三特异性融合蛋白及其用途

技术领域

本发明涉及多特异性融合蛋白领域，更具体地涉及特异性结合 VEGF A、VEGF C 和 Ang2 的三特异性融合蛋白。本发明也涉及编码所述蛋白的多核苷酸、表达载体和宿主细胞，及其药物组合物，和治疗新生血管化相关疾病的方法和用途。

背景技术

血管内皮生长因子（VEGF）是成人中健康和疾病期间血管发育和血液及淋巴管功能的主要调节因子。目前已知 VEGF 家族由五个结构相关因子组成：VEGFA，VEGFB，VEGFC，VEGFD 和胎盘生长因子（PlGF）。VEGF 家族成员主要以同型二聚体多肽形式存在，通过与相关 VEGF 受体结合来诱导信号传导和引发相应的生物学效应。

血管内皮生长因子 A(VEGF-A)有多种同种型，包括 VEGF121、VEGF145、VEGF165、VEGF183、VEGF189 和 VEGF206。这些同种型由选择性剪接生成，其中 VEGF165 是主要同种型。VEGF-A 通过与酪氨酸激酶受体 VEGFR-1 和 VEGFR-2 相互作用，参与血管发生过程。已经提出阻断 VEGF-A 通路来改善与新生血管化相关的疾病。此类 VEGF-A 阻断剂/拮抗剂包括：靶向 VEGF-A 的中和性抗体、和阻止 VEGF-A 与其正常受体结合的可溶性诱饵受体和 Trap 分子。Aflibercept (也称作阿柏西普，VEGFA-Trap，商品名 Elyea)是一种由来自人 VEGF 受体 1 和 2 的配体结合胞外结构域与人 IgG1 Fc 区融合形成的重组融合蛋白，已被批准用于治疗新生血管化相关的视网膜疾病如老年黄斑变性，并正在临床试验中用于实体瘤治疗。

血管内皮生长因子 C(VEGF-C) 与 VEGF-165 有大约 30%的序列同源性。VEGF-C 通过结合酪氨酸激酶受体 VEGFR2 和 VEGFR3 发挥作用，参与新生血管化过程以及淋巴管生成。VEGFR2 在血管内皮细胞上表达，其也结合 VEGF-A。VEGFR3 在血管内皮细胞和淋巴管细胞上表达，但不结合 VEGF-A。在多种转移性肿瘤模型中，VEGF-C/VEGFR3 信号通路阻断剂被用于抑制肿瘤的淋巴管发生和转移。此外，VEGF-C Trap 分子，例如 Opthea 有限公司开发的 OPT-032（由来自 VEGFR3 的配体结合胞外结构域构建的 VEGFC/D 抑制剂），被提出用于新生脉管化相关的视网膜病变治疗。

除 VEGF 家族之外，人血管生成素(ANG)也被认为参与血管发育和出生后的血管发生。血管生成素 2（也称作 Angiopoietin-2, ANGPT2,或 Ang2）是血管生成素家族的成员之一。该蛋白作为一种分泌型糖蛋白，由 3 个部分组成：分泌信号肽、N 端螺旋卷曲结构域(CCD)以及 C 端纤维蛋白原样结构域(FLD)。血管生成素蛋白的 FLD 结构域具有高度保守性，负责与 Tie2 受体结合。使用急性眼炎症模型和脉络膜新生血管模型(CNV 模型)的临床前研究，已经表明 ang-2 和 VEGF 协同参与该病理性新生血管化和血管通透性。因此，在抗 VEGF 治疗外，Tie2/血管生成素通路也已经被提出作为血管相关视网膜病变的治疗靶标。例如，抗 Ang2 抗体 Nesvacumab（Regeneron, Tarrytown, NY, USA）与 aflibercept（抗 VEGF-A）的组合，被用于治疗新生血管性年龄相关黄斑变性(nAMD)和糖尿病性黄斑水肿(DME)。此外，抗 VEGF-A/ang2 双特异性抗体 Faricimab（由 Roche, Basel, Switzerland 和 Genentech, South San Francisco, CA, USA 共同开发），也被提出用于 nAMD 和 DME 治疗。

已经知晓多种疾病过程牵涉异常的血管通透性和血管发生，包括例如癌症，自身免疫，和视网膜病变等。阻断血管发生信号通路的现有药物的开发，已经为一部分疾病患者带来了治疗益处。但此类疾病的治疗仍面临着诸如药物可及性、疗效、患者依从性、和治疗负担等多个方面的挑战。因此，本领域仍亟需能够有效地靶向和改善异常血管发生过程的新药物分子，以满足治疗需求。

发明内容

为满足上述需求，本发明人设计并开发了一种能够特异性靶向和结合 VEGF-A、VEGF-C 和 ANG2 的三特异性融合蛋白分子。本发明的三特异性分子表现出对各靶点抗原的较强结合和阻断作用；并在动物模型中表现出良好的抗新生血管化作用。在此基础上，本发明人建立了本发明。

因此，在第一方面，本发明提供了一种三特异性融合蛋白，其包含：

含有(i) VEGF-C 结合结构域；(ii) ANG2 结合结构域和(iii) VEGF-A 结合结构域的多肽链，

其中，所述 VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域分别包含或由特异性结合 VEGF-C 或 ANG2 的 VHH 结构域组成， 且

其中，所述 VEGF-A 结合结构域包含或由特异性结合 VEGF-A 的配体捕获结构域组成，其中所述配体捕获结构域包含来自 VEGFR 的胞外结构域，

其中，优选地，所述多肽还包含(iv)二聚化结构域，尤其是选自铰链区、CH3 区和 Fc 区的二聚化结构域。

在一些实施方案中，所述多肽包含铰链区。在另一些实施方案中，所述多肽包含 CH3 区，且优选地所述多肽包含在 N 端具有铰链区的 CH3 区。在再一些实施方案中，所述多肽包含 Fc 区，且优选地所述多肽包含在 N 端具有铰链区的 Fc 区。在一些实施方案中，所述铰链区包含 CPPC 或 CPPCPPC 氨基酸序列，优选地所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列，更优选 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述 Fc 区是人 IgG1、IgG2、 IgG3 或 IgG4 的 Fc 区。在一些实施方案中，所述 CH3 区是人 IgG1、IgG2、 IgG3 或 IgG4 的 CH3 区。

在再一方面，本发明提供编码本发明三特异性融合蛋白的多核苷酸、载体、宿主细胞；以及包含本发明分子的药物组合物、药物联合和试剂盒。

在再一方面，本发明提供本发明三特异性融合蛋白用于治疗或用作药物、或本发明三特异性融合蛋白用于预防和/或治疗疾病或用于制备预防和/或治疗疾病的药物的用途，所述疾病为例如新生脉管化相关疾病，如肿瘤和眼部疾病。

在再一方面，本发明也提供本发明分子三特异性融合蛋白的诊断用途。

在再一方面，本发明也提供了一种具有独特构型的多特异性融合蛋白，其中所述融合蛋白包含：

含有分别特异性结合第一抗原的第一 VHH 结构域、特异性结合第二抗原的第二 VHH 结构域和特异性结合第三抗原的配体捕获结构域的多肽链，其中所述多肽还包含选自铰链区、CH3 区或 Fc 区的二聚化结构域。在一些优选的实施方案中，所述二聚化结构域为铰链区，且优选地，其中所述铰链区连接在配体捕获结构域的 C 末端。

在再一方面，本发明也提供了一种铰链区，其包含或由选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列组成，且优选地包含或由 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列组成。

附图说明

图 1A 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白在蛋白 A 一步纯化后的 SDS-PAGE 纯度检测。NR 表示在非还原性上样缓冲液中处理的蛋白样品；R 表示在还原性上样缓冲液中处理的蛋白样品。

图 1B 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白在蛋白 A 一步纯化后的 SEC-HPLC 纯度检测。

图 2 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 VEGF A 诱导的 HEK 293 KDR 报道分子激活实验。

图 3 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 VEGF C 诱导的 HEK 293 KDR 报道分子激活实验。

图 4 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 VEGF C 诱导的 Baf3-FLT4 增殖实验。

图 5 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 Ang2 与 Tie2 结合的 ELISA 阻断实验。

图 6 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 Ang2 与 Tie2 表达细胞结合的阻断实验。

图 7 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制 Ang2 诱导的 Tie2 磷酸化实验。

图 8 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制 VEGF A+C 诱导的 HUVEC 增殖实验。

图 9 显示，在 A375 皮下瘤模型新生血管形成实验中，不同给药方式下的 A375 肿瘤体积随时间的变化量。

图 10 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制激光诱导的脉络膜新生血管化眼底造影图像。

图 11 显示，在激光诱导的 CNV 模型中在给药第 5 天通过 FFA 测量的渗漏面积改善率(%)。

图 12 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制 DL-AAA 诱导的视网膜新生血管化(RNV)。

图 13 显示，抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制血管渗漏。

图 14 显示，根据本发明的抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白的示例性构型，其中 VHH1 和 VHH2 分别独立地表示 VEGFC 结合结构域或 ANG2 结合结构域，配体捕获结构域表示来自 VEGF 受体的 VEGA 配体捕获结构域。

发明详述

除非另外限定，否则本文中所用的全部技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文所提及的全部出版物、专利申请、专利和其他参考文献通过引用的方式完整地并入。此外，本文中所述的材料、方法和例子仅是说明性的并且不意在是限制性的。本发明的其他特征、目的和优点将从本说明书及附图并且从后附的权利要求书中显而易见。

定义

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

如本文中所用，术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其他要素、整数或步骤。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗原结合结构域时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗原结合结构域。

如本文所用，术语“融合蛋白”是指包含至少一条由至少两个异源多肽序列，任选地通过连接肽，融合形成的多肽链的蛋白质。融合蛋白可以通过重组表达产生，并可以为包含一条或多条所述多肽链的单体或多聚体(例如二聚体)形式。在一个实施方案中，本发明的融合蛋白为由两条相同的多肽链形成的二聚体蛋白。

术语“异源”在涉及构成融合蛋白的多肽链时是指，所述多肽链包含两个或更多个子序列，这些子序列在自然界中并不存在于同一蛋白或多肽中。

术语“重组”在本文中是指多肽或蛋白通过生物宿主产生。所述宿主可以选自，包括但不限于，哺乳动物表达系统，昆虫细胞表达系统，酵母表达系统和细菌表达系统。在一个实施方案中，本发明的多肽/蛋白是在原核生物(例如大肠杆菌细胞)或真核生物宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞)中表达产生的重组多肽/蛋白。

如本文所用，术语“单特异性”指，具有一个或多个抗原结合位点的多肽/蛋白分子，所述抗原结合位点中的每一个位点与相同抗原的相同表位结合。

如本文所用，术语“多特异性”指，具有与不同表位(同一抗原上的不同表位或不同抗原上的不同表位)结合的至少两个抗原结合位点的多肽/蛋白分子。在一些实施方案中，本发明提供三特异性融合蛋白，所述融合蛋白包含至少一条多肽链，所述多肽链包含对三个不同抗原 VEGF-A、VEGF-C 和 ANG2 具有结合特异性的抗原结合位点。

如本文所用的术语“抗原结合位点”与“抗原结合结构域”可以互换使用，表示分子中与目的抗原实际结合的区域。抗原结合位点的示例包括例如不限于，抗体的可变结构域、受体的胞外配体结合结构域等。优选地，用于本发明三特异性融合蛋白中的 VEGFC 抗原结合位点由抗 VEGFC 重链抗体的可变结构域(即，“VHH”)提供；用于本发明三特异性融合蛋白中的 ANG2 抗原结合位点由抗 ANG2 重链抗体的可变结构域(即，“VHH”)提供；用于本发明三特异性结合蛋白中的 VEGFA 抗原结合位点由 VEGFA 配体捕获结构域（即，特异性结合 VEGFA 的 VEGF 受体胞外结构域多肽片段）提供、或由人工配体“mini-Trap”结构域提供。

术语“VHH 结构域” 在本文中用于指，从缺乏轻链的重链抗体衍生的重链可变结构域，也称作单可变域片段或纳米抗体片段。VHH 结构域与四链免疫球蛋白的常规 VH 结构域不同，其无需与轻链可变结构域配对来形成抗原结合位点。这种 VHH 结构域可以衍生自骆驼科物种(例如骆驼、羊驼、单峰驼、驼羊和原驼)中产生的重链抗体。除骆驼科之外的其他物种也可以产生天然缺乏轻链的重链抗体，包含这类重链抗体中的 VHH 结构域也在本发明的考虑范畴中。与常规四链 IgG 抗体中的重链可变区(VH)相同，重链抗体的可变结构域（即，VHH 结构域）是负责抗体与抗原结合的结构域，在结构上也由三个互补决定区(CDR)和 4 个保守的框架区(FR)组成，从氨基端到羧基端以如下顺序排列：FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。在一些情况下，对于 VHH 结构域的治疗应用，期望的是降低其免疫原性。因此，优选地，在一个实施方案中，本发明使用的 VHH 结构域是人源化 VHH 结构域或其进一步序列优化的形式(例如，以增加结合亲和力的亲和力成熟形式)。

如本文所用，术语配体“Trap”分子是指，包含与所述配体相互作用的受体蛋白的胞外结构域以及与之融合的免疫球蛋白 Fc 区的融合蛋白。目前已经从 VEGF 受体开发出多种“捕获”VEGF 配体，包括 VEGFA 和 VEGFC 的 trap 分子。这些 Trap 分子可以用于结合细胞外环境中的相应配体并降低其浓度。

在本文中，术语“配体捕获结构域”与配体“mini-Trap”结构域可互换使用，是指区别于 Trap 分子不含有免疫球蛋白 Fc 区的多肽片段，其由或主要由来自(至少一种)受体蛋白的配体相互作用胞外结构域组成。应当理解，包含在配体捕获结构域和 mini-Trap 结构域中与配体相互作用的受体胞外结构域，可以是天然序列形式或修饰序列形式，例如来自一种受体的天然胞外结构域序列、或由来自不同受体的胞外结构域组成的杂合胞外结构域序列，或在天然胞外结构域或杂合胞外结合域上引入了氨基酸突变的变体序列。在一个实施方案中，本发明的 VEGFA 结合结构域包含或由“捕获”VEGFA 的 mini-trap 结构域组成。该 mini-trap 结构域能够与天然 VEGFA 细胞受体竞争结合 VEGFA，从而抑制 VEGFA 诱导的信号传导。在一个实施方

案中，结合 VEGFA 的 mini-trap 结构域具有不超过 350 个氨基酸的长度，优选不超过 250 个氨基酸长度。在一个实施方案中，结合 VEGFA 的 mini-trap 结构域通过将来自 VEGF 受体 1 和 2 的胞外配体结合结构域融合而形成，且优选地具有来自人的氨基酸，从而最小化分子在人体中的免疫原性。

在本文中，术语 “连接肽”、“柔性连接肽”或“接头”是指由氨基酸组成的长度不超过 50 个氨基酸残基的短氨基酸序列，例如单独或组合使用的甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)、和/或来自免疫球蛋白天然铰链区或其截短和/或修饰形式的铰链区序列。在一个实施方案中，连接肽具有 5-50 个氨基酸长度，例如，10、15、20、25、30 个氨基酸长度。在一个实施方案中，连接肽包含氨基酸序列$(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 55)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数。在一个实施方案中，连接肽包含氨基酸序列 $TS(G_4S)_n$ (SEQ ID NO: 56),其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数。在一个实施方案中，连接肽包含氨基酸序列 $G(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 57),其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数。在一个实施方案中，连接肽包含氨基酸序列(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)或(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59),其中 n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数，例如，n 是 2 或 3 的整数。在再一实施方案中，连接肽包含铰链区，例如具有 CPPC (SEQ ID NO: 60)或 CPPCPPC (SEQ ID NO: 61)氨基酸序列的铰链区。在再一些实施方案中，连接肽还包含位于铰链区 C 末端的长度 5-15 个，例如 10 个氨基酸的短接头，尤其是由甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)组成的短接头，从而赋予包含所述连接肽的多肽在铰链区配对和二聚化的能力，并赋予连接肽两端的抗原结合结构域发挥正常功能所需的区段灵活性。

在本文中，术语“铰链区”是指来自免疫球蛋白 IgG 的天然铰链区、或至少保留了核心铰链区段的其截短形式、或其变体序列，条件是所述铰链区包含能够形成链间二硫键的至少 2 个例如 2-4 个或优选地 3 个半胱氨酸残基。铰链区中的这些半胱氨酸残基可以是原本存在于天然铰链区中的残基，或是通过氨基酸替代和/或添加而引入的残基。天然免疫球蛋白重链的铰链区是本领域熟知的，由 Fab 和 Fc 部分之间的区段构成。根据晶体学数据，天然 IgG 铰链区可以划分为上铰链区、中间(核心)铰链区和下铰链区。上铰链区为从 Fab 末端至第一重链间二硫桥的区段；核心铰链区为从第一重链间二硫桥至最后一个重链间二硫桥的多脯氨酸核心区段；下铰链区为从最后一个重链间二硫桥起至 Fc 起始残基的区段。根据 EU 编号系统，人重链 IgG1 铰链区从重链 Glu216 延伸至 Pro230 或延伸至 Gly236，其中 Cys226 至 Cys229 的多脯氨酸区段为核心区段，其将整个铰链区区分为上铰链区和下铰链区。关于免疫球蛋白铰链区的综述可参见 General Characteristics of Immunoglobulin Molecules，ROALD NEZLIN, in The Immunoglobulins, 1998，https://doi.org/10.1016/B978-012517970-6/50001-1,该文献在此并入作为参考。人免疫球蛋白 IgG 同种型 IgG1、IgG2、IgG3 和 IgG4 的铰链区序列公开在 https://www.imgt.org/IMGTScientificChart/Numbering/Hu_IGHGnber.html。本领域技术人员可以容易地通过与 IgG1 序列比对，确定其他免疫球蛋白中相应于 IgG1 残基 216-230 或残基 216-236 的铰链区序列。在本文中，术语“铰链区”不包括免疫球蛋白 Fc 区序列或其变体序列。在根据本发明的一些实施方案中，铰链区具有 4 至 25 个氨基酸长度，例如 8-22 个，尤其是 10-20 个氨基酸长度，例如 11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个或 18 个氨基酸长度。在一些优选的实施方案中，用于本发明融合蛋白多肽链的铰链区包含 CPPC 或优选地 CPPCPPC 氨基酸序列，由此两条多肽链可以通过所述铰链区配对并形成稳定的二聚体。在一些再优选的实施方案中，所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列。

在本文中，术语“Fc 区”和“Fc 结构域”在本文中可互换使用，用来定义免疫球蛋白重链的含有至少一部分恒定区的 C 端区域。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。天然的免疫球蛋白“Fc 区”包含两个或三个恒定结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。可用于本发明融合蛋白中的 Fc 区，包括但不限于，具有天然序列或变体序列的 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 Fc 区。在本文中，除非另外说明，

否则铰链区和 Fc 区以及重链的各恒定区中的氨基酸残基编号根据如 Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interes, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述的 EU 编号体系(也称作 EU 索引)进行编号。在本文中，术语“Fc 区”或“Fc 结构域”不包括免疫球蛋白的重链可变区 VH 和轻链可变区 VL 以及重链恒定区 CH1 和轻链恒定区 CL，但可以包含或不包含全部或部分的铰链区。在 Fc 区不带有天然的 N 端铰链区序列的情况下；在本发明的一些实施方案中，所述 Fc 区可以人为地在其 N 端连接如本文所定义的铰链区，例如，包含选自 SEQ ID NOs:12-19 和 45-46 的氨基酸序列的铰链区。

在本文中，术语“天然序列 Fc 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 Fc 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区包含自 Cys226 或自 Pro230 延伸至重链羧基端的氨基酸序列。然而，Fc 区的 C 端末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。在再一些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区在 N 端带有天然免疫球蛋白的铰链序列或部分铰链序列，例如根据 EU 编号，E216 到 T225 的序列或 D221 到 T225 的序列。在本文中，术语 “变体序列 Fc 区”是指，相对于天然序列 Fc 区多肽包含修饰的 Fc 区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加，缺失或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。修饰的目的可以是旨在改变由 Fc 区与其受体的结合及其由此引发的效应子功能。

在本文中，术语“CH3 区”和“CH3 结构域”在本文中可互换使用，用来定义免疫球蛋白重链的 CH3 恒定区。该术语包括天然序列 CH3 区和变体 CH3 区。可用于本发明融合蛋白中的 Fc 区，包括但不限于，具有天然序列或变体序列的 IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 的 CH3 区。

在本文中，术语“天然序列 CH3 区”涵盖天然存在的各种免疫球蛋白 Fc 区序列，例如各种 Ig 亚型以及其同种异型的 CH3 区序列(Gestur Vidarsson 等, IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, 20 October 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00520.)。在一些实施方案中，人 IgG 重链 CH3 区包含自 Gly341 延伸至重链羧基端的氨基酸序列，其中 CH3 区的 C 端末端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。在本文中，术语 “变体序列 CH3 区”是指，相对于天然序列 CH3 区多肽包含修饰的 CH3 区多肽。所述的修饰可以是氨基酸残基的添加，缺失或取代。取代可以包括天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸。修饰的目的可以是旨在改变由 CH3 区与其受体的结合及其由此引发的效应子功能。

在本文中，术语“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR” 或“高变区”，是指抗体可变结构域(VH/VL 或 VHH)中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环（“超变环”）和/或含有抗原接触残基（“抗原接触点”）的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。CDR 从 N-端开始顺序编号，通常称作 CDR1、CDR2 和 CDR3。位于重链抗体可变区（VHH 结构域）内的 CDR 有时也称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。在一个给定的重链抗体可变区氨基酸序列中，可以采用本领域公知的多种方案确定其 CDR 序列，例如：基于抗体的三维结构和 CDR 环的拓扑学的 Chothia，基于抗体序列可变性的 Kabat (Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 4 版, U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987)), AbM (University of Bath), Contact (University College London), 国际 ImMunoGeneTics database (IMGT) (国际免疫遗传学信息系统,万维网 imgt.cines.fr/)，以及基于利用大量晶体结构的近邻传播聚类(affinity propagation clustering)的 North CDR 定义（North 等，“A New Clustering of Antibody CDR Loop Con 格式ions”，Journal of Molecular Biology，406，228-256（2011））。

以下为采用 kabat、AbM、Chothia、Contact 和 IMGT 方案定义的 CDR 的区域范围。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案	IMGT 方案
LCDR1（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36	L27-L32
LCDR2（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55	L50-L51
LCDR3（Kabat 和 Chothia 编号系统）	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96	L89-L97
HCDR1（Kabat 编号系统）	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B	H26-H35B
HCDR1（Chothia 编号系统）	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35	H26-H35
HCDR2（Kabat 和 Chothia 编号系统）	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58	H51-H56
HCDR3（Kabat 和 Chothia 编号系统）	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101	H93-H102

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

此外，CDR 也可以基于与参考 CDR 序列具有相同的 Kabat 编号位置而确定。在本发明中，除非另有说明，否则当提及抗体可变区中的残基位置（包括重链可变区残基和轻链可变区残基）时，是指根据 Kabat 编号系统（Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）的编号位置。

在本文中，“分离的”蛋白或多肽（例如本发明的融合蛋白）是这样的蛋白或多肽，其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中，将蛋白或多肽纯化至超过 95%或 99%纯度，如通过例如电泳(例如，SDS-PAGE，等电聚焦(IEF)，毛细管电泳)或层析(例如，离子交换或反相 HPLC)确定的。

如本文所用，术语“VEGFA”或“VEGF-A”指血管内皮生长因子 A(例如，登录号 UniProt P15692 下的人 VEGFA 蛋白)。 VEGFA 与受体 VEGFR1(也称作 FLT1)和 VEGFR2(也称作 KDR)结合。在本文中，“针对 VEGFA 的抗原结合特异性”是指分子中特异性结合人 VEGFA 的结合位点或结合结构域。

在本文中，术语“VEGFC”或“VEGF-C”指血管内皮生长因子 C (例如，登录号 UniProt P49767 下的人 VEGFC 蛋白)。 VEGFC 与受体 VEGFR2(也称作 KDR)和 VEGFR3(也称作 FLT4)结合。在本文中，“针对 VEGFC 的抗原结合特异性”是指分子中特异性结合人 VEGFC 的结合位点或结合结构域。

在本文中，术语“ANG2”（也称作 ANGPT2 或 ANGP2）指血管生成素 2(例如，登录号 UniProt O15123 下的人 ANG2 蛋白)。 ANG2 与受体 Tie2(也称作 TEK)结合，诱导 TEK/TIE2 的酪氨酸磷酸化。ANG2 可以与 VEGF 协同促进内皮细胞迁移和增殖。在本文中，“针对 ANG2 的抗原结合特异性”是指分子中特异性结合人 ANG2 的结合位点或结合结构域。

如本文所用，术语“结合”或“特异性结合”意指结合作用对抗原是选择性的并且可以与不想要的或非特异的相互作用区别。抗原结合位点与特定抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定法(ELISA)或本领域已知的常规结合测定法测定。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物

Y 的亲和力可以通常由解离常数(KD)代表，解离常数是解离速率常数和缔合速率常数(分别是 kdis 和 kon)的比例。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

氨基酸序列的"同一性百分数(%)"是指将候选序列与本说明书中所示的具体氨基酸序列进行比对并且如有必要的话为达到最大序列同一性百分数而引入空位后，并且不考虑任何保守置换作为序列同一性的一部分时，候选序列中与本说明书中所示的具体氨基酸序列的氨基酸残基相同的氨基酸残基百分数。在一些实施方案中，本发明考虑本发明抗体分子的变体，所述变体相对于在本文中具体公开的抗体分子及其序列而言具有相当程度的同一性，例如同一性为至少 80%,85%,90%,95%, 97%, 98%或 99%或更高。所述变体可以包含保守性修饰。

对于多肽序列，"保守性修饰"包括对多肽序列的置换、缺失或添加，但不实质性改变多肽序列的期望功能活性。例如，保守性取代常常导致某个氨基酸置换为化学上相似的氨基酸。提供功能上相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。以下列出了 8 组含有互为保守替换的氨基酸：1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G)；2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q)；4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)；5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V)；6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)；7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；和 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。在一些实施方案中，术语"保守序列修饰"用于指不显著影响或改变含有氨基酸序列的本发明抗体分子或结合蛋白分子的目的抗原结合特征的氨基酸修饰。例如保守修改变体相对于亲本抗体或结合蛋白保持对目的抗原至少 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%或更高，例如 100-110%或更高的结合亲和力。

术语"宿主细胞"指已经向其中引入外源多核苷酸的细胞，包括这类细胞的子代。宿主细胞包括"转化体"和"转化的细胞"，这包括原代转化的细胞和从其衍生的子代。宿主细胞是可以用来产生本发明三特异性融合蛋白的任何类型的细胞系统，包括真核细胞，例如，哺乳动物细胞、昆虫细胞、酵母细胞；和原核细胞，例如，大肠杆菌细胞。宿主细胞包括培养的细胞，也包括转基因动物、转基因植物或培养的植物组织或动物组织内部的细胞。

术语"表达载体"是指包含重组多核苷酸的载体，其包含有效连接要表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包含足够的用于表达的顺式作用元件；用于表达的其它元件可以由宿主细胞提供或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的所有那些，包括被掺入重组多核苷酸的粘粒、质粒(例如，裸的或包含在脂质体中)和病毒(例如，慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒)。

术语"个体"或"受试者"可互换地使用，是指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如，奶牛、绵羊、猫、犬和马)、灵长类(例如，人和非人灵长类如猴)、兔和啮齿类(例如，小鼠和大鼠)。特别地，个体是人。

术语"治疗"指意欲改变正在接受治疗的个体中疾病之天然过程的临床介入。想要的治疗效果包括但不限于防止疾病出现或复发、减轻症状、减小疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低病情进展速率、改善或缓和疾病状态，以及缓解或改善预后。在一些实施方案中，本发明的抗体分子用来延缓疾病发展或用来减慢疾病的进展。

术语"抗肿瘤作用"或"抑瘤作用"指，可以通过多种手段展示的生物学效果，包括但不限于例如，肿瘤体积减少、肿瘤细胞数目减少、肿瘤细胞增殖减少或肿瘤细胞存活减少。术语"肿瘤"和"癌症"在本文中互换地使用，涵盖各种实体瘤。

在本文中，术语"新生脉管化相关疾病"或术语"新生血管化相关疾病"是指，疾病的发生、发展和/或进程涉及新生脉管发生(包括新生血管发生、新生淋巴管发生、和/或两者)的疾病、病症和/或病况。此类疾病、

病症或病况将受益于 VEGF-C、VEGF-A、ANG2、或任何两者或三者的生物活性阻断。

本发明的融合蛋白

之前已经提出多种以VEGF和血管生成素信号通路作为靶标的IgG和IgG样抗体分子,例如,抗VEGF-A、抗 VEGF-C 和抗 ANG2 的抗体和抗 VEGF 和 Ang2 的双特异性抗体。但尚未有同时阻断 VEGF A、VEGF C、Ang2 的三特异性分子的相关报道。

本发明人构建了同时对三种靶标抗原具有高结合亲合力和特异性的三特异性融合蛋白分子，证实通过单一分子对参与异常血管发生的三个主要信号通路，VEGF-A、VEGF-C 信号通路和血管生成素 2 信号通路进行靶向阻断，可以有助于遏制新生血管化相关性疾病的发展，从而在临床中使患者更多获益。并且，相比于联合给药需要多次注射，三特异性分子单次给药能够同时达到抗 VEGF A 和抗 VEGF C 和 Ang2 效果，也将有利地降低给药频率。同时，本发明的三特异性分子对三种靶标抗原的较强阻断活性，也有助于给药周期延长。

此外，在一些优选实施方案中，通过特意设计的分子形式，本发明的三特异性分子还具有成药性好和分子量较小的特点，这对于生产和治疗施用将是有利的。尤其是在眼部疾病的治疗中，往往需要药物分子作为注射液剂型通过玻璃体内给药。在相同的质量给药浓度下，较小分子量的分子可以具有相对较高的摩尔浓度，从而有助于降低给药频率、改善患者的依从性和减少治疗负担。

因此，本发明在一个方面提供了一种三特异性融合蛋白，其包含融合在一条多肽链中的(i)VEGF-A 结合结构域、(ii)VEGF-C 结合结构域和(iii)ANG2 结合结构域，其中：VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域包含或由 VHH 结构域组成；VEGF-A 结合结构域包含或由或主要由来自特异性结合 VEGFA 的 VEGF 受体胞外结合结构域组成(在本文中，也称作 VEGFA 配体捕获结构域或 mini-Trap 结构域)。在一些优选实施方案中，所述多肽链还包含 (iv)二聚化结构域，尤其是选自铰链区、CH3 区或 Fc 区的二聚化结构域。在本发明的融合蛋白的一些实施方案中，所述二聚化结构域为长度 10-20 个氨基酸的铰链区，优选地所述铰链区包含来自免疫球蛋白 IgG 的核心铰链区序列 CPPC (SEQ ID NO: 60)，或其修饰序列 CPPCPPC (SEQ ID NO: 61)，由此两条多肽链可以通过所述铰链区配对并形成稳定的二聚体融合蛋白。在另一些实施方案中，作为所述铰链区的替代，所述多肽链包含 Fc 区或 CH3 区，或在另一些实施方案中，所述多肽链包含在 N 端具有铰链区的 Fc 区或 CH3 区。在一些实施方案中，所述铰链区、CH3 区或 Fc 区存在于所多肽链的 C 末端；在另一些实施方案中，所述铰链区、CH3 区或 Fc 区位于所述多肽链的两个结合结构域之间，例如，在一些实施方案中，所述 VEGF-A 结合结构域通过所述铰链区或通过所述 CH3 区或 Fc 区在 C 端连接 VEGF-C 结合结构域或 ANG2 结合结构域或两者。在一些优选的实施方案中，本发明融合蛋白的多肽链不含免疫球蛋白 Fc 区或其修饰形式。在再一些优选的实施方案中，本发明的融合蛋白由长度 5-30 个氨基酸的连接肽和铰链区连接(i)至(iii)的结合结构域而形成。

在再一方面，本发明也提供了一种具有独特构型的多特异性融合蛋白，其中所述融合蛋白包含：

含有分别特异性结合第一抗原的第一 VHH 结构域、特异性结合第二抗原的第二 VHH 结构域和特异性结合第三抗原的配体捕获结构域的多肽链，其中所述多肽还包含选自铰链区、CH3 区或 Fc 区的二聚化结构域。优选地，所述二聚化结构域为铰链区，且优选地所述铰链区连接在配体捕获结构域的 C 末端。

用于所述多特异性融合蛋白中的铰链区可以是本文所述的任何铰链区。在一些优选方面，所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列或由其组成，更优选包含 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列，或由其组成。

除了铰链区、CH3 区或 Fc 区外，在一些方面，本发明的多特异性融合蛋白也优选包含一个或两个额

外的连接肽，以确保包含在多肽链中的各结构域能够发挥其正常功能。连接肽的序列并无特别限制，例如，所述连接肽可以是本文中描述的任何连接肽序列。在一些实施方案中，所述连接肽可以为 5-12 个氨基酸长度，优选地包含氨基酸序列(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)或者(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n=2 或 3。

因此，在一些实施方案中，本发明也提供了这样的多特异性融合蛋白，所述融合蛋白包含从 N 端到 C 端具有如下结构的多肽链：

(i) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、配体捕获结构域、铰链区、第二连接肽、第二 VHH 结构域，

(ii) 配体捕获结构域、铰链区、第一连接肽、第一 VHH 结构域、第二连接肽、第二 VHH 结构域，或

(iii) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、第二 VHH 结构域、第二连接肽、配体捕获结构域、铰链区。

在一些实施方案中，本发明也提供了这样的多特异性融合蛋白，所述融合蛋白包含从 N 端到 C 端具有如下结构的多肽链：

(i) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、配体捕获结构域、Fc 区或 CH3 区、第二连接肽、第二 VHH 结构域，

(ii) 配体捕获结构域、Fc 区或 CH3 区、第一连接肽、第一 VHH 结构域、第二连接肽、第二 VHH 结构域，或

(iii) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、第二 VHH 结构域、第二连接肽、配体捕获结构域、Fc 区或 CH3 区，

任选地，所述 Fc 区或 CH3 区在 N 端具有铰链区。

可以理解，前述实施方案中，所述第一、第二和第三抗原可以彼此不同，由此所述多特异性融合蛋白为三特异性融合蛋白；但在一些情况下，所述第一抗原和第二抗原可以相同，并由此所述多特异性融合蛋白为双特异性融合蛋白。

用于本发明多特异性融合蛋白中的第一和第二 VHH 结构域可以相同或不同，且可以针对相同或不同的靶抗原。本领域技术人员可以根据具体应用需要，选择组合使用的所述第一 VHH 结构域和第二 VHH 结构域。

用于本发明多特异性融合蛋白中的配体捕获结构域可以是来自结合所述第三抗原的天然或人工受体受体的配体相互作用结构域。例如，在一些优选方面，所述配体捕获结构域为来自 VEGFR1/2 胞外区的 VEGF-A 结合结构域。在一些更优选的方面，所述多特异性融合蛋白为根据本发明的抗 VEGFA/ANG2/VEGFC 的三特异性融合蛋白。

以下就以本发明抗 VEGFA/ANG2/VEGFC 三特异性融合蛋白为例，对构成本发明融合蛋白的组件以及示例性融合蛋白分子进行详述描述。本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，这些组件的任何技术特征的任何组合均在本发明考虑范畴之中。并且，本领域技术人员可以理解，除非上下文有明确相反指示，本发明的融合蛋白可以包含任何这样的组合特征。

VEGF-A 结合结构域

在本发明中，用于本发明融合蛋白的 VEGF-A 结合结构域由来自 VEGF 受体的配体捕获结构域或 mini-Trap 结构域提供。在一些实施方案中，所述捕获结构域或 mini-Trap 结构域包含来自 VEGF 受体(尤其是，VEGFR1 和/或 VEGFR2)的、特异性结合 VEGFA 的天然序列或人工序列胞外结构域。

VEGF 受体(VEGFR)是具有由 7 个免疫球蛋白（Ig）样结构域组成的胞外区的酪氨酸激酶受体。在本文中，Ig 样结构域从 VEGFR 蛋白的 N 端至 C 端顺序编号。例如，人 VEGFR-1 包含编号 1、2、3、4、5、

6 和 7 的七个 Ig 样结构域，Ig 样结构域 1 在胞外结构域的 N 端，Ig 样结构域 7 在胞外结构域的 C 端。VEGFR 通过 Ig 样结构域与配体相互作用。VEGFR-1（Flt-1）结合 VEGF-A、VEGF-B 和 PIGF，且可以作为 VEGF 的诱饵受体或 VEGFR-2 的调节物发挥作用。VEGFR-2（KDR/Flk-1）结合所有 VEGF 同种型，且是 VEGF 诱导的血管发生信号传导的主要中介物。VEGFR-3（Flt-4）结合 VEGF-C 和 VEGF-D，但不结合 VEGF-A，并作为淋巴管发生的中介物发挥作用。已经证实，来自受体 VEGFR1 或 VEGFR2 胞外区的部分 Ig 样结构域或其杂合形式足以起到捕获 VEGFA 配体的作用，与天然 VEGFR 竞争结合 VEGFA。关于这样的 Ig 样结构域的更详细描述可以参见，例如，美国专利号 7,531173、Yu, D.等, (2012). Mol. Ther. 20(3):938-947 和 Holash, J.等, (2002). PNAS. 99(17):11393-11398，在此以其整体引入作为参考。

在一个实施方案中，因此，根据本发明 VEGF-A 结合结构域包含来自 VEGFR1 和/或 VEGFR2 的至少一个 Ig 样结构域，例如至少 2 个或 3 个 Ig 样结构域。可用于提供本发明 VEGFA 结合结构域的 VEGFR 可以来自哺乳动物，如人、狒狒、黑猩猩、小鼠或大鼠，优选来自人。在一个实施方案中，根据本发明 VEGF-A 结合结构域包含 VEGFR-1（例如人 VEGFR-1）的 Ig 样结构域 1-3、VEGFR-1（例如人 VEGFR-1）的 Ig 样结构域 2-3、VEGFR-2（例如人 VEGFR-2）的 Ig 样结构域 1-3、或 VEGFR-1（例如人 VEGFR-1）的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR-2（例如人 VEGFR-2）的 Ig 样结构域 3、或 VEGFR-1（例如人 VEGFR-1）的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR-2（例如人 VEGFR-2）的 Ig 样结构域 3-4。在一个优选的实施方案中，根据本发明 VEGF-A 结合结构域包含 VEGFR-1（例如人 VEGFR-1）的 Ig 样结构域 2 和 VEGFR-2（例如人 VEGFR-2）的 Ig 样结构域 3。此外，本发明也考虑在上述来自 VEGFR 的天然序列 Ig 样结构域中存在突变的 VEGF-A 结合结构域，包括化学修饰形式、或 1-10 个氨基酸替代、缺失或添加的变体形式。

在一个优选的实施方案中，所述 VEGFA 结合结构域包含与 VEGFR1（例如人 VEGFR1）的 Ig 样结构域 2 的 C 端遗传融合的 VEGFR2（例如人 VEGFR2）的 Ig 样结构域 3。优选地，所述 VEGFA 结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 9 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。最优选地，所述 VEGF-A 结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成。

VEGF-C 结合结构域

在根据本发明的三特异性融合蛋白中，VEGF-C 结合结构域由 VHH 结构域提供。因此，在一些实施方案中，根据本发明的 VEGF-C 结合结构域包含特异性结合 VEGF-C 的 VHH 结构域。优选地所述 VHH 包含具有 SEQ ID NO: 4 所示的可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。可变区 SEQ ID NO: 4 氨基酸序列的 CDR 序列范围可以根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案定义，或可以根据这些定义方案中的任何两者或多者或全部进行定义。在一个实施方案中，根据本发明的 VEGF-C 结合结构域包含在具有 SEQ ID NO: 4 的可变区中根据 Kabat 或 Chothia 定义的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列；或者根据 Kabat 和 Chothia 组合定义的 CDR1 序列，和根据 Kabat 定义的 CDR2 和 CDR3 序列。

在一个实施方案中，根据本发明的 VEGF-C 结合结构域包含

(i)包含 SEQ ID NO:1 或由 SEQ ID NO: 1 组成的 CDR1；

(ii)包含 SEQ ID NO: 2 或由 SEQ ID NO: 2 组成的 CDR2；和

(iii)包含 SEQ ID NO: 3 或由 SEQ ID NO: 3 组成的 CDR3。

在一个实施方案中，根据本发明的 VEGF-C 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列。在再

一实施方案中，所述 VEGF-C 结合结构域包含与 SEQ ID NO: 4 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 VEGF-C 的能力的氨基酸序列。在再一优选实施方案中，所述 VEGF-C 结合结构域包含与 SEQ ID NO: 4 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 VEGF-C 的能力的氨基酸序列。优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。最优选地，在根据本发明的三特异性融合蛋白中，根据本发明的 VEGF-C 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列组成。

ANG-2 结合结构域

在根据本发明的三特异性融合蛋白中，ANG-2 结合结构域由 VHH 结构域提供。因此，在一些实施方案中，根据本发明的 ANG-2 结合结构域包含特异性结合 ANG-2 的 VHH 结构域。优选地所述 VHH 包含具有 SEQ ID NO: 8 所示的可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3 序列。可变区 SEQ ID NO: 8 氨基酸序列的 CDR 序列范围可以根据 Kabat、AbM、Chothia、Contact 或 IMGT 方案定义，或可以根据这些定义方案中的任何两者或多者或全部进行定义。在一个实施方案中，根据本发明的 ANG-2 结合结构域包含在具有 SEQ ID NO: 8 的可变区中根据 Kabat 或 Chothia 定义的 CDR1 序列、CDR2 序列和 CDR3 序列；或者根据 Kabat 和 Chothia 组合定义的 CDR1 序列，和根据 Kabat 定义的 CDR2 和 CDR3 序列。

在一个实施方案中，根据本发明的 ANG-2 结合结构域包含

(i)包含 SEQ ID NO:5 或由 SEQ ID NO: 5 组成的 CDR1；

(ii)包含 SEQ ID NO: 6 或由 SEQ ID NO: 6 组成的 CDR2；和

(iii)包含 SEQ ID NO: 7 或由 SEQ ID NO: 7 组成的 CDR3。

在一个实施方案中，根据本发明的 ANG-2 结合结构域包含 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。在再一实施方案中，所述 ANG-2 结合结构域包含与 SEQ ID NO: 8 具有至少 80%、85%、90%、95%或 99%同一性并且保留特异性结合 ANG-2 的能力的氨基酸序列。在再一优选实施方案中，所述 ANG-2 结合结构域包含与 SEQ ID NO: 8 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代(例如，保守性取代)并且保留特异性结合 ANG-2 的能力的氨基酸序列。优选地，所述氨基酸的添加、缺失和/或取代不发生在 CDR 区中。最优选地，在根据本发明的三特异性融合蛋白中，根据本发明的 ANG-2 结合结构域包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列组成。

二聚化结构域

铰链区

除了三个抗原结合结构域外，在一些实施方案中，根据本发明的融合蛋白的多肽链优选还包含能够驱动多肽链二聚化的铰链区。在一些实施方案中，所述铰链区包含至少 2 个或优选 3 个半胱氨酸残基。在另一些实施方案中，所述铰链区包含在 VEGF-A 结合结构域的 C 末端或存在于所述多肽链的 C 末端。

在一个实施方案中，所述铰链区包含 CPPC (SEQ ID NO: 60)或 CPPCPPC (SEQ ID NO: 61)氨基酸序列。在一个实施方案中，所述铰链区包含与 CPPC (SEQ ID NO: 60)或 CPPCPPC (SEQ ID NO: 61)的 N 端融合的来自(例如人) IgG 同种型(IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)上铰链区或部分上铰链区的氨基酸序列或其突变序列，或由所述序列组成。在一个实施方案中，所述铰链区具有不超过 20 个氨基酸序列的长度，例如，10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、或 20 个氨基酸长度。在另一个实施方案中，所述铰链区具有 10-15 个氨基酸序列长度。

在一个实施方案中，所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列，或由其组成。

在一些更为优选的实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，或由其组成；或包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列，或由其组成。

Fc 区

除了三个抗原结合结构域外，根据本发明的融合蛋白的多肽链在一些实施方案中还包含能够驱动多肽链二聚化的 Fc 区。

在本发明的三特异性融合蛋白中，适用的 Fc 区可以是来自任何天然免疫球蛋白分子的 Fc 区或 CH3 区，或其变体形式。例如，所述 Fc 区可以包含两个或三个恒定区结构域，即 CH2 结构域、CH3 结构域和可选的 CH4 结构域。优选地，所述 Fc 区从 N 端到 C 端包含：CH2-CH3，更优选地从 N 端到 C 端包含：铰链区-CH2-CH3。在一些的实施方案中，用于本发明分子中的 Fc 区为来自 IgG（尤其是人 IgG）的 Fc 区，例如，IgG1、IgG2 或 IgG4 的 Fc 区，优选地来自人 IgG1 的 Fc 区。优选地，所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 35 或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

CH3 区

除了三个抗原结合结构域外，根据本发明的融合蛋白的多肽链在一些实施方案中还包含能够驱动多肽链二聚化的 CH3 区。

在本发明的三特异性融合蛋白中，适用的 CH3 区可以是来自任何天然免疫球蛋白分子的 CH3 区，或其变体形式。优选地，所述 CH3 区在 N 端带有铰链区或柔性连接肽。在一些的实施方案中，用于本发明分子中的 CH3 区为来自 IgG（尤其是人 IgG）的 CH3 区，例如，IgG1、IgG2 或 IgG4 的 CH3 区，优选地来自人 IgG1 的 CH3 区。优选地，所述 CH3 区包含 SEQ ID NO: 47 或与其具有至少 90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性的氨基酸序列。

连接肽

在根据本发明的三特异融合蛋白中，抗原结合结构域之间可以采用连接肽进行连接。可以用于本发明的融合蛋白中的连接肽并无特定限制。本领域技术人员可以在阅读本说明书后，根据待连接的组件和连接位置，容易地确定可用的连接肽序列。

在一些实施方案中，本发明的各抗原结合结构域，和任选地二聚化结构域，通过连接肽连接。在一个实施方案中，所述连接肽为 5-50 个氨基酸的柔性连接肽，优选地包含甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的连接肽。在一个实施方案中，所述连接肽具有 5-50 个氨基酸长度，例如，8、10、15、20、25 或 30 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在一个实施方案中，所述连接肽包含氨基酸序列(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)或者(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、4、5、6 或 7 的整数，优选地，n=2 或 3。在一些实施方案中，所述连接肽包含铰链区。在一些实施方案中，所述连接肽不包含铰链区。

在一些实施方案中，本发明的融合蛋白多肽链包含至少一个（且优选地一个）包含铰链区的连接肽。所述的连接肽可以包含 20-50 个氨基酸长度，尤其是 20-30 个氨基酸长度。所述的铰链区可以具有不超过 20 个氨基酸序列的长度，例如，具有 10-15 个氨基酸序列长度。在一些实施方案中，所述连接肽包含或由所述铰链区及其 C 端的 5-20 个氨基酸的短接头组成。在一些实施方案中，所述短接头为包含或由选自甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的氨基酸残基组成的短接头，例如，具有 5、8、10、12、15、20 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在另一些实施方案中，所述短接头为包含或由 SEQ ID NO: 10 或 11 的氨基酸序列组成。优选地，所述连接肽包含 SEQ ID NO: 20 或 21 的序列。在

一些优选的实施方案中，所述包含铰链区的连接肽连接在 VEGFA 结合结构域 C 端，且所述 VEGFA 结合结构域通过所述连接肽在 C 端连接 ANG2 结合结构域或 VEGFC 结合结构域或两者。

在另一些实施方案中，本发明的融合蛋白多肽链通过不含铰链区的连接肽，将各抗原结合结构域连接在一起。在所述多肽链包含铰链区二聚化结构域时，所述铰链区二聚化结构域优选位于多肽链的 C 末端，并与位于所述多肽链最 C 端的结合结构域直接连接。在所述多肽链包含 Fc 区或 CH3 区二聚化结构域时，所述 Fc 区或 CH3 区可以直接(例如，当所述 Fc 区或 CH3 区在 N 端具有铰链区时)，或通过连接肽，连接在任一个抗原结合结构域的 C 端。在这些实施方案中，所述的连接肽可以包含 5-20 个氨基酸长度，更优选 5-15 个氨基酸长度。在一些实施方案中，所述连接肽为包含或由选自甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的氨基酸残基组成的短接头，例如，具有 5、8、10、12、15、20 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在另一些实施方案中，所述连接肽包含 SEQ ID NO: 10 或 11 的氨基酸序列。

示例性三特异性融合蛋白

在根据本发明的三特异融合蛋白中，各抗原结合结构域和任选地二聚化结构域之间的连接顺序并无特别限制。本领域技术人员可以在阅读本说明书后，根据需要，容易地确定可用的连接顺序。

在一些实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其中，VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域以分开的形式或以串联的形式，连接在 VEGF-A 结合结构域上。

在一些实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其中，VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域分别连接在 VEGF-A 结合结构域的 N 端或 C 端，优选地 ANG2 结合结构域结合在 VEGF-A 结合结构域的 N 端且 VEGF-C 结合结构域结合在 VEGF-A 结合结构域的 C 端。

在另一些实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其中，VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域串联连接，并进一步连接在 VEGF-A 结合结构域的 C 端。在一些实施方案中，VEGF-C 结合结构域连接在 ANG2 结合结构域的 N 端。在另一些实施方案中，VEGF-C 结合结构域连接在 ANG2 结合结构域的 C 端。

在一些实施方案中，所述融合蛋白还包含铰链区，且优选地所述铰链区位于 VEGF-A 结合结构域 C 末端，或位于多肽链的 C 末端。

在另一些实施方案中，所述融合蛋白还包含 Fc 区，且优选地所述 Fc 区位于 VEGF-A 结合结构域 C 末端，或位于多肽链的 C 末端。

在另一些实施方案中，所述融合蛋白还包含 CH3 区，且优选地所述 CH3 区位于 VEGF-A 结合结构域 C 末端，或位于多肽链的 C 末端。

在上述的任何实施方案中，所述连接可以为直接连接，或通过根据本文描述的连接肽进行。

在一些优选的实施方案中，根据本发明的三特异性融合蛋白包含铰链区。优选地，所述三特异性融合蛋白包含至少一条多肽链，所述多肽链从 N 端到 C 端包含：

(i) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(ii) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(iii) VEGFA 结合结构域、铰链区、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构

域，或

(iv) VEGFA 结合结构域、铰链区、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(v) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区，或

(vi) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区。

在一个实施方案中，所述第一连接肽和所述第二连接肽可以相同或不同。在一些实施方案中，所述第一和第二连接肽为包含或由选自甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的氨基酸残基组成的短接头，例如，具有 5、8、10、12、15、20 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在一些实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列$(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 55)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、或 4 的整数。在一个实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽由氨基酸序列$(G_4S)_2$ (SEQ ID NO: 62)或$(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 63)组成。在另一个实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列 $TS(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 56)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、或 4 的整数。在另一实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n 是等于或大于 2 的整数，例如，n 是 2 或 3 的整数。在另一实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)或(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)，其中 n 是等于或大于 2 的整数，例如，n 是 2 或 3 的整数。在一个优选的实施方案中，所述第一和第二连接肽各自包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，所述第一和第二连接肽各自包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述铰链区包含 CPPC(SEQ ID NO: 60)或 CPPCPPC(SEQ ID NO: 61)氨基酸序列。在一个实施方案中，所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列，或由其组成。在一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 12 的氨基酸序列，或由其组成。在另一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列，或由其组成。在一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列，或由其组成。在另一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 16 的氨基酸序列，或由其组成。在一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列，或由其组成。在另一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 18 的氨基酸序列，或由其组成。在一个优选实施方案中，所述铰链区包含 SEQ ID NO: 45 的氨基酸序列，或由其组成。已经发现，在包含铰链区为二聚化结构域的本发明融合蛋白中，包含序列例如 SEQ ID NO: 12、13、15、16、17、18 或 45 的铰链区更有利于改善融合蛋白二聚体的稳定性和由此提高其生产性能和成药性。

在一些优选的实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其包含至少一条多肽链，所述多肽链从 N 端到 C 端包含：ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区、第二连接肽、VEGFC 结合结构域。优选地，所述多肽链包含

(i) 选自 SEQ ID NOs: 23-28、48 和 50 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%， 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

在一个优选实施方案中，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含：

(i) SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

最优选地，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 24 的氨基酸序列、或由其组成。优选地，所述融合蛋白为由两条所述多肽链组成的二聚体。

在一个优选实施方案中，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含：

(i) SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

最优选地，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 25 的氨基酸序列、或由其组成。优选地，所述融合蛋白为由两条所述多肽链组成的二聚体。

在另一些优选的实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其包含至少一条多肽链，所述多肽链从 N 端到 C 端包含：VEGFA 结合结构域、铰链区、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构域。优选地，所述多肽链包含

(i) 选自 SEQ ID NOs: 29-32 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

优选地，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 29、30、或 31 的氨基酸序列，或由其组成。优选地，所述融合蛋白为由两条所述多肽链组成的二聚体。

在另一些优选的实施方案中，本发明提供了三特异性融合蛋白，其包含至少一条多肽链，所述多肽链从 N 端到 C 端包含： ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构域、铰链区。优选地，所述多肽链包含

(i) 选自 SEQ ID NOs: 33-34 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

优选地，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 33 或 34 的氨基酸序列，或由其组成。优选地，所述融合蛋白为由两条所述多肽链组成的二聚体。

在再一些实施方案中，本发明也提供了包含如下多肽链的融合蛋白，其中所述多肽链从 N 端到 C 端包含：

(i) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(ii) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(iii) VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，或

(iv) VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(v) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区，或

(vi) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区。

在一个实施方案中，所述第一连接肽和所述第二连接肽可以相同或不同。在一些实施方案中，所述第一和第二连接肽为包含或由选自甘氨酸(G)和/或丝氨酸(S)和/或苏氨酸残基(T)的氨基酸残基组成的短接头，例如，具有 5、8、10、12、15、20 个氨基酸长度，或具有落入任何两个整数之间的氨基酸长度。在一些实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列$(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 55)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、或 4 的整数。在一个实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽由氨基酸序列$(G_4S)_2$(SEQ ID NO: 62)或$(G_4S)_3$ (SEQ ID NO: 63)组成。在另一个实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列 $TS(G_4S)n$ (SEQ ID NO: 56)，其中 n 是等于或大于 1 的整数，例如，n 是 2、3、或 4 的整数。在另一实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n 是等于或大于 2 的整数，例如，n 是 2 或 3 的整数。在另一实施方案中，所述第一连接肽和/或第二连接肽包含氨基酸序列(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)或(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)，其中 n 是等于或大于 2 的整数，例如，n 是 2 或 3 的整数。在一个优选的实施方案中，所述第一和第二连接肽各自包含 SEQ ID NO: 10 的氨基酸序列。在另一个优选的实施方案中，所述第一和第二连接肽各自包含 SEQ ID NO: 11 的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 Fc 区包含天然铰链区序列或变体铰链区序列，优选地 Fc 区为来自人 IgG1 的 Fc 区，更优选地所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列。

在一些实施方案中，所述 CH3 区为来自人 IgG1 的 Fc 区，更优选地所述 CH3 区包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列。优选地，所述 CH3 区在 N 端具有铰链区。

在一些实施方案中，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含：

(i) SEQ ID NO: 22 或 49 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

最优选地，本发明提供了包含如下多肽链的三特异性融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 22 或 49 的氨基酸序列、或由其组成。优选地，所述融合蛋白为由两条所述多肽链组成的二聚体。

在一些实施方案中，本发明三特异性融合蛋白具有选自如下任一项或多项的生物学活性：

（i）高亲和力结合 VEGFA、VEGFC 和 ANG2，优选地，采用生物膜薄层干涉技术测定，例如实施例 3 所示的测定方法，对 VEGF-A 的双价结合亲和力常数 KD 值为 1-10nM 或更低；对 VEGFC 和 ANG2 的双价亲和力常数 KD 值为 0.1-1nM；

(ii) 阻断 VEGF-A 和/或 VEGF-C 诱导的 VEGFR2 信号通路激活；

(iii) 阻断 VEGF-C 诱导的 VEGFR3 信号通路激活；

(iv) 阻断 ANG2 与 Tie2 表达细胞结合；

(v) 阻断 ANG2 诱导的 Tie2 信号通路激活；

(vi) 抑制 VEGF-C 和 VEGF-A 共同诱导的内皮细胞存活和增殖；

(vii) 抑制肿瘤（例如实体瘤，例如黑素瘤）的新生血管化；

(viii) 抑制肿瘤（例如实体瘤，例如黑素瘤）的生长；

(ix) 阻抑新生血管化相关眼部疾病的发生和/或发展，例如降低新生血管化水平，减少血管渗漏，抑制新生血管化引起的眼底视网膜水肿和/或增厚。

因此，在一些实施方案中，本发明提供了可用于治疗新生脉管化相关疾病，例如癌症（例如实体瘤）和眼部疾病的抗 VEGFA/VEGFC/ANG2 的三特异性融合蛋白。

多核苷酸、载体和宿主

本发明提供编码以上任何本发明三特异性融合蛋白的核酸。还提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。还提供包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。

可以采用本领域熟知的方法，例如通过从头固相 DNA 合成，或通过 PCR 扩增，产生编码本发明分子的核酸序列。如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。此外，为了便于生产和纯化，编码本发明三特异性融合蛋白的核酸也可以包含编码融合在所述融合蛋白 N 端的分泌性信号肽，和/或融合在所述融合蛋白 C 端利于纯化的标签肽，如六组氨酸标签。

可以将编码本发明三特异性融合蛋白的编码核酸引入用于扩增或表达的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如原核表达载体或真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

本发明也提供包含本发明表达载体的宿主细胞。适于复制和支持本发明的融合蛋白表达的宿主细胞是本领域熟知的。根据需要，这类细胞可以用特定表达载体转染或转导，并且可以培育大量含有载体的细胞用于接种大规模发酵器以获得足够量的本发明分子用于临床应用。合适的宿主细胞包括原核微生物，如大肠杆菌，真核微生物如丝状真菌或酵母，或各种真核细胞，如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)、昆虫细胞等。可以使用适于悬浮培养的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的例子包括 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7)；人胚肾系(HEK 293 或 293F 细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK)、猴肾细胞(CV1)、非洲绿猴肾细胞(VERO-76)、人宫颈癌细胞(HELA)、犬肾细胞(MDCK)、布法罗大鼠肝脏细胞(BRL 3A)、人肺细胞(W138)、人肝脏

细胞(Hep G2)、CHO 细胞、NSO 细胞、骨髓瘤细胞系如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0 等。适于产生蛋白质的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki 和 Wu，Methods in Molecular Biology，第 248 卷(B.K.C. Lo 编著，Humana Press，Totowa，NJ)，第 255-268 页(2003)。在一个优选的实施方案中，所述宿主细胞是 CHO、HEK293 或 NSO 细胞。

本发明融合蛋白的生产和纯化

再一方面，本发明提供用于生产本发明三特异性融合蛋白的方法，所述方法包括：在适于表达所述融合蛋白的多肽链的条件下培养包含编码所述多肽链的宿主细胞，从而产生所述融合蛋白。为了此重组生产目的，可以使用本领域技术人员熟知的方法，来构建包含编码本发明融合蛋白的多肽链的多核苷酸的表达载体。可以使用多种技术，将表达载体转染或引入适宜的宿主细胞中，包括例如，原生质体融合、磷酸钙沉淀、电穿孔、逆转录病毒的转导、病毒转染、基因枪、基于脂质体的转染或其他常规技术。在融合蛋白自宿主细胞表达后，可以采用本领域已知的技术手段回收和/或纯化。

可以用于纯化本发明融合蛋白的方法包括，但不限于，高效液相色谱、离子交换层析、凝胶电泳、亲和层析、大小排阻层析等纯化。用来纯化特定蛋白质的实际条件还取决于如净电荷、疏水性、亲水性等因素，并且这些对本领域技术人员是显而易见的。在一个实施方案中，在表达后，通过蛋白 A 柱分离和纯化本发明的三特异性融合蛋白。

可以通过多种熟知分析方法中的任一种方法确定本发明的抗体分子的纯度，所述熟知分析方法包括大小排阻层析、凝胶电泳、高效液相色谱等。可以通过本领域已知的多种测定法，鉴定、筛选或表征本文提供的融合蛋白的物理/化学特性和/或生物学活性。

测定法

可以通过本领域中已知的多种测定法对本文中提供的融合蛋白进行鉴定，筛选，或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

对于本发明融合蛋白与人 VEGFA 和/或人 VEGFC 和/或人 ANG2 的结合，可以通过本领域已知的方法，诸如 ELISA，Western 印迹、流式细胞术等，或本文实施例公开的例示性方法来测定。例如，可以使用重组 VEGFA 和/或人 VEGFC 和/或人 ANG2 蛋白，在生物光干涉测定法中测定分子的结合动力学(例如 K_D 值)。在一些实施方案中，使用生物光干涉测定法（例如 Fortebio 亲和测量），例如实施例 3 所示的方法，在温度 30°C，测定分子与人 VEGFA 和/或人 VEGFC 和/或人 ANG2 的结合平衡解离常数，例如双价结合亲合力。也可以使用天然或重组表达 VEGFA 和/或人 VEGFC 和/或人 ANG2 蛋白的细胞，通过流式细胞术，检测本发明融合蛋白与这些细胞的结合活性。例如，如实施例 7 的 ANG2 细胞结合实验。

对于本发明融合蛋白的 VEGFA 和/或 VEGFC 和/或 ANG2 拮抗/抑制活性，可以通过本领域已知的方法，诸如 ELISA 阻断试验，受体荧光报道分子激活试验，基于细胞的受体磷酸化试验、细胞增殖试验，或本文实施例公开的例示性方法来测定。例如，可以采用基于细胞的受体报道分子测定试验，例如实施例 4 所述的方法，使用例如 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 细胞，测定分子阻断由 hVEGF-A 单独或 hVEGF-C 单独或其组合诱导的 VEGFR2 信号通路激活。也可以采用细胞增殖测定试验，如 CCK-8 试验，例如实施例 5 或 9 所述的方法，使用淋巴细胞或内皮细胞，测定分子在体外抑制 hVEGF-A 单独或 hVEGF-C 单独或其组合诱导的细胞存活和/或增殖。

对于本发明分子的抗新生血管化作用，可以通过本领域已知的方法，诸如体外试验和/或体内动物实验来测量。例如，可以使用体外内皮细胞成管实验，例如实施例 9 所示的方法，采用 VEGFA 和 VEGF C 诱导人脐静脉内皮细胞（HUVEC）管腔形成，并检测分子对 VEGF A 和 VEGF C 诱导的原代细胞管腔形成的抑制作用。也可以例如在荷瘤小鼠模型中，例如按照实施例 10 所示的方法，检测分子的抗新生血管化

和/或抗肿瘤作用。或者备选地，可以采用例如激光诱导的脉络膜新生血管化动物模型或 DL-AA 诱导的视网膜新生血管化动物模型， 在施用分子后，通过例如眼底彩色照相、荧光素眼底血管造影，光学相干断层扫描检查，观察分子对脉络膜新生血管或视网膜新生血管的抑制情况。

药物组合物、药物联合和试剂盒

在一个方面，本发明提供了组合物，例如，药物组合物，所述组合物包含与可药用载体配制在一起的本发明三特异性融合蛋白。如本文所用，“可药用载体”包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、等渗剂和吸收延迟剂等。本发明的药物组合物适于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、直肠、脊髓或表皮施用(例如，通过注射或输注)。在一个实施方案中，本发明融合蛋白配制为适用于注射给药的药物组合物。在一些实施方案中，本发明融合蛋白配制为适用于腹腔注射的药物组合物。在再一些实施方案中，本发明融合蛋白配制为适用于眼部注射给药(例如玻璃体注射给药)的药物组合物。在一些实施方案中，本发明融合蛋白是药物组合物中的唯一活性成分。在另一些实施方案中，药物组合物可以包含本文所述的融合蛋白分子与一种以上其他治疗剂。

在另一方面，本发明也提供包含本发明融合蛋白与一种以上治疗剂的药物联合。

适用于本发明的药物组合物和药物联合中的治疗剂可以为选自以下类别中任一的治疗剂：(i)抗新生血管化药物；(ii)免疫抑制药物； (iii)抗纤维化药物；(iv)神经保护药剂；和(v)具有抑制肿瘤作用的药物。

本发明的组合物可以处于多种形式。这些形式例如包括液体、半固体和固体剂型，如液态溶液剂(例如，可注射用溶液剂和可输注溶液剂)、分散体剂或混悬剂、脂质体剂和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗用途。常见的优选组合物处于可注射用溶液剂或可输注溶液剂形式。优选的施用模式是肠胃外(例如，静脉内、皮下、腹腔(i.p.)、肌内)注射。在一个优选实施方案中，通过静脉内输注或注射施用抗体分子。在另一个优选实施方案中，通过肌内、腹腔或皮下注射施用抗体分子。

如本文所用的短语“肠胃外施用”和“肠胃外方式施用”意指除了肠施用和局部施用之外的施用模式，通常通过注射施用，并且包括但不限于静脉内、肌内、动脉内、皮内、腹腔、经气管、皮下注射和输注。

治疗性组合物一般应当是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。可以将组合物配制为溶液、微乳液、分散体、脂质体或冻干形式。可以通过将活性化合物以要求的量加入适宜的溶剂中，随后过滤消毒，制备无菌可注射溶液剂。通常，通过将所述活性化合物并入无菌溶媒中来制备分散体，所述无菌溶媒含有基础分散介质和其他成分。可以使用包衣剂如卵磷脂等。在分散体的情况下，可以通过使用表面活性剂来维持溶液剂的适宜流动性。可以通过在组合物中包含延迟吸收的物质例如单硬脂酸盐和明胶而引起可注射组合物的延长吸收。

本发明的药物组合物可以包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明分子。“治疗有效量”指以需要的剂量并持续需要的时间段，有效实现所需治疗结果的量。可以根据多种因素如疾病状态、个体的年龄、性别和重量等变动治疗有效量。治疗有效量是任何有毒或有害作用不及治疗有益作用的量。相对于未治疗的受试者，“治疗有效量”优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率)至少约 20%、更优选地至少约 40%、甚至更优选地至少约 60%和仍更优选地至少约 80%。可以在预示人肿瘤中的功效的动物模型系统中评价本发明分子抑制可度量参数(例如，肿瘤体积)的能力。

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

包含本文所述抗体分子的试剂盒也处于本发明的范围内。试剂盒可以包含一个或多个其他要素，例如包括：使用说明书；其他试剂，例如标记物或用于偶联的试剂；可药用载体；和用于施用至受试者的装置或其他材料。

用途和方法

在一个方面，本发明提供了本发明融合蛋白的体内、体外用途和应用方法。

在一些实施方案中，本发明的用途和方法涉及将本发明融合蛋白在体内和/或体外应用于：

-结合 VEGFA 抗原和/或 VEGFC 抗原和/或 ANG2 抗原，

-阻断 VEGFA 和/或 VEGFC 和/或 ANG2 与其相关受体，例如 VEGFR2 和/或 VEGFR3 和/或 Tie2 的结合；

-抑制 VEGFA 和/或 VEGFC 和/或 ANG2 诱导的 VEGFR2 和/或 VEGFR3 和/或 Tie2 细胞信号传导激活；

-抑制 VEGFA 和/或 VEGFC 和/或 ANG2 诱导的血管内皮细胞存活、增殖和/或迁移；

-抑制 VEGFC 和/或 ANG2 诱导的淋巴细胞存活和/或增殖；

-抑制 VEGFC 和/或 ANG2 诱导的淋巴管发生和淋巴内皮细胞生长和迁移；

-抑制 VEGFA 和/或 VEGFC 和/或 ANG2 诱导的新生血管化和/或血管渗漏；

-抑制肿瘤的新生血管化和/或生长和/或转移。

治疗应用

在一个方面，本发明提供了本发明三特异性分子用于预防/治疗的新生血管化相关疾病的用途和相应的治疗方法。在一些实施方案中，所述疾病或病症是将获益于病变组织中的新生血管形成抑制的疾病或病症，包括，但不限于，实体瘤和眼科疾病。在一些实施方案中，所述疾病为实体瘤，优选黑素瘤，其中所述双特异性结合蛋白的施用抑制肿瘤内的新生血管形成和/或肿瘤的生长。在另一些实施方案中，所述疾病为眼部疾病。

在根据本发明的治疗方法中，本发明的抗体可以单独使用，也可以酌情与其他治疗方式或治疗剂组合使用。可用于本发明抗体组合使用的其它治疗方式/治疗剂包括，但不限于，其他的抗新生血管化药物，例如整合素、血浆激肽释放酶等、免疫抑制药物，例如抗补体 HTRA1、抗纤维化药物，例如抗 PDGF 和抗 CTGF 等、神经保护药物，例如 NGF 等。

在一些实施方案中，本发明融合蛋白或包含本发明融合蛋白的药物组合物用作在个体中治疗和/或预防疾病的药物，优选地，所述个体是哺乳动物，更优选地是人。

在一些实施方案中，本发明提供了治疗新生血管化相关疾病的方法，包括向受试者施用本发明的融合蛋白或其药物组合物。在一些实施方案中，所述疾病为实体瘤，其中所述三特异性融合蛋白的施用抑制肿瘤内的新生血管形成和/或肿瘤的生长。在另一些是实施方案中，所述疾病为眼部疾病。

在一些实施方案中，本发明提供了本发明的融合蛋白在制备在受试者中治疗和/或预防疾病的药物的用途，其中所述疾病优选为新生血管化相关疾病，例如实体瘤和眼部疾病。在一些实施方案中，所述眼部疾病为脉络膜新生血管化疾病或视网膜新生血管化疾病。

在任何上述实施方案中，一种或多种另外的活性剂，例如化疗剂和/或癌症治疗剂或抗新生血管疗法，可以进一步与本发明的三特异性融合蛋白组合施用。组合施用的形式可以是同时施用、并行施用、或以任何顺序的相继施用。

检测和诊断应用

在再一个方面，本发明也提供了体外或体内检测生物样品，例如血清、精液或尿或组织活检样品(例如，来自过度增生性或癌性病灶)中存在相关抗原的诊断方法。该诊断方法包括：(i)在允许相互作用发生的条件

下使样品(和任选地，对照样品)与(标记或未标记的)本发明的融合蛋白接触或向受试者施用所述融蛋白，和(ii)检测所述融合蛋白和样品(和任选地，对照样品)之间复合物的形成。复合物的形成表示存在相关抗原，并且在一些情况下，可以显示本文所述治疗和/或预防的适用性或需求。在一些实施方案中，本发明也提供了本发明的其融合蛋白在制备用于制备诊断疾病的诊断工具的用途，其中所述疾病优选为新生血管化相关疾病，例如实体瘤和眼部疾病。

实施例

实施例 1.多特异性融合蛋白的生产和纯化

将 Expi293F 细胞(购自 Thermo Fisher scientific 公司)传代培养于 Expi293F 细胞培养基（购自 Thermo Fisher scientific 公司）中。转染前一天检测细胞密度，用新鲜的 Expi293 细胞培养基调整到 2×10^6 个细胞/ml 继续培养，转染当天将细胞密度调整为 3×10^6 个细胞/ml。

取转染 Expi293F 细胞终体积 1/10 的 Opti-MEM 培养基（购自 Gibco 公司）作为转染缓冲液，每 mL 转染缓冲液中加入 10μg 的对应重组质粒，混匀，每 mL 转染缓冲液中再加入 30ug 聚乙烯亚胺(polyethylenimine（PEI）)（Polysciences，目录号：23966），混匀，室温温育 20 分钟，然后将 PEI/DNA 混合物轻柔倒入 Expi293F 细胞悬浮液中混匀，置于摇床培养，培养条件为 8%CO_2、36.5℃、120rpm。

培养 16~18h 后，向培养瓶中补加转染后培养物体积 1/50 的浓度为 200 g/L 的 FEED（100 g/L Phytone Peptone + 100g/L Difco Select Phytone）、终浓度为 4 g/L 的葡萄糖溶液和终浓度为 2 mM/L 的 VPA(丙戊酸)，轻轻混匀，置于 8%CO_2、36.5℃、120rpm 摇床继续培养。连续培养 6 天，收集培养物，以 4000 转/分钟离心 30 分钟，取细胞上清用 0.45μM 滤膜过滤，通过亲和层析和凝胶层析进行纯化。

具体的亲和层析纯化操作步骤为：选用 Amsphere™ A3（JSR Life Sciences，目录号：10000327-C05）蛋白 A 亲和层析柱，纯化前用 0.1 M NaOH 对亲和层析柱及管路除内毒素 2h，然后，用蒸馏水清洗管路以及柱子。用 5 倍柱体积的 1×PBS（Gibco，目录号：10010023）平衡填料柱；将收集的料液上清通过柱子，再用 10 倍柱体积的 1×PBS 清洗填料柱，去除非特异性结合蛋白；用 5 倍柱体积的洗脱缓冲液（100 mM glycine，pH 2.7）冲洗填料，收集洗脱液，然后用 2M Tris 调节蛋白 pH 至 6.0，备用于进一步的凝胶层析。

具体的凝胶交换层析纯化操作步骤为：选用 Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare，目录号：28-9909-44)凝胶层析柱，并置于 AKTApure 系统内。用 0.1 M NaOH 对装备有 Superdex 200 Increase 10/300 GL 凝胶层析柱的 AKTApure 系统除内毒 2h，然后，用蒸馏水清洗系统以及柱子；使用 2-5 倍柱体积的 1×PBS 平衡柱子，直至电导以及 pH 稳定；将亲和层析所获得的蛋白上样，继续使用 1×PBS 洗脱，根据紫外吸收峰去除聚体等杂质，收集纯度高的样品。将样品进行 0.22μm 膜过滤，测定蛋白浓度。

基于上述程序表达和纯化的本发明 IAR044 多特异性融合蛋白的氨基酸序列以及序列编号见后附序列表概述部分。

实施例 2.多特异性融合蛋白二聚体的纯度鉴定

SDS-PAGE 电泳分析：取蛋白样品，加入还原 loading buffer（翌圣生物,货号：20315ES05）或非还原 loading buffer（北京百奥莱博，货号：WE0289），70 摄氏度加热 10 分钟，取适量样品加入预制胶 4–20% Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gel（Bio-rad 货号:4561095),同时加入蛋白 marker（Biorad, 货号:1610375）作为对照，150V 电泳 50 分钟，用蛋白染色仪（金斯瑞， L00760C）染色，然后用凝胶成像仪（上海天能，

Tanon-1600）进行拍照。

SEC-HPLC 分析：取蛋白样品，使用体积排阻色谱柱检测纯度，其中色谱柱为 TSKgel G3000Swxl（7.8×300 mm，5 μm）型分析柱，保护柱为 TSKgel guardcolumn Swxl（6.0×40 mm，7 μm），流动相为 20 mmol/L 磷酸盐缓冲液+ 400 mmol/L NaClO4，pH 6.8，进样盘温度 10℃，柱温 25℃，进样量 50 μl，流速 0.5 ml/min，采集时间 30 分钟，使用 FLD 荧光检测器，PMT 值 7，激发波长 285 nm，发射波长 340 nm。取待测样品用流动相稀释至 1.0 mg/ml，作为供试品溶液。取制剂缓冲液用上述相同处理方式稀释后做为空白溶液。取空白溶液、供试品溶液各 50 μl 注入液相色谱仪，开始检测。

CE-SDS(毛细管凝胶电泳)分析：取蛋白样品，采用毛细管凝胶电泳法检测纯度。毛细管为无涂层毛细管，内径 50 μm，总长 30.2 cm，有效长度 20.2 cm。电泳前分别使用 0.1 mol/L 氢氧化钠、0.1 mol/L 盐酸、超纯水、电泳胶 70 psi 冲洗毛细管柱。将待测样品用适量超纯水稀释至 1.0mg/ml，取以上稀释后的样品 50 μl 于 1.5 ml 离心管中，分别向其中加入 45 μl pH 6.5 的样品缓冲液（称取一水柠檬酸 0.32 g，十二水合磷酸氢二钠 2.45 g，溶于 45 ml 超纯水中，定容至 50 ml，制得柠檬酸-磷酸盐缓冲液，精密量取该缓冲液 200 μl，加 10%(w/v)十二烷基硫酸钠溶液 80 μl，加水至 1 ml，混匀，即得）、5 μl 250 mmol/L NEM 溶液（称取 N-乙基顺丁稀二酰亚胺 62 mg，溶于 2 ml 超纯水中），充分混匀后 70±2℃加热 10±2 分钟，冷却至室温后转移至样品瓶作为供试品溶液。取与供试品相同体积的制剂缓冲液，按上述方法同样操作，制得空白溶液。样品进样条件：- 5 kV 20 秒；分离电压：- 10 kV 35 分钟。毛细管柱温控制在 25℃，检测波长为 220 nm。

图 1A 显示了代表性多特性融合蛋白在蛋白 A 一步纯化后的 SDS-PAGE 成像。如图所示，所有测试的多特异性融合蛋白均形成了正确大小的二聚体；相对于具有未经改造的铰链区的 IAR044-022 分子，IAR044-028，030，032，及 038，039，040 均能形成较高比例的二聚体。

图 1B 显示了 IAR044-034、035 和 036 分子的 SEC-HPLC 纯度分析结果。

下表 1 显示了采用不同的第一和第二连接肽以及任选地 C 端铰链区的多种不同融合蛋白的表达产率、SEC-HPLC 纯度和 CE-SDS 纯度。

表 1. 融合蛋白表达产率和纯度

分子编号	分子构型	第一连接肽	第二连接肽	C 端铰链区	产率 (mg/L)	SEC 纯度	CE-SDS 纯度
IAR044-026	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	EPKSSPPCPPCPAPCLLG (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 64)		165	93.28	
IAR044-027	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	DKTHTCPPCPAPELLG-CH3 (SEQ ID NO: 65)		312	51.61	78.1
IAR044-028	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	EPKSSPPCPPCPAPC (GGGGG)2 (SEQ ID NO:		272	90.6	89

			66)				
IAR044-029	Ang2_L1_Va_L1_Vc-hinge	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	DKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO: 16)	210	98.35	98.7
IAR044-030	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	ESKYGPPCPPCPPC (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 20)		340	94.6	96.8
IAR044-031	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	DKTHTCPPCPAPCLLG (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 67)		220	88.7	84.4
IAR044-032	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	EKTHTCPPCPPC (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 21)		250	97.5	98.7
IAR044-033	Ang2_L1_Va_L1_Vc-hinge	(GRPGS)2 (SEQ ID NO: 11)	(GRPGS)2 (SEQ ID NO: 11)	DKTHTCPPCPPC (SEQ ID NO: 16)	150	90.8	90.4
IAR044-034	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	DTTHTCPPCPPC (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 68)		350	95.9	
IAR044-035	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	EPKSCDTPPPCPPCP (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 69)		280	93.6	
IAR044-036	Ang2_L1_Va_L2_Vc	(GGGGG)2 (SEQ ID NO: 10)	EPKSSDTPPPCPPCPPC (GGGGG)2 (SEQ ID NO: 70)		320	95.9	

实施例 3. 生物膜薄层干涉技术（BLI）和表面等离子共振法（SPR）测定本发明多特异性融合蛋白与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(ForteBio)测定本发明多特异性融合蛋白与靶标抗原结合的平衡解离常数（KD）。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法（Estep, P 等人，High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页）进行。

实验开始前半个小时，根据样品数量，取合适数量的 AMQ（Pall，1506091）（用于样品检测）或 AHQ（Pall，1502051）（用于阳性对照检测）传感器浸泡于 SD buffer（PBS1×，BSA 0.1%，Tween-20 0.05%）中。取 100 μl 的 SD 缓冲液、多特异性融合蛋白、抗原（包括人 Ang2（北京义翘）、及人 VEGF165（R&D）和人 VEGF C（R&D）），分别加入到 96 孔黑色聚苯乙烯半量微孔板（Greiner，675076）中。根据样品位置布板，选择传感器位置。仪器设置参数如下：运行步骤：Baseline、Loading ~1 nm、Baseline、Association 和 Dissociation； 各个步骤运行时间取决于样品结合和解离速度，转速为 400 rpm，温度为 30°C。使用 ForteBio 分析软件分析 K_D 值。

在以上测定法所述的实验中，代表性多特异性融合蛋白的亲和力如表 2-4 所示：

表 2. ForteBio 检测与 VEGFA 抗原双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019				
IAR044-028				
IAR044-030		**5.15E-10**	**3.89E+05**	**2.00E-04***
IAR044-032	VEGFA	**5.17E-10**	**3.87E+05**	**2.00E-04***
IAR044-038		**6.68E-10**	**4.50E+05**	**3.00E-04**
IAR044-039		**5.82E-10**	**4.68E+05**	**2.72E-04**
IAR044-040		**6.09E-10**	**4.81E+05**	**2.93E-04**

表 3. ForteBio 检测与抗原 VEGFC 双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019				
IAR044-028				
IAR044-030		**1.04E-09**	**1.93E+05**	**2.00E-04***
IAR044-032	VEGFC	**1.01E-09**	**1.97E+05**	**2.00E-04***
IAR044-038		**9.20E-10**	**2.17E+05**	**2.00E-04***
IAR044-039		**1.01E-09**	**2.25E+05**	**2.27E-04**
IAR044-040		**8.85E-10**	**2.36E+05**	**2.09E-04**

表 4. ForteBio 检测与抗原 ANG2 双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019				
IAR044-028				
IAR044-030		**2.06E-10**	**9.73E+05**	**2.00E-04***
IAR044-032		**2.20E-10**	**9.08E+05**	**2.00E-04***
IAR044-038	Ang2	**4.75E-10**	**5.97E+05**	**2.83E-04**
IAR044-039		**7.05E-10**	**6.06E+05**	**4.27E-04**
IAR044-040		**7.83E-10**	**6.52E+05**	**5.10E-04**

*代表解离常数超过 ForteBio 检测极限

在以上试验中，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 VEGF A 的双价结合亲和力 KD 值分别为 5.15E-10 M、5.17E-10 M，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 VEGF C 的双价结合亲和力 KD 值分别为 1.04E-9 M、1.01E-9 M，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 Ang2 的双价结合亲和力 KD 值分别为 2.06E-10 M、2.20E-10 M。

采用表面等离子共振法（SPR），测定实施例 1 表达并纯化的各抗体结合人 VEGF A、VEGF C 和 Ang2 的平衡解离常数（KD）。

通过 Biacore（GE Healthcare，T200）测定抗体的 KD，其中抗体被抗人 Fc 抗体捕获到芯片上之后，通过检测抗原人 TIGIT 与被捕获的抗体之间的结合与解离，获得亲和力及动力学常数。具体方法如下：使用氨基偶联试剂盒（BR-1006-33, GE Healthcare），将抗人 Fc 抗体（R&D 货号 MAB110）或抗原偶联在 CM5 芯片（29-1496-03, GE Healthcare）表面，偶联高度约 6000 RU。注入 1 M 乙醇胺，对剩余的活化位点进行封闭。将稀释后抗体，以 10 μl/min 的流速，捕获在 CM5 芯片第四通道，捕获时间 60 s，第三通道为空白对照通道。然后，将梯度稀释后的抗原（包括人 Ang2（北京义翘）、及人 VEGF165（R&D） 和人 VEGF C（R&D）），从低浓度到高浓度的顺序，注入芯片双通道，结合时间 180 s，解离时间 600 s。最后使用 Glycine pH 1.5（BR-1003-54, GE Healthcare）对芯片进行再生。数据结果使用 Biacore T200 分析软件， 以 1:1 结合模型进行动力学的分析。结果如下表 5-7 所示。

表 5. SPR 检测抗原抗体结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019		**9.25E-13**	**5.34E+07**	**4.94E-05**
IAR044-028				
IAR044-030		**1.51E-10**	**3.99E+05**	**6.01E-05**
IAR044-032	VEGFA	**2.03E-10**	**3.82E+05**	**7.75E-05**
IAR044-038				
IAR044-039				
IAR044-040				

表 6. SPR 检测抗原抗体双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019		**<1.78E-11**	**5.62E+05**	**<1.00E-05**
IAR044-028				
IAR044-030		**<2.34E-10**	**4.28E+04**	**<1.00E-05**
IAR044-032	VEGFC	**<2.76E-10**	**3.62E+04**	**<1.00E-05**
IAR044-038				
IAR044-039				
IAR044-040				

表 7. SPR 检测抗原抗体双价结合的亲和力常数（平衡解离常数）

多价融合蛋白	抗原	K_D (M)	K_{on}(1/Ms)	k_{dis}(1/s)
IAR044-019		**5.56E-11**	**5.94E+05**	**3.30E-05**
IAR044-028				
IAR044-030		**9.32E-12**	**1.89E+06**	**1.76E-05**
IAR044-032	Ang2	**1.20E-11**	**1.63E+06**	**1.92E-05**
IAR044-038				
IAR044-039				
IAR044-040				

在以上试验中，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 VEGF A 的双价结合亲和力 KD 值分别为 1.51E-10 M、2.03E-10 M，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 VEGF C 的双价结合亲和力 KD 值分别为<2.34E-10 M、<2.76E-10 M，抗体 IAR044-030、IAR044-032 与人 Ang2 的双价结合亲和力 KD 值分别为 9.32E-12 M、1.20E-11 M。

实施例 4 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 VEGF A 或 C 诱导的 HEK293 KDR 报道分子激活

VEGF A 或 VEGF C 可以与相关受体 VEGFR2（也称作 KDR）结合，激活 VEGFR2 信号通路，诱导血管内皮细胞存活、增殖和迁移等作用。本研究利用 KDR reporter 实验体系，使用 NFAT-RE-luc2P/KDR HEK293 细胞（Promega Cat CS181401），检测梯度稀释的融合蛋白分子对 VEGFA 或 VEGFC 激活相关受体信号通路的阻断作用。实验方法参考供应商说明书进行。

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

配制具有浓度为 120ng/ml 的 VEGF A（R&D）或 200ng/ml 的 VEGF C（R&D）和梯度稀释的待测融

合蛋白的混合液。将混合液静置 30min 后， 50μl/孔加入含有细胞的 96 孔白色细胞培养板中，放入 37°C、5%二氧化碳培养箱中孵育 6 h。同时设置空白对照、以及仅包含 VEGFA 或 VEGFC 分子的对照、和替代待测融合蛋白加入 IgG 同种型对照抗体或抗 VEGF A 分子 Elylea 或抗 VEGF C 分子 OPT302 的对照。

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

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

在以上测定法所述的实验中，检测结果如图 2 和图 3 显示， 测试的本发明三特异性融合蛋白均可阻断 VEGF A 或 VEGF C 诱导的 KDR 信号通路激活。

实施例 5 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 VEGF C 诱导的 BaF3-FLT4 增殖

本研究将本发明多特异性融合蛋白和重组人 VEGFC 蛋白与 BaF3-FLT4 细胞(过表达 FLT4(VEGFR3)的 BaF3 细胞，中国医学科学院基础医学研究所）共同孵育。通过 CCK-8 试剂盒（同仁化学）检测活细胞数量，从而反映出不同融合蛋白对 VEGFC 诱导的 BaF3-FLT4 增殖的抑制作用。

使用携带 FLT4 基因的慢病毒感染 BaF3 细胞，获得过表达 FLT4 的 BaF3 细胞 BaF3-FLT4。

按照 CCK-8 试剂盒说明书进行细胞增殖抑制试验。使用含 10%FBS 的 1640 培养基配制实验培养基。测试抗体最高终浓度为 10nM，依次 1:3 等比稀释。同时设置空白对照组(blank);以及仅加入 VEGFC 的 VEGF-C 实验组。在测试体系中，hVEGFC(R&D)终浓度为 20 ng/ml，BaF3-FLT4 细胞终浓度为 $2x10^5$cell/ml。在 96 孔板中用每孔体系 100ul，37 摄氏度 CO2 培养箱孵育 72h。之后，每孔加入 15ul CCK-8，37 摄氏度 CO2 培养箱孵育 4h。采用双波长测定吸光度值，检测波长为 450nm，参考波长为 620nm。计算 OD450-OD620 值。

实验结果如图 4 所示。本发明的三特异性融合蛋白可以在体外有效抑制 hVEGFC 诱导的 BaF3-FLT4 存活和增殖。

实施例 6 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断 Ang2 与 Tie2 结合

通过 ELISA 检测了本发明多特异性融合蛋白以及对照抗体 Faricimab 阻断人 Ang2 与 hTie2 结合的能力。

将 hTie2 蛋白（北京义翘）使用 PBS 重悬并配制为 2ug/ml 浓度，用于包被酶标板过夜。使用 5%BSA 封闭板 1h。将生物素抗原 Recombinant Biotinylated hAngiopoietin-2 蛋白（R&D）稀释至 600ng/ml，按 50 μl/孔加入酶标板。将如上所述制备的多特异性融合蛋白从最高浓度开始进行梯度稀释，共 8 个或 12 稀释梯度。按 50 μl/孔将梯度稀释的融合蛋白加入酶标板，于 PBS 冰上孵育 30 min，其中抗原终浓度为 300ng/ml。将包含抗原和融合蛋白混合液的酶标板孵育 90min，PBS 洗三次，弃上清，加 1:10000 稀释的 100 μl Avidin-HRP（Invitrogen）/孔，常温孵育 30 min，加 PBS 洗六次。使用 100ul/孔 TMB 显色液（solarbio）显色 1 min，并用终止液（solarbio）100ul/孔终止。使用酶标仪读取 OD_{450} 和 OD_{620} 吸光度值。

实验结果表明，本发明多特异融合蛋白以及对照抗体 Faricimab 实现完全的阻断效果，而且就 IC50 值而言，本发明多特异性融合蛋白明显优于对照抗体 Faricimab。（参见图 5）

实施例 7 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白阻断人 Ang2-Fc 蛋白与过表达 Tie2 的 293 细胞的

结合

通过流式细胞术(FACS)，检测了本发明多特异性融合蛋白(IAR044-030 和 IAR044-032)以及对照抗体阻断人 Ang2-hFc 与细胞表面的 Tie2 结合的能力。

通过转染携带克隆至 MCS 的人 Tie2 基因的 pCHO1.0 载体（Invitrogen），产生过表达人 Tie2 的 expi-293 细胞（293-tie2 细胞）。

将抗原 hAng2-Fc 蛋白（北京义翘）稀释至 4ug/ml，以 50 μl/孔加入板孔。将抗 ANG2 分子（IAR044-030、IAR044-032 和对照抗体 Faricimab）从最高浓度 800nM 开始进行 2 倍梯度稀释，共 12 个稀释梯度，50 μl/孔加入板孔，于 PBS 冰上孵育 30 min，其中抗原终浓度 2ug/ml，抗 ANG2 分子最高终浓度 400nM。将 293-tie2 细胞调节至 2×10^5cell/孔，100μl/孔。细胞于 300 g 离心 5 min，弃上清，重悬于抗原/抗 ANG2 分子混合液中，冰上孵育 30 min。加 PBS 100 μl/孔，300 g 离心 5 min，PBS 清洗 1 次。加 1:200 稀释的 100 μl 山羊抗人 IgG-PE （SouthernBiotech）/孔，冰浴 20 min。加 PBS 100 μl/孔，300 g 离心 5 min，PBS 清洗 1 次。用 100 μl PBS 重悬细胞，细胞流式仪（BD Biosciences）检测细胞荧光信号值。根据其 MFI，用 GraphPad 拟合浓度依赖的曲线。结果如图 6 所示。

实验结果表明，IAR044-030 和 IAR044-032 以及对照抗体 Faricimab 实现完全阻断，就 IC50 而言，IAR044-030 与 IAR044-032 明显优于对照抗体。（参见图 6）

实施例 8 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制人 Ang2-Fc 蛋白诱导的 293-tie2 细胞中的 Tie2 磷酸化

为检测本发明融合蛋白对于 hAng2-Fc 诱导的 tie2 磷酸化的抑制作用，使用 hAng2 诱导的磷酸化实验。

在此实验中，将本发明融合蛋白和重组 hAng2-fc 蛋白，与过表达 tie2 的 expi293 细胞（293-tie2 细胞）共同孵育，通过检测体系中磷酸化 Tie2 的含量，反映出不同融合蛋白对 hAng2-fc 诱导的 Tie2 磷酸化的抑制作用。

取过表达 Tie2 的 293-tie2 细胞，稀释至 $2x10^6$cell/ml，每孔 100ul 加入 96 孔板，400g 离心 5min，去上清。

使用 Expi293 培养基配制实验培养基，其中测试融合蛋白最高终浓度为 60ug/ml，依次 1:2 等比稀释；hAng2-fc 终浓度为 2.5ug/ml。抗 VEGFA/Ang2 双特异性抗体 Farcimab、以及与待测本发明融合蛋白具有相似抗 VEGFC 的 VHH 结构域的双特异性融合蛋白(IEX04-56)或具有相同抗 Ang2 的 VHH 结构域的双特异性抗体 (IEX04-012)用作对照。

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

按照磷酸化 tie2 ELISA 试剂盒（R&D，货号：DYC2720E）方案检测 pTie2 浓度。简言之，将捕获抗体以 4ug/ml 浓度包被至酶标板上 4°C过夜。PBST 洗涤三次，5%BSA 封闭 1h。加入待测样品（可 2~3 倍稀释）100ul 及对照 pTie2(用于制作标准曲线)，室温孵育 2h。PBST 洗涤三次，加入 100ul 缀合有 HRP 的抗 pTyr 抗体，室温孵育 2h。PBST 洗涤 6 次，加入 100ul TMB 显色，15min 后加入 100ul 终止缓冲液终止反应。测定 OD_{450}-OD_{620} 值。

实验结果如图 7 所示。本发明的多特异性融合蛋白可以在体外有效抑制 hAng2-Fc 诱导的 293 细胞中 Tie2 磷酸化，且抑制活性优于阳性对照抗体 Farcimab。

实施例 9 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制 VEGF A+VEGF C 诱导的 HUVEC 增殖

VEGF A 和 VEGF C 可作用于血管内皮细胞中 VEGFR 等相关的受体，促进血管内皮细胞存活，增殖和迁移，进而诱导新生血管化。本实验采用 VEGF A 和 VEGF C 共同诱导人脐静脉内皮细胞（HUVEC）存活和增殖，检测本发明多特异性融合蛋白对 VEGF A 和 VEGF C 诱导的原代细胞存活和增殖的抑制作用。

本实施例通过 CCK-8 测定 HUVEC 的存活和增殖，具体方法如下：提前一天处理细胞，2000 cell/孔铺于 96 孔培养板中，放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 24 小时。待细胞贴壁后，配置含终浓度为 5ng/ml VEGF A 和 60ng/ml VEGF C 和梯度稀释的融合蛋白的实验培养基，置换 96 孔板中内皮细胞培养基，放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 72 小时。抗 VEGFA 分子 Aflibercept 和抗 VEGFC 分子 OPT302 及其 1:1 摩尔比混合物、以及抗 VEGF C/VEGF A 双特异性融合蛋白(IEX04-056)和抗 ANG2/VEGF A 双特异性抗体(IEX04-012)用作对照。

细胞用实验培养基孵育之后，以 10μl/孔加入 CCK-8 检测液（同仁化学），放入 37℃、5%二氧化碳培养箱中孵育 12~24 小时。使用多功能酶标仪进行吸光度 OD_{450}-OD_{620} 读值。

在以上测定法所述的实验中，检测结果如图 8 所示。本发明三特异性融合蛋白能够完全抑制 VEGF A+VEGF C 诱导的 HUVEC 细胞增殖和存活。

实施例 10 抗 VEGF A/VEGF C/Ang2 多特异性融合蛋白抑制 A375 肿瘤生长新生血管化实验

本实施例通过将 A375 人恶性黑色素瘤细胞以 $3x10^6$ cell 接种每只小鼠，在 nude 小鼠中测定本发明的多特异性融合蛋白的抗新生血管化和抗肿瘤作用。

人 nude 小鼠：

雌性 BALB/c 背景的 nude 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司,等级为 SPF 级。小鼠在到达后驯化 7 天，随后开始研究。

细胞：

人 A375 细胞购自 ATCC(CAT#: CRL-1619)，并严格按照说明书进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞，用 PBS 与基质胶（Matrigel）以 1:1 的比例分散 A375 细胞，制备成细胞浓度为 $1.5x10^7$ 个/mL 细胞悬液。在第 0 天小鼠皮下注射 A375 细胞悬液，0.2 mL/只，即接种量为 $3x10^6$ 个细胞/只小鼠。

给药：

小鼠随机分组（每组 6 只小鼠）。给药剂量和方式如表 8 所示，PBS(购自 Gibco)作为阴性对照，分别在接种后第 6、8、10、12、14、16、18、20 天给药，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重。在每次给药前测定体重和肿瘤体积。接种后第 21 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：TGI%=100% * (对照组肿瘤体积–治疗组肿瘤体积)/(对照组肿瘤体积–对照组给药前肿瘤体积)。肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按如下公式计算：$V=L\times W^2/2$。采用电子天平测定体重。

表 8. 实验设计

组别	给药剂量	给药次数	给药方式
IgG	25 mg/kg	Q2DX8	腹腔注射
Aflibercept	20 mg/kg	Q2DX8	腹腔注射

IEX04-010*	25 mg/kg	Q2DX8	腹腔注射
IEX04-056*	25 mg/kg	Q2DX8	腹腔注射
IAR044-030	20 mg/kg	Q2DX8	腹腔注射

*：作为对照的 IEX04-010 和 IEX04-056 分子的结构显示于 SEQ ID NO: 43 和 44 中。

肿瘤抑制率结果(如图 9 和表 9)显示：本发明针对 VEGF A、VEGF C 和 Ang2 的三特异性分子对肿瘤有明显的抑制效果。

表 9. 第 21 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积（mm^3）	TGI(%)
IgG	209	/
Aflibercept	114	46
IEX04-010	78	63
IEX04-056	85	59
IAR044-030	62	70

实施例 11. 激光诱导的脉络膜新生血管化药效试验

本实验采用小鼠激光诱导的脉络膜新生血管化模型，测定本发明的三特异性融合蛋白的抗新生血管化作用。实验动物为 SPF 等级的 C57 小鼠，体重 18~30g。

本试验采用激光围绕小鼠眼底黄斑中心凹光凝，诱导眼底脉络膜血管新生，建立与人类脉络膜新生血管类似的动物模型。光凝前 24 小时对小鼠分组，分别为模型对照组、Aflibercept 组、IEX04-010 组、IEX04-056 组、IAR044-030 组和 IAR044-032 组共 6 组，每组 5 只小鼠。光凝后 24 小时内，分别按下表 10 中剂量进行给药，双眼玻璃体注射给予供试品，模型对照组接受等体积的 0.9%氯化钠注射液。光凝后 第 3 天，第 5 天和第 10 天，分别进行眼底彩色照相、荧光素眼底血管造影检查，观察供试品对脉络膜新生血管的抑制情况。于给药后 10 天实施安乐死后取双眼进行 HE 染色组织学检查。

表 10：实验设计表

组别	剂量	给药体积	浓度	给药方式
对照	/	/	X mg/ml	玻璃体腔给药
Aflibercept	40ug/眼	1ul/眼	40mg/ml	玻璃体腔给药
IEX04-010	40ug/眼	1ul/眼	40mg/ml	玻璃体腔给药
IAR044-032	40ug/眼	1ul/眼	40mg/ml	玻璃体腔给药

眼底彩色照相及荧光造影检查

评价指标：

（1）荧光斑评级

造模后荧光造影所摄光斑的分级标准：

1 级：光斑没有出现高荧光；

2 级：光斑高荧光但没有荧光素渗漏；

3 级：光斑高荧光，轻度荧光素渗漏，渗漏不超过光斑边缘；

4 级：光斑高荧光，显著荧光素渗漏，渗漏超过光斑边缘。

统计 1-4 级光斑， 每次检查均需记录眼底激光斑等级。

（2）荧光素渗漏面积改善率

荧光素渗漏面积改善率(%)=（给药前荧光素渗漏面积-给药后荧光素渗漏面积）/给药前荧光素渗漏面积*100%

结果显示在图 10-11 中。尽管试验样本数有限，但可以看出，本发明多特异性融合蛋白 IAR044-032 在给药 5 天后已显示出显著的抗新生血管化趋势。

实施例 12. DL-AAA 诱导的视网膜新生血管化试验

本实验使用荷兰兔视网膜新生血管化模型检测分子对视网膜新生血管化的抑制作用。

实验动物描述

种属和品系：荷兰兔

动物等级：普通级

实验动物来源：邵州市东方养殖有限公司，实验动物生产许可证号： SCXK（苏）2017-0002，实验动物质量合格证编号：NO.202227644、 NO.202259452。

给药开始年龄（D1）： 8-15 月龄

给药开始前体重（D1）：2.46-3.44 kg。

动物数量：使用 29 只造模合格的动物（均为雌性，经由经玻璃体腔注射 DL-α-AAA (DL-α-氨基己二酸进行造模），入组 36 只眼。

实验方法

动物分组和试验设计

在给药前，根据造模眼 RNV 的荧光渗漏面积，将动物进行平均分组，具体见下表 11。在 D1 天开始给药。

表 11 动物分组和试验设计

组号	供试品/对照品	剂量（mg/眼）	浓度 (mg/mL)	体积 (μL/眼)	眼数#	给药方式
1	PBS	0	0	50	6	玻璃体腔给药
2	Eylea®	0.1	2	50	6	玻璃体腔给药
3	IEX04-012	0.1	2	50	6	玻璃体腔给药
4	IEX04-056	0.1	2	50	6	玻璃体腔给药
5	IAR044-030 低剂量	0.03	0.6	50	6	玻璃体腔给药
6	IAR044-030 高剂量	0.1	2	50	6	玻璃体腔给药

#：表示造模成功动物入组眼的眼别不限。

眼底无赤光影像（Red-free image）

所有动物在筛选时（造模后 12 周）、入组前、 D8、D15、 D29、 D43、 D47（仅动物#2318791）、D57、 D71，采集动物眼底无赤光影像，检查区域为颞侧、中央和鼻侧神经纤维层，观察 RNV 形态。

眼底血管荧光造影（FFA）

所有动物在筛选时（造模后 12 周）、入组前、 D8、D15、 D29、 D43、 D47（仅动物#2318791）、D57、 D71，进行 FFA 检查。 FFA 检查前，动物需要静脉注射给予 10 %荧光素钠注射液（剂量为 10

mg/kg，浓度为 100 mg/mL）。采集 FFA 早期、晚期图片，以约 1.5 min 内为早期图像，以约 1.5-3 min 为晚期图像。根据动物眼底有无荧光渗漏判断是否有 RNV 生成及渗漏，测定荧光渗漏面积，计算荧光渗漏面积减少量及荧光渗漏面积改善率：

荧光渗漏面积减少量＝给药前荧光渗漏面积－给药后荧光渗漏面积；

荧光渗漏面积改善率=荧光渗漏面积减少量/给药前荧光渗漏面积×100%。

结果显示(图 12)，在试验期间， 以 0.1 mg/眼剂量给药的 Eylea®、IEX04-012、IEX04-056、IAR044-030 以及以 0.03 mg/眼剂量给药的 IAR044-030 均可有效抑制荧光渗漏， Eylea®的抑制效果可持续至 D57， IEX04-056 的抑制效果可持续至 D57，而 IEX04-012 和低、高剂量 IAR044-030 的抑制效果均可持续至 D71，其中 IEX04-012 和低剂量 IAR044-030 的药效优于 Eylea®，且低剂量 IAR044-030 的药效强于 IEX04-012。

实施例 13. 小鼠血管渗漏 evans blue 染色实验

通过皮下注射 VEGF A，Ang2 和 VEGF C 可在体内诱导新生血管化，并促进渗漏。本实施例通过提前给予小鼠静脉注射 evans blue，30min 后将 VEGF A 50ng+ Ang2 500ng+ VEGF C 500ng 皮下注射给小鼠以诱导模型，其中每个局部一个点，每侧 3 个点，每只小鼠共计 6 个点，同时如下表 12 所示按不同分组注射以下药物，并在给药 20min 后拍照并统计渗漏面积。

表 12 动物组别和试验设计

组号	剂量/点	给药方式
IgG	50μg	单次，皮下
Aflibercept	40μg	单次，皮下
IAR044-032	40μg	单次，皮下
IEX04-010	50μg	单次，皮下
IEX04-056	50μg	单次，皮下
IAR044-019	60μg	单次，皮下
IAR044-030	40μg	单次，皮下

结果显示在图 13 中。如图所示，多特异性融合蛋白分子（IAR044-030，IAR044-032，IAR044-019）能够显著抑制血管渗漏，且效果优于临床药物及双特异性药物。

序列表概述

本申请附带有包含许多核酸和氨基酸序列的序列表。下表提供了所包含的序列的概述。

SEQ ID NO:	序列描述	序列信息
		抗 VEGF-C 抗体序列
1	抗 VEGF-C HCDR1	GSSFSPYAMG
2	抗 VEGF-C HCDR2	ATSEGGFTLYADSVKG
3	抗 VEGF-C HCDR3	HWRGSDPENY
4	抗 VEGF-C VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
		抗 ANG2 抗体序列
5	抗 ANG2 HCDR1	GFALDYYAIG

6	抗 ANG2 HCDR2	CISSGEGSTYYADSVKG
7	抗 ANG2 HCDR3	DSRGDDVACEGLRRNEYDY
8	抗 ANG2 VHH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGT LVTVSS
		抗 VEGF-A mini-Trap，来自 UniProt P17948 和 UniProt P35968 的人 VEGFR1 和 VEGFR2 序列
9	Mini-Trap 包含 VEGFR1 结构域 2(aa129-aa230) 和 VEGR2 结构域 3(aa225-327)	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTEL NVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGL MTKKNSTFVRVHEK
		短接头序列
10	短接头 1	GGGGGGGGGG
11	短接头 2	GRPGSGRPGS
		铰链序列
12	Hinge_1	ESKYGPPCPPCPPC
13	Hinge_2	EKTHTCPPCPPC
14	Hinge_3	EPKSSPPCPPCPAPC
15	Hinge_4	DTTHTCPPCPPC
16	Hinge_5	DKTHTCPPCPPC
17	Hinge_6	EPKSCDTPPPCPPCP
18	Hinge_7	EPKSSDTPPPCPPCPPC
19	Hinge_8	DKTHTCPPCPAPELLG
20	含 Hinge2 的连接肽	ESKYGPPCPPCPPCGGGGGGGGGG
21	含 Hinge3 的连接肽	EKTHTCPPCPPCGGGGGGGGGG
		本发明三特异分子
22	IAR044-019 Ang2_L1_Va_Fc_ L1_Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGRPGSGRPGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPL DTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSH GIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTI DGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGGRPGSGRPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMG WYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYC YMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
23	IAR044-028 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKEPKSSPPCPPCPAPCGGGGGGGGGE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
24	IAR044-030 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKESKYGPPCPPCPPCGGGGGGGGGGEV

		QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSV KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
25	IAR044-032 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKEKTHTCPPCPPCGGGGGGGGGGEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
26	IAR044-034 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDTTHTCPPCPPCGGGGGGGGGGEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
27	IAR044-035 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKEPKSCDTPPPCPPCPGGGGGGGGGGE VQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADS VKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
28	IAR044-036 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKEPKSSDTPPPCPPCPPCGGGGGGGGG GEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLY ADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
29	IAR044-038 Va_L2_Ang2_L1_ Vc	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKEPKSSPPCPPCPAPCGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ MNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSV KGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
30	IAR044-039 Va_L2_Ang2_L1_ Vc	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKESKYGPPCPPCPPCGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQM NSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
31	IAR044-040 Va_L2_Ang2_L1_ Vc	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKEKTHTCPPCPPCGGGGGGGGGGEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSSGGGGGGGGGGGEVQLV ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
32	IAR044-022m 或- 22b	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGRPGSGRPGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQ

	Va_L2_Ang2 _L1_Vc 其中 022m 表示单体多肽；022b 表示二聚体多肽。	MNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSSGRPGSGRPGSEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVK GRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
33	IAR044-029 Ang2_L1_Va_L1_ Vc-hinge	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYA DSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQ GTLVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFP LDTLIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPS HGIELSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTL TIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGGGGGGGGGGEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKGRFTISRDNSKN TVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPPC
34	IAR044-033 Ang2_L1_Va_L1_ Vc-hinge	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGT LVTVSSGRPGSGRPGSSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLI PDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELS VGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTR SDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKGRPGSGRPGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA ASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNS LRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSSDKTHTCPPCPPC
		Fc 区序列
35	人 IgG1 Fc 区	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
		阳性对照 VEGF-A Trap 分子 Aflibercept
36	阳性对照 Aflibercept	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
		阳性对照抗 VEGFA/ANG2 抗体 Faricimab 序列
37	阳性对照抗体 Faricimab 第一重链可变区 VH1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPT YAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQGTLV TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS VFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTK NQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
38	阳性对照抗体 Faricimab 第二重链可变区 VH2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYYMHWVRQAPGQGLEWMGWINPNSGGT NYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARSPNPYYYDSSGYYYPGAFDIW GQGTMVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMASRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLAQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQV CTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNAYTQKSLSLSPGK
39	阳性对照抗体 Faricimab 第一轻链可变区 VL1	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
40	阳性对照抗体 Faricimab 第二轻链可变区 VL2	SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPVLVVYDDSDRPSGIPERFS GSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHWVFGGGTKLTVLSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

		阳性对照 VEGF-C Trap 分子 OPT-302
41	阳性对照 OPT-302	YSMTPPTLNITEESHVIDTGDSLSISCRGQHPLEWAWPGAQEAPATGDKDSEDTGVVRDCEG TDARPYCKVLLLHEVHAQDTGSYVCYYKYIKARIEGTTAASSYVFVRDFEQPFINKPDTLLV NRKDAMWVPCLVSIPGLNVTLRSQSSVLWPDGQEVVWDDRRGMLVSTPLLHDALYLQCET TWGDQDFLSNPFLVHITGNELYDIQLLPRKSLELLVGEKLVLNCTVWAEFNSGVTFDWDYPG KQAERGKWVPERRSQQTHTELSSILTIHNVSQHDLGSYVCKANNGIQRFRESTEVIVHEEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
		阳性对照抗 VEGFA/ANG2 分子，由抗 VEGF-A scFv +接头+抗 ANG2 VHH 组成
42	阳性对照 IEX04-012 分子	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIYFTSSLHSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGCGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGG GGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQAPGKCLEWVGWINTYTG EPTYAADFKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPYYYGTSHWYFDVWGQ GTLVTVSS<u>GGGGSGGGGSGGGGS</u>*EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQA PGKGLEGVSCISSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVA CEGLRRNEYDYWGQGTLVTVSS*
		阳性对照抗 VEGFA/ANG2 分子，由 VEGF-A Trap +接头+抗 ANG2 VHH 组成
43	阳性对照 IEX04-010 分子	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTE LNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSG LMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>GG GGSGGGGSGGGGS</u>*EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCI SSGEGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDY WGQGTLVTVSS*
		阳性对照抗 VEGFA/VEGFC 分子，由 VEGF-A Trap +Fc+接头+抗 VEGFC VHH 组成
44	阳性对照分子 IEX04-056	SDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWDSRKGFII SNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIELSVGEKLVLNCTARTEL NVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGL MTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG<u>GGGGS GGGGSGGGGS</u>*EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSSG GFTLYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYTYYREYDPEMYWGQGTQVTVSS*
		本发明的其他铰链序列
45	Hinge_9	EPKSSPPCPPCPAPCLLG
46	Hinge_10	DKTHTCPPCPAPCLLG
		CH3 区序列
47	人 IgG1 CH3 区	GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
		本发明的其他三特异性分子
48	IAR044-026 Ang2_L1_Va_L2_ Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDT LIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIE LSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGV TRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKEPKSSPPCPPCPAPCLLGGGGGGGGGGGEVQ LVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
49	IAR044-027	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDT

	Ang2_L1_Va_L2_CH3_Vc	LIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIE LSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGV TRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKGRFTISRDNSKNTVYLQMN SLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
50	IAR044-031 Ang2_L1_Va_L2_Vc	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFALDYYAIGWFRQAPGKGLEGVSCISSGEGSTYYAD SVKGRFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCATDSRGDDVACEGLRRNEYDYWGQGT LVTVSSGGGGGGGGGGSDTGRPFVEMYSEIPEIIHMTEGRELVIPCRVTSPNITVTLKKFPLDT LIPDGKRIIWDSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVVLSPSHGIE LSVGEKLVLNCTARTELNVGIDFNWEYPSSKHQHKKLVNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGV TRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPCLLGGGGGGGGGGGEVQL VESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSSFSPYAMGWYRQAPGKQRELVSATSEGGFTLYADSVKG RFTISRDNSKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCYMHWRGSDPENYWGQGTQVTVSS
		其他铰链
51	来源于人 IgG1 的铰链	DKTHTCPPCPPCPPC
52	来源于人 IgG2 的铰链	ERKCCVECPPC
53	来源于人 IgG3 的铰链	EPKSCDTPPPCPRCP
54	来源于马 IgG6 的铰链	EPCCCPKCP
		其他序列
55	连接肽	(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
56	连接肽	TS(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
57	连接肽	G(G4S)n，其中 n 是等于或大于 1 的整数
58	连接肽	(GGGGG)n，其中 n 是等于或大于 2 的整数
59	连接肽	(GRPGS)n，其中 n 是等于或大于 2 的整数
60	铰链序列	CPPC
61	铰链序列	CPPCPPC
62	连接肽	(G4S)2
63	连接肽	(G4S)3
64	连接肽	EPKSSPPCPPCPAPCLLG(GGGGG)2
65	C 端具有 CH3 区的连接肽	DKTHTCPPCPAPELLGGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
66	连接肽	EPKSSPPCPPCPAPC(GGGGG)2
67	连接肽	DKTHTCPPCPAPCLLG(GGGGG)2
68	连接肽	DTTHTCPPCPPC(GGGGG)2
69	连接肽	EPKSCDTPPPCPPCP(GGGGG)2
70	连接肽	EPKSSDTPPPCPPCPPC(GGGGG)2

权利要求

1. 一种三特异性融合蛋白，其包含：

含有(i) VEGF-C 结合结构域；(ii) ANG2 结合结构域和(iii) VEGF-A 结合结构域的多肽链，

其中，所述 VEGF-C 结合结构域和 ANG2 结合结构域分别包含或由特异性结合 VEGF-C 或 ANG2 的 VHH 结构域组成， 且

其中，所述 VEGF-A 结合结构域包含或由特异性结合 VEGF-A 的配体捕获结构域组成，其中所述配体捕获结构域包含来自 VEGF 受体(VEGFR)的胞外结构域，

优选地，所述多肽还包含(iv) 选自铰链区、CH3 区和 Fc 区的二聚化结构域。

2. 权利要求 1 的融合蛋白，其中，所述融合蛋白的多肽链包含铰链区，且其中所述铰链区包含 CPPC (SEQ ID NO: 60)或 CPPCPPC(SEQ ID NO: 61)氨基酸序列，优选地所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 SEQ ID NOs:45-46 的氨基酸序列，更优选 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列。

3. 权利要求 1-2 的融合蛋白，其中，所述 VEGF-C 结合结构域包含 SEQ ID NO:4 所含有的 CDR1-3 序列，优选地，包含 SEQ ID NO: 1 或由其组成的 CDR1 序列；包含 SEQ ID NO: 2 或由其组成的 CDR2 序列；和包含 SEQ ID NO: 3 或由其组成的 CDR3 序列；

再优选地，所述 VEGF-C 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 4 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VEGF-C 结合结构域包含 SEQ ID NO: 4 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列组成。

4. 权利要求 1-3 的融合蛋白，其中所述 ANG2 结合结构域包含 SEQ ID NO: 8 所含有的 CDR1-3 序列，优选地，包含 SEQ ID NO: 5 或由其组成的 CDR1 序列；包含 SEQ ID NO: 6 或由其组成的 CDR2 序列；和包含 SEQ ID NO:7 或由其组成的 CDR3 序列；

再优选地，所述 ANG2 结合结构域包含 SEQ ID NO: 8 或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 8 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 ANG2 结合结构域包含 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列组成。

5. 权利要求 1-4 的融合蛋白，其中所述 VEGF-A 结合结构域包含 VEGFR-1 的免疫球蛋白样（Ig）结构域 2 和 VEGFR-2 的 Ig 样结构域 3，且优选地包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，或与 SEQ ID NO: 9 相比具有一个或多个(优选地 1-10 个，更优选地 1-5 个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列，

最优选地，所述 VEGF-A 结合结构域包含 SEQ ID NO: 9 的氨基酸序列，或由 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列组成。

6. 权利要求 1-5 的融合蛋白，其中所述融合蛋白的多肽链从 N 端到 C 端包含：

(i) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(ii) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(iii) VEGFA 结合结构域、铰链区、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(iv) VEGFA 结合结构域、铰链区、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(v) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区，或

(vi) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、铰链区；

或者，其中所述融合蛋白的多肽链从 N 端到 C 端包含：

(i) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(ii) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(iii) VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFC 结合结构域，

(iv) VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、ANG2 结合结构域，

(v) ANG2 结合结构域、第一连接肽、VEGFC 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区，或

(vi) VEGFC 结合结构域、第一连接肽、ANG2 结合结构域、第二连接肽、VEGFA 结合结构域、Fc 区或 CH3 区，

且任选地，所述融合蛋白的多肽链还包含连接在所述 Fc 区或所述 CH3 区 N 端的铰链区。

7. 权利要求 6 的融合蛋白，其中：

(i) 所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列，更优选 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列；

(ii) 所述第一和第二连接肽包含 5-12 个氨基酸长度，优选地包含氨基酸序列(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)或者(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n=2 或 3；

(iii) 所述 Fc 区为来自人 IgG 的 Fc 区，更优选地所述 Fc 区包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列，

(iv) 所述 CH3 区为来自人 IgG 的 CH3 区，更优选地所述 CH3 区包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列或与其具有至少 85%、90%、95%或 99%同一性的氨基酸序列。

8. 权利要求 1-7 的融合蛋白，其中所述多肽链包含：

(i) 选自 SEQ ID NOs: 22-34 和 48-50 的氨基酸序列；或

(ii) 与(i)的氨基酸序列具有至少 80%， 85%, 90%, 91%, 92%,93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%或以上的同一性的氨基酸序列；或

(iii) 相对于(i)的氨基酸序列具有至少 1-30 个，或 1-20 个，或 1-15 个，或 1-10 个，或 1-5 个氨基酸改变(例如，替代，缺失和/或插入，优选替代，更优选保守替代)的氨基酸序列。

9. 权利要求 1-8 的融合蛋白，其中所述多肽链包含 SEQ ID NO: 24 或 25 的氨基酸序列或由其组成。

10. 权利要求 1-9 的融合蛋白，其为包含两条相同的所述多肽链的二聚体蛋白。

11. 编码权利要求 1-10 的融合蛋白的多核苷酸。

12. 包含权利要求 11 的多核苷酸的表达载体。

13. 转染了权利要求 12 的载体的宿主细胞。

14.产生权利要求 1-10 的融合蛋白的方法,包括培养权利要求 13 的宿主细胞,和回收产生的融合蛋白。

15. 包含权利要求 1-10 的融合蛋白和药学可接受载体的药物组合物。

16. 治疗新生血管化相关疾病的方法，包括向受试者施用权利要求 1-10 的融合蛋白或其药物组合物。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述疾病为实体瘤，其中所述融合蛋白的施用抑制肿瘤内的新生血管形成和/或肿瘤的生长。

18. 权利要求 16 的方法，其中所述疾病为眼部疾病，例如脉络膜新生血管化或视网膜新生血管化。

19. 权利要求 1-10 的融合蛋白用作药物的用途、用作治疗疾病的药物或用作诊断疾病的诊断工具的用途、或在制备在受试者中治疗和/或预防疾病的药物和/或用于制备诊断疾病的诊断工具的用途，其中所述疾病优选为新生血管化相关疾病，例如实体瘤和眼部疾病。

20.一种多特异性融合蛋白，其包含：

含有分别特异性结合第一抗原的第一 VHH 结构域、特异性结合第二抗原的第二 VHH 结构域和特异性结合第三抗原的配体捕获结构域的多肽链，其中所述多肽还包含选自铰链区、CH3 区或 Fc 区的二聚化结构域，优选地，其中所述铰链区、CH3 区或 Fc 区连接在配体捕获结构域的 C 末端。

21. 权利要求 20 的融合蛋白，其中所述多肽链包含：

(i) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、配体捕获结构域、铰链区、第二连接肽、第二 VHH 结构域，

(ii) 配体捕获结构域、铰链区、第一连接肽、第一 VHH 结构域、第二连接肽、第二 VHH 结构域，或

(iii) 第一 VHH 结构域、第一连接肽、第二 VHH 结构域、第二连接肽、配体捕获结构域、铰链区，

优选地，其中所述铰链区包含选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列，更优选 SEQ ID NO: 12 或 13 的氨基酸序列，

优选地，所述第一和第二连接肽包含氨基酸序列(GRPGS)n (SEQ ID NO: 59)或者(GGGGG)n (SEQ ID NO: 58)，其中 n=2 或 3，

再优选地，第一和第二抗原彼此不同且分别独立选自 VEGF-C 和 ANG2，且第三抗原为 VEGF-A。

22. 一种铰链区，其包含或由选自 SEQ ID NOs: 12-19 和 45-46 的氨基酸序列组成。

23. 权利要求 22 的铰链区，其包含或由 SEQ ID NO: 12 或 SEQ ID NO: 13 的氨基酸序列组成。