



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109562163 B

(45) 授权公告日 2022. 04. 08

(21) 申请号 201780015519.9

(72) 发明人 N·张 Z·安 A·K·苏德

(22) 申请日 2017.02.06

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109562163 A

代理人 张小勇

(43) 申请公布日 2019.04.02

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/291,987 2016.02.05 US

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.06

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/22 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/016659 2017.02.06

(56) 对比文件

WO 2014150720 A1, 2014.09.25

(87) PCT国际申请的公布数据

US 2013129735 A1, 2013.05.23

W02017/136807 EN 2017.08.10

US 2012014958 A1, 2012.01.19

(73) 专利权人 得克萨斯大学体系董事会
地址 美国得克萨斯

审查员 马艳林

权利要求书2页 说明书41页

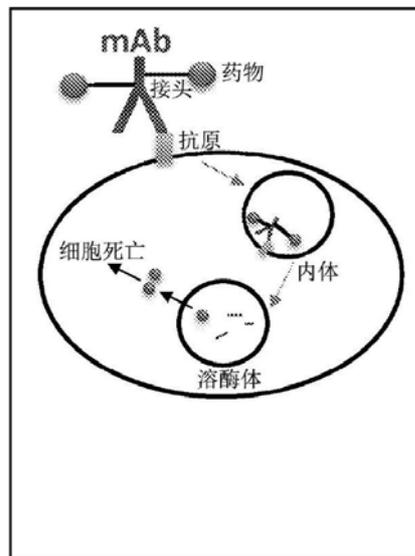
序列表50页 附图28页

(54) 发明名称

EGFL6特异性单克隆抗体及其使用方法

(57) 摘要

提供了分离或重组抗EGFL6单克隆抗体。在一些情况下,实施方式的抗体可以用于检测、诊断和/或治疗人类疾病,诸如癌症。



1. 一种分离单克隆抗体,其中,所述抗体特异性结合至EGFL6并包括:
 - (a) 第一V_H CDR与SEQ ID NO:64相同;
 - (b) 第二V_H CDR与SEQ ID NO:65相同;
 - (c) 第三V_H CDR与SEQ ID NO:66相同;
 - (d) 第一V_L CDR与SEQ ID NO:126相同;
 - (e) 第二V_L CDR与SEQ ID NO:127相同;并且
 - (f) 第三V_L CDR与SEQ ID NO:128相同。
2. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述抗体包括:

与E2-135的V_H结构域或E2-135 mAB的人源化V_H结构域至少约80%相同的V_H结构域;以及
与E2-135的V_L结构域或E2-135 mAB的人源化V_L结构域至少约80%相同的V_L结构域。
3. 根据权利要求2所述的抗体,其中,所述抗体包括与E2-135的V_H结构域相同的V_H结构域以及
与E2-135的V_L结构域相同的V_L结构域。
4. 根据权利要求2所述的抗体,其中,所述抗体是E2-135抗体。
5. 根据权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是重组的。
6. 根据权利要求1所述的抗体,其中,所述抗体是IgG、IgM、IgA或其抗原结合片段。
7. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、
单价scFv、二价scFv或单结构域抗体。
8. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中,所述抗体是人源、人源化或去免疫抗体。
9. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体,其中,所述抗体与显像剂、化学治疗剂、毒素或放射性核素缀合。
10. 根据权利要求9所述的抗体,其中,所述抗体与毒素缀合。
11. 根据权利要求10所述的抗体,其中,所述毒素为澳瑞他汀。
12. 根据权利要求10所述的抗体,其中,所述毒素为单甲基澳瑞他汀E(MMAE)。
13. 一种组合物,包括在药学上可接受载体中的根据权利要求1至4中任一项所述的抗体。
14. 一种分离多核苷酸分子,包括编码根据权利要求1至4中任一项所述的抗体的核酸序列。
15. 一种重组多肽,包括抗体V_H结构域和抗体V_L结构域,所述抗体V_H结构域包括E2-135的V_H结构域的CDR 1-3即SEQ ID NO:64、65和66,所述抗体V_L结构域包括E2-135的V_L结构域的CDR 1-3即SEQ ID NO:126、127和128。
16. 一种分离多核苷酸分子,包括编码根据权利要求15所述的多肽的核酸序列。
17. 一种宿主细胞,包括编码根据权利要求1至4中任一项所述的抗体或根据权利要求15所述的重组多肽的一种或多种多核苷酸分子。
18. 根据权利要求17所述的宿主细胞,其中,所述宿主细胞为哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、纤毛虫细胞或昆虫细胞。
19. 一种制备抗体的方法,包括:
 - (a) 在细胞中表达编码根据权利要求1至4中任一项所述的抗体的V_L链和V_H链的一种或多种多核苷酸分子;以及

(b) 纯化来自所述细胞的抗体。

20. 根据权利要求1至4中任一项所述的抗体在制备用于治疗患有癌症的受试者的药物中的用途,其中向所述受试者施用所述抗体。

21. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述癌症是乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食道癌、气管癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。

22. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述癌症是上皮癌。

23. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述癌症是大肠腺癌、乳腺癌、肝细胞癌、卵巢癌、肾透明细胞癌、肺癌或肾癌。

24. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述癌症是肺腺癌。

25. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述癌症是肺鳞状细胞癌。

26. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述抗体在药学可接受的组合物中。

27. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述抗体全身给药。

28. 根据权利要求20所述的用途,其中,所述抗体经静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹腔内、皮下或局部给药。

29. 根据权利要求20所述的用途,其中还向所述受试者施用至少第二抗癌疗法。

30. 根据权利要求29所述的用途,其中,所述第二抗癌疗法为手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

31. 根据权利要求1至4或9中任一项所述的抗体在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于检测受试者的癌症的方法,其中所述方法包括测试来自所述受试者的样本中存在EGFL6相对于对照的升高,其中,所述测试包括将所述样本与根据权利要求1至4或9中任一项所述的抗体接触。

32. 根据权利要求31所述的用途,其中所述方法还限定为体外方法。

EGFL6特异性单克隆抗体及其使用方法

技术领域

[0001] 本申请要求2016年2月5日提交的美国临时专利申请No 62/291,987 的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

背景技术

[0002] 1.发明领域

[0003] 本发明大体上涉及癌症生物学领域。更具体地,其涉及用于治疗 and 检测癌症的EGFL6靶向单克隆抗体。

[0004] 2.相关技术描述

[0005] 人表皮生长因子(EGF)样结构域多样6(EGFL6)首次在肿瘤和胚胎组织中发现,是EGF重复超家族的成员之一。EGFL6被确定为分泌蛋白,具有四又二分之一个EGF样重复结构域、两个N-连接糖基化位点、一个整合素结合基序(RGD)、酪氨酸磷酸化位点和MAM结构域(Yeung等人,1999年)。研究表明,EGFL6的高表达与某些癌症类型诸如卵巢癌和肺癌中的肿瘤组织相关联,而健康成人组织中发现的表达有限(Buckanovich等人,2007年;Chim等人,2011年;以及Oberauer等人,2010年)。然而,仍然需要治疗EGFL6阳性癌症的试剂和治疗剂。

发明内容

[0006] 本文描述了与EGFL6结合的EGFL6单克隆抗体。在其他方面,提供的EGFL6结合抗体减少EGFL6信号传导,并可以用于抑制癌细胞增生。因此,在第一实施方式中,提供了一种与EGFL6特异性结合的分离或重组单克隆抗体。在某些方面,提供了与E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142单克隆抗体竞争结合EGFL6的抗体。在某些方面,抗体可以包括E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142单克隆抗体的全部或部分重链可变区和/或轻链可变区。在另一方面,抗体可以包括与本实施方式的E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142单克隆抗体的轻可变链和/或重可变链的第一、第二和/或第三互补性决定区(CDR)对应的氨基酸序列。

[0007] 在某些方面,分离抗体包括与E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142重链和轻链氨基酸序列的CDR区至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的CDR序列。在其他方面,抗体包括与E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142CDR区相同的CDR区,除了在一个或多个CDR中的一个或多个氨基酸的取代、缺失或插入。例如,抗体可以包括下述CDR,其中CDR序列相对于E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142单克隆抗体的CDR在V_H CDR1、V_H CDR2、V_H CDR3、V_L CDR1、V_L CDR2和/或V_L CDR3中的1处或2处氨基酸取代。因此,在一些特定方面,实施方式的抗体包括:(a)与E1-33的V_H CDR1(SEQ ID NO:4)、E1-34的V_H

CDR1 (SEQ ID NO:10)、E1-80 的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:16)、E1-89的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:22)、E2-93 的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:28)、E1-38的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:34)、E1-52 的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:40)、E2-36的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:46)、E1-95 的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:52)、E2-116的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:58)、E2-135 的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:64)或E1-142的 V_H CDR1 (SEQ ID NO:70) 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%相同的第一 V_H CDR; (b) 与E1-33的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:5)、E1-34的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:11)、E1-80的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:17)、E1-89的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:23)、E2-93的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:29)、E1-38的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:35)、E1-52的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:41)、E2-36的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:47)、E1-95的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:53)、E2-116的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:59)、E2-135的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:65) 或E1-142的 V_H CDR2 (SEQ ID NO:71) 至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第二 V_H CDR; (c) 与E1-33的 V_H CDR3 (SEQ ID NO:6)、E1-34的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 12)、E1-80的 V_H CDR3 (SEQ ID NO:18)、E1-89的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 24)、E2-93的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 30)、E1-38的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 36)、E1-52的 V_H CDR3 (SEQ ID NO:42)、E2-36的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 48)、E1-95的 V_H CDR3 (SEQ ID NO:54)、E2-116的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 60)、E2-135的 V_H CDR3 (SEQ ID NO:66)或E1-142的 V_H CDR3 (SEQ ID NO: 72) 至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第三 V_H CDR; (d) 与E1-33的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:76)、E1-34的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:82)、E1-80的 V_L CDR1 (SEQ ID NO: 88)、E1-89的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:93)、E2-93的 V_L CDR1 (SEQ ID NO: 99)、E1-38的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:104)、E1-52的 V_L CDR1 (SEQ ID NO: 108)、E2-36的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:113)、E1-95的 V_L CDR1 (SEQ ID NO: 117)、E2-116的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:121)、E2-135的 V_L CDR1 (SEQ ID NO: 126)或E1-142的 V_L CDR1 (SEQ ID NO:131) 至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一 V_L CDR; (e) 与E1-33的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:77)、E1-34的 V_L CDR2 (SEQ ID NO: 83)、E1-80的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:77)、E1-89的 V_L CDR2 (SEQ ID NO: 94)、E2-93的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:100)、E1-38的 V_L CDR2 (SEQ ID NO: 100)、E1-52的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:77)、E2-36的 V_L CDR2 (SEQ ID NO: 83)、E1-95的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:83)、E2-116的 V_L CDR2 (SEQ ID NO: 100)、E2-135的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:127)或E1-142的 V_L CDR2 (SEQ ID NO:100) 至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第二 V_L CDR; 以及(f) 与E1-33的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:78)、E1-34的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:84)、E1-80的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:89)、E1-89的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:95)、E2-93的 V_L CDR3 (SEQ ID NO: 101)、E1-38的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:105)、E1-52的 V_L CDR3 (SEQ ID NO: 109)、E2-36的 V_L CDR3 (SEQ ID NO: 114)、E1-95的 V_L CDR3 (SEQ ID NO: 118)、E2-116的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:122)、E2-135的 V_L CDR3 (SEQ ID NO: 128)或E1-142的 V_L CDR3 (SEQ ID NO:132) 至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第三 V_L CDR。在某些方面,这种抗体是包括人类IgG (例如IgG1、IgG2、IgG4或遗传修饰IgG) 骨架上的前述CDR的人源化抗体或去免疫抗体。

[0008] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-33的对应CDR序列至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或100%相同的第一 V_H 、第二 V_H 、

第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:4、5、6、76、77和78表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-33的CDR序列相同的CDR序列。

[0009] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-33的V_H结构域(SEQ ID NO:157)或E1-33mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E1-33的V_L结构域(SEQ ID NO:158)或E1-33mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-33 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-33mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-33mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-33mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-33的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0010] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-34的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:10、11、12、82、83和84表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-34的CDR序列相同的CDR序列。

[0011] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-34的V_H结构域(SEQ ID NO:159)或E1-34mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E1-34的V_L结构域(SEQ ID NO:160)或E1-34mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-34 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-34mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-34mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-34mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-34的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0012] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-80的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:16、17、18、88、77和89表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-80的CDR序列相同的CDR序列。

[0013] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-80的V_H结构域(SEQ ID NO:161)或E1-80mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E1-80的V_L结构域(SEQ ID NO:162)或E1-80mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-80 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-80mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-80mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-80mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-80的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0014] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-89的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、

第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:22、23、24、93、94和95表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-89的CDR序列相同的CDR序列。

[0015] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-89的V_H结构域(SEQ ID NO:163)或E1-89mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及E1-89的V_L结构域(SEQ ID NO:164)或E1-89mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-89 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-89mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-89mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-89mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-89的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0016] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-93的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:28、29、30、99、100和101表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-93的CDR序列相同的CDR序列。

[0017] 在另一方面,分离抗体包括:与E2-93的V_H结构域(SEQ ID NO:165)或E2-93mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及E2-93的V_L结构域(SEQ ID NO:166)或E2-93mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E2-93 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E2-93mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E2-93mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E2-93mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实施例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E2-93的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0018] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-38的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:34、35、36、104、100和105表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-38的CDR序列相同的CDR序列。

[0019] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-38的V_H结构域(SEQ ID NO:167)或E1-38mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及E1-38的V_L结构域(SEQ ID NO:168)或E1-38mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-38 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-38mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-38mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-38mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-38的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0020] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-52的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、

第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:40、41、42、108、77和109表示。在 一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-52的CDR序列相同的CDR序列。

[0021] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-52的V_H结构域(SEQ ID NO:169) 或E1-52mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以 及与E1-52的V_L结构域(SEQ ID NO:170) 或E1-52mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-52 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-52mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源 化E1-52mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-52mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗 体E1-52的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0022] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-36的对应CDR序列至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:46、47、48、113、83和114表示。在 一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-36的CDR序列相同的CDR序列。

[0023] 在另一方面,分离抗体包括:与E2-36的V_H结构域(SEQ ID NO:171) 或E2-36mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以 及与E2-36的V_L结构域(SEQ ID NO:172) 或E2-36mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E2-36 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E2-36mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源 化E2-36mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E2-36mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗 体E2-36的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0024] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-95的对应CDR序列至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三 V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:52、53、54、117、83、119表示。在一 方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-95的CDR序列相同的CDR序列。

[0025] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-95的V_H结构域(SEQ ID NO:173) 或E1-95mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以 及与E1-95的V_L结构域(SEQ ID NO:174) 或E1-95mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-95 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-95mAB的 V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源 化E1-95mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-95mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗 体E1-95的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0026] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-116的对应CDR序列至 少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、

第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:58、59、60、121、100和122表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-116的CDR序列相同的CDR序列。

[0027] 在另一方面,分离抗体包括:与E2-116的V_H结构域(SEQ ID NO:175)或E2-116mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E2-116的V_L结构域(SEQ ID NO:176)或E2-116mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E2-116 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E2-116mAB的V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E2-116mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E2-116mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E2-116的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0028] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-135的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:64、65、66、126、127和128表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E2-135的CDR序列相同的CDR序列。

[0029] 在另一方面,分离抗体包括:与E2-135的V_H结构域(SEQ ID NO:177)或E2-135mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E2-135的V_L结构域(SEQ ID NO:178)或E2-135mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E2-135 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E2-135mAB的V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E2-135mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E2-135mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E2-135的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0030] 在其他方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-142的对应CDR序列至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的第一V_H、第二V_H、第三V_H、第一V_L、第二V_L、和第三V_L CDR序列,分别以SEQ ID NO:70、71、72、131、100和132表示。在一方面,分离抗体包括与单克隆抗体E1-142的CDR序列相同的CDR序列。

[0031] 在另一方面,分离抗体包括:与E1-142的V_H结构域(SEQ ID NO:179)或E1-142mAB的人源化V_H结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_H结构域;以及与E1-142的V_L结构域(SEQ ID NO:180)或E1-142mAB的人源化V_L结构域至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的V_L结构域。例如,抗体可以包括与人源化E1-142 mAB的V_H结构域至少95%相同的V_H结构域以及与人源化E1-142mAB的V_L结构域至少95%相同的V_L结构域。因此,在一些方面,抗体包括与人源化E1-142mAB的V_H结构域相同的V_H结构域以及与人源化E1-142mAB的V_L结构域相同的V_L结构域。在特定实例中,分离抗体可以包括与单克隆抗体E1-142的V_H结构域和V_L结构域相同的V_H结构域和V_L结构域。

[0032] 在一些方面,实施方式的抗体可以是IgG(例如,IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgM、IgA、遗传修饰IgG同种型或其抗原结合片段。抗体可以是Fab'、F(ab')₂、F(ab')₃、单价

scFv、二价scFv、双特异性或单结构域抗体。抗体可以是人抗体、人源化抗体或去免疫抗体。在另一方面,分离抗体是E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142抗体。

[0033] 在一些方面,抗体可以与显像剂、化疗剂、毒素或放射性核素缀合。在特定方面,抗体可以与澳瑞他汀(auristatin)或特别地单甲基澳瑞他汀E(MMAE)缀合。

[0034] 在一个实施方式中,提供了一种重组多肽,包括抗体 V_H 结构域,抗体 V_H 结构域包括:E1-33的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:4、5和6);E1-34的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:10、11和12);E1-80的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:16、17和18);E1-89的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:22、23和24);E2-93的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:28、29和30);E1-38的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:34、35和36);E1-52的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:40、41和42);E2-36的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:46、47和48);E1-95的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:52、53和54);E2-116的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:58、59和60);E2-135的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:64、65和66);或E1-142的 V_H 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:70、71和72)。在另一实施方式中,提供了一种重组多肽,包括抗体 V_L 结构域,抗体 V_L 结构域包括:E1-33的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:76、77和78);E1-34的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:82、83和84);E1-80的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:88、77和89);E1-89的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:93、94和95);E2-93的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:99、100和101);E1-38的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:104、100和105);E1-52的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:108、77和109);E2-36的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:113、83和114);E1-95的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:117、83和118);E2-116的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:121、100和122);E2-135的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:126、127和128);或E1-142的 V_L 结构域的CDR 1-3(SEQ ID NO:131、100和132)。

[0035] 在一些实施方式中,提供了一种包括编码抗体或多肽的核酸序列的分离多核苷酸分子,多肽包括本文公开的抗体 V_H 或 V_L 结构域。

[0036] 在其他实施方式中,提供了一种宿主细胞,该宿主细胞产生实施方式的单克隆抗体或重组多肽。在一些方面,宿主细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、纤毛虫细胞或昆虫细胞。在某些方面,宿主细胞是杂交瘤细胞。

[0037] 在另外的实施方式中,提供了一种制备本发明的抗体的方法,包括在细胞中表达编码本文公开的抗体的 V_L 或 V_H 链的一个或多个多核苷酸分子,并且从细胞纯化抗体。

[0038] 在其他实施方式中,提供了药用组合物,其包括本文讨论的抗体或抗体片段。这种组合物还包括药学可接受的载体,并且可以包含或不包含额外的活性成分。

[0039] 在本发明的实施方式中,提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法,包括给药有效量的本文公开的抗体。在某些方面,抗体是本文实施方式的单克隆抗体,诸如E1-33、E1-34、E1-80、E1-89、E2-93、E1-38、E1-52、E2-36、E1-95、E2-116、E2-135或E1-142抗体或包括从其中得到的抗体片段的重组多肽。

[0040] 在某些方面,癌症可以是乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食道癌、气管癌、脑癌、肝癌、膀胱癌、胃癌、胰腺癌、卵巢癌、子宫癌、宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。在特定方面,癌症是上皮癌。在其他方面,癌症可以是结直肠腺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、乳腺癌、肝细胞癌、卵巢癌、肾透明细胞癌、肺癌或肾癌。

[0041] 在一方面,抗体可以全身给药。在其他方面,抗体可以经静脉内、皮内、瘤内、肌内、腹腔内、皮下或局部给药。方法还可以包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。第二抗癌疗法的实例包括但不限于手术疗法、化学疗法、放射疗法、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法。

[0042] 在其他方面,方法还可以包括向受试者给药大于一次的本发明的组合,诸如例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20或更多次。

[0043] 在另一实施方式中,提供了一种用于检测受试者体中的癌症的方法,包括测试来自受试者样本中EGFL6相对于对照的升高,其中,测试包括将样本与本文公开的抗体接触。例如,方法可以是体内法或活体法。

[0044] 某些实施方式针对抗体或重组多肽组合物,该抗体或重组多肽组合物包括特异性结合EGFL6的分离和/或重组抗体或多肽。在某些方面,抗体或多肽具有与本文提供的任何单克隆抗体的全部或部分至少或至多80、85、90、95、96、97、98、99或100%相同(或可从其中得出的任何范围)。在还另外的方面,分离和/或重组抗体或多肽具有来自本文提供的任何序列或这样序列的组合中的10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100个或更多个连续氨基酸,具有来自本文提供的任何序列或这样序列的组合中的至少10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100个或更多个连续氨基酸,或具有来自本文提供的任何序列或这样序列的组合中的至多10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100个或更多个连续氨基酸。

[0045] 在另外的方面,实施方式的抗体或多肽包括本文公开的任何氨基酸序列的一个或多个氨基酸片段。例如,抗体或多肽可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个氨基酸片段,氨基酸片段在长度上包括约至少或至多5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25至25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199或200个氨基酸,包括其中的

所有值和范围,这些氨基酸与本文公开的任何氨基酸序列至少80、85、90、95、96、97、98、99或100%相同。在某些方面,氨基片段选自本文提供的 EGFL6结合抗体的氨基酸序列中的一个。

[0046] 在另外的方面,实施方式的抗体或多肽包括本文公开的任何氨基酸序列的氨基酸片段,其中,片段在本文提供的任何序列中氨基酸位置1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25至25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199或200处开始,并在同一提供的序列中氨基酸位置4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25至25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102、103、104、105、106、107、108、109、110、111、112、113、114、115、116、117、118、119、120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139、140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、150、151、152、153、154、155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170、171、172、173、174、175、176、177、178、179、180、181、182、183、184、185、186、187、188、189、190、191、192、193、194、195、196、197、198、199或200处结束。在某些方面,氨基片段或其部分选自本文提供的EGFL6结合抗体的氨基酸序列中的一个。

[0047] 在另外的方面,实施方式的抗体或多肽包括与EGFL6结合抗体的V、VJ、VDJ、D、DJ、J或CDR结构域(如表1和表2所提供的)至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或可从其中得出的任何范围)相同的氨基酸片段。例如,多肽可以包括与表1和表2中提供的EGFL6结合抗体的CDR 1、2和/或3至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%(或可从其中得出的任何范围)相同的1、2或3个氨基酸片段。

[0048] 在本发明的方法和/或组合物背景下讨论的实施方式可以应用于本文描述的任何其他方法或组合物。因此,关于一种方法或组合物的实施方式也可以应用于本发明的其他方法和组合物。

[0049] 本文说明书所用的“一(a)”或“一个(an)”可以指一个或多个。本文权利要求中所用的词语“一(a)”或“一个(an)”当与词语“包括”结合时可以指一个或多个。

[0050] 权利要求中使用术语“或”用于表示“和/或”,除非明确指明仅指替代物或替代物是相互排斥的,尽管本公开支持仅指替代物以及“和/或”的定义。本文所用“另一个”可以指至少第二或更多。

[0051] 本申请全文,术语“约”用于指示值包括设备的固有误差变化,用于确定该值的方法或研究受试者中存在的变化。

[0052] 根据下面的详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得显而易见。然而,应理解详细描述和具体实施例表示本发明的优选实施方式,仅以说明方式给出,因此对于本领域技术人员而言,根据详细描述,在本发明的精神和范围内的各种改动和修改将变得显而易见。

附图说明

[0053] 下面的附图构成本说明书的部分,列入这些附图是为了进一步对本发明的某些方面进行说明。参考这些附图中的一个或多个,接合本文给出的具体实施方式的详细描述,可以更好地理解本发明。本专利或申请文件包含至少一幅彩色附图。在收到要求并支付所需费用后,官方将提供本专利或专利申请公布连同彩色附图的副本。

[0054] 图1. 示出ADC(抗体-药物缀合物)的工作原理的示意图。在结合到其目标抗原时,MAb-抗原复合物内化为内体,然后内体与溶酶体融合,其中,MAb降解,药物释放。

[0055] 图2. 通过ELISA检测高结合EGFL6抗体。人类(左侧条)或小鼠(右侧条)EGFL6蛋白(义翘神州(Sino Biologicals))包被在96孔高结合板上在PBS中4°C下过夜。添加B细胞培养上清液(5 μ l培养基和95 μ l的PBS),用于结合包被在板上的EGFL6抗原。结合的抗体使用抗与HRP和TMB底物缀合的兔IgG的第二抗体检测。为了确认重复了2次实验。

[0056] 图3. 在ELISA中确定EGFL6抗体的结合亲和力。在ELISA中测定了一系列抗体浓度,并使用4参数拟合计算抗体的结合亲和力。实验重复3次,误差条指示标准偏差。

[0057] 图4A至图4D. 在与肿瘤相关的内皮细胞中的EGFL6上调,但正常卵巢和伤口愈合组织中的EGFL6不上调。A) 内皮细胞分离概要。B) 来自正常卵巢、愈合伤口组织的内皮细胞和卵巢肿瘤相关的内皮细胞的基因微阵列。C) EGFL6、CD31和VEGF在卵巢癌患者中的表达。D) 使用Q-RT PCR 验证基因微阵列数据。比例尺=100 μ m。

[0058] 图5A至图5H. EGFL6基因沉默没有破坏伤口愈合,但减少了A2780ip2 卵巢原位小鼠模型中的肿瘤负荷。A) EGFL6在小干扰对照(siControl)以及在siEGFL6处理的真皮内皮细胞中的表达;B) EGFL6沉默对体外伤口愈合的影响;C) 条形图表示伤口愈合面积;D) EGFL6沉默对伤口愈合的影响;E) 伤口体积;F) 肿瘤负荷的代表图像;G) 肿瘤重量;以及H) 肿瘤结节。

[0059] 图6A至图6K. TWIST1在缺氧情况下诱导EGFL6表达。A)、B) 在常氧和缺氧条件下进行的EGFL6启动子报告物分析。C) TWIST1提高EGFL6在缺氧情况下的表达。D) TWIST1与EGFL6的启动子区结合。E) 和F) TWIST1的异位表达提高RF24细胞中的EGFL6表达。G) 对TWIST1在缺氧情况下对比常氧情况下与EGFL6启动子区结合的ChIP分析。TWIST1与人类卵巢内皮细胞(RF24)中的EGFL6启动子结合的EGFL6和ChIP测定。来自用TWIST1处理的以及用EGFL6或IgG对照抗体进行免疫沉淀的RF24细胞的交联染色质。使用与EGFL6转录起始位点上游的碱基对对应的引物使输入和免疫沉淀DNA进行PCR。在溴化乙锭染色的琼脂糖胶上对PCR产物进行检查。H) 使用siRNA进行EGFL6基因沉默导致在缺氧情况下细胞死亡增多。I) 后肢缺血。经过动脉结扎后,将股动脉切除,并将小鼠分为3组(n=5):正常组,缺血24h组以及缺血96h组。在股动脉结扎前后使用连续激光多普勒监测血液流动。在每个时间

点,收获组织并进行冷冻,以进行免疫荧光。J)、K) EGFL6表达在缺血(缺氧)情况下相比于正常情况在内皮细胞中提高。

[0060] 图7A至图7K.用EGFL6处理内皮细胞激活了PI3激酶/AKT信号转导。A)对照和经EGFL6处理RF24细胞的RPPA分析。B)EGFL6介导的PI3激酶/AKT信号转导激活的蛋白质印迹。C)EGFL6介导的IGF-R、EGFR和Tie2受体激活的蛋白质印迹。D)Tie2抗体拉下(Pull-downed)整合素蛋白。E)细胞溶质和膜分级蛋白中的Tie2和AKT信号通路。F)经siITGB1和siTie2处理的RF24细胞中的Tie2和AKT信号通路。G)、H)使用特异性siRNA进行的整合素和Tie2沉默降低内皮细胞中EGFL6介导的小管形成(G)和迁移(H)。I)RGD阻断肽降低内皮细胞中整合素介导的信号通路J)、迁移K)和小管形成。

[0061] 图8A至图8G. EGFL6功能阻断抗体减少血管生成和肿瘤生长。A)线形图表示抗体结合亲和力。B)EGFL6阻断抗体对RF24细胞中Tie2/AKT活化的影响。对照、mAb93和mAb135工作浓度为10ug/ml。C)EGFL6阻断抗体对真皮内皮细胞的伤口愈合分析的影响。D)EGFL6阻断抗体对RF24细胞中小管形成的影响以及对E)小管迁移的影响。F)EGFL6阻断抗体对荷SKOV3ip1瘤小鼠肿瘤重量、肿瘤结节的影响。G)Ki67和CD31表达显示细胞增殖和血管密度。注射肿瘤细胞七天后,将小鼠随机分为三组(10只小鼠/组)接受处理:(1)对照Ab(5mg/kg), (2)EGFL6Ab 93(5mg/kg)以及(3)EGFL6Ab 135(5mg/kg)。每周给一次抗体。按本文实施例所述的收获肿瘤。按本文实施例所述的形成伤口并收获肿瘤。误差条指示SEM。*相对于对照Ab $P < 0.05$ 。

[0062] 图8H. EGFL6抗体抑制内皮细胞(RF24)的小管形成。相比于对照抗体,向细胞培养物(RF24)添加抗体(5ug/ml的浓度)。经过48小时处理后,计算96孔分析板中管的数量。图8H示出了每组的代表,条形图示出了经处理的每组的平均管数量。误差条指示标准误差,且 $n=3$ 。

[0063] 图9A至图9C. Tie2-cre的生成;EGFL6^{f/f}敲除小鼠。A) Tie2cre的生成;EGFL6敲除小鼠。B)同窝仔和EGFL6敲除小鼠的分离内皮细胞中的CD31表达。C)分离内皮细胞中的EGFL6表达。

[0064] 图9D至图9G. EGFL6基因沉默减少SKOV3ip1卵巢原位小鼠模型中的肿瘤负荷和血管生成。D)EGFL6在各卵巢肿瘤细胞中的表达。E)、F)内皮细胞(mEGFL6siRNA)或肿瘤(hEGFL6siRNA)靶向EGFL6siRNA对卵巢癌SKOV3ip1原位小鼠模型中的肿瘤重量和肿瘤结节的影响。注射肿瘤细胞七天后,将小鼠随机分为四组(10只小鼠/组)接受处理:(1)对照siRNA, (2)mEGFL6siRNA, (3)hEGFL6siRNA, (4)mEGFL6siRNA+hEGFL6siRNA。当对照组和处理组中的任何动物垂死时(经过3-4周的处理),将小鼠处死,并记录肿瘤重量(E)和肿瘤结节的数量(F)。误差条指示SEM。G)靶向EGFL6siRNA对增殖和微血管密度的影响。将收获的肿瘤染色以检测Ki67增殖和CD31。比例尺=50um。图中的条依次对应于左侧图像的标记栏。误差条指示SEM。

[0065] 图10A至图E. EGFL6调节肿瘤血管生成。A)分离了人类正常卵巢、卵巢肿瘤和愈合伤口组织,并处理分离的内皮细胞和样本,用于微阵列。B)VEGF在人类正常卵巢、伤口和卵巢肿瘤样本中的表达。C)、D)、E)对照siRNA和EGFL6siRNA处理的RF24细胞以及表征的小管形成和迁移。EGFL6免疫组织化学染色低和免疫组织化学染色高的人类卵巢癌脉管系统的代表图像。比例尺=200um。误差条指示SEM。*相对于对照siRNA $p < 0.05$ 。

[0066] 图11A至图B.在有伤口或无伤口情况下,用对照siRNA-CH或mEGFL6 siRNA-CH对动物进行处理。将收获的肿瘤染色以检测Ki67(增殖)和CD31(微血管)。误差条指示SEM。

[0067] 图12A至图12D.用EGFL6处理内皮细胞激活PI3K/AKT信号转导。A) RPPA分析的热图表示显示对照和EGFL6处理的RF24内皮细胞中的蛋白表达变化。B) RPPA分析的热图表示显示对照和EGFL6处理的RMG2 卵巢癌细胞中的蛋白表达变化。C)、D) 内皮细胞中PI3K抑制减少了EGFL6 介导的迁移和小管形成(下方子图)。

[0068] 说明性实施方式的描述

[0069] EGFL6是EGF重复超家族的成员,其参与伤口愈合。然而,在各种癌症细胞类型中发现EGFL6升高,诸如卵巢癌和肺癌。本文的研究证明了抑制EGFL6活性有效抑制肿瘤组织中的癌症细胞增殖和血管生成。此外,发现本文提供的EGFL6结合抗体有效抑制EGFL6活性和癌症细胞生长。因此,实施方式的抗体提供了用于治疗癌症和抑制血管生成的新的有效方法。

[0070] I. 实施方式的抗体

[0071] 在一些实施方式中,构想了与EGFL6蛋白的至少一部分结合并抑制 EGFL6信号转导和癌症细胞增殖的抗体或其片段。本文所用术语“抗体”意在广泛地指任何免疫结合剂,诸如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE和遗传修饰IgG,以及包括保持抗原结合活性的抗体CDR结构域的多肽。抗体可以选自嵌合抗体、亲和成熟抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人抗体或抗原结合抗体片段或天然或合成配体组成的组。优选地,抗EGFL6 抗体是单克隆抗体或人源化抗体。

[0072] 因此,通过已知方式和本文所述,可以形成对EGFL6蛋白、其相应表位中的一个或多个或前述中任何一个的缀合物特异的多克隆和单克隆抗体、抗体片段以及结合结构域和CDR(包括前述中任何一个的设计形式),无论这种抗原或表位是从天然源分离的还是天然化合物的合成衍生物或变体。

[0073] 适用于本实施方式的抗体片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成;(ii) “Fd”片段,由 V_H 和 C_H1 结构域组成;(iii) “Fv”片段,由单个抗体的 V_L 和 V_H 结构域组成;(iv) “dAb”片段,由 V_H 结构域组成;(v) 分离的CDR区;(vi) F(ab')₂ 片段,包括两个连接的Fab片段的二价片段;(vii) 单链Fv分子(“scFv”),其中, V_H 结构域和 V_L 结构域通过允许两个结构域缔合形成结合结构域的肽接头连接;(viii) 双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利No.5,091,513);以及(ix) 双抗体,通过基因融合构造的多价或多特异性片段(美国专利申请公布20050214860)。通过加入将 V_H 和 V_L 结构域连接在一起的二硫键桥可以稳定Fv、scFv或双抗体。还可以制成包括连接CH3结构域的scFv的微抗体(Hu等人,1996年)。

[0074] 实施方式中还设想了抗体样结合拟肽。Liu等人(2003年)描述了“抗体样结合拟肽”(ABiP),其是用作缩小抗体的肽,并具有血清半衰期较长以及繁琐的合成方法较少的优点。

[0075] 可以对动物接种抗原,诸如EGFL6胞外结构域(ECD)蛋白,以产生对EGFL6蛋白特异的抗体。通常,抗原与另一分子结合或缀合,以增强免疫应答。如本文所用,缀合物是与用于在动物体内引起免疫应答的抗原结合的任何肽、多肽、蛋白质或非蛋白质。响应于抗原接种在动物内产生的抗体包括由B淋巴细胞产生的多种独立抗体形成的多种不同的

分子(多克隆抗体)。多克隆抗体是抗体种类的混合群体,每种均可以识别相同抗原上的不同表位。考虑到动物体内产生的多克隆抗体的正确条件,动物血清中的大部分抗体将识别免疫动物的抗原化合物上的集体表位。通过亲和纯化以仅选择识别感兴趣的抗原或表位的那些抗体,进一步增强了这种特异性。

[0076] 单克隆抗体是单个抗体种类,其中,每个抗体分子识别相同的表位,因为所有产生细胞的抗体均衍生自单个B淋巴细胞系。用于产生单克隆抗体(MAb)的方法通常以与制备多克隆抗体那些方法相同的方式开始。在一些实施方式中,啮齿动物诸如小鼠和大鼠用于生成单克隆抗体。在一些实施方式中,兔、绵羊或青蛙细胞用于生成单克隆抗体。使用大鼠是熟知的,并可以提供某些优势。通常使用小鼠(如BALB/c小鼠),一般稳定融合百分比比较高。

[0077] 杂交瘤技术涉及将来自此前用EGFL6抗原免疫的小鼠的单B淋巴细胞与永生骨髓瘤细胞(通常是小鼠骨髓瘤)融合。该技术提供下述方法:该方法使产生单抗体的细胞繁殖无限代,使得可以产生无限数量的具有相同抗原或表位特异性的结构相同的抗体(单克隆抗体)。

[0078] 可以从新鲜制备的免疫兔的兔外周血单核细胞分离出血浆B细胞(CD45+CD5-CD19+),并进一步筛选EGFL6结合细胞。在富集产生抗体的B细胞后,可以将总RNA分离并合成cDNA。可以扩增来自重链和轻链二者的抗体可变区的DNA序列,构造成噬菌体展示Fab表达载体,并转化大肠杆菌(E.coli.)。可以通过多轮富集筛选选出EGFL6特异性结合Fab并测序。利用人类胚肾(HEK293)细胞(英杰公司(Invitrogen))中的哺乳动物表达载体系统,选出的EGFL6结合命中物可以在兔和兔/人嵌合形式中表达为全长IgG,并可以用快速蛋白液相色谱(FPLC)分离单元利用蛋白G树脂进行纯化。

[0079] 在一个实施方式中,抗体是嵌合抗体,例如,包括来自非人供体的移植到异种非人源、人或人源化序列的抗原结合序列(例如,构架和/或恒定结构域序列)的抗体。已研发了用人源的类似结构域代替单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域使外来抗体的可变区保持完整的方法。可替代地,“全人”单克隆抗体在抗人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠中产生。也研发了通过以重组方式构造具有啮齿动物例如小鼠和人类氨基酸序列的抗体可变结构域将单克隆抗体的可变结构域转换为更人形式的方法。在“人源化”单克隆抗体中,只有高变CDR来自小鼠单克隆抗体,框架和恒定区来自人氨基酸序列(参见美国专利No.5,091,513和6,881,557)。认为将啮齿动物特有的抗体中的氨基酸序列替换为人抗体对应位置处的氨基酸序列将在治疗使用期间降低不良免疫反应的可能性。产生抗体的杂交瘤或其他细胞还可能发生基因突变或其他变化,这可能会也可能不会改变杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0080] 用于在各种动物物种中产生多克隆抗体的方法以及用于产生各种类型的单克隆抗体包括人源化抗体、嵌合抗体和全人抗体的方法是本领域熟知的而且是高度可预测的。例如,下述美国专利和专利申请提供了实现这些方法的描述:美国专利申请No.2004/0126828和2002/0172677;以及美国专利No.3,817,837;3,850,752;3,939,350;3,996,345;4,196,265;4,275,149;4,277,437;4,366,241;4,469,797;4,472,509;4,606,855;4,703,003;4,742,159;4,767,720;4,816,567;4,867,973;4,938,948;4,946,778;5,021,236;5,164,296;5,196,066;5,223,409;5,403,484;5,420,253;5,565,332;5,571,698;5,

627,052; 5,656,434;5,770,376;5,789,208;5,821,337;5,844,091;5,858,657;5,861,155; 5,871,907;5,969,108;6,054,297;6,165,464;6,365,157;6,406,867;6,709,659;6,709,873;6,753,407;6,814,965;6,849,259;6,861,572;6,875,434和6,891,024。本文引用的及其中的所有专利、专利申请公布和其他公布均通过引用并入本申请。

[0081] 可以由任何动物来源包括鸟类和哺乳动物类产生抗体。优选地,抗体可以是绵羊、鼠科(如,小鼠和大鼠)、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡抗体。另外,更新的技术允许从人组合抗体库中开发和筛选人抗体。例如,噬菌体抗体表达技术允许在缺少动物免疫的情况下产生特异性抗体,如美国专利No.6,946,546中所述,其通过引用并入本文。下述文献进一步描述了这些技术:Marks(1992年);Stemmer(1994);Gram等人(1992年);Barbas等人(1994年);以及Schier等人(1996年)。

[0082] 完全可以预料针对EGFL6的抗体能使EGFL6失去效果或消除其影响,而不管动物种类、单克隆细胞系或抗体的其他来源如何。某些动物种类可能不太适合产生治疗性抗体,因为由于通过抗体的“Fc”部分补体系统活化,它们更可能引起过敏反应。然而,整体抗体可以被酶消化为“Fc”(补体结合)片段以及具有结合结构域或CDR的抗体片段。移除Fc部分降低了抗原抗体片段引起不期望的免疫反应的可能性,因此,没有Fc的抗体优选用于预防性或治疗性治疗。如上所述,抗体可以构造为嵌合的或部分人或全人的,以减少或消除因向动物施用其他物种产生的抗体或具有其他物种的序列的抗体造成的不良免疫后果。

[0083] 替换变体通常包括在蛋白质内的一个或多个位点的一个氨基酸交换为另一氨基酸,并可以设计成调节多肽的一个或多个特性,同时丢失或不丢失其他功能或特性。替换可以是保守的,即,一个氨基酸用形状和电荷类似的氨基酸替换。保守替换是本领域熟知的,并且包括例如:将丙氨酸转化成丝氨酸;将精氨酸转化为赖氨酸;将天冬酰胺转化为谷氨酰胺或组氨酸;将天冬氨酸转化为谷氨酸;将半胱氨酸转化为丝氨酸;将谷氨酰胺转化为天冬酰胺;将谷氨酸转化为天冬氨酸;将甘氨酸转化为脯氨酸;将组氨酸转化为天冬酰胺或谷氨酰胺;将异亮氨酸转化为亮氨酸或缬氨酸;将亮氨酸转化为缬氨酸或异亮氨酸;将赖氨酸转化为精氨酸;将蛋氨酸转化为亮氨酸或异亮氨酸;将苯丙氨酸转化为酪氨酸、亮氨酸或蛋氨酸;将丝氨酸转化为苏氨酸;将苏氨酸转化为丝氨酸;将色氨酸转化为酪氨酸;将酪氨酸转化为色氨酸或苯基丙氨酸;以及将缬氨酸转化为异亮氨酸或亮氨酸。可替代地,替换可以是非保守的,使得影响多肽的功能或活性。非保守转化通常涉及将残基替换为化学性质不同的残基,诸如将极性或带电氨基酸替换为非极性或不带电氨基酸,以及将非极性或不带电氨基酸替换为极性或带电氨基酸。

[0084] 蛋白质可以是重组的或体外合成的。可替代地,可以从细菌中分离出非重组或重组蛋白。还设想了包含这种变体的细菌可以实施为组合物和方法。因此,不需要分离蛋白质。

[0085] 设想了每ml组合物中存在约0.001mg至约10mg的多肽、肽和/或蛋白质总量。因此,组合物中蛋白质的浓度可以为约、至少约或至多约0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更多(或其中可得出的任何范围)。其中,约,至少约或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、

27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%可以是结合EGFL6的抗体。

[0086] 抗体或优选地抗体的免疫部分可以与其他蛋白质缀合或表达为融合蛋白。出于本说明书和所附权利要求的目的,所有这种融合蛋白都包括在抗体或抗体的免疫部分的定义中。

[0087] 实施方式提供了针对EGFL6的抗体或抗体样分子、多肽和肽,其与至少一种剂连接以形成抗体缀合物或有效载荷。为了增强抗体分子作为诊断剂或治疗剂的功效,常规的做法是连接或共价结合或复合至少一个期望的分子或部分。这种分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报道分子。效应分子包括具有期望活性例如细胞毒性活性的分子。与抗体附连的效应分子的非限制性示例包括毒素、治疗性酶、抗生素、放射性标记核苷酸等等。对比之下,报道分子定义为可以使用测定检测到的任何部分。与抗体缀合的报道分子的非限制性示例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色颗粒或配体,诸如生物素。

[0088] 本领域已知有若干方法将抗体与其缀合部分附连或缀合。这种附连方法涉及使用金属螯合配合物,金属螯合配合物采用例如有机螯合剂,诸如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3-6?-二苯基甘脲-3,其附连至抗体。单克隆抗体还可以在存在偶联剂诸如戊二醛或高碘酸盐的情况下与酶反应。在存在这些偶联剂的情况下或通过与异硫氰酸酯反应制备具有荧光素标志物的缀合物。

[0089] II. 疾病治疗

[0090] 本实施方式的某些方面可以用于预防或治疗与EGFL6信号转导相关联的疾病或疾患。可以通过适合的药物减少EGFL6的信号转导,预防癌症细胞增殖。优选地,这种物质可以是抗EGFL6抗体。

[0091] “治疗(Treatment)”和“治疗(treating)”指为了获得疾病或健康相关病症的治疗益处而向受试者给药或施用治疗剂或者对受试者进行手术或疗程或物理疗法。例如,治疗可以包括给药药理学有效量的抑制EGFL6信号转导的抗体。

[0092] “受试者”和“患者”指人类或非人类,诸如灵长类动物、哺乳类动物和脊椎动物。在特定实施方式中,受试者是人。

[0093] 本申请通篇使用的术语“治疗益处”或“治疗有效”指相对于该病症的药物治疗促进或增强受试者的健康状况的任何事物。这包括但不限于降低疾病体征或症状的频率或严重性。例如,癌症治疗可以包括例如缩小肿瘤大小、降低肿瘤侵袭性、降低癌症生长速率或预防转移。癌症治疗还可以指延长患有癌症的受试者的存活时间。

[0094] A. 药物制剂

[0095] 在进行含有抑制抗体的治疗组合物的临床应用的情况下,通常有益的是制备适合预期应用的药物或治疗组合物。在某些实施方式中,药物组合物可以包括例如至少约0.1%的活性化合物。在其他实施方式中,活性化合物可以占单位重量的例如约2%至约75%,或约25%至约60%,以及其中可得出的任何范围。

[0096] 本实施方式的治疗组合物有利地以可注射组合物的形式给药,或作为液体溶液

或混悬液；还可以制备适合在注射之前的液体溶液或混悬液的固体形式。这些制剂还可以进行乳化。

[0097] 词组“药物的或药理学上可接受的”指在向动物诸如人——视情况而定——给药时不会产生不利、过敏或其他不良反应的分子实体和组合物。根据本公开，本领域技术人员将知道如何制备包括抗体或附加活性成分的药物组合物。此外，对于动物（例如，人）施用，可以理解制剂应满足FDA 局生物学标准部门要求的无菌性、致热原性、一般安全性和纯度标准。

[0098] 本文所用“药学上可接受载体”包括任何和所有水性溶剂（例如，水，醇/水溶液，盐溶液，肠胃外载体，诸如氯化钠、林格氏葡萄糖等）、非水性溶剂（例如，丙二醇，聚乙二醇，植物油和可注射有机酯，诸如油酸乙酯）、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂（例如，抗细菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体）、等渗剂、吸收延迟剂、盐、药物、药物稳定剂、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、流体和营养补充物、类似的物质及其组合，如本领域普通技术人员已知的。药物组合物中各组分的pH和确切浓度根据熟知的参数调节。

[0099] 术语“单位剂量”或“剂量”指适合用于受试者的物理上离散的单位，每个单位包含预定量的治疗组合物，计算的该预定量的治疗组合物会产生与其给药相关的上述期望反应，即，适合的途径和治疗方案。待给药的量，根据治疗次数和单位剂量二者，取决于期望的效果。可以通过物理和生理因素来确定向患者或受试者给药的本实施方式的组合物的实际剂量，物理和生理因素诸如受试者的体重、年龄、健康情况、性别、治疗疾病的类型、疾病侵入程度、之前或同时进行治疗干预、患者的自发病、给药途径、特定治疗物质的效力、稳定性和毒性。例如，剂量还可以包括每次施用约1 μg/kg/体重至约1000mg/kg/体重（这种范围包括居间剂量）或更多以及其中可得出的任何范围。本文列出的数字中可得出的范围的非限制性实例中，可以给药约5μg/kg/体重至约100mg/kg/体重、约5μg/kg/体重至约500 mg/kg/体重范围的剂量。在任何情况下，负责进行给药的从业者将确定组合物中活性成分的浓度以及适合个体受试者的剂量。

[0100] 活性化合物可以配制用于肠胃外施用，如，配制用于经静脉内、肌肉内、皮下或者甚至腹膜内途径注射。通常，这种组合物可以制备为液体溶液或混悬液；还可以制备适合用于在注射前在添加液体时制备成溶液或混悬液的固体形式；制剂还可以乳化。

[0101] 适合注射使用的药用形式包括：无菌水溶液或混悬液；制剂，包括芝麻油、花生油或含水丙二醇；以及用于临时制备无菌可注射溶液或混悬液的无菌粉末。在所有情况下，形式必须是无菌的，并且流动的程度要使得其容易注射。在制备和储存条件下还应该是稳定的，并且必须防止被微生物污染，诸如细菌和真菌。

[0102] 蛋白质组合物可以配置成中性或盐形式。药学上可接受的盐包括酸加成盐（用蛋白质的游离氨基形成），并且用无机酸或有机酸形成那些，无机酸诸如例如盐酸或磷酸，有机酸诸如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等等。用游离羧基形成的盐还可以来自无机碱以及有机碱，无机碱诸如例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁，有机碱诸如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。

[0103] 药物组合物可以包括含有例如水、乙醇、多元醇（例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等）、其适合的混合物以及植物油等的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣诸如

卵磷脂、在分散质的情况下维持所需的颗粒大小以及通过使用表面活性剂维持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂例如尼泊金、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等防止微生物的作用。在许多情况下,优选地包括等渗剂,例如糖或氯化钠。可以通过在组合物中使用延迟吸收剂例如单硬脂酸铝和明胶延长可注射组合物的吸收。

[0104] B. 联合治疗

[0105] 在某些实施方式中,本实施方式的控制物和方法涉及针对EGFL6与第二或附加疗法联合抑制EGFL6在癌症细胞增殖方面的活性的抗体或抗体片段。这种疗法可以应用于治疗与EGFL6介导的细胞增殖相关联的任何疾病。例如,疾病可以是癌症。

[0106] 方法和控制物,包括联合疗法,增强治疗或保护效果,和/或提高另一抗癌或抗过度增殖疗法的治疗效果。可以以有效达到期望效果的控制量提供治疗和预防方法和控制物,期望效果诸如杀死癌症细胞和/或抑制细胞过度增殖。该过程可以涉及使细胞与抗体或抗体片段和第二疗法接触。组织、肿瘤或细胞可以与包含药剂中的一种或多种(即,抗体或抗体片段或抗癌剂)的一种或多种控制物或药理制剂接触,或通过将组织、肿瘤和/或细胞与两种或更多不同的控制物或制剂接触,其中,一种控制物提供1)抗体或抗体片段,2)抗癌剂,或3)抗体或抗体片段和抗癌剂二者。另外,设想了一种联合疗法可以与化学疗法、放射疗法、外科疗法或免疫疗法结合使用。

[0107] 当应用于细胞时,本文使用术语“接触”或“暴露”用于描述下述过程:通过该过程将治疗构建体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至目标细胞或者直接与目标细胞并置。为了杀死细胞,例如,两种药剂均以有效杀死细胞或防止细胞分裂的控制量递送至细胞。

[0108] 可以在抗癌治疗之前、期间或之后给药抑制抗体,或者以各种组合给药。给药间隔可以从同时至数分钟至数天至数周的范围。在与抗癌剂分开向患者提供抗体或抗体片段的实施方式中,基本上可以确保在每次递送的时间之间很长一段时间内不会失效,使得两种化合物仍能对患者产生有利的组合效果。在这种情况下,设想了一种可以在约12至24或72h内、更优选在约6-12h内向患者提供抗体疗法或抗癌疗法。在一些情况下,可能期望显著延长治疗的时间段,相应给药之间经过若干天(2、3、4、5、6或7天)至若干周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0109] 在某些实施方式中,治疗过程将持续1-90天或更多天(该范围包括居间天数)。设想了一种可以在第1天至第90天(该范围包括居间天数)或其任何组合中的任何一天给予一种药剂,在第1天至第90天(该范围包括居间天数)或其任何组合中的任何一天给予另一种药剂。单独一天(24小时期间)内,可以向患者一次或多次给药药剂。此外,经过治疗过程后,设想了一种不施用抗癌治疗一时间段。该时间段可以持续1-7天和/或1-5周和/或1-12个月或更长(该范围包括居间天数),取决于患者的情况,诸如其预后、力量、健康等。预计根据需要将重复治疗周期。

[0110] 可以采用各种组合。例如,下面抗体疗法为“A”,而抗癌疗法为“B”。

[0111] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0112] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0113] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0114] 向患者施用本实施方式的任何化合物或疗法将遵循施用这种化合物的一般规程,将药剂的毒性(如有)考虑在内。因此,在一些实施方式中,有监测因联合疗法引起的毒

性的步骤。

[0115] i. 化学疗法

[0116] 根据本实施方式可以使用许多化学治疗剂。术语“化学疗法”指使用药物治疗癌症。“化学治疗剂”用于指示在治疗癌症中给药的化合物或组合 物。这些药剂或药物按其 在细胞内的活性方式分类,例如,其是否影响细 胞周期,在什么阶段影响。可替代地,可以根据与DNA直接交联、嵌入 DNA或通过影响核酸合成引起染色体畸变和有丝分裂畸变的能力对药剂进 行表征。

[0117] 化学治疗剂的实例包括:烷化剂,诸如噻替哌(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide);磺酸烷基酯类(alkyl sulfonate),诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和噻消安(piposulfan);氮杂环丙烷类(aziridine),诸如苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替派(uredopa);乙烯亚胺(ethylenimine)和甲 基蜜胺类(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙撑蜜胺(triethylenemelamine)、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲蜜胺(trimethylolomelamine);番荔枝内酯类(acetogenins)(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包 括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素(bryostatin);卡利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);念珠藻素类(cryptophycin)(特别是念珠藻素 1(cryptophycin 1)和念珠藻素 8(cryptophycin 8));尾海兔素(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物,KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥类,诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧化氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼氮芥(prednimustine)、曲洛磷胺(trofosfamide)和尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲类,诸如卡氮芥(carmustine)、氯脲霉素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、罗氮芥(lomustine)、嘧啶亚硝脲(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素类,诸如烯二炔类抗生素(例如,卡里奇霉素(calicheamicin),尤其是卡奇霉素 γ II及卡奇霉素 ω II);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素 A;双膦酸酯/盐(bisphosphonates),诸如氯膦酸酯/盐;埃斯佩拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素类(aclacinomysins)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authrarnycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素类(bleomycins)、放线菌素C、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜 癌菌素、色霉素类、放线菌素d、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氨基-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉基-多柔比星、氰基吗啉基-多柔比星、2-吡咯啉多柔比星(2-pyrrolino-doxorubicin)及脱氧阿霉素)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素类,诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素(nogalarnycin)、橄榄霉素类(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、波弗霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素

(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲菌素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他汀(zinostatin)和佐柔比星(zorubicin);抗代谢物类,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、蝶罗呤(pteropterin)和三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮杂尿苷、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷、二脱氧尿苷、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)和氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡普睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)和睾内酯(testolactone);抗肾上腺剂,诸如米托坦(mitotane)和曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,诸如亚叶酸;醋葡萄糖内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基酮戊酸;恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);贝斯特布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依氟鸟胺酸(elformithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类(maytansinoids),诸如美登素I(maytansine)和安丝菌素类(ansamitocins);米托胍脘(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidanmol);硝氮吡啶(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);蛋胺氮芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);足叶草酸(podophyllinic acid);2-乙基胍;甲基苄胍(procarbazine);PSK多糖复合物;雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯毒素类(trichothecenes)(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));尿烷;长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);加赛特辛(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺(cyclophosphamide);紫杉烷类(taxoids),例如紫杉醇(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel)吉西他滨(gemcitabine);6-硫代鸟嘌呤;硫嘌呤;铂配合复合物类,诸如顺铂、奥沙利铂(oxaliplatin)和卡铂(carboplatin);长春花碱;(vinblastine)铂;依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);长春新碱(vincristine);长春瑞滨(vinorelbine);诺肖林(novantrone);替尼泊苷(teniposide);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素(daunomycin);氨嘌呤(aminopterin);希罗达(xeloda);伊班膦酸盐(ibandronate);伊立替康(irinotecan)(例如,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟胺酸(DMF0);视黄醇类,诸如视黄酸;卡培他滨(capecitabine);卡铂(carboplatin)、甲基苄胍(procarbazine)、普卡霉素(plicomycin)、吉西他滨(gemcitabien)、长春瑞滨(navelbine)、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂(transplatinum)和上述中任意一个的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0118] ii. 放射疗法

[0119] 造成DNA损伤并已广泛使用的其他因素包括俗称的 γ 射线、X-射线和/或直接递送放射性同位素至肿瘤细胞。还设想其他形式的DNA损伤因素,诸如微波、质子束辐照(美国专利5,760,395和4,870,287)和紫外光辐照。最有可能的是所有这些因素对DNA、DNA的前体、DNA复制和修复以及染色体组装和维持造成大范围损伤。X-射线的剂量范围从长时间段(3至4周)50至200伦琴的每日剂量到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,取决于同位素的半衰期、发出的放射强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

[0120] iii. 免疫疗法

[0121] 技术人员将理解其他免疫疗法可以与实施方式的方法联合或结合使用。在癌症治疗的背景下,免疫治疗剂一般依靠使用免疫效应细胞和分子来靶向并破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN®)就是这样的实例。免疫效应子可以是例如对肿瘤细胞表面上某个标志物特异的抗体。单独的抗体可以用作治疗的效应子,或者可以募集其他细胞对细胞杀伤造成实际影响。抗体还可以与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并用作靶向剂。可替代地,效应子可以是携带与肿瘤细胞靶点直接或间接相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0122] 抗体-药物缀合物已成为癌症治疗发展的突破性方法。癌症是世界上引起死亡的主要原因之一。抗体-药物缀合物(ADC)包括与细胞杀伤药物共价连接的单克隆抗体(MAb)(图1)。该方法将MAb针对其抗原靶标的高特异性与高效细胞毒性药物结合,形成“武装”MAb,其将富含抗原的载荷物(药物)递送至肿瘤细胞(Carter等人,2008年;Teicher,2014年;Leal等人,2014年)。药物的靶向递送还最小化其暴露于正常组织,造成毒性降低,治疗指数提高。FDA批准的两种ADC药物——2011年批准ADCETRIS®(本妥昔单抗),2013年批准KADCYLA®(曲妥珠单抗美坦新或T-DM1)——证实了该方法。目前癌症治疗临床试验各阶段有超过30种候选ADC药物(Leal等人,2014年)。随着抗体工程和接头-载荷物优化变得越来越成熟,新ADC的发现和研发越来越取决于适合这种方法新靶标的识别和验证(Teicher,2009年)和靶向MAb生成。ADC靶标的两个标准是在肿瘤细胞中上调/高水平的表达以及稳健的内化。

[0123] 在免疫疗法的一个方面,肿瘤细胞必须携带一些易于靶向的标志物,即不存在于大部分其他细胞。存在许多肿瘤标志物,这些中的任何肿瘤标志物都可以适用于在本实施方式的背景下进行靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20、癌胚抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMGF、唾液酸化路易斯抗原、MucA、MucB、PLAP、层黏连素受体、erb B、和p155。免疫疗法的可替代方面是将抗癌作用与免疫刺激作用结合。也存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,诸如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN;趋化因子,诸如MIP-1、MCP-1、IL-8;以及生长因子,诸如FLT3配体。

[0124] 目前在研究或使用的免疫疗法的实例是:免疫佐剂,例如,牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、镰状疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳香族化合物(美国专利5,801,005和5,739,169;Hui和Hashimoto,1998年;Christodoulides等人,

1998年);细胞因子治疗,例如干扰素 α 、 β 和 γ 和IL-1、GM-CSF以及TNF (Bukowski等人,1998年; Davidson等人,1998年;Hellstrand等人,1998年);基因疗法,例如TNF、IL-1、IL-2和p53 (Qin等人,1998年;Austin-Ward和Villaseca,1998年; 美国专利5,830,880和5,846,945);以及单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2以及抗p185 (Hollander,2012年; Hanibuchi等人,1998年; 美国专利5,824,311)。设想了可以将一种或多种抗癌疗法与本文描述的抗体疗法一起使用。

[0125] iv. 手术

[0126] 大约60%的患有癌症的人会进行某种类型的手术,包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除术,其中癌症组织的全部或部分被物理移除、切除和/或破坏,并可以与其他疗法结合使用,诸如本实施方式的治疗、化学疗法、放射疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除指物理移除肿瘤的至少部分。除了肿瘤切除以外,通过手术进行的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微镜控制手术(莫氏手术)。

[0127] 在切除部分或全部癌症细胞、组织或肿瘤时,体内可能会形成腔。可以通过灌注、直接注射或向区域局部应用额外抗肿瘤疗法来完成治疗。可以例如每1、2、3、4、5、6或7天或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复这种治疗。这些治疗的剂量也可能变化。

[0128] v. 其他药剂

[0129] 设想了其他药剂可以与本实施方式的某些方面结合使用,以提高治疗的治疗功效。这些额外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的药剂、细胞抑制剂和分化剂,细胞粘附抑制剂、提高细胞对凋亡诱导剂或其他生物药剂的敏感性的药剂。通过提高GAP连接的数量增强细胞间信号转导将增强对相邻过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方式中,细胞抑制剂或分化剂可以与本实施方式的某些方面结合使用,以增强治疗的抗过度增殖功效。设想了细胞粘附抑制剂会增强本实施方式的功效。细胞粘附抑制剂的实例为粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。还设想了提高过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其他药剂诸如抗体c225可以与本实施方式的某些方面结合使用,增强治疗功效。

[0130] III. 试剂盒和诊断

[0131] 在实施方式的各个方面,预想试剂盒包含治疗剂和/或其他治疗和递送剂。在一些实施方式中,本实施方式设想了用于准备和/或施用实施方式的治疗的试剂盒。试剂盒可以包括含本实施方式的任何药物组合物中的一个或多个密封小瓶。试剂盒可以包括例如至少一种EGFL6抗体以及试剂,以制备、配制和/或给药实施方式的成分或执行本发明方法的一个或多个步骤。在一些实施方式中,试剂盒还可以包括适合的容器,其是不会与试剂盒的成分发生反应的容器,诸如艾本德(eppendorf)管、分析板、注射器、瓶或管。容器可以由可灭菌材料诸如塑料或玻璃制成。

[0132] 试剂盒还可以包括概述本文所述方法的程序步骤的说明书,并将基本按照本文描述的相同程序或是本领域普通技术人员已知的。说明信息可以是包含机器可读指令的计算机可读介质,当使用计算机执行时,机器可读指令使得显示递送药学有效量的治疗剂的真实或虚拟程序。

IV. 实施例

[0133] 列入下述实施例是为了对本发明的优选实施方式进行说明。本领域技术人员应理解,下述实施例中公开的技术代表发明人发现的在本发明的实践中很好地起作用的技术,因此应视为构成实践本发明的优选模式。然而,根据本公开,本领域技术人员应理解,在不脱离本发明的精神和范围的情况下可以对公开的具体实施方式做出许多改动,仍得到相同或类似的结果。

[0134] 实施例1——靶向人源EGFL6的单克隆抗体的生成和克隆

[0135] 在美国RevMab Biosciences公司,使用EGFL6 (Genebank登录号# Q8IUX8) 蛋白在对新西兰兔进行免疫。使用ELISA中用于结合的一系列血清稀释液,通过将EGFL6蛋白包被在96孔板(max-sorb板,Nunc)上测定抗EGFL6血清效价,并用与辣根辣根过氧化物酶(HRP)和TMB底物缀合的抗兔抗体进行检测。经过2-3次免疫增强后,滴度达到 $>10^6$,从免疫兔采集外周血样本,使用荧光辅助细胞分选(FACS)仪器(BD FACSAriaTM III, BD Biosciences)将B细胞(CD45+CD5-CD19+)与新鲜制备的外周血单核细胞(PBMC)分离。分离的B细胞铺板为单B细胞并培养7-10天。分析培养上清液与EGFL6的结合。将来自阳性孔的细胞裂解,分离总RNA,并使用SuperScript逆转录酶II(英杰公司(Invitrogen))根据制造商建议合成cDNA。使用一组设计引物通过聚合酶链反应(PCR)扩增来自重链和轻链二者的抗体可变区的DNA序列并测序。下面第V部分列出了DNA和氨基酸序列。使用IMGT程序鉴定抗EGFL6单克隆抗体的CDR并在表1和表2中列出。

[0136]

表 1. EGFL6 抗体的重链可变序列的 CDR。

mAb	重链		
	CDR1	CDR2	CDR3
E1-33	ggactcaccctcagtagctactactac (SEQ ID NO: 1)	attatgtgtagtagtgtagcact (SEQ ID NO: 2)	ggagaggtagtgtagtactatgctcaataattttaacttg (SEQ ID NO: 3)
	GLDLSSYY (SEQ ID NO: 4)	IYAGSSGST (SEQ ID NO: 5)	ARGGGSTYAQYFNL (SEQ ID NO: 6)
E1-34	ggatttccttcagtagtattattgg (SEQ ID NO: 7)	attcagattactagtggtatcact (SEQ ID NO: 8)	agaaggggatgggcctatgctggtagctgggcctctgacttg (SEQ ID NO: 9)
	GFSFSSIYW (SEQ ID NO: 10)	IQITSGIT (SEQ ID NO: 11)	RRGYGAYAGTGASDL (SEQ ID NO: 12)
E1-80	ggattcaccctcaatagttattat (SEQ ID NO: 13)	attgatagtagtctactactagc (SEQ ID NO: 14)	ggagaggctatggctctgcttgatggatctc (SEQ ID NO: 15)
	GFTLNSYY (SEQ ID NO: 16)	IDSDSPTT (SEQ ID NO: 17)	ARGYGPVRLDL (SEQ ID NO: 18)
E1-89	ggatttccttcagtagcggctactgg (SEQ ID NO: 19)	attatgctgtagtagtggtggcac (SEQ ID NO: 20)	gtacaagagataaattatggggtagtggttctgcttccaattg (SEQ ID NO: 21)
	GFSFSSGYW (SEQ ID NO: 22)	IYAGSSGGH (SEQ ID NO: 23)	CTRDNYGGGGSASKL (SEQ ID NO: 24)
E2-93	ggatttccttcagtagttatgga (SEQ ID NO: 25)	atfgctttagtagtagatc (SEQ ID NO: 26)	gtgagagatcttcatagtaagtgttg (SEQ ID NO: 27)
	GFSFSSYG (SEQ ID NO: 28)	IGLSSEI (SEQ ID NO: 29)	VRDLYHSNGL (SEQ ID NO: 30)
E1-38	ggatttccttcataataggctactgg (SEQ ID NO: 31)	atctatactagtagtctactgtggcc (SEQ ID NO: 32)	gtacaagagataaatttggggtagtggttctgcttccaattg (SEQ ID NO: 33)
	GFSFNSGYW	IYTSPTGA	CTRDNFGGGSASKL

[0137]

	(SEQ ID NO: 34)	(SEQ ID NO: 35)	(SEQ ID NO: 36)
E1-52	ggattcaccctcagtagctactac (SEQ ID NO: 37)	attgatactgataatgatattagg (SEQ ID NO: 38)	gggagaggctatggcgccttcggttggatctc (SEQ ID NO: 39)
E2-36	GFTLSSYY (SEQ ID NO: 40)	IDTDNDR (SEQ ID NO: 41)	GRGYGALRLDL (SEQ ID NO: 42)
	ggatttcacctcagtagctaccac (SEQ ID NO: 43)	attaataattatggccaca (SEQ ID NO: 44)	gccagaagtcctgggattcctggttataattcg (SEQ ID NO: 45)
	GFSLSSYH (SEQ ID NO: 46)	INNYGAT (SEQ ID NO: 47)	ARSPGIPGYNS (SEQ ID NO: 48)
E1-95	ggatttccttcagtagcaattca (SEQ ID NO: 49)	attgtagtagtagtagcatagt (SEQ ID NO: 50)	gcgagagattcggtaatcgtggtacccttatcggggcgactttaact tg (SEQ ID NO: 51)
	GFSFSSNS (SEQ ID NO: 52)	IASSSHS (SEQ ID NO: 53)	ARDSGNRGYLYAGDFNL (SEQ ID NO: 54)
E2-116	ggattcgacctcagtagctactac (SEQ ID NO: 55)	attgacgggtgggggtgagcccact (SEQ ID NO: 56)	gcgagacgagatctggtgctgggaacgccctttagcttg (SEQ ID NO: 57)
	GFDLSSYY (SEQ ID NO: 58)	IDGGGGEPT (SEQ ID NO: 59)	ARRDAGAGNAFSL (SEQ ID NO: 60)
E2-135	ggattcgactcagtagcagctacttt (SEQ ID NO: 61)	atttatactgttattagctgtaagact (SEQ ID NO: 62)	gcgagatcggcaacaattgaaagattggatctc (SEQ ID NO: 63)
	GFDFSSSYF (SEQ ID NO: 64)	IYTVISRKT (SEQ ID NO: 65)	ARSATIERLDL (SEQ ID NO: 66)
E1-142	ggattcaccatcaataactaac (SEQ ID NO: 67)	atttggaatggtagggcagc (SEQ ID NO: 68)	gcgagaaatttaacttg (SEQ ID NO: 69)
	GFTINNYN (SEQ ID NO: 70)	IWNGDGS (SEQ ID NO: 71)	ARNFNL (SEQ ID NO: 72)

表 2. EGFL6 抗体的轻链可变序列的 CDR。

轻链		
CDR1	CDR2	CDR3
E1-33 ccgagtgttataggcactac	tgggcttcc	gcagggcaatatgctagtagataatcat

[0138]

	(SEQ ID NO: 73)	(SEQ ID NO: 74)	(SEQ ID NO: 75)
	PSVYRHY	WAS	AGEYASDSDNH
	(SEQ ID NO: 76)	(SEQ ID NO: 77)	(SEQ ID NO: 78)
E1-34	cagagtttataataacaacaac (SEQ ID NO: 79)	gaagcatcc (SEQ ID NO: 80)	gcagcggttatgctggctacattgggct (SEQ ID NO: 81)
	QSVYNNNN (SEQ ID NO: 82)	EAS (SEQ ID NO: 83)	AGGYAGYIWA (SEQ ID NO: 84)
E1-80	aagaacgcctatttacctactac (SEQ ID NO: 85)	tgggtcc (SEQ ID NO: 86)	gcagccgaatagtaataatagatgataatggct (SEQ ID NO: 87)
	KNAYLSYY (SEQ ID NO: 88)	WAS (SEQ ID NO: 77)	AAEYSNDSNDNG (SEQ ID NO: 89)
E1-89	cagagtgttagtaacaaccgc (SEQ ID NO: 90)	tatgcagcc (SEQ ID NO: 91)	gcaggataaaaactgctgattctgatggattgct (SEQ ID NO: 92)
	QSVYSNNR (SEQ ID NO: 93)	YAA (SEQ ID NO: 94)	AGYKTADSDGIA (SEQ ID NO: 95)
E2-93	gagagcgttataataataaccgc (SEQ ID NO: 96)	tatgcctcc (SEQ ID NO: 97)	gtagcctttaagggttaggtactgacggcgaatgct (SEQ ID NO: 98)
	ESVYNNNR (SEQ ID NO: 99)	YAS (SEQ ID NO: 100)	VAFKGYGTDGNA (SEQ ID NO: 101)
E1-38	gagagtgttagtaacaaccgc (SEQ ID NO: 102)	tatgcctcc (SEQ ID NO: 97)	gcaggataaagactgccgattctgatggcttgggt (SEQ ID NO: 103)
	ESVYSNNR (SEQ ID NO: 104)	YAS (SEQ ID NO: 100)	AGYKTADSDGLG (SEQ ID NO: 105)
E1-52	ccgagtgttaggcactac (SEQ ID NO: 106)	tgggtcc (SEQ ID NO: 86)	gcagcgaatagctagtagatgataatcat (SEQ ID NO: 107)
	PSVYRHY (SEQ ID NO: 108)	WAS (SEQ ID NO: 77)	AGEYASDSDNH (SEQ ID NO: 109)

50)。为了进行Biacore分析,所有实验均在25℃、45 μ l/min的流速下进行。使用胺缀合程序根据制造商说明,将抗人IgG Fc抗体(来自ThermoFisher,在乙酸盐缓冲溶液中各自浓度为50 μ g/ml,pH 5.0)固定在羧甲基葡聚糖传感器芯片(CM5)上。在0.5%P20,HBS-EP缓冲液中将待测试的纯化兔/人嵌合抗体稀释至5 μ g/ml的浓度,并注射在FC2上达到500至1000RU。将FC1用作参照池。特定信号对应于在FC2与FC1上获得的信号差异。在90秒内将分析物(重组人源EGFL6,SDS-PAGE胶上表观分子量60kDa)以在0.5%P20,HBS-EP缓冲液中的一系列浓度稀释(100、50、25、12.5、6.25和3.13、1.56nM)注射。这些浓度由0.5%P20,HBS-EP储备溶液制备。对分析物的解离阶段监测30分钟。在相同条件下也注射了运行缓冲液,作为双参照。每次运行周期后,通过注射20至45 μ l的pH 1.5的甘氨酸盐酸盐缓冲液重新生成两个流动池。根据每个EGFL6单克隆抗体的 k_{off}/k_{on} 动力学速率计算对EGFL6的结合 K_D (表3)。

[0143] 表3. 根据ELISA或Biacore方法确定的EGFL6抗体结合亲和力

[0144]	抗体名称	EC50 (ng/ml)
	E1-34	0.78
	E1-38	5.81
[0145]	E2-93	0.37
	E1-142	1.91
	E2-135	0.44

[0146] 实施例3——实验程序和方法

[0147] 细胞系和培养基:按照描述维持了人上皮性卵巢癌细胞系、SKOV3ip1 和A2780ip2 (Sood,A.K.等人,Molecular determinants of ovarian cancer plasticity.American Journal of Pathology 158,1279-1288,2001)。在具有补充物的MEM培养基上(丙酮酸钠、非必需氨基酸、MEM维生素和谷氨酰胺; Life Technologies)生长人永生化脐带内皮细胞(RF24)。之前已描述了小鼠卵巢内皮细胞(MOEC)的来源和表征(Langley,R.R.等人,Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58mice for studies of angiogenesis and metastasis.Cancer Research 63,2971-2976,2003)。在37℃、95%湿度下在5%CO2培养箱中维持细胞培养。为了进行体内注射,将细胞用胰蛋白酶消化并在4℃下以1,200rpm离心5min,用PBS清洗两次,并在无血清Hank's平衡盐溶液(Life Technologies,Grand Island,NY,美国)中重构。仅使用存活力超过95%(通过台盼蓝排除法确定)的单细胞悬浮液进行体内腹腔内注射。

[0148] 内皮细胞分离:经过机构伦理审查委员会批准后在M.D.Anderson癌症中心从经受初步手术探查的患者获得了新鲜组织样本(5个正常卵巢、5个受伤组织和10个上皮高级、III期或IV期侵袭性浆液性卵巢癌)。来自纯化内皮细胞的总RNA使用Affymetrix

Human U133加2.0GeneChip平台 进行微阵列分析(Lu,C.等人, Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma. *Cancer Research* 67,1757-1768,2007)。

[0149] 定量实时PCR验证:使用根据制造商的说明使用RNeasy微型试剂盒 (Qiagen)分离的来自纯化内皮细胞的50ng总RNA进行定量实时RT-PCR。使用Verso cDNA试剂盒(Thermo Scientific)由0.5-1 μ g总RNA合成互补 DNA (cDNA)。使用SYBR Green ER qPCR SuperMix Universal (英杰公司) 和Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, 美国)分三份进行定量PCR (qPCR)分析。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算相对定量,相对于对照归一化,得到 倍数变化百分比(Donninger,H.等人, Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways. *Oncogene* 23,8065-8077,2004)。

[0150] SiRNA构建和递送:SiRNA采购自Sigma-Aldrich(The Woodlands, TX, 美国)。根据BLAST检索不与任何已知人mRNA有同源性的非沉默 siRNA用作靶向siRNA的对照。如所述进行体外瞬时转染(Landen,C.N., Jr. 等人, Therapeutic EphA2 gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery. *Cancer Research* 65,6910-6918,2005)。简而言之, 根据制造商说明在室温下siRNA(4 μ g)与10 μ L的Lipofectamine 2000转染试剂(Lipofectamine)温育20min,并添加至10cm培养板中汇合度为80%的培养中细胞。

[0151] 反相蛋白质阵列(RPPA)和蛋白质印迹分析:在存在或不存在人重组 EGFL6蛋白质的情况下对RF24和OVCAR3细胞进行RPPA分析。如前述 进行了蛋白质印迹分析(Landen, C.N., Jr.等人,2005, *ibid*; Halder, J.等人, Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy. *Clinical Cancer Research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12,4916-4924, 2006)。用人重组EGFL6蛋白或抗EGFL6抗体对RF24细胞的细胞裂解产物进行处理,并使用抗人EGFL6、PI3激酶和AKT抗体检查PI3激酶的活化情况和AKT信号转导,随后用与辣根过氧化物酶(HRP)缀合的第二抗体进行处理。

[0152] 细胞迁移分析:使用涂覆0.1%明胶的改良博伊登(Boyden)室,在存在或不存在hEGFL6siRNA的情况下评估RF24细胞的迁移。在用hEGFL6或整合素siRNA转染48h后或用EGFL6抗体或PI3激酶抑制剂转染6h后,将MEM无血清培养基中的RF24细胞(1.0×10^5)接种入Transwell孔聚碳酸酯膜嵌套(Corning, Lowell, MA, 美国)的上室。将室放置在24孔板中,下室中包含具有15%血清的MEM培养基的作为化学引诱剂。允许细胞在加湿培养箱中迁移6h。使用苏木素染色对已迁移的细胞进行染色,并通过光学显微镜在每个样本五个随机视野中计数($200 \times$ 原始放大率)。实验分两份完成,进行三次。

[0153] 小管形成分析:在4 $^{\circ}$ C下融解基质胶(Matrigel) (12.5mg/mL),向96孔板的每个孔快速添加50 μ L,并允许在37 $^{\circ}$ C下固化10min。然后孔在37 $^{\circ}$ C下与RF24细胞温育6h(每孔20,000个),RF24细胞事先已用EGFL6或整合素siRNA处理(48h)或用EGFL6抗体或PI3激酶抑制剂处理(6h)。实验分三份进行,重复两次。使用Olympus IX81倒置显微镜,在100的放大倍率下每孔拍摄五张图像。确定每张图像结节(定义为至少三个细胞形成单个点)的数量。为

了说明细胞凝结,每组移除了最高值和最低值。

[0154] 启动子分析和染色质免疫沉淀(ChIP)分析:RF24细胞在低血清培养基(0.5%血清)中培养18h,然后用EGFL6或HIF1 α (50ng/mL)处理6小时。经过处理后,用EZ ChIP™试剂盒(Millipore, Temecula, CA, 美国)按照制造商描述的进行ChIP分析。简要说,收集交联细胞、裂解、超声处理,然后用EGFL6(Abchem)抗体或IgG对照进行免疫沉淀反应。使用蛋白G琼脂糖珠收集免疫复合物并洗脱。通过在65°C下温育将交联逆转。然后提取DNA并纯化,使用EGFL6转录起始位点上游的引物对进行PCR。

[0155] 流式细胞术分析:用PBS冲洗RF24细胞并用PBS-EDTA 5mM收获。然后用不同整合素一级抗体(Sigma-Aldrich)对细胞进行免疫标记,随后用二级抗体(英杰公司)进行染色。用Cell Quest软件在FACSCalibur上获取样本,并用FlowJo软件分析数据。

[0156] 卵巢癌原位体内模型和组织处理:从NCI-Frederick癌症研究和发展中心(Frederick, MD, 美国)购买了雌性无胸腺裸鼠(NCr-nu)并按之前描述维持(Landen, C.N., Jr.等人,2005, *ibid*)。所有小鼠研究均通过实验动物护理与使用委员会批准。按照美国实验动物护理认证协会规定的指南和美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策护理小鼠。对于肿瘤细胞注射,腹膜内(i.p)注射A2780ip2或SKOV3ip1或OVCAR3细胞(1×10^6)。为了进行治疗实验,每周按每次150 μ g/kg体重的剂量给予siRNA。在处死时,记录小鼠和肿瘤重量、肿瘤数量和分布。进行尸体剖检的个人对治疗组分配不清楚。或用福尔马林、OCT(Miles, Inc., Elkhart, IN, 美国)固定组织试样或在液氮中速冻组织试样。对于脱靶效应,用与上述相同的两种不同EGFL6siRNA序列对荷SKOV3ip1瘤小鼠进行治疗。

[0157] 异种移植的免疫组织化学染色和免疫荧光染色:对细胞增殖(Ki67, 1:200, Zymed)的IHC分析、微血管密度(MVD, CD31, 1:500, Pharmingen)和缺氧(碳酸酐酶抗CA9, 1:500, Novus)均按照描述进行(Thaker, P.H.等人, *Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma. Nature Medicine* 12, 939-944, 2006; Lu, C.等人, *Regulation of tumor angiogenesis by EZH2. Cancer Cell* 18, 185-197, 2010)。为了进行统计分析,对每组随机选取的五个肿瘤的切片进行染色并对每个肿瘤的五个随机视野评分。在 $\times 200$ 或 $\times 100$ 的放大倍率下拍摄图片。为了量化小鼠肿瘤样本中的MVD,记录 $\times 200$ 放大倍率下10个0.159-mm²的随机视野中CD31染色阳性的血管数量。为了量化PCNA表达,在 $\times 100$ 放大倍率下在10个0.159-mm²的随机视野中计数阳性细胞(3,3'-二氨基联苯胺染色)(Thaker, P.H.等人, 2006, *ibid*; Lu, C.等人, 2010, *ibid*)。所有染色由2名研究员以盲测方式进行量化。使用冷冻组织按照描述进行EGFL6(Santa Cruz)和CD31染色(Lu, C.等人, 2010, *ibid*)。

[0158] 基质胶塞分析:通过将基质胶塞皮下注射入小鼠进行体内基质胶塞分析。基质胶塞包括无血清MEM完全培养基(作为阴性对照)、VEGF(作为阳性对照)或EGFL6(作为测试组)。注射后6h,处死动物,收集基质胶并进行血红蛋白测定。

[0159] 伤口愈合分析:在第1天,向裸鼠注射A2780ip2细胞,第2天在荷瘤小鼠背部形成伤口。动物接受了兽医护理并在单独的笼子中饲养。小鼠分为两组(n=10)。

[0160] CH/对照siRNA和CH/mEGFL6siRNA纳米颗粒:在第3天开始siRNA治疗,每周给药两次(150 μ g/kg)。在第0、1、3、5、7、9、11、13和15天测量伤口(直到伤口愈合完成)。当任何组中的动物濒死时收获肿瘤。

[0161] 后肢缺血:用氯胺酮(100mg/kg)通过腹腔内注射将雌性裸鼠麻醉后,诱导此前描述的严重后肢缺血(Baluk,P.,Hashizume,H.&McDonald,D.M. Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer.Current Opinion in Genetics&Development 15,102-111,2005),切除从作为髂外动脉的分支的近端源点至分叉为隐动脉和腓动脉的远端点之间的股动脉。动脉结扎后,立即将小鼠分配至下述实验组(n=5):对照组,局部缺血24h组以及局部缺血96h组。进行连续激光多普勒成像分析(Moor Instruments,Devon,英国),监测股动脉结扎前后(24h和96h后)后肢的血液流动。对数字彩色编码的图像进行分析,量化从膝盖到脚趾之间的区域的血流量;计算灌注的平均值。在每个时间点,收获缺血肢体的组织并在OCT培养基中冷冻。小鼠单克隆抗CD31用于使用标准免疫染色程序测定MVD和小鼠多克隆抗EGFL6抗体在冷冻包埋组织上的EGFL6表达。

[0162] 人卵巢癌试样:在经机构伦理审查委员会批准后,从Karmanos癌症研究所肿瘤库获得了具有可用的临床结果数据且具有经执业资格认证的妇产科病理医师确认的诊断为180例石蜡包埋上皮卵巢癌试样(1985年至2004年之间收集)。

[0163] 对于人卵巢癌样本,按之前所述对EGFL6、CD34和VEGF进行免疫组织化学法分析(Ali-Fehmi,R.等人,Expression of cyclooxygenase-2in advanced stage ovarian serous carcinoma:correlation with tumor cell proliferation,apoptosis,angiogenesis,and survival.American Journal of Obstetrics and Gynecology 192,819-825,2005)。使用抗人EGFL6抗体(Sigma-Aldrich)进行EGFL6染色。简言之,将福尔马林固定的、石蜡包埋的组织切片脱蜡并再水合。用Diva溶液进行抗原回收后,用3%的过氧化氢在甲醇中封闭内源性过氧化物酶15min。用PBS洗涤后,在室温(RT)下用蛋白质封闭物(5%正常马血清和1%山羊血清)将切片封闭20min,然后在4℃下与抗EGFL6抗体(Sigma-Aldrich)温育过夜。用PBS洗涤后,在室温下切片与缀合辣根过氧化物酶(HRP)的羊抗兔(1:250,Jackson ImmunoResearch)温育1h。最后,用3,3'-二氨基联苯胺(Research Genetics)并且Gill苏木素(BioGenex Laboratories)反染色实现可视化。负染报告为0分,1-4分用于EGFL6强度的增加。由两名研究员根据组织化学评分(H-评分;>100定义为高表达,≤100低表达)按照之前描述的方法(Ali-Fehmi等人,2005ibid)对染色载片进行评分,该方法考虑了染色强度和染色细胞百分比两方面。

[0164] 统计分析:对于动物实验,每治疗组分配十只小鼠。该样本大小提供80%的能力来检测肿瘤重量减少50%,置信度为95%。使用学生t检验(用于比较两组)比较每组的肿瘤重量和肿瘤结节数量。小于0.05的P值视为有统计显著性。所有统计测试都是双侧的,并且是使用针对Windows的SPSS 12版统计软件(SPSS,Inc.,Chicago,IL,美国)进行的。

[0165] 实施例4——肿瘤相关内皮细胞中EGFL6表达上调

[0166] 获得五个正常卵巢、五个伤口组织样本和10个侵袭性上皮卵巢肿瘤,并进行阴性和阳性免疫选择。在进行微阵列分析之前,使用内皮细胞标志物P1H12和冯维勒布兰德因子建立内皮细胞所有样本的纯度(图4A)。免疫染色表明,免疫纯化技术在所有样本中产生>95%的内皮细胞纯度。数据分析表明,相比于正常和伤口内皮细胞,卵巢肿瘤内皮细胞中375个基因上调(图4B)。其中,相比于正常和伤口内皮细胞,EGFL6在肿瘤内皮细胞中显示出最高的差异表达(图4B)。测定卵巢癌患者样本中EGFL6、VEGF和CD31的表达(图4C)。为了进一步验证结果,从正常卵巢、卵巢肿瘤和伤口愈合组织分离了内皮细胞,并使用PCR测定

了EGFL6的表达。相比于正常或伤口内皮细胞,EGFL6主要仅在肿瘤内皮细胞中过度表达(图4D)。还证实了EGFL6在肿瘤内皮细胞中上调。EGFL6在测试的内皮细胞和大部分卵巢癌细胞中表达。为了证实EGFL6在肿瘤血管生成中的作用,用 siEGFL6对RF24细胞进行处理,其相比于对照细胞,导致在72hr时在蛋白质水平上超过80%的敲除。相比于对照siRNA处理细胞,EGFL6siRNA处理细胞显示出明显较小的迁移和小管形成,表明了EGFL6在血管生成中的重要性。

[0167] 实施例5——EGFL6沉默不影响小鼠伤口愈合

[0168] 使用由人真皮微血管内皮细胞(HDMEC)产生的伤口论述了EGFL6在伤口愈合方面的作用。使用下述程序对伤口愈合造成影响。在第1天,向裸鼠注射SKOV3ip1细胞,第2天在荷瘤小鼠背部形成伤口(2cm×2cm)。动物随机分为两组(n=10),一组给药对照抗体,另一组小鼠用EGFL6抗体处理。在第3天开始抗体处理,每周给予一次(5mg/kg)。对伤口(面积=长度×宽度)进行2周的监测,直到伤口愈合完成。使用伤口愈合体内研究测试时,EGFL6抗体未妨碍伤口愈合(图9C)。

[0169] 伤口愈合分析表明24hr后,小干扰对照处理细胞和siEGFL6处理细胞对伤口愈合能力无影响(图5A至5C)。此外,荷瘤小鼠上产生的类似伤口用于使用鼠siRNA序列确定内皮细胞区室中EGFL6沉默对伤口愈合的影响。如图5D和图5E所示,用对照siRNA或小鼠EGFL6siRNA处理的动物的伤口愈合未观察到显著差异,且两组均显示出类似的伤口愈合模式。

[0170] 然而,用小鼠EGFL6siRNA处理的动物显示肿瘤负荷显著减小(图5F至5H),表明EGFL6在内皮细胞区室中沉默对肿瘤生长有显著影响但不会破坏伤口愈合。EGFL6基因沉默还显著减少肿瘤血管增生(图11A至图11B)。

[0171] 实施例6——内皮细胞EGFL6增强血管生成

[0172] 为了证实EGFL6在缺氧条件下会提高内皮细胞的存活率,使用EGFL6 siRNA在缺氧情况下将缺氧RF24细胞中的EGFL6沉默,并检查细胞死亡情况。如图6A所示,相比于常氧情况,几乎50%的细胞即使在5天后仍在缺氧情况下存活。与此相比,EGFL6基因沉默在缺氧情况下相比于未处理细胞在缺氧和常氧情况下造成75%的细胞死亡(图6H)。通过将小鼠后肢的股动脉切除使小鼠产生后肢缺血,这造成切断向后肢的供血和供氧(图6I)。如图6J至图6K,缺血小鼠显示出MVD(血管)显著减少,内皮细胞中EGFL6表达增加。用EGFL6处理后RF24细胞的迁移(图12C)和小管形成(图12D)增加。

[0173] 实施例7——EGFL6沉默抑制肿瘤生长和血管生成

[0174] 使用两个原位卵巢癌肿瘤模型SKOV3ip1和OVCAR5研究了EGFL6在基因沉默方面的治疗功效。从NCI-Frederick癌症研究和发展中心(Frederick,MD)购买了雌性无胸腺裸鼠(NCr-nu),所有小鼠研究均通过实验动物护理与使用委员会批准。按照美国实验动物护理认证协会规定的指南和美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策护理小鼠。对于肿瘤细胞注射,通过腹膜内(i.p)途径注射SKOV3ip1细胞(1×10^6)。对于抗体处理组,以5mg/kg体重每周给予纯化单克隆抗体,持续5周。在处死时,记录小鼠和肿瘤重量、肿瘤数量和分布。进行实体剖检的个人不清楚处理组的分配。用福尔马林、OCT(Miles, Inc., Elkhart, IN)固定组织试样或在液氮中速冻。

[0175] 如图8F所示,与用对照siRNA处理的荷瘤小鼠相比,单独用小鼠EGFL6siRNA以及

与人EGFL6siRNA结合来处理荷SKOV3ip1瘤动物显著减少肿瘤生长。单独人EGFL6siRNA对肿瘤减小没有太大影响。图8F示出了EGFL6对肿瘤结节数量以及观察到的肿瘤负荷的影响。单独用小鼠EGFL6siRNA以及与人EGFL6siRNA结合来处理荷OVCAR5瘤小鼠也显示出肿瘤重量和结节显著减少。

[0176] 用mEGFL6siRNA以及用小鼠和人EGFL6siRNA组合处理荷SKOV3ip1瘤小鼠相比于用对照siRNA显示出增殖细胞和微血管密度减少(图8C至图8D)。荷OVCAR5瘤动物也显示出类似的结果。为了确定小鼠EGFL6siRNA序列的脱靶效应,使用两个其他小鼠siRNA序列检验了EGFL6基因沉默对SKOV3ip1肿瘤生长的影响,两个序列均显示出肿瘤生长和肿瘤结节大量减少。

[0177] 用抗EGFL6抗体Mab#135和#93(E2-135&E2-93)进行处理极大地抑制了肿瘤生长(图8F),EGFL6抗体处理的小鼠中仅检测到残留癌细胞,但未处理的对照小鼠具有较大肿瘤负荷和肿瘤扩散,如肿瘤结节数量所指示的。相比于对照抗体处理组用抗EGFL6抗体(Mab E2-93和E2-135)进行处理也抑制癌细胞增殖(Ki67染色),并降低微血管密度(肿瘤血管生成,CD31IHC染色)(图8G)。

[0178] 实施例8——抗EGFL6阻断抗体在内皮细胞方面减少血管生成

[0179] 为了证实EGFL6阻断会影响其血管生成介导功能,研发了EGFL6功能阻断抗体并测试其在血管生成方面的活性。筛选了亲和力相近的与人和小鼠EGFL6结合的若干EGFL6抗体克隆。两种抗体(93和135)均达到所有结合亲和力并选择体外活性标准进行进一步研究。如图8B所示,用EGFL6重组蛋白质处理内皮细胞增加磷酸化Tie2和AKT蛋白质二者的表达。与此相比,EGFL6阻断抗体93和135造成两种磷酸化蛋白质表达降低。如图8D至图8E所示,用EGFL6重组蛋白质处理内皮细胞增强这些细胞的迁移和小管形成。然而,EGFL6阻断抗体显著降低了EGFL6介导功能对小管形成和迁移二者的影响。

[0180] 一种抗体经过人源化,其中,其被放置在人IgG1骨架内,使得能在人类癌症患者中使用,证实经过人源化后保留了抗体的结合亲和力和体外活性。

[0181] 实施例9——抗EGFL6阻断抗体对卵巢癌模型具有抗血管生成和抗肿瘤影响

[0182] 上述EGFL6的体外活性表明阻断EGFL6功能会增强破坏肿瘤血管的能力,从而增强抗肿瘤功效。为了测试这一点,研究了EGFL6抗体阻断EGFL6活性的能力以及抑制血管生成和肿瘤生长和血管生成的能力。

[0183] 用对照抗体和抗EGFL6抗体对荷SKOV3-ip1瘤小鼠进行处理。处理5周后,收获肿瘤并分析抗肿瘤和抗血管生成活性。与用对照抗体处理相比,用抗EGFL6抗体处理产生有效抗肿瘤活性。用抗EGFL6抗体93和135处理造成肿瘤重量和肿瘤结节显著减少(图9E和图9F)。与对照抗体处理组相比,用EGFL6阻断抗体处理的动物还显示出MVD降低(图9F),表明阻断EGFL6活性抑制了肿瘤生长和血管生成。EGFL6抗体不妨碍体外或体内伤口愈合(图9G),表明其可以调节肿瘤血管生成,而不影响正常组织修复。

[0184] V. 抗体可变序列

[0185] 下面示出了抗EGFL6抗体的可变DNA序列。

[0186] >E1-33H

[0187] CAGTCGCTGGAGGAGTCCGAGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGG GATCCCTGACACTCACCTGCAAAG
CCTCTGGACTCGACCTCAGTAGCT ACTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGG

ATCGCATGCATTTATGCTGGTAGTAGTGGTAGCACTTACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCC
AAAACCTCGTCGACCACG GTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTA TTTCTGTGC
GAGAGGTGGTGGTAGTACTTATGCTCAATATTTTAACTTG TGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCAG
(SEQ ID NO:133)

[0188] >E1-33K

[0189] GAGCTCGATATGACCCANACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACAGTCAGCATCAATT
GCCAGTCCAGTCCGAGTGTATAGG CACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCTC
CTGATCTACTGGGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTT AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTC
ACTCTCACCATCAGCGGCGT GCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCCGAATATGCTAG TGATAG
TGATAATCATTTTCGGCGGAGGGACCGAGCTGGAGATCCTAG (SEQ ID NO:134)

[0190] >E1-34H

[0191] GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCCAGCCTG AGGGATCCCTGACACTCACCTGCA
CAGCTTCTGGATTCTCCTCAGTA GTATTTATTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGAAGGGGCTGG AG
TTGATCGCATGCATTCAGATTACTAGTGGTATCACTTACTACGCGAG CTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCC
AAAATGTCGTCGACCACGG TGA CTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACCTAT TTCTGTGG
GAGAAGGGGATATGGTGCCTATGCTGGTACTGGTGCCTCT GACTTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCGTCTC
TTCAG (SEQ ID NO:135)

[0192] >E1-34K

[0193] GAGCTCGATCTGACCCAGACTGCATCGTCCGTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACCGTCACCATCAATT
GCCAGTCCAGTCAGAGTGTATAAT AACAACA ACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G
CTCCTGATCTACGAAGCATCCAAACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCG GTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG
TTCCTCTCACCATCAGCG GCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTATTGTGCAGGCGTTATG CTGGCTA
CATTTGGGCTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA G (SEQ ID NO:136)

[0194] >E1-80H

[0195] GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGTTCCAGCCTG GGGATCCCTGGCACTCACCTGCA
AAGCCTCTGGATTACCCCTCAATA GTTATTATATGTCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGT GG
ATCGGATGCATTGATAGTATGATGCTACTACGACTGCCTACGCGA ACTGGGCGAGAGGCCGATTACCATCTCC
AAGACCTCGTCGACCACG GTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTA TTTCTGTGC
GAGAGGCTATGGTCTGTTGATTGGATCTCTGGGGCCA GGGCACCTGGTCACCGTCTCTTCAG (SEQ ID NO:
137)

[0196] >E1-80K

[0197] ACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGTGGGAGGCACAGT CAGCATCAATTGCCAGTCCAGTC
AGAGTGTATAAGAACGCCTATTTA TCCTACTACTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAG
CTCCTGATCTACTGGGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG
TTCCTCTCACCATCAGCGA CGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGCCGAATATAG TAATGA
TAGTGATAATGGTTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAA AG (SEQ ID NO:138)

[0198] >E1-89H

[0199] GAGCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTG AGGGATCCCTGACACTCACCTGCG
CAGCCTCTGGATTCTCCTCAGTA GCGGCTACTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAG

TGGATCGGATGCATTTATGCTGGTAGTAGTGGTGGGCACATTTATT ACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACACC
ATCTCCCAAACCTCGTCG ACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGC CACATATTT
CTGTACAAGAGATAATTATGGTGGTGGTGGTTCTGCTTCC AAATTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTC
TTCAG (SEQ ID NO:139)

[0200] >E1-89K

[0201] GAGCTCGTGATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCAACT
GCCAGTCCAGTCAGAGTGTATAGT AACACCCTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G
CTCCTGGTCTATTATGCAGCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCGTCGCG GTTCAAAGGCAGTGGATATGGGACACAG
TCCACTCTCACCATCGCCGA TGTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGATATAAAAC TGCTGA
TTCTGATGGTATTGCTTTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGAAAAT CAAAG (SEQ ID NO:140)

[0202] >E2-93H

[0203] CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGGCCTGGTCCAGCCTGAGG GATCCCTGACACTCACCTGCAAAG
CCTCTGGATTCTCCTCAGTAGTT ATGGAGTGAAGTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTG GATC
GCGTATATTGGTCTTAGTAGTGAGATCACTTACTACGCGGGCTGG GCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAGCCC
TCGTCGACCACGGTGAC TCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTG TGTGAGAGA
TCTTTATCATAGTAATGGTTTGTGGGGCCCAGGCACCCT GGTACCATCTCTTCAG (SEQ ID NO:141)

[0204] >E2-93K

[0205] GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACAGTCACCGTCAGTT
GCCAGGCCAGTGAGAGCGTTTATAA TAATAACCCTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G
CTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAG
TTCACTCTCACCATCAGCAG CGTGCAATGTGCTGATGCTGCCACGTATTATTGTGTAGCCTTTAAAGGT TATGG
TACTGACGGCAATGCTTTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGAAAAT CAAAG (SEQ ID NO:142)

[0206] >E1-38H

[0207] GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTG AGGGATCCCTGACACTCACCTGCA
CAGCCTCTGGATTCTCCTTCAATA GCGGCTACTGGGTATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAG
TGGATCGCTTGCATCTATACTAGTAGTCTACTGGTGCATATACT ACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACACC
ATCTCCCAAACCTCGTCG ACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGC CACCTATTT
CTGTACAAGAGATAATTTTGGTGGTGGTGGTTCTGCTTCC AAATTGTGGGGCCCAGGCACCCTGGTCACCATCTC
TTCAG (SEQ ID NO:143)

[0208] >E1-38K

[0209] GAGCTCGTGATGACCCAGACTCCATCTTCCAAGTCTGTCCCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCGATT
GCCAGGCCAGTGAGAGTGTATAGT AACACCCTGTGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G
CTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCGTCGCGG TTCAAATGCAGTGGATCTGGGACACGG
TTCACTCTCACCATCAGCGGC GTGCAGTGTGAAGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGATATAAGACT GCCGA
TTCTGATGGTCTTGGTTTCCGGCGGAGGGACCGAGGTGAAAAT CAAA (SEQ ID NO:144)

[0210] >E1-52H

[0211] GAGCAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGACCTGGTCAAGCCTG AGGGATCCCTGACACTCGCCTGCA
CAGCTTCTGGATTACCCTCAGTA GCTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAA TGG
ATCGCATGCATTGATACTGATAATGATATTAGGACTGCCTACGCGA GCTGGGCGAGGGGCCGATTACCATCTCC

AGGACCTCGTCGACCACG GTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTA TTTCTGTGG
GAGAGGCTATGGTGCCTTCGGTTGGATCTCTGGGGCCA GGGCCCCTGGTCACCGTCTCTCAG (SEQ ID NO:
145)

[0212] >E1-52K

[0213] GAGCTCGATCTGACCCAGACACCAGCCTCCGTGTCTGCAGCTGT GGGAGGCACAGTCAGCATCAATT
GCCAGTCCAGTCCGAGTGTATAG GCACTACTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAAGCT C
CTGATCTACTGGGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGTT CAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTC
ACTCTCACCATCAGCGGCG TGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGAATATGCTA GTGATAG
TGATAATCATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGAAATCAAA G (SEQ ID NO:146)

[0214] >E2-36H

[0215] CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGTCGCTGGTACGCCTGGGAC ACCCCTGACACTCACCTGCACAG
TCTCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTA CCACATGGGCTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATACA TC
GGAATCATTAATAATTATGGTGCACATACTACGCGAGCTGGGCAA AAGGCCGATTCACCATCTCCAGAACCTCG
ACCACGGTGGATCTGAAA ATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGCCAG AAGTCCTGG
GATTCTGGTTATAATTCGTGGGGCCAGGCACCCTGGT CACCATCTCCTCAG (SEQ ID NO:147)

[0216] >E2-36K

[0217] GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCTTCCACGTCTGCGGCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCAACT
GCCAGTCCAGTCAGAATGTTTATAGT TACAACCGCTTATCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G
CTCCTGATCTACGAAGCATCCAACTGGCATCTGGGGTCCCATCGCG GTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG
TTCCTCTCACCATCAGCG GCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGGTTATG ATTGTAG
GAGTTCTGATTGTGATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGG AAATCAAAC (SEQ ID NO:148)

[0218] >E1-95H

[0219] AGCAGTTCGGTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCCG GGGCATCCCTGACACTCACCTGCA
CAGCCTCTGGATTCTCCTTCAGTA GCAATTCAATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGG
ATCGGATGCATTGCTAGTAGTAGTATAGTACATAGTACTTACTACGCGA GCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCATCTCC
AAAACCTCGTCGACCACG GTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACATGGCCACCTA TTTCTGTGC
GAGAGATTCTGGTAATCGTGGTTACCTTTATGCGGGCGA CTTTAACTTGTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCGT
CTCTTCAG (SEQ ID NO:149)

[0220] >E1-95K

[0221] GAGCTCGTGCTGACCCAGACTCCAGCCTCTGTGGAGGTAGCTGT GGGAGGCACAGTCACCATCAATT
GCCAGGCCAGTCAGAGCATTAAATA GTTGGTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCGTCCCAAATC CTG
ATCTACGAAGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTT AGTGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACT
CTCACCATCAGCGGCGT GCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATAGTTAT AGTAATGT
TGATAATAATATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTC AAAG (SEQ ID NO:150)

[0222] >E2-116H

[0223] CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGGCCTGGTCAAGCCTGAGG GATCCCTGACACTCACCTGCACAG
CCTCTGGATTTCGACCTCAGTAGCT CCTACTACATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAG TGG
ATCGTCTGTATTGACGGTGGTGGGGTGAGCCACTGCCTACCCG AGCTGGGCGAAAGGCCGATTCACCGTCTCC
AAAACCTCGTCGACCAC GGTGACTCTTCAAATGACCAGTCTGACAGTCGCGGACACGGCCACGT ATTTCTGTGC

GAGACGAGATGCTGGTGCTGGGAACGCCTTTAGCTTGT GGGGCCAGGCACCCTGGTCACCATCTCCTCAG (SEQ ID NO:151)

[0224] >E2-116K

[0225] GAGCTCGATATGACCCAGACTCCATCCCCCGTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCAGTT GCCAGTCCAGTCAAAGTGTTTATCTT CAGAACAACCTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G CTCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG TTCACTCTCACCATCAGCGA CCTGGAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGAGGGCGGTTACAG TGGATA TATCAATTCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAAG (SEQ ID NO:152)

[0226] >E2-135H

[0227] CAGTCGGTGAAGGAGTCCGAGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGG CATCCCTGACACTCACCTGCAAAG CCTCTGGATTGCACTTACAGTAGCA GCTACTTTATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGGCTGGAG TGG ATCGCATGCATTTATACTGTTATTAGTCGTAAGACTTATTACGCGA GCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCC AAAACCTCGGCGACCACG GTGGATCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTA TTTCTGTGC GAGATCGGCAACAATTGAAAGATTGGATCTCTGGGGCCA GGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCAG (SEQ ID NO: 153)

[0228] >E2-135K

[0229] GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCATCGCCCGTGTCTGCACCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCAATT GCCAGGCCAGTGAGAGTGTTTATAAT AACTACCGCTTATCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G CTCCTAATCTATGCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG TTCACTCTCGCCATCAGCGAT GTGGTGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGTAGGATATAAAAAGT GGTTA TATTGATAGTATTCCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTC AAAG (SEQ ID NO:154)

[0230] >E1-142H

[0231] CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGG CATCCCTGACACTCACCTGCACAG CTTCTGGATTACCATCAATAACT ACAACATTAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGG ATC GCACGTATTTGGAATGGTGATGGCAGCACATACTACGCGAGCTGG GCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAAACC TCGTCGACCACGGTGAC TCTACAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTG TCGGAGAAA TTTTAACTTGTGGGGCCAGGCACCCTGGTCACCATCTC TTCAG (SEQ ID NO:155)

[0232] >E1-142K

[0233] GAGCTCGTGCTGACCCAGACTCCATCTCCCCTGTCTGCAGCTGTG GGAGGCACAGTCACCATCAATT GCCAGTCCAGTGCAGAGTGTTTATAGT AACAACTACTTATCCTGGTTTCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCCAA G CCCCTGATCTATTATGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGG TTAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAG TTCACTCTCACCATCAGCGA CGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGAGGCGATTATAG TAGTAG TAGTGATATGTGTATTTTCGGCGGAGGGACCGAGCTGGAAAT CAAAG (SEQ ID NO:156)

[0234] 下面示出了抗EGFL6抗体的可变氨基酸序列。

[0235] >E1-33H

[0236] QSLEESEGLVQPEGLTLTCKASGLDLSSYYMCWVRQAPGKGLE WIACIYAGSSGSTYYASWAKG RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARGGGSTYAQYFNLWPGTLVTISS (SEQ ID NO:157)

[0237] >E1-33L

[0238] ELDMTTPASVSAAVGGTVSINCQSSPSVYRHYLSWYQQKPGQPPKL LIYWASTLASGVPSRFSGSGS

GTEFTLTISGVQCDDAATYYCAGEYASDS DNHFGGGTELEIL (SEQ ID NO:158)
[0239] >E1-34H
[0240] EQSVKESGGGLVQPEGSLTLTCTASGFSFSSIIWICWVRQAPGKGLE LIACIQITSGITYYASWAKG
RFTISKMSSTTVTLQMTSLTVADTATYFCGR RYGAYAGTGASDLWGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:159)
[0241] >E1-34L
[0242] ELDLTQTASSVSAAVGGTVTINCQSSQSVYNNNNLAWYQQKPGQPP KLLIYEASKLASGVPSRFKGS
GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCAGGYAG YIWAFFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:160)
[0243] >E1-80H
[0244] EQSVEESGGGLFQPGGSLALTCKASGFTLNSYYMSWVRQAPGKGL EWIGCIDSPTSPTTAYANWARG
RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFC ARGYGPVRLDLWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:161)
[0245] >E1-80LK
[0246] TQTPASVSAAVGGTVSINCQSSQSVYKNAYLSYLLAWYQQKPGQPP KLLIYWASTLASGVPSRFKGS
GSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAA EYSN DSDNGFFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:162)
[0247] >E1-89H
[0248] EQSLEESGGDLVKPEGSLTLTCAASGFSFSSGYWICWVRQAPGKGL EWIGCIYAGSSGGHIYYATWA
KGRFTISQTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF CTRDNYGGGGSASKLWGPGLTVTISS (SEQ ID NO:163)
[0249] >E1-89L
[0250] ELVMTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSQSVYSNNRLAWYQQKPGQPP KLLVYYAATLASGVPSRFKGS
GYGTQSTLTIADVQCDDAATYYCAGYKT ADSDGIAFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:164)
[0251] >E2-93H
[0252] QSVKESEGGLVQPEGSLTLTCKASGFSFSSYGVNWVRQAPGKGLEW IAYIGLSSEITYYAGWAKGRF
TISKPSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCVRDL YHSNGLWGPGLTVTISS (SEQ ID NO:165)
[0253] >E2-93L
[0254] ELDLTQTPSPVSAAVGGTVTVSCQASESVYNNNRLSWYQQKPGQPP KLLIYYASTLASGVPSRFSGS
GSGTQFTLTISVQCADAATYYCVAFKGY GTDGNAFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:166)
[0255] >E1-38H
[0256] EQSVKESGGDLVKPEGSLTLTCTASGFSFNSGYWVCWVRQAPGKGL EWIACIYTSSPTGAIYYATWA
KGRFTISQTSSTTVTLQMTSLTAADTATYF CTRDNFGGGGSASKLWGPGLTVTISS (SEQ ID NO:167)
[0257] >E1-38L
[0258] ELVMTQTPSSKSVVGGTVIDCQASESVYSNNRCAWYQQKPGQPP KLLIYYASTLASGVPSRFKCS
GSGTRFTLTISGVQCEDAATYYCAGYKTA DSDGLGFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:168)
[0259] >E1-52H
[0260] EQSVKESEGDLVKPEGSLTLACTASGFTLSSYYMCWVRQAPGKGLE WIACIDTDNDIRTAYASWARG
RFTISRTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCG RYGALRLDLWGQGLTVTISS (SEQ ID NO:169)
[0261] >E1-52L
[0262] ELDLTQTPASVSAAVGGTVSINCQSSPSVYRHYLSWYQQKPGQPPK LLIYWASTLASGVPSRFSGSG
SGTEFTLTISGVQCDDAATYYCAGEYASD SDNHFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:170)
[0263] >E2-36H
[0264] QSVKESEGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSLSSYHMGWVRQAPGKLEY IGIINNYGATYYASWAKGRFT

ISRTSTTVDLKMTSLTTEDTATYFCARSPGI PGYNSWPGTLVTISS (SEQ ID NO:171)

[0265] >E2-36L

[0266] ELDLTQTPSSTSAAVGGTVTINCQSSQNVYSYNRLSWFQQKPGQPP KLLIYEASKLASGVPSRFKGS
GSGTQFTLTISGVQCDDAATYYCAGGYD CRSSDCDAFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:172)

[0267] >E1-95H

[0268] SSSVEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSSNSMCWVRQAPGKGLE WIGCIASSSSHSTYYASWAKG
RFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADMATYFC ARDSGNRGYLYAGDFNLWPGTLVTVSS (SEQ ID NO:173)

[0269] >E1-95L

[0270] ELVLTQTPASVEVAVGGTVTINCQASQSINSWLSWYQQKPGQRPKL LIYEASTLASGVSSRFSGSGS
GTQFTLTISGVQCDDAATYYCQQGYSYSN VDNNIFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:174)

[0271] >E2-116H

[0272] QSLEESGGGLVKPEGSLTLTCTASGFDLSSSYMCWVRQAPGKGLE WIVCIDGGGGEPTAYPSWAKG
RFTVSKTSSTTVTLQMTSLTVADTATYFC ARR DAGAGNAFSLWPGTLVTISS (SEQ ID NO:175)

[0273] >E2-116L

[0274] ELDMTQTPSPVSAAVGGTVTISCQSSQSVYLQNNLAWYQQKPGQPP KLLIYYASTLASGVSSRFKGS
GSGTQFTLTISDLECDAAATYYCQGGYSG YINSFGGGTEVEIK (SEQ ID NO:176)

[0275] >E2-135H

[0276] QSVKESEGDLVKPGASLTLTCKASGFDLSSSYFMCWVRQAPGRGLE WIACIYTVISRKTYASWAKG
RFTISKTSATTVDLQMTSLTAADTATYFC ARSATIERLDLWGGTLVTVSS (SEQ ID NO:177)

[0277] >E2-135L

[0278] ELDLTQTPSPVSAPVGGTVTINCQASESVYNNYRLSWYQQKPGQPP KLLIYAASTLASGVPSRFKGS
GSGTQFTLAISDVVCDAAATYYCVGYKSG YIDSIPFGGGTEVVVK (SEQ ID NO:178)

[0279] >E1-142H

[0280] QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGFTINNYNINWVRQAPGKGLEWI ARIWNGDGSTYYASWAKGRF
TISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCAR NFNWPGTLVTISS (SEQ ID NO:179)

[0281] >E1-142L

[0282] ELVLTQTPSPVSAAVGGTVTINCQSSASVYSNNYLSWFQQKPGQPPK PLIYYASTLASGVPSRFKGS
GSGTQFTLTISDVQCDDAATYYCAGDYSSSS DMCIFGGGTELEIK (SEQ ID NO:180)

[0283] 根据本公开,在不过度实验的情况下可以完成或执行本文公开和要求保护的所有方法。虽然根据优选实施方式描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的理念、精神和范围的情况下可以对方法和步骤或方法步骤的顺序做出变动。更具体的,显而易见的是化学和生理学相关的某些药剂可以代替本文描述的药剂,同时仍实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这种类似代替物和修改均视为在所附权利要求限定的本发明的精神、范围和理念内。

[0284] 参考文献

[0285] 下面的参考文献以提供对本文所述的那些进行补充的示例程序或其他细节的程度通过引用具体地并入本文。

[0286] 美国专利申请No.2002/0172677

[0287] 美国专利申请No.2004/0126828

- [0288] 美国专利申请No.2005/0214860
- [0289] 美国专利No.3,817,837
- [0290] 美国专利No.3,850,752
- [0291] 美国专利No.3,939,350
- [0292] 美国专利No.3,996,345
- [0293] 美国专利No.4,196,265
- [0294] 美国专利No.4,275,149
- [0295] 美国专利No.4,277,437
- [0296] 美国专利No.4,366,241
- [0297] 美国专利No.4,469,797
- [0298] 美国专利No.4,472,509
- [0299] 美国专利No.4,606,855
- [0300] 美国专利No.4,703,003
- [0301] 美国专利No.4,742,159
- [0302] 美国专利No.4,767,720
- [0303] 美国专利No.4,816,567
- [0304] 美国专利No.4,867,973
- [0305] 美国专利No.4,870,287
- [0306] 美国专利No.4,938,948
- [0307] 美国专利No.4,946,778
- [0308] 美国专利No.5,021,236
- [0309] 美国专利No.5,091,513
- [0310] 美国专利No.5,164,296
- [0311] 美国专利No.5,196,066
- [0312] 美国专利No.5,223,409
- [0313] 美国专利No.5,403,484
- [0314] 美国专利No.5,420,253
- [0315] 美国专利No.5,565,332
- [0316] 美国专利No.5,571,698
- [0317] 美国专利No.5,627,052
- [0318] 美国专利No.5,656,434
- [0319] 美国专利No.5,739,169
- [0320] 美国专利No.5,760,395
- [0321] 美国专利No.5,770,376
- [0322] 美国专利No.5,789,208
- [0323] 美国专利No.5,801,005
- [0324] 美国专利No.5,821,337
- [0325] 美国专利No.5,824,311
- [0326] 美国专利No.5,830,880

- [0327] 美国专利No.5,844,091
- [0328] 美国专利No.5,846,945
- [0329] 美国专利No.5,858,657
- [0330] 美国专利No.5,861,155
- [0331] 美国专利No.5,871,907
- [0332] 美国专利No.5,969,108
- [0333] 美国专利No.6,054,297
- [0334] 美国专利No.6,165,464
- [0335] 美国专利No.6,365,157
- [0336] 美国专利No.6,406,867
- [0337] 美国专利No.6,709,659
- [0338] 美国专利No.6,709,873
- [0339] 美国专利No.6,753,407
- [0340] 美国专利No.6,814,965
- [0341] 美国专利No.6,849,259
- [0342] 美国专利No.6,861,572
- [0343] 美国专利No.6,875,434
- [0344] 美国专利No.6,881,557
- [0345] 美国专利No.6,891,024
- [0346] 美国专利No.6,946,646
- [0347] Ali-Fehmi等人,Expression of cyclooxygenase-2in advanced stage ovarian serous carcinoma:correlation with tumor cell proliferation,apoptosis, angiogenesis,and survival.American journal of obstetrics and gynecology 192, 819-825,2005.
- [0348] Baluk等人,Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Current opinion in genetics&development 15,102-111,2005.
- [0349] Buckanovich等人Tumor vascular proteins as biomarkers in ovarian cancer.Journal of clinical oncology:official journal of the American Society of Clinical Oncology 25,852-861,2007.
- [0350] Chim等人EGFL6promotes endothelial cell migration and angiogenesis through the activation of extracellular signal-regulated kinase.The Journal of biological chemistry 286,22035-22046,2011.
- [0351] Donninger等人,Whole genome expression profiling of advance stage papillary serous ovarian cancer reveals activated pathways.Oncogene 23, 8065-8077,2004.
- [0352] Halder等人,Focal adhesion kinase targeting using in vivo short interfering RNA delivery in neutral liposomes for ovarian carcinoma therapy.Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 12,4916-4924,2006.

- [0353] Landen等人,Therapeutic EphA2gene targeting in vivo using neutral liposomal small interfering RNA delivery.Cancer research 65,6910-6918,2005.
- [0354] Langley等人,Tissue-specific microvascular endothelial cell lines from H-2K(b)-tsA58mice for studies of angiogenesis and metastasis.Cancer Research 63,2971-2976,2003.
- [0355] Lu等人,Gene alterations identified by expression profiling in tumor-associated endothelial cells from invasive ovarian carcinoma.Cancer research 67,1757-1768,2007.
- [0356] Lu等人,Regulation of tumor angiogenesis by EZH2.Cancer cell 18, 185-197,2010.
- [0357] Oberauer等人,,EGFL6is increasingly expressed in human obesity and promotes proliferation of adipose tissue-derived stromal vascular cells. Molecular and cellular biochemistry 343,257-269,2010.
- [0358] Sood等人,,Molecular determinants of ovarian cancer plasticity.American Journal of Pathology 158,1279-1288,2001.
- [0359] Thaker等人,Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma.Nature medicine 12,939-944,2006.
- [0360] Yeung等人,Cloning of a novel epidermal growth factor repeat containing gene EGFL6:expressed in tumor and fetal tissues.Genomics 62,304-307,1999.

序列表

	<110> 得克萨斯大学体系董事会	
	<120> EGFL6特异性单克隆抗体及其使用方法	
	<130> UTFH.P0324W0	
	<140> 未知	
	<141> 2017-02-06	
	<150> 62/291,987	
	<151> 2016-02-05	
	<160> 180	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 1	
	ggactcgacc tcagtagcta ctactac	27
[0001]	<210> 2	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 2	
	atztatgctg gtagtagtgg tagcact	27
	<210> 3	
	<211> 42	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 3	
	gcgagaggtg gtgtagtac ttatgctcaa taitttaact tg	42
	<210> 4	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 4	

Gly Leu Asp Leu Ser Ser Tyr Tyr Tyr
1 5

<210> 5
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 5

Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr
1 5

<210> 6
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 6

Ala Arg Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Ala Gln Tyr Phe Asn Leu
1 5 10

[0002]

<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 7
ggattctcct tcagtagtat ttattgg

27

<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 8
attcagatta ctagtgtat cact

24

<210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 9

agaaggggat atggtccta tgctgtact ggtgcctctg acttg

45

<210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 10

Gly Phe Ser Phe Ser Ser Ile Tyr Trp
 1 5

<210> 11
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 11

Ile Gln Ile Thr Ser Gly Ile Thr
 1 5

[0003]

<210> 12
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 12

Arg Arg Gly Tyr Gly Ala Tyr Ala Gly Thr Gly Ala Ser Asp Leu
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 13

ggattcaccc tcaatagtta ttat

24

<210> 14
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

	<400> 14 attgatagtg atagtcctac tacg	24
	<210> 15 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 15 gcgagaggct atggtcctgt tcgattggat ctc	33
	<210> 16 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 16 Gly Phe Thr Leu Asn Ser Tyr Tyr 1 5	
[0004]	<210> 17 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 17 Ile Asp Ser Asp Ser Pro Thr Thr 1 5	
	<210> 18 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 18 Ala Arg Gly Tyr Gly Pro Val Arg Leu Asp Leu 1 5 10	
	<210> 19 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	

	<400> 19 ggatttcct tcagtagcgg ctactgg	27
	<210> 20 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 20 atztatgctg gtagtagtgg tgggcac	27
	<210> 21 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 21 tgtacaagag ataattatgg tgggtggtgt tctgcttcca aattg	45
[0005]	<210> 22 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 22 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly Tyr Trp 1 5	
	<210> 23 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 23 Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Gly His 1 5	
	<210> 24 <211> 15 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	

	Ile Gly Leu Ser Ser Glu Ile 1 5	
	<210> 30 <211> 10 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 30	
	Val Arg Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Leu 1 5 10	
	<210> 31 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 31 ggattctcct tcaatagcgg ctactgg	27
[0007]	<210> 32 <211> 27 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 32 atctatacta gtagtcctac tggtgcc	27
	<210> 33 <211> 45 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 33 tgtacaagag ataattttgg tgggtggtgt tctgcttcca aattg	45
	<210> 34 <211> 9 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 34	

Gly Phe Ser Phe Asn Ser Gly Tyr Trp
1 5

<210> 35
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 35

Ile Tyr Thr Ser Ser Pro Thr Gly Ala
1 5

<210> 36
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 36

Cys Thr Arg Asp Asn Phe Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Lys Leu
1 5 10 15

[0008]

<210> 37
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 37
ggattcaccc tcagtageta ctac

24

<210> 38
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 38
attgatactg ataatgatat tagg

24

<210> 39
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成CDR序列

<400> 39

gggagaggct atggtgcgct tcggttgat ctc

33

<210> 40
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 40

Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 41

Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ile Arg
 1 5

[0009]

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 42

Gly Arg Gly Tyr Gly Ala Leu Arg Leu Asp Leu
 1 5 10

<210> 43
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 43

ggattctccc tcagtagcta ccac

24

<210> 44
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

	<400> 44 attaataatt atggtgccac a	21
	<210> 45 <211> 33 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 45 gccagaagtc ctgggattcc tggttataat tcg	33
	<210> 46 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 46 Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His 1 5	
[0010]	<210> 47 <211> 7 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 47 Ile Asn Asn Tyr Gly Ala Thr 1 5	
	<210> 48 <211> 11 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 48 Ala Arg Ser Pro Gly Ile Pro Gly Tyr Asn Ser 1 5 10	
	<210> 49 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	

	<400> 49 ggatttcct tcagtagcaa ttca	24
	<210> 50 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 50 attgctagta gtagtagtca tagt	24
	<210> 51 <211> 51 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 51 gcgagagatt ctgtaatcg tggttacctt tatgcgggcg actttaactt g	51
[0011]	<210> 52 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 52 Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asn Ser 1 5	
	<210> 53 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 53 Ile Ala Ser Ser Ser Ser His Ser 1 5	
	<210> 54 <211> 17 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	

	<223> 合成CDR序列	
	<400> 64	
	Gly Phe Asp Phe Ser Ser Ser Tyr Phe	
	1 5	
	<210> 65	
	<211> 9	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 65	
	Ile Tyr Thr Val Ile Ser Arg Lys Thr	
	1 5	
	<210> 66	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 66	
[0014]	Ala Arg Ser Ala Thr Ile Glu Arg Leu Asp Leu	
	1 5 10	
	<210> 67	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 67	
	ggattcacca tcaataacta caac	24
	<210> 68	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 68	
	atttggaatg gtgatggcag c	21
	<210> 69	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成CDR序列	
<400> 79	
cagagtgttt ataataacaa caac	24
<210> 80	
<211> 9	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成CDR序列	
<400> 80	
gaagcatcc	9
<210> 81	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成CDR序列	
<400> 81	
gcaggcgggtt atgctggcta catttgggct	30
[0017]	
<210> 82	
<211> 8	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成CDR序列	
<400> 82	
Gln Ser Val Tyr Asn Asn Asn Asn	
1 5	
<210> 83	
<211> 3	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成CDR序列	
<400> 83	
Glu Ala Ser	
1	
<210> 84	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	合成CDR序列	
	<400>	89	
	Ala Ala Glu Tyr Ser Asn Asp Ser Asp Asn Gly		
	1	5	10
	<210>	90	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成CDR序列	
	<400>	90	
	cagagtgttt atagtaacaa ccgc		24
	<210>	91	
	<211>	9	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成CDR序列	
	<400>	91	
	tatgcagcc		9
[0019]	<210>	92	
	<211>	36	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成CDR序列	
	<400>	92	
	gcaggatata aaactgctga ttctgatggt attgct		36
	<210>	93	
	<211>	8	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成CDR序列	
	<400>	93	
	Gln Ser Val Tyr Ser Asn Asn Arg		
	1	5	
	<210>	94	
	<211>	3	
	<212>	PRT	
	<213>	人工序列	
	<220>		

	<223> 合成CDR序列	
	<400> 94	
	Tyr Ala Ala 1	
	<210> 95	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 95	
	Ala Gly Tyr Lys Thr Ala Asp Ser Asp Gly Ile Ala 1 5 10	
	<210> 96	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 96	
[0020]	gagagcgttt ataataataa ccgc	24
	<210> 97	
	<211> 9	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 97	
	tatgcatcc	9
	<210> 98	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 98	
	gtagccttta aagttatgg tactgacggc aatgct	36
	<210> 99	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	

	<400> 99	
	Glu Ser Val Tyr Asn Asn Asn Arg	
	1 5	
	<210> 100	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 100	
	Tyr Ala Ser	
	1	
	<210> 101	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 101	
	Val Ala Phe Lys Gly Tyr Gly Thr Asp Gly Asn Ala	
[0021]	1 5 10	
	<210> 102	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 102	
	gagagtgttt atagtaaca cgc	24
	<210> 103	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 103	
	gcaggatata agactgccga ttctgatggt cttggt	36
	<210> 104	
	<211> 8	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	

	<223> 合成CDR序列	
	<400> 104	
	Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Arg	
	1 5	
	<210> 105	
	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 105	
	Ala Gly Tyr Lys Thr Ala Asp Ser Asp Gly Leu Gly	
	1 5 10	
	<210> 106	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 106	
[0022]	ccgagtgttt ataggcacta c	21
	<210> 107	
	<211> 33	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 107	
	gcaggcgaat atgctagtga tagtgataat cat	33
	<210> 108	
	<211> 7	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成CDR序列	
	<400> 108	
	Pro Ser Val Tyr Arg His Tyr	
	1 5	
	<210> 109	
	<211> 11	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	

<220>
 <223> 合成CDR序列
 <400> 109
 Ala Gly Glu Tyr Ala Ser Asp Ser Asp Asn His
 1 5 10

<210> 110
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 110
 cagaatgttt atagttacaa ccgc

24

<210> 111
 <211> 9
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 111
 gaagcatcc

9

[0023]

<210> 112
 <211> 39
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 112
 gcagcgggtt atgattgtag gatttctgat tgtgatgct

39

<210> 113
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成CDR序列

<400> 113

Gln Asn Val Tyr Ser Tyr Asn Arg
 1 5

<210> 114
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

	<223> 合成CDR序列	
	<400> 124 gctgcatcc	9
	<210> 125 <211> 36 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 125 gtaggatata aaagtggta tattgatagt attcct	36
	<210> 126 <211> 8 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 126 Glu Ser Val Tyr Asn Asn Tyr Arg 1 5	
[0026]	<210> 127 <211> 3 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 127 Ala Ala Ser 1	
	<210> 128 <211> 12 <212> PRT <213> 人工序列	
	<220> <223> 合成CDR序列	
	<400> 128 Val Gly Tyr Lys Ser Gly Tyr Ile Asp Ser Ile Pro 1 5 10	
	<210> 129 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	

ggtagtactt atgetcaata ttttaacttg tggggccag gcaccctggt caccatctcc 360
tcag 364

<210> 134
<211> 331
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<220>
<221> misc_feature
<222> (18)..(18)
<223> n is a, c, g, or t

<400> 134
gagctcgata tgaccanac accagcctcc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcagc 60
atcaattgcc agtcagtc gagtgttat aggcactact taccctggta tcagcagaaa 120
ccagggcagc ctccaagct cctgatctac tgggcttcca ctctggcacc tggggtccca 180
tcgcggttca gcggcagtg atctgggaca gattcactc tcaccatcag cggcgtgcag 240
tgtgacgatg ctgccactta ctactgtgca ggcgaatatg ctagtgatag tgataatcat 300
ttcggcggag ggaccgagct ggagatccta g 331

[0028]

<210> 135
<211> 370
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 135
gagcagtcgg tgaaggagtc cgggggaggc ctggtccagc ctgagggatc cctgacactc 60
acctgcacag cttctggatt ctcttcagc agtatttatt ggatattctg ggtccgccag 120
gctccagga aggggctgga gttgatcga tgcattcaga ttactagtgg taccacttac 180
tacgcagct gggcgaaagg ccgattcacc atctccaaa tgctcgcac cacggtgact 240
ctgcaaatga ccagtctgac agtcgaggc acggccacct atttctgtgg gagaagggga 300
tatggtgctt atgctggtac tgggtcctct gacttgtggg gccaggcac cctggtcacc 360
gtctcttcag 370

<210> 136
<211> 331
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成寡核苷酸

<400> 136		
gagctcgatc tgaccagac tgcacgtcc gtgtctgcag ctgtgggagg cacctcacc		60
atcaattgcc agtccagtca gagtgtttat aataacaaca acttagcctg gtatcagcag		120
aaaccagggc agcctcccaa gctcctgac tacgaagcat ccaaactggc atctggggtc		180
ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagtcca ctctcacat cagcggcgtg		240
cagtgtgacg atgtgccac ttactattgt gcaggcggtt atgtggcta catttgggt		300
ttcgccggag ggaccgaggt ggtggtcaaa g		331
<210> 137		
<211> 355		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 137		
gagcagtcgg tggaggagtc cgggggaggc ctgttcagc ctgggggac cctggcactc		60
acctgcaaag cctctggatt caccctcaat agttattata tgtcctgggt ccgccaggt		120
ccaggggaagg ggctggagtg gatcggatgc attgatagtg atagtcctac tacgactgcc		180
tacgcgaact gggcgagagg ccgattcacc atctccaaga cctcgtcag cacggtgact		240
[0029] ctgcaaatga ccagtctgac agcccgaggc acggccacct atttctgtgc gagaggctat		300
ggtcctgttc gattggatct ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ttcag		355
<210> 138		
<211> 334		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成寡核苷酸		
<400> 138		
accagacac cagcctccgt gtctgcagct gtgggaggca cagtcagcat caattgccag		60
tccagtcaga gtgtttataa gaacgcctat ttatcctact acttagcctg gtatcagcag		120
aaaccagggc agcctcccaa gctcctgac tactgggctt ccaactctgc atctggggtc		180
ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagtcca ctctcacat cagcagcgtg		240
cagtgtgacg atgtgccac ttactactgt gcagccgaat atagtaatga tagtgataat		300
ggtttcggcg gagggaccga ggtggaatc aaag		334
<210> 139		
<211> 370		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		

	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 139	
	gagcagtcgt tggaggagtc cgggggagac ctgggtcaagc ctgagggatc cctgacactc	60
	acctgcgcag cctctggatt ctcttcagtc agcggctact ggatatgctg ggtccgccag	120
	gctccaggga aggggctgga gtggatcgga tgcatttatg ctggtagtag tgggtggcac	180
	atattattacg cgacctgggc gaaaggccga ttcaccatct cccaaacctc gtcgaccacg	240
	gtgactctgc aaatgaccag tctgacagcc gcggacacgg ccacatattt ctgtacaaga	300
	gataattatg gtggtggtgg ttctgcttcc aaattgtggg gccagggcac cctggtcacc	360
	atctcttcag	370
	<210> 140	
	<211> 337	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 140	
	gagctcgtga tgaccagac tccatcccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcaactgcc agtccagtca gagtgtttat agtaacaacc gcttagcctg gtatcagcag	120
	aaaccagggc agcctcccaa gctcctggtc tattatgcag cactctggc atctggggtc	180
[0030]	ccgtcgcggt tcaaaggcag tggatatggg acacagtcca ctctcaccat cgccgatgtg	240
	gtgtgtgacg atgtgccac ttactactgt gcaggatata aaactgctga ttctgatggt	300
	attgctttcg gcggaggac cgaggtggaa atcaaa	337
	<210> 141	
	<211> 346	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 141	
	cagtcggtga aggagtccga gggaggcctg gtccagcctg aggatccct gacactcacc	60
	tgcaaagcct ctggattctc cttcagtagt tatggagtga actgggtccg ccaggtcca	120
	gggaaggggc tggagtggat cgcgtatatt ggtcttagta gtgagatcac ttactacgcg	180
	ggctgggcga aaggccgatt caccatctcc aagccctcgt cgaccacggt gactctgcaa	240
	atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acctatttct gtgtgagaga tctttatcat	300
	agtaatggtt tgtggggccc aggcaccctg gtcaccatct cttcag	346
	<210> 142	
	<211> 337	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 142	
	gagctcgatc tgaccagac tccatcccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	gtcagttgcc aggccagtga gagcgtttat aataataacc gcttatcctg gtatcagcag	120
	aaaccagggc agcctcccaa gctcctgac tattatgcat ccaactctggc atctggggtc	180
	ccatcgcggt tcagcggcag tggatctggg acacagttca ctctcacat cagcagcgtg	240
	caatgtgctg atgctgccac gtattattgt gtagccttta aaggttatgg tactgacggc	300
	aatgctttcg gcggaggac cgaggtggaa atcaaag	337
	<210> 143	
	<211> 370	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 143	
	gagcagtcgg tgaaggagtc cgggggagac ctggtcaagc ctgagggatc cctgacactc	60
[0031]	acctgcacag cctctggatt ctccittcaat agcggctact gggtatgctg ggtccgccag	120
	gctccagga aggggctgga gtggatcgct tgcattata ctagtagtcc tactgggtcc	180
	atatactacg cgacctgggc gaaaggccga ttcaccatct cccaaacctc gtcgaccacg	240
	gtgactctgc aatgaccag tctgacagcc gcggacacgg ccacctattt ctgtacaaga	300
	gataattttg gtggtggtgg ttctgcttcc aaattgtggg gccagggcac cctggtcacc	360
	atctcttcag	370
	<210> 144	
	<211> 336	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 144	
	gagctcgtga tgaccagac tccatcttcc aagtctgtcc ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcgattgcc aggccagtga gagtgtttat agtaacaacc gctgtgcctg gtatcagcag	120
	aaaccagggc agcctcccaa gctcctgac tattatgcat ccaactctggc atctggggtc	180
	ccgtcgcggt tcaaatgcag tggatctggg acacggttca ctctcacat cagcggcgtg	240
	cagtgtgaag atgctgccac ttactactgt gcaggatata agactgccga ttctgatggt	300
	cttggtttcg gcggaggac cgaggtggaa atcaaa	336

	<210> 145	
	<211> 354	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 145	
	gagcagtcgg tgaaggagtc cgagggagac ctggtcaage ctgagggatc cctgacactc	60
	gcctgcacag cttctggatt caccctcagt agctactaca tgtgctgggt ccgccaggct	120
	ccagggaaagg ggctggaatg gatcgcgatg attgatactg ataatgatat taggactgcc	180
	tacgcgagct gggcgagggg ccgattcacc atctccagga cctcgtcgac cacgggtgact	240
	ctgcaaatga ccagtctgac agcccgaggac acggccacct atttctgtgg gagaggctat	300
	ggtgcgcttc ggttggatct ctggggccag ggcccctggt caccgtctct tcag	354
	<210> 146	
	<211> 331	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 146	
[0032]	gagctcgatc tgaccagac accagcctcc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcagc	60
	atcaattgcc agtccagtcc gagtgtttat aggcaactact tatectggta tcagcagaaa	120
	ccagggcagc ctccaagct cctgatctac tgggcttcca ctctggcacc tggggctcca	180
	tcgcggttca gcggcagtgg atctgggaca gaggctcact tcaccatcag cggcgtgcag	240
	tgtgacgatg ctgccactta ctactgtgca ggccaatatg ctagtgatag tgataatcat	300
	ttcggcggag ggaccgaggt ggaaatcaaa g	331
	<210> 147	
	<211> 343	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 147	
	cagtcggtga aggagtccga gggctgcctg gtcacgcctg ggacaccctc gacactcacc	60
	tgcacagtct ctggattctc cctcagtagc taccacatgg gctgggtccg ccaggctcca	120
	gggaaggggc tggaatacat cggaatcatt aataattatg gtgccacata ctacgcgagc	180
	tgggcaaaag gccgattcac catctccaga acctcgacca cgggtgatct gaaaatgacc	240
	agtctgacaa ccaggacac ggccacctat ttctgtgcca gaagtcctgg gattcctggt	300
	tataattcgt ggggcccagg caccctggtc accatctctc cag	343

<210> 148
 <211> 340
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 148
 gagctcgatc tgaccagac tccatcttc acgtctgagg ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcaactgcc agtccagtca gaatgtttat agttacaacc gcttatcctg gtttcagcag 120
 aaaccagggc agcctcccaa gctcctgac tacgaagcat ccaaactggc atctggggtc 180
 ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcacat cagcggcgtg 240
 cagtgtgacg atgctgccac ttactactgt gcaggcggtt atgattgtag gatttctgat 300
 tgtgatgctt tcggcggagg gaccgaggtg gaaatcaaac 340

<210> 149
 <211> 373
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

[0033] <400> 149
 agcagttcgg tggaggagtc cgggggagac ctggtcaagc ccggggcacc cctgacactc 60
 acctgcacag cctctggatt ctcttcagt agcaattcaa tgtgctgggt ccgccaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg gatcgatgc attgctagta gtagtagtca tagtacttac 180
 tacgcgagct gggcgaaagg ccgattcacc atctcaaaa cctcgtcgac cacggtgact 240
 ctgcaaatga ccagtctgac agccgcggac atggccacct atttctgtgc gagagattct 300
 ggtaatcgtg gttaccttta tgcgggcgac ttaacttgt ggggccagg caccctggtc 360
 accgtctctt cag 373

<210> 150
 <211> 334
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成寡核苷酸

<400> 150
 gagctcgtgc tgaccagac tccagcctct gtggaggtag ctgtgggagg cacagtcacc 60
 atcaattgcc aggccagtca gagcattaat agttggttat cctggtatca gcagaaacca 120
 gggcagcgtc ccaaactcct gatctacgaa gcatccactc tggcatctgg ggtctcatcg 180
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacacag ttcactctca ccatcagcgg cgtgcagtg 240
 gacgatgctg ccacttacta ctgtcaacag gggtatagtt atagtaatgt tgataataat 300

	attttcggcg gagggaccga ggtggtggtc aaag	334
	<210> 151	
	<211> 361	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 151	
	cagtcgttgg aggagtccgg gggaggcctg gtcaagcctg agggatccct gacactcacc	60
	tgcacagcct ctggattcga cctcagtagc tctactaca tgtgctgggt ccgccagget	120
	ccagggaagg ggctggagtg gatcgtctgt attgacggtg gtgggggtga gccactgcc	180
	tacccgagct gggcgaaagg ccgattcacc gtctcaaaa cctcgtcgac cacggtgact	240
	cttcaaatga ccagtctgac agtcgaggac acggccacgt atttctgtgc gagacgagat	300
	gctggtgctg ggaacgcctt tagcttgtgg ggcccaggca ccctggtcac catctcctca	360
	g	361
	<210> 152	
	<211> 331	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0034]	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 152	
	gagctcgata tgaccagac tccatcccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
	atcagttgcc agtccagtca aagtgtttat cttcagaaca acttagcctg gtatcagcag	120
	aaaccagggc agcctcccaa gtcctgatc tattatgcat ccactctggc atctggggtc	180
	tcatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagtcca ctctaccat cagcgacctg	240
	gagtgtgacg atgctgccac ttactactgt caggcgggtt acagtgata tatcaattct	300
	ttcggcggag ggaccgaggt ggaaatcaaa g	331
	<210> 153	
	<211> 355	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 153	
	cagtcggtga aggagtccga gggagacctg gtcaagcctg gggcatccct gacactcacc	60
	tgcaaagcct ctggattcga cttcagtagc agctacttta tgtgctgggt ccgccagget	120
	ccaggagggg ggctggagtg gatcgcacgc atttatactg ttattagtcg taagacttat	180

tacgcgagct gggcgaaagg ccgattcacc atctccaaaa cctcggcgac cacggtggat	240
ctgcaaatga ccagtctgac agcccgggac acggccacct atttctgtgc gagatcggca	300
acaattgaaa gattggatct ctggggccag ggcaccctgg tcaccgtctc ctgag	355
<210> 154	
<211> 337	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 154	
gagctcgatc tgaccagac tccatcgccc gtgtctgcac ctgtgggagg cacagtcacc	60
atcaattgcc aggccagtga gagtgtttat aataactacc gcttatcctg gtatcagcag	120
aaaccagggc agcctcccaa gctcctaate tatgtctgat ccaactctggc atctggggtc	180
ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagtcca ctctcgccat cagcgatgtg	240
gtgtgtgacg atgtgccac ttactactgt gtaggatata aaagtggta tattgatagt	300
attcctttcg gcggaggac cgaggtggtg gtcaaaag	337
<210> 155	
<211> 334	
<212> DNA	
[0035] <213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 155	
cagtcgttgg aggagtccgg gggagacctg gtcaagcctg gggcatcct gacactcacc	60
tgcacagctt ctggattcac catcaataac tacaacatta actgggtccg ccaggctcca	120
gggaaggggc tggagtggat cgcacgtatt tggaatggtg atggcagcac atactacgcg	180
agctgggcga aaggccgatt caccatctcc aaaacctcgt cgaccacggt gactctacaa	240
atgaccagtc tgacagccgc ggacacggcc acctatttct gtgcgagaaa ttttaacttg	300
tggggcccag gcaccctggt caccatctct tcag	334
<210> 156	
<211> 337	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成寡核苷酸	
<400> 156	
gagctcgtgc tgaccagac tccatctccc gtgtctgcag ctgtgggagg cacagtcacc	60
atcaattgcc agtccagtgc gagtgtttat agtaacaact acttatcctg gtttcagcag	120
aaaccagggc agcctcccaa gccctgatc tattatgcat ccaactctggc atctggggtc	180

ccatcgcggt ttaaaggcag tggatctggg acacagttca ctctcaccat cagcgacgtg 240
 cagtgtgacg atgctgccac ttactactgt gcaggcgatt atagtagtag tagtgatag 300
 tgtattttcg gcggaggac cgagctggaa atcaaag 337

<210> 157
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 157

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Leu Asp Leu Ser Ser Tyr Tyr
 20 25 30

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60

[0036]

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Ala Gln Tyr Phe Asn Leu Trp Gly
 100 105 110

Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
 115 120

<210> 158
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 158

Glu Leu Asp Met Thr Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly Gly
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ile Asn Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Tyr Arg His Tyr

<210> 160
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 160

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Ala Ser Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ala Gly
 85 90 95

[0038]

Tyr Ile Trp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 161
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 161

Glu Gln Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Phe Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Ala Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asn Ser Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Asp Ser Asp Ser Pro Thr Thr Thr Ala Tyr Ala Asn Trp
 50 55 60

Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Ile Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Cys Ile Tyr Ala Gly Ser Ser Gly Gly His Ile Tyr Tyr Ala
50 55 60

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Thr Ser Ser Thr Thr
65 70 75 80

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Thr Arg Asp Asn Tyr Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Lys Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 164

<211> 112

<212> PRT

[0040] <213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 164

Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Arg Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Val Tyr Tyr Ala Ala Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Gln Ser Thr Leu Thr Ile Ala Asp Val
65 70 75 80

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Thr Ala
85 90 95

Asp Ser Asp Gly Ile Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys

	100	105	110
<210>	165		
<211>	115		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	165		
Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Gly Leu Val Gln Pro Glu Gly Ser	1	5	10 15
Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr Gly	20	25	30
Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala	35	40	45
Tyr Ile Gly Leu Ser Ser Glu Ile Thr Tyr Tyr Ala Gly Trp Ala Lys	50	55	60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln	65	70	75 80
[0041] Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Arg	85	90	95
Asp Leu Tyr His Ser Asn Gly Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr	100	105	110
Ile Ser Ser	115		
<210>	166		
<211>	112		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成多肽		
<400>	166		
Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly	1	5	10 15
Gly Thr Val Thr Val Ser Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Asn Asn	20	25	30
Asn Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu	35	40	45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val
65 70 75 80

Gln Cys Ala Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Ala Phe Lys Gly Tyr
85 90 95

Gly Thr Asp Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 167

<211> 123

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 167

Glu Gln Ser Val Lys Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly
1 5 10 15

[0042]

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Asn Ser Gly
20 25 30

Tyr Trp Val Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Ala Cys Ile Tyr Thr Ser Ser Pro Thr Gly Ala Ile Tyr Tyr Ala
50 55 60

Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Gln Thr Ser Ser Thr Thr
65 70 75 80

Val Thr Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr
85 90 95

Phe Cys Thr Arg Asp Asn Phe Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Lys Leu
100 105 110

Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 168

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽
 <400> 168
 Glu Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Ser Lys Ser Val Pro Val Gly
 1 5 10 15
 Gly Thr Val Thr Ile Asp Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
 20 25 30
 Asn Arg Cys Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Lys Cys Ser Gly Ser Gly Thr Arg Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Tyr Lys Thr Ala
 85 90 95
 Asp Ser Asp Gly Leu Gly Phe Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
 100 105 110

[0043]

<210> 169
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成多肽
 <400> 169
 Glu Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val Lys Pro Glu Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Thr Leu Ala Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Cys Ile Asp Thr Asp Asn Asp Ile Arg Thr Ala Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60
 Ala Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Gly Arg Gly Tyr Gly Ala Leu Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Ile Ser Ser
 115

<210> 170
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 170

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Ser Ile Asn Cys Gln Ser Ser Pro Ser Val Tyr Arg His
 20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

[0044] Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln
 65 70 75 80

Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Glu Tyr Ala Ser Asp
 85 90 95

Ser Asp Asn His Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 171
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 171

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr His
 20 25 30

Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Ile Gly
35 40 45

Ile Ile Asn Asn Tyr Gly Ala Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Val Asp Leu Lys Met Thr
65 70 75 80

Ser Leu Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Pro
85 90 95

Gly Ile Pro Gly Tyr Asn Ser Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile
100 105 110

Ser Ser

- <210> 172
- <211> 113
- <212> PRT
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 合成多肽

[0045]

<400> 172

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ser Ser Thr Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Gln Asn Val Tyr Ser Tyr
20 25 30

Asn Arg Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Glu Ala Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Asp Cys
85 90 95

Arg Ser Ser Asp Cys Asp Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 173
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 173

Ser Ser Ser Val Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Ser Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Ser Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Cys Ile Ala Ser Ser Ser Ser His Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
 50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
 65 70 75 80

[0046] Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Met Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Gly Asn Arg Gly Tyr Leu Tyr Ala Gly Asp Phe Asn
 100 105 110

Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 174
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 174

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ala Ser Val Glu Val Ala Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Ser Ile Asn Ser Trp
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Glu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys
65 70 75 80

Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Ser Tyr Ser Asn
85 90 95

Val Asp Asn Asn Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
100 105 110

<210> 175

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 175

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Glu Gly Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asp Leu Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

[0047]

Tyr Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Val Cys Ile Asp Gly Gly Gly Glu Pro Thr Ala Tyr Pro Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Val Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ala Gly Ala Gly Asn Ala Phe Ser Leu Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
115 120

<210> 176

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 176

Glu Leu Asp Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Ser Cys Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Leu Gln
20 25 30

Asn Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Ser Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Leu
65 70 75 80

Glu Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gly Gly Tyr Ser Gly
85 90 95

Tyr Ile Asn Ser Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Glu Ile Lys
100 105 110

[0048]

<210> 177

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 177

Gln Ser Val Lys Glu Ser Glu Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Ser Ser Tyr
20 25 30

Phe Met Cys Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Ala Cys Ile Tyr Thr Val Ile Ser Arg Lys Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp
50 55 60

Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ala Thr Thr Val Asp
65 70 75 80

Leu Gln Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Ala Thr Ile Glu Arg Leu Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 178
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 178

Glu Leu Asp Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Pro Val Gly
 1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Asn Asn
 20 25 30

Tyr Arg Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45

[0049] Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Ala Ile Ser Asp Val
 65 70 75 80

Val Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gly Tyr Lys Ser Gly
 85 90 95

Tyr Ile Asp Ser Ile Pro Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
 100 105 110

<210> 179
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成多肽

<400> 179

Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15

Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Ile Asn Asn Tyr Asn
 20 25 30

Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Ala
35 40 45

Arg Ile Trp Asn Gly Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Thr Ser Ser Thr Thr Val Thr Leu Gln
65 70 75 80

Met Thr Ser Leu Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
85 90 95

Asn Phe Asn Leu Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Ile Ser Ser
100 105 110

<210> 180

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

[0050]

<400> 180

Glu Leu Val Leu Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
1 5 10 15

Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser Ala Ser Val Tyr Ser Asn
20 25 30

Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Pro
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
65 70 75 80

Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Asp Tyr Ser Ser
85 90 95

Ser Ser Asp Met Cys Ile Phe Gly Gly Gly Thr Glu Leu Glu Ile Lys
100 105 110

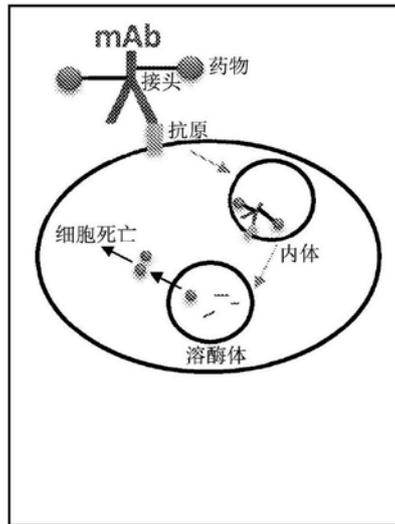


图1

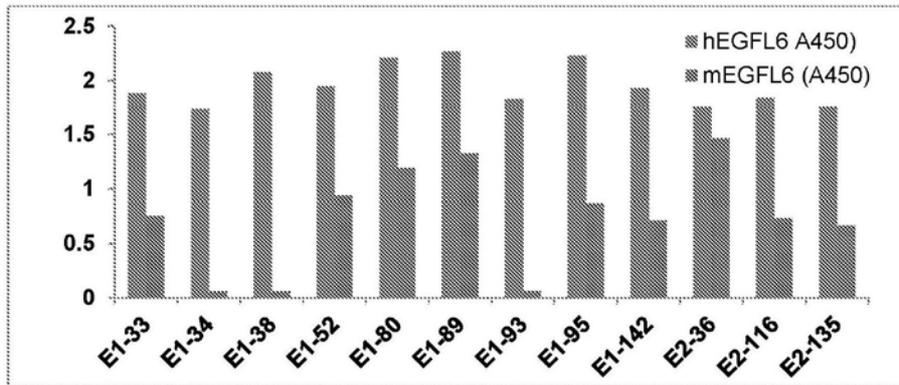


图2

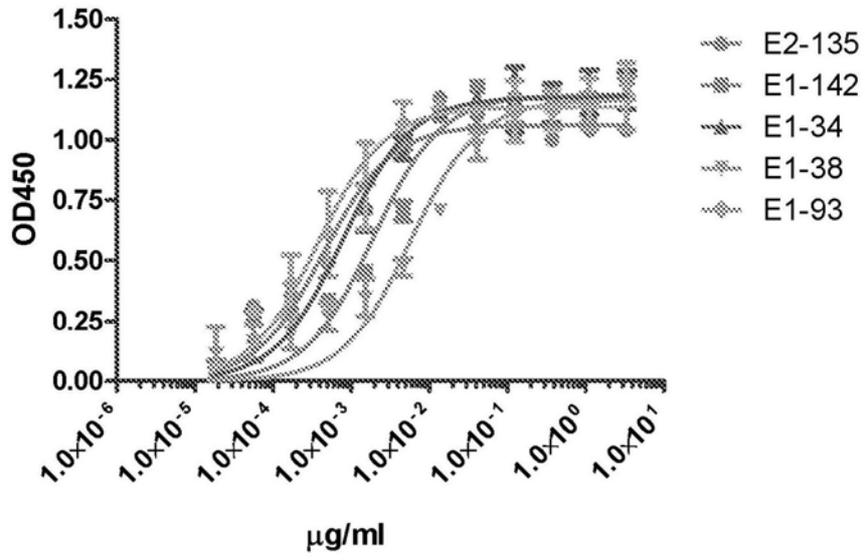


图3

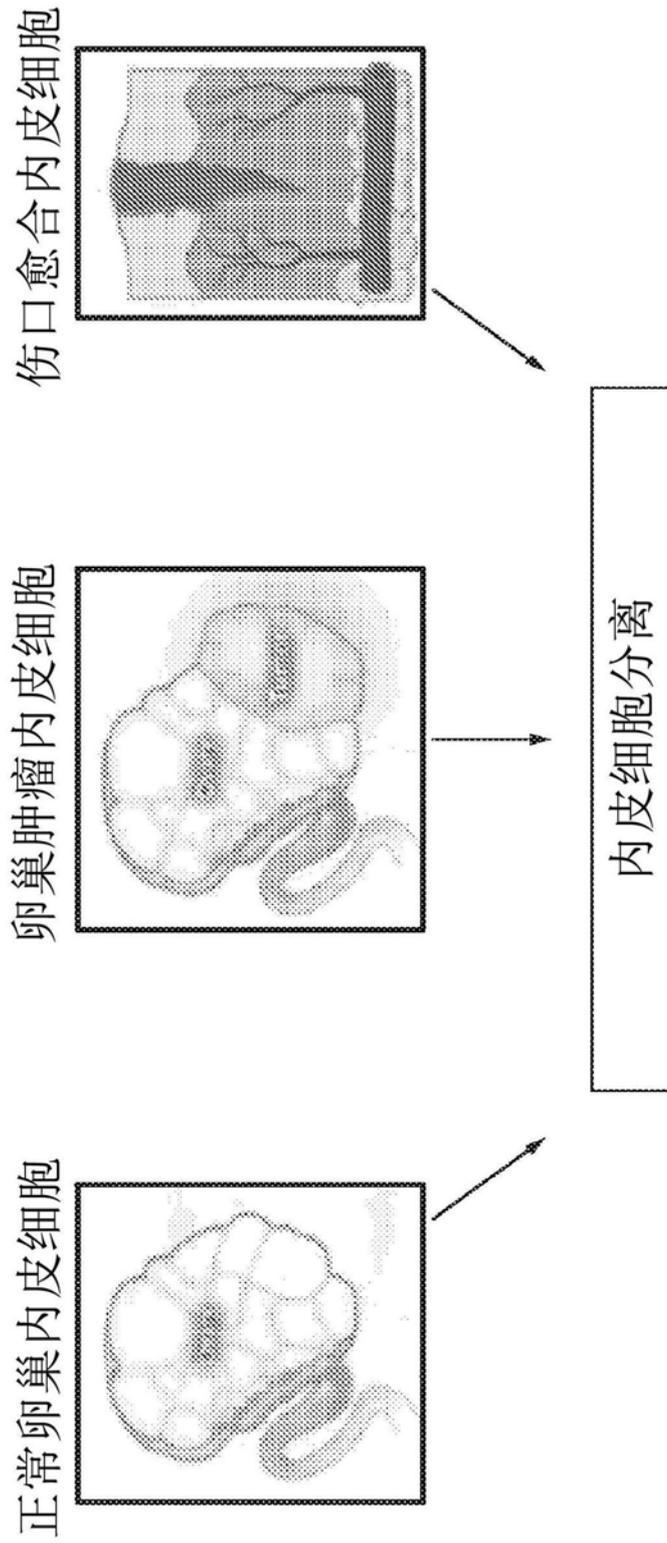


图4A

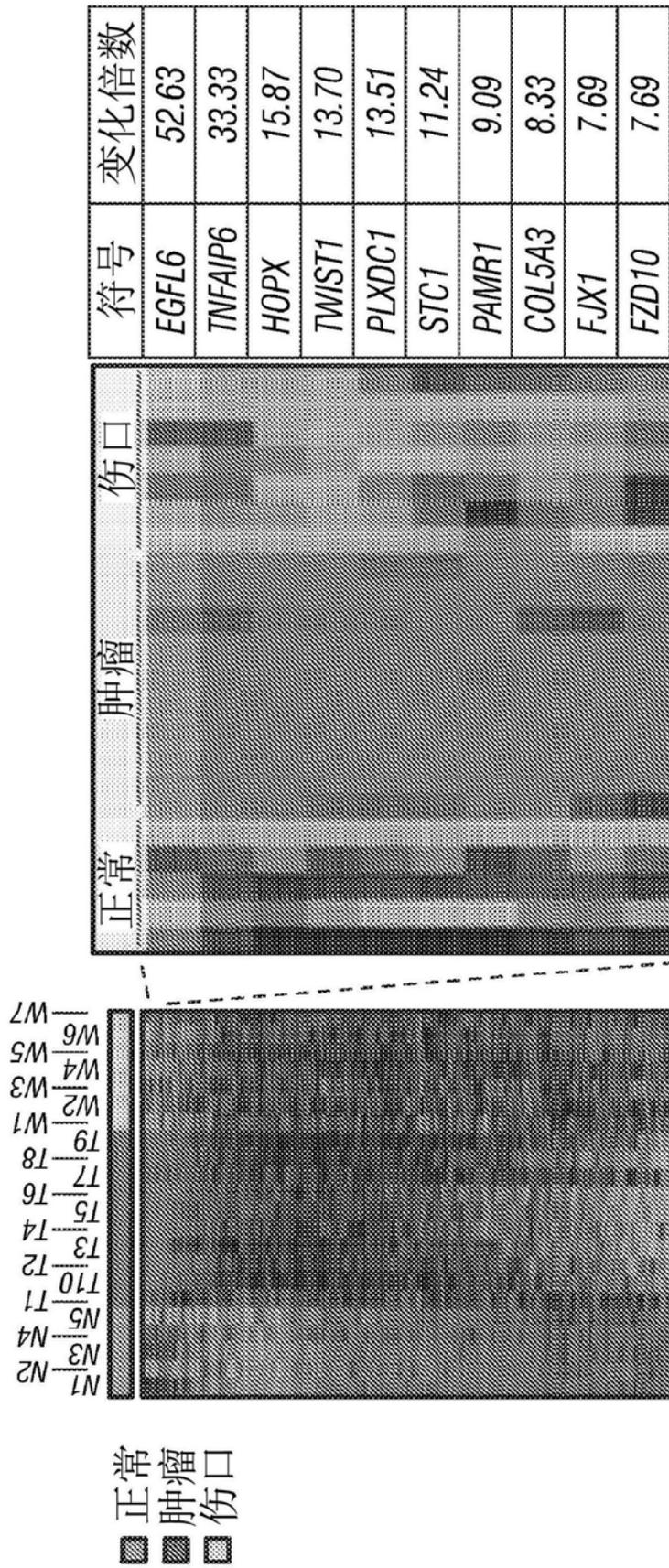


图4B

EGFL6表达

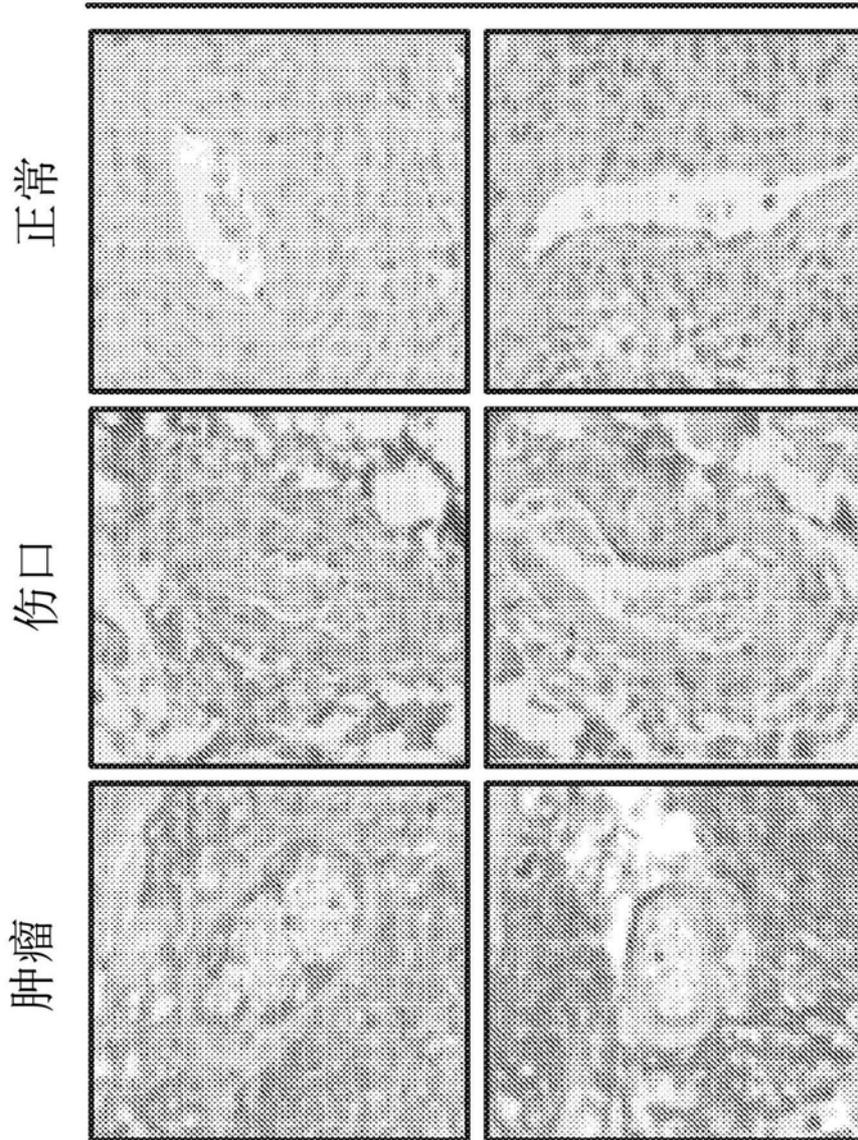
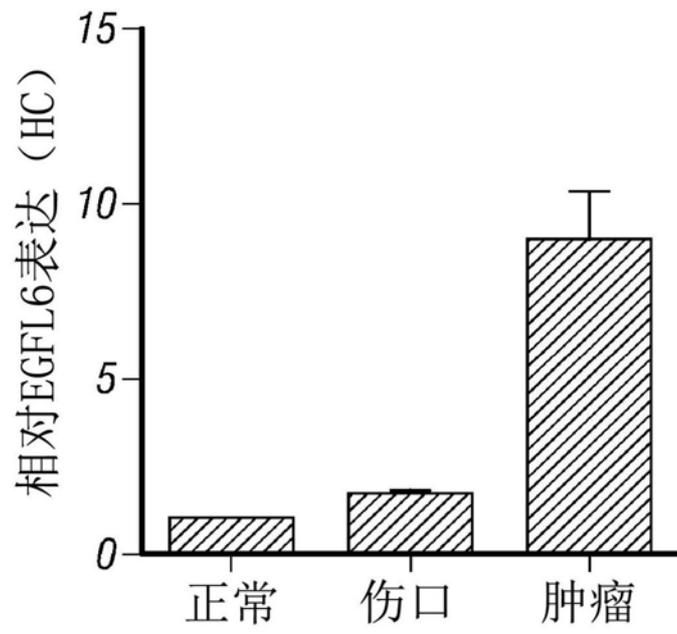


图4C



EGFL6

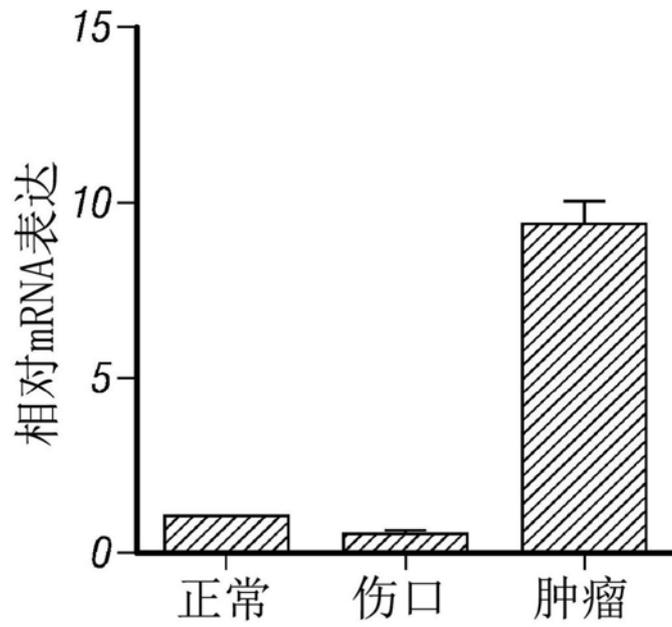


图4D

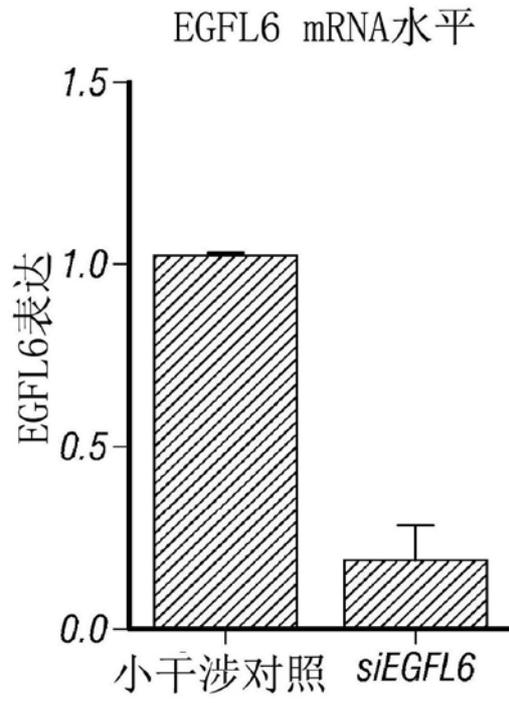


图5A

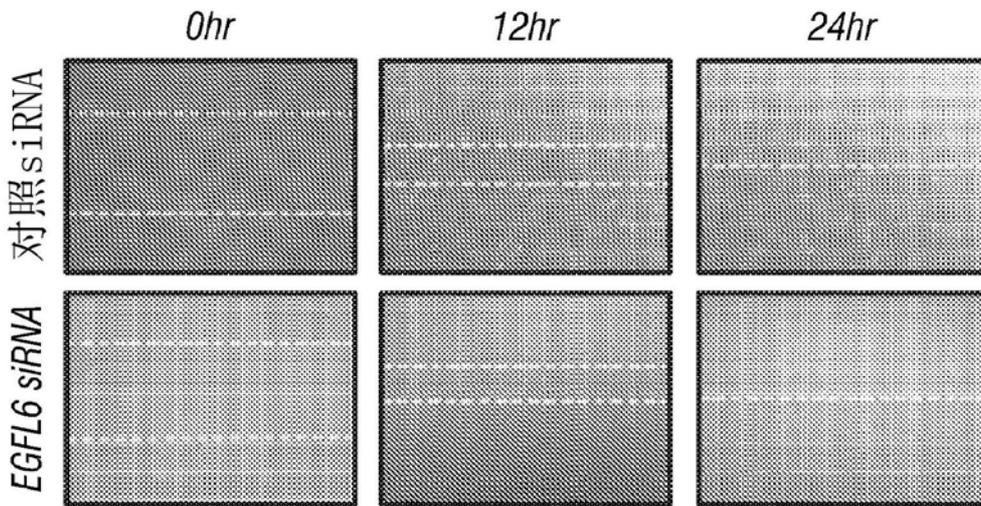


图5B

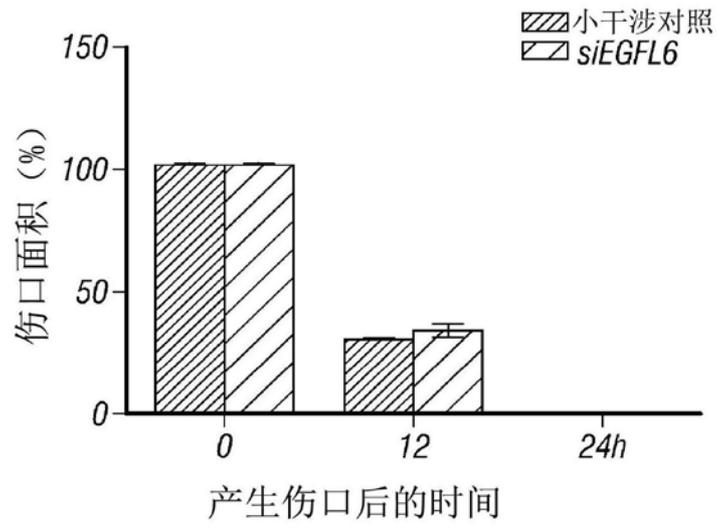


图5C

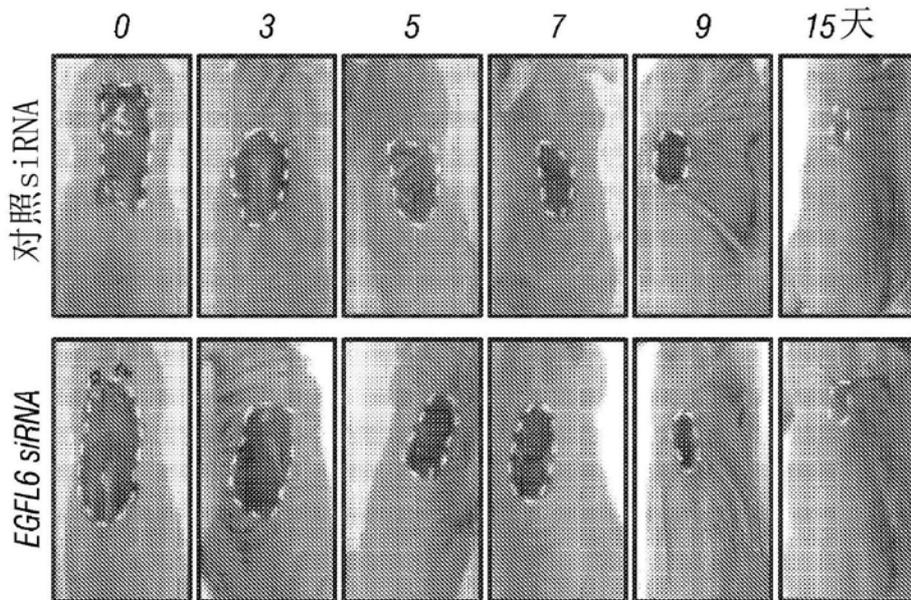


图5D

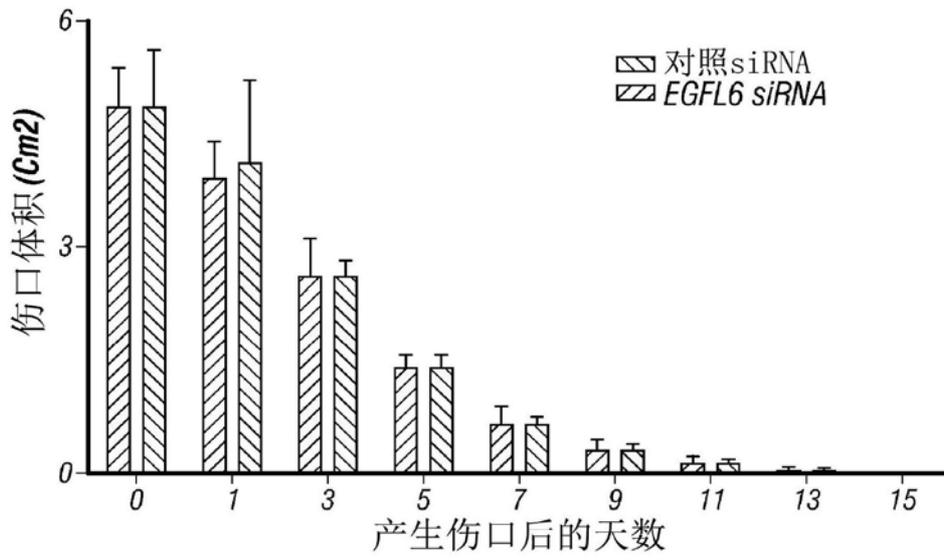


图5E

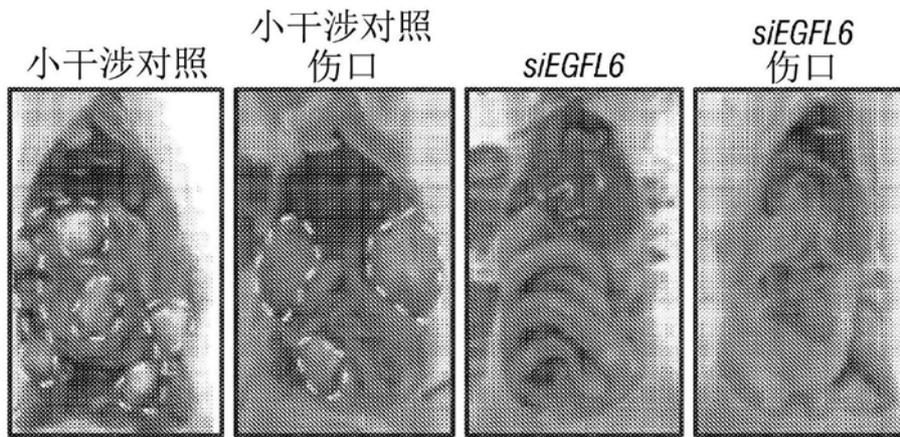


图5F

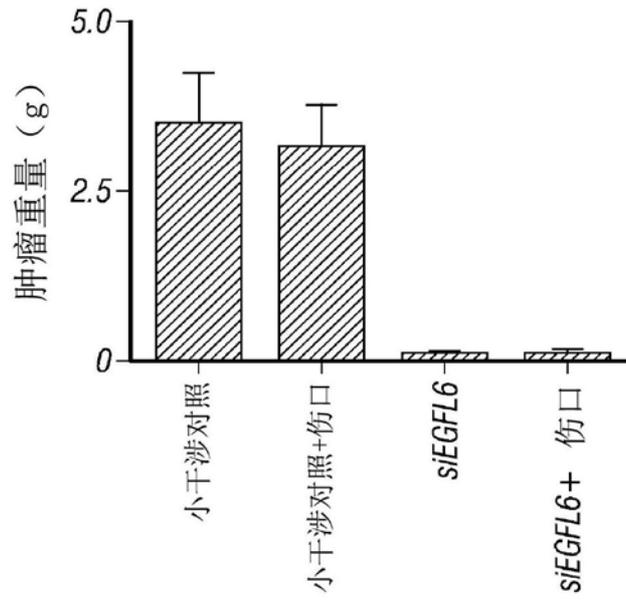


图5G

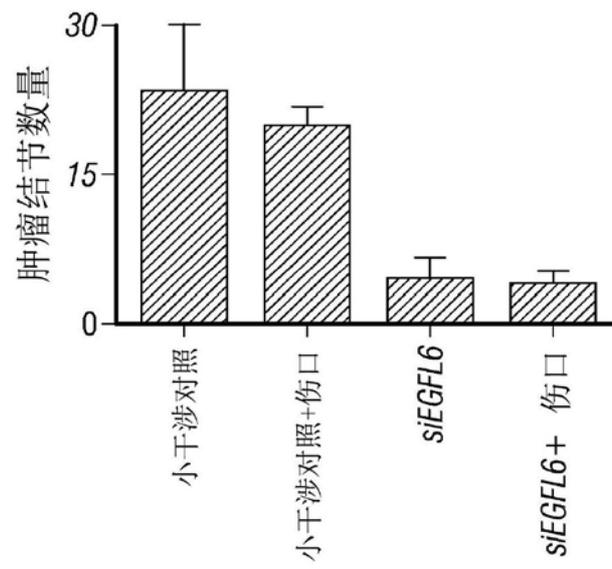


图5H

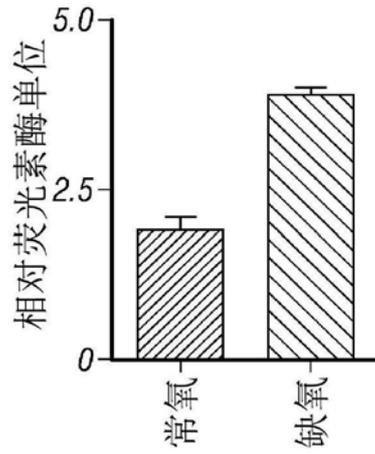


图6A

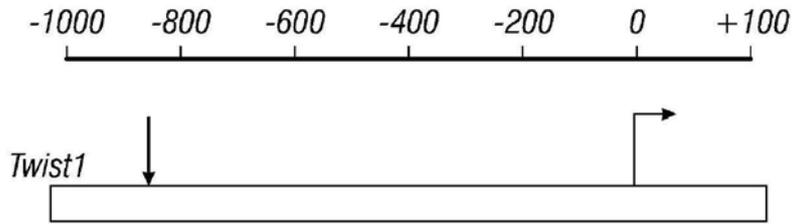


图6B

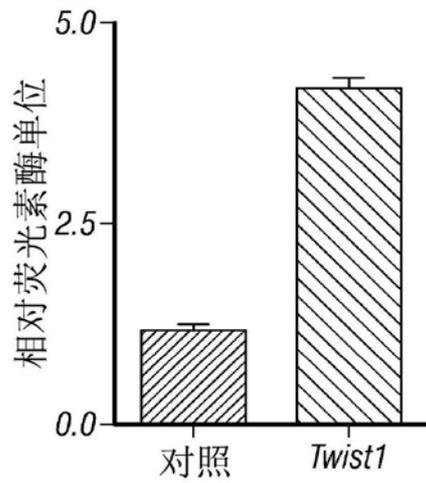


图6C

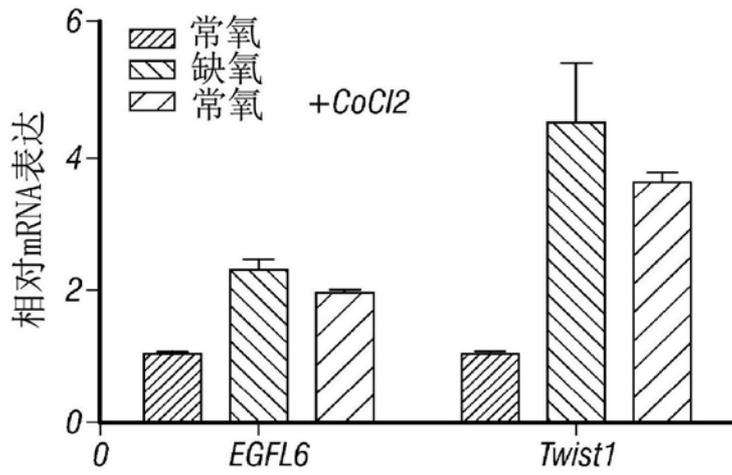


图6D

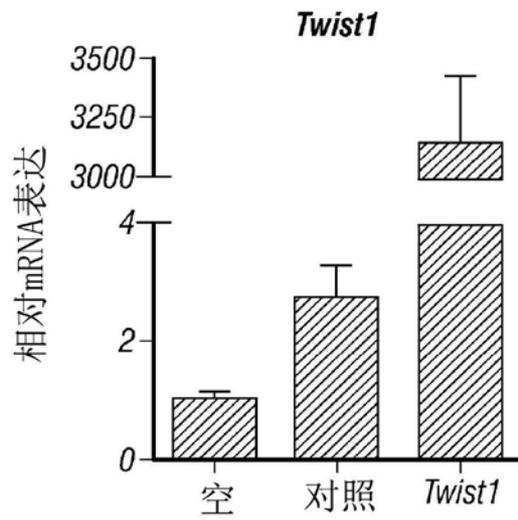


图6E

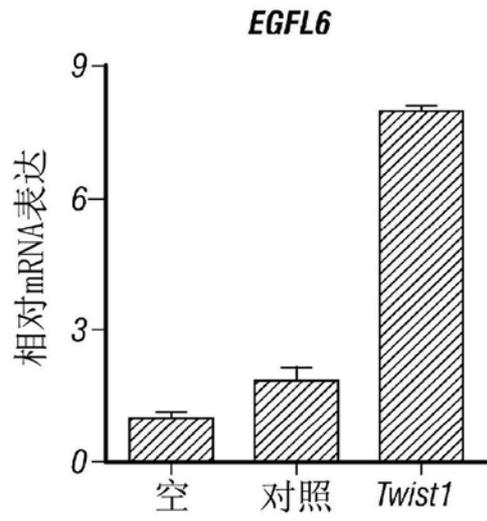


图6F

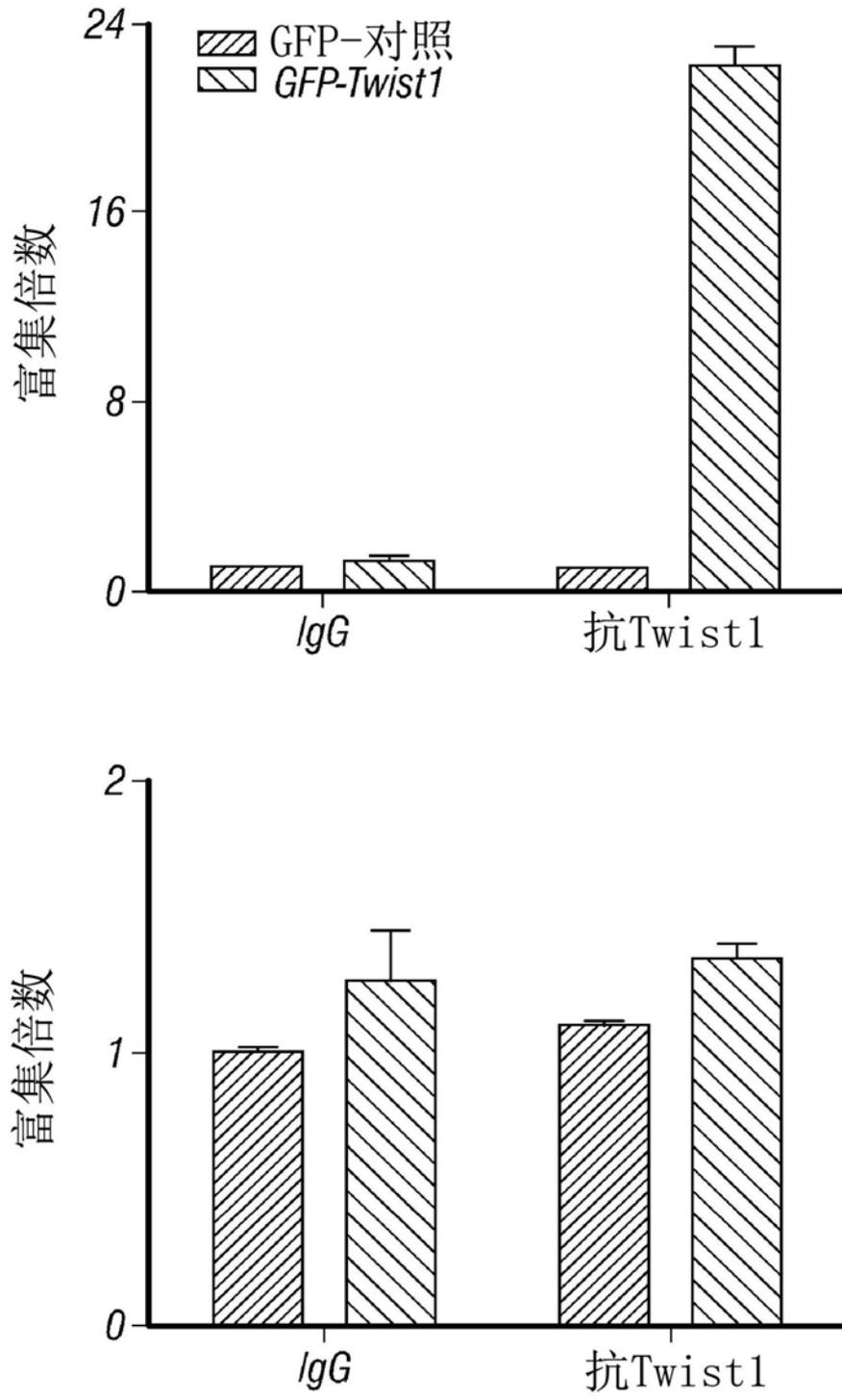


图6G

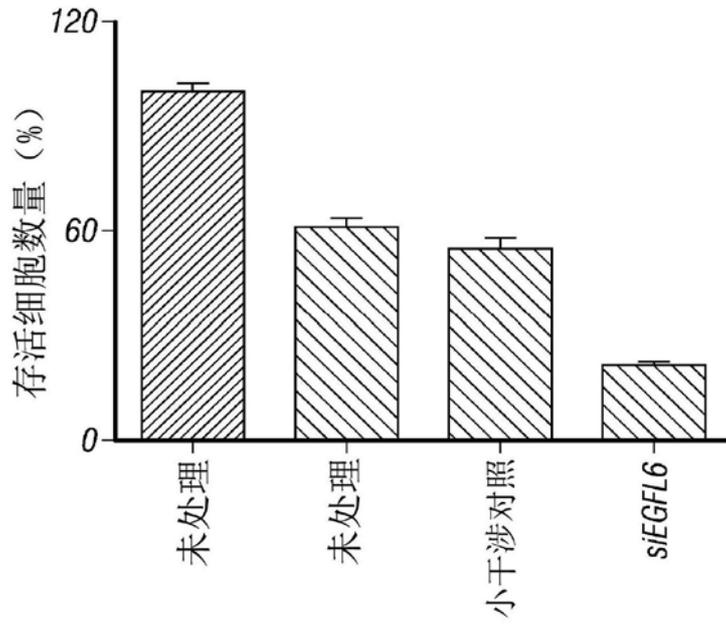


图6H

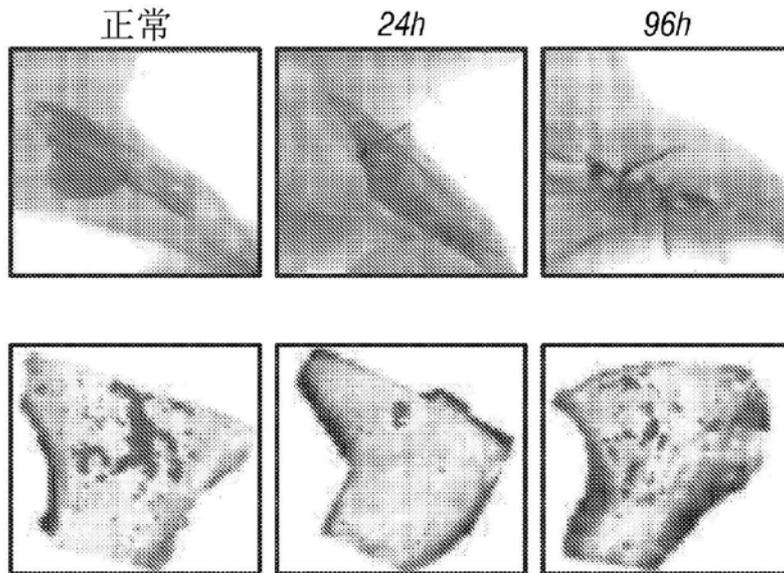


图6I

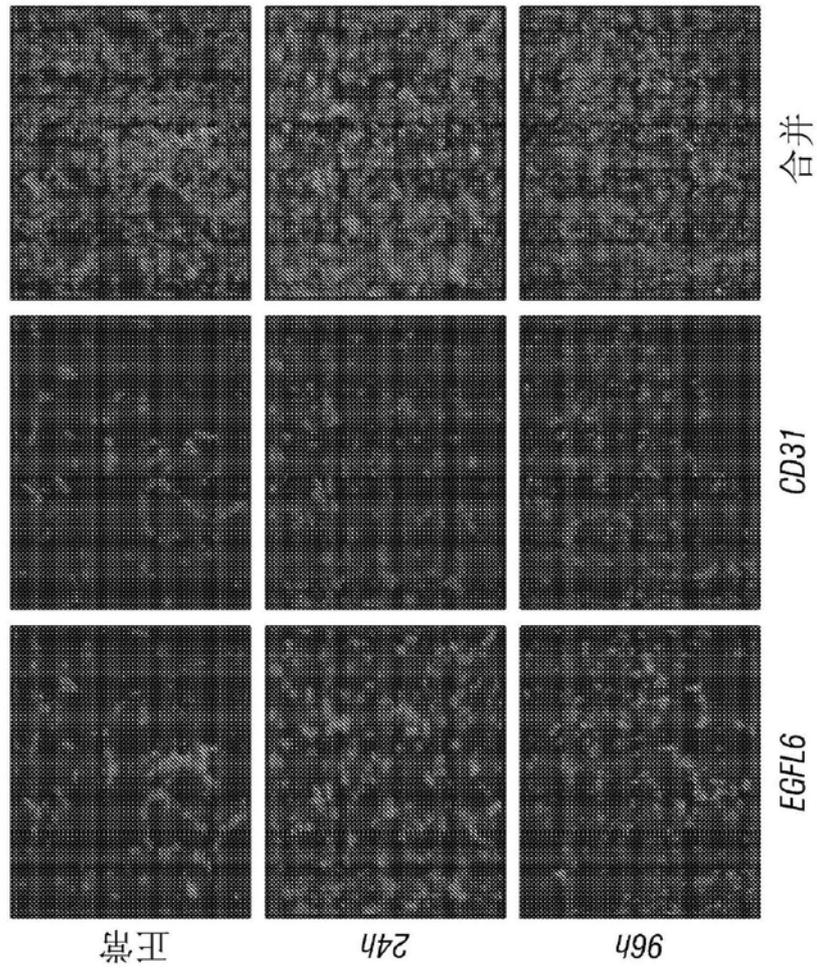


图6J

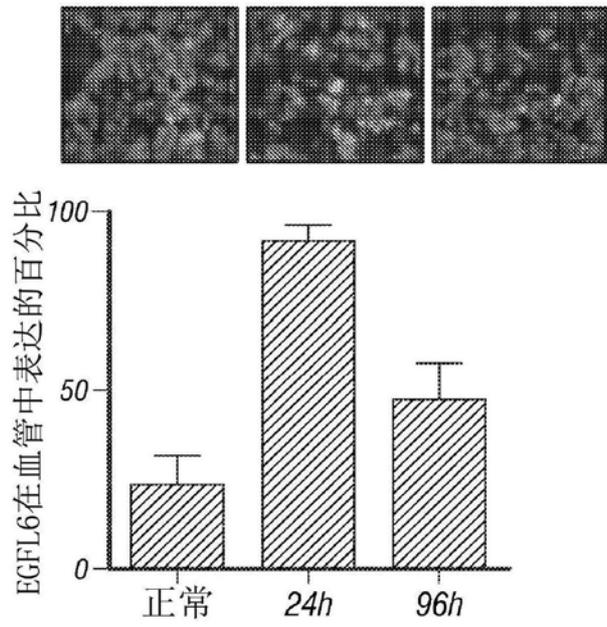


图6K

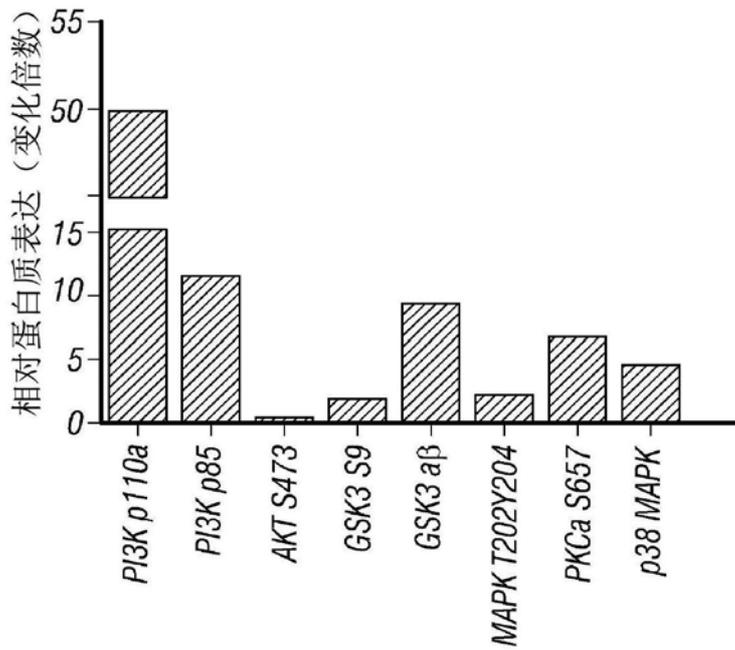


图7A

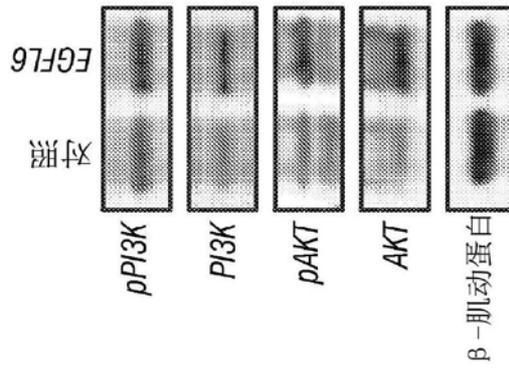


图7B

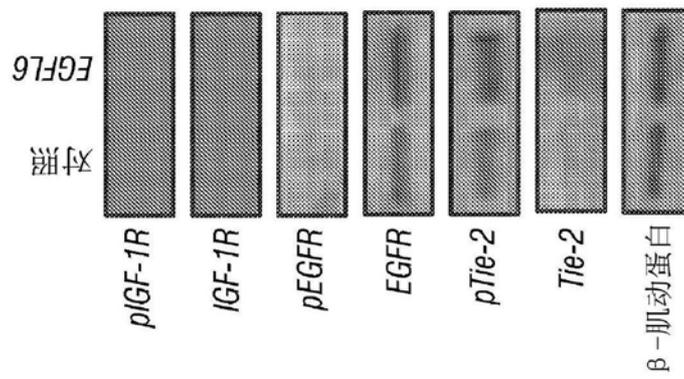


图7C

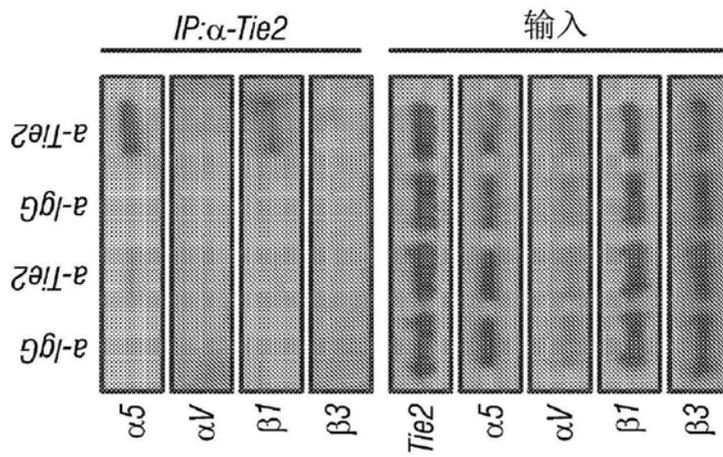


图7D

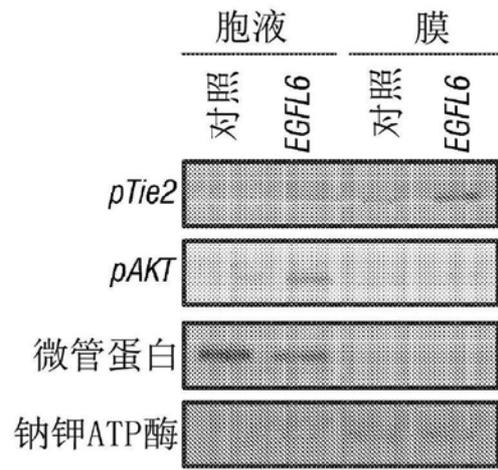


图7E

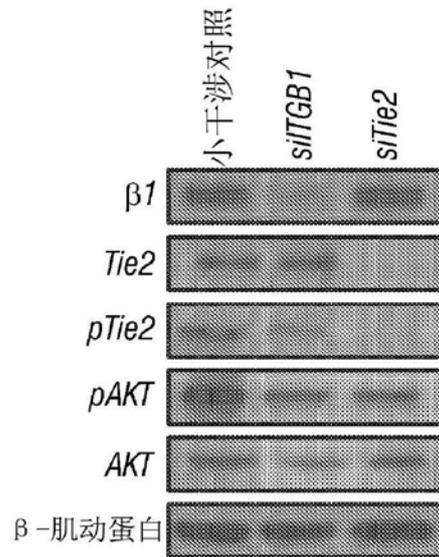


图7F

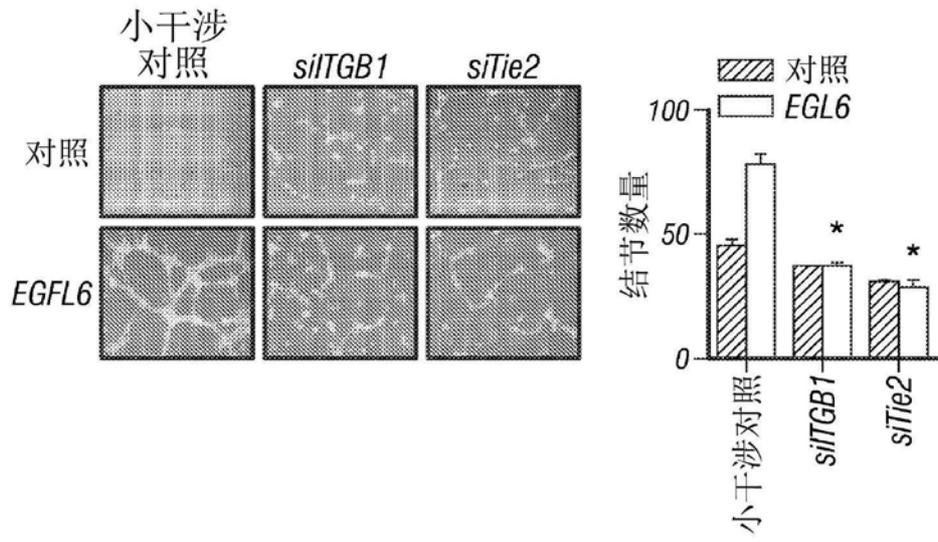


图7G

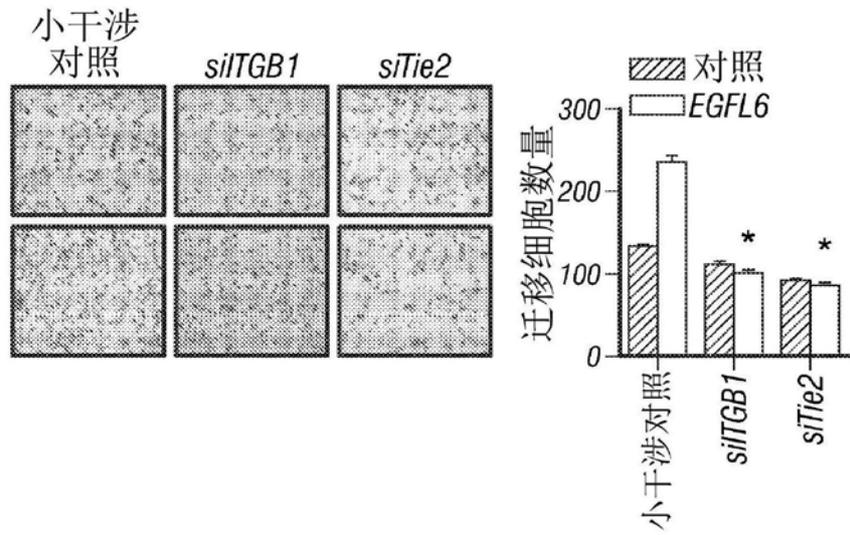


图7H

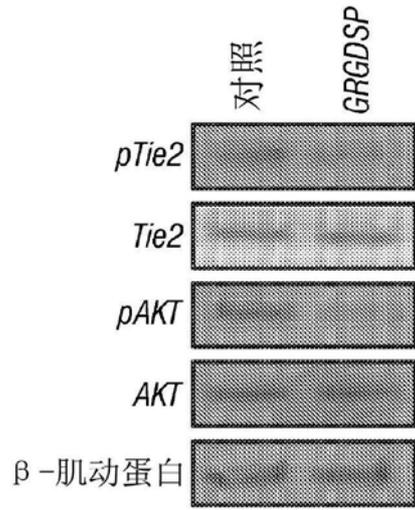


图7I

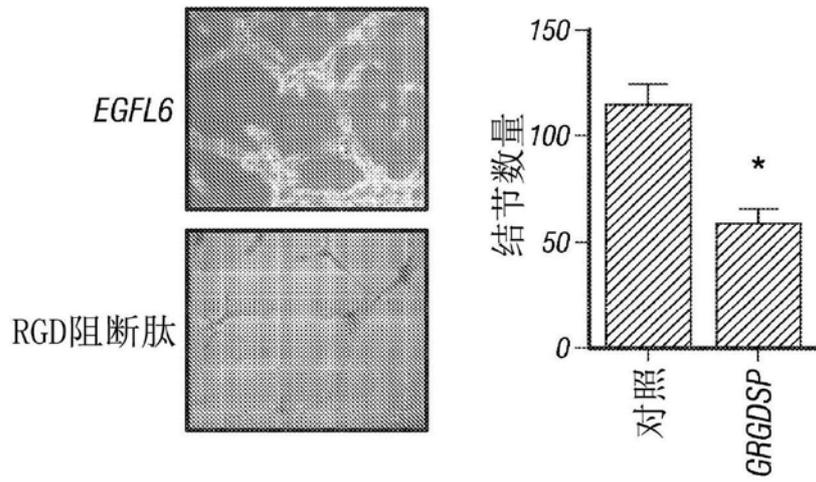


图7J

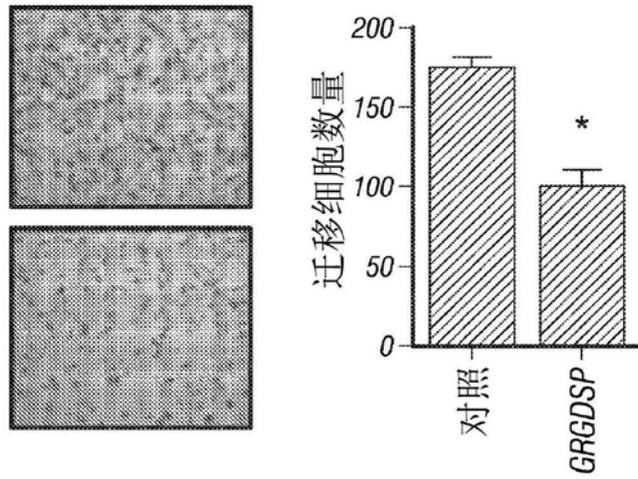


图7K

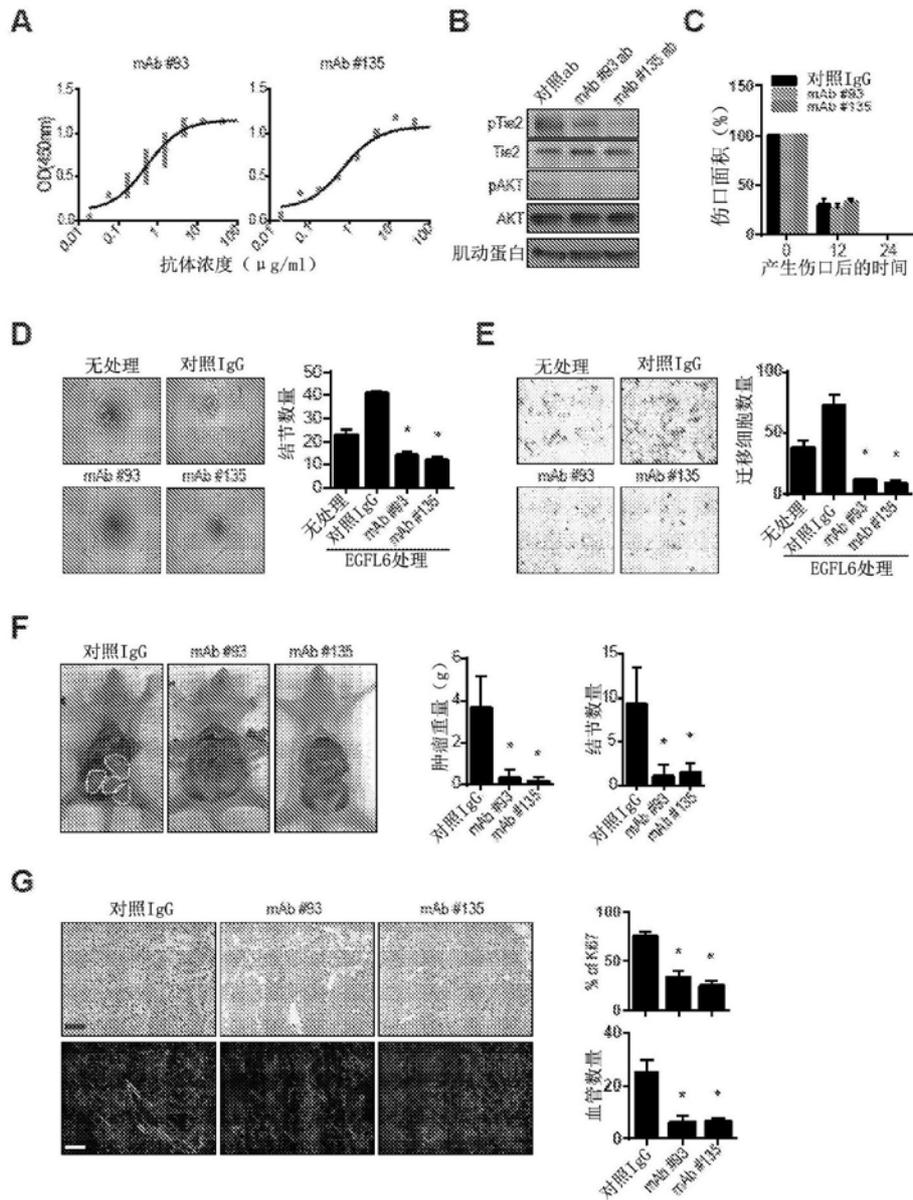


图8A-G

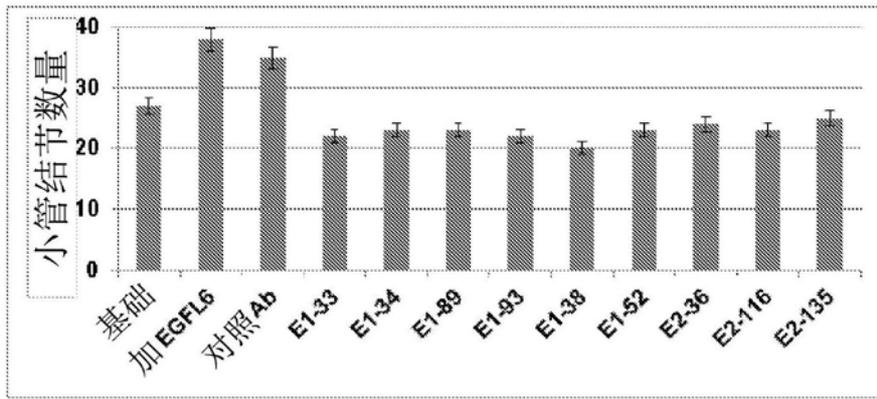


图8H

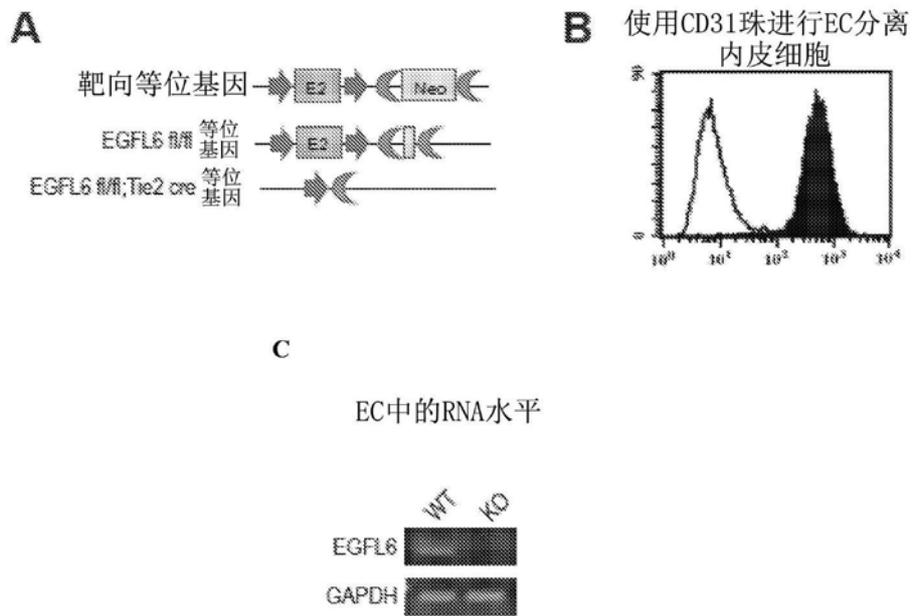


图9A-C

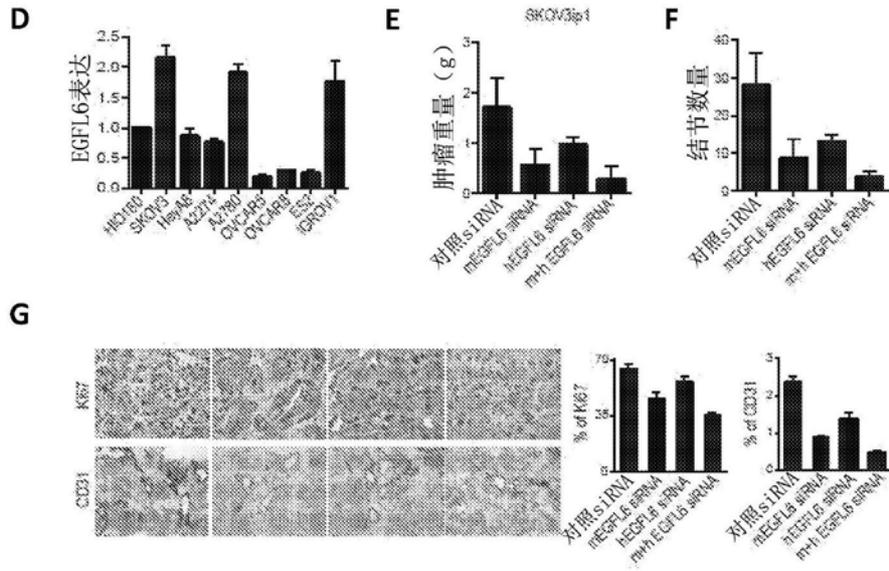


图9D-G

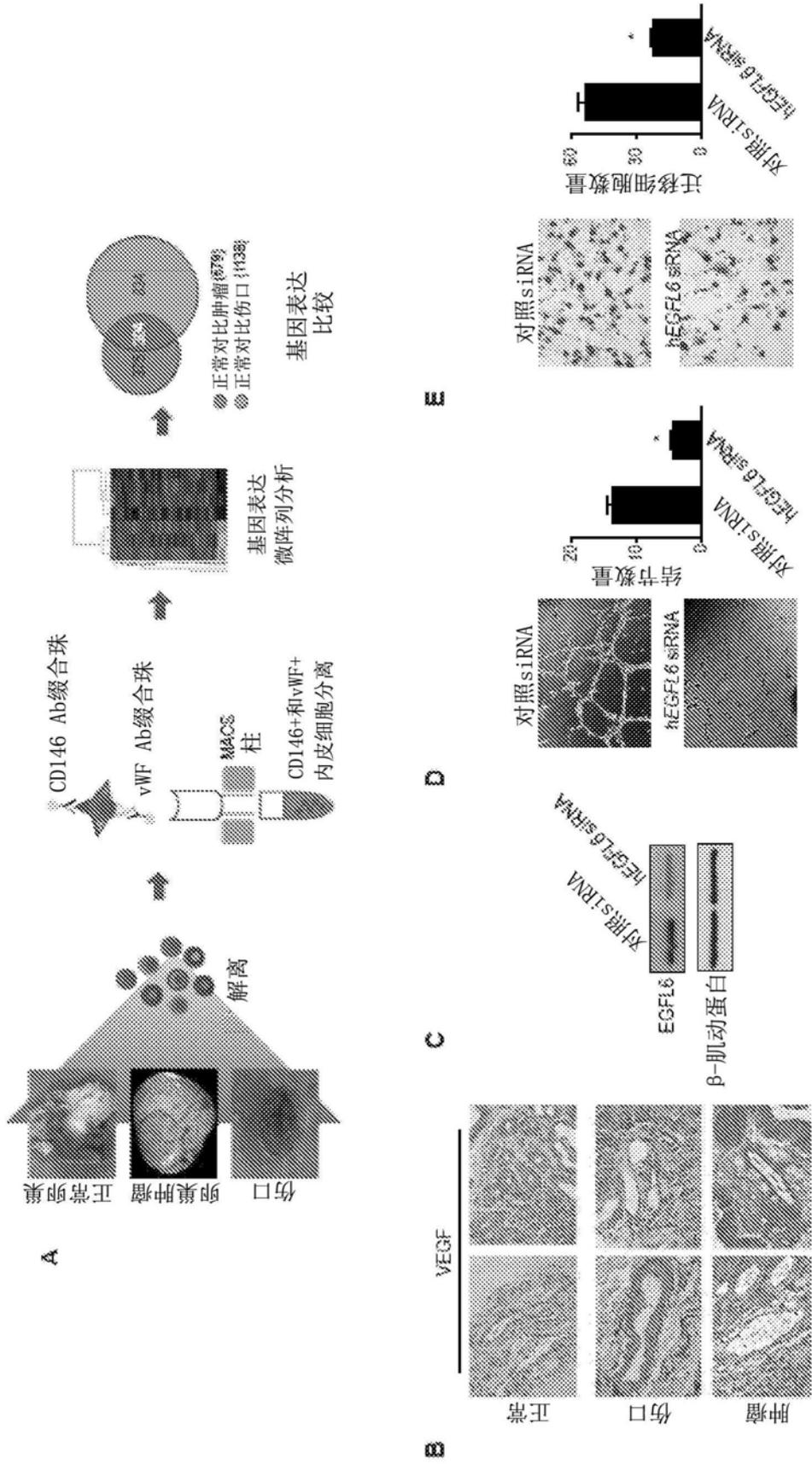


图10A-E

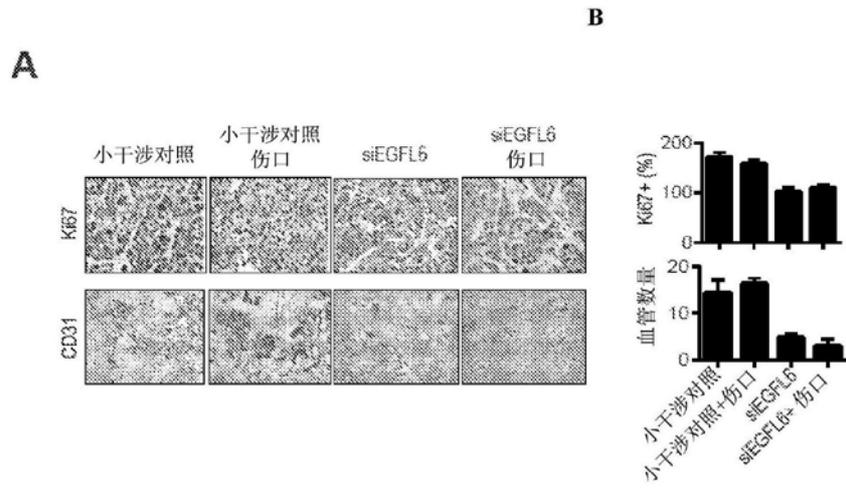


图11A-B

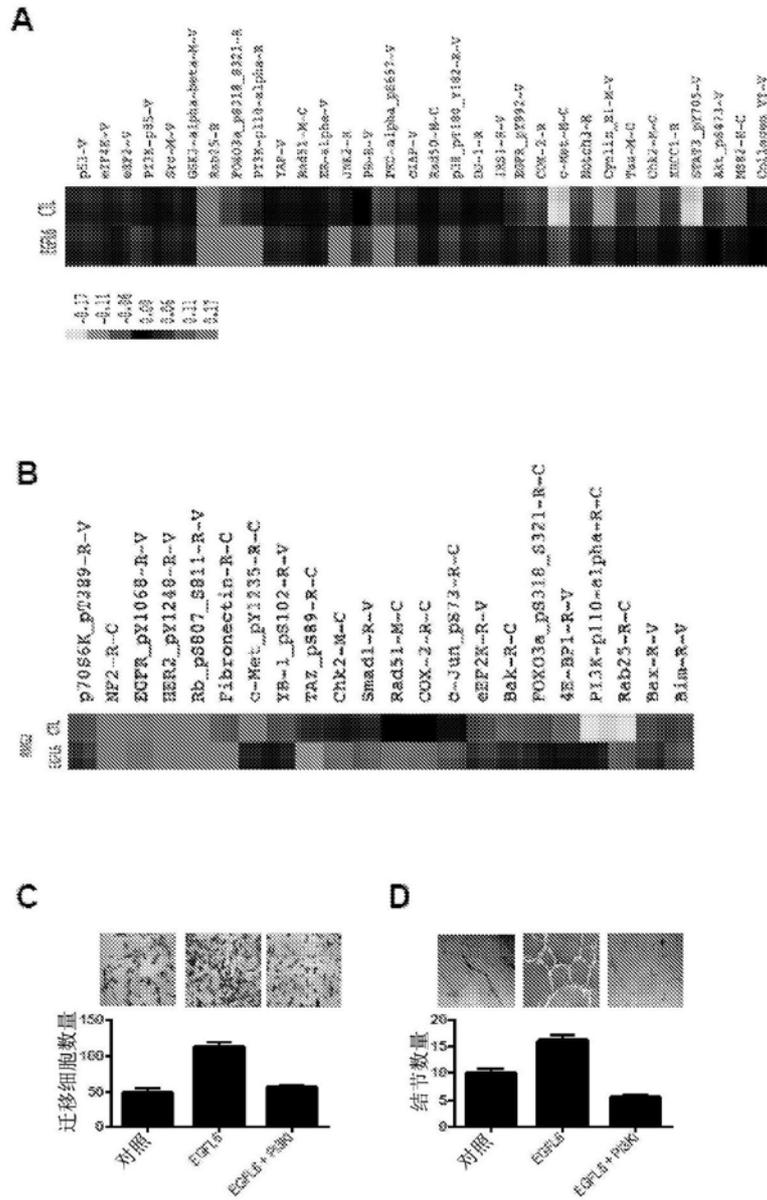


图12A-D