



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202302633 A

(43)公開日：中華民國 112 (2023) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：111120663

(22)申請日：中華民國 111 (2022) 年 06 月 02 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/22 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**C07K16/46 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P27/02 (2006.01)*

(30)優先權：2021/06/04

中國大陸

202110623779.2

(71)申請人：大陸商信達生物製藥（蘇州）有限公司（中國大陸）INNOVENT BIOLOGICS
(SUZHOU) CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：黎一鳴 LI, YIMING (CN)；胡思怡 HU, SIYI (CN)；荊華 JING, HUA (CN)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：32 項 圖式數：17 共 83 頁

(54)名稱

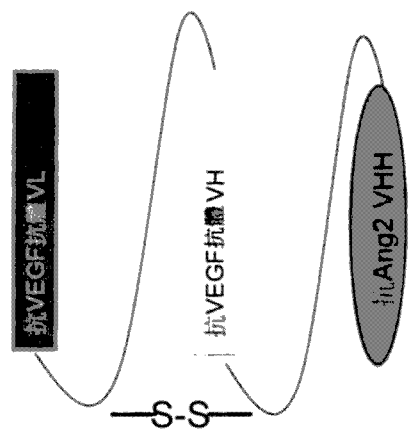
結合 V E G F 和 A N G 2 的雙特異性結合分子以及其用途

(57)摘要

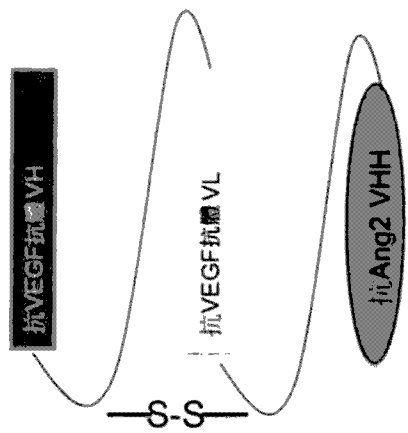
本發明關於分別針對血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)和針對血管生成素-2(ANG-2)的抗體，同時針對血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的雙特異性結合分子(例如抗體)，以及其製備方法，包含該抗體或分子的醫藥組成物，及其應用。

The present invention relates to antibodies directed against vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and angiopoietin-2 (ANG-2), respectively, and a bispecific binding molecule(e.g., antibody) that both direct to vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and angiopoietin-2(ANG-2), and methods for preparing thereof, pharmaceutical compositions comprising the antibodies or molecules, and uses thereof.

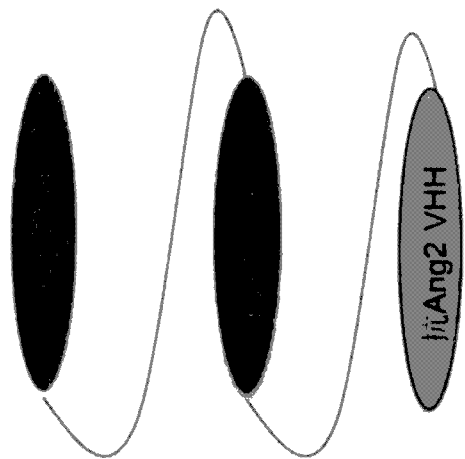
指定代表圖：



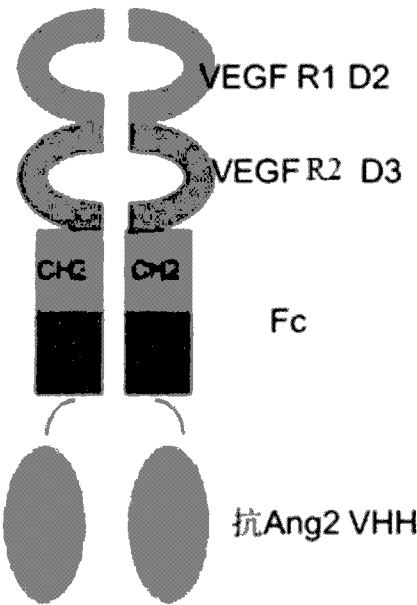
【圖1A】



【圖1B】



【圖1C】



【圖1D】

【發明摘要】

【中文發明名稱】 結合VEGF和ANG2的雙特異性結合分子以及其用途

【英文發明名稱】 BISPECIFIC BINDING MOLECULES THAT BIND VEGF
AND ANG2 AND USES THEREOF

【中文】

本發明關於分別針對血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)和針對血管生成素-2(ANG-2)的抗體，同時針對血管內皮生長因子(VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的雙特異性結合分子（例如抗體），以及其製備方法，包含該抗體或分子的醫藥組成物，及其應用。

【英文】

The present invention relates to antibodies directed against vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and angiopoietin-2 (ANG-2), respectively, and a bispecific binding molecule(e.g., antibody) that both direct to vascular endothelial growth factor (VEGF/VEGF-A) and angiopoietin-2(ANG-2), and methods for preparing thereof, pharmaceutical compositions comprising the antibodies or molecules, and uses thereof.

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【特徵化學式】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 結合VEGF和ANG2的雙特異性結合分子以及其用途

【英文發明名稱】 BISPECIFIC BINDING MOLECULES THAT BIND VEGF
AND ANG2 AND USES THEREOF

【技術領域】

【0001】 本發明關於分別針對血管內皮生長因子 (VEGF/VEGF-A)和針對血管生成素-2(ANG-2)的抗體，同時針對血管內皮生長因子 (VEGF/VEGF-A)和血管生成素-2(ANG-2)的雙特異性結合分子（例如抗體），以及其製備方法，包含該抗體或分子的醫藥組成物，及其應用。

【先前技術】

【0002】 血管發生參與各種疾病的發病機理，該疾病包括實體瘤、眼內新生血管化相關的疾病、類風濕性關節炎(rheumatoid arthritis)和銀屑病。

【0003】 VEGF 是有效且普遍存在的血管生長因子。VEGF 家族成員包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盤生長因子(PIGF)和內分泌腺衍生的 VEGF(EG-VEGF)。VEGF 的活性形式與其他 VEGF 家族成員合成為同型二聚體或異型二聚體。VEGF-A 以藉由選擇性剪接生成的六種同種型存在：VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 和 VEGF206。這些同種型主要因其生物可利用性而不同，其中 VEGF165 是主要同種型。據信，VEGF 是正常和疾病相關血管發生的重要調節劑。

【0004】除 VEGF 家族之外，還認為人血管生成素參與了血管發育和出生後的血管發生。人血管生成素包括天然存在的激動劑血管生成素-1(ANG-1)以及天然存在的拮抗劑血管生成素-2(ANG-2)。認為 ANG-1 的作用在成人中是保守的，它在成人中廣泛地且組成型地表達。相比之下，ANG-2 表達主要限於血管重塑的部位，其中認為它阻斷 ANG-1 的組成型穩定化或成熟化功能，從而允許血管恢復到可能對芽生信號更具響應性的塑性狀態並保持在該塑性狀態下。

【0005】近年來，已經開發了一些靶向 VEGF-A 和 ANG-2 的雙特異性抗體（例如 WO2012131078 和 WO2014009465）。然而，現有的雙特異性抗體針對 VEGF 和 Ang2 的阻斷性較差，且由於分子量太大，導致單次給藥時莫耳濃度較低。特別地，對於眼部疾病，通常使用藉由玻璃體內應用的較小分子量的抗體，且需要較少的給藥頻率。因此，仍然需要新的，特別是適用於眼部疾病的靶向 VEGF-A 和 ANG-2 的雙特異性結合分子。

【發明內容】

【0006】本發明開發了新的靶向 VEGF-A 或 ANG-2 的 VHH 抗體，以及同時針對 VEGF-A 和 ANG2 的雙特異性結合分子。特別地，本發明的雙特異性結合分子相比已知的抗體，具有較小的分子量，相同質量濃度下，莫耳濃度更高；且具有較強的 VEGF A 和 Ang2 阻斷活性，能夠完全阻斷 VEGFA 誘導的原代細胞增殖。因此，本發明的分子在臨床上具有更強的阻斷活性，且能夠在單次給藥時使得抗體莫耳濃度更高，維持單次給藥藥效時間更久，降低眼部施用（例如玻璃體腔注射）頻率。

【圖式簡單說明】

【0007】

圖 1 顯示了雙特異性結合分子的結構。

圖 2 顯示了應用 ELISA 測定的抗 VEGF A VHH 抗體能夠阻斷 VEGF A 與 VEGFR2 的結合。

圖 3 顯示了應用 ELISA 法測定的人源化 anti-Ang2 VHH 抗體阻斷 Ang2 與 Tie2 結合的作用。

圖 4 顯示了應用 ELISA 法測定的抗 Ang2 VHH 抗體 (A) 和人源化抗 Ang2 VHH 抗體 (B) 抑制 hAng2-Fc 誘導的 293-Tie2 細胞磷酸化的作用。

圖 5 顯示了應用 HEK293-KDR reporter 法檢測抗 VEGF A VHH 阻斷 VEGFA 激活 KDR 受體的作用。

圖 6 顯示了 CCK-8 測定的抗 VEGF A VHH 抗體抑制 VEGF A 誘導 HUVEC 細胞的存活和增殖的作用。

圖 7 顯示了應用 HEK293-KDR reporter 法檢測 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子 IEX04-012 阻斷 VEGF 激活 KDR 受體的作用。

圖 8 顯示了雙特異性結合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 抑制 VEGF 誘導的 HUVEC 細胞存活和增殖的作用。

圖 9 顯示了 ELISA 法測定的雙特異性結合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 阻斷人 Ang2 與 Tie2 的結合。

圖 10 顯示了流式細胞檢測法測定雙特異性結合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 阻斷 Ang2-Fc 與 Tie2 的結合。

圖 11 顯示了應用流式細胞檢測法測定本發明的雙特異性結合分子 IEX04-012 在體外有效抑制 hAng2-Fc 誘導的 293-Tie2 磷酸化。

圖 12 顯示了本發明的雙特異性結合分子 IEX04-012 降低 VEGF 誘導的血管內皮細胞通透性，即抑制 VEGF 誘導的 HUVEC 細胞滲漏。

圖 13 顯示了雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型中 4 級（圖 A）和 3 級以上（圖 B）雷射斑比例統計。

圖 14 顯示了雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型中視網膜厚度統計。

圖 15 顯示了雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型中滲漏面積統計

圖 16 顯示了雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型眼底組織 H&E 染色圖（A）及病變面積統計（B）。

圖 17 顯示了雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型眼底組織 CD31 染色圖（A）及陽性細胞統計（B）。

【實施方式】

定義

【0008】 在下文詳細描述本發明前，應理解本發明不限於本文中描述的特定方法學、方案和試劑，因為這些可以變化。還應理解本文中使用的術語僅為了描述具體實施方案，而並不意圖限制本發明的範圍，其僅會由所附申請專利範圍限制。除非另外定義，本文中使用的所有技術和科學術語與本發明所屬技術領域具有通常知識者通常的理解具有相同的含義。

【0009】為了解釋本說明書，將使用以下定義，並且只要適當，以單數形式使用的術語也可以包括複數，並且反之亦然。要理解，本文所用的術語僅是為了描述具體的實施方案，並且不意欲是限制性的。

【0010】術語“約”在與數字數值聯合使用時意為涵蓋具有比指定數字數值小 5%的下限和比指定數字數值大 5%的上限的範圍內的數字數值。

【0011】如本文所用，術語“和/或”意指可選項中的任一項或可選項的兩項或多項或全部。

【0012】如本文所用，術語“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整數或步驟，但是不排除任意其他要素、整數或步驟。在本文中，當使用術語“包含”或“包括”時，除非另有指明，否則也涵蓋由該及的要素、整數或步驟組成的情形。例如，當提及“包含”某個具體序列的抗體可變區時，也旨在涵蓋由該具體序列組成的抗體可變區。

【0013】本文所用的術語“VEGF”是指血管生長因子。VEGF 家族成員包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D、VEGF-E、胎盤生長因子(PIGF)和內分泌腺衍生的 VEGF(EG-VEGF)。VEGF 的活性形式與其他 VEGF 家族成員合成為同型二聚體或異型二聚體。VEGF-A 以藉由選擇性剪接生成的六種同種型存在：VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 和 VEGF206。這些同種型主要因其生物可利用性而不同，其中 VEGF165 是主要同種型。在一些實施方案中，本發明的 VEGF A 是指來自人的 VEGF A，例如來自人的 VEGF 165。在一個實施方案中，本發明的 VEGFA 的胺基酸序列是登錄號為 P15692(uniprot 數據庫)的胺基酸序列。

【0014】如本文所用，術語“ANG2”指人血管生成素-2(ANG-2)(備選地縮寫為：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 作為血管內皮中選擇性表達的酪胺酸激酶家族 Tie 的配體被發現。目前存在 4 個確定的血管生成素家族成員。血管生成素-3 和-4(ANG3 和 ANG4)可以代表小鼠和 humans 中相同基因座的廣泛多樣的對應物。Ang1 和 Ang2 最初在組織培養實驗中分別鑑定為激動劑和拮抗劑(關於 ANG1，參見 Davis,S.等人,Cell 87(1996)1161-69；關於 ANG2，參見 Maisonpierre,P.C.等人,Science 277(1997)55-60)。全部已知的血管生成素主要與 Tie2 結合。在一些實施方案中，本發明的 ANG2 是指來自人的 Ang2。在一些實施方案中，人 Ang2 包含登錄號為 O15123(uniprot 數據庫)的胺基酸序列。

【0015】術語“多特異性結合分子”是指至少是雙特異性的多特異性結合分子，例如雙特異性結合分子，即該分子包含至少第一靶標結合區和第二靶標結合區，其中該第一靶標結合區結合一種靶標或抗原且該第二靶標結合區結合另一抗原或靶標。因此，根據本發明的分子包含對於至少兩種不同的抗原或靶標的特異性。根據本發明的分子也涵蓋包含多個靶標結合區/結合位點的多特異性分子，諸如三特異性結合分子。在一些實施方案中，本發明的雙特異性結合分子是雙特異性抗體。

【0016】如本文所用的術語“接頭”是指使得能夠直接連接雙特異性結合分子的不同部分的任何分子。在不同分子部分之間建立共價連接的接頭的實例包括肽接頭和非蛋白質聚合物，包括但不限於聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯或聚乙二醇、聚丙二醇的共聚物。在一些實施方案中，接頭是肽接頭，其是指胺基酸的序列，其中該序列將結合分子的第一部分的胺基酸序列連接至結合分

子的第二部分。例如，肽接頭可以將結合分子的第一靶標結合區連接至第二靶標結合區。例如，肽接頭也可以將抗體的一部分連接至抗體的另一部分，諸如將輕鏈可變區連接至重鏈可變區。較佳地，該肽接頭具有這樣的長度，其足以連接兩個實體，其方式使得它們維持它們相對於彼此的構象，使得不妨礙期望的活性。

【0017】 肽接頭可以主要包括或可以不主要包括以下胺基酸殘基：Gly、Ser、Ala 或 Thr。有用的接頭包括甘胺酸-絲胺酸聚合物，包括例如 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ 、 $(GGGGS)_n$ 、 $(GGGS)_n$ 和 $(GGGGS)_nG$ ，其中 n 是至少 1(且較佳 2、3、4、5、6、7、8、9、10)的整數。有用的接頭還包括甘胺酸-丙胺酸聚合物、丙胺酸-絲胺酸聚合物和其他柔性接頭。有用的接頭還包括甘胺酸單體聚合，例如 $(G)_n$ ，其中 n 是至少 4(且例如為 4-20，例如 4、5、6、7、8、9、10 以及更多)的整數。較佳的，該接頭是 $(GGGGS)_n$ ，其中 $n=1、2、3$ 或 4。

【0018】 根據本發明的術語“價”表示在結合分子，例如抗體分子中存在指定數目的結合位點。因此，術語二價、三價、四價分別表示在結合分子中存在兩個、三個或四個結合位點（靶標結合區）。根據本發明的雙特異性結合分子是至少二價的並且可以是多價的，例如二價、三價、四價或六價的。

【0019】 如本文所用的術語“靶標結合區”是指多特異性結合分子，例如雙特異性結合分子的結合特定靶標或抗原的任何部分。靶標結合區可以是例如抗體或免疫球蛋白本身或抗體片段。這種靶標結合區可以具有或可以不具有獨立於 BsAB 的剩餘部分的三級結構，並且可以作為單獨實體結合或不結合其靶標。靶標結合區還可以是受體或配體，或受體的能夠結合配體的結構域。

【0020】 術語“抗體片段”包括完整抗體的一部分。在較佳的實施方案中，抗體片段為抗原結合片段。

【0021】“抗原結合片段”指與完整抗體不同的分子，其包含完整抗體的一部分且結合完整抗體所結合的抗原。抗體片段的例子包括但不限於 Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；dAb(domain antibody)；線性抗體；單鏈抗體(例如 scFv)；單結構域抗體例如 VHH；雙價抗體或其片段；或駱駝科抗體。

【0022】“VHH”，又稱為單域抗體 (single domain antibody, sdAb)，是指僅由重鏈抗體可變區 (Variable region) 組成的基因工程抗體，其僅包含重鏈可變區的 3 個 HCDR。VHH 靠僅有的 3 個 HCDR 就具備抗原的特異性和高親和力，而普通抗體則需要 6 個 CDR。晶體結構表明，VHH 由 2 個 β 片層組成支架，類似於傳統抗體 VH 免疫球蛋白折疊。

【0023】術語“靶標”是指結合分子所針對的被結合物。靶標可以是抗原，也可以是配體或受體。

【0024】術語“抗原”是指引發免疫應答的分子。這種免疫應答可能關於抗體產生或特異性免疫細胞的活化，或兩者兼有。所屬技術領域具有通常知識者將理解，任何大分子，包括基本上所有的蛋白質或肽，都可以用作抗原。此外，抗原可以衍生自重組或基因組 DNA。如本文所用，術語“表位”指抗原(例如，VEGF 或 Ang2)中與抗體分子特異性相互作用的部分。

【0025】“互補決定區”或“CDR 區”或“CDR”是抗體可變結構域中在序列上高變並且形成在結構上確定的環(“超變環”)和/或含有抗原接觸殘基(“抗原接觸點”)的區域。CDR 主要負責與抗原表位結合。重鏈和輕鏈的 CDR 通常被稱作 CDR1、CDR2 和 CDR3，從 N-端開始順序編號。位於抗體重鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，而位於抗體輕鏈可變結構域內的 CDR 被稱作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一個給定的輕鏈可變區或重鏈可

變區胺基酸序列中，各 CDR 的精確胺基酸序列邊界可以使用許多公知的抗體 CDR 指派系統的任一種或其組合確定，該指派系統包括例如：基於抗體的三維結構和 CDR 環的拓撲學的 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))，基於抗體序列可變性的 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)，國際 ImMunoGeneTics database (IMGT) (在萬維網上 imgt.cines.fr/ 上)，以及基於利用大量晶體結構的近鄰傳播聚類(affinity propagation clustering)的 North CDR 定義。

【0026】 例如，根據不同的 CDR 確定方案，每一個 CDR 的殘基如下所述。

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 編號系統)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 編號系統)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 編號系統)				

【0027】 CDR 也可以基於與參考 CDR 序列(例如本發明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 編號位置而確定。

【0028】 除非另有說明，否則在本發明中，術語“CDR”或“CDR 序列”涵蓋以上述任一種方式確定的 CDR 序列。

【0029】 除非另有說明，否則在本發明中，當提及抗體可變區中的殘基位置(包括重鏈可變區殘基和輕鏈可變區殘基)時，是指根據 Kabat 編號系統(Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 的編號位置。

【0030】 在一個實施方案中，本發明的 VHH 中的 CDR 按照以下規則：其中 HCDR1 按照 AbM 確定，HCDR2 和 HCDR3 按照 Kabat 確定。

【0031】 應該注意，基於不同的指派系統獲得的同一抗體的可變區的 CDR 的邊界可能有所差異。即不同指派系統下定義的同一抗體可變區的 CDR 序列有所不同。因此，在涉及用本發明定義的具體 CDR 序列限定抗體時，該抗體的範圍還涵蓋了這樣的抗體，其可變區序列包含該具體 CDR 序列，但是由於應用了不同的方案(例如不同的指派系統規則或組合)而導致其所聲稱的 CDR 邊界與本發明所定義的具體 CDR 邊界不同。

【0032】 具有不同特異性(即，針對不同抗原的不同結合位點)的抗體具有不同的 CDR(在同一指派系統下)。然而，儘管 CDR 在抗體與抗體之間是不同的，但是 CDR 內只有有限數量的胺基酸位置直接參與抗原結合。使用 Kabat、Chothia、AbM、Contact 和 North 方法中的至少兩種，可以確定最小重疊區域，從而提供用於抗原結合的“最小結合單位”。最小結合單位可以是 CDR 的一個子部分。正如所屬技術領域具有通常知識者明瞭，藉由抗體的結構和蛋白折疊，可

以確定 CDR 序列其餘部分的殘基。因此，本發明也考慮本文所給出的任何 CDR 的變體。例如，在一個 CDR 的變體中，最小結合單位的胺基酸殘基可以保持不變，而根據 Kabat 或 Chothia 定義的其餘 CDR 殘基可以被保守胺基酸殘基替代。

【0033】術語“Fc 區”在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈的 CH2 和 CH3 的恆定區域，該術語包括天然序列 Fc 區和變體 Fc 區。天然或野生型 Fc 區域能夠和免疫細胞表面的不同的 Fc 受體結合，從而能夠引起 CDC\ADCC\ADCP 效應功能。此類效應器功能一般要求 Fc 區與結合結構域(例如抗體可變區)聯合。在一些實施方案中，Fc 區被突變以增強其 CDC\ADCC\ADCP 效應功能。在一些實施方案中，Fc 區被突變以削弱或刪除其 CDC\ADCC\ADCP 效應功能。

【0034】“人源化”抗體是指包含來自非人 CDR 的胺基酸殘基和來自人 FR 的胺基酸殘基的抗體。在一些實施方案中，人源化抗體將包含基本上所有的至少一個、通常兩個可變結構域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，CDR)對應於非人抗體的那些，並且所有或基本上所有的 FR 對應於人抗體的那些。人源化抗體視需要可以包含至少一部分的來源於人抗體的抗體恆定區。抗體(例如非人抗體)的“人源化形式”是指已經進行了人源化的抗體。“人抗體”或“全人抗體”或“全人源抗體”可以互換使用，其指具有這樣的胺基酸序列的抗體，該胺基酸序列對應於下述抗體的胺基酸序列，該抗體由人或人細胞生成或來源於非人來源，其利用人抗體庫或其它人抗體編碼序列。人抗體的這種定義明確排除包含非人抗原結合殘基的人源化抗體。

【0035】如本文所用，術語“抗”、“結合”或“特異性結合”意指結合作用對靶標或抗原是選擇性的並且可以與不想要的或非特異的相互作用區別。結合位點與特定靶標或抗原結合的能力可以藉由酶聯免疫吸附測定法(ELISA)或本領域

已知的常規結合測定法如藉由放射性免疫測定(RIA)或生物膜薄層干涉測定法或MSD 測定法或表面電漿共振法 (SPR) 測定。

【0036】術語“有效量”指本發明的抗體或片段或組成物或組合的這樣的量或劑量，其以單一或多次劑量施用患者後，在需要治療或預防的患者中產生預期效果。

【0037】“治療有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，有效實現所需治療結果的量。治療有效量也是這樣的一個量，其中抗體或抗體片段或組成物或組合的任何有毒或有害作用不及治療有益作用。相對於未治療的對象，“治療有效量”較佳地抑制可度量參數或改善可度量參數至少約 40%、甚至更佳地至少約 50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%甚至 100%。

【0038】“預防有效量”指以需要的劑量並持續需要的時間段，有效實現所需預防結果的量。通常，由於預防性劑量在對象中在疾病較早階段之前或在疾病較早階段使用，故預防有效量將小於治療有效量。

【0039】術語“宿主細胞”、“宿主細胞系”和“宿主細胞培養物”可交換地使用且是指其中引入外源核酸的細胞，包括這種細胞的後代。宿主細胞包括“轉化體”和“轉化的細胞”，其包括初級轉化的細胞和來源於其的後代，而不考慮傳代的數目。後代在核酸內容上可能與親本細胞不完全相同，而是可以包含突變。本文中包括在最初轉化的細胞中篩選或選擇的具有相同功能或生物學活性的突變體後代。

【0040】本文所使用的術語“標記”是指被直接或間接綴合或融合至試劑（諸如多核苷酸探針或抗體）並且促進其所綴合或融合的試劑的檢測的化合物或組成物。標記本身可以是可檢測的(例如，放射性同位素標記或螢光標記)或在

酶促標記的情況下可以催化可檢測的受質化合物或組成物的化學改變。術語旨在涵蓋藉由將可檢測物質偶聯(即，物理連接)至探針或抗體來直接標記探針或抗體以及藉由與直接標記的另一種試劑反應來間接標記探針或抗體。在一些實施方案中，標記是 hFc 或生物素。

【0041】“個體”或“受試者”包括哺乳動物。哺乳動物包括但不限於，家養動物(例如，牛，羊，貓，狗和馬)，靈長類動物(例如，人和非人靈長類動物如猴)，兔，以及齧齒類動物(例如，小鼠和大鼠)。在一些實施方案中，個體或受試者是人。

【0042】“分離的”抗體或分子是這樣的抗體或分子，其已經與其天然環境的組分分離。在一些實施方案中，將抗體或分子純化至超過 95% 或 99% 純度，如藉由例如電泳(例如，SDS-PAGE，等電聚焦(IEF)，毛細管電泳)或層析(例如，離子交換或反相 HPLC)確定的。

【0043】如下進行序列之間序列同一性的計算。

【0044】為確定兩個胺基酸序列或兩個核酸序列的同一性百分數，將該序列出於最佳比較目的比對(例如，可以為了最佳比對而在第一和第二胺基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以為比較目的而拋棄非同源序列)。在一個較佳實施方案中，為比較目的，所比對的參考序列的長度是至少 30%、較佳地至少 40%、更佳地至少 50%、60% 和甚至更佳地至少 70%、80%、90%、100% 的參考序列長度。隨後比較在對應胺基酸位置或核苷酸位置處的胺基酸殘基或核苷酸。當第一序列中的位置由第二序列中對應位置處的相同胺基酸殘基或核苷酸佔據時，則該分子在這個位置處是相同的。

【0045】 可以利用數學算法實現兩個序列間的序列比較和同一性百分數的計算。在一個較佳實施方案中，使用已經集成至 GCG 軟體包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch ((1970) J. Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 <http://www.gcg.com> 可獲得)，使用 Blossum 62 矩陣或 PAM250 矩陣和空位權重 16、14、12、10、8、6 或 4 和長度權重 1、2、3、4、5 或 6，確定兩個胺基酸序列之間的同一性百分數。在又一個較佳的實施方案中，使用 GCG 軟體包中的 GAP 程序(在 <http://www.gcg.com> 可獲得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩陣和空位權重 40、50、60、70 或 80 和長度權重 1、2、3、4、5 或 6，確定兩個核苷酸序列之間的同一性百分數。特別佳的參數集合(和除非另外說明否則應當使用的一個參數集合)是採用空位罰分 12、空位延伸罰分 4 和移碼空位罰分 5 的 Blossum 62 評分矩陣。還可以使用 PAM120 加權餘數表、空位長度罰分 12，空位罰分 4)，利用已經併入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS, 4:11-17) 確定兩個胺基酸序列或核苷酸序列之間的同一性百分數。額外地或備選地，可以進一步使用本文所述的核酸序列和蛋白質序列作為“查詢序列”以針對公共數據庫執行檢索，以例如鑑定其他家族成員序列或相關序列。

【0046】 本發明所述的“眼部疾病”涵蓋關於血管發生的眼部疾病（例如發生在眼內的疾病），例如與角膜新生血管化相關的眼部疾病。

【0047】 術語“藥用輔料”指與活性物質一起施用的稀釋劑、佐劑(例如弗氏佐劑(完全和不完全的))、賦形劑、載體或穩定劑等。

【0048】 術語“醫藥組成物”指這樣的組成物，其以允許包含在其中的活性成分的生物學活性有效的形式存在，並且不包含對施用該組成物的受試者具有不可接受的毒性的另外的成分。

【0049】用於本文時，“治療”指減緩、中斷、阻滯、緩解、停止、降低、或逆轉已存在的症狀、病症、病況或疾病的進展或嚴重性。

【0050】用於本文時，“預防”包括對疾病或病症或特定疾病或病症的症狀的發生或發展的抑制。

【0051】術語“載體”當在本文中使用時是指能夠增殖與其相連的另一個核酸的核酸分子。該術語包括作為自我複製核酸結構的載體以及結合到已經引入其的宿主細胞的基因組中的載體。一些載體能夠指導與其可操作相連的核酸的表達。這樣的載體在本文中被稱為“表達載體”。

【0052】“受試者/患者/個體樣品”指從患者或受試者得到的細胞或流體的集合。組織或細胞樣品的來源可以是實體組織，像來自新鮮的、冷凍的和/或保存的器官或組織樣品或活檢樣品或穿刺樣品；血液或任何血液組分；體液，諸如淚液、玻璃體液、腦脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或間隙液；來自受試者的妊娠或發育任何時間的細胞。在一些實施方案中，組織樣品是眼部組織，例如玻璃體。在一些實施方案中，樣品是淚液或玻璃體液。組織樣品可能包含在自然界中天然不與組織混雜的化合物，諸如防腐劑、抗凝劑、緩衝劑、固定劑、營養物、抗生素、等等。

具體實施方案

【0053】 I. 抗 VEGF A 的 VHH 抗體

本發明關於針對 VEGF A 的 VHH 抗體。在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF VHH 包含如下的 3 個 CDR，HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由該序列組成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由該序列組成。

【0054】 在一些實施方案中，該 VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 該胺基酸組成。

【0055】 在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【0056】 在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0057】 II. 抗 Ang2 的 VHH 抗體

本發明關於針對 Ang2 的 VHH 抗體。在一些實施方案中，本發明的抗 Ang2 VHH 包含如下的 3 個 CDR，HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由該序列組成。

【0058】 在一些實施方案中，該 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 19 或 21 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 該胺基酸組成。

【0059】 在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO:19 或 21 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個(較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個)突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【0060】 在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0061】 III. 抗 VEGF A ×ANG2 的雙特異性結合分子

在本發明的一個方面，本發明關於結合 VEGF A 和 Ang2 的雙特異性結合分子，其包含特異性結合 VEGF A 的第一靶標結合區和特異性結合 Ang2 的第二靶標結合區，其中第二靶標結合區是抗 Ang2 的 VHH，例如本發明的如上所述的抗 Ang2 VHH。

【0062】 在一些實施方案中，該第一靶標結合區選自
特異性結合 VEGF A 的 VHH；

特異性結合 VEGF A 的抗體的抗原結合片段，例如 scFv，例如該抗體為全人抗體或人源化抗體；或

特異性結合 VEGF A 的 VEGF 受體(VEGF R)或其胞外結構域或包含其胞外結構域的融合蛋白，例如胞外結構域與 Fc 的融合蛋白。

【0063】 在一些實施方案中，本發明的雙特異性結合分子包含 1 個或 2 個或 3 個或 4 個第一或第二靶標結合區。在一些實施方案中，本發明的雙特異性結

合分子包含 2 個、3 個或 4 個靶標結合區。在一些實施方案中，本發明的雙特異性結合分子是二價的或 3 價的或 4 價的。在一些實施方案中，本發明的雙特異性結合分子為雙特異性抗體。

【0064】 在本發明的一個方面，本發明的雙特異性結合分子，例如雙特異性抗體具有以下結構：

抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL-接頭-抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH-接頭-抗 Ang2 VHH 或

抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH-接頭-抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL-接頭-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，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由該序列組成。

【0065】 在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子的結構如圖 1A 或圖 1B 所示。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子由一條鏈組成。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子為二價的。

【0066】 在一些實施方案中，抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由其組成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:32 所示的序列或由其組成；LCDR3 包含 SEQ ID NO:33 所示的序列或由其組成。

【0067】 在一些實施方案中，抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由其組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:36 所示的序列或由其組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:37 所示的序列或由其組成。

【0068】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH 包含 SEQ ID NO:34 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 34 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 34 該胺基酸組成。在一些實施方案中，該重鏈可變區 VH 包含與 SEQ ID NO:34 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0069】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL 包含 SEQ ID NO:30 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 30 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 30 該胺基酸組成。在一些實施方案中，該輕鏈可變區 VL 包含與 SEQ ID NO:30 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 LCDR1、LCDR2 或 LCDR3 中。

【0070】 在一些實施方案中，本發明的抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 19 或 21 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 該胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VHH 包

含與 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0071】 在一些實施方案中，該接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成。在一些實施方案中，在抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區和重鏈可變區之間的接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成，其中例如 $n=4$ 。在一些實施方案中，抗 VEGF 可變區與抗 Ang2 VHH 之間的接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成，其中例如 $n=2$ 或 3，例如 3。

【0072】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF A $\times$ ANG2 的雙特異性結合分子包含 SEQ ID NO:28 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 28 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 28 該胺基酸組成。在一些實施方案中，該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO: 28 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於抗 VEGF 抗體可變區和抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。

【0073】 在本發明的另一個方面，本發明的雙特異性結合分子，例如雙特異性抗體具有以下結構：

第一抗 VEGF VHH-接頭-第二抗 VEGF VHH-接頭-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，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示

99572 第 20 頁，共 60 頁(發明說明書)

的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由該序列組成。

【0074】 在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子的結構如圖 1C 所示。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子由一條鏈組成。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子為三價的。在一些實施方案中，第一抗 VEGF VHH 與第二抗 VEGF VHH 相同或不同。

【0075】 在一些實施方案中，抗 VEGF VHH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由該序列組成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由該序列組成。

【0076】 在一些實施方案中，該抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO: 4、5、9 或 11 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0077】 在一些實施方案中，抗 VEGF VHH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由該序列組成。

【0078】 在一些實施方案中，該抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 9 或 11 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO: 9 或 11 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0079】 在一些實施方案中，本發明的抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0080】 在一些實施方案中，該接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成。在一些實施方案中，第一抗 VEGF VHH 和第二抗 VEGF VHH 之間

的接頭或第二抗 VEGF VHH 與抗 Ang2 VHH 之間的接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成，例如 $n=2$ 。

【0081】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF A $\times$ ANG2 的雙特異性結合分子包含 SEQ ID NO:22 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:22 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:22 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO:22 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於抗 VEGF VHH 和抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。

【0082】 在本發明的另一個方面，本發明的雙特異性結合分子包含一條或兩條以下鏈：

VEGF R 胞外結構域-Fc-接頭-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，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由該序列組成。

【0083】 在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子的結構如圖 1D 所示。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子由兩條鏈組成。在一些實施方案中，上述雙特異性結合分子為四價的。

【0084】 在一些實施方案中，該抗 Ang2 VHH 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:19 或 21 所述的胺基酸序列具有至少

90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VHH 包含與 SEQ ID NO: 19 或 21 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一些較佳的實施方案中，該突變不存在於 CDR，例如 HCDR1、HCDR2 或 HCDR3 中。

【0085】 在一些實施方案中，VEGFR 胞外結構域為來自人的 VEGFR 的胞外結構域。在一些實施方案中，該 VEGFR 胞外結構域包含 VEGFR1 第二抗體樣結構域(例如 FLT1 domain 2)和 VEGFR2 第三抗體樣結構域(例如 KDR domain 3)。在一些實施方案中，該 VEGFR 胞外結構域包含人 VEGFR1 第二抗體樣結構域和人 VEGFR2 第三抗體樣結構域。在一些實施方案中，該 VEGFR 胞外結構域包含 SEQ ID NO:26 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 26 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:26 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VEGFR 胞外結構域包含與 SEQ ID NO:26 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換，較佳地該 VEGFR 胞外結構域保留與 SEQ ID NO:26 所示的結構域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的與 VEGF 的結合親和力。

【0086】 在一些實施方案中，該 Fc 為來源於人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc，例如野生型 Fc，或本領域已知的 Fc 變體。在一些實施方案中，該 Fc 包含 SEQ ID NO:27 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 27 所述的胺基酸序列

具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:27 所述的胺基酸組成。

【0087】 在一些實施方案中，該 VEGF R 胞外結構域-Fc 為 VEGFR 胞外結構域與 Fc 的融合蛋白，例如 Aflibercept 或其衍生物。

【0088】 在一些實施方案中，該 VEGF R 胞外結構域-Fc 包含 SEQ ID NO:25 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 25 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該 VEGF R 胞外結構域-Fc 包含與 SEQ ID NO:25 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換，較佳地該 VEGF R 胞外結構域-Fc 保留與 SEQ ID NO:25 所示的結構域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的與 VEGF 的結合親和力。

【0089】 在一些實施方案中，該接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成，例如 n=3。

【0090】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF A ×ANG2 的雙特異性結合分子的一條鏈包含 SEQ ID NO:24 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:24 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 24 所述的胺基酸組成。在一些實施方案中，該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO: 24 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。在一

些較佳的實施方案中，該突變不存在於抗 Ang2 VHH 的 CDR 中。在一些實施方案中，該具有突變的 VEGF R 胞外結構域-Fc 保留與 SEQ ID NO:25 所示的結構域相似（例如具有至少 70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）的與 VEGF 的結合親和力。

【0091】 在本發明的一個實施方案中，本文所述的抗體或結合分子包含一個或多個胺基酸突變。在一些實施方案中，胺基酸突變包括胺基酸的置換、插入或缺失。較佳的，本文所述的胺基酸改變為胺基酸置換，較佳地保守置換。

【0092】 在較佳的實施方案中，本發明所述的胺基酸突變發生在 CDR 外的區域（例如在 FR 中）。在一些實施方案中，本發明所述的胺基酸突變發生在抗體重鏈恆定區，例如 Fc 區上，在較佳的實施方案中，該 Fc 區上的胺基酸突變削弱或刪除了抗體的 ADCC 和/或 CDC 作用。

【0093】 在一些實施方案中，置換為保守性置換。保守置換是指一個胺基酸經相同類別內的另一胺基酸置換，例如一個酸性胺基酸經另一酸性胺基酸置換，一個鹼性胺基酸經另一鹼性胺基酸置換，或一個中性胺基酸經另一中性胺基酸置換。

【0094】 在某些實施方案中，可在本文中所提供抗體的 Fc 區中引入一個或多個胺基酸突變，以此產生 Fc 區變體，以改變抗體的一種或多種功能特性，例如血清半衰期、補體結合、補體依賴性細胞毒性、Fc 受體結合和/或抗體依賴性細胞毒性。Fc 區變體可包括在一或多個胺基酸位置處包含胺基酸突變(例如置換)的人 Fc 區序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc 區)。

【0095】 在某些實施方案中，可能需要對抗體的可變區進行突變以產生二硫鍵，例如產生包含二硫鍵突變的 scFv。

【0096】 在某些實施方案中，本文中所提供的抗體或結合分子可進一步經修飾為含有本領域中已知且輕易獲得的其他非蛋白質部分。適合該衍生作用的部分包括，但不限於，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性實例包括，但不限於，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、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/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚環氧丙烷/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。

【0097】 IV. 本發明 VHH 抗體或雙特異性結合分子的性質

在一些實施方案中，本發明抗 Ang2 VHH 抗體能夠特異性結合 Ang2，例如人 Ang2，例如以高親和力。

【0098】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGFA VHH 抗體能夠特異性結合 VEGF A，例如人 VEGF A，例如以高親和力。

【0099】 在一些實施方案中，本發明的雙特異性結合分子能夠特異性結合 Ang2 和 VEGFA，例如人 Ang2 和人 VEGFA，例如以高親和力。

【0100】 在一些實施方案中，本發明的抗 Ang2 抗體或抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子具有一種或多種以下性質：

(i) 抗 Ang2 抗體或雙特異性結合分子對於 Ang2 誘導的 Tie2 磷酸化具有抑制作用；

(ii) 抗 Ang2 抗體或雙特異性結合分子對於 Ang2 與 Tie2 之間結合具有阻斷作用；

(iii) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGFA 激活相關受體信號通路具有阻斷作用，例如藉由 KDR reporter 檢測；

(iv) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGFA 與 VEGFR 之間結合具有阻斷作用；

(v) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGF A 誘導的細胞（例如原代細胞，例如血管內皮細胞，例如人臍靜脈內皮細胞，例如 HUVEC）的存活和增殖具有抑制作用；

(vi) 雙特異性結合分子對血管內皮細胞（例如人臍靜脈內皮細胞，例如 HUVEC）滲漏具有抑制作用；

(vii) 雙特異性結合分子在體內或體外對新生血管化具有抑制作用，例如抑制眼底或視網膜脈絡膜新生血管化，例如抑制新生血管引起的滲漏，例如保護血管完整性。

【0101】 V. 本發明的核酸以及包含其的宿主細胞

在一方面，本發明提供了編碼以上任何 VHH 或雙特異性結合分子或其任一條鏈的核酸。在一個實施方案中，提供包含該核酸的載體。在一個實施方案中，載體是表達載體，例如真核表達載體。載體包括但不限於病毒、質粒、黏粒、 λ 噬菌體或酵母人工染色體(YAC)。在一個實施方案中，載體是例如 pcDNA3.1。在一個實施方案中，提供包含該核酸或該載體的宿主細胞。在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞(例如 CHO 細胞(例如 CHO-S)或 293 細胞（例如 293F 或 HEK293 細胞）)或適用於製備抗體或其片段的其它細胞。在另一個實施方案中，宿主細胞是原核的，例如大腸桿菌，例如 TG1。

【0102】例如，本發明的核酸包含編碼選自 SEQ ID NO: 4、5、9、11、19、21、22、24、28 中任一項所示胺基酸序列的核酸，或編碼與選自 SEQ ID NO: 4、5、9、11、19、21、22、24、28 中任一項所示的胺基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的同一性的胺基酸序列的核酸。

【0103】在一個實施方案中，提供包含該載體的宿主細胞。用於選植或表達編碼 VHH 或雙特異性結合分子的載體的適當宿主細胞包括本文描述的原核或真核細胞。例如，VHH 可在細菌中產生。在表達後，VHH 存在於在培養物上清中，並且可以進一步純化。

【0104】在一個實施方案中，宿主細胞是原核的，例如是細菌，例如大腸桿菌，例如 TG1。

【0105】在一個實施方案中，宿主細胞是真核的。在另一個實施方案中，宿主細胞選自酵母細胞、哺乳動物細胞或適用於製備抗體或其片段的其它細胞。例如，真核微生物諸如絲狀真菌或酵母是關於編碼抗體的載體的合適純株或表達宿主。例如，糖基化途徑已經進行“人源化”的真菌和酵母菌株導致產生具有部分或完全人糖基化模式的抗體。適於表達糖基化抗體的宿主細胞也衍生自多細胞生物體(無脊椎動物和脊椎動物)。也可以將脊椎動物細胞用作宿主。例如，可以使用被改造以適合於懸浮生長的哺乳動物細胞系。有用的哺乳動物宿主細胞系的其它實例是用 SV40 轉化的猴腎 CV1 系(COS-7)；人胚腎系(HEK293、293F 或 293T 細胞) 等。其它有用的哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO) 細胞，包括 DHFR-CHO 細胞、CHO-S 細胞、ExpiCHO 等；以及骨髓瘤細胞系如 Y0，NS0 和 Sp2/0。本領域已知適合產生抗體的哺乳動物宿主細胞系。

【0106】 VI. 本發明的 VHH 或雙特異性結合分子的生產和純化

在一個實施方案中，提供了製備本發明 VHH 或雙特異性結合分子的方法，其中該方法包括，在適合 VHH 或雙特異性結合分子或其鏈表達的條件下，培養包含編碼該 VHH 或雙特異性結合分子（例如任意一條多肽鏈和／或多條多肽鏈）的核酸或包含該核酸的表達載體的宿主細胞，如上文所提供的，和視需要地從該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該 VHH 或雙特異性結合分子。

【0107】 為了重組產生本發明的分子，分離編碼本發明 VHH 或雙特異性結合分子(例如上文所描述分子，例如任意一條多肽鏈和／或多條多肽鏈)的核酸，並將其插入一個或多個載體，用於在宿主細胞中進一步選殖和/或表達。此類核酸易於使用常規規程分離和測序。

【0108】 如本文該製備的 VHH 或雙特異性結合分子可以藉由已知的現有技術如高效液相色譜、離子交換層析、凝膠電泳、親和層析、大小排阻層析等純化。用來純化特定蛋白質的實際條件還取決於淨電荷、疏水性、親水性等因素，並且這些對所屬技術領域具有通常知識者是顯而易見的。可以藉由多種熟知分析方法中的任一種方法確定本發明的抗體分子的純度，該熟知分析方法包括尺寸排阻層析、凝膠電泳、高效液相色譜等。

【0109】 VII. 測定法

可以藉由本領域中已知的多種測定法對本文中提供的 VHH 或雙特異性結合分子進行鑑定，篩選，或表徵其物理/化學特性和/或生物學活性。一方面，對本發明的 VHH 或雙特異性結合分子測試其靶標（例如抗原）結合活性，例如藉由已知的方法諸如生物膜薄層干涉技術、ELISA，等來進行。可使用本領域已知方法來測定對 VEGF A 和/或 Ang2 的結合，本文中公開了例示性方法。在一些實施

方案中，使用放射性免疫測定(RIA)或生物膜薄層干涉測定法或 MSD 測定法或表面電漿共振法（SPR）或流式細胞術測量。

【0110】 本發明還提供了用於鑑定具有生物學活性的 VHH 或雙特異性結合分子的測定法。生物學活性選自例如

(i) 抗 Ang2 抗體或雙特異性結合分子對於 Ang2 誘導的 Tie2 磷酸化的抑制作用；

(ii) 抗 Ang2 抗體或雙特異性結合分子對於 Ang2 與 Tie2 之間結合的阻斷作用；

(iii) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGFA 激活相關受體信號通路的阻斷作用，例如藉由 KDR reporter 檢測；

(iv) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGFA 與 VEGFR 之間結合的阻斷作用；

(iv) 抗 VEGFA 抗體或雙特異性結合分子對於 VEGF A 誘導的細胞（例如原代細胞，例如血管內皮細胞，例如人臍靜脈內皮細胞，例如 HUVEC）的存活和增殖的抑制作用；

(vi) 雙特異性結合分子對血管內皮細胞（例如人臍靜脈內皮細胞，例如 HUVEC）滲漏的抑制作用；

(vii) 雙特異性結合分子在體內或體外對新生血管化的抑制作用，例如抑制眼底或視網膜脈絡膜新生血管化，例如抑制新生血管引起的滲漏，例如保護血管完整性。

【0111】 供任何上述體外測定法使用的細胞為原代細胞或細胞系，包括天然表達或過表達 Ang2 受體（例如 Tie2）或 VEGFR（例如 VEGFR2，即 KDR）

的細胞，例如過表達 Tie2 或 KDR 的 293 細胞，例如 HEK293 或 Expi293；或血管內皮細胞，例如人臍靜脈內皮細胞，例如 HUVEC。

【0112】 在一些實施方案中，測定可以應用生物素或 hFc 等標記物進行。

【0113】 可以理解的是，能夠使用本發明的抗體和別的活性劑的組合來進行任何上述測定法。

【0114】 VIII. 免疫綴合物和醫藥組成物

在一些實施方案，本發明提供了包含本文所述的任何 VHH 或雙特異性結合分子的免疫綴合物。較佳地，該免疫綴合物包含一種或多種其他治療劑或標記物。

【0115】 在一些實施方案中，本發明提供包含本文所述的任何 VHH 或雙特異性結合分子的組成物或藥物或製劑，較佳地組成物為醫藥組成物。在一個實施方案中，該組成物還包含藥用輔料。在一個實施方案中，組成物，例如，醫藥組成物，包含本發明的 VHH 或雙特異性結合分子，以及一種或多種其它治療劑的組合。

【0116】 本發明還包括包含本發明的 VHH 或雙特異性結合分子的組成物(包括醫藥組成物)或藥物或製劑。這些組成物或藥物或製劑還可以包含合適的藥用輔料，如本領域中已知的藥用載體、藥用賦形劑，包括緩衝劑。

【0117】 如本文所用，“藥用載體”包括生理上相容的任何和全部溶劑、分散介質、等滲劑和吸收延遲劑等。

【0118】 對於藥用輔料的使用及其用途，亦參見“Handbook of Pharmaceutical Excipients”，第八版，R.C.Rowe,P.J.Seskey 和 S.C. Owen, Pharmaceutical Press, London, Chicago。

【0119】本發明的組成物或藥物或製劑可以處於多種形式。這些形式例如包括液體、半固體和固體劑型，如液態溶液劑(例如，注射液或滴眼液)、散劑或混懸劑、脂質體劑和栓劑。較佳的形式取決於預期的施用模式和治療用途。例如，本發明的組成物或藥物或製劑可以是滴眼液。

【0120】可以藉由將具有所需純度的本發明的 VHH 或雙特異性結合分子與一種或多種視需要的藥用輔料混合來製備包含本文所述的 VHH 或雙特異性結合分子的藥物或製劑，較佳地以凍乾製劑或水溶液的形式。

【0121】本發明的組成物或藥物或製劑還可以包含超過一種活性成分，該活性成分是被治療的特定適應證所需的，較佳具有不會不利地彼此影響的互補活性的那些活性成分。例如，理想的是還提供其它治療劑。

【0122】可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑的合適實例包括含有抗體的固體疏水聚合物的半滲透基質，該基質呈成形物品，例如薄膜或微囊形式。

【0123】本發明還提供了藥物組合或藥物組合產品，其包含本發明的 VHH 或雙特異性結合分子，以及一種或多種其它治療劑。本發明還提供了包含該藥物組合的成套藥盒，例如該成套藥盒在同一包裝內包含：

- 含有包含本發明的 VHH 或雙特異性結合分子的醫藥組成物的第一容器；
- 含有包含其它治療劑的醫藥組成物的第二容器。

【0124】IX. 用途和方法

本發明一方面提供了在受試者中預防或治療眼部疾病的方法，包括向受試者施用有效量的本發明的抗 VEGF VHH、本發明的抗 Ang2 VHH 或本發明的雙特異性結合分子，或包含其的組成物或藥物或製劑。

【0125】 在一些實施方案中，該患者中具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白質水平的）VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

【0126】 在一些實施方案中，該眼部疾病包括但不限於與血管發生相關的眼部疾病，例如與角膜新生血管化相關的眼部疾病。

【0127】 在一些實施方案中，該眼部疾病治療將受益於抑制核酸或蛋白質水平的 VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

【0128】 在其他方面，本發明提供本發明的抗 VEGF VHH、本發明的抗 Ang2 VHH 或本發明的雙特異性結合分子或包含其的組成物在生產或製備藥物中的用途，該藥物用於本文該用途，例如用於預防或治療本文提及的相關疾病或病症。

【0129】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF VHH、本發明的抗 Ang2 VHH 或本發明的雙特異性結合分子或包含其的組成物或藥物或製劑會延遲病症和/或與病症相關的症狀的發作。

【0130】 在一些實施方案中，本發明的抗 VEGF VHH、本發明的抗 Ang2 VHH 或本發明的雙特異性結合分子或包含其的組成物或藥物或製劑還能與一種或多種其它療法例如治療方式和/或其它治療劑組合施用，用於本文所述的用途，例如用於預防和/或治療本文提及的相關疾病或病症。

【0131】 本發明的抗 VEGF VHH、本發明的抗 Ang2 VHH 或本發明的雙特異性結合分子或包含其的組成物或藥物或製劑的施用途徑是根據已知方法，例如，局部施用，例如眼內施用、眼表施用。在一些實施方案，藉由注射或滴入施用。

【0132】 X. 用於診斷和檢測的方法和組成物

在某些實施方案中，本文中提供的抗 Ang2 VHH 抗體可以用於檢測 Ang2 在生物樣品中的存在。在某些實施方案中，本文中提供的抗 VEGFA VHH 抗體可以用於檢測 VEGFA 在生物樣品中的存在。在某些實施方案中，本文中提供的抗雙特異性結合分子可以用於檢測 Ang2 和/或 VEGFA 在生物樣品中的存在。

【0133】術語“檢測”用於本文中時，包括定量或定性檢測，示例性的檢測方法可以關於免疫組織化學、免疫細胞化學、流式細胞術(例如，FACS)、抗體分子複合的磁珠、ELISA 測定法、PCR-技術(例如，RT-PCR)。在某些實施方案中，生物樣品是體液或眼部組織，例如玻璃體液。

【0134】在某些實施方案中，該方法包括將生物樣品與如本文所述的 VHH 或雙特異性結合分子在允許其與 Ang2 或 VEGFA 結合的條件下接觸，並檢測在該 VHH 或雙特異性結合分子和 Ang2 或 VEGFA 之間是否形成複合物。複合物的形成表示存在 Ang2 或 VEGFA。該方法可以是體外或體內方法。在一個實施方案中，本發明的抗體用於選擇適合利用本發明的 VHH 或雙特異性結合分子治療的受試者，例如其中 Ang2 或 VEGFA 是用於選擇該受試者的生物標記物。

【0135】在某些實施方案中，提供標記的 VHH 或雙特異性結合分子。標記包括但不限於，被直接檢測的標記或部分(如螢光標記、發色團標記、電子緻密標記、化學發光標記和放射性標記)，以及被間接檢測的部分，如酶或配體，例如，藉由酶促反應或分子相互作用。在一些實施方案中，該標記例如生物素或 hFc 等標記物。

【0136】在本文中提供的一些實施方案中，樣品是在用本發明的 VHH 或雙特異性結合分子治療之前獲得的。在一些實施方案中，樣品是在用其他療法之

前獲得的。在一些實施方案中，樣品是在用其他療法治療過程中，或者用其他療法治療後獲得的。

【0137】 在一些實施方案中，在治療之前，例如，在起始治療之前或在治療間隔後的某次治療之前檢測 Ang2 和/或 VEGF A。

【0138】 在一些實施方案中，提供了一種治療本發明疾病的方法，該方法包括：對受試者(例如，樣品)(例如，受試者樣品)檢驗 Ang2 和/或 VEGF A 的存在，因而確定 Ang2 和/或 VEGF A 值，將 Ang2 和/或 VEGF A 值與對照值(例如正常個體中的值)比較，並且如果 Ang2 和/或 VEGF A 值大於對照值，則向受試者施用治療有效量的視需要與一種或多種其他療法組合的本發明所述的 VHH 或雙特異性結合分子，因而治療該疾病。

【0139】 本發明的這些以及其它方面和實施方案在圖式(圖簡單說明緊隨其後)和以下的發明詳述中得到描述並且示例於以下實施例中。上文以及整個本申請中所論述的任何或所有特徵可以在本發明的各種實施方案中組合。以下實施例進一步說明本發明，然而，應理解實施例以說明而非限定的方式來描述，並且所屬技術領域具有通常知識者可以進行多種修改。

【0140】 實施例 1. 噬菌體免疫庫的製備

羊駝免疫或合成庫構建

【0141】 1.1 選取健康成年羊駝(成都阿帕克公司)2 隻，將 0.5mg 重組蛋白抗原 VEGFA 或 Ang2 (北京義翹公司)與弗氏佐劑按 1:1 比例混勻，背部皮下多點注射的方式免疫羊駝，共免疫四次，免疫間隔為 2 週。

【0142】 1.2 採集 50ml 羊駝外周血，分離淋巴細胞，按照每 2.5×10^7 個活細胞加入 1mL Trizol 試劑，採用氯仿/異丙醇沉澱方法抽提總 RNA。取 10ug RNA

作為模板，使用 PrimeScript 逆轉錄試劑盒（Takara 公司）進行反轉錄。將 cDNA 作為模版進行第一輪 PCR 反應，使用正向引子 Alp-VhL 和反向引子 Alp-2b/2cR，獲得第一輪 PCR 產物。將第一輪 PCR 產物作為模板進行第二輪 PCR 反應，使用正向引子 Alp-VhF 和反向引子 Alp-JHR-SalI，獲得第二輪 PCR 產物。將 pC3-HF 載體和第二輪 PCR 產物分別使用 SacI 和 SalI（Thermo 公司）進行雙酶切，酶切產物加入 T4 連接酶（Thermo 公司）反應，電轉化 TG1 感受態細胞，構建 VHH 抗體文庫，將菌液在-80℃凍存。

【0143】取復蘇的菌液接種至 100ml YT-AG 培養基（上海生工公司）中，加入 M13KO7 輔助噬菌體進行感染，用 2×YT-AK 培養基（上海生工公司）重新懸浮菌體，37℃ 200rpm 培養過夜。收集培養上清，採用 PEG/NaCl 沉澱方法製備重組噬菌體。

【0144】1.3 重組噬菌體使用生物素標記抗原 VEGFA（ACRO 公司）或 Ang2（北京義翹公司）進行 3 輪淘洗實驗。每管加入 50ul M280 磁珠（Thermo 公司）和適量生物素標記抗原，室溫培育 30 分鐘後，加入 1×10^{12} cfu 重組噬菌體室溫培育 1 小時。將獲得的混合物加入 1ml PBST 洗滌 10 次，每次洗滌時間 5 分鐘。最後加入 0.5ml pH2.5 甘胺酸緩衝液，沖提抗原結合的重組噬菌體，侵染 TG1 過夜培養，製備重組噬菌體，用於下一輪淘洗實驗並且鑑定陽性 VHH 的 TG1 細菌純株。

【0145】1.4 Binding ELISA 檢測結合活性和純株測序。

【0146】提前取 VEGF A，Ang2 抗原（北京義翹公司）用 PBS 緩衝液稀釋成 0.5ug/ml 包被 96 孔 ELISA 板，4℃冰箱過夜。抗原包被板用 PBST 洗 3 遍，

加入封閉劑至 300ul/孔，室溫靜置封閉 1 小時。PBST 洗 3 遍，加入 80ul 封閉劑 +20ul 上述 1.3 鑑定的陽性 VHH 的 TG1 菌的表達上清，室溫振盪 1 小時。

【0147】 PBST 洗 3 遍，加入封閉劑稀釋的 Anti-Flag/HRP 二抗（Sigma 公司）100ul/孔，室溫震盪 40 分鐘。PBST 洗 6 遍，加入 TMB 顯色液至 100ul/孔，避光顯色 5-15 分鐘。再加入 100ul/孔終止液。酶標儀讀數，測定 OD450nm 吸光值，選取讀值大於 0.5 的細菌純株送金唯智測序，選取含有各個對應 VHH 序列的 TG1 菌單純株加入甘油，凍於-80℃冰箱。

【0148】 實施例 2. 原核抗體的生產和純化，及人源化

本發明利用分子生物學技術，獲得抗 VEGFA 或 Ang2 陽性噬菌體中的抗體序列，並利用上述獲得的含有陽性 VHH 的 TG1 單株表達純化獲得 VHH 抗體蛋白。

【0149】 取實施例 1 鑑定的含有 VHH 表達質粒的 TG1 菌，接種到 800ml LB-Amp 培養基中，37℃ 200rpm 培養至 OD600 值 0.5-0.6。菌液加入 1mMIPTG 誘導表達，28℃ 200rpm 培養過夜，收集培養上清，離心後加入 15ml PB +1mg/ml 多黏菌素重新懸浮細菌，再次離心，0.22um 濾膜過濾。將細菌裂解液流過 1 ml Ni Sepharose 預先管柱，加入 PBS 洗滌 2 次，加入 0.5M 咪唑沖提目標蛋白，用紫外法測定蛋白濃度。沖提的目標蛋白用紫外法測定蛋白濃度，分裝多管置於-40 度冰箱保存。獲得的抗體溶液後續稱為上清。

【0150】 本發明獲得的 2 個抗 VEGF A VHH 抗體（LA42F8 和 LA46E11）和 1 個抗 Ang2 VHH 抗體（LA24C11）的 CDR、和 VHH 的胺基酸序列，以及序列編號請參見序列表。

【0151】 之後將上述獲得的免疫庫抗體 LA42F8、LA46E11、LA24C11 抗體人源化，步驟如下：

- ①確定 CDR 環結構；
- ②在人種系序列數據庫為重鏈的每個 V / J 區域找到最接近的同源序列；
- ③篩選與重鏈輕鏈最匹配的人種系以及最低量的回復突變；
- ④將嵌合抗體的 CDR 區構建至人的骨架區上；
- ⑤使用序列和結構特徵，確定骨架區中起到維持 CDR 功能的胺基酸位置；
- ⑥在確定為重要的序列位置進行回復突變（返回到輸入胺基酸類型）；
- ⑦優化風險位點的胺基酸。

【0152】 本發明獲得的 3 個人源化抗體分別獲得人源化 VHH 抗體 LA42F8.5、LA46E11.8、LA24C11.10 的 CDR、和重鏈可變區的胺基酸序列請參見所附序列表。

【0153】 上述 LA42F8、LA46E11、LA24C11 和人源化抗體 LA42F8.5、LA46E11.8、LA24C11.10 在真核細胞中的表達製備如下：

【0154】 將從上文獲得的人源化抗體序列選殖到 pcDNA3.1 (Invitrogen)，分別獲得包含抗體序列的質粒。

【0155】 根據所需轉染體積傳代 Expi-293 細胞 (Invitrogen)，轉染前一天將細胞密度調整至 1.5×10^6 個細胞/ml。轉染當天細胞密度約為 3×10^6 個細胞/ml。取終體積 1/10 的 F17 培養基 (Gibco, A13835-01) 作為轉染緩衝液，加入適當的該質粒，混勻。加合適的聚乙烯亞胺(PEI) (Polysciences, 23966) 到質粒中(質粒與 PEI 的比例在 293F 細胞中為 1:3)，混勻後室溫培育 10 min，獲得 DNA/PEI 混合物。用 DNA/PEI 混合物重新懸浮細胞後， 36.5°C ，8%的 CO_2 。24 h 後補加

轉染體積 2%的 FEED (Sigma) , 於 36.5°C , 120 rpm , 8%的 CO₂ 條件下培養。連續培養至第 6 天或者細胞活力≤ 60%時, 收集細胞上清進行純化。

【0156】 將純化使用的重力管柱使用 0.5 M NaOH 過夜處理, 玻璃瓶等用蒸餾水洗淨後在 180°C 乾烤 4h, 獲得純化管柱。純化前將上述收集的細胞上清 4500 rpm 離心 30 min, 棄掉細胞。再將上清使用 0.22 μl 的濾器過濾。使用 10 ml 結合緩衝液 (磷酸鈉 20mM, NaCl 150mM, PH7.0) 平衡 Protein A 管柱 (Hitrap Mabselect Sure 5*5ml, GE, 11-0034-95)。將過濾後的上清加入純化管柱後使用 15 ml 結合緩衝液再平衡。加 5 ml 沖提緩衝液(檸檬酸+檸檬酸鈉 0.1M, pH3.5), 收集沖提液, 每 1 ml 的沖提液加入 80 μl Tris-HCl。將收集的抗體超濾濃縮交換到 PBS (Gibco, 70011-044) 中, 並檢測濃度。除表 3, 圖 2, 圖 4A 和圖 5A 中的用於檢測的本發明抗體, 後續如無特殊提及上清, 實施例中所用的抗體均為此表達純化的抗體。

【0157】 類似地, 陰性對照 IgG、陽性對照 BI-anti-VEGF、BI836880、Faricimab (序列見序列表) 的編碼核酸選殖到 pcDNA3.1 後, 轉染 Expi-293 細胞後, 表達並純化獲得, 方法同實施例 2。

【0158】 實施例 3 生物膜薄層干涉技術測定本發明的嵌合抗體與抗原的結合動力學

採用生物膜薄層干涉測定技術(ForteBio)測定本發明抗體結合人 Ang2 的平衡解離常數 (KD)。ForteBio 親和力測定按照現有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 頁) 進行。

【0159】 實驗開始前半個小時，根據樣品數量，取合適數量的 AMQ (Pall，1506091) (用於樣品檢測) 或 AHQ (Pall，1502051) (用於陽性對照檢測) 傳感器浸泡於 SD buffer (PBS 1×，BSA 0.1%，Tween-20 0.05%) 中。

【0160】 取 100 μ l 的 SD 緩衝液、上文實施例 2 中製備的 VHH 抗體、抗原 [包括人 Ang2 (北京義翹)、及人 VEGF165 (R&D)]，分別加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板 (Greiner，675076) 中。根據樣品位置布板，選擇傳感器位置。儀器設置參數如下：運行步驟：Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation；各個步驟運行時間取決於樣品結合和解離速度，轉速為 400 rpm，溫度為 30°C。使用 ForteBio 分析軟體分析 K_D 值。

【0161】 在以上測定法所述的實驗中，抗體的親和力如表 1 所示：

表 1. ForteBio 檢測抗原抗體單價結合的親和力常數（平衡解離常數）

抗體	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 表示未檢測

表 2. ForteBio 檢測抗原抗體雙價結合的親和力常數（平衡解離常數）

抗體	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*

*代表解離常數超過 ForteBio 檢測極限

【0162】 實施例 4 抗 VEGF A VHH 抗體 ELISA 阻斷實驗

本實施例驗證了本發明抗 VEGF A VHH 對於 hVEGF A 與受體 KDR 結合的阻斷作用。將 SA（Thermo 貨號 21125）稀釋成 1ug/ml，100ul/孔鋪於酶標版中 4℃ 過夜。PBST 洗 3 遍，加入 3% BSA 封閉 1.5h。PBST 洗 3 遍，加入 50ng/ml 生物素標記的 VEGF A165（ACRO 貨號 VE5-H8210），培育 1.5h，提前將抗體（起始濃度為 150ug/ml，3 倍連續稀釋）的實施例 2 中製備的 LA42F8 上清、LA46E11 上清 和陰性對照 IgG，以及陽性對照 BI-anti-VEGF）50ul 與 VEGFR-Fc（北京義翹，貨號：10012-H02H 終濃度 0.2ug/ml）培育 20min 後加入板中。PBST 洗 3 遍，加入抗 human Fc HRP 抗體（Bethyl 貨號：A80-104P）（1:10000）培育 30min。PBST 洗 6 遍，TMB 顯色 5min，終止後 OD450nm 讀數。

【0163】 本發明獲得的 3 個抗 VEGF VHH 抗體阻斷結果如圖 2。圖 2 顯示了候選分子 LA42F8、LA46E11 抗體能夠完全阻斷 VEGF A 與 VEGFR2 結合。

【0164】 實施例 5 抗 Ang2 VHH 抗體 ELISA 阻斷實驗

本實施例驗證了本發明抗體抗 Ang2 VHH 對於 hAng2-biotin（R&D 貨號：BT623B/CF）與 Tie2 蛋白結合的阻斷作用

【0165】 將 Tie2-Fc（北京義翹 貨號：10700-H03H）稀釋成 2ug/ml，100ul/孔鋪於酶標版中 4℃ 過夜。PBST 洗 3 遍，加入 3% BSA 封閉 1.5h。PBST 洗 3 遍，提前將實施例 2 中製備的純化的 LA24C11.10 與陰性對照 IgG 各 50ul 與 hAng2-biotin（終濃度 0.2ug/ml）培育 20min 後加入板中。PBST 洗 3 遍，加入 Avidin HRP(1:2000)培育 35min。PBST 洗 6 遍，TMB 顯色 5min，終止後 OD450nm 讀數。

【0166】 本發明獲得的抗 Ang2 VHH 抗體 阻斷結果如表 3，候選分子 LA24C11 對 Ang2 於受體 Tie2 結合有阻斷作用。

表 3. 純化抗體單點 blocking ELISA

		Ang2-Bio(Sino)		Ang2-Bio(R&D 貨號:BT623B/CF)		Ang2-Bio (R&D 貨號: BT623B/CF)	
純株號	抗體 ¹ 起始濃度(mg/ml)	1:10 稀釋 抗體 ¹ (OD450nm)	1:100 稀釋 抗體 ¹ (OD450nm)	1:10 稀釋抗體 ¹ (OD450nm)	1:100 稀釋 抗體 ¹ (OD450nm)	上清 ² (OD450nm)	Blank(無抗體) (OD450nm)
24C11	0.556	0.09	0.20	0.07	0.07	0.12	3.45

¹ 抗體是指實施例 2 製備的純化原核上清，起始濃度為 0.556mg/ml，後續經 1:10 或 1:100 稀釋；

² 上清是指未經純化的原核上清。

【0167】與實施例 4 類似的（應用 Ang2-Bio（R&D 貨號：BT623B/CF）），藉由 ELISA 阻斷實驗檢測了 LA24C11.10 阻斷 Ang2 與 Tie2 的結合的作用，結果如圖 3 所示。可見，LA24C11.10 對 Ang2 於受體 Tie2 結合有阻斷作用。

【0168】實施例 6 抗 Ang2 VHH 抗體的磷酸化實驗

本實施例驗證了本發明的抗體抗 Ang2 VHH 抗體對於 hAng2-Fc 誘導的 Tie2 磷酸化抑制作用。

【0169】hAng2 誘導的磷酸化實驗

本研究將抗體和重組 hAng2-Fc 蛋白共同培育過表達 Tie2 的 Expi293 細胞 293-Tie2，藉由檢測體系中磷酸化 Tie2 的含量，從而反應出不同抗體對 hAng2-fc 誘導的 Tie2 磷酸化抑制作用。

【0170】藉由向 Expi-293 細胞(Thermo)轉染攜帶選殖至多選殖位點 MCS 的人 Tie2 基因（北京義翹 貨號：HG10700-M）的 pCHO1.0 載體（Invitrogen），產生過表達人 Tie2 的 Expi-293 細胞 293-Tie2 細胞。

【0171】取過表達人 Tie2 的 293-Tie2 細胞，稀釋至 2×10^6 細胞/ml，每孔 100ul 加入 96 孔板，400g 離心 5min，去上清。

【0172】使用 Expi293 培養基(Thermo 貨號 A1435102)配置實驗培養基：其中加入測試抗體(實施例 2 中製備的 LA24C11(24C11)和 LA24C11.0 (hz24C11.10)，以及陰性對照 IgG，和陽性對照 Nesvacumab(依據 CN202010573625.2 製備))，起始濃度為 60ug/ml，依次 1:2 等比稀釋；hAng2-Fc（北京義翹：10691-H02H）終濃度為 2.5ug/ml。

【0173】用每孔 100ul 實驗培養基重新懸浮細胞，37℃ 培育 15min，

【0174】離心去除培養基，加入 100ul 含 1%蛋白酶 (Thermo 貨號：78442) 及磷酸酶抑制劑(Thermo 貨號：78442)的 NP-40 裂解液(碧雲天，貨號：P0013F)，冰上放置 30min，2000g 離心，收集蛋白上清，放於-80 度冰箱存儲。

【0175】按照磷酸化 Tie2 ELISA 試劑盒 (R&D 貨號：DYC2720E) 的說明檢測 pTie2 濃度，將試劑盒中的捕獲抗體以 4ug/ml 濃度包被至酶標板上 4℃ 過夜。PBST 洗滌三次，5%BSA 封閉 1h。加入凍融的上一步獲得的蛋白上清 100ul，及對照 pTie2 (R&D 貨號：DYC2720E) 用於製作標準曲線室溫培育 2h (若樣品 pTie2 濃度過高，超過 ELISA 檢測範圍的時候，可對獲得的混合物進行 2~3 倍稀釋)。PBST 洗滌三次，加入 100ul 綴合有 HRP 的抗 pTyr 抗體 (R&D 貨號：DYC2720E)，室溫培育 2h。PBST 洗滌 6 次，加入 100ulTMB (Solarbio 貨號：PR1200) 顯色，15min 後加入 100ul 終止緩衝液 (Solarbio 貨號：C1058) 終止反應。應用多功能酶標儀 SpectraMax i3 測定 OD450-OD620。實驗結果參見圖 4A (24C11 為實施例 2 中製備的 LA24C11 原核表達純化上清) 和圖 4B。

【0176】因此，本發明的抗 Ang2 VHH 抗體 LA24C11 和 LA24C11.10 均可以在體外有效抑制 hAng2-Fc 誘導的 293-Tie2 細胞磷酸化。

【0177】實施例 7 抗 VEGF A VHH 抗體 KDR reporter 阻斷實驗

VEGF A 可以與相關受體 VEGFR2 (KDR) 結合，激活 VEGFR2 信號通路，誘導血管內皮細胞存活，增殖和遷移等作用，本研究利用 KDR reporter 實驗體系，使用 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 細胞 (Promega Cat CS181401)，檢測梯度稀釋的抗體對 VEGFA 激活相關受體信號通路的阻斷作用。

【0178】實驗方法參考供應商 (Promega) 說明：

將提前 3 天換成實驗培養基（含 10%FBS 的 DMEM 培養基）的 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 細胞取出，吸除舊培養基，用 PBS 洗滌一次，之後用 1 ml Accutase solution（Sigma 貨號：A6964-500ML）消化細胞，直至細胞變圓脫壁，用 5 ml 稀釋培養基終止反應，吸取細胞至離心管中，1000 rpm 離心 5 min，棄去培養基，加入 10 ml 稀釋培養基（含 10%FBS 的 DMEM 培養基）重新懸浮細胞，混勻後計數，細胞活率應在 90%以上。用稀釋培養基調整細胞密度至 0.8×10^6 個/ml，50 μ l/孔按照實驗佈局加入 96 孔白色細胞培養板中，

配置濃度為 100ng/ml VEGF A 和梯度稀釋的待測抗體混合液，靜置 30min，50 μ l/孔含有細胞的 96 孔白色細胞培養板中，放入 37°C、5%二氧化碳培養箱中培育 6h。其中，待測樣品如下：陰性對照 IgG；陽性對照 BI-anti-VEGF；LA42F8；LA46E11；LA42F8.5；LA46E11.8；Blank：僅含稀釋培養基，無 VEGF A，無抗體；VEGF A 100ng/ml：僅含 100ng/ml VEGF A。

【0179】從二氧化碳培養箱中取出已培育 6h 的 96 孔白色細胞培養板，平衡 10~15 min 至室溫。將提前拿出平衡至室溫的 Bio-Glo Luciferase Assay System 按照實驗佈局 100 μ l/孔加入 96 孔白色細胞培養板中，室溫避光培育 5 min。

【0180】使用多功能酶標儀進行螢光讀值，讀板模式選擇化學發光模式、讀板類型選擇終點法、波長設定為全波長，逐列收集螢光，每列收集時間為 1000 ms。

【0181】在以上測定法該實驗中，檢測結果如圖 5 顯示，抗 VEGF VHH 抗體 LA42F8、LA42F8.5、LA46E11、LA46E11.8 均可阻斷 VEGF A 誘導的 KDR 信號通路激活。

【0182】 實施例 8 抗 VEGF A VHH 抑制 VEGF A 誘導的 HUVEC 存活增殖實驗

VEGF A 可作用於血管內皮細胞中 VEGFR 等相關的受體，促進血管內皮細胞存活，增殖和遷移，進而誘導新生血管化，本實驗基於 VEGF 誘導人臍靜脈內皮細胞（HUVEC）存活和增殖，檢測抗體對 VEGF A 誘導的原代細胞存活和增殖的抑制作用。

【0183】 本實施例藉由 CCK-8 測定 HUVEC 的存活和增殖，具體方法如下：提前一天處理細胞 HUVEC（Allcells 貨號：H-001-CN），2000 細胞/孔鋪於 96 孔培養板中，放入 37°C、5%二氧化碳培養箱中培育 24 小時，

待細胞貼壁後，配置含終濃度為 10ng/ml VEGF A 和梯度稀釋的抗體（實施例 2 中製備的 LA42F8，起始濃度 80ug/ml 1:3 等比稀釋，陰性對照 IgG，陽性對照 BI836880，僅含 10ng/ml VEGF A 的組(VEGFA)，以及無 VEGF A 和抗體添加的 Blank）實驗培養基，置換 96 孔板中內皮細胞培養基，放入 37°C、5%二氧化碳培養箱中培育 72 小時，

10μl/孔加入 CCK-8 檢測液（同仁化學貨號：CK04），放入 37°C、5%二氧化碳培養箱中培育 12~24 小時，

使用多功能酶標儀進行吸光度 OD₄₅₀-OD₆₂₀ 讀值，

在以上測定法所述的實驗中，檢測結果如圖 6 所示，從圖中可以看出，抗 VEGFA 抗體 LA42F8 能夠完全抑制 VEGFA 誘導的 HUVEC 細胞存活和增殖。

【0184】 實施例 9 抗 VEGF A/Ang2 雙特異性抗體 HEK293-KDR reporter 阻斷實驗

將本發明的雙特異性結合分子的鏈 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012(序列如序列表所示)的鏈構建到 pcDNA3.1 載體，如實施例 2 該在 293 細胞中表達和純化該雙特異性結合分子。

【0185】 本實施例藉由 HEK293-KDR reporter 實驗檢測了抗 VEGF A/Ang2 雙特異性抗體對 VEGF A 的阻斷作用。實驗方法參照實施例 7。

【0186】 應用的結合分子或對照如下：

Blank：無 VEGF A，無抗體；

VEGF A：100ng/ml VEGF A；

陰性對照 IgG：如上所述製備；

陽性對照 Faricimab：如上所述製備，起始濃度為 13.5ug/ml，1:3 梯度稀釋；

陽性對照 BI-836880：如上所述該製備，起始濃度為 13.5ug/ml，1:3 梯度稀釋；

IEX04-012：如上所述製備，起始濃度為 13.5ug/ml，1:3 梯度稀釋。

【0187】 檢測結果如圖 7 所示，雙特異性結合分子 IEX04-012 抑制 VEGF 誘導 KDR 信號通路激活，與對照抗體 BI836880 相比，具有更優的抑制能力。

【0188】 **實施例 10 抗 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子 HUVEC 增殖抑制實驗**

本研究藉由 HEK293-KDR reporter 實驗檢測了抗 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子對 VEGF A 誘導的 HUVEC 細胞存活和增殖的抑制作用。

【0189】 實驗方法如實施例 8，但是應用的抗體如下：

圖 A: 起始濃度為 20ug/ml，1:3 等比稀釋的如上所述製備的 IEX04-008、陰性對照 IgG，陽性對照 Faricimab 和 BI836880，空白為 Blank（即無抗體和 VEGF A），以及 VEGF A 組（即僅添加 20ng/ml VEGFA）；

圖 B：起始濃度為 80ug/ml，1:3 等比稀釋的如上所述製備的陰性對照 IgG、BI-anti-VEGF、IEX04-010、空白為 Blank（即無抗體和 VEGF A），以及 VEGF A 組（即僅添加 20ng/ml VEGFA）；

圖 C: 起始濃度為 20nM，1:3 等比稀釋的如上所述製備的 IEX04-012、陰性對照 IgG，陽性對照 Faricimab 和 BI836880，空白為 Blank（即無抗體和 VEGF A），以及 VEGF A 組（即僅添加 20ng/ml VEGFA）。

【0190】 檢測結果如圖 8 所示在，雙特異性結合分子 IEX04-008，IEX04-010，IEX04-012 均抑制了 VEGF 誘導的 HUVEC 細胞存活和增殖，與對照抗體 BI836880 和 Faricimab 相比，IEX04-012 的 IC₅₀ 更低，具有更優的抑制能力。

【0191】 實施例 11 抗 VEGF A/Ang2 雙特異性抗體 Ang2 阻斷實驗

Ang2 可與其天然受體 Tie2 結合，本研究藉由 ELISA 法和 FACS 法檢測了抗 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子對 Ang2 與 Tie2 之間結合的阻斷。

【0192】 （1）ELISA

藉由 ELISA 檢測了 IEX04-008，IEX04-010 和 IEX04-012 以及對照抗體 BI-836880 和 Faricimab 阻斷人 Ang2 與 hTie2 結合的能力。

【0193】 將 hTie2 蛋白（北京義翹）使用 PBS 重新懸浮並溶解至 2ug/ml 濃度，包被至酶標板過夜。使用 5%BSA 封閉 1h，將生物素抗原 Recombinant Biotinylated hAngiopoietin-2 蛋白（R&D）稀釋至 600ug/mlM，50 μl/孔。將如上所述製備的抗體（IEX04-008，IEX04-010、IEX04-012 以及陽性對照抗體 BI836880

和 Faricimab 和陰性對照 IgG) 從最高濃度 300nM 1 : 2 等比稀釋，共 8 個或 12 稀釋梯度，50 μ l/孔，於 PBS 冰上培育 30 min，生物素抗原終濃度 300ng/ml。將如上所述獲得的抗原抗體混合液培育至酶標板 90min，PBS 洗三次，棄上清，加 1:10000 稀釋的 100 μ l Avidin-HRP (Invitrogen) /孔，常溫 30 min，加 PBS 洗六次。使用 100ul/孔 TMB 顯色液 (solarbio) 顯色 1 min，並用終止液 (Solarbio) 100ul/孔終止。

【0194】 應用酶標儀對每孔讀數 OD₄₅₀，OD₆₂₀。

【0195】 實驗結果表明 (參見圖 9)，IEX04-008，IEX04-010，IEX04-012 以及對照抗體 BI836880 都具有完全阻斷效果，且本發明的雙特異性結合分子的 IC₅₀ 均顯著小於陽性對照抗體。

【0196】 (2) 流式細胞檢測 (FACS)

藉由 FACS 檢測了 IEX04-008，IEX04-010，IEX04-012 以及陽性對照抗體 BI-836880 和 Faricimab 和陰性對照 IgG 阻斷人 Ang2-hFc 與細胞表面的 Tie2 結合的能力。

【0197】 將抗原 hAng2-Fc 蛋白 (北京義翹，貨號：10691-H02H) 稀釋至 4ug/ml，50 μ l/孔。將如上所述製備的抗體 (IEX04-008，IEX04-010、IEX04-012 以及陽性對照抗體 BI-836880 和 Faricimab 和陰性對照 IgG) 從最高濃度 800nM 開始進行 2 倍梯度稀釋，共 12 個稀釋梯度，50 μ l/孔，於 PBS 冰上培育 30 min，抗原 hAng2-Fc 蛋白終濃度 2ug/ml，每個抗體最高終濃度 400nM。將如上所述製得的 293-Tie2 細胞調節至 2 $\times$ 10⁵細胞/孔，100 μ l/孔。細胞於 300 g 離心 5 min，棄上清，重新懸浮於抗原抗體混合液。冰上培育 30 min，加 PBS 100 μ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次，加 1:200 稀釋的 100 μ l Goat anti-human IgG-PE 99572

(SouthernBiotech) /孔，冰浴 20 min，加 PBS 100 μ l/孔，300 g 離心 5 min，PBS 清洗 1 次。用 100 μ l PBS 重新懸浮，細胞流式儀 (BD Biosciences) 檢測細胞螢光信號值。根據其 MFI，用 GraphPad 擬合濃度依賴的曲線。結果如圖 10 所示。圖中顯示，雙特異性結合分子 IEX04-008、IEX04-010 和 IEX04-012 都能有效阻斷人 Ang2-hFc 與 Tie2 的結合，且 IC₅₀ 低於陽性對照。

【0198】 實施例 12 抗 VEGFA/Ang2 雙特異性結合分子的 Ang2 磷酸化抑制實驗

本實施例驗證了本發明雙特異性結合分子對於 hAng2-Fc 誘導的 Tie2 磷酸化的抑制作用，其應用了 hAng2 誘導的磷酸化實驗。

【0199】 本研究將雙特異性結合分子和重組 hAng2-Fc 蛋白共同培育過表達 Tie2 的 Expi293 細胞，293-Tie2，藉由檢測體系中磷酸化 Tie2 的含量，從而反應出不同抗體對 hAng2-Fc 誘導的 Tie2 磷酸化抑制作用。

【0200】 取如上製備的過表達 293-Tie2 細胞，稀釋至 2×10^6 cell/ml，每孔 100ul 加入 96 孔板，400g 離心 5min，去上清。

【0201】 使用 Expi293 培養基 (Thermo 貨號 A1435102) 配置實驗培養基，其中分別加入了測試抗體 (如上製備的 IEX04-012、陽性對照 BI-836880 和 Faricimab、陰性對照 IgG) 最高終濃度為 60ug/ml，依次 1:2 等比稀釋，hAng2-Fc (北京義翹 貨號：10691-H02H) 終濃度為 2.5ug/ml。

【0202】 用每孔 100ul 實驗培養基重新懸浮細胞，37 度培育 15min，離心去除培養基，加入 100ul 含 1%蛋白酶及磷酸酶抑制劑的 NP-40 裂解液，冰上放置 30min。2000g 離心，收集蛋白上清，放於-80 度冰箱存儲，

【0203】按照磷酸化 Tie2 ELISA 試劑盒(R&D DYC2720E)說明檢測 pTie2 濃度，將捕獲抗體以 4ug/ml 濃度包被至酶標板上 4 度過夜。PBST 洗滌三次，5%BSA 封閉 1h。加入待測樣品 100ul，及對照 pTie2 (R&D DYC2720E)用於製作標準曲線室溫培育 2h (若樣品 pTie2 濃度過高，超過 ELISA 檢測範圍的時候，可對獲得的混合物進行 2~3 倍稀釋)。PBST 洗滌三次，加入 100ul 綴合有 HRP 的抗 pTyr 抗體 (R&D 貨號：DYC2720E)，室溫培育 2h。PBST 洗滌 6 次，加入 100ul TMB 顯色，15min 後加入 100ul 終止緩衝液終止反應。應用分光光度計測定每孔的 OD450-OD620。

【0204】實驗結果如圖 11 所示。本發明的抗體 IEX04-012 可以在體外有效抑制 hAng2-Fc 誘導的 293-Tie2 磷酸化，且 IC₅₀ 優於陽性對照。

【0205】實施例 13 抗 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子對 Ang2 血管內皮細胞滲漏的抑制實驗

本研究藉由 HUVEC-Tie2 滲漏實驗鑑定抗 VEGF A/Ang2 雙特異性結合分子對血管內皮細胞滲漏的作用和功能。

【0206】使用慢病毒轉染 HUVEC 細胞 (Allcells 貨號：H-001-CN) 獲得過表達 Tie2 的 HUVEC-Tie2 細胞。

【0207】使用 mini-well 96 孔插入式培養皿下層鋪 EGM-2 培養基 300ul，用 Accutase (Sigma) 消化並獲得 HUVEC-Tie2，使用 EGM-2 培養基重新懸浮至 1×10^7 細胞/ml，100ul/孔鋪於培養皿上層。每隔 24h 置換下室培養基 (EGM-2 培養基)，24 小時後更換下室培養基為實驗培養基，該實驗培養基組成如下：

Blank：EGM-2 培養基 (Lonza 貨號：CC-5035)，

VEGF A 組：EGM-2 培養基+20ng/ml VEGF (R&D 貨號：293-VE)

IgG 組 (VEGF A+IgG) : EGM-2 培養基+20ng/ml VEGF +10ug/ml IgG ;

Ang1 組 (VEGF A+Ang1) : EGM-2 培養基+20ng/ml VEGF (R&D 貨號 : 293-VE) +200ng/ml Ang1 (R&D 貨號 : 923-AN) ;

IEX04-012 組 (VEGF A+ IEX04-012) : EGM-2 培養基+20ng/ml VEGF +10ug/ml IEX04-012 ;

BI-836880組(VEGF A+ BI-836880):EGM-2培養基+20ng/ml VEGF +10ug/ml BI-836880 ;

Faricimab 組(VEGF A+ Faricimab) : EGM-2 培養基+20ng/ml VEGF +10ug/ml Faricimab 。

【0208】 將上述實驗培養基放置於 37°C、5% CO₂培養。

【0209】 24 小時後上室實驗培養基每孔加入 1ul FITC-Dextran (Sigma 貨號 : FD2000S-1G) (4mg/ml), 放置於 37°C、5% CO₂.30min 後取下室培養基, 使用 PBS 稀釋 1:10 稀釋後於多功能酶標儀檢測, 激發光波長 488nm, 發射光波長 535nm。

【0210】 實驗結果如圖 12, 其顯示本發明抗體 IEX04-012 能夠有效降低 VEGF 誘導的血管內皮細胞通透性。

【0211】 實施例 14. 雷射誘導的脈絡膜新生血管化藥效試驗

本實驗採用恆河猴雷射誘導的脈絡膜新生血管化模型測定本發明的雙特异性結合分子 IEX04-012 的抗新生血管化作用。

【0212】 恆河猴 :

種屬：恆河猴；等級：普通級；體重：購入時體重 3.30~4.20 kg；造模時體重 3.35~4.35 kg；來源：四川橫豎生物科技股份有限公司，生產許可證號：SCXK(川)2019-029，實驗動物質量合格證編號：No.0023356；

【0213】本試驗採用雷射圍繞恆河猴眼底黃斑中心凹光凝，誘導眼底脈絡膜血管新生，建立與人類脈絡膜新生血管類似的動物模型。光凝前及光凝後 20 天進行螢光素眼底血管造影判定造模情況，選擇造模成功的 20 隻恆河猴（雌雄各半）分 5 組，分別為模型對照組、IEX04-012 低劑量組、IEX04-012 高劑量組、Eylea 組、Faricimab 組 5 組，每組 4 隻猴，雌雄各半。

【0214】光凝後第 21 天，對各組猴分別按表中劑量進行給藥，雙眼玻璃體注射給予 IEX04-012、Eylea (Bayer) 或 Faricimab (均溶於 0.9%氯化鈉注射液)，模型對照組給與等體積的 0.9%氯化鈉注射液。各組動物分別於給藥後 7、14、21、28 天進行眼底彩色照相、螢光素眼底血管造影（滲漏斑統計和滲漏面積測量）（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），光學相干斷層掃描檢查（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），觀察供試品對脈絡膜新生血管的抑制情況。於給藥後 29 天實施安樂死後取雙眼進行免疫組織化學（HE）染色的組織學檢查。

【0215】實驗設計表

組別	劑量	給藥體積	濃度	給藥方式
對照	/	/	X mg/ml	
IEX04-012 低劑量	10ug/眼	50ul/眼	0.2mg/ml	玻璃體腔給藥
IEX04-012 高劑量	30ug/眼	50ul/眼	0.6mg/ml	玻璃體腔給藥
Eylea	10ug/眼	50ul/眼	0.2mg/ml	玻璃體腔給藥
Faricimab	30ug/眼	50ul/眼	0.6mg/ml	玻璃體腔給藥

【0216】 結果如圖 13-15 顯示，本發明雙特異性結合分子在給藥 28 天後即顯示出顯著的抗新生血管化作用，四級滲漏光斑（圖 13A）和三至四級滲漏光斑（圖 13B）數量統計顯示，IEX04-012 組治療動物，高滲漏光斑數量顯著少於對照和陽性對照給藥組。OCT 結果顯示，IEX04-012 治療組動物中，視網膜厚度顯著降低，提示視網膜水腫程度減輕，且效果優於對照（圖 14）。螢光素眼底血管照影結果顯示，IEX04-012 治療組眼底滲漏面積顯著降低，且效果優於陽性對照 Eylea 和 Faricimab（圖 15），說明本發明抗體能顯著抑制新生血管引起的滲漏。綜上所述，證明本發明抗體本發明抗體聯合抗 VEGF 抑制劑對雷射誘導的眼底新生血管化有明顯的抑制效果，同時具有保護血管完整性功能。

【0217】 恆河猴給藥 29 天後根據體重以戊巴比妥鈉麻醉（靜脈注射約 30 mg/kg，可根據動物健康狀況調整劑量），腹主動脈或股動脈放血安樂死，進行大體觀察，並摘取雙側眼球。

【0218】 部分動物雙眼以改良的 Davidson’s 固定液固定，石蠟包埋切片，並選取雷射造模區域進行常規 HE 染色，CD31 IHC 染色等組織病理學檢查。

【0219】 本發明抗體組在病理切片中，相對抗 VEGF 單獨治療，視網膜病變區域顯著減少，視網膜水腫減輕，雷射損傷區域組織增生減少，結果顯示了更好的視網膜形態學改善（參見圖 16），抑制了視網膜脈絡膜新生血管化，增強了血管完整性功能（圖 17）。

【0220】 序列表

SEQ ID NO	抗體名稱	LA42F8 (VEGFA VHH)
1	HCDR1	GFNLDYYPIG
2	HCDR2	CISSVGSTNYADSVKG
3	HCDR3	DPLCSALILPPPFLS
4	VH	QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDYYPIGWFRQAPG KEREGVSCISSVGSTNYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMNSL KPEDTAVYYCAADPLCSALILPPPFLSWGQGTQVTVSS
	抗體名稱	LA42F8.5
1	HCDR1	GFNLDYYPIG
2	HCDR2	CISSVGSTNYADSVKG
3	HCDR3	DPLCSALILPPPFLS
5	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFNLDYYPIGWFRQAPG KGLEGVSCISSVGSTNYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSL RAEDTAVYYCAADPLCSALILPPPFLSWGQGTQVTVSS
	抗體名稱	LA46E11 (VEGFA VHH)
6	HCDR1	GSIFSINAMG
7	HCDR2	TMIGGSSTFYADSVNG
8	HCDR3	DVTGRSGTSIWNKRDDY
9	VH	QVQLEES GGGLVQPGGSLRLSCVASGSIFSINAMGWHRQAPGS QRELVATMIGGSSTFYADSVNGRFTISRDNKNTVY LQMNSLK LEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGT LTVTVSS
	抗體名稱	LA46E11.8 (VEGFA VHH)
6	HCDR1	GSIFSINAMG
10	HCDR2	TMIGGSSTFYAESVQG
8	HCDR3	DVTGRSGTSIWNKRDDY
11	VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWHRQAPG KQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRDN SKNTVY LQMNSL RAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGTQVTVSS
	抗體名稱	LA24C11 (Ang2 VHH)
16	HCDR1	GFALDYYAIG
17	HCDR2	CISSGDGSTYYADSVKG
18	HCDR3	DSRGDDVACEGLRRNEYDY
19	VH	QVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPG KEREGVSCISSGDGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTVY LQMN SLKPEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTQVT VSS
	抗體名稱	LA24C11.10 (Ang2 VHH)
16	HCDR1	GFALDYYAIG

20	HCDR2	CISSGEGSTYYADSVKG
18	HCDR3	DSRGDDVACEGLRRNEYDY
21	VH	<i>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYAIGWFRQAPGKGL EGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDT AVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGLTVTVSS</i>
	抗體名稱	IEX04-008 LA46E11.8(VHH)(下劃線)+接頭(粗體)+LA46E11.8(VHH)(下劃線)+LA24C11.10(斜體)
22	全長	<u>EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINAMGWHRQAPG</u> <u>KQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRDN SKNTVYLQMNSL</u> <u>RAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWGQGTQVTVSSG</u> <u>GGGSGGGGSEVQLLES</u> <u>GGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFSINA</u> <u>MGWHRQAPGKQRELVATMIGGSSTFYAESVQGRFTISRDN SK</u> <u>NTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYADVTGRSGTSIWNKRDDYWG</u> <u>QGTQVTVSSGGGSGGGGSEVQLLES</u> <u>GGGLVQPGGSLRLSCA</u> <u>ASGFALDYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFT</u> <u>ISRDN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNE</u> <u>YDYWGQGLTVTVSS</u>
	抗體名稱	IEX04-010 VEGFR 胞外結構域+Fc+接頭(下劃線)+LA24C11.10(斜體)
24	全長	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKT NYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGI DFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKD KTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL TNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLS PGGGGGSGGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASG FALDYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISR DN SKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDY WGQGLTVTVSS*
	名稱	Aflibercept (VEGFR 胞外結構域(下劃線)+Fc(斜體+粗體)，其中 FLT1 domain 2 為下劃線，KDR domain 3 為下劃線+粗體)
25	全長	<u>SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP</u> <u>LDTLIPDGKRIIWDSRKGFISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKT</u> <u>NYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELNV</u> <u>GIDFNWEYPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLT</u> <u>DGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKD KTHTCP</u> <u>PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHED</u> <u>PEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ</u> <u>DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS</u> <u>RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV</u> <u>LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQ</u> <u>KLSLSLSPG</u>

26	VEGFR胞外結構域	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKT NYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTELVNVI DFNWEYPSSKHQHKKLNVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVT RSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEK
27	Fc	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
\	抗體名稱	IEX04-012 含二硫鍵突變的 Ranibizumab scFv+接頭(粗體)+LA24C11.10(斜體)
28	全長	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGCGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPG KCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTSLTVTVSS GG GGSGGGGSGGGGSEVQLLES <i>GGGLVQPGGSLRLSCAASGFALD</i> <i>YYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDN</i> <i>SKNTVYLQMN</i> <i>SLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ</i> <i>GTLVTVSS*</i>
		含二硫鍵突變的 Ranibizumab scFv
29	scFv	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGCGTKVEIK GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPG KCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMN SLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTSLTVTVSS
30	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTTTCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGCGTKVEIK
31	LCDR1	QDISNYLN
32	LCDR2	FTSSLHS
33	LCDR3	QQYSTVPWT
34	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAP GKCLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTSLTVTVSS
35	HCDR1	GYDFTHY
36	HCDR2	NTYTGE
37	HCDR3	YPYYYGTSHWYFDV
23	接頭	(GGGS) _n ，其中 n=1、2、3 或 4
		陽性對照抗體 BI836880 (VEGFA 端)
12	VH	DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPG KEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYLQINSL RPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTSLTVTVSS
		陽性對照抗體 Faricimab

13	HC 1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAP GKGLEWVGWINTYTGEPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQM NSLRAEDTAVYYCAKYPYYGTSHWYFDVWGQGTLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
40	LC1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDY SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
14	HC 2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYMHWRQA PGQGLEWMGWINPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYM ELSRRLSDDTAVYYCARSPNPYYDSSGYYPGAFDIWGQGT MVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEA AGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNG KEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDEL TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDS GDSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSL SLSPGK
41	LC 2	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP VLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSSSDHWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
		陽性對照抗體 BI836880 (VEGFA/HSA/Ang2)
15	VH	<u>DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRFTSSYSMGWFRQAPG</u> <u>KEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNANKNTVYLQINSL</u> <u>RPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGTLVTVSSGG</u> GGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTSSFGMS WVRQAPGRGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTT LYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTLVTVSS GGGGSG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGITLDDYAIGWFRQA PGKEREGVSAIRSSGGSTYYADSVKGRFTISSDNSKNTVYLQM NSLRPEDTAVYYCAAVPAGRLRYGEQWYPIYEYDAWGQGTLV TVSS
		陰性對照 IgG

38	重鏈	EVRLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMGWVRQAPG KGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTTSRDDSKNALYLQMN SLRAEDTAVYYCARGGPGWYAADVWGQGTTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK VDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVHLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
42	輕鏈	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKA PKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQADLPFAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
		陽性對照抗體 BI-anti-VEGF
39		DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSSYSMGWFRQAPG KEREFVVAISKGGYKYDAVSLEGRFTISRDNKNTVYQLQINSL RPEDTAVYYCASSRAYGSSRLRLADTYEYWGQGLTVTVSS

【符號說明】 無

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種抗 Ang2 的 VHH 抗體，其包含如下的 3 個 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:16 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:17 或 20 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:18 所示的序列，或由該序列組成。

【請求項2】 如請求項 1 所述的 VHH 抗體，其中該 VHH

(1) 包含 SEQ ID NO:19 或 21 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:19 或 21 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 19 或 21 所述的胺基酸組成；或

(2) 包含與 SEQ ID NO:19 或 21 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項3】 一種結合 VEGF A 和 Ang2 的雙特異性結合分子，其包含特異性結合 VEGF A 的第一靶標結合區和特異性結合 Ang2 的第二靶標結合區，其中第二靶標結合區為如請求項 1 或 2 該 VHH 抗體，

視需要地，其中第一靶標結合區選自：

特異性結合 VEGF A 的 VHH；

特異性結合 VEGF A 的抗體的抗原結合片段，例如 scFv，例如該抗體為全人抗體或人源化抗體；或

特異性結合 VEGF A 的 VEGF 受體 (VEGFR) 或其胞外結構域或包含其胞外結構域的融合蛋白，例如其胞外結構域與 Fc 的融合蛋白。

【請求項4】 如請求項 3 所述的雙特異性結合分子，其為雙特異性抗體。

【請求項5】 如請求項 3 或 4 所述的雙特異性結合分子，其為二價、三價或四價的。

【請求項6】 如請求項 4 或 5 所述的雙特異性結合分子，其具有以下結構：

抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL-接頭-抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH-接頭-抗 Ang2 VHH 或

抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH-接頭-抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL-接頭-抗 Ang2 VHH。

【請求項7】 如請求項 6 所述的雙特異性結合分子，其中，

抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL 包含 LCDR1，LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO:31 所示的序列或由其組成；LCDR2 包含 SEQ ID NO:32 所示的序列或由其組成；LCDR3 包含 SEQ ID NO:33 所示的序列或由其組成；和/或

抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH 包含 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO:35 所示的序列或由其組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:36 所示的序列或由其組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:37 所示的序列或由其組成。

【請求項8】 如請求項 6 或 7 所述的雙特異性結合分子，其中

抗 VEGF 抗體的重鏈可變區 VH 包含 SEQ ID NO:34 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 34 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 34 該胺基酸組

成；或該重鏈可變區 VH 包含與 SEQ ID NO:34 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換；

抗 VEGF 抗體的輕鏈可變區 VL 包含 SEQ ID NO:30 該胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 30 該胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 30 該胺基酸組成；或該輕鏈可變區 VL 包含與 SEQ ID NO:30 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項9】 如請求項 6 至 8 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中

(1) 該結合分子包含 SEQ ID NO:28 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 28 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 28 所述的胺基酸組成；
或

(2) 該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO: 28 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項10】 如請求項 4 或 5 所述的雙特異性結合分子，其具有以下結構：

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

其中第一抗 VEGF VHH 與第二抗 VEGF VHH 相同或不同。

【請求項11】 如請求項 10 所述的雙特異性結合分子，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，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由該序列組成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由該序列組成；HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由該序列組成；HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由該序列組成。

【請求項12】 如請求項 10 或 11 所述的雙特異性結合分子，其中第一抗 VEGF VHH 或第二抗 VEGF VHH 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸組成；或該 VHH 包含與 SEQ ID NO: 4、5、9 或 11 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項13】 如請求項 10 至 12 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中

(1) 該結合分子包含 SEQ ID NO:22 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 22 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO: 22 所述的胺基酸組成；
或

(2) 該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO: 22 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項14】 如請求項 3 所述的雙特異性結合分子，其包含一條或兩條以下鏈：

VEGF R 胞外結構域-Fc-接頭-抗 Ang2 VHH。

【請求項15】 如請求項 14 所述的雙特異性結合分子，其中該 VEGFR 胞外結構域為來自人的 VEGFR 的胞外結構域；較佳地，該 VEGFR 胞外結構域包含 VEGFR1 第二抗體樣結構域和 VEGFR2 第三抗體樣結構域；更佳地，該 VEGFR 胞外結構域包含人 VEGFR1 第二抗體樣結構域和人 VEGFR2 第三抗體樣結構域。

【請求項16】 如請求項 14 或 15 所述的雙特異性結合分子，該 VEGFR 胞外結構域包含 SEQ ID NO:26 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 26 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% 同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:26 所述的胺基酸組成。

【請求項17】 如請求項 14 至 16 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中該 Fc 為來源人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 的 Fc，較佳地，該 Fc 包含 SEQ ID NO:27 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO: 27 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:27 所述的胺基酸組成。

【請求項18】 如請求項 14 至 17 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中該 VEGF R 胞外結構域-Fc 為 VEGFR 胞外結構域與 Fc 的融合蛋白，例如 Aflibercept

99572 第 5 頁，共 8 頁(發明申請專利範圍)

或其衍生物，例如包含 SEQ ID NO:25 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:25 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:25 所述的胺基酸組成。

【請求項19】 如請求項 14 至 18 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中

(1) 該結合分子包含 SEQ ID NO:24 的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:24 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:24 所述的胺基酸組成；
或

(2) 該雙特異性結合分子包含與 SEQ ID NO:24 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項20】 如請求項 3 至 19 中任一項所述的雙特異性結合分子，其中該接頭包含 SEQ ID NO:23 的胺基酸序列，或由其組成。

【請求項21】 一種抗 VEGF A 的 VHH 抗體，其包含如下的 3 個 CDR，HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中

HCDR1 包含 SEQ ID NO:1 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:2 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:3 所示的序列，或由該序列組成；

或者

HCDR1 包含 SEQ ID NO:6 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR2 包含 SEQ ID NO:7 或 10 所示的序列，或由該序列組成；

HCDR3 包含 SEQ ID NO:8 所示的序列，或由該序列組成。

【請求項22】 如請求項 21 所述的 VHH 抗體，其

(1) 包含 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列，或包含與該 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的胺基酸序列，或由 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所述的胺基酸組成；或

(2) 包含與 SEQ ID NO:4、5、9 或 11 所示的胺基酸序列相比具有一個或幾個（較佳不超過 10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 個）突變的胺基酸序列，該突變例如置換、缺失或添加，較佳地置換，例如保守置換。

【請求項23】 一種核酸分子，其編碼如請求項 1 或 2 或 21 或 22 中任一項所述的 VHH 抗體，或如請求項 3 至 20 中任一項所述的雙特異性結合分子或該結合分子的鏈。

【請求項24】 一種表達載體，其包含如請求項 23 所述的核酸分子，較佳地，該表達載體為 pcDNA3.1。

【請求項25】 一種宿主細胞，其包含如請求項 23 所述的核酸分子或如請求項 24 所述的表達載體，較佳地，該宿主細胞是原核的或真核的，例如細菌如大腸桿菌細胞，例如 TG1；或 293 細胞，例如 293F 或 Expi-293 細胞。

【請求項26】 一種製備如請求項 1 或 2 或 21 或 22 中任一項所述的 VHH 抗體，或如請求項 3 至 20 中任一項所述的雙特異性結合分子的方法，該方法包括，在適合該 VHH 抗體或或雙特異性結合分子或其鏈表達的條件下，培養如請求項 25 所述的宿主細胞，和視需要地從該宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收該 VHH 或雙特異性結合分子。

【請求項27】 一種免疫綴合物，其包含如請求項 1 或 2 或 21 或 22 中任一項所述的 VHH 抗體，或如請求項 3 至 20 中任一項所述的雙特異性結合分子

【請求項28】 一種醫藥組成物或製劑，其包含如請求項 1 或 2 或 21 或 22 中任一項所述的 VHH 抗體，或如請求項 3 至 20 中任一項所述的雙特異性結合分子，以及視需要地一種或多種其他治療劑，以及視需要地藥用輔料。

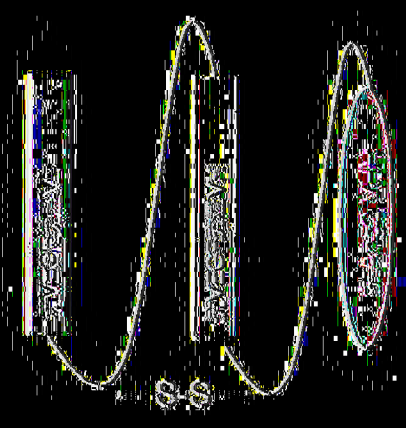
【請求項29】 一種在受試者中預防或治療眼部疾病的方法，包括向受試者施用有效量的如請求項 1 或 2 或 21 或 22 中任一項所述的 VHH 抗體，或如請求項 3 至 20 中任一項所述的雙特異性結合分子，如請求項 27 所述的免疫綴合物或如請求項 28 所述的醫藥組成物或製劑。

【請求項30】 如請求項 29 所述的方法，其中該眼部疾病選自與血管發生相關的眼部疾病，例如與角膜新生血管化相關的眼部疾病。

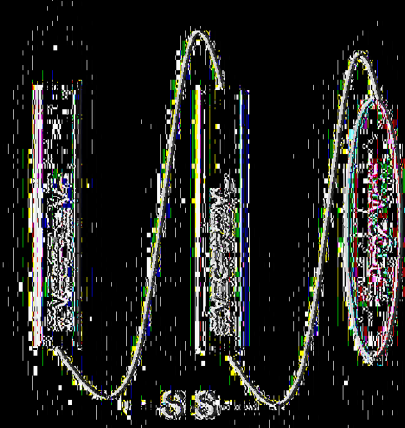
【請求項31】 如請求項 29 或 30 所述的方法，其中該患者具有（例如升高水平的，例如核酸或蛋白質水平的）VEGF，例如 VEGF A，和/或 Ang2。

【請求項32】 如請求項 29 至 31 中任一項所述的方法，其中該方法還包括向患者施用一種或多種療法，例如治療方式和/或其它治療劑。

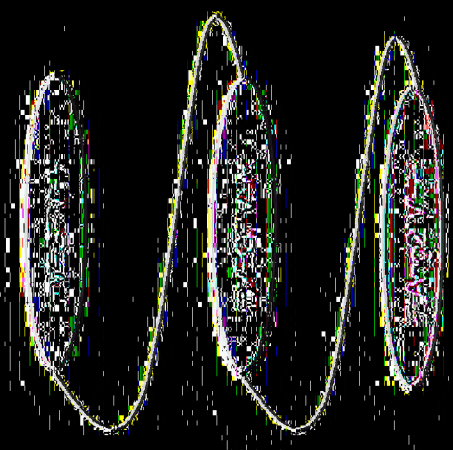
[發明圖式]



[圖1A]



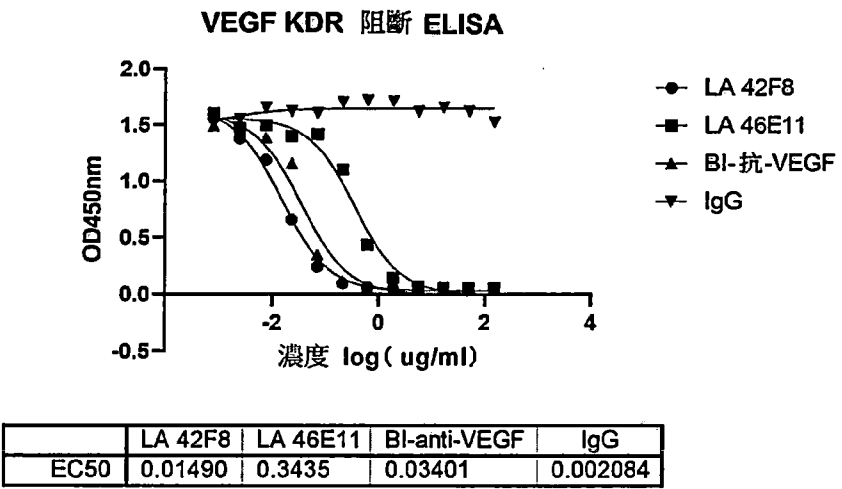
[圖1B]



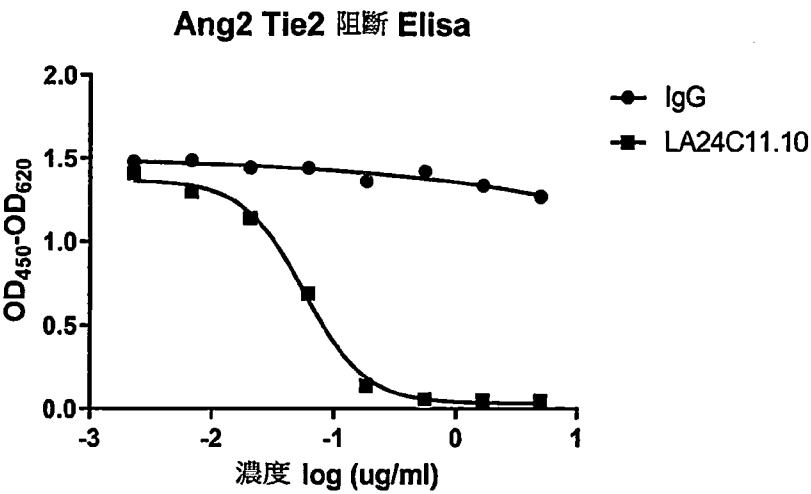
[圖1C]



[圖1D]

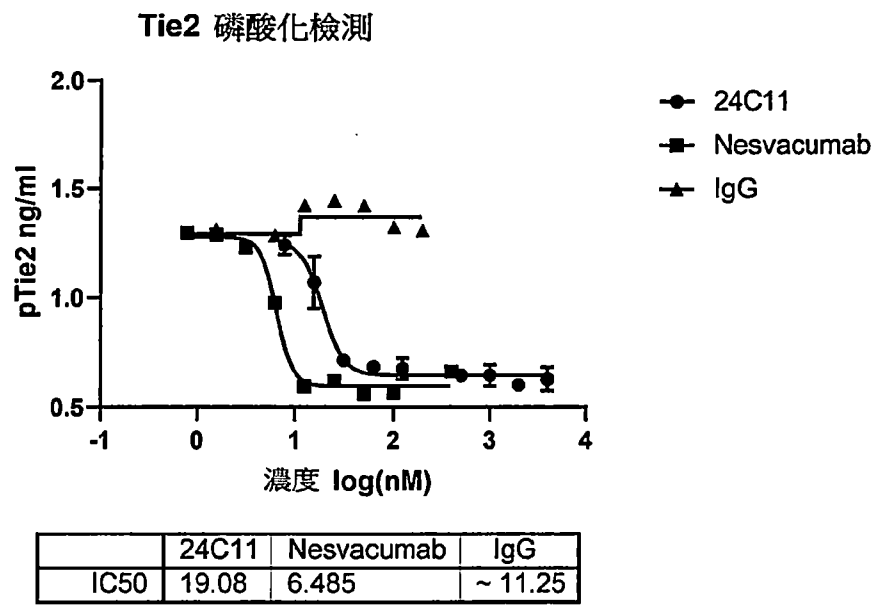


【圖2】

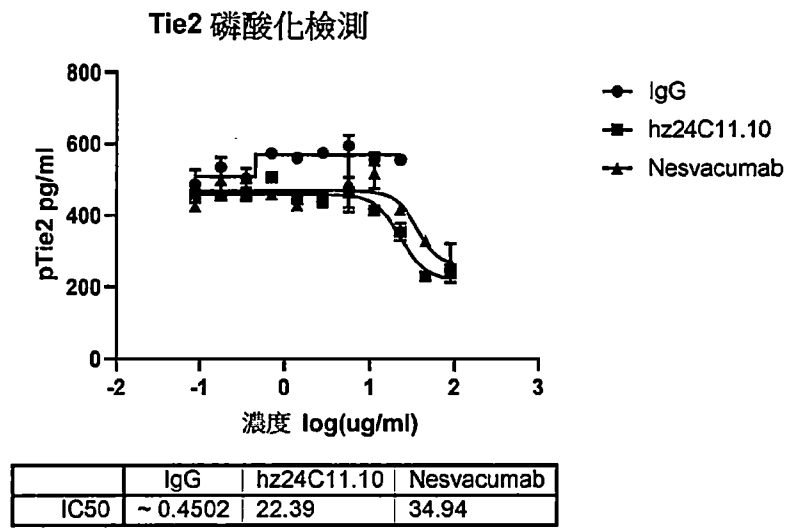


【圖3】

A

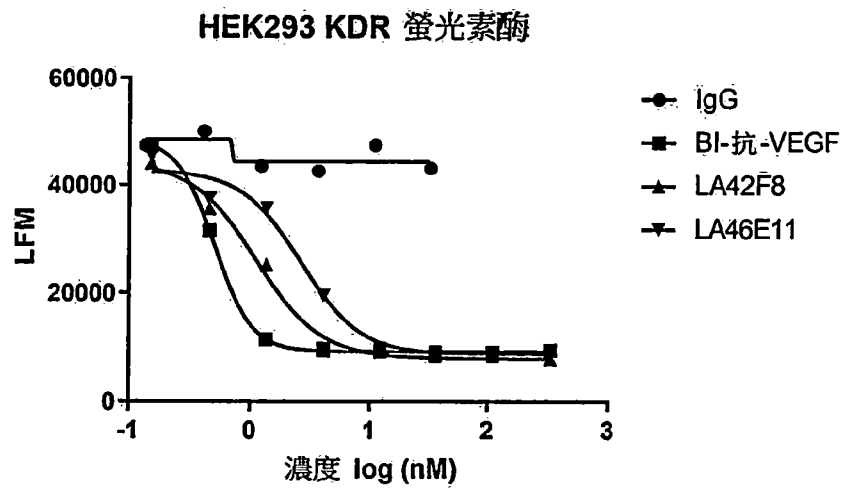


B

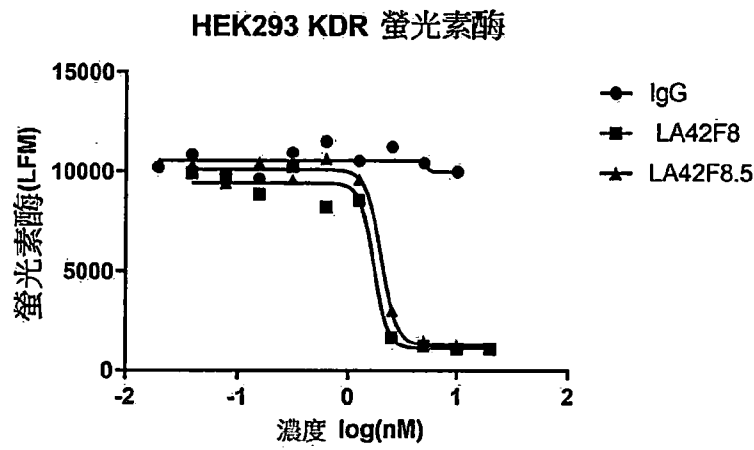


【圖4】

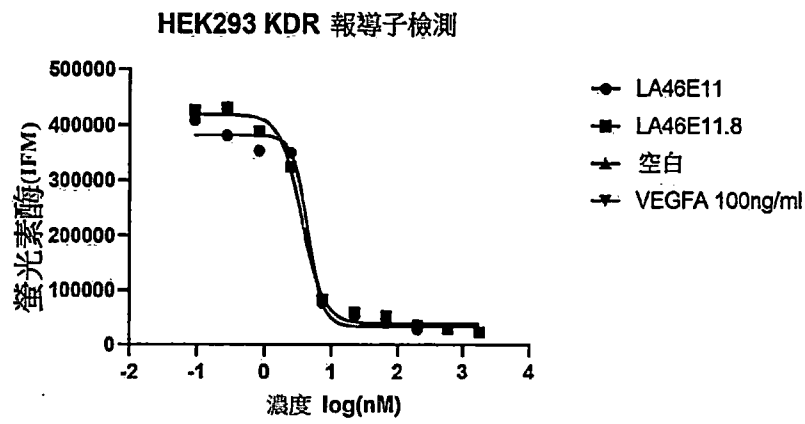
A



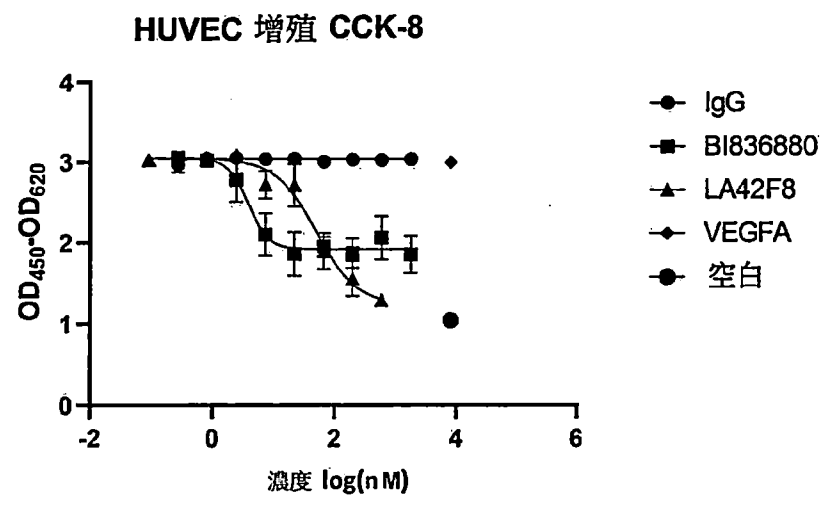
B



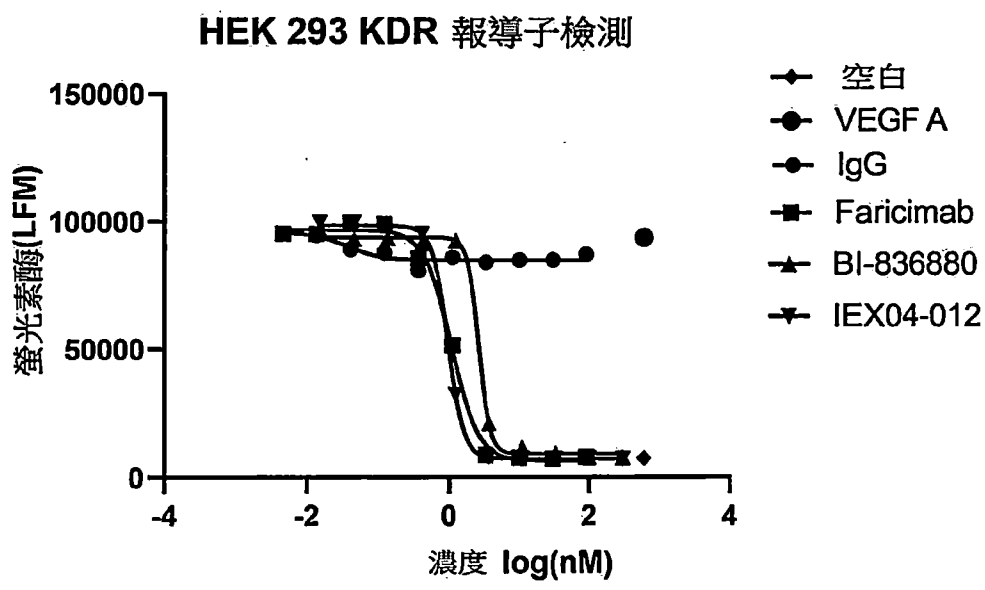
C



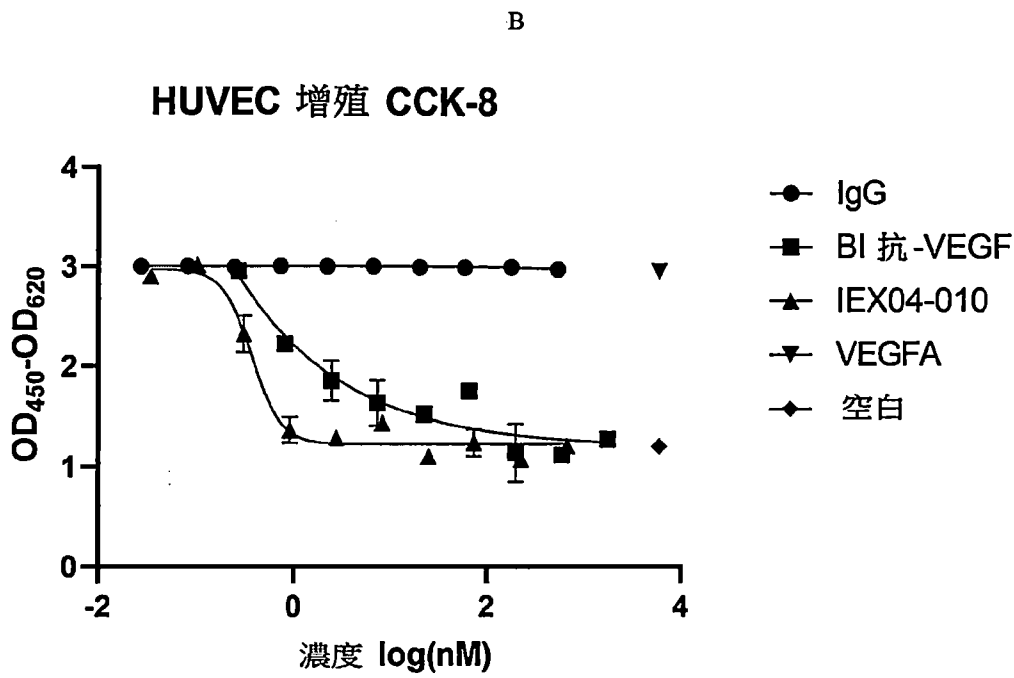
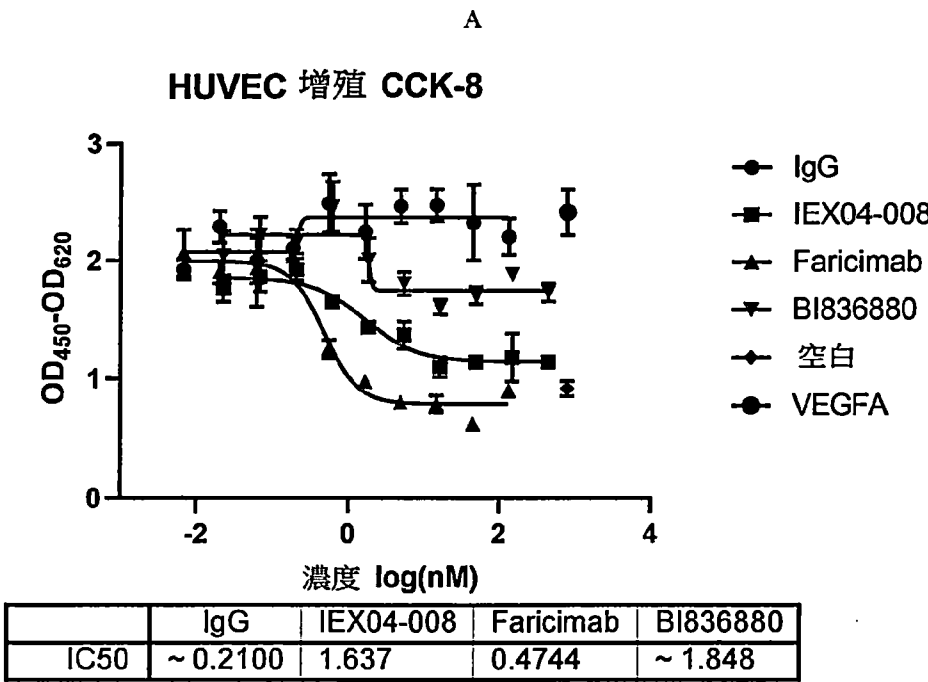
【圖5】



【圖6】



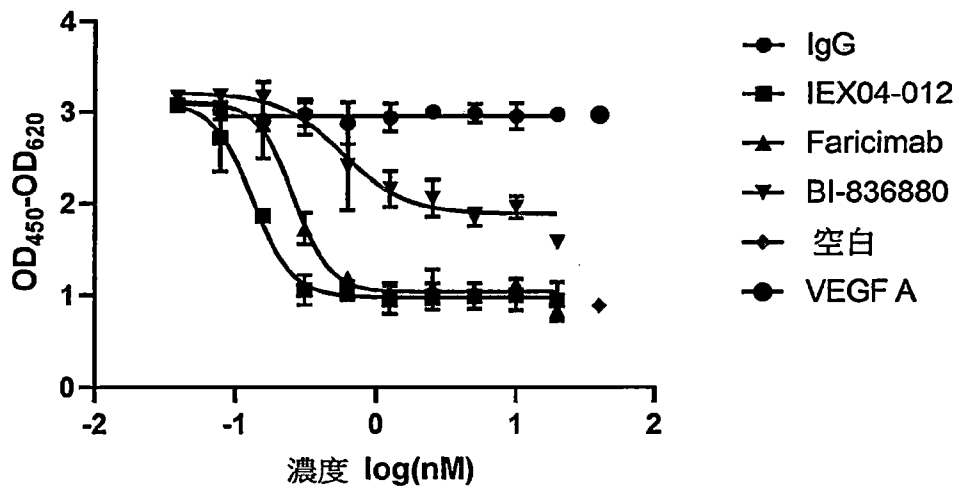
【圖7】



【圖8】

C

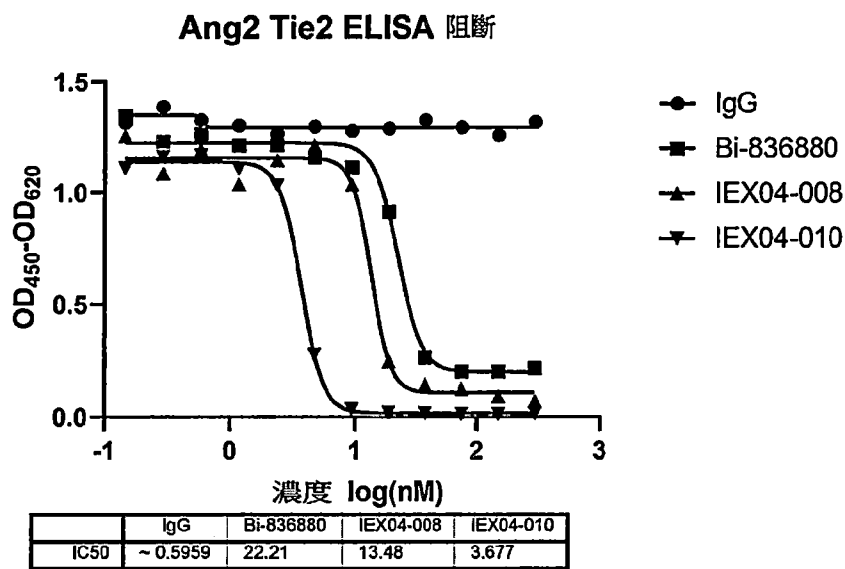
HUVEC 增殖 CCK-8



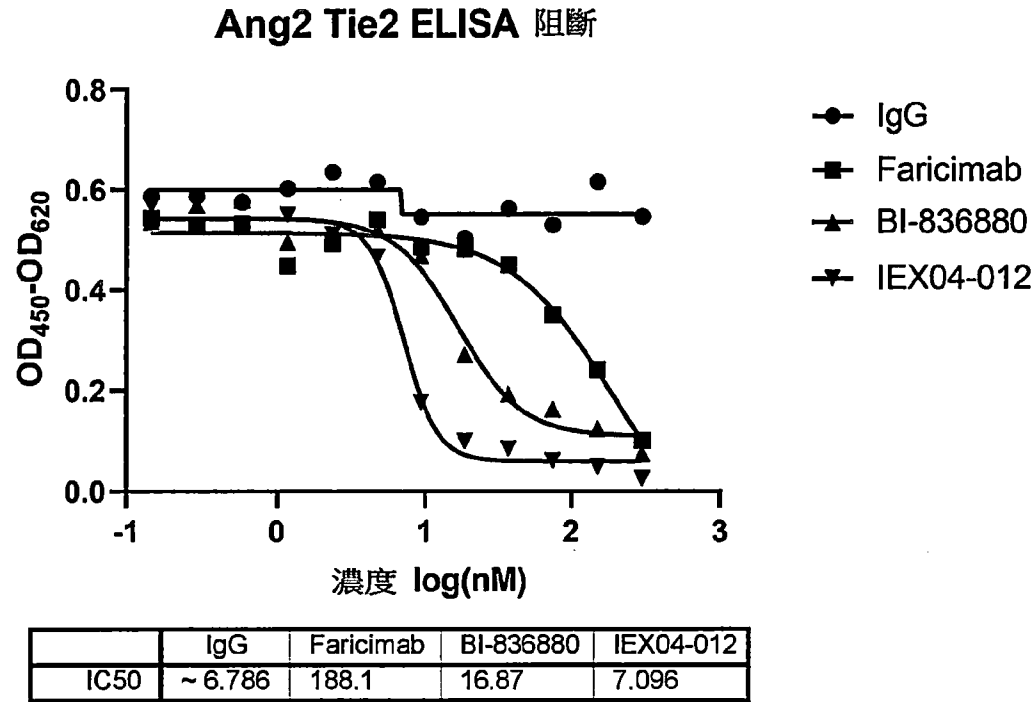
	IgG	IEX04-012	Faricimab	BI-836880
IC50	~ 0.07786	0.1323	0.2592	0.5703

【圖8】 (續)

A

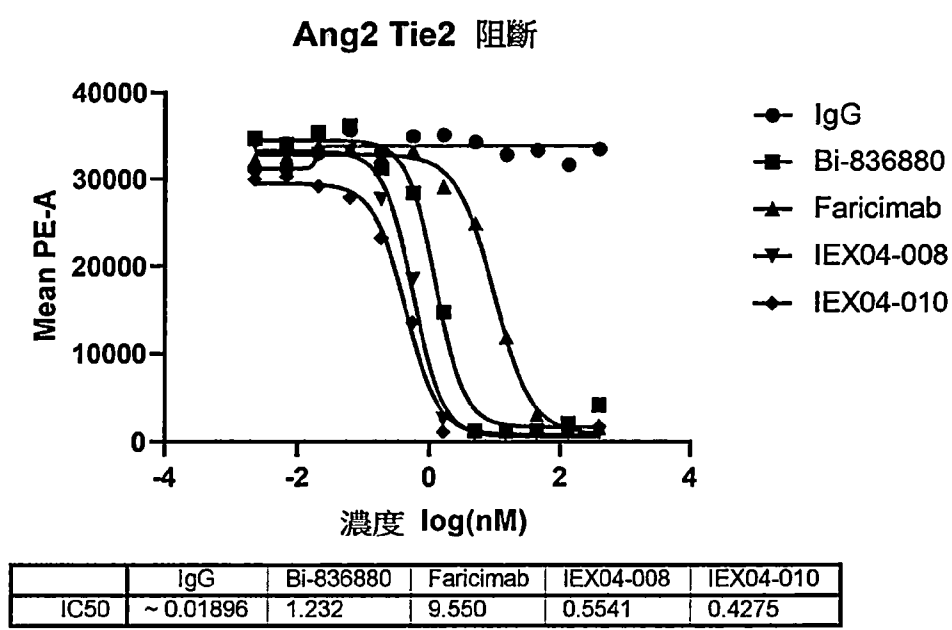


B

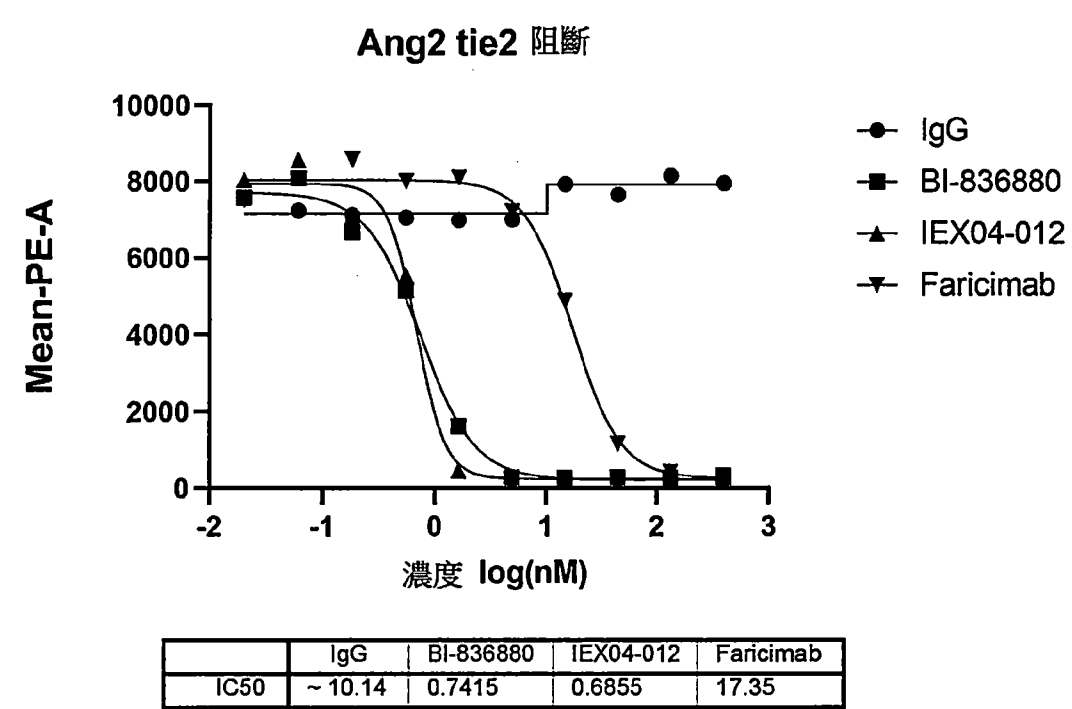


【圖9】

A



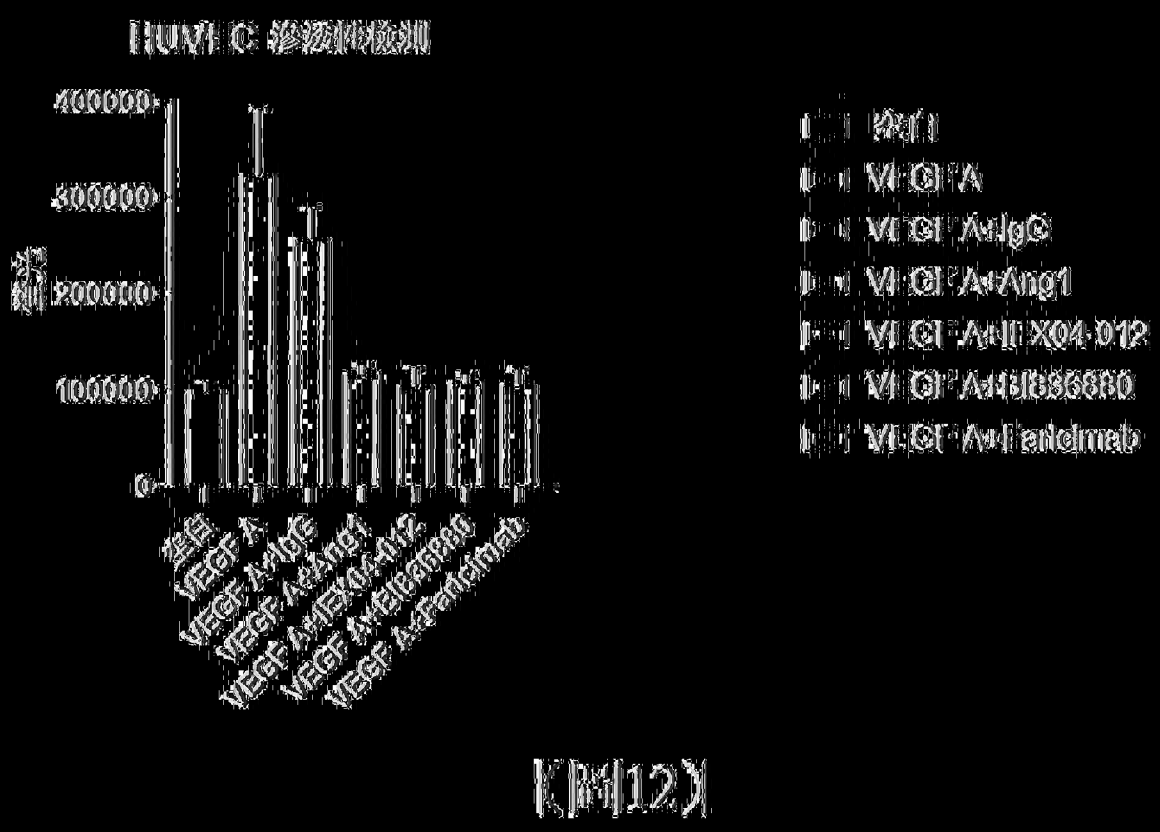
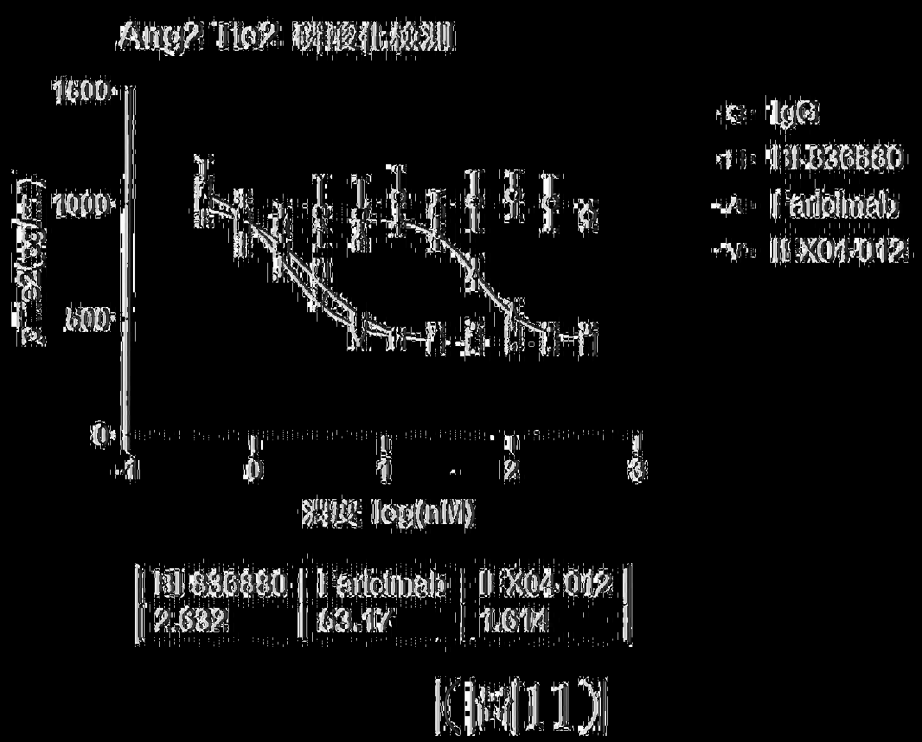
B



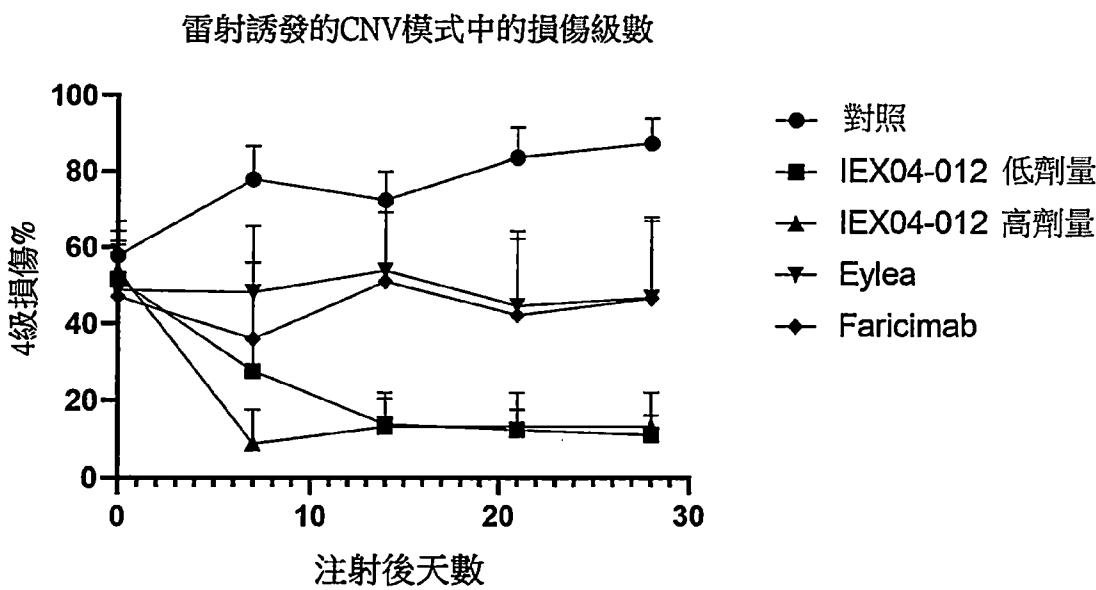
【圖10】

42

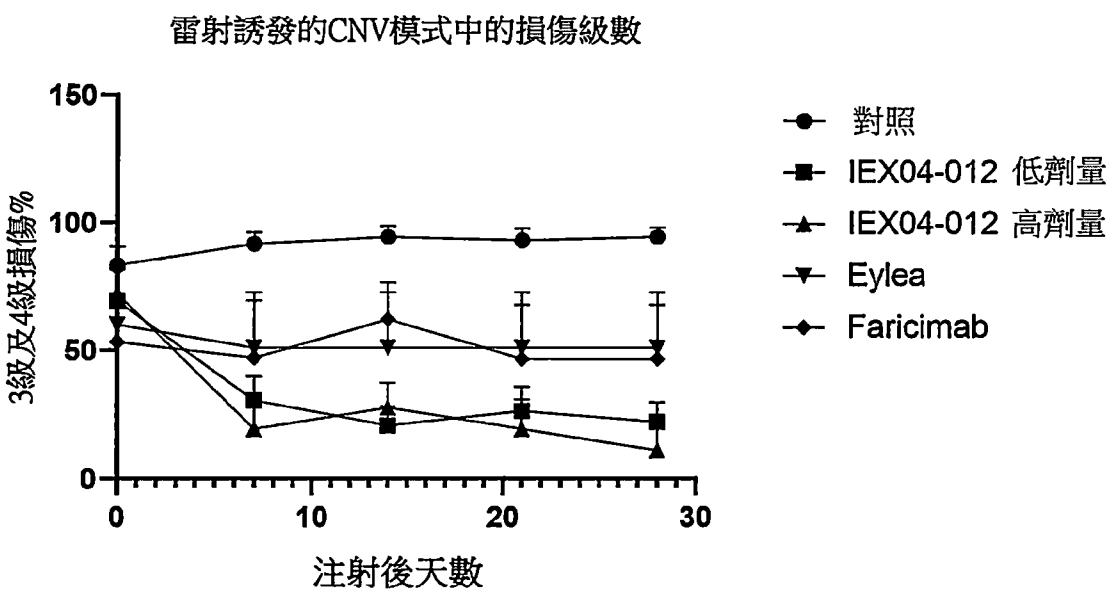
43



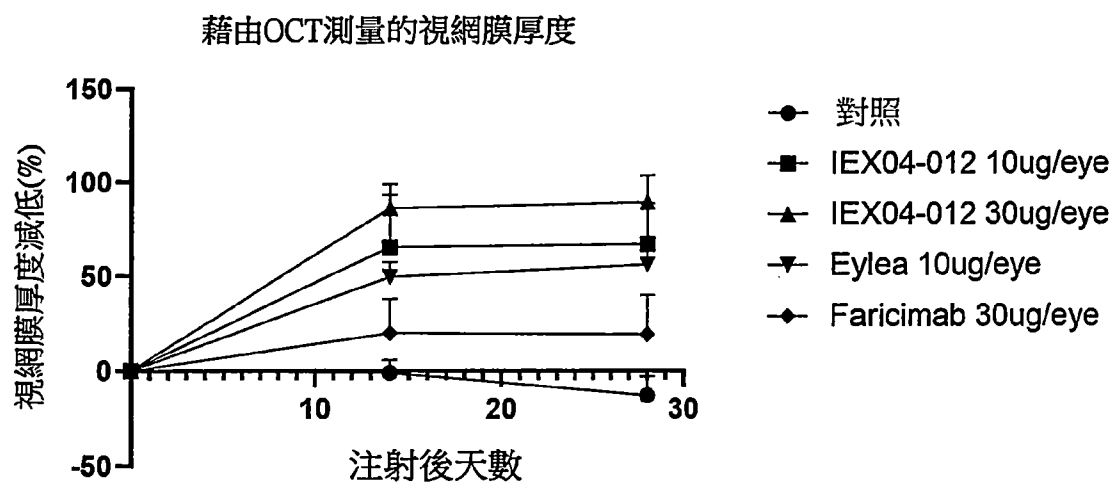
A



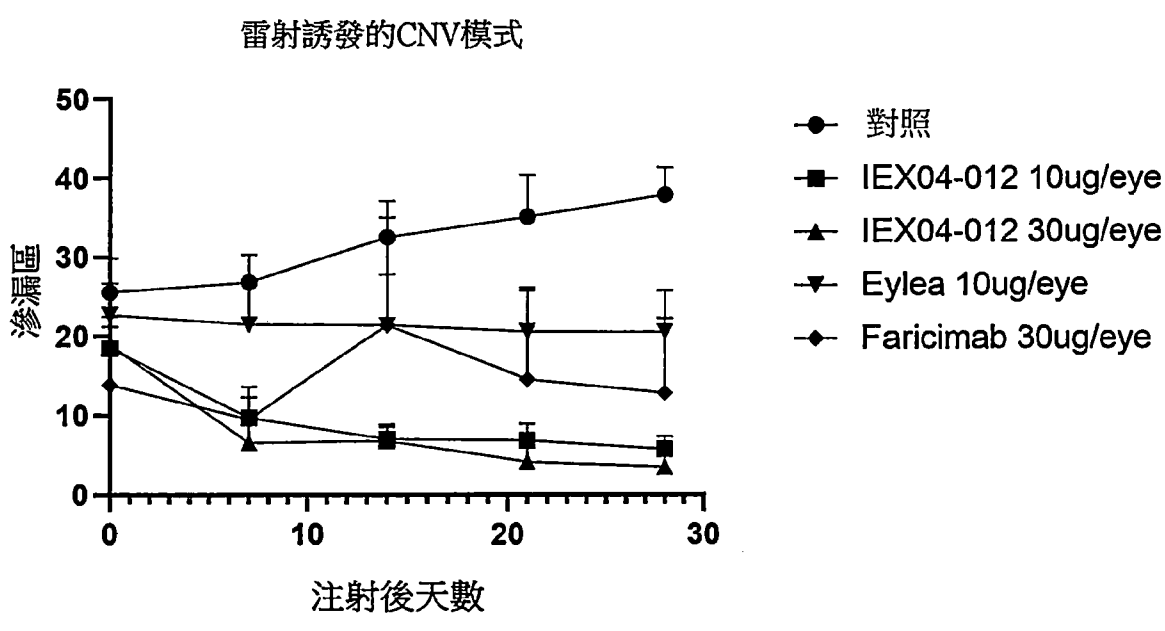
B



【圖13】



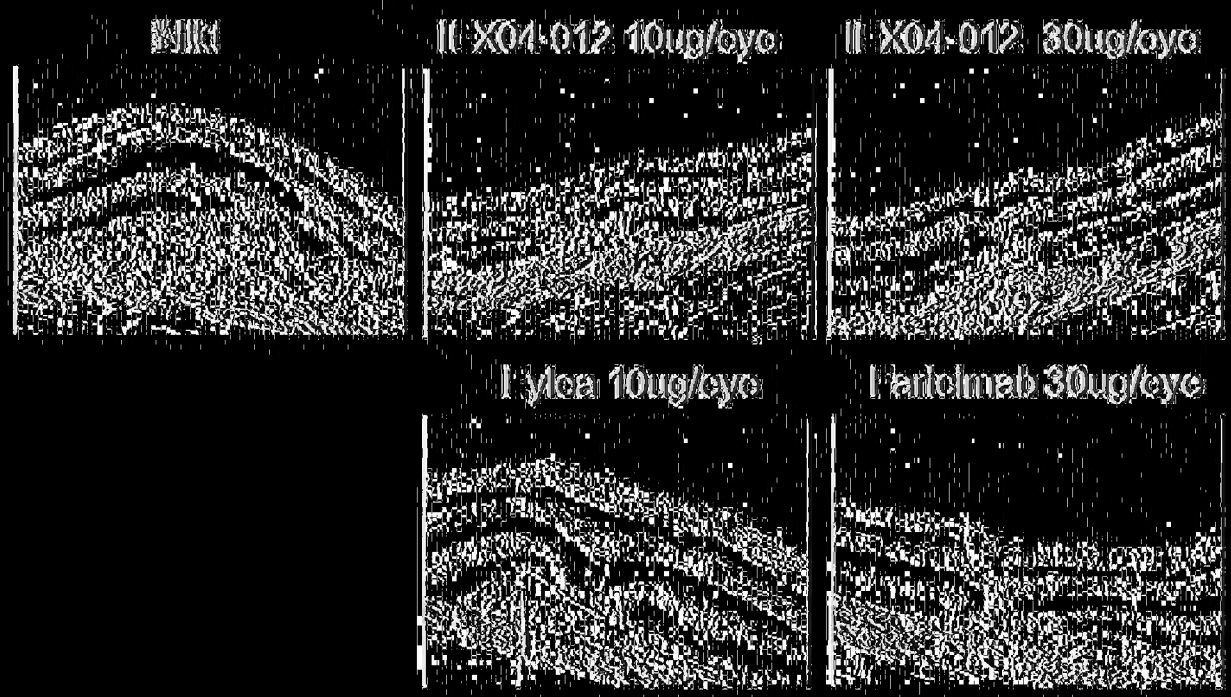
【圖14】



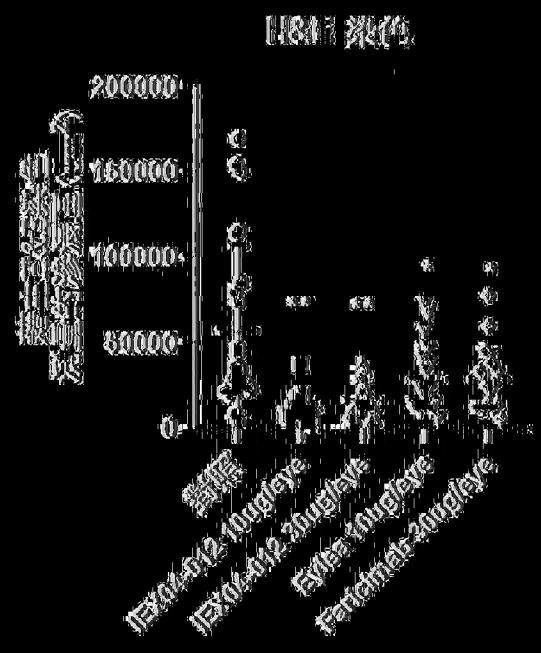
【圖15】

第
五

A

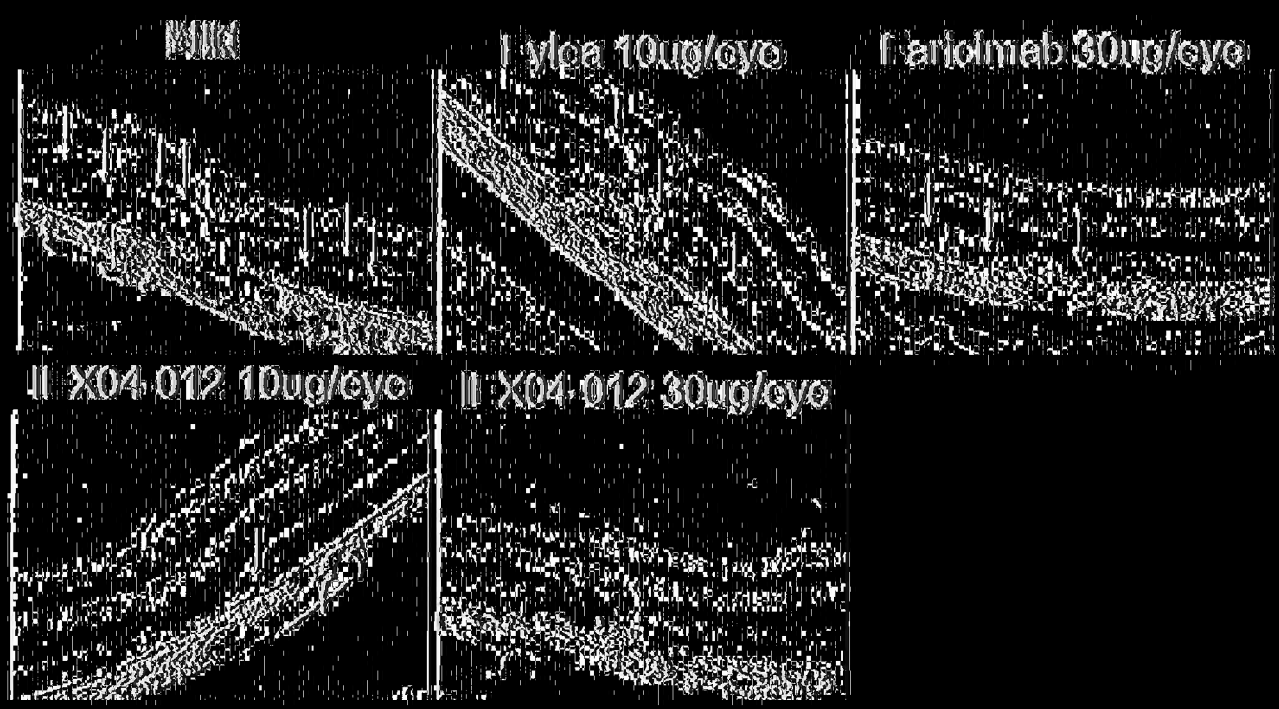


B



【图16】

A.



B.

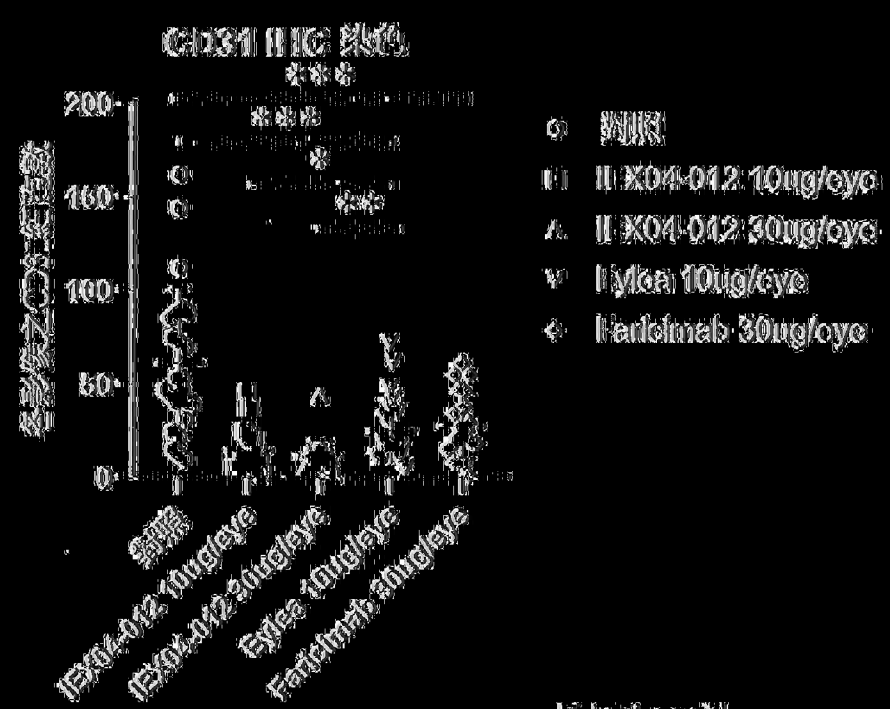


Figure 17