(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117500828 A
(43)申请公布日 2024.02.02

(21)申请号 202280039743.2
(22)申请日 2022.06.02
(66)本国优先权数据
202110623779.2 2021.06.04 CN
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.12.01
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2022/096848 2022.06.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/253314 ZH 2022.12.08
(71)申请人 信达生物制药(苏州)有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号
(72)发明人 黎一鸣 胡思怡 荆华
(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
专利代理师 史文静 黄革生
(51)Int.Cl.
C07K 16/22(2006.01)

(54)发明名称

结合VEGF和Ang2的双特异性结合分子以及其用途

(57)摘要

提供分别针对血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)和针对血管生成素-2(ANG-2)的抗体,同时针对血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的双特异性结合分子(例如抗体),以及其制备方法,包含所述抗体或分子的药物组合物,及其应用。

CN 117500828 A

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 12 月 8 日 (08.12.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/253314 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/22 (2006.01) *C07K 16/26* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/096848

(22) 国际申请日: 2022 年 6 月 2 日 (02.06.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202110623779.2 2021年6月4日 (04.06.2021) CN

(71) 申请人: 信达生物制药（苏州）有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 黎一鸣(LI, Yiming); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。胡思怡(HU, Siyi); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。荆华(JING, Hua); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2022/253314 A1

(54) **Title:** BISPECIFIC BINDING MOLECULE BINDING VEGF AND ANG2 AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 结合VEGF和Ang2的双特异性结合分子以及其用途

(57) **Abstract:** Provided are an antibody against a vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and angiopoietin-2 (ANG-2) respectively, a bispecific binding molecule (for example, an antibody) simultaneously against VEGF/VEGF-A and ANG-2, a preparation method therefor, and a pharmaceutical composition containing the antibody or molecule and an application thereof.

(57) 摘要: 提供分别针对血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)和针对血管生成素-2(ANG-2)的抗体，同时针对血管内皮生长因子(VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的双特异性结合分子(例如抗体)，以及其制备方法，包含所述抗体或分子的药物组合物，及其应用。

结合 VEGF 和 Ang2 的双特异性结合分子以及其用途

本发明涉及分别针对血管内皮生长因子 (VEGF/VEGF-A)和针对血管生成素-2(ANG-2)的抗体，同时针对血管内皮生长因子 (VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的双特异性结合分子（例如抗体），以及其制备方法， 包含所述抗体或分子的药物组合物，及其应用。

发明背景

血管发生参与各种疾病的发病机理，所述疾病包括实体瘤、眼内新生血管化相关的疾病、类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis)和银屑病。

VEGF 是有效且普遍存在的血管生长因子。VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盘生长因子(PIGF)和内分泌腺衍生的 VEGF(EG-VEGF)。VEGF 的活性形式与其他 VEGF 家族成员合成为同型二聚体或异型二聚体。VEGF-A 以通过选择性剪接生成的六种同种型存在：VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 和 VEGF206。这些同种型主要因其生物可利用性而不同，其中 VEGF165 是主要同种型。据信，VEGF 是正常和疾病相关血管发生的重要调节剂。

除 VEGF 家族之外，还认为人血管生成素参与了血管发育和出生后的血管发生。人血管生成素包括天然存在的激动剂血管生成素-1(ANG-1)以及天然存在的拮抗剂血管生成素-2(ANG-2)。认为 ANG-1 的作用在成人中是保守的，它在成人中广泛地且组成型地表达。相比之下，ANG-2 表达主要限于血管重塑的部位，其中认为它阻断 ANG-1 的组成型稳定化或成熟化功能，从而允许血管恢复到可能对芽生信号更具响应性的塑性状态并保持在该塑性状态下。

近年来，已经开发了一些靶向 VEGF-A 和 ANG-2 的双特异性抗体（例如 WO2012131078 和 WO2014009465）。然而，现有的双特异性抗体针对 VEGF 和 Ang2 的阻断性较差，且由于分子量太大，导致单次给药时摩尔浓度较低。特别地，对于眼部疾病，通常使用通过玻璃体内应用的较小分子量的抗体，且需要较少的给药频率。因此，仍然需要新的，特别是适用于眼部疾病的靶向 VEGF-A 和 ANG-2 的双特异性结合分子。

发明内容

本发明开发了新的靶向 VEGF-A 或 ANG-2 的 VHH 抗体，以及同时针对 VEGF-A 和 ANG2 的双特异性结合分子。特别地，本发明的双特异性结合分子相比已知的抗体，具有较小的分子量，相同质量浓度下，摩尔浓度更高；且具有较强的 VEGF A 和 Ang2 阻断活性，能够完全阻断 VEGFA 诱导的原代细胞增殖。因此，本发明的分子在临床上具有更强的阻断活性，且能够在单次给药时使得抗体摩尔浓度更高，维持单次给药药效时间更久，降低眼部施用（例如玻璃体腔注射）频率。

附图说明：

图 1 显示了双特异性结合分子的结构。

图 2 显示了应用 ELISA 测定的抗 VEGF A VHH 抗体能够阻断 VEGF A 与 VEGFR2 的结合。

图 3 显示了应用 ELISA 法测定的人源化 anti-Ang2 VHH 抗体阻断 Ang2 与 Tie2 结合的作用。

图 4 显示了应用 ELISA 法测定的抗 Ang2 VHH 抗体（A）和人源化抗 Ang2 VHH 抗体（B）抑制 hAng2-Fc 诱导的 293-Tie2 细胞磷酸化的作用。

图 5 显示了应用 HEK293-KDR reporter 法检测抗 VEGF A VHH 阻断 VEGFA 激活 KDR 受体的作用。

图 6 显示了 CCK-8 测定的抗 VEGF A VHH 抗体抑制 VEGF A 诱导 HUVEC 细胞的存活和增殖的作用。

图 7 显示了应用 HEK293-KDR reporter 法检测 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子 IEX04-012 阻断 VEGF 激活 KDR 受体的作用。

图 8 显示了双特异性结合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞存活和增殖的作用。

图 9 显示了 ELISA 法测定的双特异性结合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 阻断人 Ang2 与 Tie2 的结合。

图 10 显示了流式细胞检测法测定双特异性结合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 阻断 Ang2-Fc 与 Tie2 的结合。

图 11 显示了应用流式细胞检测法测定本发明的双特异性结合分子 IEX04-012 在体外有效抑制 hAng2-Fc 诱导的 293-Tie2 磷酸化。

图 12 显示了本发明的双特异性结合分子 IEX04-012 降低 VEGF 诱导的血管内皮细胞通透性，即抑制 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞渗漏。

图 13 显示了激光诱导的脉络膜新生血管化模型中 4 级（图 A）和 3 级以上（图 B）激光斑比例统计。

图 14 显示了激光诱导的脉络膜新生血管化模型中视网膜厚度统计。

图 15 显示了激光诱导的脉络膜新生血管化模型中渗漏面积统计

图 16 显示了激光诱导的脉络膜新生血管化模型眼底组织 H&E 染色图（A）及病变面积统计（B）。

图 17 显示了激光诱导的脉络膜新生血管化模型眼底组织 CD31 染色图（A）及阳性细胞统计（B）。

定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5%的下限和比指定数字数值大 5%的上限的范围内的数字数值。

如本文所用，术语“和/或”意指可选项中的任一项或可选项的两项或多项或全部。

如本文所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组成的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

本文所用的术语 “VEGF” 是指血管生长因子。VEGF 家族成员包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盘生长因子(PIGF)和内分泌腺衍生的 VEGF(EG-VEGF)。VEGF 的活性形式与其他 VEGF 家族成员合成为同型二聚体或异型二聚体。VEGF-A 以通过选择性剪接生成的六种同种型存在：VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 和 VEGF206。这些同种型主要因其生物可利用性而不同，其中 VEGF165 是主要同种型。在一些实施方案中，本发明的 VEGF A 是指来自人的 VEGF A，例如来自人的 VEGF 165。在一个实施方案中，本发明的 VEGFA 的氨基酸序列是登录号为 P15692（uniprot 数据库）的氨基酸序列。

如本文所用，术语“ANG2”指人血管生成素-2(ANG-2)(备选地缩写为：ANGPT2 或 ANG2)，其例如在 Maisonpierre,P.C. 等人 ,Science 277(1997)55-60 和 Cheung,A.H. 等人 ,Genomics 48(1998)389-91 中描述。Ang1 和 Ang2 作为血管内皮中选择性表达的酪氨酸激酶家族 Tie 的配体被发现。目前存在 4 个确定的血管生成素家族成员。血管生成素-3 和-4(ANG3 和 ANG4)可以代表小鼠和人中相同基因座的广泛多样的对应物。Ang1 和 Ang2 最初在组织培养实验中分别鉴定为激动剂和拮抗剂(关于 ANG1，参见 Davis,S. 等人,Cell 87(1996)1161-69; 关于 ANG2，参见 Maisonpierre,P.C. 等人,Science 277(1997)55-60)。全部已知的血管生成素主要与 Tie2 结合。在一些实施方案中，本发明的 ANG2 是指来自人的 Ang2。在一些实施方案中，人 Ang2 包含登录号为 O15123（uniprot 数据库）的氨基酸序列。

术语 “多特异性结合分子” 是指至少是双特异性的多特异性结合分子，例如双特异性结合分子，即所述分子包含至少第一靶标结合区和第二靶标结合区，其中所述第一靶标结合区结合一种靶标或抗原且所述第二靶标结合区结合另一抗原或靶标。因此，根据本发明的分子包含对于至少两种不同的抗原或靶标的特异性。根据本发明的分子也涵盖包含多个靶标结合区/结合位点的多特异性分子，诸如三特异性结合分子。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子是双特异性抗体。

如本文所用的术语“接头”是指使得能够直接连接双特异性结合分子的不同部分的任何分子。在不同分子部分之间建立共价连接的接头的实例包括肽接头和非蛋白质聚合物，包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些实施方案中，接头是肽接头，其是指氨基酸的序列，其中所述序列将结合分子的第一部分的氨基酸序列连接至结合分子的第二部分。例如，肽接头可以将结合分子的第一靶标结合区连接至第二靶标结合区。例如，肽接头也可以将抗体的一部分连接至抗体的另一部分，诸如将轻链可变区连接至重链可变区。优选地，所述肽接头具有这样的长度，其足以连接两个实体，其方式使得它们维持它们相对于彼此的构象，使得不妨碍期望的活性。

肽接头可以主要包括或可以不主要包括以下氨基酸残基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物，包括例如$(GS)_n$、$(GSGGS)_n$、$(GGGGS)_n$、$(GGGS)_n$和$(GGGGS)_nG$，其中 n 是至少 1(且优选 2、3、4、5、6、7、8、9、10)的整数。有用的接头还

包括甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其他柔性接头。有用的接头还包括甘氨酸单体聚合，例如$(G)_n$，其中 n 是至少 4(且例如为 4-20，例如 4、5、6、7、8、9、10 以及更多)的整数。优选的，所述接头是$(GGGGS)_n$，其中 n=1、2、3 或 4。

根据本发明的术语"价"表示在结合分子，例如抗体分子中存在指定数目的结合位点。因此，术语二价、三价、四价分别表示在结合分子中存在两个、三个或四个结合位点（靶标结合区）。根据本发明的双特异性结合分子是至少二价的并且可以是多价的，例如二价、三价、四价或六价的。

如本文所用的术语"靶标结合区"是指多特异性结合分子，例如双特异性结合分子的结合特定靶标或抗原的任何部分。靶标结合区可以是例如抗体或免疫球蛋白本身或抗体片段。这种靶标结合区可以具有或可以不具有独立于 BsAB 的剩余部分的三级结构，并且可以作为单独实体结合或不结合其靶标。靶标结合区还可以是受体或配体，或受体的能够结合配体的结构域。

术语"抗体片段"包括完整抗体的一部分。在优选的实施方案中，抗体片段为抗原结合片段。

"抗原结合片段"指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。抗体片段的例子包括但不限于 Fv，Fab，Fab'，Fab'-SH，$F(ab')_2$；dAb(domain antibody)；线性抗体；单链抗体(例如 scFv)；单结构域抗体例如 VHH；双价抗体或其片段；或骆驼科抗体。

"VHH"，又称为单域抗体（single domain antibody，sdAb），是指仅由重链抗体可变区（Variable region）组成的基因工程抗体，其仅包含重链可变区的 3 个 HCDR。VHH 靠仅有的 3 个 HCDR 就具备抗原的特异性和高亲和力，而普通抗体则需要 6 个 CDR。晶体结构表明，VHH 由 2 个 β 片层组成支架，类似于传统抗体 VH 免疫球蛋白折叠。

术语"靶标"是指结合分子所针对的被结合物。靶标可以是抗原，也可以是配体或受体。

术语"抗原"是指引发免疫应答的分子。这种免疫应答可能涉及抗体产生或特异性免疫细胞的活化，或两者兼有。技术人员将理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白质或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重组或基因组 DNA。如本文所用，术语"表位"指抗原(例如，VEGF 或 Ang2)中与抗体分子特异性相互作用的部分。

"互补决定区"或"CDR 区"或"CDR"是抗体可变结构域中在序列上高变并且形成在结构上确定的环（"超变环"）和/或含有抗原接触残基（"抗原接触点"）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 通常被称作 CDR1、CDR2 和 CDR3，从 N-端开始顺序编号。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 被称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 被称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中，各 CDR 的精确氨基酸序列边界可以使用许多公知的抗体 CDR 指派系统的任一种或其组合确定，所述指派系统包括例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia (Chothia 等人. (1989) Nature 342: 877-883，Al-Lazikani 等人，"Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins", Journal of Molecular Biology, 273, 927-948 (1997))，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath)，Contact (University College London)，国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在万维网上 imgt.cines.fr/上)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义。

例如，根据不同的 CDR 确定方案，每一个 CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

除非另有说明，否则在本发明中，术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

除非另有说明，否则在本发明中，当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在一本实施方案中，本发明的 VHH 中的 CDR 按照以下规则：其中 HCDR1 按照 AbM 确定，HCDR2 和 HCDR3 按照 Kabat 确定。

应该注意，基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时，所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体，其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列，但是由于应用了不同的方案（例如不同的指派系统规则或组合）而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即，针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR(在同一指派系统下)。然而，尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的，但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种，可以确定最小重叠区域，从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了，通过抗体的结构和蛋白折叠，可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此，本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如，在一个 CDR 的变体中，最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变，而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 CH2 和 CH3 的恒定区域，该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然或野生型 Fc 区域能够和免疫细胞表面的不同的 Fc 受体结合，从而能够引起 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变区)联合。在一些实施方案中，Fc 区被突变以增强其 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。在一些实施方案中，Fc 区被突变以削弱或删除其 CDC\ADCC\ADCP 效应功能。

“人源化”抗体是指包含来自非人 CDR 的氨基酸残基和来自人 FR 的氨基酸残基的抗体。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。“人抗体”或“全人抗体”或“全人源抗体”可以互换使用，其指具有这样的氨基酸序列的抗体，所述氨基酸序列对应于下述抗体的氨基酸序列，所述抗体由人或人细胞生成或来源于非人来源，其利用人抗体库或其它人抗体编码序列。人抗体的这种定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

如本文所用，术语“抗”、“结合”或“特异性结合”意指结合作用对靶标或抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。结合位点与特定靶标或抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法如通过放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法（SPR）测定。

术语“有效量”指本发明的抗体或片段或组合物或组合的这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。

“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。治疗有效量也是这样的一个量，其中抗体或抗体片段或组合物或组合的任何有毒或有害作用不及治疗有益作用。相对于未治疗的对象，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数或改善可度量参数至少约 40%、甚至更优选地至少约 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%。

“预防有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需预防结果的量。通常，由于预防性剂量在对象中在疾病较早阶段之前或在疾病较早阶段使用，故预防有效量将小于治疗有效量。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其中引入外源核酸的细胞，包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“转化的细胞”，其包括初级转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂(诸如多核苷酸探针或抗体）并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如，放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即，物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。在一些实施方案中，标记是 hFc 或生物素。

“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于，家养动物(例如，牛，羊，猫，狗和马)，灵长类动物(例如，人和非人灵长类动物如猴)，兔，以及啮齿类动物(例如，小鼠和大鼠)。在一些实施方案中，个体或受试者是人。

“分离的”抗体或分子是这样的抗体或分子，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施

方案中，将抗体或分子纯化至超过95％或99％纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相HPLC)确定的。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选实施方案中，为比较目的，所比对的参考序列的长度是至少30%、优选地至少40%、更优选地至少50%、60%和甚至更优选地至少70%、80%、90%、100%的参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在一个优选实施方案中，使用已经集成至GCG软件包的GAP程序中的Needlema和Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 http://www.gcg.com 可获得)，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在又一个优选的实施方案中，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 http://www.gcg.com 可获得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12，空位罚分 4)，利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。额外地或备选地，可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索，以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

本发明所述的“眼部疾病”涵盖涉及血管发生的眼部疾病（例如发生在眼内的疾病），例如与角膜新生血管化相关的眼部疾病。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物，其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

用于本文时，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

“受试者/患者/个体样品”指从患者或受试者得到的细胞或流体的集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织，像来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品；血液或任何血液组分；体液，诸如泪液、玻璃体液、脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。在一些实施方案中，组织样品是眼部组织，例如玻璃体。在一些实施方案中，样品是泪液或玻璃体液。组织样品可能包含在自然界中天然不与组织混杂的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素、等等。

具体实施方案

I. 抗 VEGF A 的 VHH 抗体

本发明涉及针对 VEGF A 的 VHH 抗体。在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF VHH 包含如下的 3 个 CDR，HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由所述序列组成;

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述 VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸组成。

在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

II. 抗 Ang2 的 VHH 抗体

本发明涉及针对 Ang2 的 VHH 抗体。在一些实施方案中，本发明的抗 Ang2 VHH 包含如下的 3 个 CDR，HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸组成。

在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO:19 或 21 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

III. 抗 VEGF A × ANG2 的双特异性结合分子

在本发明的一个方面，本发明涉及结合 VEGF A 和 Ang2 的双特异性结合分子，其包含特异性结合 VEGF A 的第一靶标结合区和特异性结合 Ang2 的第二靶标结合区，其中第二靶标结合区是抗 Ang2 的 VHH，例如本发明的如上所述的抗 Ang2 VHH。

在一些实施方案中，所述第一靶标结合区选自

特异性结合 VEGF A 的 VHH;

特异性结合 VEGF A 的抗体的抗原结合片段，例如 scFv，例如所述抗体为全人抗体或人源化抗体；或

特异性结合 VEGF A 的 VEGF 受体（VEGF R）或其胞外结构域或包含其胞外结构域的融合蛋白，例如胞外结构域与 Fc 的融合蛋白。

在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子包含 1 个或 2 个或 3 个或 4 个第一或第二靶标结合区。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子包含 2 个、3 个或 4 个靶标结合区。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子是二价的或 3 价的或 4 价的。在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子为双特异性抗体。

在本发明的一个方面，本发明的双特异性结合分子，例如双特异性抗体具有以下结构:

抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL-接头-抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH-接头-抗 Ang2 VHH 或

抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH-接头-抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL-接头-抗 Ang2 VHH;

其中抗 Ang2 VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，上述双特异性结合分子的结构如图 1A 或图 1B 所示。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子由一条链组成。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子为二价的。

在一些实施方案中，抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由其组成; LCDR2 包含 SEQ ID NO:32 所示的序列或由其组成；LCDR3 包含 SEQ ID NO:33 所示的序列或由其组成。

在一些实施方案中，抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由其组成;HCDR2 包含 SEQ ID NO:36 所示的序列或由其组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:37 所示的序列或由其组成。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO:34 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 34 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 34 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述重链可变区 VH 包含与 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO:30 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 30 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 30 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述轻链可变区 VL 包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 LCDR1、LCDR2 或 LCDR3 中。

在一些实施方案中，本发明的抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，所述接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成。在一些实施方案中，在抗 VEGF 抗体的轻链可变区和重链可变区之间的接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成，其中例如 n=4。在一些实施方案中，抗 VEGF 可变区与抗 Ang2 VHH 之间的接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成，其中例如 n=2 或 3，例如 3。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF A × ANG2 的双特异性结合分子包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 28 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 28 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于抗 VEGF 抗体可变区和抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。

在本发明的另一个方面，本发明的双特异性结合分子，例如双特异性抗体具有以下结构:

第一抗 VEGF VHH-接头-第二抗 VEGF VHH-接头-抗 Ang2 VHH,

其中抗 Ang2 VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，上述双特异性结合分子的结构如图 1C 所示。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子由一条链组成。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子为三价的。在一些实施方案中，第一抗 VEGF VHH 与第二抗 VEGF VHH 相同或不同。

在一些实施方案中，抗 VEGF VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由所述序列组成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO: 4、5、9 或 11 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，抗 VEGF VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，所述抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO: 9 或 11 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，本发明的抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，所述接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成。在一些实施方案中，第一抗 VEGF VHH 和第二抗 VEGF VHH 之间的接头或第二抗 VEGF VHH 与抗 Ang2 VHH 之间的接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成，例如 n=2。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF A × ANG2 的双特异性结合分子包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:22 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 22 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于抗 VEGF VHH 和抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。

在本发明的另一个方面，本发明的双特异性结合分子包含一条或两条以下链:

VEGF R 胞外结构域-Fc-接头-抗 Ang2 VHH

其中抗 Ang2 VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由所述序列组成。

在一些实施方案中，上述双特异性结合分子的结构如图 1D 所示。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子由两条链组成。在一些实施方案中，上述双特异性结合分子为四价的。

在一些实施方案中，所述的抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VHH 包含与 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

在一些实施方案中，VEGFR 胞外结构域为来自人的 VEGFR 的胞外结构域。在一些实施方案中，所述 VEGFR 胞外结构域包含 VEGFR1 第二抗体样结构域（例如 FLT1 domain 2）和 VEGFR2 第三抗体样结构域(例如 KDR domain 3)。在一些实施方案中，所述 VEGFR 胞外结构域包含人 VEGFR1 第二抗体样结构域和人 VEGFR2 第三抗体样结构域。在一些实施方案中，所述 VEGFR 胞外结构域包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 26 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:26 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VEGFR 胞外结构域包含与 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换，优选地所述 VEGFR 胞外结构域保留与 SEQ ID NO:26 所示的结构域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的与 VEGF 的结合亲和力。

在一些实施方案中，所述 Fc 为来源于人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc，例如野生型 Fc，或本领域已知的 Fc 变体。在一些实施方案中，所述 Fc 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 27 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:27 所述的氨基酸组成。

在一些实施方案中，所述 VEGF R 胞外结构域-Fc 为 VEGFR 胞外结构域与 Fc 的融合蛋白，例如 Aflibercept 或其衍生物。

在一些实施方案中，所述 VEGF R 胞外结构域-Fc 包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 25 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述 VEGF R 胞外结构域-Fc 包含与 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换，优选地所述 VEGF R 胞外结构域-Fc 保留与 SEQ ID NO:25 所示的结构域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的与 VEGF 的结合亲和力。

在一些实施方案中，所述接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成，例如 n=3。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF A × ANG2 的双特异性结合分子的一条链包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:24 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 24 所述的氨基酸组成。在一些实施方案中，所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。在一些优选的实施方案中，所述突变不存在于抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。在一些实施方案中，所述具有突变的 VEGF R 胞外结构域-Fc 保留与 SEQ ID NO:25 所示的结构域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的与 VEGF 的结合亲和力。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的抗体或结合分子包含一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中，氨基酸突变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸突变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。在一些实施方案中，本发明所述的氨基酸突变发生在抗体重链恒定区，例如 Fc 区上，在优选的实施方案中，所述 Fc 区上的氨基酸突变削弱或删除了抗体的 ADCC 和/或 CDC 作用。

在一些实施方案中，置换为保守性置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸突变，以此产生 Fc 区变体，以改变抗体的一种或多种功能特性，例如血清半衰期、补体结合、补体依赖性细胞毒性、Fc 受体结合和/或抗体依赖性细胞毒性。Fc 区变体可包括在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸突变(例如置换)的人 Fc 区序列(例如人 IgGl、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 区)。

在某些实施方案中，可能需要对抗体的可变区进行突变以产生二硫键，例如产生包含二硫键突变的 scFv。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体或结合分子可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其他非蛋白质部分。适合所述衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

IV. 本发明 VHH 抗体或双特异性结合分子的性质

在一些实施方案中，本发明抗 Ang2 VHH 抗体能够特异性结合 Ang2，例如人 Ang2，例如以高亲和力。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGFA VHH 抗体能够特异性结合 VEGF A，例如人 VEGF A，例如以高亲和力。

在一些实施方案中，本发明的双特异性结合分子能够特异性结合 Ang2 和 VEGFA，例如人 Ang2 和人 VEGFA，例如以高亲和力。

在一些实施方案中，本发明的抗 Ang2 抗体或抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子具有一种或多种以下性质:

（i）抗 Ang2 抗体或双特异性结合分子对于 Ang2 诱导的 Tie2 磷酸化具有抑制作用;

（ii）抗 Ang2 抗体或双特异性结合分子对于 Ang2 与 Tie2 之间结合具有阻断作用;

（iii）抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGFA 激活相关受体信号通路具有阻断作用，例如通过 KDR reporter 检测;

(iv) 抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGFA 与 VEGFR 之间结合具有阻断作用;

（v）抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGF A 诱导的细胞（例如原代细胞，例如血管内皮细胞，例如人脐静脉内皮细胞，例如 HUVEC）的存活和增殖具有抑制作用;

（vi）双特异性结合分子对血管内皮细胞（例如人脐静脉内皮细胞，例如 HUVEC）渗漏具有抑制作用;

（vii）双特异性结合分子在体内或体外对新生血管化具有抑制作用，例如抑制眼底或视网膜脉络膜新生血管化，例如抑制新生血管引起的渗漏，例如保护血管完整性。

V. 本发明的核酸以及包含其的宿主细胞

在一方面，本发明提供了编码以上任何 VHH 或双特异性结合分子或其任一条链的核酸。在一个实施方案中，提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。在一个实施方案中，载体是例如 pcDNA3.1。在一个实施方案中，提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞(例如 CHO-S)或 293 细胞（例如 293F 或 HEK293 细胞）)或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的，例如大肠杆菌，例如 TG1。

例如，本发明的核酸包含编码选自 SEQ ID NO: 4、5、9、11、19、21、22、24、28 中任一项所示氨基酸序列的核酸，或编码与选自 SEQ ID NO: 4、5、9、11、19、21、22、24、28 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的氨基酸序列的核酸。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码 VHH 或双特异性结合分子的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，VHH 可在细菌中产生。在表达后，VHH 存在于在培养物上清中，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是原核的，例如是细菌，例如大肠杆菌，例如 TG1。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(HEK293、293F 或 293T 细胞) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞，包括 DHFR-CHO 细胞、CHO-S 细胞、ExpiCHO 等 ；以及骨髓瘤细胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。本领域已知适合产生抗体的哺乳动物宿主细胞系。

VI. 本发明的 VHH 或双特异性结合分子的生产和纯化

在一个实施方案中，提供了制备本发明 VHH 或双特异性结合分子的方法，其中所述方法包括，在适合 VHH 或双特异性结合分子或其链表达的条件下，培养包含编码所述 VHH 或双特异性结合分子（例如任意一条多肽链和／或多条多肽链）的核酸或包含所述核酸的表达载体的宿主细胞，如上文所提供的，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述 VHH 或双特异性结合分子。

为了重组产生本发明的分子，分离编码本发明 VHH 或双特异性结合分子(例如上文所描述的分子，例如任意一条多肽链和／或多条多肽链)的核酸，并将其插入一个或多个载体，用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。此类核酸易于使用常规规程分离和测序。

如本文所述制备的 VHH 或双特异性结合分子可以通过已知的现有技术如高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度，所述熟知分析方法包括尺寸排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。

VII. 测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的 VHH 或双特异性结合分子进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。一方面，对本发明的 VHH 或双特异性结合分子测试其靶标（例如抗原）结合活性，例如通过已知的方法诸如生物膜薄层干涉技术、ELISA，等来进行。可使用本领域已知方法来测定对 VEGF A 和/或 Ang2 的结合，本文中公开了例示性方法。在一些实施方案中，使用放射性免疫测定(RIA)或生物膜薄层干涉测定法或 MSD 测定法或表面等离子体共振法（SPR）或流式细胞术测量。

本发明还提供了用于鉴定具有生物学活性的 VHH 或双特异性结合分子的测定法。生物学活性选自例如

（i）抗 Ang2 抗体或双特异性结合分子对于 Ang2 诱导的 Tie2 磷酸化的抑制作用；

（ii）抗 Ang2 抗体或双特异性结合分子对于 Ang2 与 Tie2 之间结合的阻断作用；

（iii）抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGFA 激活相关受体信号通路的阻断作用，例如通过 KDR reporter 检测；

(iv) 抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGFA 与 VEGFR 之间结合的阻断作用；

（iv）抗 VEGFA 抗体或双特异性结合分子对于 VEGF A 诱导的细胞（例如原代细胞，例如血管内皮细胞，例如人脐静脉内皮细胞，例如 HUVEC）的存活和增殖的抑制作用；

（vi）双特异性结合分子对血管内皮细胞（例如人脐静脉内皮细胞，例如 HUVEC）渗漏的抑制作用；

（vii）双特异性结合分子在体内或体外对新生血管化的抑制作用，例如抑制眼底或视网膜脉络膜新生血管化，例如抑制新生血管引起的渗漏，例如保护血管完整性。

供任何上述体外测定法使用的细胞为原代细胞或细胞系，包括天然表达或过表达 Ang2 受体（例如 Tie2）或 VEGFR（例如 VEGFR2，即 KDR）的细胞，例如过表达 Tie2 或 KDR 的 293 细胞，例如 HEK293 或 Expi293；或血管内皮细胞，例如人脐静脉内皮细胞，例如 HUVEC。

在一些实施方案中，测定可以应用生物素或 hFc 等标记物进行。

可以理解的是，能够使用本发明的抗体和别的活性剂的组合来进行任何上述测定法。

VIII. 免疫缀合物和药物组合物

在一些实施方案，本发明提供了包含本文所述的任何 VHH 或双特异性结合分子的免疫缀合物。优选地，所述免疫缀合物包含一种或多种其他治疗剂或标记物。

在一些实施方案中，本发明提供包含本文所述的任何 VHH 或双特异性结合分子的组合物或药物或制剂，优选地组合物为药物组合物。在一个实施方案中，所述组合物还包含药用辅料。在一个实施方案中，组合物，例如，药物组合物，包含本发明的 VHH 或双特异性结合分子，以及一种或多种其它治疗剂的组合。

本发明还包括包含本发明的 VHH 或双特异性结合分子的组合物(包括药物组合物)或药物或制剂。这些组合物或药物或制剂还可以包含合适的药用辅料，如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂，包括缓冲剂。

如本文所用，“药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。

对于药用辅料的使用及其用途，亦参见 “Handbook of Pharmaceutical Excipients” ,第八版, R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

本发明的组合物或药物或制剂可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，注射液或滴眼液)、散剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。例如，本发明的组合物或药物或制剂可以是滴眼液。

可以通过将具有所需纯度的本发明的 VHH 或双特异性结合分子与一种或多种任选的药用辅料混合来制备包含本文所述的 VHH 或双特异性结合分子的药物或制剂，优选地以冻干制剂或水溶液的形式。

本发明的组合物或药物或制剂还可以包含超过一种活性成分，所述活性成分是被治疗的特定适应证所需的，优选具有不会不利地彼此影响的互补活性的那些活性成分。例如，理想的是还提供其它治疗剂。

可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半渗透基质，所述基质呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

本发明还提供了药物组合或药物组合产品，其包含本发明的 VHH 或双特异性结合分子，以及一种或多种其它治疗剂。本发明还提供了包含所述药物组合的成套药盒，例如所述成套药盒在同一包装内包含:

- 含有包含本发明的 VHH 或双特异性结合分子的药物组合物的第一容器;
- 含有包含其它治疗剂的药物组合物的第二容器。

IX. 用途和方法

本发明一方面提供了在受试者中预防或治疗眼部疾病的方法，包括向受试者施用有效量的本发明的抗 VEGF VHH、本发明的抗 Ang2 VHH 或本发明的双特异性结合分子，或包含其的组合物或药物或制剂。

在一些实施方案中，所述患者中具有(例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的)VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

在一些实施方案中，所述眼部疾病包括但不限于与血管发生相关的眼部疾病，例如与角膜新生血管化相关的眼部疾病。

在一些实施方案中，所述眼部疾病治疗将受益于抑制核酸或蛋白质水平的 VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

在其他方面，本发明提供本发明的抗 VEGF VHH、本发明的抗 Ang2 VHH 或本发明的双特异性结合分子或包含其的组合物在生产或制备药物中的用途，所述药物用于本文所述的用途，例如用于预防或治疗本文提及的相关疾病或病症。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF VHH、本发明的抗 Ang2 VHH 或本发明的双特异性结合分子或包含其的组合物或药物或制剂会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

在一些实施方案中，本发明的抗 VEGF VHH、本发明的抗 Ang2 VHH 或本发明的双特异性结合分子或包含其的组合物或药物或制剂还能与一种或多种其它疗法例如治疗方式和/或其它治疗剂组合施用，用于本文所述的用途，例如用于预防和/或治疗本文提及的相关疾病或病症。

本发明的抗 VEGF VHH、本发明的抗 Ang2 VHH 或本发明的双特异性结合分子或包含其的组合物或药物或制剂的施用途径是根据已知方法，例如，局部施用，例如眼内施用、眼表施用。在一些实施方案，通过注射或滴入施用。

X. 用于诊断和检测的方法和组合物

在某些实施方案中，本文中提供的抗 Ang2 VHH 抗体可以用于检测 Ang2 在生物样品中

的存在。在某些实施方案中，本文中提供的抗 VEGFA VHH 抗体可以用于检测 VEGFA 在生物样品中的存在。在某些实施方案中，本文中提供的抗双特异性结合分子可以用于检测 Ang2 和/或 VEGFA 在生物样品中的存在。

术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是体液或眼部组织，例如玻璃体液。

在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的 VHH 或双特异性结合分子在允许其与 Ang2 或 VEGFA 结合的条件下接触，并检测在该 VHH 或双特异性结合分子和 Ang2 或 VEGFA 之间是否形成复合物。复合物的形成表示存在 Ang2 或 VEGFA。该方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中，本发明的抗体用于选择适合利用本发明的 VHH 或双特异性结合分子治疗的受试者，例如其中 Ang2 或 VEGFA 是用于选择所述受试者的生物标记物。

在某些实施方案中，提供标记的 VHH 或双特异性结合分子。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。在一些实施方案中，所述标记例如生物素或 hFc 等标记物。

在本文中提供的一些实施方案中，样品是在用本发明的 VHH 或双特异性结合分子治疗之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法之前获得的。在一些实施方案中，样品是在用其他疗法治疗过程中，或者用其他疗法治疗后获得的。

在一些实施方案中，在治疗之前，例如，在起始治疗之前或在治疗间隔后的某次治疗之前检测 Ang2 和/或 VEGF A。

在一些实施方案中，提供了一种治疗本发明疾病的方法，所述方法包括：对受试者(例如，样品)(例如，受试者样品)检验 Ang2 和/或 VEGF A 的存在，因而确定 Ang2 和/或 VEGF A 值，将 Ang2 和/或 VEGF A 值与对照值（例如正常个体中的值）比较，并且如果 Ang2 和/或 VEGF A 值大于对照值，则向受试者施用治疗有效量的任选与一种或多种其他疗法组合的本发明所述的 VHH 或双特异性结合分子，因而治疗所述疾病。

本发明的这些以及其它方面和实施方案在附图(附图简述紧随其后)和以下的发明详述中得到描述并且示例于以下实施例中。上文以及整个本申请中所论述的任何或所有特征可以在本发明的各种实施方案中组合。以下实施例进一步说明本发明，然而，应理解实施例以说明而非限定的方式来描述，并且本领域技术人员可以进行多种修改。

实施例 1. 噬菌体免疫库的制备

羊驼免疫或合成库构建

1.1 选取健康成年羊驼(成都阿帕克公司)2 只，将 0.5mg 重组蛋白抗原 VEGFA 或 Ang2（北京义翘公司）与弗氏佐剂按 1:1 比例混匀，背部皮下多点注射的方式免疫羊驼，共免疫四次，免疫间隔为 2 周。

1.2 采集 50ml 羊驼外周血，分离淋巴细胞，按照每 2.5×10^7 个活细胞加入 1mL Trizol 试剂，采用氯仿/异丙醇沉淀方法抽提总 RNA。取 10ug RNA 作为模板，使用 PrimeScript 逆转录试剂盒（Takara 公司）进行反转录。将 cDNA 作为模版进行第一轮 PCR 反应，使用正向引物 Alp-VhL 和反向引物 Alp-2b/2cR，获得第一轮 PCR 产物。将第一轮 PCR 产物作为模板进行第二轮 PCR 反应，使用正向引物 Alp-VhF 和反向引物 Alp-JHR-SalI，获得第二轮 PCR 产物。将 pC3-HF 载体和第二轮 PCR 产物分别使用 SacI 和 SalI（Thermo 公司）进行双酶切，酶切产物加入 T4 连接酶（Thermo 公司）反应，电转化 TG1 感受态细胞，构建 VHH 抗体文库，将菌液在-80℃冻存。

取复苏的菌液接种至 100ml YT-AG 培养基（上海生工公司）中，加入 M13KO7 辅助噬菌体进行感染，用 2 × YT-AK 培养基（上海生工公司）重悬菌体，37℃ 200rpm 培养过夜。收集培养上清，采用 PEG/NaCl 沉淀方法制备重组噬菌体。

1.3 重组噬菌体使用生物素标记抗原 VEGFA（ACRO 公司）或 Ang2（北京义翘公司）进行 3 轮淘洗实验。每管加入 50ul M280 磁珠（Thermo 公司）和适量生物素标记抗原，室温孵育 30 分钟后，加入 $1x10^{12}$ cfu 重组噬菌体室温孵育 1 小时。将获得的混合物加入 1ml PBST 洗涤 10 次，每次洗涤时间 5 分钟。最后加入 0.5ml pH2.5 甘氨酸缓冲液，洗脱抗原结合的重组噬菌体，侵染 TG1 过夜培养，制备重组噬菌体，用于下一轮淘洗实验并且鉴定阳性 VHH 的 TG1 细菌克隆。

1.4 Binding ELISA 检测结合活性和克隆测序。

提前取 VEGF A，Ang2 抗原（北京义翘公司）用 PBS 缓冲液稀释成 0.5ug/ml 包被 96 孔 ELISA 板， 4℃冰箱过夜。抗原包被板用 PBST 洗 3 遍，加入封闭剂至 300ul/孔，室温静置封闭 1 小时。PBST 洗 3 遍，加入 80ul 封闭剂+20ul 上述 1.3 鉴定的阳性 VHH 的 TG1 菌的表达上清，室温振荡 1 小时。

PBST 洗 3 遍，加入封闭剂稀释的 Anti-Flag/HRP 二抗（Sigma 公司）100ul/孔，室温震荡 40 分钟。PBST 洗 6 遍，加入 TMB 显色液至 100ul/孔，避光显色 5-15 分钟。再加入 100ul/孔终止液。酶标仪读数，测定 OD450nm 吸光值，选取读值大于 0.5 的细菌克隆送金唯智测序，选取含有各个对应 VHH 序列的 TG1 菌单克隆加入甘油，冻于-80℃冰箱。

实施例 2. 原核抗体的生产和纯化，及人源化

本发明利用分子生物学技术，获得抗 VEGFA 或 Ang2 阳性噬菌体中的抗体序列，并利用上述获得的含有阳性 VHH 的 TG1 单克隆表达纯化获得 VHH 抗体蛋白。

取实施例 1 鉴定的含有 VHH 表达质粒的 TG1 菌，接种到 800ml LB-Amp 培养基中，37℃ 200rpm 培养至 OD600 值 0.5-0.6。菌液加入 1mM IPTG 诱导表达，28℃ 200rpm 培养过夜，收集培养上清，离心后加入 15ml PB +1mg/ml 多粘菌素重悬细菌，再次离心，0.22um 滤膜过滤。将细菌裂解液流过 1 ml Ni Sepharose 预先柱，加入 PBS 洗涤 2 次，加入 0.5M 咪唑洗脱目标蛋白，用紫外法测定蛋白浓度。洗脱的目标蛋白用紫外法测定蛋白浓度，分装多管置于-40 度冰箱保存。获得的抗体溶液后续称为上清。

本发明获得的 2 个抗 VEGF A VHH 抗体（LA42F8 和 LA46E11）和 1 个抗 Ang2 VHH 抗体（LA24C11）的 CDR、和 VHH 的氨基酸序列，以及序列编号请参见序列表。

之后将上述获得的免疫库抗体 LA42F8，LA46E11，LA24C11 抗体人源化，步骤如下：

①确定 CDR 环结构；

②在人种系序列数据库为重链的每个 V / J 区域找到最接近的同源序列;

③筛选与重链轻链最匹配的人种系以及最低量的回复突变;

④将嵌合抗体的 CDR 区构建至人的骨架区上;

⑤使用序列和结构特征，确定骨架区中起到维持 CDR 功能的氨基酸位置;

⑥在确定为重要的序列位置进行回复突变（返回到输入氨基酸类型）;

⑦优化风险位点的氨基酸。

本发明获得的 3 个人源化抗体分别获得人源化 VHH 抗体 LA42F8.5，LA46E11.8，LA24C11.10 的 CDR、和重链可变区的氨基酸序列请参见所附序列表。

上述 LA42F8，LA46E11，LA24C11 和人源化抗体 LA42F8.5，LA46E11.8， LA24C11.10 在真核细胞中的表达制备如下:

将从上文获得的人源化抗体序列克隆到 pcDNA3.1(Invitrogen)，分别获得包含抗体序列的质粒。

根据所需转染体积传代 Expi-293 细胞（Invitrogen），转染前一天将细胞密度调整至 1.5 × 10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度约为 3 × 10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 的 F17 培养基(Gibco，A13835-01）作为转染缓冲液，加入适当的所述质粒，混匀。加合适的聚乙烯亚胺(PEI)（Polysciences，23966）到质粒中(质粒与 PEI 的比例在 293F 细胞中为 1:3)，混匀后室温孵育 10 min，获得 DNA/PEI 混合物。用 DNA/PEI 混合物重悬细胞后，36.5℃，8%的 CO_2。24 h 后补加转染体积 2%的 FEED（Sigma），于 36.5℃，120 rpm，8%的 CO_2 条件下培养。连续培养至第 6 天或者细胞活力 ⩽ 60%时，收集细胞上清进行纯化。

将纯化使用的重力柱使用 0.5 M NaOH 过夜处理，玻璃瓶等用蒸馏水洗净后在 180℃干烤 4h，获得纯化柱。纯化前将上述收集的细胞上清 4500 rpm 离心 30 min，弃掉细胞。再将上清使用 0.22 μl 的滤器过滤。使用 10 ml 结合缓冲液（磷酸钠 20mM. NaCl 150mM, PH7.0）平衡 Protein A 柱（Hitrap Mabselect Sure 5*5ml，GE，11-0034-95）。将过滤后的上清加入纯化柱后使用 15 ml 结合缓冲液再平衡。加 5 ml 洗脱缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠 0.1M, pH3.5)，收集洗脱液，每 1 ml 的洗脱液加入 80 μl Tris-HCl。将收集的抗体超滤浓缩交换到 PBS（Gibco，70011-044）中，并检测浓度。除表 3，图 2，图 4A 和图 5A 中的用于检测的本发明抗体，后续如无特殊提及上清，实施例中所用的抗体均为此表达纯化的抗体。

类似地，阴性对照 IgG、阳性对照 BI-anti-VEGF、BI836880、Faricimab（序列见序列表）的编码核酸克隆到 pcDNA3.1 后，转染 Expi-293 细胞后，表达并纯化获得，方法同实施例 2。

实施例 3 生物膜薄层干涉技术测定本发明的嵌合抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(ForteBio)测定本发明抗体结合人 Ang2 的平衡解离常数（KD）。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页）进行。

实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AMQ（Pall，1506091）（用于样品检测）或 AHQ（Pall，1502051）（用于阳性对照检测）传感器浸泡于 SD buffer（PBS 1×，BSA

0.1%，Tween-20 0.05%）中。

取 100 μl 的 SD 缓冲液、上文实施例 2 中制备的 VHH 抗体、抗原[包括人 Ang2（北京义翘）、及人 VEGF165（R&D）]，分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板（Greiner，675076）中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation； 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度，转速为 400 rpm，温度为 30℃。使用 ForteBio 分析软件分析 K_D 值。

在以上测定法所述的实验中，抗体的亲和力如表 1 所示：

表 1. ForteBio 检测抗原抗体单价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

抗体	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
LA42F8.5	VEGF 165	ND	ND	ND
LA42F8		6.11E-09	1.89E+05	1.16E-03
LA46E11.8		ND	ND	ND
LA46E11		7.741E-09	1.84E+05	1.42E-03
LA24C11	Ang2	2.18E-09	7.61E+05	1.66E-03
LA24C11.10		ND	ND	ND

ND 表示未检测

表 2. ForteBio 检测抗原抗体双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

抗体	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
LA42F8.5	VEGF 165	2.00E-10	1.06E+06	2.13E-04
LA42F8		8.43E-10	2.37E+05	2.00E-04*
LA46E11.8		7.88E-10	4.21E+05	3.32E-04
LA46E11		1.11E-09	1.79E+05	2.00E-04*
LA24C11	Ang2	8.67E-10	2.31E+05	2.00E-04*
LA24C11.10		8.28E-10	2.42E+05	2.00E-04*

*代表解离常数超过 ForteBio 检测极限

实施例 4 抗 VEGF A VHH 抗体 ELISA 阻断实验

本实施例验证了本发明抗 VEGF A VHH 对于 hVEGF A 与受体 KDR 结合的阻断作用。将 SA（Thermo 货号 21125）稀释成 1ug/ml，100ul/孔铺于酶标版中 4℃过夜。PBST 洗 3 遍，加入 3% BSA 封闭 1.5h。PBST 洗 3 遍，加入 50ng/ml 生物素标记的 VEGF A165（ACRO 货号 VE5-H8210），孵育 1.5h，提前将抗体（起始浓度为 150ug/ml，3 倍连续稀释）的实施例 2 中制备的 LA42F8 上清、LA46E11 上清 和阴性对照 IgG，以及阳性对照 BI-anti-VEGF）50ul 与 VEGFR-Fc（北京义翘，货号：10012-H02H 终浓度 0.2ug/ml）孵育 20min 后加入板中。PBST 洗 3 遍，加入抗 human Fc HRP 抗体（Bethyl 货号：A80-104P）（1:10000）孵育 30min。PBST 洗 6 遍，TMB 显色 5min，终止后 OD450nm 读数。

本发明获得的 3 个抗 VEGF VHH 抗体阻断结果如图 2。图 2 显示了候选分子 LA42F8, LA46E11 抗体能够完全阻断 VEGF A 与 VEGFR2 结合。

实施例 5 抗 Ang2 VHH 抗体 ELISA 阻断实验

本实施例验证了本发明抗体抗 Ang2 VHH 对于 hAng2-biotin（R&D 货号：BT623B/CF）与 Tie2 蛋白结合的阻断作用

将 Tie2-Fc（北京义翘 货号：10700-H03H）稀释成 2ug/ml，100ul/孔铺于酶标版中 4℃过夜。PBST 洗 3 遍，加入 3% BSA 封闭 1.5h。PBST 洗 3 遍，提前将实施例 2 中制备的纯化的 LA24C11.10 与阴性对照 IgG 各 50ul 与 hAng2-biotin（终浓度 0.2ug/ml）孵育 20min 后加入板中。PBST 洗 3 遍，加入 Avidin HRP（1:2000）孵育 35min。PBST 洗 6 遍，TMB 显色 5min，终止后 OD450nm 读数。

本发明获得的抗 Ang2 VHH 抗体 阻断结果如表 3，候选分子 LA24C11 对 Ang2 于受体 Tie2 结合有阻断作用。

表 3. 纯化抗体单点 blocking ELISA

		Ang2-Bio（Sino）		Ang2-Bio（R&D 货号：BT623B/CF）		Ang2-Bio（R&D 货号：BT623B/CF）	
克隆号	抗体[1]起始浓度（mg/ml）	1:10 稀释抗体[1]（OD450nm）	‘1:100 稀释抗体[1]（OD450nm）	1:10 稀释抗体[1]（OD450nm）	‘1:100 稀释抗体[1]（OD450nm）	上清[2]（OD450nm）	Blank（无抗体）（OD450nm）
24C11	0.556	0.09	0.20	0.07	0.07	0.12	3.45

[1]抗体是指实施例 2 制备的纯化原核上清，起始浓度为 0.556mg/ml，后续经 1:10 或 1:100 稀释;

[2]上清是指未经纯化的原核上清。

与实施例 4 类似的（应用 Ang2-Bio（R&D 货号：BT623B/CF）），通过 ELISA 阻断实验检测了 LA24C11.10 阻断 Ang2 与 Tie2 的结合的作用，结果如图 3 所示。可见，LA24C11.10 对 Ang2 于受体 Tie2 结合有阻断作用。

实施例 6 抗 Ang2 VHH 抗体的磷酸化实验

本实施例验证了本发明的抗体抗 Ang2 VHH 抗体对于 hAng2-Fc 诱导的 Tie2 磷酸化抑制作用。

hAng2 诱导的磷酸化实验

本研究将抗体和重组 hAng2-Fc 蛋白共同孵育过表达 Tie2 的 Expi293 细胞 293-Tie2，通过检测体系中磷酸化 Tie2 的含量，从而反应出不同抗体对 hAng2-fc 诱导的 Tie2 磷酸化抑制作用。

通过向 Expi-293 细胞（Thermo）转染携带克隆至多克隆位点 MCS 的人 Tie2 基因（北京义翘 货号：HG10700-M）的 pCHO1.0 载体（Invitrogen），产生过表达人 Tie2 的 Expi-293 细胞 293-Tie2 细胞。

取过表达人 Tie2 的 293-Tie2 细胞，稀释至 2*10^6 细胞/ml，每孔 100ul 加入 96 孔板，400g 离心 5min，去上清。

使用 Expi293 培养基（Thermo 货号 A1435102）配置实验培养基：其中加入测试抗体（实施例 2 中制备的 LA24C11(24C11)和 LA24C11.0(hz24C11.10)，以及阴性对照 IgG，和阳性对照 Nesvacumab（依据 CN202010573625.2 制备）），起始终浓度为 60ug/ml，依次 1:2 等比稀释；hAng2-Fc（北京义翘：10691-H02H）终浓度为 2.5ug/ml。

用每孔 100ul 实验培养基重悬细胞，37℃孵育 15min，

离心去除培养基，加入 100ul 含 1%蛋白酶（Thermo 货号：78442）及磷酸酶抑制剂（Thermo 货号：78442）的 NP-40 裂解液（碧云天，货号：P0013F），冰上放置 30min，2000g 离心，收集蛋白上清，放于-80 度冰箱存储。

按照磷酸化 Tie2 ELISA 试剂盒（R&D 货号：DYC2720E） 的说明检测 pTie2 浓度，将试剂盒中的捕获抗体以 4ug/ml 浓度包被至酶标板上 4℃过夜。PBST 洗涤三次，5%BSA 封闭 1h。加入冻融的上一步获得的蛋白上清 100ul，及对照 pTie2（R&D 货号：DYC2720E）用于制作标准曲线室温孵育 2h（若样品 pTie2 浓度过高，超过 ELISA 检测范围的时候，可对获得的混合物进行 2~3 倍稀释）。PBST 洗涤三次，加入 100ul 缀合有 HRP 的抗 pTyr 抗体（R&D 货号：DYC2720E），室温孵育 2h。PBST 洗涤 6 次，加入 100ulTMB（Solarbio 货号：PR1200）显色，15min 后加入 100ul 终止缓冲液（Solarbio 货号：C1058）终止反应。应用多功能酶标仪 SpectraMax i3 测定 OD450-OD620。实验结果参见图 4A（24C11 为实施例 2 中制备的 LA24C11 原核表达纯化上清）和图 4B。

因此，本发明的抗 Ang2 VHH 抗体 LA24C11 和 LA24C11.10 均可以在体外有效抑制 hAng2-Fc 诱导的 293-Tie2 细胞磷酸化。

实施例 7 抗 VEGF A VHH 抗体 KDR reporter 阻断实验

VEGF A 可以与相关受体 VEGFR2（KDR）结合，激活 VEGFR2 信号通路，诱导血管内皮细胞存活，增殖和迁移等作用，本研究利用 KDR reporter 实验体系，使用 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 细胞（Promega Cat CS181401），检测梯度稀释的抗体对 VEGFA 激活相关受体信号通路的阻断作用。

实验方法参考供应商（Promega）说明：

将提前 3 天换成实验培养基（含 10%FBS 的 DMEM 培养基）的 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 细胞取出，吸除旧培养基，用 PBS 洗涤一次，之后用 1 ml Accutase solution（Sigma 货号：A6964-500ML）消化细胞，直至细胞变圆脱壁，用 5 ml 稀释培养基终止反应，吸取细胞至离心管中，1000 rpm 离心 5 min，弃去培养基，加入 10 ml 稀释培养基（含 10%FBS 的 DMEM 培养基）重悬细胞，混匀后计数，细胞活率应在 90%以上。用稀释培养基调整细胞密度至 0.8 × 10^6 个/ml，50 μl/孔按照实验布局加入 96 孔白色细胞培养板中，

配置浓度为 100ng/ml VEGF A 和梯度稀释的待测抗体混合液，静置 30min，50 μl/孔含有细胞的 96 孔白色细胞培养板中，放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 6 h。其中，待测样品如下: 阴性对照 IgG; 阳性对照 BI-anti-VEGF; LA42F8;LA46E11;LA42F8.5; LA46E11.8; Blank: 仅含稀释培养基，无 VEGF A，无抗体; VEGF A 100ng/ml: 仅含 100ng/ml VEGF A。

从二氧化碳培养箱中取出已孵育 6 h 的 96 孔白色细胞培养板，平衡 10~15 min 至室温。将提前拿出平衡至室温的 Bio-Glo Luciferase Assay System 按照实验布局 100 μl/孔加入 96 孔白色细胞培养板中，室温避光孵育 5 min。

使用多功能酶标仪进行荧光读值，读板模式选择化学发光模式、读板类型选择终点法、波长设定为全波长，逐列收集荧光，每列收集时间为 1000 ms。

在以上测定法所述的实验中，检测结果如图 5 显示，抗 VEGF VHH 抗体 LA42F8，LA42F8.5，LA46E11，LA46E11.8 均可阻断 VEGF A 诱导的 KDR 信号通路激活。

实施例 8 抗 VEGF A VHH 抑制 VEGF A 诱导的 HUVEC 存活增殖实验

VEGF A 可作用于血管内皮细胞中 VEGFR 等相关的受体，促进血管内皮细胞存活，增殖和迁移，进而诱导新生血管化，本实验基于 VEGF 诱导人脐静脉内皮细胞（HUVEC）存活和增殖，检测抗体对 VEGF A 诱导的原代细胞存活和增殖的抑制作用。

本实施例通过 CCK-8 测定 HUVEC 的存活和增殖，具体方法如下：提前一天处理细胞 HUVEC（Allcells 货号：H-001-CN），2000 细胞/孔铺于 96 孔培养板中，放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 24 小时，

待细胞贴壁后，配置含终浓度为 10ng/ml VEGF A 和梯度稀释的抗体（实施例 2 中制备的 LA42F8，起始浓度 80ug/ml 1:3 等比稀释，阴性对照 IgG，阳性对照 BI836880，仅含 10ng/ml VEGF A 的组(VEGFA)，以及无 VEGF A 和抗体添加的 Blank）实验培养基，置换 96 孔板中内皮细胞培养基，放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 72 小时，

10 μl/孔加入 CCK-8 检测液（同仁化学 货号：CK04），放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 12~24 小时，

使用多功能酶标仪进行吸光度 OD_{450}-OD_{620} 读值，

在以上测定法所述的实验中，检测结果如图 6 所示，从图中可以看出，抗 VEGFA 抗体 LA42F8 能够完全抑制 VEGFA 诱导的 HUVEC 细胞存活和增殖。

实施例 9 抗 VEGF A/Ang2 双特异性抗体 HEK293-KDR reporter 阻断实验

将本发明的双特异性结合分子的链 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012（序列如序列表所示）的链构建到 pcDNA3.1 载体，如实施例 2 所述在 293 细胞中表达和纯化所述双特异性结合分子。

本实施例通过 HEK293-KDR reporter 实验检测了抗 VEGF A/Ang2 双特异性抗体对 VEGF A 的阻断作用。实验方法参照实施例 7。

应用的结合分子或对照如下:

Blank: 无 VEGF A，无抗体;

VEGF A: 100ng/ml VEGF A;

阴性对照 IgG: 如上所述制备;

阳性对照 Faricimab: 如上所述制备，起始浓度为 13.5ug/ml, 1:3 梯度稀释;

阳性对照 BI-836880: 如上所述所述制备，起始浓度为 13.5ug/ml, 1:3 梯度稀释;

IEX04-012: 如上所述制备，起始浓度为 13.5ug/ml, 1:3 梯度稀释。

检测结果如图 7 所示，双特异性结合分子 IEX04-012 抑制 VEGF 诱导 KDR 信号通路激活，与对照抗体 BI836880 相比，具有更优的抑制能力。

实施例 10 抗 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子 HUVEC 增殖抑制实验

本研究通过 HEK293-KDR reporter 实验检测了抗 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子对 VEGF A 诱导的 HUVEC 细胞存活和增殖的抑制作用。

实验方法如实施例 8，但是应用的抗体如下:

图 A: 起始浓度为 20ug/ml,1:3 等比稀释的如上所述制备的 IEX04-008、阴性对照 IgG，阳性对照 Faricimab 和 BI836880，空白为 Blank（即无抗体和 VEGF A），以及 VEGF A 组（即仅添加 20ng/ml VEGFA）;

图 B: 起始浓度为 80ug/ml，1:3 等比稀释的如上所述制备的阴性对照 IgG、BI-anti-VEGF、IEX04-010、空白为 Blank(即无抗体和 VEGF A),以及 VEGF A 组(即仅添加 20ng/ml VEGFA);

图 C: 起始浓度为 20nM，1:3 等比稀释的如上所述制备的 IEX04-012、阴性对照 IgG，阳性对照 Faricimab 和 BI836880，空白为 Blank（即无抗体和 VEGF A），以及 VEGF A 组（即仅添加 20ng/ml VEGFA）。

检测结果如图 8 所示在，双特异性结合分子 IEX04-008，IEX04-010，IEX04-012 均抑制了 VEGF 诱导的 HUVEC 细胞存活和增殖，与对照抗体 BI836880 和 Faricimab 相比，IEX04-012 的 IC_{50} 更低，具有更优的抑制能力。

实施例 11 抗 VEGF A/Ang2 双特异性抗体 Ang2 阻断实验

Ang2 可与其天然受体 Tie2 结合，本研究通过 ELISA 法和 FACS 法检测了抗 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子对 Ang2 与 Tie2 之间结合的阻断。

（1）ELISA

通过 ELISA 检测了 IEX04-008， IEX04-010 和 IEX04-012 以及对照抗体 BI-836880 和 Faricimab 阻断人 Ang2 与 hTie2 结合的能力。

将 hTie2 蛋白（北京义翘）使用 PBS 重悬并溶解至 2ug/ml 浓度，包被至酶标板过夜。使用 5%BSA 封闭 1h，将生物素抗原 Recombinant Biotinylated hAngiopoietin-2 蛋白（R&D）稀释至 600ug/mlM，50 μl/孔。将如上所述制备的抗体（IEX04-008， IEX04-010、IEX04-012 以及阳性对照抗体 BI836880 和 Faricimab 和阴性对照 IgG）从最高浓度 300nM 1: 2 等比稀释，共 8 个或 12 稀释梯度，50 μl/孔，于 PBS 冰上孵育 30 min，生物素抗原终浓度 300ng/ml。将如上所述获得的抗原抗体混合液孵育至酶标板 90min，PBS 洗三次，弃上清，加 1:10000 稀释的 100 μl Avidin-HRP（Invitrogen）/孔，常温 30 min，加 PBS 洗六次。使用 100ul/孔 TMB

显色液（solarbio）显色 1 min，并用终止液（Solarbio）100ul/孔终止。

应用酶标仪对每孔读数 OD_{450}，OD_{620}。

实验结果表明（参见图 9），IEX04-008， IEX04-010，IEX04-012 以及对照抗体 BI836880 都具有完全阻断效果，且本发明的双特异性结合分子的 IC_{50} 均显著小于阳性对照抗体。

（2）流式细胞检测（FACS）

通过 FACS 检测了 IEX04-008， IEX04-010，IEX04-012 以及阳性对照抗体 BI-836880 和 Faricimab 和阴性对照 IgG 阻断人 Ang2-hFc 与细胞表面的 Tie2 结合的能力。

将抗原 hAng2-Fc 蛋白（北京义翘，货号：10691-H02H）稀释至 4ug/ml，50 μl/孔。将如上所述制备的抗体（IEX04-008，IEX04-010、IEX04-012 以及阳性对照抗体 BI-836880 和 Faricimab 和阴性对照 IgG）从最高浓度 800nM 开始进行 2 倍梯度稀释，共 12 个稀释梯度，50 μl/孔，于 PBS 冰上孵育 30 min，抗原 hAng2-Fc 蛋白终浓度 2ug/ml，每个抗体最高终浓度 400nM。将如上所述制得的 293-Tie2 细胞调节至 2×10^5 细胞/孔，100 μl/孔。细胞于 300 g 离心 5 min，弃上清，重悬于抗原抗体混合液。冰上孵育 30 min，加 PBS 100 μl/孔，300 g 离心 5 min，PBS 清洗 1 次，加 1:200 稀释的 100 μl Goat anti-human IgG-PE （SouthernBiotech）/孔，冰浴 20 min，加 PBS 100 μl/孔，300 g 离心 5 min，PBS 清洗 1 次。用 100 μl PBS 重悬，细胞流式仪（BD Biosciences）检测细胞荧光信号值。根据其 MFI，用 GraphPad 拟合浓度依赖的曲线。结果如图 10 所示。图中显示，双特异性结合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 都能有效阻断人 Ang2-hFc 与 Tie2 的结合，且 IC_{50} 低于阳性对照。

实施例 12 抗 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子的 Ang2 磷酸化抑制实验

本实施例验证了本发明双特异性结合分子对于 hAng2-Fc 诱导的 Tie2 磷酸化的抑制作用，其应用了 hAng2 诱导的磷酸化实验。

本研究将双特异性结合分子和重组 hAng2-Fc 蛋白共同孵育过表达 Tie2 的 Expi293 细胞，293-Tie2，通过检测体系中磷酸化 Tie2 的含量，从而反应出不同抗体对 hAng2-Fc 诱导的 Tie2 磷酸化抑制作用。

取如上制备的过表达 293-Tie2 细胞，稀释至 $2*10^6$cell/ml，每孔 100ul 加入 96 孔板，400g 离心 5min，去上清。

使用 Expi293 培养基（Thermo 货号 A1435102）配置实验培养基，其中分别加入了测试抗体（如上制备的 IEX04-012、阳性对照 BI-836880 和 Faricimab、阴性对照 IgG）最高终浓度为 60ug/ml，依次 1:2 等比稀释，hAng2-Fc(北京义翘 货号: 10691-H02H)终浓度为 2.5ug/ml。

用每孔 100ul 实验培养基重悬细胞，37 度孵育 15min，离心去除培养基，加入 100ul 含 1%蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 NP-40 裂解液，冰上放置 30min。2000g 离心，收集蛋白上清，放于-80 度冰箱存储，

按照磷酸化 Tie2 ELISA 试剂盒（R&D DYC2720E）说明检测 pTie2 浓度，将捕获抗体以 4ug/ml 浓度包被至酶标板上 4 度过夜。PBST 洗涤三次，5%BSA 封闭 1h。加入待测样品 100ul，及对照 pTie2（R&D DYC2720E）用于制作标准曲线室温孵育 2h（若样品 pTie2 浓度过高，超过 ELISA 检测范围的时候，可对获得的混合物进行 2~3 倍稀释）。PBST 洗涤三次，加入 100ul 缀合有 HRP 的抗 pTyr 抗体（R&D 货号：DYC2720E）,室温孵育 2h。PBST 洗涤 6 次，加入 100ul TMB 显色，15min 后加入 100ul 终止缓冲液终止反应。应用分光光度计测

定每孔的 OD450-OD620。

实验结果如图 11 所示。本发明的抗体 IEX04-012 可以在体外有效抑制 hAng2-Fc 诱导的 293-Tie2 磷酸化，且 IC_{50} 优于阳性对照。

实施例 13 抗 VEGF A/Ang2 双特异性结合分子对 Ang2 血管内皮细胞渗漏的抑制实验

本研究通过HUVEC-Tie2渗漏实验鉴定抗VEGF A/Ang2双特异性结合分子对血管内皮细胞渗漏的作用和功能。

使用慢病毒转染 HUVEC 细胞(Allcells 货号:H-001-CN)获得过表达 Tie2 的 HUVEC-Tie2 细胞。

使用 mini-well 96 孔插入式培养皿下层铺 EGM-2 培养基 300ul，用 Accutase（Sigma）消化并获得 HUVEC-Tie2，使用 EGM-2 培养基重悬至 $1*10^7$ 细胞/ml,100ul/孔铺于培养皿上层。每隔 24h 置换下室培养基（EGM-2 培养基），24 小时后更换下室培养基为实验培养基，所述实验培养基组成如下:

Blank: EGM-2 培养基（Lonza 货号: CC-5035），

VEGF A 组: EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF（R&D 货号: 293-VE）

IgG 组（VEGF A+IgG）: EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF +10ug/ml IgG;

Ang1 组（VEGF A+Ang1）: EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF（R&D 货号: 293-VE）+200ng/ml Ang1（R&D 货号: 923-AN）;

IEX04-012 组（VEGF A+ IEX04-012）: EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF +10ug/ml IEX04-012;

BI-836880 组(VEGF A+ BI-836880): EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF +10ug/ml BI-836880;

Faricimab 组（VEGF A+ Faricimab）: EGM-2 培养基+20ng/ml VEGF +10ug/ml Faricimab。

将上述实验培养基放置于 37℃、5% CO_2 培养。

24 小时后上室实验培养基每孔加入 1ul FITC-Dextran（Sigma 货号: FD2000S-1G）(4mg/ml), 放置于 37℃、5% CO_2.30min 后取下室培养基，使用 PBS 稀释 1:10 稀释后于多功能酶标仪检测，激发光波长 488nm，发射光波长 535nm。

实验结果如图 12，其显示本发明抗体 IEX04-012 能够有效降低 VEGF 诱导的血管内皮细胞通透性。

实施例 14. 激光诱导的脉络膜新生血管化药效试验

本实验采用恒河猴激光诱导的脉络膜新生血管化模型测定本发明的双特异性结合分子 IEX04-012 的抗新生血管化作用。

恒河猴:

种属: 恒河猴; 等级: 普通级; 体重: 购入时体重 3.30~4.20 kg; 造模时体重 3.35~4.35 kg; 来源: 四川横竖生物科技股份有限公司，生产许可证号: SCXK(川)2019-029，实验动物质量合格证编号: No.0023356;

本试验采用激光围绕恒河猴眼底黄斑中心凹光凝，诱导眼底脉络膜血管新生，建立与人类脉络膜新生血管类似的动物模型。光凝前及光凝后 20 天进行荧光素眼底血管造影判定造模情况，选择造模成功的 20 只恒河猴（雌雄各半）分 5 组，分别为模型对照组、IEX04-012 低剂量组、IEX04-012 高剂量组、Elyea 组、Faricimab 组 5 组，每组 4 只猴，雌雄各半。

光凝后第 21 天，对各组猴分别按表中剂量进行给药，双眼玻璃体注射给予 IEX04-012、Eylea（Bayer）或 Faricimab（均溶于 0.9%氯化钠注射液），模型对照组给与等体积的 0.9%氯化钠注射液。各组动物分别于给药后 7、14、21、28 天进行眼底彩色照相、荧光素眼底血管造影（渗漏斑统计和渗漏面积测量）（Robin J Goody, Wenzheng Hu, Afshin Shafiee 等人，Optimization of laser-induced choroidal neovascularization in African green monkeys. Experimental Eye Research, Exp Eye Res. 2011 92(6):464-72），光学相干断层扫描检查（OCT，Wang Q, Lin X, Xiang W 等人，Assessment of laser induction of Bruch's membrane disruption in monkey by spectral-domain optical coherence tomography. British Journal of Ophthalmology, 2015, 99(1):119-24），观察供试品对脉络膜新生血管的抑制情况。于给药后 29 天实施安乐死后取双眼进行免疫组织化学（HE）染色的组织学检查。

实验设计表

组别	剂量	给药体积	浓度	给药方式
对照	/	/	X mg/ml	
IEX04-012 低剂量	10ug/眼	50ul/眼	0.2mg/ml	玻璃体腔给药
IEX04-012 高剂量	30ug/眼	50ul/眼	0.6mg/ml	玻璃体腔给药
Eylea	10ug/眼	50ul/眼	0.2mg/ml	玻璃体腔给药
Faricimab	30ug/眼	50ul/眼	0.6mg/ml	玻璃体腔给药

结果如图 13-15 显示，本发明双特异性结合分子在给药 28 天后即显示出显著的抗新生血管化作用，四级渗漏光斑（图 13A）和三至四级渗漏光斑（图 13 B）数量统计显示，IEX04-012 组治疗动物，高渗漏光斑数量显著少于对照和阳性对照给药组。OCT 结果显示，IEX04-012 治疗组动物中，视网膜厚度显著降低，提示视网膜水肿程度减轻，且效果优于对照（图 14）。荧光素眼底血管照影结果显示，IEX04-012 治疗组眼底渗漏面积显著降低，且效果优于阳性对照 Eylea 和 Faricimab（图 15），说明本发明抗体能显著抑制新生血管引起的渗漏。综上所述，证明本发明抗体本发明抗体联合抗 VEGF 抑制剂对激光诱导的眼底新生血管化有明显的抑制效果，同时具有保护血管完整性功能。

恒河猴给药 29 天后根据体重以戊巴比妥钠麻醉（静脉注射约 30 mg/kg，可根据动物健康状况调整剂量），腹主动脉或股动脉放血安乐死，进行大体观察，并摘取双侧眼球。

部分动物双眼以改良的 Davidson’s 固定液固定，石蜡包埋切片，并选取激光造模区域进行常规 HE 染色，CD31 IHC 染色等组织病理学检查。

本发明抗体组在病理切片中，相对抗 VEGF 单独治疗，视网膜病变区域显著减少，视网膜水肿减轻，激光损伤区域组织增生减少，结果显示了更好的视网膜形态学改善（参见图 16），抑制了视网膜脉络膜新生血管化，增强了血管完整性功能（图 17）。

序列表

SEQ ID NO	抗体名称	LA42F8（VEGFA VHH）
1	HCDR1	GFNLDYYPIG
2	HCDR2	CISSVGSTNYADSVKG
3	HCDR3	DPLCSALILPPPFLS
4	VH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDYYPIGWFRQAP GKEREGVSCISSVGSTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKPEDTAVYYCAADPLCSALILPPPFLSWGQGTQVTVSS
	抗体名称	LA42F8.5
1	HCDR1	GFNLDYYPIG
2	HCDR2	CISSVGSTNYADSVKG
3	HCDR3	DPLCSALILPPPFLS
5	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDYYPIGWFRQAP GKGLEGVSCISSVGSTNYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCAADPLCSALILPPPFLSWGQGTQVTVSS
	抗体名称	LA46E11（VEGFA VHH）
6	HCDR1	GSIFSINAMG
7	HCDR2	TMIGGSSTFYADSVNG
8	HCDR3	DVTGRSGTSIWNKRDDY
9	VH	QVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCVASGSIFSINAMGWHRQAP GSQRELVATMIGGSSTFYADSVNGRFTISRDNAKNTVYLQM NSLKLEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGTLVT VSS
	抗体名称	LA46E11.8（VEGFA VHH）
6	HCDR1	GSIFSINAMG
10	HCDR2	TMIGGSSTFYAESVQG
8	HCDR3	DVTGRSGTSIWNKRDDY
11	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWHRQAPG KQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRDNSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGTQVTVS S
	抗体名称	LA24C11（Ang2 VHH）
16	HCDR1	GFALDYYAIG
17	HCDR2	CISSGDGSTYYADSVKG
18	HCDR3	DSRGDDVACEGLRRNEYDY
19	VH	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAP GKEREGVSCISSGDGSTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQ MNSLKPEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQG TQVTVSS
	抗体名称	LA24C11.10（Ang2 VHH）
16	HCDR1	GFALDYYAIG
20	HCDR2	CISSGEGSTYYADSVKG
18	HCDR3	DSRGDDVACEGLRRNEYDY
21	VH	*EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKG LEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAE DTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSS*
	抗体名称	IEX04-008 LA46E11.8(VHH)(下划线)+接头（粗体）+ LA46E11.8(VHH)(下划线)+ LA24C11.10（斜体）
22	全长	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWHRQAPG KQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRDNSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGTQVTVS</u> **<u>SGGGGSGGGGS</u>**<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSI</u>

		NAMGWHRQAPGKQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRD NSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRD DYWGQGTQVTVSS**GGGGSGGGGS***EVQLLESGGGLVQPGGS* *LRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD* *SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVA* *CEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSS*
	抗体名称	IEX04-010 VEGFR 胞外结构域+Fc+接头（下划线）+ LA24C11.10（斜体）
24	全长	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKF PLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLY KTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELN VGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTID GVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPG**GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLLESGGGLVQPGGS* *LRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD* *SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVA* *CEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSS** *
	名称	Aflibercept （VEGFR 胞外结构域（下划线）+Fc（斜体+粗体），其中 FLT1 domain 2 为下划线，KDR domain 3 为下划线+粗体）
25	全长	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKF PLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLY KTNYLTHRQTNTII**DVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE** **LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS** **TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK*DK*** ***THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV*** ***DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV*** ***LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ*** ***VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN*** ***NYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE*** ***ALHNHYTQKSLSLSPG***
26	VEGFR 胞外结构域	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKF PLDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLY KTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELN VGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTID GVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
27	Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPG
\	抗体名称	IEX04-012 含二硫键突变的 Ranibizumab scFv+接头（粗体）+ LA24C11.10（斜体）
28	全长	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK APKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGCGTKVEIK**GGGGSGGGGSGGGGSGGG** **GS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVR

		QAPGKCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTL VTVSS**GGGGSGGGGSGGGGS***EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGL RRNEYDYWGQGTLVTVSS****
		含二硫键突变的 Ranibizumab scFv
29	scFv	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK APKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGCGTKVEIK**GGGGSGGGGSGGGGSGGG GS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVR QAPGKCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTA YLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTL VTVSS
30	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK APKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGCGTKVEIK
31	LCDR1	QDISNYLN
32	LCDR2	FTSSLHS
33	LCDR3	QQYSTVPWT
34	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVT VSS
35	HCDR1	GYDFTHY
36	HCDR2	NTYTGE
37	HCDR3	YPYYYGTSHWYFDV
23	接头	$(GGGGS)_n$,其中 n=1、2、3 或 4
		阳性对照抗体 BI836880（VEGFA 端）
12	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAP GKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQIN SLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVS S
		阳性对照抗体 Faricimab
13	HC 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYL QMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCK VSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVS LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPG K
40	LC1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK APKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
14	HC 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQ APGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTA

		YMELSRLRSDDTAVYYCARSPNPYYYDSSGYYYPGAFDIWG QGTMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPP CPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHED PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLA QDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTL PPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN AYTQKSLSLSPGK
41	LC 2	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQ APVLVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEAD YYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV EPKSC
		阳性对照抗体 BI836880（VEGFA/HSA/Ang2)
15	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAP GKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQIN SLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVS S**GGGGSGGGS**EVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSS FGMSWVRQAPGRGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRD NAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSS **GGGGSGGGS**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDY AIGWFRQAPGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDN SKNTVYLQMNSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIY EYDAWGQGTLVTVSS
		阴性对照 IgG
38	重链	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSK NALYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQG TTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQK PGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP EDFATYYCQQADLPAFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
		阳性对照抗体 BI-anti-VEGF
39		DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAP GKEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNAKNTVYLQIN

		SLRPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSS

权利要求:

1、抗 Ang2 的 VHH 抗体 ，其包含如下的 3 个 CDR，HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由所述序列组成;

HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由所述序列组成。

2、权利要求 1 的 VHH 抗体，其中所述 VHH

（1）包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的氨基酸组成;或

（2）包含与 SEQ ID NO:19 或 21 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

3、结合 VEGF A 和 Ang2 的双特异性结合分子，其包含特异性结合 VEGF A 的第一靶标结合区和特异性结合 Ang2 的第二靶标结合区，其中第二靶标结合区为权利要求 1 或 2 所述的 VHH 抗体，

任选地，其中第一靶标结合区选自:

特异性结合 VEGF A 的 VHH;

特异性结合 VEGF A 的抗体的抗原结合片段，例如 scFv，例如所述抗体为全人抗体或人源化抗体; 或

特异性结合 VEGF A 的 VEGF 受体（VEGF R）或其胞外结构域或包含其胞外结构域的融合蛋白，例如其胞外结构域与 Fc 的融合蛋白。

4、权利要求 3 的双特异性结合分子，其为双特异性抗体。

5、权利要求 3 或 4 的双特异性结合分子，其为二价、三价或四价的。

6、权利要求 4 或 5 的双特异性结合分子，其具有以下结构:

抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL-接头-抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH-接头-抗 Ang2 VHH 或

抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH-接头-抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL-接头-抗 Ang2 VHH。

7、权利要求 6 的双特异性结合分子，其中:

抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由其组成;LCDR2 包含 SEQ ID NO:32 所示的序列或由其组成;LCDR3 包含 SEQ ID NO:33 所示的序列或由其组成; 和/或

抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由其组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO:36 所示的序列或由其组成;

HCDR3 包含 SEQ ID NO:37 所示的序列或由其组成。

8、权利要求 6 或 7 的双特异性结合分子，其中

抗 VEGF 抗体的重链可变区 VH 包含 SEQ ID NO:34 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 34 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 34 所述的氨基酸组成；或所述重链可变区 VH 包含与 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换；

抗 VEGF 抗体的轻链可变区 VL 包含 SEQ ID NO:30 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 30 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 30 所述的氨基酸组成；或所述轻链可变区 VL 包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

9、权利要求 6-8 中任一项所述的双特异性结合分子，其中

（1）所述结合分子包含 SEQ ID NO:28 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 28 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 28 所述的氨基酸组成；或

（2）所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 28 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

10、权利要求 4 或 5 的双特异性结合分子，其具有以下结构：

第一抗 VEGF VHH-接头-第二抗 VEGF VHH-接头-抗 Ang2 VHH，

其中第一抗 VEGF VHH 与第二抗 VEGF VHH 相同或不同。

11、权利要求 10 的双特异性结合分子，其中第一抗 VEGF VHH 或第二抗 VEGF VHH 包含 HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由所述序列组成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由所述序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由所述序列组成。

12、权利要求 10 或 11 的双特异性结合分子，其中第一抗 VEGF VHH 或第二抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸组成；或所述 VHH 包含

与 SEQ ID NO: 4、5、9 或 11 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

13、权利要求 10-12 中任一项的双特异性结合分子，其中

（1）所述结合分子包含 SEQ ID NO:22 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 22 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 22 所述的氨基酸组成；或

（2）所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 22 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

14、权利要求 3 的双特异性结合分子，其包含一条或两条以下链:

VEGF R 胞外结构域-Fc-接头-抗 Ang2 VHH。

15、权利要求 14 的双特异性结合分子，其中所述 VEGFR 胞外结构域为来自人的 VEGFR 的胞外结构域；优选地，所述 VEGFR 胞外结构域包含 VEGFR1 第二抗体样结构域和 VEGFR2 第三抗体样结构域；更优先地，所述 VEGFR 胞外结构域包含人 VEGFR1 第二抗体样结构域和人 VEGFR2 第三抗体样结构域。

16、权利要求 14 或 15 的双特异性结合分子，所述 VEGFR 胞外结构域包含 SEQ ID NO:26 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 26 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:26 所述的氨基酸组成。

17、权利要求 14-16 中任一项的双特异性结合分子，其中所述 Fc 为来源人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc，优选地，所述 Fc 包含 SEQ ID NO:27 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 27 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:27 所述的氨基酸组成。

18、权利要求 14-17 中任一项的双特异性结合分子，其中所述 VEGF R 胞外结构域-Fc 为 VEGFR 胞外结构域与 Fc 的融合蛋白，例如 Aflibercept 或其衍生物，例如包含 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 25 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所述的氨基酸组成。

19、权利要求 14-18 中任一项的双特异性结合分子，其中

（1）所述结合分子包含 SEQ ID NO:24 的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO: 24 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 24 所述的氨基酸组成；或

（2）所述双特异性结合分子包含与 SEQ ID NO: 24 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

20、权利要求 3-19 中任一项的双特异性结合分子，其中所述接头包含 SEQ ID NO:23 的氨基酸序列，或由其组成。

21、抗 VEGF A 的 VHH 抗体，其包含如下的 3 个 CDR，HCDR1， HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由所述序列组成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由所述序列组成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由所述序列组成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由所述序列组成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由所述序列组成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由所述序列组成。

22、权利要求 21 的 VHH 抗体，其

（1）包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列，或包含与所述 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的氨基酸组成；或

（2）包含与 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所示的氨基酸序列相比具有一个或几个（优选不超过 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 个）突变的氨基酸序列，所述突变例如置换、缺失或添加，优选地置换，例如保守置换。

23、核酸分子，其编码权利要求 1 或 2 或 21 或 22 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 3-20 中任一项的双特异性结合分子或所述结合分子的链。

24、表达载体，其包含权利要求 23 的核酸分子，优选地，所述表达载体为 pcDNA3.1。

25、宿主细胞，其包含权利要求 23 所述的核酸分子或权利要求 24 所述的表达载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，例如细菌如大肠杆菌细胞，例如 TG1；或 293 细胞，例如 293F 或 Expi-293 细胞。

26、制备权利要求 1 或 2 或 21 或 22 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 3-20 中任一项的双特异性结合分子的方法，所述方法包括，在适合所述 VHH 抗体或或双特异性结合分子或其链表达的条件下，培养权利要求 25 的宿主细胞，和任选地从所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述 VHH 或双特异性结合分子。

27、免疫缀合物，其包含权利要求 1 或 2 或 21 或 22 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 3-20 中任一项的双特异性结合分子

28、药物组合物或制剂，其包含权利要求 1 或 2 或 21 或 22 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 3-20 中任一项的双特异性结合分子，以及任选地一种或多种其他治疗剂，以及任选地药用辅料。

29、在受试者中预防或治疗眼部疾病的方法，包括向受试者施用有效量的权利要求 1 或 2 或 21 或 22 中任一项的 VHH 抗体，或权利要求 3-20 中任一项的双特异性结合分子，权利要求 27 的免疫缀合物或权利要求 28 的药物组合物或制剂。

30、权利要求 29 的方法，其中所述眼部疾病选自与血管发生相关的眼部疾病，例如与角

膜新生血管化相关的眼部疾病。

31、权利要求 29 或 30 的方法，其中所述患者具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白质水平的）VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

32、权利要求 29-31 中任一项的方法，其中所述方法还包括向患者施用一种或多种疗法，例如治疗方式和/或其它治疗剂。

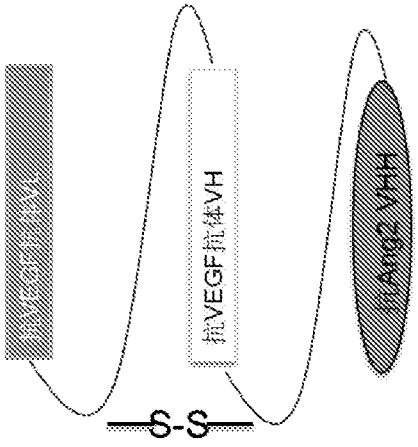


图1A

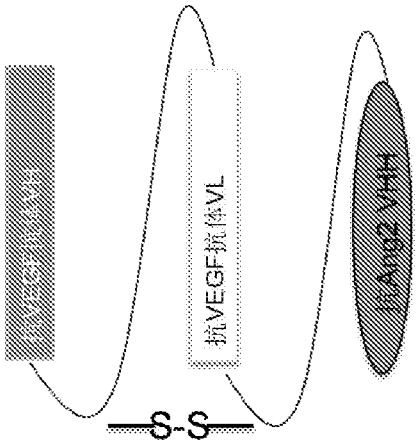


图1B

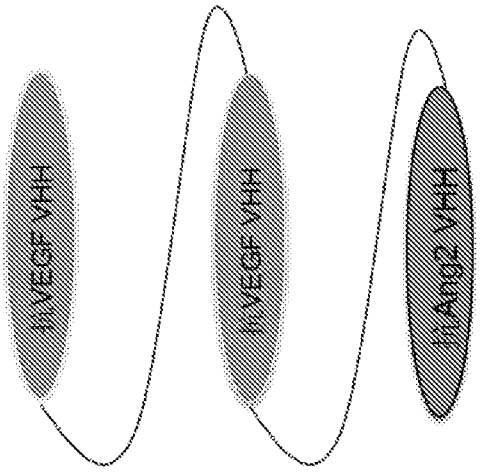


图1C

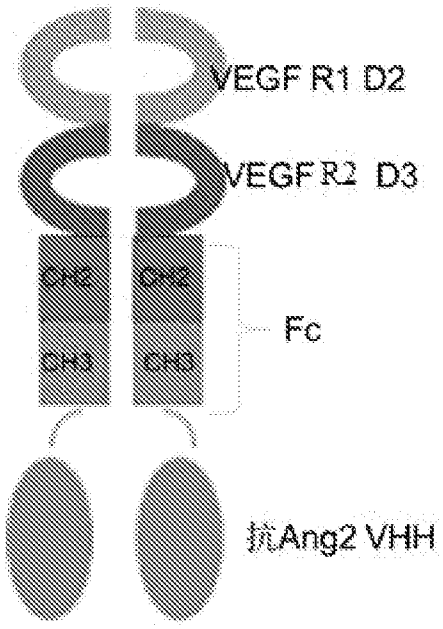
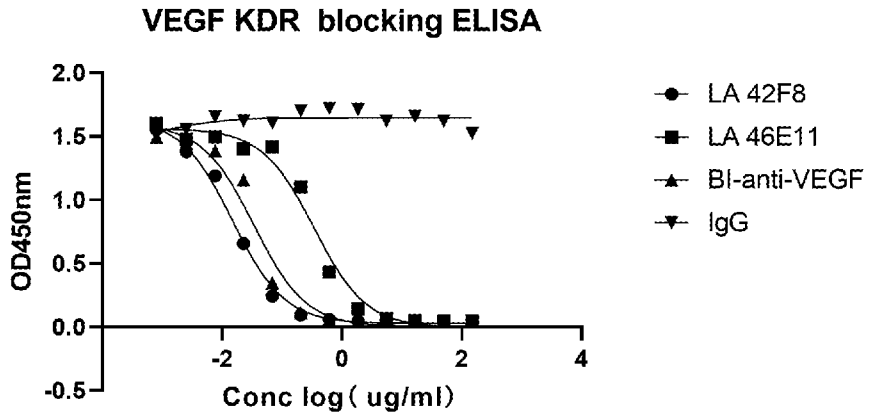


图1D



	LA 42F8	LA 46E11	BI-anti-VEGF	IgG
EC50	0.01490	0.3435	0.03401	0.002084

图 2

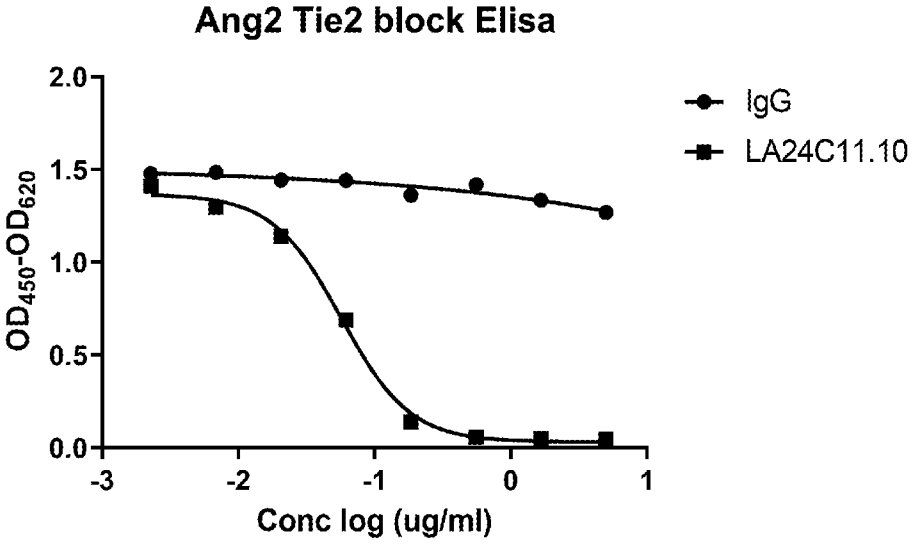
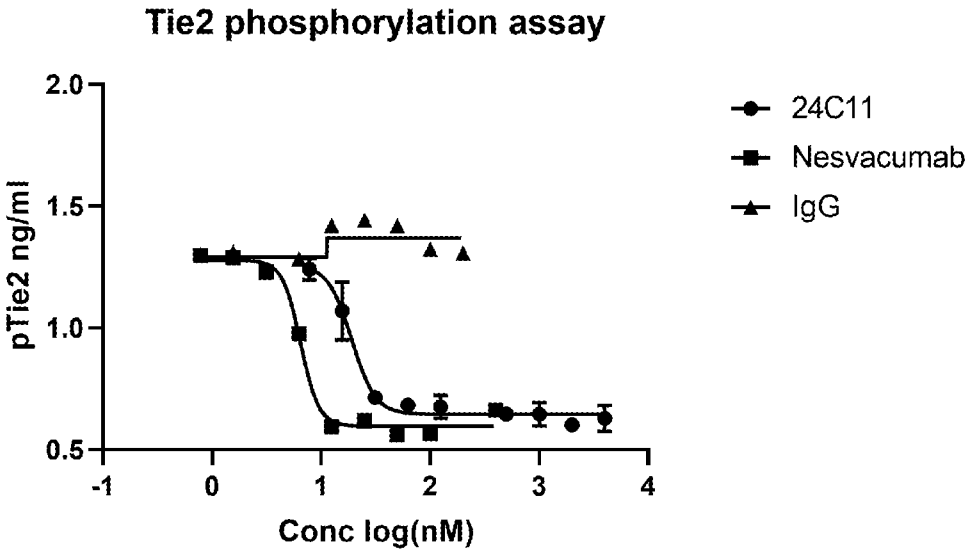


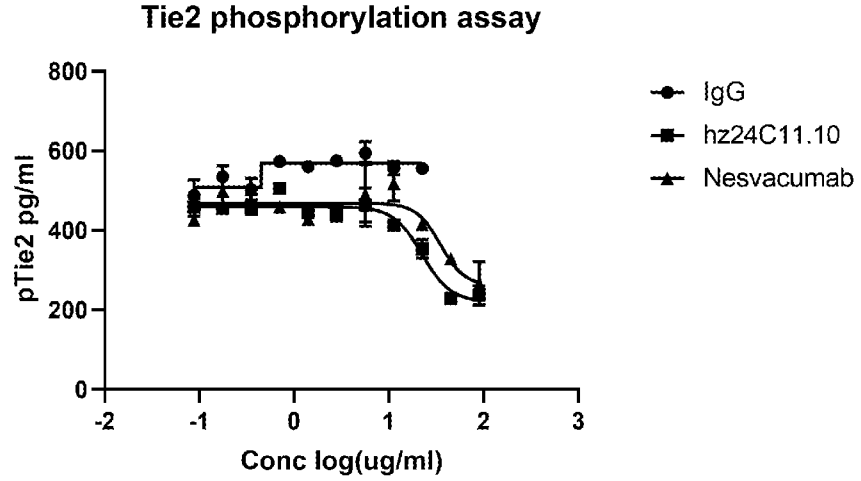
图 3

A



	24C11	Nesvacumab	IgG
IC50	19.08	6.485	~ 11.25

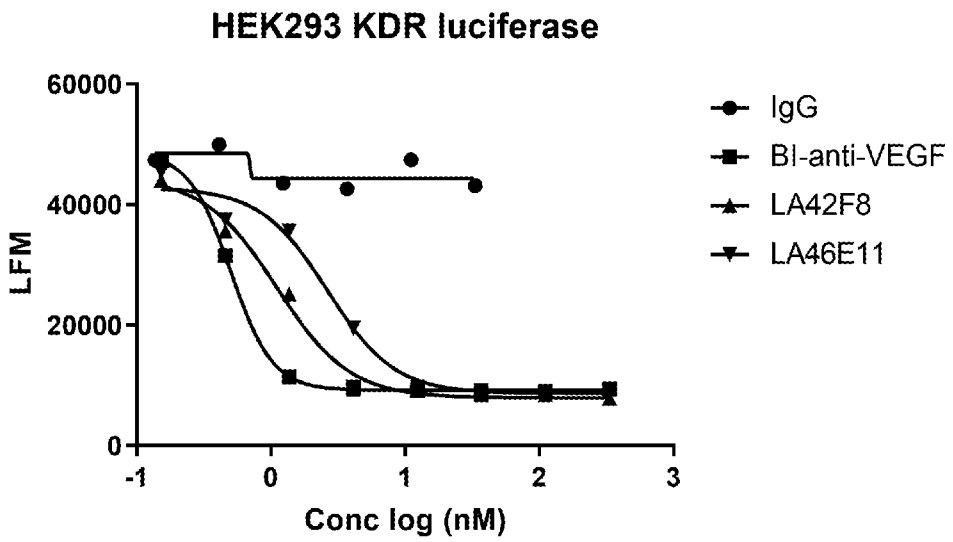
B



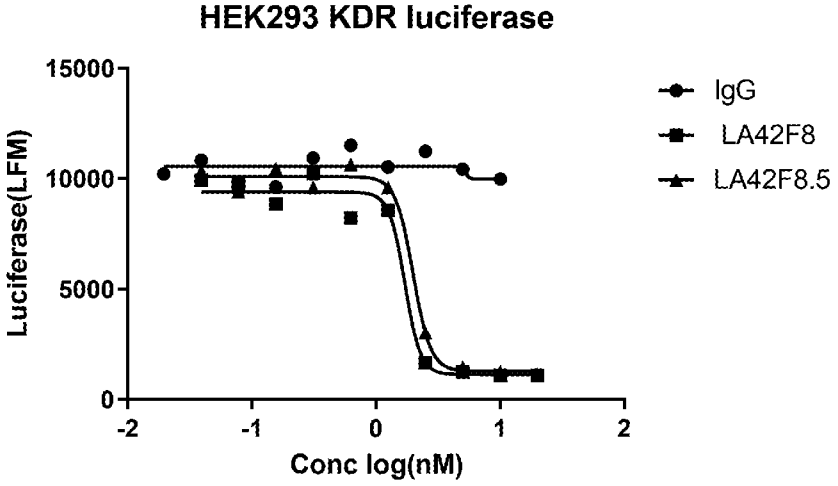
	IgG	hz24C11.10	Nesvacumab
IC50	~ 0.4502	22.39	34.94

图 4

A


HEK293 KDR luciferase
60000
40000
20000
0
LFM
-1
0
1
2
3
Conc log (nM)
IgG
BI-anti-VEGF
LA42F8
LA46E11

B


HEK293 KDR luciferase
15000
10000
5000
0
Luciferase(LFM)
-2
-1
0
1
2
Conc log(nM)
IgG
LA42F8
LA42F8.5

C

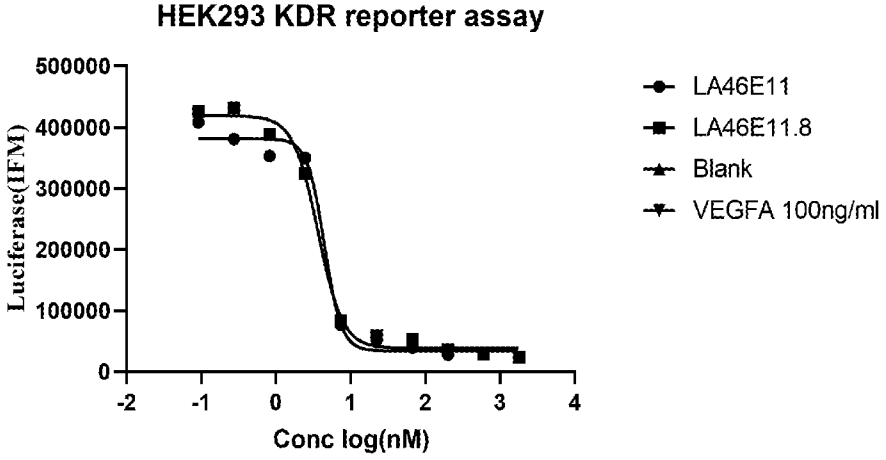
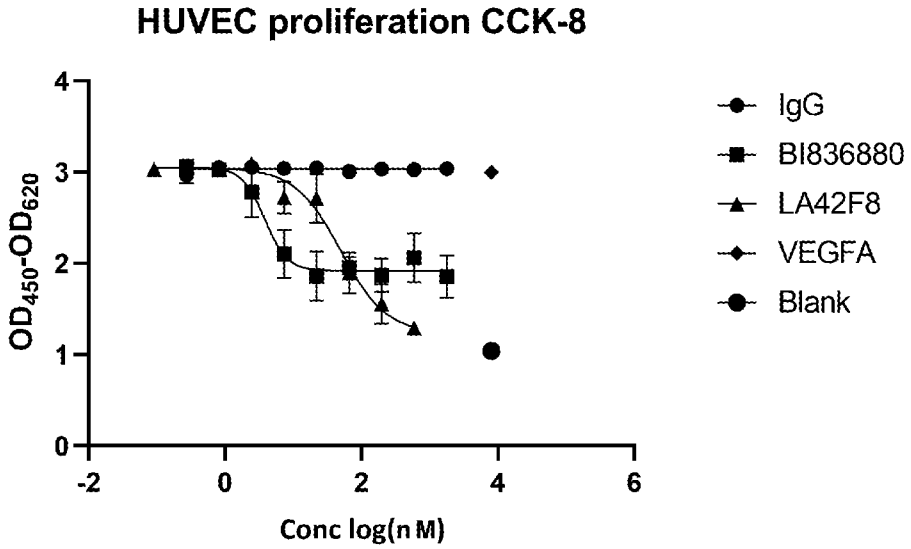
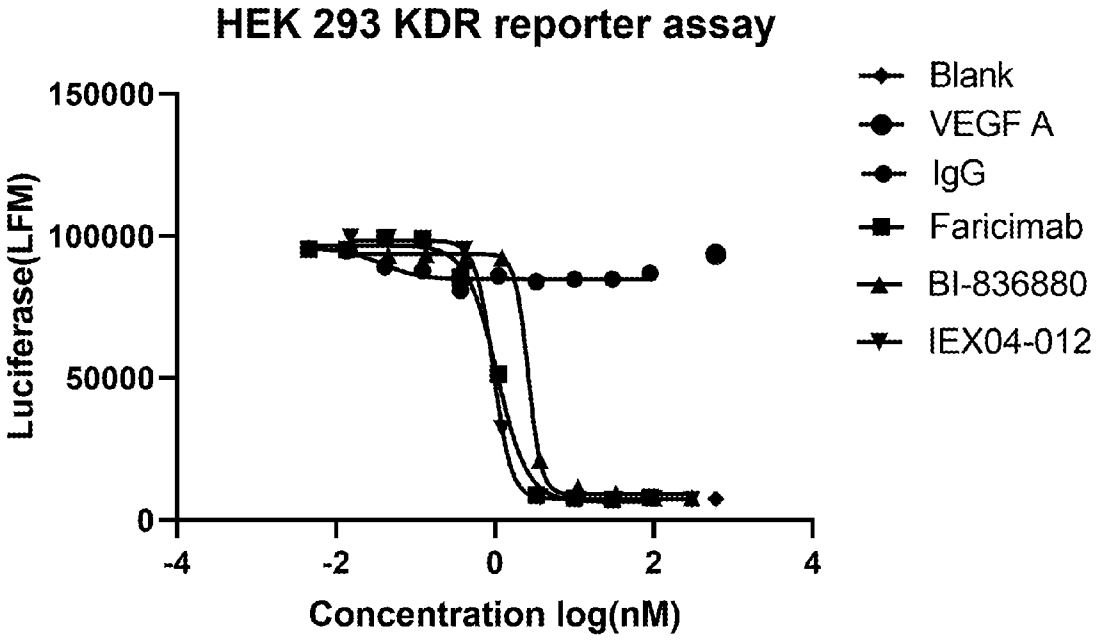

HEK293 KDR reporter assay
500000
400000
300000
200000
100000
0
Luciferase(IFM)
-2
-1
0
1
2
3
4
Conc log(nM)
LA46E11
LA46E11.8
Blank
VEGFA 100ng/ml

图 5



	IgG	BI836880	LA42F8
IC50	~ 0.2425	3.812	49.41

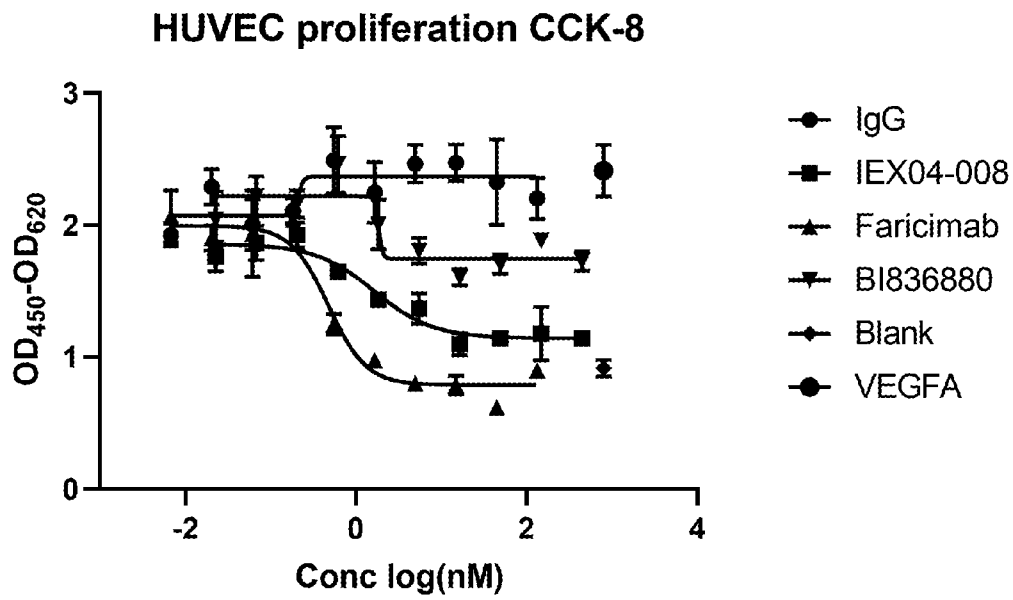
图 6



	IgG	Faricimab	BI-836880	IEX04-012
IC50	0.03672	1.064	2.631	0.9586

图 7

A



	IgG	IEX04-008	Faricimab	BI836880
IC50	~ 0.2100	1.637	0.4744	~ 1.848

B

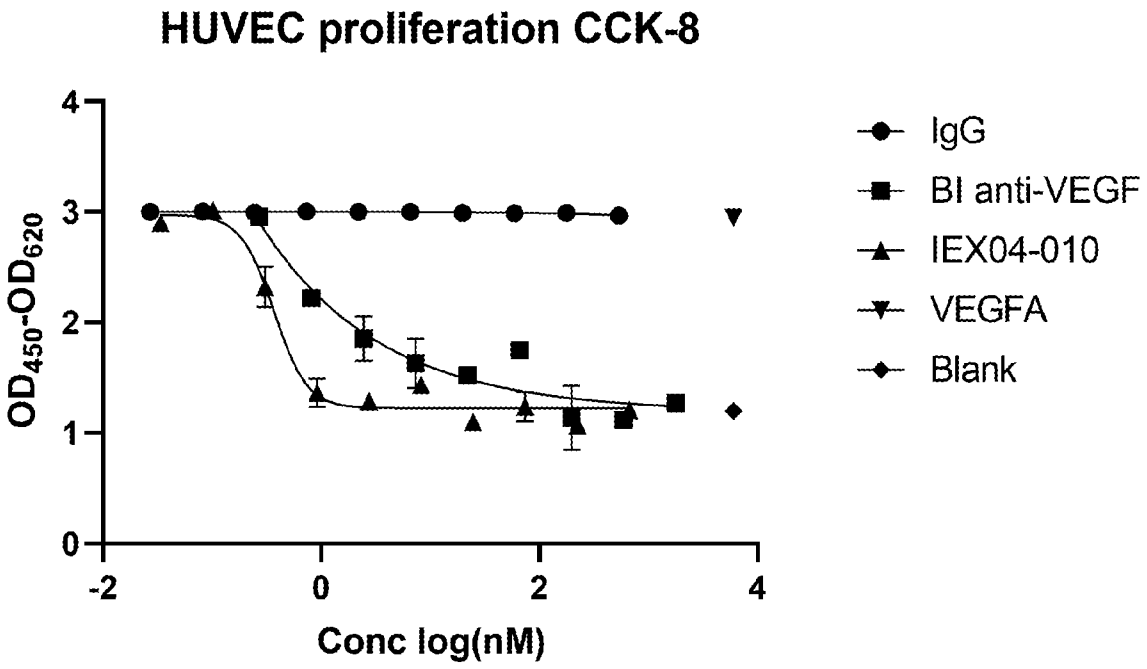
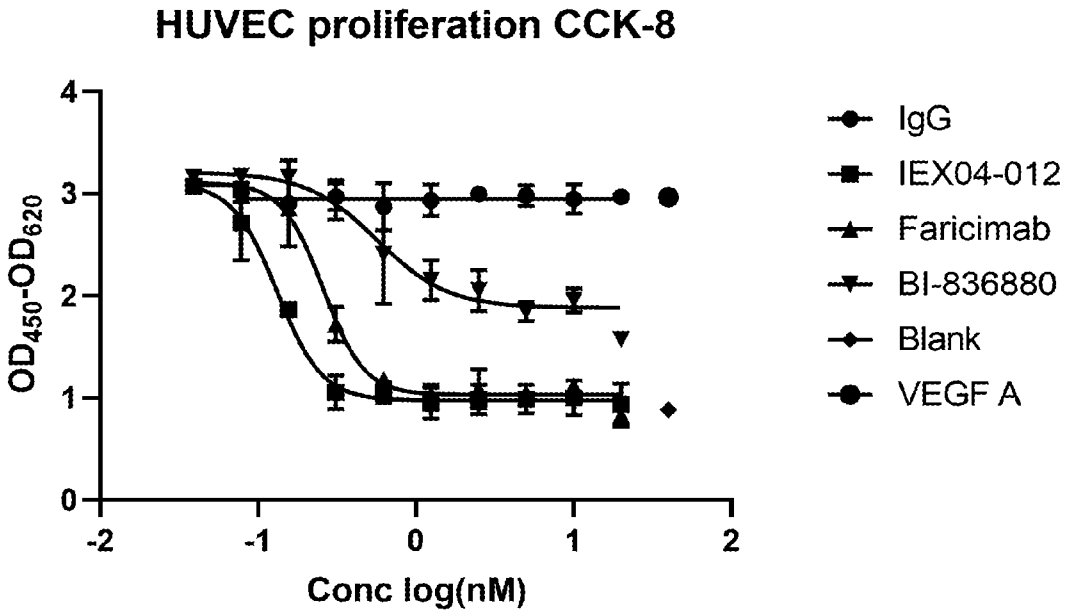


图 8

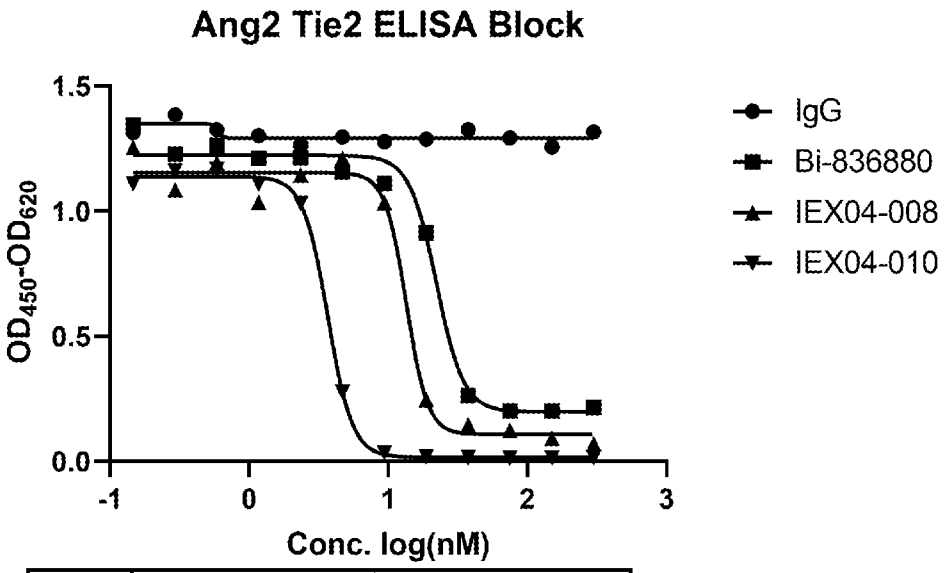
C



	IgG	IEX04-012	Faricimab	BI-836880
IC50	~ 0.07786	0.1323	0.2592	0.5703

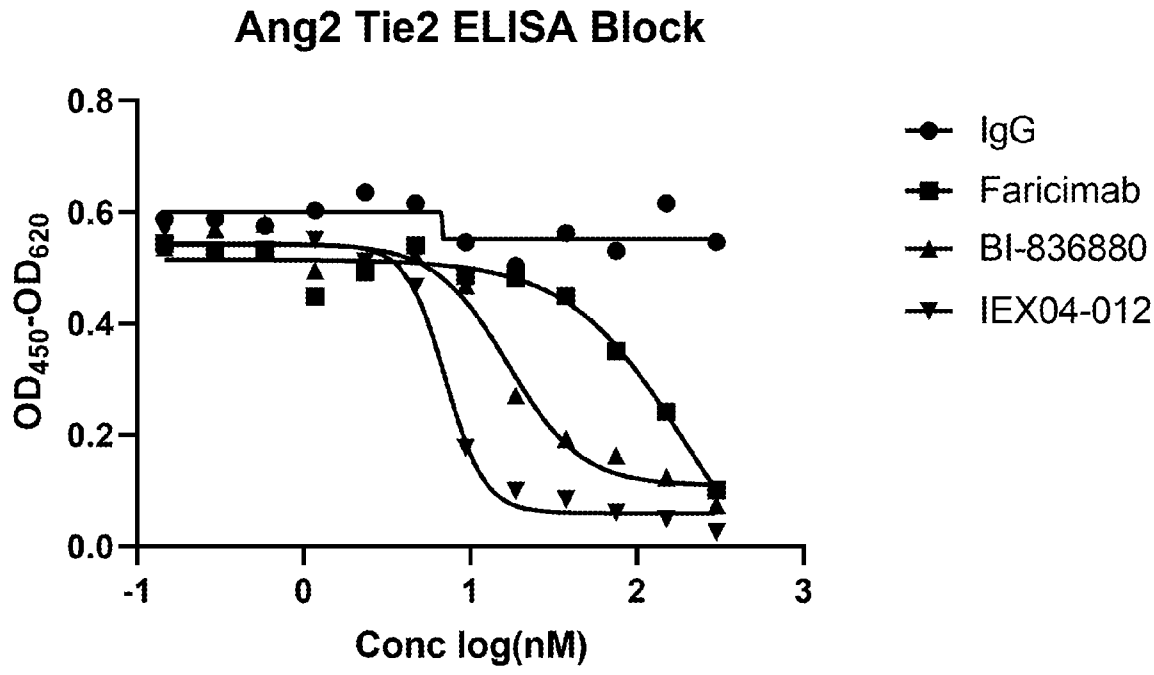
图 8（续）

A



	IgG	Bi-836880	IEX04-008	IEX04-010
IC50	~ 0.5959	22.21	13.48	3.677

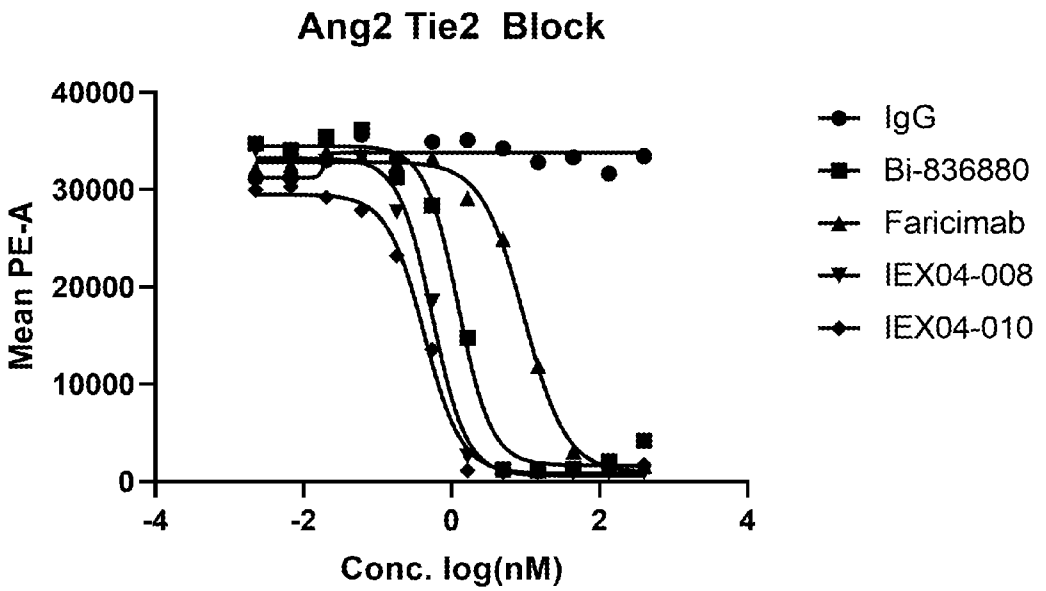
B



	IgG	Faricimab	BI-836880	IEX04-012
IC50	~ 6.786	188.1	16.87	7.096

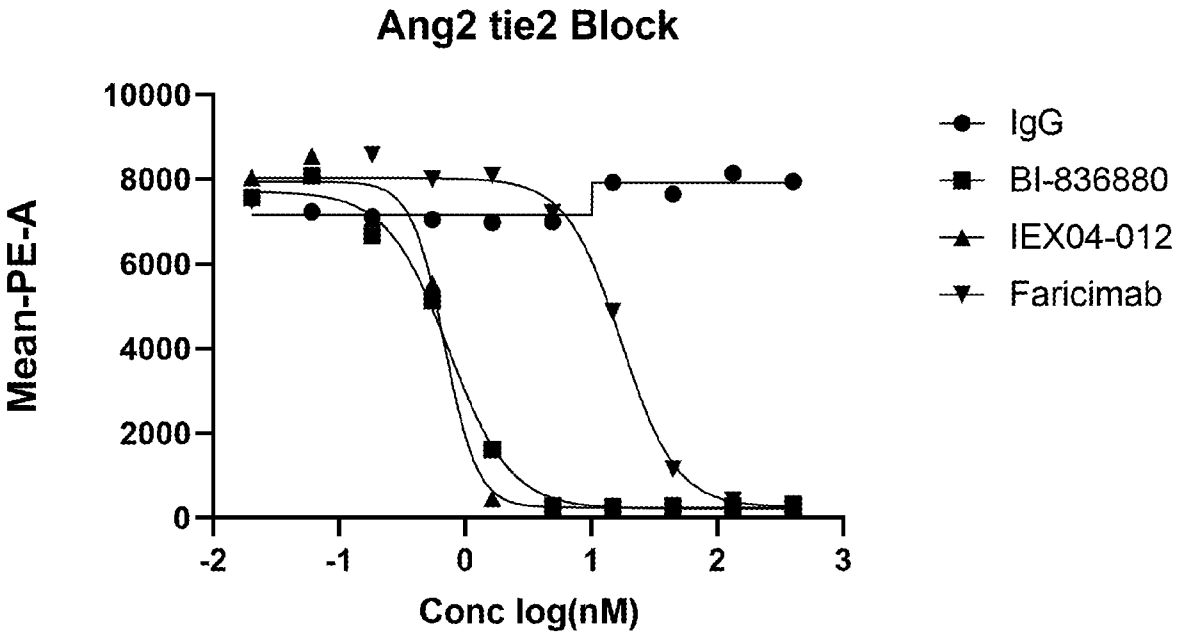
图 9

A



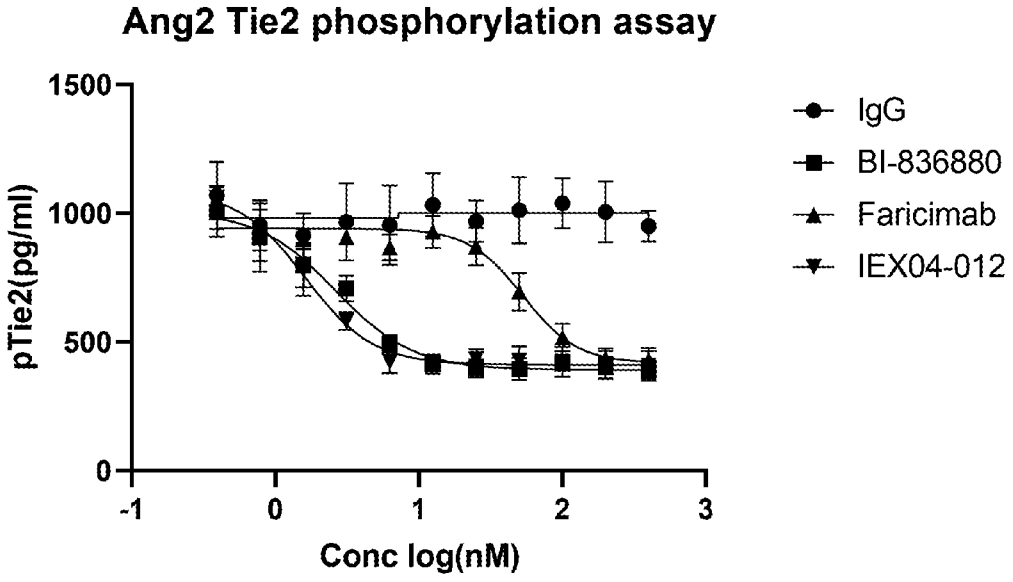
	IgG	Bi-836880	Faricimab	IEX04-008	IEX04-010
IC50	~ 0.01896	1.232	9.550	0.5541	0.4275

B



	IgG	BI-836880	IEX04-012	Faricimab
IC50	~ 10.14	0.7415	0.6855	17.35

图 10



BI-836880	Faricimab	IEX04-012
2.632	53.17	1.614

图 11.

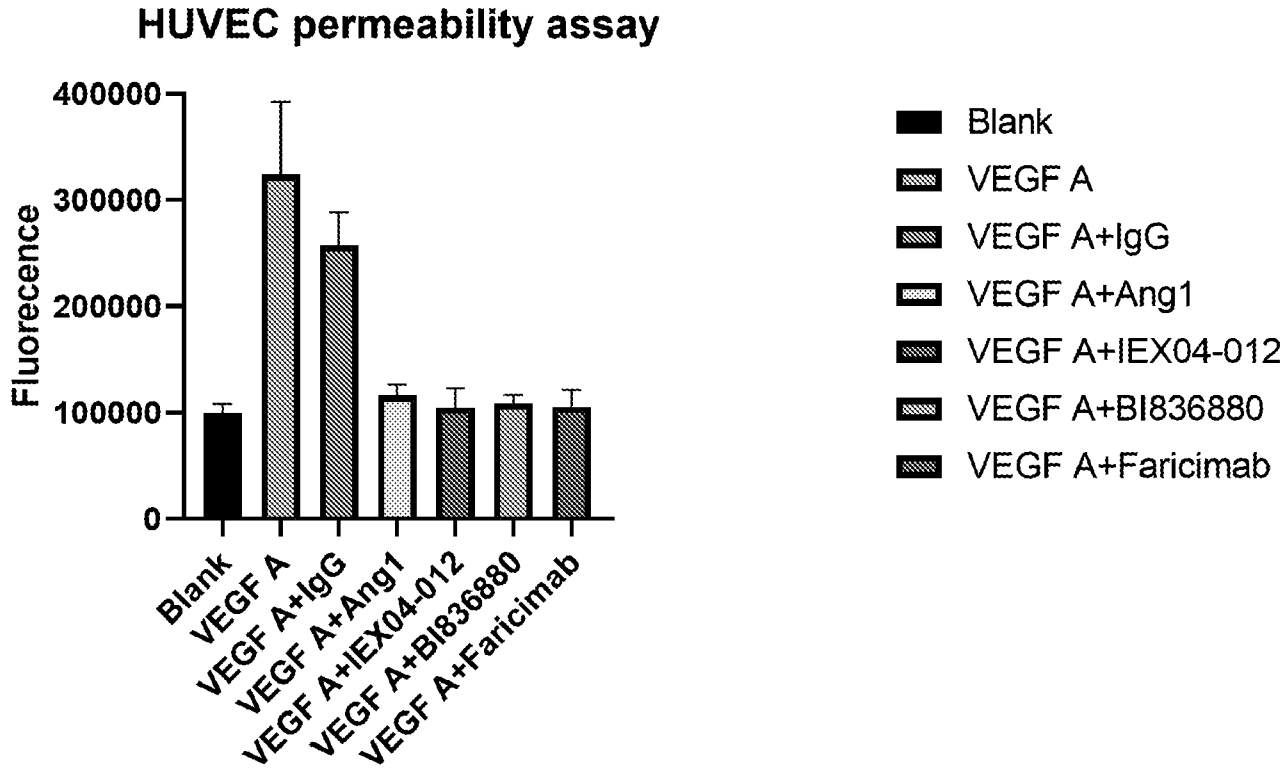
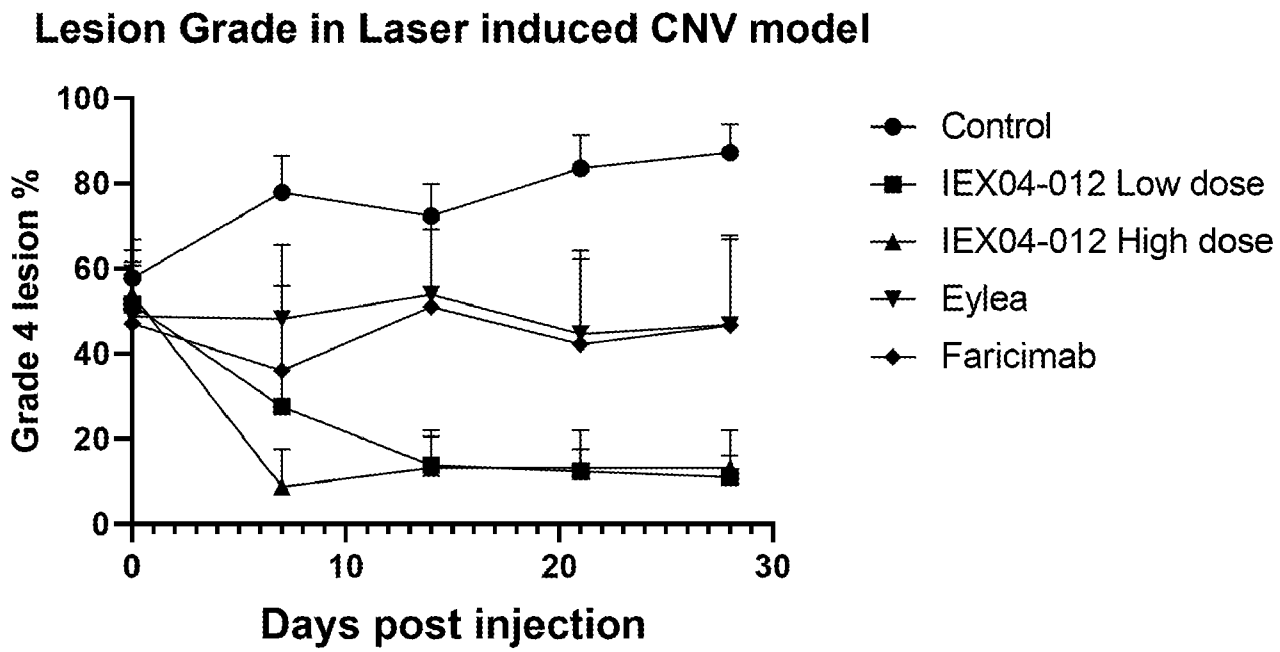


图 12

A


Lesion Grade in Laser induced CNV model
Grade 4 lesion %
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
Days post injection
Control
IEX04-012 Low dose
IEX04-012 High dose
Eylea
Faricimab

B

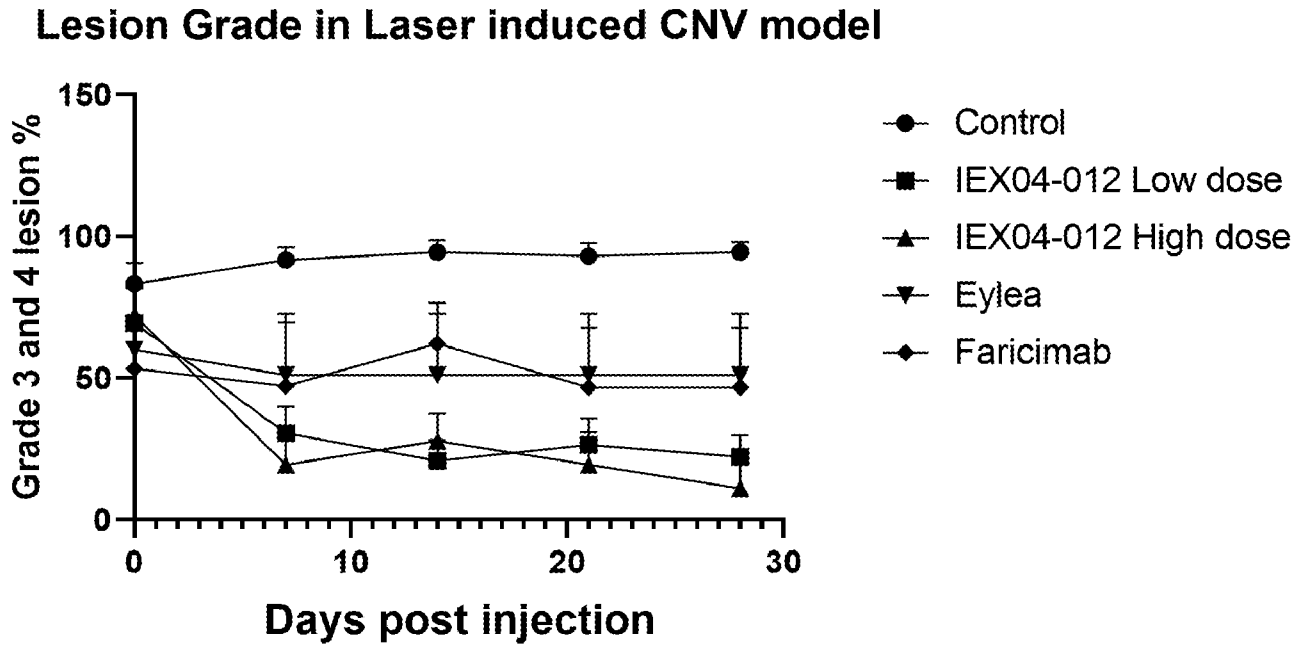

Lesion Grade in Laser induced CNV model
Grade 3 and 4 lesion %
150
100
50
0
0
10
20
30
Days post injection
Control
IEX04-012 Low dose
IEX04-012 High dose
Eylea
Faricimab

图 13.

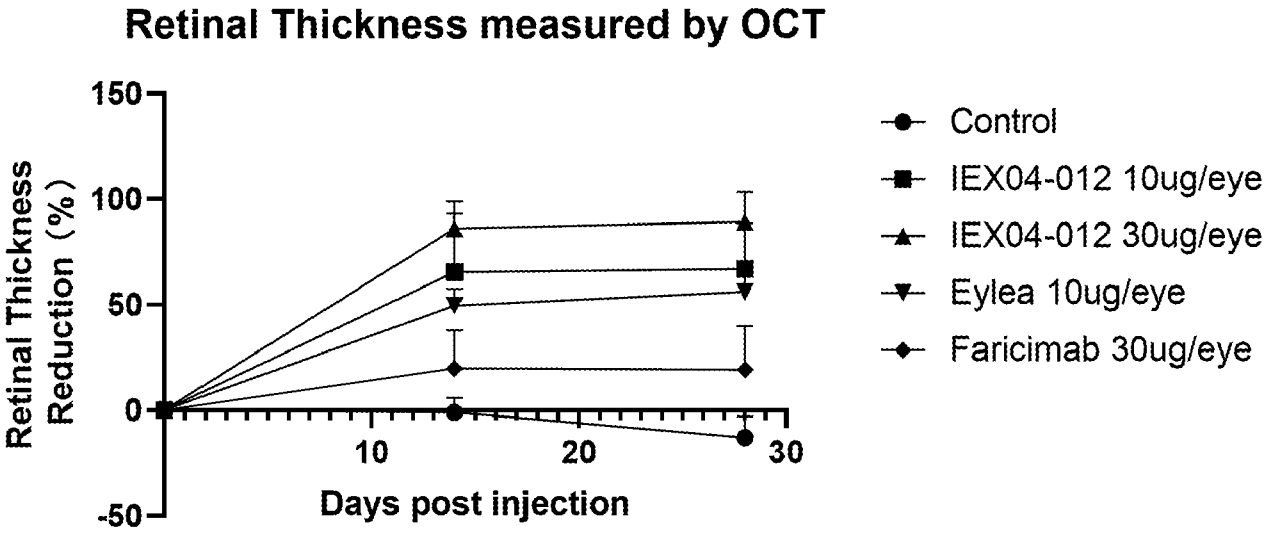

Retinal Thickness measured by OCT
Retinal Thickness Reduction (%)
150
100
50
0
-50
10
20
30
Days post injection
Control
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye

图 14

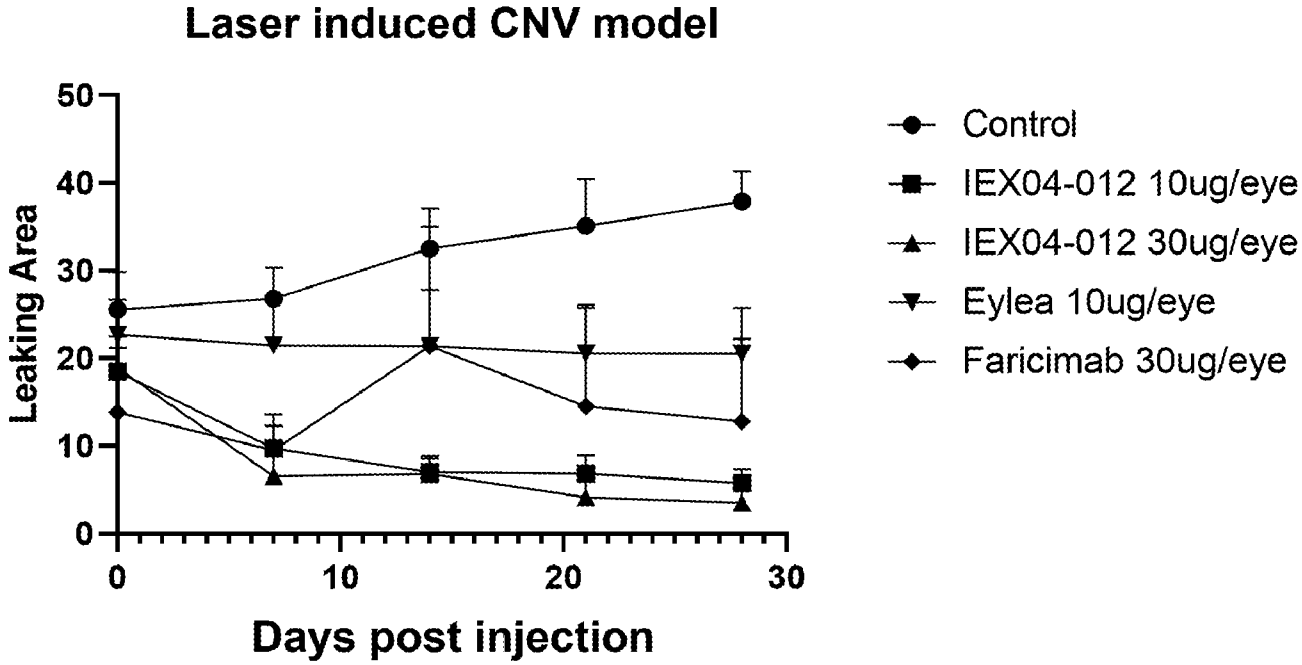
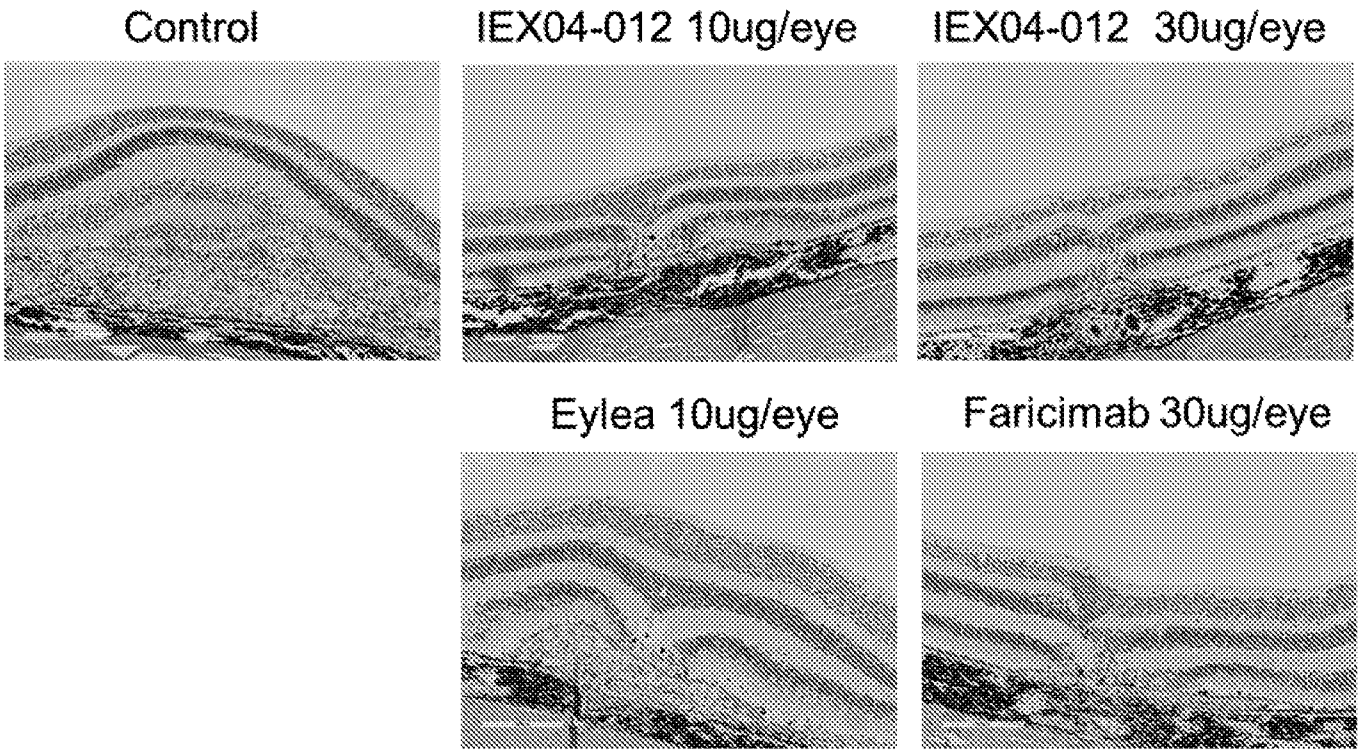

Laser induced CNV model
Leaking Area
50
40
30
20
10
0
0
10
20
30
Days post injection
Control
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye

图 15

A


Control
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye

B

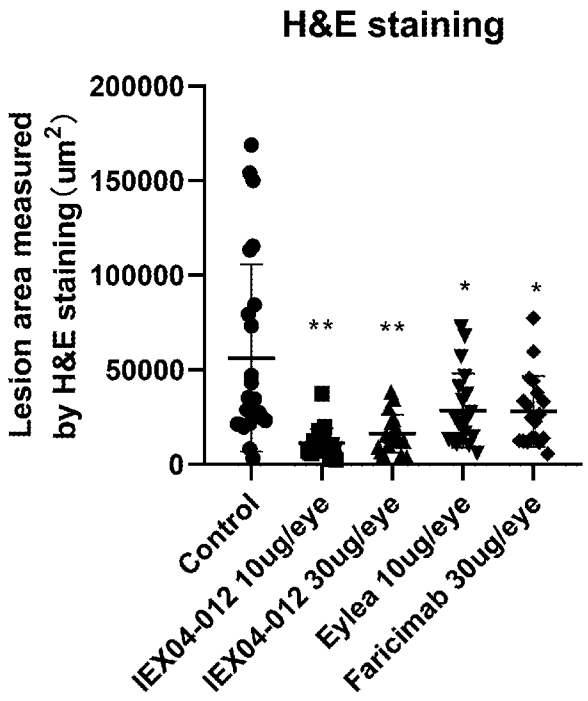
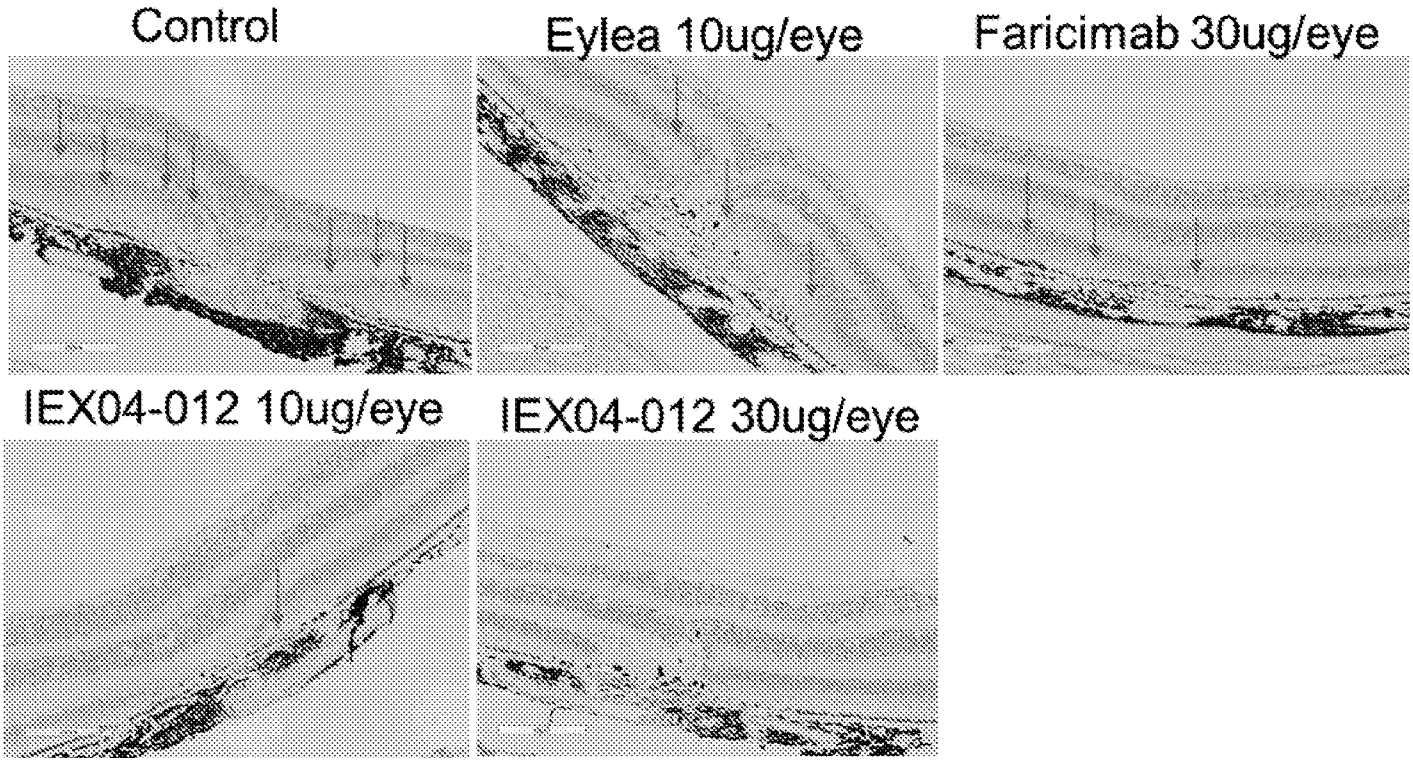

H&E staining
Lesion area measured by H&E staining (um²)
200000
150000
100000
50000
0
**
**
*
*
Control
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye

图 16

A


Control
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye

B

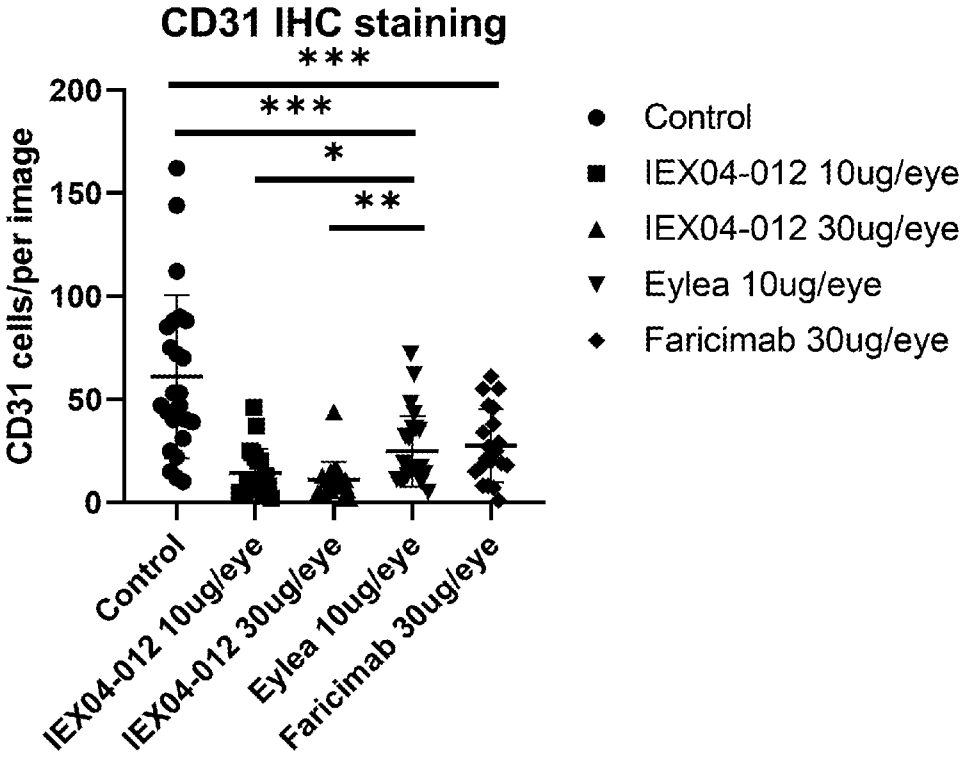

CD31 IHC staining
CD31 cells/per image
200
150
100
50
0
***
***
*
**
Control
IEX04-012 10ug/eye
IEX04-012 30ug/eye
Eylea 10ug/eye
Faricimab 30ug/eye

图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/096848

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/22(2006.01)i; C07K 16/26(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K;

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WCNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, WANFANG, 百度, BAIDU, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀, DUXIU: SEQ ID Nos: 1-42, ANG2, ANG-2, ANGPT2, VEGF, VEGF A, VEGFR, VHH, 抗体, 双抗, 多抗, 疾病, 眼, 接头, antibod+, dual, disease, eyes, linker.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103562222 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 05 February 2014 (2014-02-05) claims 1-40, and description, paragraphs 109-329	1-32
A	CN 105820243 A (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 03 August 2016 (2016-08-03) entire document	1-32
A	CN 107074941 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG.) 18 August 2017 (2017-08-18) entire document	1-32
A	KLOEPPER, J. et al. "Ang-2/VEGF Bispecific Antibody Reprograms Macrophages and Resident Microglia to Anti-tumor Phenotype and Prolongs Glioblastoma Survival" *Proceedings of the National Academy of Sciences,* Vol. 113, No. 16, 19 April 2016 (2016-04-19), pp. 4476-4481	1-32
A	SCHMITTNAEGEL, M. et al. "Dual Angiopoietin-2 and VEGFA Inhibition Elicits Antitumor Immunity That is Enhanced by PD-1 Checkpoint Blockade" *Science Translation Medicine,* Vol. 9, 12 April 2017 (2017-04-12), abstract	1-32

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 August 2022	**02 September 2022**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2016073157 A1 (GENENTECH INC. et al.) 12 May 2016 (2016-05-12) entire document	1-32

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/096848

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2022/096848

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **29-32**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

[1] The subject matter set forth in claims 29-32 relates to a method for treating a human or animal body. Therefore, no international search is conducted according to PCT Rule 39.1(iv). A search was conducted on the basis of a use of the antibody of claims 29-32 in the preparation of a drug for treating eye diseases.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/096848

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103562222	A	05 February 2014	AP	201307085	D0	31 August 2013
				RS	55361	B1	31 March 2017
				JP	2014515602	A	03 July 2014
				CA	2827817	A1	04 October 2012
				PE	20140448	A1	13 April 2014
				EA	201301108	A1	31 March 2014
				HK	1225400	A1	08 September 2017
				SI	2694546	T1	31 January 2017
				JP	2017023152	A	02 February 2017
				WO	2012131078	A1	04 October 2012
				ES	2606302	T3	23 March 2017
				BR	112013025304	A2	06 June 2017
				MY	171007	A	23 September 2019
				EP	2694546	A1	12 February 2014
				AP	201307085	A0	31 August 2013
				CN	105820243	A	03 August 2016
				MA	34979	B1	01 March 2014
				TN	2013000390	A1	20 January 2015
				AU	2012237234	A1	05 September 2013
				EP	3144322	A2	22 March 2017
				AR	085984	A1	13 November 2013
				US	2022017642	A1	20 January 2022
				HR	P20161689	T1	24 February 2017
				EA	201600338	A1	30 September 2016
				NZ	614249	A	29 May 2015
				CL	2013002623	A1	14 February 2014
				US	2020010569	A1	09 January 2020
				KR	20140018317	A	12 February 2014
				PL	2694546	T3	31 March 2017
				DK	2694546	T3	05 December 2016
				MX	2013010949	A	06 June 2014
				IL	227936	D0	30 September 2013
				SG	10201602373 T	A	30 May 2016
				UA	114707	C2	25 July 2017
				US	2013078248	A1	28 March 2013
				UY	33998	A	28 September 2012
				CO	6801639	A2	29 November 2013
				US	2017247475	A1	31 August 2017
				LT	2694546	T	10 November 2016
				CY	1118339	T1	28 June 2017
				MX	343440	B	07 November 2016
				SG	193561	A1	29 November 2013
				HK	1190412	A1	04 July 2014
				EC	SP13013001	A	31 December 2013
				PT	2694546	T	28 December 2016
				AU	2017200237	A1	02 February 2017
				HU	E030148	T2	28 April 2017
CN	105820243	A	03 August 2016	CY	1118339	T1	28 June 2017
				MX	343440	B	07 November 2016
				SG	193561	A1	29 November 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/096848

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				HK	1190412	A1	04 July 2014
				EC	SP13013001	A	31 December 2013
				PT	2694546	T	28 December 2016
				AU	2017200237	A1	02 February 2017
				HU	E030148	T2	28 April 2017
				AP	201307085	D0	31 August 2013
				RS	55361	B1	31 March 2017
				JP	2014515602	A	03 July 2014
				CA	2827817	A1	04 October 2012
				PE	20140448	A1	13 April 2014
				EA	201301108	A1	31 March 2014
				HK	1225400	A1	08 September 2017
				SI	2694546	T1	31 January 2017
				JP	2017023152	A	02 February 2017
				WO	2012131078	A1	04 October 2012
				ES	2606302	T3	23 March 2017
				BR	112013025304	A2	06 June 2017
				MY	171007	A	23 September 2019
				EP	2694546	A1	12 February 2014
				AP	201307085	A0	31 August 2013
				MA	34979	B1	01 March 2014
				TN	2013000390	A1	20 January 2015
				AU	2012237234	A1	05 September 2013
				EP	3144322	A2	22 March 2017
				AR	085984	A1	13 November 2013
				US	2022017642	A1	20 January 2022
				HR	P20161689	T1	24 February 2017
				EA	201600338	A1	30 September 2016
				NZ	614249	A	29 May 2015
				CL	2013002623	A1	14 February 2014
				US	2020010569	A1	09 January 2020
				KR	20140018317	A	12 February 2014
				PL	2694546	T3	31 March 2017
				DK	2694546	T3	05 December 2016
				MX	2013010949	A	06 June 2014
				IL	227936	D0	30 September 2013
				SG	10201602373 T	A	30 May 2016
				CN	103562222	A	05 February 2014
				UA	114707	C2	25 July 2017
				US	2013078248	A1	28 March 2013
				UY	33998	A	28 September 2012
				CO	6801639	A2	29 November 2013
				US	2017247475	A1	31 August 2017
				LT	2694546	T	10 November 2016
CN	107074941	A	18 August 2017	AU	2015345323	A1	06 April 2017
				CA	2963175	A1	19 May 2016
				JP	2017537896	A	21 December 2017
				AR	102592	A1	08 March 2017
				KR	20170080584	A	10 July 2017
				US	2017240629	A1	24 August 2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2022/096848

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		IL 251128 D0	30 April 2017
		EP 3218399 A1	20 September 2017
		TW 201632551 A	16 September 2016
		SG 11201703428 S A	30 May 2017
		RU 2017120360 A	13 December 2018
		MX 2017005977 A	29 June 2017
		BR 112017009764 A2	20 February 2018
		WO 2016075037 A1	19 May 2016
WO 2016073157 A1	12 May 2016	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/096848

A. 主题的分类

C07K 16/22(2006.01)i; C07K 16/26(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K;

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

WCNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID Nos: 1-42, ANG2, ANG-2, ANGPT2, VEGF, VEGF A, VEGFR, VHH, 抗体, 双抗, 多抗, 疾病, 眼, 接头, antibod+, dual, disease, eyes, linker。

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103562222 A (勃林格殷格翰国际有限公司) 2014年2月5日 (2014-02-05) 权利要求1-40，说明书第109-329段	1-32
A	CN 105820243 A (勃林格殷格翰国际有限公司) 2016年8月3日 (2016-08-03) 全文	1-32
A	CN 107074941 A (豪夫迈 罗氏有限公司) 2017年8月18日 (2017-08-18) 全文	1-32
A	KLOEPPER, J.等. "Ang-2/VEGF bispecific antibody reprograms macrophages and resident microglia to anti-tumor phenotype and prolongs glioblastoma survival" PNAS, 第113卷，第16期，2016年4月19日 (2016-04-19), 第4476-4481页	1-32
A	SCHMITTNAEGEL, M.等. "Dual angiopoietin-2 and VEGFA inhibition elicits antitumor immunity that is enhanced by PD-1 checkpoint blockade" SCIENCE TRANSLATION MEDICINE, 第9卷，2017年4月12日 (2017-04-12), 摘要	1-32

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2022年8月22日	2022年9月2日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088	沈晶晶
传真号 (86-10)62019451	电话号码 86-(10)-53961944

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 2016073157 A1 (GENENTECH INC等) 2016年5月12日 (2016-05-12) 全文	1-32

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/096848

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2022/096848

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下:

1. ☑ 权利要求： 29-32
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

[1] 权利要求29-32的保护主题涉及对人体或者动物体进行治疗的方法,因此依据PCT实施细则39.1(iv)不进行国际检索。检索是基于权利要求29-32的抗体在制备治疗眼部疾病的药物中的用途作出。

2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：

3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/096848

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103562222	A	2014年2月5日	AP	201307085	D0	2013年8月31日
				RS	55361	B1	2017年3月31日
				JP	2014515602	A	2014年7月3日
				CA	2827817	A1	2012年10月4日
				PE	20140448	A1	2014年4月13日
				EA	201301108	A1	2014年3月31日
				HK	1225400	A1	2017年9月8日
				SI	2694546	T1	2017年1月31日
				JP	2017023152	A	2017年2月2日
				WO	2012131078	A1	2012年10月4日
				ES	2606302	T3	2017年3月23日
				BR	112013025304	A2	2017年6月6日
				MY	171007	A	2019年9月23日
				EP	2694546	A1	2014年2月12日
				AP	201307085	A0	2013年8月31日
				CN	105820243	A	2016年8月3日
				MA	34979	B1	2014年3月1日
				TN	2013000390	A1	2015年1月20日
				AU	2012237234	A1	2013年9月5日
				EP	3144322	A2	2017年3月22日
				AR	085984	A1	2013年11月13日
				US	2022017642	A1	2022年1月20日
				HR	P20161689	T1	2017年2月24日
				EA	201600338	A1	2016年9月30日
				NZ	614249	A	2015年5月29日
				CL	2013002623	A1	2014年2月14日
				US	2020010569	A1	2020年1月9日
				KR	20140018317	A	2014年2月12日
				PL	2694546	T3	2017年3月31日
				DK	2694546	T3	2016年12月5日
				MX	2013010949	A	2014年6月6日
				IL	227936	D0	2013年9月30日
				SG	10201602373T	A	2016年5月30日
				UA	114707	C2	2017年7月25日
				US	2013078248	A1	2013年3月28日
				UY	33998	A	2012年9月28日
				CO	6801639	A2	2013年11月29日
				US	2017247475	A1	2017年8月31日
				LT	2694546	T	2016年11月10日
				CY	1118339	T1	2017年6月28日
				MX	343440	B	2016年11月7日
				SG	193561	A1	2013年11月29日
				HK	1190412	A1	2014年7月4日
				EC	SP13013001	A	2013年12月31日
				PT	2694546	T	2016年12月28日
				AU	2017200237	A1	2017年2月2日
				HU	E030148	T2	2017年4月28日
CN	105820243	A	2016年8月3日	CY	1118339	T1	2017年6月28日
				MX	343440	B	2016年11月7日
				SG	193561	A1	2013年11月29日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/096848

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				HK	1190412	A1	2014年7月4日
				EC	SP13013001	A	2013年12月31日
				PT	2694546	T	2016年12月28日
				AU	2017200237	A1	2017年2月2日
				HU	E030148	T2	2017年4月28日
				AP	201307085	D0	2013年8月31日
				RS	55361	B1	2017年3月31日
				JP	2014515602	A	2014年7月3日
				CA	2827817	A1	2012年10月4日
				PE	20140448	A1	2014年4月13日
				EA	201301108	A1	2014年3月31日
				HK	1225400	A1	2017年9月8日
				SI	2694546	T1	2017年1月31日
				JP	2017023152	A	2017年2月2日
				WO	2012131078	A1	2012年10月4日
				ES	2606302	T3	2017年3月23日
				BR	112013025304	A2	2017年6月6日
				MY	171007	A	2019年9月23日
				EP	2694546	A1	2014年2月12日
				AP	201307085	A0	2013年8月31日
				MA	34979	B1	2014年3月1日
				TN	2013000390	A1	2015年1月20日
				AU	2012237234	A1	2013年9月5日
				EP	3144322	A2	2017年3月22日
				AR	085984	A1	2013年11月13日
				US	2022017642	A1	2022年1月20日
				HR	P20161689	T1	2017年2月24日
				EA	201600338	A1	2016年9月30日
				NZ	614249	A	2015年5月29日
				CL	2013002623	A1	2014年2月14日
				US	2020010569	A1	2020年1月9日
				KR	20140018317	A	2014年2月12日
				PL	2694546	T3	2017年3月31日
				DK	2694546	T3	2016年12月5日
				MX	2013010949	A	2014年6月6日
				IL	227936	D0	2013年9月30日
				SG	10201602373T	A	2016年5月30日
				CN	103562222	A	2014年2月5日
				UA	114707	C2	2017年7月25日
				US	2013078248	A1	2013年3月28日
				UY	33998	A	2012年9月28日
				CO	6801639	A2	2013年11月29日
				US	2017247475	A1	2017年8月31日
				LT	2694546	T	2016年11月10日
CN	107074941	A	2017年8月18日	AU	2015345323	A1	2017年4月6日
				CA	2963175	A1	2016年5月19日
				JP	2017537896	A	2017年12月21日
				AR	102592	A1	2017年3月8日
				KR	20170080584	A	2017年7月10日
				US	2017240629	A1	2017年8月24日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2022/096848

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
		IL	251128	D0	2017年4月30日
		EP	3218399	A1	2017年9月20日
		TW	201632551	A	2016年9月16日
		SG	11201703428S	A	2017年5月30日
		RU	2017120360	A	2018年12月13日
		MX	2017005977	A	2017年6月29日
		BR	112017009764	A2	2018年2月20日
		WO	2016075037	A1	2016年5月19日
WO 2016073157 A1	2016年5月12日	无			