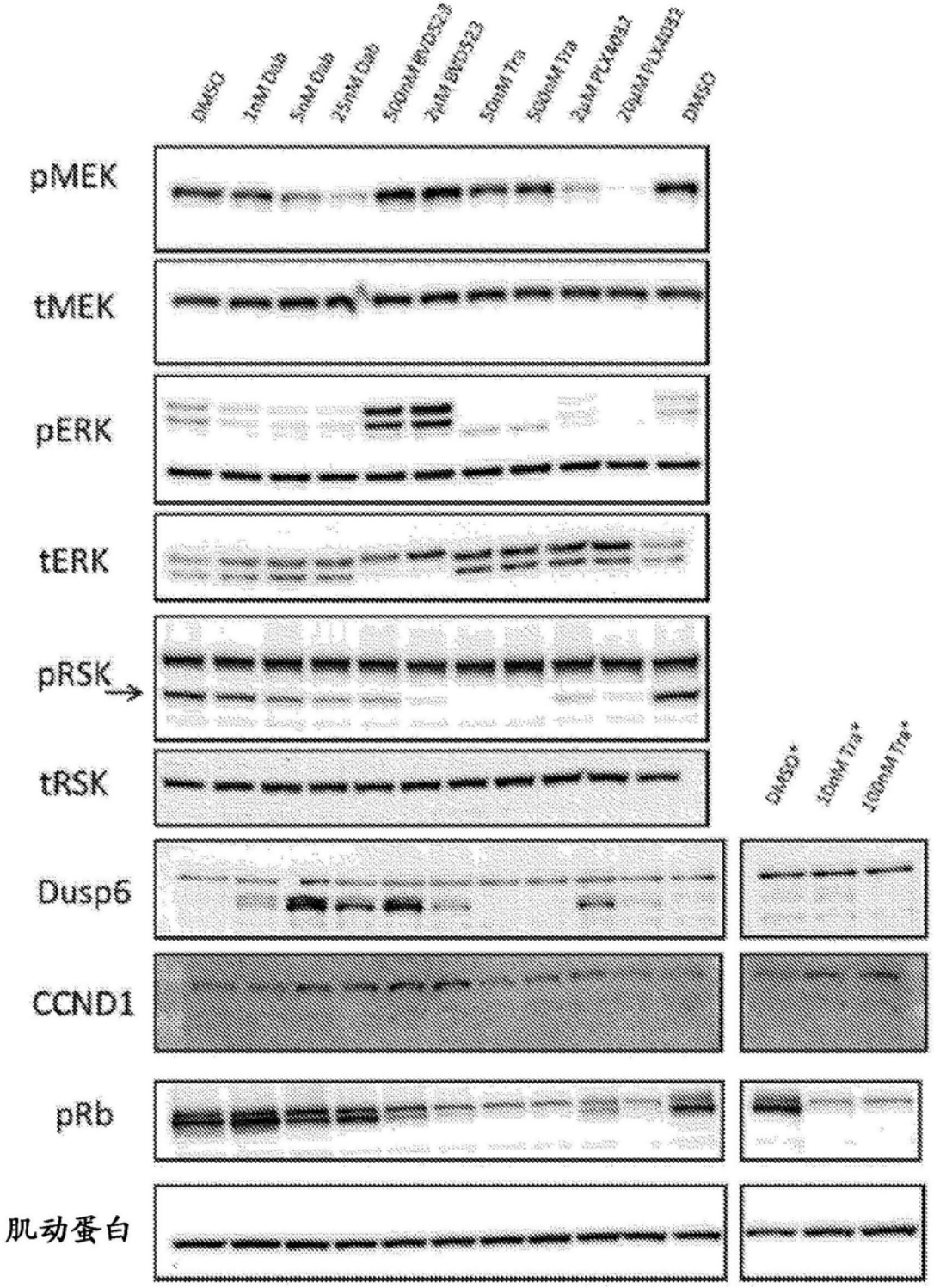

DMSO
1nM Dab
5nM Dab
15nM Dab
500nM BVD523
2μM BVD523
50nM Tra
500nM Tra
2μM PLX4032
10μM PLX4032
DMSO
pMEK
tMEK
pERK
tERK
pRSK
tRSK
DMSO*
10nM Tra*
100nM Tra*
Dusp6
CCND1
pRb
肌动蛋白

图27F

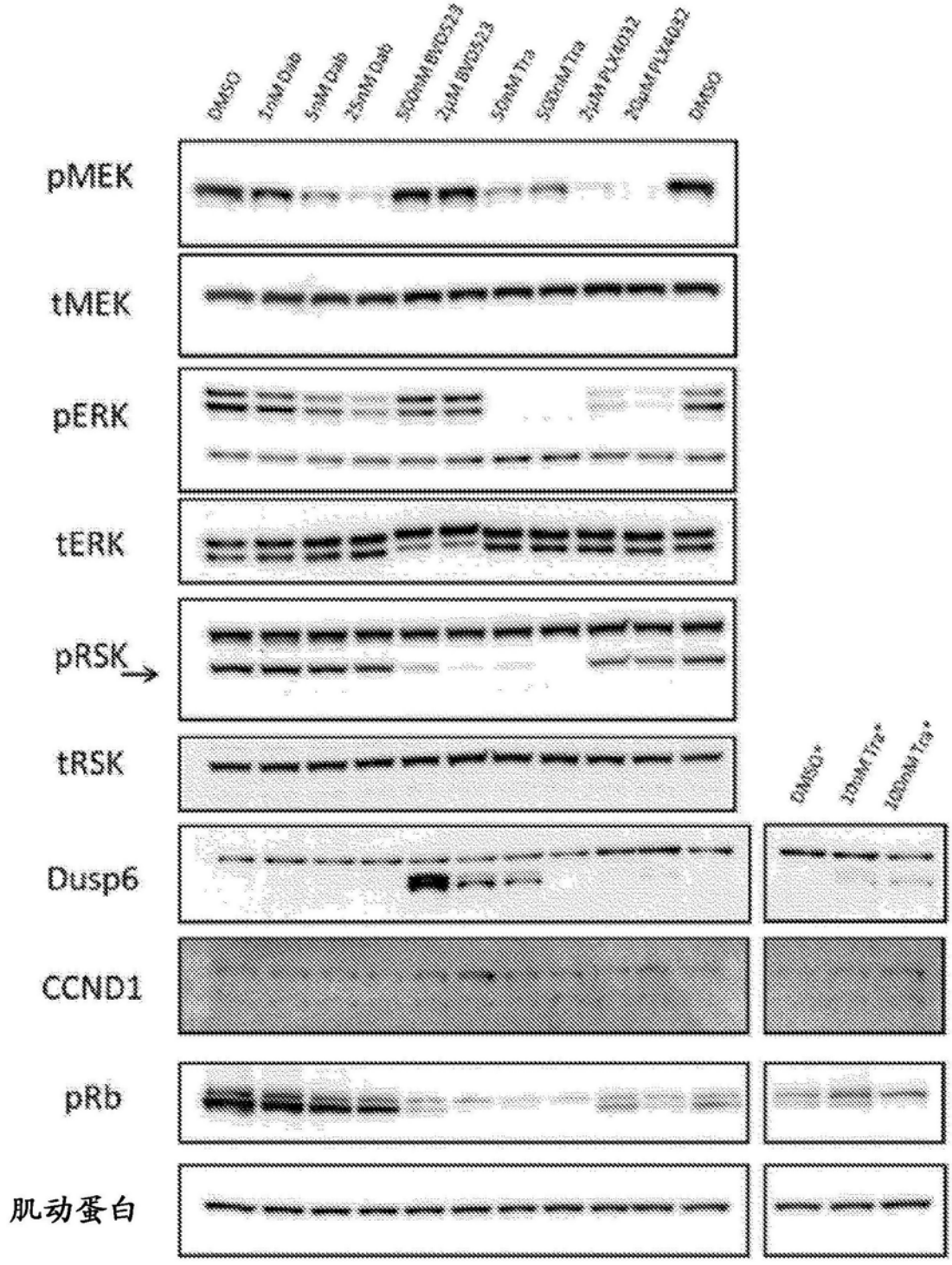

DMSO
1nM Dab
5nM Dab
25nM Dab
500nM BVD523
2μM BVD523
50nM Tra
500nM Tra
2μM PLX4032
20μM PLX4032
DMSO
pMEK
tMEK
pERK
tERK
pRSK
tRSK
DMSO*
175nM Tra*
1400nM Tra*
Dusp6
CCND1
pRb
肌动蛋白

图27G

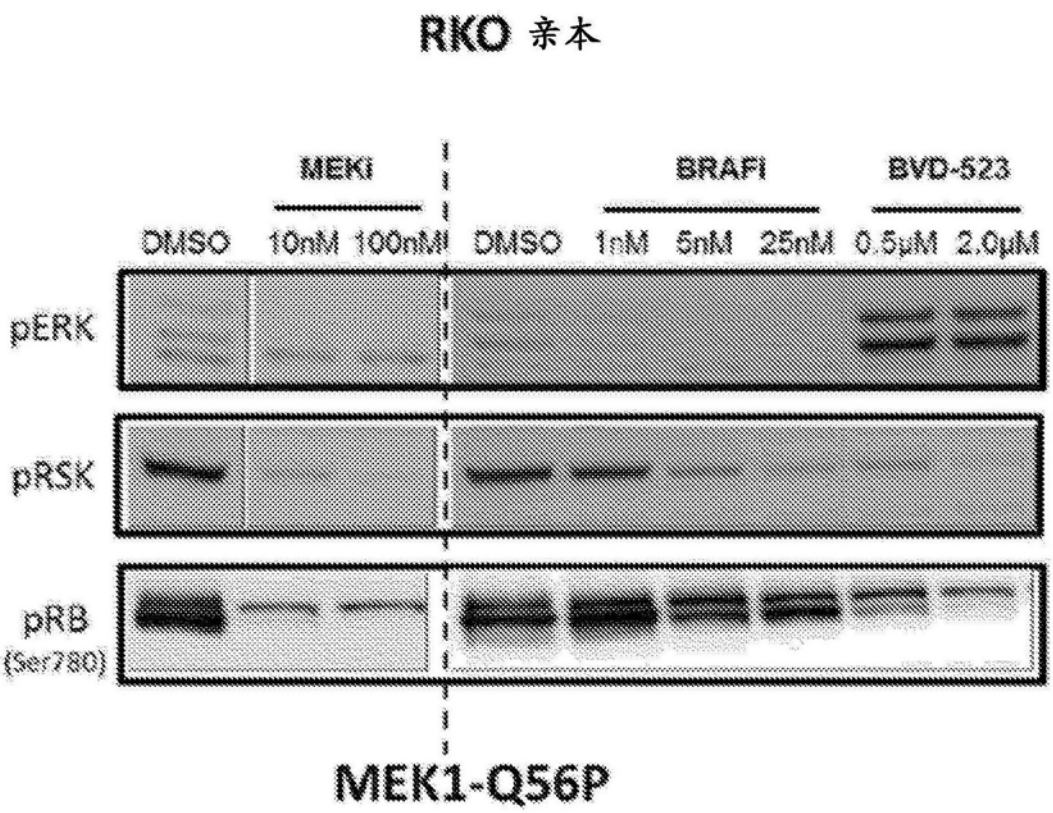

RKO 亲本
MEKi
BRAFi
BVD-523
DMSO
10nM
100nM
DMSO
1nM
5nM
25nM
0.5μM
2.0μM
pERK
pRSK
pRB
(Ser780)
MEK1-Q56P

图27H

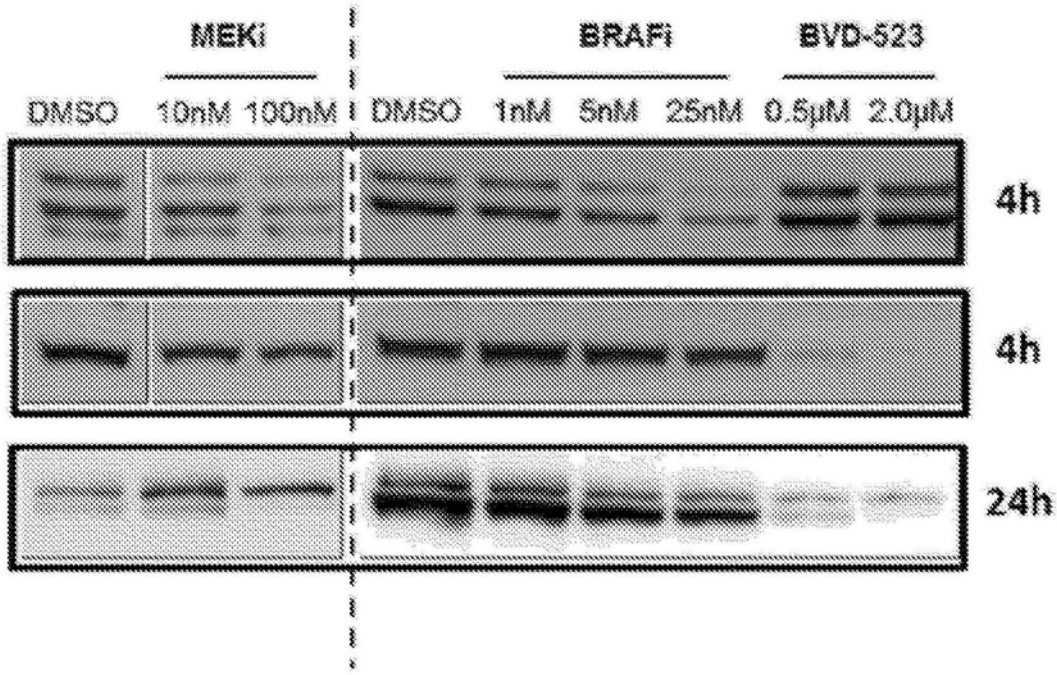

MEKi
BRAFi
BVD-523
DMSO
10nM
100nM
DMSO
1nM
5nM
25nM
0.5μM
2.0μM
4h
4h
24h

图27I

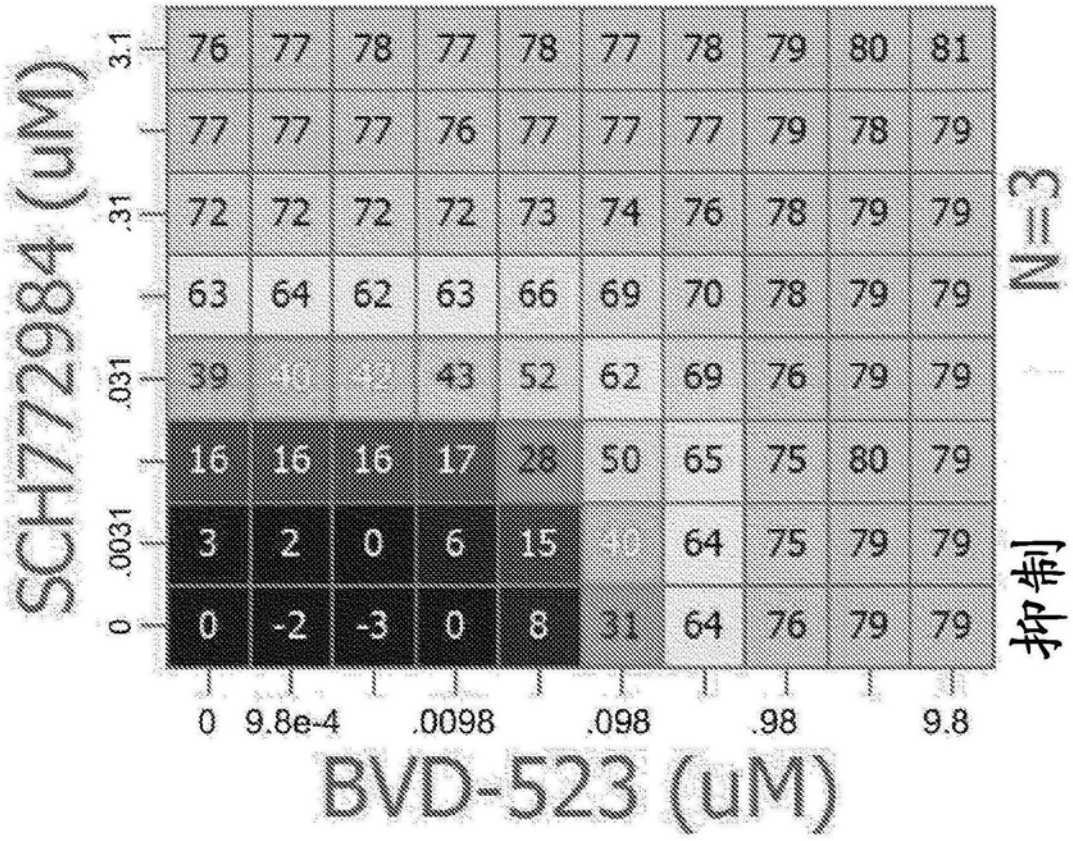

SCH772984 (uM)
3.1
.31
.031
.0031
0
76 77 78 77 78 77 78 79 80 81
77 77 77 76 77 77 77 79 78 79
72 72 72 72 73 74 76 78 79 79
63 64 62 63 66 69 70 78 79 79
39 40 42 43 52 62 69 76 79 79
16 16 16 17 28 50 65 75 80 79
3 2 0 6 15 40 64 75 79 79
0 -2 -3 0 8 31 64 76 79 79
N=3
抑制
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
BVD-523 (uM)

图28A

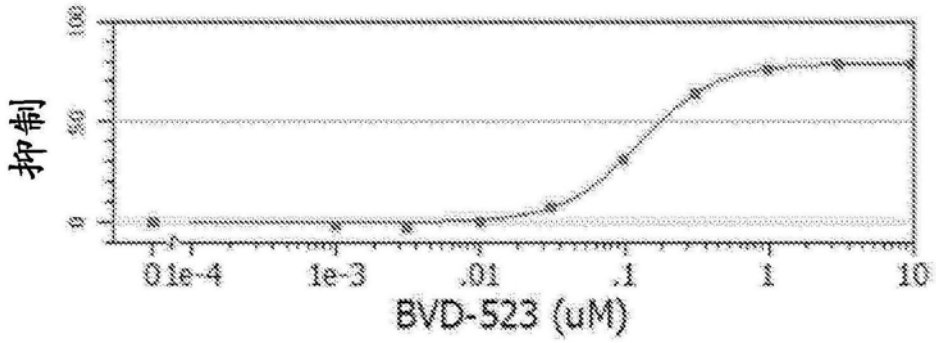

抑制
100
50
0
0 1e-4 1e-3 .01 .1 1 10
BVD-523 (uM)

图28B

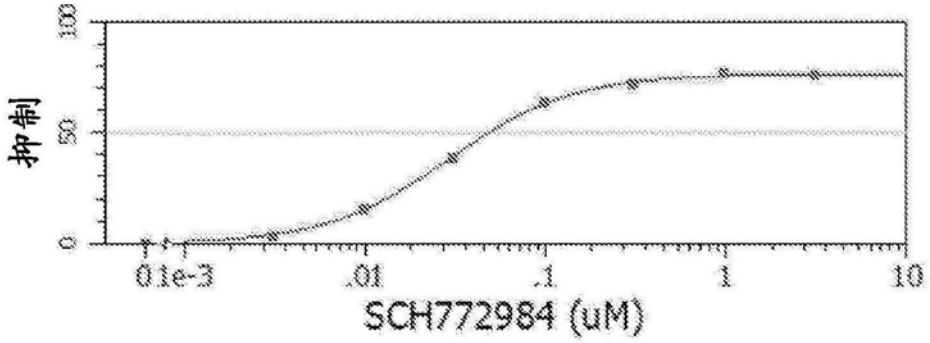

抑制
100
50
0
0.1e-3
.01
.1
1
10
SCH772984 (uM)

图28C

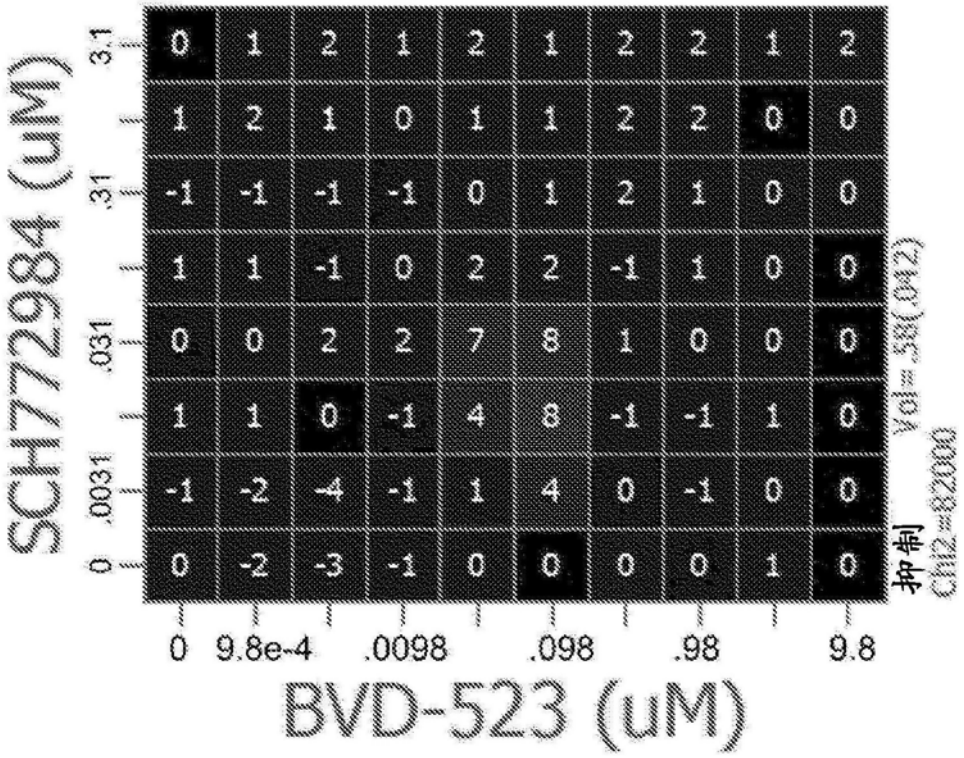

SCH772984 (uM)
3.1
.31
.031
.0031
0
0 1 2 1 2 1 2 2 1 2
1 2 1 0 1 1 2 2 0 0
-1 -1 -1 -1 0 1 2 1 0 0
1 1 -1 0 2 2 -1 1 0 0
0 0 2 2 7 8 1 0 0 0
1 1 0 -1 4 8 -1 -1 1 0
-1 -2 -4 -1 1 4 0 -1 0 0
0 -2 -3 -1 0 0 0 0 1 0
抑制
Vol = 58(.042)
Ch2 = 82000
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
BVD-523 (uM)

图28D

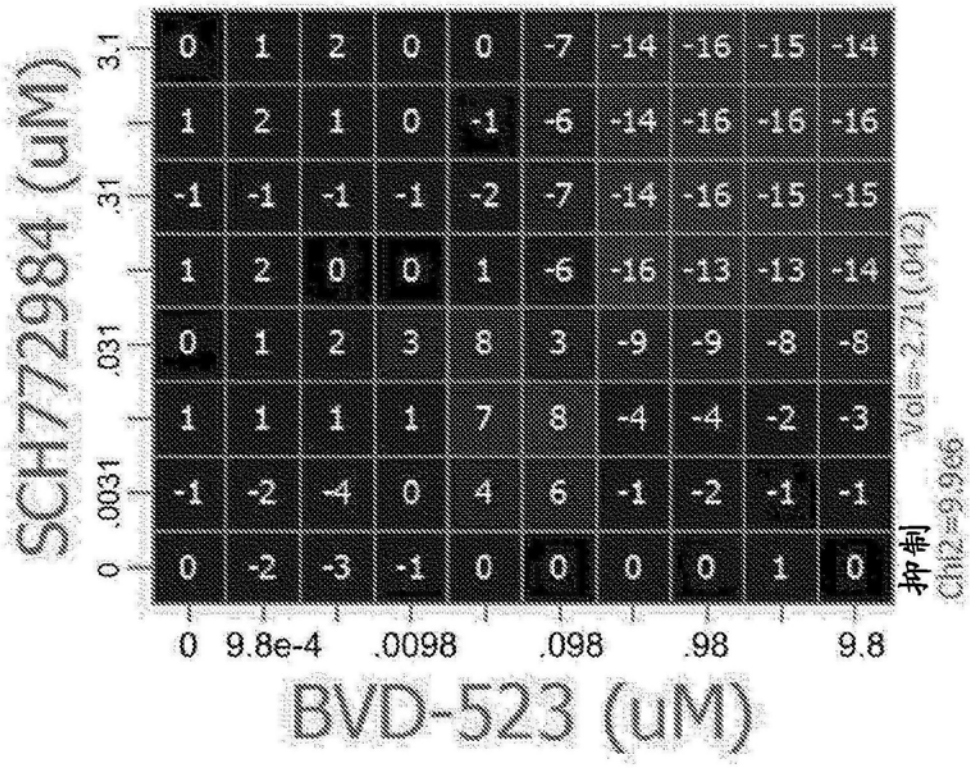

SCH772984 (uM)
3.1
.31
.031
.0031
0
0 1 2 0 0 -7 -14 -16 -15 -14
1 2 1 0 -1 -6 -14 -16 -16 -16
-1 -1 -1 -1 -2 -7 -14 -16 -15 -15
1 2 0 0 1 -6 -16 -13 -13 -14
0 1 2 3 8 3 -9 -9 -8 -8
1 1 1 1 7 8 -4 -4 -2 -3
-1 -2 -4 0 4 6 -1 -2 -1 -1
0 -2 -3 -1 0 0 0 0 1 0
抑制
Vol=-2.71(.042)
Chi2=9.966
0 9.8e-4 .0098 .098 .98 9.8
BVD-523 (uM)

图28E

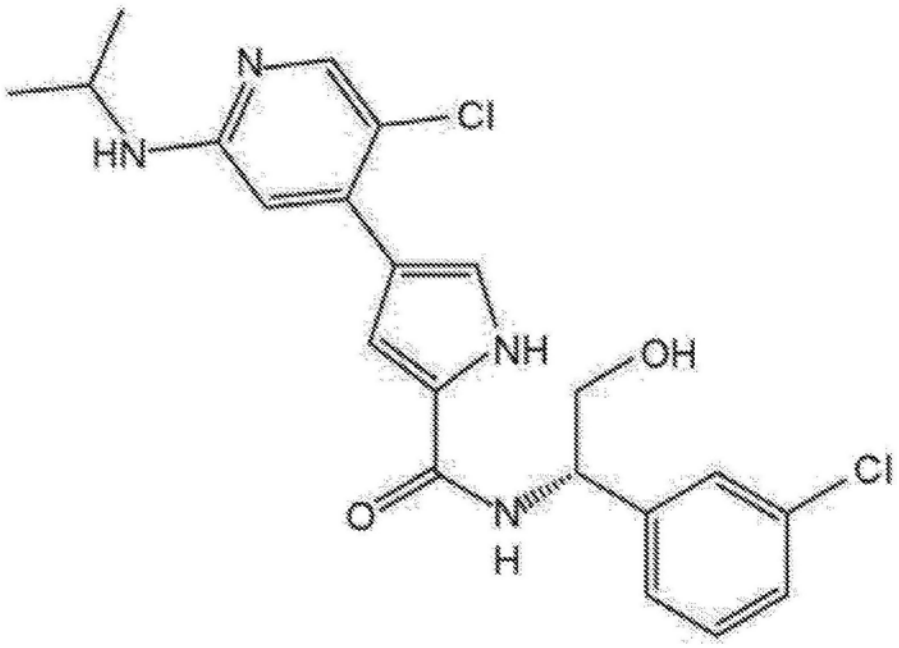

N
HN
Cl
NH
OH
O
N
H
Cl

图29A

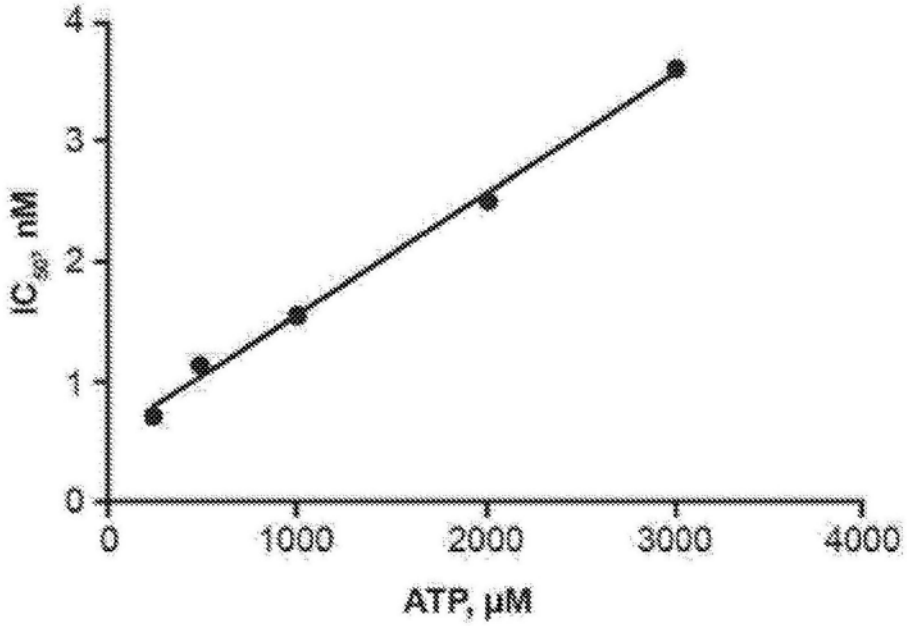

4
3
2
1
0
IC_{50}, nM
0
1000
2000
3000
4000
ATP, μM

图29B

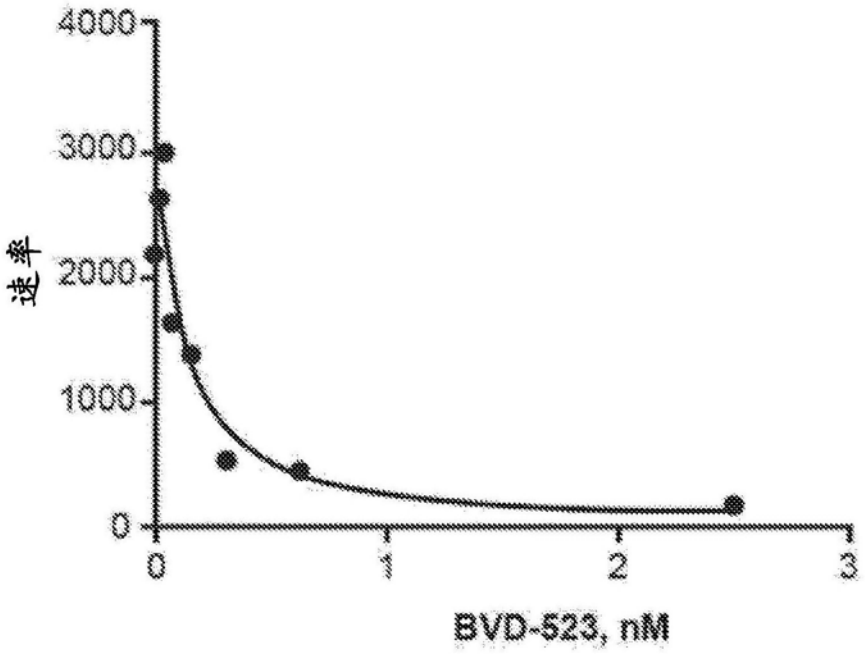

4000
3000
2000
1000
0
速率
0
1
2
3
BVD-523, nM

图29C

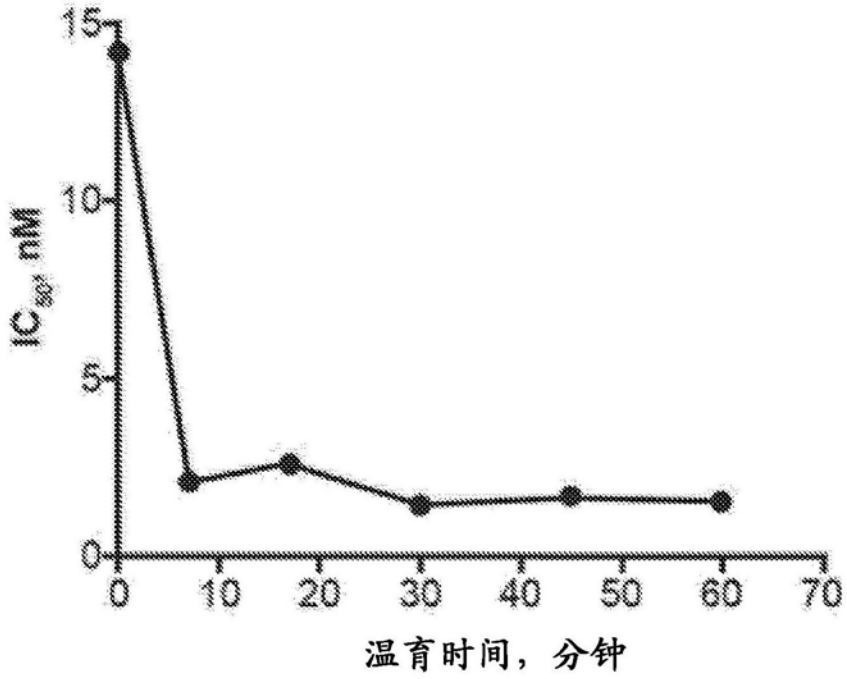

15
10
5
0
IC_{50}, nM
0
10
20
30
40
50
60
70
温育时间，分钟

图29D

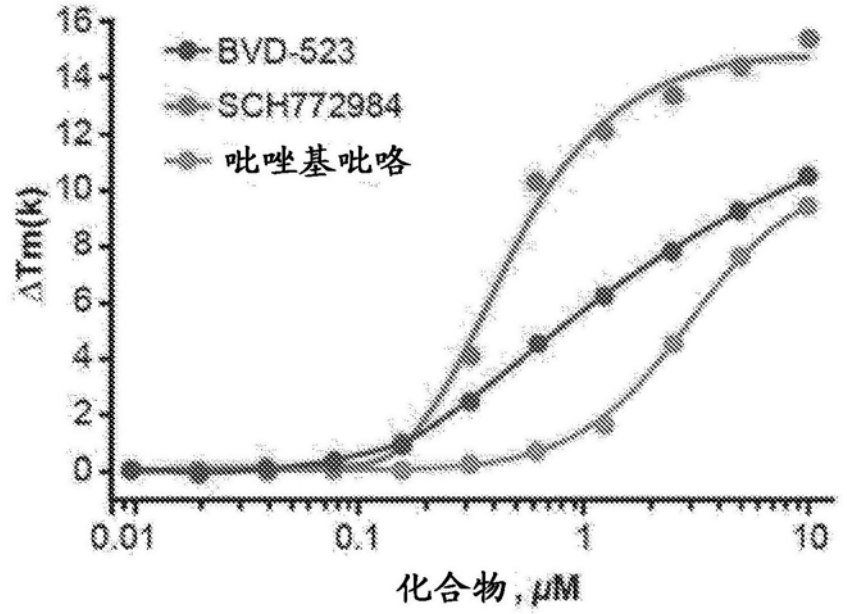

16
14
12
10
8
6
4
2
0
ΔTm(K)
BVD-523
SCH772984
吡唑基吡咯
0.01
0.1
1
10
化合物，μM

图29E

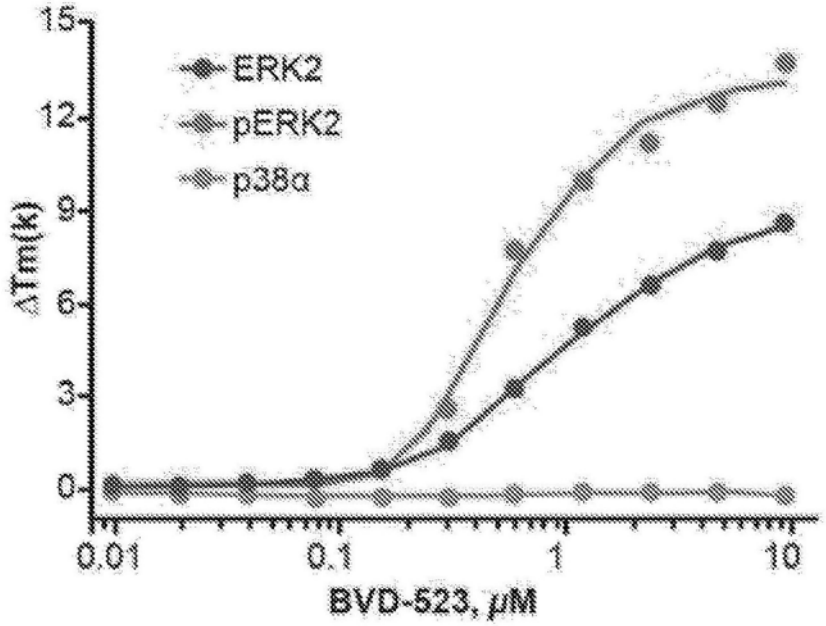


图29F

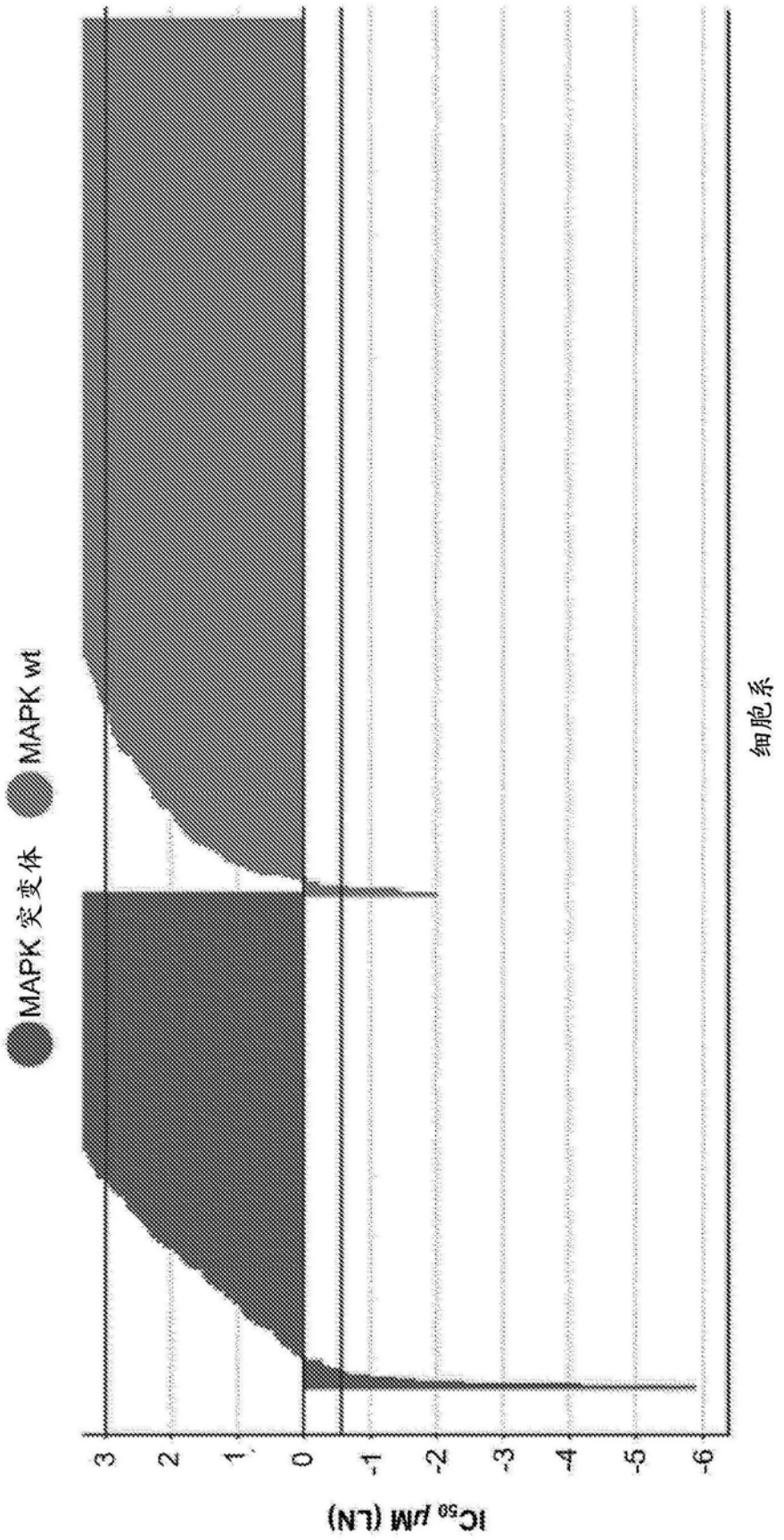


图30A

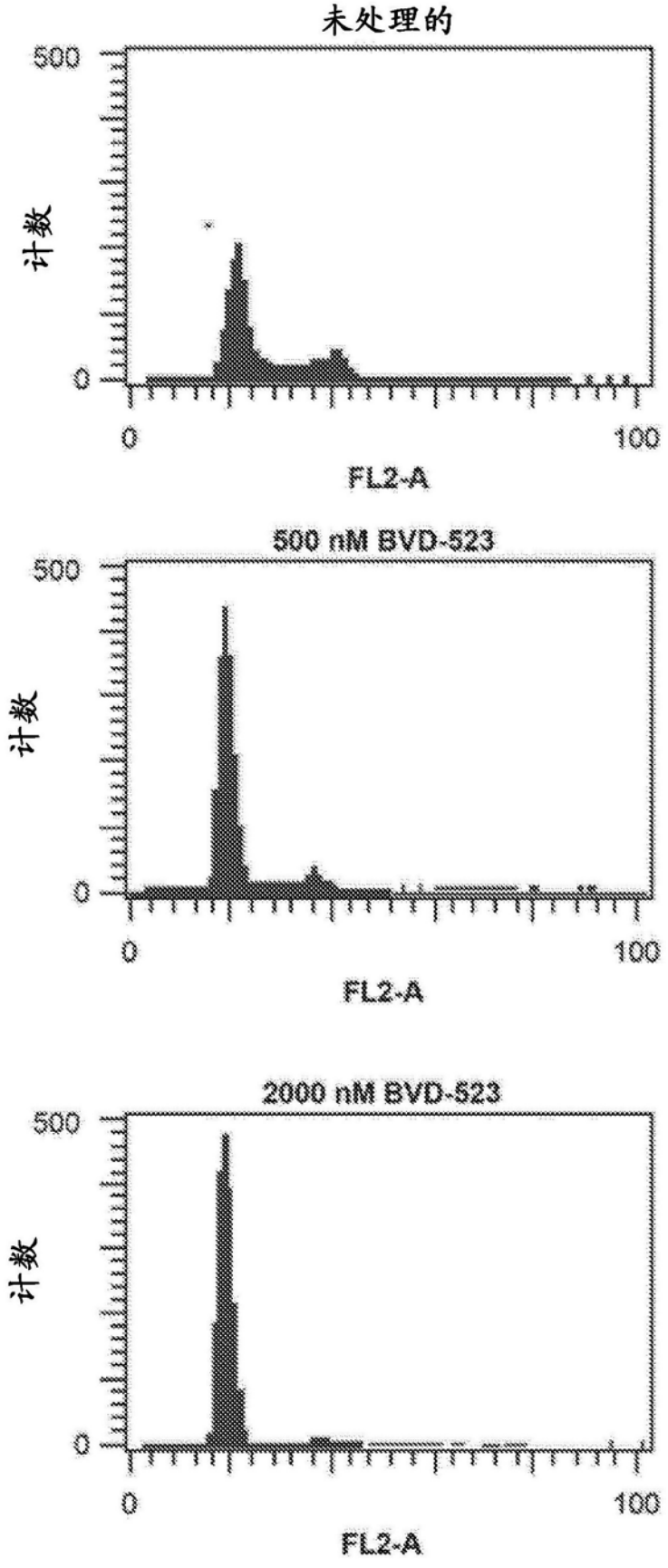

未处理的
500
计数
0
0
100
FL2-A
500 nM BVD-523
500
计数
0
0
100
FL2-A
2000 nM BVD-523
500
计数
0
0
100
FL2-A

图30B

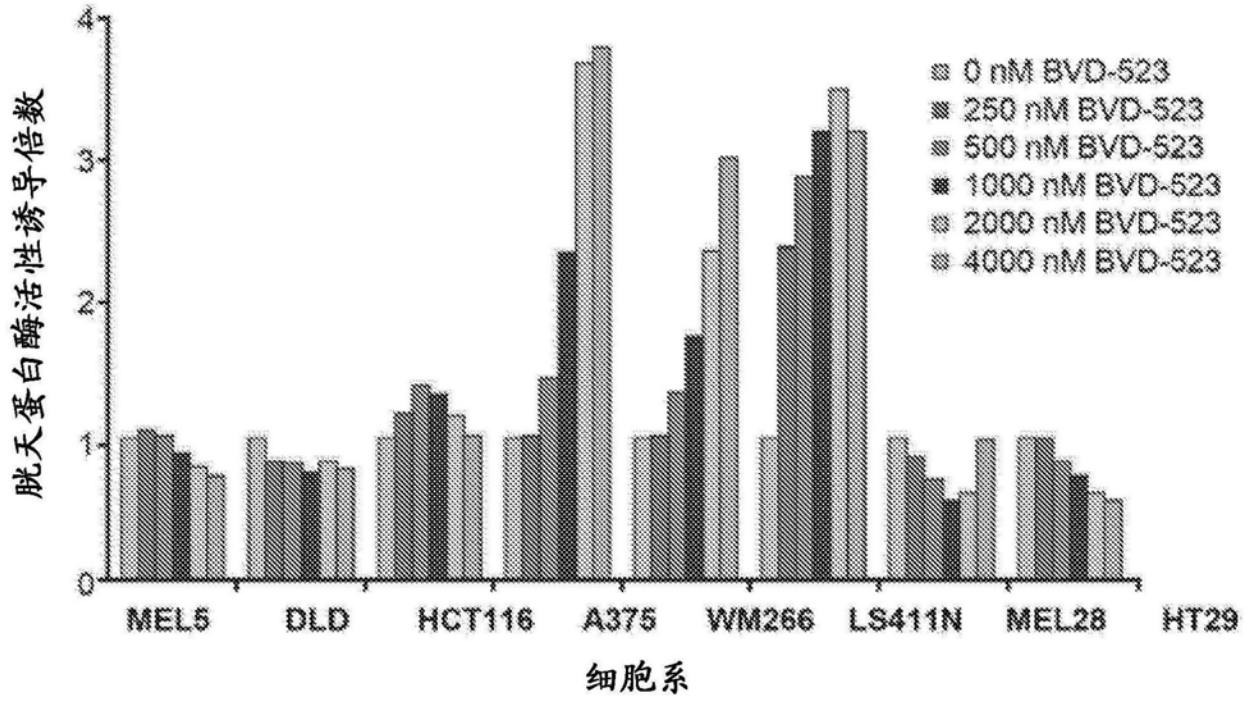

胱天蛋白酶活性诱导倍数
0
1
2
3
4
0 nM BVD-523
250 nM BVD-523
500 nM BVD-523
1000 nM BVD-523
2000 nM BVD-523
4000 nM BVD-523
MEL5
DLD
HCT116
A375
WM266
LS411N
MEL28
HT29
细胞系

图30C

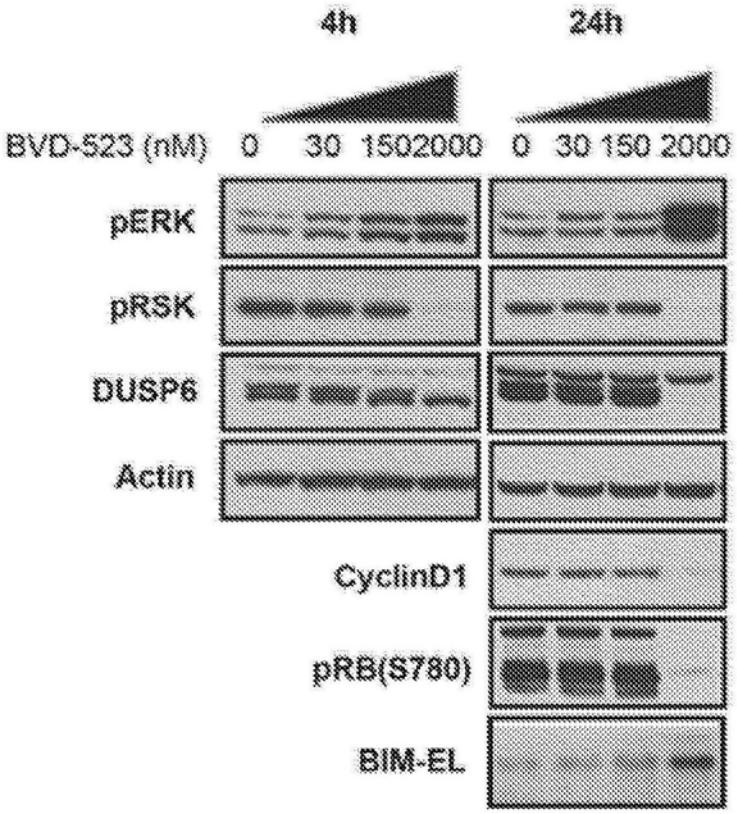

4h
24h
BVD-523 (nM) 0 30 150 2000 0 30 150 2000
pERK
pRSK
DUSP6
Actin
CyclinD1
pRB(S780)
BIM-EL

图30D

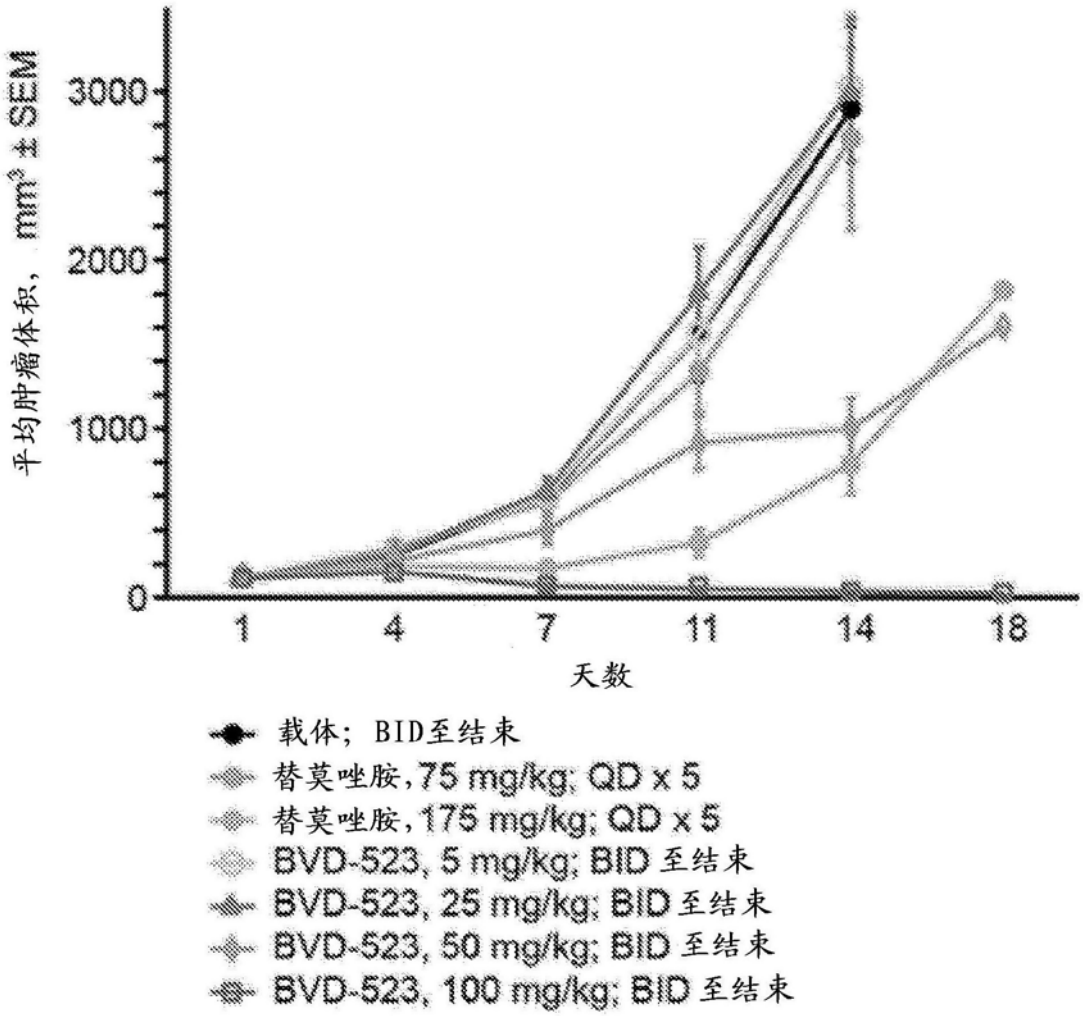

平均肿瘤体积，mm³ ± SEM
3000
2000
1000
0
1
4
7
11
14
18
天数
载体；BID至结束
替莫唑胺，75 mg/kg; QD x 5
替莫唑胺，175 mg/kg; QD x 5
BVD-523, 5 mg/kg; BID 至结束
BVD-523, 25 mg/kg; BID 至结束
BVD-523, 50 mg/kg; BID 至结束
BVD-523, 100 mg/kg; BID 至结束

图31A

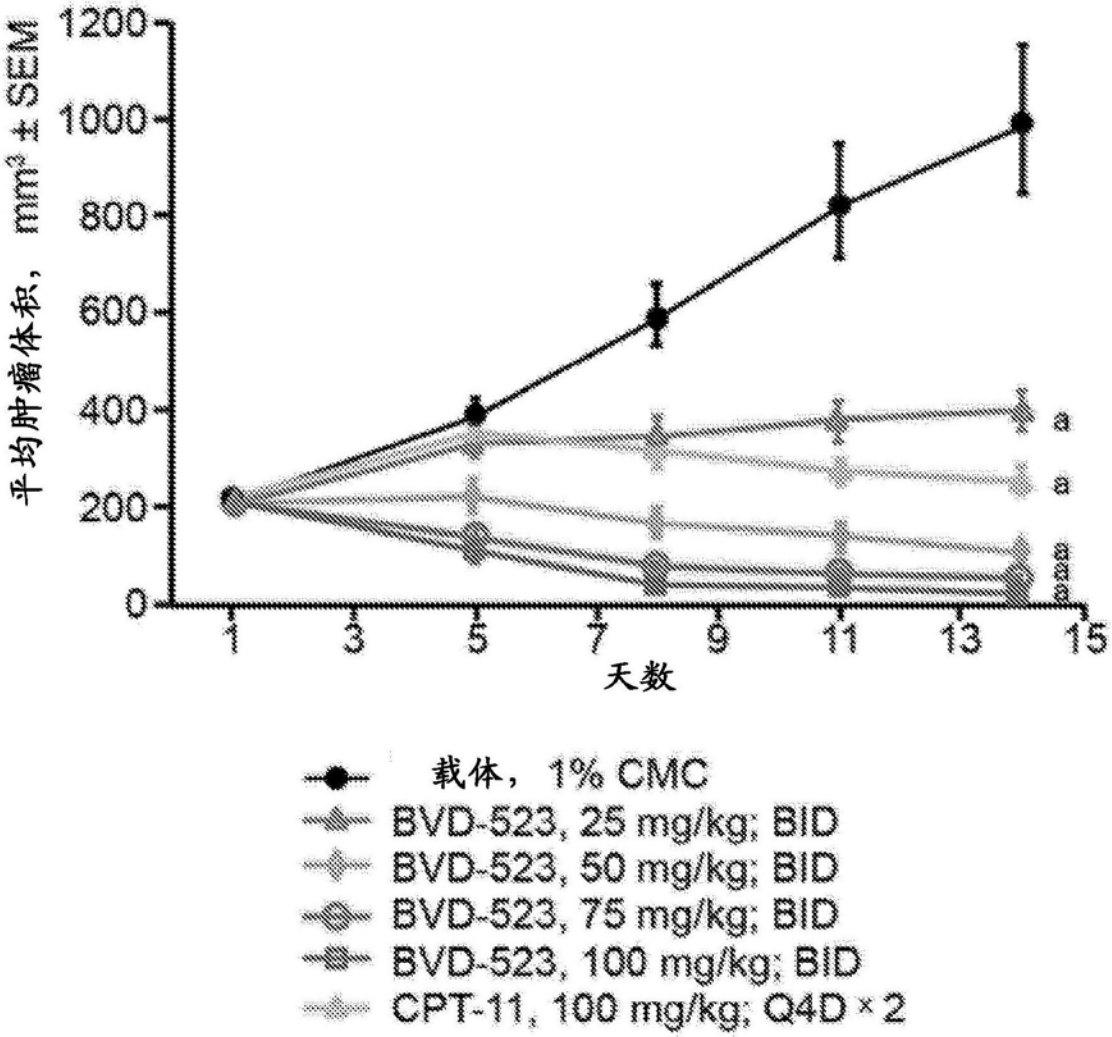

平均肿瘤体积，mm³ ± SEM
1200
1000
800
600
400
200
0
1
3
5
7
9
11
13
15
天数
a
a
a
a
载体，1% CMC
BVD-523, 25 mg/kg; BID
BVD-523, 50 mg/kg; BID
BVD-523, 75 mg/kg; BID
BVD-523, 100 mg/kg; BID
CPT-11, 100 mg/kg; Q4D × 2

图31B

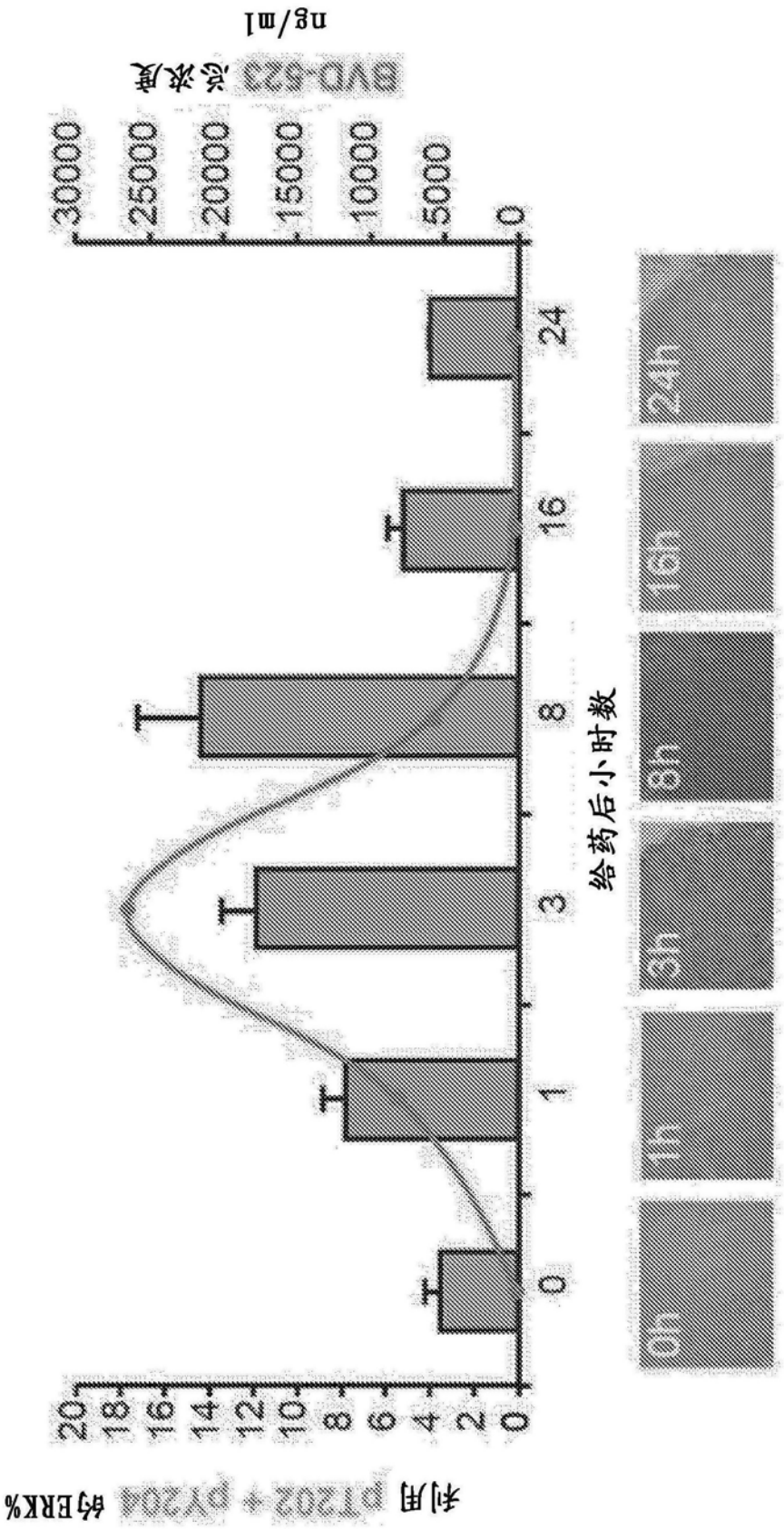

利用 pT202+pY204 的ERK%
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
0
1
3
8
16
24
给药后小时数
0h
1h
3h
8h
16h
24h
BVD-523 总浓度
ng/ml
30000
25000
20000
15000
10000
5000
0

图31C

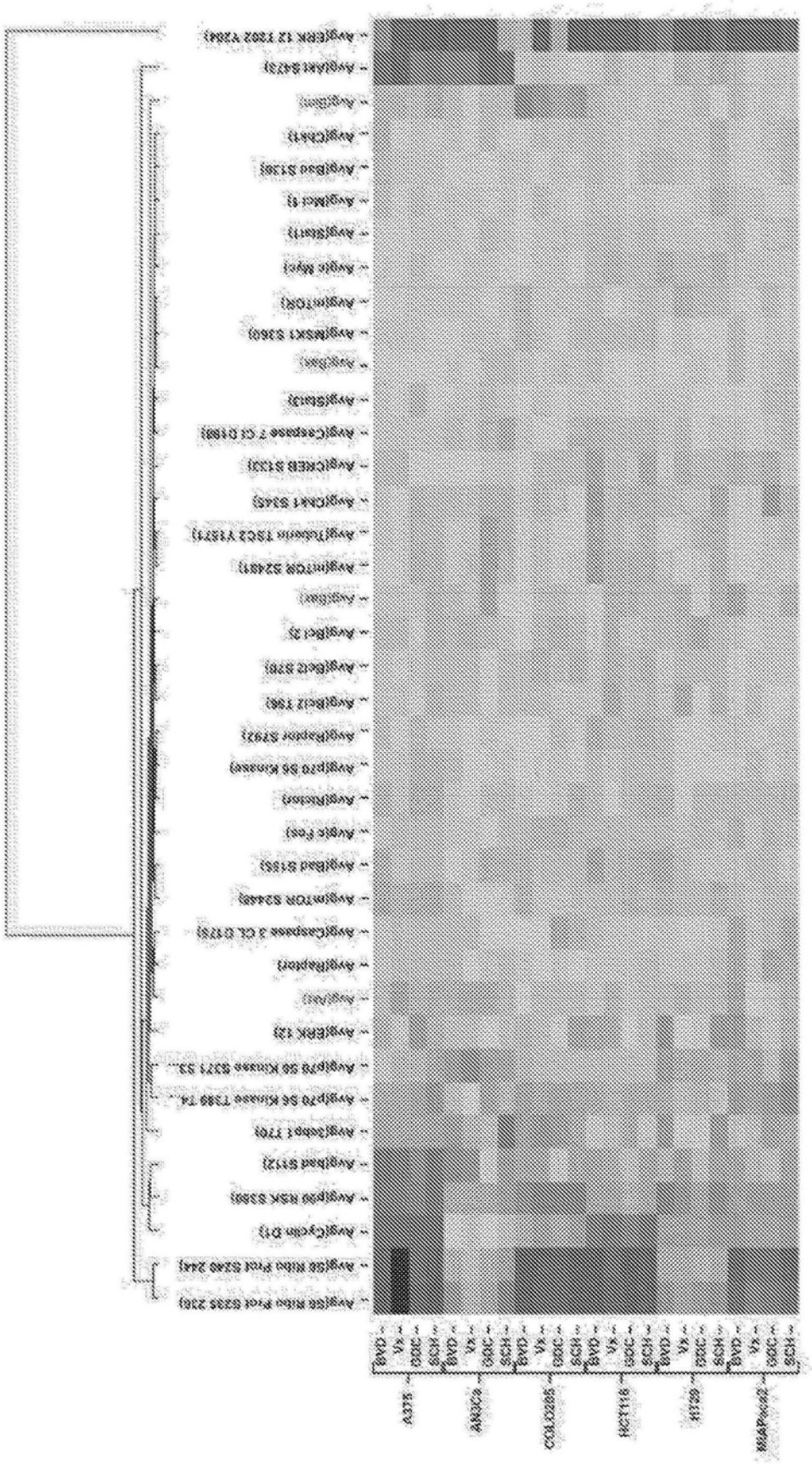


图32A

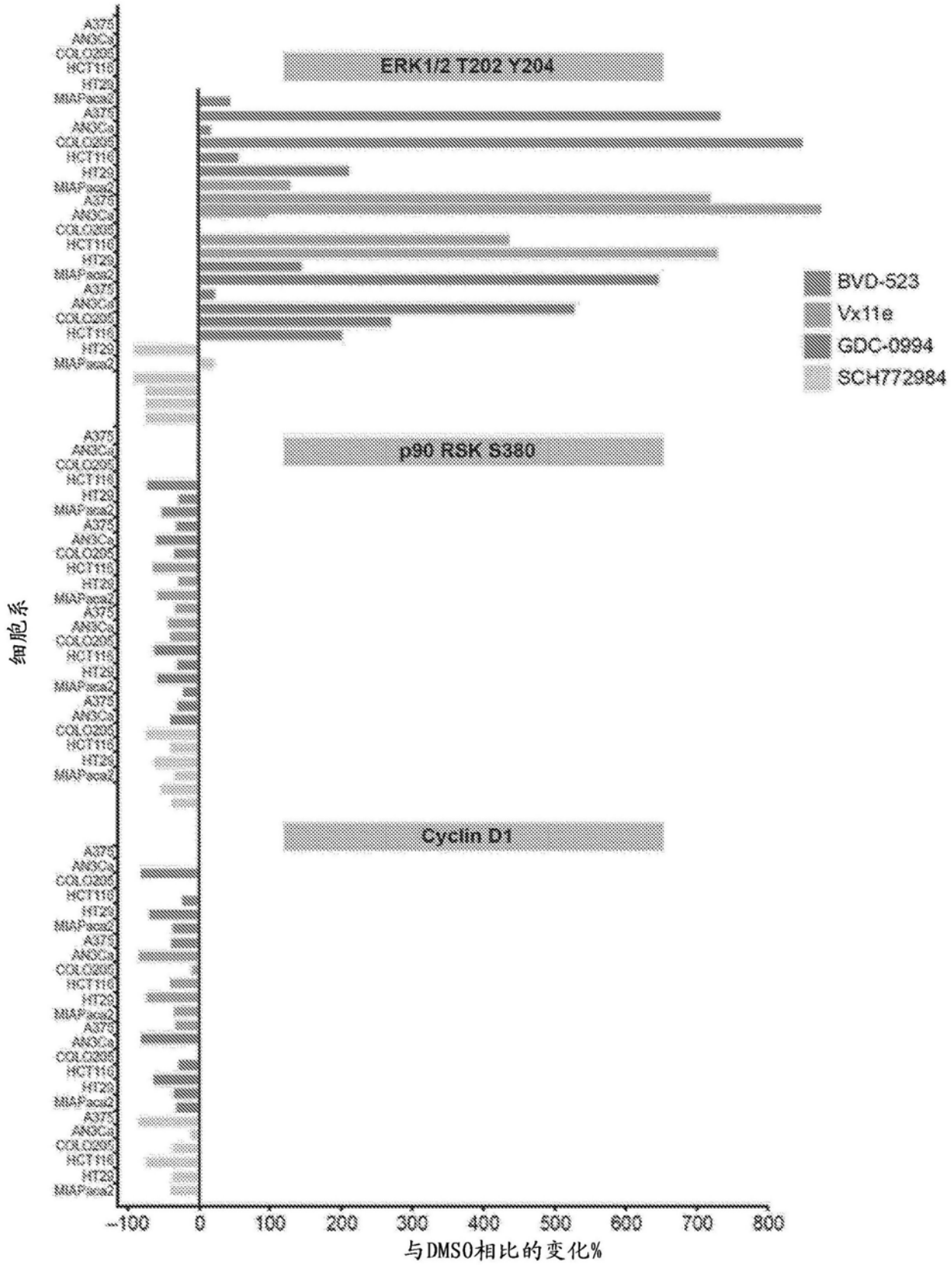

ERK1/2 T202 Y204
p90 RSK S380
Cyclin D1
BVD-523
Vx11e
GDC-0994
SCH772984
细胞系
A375
A431Cs
COLO205
HCT116
HT29
MIAPaca2
-100
0
100
200
300
400
500
600
700
800
与DMSO相比的变化%

图32B

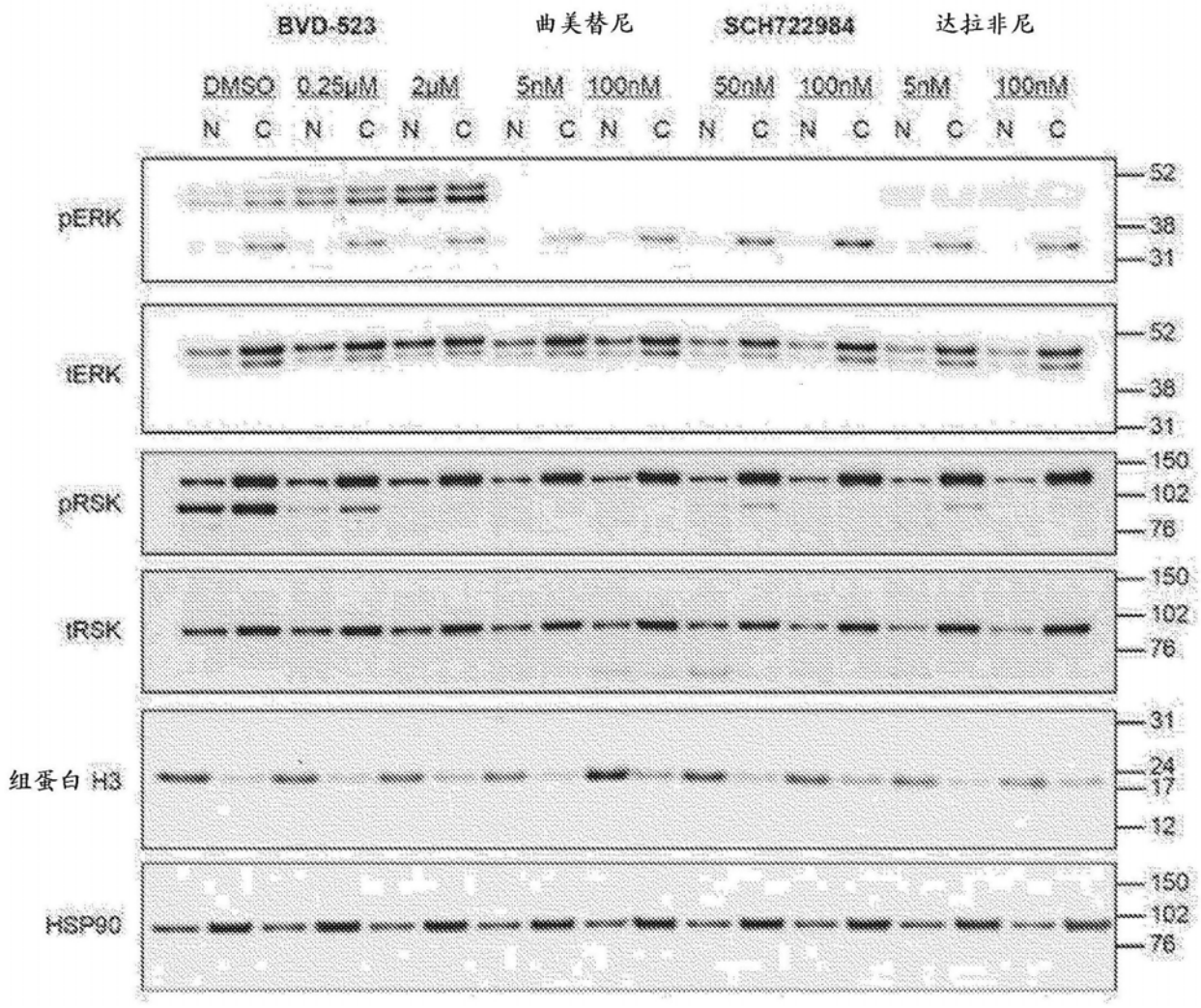

BVD-523
曲美替尼
SCH722984
达拉非尼
DMSO
0.25μM
2μM
5nM
100nM
50nM
100nM
5nM
100nM
N C N C N C N C N C N C N C N C N C
pERK
tERK
pRSK
tRSK
组蛋白 H3
HSP90
52
38
31
150
102
76
24
17
12

图32C

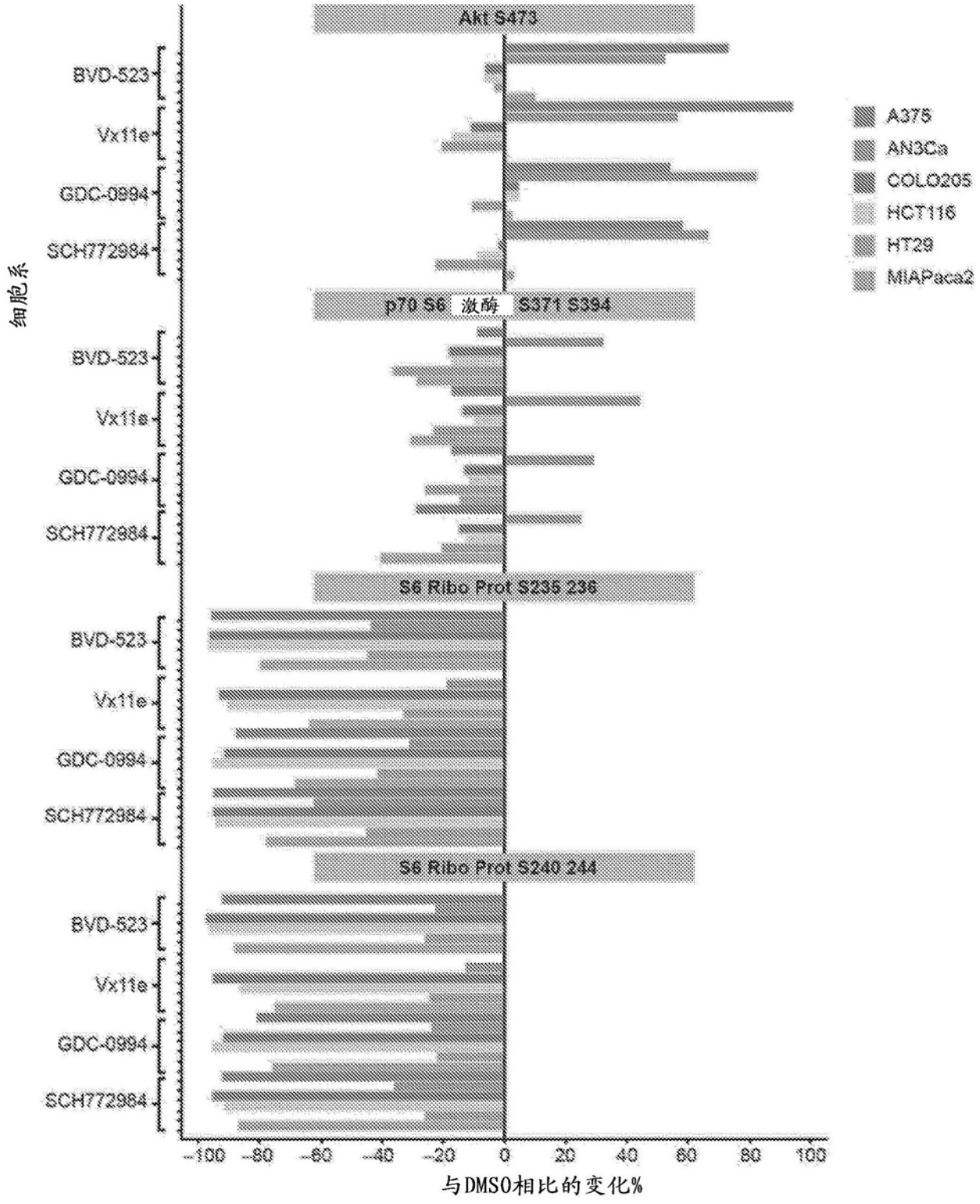

Akt S473
p70 S6 激酶 S371 S394
S6 Ribo Prot S235 236
S6 Ribo Prot S240 244
BVD-523
Vx11e
GDC-0994
SCH772984
细胞系
A375
AN3Ca
COLO205
HCT116
HT29
MIAPaca2
-100 -80 -60 -40 -20 0 20 40 60 80 100
与DMSO相比的变化%

图33

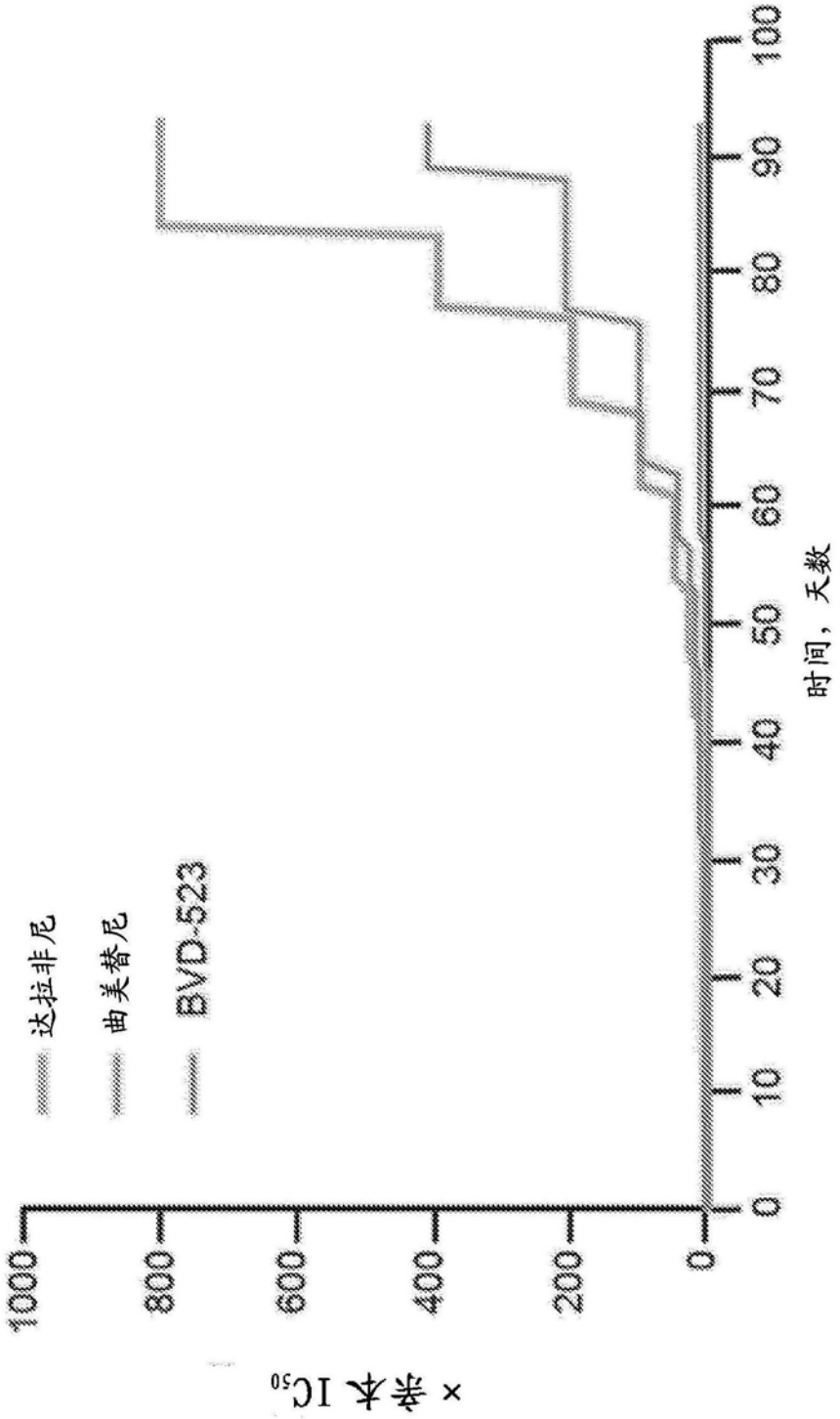

达拉非尼
曲美替尼
BVD-523
× 亲本 IC_{50}
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
时间，天数

图34A

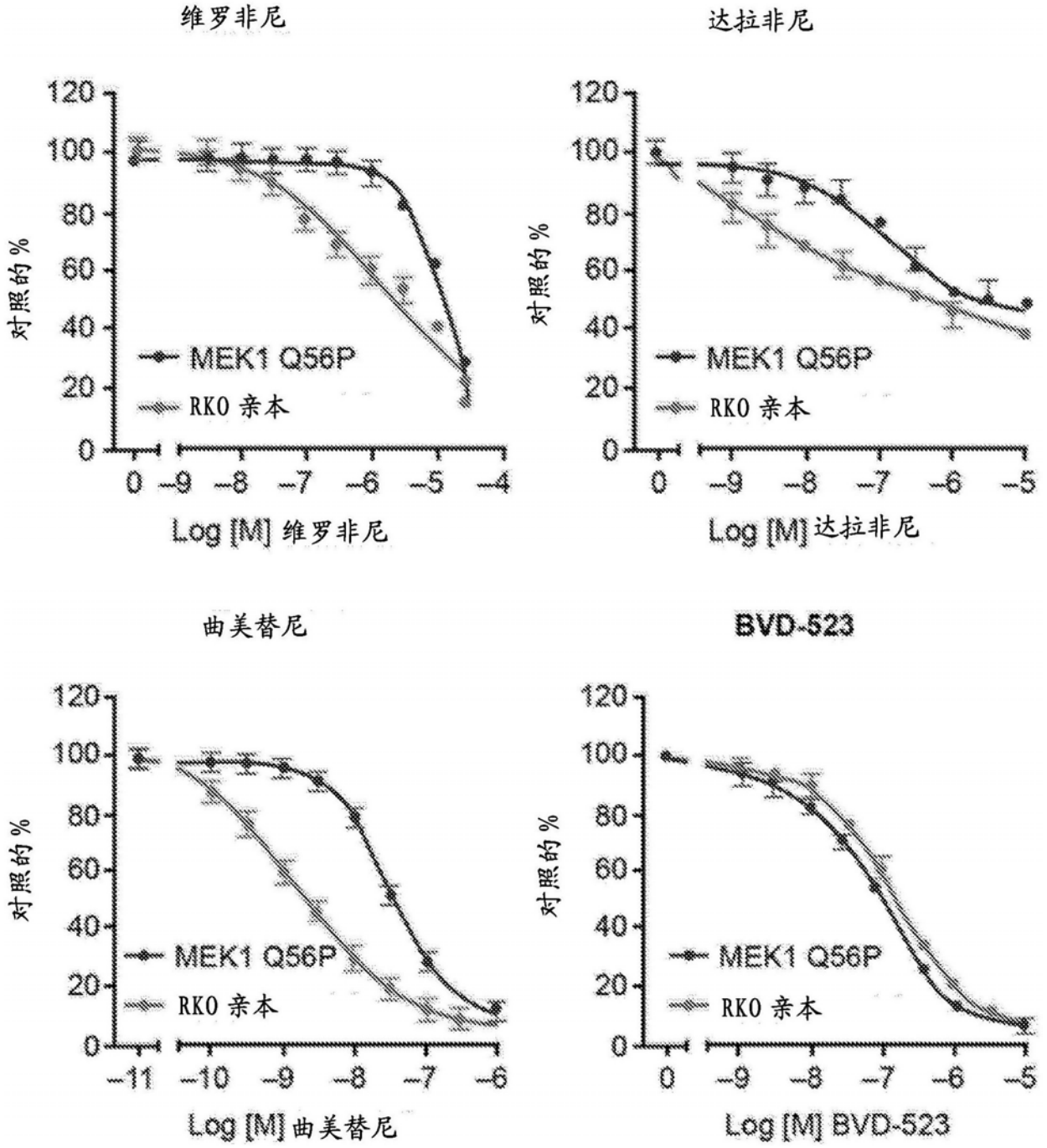

维罗非尼
对照的 %
MEK1 Q56P
RKO 亲本
Log [M] 维罗非尼
达拉非尼
对照的 %
MEK1 Q56P
RKO 亲本
Log [M] 达拉非尼
曲美替尼
对照的 %
MEK1 Q56P
RKO 亲本
Log [M] 曲美替尼
BVD-523
对照的 %
MEK1 Q56P
RKO 亲本
Log [M] BVD-523

图34B

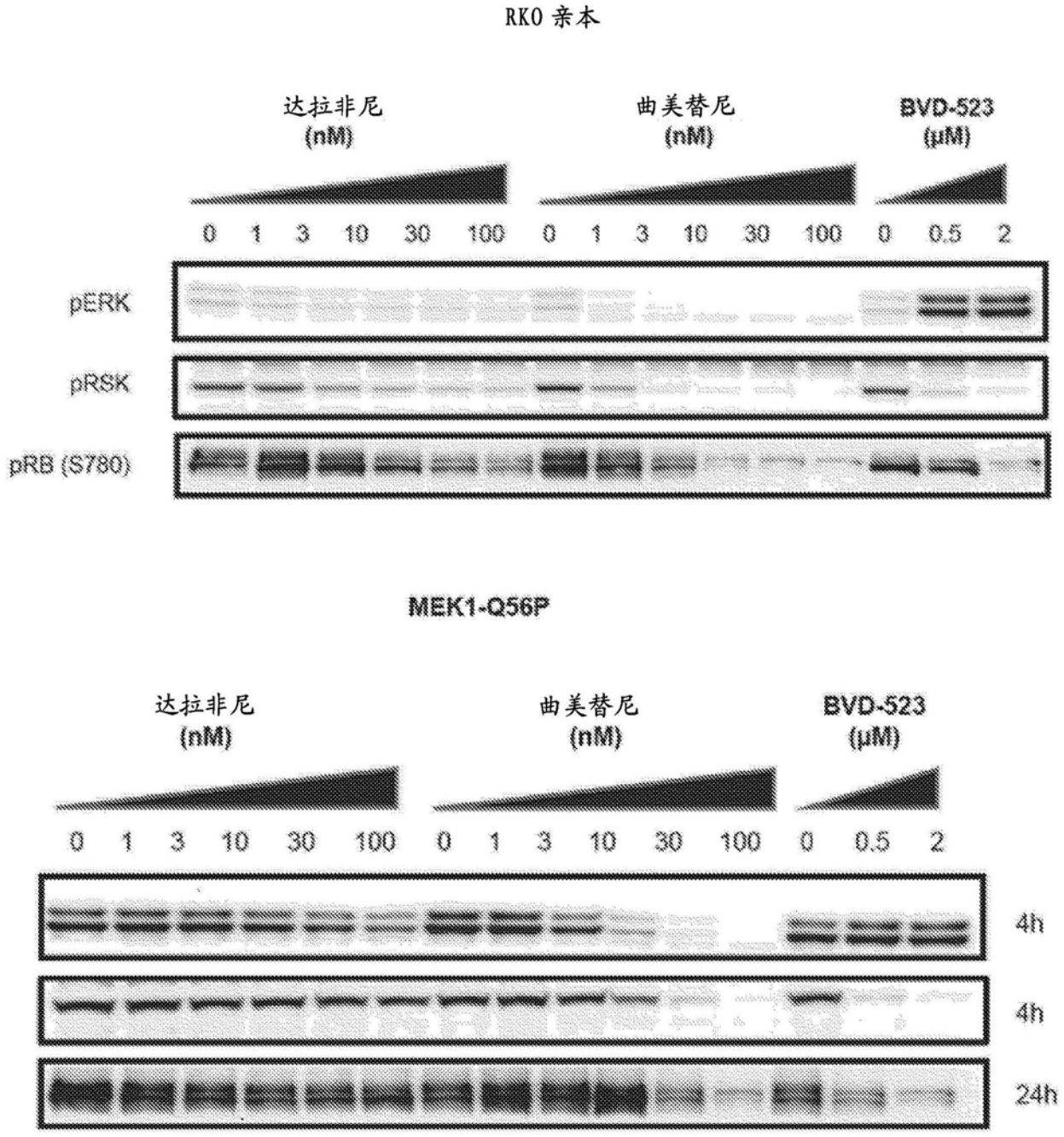

RKO 亲本
达拉非尼
(nM)
曲美替尼
(nM)
BVD-523
(μM)
0 1 3 10 30 100 0 1 3 10 30 100 0 0.5 2
pERK
pRSK
pRB (S780)
MEK1-Q56P
达拉非尼
(nM)
曲美替尼
(nM)
BVD-523
(μM)
0 1 3 10 30 100 0 1 3 10 30 100 0 0.5 2
4h
4h
24h

图34C

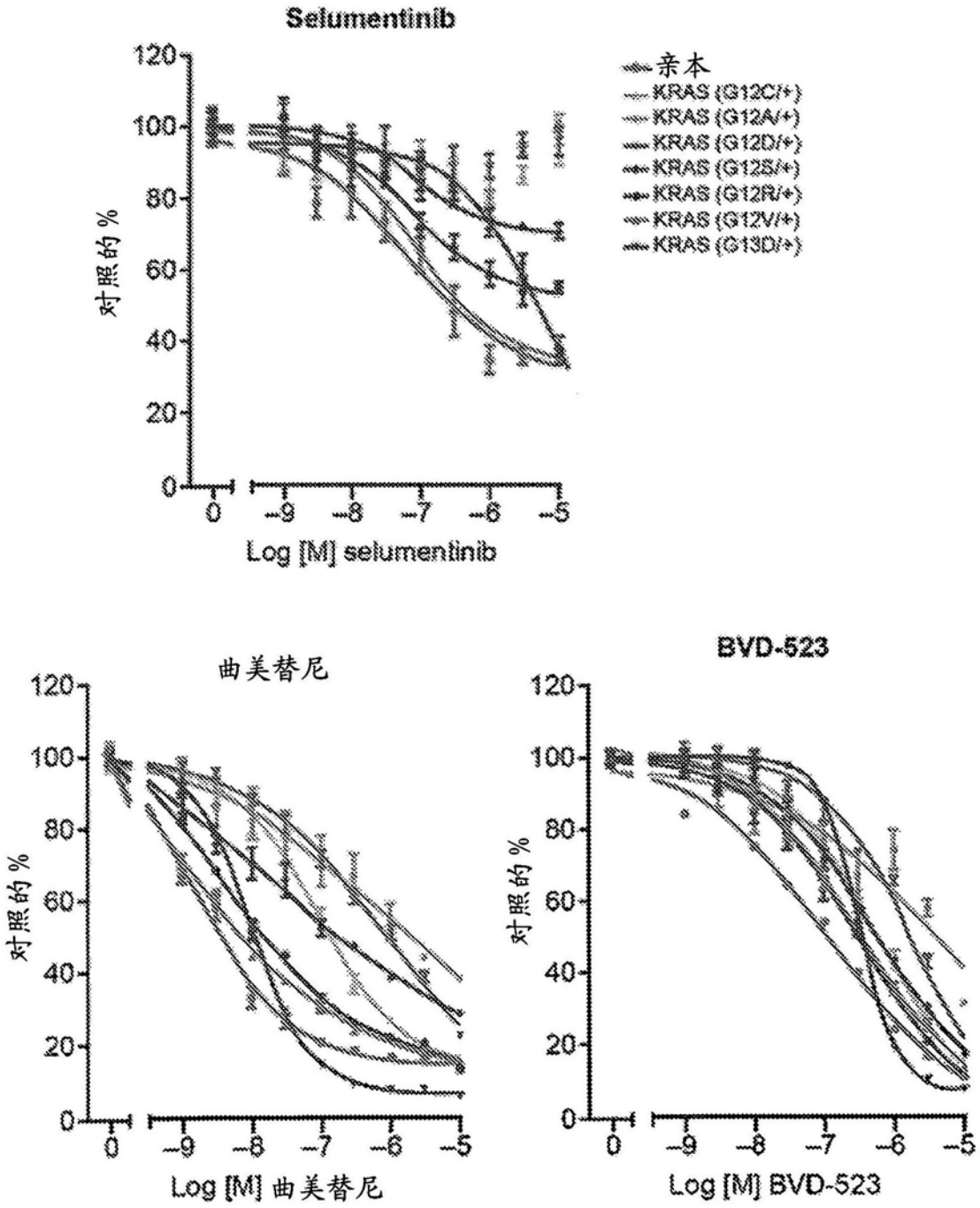

Selumentinib
亲本
KRAS (G12C/+)
KRAS (G12A/+)
KRAS (G12D/+)
KRAS (G12S/+)
KRAS (G12R/+)
KRAS (G12V/+)
KRAS (G13D/+)
对照的 %
Log [M] selumentinib
曲美替尼
Log [M] 曲美替尼
BVD-523
Log [M] BVD-523

图34D

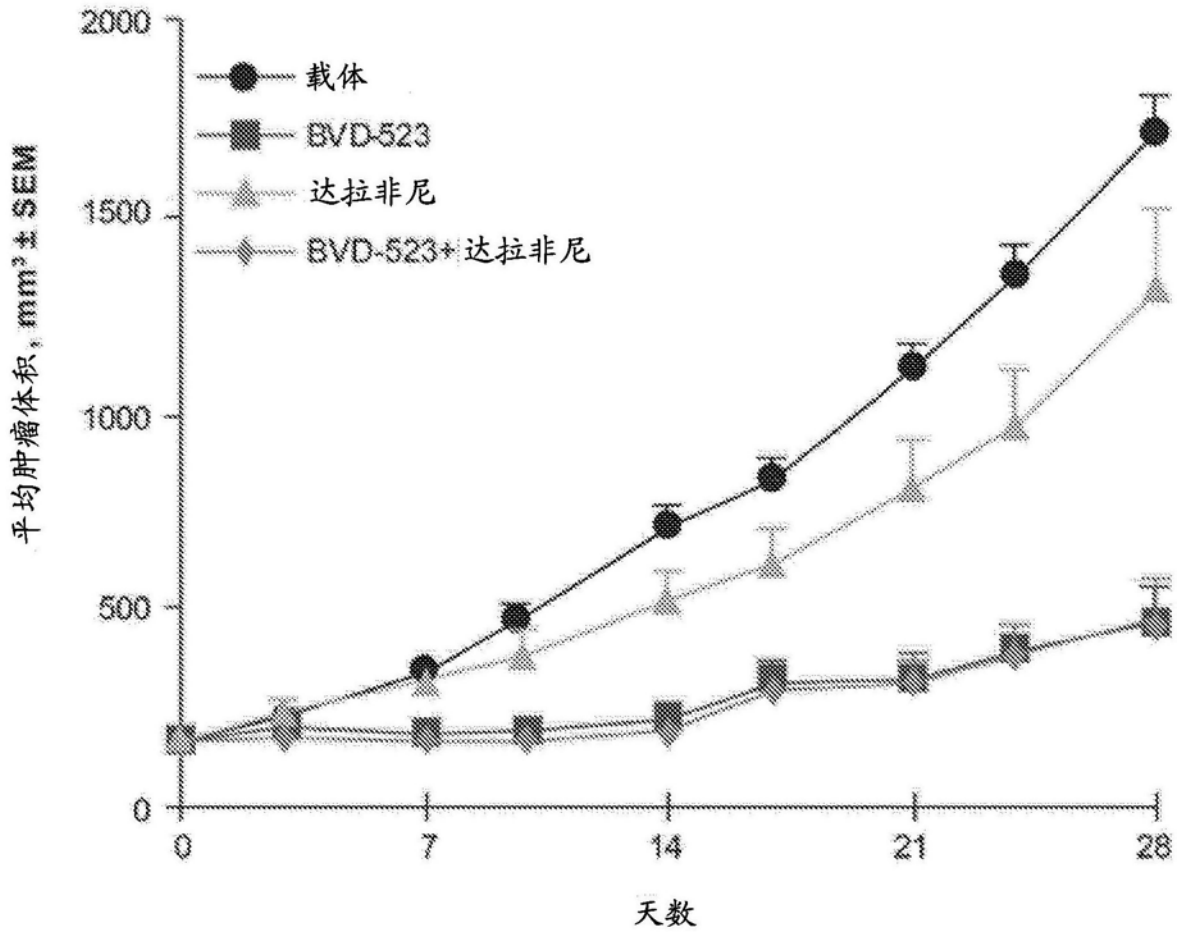

2000
1500
1000
500
0
载体
BVD-523
达拉非尼
BVD-523+达拉非尼
平均肿瘤体积，mm³±SEM
0
7
14
21
28
天数

图35A

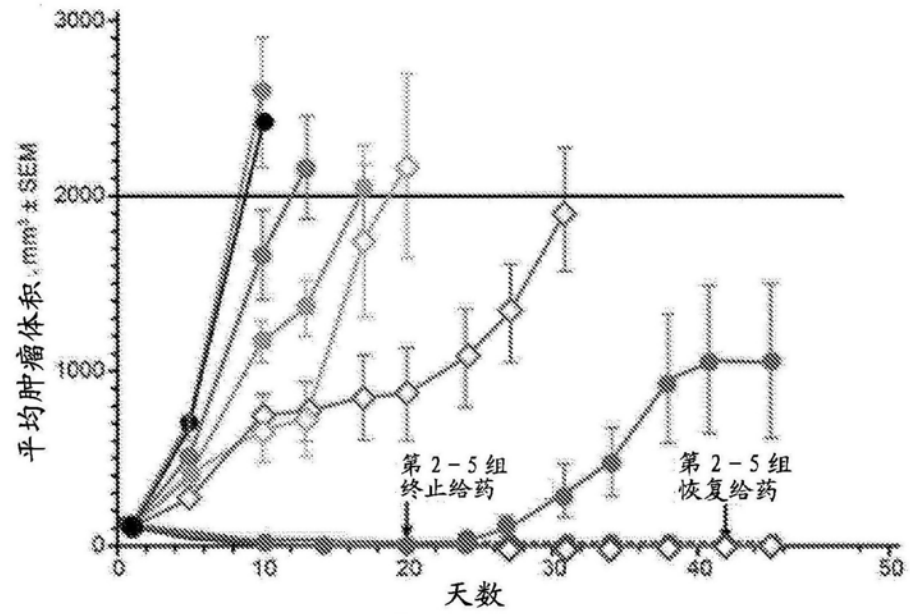
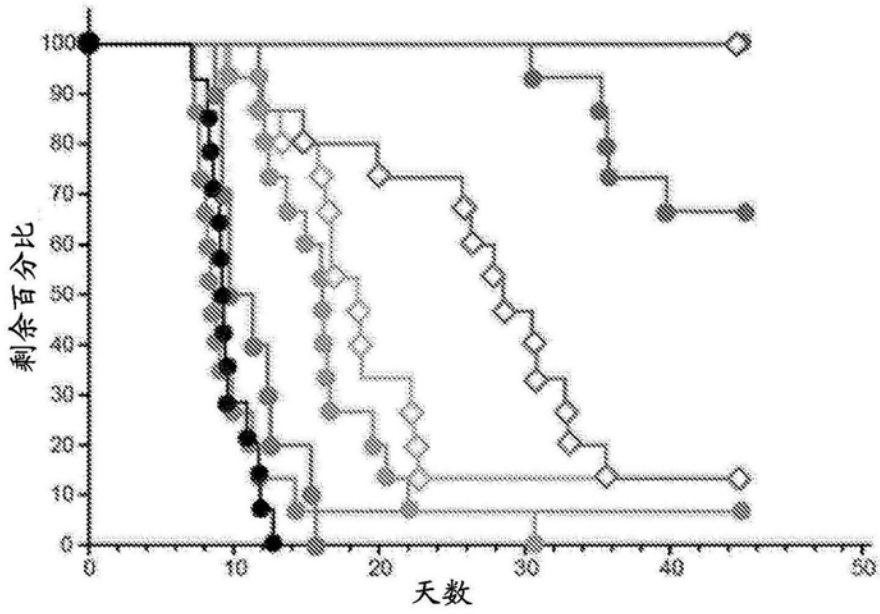


图 36A



G1: 载体; QD 至结束
G2: 达拉非尼, 50 mg/kg + BVD-523, 50 mg/kg
G3: 达拉非尼, 50 mg/kg + BVD-523, 100 mg/kg
G4: 达拉非尼, 100 mg/kg + BVD-523, 50 mg/kg
G5: 达拉非尼, 100 mg/kg + BVD-523, 100 mg/kg
G6: 达拉非尼, 50 mg/kg 口服; QD 至结束
G7: 达拉非尼, 100 mg/kg 口服; QD 至结束
G8: BVD-523, 50 mg/kg 口服; BID 至结束
G9: BVD-523, 100 mg/kg 口服; BID 至结束
G10: 替莫唑胺 , 150 mg/kg 口服; QD x 5

图 36B

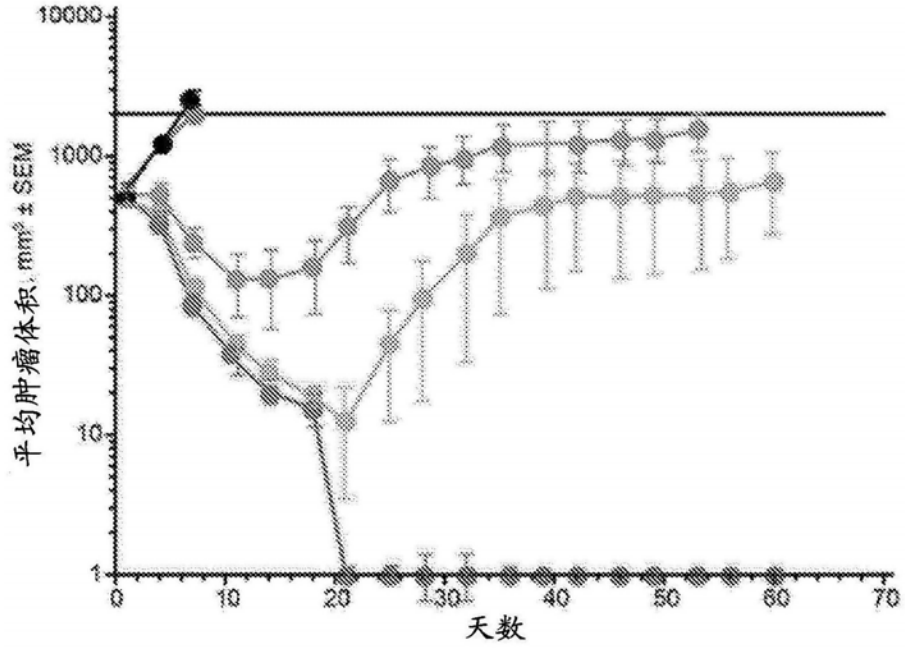

10000
1000
100
10
1
平均肿瘤体积, mm³ ± SEM
0
10
20
30
40
50
60
70
天数

图 36C

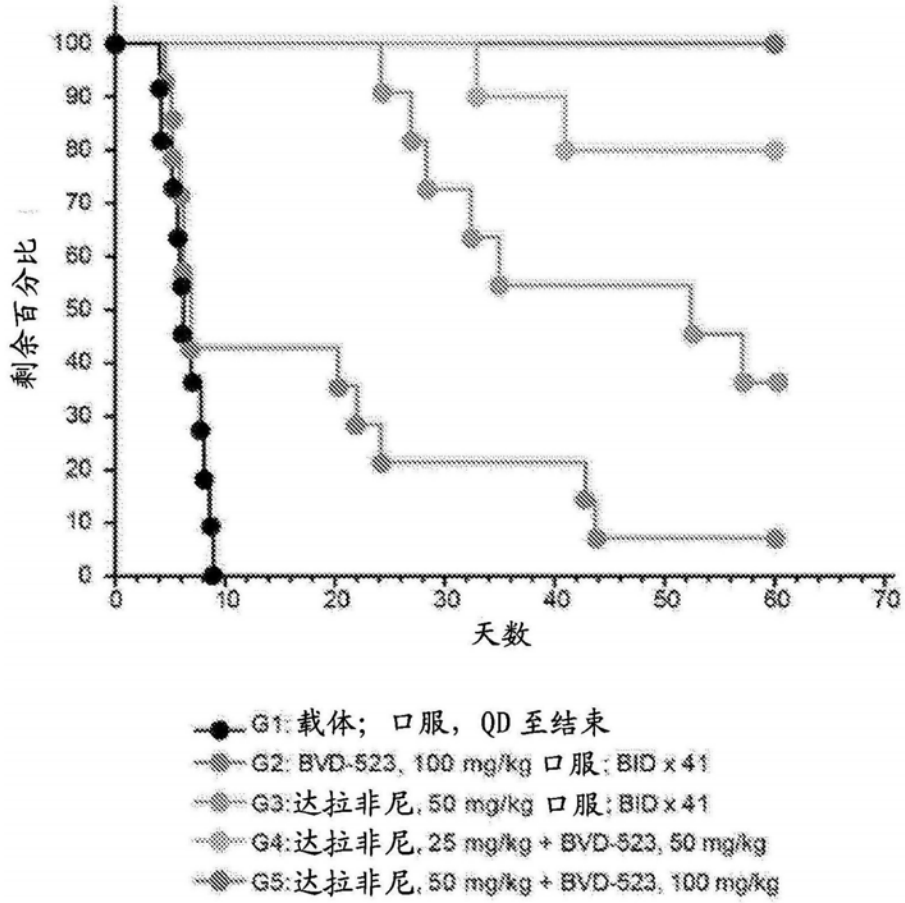

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
剩余百分比
0
10
20
30
40
50
60
70
天数
G1: 载体; 口服, QD 至结束
G2: BVD-523, 100 mg/kg 口服; BID x 41
G3: 达拉非尼, 50 mg/kg 口服; BID x 41
G4: 达拉非尼, 25 mg/kg + BVD-523, 50 mg/kg
G5: 达拉非尼, 50 mg/kg + BVD-523, 100 mg/kg

图 36D

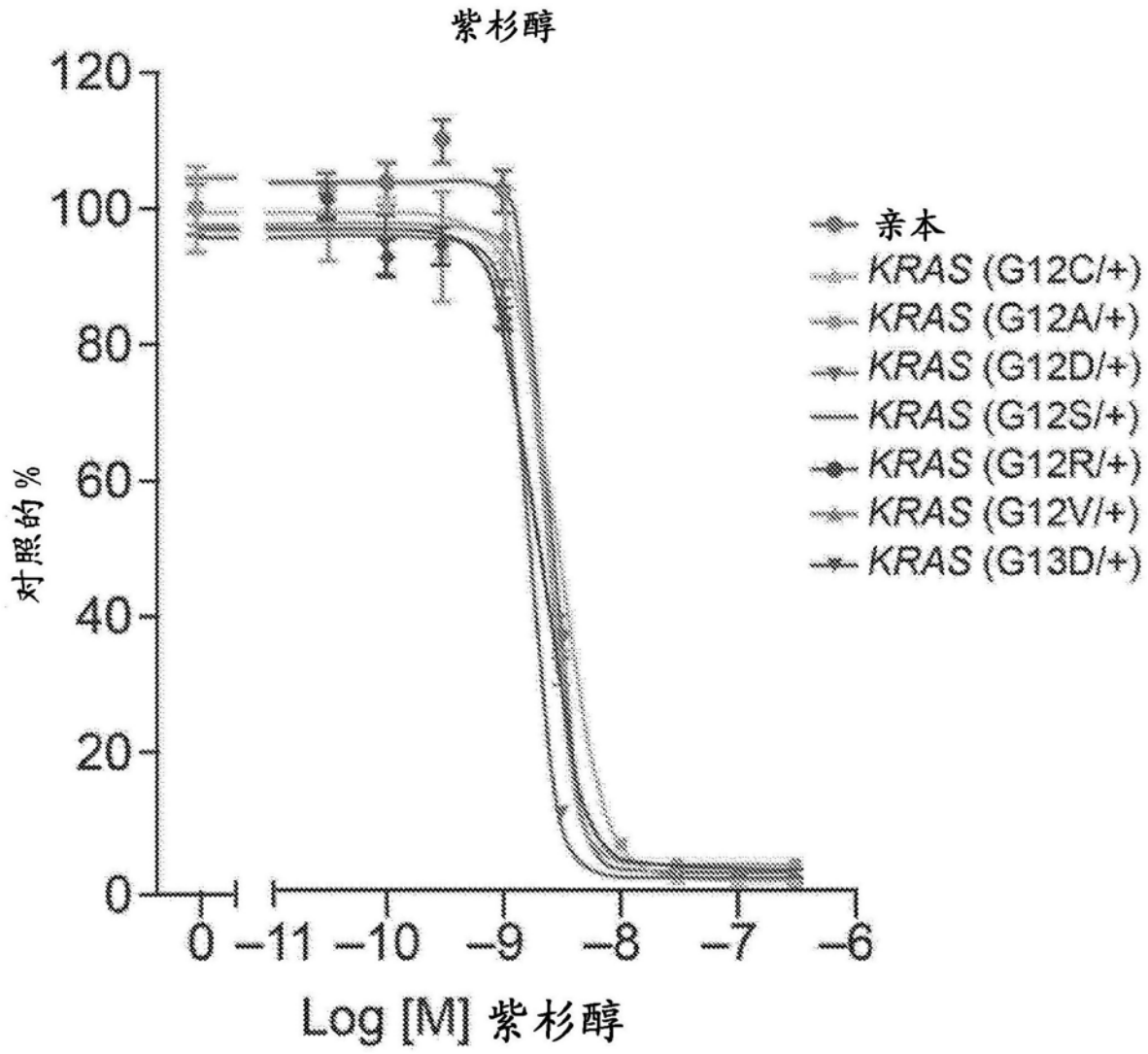

紫杉醇
120
100
80
60
40
20
0
对照的 %
0 −11 −10 −9 −8 −7 −6
Log [M] 紫杉醇
亲本
KRAS (G12C/+)
KRAS (G12A/+)
KRAS (G12D/+)
KRAS (G12S/+)
KRAS (G12R/+)
KRAS (G12V/+)
KRAS (G13D/+)

图37A

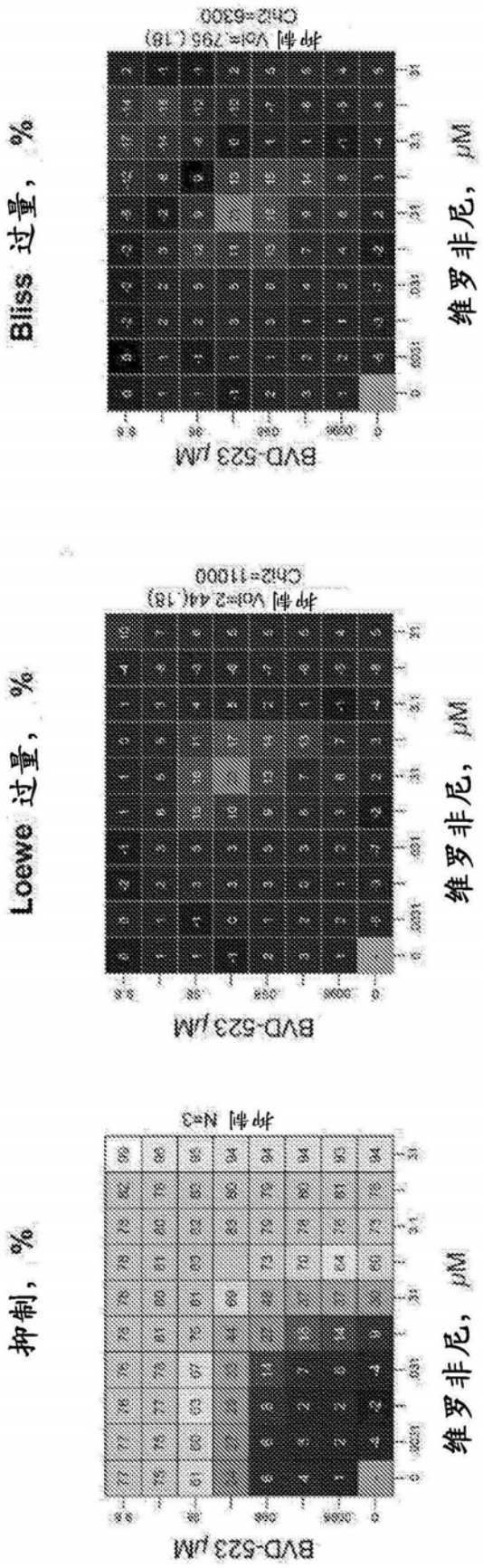

Bliss 过量，%
Loewe 过量，%
抑制，%
BVD-523 μM
维罗非尼，μM
抑制 Vol=795(18)
Ch2=6300
抑制 Vol=244(18)
Ch2=11000
抑制 N=3

图37B

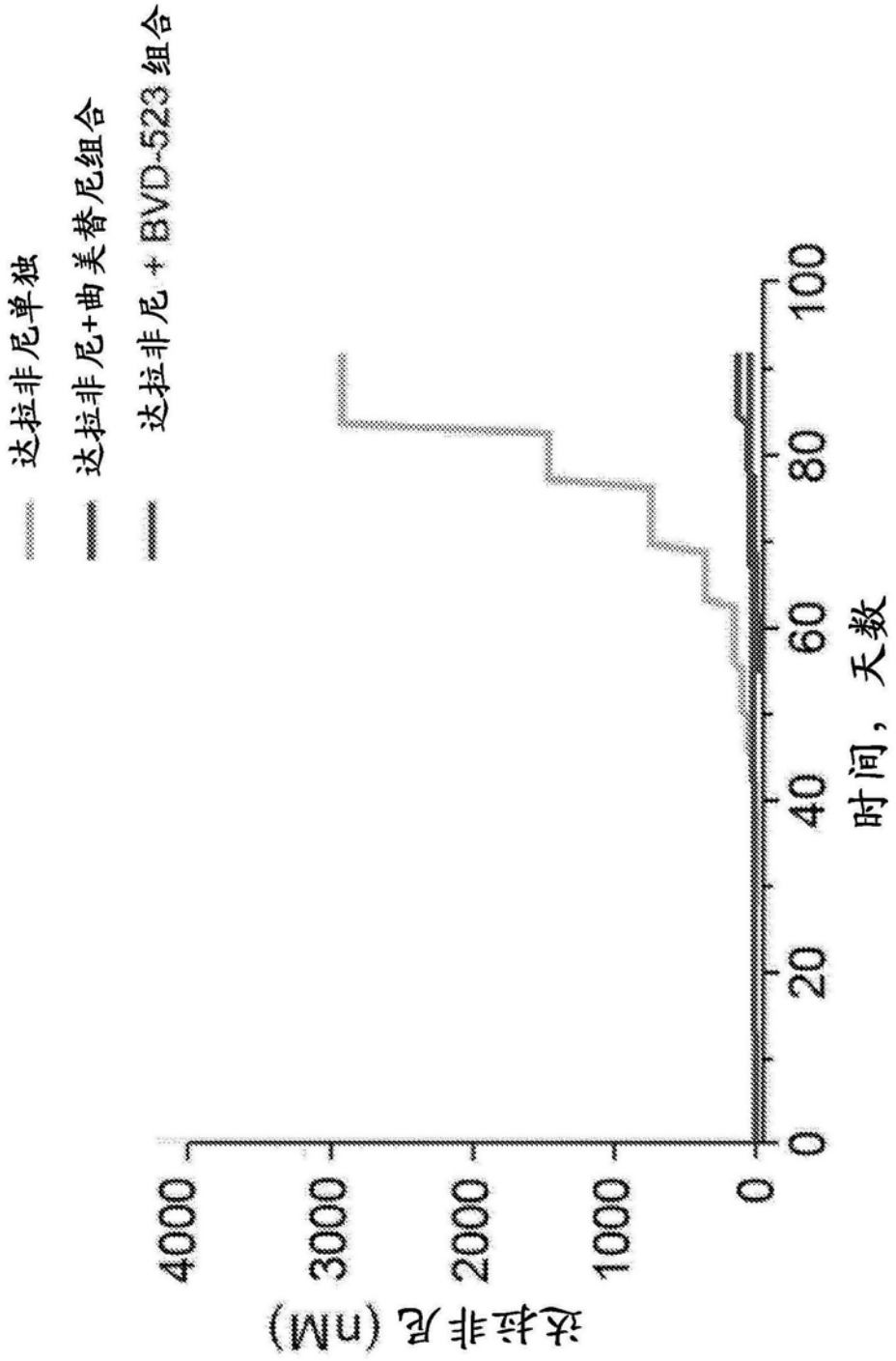

达拉非尼单独
达拉非尼+曲美替尼组合
达拉非尼 + BVD-523 组合
达拉非尼 (nM)
4000
3000
2000
1000
0
0
20
40
60
80
100
时间，天数

图37C

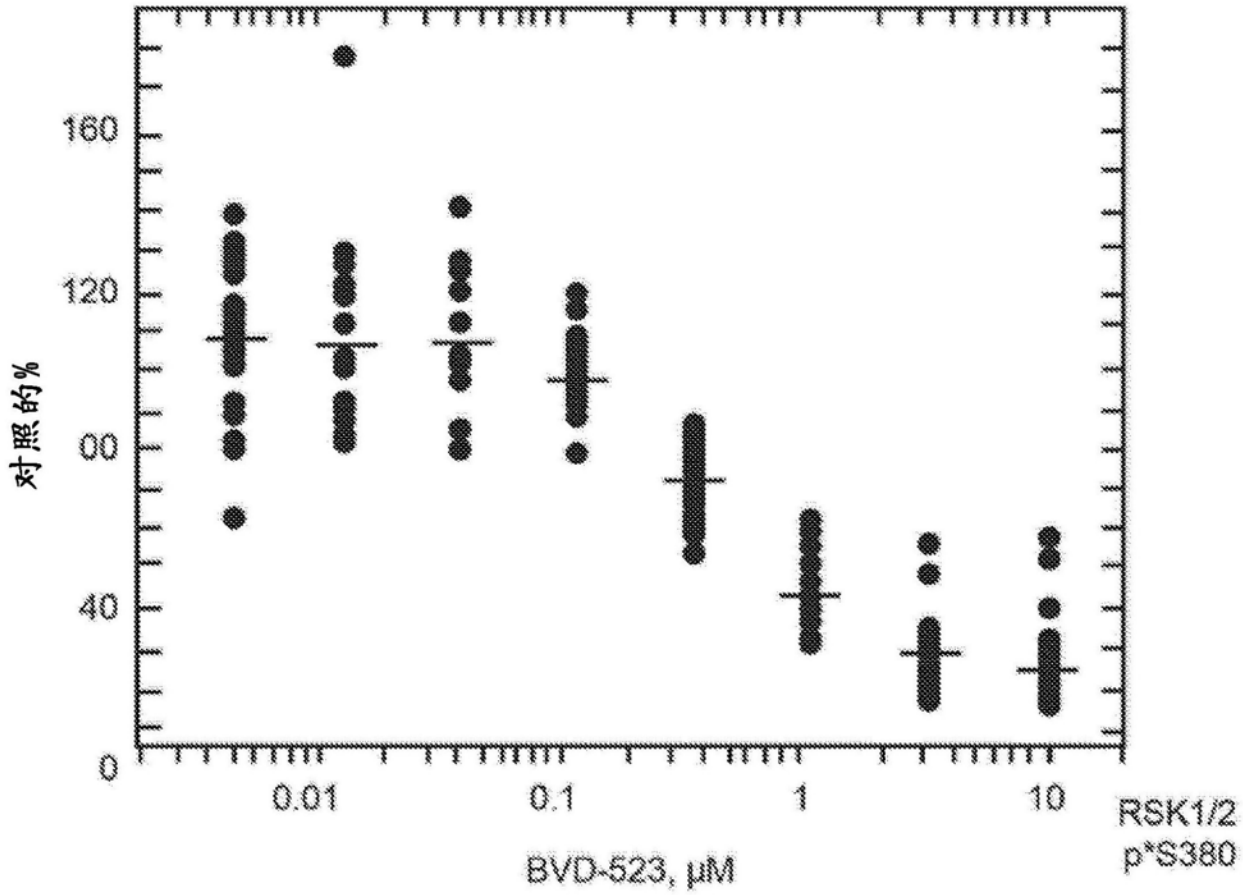


图38

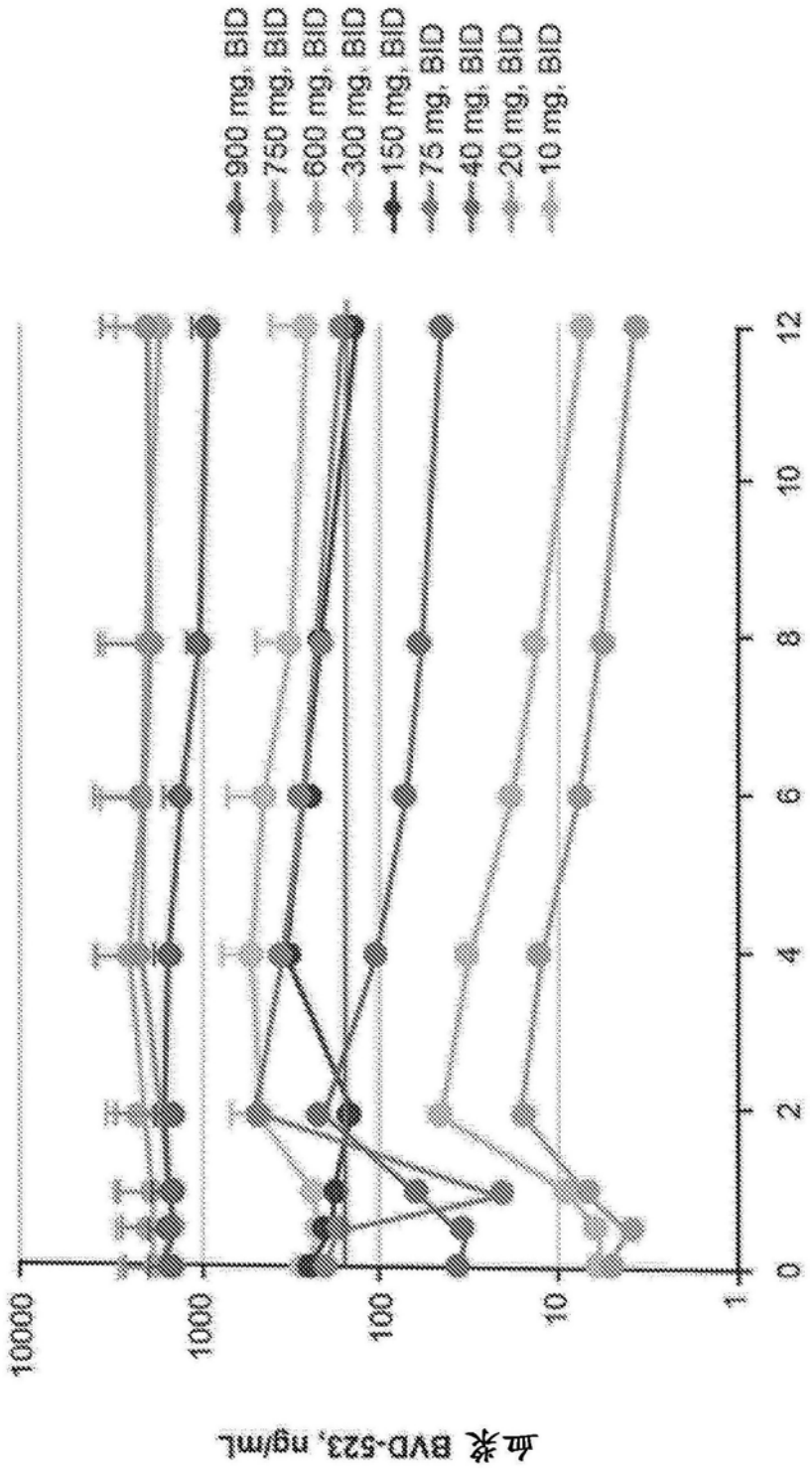

900 mg, BID
750 mg, BID
600 mg, BID
300 mg, BID
150 mg, BID
75 mg, BID
40 mg, BID
20 mg, BID
10 mg, BID
血浆 BVD-523, ng/mL
10000
1000
100
10
1
0
2
4
6
8
10
12

图39A

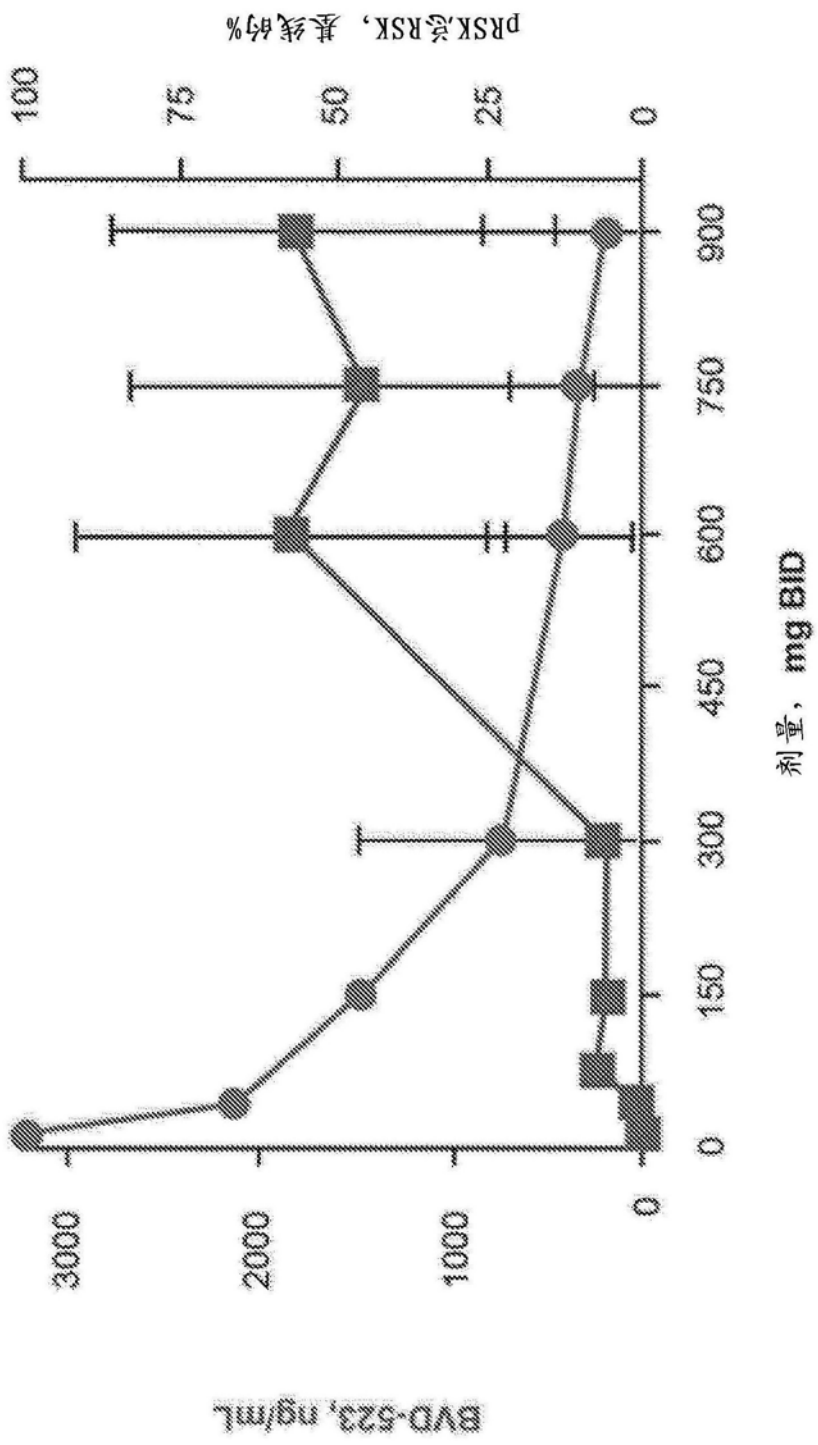

pRSK总RSK，基线的%
100
75
50
25
0
900
750
600
450
300
150
0
剂量，mg BID
0
1000
2000
3000
BVD-523，ng/mL

图39B

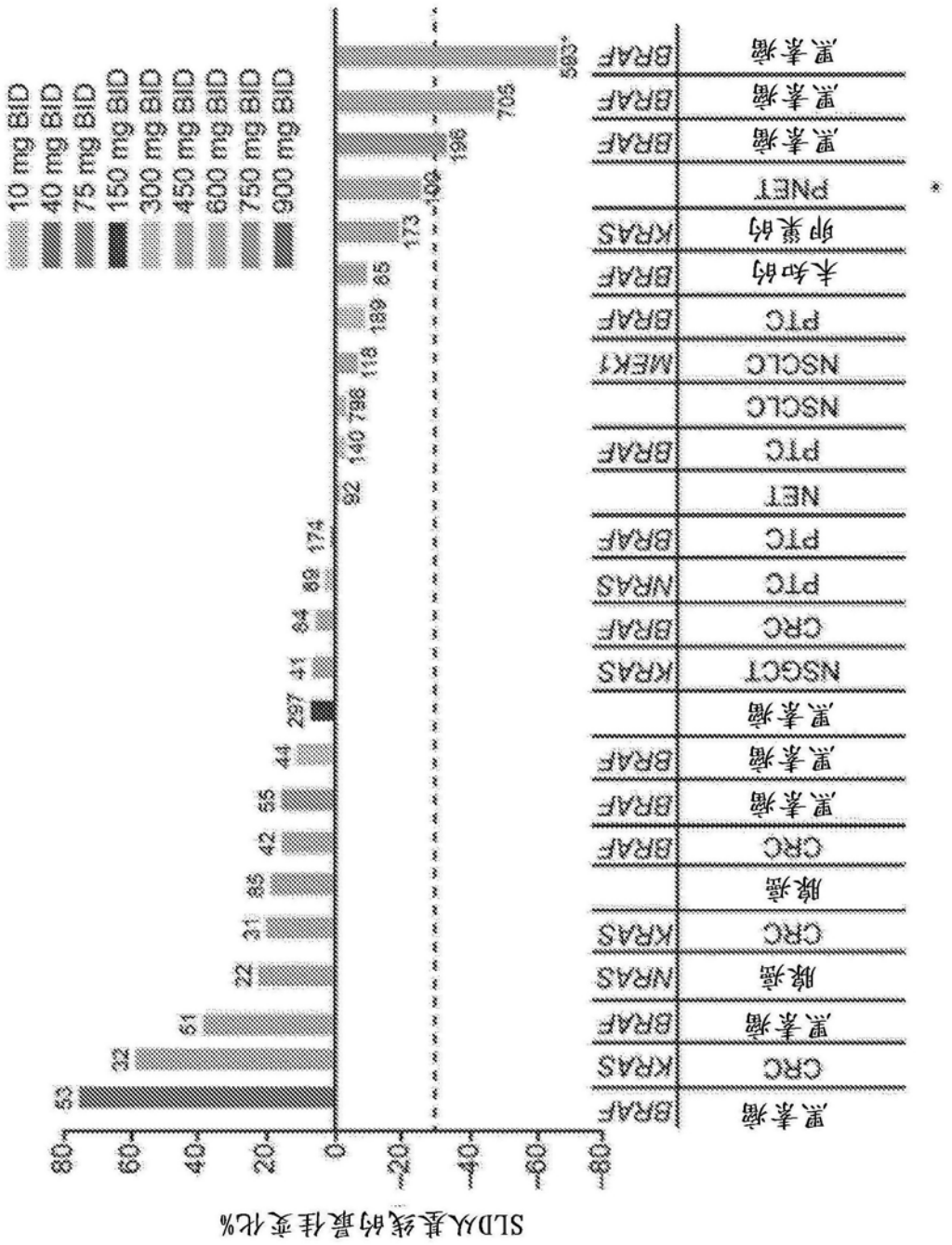

10 mg BID
40 mg BID
75 mg BID
150 mg BID
300 mg BID
450 mg BID
600 mg BID
750 mg BID
900 mg BID
SLD从基线的最佳变化%
80
60
40
20
0
20
40
60
80
53
32
61
22
31
35
42
55
44
227
41
64
89
174
92
140
736
118
189
85
173
134
196
729
583
黑素瘤 BRAF
CRC KRAS
黑素瘤 BRAF
腺癌 NRAS
CRC KRAS
腺癌
CRC BRAF
黑素瘤 BRAF
黑素瘤 BRAF
NSCLC KRAS
黑素瘤
PTC NRAS
PTC BRAF
NET
PTC BRAF
NSCLC
NSCLC MEK1
PTC BRAF
未知的 BRAF
卵巢的 KRAS
PNET
黑素瘤 BRAF
黑素瘤 BRAF
黑素瘤 BRAF
*

图40A

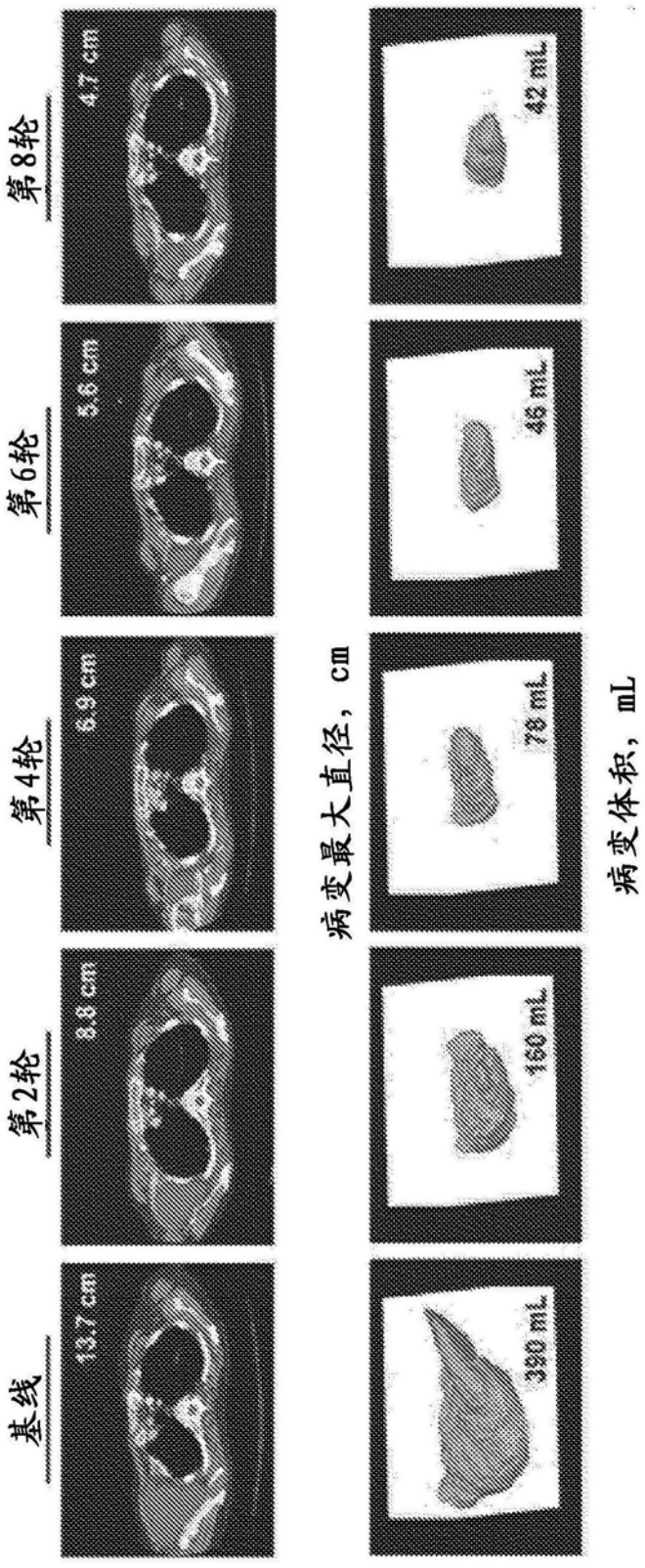

基线
第2轮
第4轮
第6轮
第8轮
13.7 cm
8.8 cm
6.9 cm
5.6 cm
4.7 cm
390 mL
160 mL
78 mL
46 mL
42 mL
病变最大直径，cm
病变体积，mL

图40B

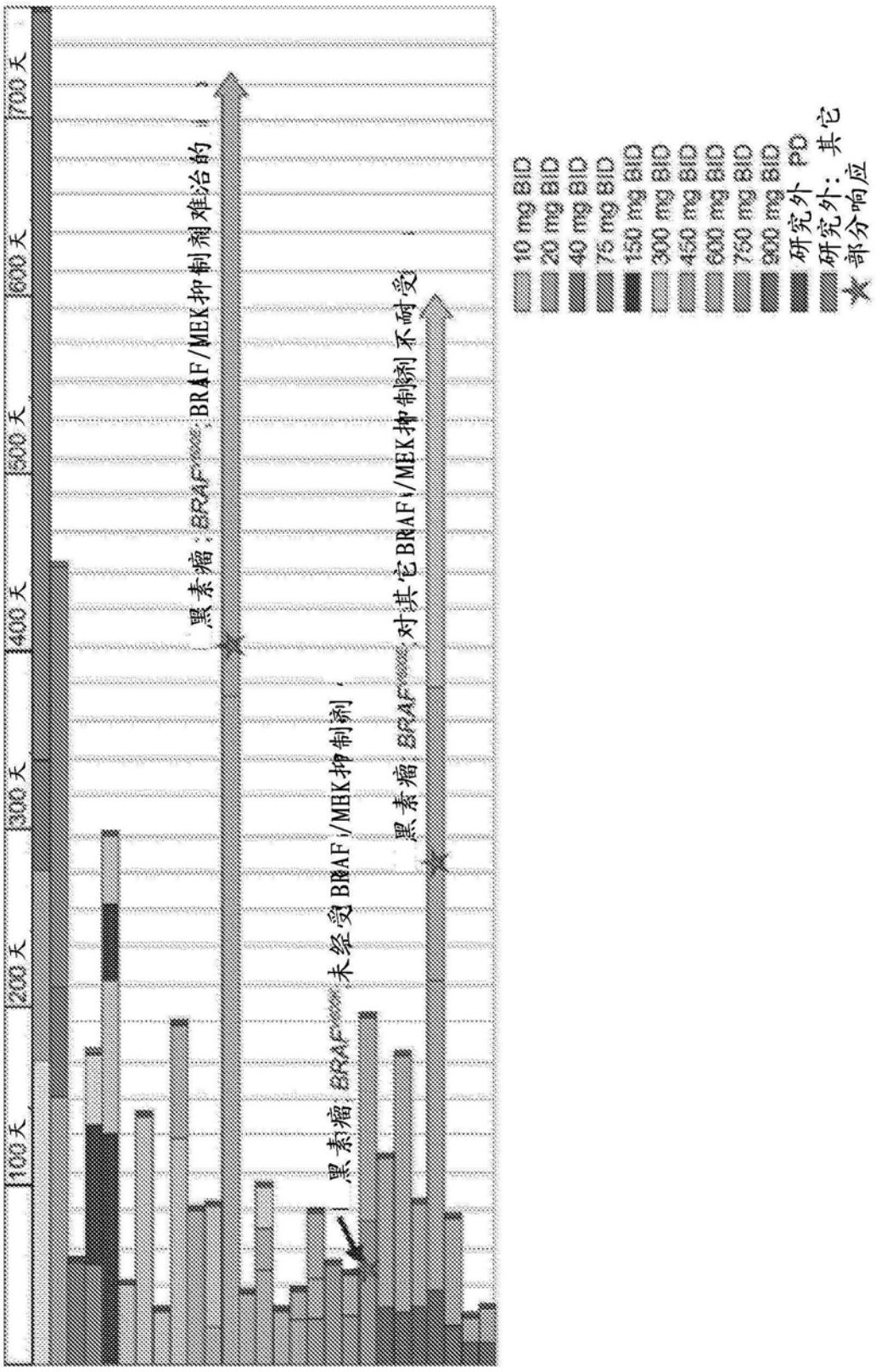

100 天
200 天
300 天
400 天
500 天
600 天
700 天
黑素瘤; BRAF V600E; 未经受 BRAFi/MEK抑制剂
黑素瘤; BRAF V600E; BRAF/MEK抑制剂难治的
黑素瘤; BRAF V600E; 对其它BRAFi/MEK抑制剂 不耐受
10 mg BID
20 mg BID
40 mg BID
75 mg BID
150 mg BID
300 mg BID
450 mg BID
600 mg BID
750 mg BID
900 mg BID
研究外 PD
研究外：其它
* 部分响应

图41