

一种含有抗 VEGF 的融合蛋白的药物组合物

本申请要求申请日为 2023/12/27 的中国专利申请 2023118409197 的优先权。本申请引用上述中国专利申请的全文。

技术领域

本发明涉及药物制剂领域，具体涉及一种含有抗 VEGF 的融合蛋白的药物组合物。

背景技术

新生血管的形成是许多疾病发展和扩散的关键所在。眼部的许多疾病都涉及血管发生，包括年龄相关性黄斑变性(AMD)、视网膜静脉阻塞(RVO)、糖尿病视网膜病变(DR)和病理性近视等。VEGF 是一种高度特异性的促血管内皮细胞生长因子，具有促进血管通透性增加、细胞外基质变性、血管内皮细胞迁移、增殖和血管形成等作用。VEGF 广泛分布于人和动物体内多处组织中，正常眼视网膜色素上皮细胞、血管内皮细胞和周细胞均可产生较低水平的 VEGF。许多研究已证实如果 VEGF 表达过量就可以诱发病理性新生血管性眼病。由于 VEGF 信号传递对血管新生的重要性，阻断 VEGF 或 VEGF 受体从而达到抑制血管新生，对包括癌症、视网膜血管病变等与血管新生相关的疾病有着重要的治疗作用。在过去的十多年，诞生了一些用于治疗眼部新生血管性眼病的抗 VEGF 药物，如贝伐单抗、雷珠单抗、阿柏西普、康柏西普等抗体或融合蛋白药物。

盐键、氢键、二硫键和疏水作用是维持蛋白质构象稳定作用力。金属离子、底物、辅助因子和其他低相对分子量配体的相互作用使蛋白构象稳定。本领域技术人员熟知，抗体或蛋白的在保存过程中会受到多种环境因素的影响，如温度，适度，氧，紫外线等都可以是融合蛋白发生多种物理或化学变化，造成蛋白质的聚合，分解，氧化或变性等。这些变化都可以使蛋白的活性降低，治疗效果下降并引起严重的毒副作用。

发明内容

本发明的目的一方面在于提供一种稳定性好、生物学活性稳定的含有抗 VEGF 的融合蛋白的药物组合物。

在某些实施方案中，本发明所述抗 VEGF 的融合蛋白包括两条融合多肽的二聚体，每个多肽包含 VEGFR-1 的细胞外结构域 2、VEGFR-2 的细胞外结构域 3、4 以及人免疫球蛋白 IgG4。在某些具体实施方案中，本发明所述抗 VEGF 的融合蛋白为包括两条含有

SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 1 序列如图 1) 所述融合多肽的二聚体, 两条融合多肽通过二硫键非共价连接, 分子量为 142kDa。以下简称该融合蛋白为融合蛋白 A。

融合蛋白 A 是中国专利“VEGF 受体融合蛋白在治疗眼睛疾病中的应用”(专利号 ZL200610066257.2)中描述的融合蛋白, 具体而言是 FP3 融合蛋白中的活性组成部分, 其由人血管内皮生长因子 VEGF 受体 1 中的免疫球蛋白样区域 2 和 VEGF 受体 2 中的免疫球蛋白样区域 3 和 4, 与人免疫球蛋白 Fc 片段经过融合而成, 具有如 SEQ ID NO: 1 所述的氨基酸序列, 因此 ZL200610066257.2 的内容可用于进一步阐述本发明。

本发明发现, 在细胞表达或纯化获得的蛋白中, 除了融合蛋白 A, 通常还含有低分子量的蛋白片段 B、C、D, 这可能是在细胞培养、纯化等过程中由各种应激条件诱导形成, 通常与自发或酶促反应导致的蛋白质共价键断裂有关。

蛋白片段 B 为融合蛋白 A 中一条融合多肽被截短后与另一条完整融合多肽形成的二聚体, 分子量为 131.2kDa。具体的, 蛋白片段 B 中一条被截短后的融合多肽具有 SEQ ID NO: 1 中第 82-526 位所述的氨基酸序列, 更具体具有如 SEQ ID NO: 2 所述的氨基酸序列, 另一条融合多肽具有如 SEQ ID NO: 1 所述的完整氨基酸序列。蛋白片段 B 的两条融合多肽通过二硫键非共价连接, 如图 2 所示。

蛋白片段 C 为融合蛋白 A 中一条融合多肽被截短后与另一条完整融合多肽形成的二聚体, 分子量为 122.6kDa。具体的, 蛋白片段 C 中一条被截短后的融合多肽具有 SEQ ID NO: 1 中第 142-526 位所述的氨基酸序列, 更具体具有如 SEQ ID NO: 3 所述的氨基酸序列, 另一条融合多肽具有如 SEQ ID NO: 1 所述的完整氨基酸序列。蛋白片段 C 的两条融合多肽通过二硫键非共价连接, 如图 3。

蛋白片段 D 为融合蛋白 A 中的一条融合多肽(单体), 分子量为 71kDa, 具有如 SEQ ID NO: 1 所述的氨基酸序列。

本发明的发明人意外发现, 在包含融合蛋白 A 的药物组合物中, 蛋白片段 B 的含量对于稳定性(例如融合蛋白 A 的聚合速率)以及活性具有重要的影响, 蛋白片段 C、D 对于稳定性以及活性的影响较小。通过控制药物组合物中低分子量蛋白片段 B 的含量, 能够更好地维持组合物中融合蛋白 A 的稳定性, 以及维持其生物学活性。

因此, 本发明一方面提供了一种药物组合物, 所述药物组合物含有抗 VEGF 的融合蛋白 A 和 0.01~7%的蛋白片段 B。在某些优选的实施方案中, 所述药物组合物含有抗 VEGF 的融合蛋白 A 和 0.01~5.4%的蛋白片段 B。在某些优选的实施方案中, 所述药物组合物含有抗 VEGF 的融合蛋白 A 和 0.01~4.6%的蛋白片段 B。

在某些实施方案中, 本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~7%。在某些优选的实施方案

案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~5.4%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~4.9%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~4.4%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~4.6%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~3.7%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~3.1%。

在某些实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~7%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~5.4%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~4.9%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~4.6%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 1.3~5.4%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 1.3~4.6%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~4.1%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~3.7%。在某些优选的实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~3.1%。

在某些实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.01~7%，蛋白片段 C 的含量为 0~12.0%，蛋白片段 D 的含量为 0~6.1%。在某些实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.1~7%，蛋白片段 C 的含量为 0~12.0%，蛋白片段 D 的含量为 0~6.1%。在某些实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~7%，蛋白片段 C 的含量为 0~12.0%，蛋白片段 D 的含量为 0~6.1%。在某些优选实施方案中，本发明所述蛋白片段 B 的含量为 0.6~5.4%，蛋白片段 C 的含量为 0~12.0%，蛋白片段 D 的含量为 0~6.1%。

在某些实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度大于 77%。在某些优选的实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度大于 78%，优选大于 78%，79%，80%，81%，82%，83%，84%，85%，86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%。

在某些实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 77~98%。在某些优选的实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 77~96%。在某些优选的实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 77~87%。在某些实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 80~98%。在某些实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 80~96%。在某些优选的实施方案中，本发明所述的抗 VEGF 的融合蛋白 A 的纯度为 80~87%。

在某些实施方案中，本发明所述的融合蛋白 A 及蛋白片段的含量通过凝胶电泳(SDS-PAGE)进行测定。在一些具体的实施方案中，本发明所述的 SDS-PAGE 按《中国药典》

2020 版(四部)通则“0541 电泳法第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法”,采用凝胶电泳,将含有上样缓冲液的蛋白 $70\pm 2^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min, 上样 $4\ \mu\text{g}$ 在 4~15%预制聚丙烯酰胺凝胶中电泳成像,该预制胶中添加有三氯化物荧光染料,在 300 nm 左右紫外光照下与蛋白中的色氨酸供价结合发出荧光,使凝胶中的蛋白达到可视化,根据主成分蛋白和杂蛋白的响应信号值计算蛋白纯度或杂质含量。

本发明药物组合物中融合蛋白的制备通过本领域常规的生物学方法进行表达载体的构建、细胞(如 CHO 细胞)的表达(如 CN200510073595.4 等方法)获得。融合蛋白 A、蛋白片段 B、C、D 的控制可以通过本领域常规的纯化方法,如 2005 年出版的《蛋白质纯化及分析技术》中记载的常规纯化方法(陆健编著,北京工业出版社)。

例如在某些实施例中,在融合蛋白 A 的纯化过程中可以通过凝胶色谱层析进行蛋白片段 B、C、D 的去除或含量控制。在凝胶色谱层析过程中,当含有不同分子量大小的混合蛋白质样品加到用凝胶颗粒填装而成的色谱柱,这些物质随洗脱液的流动而发生移动,在柱内存在垂直向下的因重力引起的移动和无规则的扩散两种运动方式。大分子蛋白由于直径较大,不能进入凝胶颗粒内的微孔,只能在颗粒之间的空隙流动,所以在洗脱时下移速度较快,最先被洗出凝胶柱;小分子蛋白除了可在凝胶颗粒间的空隙中扩散外,还可以渗透到凝胶内孔中,下移过程中在凝胶内部和颗粒间隙之间不断往复运动使其行程较长,最后被洗脱出柱;中等分子蛋白流出的时间介于大小分子之间,分子越大流出的时间越早,最终使样品中不同分子大小的蛋白质彼此分离。本发明融合蛋白 A 的分子量约 142kDa,而低分子量片段 B、C、D 的分子量在 71~131kDa 之间,其中片段 B 的分子量约 131.2kDa,片段 C 的分子量约 122.6kDa,片段 D 的分子量约 71kDa,因此可根据低分子量片段与融合蛋白 A 分子量大小不同,采用凝胶层析并根据本领域的常规方式调整工艺参数(例如填料、柱长、上样量、流速等),将目的蛋白与低分量片段进行分离,从而控制不同分子量片段的含量。凝胶层析色谱的分离原理及过程为本领域技术人员所熟知并可以根据实际的分离效果进行常规调整(如参见陆健编著,《蛋白质纯化及分析技术》,北京:北京工业出版社,2005 年,第 40-52 页)。例如在一个具体的示例性的实施方案中,用适用于 10~400kDa 蛋白分离的凝胶填料装填层析柱,采用层析平衡液平衡层析柱,控制上样体积 $\leq 10\%\text{CV}$ 、上样流速 $\leq 20\text{cm/h}$ 进行上样,平衡,收集目的蛋白。根据上述方法,可以按不同的收峰参数获得具有不同片段含量的样品蛋白。

例如在某些实施例中,在融合蛋白 A 的纯化过程中可以通过阳离子交换层析进行蛋白 A 及蛋白片段 B、C、D 的含量控制。离子交换色谱是蛋白纯化技术中常用的一种纯化方法,其原理是被分离物所带的电荷可与填料所带的相反电荷结合,这种带电分子与填

料相之间的结合作用是可逆的，在改变 pH 或者用逐渐增加离子强度的缓冲液洗脱时，填料上结合的物质可与洗脱液中的离子发生交换而被洗脱到溶液中。由于聚集体（HMWs）、单体、低分子量片段（LMWs）、宿主细胞蛋白（HCP）等的电荷不同，其与填料的结合能力也不同，所以被洗脱到溶液中的顺序也不同，从而被分离出来。本发明可根据低分子量片段以及其他杂质与蛋白 A 的电荷性质不同，从而控制融合蛋白 A 中低分子量片段及其他杂质的含量。阳离子交换层析的分离原理及过程为本领域技术人员所熟知并可以根据实际的分离效果进行常规调整（如参见陆健编著，《蛋白质纯化及分析技术》，北京：北京工业出版社，2005 年，第 64-119 页）。例如在一个具体的示例性的实施方案中，采用强阳离子交换层析填料装填层析柱，调节上样样品至弱酸性、电导率 $<30\text{mS/cm}$ 后进行上样，平衡，中间清洗，洗脱目的蛋白。根据上述方法，可以按不同的收峰参数获得具有不同片段含量的样品蛋白。

例如在某些实施例中，在融合蛋白 A 的纯化过程中可以利用混合模式层析进行蛋白 A 及蛋白片段 B、C、D 的含量控制。混合模式层析对功能配基的结构进行优化设计，组合两种或以上的相互作用模式，通常来说用于蛋白类生物制品的混合模式层析主要有两种，一是阳离子+疏水模式，二是阴离子+疏水模式。配基通过多种作用与目标分子结合，如离子作用、疏水作用和氢键作用，通过流穿模式去除聚集体、低分子量片段、Protein A、HCP、DNA 和病毒等多种杂质。混合模式层析的分离原理及过程为本领域技术人员所熟知并可以根据实际的分离效果进行常规调整。例如在一个具体的示例性的实施方案中，采用阴离子和疏水性的混合模式层析填料装填层析柱，调节上样样品至弱碱性、电导率至 $40\sim60\text{mS/cm}$ 之间，收集流穿液，获得目的蛋白。根据上述方法，可以按不同的收峰参数获得具有不同片段含量的样品蛋白。

在某些实施方案中，本发明所述抗 VEGF 的融合蛋白 A 的浓度为 $1\text{mg/mL}\sim200\text{mg/mL}$ 。在某些优选的实施方案中，本发明所述抗 VEGF 的融合蛋白 A 的浓度为 $10\text{mg/mL}\sim150\text{mg/mL}$ ， $10\text{mg/mL}\sim140\text{mg/mL}$ ， $10\text{mg/mL}\sim130\text{mg/mL}$ 或 $10\text{mg/mL}\sim120\text{mg/mL}$ 。在一些具体的实施方案中，本发明所述抗 VEGF 的融合蛋白 A 的浓度为 10mg/mL 、 20mg/mL 、 30mg/mL 、 40mg/mL 、 50mg/mL 、 60mg/mL 、 70mg/mL 、 80mg/mL 、 90mg/mL 、 100mg/mL 、 110mg/mL 或 120mg/mL 。

在某些实施方案中，本发明所述药物组合物还包括：缓冲液；渗透压调节剂，和/或表面活性剂；氨基酸；pH 为 6.8~8.7。

用于与本发明一起使用的合适的缓冲液包括但不限于有机酸盐，例如 Tris-HCl，柠檬酸，磷酸盐，组氨酸，琥珀酸盐或醋酸盐缓冲液等。

用于与本发明一起使用的合适的渗透压调节剂包括但不限于糖，甘油和丙二醇中的一种或多种。作为糖，可以包括但不限于单糖，例如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖或山梨糖等；二糖，例如乳糖、蔗糖、海藻糖或纤维二糖等；多糖，例如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖或淀粉等；以及糖醇，例如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇或山梨糖醇(葡萄糖醇)等。作为优选的，渗透压调节剂选自蔗糖、海藻糖、甘露醇和山梨糖醇中的一种多种。更优选地，渗透压调节剂选自蔗糖或海藻糖。在一些实施方案中，本发明的渗透压调节剂也可以起到稳定剂的作用，例如糖。

用于与本发明一起使用的合适的表面活性剂包括但不限于非离子表面活性剂、离子表面活性剂和两性离子表面活性剂。用于本发明的典型表面活性剂包括但不限于，山梨糖醇脂肪酸酯、山梨糖醇三油酸酯、甘油脂肪酸酯、聚甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯甘油脂肪酸酯、聚乙二醇脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚、聚氧乙烯烷基苯基醚、聚氧乙烯氢化蓖麻油(例如，聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯氢化蓖麻油)、聚氧乙烯蜂蜡衍生物、聚氧乙烯羊毛脂衍生物、以及聚氧乙烯脂肪酸酰胺；C10-C18 烷基硫酸盐(例如十六烷基硫酸钠、十二烷基硫酸钠、油烷基硫酸钠)、聚氧乙烯十二烷基硫酸钠、十二烷基磺基琥珀酸酯钠、丙二醇，二甲基亚砜等；以及天然表面活性剂，例如卵磷脂、甘油磷脂、磷酸鞘酯等。优选的表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯例如聚山梨醇酯 20、40、60、80，或者泊洛沙姆 188。更优选的表面活性剂为聚山梨醇酯 20 或 80。

本发明所述药物组合物，基于本发明所述的融合蛋白稳定性考虑，pH 优选为 6.8~8.7。该 pH 范围可以通过缓冲剂或 pH 调节剂以实现 pH 控制。在某些实施例中，本发明的药物组合物的 pH 在 7.0 和 8.7 之间。在某些实施例中，本发明的药物组合物的 pH 在 7.5 和 8.7 之间。在某些实施例中，本发明的药物组合物的 pH 在 7.7 和 8.7 之间。在一个实施例中，本发明的药物组合物的 pH 为约 7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6 或 8.7。在优选实施例中，所述药物组合物的 pH 为约 7.7±0.2。

用于本发明的合适的游离氨基酸包括但不限于，精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸、甘氨酸、谷氨酸或天冬氨酸。优选包含碱性氨基酸，即精氨酸、赖氨酸和/或组氨酸。如果组合物包含组氨酸，则所述组合物既可以充当缓冲剂又可以充当游离氨基酸，但是当使用组氨酸缓冲液时，通常要包含非组氨酸游离氨基酸，例如要包含组氨酸缓冲液和赖氨酸/精氨酸。所述氨基酸可以任何合适的盐的形式存在，例如盐酸盐，例如精氨酸-HCl。可用于本发明药物组合物还可以包括其他预期赋形剂包括，例如，抗氧化剂，抗菌剂等。

本发明另一方面提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

1mg/mL~200mg/mL 的融合蛋白 A；

5-300mM 缓冲液；

10-500mM 氨基酸；

0-30%的渗透压调节剂；和，

0-0.1%的表面活性剂；

pH 为 6.8~8.7；

所述缓冲液选自 Tris-HCl，柠檬酸，磷酸盐，组氨酸，谷氨酸，琥珀酸盐，氨丁三醇和醋酸盐缓冲液中的一种或多种；

所述渗透压调节剂选自蔗糖，海藻糖，甘露醇，甘油，丙二醇和山梨酯醇中的一种或多种；

所述表面活性剂选自聚乙二醇，吐温 20，吐温 80，P188，丙二醇和二甲基亚砷中的一种或多种；

所述氨基酸选自赖氨酸，精氨酸，组氨酸，鸟氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，丙氨酸，甘氨酸，谷氨酸和天冬氨酸中的一种或多种。

在某些更具体的实施方案中，所述药物组合物含有：

1mg/mL~200mg/mL 的融合蛋白 A；

5-300mM 缓冲液；

10-300mM 氨基酸；

0-30%的渗透压调节剂；和，

0-0.1%的表面活性剂；

pH 为 6.8~8.7；

所述缓冲液选自柠檬酸，磷酸盐，组氨酸，谷氨酸和氨丁三醇中的一种或多种；

所述渗透压调节剂选自蔗糖，海藻糖，甘露醇和山梨酯醇中的一种或多种；

所述表面活性剂选自吐温 20，吐温 80 和 P188 中的一种或多种；

所述氨基酸选自谷氨酸，精氨酸和组氨酸中的一种或多种。

在某些更具体的实施方案中，所述药物组合物含有：

10mg/mL~150mg/mL 的融合蛋白 A；

5-300mM 缓冲液；

100-300mM 氨基酸；

0-20%的渗透压调节剂；和，

0-0.1%的表面活性剂;

pH 为 6.8~8.7;

所述缓冲液选自柠檬酸, 磷酸盐, 组氨酸, 谷氨酸和氨丁三醇中的一种或多种;

所述渗透压调节剂选自蔗糖, 海藻糖, 甘露醇和山梨酯醇中的一种或多种;

所述表面活性剂选自吐温 20, 吐温 80 和 P188 中的一种或多种;

所述氨基酸选自谷氨酸, 精氨酸和组氨酸中的一种或多种。

在某些更具体的实施方案中, 所述药物组合物含有:

10-150mg/mL 的融合蛋白 A;

10-250mM 的柠檬酸缓冲液;

100-250mM 的精氨酸或组氨酸;

5-20%的蔗糖或海藻糖; 和,

0-0.1%的吐温 20、吐温 80 或 P188;

pH 为 7.5~8.7。

在某些更具体的实施方案中, 所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 的柠檬酸缓冲液;

100mM 的精氨酸;

5%的蔗糖; 和,

0.05%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中, 所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 的柠檬酸缓冲液;

100mM 的精氨酸; 和,

5%的海藻糖;

pH 为 7.5~8.7, 优选盐酸调节系统 pH 到 7.7 ± 0.2 。

在一些具体的实施方案中, 所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

100mM 的柠檬酸缓冲液;

250mM 的精氨酸;

20%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中,所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

250mM 的柠檬酸缓冲液;

100mM 的组氨酸;

8%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中,所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 的柠檬酸缓冲液;

250mM 的精氨酸;

20%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中,所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 氨丁三醇 ;

100mM 精氨酸; 和,

5%的蔗糖;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中,所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

290mM 谷氨酸;

290mM 精氨酸; 和,

78mM NaOH;

pH 为 7.5~8.7。

在一些具体的实施方案中,所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

5mM 磷酸盐; 优选 5mM 磷酸二氢钠;

100mM 精氨酸;

10%的海藻糖; 和,

0.01%的 P188;

pH 为 7.5~8.7。

本发明的另一目的在于提供一种包含本发明目的一所述的药物组合物的容器或递送装置。在一些具体的实施方案中, 所述容器的实例包括但不限于小瓶、注射器、安瓿、瓶、药筒和小袋。所述注射器可以通过标准针筒和针、自动注射器装置和微输注装置来施用。在一些优选的实施方案中, 本发明所述的递送装置为预填充注射装置, 足量的根据本公开配制的药物组合物包含在预填充的容器中, 其有助于分配蛋白制剂用于肠胃外施用(注射或输注)。在一些实施方案中, 容器或预填充容器包含至少一种药物单位剂型, 其可以特别适合于自施用。例如, 每小瓶、药筒或预填充的容器(例如, 预填充的注射器或一次性笔)的单位剂量可以包含约 0.1mL、0.2mL、0.3mL、0.4mL、0.5mL、0.6mL、0.7mL、0.8mL、0.9mL、1mL、1.1mL、1.2mL、1.3mL、1.4mL、1.5mL、1.6mL、1.7mL、1.8mL、1.9mL、2.0mL、2.1mL、2.2mL、2.3mL、2.4mL、2.5mL、2.6mL、2.7mL、2.8mL、2.9mL、3.0mL、3.5mL、4.0mL、4.5mL、5.0mL、5.5mL、6.0mL、6.5mL、7.0mL、7.5mL、8.0mL、8.5mL、9.0mL、9.5mL 或约 10.0mL 或更大体积的本发明所述药物组合物。

本发明的另一目的在于提供一种将本发明目的一所述的药物组合物冻干而制备的冻干制剂。冻干方法是本领域普通技术人员所公知的, 例如包括在控制条件下水从冷冻的制剂中升华。可冻干的制剂可以重新溶解成溶液、混悬液、乳液或任何其他适合施用或使用的形式。典型地可以通过加入水溶液溶解冻干制剂来进行复溶。

本发明的另一目的在于提供本发明目的一所述的药物组合物在制备用于治疗眼部疾病的药物中的用途。或者提供本发明目的一所述的药物组合物用于治疗眼部疾病。所述“治疗”的方法采用向需要此类治疗的受试者(例如, 患有 VEGF 介导的眼部障碍的受试者或最终可能获得此类障碍的受试者)施用本发明的药物组合物, 以预防、治愈、延迟障碍或复发的障碍, 减轻障碍或复发的障碍的严重性, 或改善障碍或复发的障碍的一种或多种症状。

在一些具体的实施方案中, 所述眼部疾病为眼部新生血管疾病。在一些更具体的实施方案中, 所述眼部新生血管疾病选自视网膜新生血管性、脉络膜新生血管、虹膜新生血管或角膜新生血管性眼部疾病。在一些优选的实施方案中, 所述疾病选自年龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞所致黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿、糖尿

病性视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变、继发于退行性近视的脉络膜新生血管或早产儿视网膜病变。在另一些优选的实施方案中，所述疾病选自年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿或糖尿病性视网膜病变。

治疗的剂量可以由具有治疗该疾病或病症的普通技术的医生，使用已知的剂量调整技术容易地确定。例如，通过考虑所需的剂量体积和施用方式来确定本发明的药物组合物中使用的抗 VEGF 融合蛋白的治疗有效量。通常，治疗有效的组合物以每剂从 10mg/mL 至约 200mg/mL 的剂量施用。优选地，在本发明的方法中使用的剂量为约 100mg/mL 至约 120mg/mL(即，约 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110 或 120mg/mL)。在一些在优选实施例中，在本发明的方法中使用的抗 VEGF 融合蛋白的剂量是 10mg/mL。在另一些优选实施例中，在本发明的方法中使用的抗 VEGF 融合蛋白的剂量是 120mg/mL。将药物组合物递送至受试者可通过例如玻璃体内注射、视网膜下注射、脉络膜注射（例如脉络膜上腔注射）或局部施用（例如滴眼液）或藉由注射至受眼部组织以此来影响哺乳动物的眼睛。在某些实施例中，每只眼睛的剂量为至少约 0.5mg 至高达约 10mg。每只眼睛的优选剂量包括约 0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1.0mg、1.2mg、1.4mg、1.6mg、1.8mg、2.0mg、2.5mg、3.0mg、3.5mg、4.0mg、4.5mg、5.0mg、5.5mg、6.0mg、6.5mg、7mg、7.5mg、8mg、8.5mg、9mg、9.5mg 或 10mg。剂量可以以适合眼睛施用的各种体积施用递送。

本发明的有益效果在于：

提供了一种包含抗 VEGF 的融合蛋白 A 和蛋白片段 B 药物组合物，通过控制药物组合物中蛋白片段 B 的含量，能够降低药物组合物的蛋白 A 的聚合，提高稳定性；且使得药物组合物能够维持良好的生物学活性，即便在经历高温处理后，生物学活性仍然能够得以较好地维持。

本发明所述的融合蛋白 A 的聚合物主要指蛋白分子间通过共价键或氢键等分子间作用力形成的聚合物，是由两个或多个蛋白组成的复合物，例如二聚体、四聚体、六聚体。

附图说明

图 1 融合蛋白 A SEQ ID NO: 1 序列。

图 2 蛋白片段 B 结构示意图。

图 3 蛋白片段 C 结构示意图。

具体实施方式

本发明所述的 SEC-HPLC 按《中国药典》2020 版（四部）通则“0514 分子排阻色谱法”，用亲水硅胶体积排阻色谱柱 TSK G3000 SWXL，上样量 50~200 μg ，流动相为 20mM 磷酸氢二钠、150mM 氯化钠，200 mM 精氨酸，pH7.2，流速 0.5 ml/min，检测波长 280 nm，按面积归一法计算聚合物含量。如无特别说明，本发明实施例中的聚合物含量（%）均通过该 SEC-HPLC 方法进行检测。

本发明所述的 SEC-UPLC 按《中国药典》2020 版（四部）通则“0514 分子排阻色谱法”，采用超高液相及基于亚乙基桥杂化（BEH）颗粒技术的体积排阻色谱柱（ACQUITY UPLC Protein BEH SEC Column，200A，1.7 μm ，4.6mm*150mm），控制上样量 4~12 μg ，流动相为 20mM 磷酸氢二钠、150mM 氯化钠，200 mM 精氨酸，pH7.2，流速 0.3 ml/min，检测波长 280 nm，按面积归一法计算聚合物（%）。

本发明所述的 SDS-PAGE 免染法按《中国药典》2020 版（四部）通则“0541 电泳法第五法 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法”，采用凝胶电泳，将含有上样缓冲液的蛋白 70 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 10 min，上样 4 μg 在 4~15%预制聚丙烯酰胺凝胶中电泳成像，该预制胶中添加有三氯化物荧光染料，在 300 nm 左右紫外光照下与蛋白中的色氨酸供价结合发出荧光，使凝胶中的蛋白达到可视化，根据主成分蛋白和杂蛋白的响应信号值计算蛋白纯度或杂质含量。本发明实施例中的蛋白非还原纯度（%）均通过该 SDS-PAGE 方法进行检测。

本发明所述的生物学活性荧光素酶报告基因法，按《中国药典》2020 版（四部）通则“3535 康柏西普生物学活性测定法”进行检测。该方法使用稳定转染了血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)基因和荧光素酶报告基因 luc2P 的人胚肾细胞(HEK293)，通过不同浓度蛋白的阻断血管内皮生长因子(VEGF)刺激细胞荧光素酶的表达情况不同，测定蛋白的生物学活性。实验中将蛋白标准品/供试品梯度稀释至 30000ng/mL，再向下稀释至 1.21ng/mL，共计 11 个浓度梯度，将 11 个梯度标准品/样品分别与 rhVEGF165 工作液等体积混合，于 37 $^{\circ}\text{C}\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下孵育 20~40 分钟，每个梯度做 2 个复孔。取 HEK293 细胞，用 DMEM 测试培养基配制成 5×10^5 cells/mL 的细胞悬液后接种于 96 孔细胞培养板中，每孔接种 80 μl 。分别加入不同浓度标准品/供试品混合溶液，每孔 20 μl ，于 37 $^{\circ}\text{C}\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 、5%二氧化碳条件下培养 5.8-6 小时。室温平衡 10~15 分钟，每孔加入显色底物 100 μl ，室温放置 3~5 分钟后，立即放入酶标仪，使用化学发光模块测定每孔的荧光响应值。以细胞孔中加入 rhVEGF165 工作液作为阳性对照，细胞孔中加入 DMEM 测试培养基作为阴性对照，同法测定，记录实验结果。采用计算机程序或四参数回归算法进行处理，以供试品和标准品浓度为横坐标，以荧光响应平均值为纵坐标绘制四参数曲线，计算供试品和标准品的半数有效浓度(EC50)。按下式计算供试品相对生物学效价。供试

品相对生物学效价(%)=标准品 EC50÷供试品 EC50×100%。本发明实施例中的蛋白生物学活性(%)通过该方法进行评价。本发明实施例中的制剂样品在配制后的生物学活性经检测均高于 85%。

本发明所有实施例中所测试的数据均为 6 个平行样 (n=6) 的平均值。

实施例 1

制剂样品组成如下：

蛋白	10mg/mL
柠檬酸	10mM
精氨酸	100mM
蔗糖	5%
吐温 20	0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 1，该蛋白包含融合蛋白 A、蛋白片段 B、C、D，其中具体组分的含量参见表中的“蛋白非还原纯度(%)”，下同），按照上述制剂组成制备成样品 1 和样品 2。样品在 25℃放置 2 周，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 1。从表 1 结果可知，当蛋白片段 B 含量基本一致时，在其他成分含量（融合蛋白 A 或蛋白片段 C、D 等）差异显著的情况下，25℃放置后 2 周，4 周两组样品的聚合物含量基本保持一致。同时测定蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%，活性维持良好。

表 1

样品	蛋白非还原纯度 (%)					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
1	86.7	2.3	8.1	2.1	0.8	1.8	2.7
2	93.0	2.5	2.6	1.7	0.2	1.9	2.7

实施例 2

制剂样品组成如下：

蛋白	10mg/mL
柠檬酸	10mM
精氨酸	100mM
蔗糖	5%
吐温 20	0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 2），按照上述制剂组成制备成样品 3 和样品 4。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 2。从表 2 中可以看出，随着制剂样品中蛋白片段 B 的含量增加，在放置后，样品中的聚合物的含量增加更显著，聚合物的聚合速率更快。同时测定蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，样品 3 的蛋白生物学活性大于 75%，样品 4 的蛋白生物学活性低于 65%。

表 2

样品	蛋白非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
样品 3	82.3	6.1	7.0	3.9	0.7	3.4	4.8
样品 4	79.4	9.3	7.2	4.0	0.1	4.5	6.3

实施例 3

制剂样品组成如下：

蛋白 10mg/mL
柠檬酸 10mM
精氨酸 100mM
蔗糖 5%
吐温 20 0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 3），按照上述制剂组成制备成样品 5 和样品 6。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 3。从表 3 结果可知，当蛋白片段 B 含量基本一致时，在其他成分含量（如蛋白片段 C）差异显著的情况下，25℃放置之后两组制剂样品的聚合物含量基本保持一致。同时测定了两组样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 3

样品	蛋白非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
5	82.8	3.8	6.5	6.1	0.8	2.7	4.1
6	80.0	4.0	9.1	6.0	0.9	2.8	4.1

实施例 4

制剂样品组成如下：

- 蛋白 10mg/mL
- 柠檬酸 10mM
- 精氨酸 100mM
- 蔗糖 5%
- 吐温 20 0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 4），按照上述制剂组成制备成样品 7 和样品 8。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 4。从表 4 中可以看出，当组合物中蛋白片段 B 的含量保持基本一致，在其他成分含量（蛋白 A、C、D 等）差异显著的情况下，放置后两组制剂样品中的聚合物含量基本一致。同时测定了两组样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 4

样品	蛋白非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
7	87.0	4.4	5.0	2.9	0.7	2.9	4.2
8	77.1	4.6	11.4	6.0	0.9	2.9	4.3

实施例 5

制剂样品组成如下：

- 蛋白 10mg/mL
- 柠檬酸 10mM
- 精氨酸 100mM
- 蔗糖 5%
- 吐温 20 0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 5），按照上述制剂组成制备成样品 9-15。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量。结果如表 5。从表 5 中可以看出，随着组合物中蛋白片段 B 的含量增加，在放置后，制剂样品中的聚合物的含量增加显著，聚合速率更快。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，样品 9-13 的蛋白生物学活性均大于 80%，样品 14 的蛋白生物学活性大于 75%，样品 15 低于

65%。

表 5

样品	非还原纯度 (%)					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
9	97.6	0.6	0.6	1.2	0	1.3	2.0
10	97.3	0.8	0.0	1.3	0.6	1.3	2.1
11	91.4	1.5	4.7	1.8	0.6	1.7	2.4
12	81.5	3.1	12.0	2.6	0.8	1.9	2.8
13	81.5	5.4	6.5	5.2	1.4	3.1	4.5
14	78.2	6.9	8.2	5.6	1.1	4.0	5.4
15	78.2	8.0	8.4	4.7	0.7	4.1	5.8

实施例 6

制剂样品组成如下：

蛋白 10mg/mL
柠檬酸 10mM
精氨酸 100mM
蔗糖 5%
吐温 20 0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取不同纯度的蛋白（见表 6），按照上述制剂组成制备成样品 16-23。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，具体见表 6。

表 6

样品	蛋白非还原纯度 (%)				生物学活性(%)
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	
16	95.2	1.3	1.6	1.9	88
17	92.2	2.8	2.6	2.4	89
18	88.2	3.7	5.5	2.6	84
19	85.0	4.1	7.4	3.5	85
20	88.0	4.9	3.8	3.3	82
21	80.4	5.4	10.1	4.1	80
22	80.7	8.4	7.5	3.4	60
23	72.8	12.6	9.8	4.8	58

实施例 7

制剂样品处方如下：

蛋白 10mg/mL
柠檬酸 10mM
精氨酸 100mM
海藻糖 5%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 7 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 24-25。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 7。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 7

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
24	96.0	1.0	1.1	1.8	0.1	1.3	2.0
25	89.3	4.0	3.8	2.9	0	1.9	2.9

实施例 8

制剂样品处方如下：

蛋白 10mg/mL
氨丁三醇 10mM
精氨酸 100mM
蔗糖 5%

调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 8 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 26-27。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 8。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 8

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
26	95.9	0.7	1.4	2.0	0	1.3	2.0
27	89.4	4.2	3.5	2.8	0.1	1.6	2.4

实施例 9

制剂样品处方如下：

蛋白	10mg/mL
谷氨酸	290mM
精氨酸	290mM
NaOH	78mM

调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 9 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 28-29。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 9。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 9

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
28	96.1	0.7	1.1	2.1	0	0.8	1.1
29	88.9	4.1	3.9	3.0	0.1	1.3	1.8

实施例 10

制剂样品处方如下：

蛋白	10mg/mL
磷酸二氢钠	5mM
精氨酸	100mM
海藻糖	10%
P188	0.01%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 10 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 30-31。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 10。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 10

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
30	96.3	0.8	1.1	1.7	0.1	0.8	1.1
31	89.1	4.2	3.9	2.8	0	1.4	1.9

实施例 11

制剂样品处方如下：

蛋白	10mg/mL
柠檬酸	100mM
精氨酸	250mM
蔗糖	20%
吐温 20	0.1%

调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 11 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 32-33。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 11。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 11

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
32	96.1	0.8	1.1	2.0	0	0.5	0.6
33	89.0	4.2	3.8	3.0	0	0.8	0.9

实施例 12

制剂样品处方如下：

蛋白	10mg/mL
柠檬酸	250mM
组氨酸	100mM
蔗糖	8%
吐温 20	0.1%

调节系统 pH 到 7.7±0.2

取表 12 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 34-35。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 12。同时测定样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 12

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
34	96.0	0.8	1.2	2.0	0	0.7	0.8
35	88.9	4.4	3.9	2.8	0	1.2	1.5

实施例 13

制剂样品处方如下：

蛋白	20mg/mL
柠檬酸	10mM
精氨酸	250mM
蔗糖	20%
吐温 20	0.1%

用盐酸调节系统 pH 到 7.9±0.2

取表 13 所述的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 36-37。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 13。同时测定了样品的蛋白在 35℃放置 15 天之后的生物学活性，结果表明两组样品的蛋白生物学活性均大于 80%。

表 13

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%	
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W	4 W
36	95.8	0.9	1.1	2.1	0.1	0.9	1.3
37	89.0	4.1	3.9	2.9	0.1	1.6	2.1

实施例 14

制剂样品处方如下：

蛋白	120mg/mL
柠檬酸	10mM
精氨酸	100mM
蔗糖	5%
吐温 20	0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 7.7～8.7

取表 14 所述的不同纯度的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 38-40。样品在 25℃放置 2，4 周之后，通过 SEC-HPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 14。

表 14

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	2 W
38	97.5	0.8	0.7	1.0	0.0	12.6
39	93.5	2.3	2.4	1.8	0.0	13.7

40	77.6	9.5	8.2	4.6	0.1	20.2
----	------	-----	-----	-----	-----	------

实施例 15

制剂样品处方如下：

蛋白	10mg/mL
柠檬酸	10mM
精氨酸	100mM
蔗糖	5%
吐温 20	0.05%

用盐酸调节系统 pH 到 5±0.5

取表 15 所述的不同纯度的蛋白，按照上述制剂组成制备成样品 41-44。然后通过 SEC-UPLC 测定样品中的聚合物含量，结果如表 15 所示。

表 15

样品	非还原纯度（%）					聚合物的含量%
	融合蛋白 A	蛋白片段 B	蛋白片段 C	蛋白片段 D	其他	
41	93.5	1.7	3.2	1.6	0.0	0.6
42	85.5	5.3	4.7	4.5	0.0	2.9
43	78.2	8.1	10.2	3.5	0.0	4.8
44	71.4	11.5	8.9	8.2	0.0	6.7

实施例 16 蛋白纯化

1、凝胶层析法

用适用于 10~400kDa 蛋白分离的凝胶填料装填层析柱，采用层析平衡液平衡层析柱，控制上样体积≤10%CV、上样流速≤20cm/h 进行上样，平衡，收集目的蛋白。按不同的收峰参数获得样品 1-4、9-23、41-44 中的蛋白。

2、阳离子交换层析法

采用强阳离子交换层析填料装填层析柱，调节上样样品至弱酸性、电导率<30mS/cm 后进行上样，平衡，中间清洗，洗脱目的蛋白，按不同的收峰参数获得样品 5-6、38-40 中的蛋白。

3、混合模式层析法

采用阴离子和疏水性的混合模式层析填料装填层析柱，调节上样样品至弱碱性、电导率至 40~60mS/cm 之间，收集流穿液，获得目的蛋白。按不同的收峰参数获得样品 7-8、24-37 中的蛋白。

权利要求

1. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有抗 VEGF 的融合蛋白 A 和蛋白片段 B，所述融合蛋白 A 为包括两条含有 SEQ ID NO: 1 所述融合多肽的二聚体；所述蛋白片段 B 为包含 SEQ ID NO: 1 和 SEQ ID NO: 2 所述两条融合多肽的二聚体，且所述药物组合物中蛋白片段 B 的含量为 0.01~7%，优选 0.01~5.4%，更优选 0.01~4.6%。

2. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物中，蛋白片段 B 的含量为 0.6~7%，优选 0.6~5.4%，更优选 0.6~4.6% 或 1.3~5.4%，进一步更优选 1.3~4.6%。

3. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物中，融合蛋白 A 的含量为 77~98%；优选 80~98%。

4. 根据权利要求 3 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物中，融合蛋白 A 的含量为 77~87%；优选 80~87%。

5. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物中，融合蛋白 A 的浓度为 1mg/mL~200mg/mL，优选 10mg/mL~150mg/mL，更优选 10mg/mL~120mg/mL。

6. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物的 pH 值为 6.8~8.7，优选 7.5~8.7，更优选 7.7±0.2。

7. 根据权利要求 1-6 中任一项所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物还包括：

缓冲液；

渗透压调节剂；

表面活性剂；和，

氨基酸；

pH 为 6.8~8.7。

8. 根据权利要求 6 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

1mg/mL~200mg/mL 的融合蛋白 A；

5-300mM 缓冲液；

10-500mM 氨基酸；

0-30% 的渗透压调节剂；和，

0-0.1% 的表面活性剂；

pH 为 6.8~8.7；

所述缓冲液选自 Tris-HCl，柠檬酸，磷酸盐，组氨酸，谷氨酸，琥珀酸盐，氨丁三醇

和醋酸盐缓冲液中的一种或多种；

所述渗透压调节剂选自蔗糖，海藻糖，甘露醇，甘油，丙二醇和山梨酯醇中的一种或多种；

所述表面活性剂选自聚乙二醇，吐温 20，吐温 80，P188，丙二醇和二甲基亚砷中的一种或多种；

所述氨基酸选自赖氨酸，精氨酸，组氨酸，鸟氨酸，异亮氨酸，亮氨酸，丙氨酸，甘氨酸，谷氨酸和天冬氨酸中的一种或多种。

9. 根据权利要求 7 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

1mg/mL~200mg/mL 的融合蛋白 A；

5-300mM 缓冲液；

10-300mM 氨基酸；

0-30%的渗透压调节剂；和，

0-0.1%的表面活性剂；

pH 为 6.8~8.7；

所述缓冲液选自柠檬酸，磷酸盐，精氨酸，谷氨酸和氨丁三醇中的一种或多种；

所述渗透压调节剂选自蔗糖，海藻糖，甘露醇和山梨酯醇中的一种或多种；

所述表面活性剂选自吐温 20，吐温 80 和 P188 中的一种或多种；

所述氨基酸选自谷氨酸，精氨酸和组氨酸中的一种或多种。

10. 根据权利要求 8 中所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

10-150mg/mL 的融合蛋白 A；

10-250mM 的柠檬酸缓冲液；

100-250mM 的精氨酸或组氨酸；

5-20%的蔗糖或海藻糖；和，

0-0.1%的吐温 20、吐温 80 或 P188；

pH 为 7.5~8.7。

11. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A；

10mM 的柠檬酸缓冲液；

100mM 的精氨酸；

5%的蔗糖；和，

0.05%的吐温 20；

pH 为 7.5~8.7;

或者, 所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

100mM 的柠檬酸缓冲液;

250mM 的精氨酸;

20%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7;

或者, 所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

250mM 的柠檬酸缓冲液;

100mM 的组氨酸;

8%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7;

或者, 所述药物组合物含有:

10-120 mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 的柠檬酸缓冲液;

250mM 的精氨酸;

20%的蔗糖; 和,

0.1%的吐温 20;

pH 为 7.5~8.7;

或者, 所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

10mM 氨丁三醇 ;

100mM 精氨酸; 和,

5%的蔗糖;

pH 为 7.5~8.7;

或者, 所述药物组合物含有:

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A;

290mM 谷氨酸;

290mM 精氨酸；和，

78mM NaOH；

pH 为 7.5~8.7；

或者，所述药物组合物含有：

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A；

5mM 磷酸盐；优选 5mM 磷酸二氢钠；

100mM 精氨酸；

10%的海藻糖；和，

0.01%的 P188；

pH 为 7.5~8.7；

或者，所述药物组合物含有：

10mg/mL~120mg/mL 的融合蛋白 A；

10mM 的柠檬酸缓冲液；

100mM 的精氨酸；和，

5%的海藻糖；

pH 为 7.5~8.7。

12. 根据权利要求 1 所述的药物组合物，其特征在于，所述融合蛋白 A 或蛋白片段 B 的含量通过凝胶电泳（SDS-PAGE）进行测定。

13. 一种包含权利要求 1-12 中任一项所述的药物组合物的容器或递送装置。

14. 根据权利要求 13 所述的容器或递送装置，其特征在于，所述容器为小瓶或注射器。

15. 根据权利要求 13 所述的容器或递送装置，其特征在于，所述递送装置为预填充注射装置。

16. 一种将权利要求 1-12 中任一项所述的药物组合物冻干而制备的冻干制剂。

17. 根据权利要求 1-12 中任一项所述的药物组合物在制备用于治疗眼部疾病的药物中的用途。

18. 一种治疗眼部疾病的方法，包括向受试者施用权利要求 1-12 中任一项所述的药物组合物。

19. 根据权利要求 17 所述的用途或权利要求 18 所述的方法，其特征在于，所述眼部疾病为眼部新生血管疾病；优选地，所述眼部新生血管疾病选自视网膜新生血管性、脉络膜新生血管、虹膜新生血管或角膜新生血管性眼部疾病。

20. 根据权利要求 19 所述的用途或方法，其特征在于，所述眼部新生血管疾病选自年

龄相关性黄斑变性、黄斑水肿、继发于视网膜静脉阻塞的黄斑水肿、视网膜静脉阻塞、视网膜中央静脉阻塞所致黄斑水肿、视网膜分支静脉阻塞所致黄斑水肿、糖尿病性黄斑水肿、糖尿病性视网膜病变、息肉状脉络膜血管病变、继发于退行性近视的脉络膜新生血管或早产儿视网膜病变；

优选地，所述眼部新生血管疾病选自年龄相关性黄斑变性、糖尿病性黄斑水肿或糖尿病性视网膜病变。