

## 抗 ANG2 抗体及其制备方法和应用

### 技术领域

本发明涉及医药领域，具体地涉及 ANG2(angiotensin-2，人血管生成素 2)的抗体及其制备方法和应用。

### 背景技术

针对 ANG2 的抗体能抑制新生血管的生成和渗漏，并减少炎症反应的发生。ANG/Tie2 是一种调节血管生成的重要信号通路。ANG1 促进内皮细胞受体 Tie2 磷酸化，吸引血管平滑肌细胞、周细胞等血管周围细胞包围和支持内皮细胞，促进血管重塑、并维持血管的完整性和调节血管功能；ANG1 能够保护血管不发生病变，并保持血管形态，而 ANG2 促进血管渗漏，导致低血压和血管结构异常。尽管有很多企业开发的 ANG2 抗体在进行临床实验，但是目前尚无针对 ANG2 的抗体药物上市。

### 发明内容

本发明提供一种针对 ANG2 的特异性单克隆抗体，在抑制 ANG2 的促血管生成活性和治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病和病症中发挥作用，例如眼底新生血管性疾病、类风湿性关节炎和银屑病。另外，血管生成对肿瘤生长和维持是非常关键的，抑制 ANG2 的单克隆抗体也能对治疗癌症过程中产生作用。此外，本发明还提供了针对 ANG2 和 VEGF 的双特异性抗体。本发明抗体能够与人 ANG2、兔 ANG2 和猴 ANG2 结合。

具体地，本发明涉及以下方面：

1. 抗 ANG2 重链单域抗体，其包含 SEQ ID NO:1-10 任一项所示的重链可变区包含的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3，或其变体，

优选地，按照 IMGT 编号系统，包含选自以下各项组成的组的 HCDR1，HCDR2 和 HCDR3：

(1) SEQ ID NO:21 所示的 HCDR1，SEQ ID NO:22 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR3，

(2) SEQ ID NO:34 所示的 HCDR1，SEQ ID NO:35 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:36 所示的 HCDR3，

(3) SEQ ID NO:37 所示的 HCDR1，SEQ ID NO:38 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:39 所示的 HCDR3，

(4) SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1，SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3，或 SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 的变体，及其组合，所述变体为与 SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1，SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 相比分别具有一个或多个（优选 1 个、2 个或 3 个）保守氨基酸突变

(优选置换, 插入或缺失) 并保留与 ANG2 结合亲和力的氨基酸序列,

优选地, SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3, 其中 SEQ ID NO:40 所示的 CDR1 中第 5-8 位和第 10-11 位氨基酸、SEQ ID NO:41 所示的 CDR2 中第 2-5 位氨基酸和第 7 位、SEQ ID NO:42 所示的 CDR3 第 1 位氨基酸、第 3-8 位氨基酸选自氨基酸 X, 所述氨基酸 X 选自 Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 和 Val 组成的组,

优选地, SEQ ID NO:40 所示 HCDR1 的变体, 其中第 1 位的甘氨酸 G 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Val, Leu 和 Ile; 第 2 位的苯丙氨酸 F 可以被 Tyr 替换; 第 3 位的脯氨酸 P 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Trp 和 His; 第 4 位的 Ser 可以被 Thr 替换; 第 9 位的 Ser 可以被 Thr 替换; 第 12 位的 Gln 可以被 Asn 替换;

SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 的变体, 第 1 位的 Ile 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Val, leu 和 Gly; 第 6 位的 Leu 可以被 Ile 替换; 第 8 位的 Lys 可以被 Arg 替换;

SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 的变体, 其中第 2 位的 Val 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Gly, Leu 和 Ile; 第 9 位的 Asp 可以被 Glu 替换,

(5) SEQ ID NO:43 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:45 所示的 HCDR3,

(6) SEQ ID NO:46 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:48 所示的 HCDR3,

(7) SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:48 所示的 HCDR3,

(8) SEQ ID NO:52 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:48 所示的 HCDR3, 和

(9) SEQ ID NO:55 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:56 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:57 所示的 HCDR3。

2. 项目 1 所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 其中所述 ANG2 选自人 ANG2、兔 ANG2、或猴 ANG2。

3. 项目 1 或 2 所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 其包含重链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:1-10 任一项所示的序列或与 SEQ ID NO:1-10 任一项所述的序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99% 同源性且具有 ANG2 结合活性的序列, 或由其组成。

4. 重组蛋白, 其包含项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 优选地, 所述重组蛋白进一步包含生物活性物质, 如具有酶活性的毒素或其活性片段 (如相思豆毒蛋白, 蓖麻毒蛋白 A, 假单胞菌外毒素或白喉毒素), 肿瘤坏死因

子或干扰素(如 IFN- $\gamma$ ), 生物反应调节物(如淋巴因子, IL-2, IL-2, IL2-6, IL-10, 粒 GM-CSF), 和/或 Fc 片段(如来自 IgG(例如 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 的 Fc 区, 例如来自人、兔或猴的 IgG, IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 的 Fc 区), 优选地, 所述抗 ANG2 重链单域抗体和所述 Fc 片段通过连接肽连接, 优选地, 所述连接肽为 (GGGGS) $_n$ ,  $n=1$ 、2 或者 3, 优选地, 所述 Fc 片段为人 IgG1 重链恒定区, 更优选为 GenBank No. AK303185.1 或 SEQ ID NO: 29 所示的 Fc 片段, 更优选地, 所述重组蛋白包含 SEQ ID NO:11-20 所示的序列或由其组成。

5. 多特异性抗体, 优选双特异性抗体, 其包含项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 优选所述双特异性抗体的结构为: 包含轻链和重链, 其中轻-重链配对并形成链间二硫键, 两个重链配对并形成链间二硫键, 其中重链为 (VH)-(CH1)-(铰链区)-(Fc)-(连接肽)-(VHH), 轻链为 (VL)-(轻链恒定区)。

6. 项目 5 所述的多特异性抗体, 其中 VHH 为项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 单域抗体, VH 和 VL 为第二种抗体的重链和轻链可变区, 优选所述第二种抗体针对的抗原选自免疫细胞表面抗原、肿瘤抗原、病毒、细菌、内毒素、细胞因子、或其组合; 更优选地选自: PD-L1, PD-1, VEGFA, IL-10, IL-10R, BCMA, VEGF, TGF- $\beta$ , CTLA-4, LAG-3, TIGIT, CEA, CD38, SLAMF7, B7-H3, Her2, EpCAM, CD19, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, EGFR, GD2, GD3, GM2, RANKL, CD3, 和/或 CD16a, 优选第二种抗体针对的抗原为 VEGF, 更优选第二种抗体选自抗 VEGF 抗体, 其包含 SEQ ID NO:24 所示的重链可变区包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3(优选按照 IMGT 编号系统, 包含 SEQ ID NO:50 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:51 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:53 所示的 HCDR3)和 SEQ ID NO:27 所示的轻链可变区包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3(优选按照 IMGT 编号系统, 包含 SEQ ID NO:54 所示的 LCDR1, SEQ ID NO:58 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:59 所示的 LCDR3), 更优选, 所述抗 VEGF 抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列或与 SEQ ID NO:24 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的序列, 或由其组成; 所述抗 VEGF 抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 所示的序列或与 SEQ ID NO:27 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的序列, 或由其组成。

7. 项目 5 或 6 所述的多特异性抗体, 其中 CH1 的序列如 SEQ ID NO:25 所示, 铰链区的序列如 SEQ ID NO:26 所示, Fc 恒定区的序列如 SEQ ID NO:29 所示, 连接肽的序列如 SEQ ID NO:30 或 47 所示, 轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO:28 所示; 优选地, 所述多特异性抗体选自下组:

(1) Y400C, 其包含重链和轻链, 或由其组成; 其中重链的序列包含 SEQ ID NO:24, 25, 26, 29, 30 和 4, 或由其组成; 轻链的序列包含 SEQ ID NO: 27 和 28, 或由其组成;

(2) Y400E, 其包含重链和轻链, 或由其组成; 其中重链的序列包含 SEQ ID

NO:24, 25, 26, 29, 47 和 4, 或由其组成;轻链的序列包含 SEQ ID NO: 27 和 28, 或由其组成。

8. 多核苷酸, 其编码项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 或项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体。

9. 载体, 其包含项目 8 所述的多核苷酸。

10. 宿主细胞, 其包含项目 9 所述的载体。

11. 偶联物, 其包含项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 或项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体, 以及偶联部分, 其中, 所述偶联部分为纯化标签(如 His 标签)、可检测的标记、药物、毒素、细胞因子、酶、或其组合; 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质、化疗剂、生物毒素、聚乙二醇或酶。

12. 试剂盒, 其包括包含项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体或项目 11 所述的偶联物; 优选地, 所述试剂盒还包括特异性识别项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体或项目 11 所述的偶联物的抗 ANG2 重链单域抗体、重组蛋白或多特异性抗体; 任选地, 所述抗 ANG2 重链单域抗体、重组蛋白或多特异性抗体还包括可检测的标记, 例如放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质或酶; 优选地, 所述试剂盒用于检测 ANG2 在样品中的存在或其水平; 或者

所述试剂盒包含(1) 项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体或项目 11 所述的偶联物, 和(2) 针对其它抗原的抗体或其抗原结合片段, 和/或细胞毒性剂, 和/或化疗药, 和任选地, 使用说明书。

13. 药物组合物, 其包含项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体或项目 11 所述的偶联物; 可选地, 所述药物组合物还包括药理学上可接受的载体和/或赋形剂; 优选地, 所述药物组合物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

14. 项目 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、项目 4 所述的重组蛋白, 项目 5-7 任一项所述的多特异性抗体或项目 11 所述的偶联物在抑制 ANG2 的促血管生成活性、预防和/或治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病例如眼底新生血管性疾病、类风湿性关节炎和银屑病, 和/或肿瘤中的用途, 或在制备用于抑制 ANG2 的促血管生成活性、预防和/或治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病例如眼底新生血管性疾病、类风湿性关节炎和银屑病和/或肿瘤的药物中的用途。

应理解, 在本发明范围内, 本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合, 从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅, 在此不再一一累述。

在本发明中涉及的术语具备本领域技术人员理解的常规含义。在本技术领域内使用和/或可接受的情况下，一个术语有两个或两个以上定义时，本文使用的术语的定义用于包括所有的含义。

本领域普通技术人员可以理解，抗体的 CDR 区负责抗体对抗原的结合特异性。在已知抗体重链和轻链可变区序列的情况下，目前有多种确定抗体 CDR 区的方法，包括 Kabat, IMGT, Chothia 和 AbM 编号系统。然而，每种关于抗体或其变体的 CDR 的定义的应用都将在本文定义和使用的术语的范围内。如果给定该抗体的可变区氨基酸序列，则本领域技术人员通常可确定特定 CDR，而不依赖于该序列自身之外的任何实验数据。

在本发明中，重链单域抗体也称为 VHH 结构域，VHH 抗体片段或 VHH 抗体，是称为“重链抗体”（即缺乏轻链的抗体）的抗原结合免疫球蛋白的可变结构域(Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, BEndahman N, Hamers R.: “Naturally occurring antibodies devoid of light chains”, Nature 363, 446-448, 1993)。VHH 结构域特异性结合表位而无需其他抗原结合结构域。VHH 结构域为由单一免疫球蛋白结构域形成的小型稳定及高效的抗原识别单元。

本发明的重链单域抗体可以与具有需要的生物活性物质缀合，形成重组蛋白。在一些实施方案中，所述生物活性物质选自例如具有酶活性的毒素或其活性片段（如相思豆毒蛋白，蓖麻毒蛋白 A，假单胞菌外毒素或白喉毒素），肿瘤坏死因子或干扰素（如 IFN- $\gamma$ ），生物反应调节物（如淋巴因子，IL-2，IL-2，IL-2-6，IL-10，粒 GM-CSF），Fc 片段。本发明重组蛋白包含的 Fc 片段可以使其形成二聚体，同时延长所述重组蛋白的体内半衰期。在一些实施方案中，可用于本发明的 Fc 片段可以来自不同亚型的免疫球蛋白如 IgG（如 IgG1，IgG2，IgG3 或 IgG4 亚型），IgA1，IgA2，IgD，IgE 或 IgM。

本发明的抗体可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与 6His 标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

#### 保守替换：

“保守氨基酸替换”是其中氨基酸残基被具有类似侧链的氨基酸残基替换。具有类似侧链的氨基酸残基家族已在本领域中定义，其包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)，酸性侧链(例如天冬氨酸，谷氨酸)，不带电荷的极性侧链(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)，非极性侧链(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)， $\beta$ -支链的侧链(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳族侧链(例如酪氨酸、

苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，免疫球蛋白多肽的非必需氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换。在另一些实施方案中，一串氨基酸可被结构上类似的氨基酸串替换，后者在顺序上和/或侧链家族的组成上不同。

在下表中提供了保守性氨基酸替换的非限制性实例，其中相似性得分为 0 或更高表示在这两个氨基酸之间有保守替换。

|   | C  | G  | P  | S  | A  | T  | D  | E  | N  | Q  | H  | K  | R  | V  | M  | I  | L  | F | Y  | W  |
|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|---|----|----|
| W | -8 | -7 | -6 | -2 | -6 | -5 | -7 | -7 | -4 | -5 | -3 | -3 | 2  | -6 | -4 | -5 | -2 | 0 | 0  | 17 |
| Y | 0  | -5 | -5 | -3 | -3 | -3 | -4 | -4 | -2 | -4 | 0  | -4 | -5 | -2 | -2 | -1 | -1 | 7 | 10 |    |
| F | -4 | -5 | -5 | -3 | -4 | -3 | -6 | -5 | -4 | -5 | -2 | -5 | -4 | -1 | 0  | 1  | 2  | 9 |    |    |
| L | -6 | -4 | -3 | -3 | -2 | -2 | -4 | -3 | -3 | -2 | -2 | -3 | -3 | 2  | 4  | 2  | 6  |   |    |    |
| I | -2 | -3 | -2 | -1 | -1 | 0  | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | 4  | 2  | 5  |    |   |    |    |
| M | -5 | -3 | -2 | -1 | -1 | -1 | -3 | -2 | 0  | -1 | -2 | 0  | 0  | 2  | 6  |    |    |   |    |    |
| V | -2 | -1 | -1 | -1 | 0  | 0  | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | -2 | 4  |    |    |    |   |    |    |
| R | -4 | -3 | 0  | 0  | -2 | -1 | -1 | -1 | 0  | 1  | 2  | 3  | 6  |    |    |    |    |   |    |    |
| K | -5 | -2 | -1 | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | 1  | 1  | 0  | 5  |    |    |    |    |    |   |    |    |
| H | -3 | -2 | 0  | -1 | -1 | -1 | 1  | 1  | 2  | 3  | 6  |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| Q | -5 | -1 | 0  | -1 | 0  | -1 | 2  | 2  | 1  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| N | -4 | 0  | -1 | 1  | 0  | 0  | 2  | 1  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| E | -5 | 0  | -1 | 0  | 0  | 0  | 3  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| D | -5 | 1  | -1 | 0  | 0  | 0  | 4  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| T | -2 | 0  | 0  | 1  | 1  | 3  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| A | -2 | 1  | 1  | 1  | 2  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| S | 0  | 1  | 1  | 1  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| P | -3 | -1 | 6  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| G | -3 | 5  |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |
| C | 12 |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |   |    |    |

在一些实施方案中，所述保守替换优选地是这样的替换，即，其中下列组(a) – (e)内的一个氨基酸被同组内的另一氨基酸残基替换：(a) 小的脂肪族、非极性或弱极性的残基：Ala, Ser, Thr, Pro 和 Gly; (b) 极性、带负电荷的残基及其（不带电荷的）酰胺：Asp, Asn, Glu 和 Gln; (c) 极性、带正电荷的残基：His, Arg 和 Lys; (d) 大的脂肪族、非极性残基：Met, Leu, Ile, Val 和 Cys; 以及(e) 芳族残基：Phe, Tyr 和 Trp。

特别优选的保守替换如下：Ala 替换成 Gly 或替换成 Ser; Arg 替换成 Lys; Asn 替换成 Gln 或替换成 His; Asp 替换成 Glu; Cys 替换成 Ser; Gln 替换成 Asn; Glu 替换成 Asp; Gly 替换成 Ala 或替换成 Pro; His 替换成 Asn 或替换成 Gln; Ile 替换成 Leu 或替换成 Val; Leu 替换成 Ile 或替换成 Val; Lys 替换成 Arg, 替换成 Gln 或替换成 Glu; Met 替换成 Leu, 替换成 Tyr 或替换成 Ile; Phe 替换成 Met, 替换成 Leu 或替换成 Tyr; Ser 替换成 Thr; Thr 替换成 Ser; Trp 替换成 Tyr; Tyr 替换成 Trp; 和/或 Phe 替换成 Val, 替换成 Ile 或替换成 Leu。

在一些实施方案中，以下氨基酸具有相似的结构特征和性能：

如甘氨酸 G、丙氨酸 A、缬氨酸 V、亮氨酸 L 和异亮氨酸 I 均属于含一氨基一羧基的中性氨基酸，

丝氨酸 S 和苏氨酸 T 均属于羟基氨基酸，

半胱氨酸 C 和甲硫氨酸 M 均属于含硫氨基酸，

天冬酰胺 N 和谷氨酰胺 Q 均属于含酰胺基氨基酸，

天冬氨酸 D 和谷氨酸 E 均属于酸性氨基酸，

赖氨酸 K 和精氨酸 R 均属于碱性氨基酸，

苯丙氨酸 F 和酪氨酸 Y 均属于芳香族氨基酸，  
色氨酸 W，组氨酸 H 和脯氨酸 P 均属于杂环氨基酸。因此相似的结构特征和性能，彼此之间可以进行保守置换。

在一些实施方案中，本发明所述抗体可以结合治疗剂（如化疗药，如顺铂、卡铂）、药物前体、肽、蛋白、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或 PEG。本发明抗体可以连接至或融合至治疗剂上，该治疗剂可包括可检测标记物，如放射性标记物、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光活性治疗剂或诊断剂、细胞毒性剂，其可为药物或毒素，超声增强剂，非放射性标记物，它们的组合和其他这类本领域已知的成分。

附图说明

- 图 1. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 结合人 ANG2 的生物学活性。
- 图 2. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 结合猴 ANG2 的生物学活性。
- 图 3. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 抑制人 ANG2 与其受体 hTIE2 结合的生物学活性。
- 图 4. 抗体抑制人 ANG2 与 HUVEC 结合的生物学活性。
- 图 5. 抗体抑制人 ANG1 与 HUVEC 结合的生物学活性。
- 图 6. 抗体抑制人 ANG2 依赖的 HUVEC 细胞的 AKT 磷酸化。

具体实施方式

下面通过实施例详细描述本发明。本领域的普通技术人员可以理解，下述实施例仅是用于举例说明的目的。本发明的精神和范围由权利要求所限定。下述实施例中所用方法如无特别说明均为常规方法，所用的试剂如无特别说明均为可商购的试剂。

实施例 1：针对 ANG2 的重链单域抗体的筛选

对应人 ANG2 的 Lys275-Phe496 位氨基酸的重组人 ANG2 蛋白，后简称 hANG2，序列如 SEQ ID NO:32 所示；猴 ANG2 蛋白的序列如 SEQ ID NO: 33 所示，后简称 cynoANG2。具体 ANG2 ECD 分子的氨基酸序列信息如表 1。

表 1. 重组人 ANG2 序列信息

| 种属             | 序列                                                                                                                                                                                                                                                    | SEQ ID NO: |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 标签             | HHHHHHHH                                                                                                                                                                                                                                              | 31         |
| 人 ANG2 (hANG2) | KEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGIYTLTFPNSTEEIKAY<br>CDMEAGGGGWTHIQRREDGSVDFQRTWKEYKVGFG<br>NPSGEYWLGNEFVSQLTNQQRVVLKIHLKDWEGNE<br>AYSLYEHFYLSSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQPG<br>NDFSTKDGDNCKICKCSQMLTGGWWFDACGPSNL<br>NGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKATTM<br>MIRPADF | 32         |
| 猴 ANG2         | KEEQISFRDCAEVFKSGHTTNGVYTLTLPNSTEEVKA                                                                                                                                                                                                                 | 33         |

|            |                                                                                                                                                                                                               |  |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|
| (cynoANG2) | YCDMEAGGGGWTIIQRREDGSVDFQRTWKEYKVGF<br>GNPSGEYWLGNFVSQLTNQQRVYLKIHLKDWEWN<br>EAYSLYEHFYLSSSEELNYRIHLKGLTGTAGKISSISQP<br>GNDFSTKDADNDKCICKCSQMLTGGWWFDACGPSN<br>LNGMYYPQRQNTNKFNGIKWYYWKGSGYSLKGTT<br>MMIRPADF |  |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--|

### 1.1 重链单域抗体噬菌体文库的构建:

选取两只羊驼 (Alpaca) 进行抗原免疫, 用人 ANG2 蛋白进行 4 次免疫后, 提取羊驼 100ml 外周血的淋巴细胞, 用 RNAiso Plus 试剂 (TAKARA, 9109) 提取总 RNA, 使用 PrimeScript II 试剂盒 (TAKARA, 6210A) 将提取的 RNA 反转录成 cDNA。用 PCR 扩增的方法先扩增 750bp 长的重链抗体可变区和恒定区 CH2 的核酸片段, 然后以上一步中回收的 750bp 长的核酸片段为模板扩增目的片段, 即重链抗体可变区片段。将载体 pComb3XSS (NBbiolab, NPL-001,) 与目的片段分别用 SfiI 进行酶切, 50℃过夜酶切, 回收目的片段, 按照连接摩尔比例载体: 片段=1:3 的比例连接。将连接产物电转化至大肠杆菌感受态细胞 TG1 中, 每一只羊驼的连接产物进行 10 次电击转化。通过梯度稀释铺板, 计算库容的大小, 两只羊驼的噬菌体文库大小分别为:  $1.21 \times 10^9$  和  $1 \times 10^9$ 。随机从测滴度平板上挑取 96 个克隆进行鉴定, 结果表明插入率为 100%。

### 1.2 针对 ANG2 的重链单域抗体淘选:

用 hANG2 蛋白 10μg/孔包被平板, 4℃过夜。第二天用 1%BSA 室温封闭 2 小时后, 加入 100μl 噬菌体( $2 \times 10^9$  pfu/孔, 来自 1.1 所构建的重链单域抗体噬菌体文库), 37℃孵育 1 小时。之后用 PBST(PBS 中含有 0.05%吐温 20)洗 5 遍, 以洗掉不结合的噬菌体。最后用甘氨酸-盐酸(200mM)将与 hANG2 特异性结合的噬菌体洗脱下来, 并感染处于对数期生长的大肠杆菌 TG1, 产生并纯化噬菌体用于下一轮的筛选。相同筛选过程重复 2 轮后, 将获得的噬菌体感染大肠杆菌 TG1 并铺板, 从平板上挑取单克隆并测序。根据序列比对结果分析各个克隆的蛋白序列, 把 CDR1、CDR2、CDR3 序列不相同的克隆视为不同抗体株, 最终共获得 10 株不同的抗体。

表 2. 重链单域抗体可变区氨基酸序列信息 (Numbering Scheme IMGT)

| 克隆号   | 抗体可变区氨基酸序列 (下划线为 CDR 区)                                                                                                                                                                                                                                                 | SEQ ID NO.: |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| B1-G8 | QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVAP <u>GISFSNRG</u> MAWYRQ<br>APGKQRELVA <u>IDSAGSQ</u> RYAGSVKDRFTISRDNKNTVF<br>LQMNSLKPEDTAVYYC <u>NQPRFNL</u> WGQGTQVTSS<br>CDR1: <u>GISFSNRG</u> (SEQ ID NO:21)<br>CDR2: <u>IDSAGSQ</u> (SEQ ID NO:22)<br>CDR3: <u>NQPRFNL</u> (SEQ ID NO:23) | 1           |
| B1-G3 | EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS <u>MPSGISFSNRG</u> MAW<br>YRQAPGKQRELVA <u>IDSAGST</u> RYQDSVKGRFTISRDNKNTVF<br>LQMNSLKPEDTAVYYC <u>NQPAFKAW</u> WGQGTQVTSS<br>CDR1: <u>MPSGISFSNRG</u> (SEQ ID NO:34)<br>CDR2: <u>IDSAGST</u> (SEQ ID NO:35)                                 | 2           |

|            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |    |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|            | CDR3: <u><b>NQPAFKA</b></u> (SEQ ID NO:36)                                                                                                                                                                                                                                                                                |    |
| B4-D3      | QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVAS <b><u>GASGISFSNRG</u></b> MAWYRQAPGKQRELVA <b><u>IDSAGSP</u></b> AYAGSVKGRFTISRDNAKNTVFLQMNSLKPEDTAVYYC <b><u>NOPRENLWG</u></b> LGTVTVSS<br>CDR1: <u><b>GASGISFSNRG</b></u> (SEQ ID NO:37)<br>CDR2: <u><b>IDSAGSP</b></u> (SEQ ID NO:38)<br>CDR3: <u><b>NOPRENLWG</b></u> (SEQ ID NO:39)        | 3  |
| B2-E2      | EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCVAS <b><u>GFPSGFTFSDYQ</u></b> MYWYRQAPGKERELVA <b><u>ISNDGLRK</u></b> TYADSVKGRFTISRDNAKNTMFLQMNSLKPEDTAVYYC <b><u>NVRRANRDD</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GFPSGFTFSDYQ</b></u> (SEQ ID NO:40)<br>CDR2: <u><b>ISNDGLRK</b></u> (SEQ ID NO:41)<br>CDR3: <u><b>NVRRANRDD</b></u> (SEQ ID NO:42) | 4  |
| B2-F10     | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGAS <b><u>GSAVSITL</u></b> MAWYRQAPGKQRELVA <b><u>ISNIGDT</u></b> NYVDSVKDRFTISRINAKNAMLQMNSLKPEDTAVYYC <b><u>FAODWGGHHY</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GSAVSITL</b></u> (SEQ ID NO:43)<br>CDR2: <u><b>ISNIGDT</b></u> (SEQ ID NO:44)<br>CDR3: <u><b>FAODWGGHHY</b></u> (SEQ ID NO:45)          | 5  |
| B4-C1<br>1 | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <b><u>GSTFSNVVA</u></b> GWYRQAPGKQRELVA <b><u>ISNIGDT</u></b> RYADSVKGRFTISRDNAKKAVYLQMNSLKPEDTAVYYC <b><u>YAKYWARDY</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GSTFSNVVA</b></u> (SEQ ID NO:46)<br>CDR2: <u><b>ISNIGDT</b></u> (SEQ ID NO:44)<br>CDR3: <u><b>YAKYWARDY</b></u> (SEQ ID NO:48)          | 6  |
| B1-H9      | EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAAS <b><u>GSTFSSTI</u></b> AGWYRQAPGKQRELVA <b><u>ISNIGDT</u></b> RYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKPEDTAVYYC <b><u>YAKYWARDY</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GSTFSSTI</b></u> (SEQ ID NO:49)<br>CDR2: <u><b>ISNIGDT</b></u> (SEQ ID NO:44)<br>CDR3: <u><b>YAKYWARDY</b></u> (SEQ ID NO:48)           | 7  |
| B3-H7      | EVQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS <b><u>GSTAINSV</u></b> AGWYRQAPGKQRELVA <b><u>ISNIGDT</u></b> RYADSVKGRFTISRDNAKKTVYLQMNSLKSEDTAVYYC <b><u>YAKYWARDY</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GSTAINSV</b></u> (SEQ ID NO:52)<br>CDR2: <u><b>ISNIGDT</b></u> (SEQ ID NO:44)<br>CDR3: <u><b>YAKYWARDY</b></u> (SEQ ID NO:48)           | 8  |
| B3-C1<br>1 | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCFVS <b><u>GSTFSASL</u></b> MGWYRQAPGKERELVA <b><u>ISNIGNT</u></b> YADSAKGRFTISRDGAKNTVHLQMNAKLPEDTAVYYC <b><u>YATVPRAA</u></b> WGQGTQVTVSS<br>CDR1: <u><b>GSTFSASL</b></u> (SEQ ID NO:55)<br>CDR2: <u><b>ISNIGNT</b></u> (SEQ ID NO:56)<br>CDR3: <u><b>YATVPRAA</b></u> (SEQ ID NO:57)              | 9  |
| B2-A6      | QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCFVS <b><u>GSTFSASL</u></b> MGWYRQAPGKERELVA <b><u>ISNIGNT</u></b> YADSAKGRFTISRDGAKNTVHLQMNAKLPEDTAVYYC <b><u>YATVPRAA</u></b> WGQGTQVTVSS                                                                                                                                                          | 10 |

|                       |                |
|-----------------------|----------------|
| CDR1: <u>GSTFSASL</u> | (SEQ ID NO:55) |
| CDR2: <u>ISNIGNT</u>  | (SEQ ID NO:56) |
| CDR3: <u>YATVPRAA</u> | (SEQ ID NO:57) |

实施例 2：针对 ANG2 的重链单域抗体的初步评价鉴定

1. 重链单域抗体在宿主菌大肠杆菌中表达：

将所获得10株重链单域抗体的TG1宿主菌挑选单菌落接种、培养过夜，第二天将过夜菌种转接扩增，0.5mM IPTG诱导，37℃摇床培养过夜。第二天，离心收集上清检测。

2. ELISA检测10个重链单域抗体亲和力：

将 hANG2 蛋白溶液和 BSA 分别以 2μl/孔包被酶标板，4 度过夜；弃上清，每孔加入 300μl 封闭液(含 3%BSA 的 PBS)，37 度封闭 2 小时；将离心收集的上清以每孔 200μl 加入到酶标板孔中，室温下静置孵育 2 小时，弃上清；用 200μl/孔 PBST(PBS 含 0.1%Tween20)洗涤 3 次；加入稀释好的 HRP 标记的抗 VHH 二抗（Genscript，A01861），二抗以 1：10000 稀释后使用，稀释液为 1%BSA 的 PBS，体积为 100μl/孔，室温孵育 1 小时；用 200μl/孔 PBST 洗涤 5 次；加 TMB 显色液(BD，55214)100μl /孔，37 度显色 8 分钟。加 2M HCl 终止液 100μl/孔，终止液加入后，在 30 分钟内进行酶标仪 450nm 读数。结果见下表 3。

表 3. 重链单域抗体与 hANG2 抗原结合的 OD 值

| 克隆号    | 结合 hANG2 的 OD 值 | 结合 BSA 的 OD 值 |
|--------|-----------------|---------------|
| B1-G8  | 2.021           | 0.065         |
| B1-G3  | 1.572           | 0.067         |
| B4-D3  | 1.679           | 0.059         |
| B2-E2  | 1.962           | 0.070         |
| B2-F10 | 2.061           | 0.063         |
| B4-C11 | 1.58            | 0.071         |
| B1-H9  | 1.495           | 0.058         |
| B3-H7  | 1.82            | 0.056         |
| B3-C11 | 1.63            | 0.071         |
| B2-A6  | 2.39            | 0.049         |

实施例 3：抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 的质粒制备

通过将 PCR 克隆的单抗重链可变区（SEQ ID NO：1~10）对应的编码 DNA 序列与人 IgG1 重链恒定区（GenBank No. AK303185.1）对应的编码 DNA 连接，来构建重链抗体，以获得抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 表达质粒，载体一般用 pcDNA3.1(-)（购自 Invitrogen）或其他真核表达载体。所述的重链抗体蛋白序列的可变区与恒定区之间使用连接肽相连，所述连接肽为（GGGGS）n，n=1、2 或者 3。

表 4. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 氨基酸序列

| 克 隆 号 | 抗体氨基酸序列 | SEQ ID NO |
|-------|---------|-----------|
|-------|---------|-----------|

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| B1-G<br>8-Fc  | QVQLVESGGGLVQTGDSLRLSCVAPGISFSNRGMAWYRQAP<br>GKQRELVA/AIDSAGSQRYSVKDRFTISRDNANTVFLQM<br>NSLKPEDTAVYYCNQPRFNLWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK       | 11 |
| B1-G<br>3-Fc  | EVQVVESGGGLVQPGGSLRLSCVASMPSGISFSNRGMAWYR<br>QAPGKQRELVA/AIDSAGSTRYQDSVKGRFTISRDNANTVFL<br>QMNSLKPEDTAVYYCNQPAFKAWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 12 |
| B4-D<br>3-Fc  | QLQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGASGISFSNRGMAWYR<br>QAPGKQRELVA/AIDSAGSPAYAGSVKGRFTISRDNANTVFL<br>QMNSLKPEDTAVYYCNQPRFNLWGLGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 13 |
| B2-E2<br>-Fc  | EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCVASGFPSGFTFSDYQMYWY<br>RQAPGKERELVAIISNDGLRKYADSVKGRFTISRDNANTM<br>FLQMNSLKPEDTAVYVCNVRANRDDWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 14 |
| B2-F1<br>0-Fc | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCGASGSAVSITLMAWYRQAP<br>GKQRELVA/GISNIGDTNYVDSVKDRFTISRINAKNAMYLM<br>NSLKPEDTAVYYCFAQDWGGHHYWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 15 |

|               |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |    |
|---------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| B4-C<br>11-Fc | QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTFSNVVAGWYRQAP<br>GKQREL VAGISNIGDTRYADSVKGRFTISRDN AKKAVYLQMN<br>SLKPEDTAVYYCYAKYWARDYWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 16 |
| B1-H<br>9-Fc  | EVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGSTFSSTIAGWYRQAPG<br>KQREL VAGISNIGDTRYADSVKGRFTISRDN AKKTVYLQMN<br>LKPEDTAVYYCYAKYWARDYWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 17 |
| B3-H<br>7-Fc  | EVQVVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSTAINSVAGWYRQAP<br>GKQREL VAGISNIGDTRYADSVKGRFTISRDN AKKTVYLQMN<br>SLKSEDTAVYYCYAKYWARDYWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK | 18 |
| B3-C<br>11-Fc | EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCFVSGSTFSASLMGWYRQAP<br>GKEREL VAGISNIGNTVYADSAKGRFTISR DGAKNTVHLQMN<br>ALKPEDTAVYYCYATVPRAAWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 19 |
| B2-A<br>6-Fc  | QLQLVESGGGLVQAGGSLRLSCFVSGSTFSASLMGWYRQAP<br>GKEREL VAGISNIGNTVYADSAKGRFTISR DGAKNTVHLQMN<br>ALKPEDTAVYYCYATVPRAAWGQGTQVTVSS<br>GGGGSGGGSGGGGS<br>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV<br>VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV<br>SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR<br>EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ<br>PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV<br>MHEALHNHYTQKSLSLSPGK  | 20 |

实施例 4. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 的表达与纯化

利用无内毒素大量提取质粒试剂盒（Qiagen，货号 12391）进行质粒提取，具体操作按照厂商提供的说明书进行。CHO-S 细胞培养根据厂商提供的说明书在 CD CHO 培养基（Gibco，货号 10743-029）中，置于 37℃，5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中进行培养，准备好细胞后，将含有抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 序列的质粒一起共转染到 CHO-S 细胞中，以表达抗体-Fc。在转染后的第二天，培养温度下调到 32℃，并每天补加 3.5% 2×EFC+（Gibco，货号 A2503105），培养 14 天后，800×g 离心收获表达上清。并用 0.22 μm 滤膜过滤。通过蛋白 A 亲和层析和阳离子交换层析纯化得到培养上清液中的抗体-Fc。通过在 280 nm 处的 UV 吸光度以及每种蛋白对应的消光系数测定纯化的抗体-Fc 浓度。通过 SDS-PAGE 和 SE-HPLC 评估抗体-Fc 的纯度和均质性。或者使用离子交换和 Superdex 200 的 SEC 进行二次纯化制备高纯度抗体-Fc 样品备用。

实施例 5. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 结合 ANG2 的亲合力

本实施例使用 ELISA 检测方法评估 10 个抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 亲合力。将 ANG2 蛋白溶液分别以 2μl/孔包被酶标板，4 度过夜；弃上清，每孔加入 300μl 封闭液(含 3%BSA 的 PBS)，37 度封闭 2 小时；梯度稀释抗 ANG2 重链单域抗体-Fc，稀释液为 1%BSA 的 PBS。比如稀释的初始浓度为 500nM，10 倍稀释，稀释成 8 个浓度梯度。将稀释好的抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 以每孔 200μl 加入到酶标板孔中，室温下静置孵育 2 小时，弃上清；用 200μl/孔 PBST(PBS 含 0.1%Tween20)洗涤 3 次；加入稀释好的 HRP 标记的抗人 Fc 二抗（SIGMA，A8667），二抗以 1: 20000 稀释后使用，稀释液为 1%BSA 的 PBS，体积为 100μl/孔，室温孵育 1 小时；用 200μl/孔 PBST 洗涤 5 次；加 TMB 显色液(BD, 55214)100μl/孔，37 度显色 8 分钟。加 2M HCl 终止液 100μl/孔，终止液加入后，在 30 分钟内进行酶标仪 450nm 读数。用 GraphPad Prism6.0 软件分析数据，进行亲和力的拟合，得到 EC<sub>50</sub> 值，结果见图 1、图 2 和表 5。B2-E2-Fc 对人 ANG2 和猴 ANG2 蛋白的亲合力最高。

表 5. 重链单域抗体对 ANG2 蛋白的亲合力

| 抗体-Fc     | Anti-hANG2<br>EC50 nM | Anti-cynoANG2<br>EC50 nM |
|-----------|-----------------------|--------------------------|
| B1-G8-Fc  | 0.03923               | 0.5893                   |
| B1-G3-Fc  | 0.02332               | 0.3065                   |
| B4-D3-Fc  | 0.04241               | 0.7072                   |
| B2-E2-Fc  | 0.005842              | 0.2727                   |
| B2-F10-Fc | 1.112                 | 1.44                     |
| B4-C11-Fc | 2.275                 | 0.5418                   |
| B1-H9-Fc  | 2.235                 | 0.6734                   |
| B3-H7-Fc  | 3.507                 | 0.9301                   |
| B3-C11-Fc | 0.2415                | 0.624                    |

|          |        |        |
|----------|--------|--------|
| B2-A6-Fc | 0.2617 | 0.6409 |
|----------|--------|--------|

实施例 6. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 抑制 hANG2 与其受体 hTIE2 的结合

用 100  $\mu$ L 的 2  $\mu$ g/mL 在 PBS 中制备的 hTIE2-Fc (Novoprotein, CW98) 处理 96 孔板, 并在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。然后将板用含有 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤缓冲液洗涤三次, 接着加入 300  $\mu$ L 含有 1%BSA 的 PBS 封闭 2 小时。将待测抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 稀释后与终浓度为 10 $\mu$ g/mL 的 hANG2 混合, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 将抗原抗体混合物加入 96 孔板, 并将在 37  $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。用含有 0.1% Tween-20 的 PBS 洗涤缓冲液洗涤后, 加入稀释好的 HRP 标记的抗 His 二抗 (Proteintech, 66005-1-Ig), 二抗以 1: 2000 稀释后使用, 稀释液为 1%BSA 的 PBS, 体积为 100 $\mu$ l/孔, 室温孵育 1 小时; 用 200 $\mu$ l/孔 PBST 洗涤 5 次; 加 TMB 显色液(BD, 55214)100 $\mu$ l /孔, 37 度显色 8 分钟。加 2M HCl 终止液 100 $\mu$ l/孔, 终止液加入后, 在 30 分钟内进行酶标仪 450nm 读数。用 GraphPad Prism6.0 软件分析数据, 进行亲和力的拟合, 得到 EC50 值, 结果见图 3, B2E2-Fc 对人 ANG2 与其受体 TIE2 的结合有明显的抑制作用。

实施例 7: 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 的酸稳定性和热稳定性评估

按照以下酸稳定性和热稳定性评估方法对 B2-E2-Fc 进行评估。抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 分子进行 protein A 亲和层析时, 在酸洗脱步骤中 (使用 pH3.5 的柠檬酸缓冲液), 洗脱下来的抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 溶液不进行中和, 在该缓冲液中保持一段时间后, 在第 30 min 取样加入 1/10 体积的 1 M Tris-HCl(pH 8.0) 进行中和, 并进行该样品的 HPLC-SEC 检测。抗体分子在经过 pH 3.5 处理 30 min 后未出现聚集或降解现象, 纯度变化小于 4%, 说明其在酸性环境中能保持稳定性。同时, 在经 40 $^{\circ}$ C 培养箱孵育 14 天后进行该样品的 HPLC-SEC 检测, 未出现聚集或降解现象, 纯度变化小于 4%, 说明其在 40 $^{\circ}$ C 环境中能保持稳定性。如表 6 和表 7 结果显示, B2-E2-Fc 具有良好的酸稳定性和热稳定性。

表 6. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 酸稳定性评估结果

| 样品       | pH3.5, 30 分钟 |              |
|----------|--------------|--------------|
|          | 处理前 SEC 检测纯度 | 处理后 SEC 检测纯度 |
| B2-E2-Fc | 96.78%       | 95.59%       |

表 7. 抗 ANG2 重链单域抗体-Fc 热稳定性评估结果

| 样品       | 热稳定性检测, 40 $^{\circ}$ C 处理 |                |                 |
|----------|----------------------------|----------------|-----------------|
|          | Day 0 SEC 检测纯度             | Day 7 SEC 检测纯度 | Day 14 SEC 检测纯度 |
| B2-E2-Fc | 96.78%                     | 95.99%         | 94.74%          |

实施例 8. 构建双特异性抗体及应用

(1) 双特异性抗体构建

按表 8 所示的双特异性抗体氨基酸序列, 进行 DNA 编码的逆向翻译和 DNA 片段的合成, 构建至表达载体 pcDNA3.1 中, 瞬时转染至 293 或者 CHO 细胞中表达。收获上清进行蛋白纯化, 获得纯度不低于 95% 的双特异性抗体 Y400C 和 Y400E。具体载体构建, 瞬时转染和蛋白纯化方法参加前述的各实施例。所述双特异性抗体的结构为: 包含轻链和重链, 其中轻-重链配对并形成链间二硫键, 两个重链配对并形成链间二硫键, 其中重链为(VH)-(CH1)-(铰链区)-(Fc)-(连接肽)-(VHH), 轻链为(VL)-(轻链恒定区), VH 和 VL 为抗 VEGF 抗体的重链和轻链可变区, VHH 为抗 ANG2 重链单域抗体的可变区。

表 8: 双特异性抗体氨基酸序列 (Numbering scheme IMGT)

| 双特异性抗体 | 链  | 结构域                 | 氨基酸序列 (下划线为 CDR 区, 方框内为突变位点)                                                                                                                                                                                                                                                                        | SEQ ID NO |
|--------|----|---------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Y400C  | 重链 | 抗 VEGF 重链可变区 (VH)   | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GYDFTHY</u><br><u>GMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT</u> YAA<br>DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYY<br><u>CAKYPYYYGTSHWYFDV</u> WGQGTLLTVSS<br>HCDR1: <u>GYDFTHY</u> (SEQ ID NO:50)<br>HCDR2: <u>INTYTGEPT</u> (SEQ ID NO:51)<br>HCDR3 : <u>AKYPYYYGTSHWYFDV</u> (SEQ ID NO:53) | 24        |
|        |    | CH1                 | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE<br>PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC                                                                                                                                                                                     | 25        |
|        |    | 铰链区                 | DKTHTCPPCP                                                                                                                                                                                                                                                                                          | 26        |
|        |    | Fc 恒定区              | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTV<br>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV<br>LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG                                                    | 29        |
|        |    | 连接肽                 | GGGGS                                                                                                                                                                                                                                                                                               | 30        |
|        |    | 抗 ANG2 重链单域抗体 (VHH) | EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCVAS <u>GFPSGF</u> <u>TFS</u><br><u>DYQ</u> MYWYRQAPGKERELVAI <u>ISNDGLRK</u> TYAD<br>SVKGRFTISRDNKNTMFLQMNSLKPEDTAVYV<br><u>CNVRANR</u> <u>DD</u> WGQGTQVTVSS                                                                                                                 | 4         |
|        | 轻链 | 抗 VEGF 轻链可变区 (VL)   | DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSAS <u>QDISNY</u> LN<br>WYQQKPGKAPKVLIIY <u>FT</u> SSLHSGVPSRFSGSGSG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYSTVPWT</u> FGQG<br>TKVEIK<br>LCDR1: <u>QDISNY</u> (SEQ ID NO:54)<br>LCDR2: <u>FTS</u> (SEQ ID NO:58)<br>LCDR3: <u>QQYSTVPWT</u> (SEQ ID NO:59)                            | 27        |
|        |    | 轻链恒定区               | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR<br>EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSPVTKS                                                                                                                                                                                       | 28        |

|       |    |               |                                                                                                                                                                                                                                                    |    |
|-------|----|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
|       |    |               | FNRGEC                                                                                                                                                                                                                                             |    |
| Y400E | 重链 | 抗 VEGF 重链可变区  | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GYDFTHY</u><br><u>GMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTYAA</u><br>DFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYY<br>C <u>AKYPYYYGTSHWYFDV</u> WGQGTLLTVSS                                                                                    | 24 |
|       |    | CH1           | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP<br>EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV<br>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS<br>C                                                                                                                                | 25 |
|       |    | 铰链区           | DKTHTCPPCP                                                                                                                                                                                                                                         | 26 |
|       |    | Fc 恒定区        | APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVTVV<br>DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY<br>NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL<br>PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV<br>SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV<br>LDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHE<br>ALHNHYTQKSLSLSPG | 29 |
|       |    | 连接肽           | GGGGSGGGGSGGGGS                                                                                                                                                                                                                                    | 47 |
|       |    | 抗 ANG2 重链单域抗体 | EVQLVESGGGLVQPGESLRLSCVAS <u>GFPSGFTFS</u><br><u>DYQMYWYRQAPGKERELVAIISNDGLRKTYAD</u><br>SVKGRFTISRDNKNTMFLQMNSLKPEDTAVYV<br>C <u>NVRRANRDDW</u> GQGTQVTSS                                                                                         | 4  |
|       | 轻链 | 抗 VEGF 轻链可变区  | DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSAS <u>QDISNYLN</u><br>WYQQKPGKAPKVLIIY <u>FTSSLHSGVPSRFS</u> SGSGG<br>TDFTLTISSLQPEDFATYYC <u>QQYSTVPWTF</u> GQG<br>TKVEIK                                                                                                  | 27 |
|       |    | 轻链恒定区         | RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPR<br>EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYS<br>LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS<br>FNRGEC                                                                                                                           | 28 |

(2) 双特异性抗体的热稳定性考察

将双特异性抗体放置在 40 度培养箱处理 14 天或者 28 天后进行该样品的 HPLC-SEC 检测。结果发现，本发明抗体分子在经 40℃ 处理 28 天后未出现聚集或降解现象，纯度变化小于 4%，说明其在 40℃ 环境中能保持稳定性，如表 9 所示。

表 9：抗体热稳定性评估结果

| 样品    | 热稳定性检测，40℃ 处理  |                 |                 |
|-------|----------------|-----------------|-----------------|
|       | Day 0 SEC 检测纯度 | Day 14 SEC 检测纯度 | Day 28 SEC 检测纯度 |
| Y400C | 98.24%         | 97.20%          | 99.10%          |
| Y400E | 97.90%         | 96.93%          | 99.27%          |

结果显示，双抗体分子 Y400C 和 Y400E 均具有良好热稳定性。

(3) 双特异性抗体与 hANG2 的结合

用 Sensor Chip ProteinA 芯片（GE，货号：28995056）捕获供试抗体，抗原人 ANG2 蛋白（623-AN-025/CF，R&D）作为分析物检测其与供试品结合的动力学和亲和力数据。抗原与供试品结合的检测起始浓度为 10 nM，在此基础上，2 倍梯度稀释，即抗原稀释的浓度分别为 10 nM、5 nM、2.5 nM、1.25 nM、0.625 nM，抗原依次从低浓度到高浓度开始进样，并设置 1 个阴性对照(即 1×HBS-EP+ buffer)和 1 个重复浓度(一般为最低浓度重复)，进样前至少进行 3 次 Start up（1×HBS-EP+ buffer）的冲洗流程以平衡系统，检测抗原与供试品的结合和解离趋势，当解离完成后，再生试剂进样，对芯片进行再生，芯片再生完成后，进行下一个浓度的检测。检测完成后，利用数据分析软件（Biacore T200 Evaluation Software）中的 1:1 Binding 拟合方式进行数据拟合试验结果见表 10。

表 10：抗体对人 ANG2 亲和力检测结果

| 样品    | 抗原    | ka(1/Ms)  | kd(1/s)   | KD(M)     |
|-------|-------|-----------|-----------|-----------|
| Y400C | hANG2 | 1.142E+06 | 6.224E-04 | 5.450E-10 |
| Y400E |       | 1.928E+06 | 8.731E-04 | 4.529E-10 |

与人 ANG2 的亲和力检测结果显示，双特异性抗体对人 ANG2 具有较强的亲和力。

（4）双特异性抗体抑制 hANG2 与 HUVEC 细胞的结合

将生长状态良好的 HUVEC 细胞（H-003，Allcells）用制备成单细胞悬液。细胞计数后，以 10<sup>5</sup> 个细胞/孔铺入 96 孔板；固定人 ANG2 蛋白（623-AN-025/CF，R&D）的终浓度 10μg/ml，各孔按照实验设计分别加入待测抗体，抗体最高浓度为 1000nM，依次 5 倍稀释，共设置 7 个浓度梯度，同时设置空白对照和阳性对照 RG7716（ATAD00534，Atagenix）；将细胞置于室温孵育 30min 后，各孔细胞洗 3 次、重悬后，加入荧光标记二抗 PE anti-His（362603，Biolegend），室温避光孵育 30min；各孔细胞洗涤 3 次、重悬后流式上机检测。如图 4 所示，双特异性抗体 Y400C 和 Y400E 对 ANG2 与 HUVEC 细胞的阻断活性优于对照阳性抗体。

表 11：抗体抑制人 ANG2 与 HUVEC 结合的生物学活性

| 样品       | IC50 (nM) |
|----------|-----------|
| Y400C    | 19.43     |
| Y400E    | 30.29     |
| B2-E2-Fc | 11.19     |
| RG7716   | 53.87     |

（5）双特异性抗体不抑制 hANG1 与 HUVEC 细胞的结合

在 ANG1/ANG2-TIE2 这个信号通路相关的生物学功能中，保存 ANG1 活性对某些抗血管生成的治疗是有益的。因此本发明中的抗体特异性结合 ANG2 但不结合 ANG1，同时只抑制 ANG2 和其受体 TIE2 的结合但不抑制 ANG1 和其受体 TIE2 的结合。本发明的抗体在抑制 ANG2 的促血管生成活性和治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病和病症中特别有用。

将生长状态良好的 HUVEC 细胞（H-003，Allcells）用制备成单细胞悬液。细胞计数后，以 10<sup>5</sup> 个细胞/孔铺入 96 孔板；固定人 ANG1 蛋白（623-AN/CF，R&D）的终浓度 10μg/ml，各孔按照实验设计分别加入待测抗体，抗体最高浓度为 1000nM，依次 5 倍稀释，共设置 7 个浓度梯度，同时设置空白对照和阳性对照 hTIE2-Fc（Novoprotein，CW98）；将细胞置于室温孵育 30min 后，各孔细胞洗 3 次、重悬后，加入荧光标记二抗 PE anti-His（362603，Biolegend），室温避光孵育 30min；各孔细胞洗涤 3 次、重悬后流式上机检测。如图 5 所示，双特异性抗体 Y400C 和 Y400E 对 ANG1 与 HUVEC 细胞没有结合阻断活性。

（6）双特异性抗体抑制 hANG2 依赖的 HUVEC 细胞的 AKT 磷酸化

HUVEC 细胞表面天然表达 ANG2 蛋白的受体，当 ANG2 与细胞表面受体结合，会激活 AKT 磷酸化反应。Phospho-AKT 分析试剂盒（64AKSPE1-1，Cisbio）包含两种标记抗体：一种带有供体荧光团，另一种带有受体。选择第一抗体的原因在与其与蛋白质上磷酸化基序的特异性结合，第二抗体是由于其识别蛋白质的能力独立于其磷酸化状态而选择的。蛋白质的磷酸化使免疫复合物的形成既涉及标记的抗体，又使供体的荧光团与受体紧密接近，从而产生信号。在本实验中，HUVEC 细胞与连续稀释的样品和固定浓度的 ANG2 共孵育。通过 HUVEC 细胞的 AKT 磷酸化程度，评估 ANG2 功能活性以及样品对 ANG2 功能活性的抑制作用。将生长状态良好的 HUVEC 细胞（70013502，ATCC）制备成单细胞悬液。细胞计数后，以 10<sup>5</sup> 个细胞/孔铺入 96 孔板；固定人 ANG2 蛋白（623-AN-025/CF，R&D）的终浓度 10μg/ml，各孔按照实验设计分别加入待测抗体，抗体最高浓度为 1000nM，依次 5 倍稀释，共设置 8 个浓度梯度，同时设置空白对照和阳性对照 RG7716（ATAD00534，Atagenix）；将细胞置于 37 度孵育 10min 后，移去孔内上清，加入裂解液后，室温震荡孵育 30min，吸取细胞裂解液至 384 孔板，加入检测试剂避光孵育 4 小时，使用 PHERAstar 进行检测。如图 6 所示，双特异性抗体 Y400C 和 Y400E 对 hANG2 依赖的 HUVEC 细胞的 AKT 磷酸化抑制活性优于对照阳性抗体。

表 12：抗体抑制人 ANG2 依赖的 HUVEC 细胞的 AKT 磷酸化

| 样品     | IC50 (nM) |
|--------|-----------|
| Y400C  | 1.262     |
| Y400E  | 2.269     |
| RG7716 | 27.31     |

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

## 权 利 要 求

1. 抗 ANG2 重链单域抗体, 其包含 SEQ ID NO:1-10 任一项所示的重链可变区包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3, 或其变体,

优选地, 按照 IMGT 编号系统, 包含选自以下各项组成的组的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3:

(1) SEQ ID NO:21 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:22 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:23 所示的 HCDR3,

(2) SEQ ID NO:34 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:35 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:36 所示的 HCDR3,

(3) SEQ ID NO:37 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:38 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:39 所示的 HCDR3,

(4) SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3, 或 SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1、SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 的变体, 及其组合, 所述变体为与 SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 相比分别具有一个或多个(优选 1 个、2 个或 3 个)保守氨基酸突变(优选置换, 插入或缺失)并保留与 ANG2 结合亲和力的氨基酸序列,

优选地, SEQ ID NO:40 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3, 其中 SEQ ID NO:40 所示的 CDR1 中第 5-8 位和第 10-11 位氨基酸、SEQ ID NO:41 所示的 CDR2 中第 2-5 位氨基酸和第 7 位、SEQ ID NO:42 所示的 CDR3 第 1 位氨基酸、第 3-8 位氨基酸选自氨基酸 X, 所述氨基酸 X 选自 Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr 和 Val 组成的组,

优选地, SEQ ID NO:40 所示 HCDR1 的变体, 其中第 1 位的甘氨酸 G 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Val, Leu 和 Ile; 第 2 位的苯丙氨酸 F 可以被 Tyr 替换; 第 3 位的脯氨酸 P 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Trp 和 His; 第 4 位的 Ser 可以被 Thr 替换; 第 9 位的 Ser 可以被 Thr 替换; 第 12 位的 Gln 可以被 Asn 替换;

SEQ ID NO:41 所示的 HCDR2 的变体, 第 1 位的 Ile 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Val, leu 和 Gly; 第 6 位的 Leu 可以被 Ile 替换; 第 8 位的 Lys 可以被 Arg 替换;

SEQ ID NO:42 所示的 HCDR3 的变体, 其中第 2 位的 Val 可以被选自以下各项组成的组的氨基酸替换: Ala, Gly, Leu 和 Ile; 第 9 位的 Asp 可以被 Glu 替换,

(5) SEQ ID NO:43 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:45 所示的 HCDR3,

(6) SEQ ID NO:46 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID

NO:48 所示的 HCDR3,

(7) SEQ ID NO:49 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:48 所示的 HCDR3,

(8) SEQ ID NO:52 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:44 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:48 所示的 HCDR3, 和

(9) SEQ ID NO:55 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:56 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:57 所示的 HCDR3。

2. 权利要求 1 所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 其中所述 ANG2 选自人 ANG2、兔 ANG2、或猴 ANG2。

3. 权利要求 1 或 2 所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 其包含重链可变区, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO:1-10 任一项所示的序列或与 SEQ ID NO:1-10 任一项所述的序列具有至少 80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同源性且具有 ANG2 结合活性的序列, 或由其组成。

4. 重组蛋白, 其包含权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 优选地, 所述重组蛋白进一步包含生物活性物质, 如具有酶活性的毒素或其活性片段(如相思豆毒蛋白, 蓖麻毒蛋白 A, 假单胞菌外毒素或白喉毒素), 肿瘤坏死因子或干扰素(如 IFN- $\gamma$ ), 生物反应调节物(如淋巴因子, IL-2, IL-2, IL-2-6, IL-10, 粒 GM-CSF), Fc 片段(如来自 IgG(例如 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 的 Fc 区, 例如来自人、兔或猴的 IgG, IgA1, IgA2, IgD, IgE 或 IgM 的 Fc 区), 优选地, 所述抗 ANG2 重链单域抗体和所述 Fc 片段通过连接肽连接, 优选地, 所述连接肽为 (GGGGS) $n$ ,  $n=1$ 、2 或者 3, 优选地, 所述 Fc 片段为人 IgG1 重链恒定区, 更优选为 GenBank No. AK303185.1 所示的 Fc 片段, 更优选地, 所述重组蛋白包含 SEQ ID NO:11-20 所示的序列或由其组成。

5. 多特异性抗体, 优选双特异性抗体, 其包含权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体, 优选所述双特异性抗体的结构为: 包含轻链和重链, 其中轻-重链配对并形成链间二硫键, 两个重链配对并形成链间二硫键, 其中重链为 (VH)-(CH1)-(铰链区)-(Fc)-(连接肽)-(VHH), 轻链为 (VL)-(轻链恒定区)。

6. 权利要求 5 所述的多特异性抗体, 其中 VHH 为权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 单域抗体, VH 和 VL 为第二种抗体的重链和轻链可变区, 优选所述第二种抗体针对的抗原选自免疫细胞表面抗原、肿瘤抗原、病毒、细菌、内毒素、细胞因子、或其组合; 更优选地选自: PD-L1, PD-1, VEGFA, IL-10, IL-10R, BCMA, VEGF, TGF- $\beta$ , CTLA-4, LAG-3, TIGIT, CEA, CD38, SLAMF7, B7-H3, Her2, EpCAM, CD19, CD20, CD30, CD33, CD47, CD52, CD133, EGFR, GD2, GD3, GM2, RANKL, CD3, 和/或 CD16a, 优选第二种抗体针对的抗原为 VEGF, 更优选第二抗体选自抗 VEGF 抗体, 其包含 SEQ ID NO:24 所示的重链可变区包含的 HCDR1, HCDR2 和 HCDR3(优选按照 IMGT 编号系统,

包含 SEQ ID NO:50 所示的 HCDR1, SEQ ID NO:51 所示的 HCDR2 和 SEQ ID NO:53 所示的 HCDR3) 和 SEQ ID NO:27 所示的轻链可变区包含的 LCDR1, LCDR2 和 LCDR3(优选按照 IMGT 编号系统, 包含 SEQ ID NO:54 所示的 LCDR1, SEQ ID NO:58 所示的 LCDR2 和 SEQ ID NO:59 所示的 LCDR3), 更优选, 所述抗 VEGF 抗体的重链可变区包含 SEQ ID NO:24 所示的序列或与 SEQ ID NO:24 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的序列, 或由其组成; 所述抗 VEGF 抗体的轻链可变区包含 SEQ ID NO:27 所示的序列或与 SEQ ID NO:27 所示的序列具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%同源性的序列, 或由其组成。

7. 权利要求 5 或 6 所述的多特异性抗体, 其中 CH1 的序列如 SEQ ID NO:25 所示, 铰链区的序列如 SEQ ID NO:26 所示, Fc 恒定区的序列如 SEQ ID NO:29 所示, 连接肽的序列如 SEQ ID NO:30 或 47 所示, 轻链恒定区的序列如 SEQ ID NO:28 所示。

8. 多核苷酸, 其编码权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 或权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体。

9. 载体, 其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。

10. 宿主细胞, 其包含权利要求 9 所述的载体。

11. 偶联物, 其包含权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 或权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体, 以及偶联部分, 其中, 所述偶联部分为纯化标签(如 His 标签)、可检测的标记、药物、毒素、细胞因子、酶、或其组合; 优选地, 所述偶联部分为放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质、化疗剂、生物毒素、聚乙二醇或酶。

12. 试剂盒, 其包括包含权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体或权利要求 11 所述的偶联物; 优选地, 所述试剂盒还包括特异性识别权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体或权利要求 11 所述的偶联物的抗 ANG2 重链单域抗体、重组蛋白或多特异性抗体; 任选地, 所述抗 ANG2 重链单域抗体、重组蛋白或多特异性抗体还包括可检测的标记, 例如放射性同位素、荧光物质、化学发光物质、有色物质或酶; 优选地, 所述试剂盒用于检测 ANG2 在样品中的存在或其水平; 或者

所述试剂盒包含(1) 权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体或权利要求 11 所述的偶联物, 和(2) 针对其它抗原的抗体或其抗原结合片段, 和/或细胞毒性剂, 和/或化疗药, 和任选地, 使用说明书。

13. 药物组合物, 其包含权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白, 权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体或权利要

求 11 所述的偶联物；可选地，所述药物组合物还包括药学上可接受的载体和/或赋形剂；优选地，所述药物组合物为适于通过皮下注射、皮内注射、静脉内注射、肌肉注射或病灶内注射施用的形式。

14. 权利要求 1-3 任一项所述的抗 ANG2 重链单域抗体、权利要求 4 所述的重组蛋白，权利要求 5-7 任一项所述的多特异性抗体或权利要求 11 所述的偶联物在抑制 ANG2 的促血管生成活性、预防和/或治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病例如眼底新生血管性疾病、类风湿性关节炎和银屑病，和/或肿瘤中的用途，或在制备用于抑制 ANG2 的促血管生成活性、预防和/或治疗由血管生成过程导致的或与其相关的疾病例如眼底新生血管性疾病、类风湿性关节炎和银屑病和/或肿瘤的药物中的用途。