

长效化重组人粒细胞集落刺激因子的研究进展

王旭东, 刘家辉, 陈康楠, 梅建凤, 易 喻, 应国清*

(浙江工业大学药学院, 浙江 杭州 310014)

摘要: 重组人粒细胞集落刺激因子 (rhG-CSF) 在临床上主要用于辅助治疗癌症患者因放/化疗引起的中性粒细胞减少症, 但存在体内稳定性差、半衰期短等问题, 需要反复多次给药, 容易使患者产生药物耐受性及免疫排斥等不良反应, 因此有必要开发长效化 rhG-CSF 来提高其临床药效。本文综述了近年来利用聚乙二醇 (PEG) 修饰、融合蛋白以及新剂型等技术开发长效化 rhG-CSF 的研究进展, 展望了其未来发展趋势。

关键词: 重组人粒细胞集落刺激因子; 长效化重组人粒细胞集落刺激因子; 聚乙二醇修饰; 融合蛋白; 新剂型
中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)04-0875-09

Recent advances on long-acting recombinant human granulocyte colony-stimulating factor

WANG Xu-dong, LIU Jia-hui, CHEN Kang-nan, MEI Jian-feng, YI Yu, YING Guo-qing*

(College of Pharmaceutical Science, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

Abstract: Recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) has been in clinical use for the adjuvant therapy of cancer patients with neutropenia caused by radiotherapy/chemotherapy. However, it does have some drawbacks such as poor stability and short half-life, and needs to be administered repeatedly, which is easy to cause adverse reactions such as drug tolerance and immune rejection. Therefore, it is necessary to develop long-acting rhG-CSF to improve its clinical efficacy. In this review, we summarize the research progress on the development of long-acting rhG-CSF using the strategies such as PEGylation, fusion protein and new dosage forms in recent years, and discuss its future development trend.

Key words: rhG-CSF; long-acting rhG-CSF; PEGylation; fusion protein; new dosage form

重组人粒细胞集落刺激因子 (recombinant human granulocyte colony stimulating factor, rhG-CSF) 是通过基因重组技术产生的由 175 个氨基酸组成的重组蛋白, 具有与天然 G-CSF 几乎相同的生物活性, 分子质量约为 18.8 kDa^[1-3]。在临床上, rhG-CSF 已被批准用于下列适应症: 接受骨髓抑制化疗的癌症患者; 接受诱导或巩固化疗的急性髓性白血病患者; 接受骨髓移植 (BMT) 的癌症患者; 接受外周血祖细胞收集和治疗的

患者; 重度慢性中性粒细胞减少患者^[4]。此外, rhG-CSF 在缺血性脑梗死^[5]、调节免疫^[6]、鼻咽癌放射治疗引发的急性口腔黏膜炎^[7]、受到大量辐射照射导致造血急性辐射综合征 (ARS)^[8]等方面也有不错的治疗效果。

目前, 主要有非糖基化 rhG-CSF [如非格司亭 (filgrastim)]、糖基化 G-CSF [如来格司亭 (lenograstim)] 和 G-CSF 的突变基因产物 [如那托司亭 (nartograstim)] 等短效 rhG-CSF 被应用于临床^[9-11]。然而, 短效 rhG-CSF 存在体内稳定性差、半衰期短等问题, 需要反复多次给药, 容易使患者产生药物耐受性及免疫排斥等不良反应, 因此非常有必要开发长效化 rhG-CSF 来提高其临床药效^[2,12]。目前, 开发长效 rhG-CSF 的技术主要有化学修饰 [如聚乙二醇 (PEG) 修饰]^[13]、融合蛋白^[14,15]以

收稿日期: 2021-08-24; 修回日期: 2021-09-20.

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (LY21B060007); 浙江省重点研发计划项目 (2021C03088).

*通讯作者 Tel: 86-571-88871029, E-mail: biop@zjut.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2021-1230

及新剂型^[16]等(图1)。

1 rhG-CSF的PEG修饰

PEG修饰具有延长药物体内半衰期、降低蛋白的免疫原性以及改善药物溶解性等优点,是开发长效化蛋白类药物应用最成功的化学修饰技术^[17-20]。目前,PEG修饰rhG-CSF的位点主要包括赖氨酸侧链的 ϵ -氨基、N末端的 α -氨基、半胱氨酸的巯基和苏氨酸的羟基,其修饰方法如图1B所示。

1.1 赖氨酸侧链 ϵ -氨基修饰 rhG-CSF上有4个赖氨酸侧链 ϵ -氨基,容易出现多修饰产物。而且,对rhG-CSF的赖氨酸侧链 ϵ -氨基的PEG修饰会干扰其与rhG-CSFR的结合,从而影响到rhG-CSF的活性^[4]。

1.2 N末端 α -氨基修饰 rhG-CSF的N末端远离其活性中心,对其进行修饰不会影响其与rhG-CSFR结合。目前上市的PEG修饰rhG-CSF基本都是N末端修饰。其中,培非格司亭(pegfilgrastim)是Amgen公司在非格司亭(filgrastim, Neupogen[®])基础上开发的长效剂型,是第一个上市的长效rhG-CSF药物(商品名Neulasta[®])。由于rhG-CSF的N端 α -氨基的pKa值约为7.6~8.0,而赖氨酸侧链 ϵ -氨基的pKa值约为10~10.2,可以控制pH值在酸性条件下利用PEG醛基化衍生物对rhG-CSF的N端 α -氨基进行位点特异性PEG修饰^[21,22]。与filgrastim(未修饰的rhG-CSF)相比,pegfilgrastim的半衰期从3 h延长到33 h,给药频率从一天一次延长到一

个化疗周期给药一次,减轻了患者的负担。在市场上,pegfilgrastim的销售额远高于filgrastim,体现了长效化的优势。

硫培非格司亭(macapegfilgrastim)是由江苏恒瑞公司开发的长效型rhG-CSF药物,于2018年上市。Macapegfilgrastim是在rhG-CSF的N端引入一个巯基,再通过迈克尔加成反应,将一个19 kDa的PEG分子连接到rhG-CSF上^[23]。Macapegfilgrastim给药后22 h达到最大血浆浓度,半衰期可达到56 h^[23],在临床上主要用于预防非髓系恶性肿瘤接受骨髓抑制化疗的发热性中性粒细胞减少症。临床Ib期试验表明,3组不同剂量的macapegfilgrastim(60、100和200 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)与filgrastim(5 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{day}^{-1}$)对治疗非小细胞肺癌的安全性及耐受性进行比较,最终确定了100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ macapegfilgrastim最安全^[24]。一项多中心、随机II期临床试验表明,macapegfilgrastim的疗效在各方面均优于rhG-CSF,安全性方面相当^[25]。非小细胞肺癌^[26]或乳腺癌^[27]患者进行的两个多中心、随机临床III期试验表明,给药剂量6 mg的macapegfilgrastim与pegfilgrastim的疗效相当。

1.3 巯基修饰 目前常用于蛋白多肽类药物半胱氨酸巯基PEG修饰的试剂有PEG-马来酰亚胺(PEG-MAL)、PEG-乙烯基砜(PEG-VS)、PEG-邻吡啶二硫醚(PEG-OPSS)^[28]、聚乙二醇-硒(PEG-Se)^[3]和聚乙二醇-

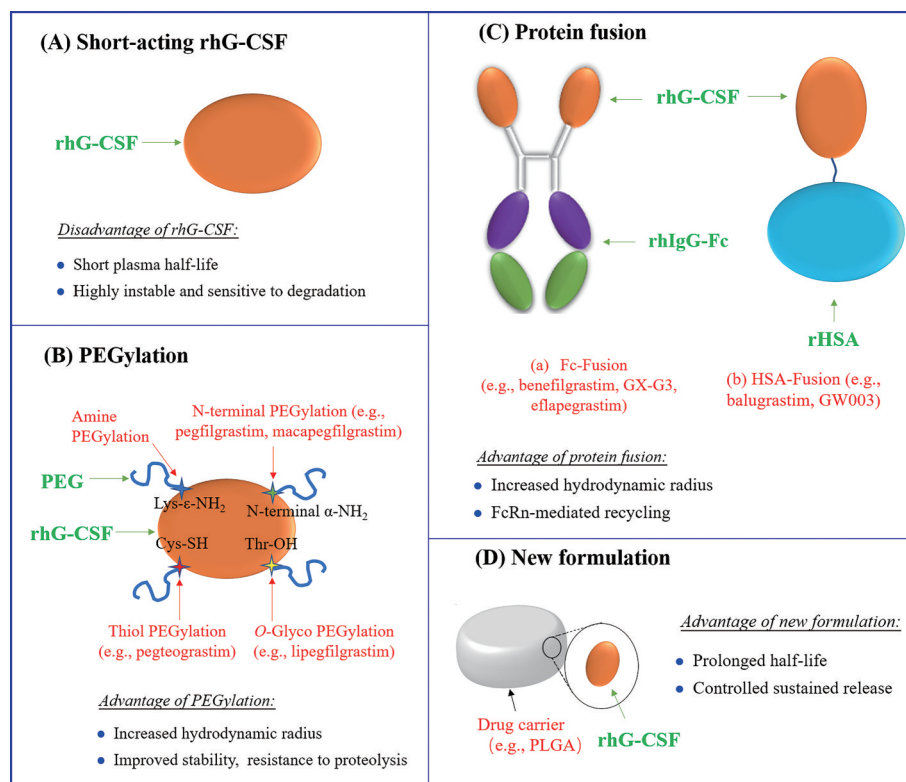


Figure 1 Strategies for the development of long-acting recombinant human granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF)

多巴醌 (PEG-DAQ)^[29]等。

rhG-CSF 存在一个游离半胱氨酸残基,但存在于内部的疏水结构区域,需要使用合适溶剂体系使半胱氨酸残基暴露出来与 PEG 修饰剂反应^[30,31]。Veronese 等^[30]使用盐酸胍或尿素溶液作为溶剂,使 rhG-CSF 的半胱氨酸巯基暴露出来,显著提高了 PEG 修饰效率,而且 rhG-CSF 的二级结构也无明显变化。Peng 等^[31]使用 DMSO 作为溶剂,使疏水端的半胱氨酸残基暴露出来,同样显著提高了 PEG 修饰效率,并且显著加快了反应速度。

另外,还可以通过序列改造在 rhG-CSF 引入游离半胱氨酸巯基。如 pegteograstim (Neulapeg) 是韩国 Green Cross 公司研制的一种新型的长效化 rhG-CSF,是在 filgrastim 的 Gly136 和 Ala137 之间插入一个半胱氨酸残基,并将 Cys18 用 Ser 取代^[32],最后将 20 kDa PEG-MAL 与半胱氨酸巯基反应^[33]。I 期临床研究表明,与相同剂量的 pegfilgrastim 相比,pegteograstim 对 ANC 和 CD34⁺细胞的活性增强^[34]。在人体 pegteograstim 单次给药 30~100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后的药代动力学反应与单剂量皮下注射 neulasta 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的药代动力学反应相当^[34]。II/III 临床研究表明,pegteograstim 在预防乳腺癌患者高危化疗后的严重中性粒细胞减少方面,与 pegfilgrastim 一样有效^[35]。

1.4 苏氨酸羟基修饰 利培非格司亭 (lipegfilgrastim) 是 Teva 公司研发的一种聚乙二醇化的糖基化长效型非格司亭,于 2013 年经 EMA 批准上市,商品名 Lonquex[®]。Lipegfilgrastim 是通过 *N*-乙酰半乳糖氨基转移酶亚型 2 将 *N*-乙酰氨基半乳糖 (GalNAc) 结合到蛋白质肽链的 Thr134 的羟基上,再用唾液酸转移酶将一种 20 kDa 的聚乙二醇-唾液酸衍生物连接到其 *O*-糖链上^[36]。

Lipegfilgrastim 在给药 30~36 h 后血药浓度出现峰值,半衰期为 32~62 h,比 pegfilgrastim 长 7~10 h^[37]。临床 II 期试验确定 lipegfilgrastim 的给药剂量为 6 mg^[38]。对乳腺癌患者的临床 III 期试验表明,lipegfilgrastim 的安全性及药效都与 pegfilgrastim 相当^[39]。单次注射 6 mg lipegfilgrastim 可有效地进行足够的干细胞动员、收集,确保接受自体干细胞移植 (ASCT) 的多发性骨髓瘤 (MM) 患者在 ASCT 后以最小的毒性进行移植^[40]。

2 rhG-CSF 的融合蛋白技术

融合蛋白是通过将药物分子跟其他蛋白融合在一起,增加药物的分子量,降低其肾脏清除率,从而延长半衰期^[41,42]。目前,应用最为广泛的是 Fc 融合蛋白和人血清白蛋白 (HSA) 融合蛋白技术 (图 1C)。

2.1 Fc 融合蛋白技术 Fc 融合蛋白技术是通过将蛋白或多肽药物与免疫球蛋白 (IgG) 的 Fc 片段融合而获

得的一种新型功能重组蛋白。Fc 融合蛋白除通过增加分子量提高药物半衰期外,还可以与 Fc 受体结合,避免融合蛋白被细胞中的溶酶体降解。治疗蛋白通常通过它们的羧基端连接到人 IgG 的 Fc (较链-CH2-CH3) 和 C_H (CH1-较链-CH2-CH3) 结构域的氨基末端。当 IgG 融合蛋白在哺乳动物细胞中表达时,由于位于 IgG 较链区的半胱氨酸残基之间形成链间二硫键,IgG 融合蛋白通常以二硫键连接的同型二聚体形式分泌。Cox 等^[43]构建了 G-CSF 融合人 IgG1 和 IgG4 的 Fc 和 CH 结构域 N 端的嵌合基因,并在 COS-1 细胞中表达。结果发现,G-CSF/IgG-Fc 的体外活性与 G-CSF 相当,而 G-CSF/IgG-C_H 的体外活性降至 G-CSF 的 1/4~1/3。随后做了动物实验,条件性位置厌恶反应 (CPA) 治疗大鼠经一次性注射 G-CSF/IgG1-Fc 后,其促进中性粒细胞恢复的作用与 PEG-G-CSF 效果相当^[44]。以下主要介绍 benefilgrastim、GX-G3 和 eflapegrastim 这 3 种 G-CSF-Fc 融合蛋白候选药物。

Benefilgrastim 是由亿帆医药研发的一种 rhG-CSF 二聚体 (rhG-CSF/IgG2-Fc 融合蛋白),它在人体内的半衰期为 43.9~62.8 h^[45],在美国和中国都完成了临床 III 期试验 (图 2A)。由于天然的 IgG 会有抗体依赖性细胞毒作用和补体依赖性细胞毒作用,所以对 Fc 区的某些氨基酸进行了突变^[46]。Benefilgrastim 就是这种形式的突变体 IgG2-Fc。乳腺癌化疗患者的临床 II 期试验表明每个化疗周期单次注射 240 或 320 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ benefilgrastim,与 pegfilgrastim 的安全性相当^[46];临床 III 期试验结果表明,给药剂量为 20 mg 的 benefilgrastim 与 6 mg 给药剂量 pegfilgrastim 疗效相当^[46]。

GX-G3 是韩国 Genexine 公司研发的一种 rhG-CSF-Fc 融合蛋白药物^[47],其中使用的人 Fc 是 IgD-Fc 和 IgG4-Fc 的杂交形式 (图 2B)。这种杂交 Fc 无抗体依赖性细胞毒作用 (ADCC) 和补体依赖性细胞毒作用 (CDC),表现出较长的作用特性和较低的免疫原性^[48]。SD 大鼠实验表明,filgrastim-100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 pegfilgrastim-100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的半衰期分别为 2.4 h 和 4.0 h,而 GX-G3-25 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 GX-G3-100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的半衰期为 13.1 h 和 9.1 h,明显高于 pegfilgrastim 和 filgrastim^[49]。GX-G3 对 CPA 治疗大鼠的作用也强于 pegfilgrastim^[49]。目前 GX-G3 已完成了 I 期临床试验,目前正在进行临床 II 期试验。

Eflapegrastim 是由 Spectrum Pharmaceuticals, Inc. 从韩美制药公司引进的,通过柔性的 PEG linker 将 IgG4 来源的 Fc 结构域与 rhG-CSF 相连^[50] (图 2C)。Eflapegrastim 不同于上述提到的两款 rhG-CSF 融合蛋白候选药物在于它分子结构只含有一个 rhG-CSF 分子,且采用非肽连接子 PEG,通过活化 PEG 两端的基团,

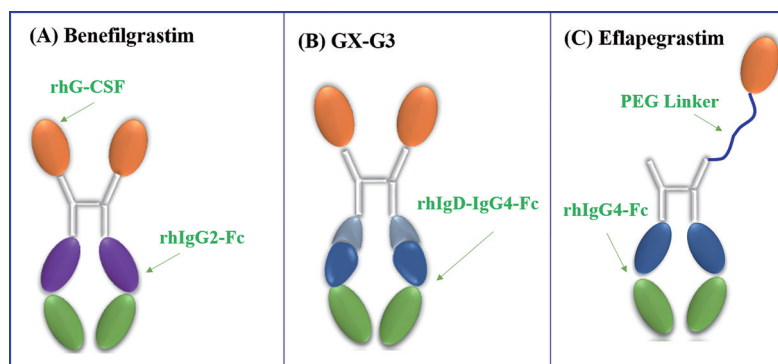


Figure 2 Structures of benefilgrastim, GX-G3, and eflapegrastim

分别与 rhG-CSF 和 IgG 的 Fc 片段结合,可以避免肽连接子可能在体内被蛋白酶水解的风险。药效学和药动学实验表明, eflapegrastim 的体外活性和药动学 (PK) 曲线与 pegfilgrastim 相似^[51]。临床 II 期试验表明,患者注射 eflapegrastim 的适宜剂量为 45~270 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 12.3~73.6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ G-CSF)^[52]。两次 III 期临床试验 (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02953340、NCT02643420)^[53]表明给药剂量为 13.2 mg 的 eflapegrastim (3.6 mg rhG-CSF) 与 pegfilgrastim (6 mg rhG-CSF) 的效果相当;体重对临床疗效无显著性影响;每周给药一次剂量为 13.2 mg (3.6 mg rhG-CSF) 的 eflapegrastim 对预防化疗诱导的中性粒细胞减少有效。

2.2 人血清白蛋白 (HSA) 融合蛋白技术 HSA 占血浆蛋白质量的 60%,可以将营养物质运输到细胞内以及将代谢物质运输到肝脏进行清除,平均半衰期为 14 天。而且肿瘤细胞对 HSA 的摄取量比正常细胞多^[54]。与 HSA 融合的药物除通过增加分子质量延长半衰期外, HSA 的结构域 III 也可以与 Fc 受体结合,防止溶酶体对蛋白的降解,并实现靶向药物递送^[15]。HSA 融合蛋白可以将目标蛋白通过连接子结合到 HSA 的 C 端或 N 端,这取决于目标蛋白的 C 端或 N 端是否是活性中心。另外,连接子类型和长度也会影响到融合蛋白的活性、稳定性以及细胞内的表达^[41]。下面主要介绍 balugrastim 和 GW003 这两种 G-CSF-HSA 融合蛋白候选药物。

Balugrastim 是由 Teva Pharmaceutical 公司研发的一种由人血清白蛋白和 rhG-CSF 通过重组 DNA 技术在酿酒酵母中表达的重组蛋白,它将 rhG-CSF 的 N 末端与白蛋白的 C 端结合得到一条由 759 个氨基酸组成的单肽链 (分子质量为 85 kDa),半衰期可达 36 h^[55]。目前 balugrastim 已经完成了临床试验。临床 I/IIa 期试验表明,给药 450 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (相当于 30 mg) 的 balugrastim, ANC 恢复和安全性与 6 mg pegfilgrastim 相当^[56]。临床 II 期试验表明,给药剂量为 40 或 50 mg 的 balugrastim 对接受多柔比星和多西他赛化疗的乳腺癌患者的安全

有效性,与 6 mg pegfilgrastim 的效果相当^[57]。临床 III 期试验结果表明,每周注射一次 40 mg balugrastim 在治疗第一期严重的中性粒细胞减少症患者的持续作用时间与 pegfilgrastim 相当^[58]。

GW003 是由江苏泰康生物医药公司研发的一种由人血清白蛋白和突变的人 G-CSF 通过重组 DNA 技术在酵母中产生的重组蛋白,其也是通过 N 端基因连接于重组 HSA 的 C 端, GW003 的分子质量约为 85 kDa^[59]。与 balugrastim 不同的是, GW003 对 rhG-CSF 的 T1A、L3T、G4Y、P5R、K34H、L35I、K40H、L41I 的位点进行了突变,半衰期更长且活性更高^[60]。GW003 临床前实验表明,食蟹猴内 GW003 的清除速率得到明显的下降,半衰期是 rhG-CSF 的 5 倍 (15.7 h),但是随着 GW003 剂量的增加,清除速率也在增加^[59]。目前 GW003 正在进行临床 I 期试验,进一步研究其安全有效性。

另外,天津溥瀛生物技术有限公司于 2009 年向国家药监局提交了“注射用重组人血清蛋白/粒细胞刺激因子融合蛋白”原创新药的注册申请,2011 年被批准开展 I~II 期临床试验。该 rHSA/G-CSF 创新药的半衰期 (~38.6 h) 比 rhG-CSF 的半衰期 (~2.54 h) 延长约 10 倍以上^[61]。I~II 期临床试验 (ClinicalTrials.gov identifiers: NCT02465801、NCT03246009 和 NCT03251768)^[61]结果表明,给药剂量为 1.5 mg 的 rHSA/G-CSF 对接受含蒽环类药物化疗的乳腺癌患者的持续作用时间与吉赛欣®相当,剂量范围为 1.8~2.4 mg 的 rHSA/G-CSF 的安全性被评估为可接受,而重复给药 2.4 mg HSA/G-CSF 与吉赛欣®相比未能满足非劣效性。

2.3 其他融合蛋白技术 除了 G-CSF/IgG Fc 和 G-CSF/HSA 融合蛋白之外, Huang 等^[62]合成了一种高亲水性人工明胶样蛋白 (GLK),将其跟 G-CSF 融合,得到水动力半径大、稳定性好和生物活性保持高的 GLK/G-CSF 融合蛋白。Mickiene 等^[63]将干细胞因子 (SCF) 通过一个柔韧性的 α 螺旋连接子与 G-CSF 融合 (SCF- α -G-CSF)。由于 SCF 和 G-CSF 都是调节造血的重要

造血生长因子,融合蛋白能协同增强 SCF 和 G-CSF 的作用。连接子 L α 的 α -螺旋构象有效地分离了双功能融合蛋白的结构域,保证了单体之间的距离,从而使 SCF-L α -G-CSF 保持高的 G-CSF 生物活性^[64]。利用这两种方法开发的 G-CSF 融合蛋白均能保持 G-CSF 良好的生物活性,目前处在临床前研究阶段。

3 新剂型

新剂型是通过改变药物的传递系统来延长药物半衰期的手段(图 1D),如微球、埋植剂、口服、鼻腔、肺部等给药途径和纳米技术^[65]。早期,研究者开发了鼻腔^[66,67]、肺^[68,69]和口服^[70,71]给药等 rhG-CSF 新剂型,虽然一定程度上克服 rhG-CSF 半衰期短的问题以及提高患者依从性,但这些非注射给药都存在药物吸收差、稳定性差、对肝脏的首过作用以及药物对作用部位的靶向性等方面的明显不足^[65]。为了解决这些问题,研究者使用一些药物载体材料对其进行包裹。Maeda 等^[72]在单层微丸外侧再包覆一层高密度胶原得到一种双层微丸,延长了 rhG-CSF 的释放期,血液中的 rhG-CSF 浓度可维持约一周,并持续增加白细胞计数。另外,聚乳酸-羟基乙酸共聚物(PLGA)具有良好的生物相容性、成囊和成膜特性,并且无毒,已通过美国 FDA 认证,并被正式作为药用辅料收录进美国药典(USP)^[73]。但 PLGA 微粒在释放期间,PLGA 会降解产生酸性单体和低聚物,导致包裹的蛋白质在更大程度上变性和聚集^[74]。而且 PLGA 单体及其低聚物的降解产物在酸性条件下与包裹的多肽和蛋白质的游离氨基化学偶联^[75]。Choi 等^[76]设计了一种 rhG-CSF PLGA 纳米粒。由于 PLGA 纳米粒子的尺寸大小,人 PLGA 纳米粒子比 PLGA 微米粒子在更大程度上减少酸性微环境问题,并且酸性降解产物更容易从 PLGA 纳米粒子中扩散到外水介质中。该 PLGA 纳米粒中约 90% 的 rhG-CSF 在 1 周内从 PLGA 纳米粒中以持续的方式释放,大大提高了 rhG-CSF 的释放率,不足之处在于 PLGA 纳米粒对 rhG-CSF 的包覆率仅为 37.8%。Liu 等^[77]使用 S/O/O/W 制备 PLGA 微球,将 G-CSF-葡聚糖纳米粒子微胶囊化成 PLGA 微球,提高了 PLGA 对 G-CSF 的包覆率。葡聚糖纳米粒在释药过程中还能吸收水,体积增大,易于相互接触,在 PLGA 微球内形成更多的扩散通道,这些扩散通道使 PLGA 降解产生的酸从微球中扩散出来,降低了微球内的酸含量。这种方法得到的 G-CSF-PLGA 微球能够有效地缓释 G-CSF,可持续两周,并保持 90% 以上的生物活性。

目前, G-CSF 的新剂型的研究虽然取得了一些不错的进展,但均处于临床前阶段。

4 总结与展望

目前,利用 PEG 修饰、融合蛋白以及新剂型技术开发长效化 rhG-CSF 中,PEG 修饰是最成功的。然而,PEG 修饰经过了 40 多年的发展,逐渐暴露出一些问题:① PEG 对蛋白药物的空间屏蔽作用会减弱蛋白药物与受体的相互作用,降低其生物活性,且分子质量越大活性降低越多^[78];② 高分子质量的 PEG 在体内不易被代谢,容易聚集在肝脏等部位而引起大分子综合征,长期使用会对肝脏造成损伤^[79];③ 偶联在蛋白药物上的 PEG 可能会诱导产生抗 PEG 抗体,降低药效和安全性^[80,81]。虽然近年来有抗 PEG 单克隆抗体用于开发 PEG 化治疗或药物释放的分析工具的报道,但相关的研究仍处于临床前阶段^[81]。

对于 Fc 融合蛋白延长药物半衰期,已经应用到很多药物了,如 Enbrel、Orencia 和 Nplate 等,但 Fc 融合蛋白技术也仍有一些难题需要解决:① Fc 片段往往会形成二聚体,如果单体的蛋白分子是生物活性的首选形式,这样可能导致药物的异质性,而影响药效。② Fc 分别与 Fc γ Rs 和 C1q 结合,会导致 ADCC 和 CDC,如果 Fc 融合蛋白不需要抗体相关的细胞毒性,所以需要仔细选择和修饰 IgG 亚型的 Fc 区域。HSA 融合蛋白虽然可以有效地提高药物的半衰期,但在融合蛋白的设计以及药物进行长期的检测和评估方面仍需考虑以下问题:① 与 HSA 融合会导致目标蛋白生物活性下降;② HSA 融合蛋白的给药剂量较高,连续的高剂量给药可能会出现免疫原性或不良反应;③ HSA 融合蛋白由至少两个具有不同理化性质的组分组成,可能引起纯化、配方和稳定性的问题^[15]。

目前,蛋白质药物新剂型研究中最常用的方法是微粒控制释放。而在微粒制备和应用中仍需考虑对蛋白质稳定性的影响、微粒的载药量和包封率低以及突释效应等问题^[82]。蛋白药物新剂型的开发与药物载体新材料的开发密不可分,但单一高分子材料仍存在一些问题。如聚乳酸、聚己内酯和 PLGA 都是疏水性可降解载体材料。这些材料在蛋白的包封过程中必须使用有机溶剂(如 DMSO),而这些聚合物会降解产生酸性物质,可能会影响蛋白质药物的活性^[73]。

此外,脂肪酸链修饰也是一种发展前景不错的长效化技术,具有如下优势^[83,84]:脂肪酸是 HSA 的天然配体,在体内能与大分子质量的 HSA 可逆性地结合,延长药物体内半衰期;某些情况下,脂肪酸还能诱导药物自组装形成多聚体,进一步延长药物体内半衰期;脂肪酸是构成细胞膜磷脂及人体脂肪与类脂的重要成分,几乎无免疫原性;脂肪酸有助于提高亲水性药物的脂溶性,增大肠道黏膜透过性,因此脂肪酸链修饰蛋白多肽

类药物有望制成口服制剂(如索马鲁肽^[85])。此外,脂肪酸链修饰还可以减少药物与组织相容性复合物II分子结合,干扰T细胞的活化,从而降低免疫原性^[86,87]。目前,上市的脂肪酸链修饰药物有由诺和诺德公司研发的地特胰岛素^[88]、德谷胰岛素^[89]、利拉鲁肽^[90]和索马鲁肽^[85]。目前,本课题组正在开展利用脂肪酸链修饰开发长效rhG-CSF的研究。

总体而言,目前已有好几款长效化rhG-CSF药物上市,多款候选药物正在临床试验中。如2001年美国FDA批准上市了第一个长效化rhG-CSF,即安进公司开发的PEG修饰rhG-CSF药物,商品名Neulasta[®]。目前,Neulasta的累积销售额为554亿美元,远超1991年获批的filgrastim。随着Neulasta的专利到期以及lipegfilgrastim的上市,Neulasta生物类似药也层出不穷^[91]。截至目前,FDA已批准4款Neulasta生物类似药(Fulphila[®]、Udenyca[®]、Ziextenzo[®]及Nyvepria[®]^[92])上市。这虽然导致Neulasta近年来的销售额逐步下降,但在国外长效rhG-CSF市场占比仍然很高。目前国内市场上,短效rhG-CSF药物占比很高,有近20个。长效rhG-CSF目前有4个,分别为津优力[®]^[93]、新瑞白[®]^[94]、药艾多[®]和申力达[®]。另外还有多个处于临床研究阶段,如亿帆医药自主研发的benefilgrastim^[45]、杭州九源基因工程有限公司的Neulasta生物仿制药(ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01918241和NCT01637493)、北京双鹭药业股份有限公司的Neulasta生物仿制药(Trial registration: <http://www.chinadrugtrials.org.cn/CTR20170164>)^[95]、厦门特宝的Y型PEG化rhG-CSF^[96]和天津博瀛生物技术公司的I类新药rHSA/G-CSF^[61]等。在这种趋势下,长效化rhG-CSF有望在未来几年内替代短效rhG-CSF在国内市场中占据主导地位。

作者贡献: 王旭东负责组织文章的框架、文章的撰写及修改;刘家辉负责资料的收集和文章初稿撰写;陈康楠负责资料的收集和整理;梅建凤和易喻完善了文章思路并修改文章;应国清负责文章的思路指导和审阅。

利益冲突: 所有作者声明不存在利益冲突。

References

- Arvedson T, O'Kelly J, Yang BB. Design rationale and development approach for pegfilgrastim as a long-acting granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Biodrugs*, 2015, 29: 185-198.
- Behi J, Hassiki R, Said NB, et al. Optimization of PEGylation reaction time and molar ratio of rhG-CSF toward increasing bioactive potency of monoPEGylated protein [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 109: 888-895.
- Kunstelj M, Fidler K, Skrajnar S, et al. Cysteine-specific PEGylation of rhG-CSF via selenylsulfide bond [J]. *Bioconjug Chem*, 2013, 24: 889-896.
- Singh VK, Newman VL, Seed TM. Colony-stimulating factors for the treatment of the hematopoietic component of the acute radiation syndrome (H-ARS): a review [J]. *Cytokine*, 2015, 71: 22-37.
- Schabitz WR, Kollmar R, Schwaninger M, et al. Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia [J]. *Stroke*, 2003, 34: 745-751.
- Jin SZ, Han MZ, Pei FH. Application of G-CSF in the transplantation of stem cell [J]. *Basic Clin Med (基础医学与临床)*, 2008, 28: 289-293.
- Liang G, Du W, Ke Q, et al. The effects of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor mouthwash on radiotherapy-induced oral mucositis in locally advanced nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Adv Clin Exp Med*, 2017, 26: 409-413.
- Singh VK, Seed TM. An update on sargramostim for treatment of acute radiation syndrome [J]. *Drugs Today*, 2018, 54: 679-693.
- Gomes FR, Maluenda AC, Tapias JO, et al. Expression of recombinant human mutant granulocyte colony stimulating factor (Nartograstim) in *Escherichia coli* [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2012, 28: 2593-2600.
- Innocenti R, Rigacci L, Restelli U, et al. Lenograstim and filgrastim in the febrile neutropenia prophylaxis of hospitalized patients: efficacy and cost of the prophylaxis in a retrospective survey [J]. *J Blood Med*, 2019, 10: 21-27.
- Sourgens H, Lefrere F. A systematic review of available clinical evidence-filgrastim compared with lenograstim [J]. *Int J Clin Pharmacol Ther*, 2011, 49: 510-518.
- Tiwari D, Haque S, Jawed A, et al. Efficient purification of rhG-CSF and its PEGylated forms and evaluation for *in vitro* activities [J]. *Protein Pept Lett*, 2015, 22: 877-884.
- Reddy NC, Kumar M, Molla R, et al. Chemical methods for modification of proteins [J]. *Org Biomol Chem*, 2020, 18: 4669-4691.
- Jazayeri JA, Carroll GJ. Fc-based cytokines: prospects for engineering superior therapeutics [J]. *BioDrugs*, 2008, 22: 11-26.
- Rogers B, Dong D, Li Z, et al. Recombinant human serum albumin fusion proteins and novel applications in drug delivery and therapy [J]. *Curr Pharm Des*, 2015, 21: 1899-1907.
- Warkentin TE. Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin [J]. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2004, 17: 105-125.
- Jain A, Jain SK. PEGylation: an approach for drug delivery. a review [J]. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, 2008, 25: 403-447.
- Jevsevar S, Kunstelj M, Porekar VG. PEGylation of therapeutic proteins [J]. *Biotechnol J*, 2010, 5: 113-128.
- Kang JS, Deluca PP, Lee KC. Emerging PEGylated drugs [J]. *Expert Opin Emerging Drugs*, 2009, 14: 363-380.

- [20] Pfister D, Morbidelli M. Process for protein PEGylation [J]. *J Control Release*, 2014, 180: 134-149.
- [21] Biganzoli L, Untch M, Skacel T, et al. Neulasta (pegfilgrastim) a once-per-cycle option for the management of chemotherapy-induced neutropenia [J]. *Semin Oncol*, 2004, 31: 27-34.
- [22] Molineux G. The design and development of pegfilgrastim (PEG-rmetHuG-CSF, Neulasta®) [J]. *Curr Pharm Des*, 2004, 10: 1235-1244.
- [23] Al-Salama ZT, Keam SJ. Mecapegfilgrastim in chemotherapy-induced neutropenia: a profile of its use in china [J]. *Clin Drug Investig*, 2019, 39: 1009-1018.
- [24] Yan B, Zhang W, Lu F, et al. Safety of polyethylene glycol recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in treating non-small cell lung cancer patients at I b stage [J]. *Asian Pac J Trop Med*, 2013, 6: 912-915.
- [25] Wang T, Wu B, Hu X, et al. A randomized multicenter phase II trial of mecapegfilgrastim single administration *versus* granulocyte colony-stimulating growth factor on treating chemotherapy-induced neutropenia in breast cancer patients [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7: 196.
- [26] Zhou C, Huang Y, Wang D, et al. A Randomized multicenter phase III study of single administration of mecapegfilgrastim (HHPG-19K), a pegfilgrastim biosimilar, for prophylaxis of chemotherapy-induced neutropenia in patients with advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC) [J]. *Clin Lung Cancer*, 2016, 17: 119-127.
- [27] Xu F, Zhang Y, Miao Z, et al. Efficacy and safety of mecapegfilgrastim for prophylaxis of chemotherapy-induced neutropenia in patients with breast cancer: a randomized, multicenter, active-controlled phase III trial [J]. *Ann Transl Med*, 2019, 7: 482.
- [28] Wang JL, Feng ZW, Zhao X. Research progress on site-specific PEGylation on thiol in protein drugs [J]. *Drugs Clinic (现代药物与临床)*, 2017, 32: 2534-2538.
- [29] Xu L, Zhang C, Wang Q, et al. Oxidized catechol-derived poly(ethylene glycol) for thiol-specific conjugation [J]. *React Funct Polym*, 2017, 117: 97-105.
- [30] Veronese FM, Mero A, Caboi F, et al. Site-specific pegylation of G-CSF by reversible denaturation [J]. *Bioconjug Chem*, 2007, 18: 1824-1830.
- [31] Peng F, Liu Y, Li X, et al. PEGylation of G-CSF in organic solvent markedly increase the efficacy and reactivity through protein unfolding, hydrolysis inhibition and solvent effect [J]. *J Biotechnol*, 2014, 170: 42-49.
- [32] Ishikawa M, Iijima H, Satake-Ishikawa R, et al. The substitution of cysteine 17 of recombinant human G-CSF with alanine greatly enhanced its stability [J]. *Cell Struct Funct*, 1992, 17: 61-65.
- [33] Hong J, Lee B, Kang K, et al. Characterisation of the site-specific monoPEGylated rhG-CSF analogue pegteograstim [J]. *Biologicals*, 2018, 51: 54-61.
- [34] Shin KH, Lim KS, Lee H, et al. An assessment of the pharmacokinetics, pharmacodynamics, and tolerability of GCPGC, a novel pegylated granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), in healthy subjects [J]. *Invest New Drugs*, 2014, 32: 636-643.
- [35] Lee KH, Kim JY, Lee MH, et al. A randomized, multicenter, phase II/III study to determine the optimal dose and to evaluate the efficacy and safety of pegteograstim (GCPGC) on chemotherapy-induced neutropenia compared to pegfilgrastim in breast cancer patients: KCSG PC10-09 [J]. *Support Care Cancer*, 2016, 24: 1709-1717.
- [36] Hoggatt J, Tate TA, Pelus LM. Role of lipegfilgrastim in the management of chemotherapy-induced neutropenia [J]. *Int J Nanomedicine*, 2015, 10: 2647-2652.
- [37] Buchner A, Lammerich A, Abdolzade-Bavil A, et al. Lipegfilgrastim: pharmacodynamics and pharmacokinetics for body-weight-adjusted and 6 mg fixed doses in two randomized studies in healthy volunteers [J]. *Curr Med Res Opin*, 2014, 30: 2523-2533.
- [38] Buchner A, Elsasser R, Bias P. A randomized, double-blind, active control, multicenter, dose-finding study of lipegfilgrastim (XM22) in breast cancer patients receiving myelosuppressive therapy [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2014, 148: 107-116.
- [39] Bondarenko I, Gladkov OA, Elsaesser R, et al. Efficacy and safety of lipegfilgrastim *versus* pegfilgrastim: a randomized, multicenter, active-control phase 3 trial in patients with breast cancer receiving doxorubicin/docetaxel chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 386.
- [40] Danylesko I, Sareli R, Varda-Bloom N, et al. Long-acting granulocyte colony-stimulating factor pegfilgrastim (lipegfilgrastim) for stem cell mobilization in multiple myeloma patients undergoing autologous stem cell transplantation [J]. *Int J Hematol*, 2021, 114: 363-372.
- [41] Chen X, Zaro JL, Shen WC. Fusion protein linkers: property, design and functionality [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2013, 65: 1357-1369.
- [42] Szlachcic A, Zakrzewska M, Otlewski J. Longer action means better drug: tuning up protein therapeutics [J]. *Biotechnol Adv*, 2011, 29: 436-441.
- [43] Cox GN, Smith DJ, Carlson SJ, et al. Enhanced circulating half-life and hematopoietic properties of a human granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin fusion protein [J]. *Exp Hematol*, 2004, 32: 441-449.
- [44] Cox GN, Chlipala EA, Smith DJ, et al. Hematopoietic properties of granulocyte colony-stimulating factor/immunoglobulin (G-CSF/IgG-Fc) fusion proteins in normal and neutropenic rodents [J]. *PLoS One*, 2014, 9: e91990.
- [45] Yan XQ, Huang ZH, Yang HZ, et al. Recombinant human G-CSF dimer and application for treatment of neurological diseases: CN, ZL201510112334.2 [P]. 2018-10-16.
- [46] Glaspy J, Tang T, Ruddy D, et al. A phase II, randomized, multicentre, open-label, active-controlled, dose-finding trial of f-627

- (benefilgrastim) in women with breast cancer receiving myelotoxic chemotherapy [J]. *Blood*, 2014, 124: 1584.
- [47] Ertan-Ahmed S, Kiehl MG, Radinoff A, et al. GX-G3, a long-acting G-CSF, compared with pegfilgrastim in reducing duration of severe neutropenia after chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma [J]. *J Clin Oncol*, 2019, 37: e19065.
- [48] Kim YJ, Koh EM, Song CH, et al. Preclinical immunogenicity testing using anti-drug antibody analysis of GX-G3, Fc-fused recombinant human granulocyte colony-stimulating factor, in rat and monkey models [J]. *Sci Rep*, 2021, 11: 12004.
- [49] Kim YJ, Ertan-Ahmed S, Capan Y, et al. Preclinical evaluation of a biobetter candidate: pharmacokinetics and pharmacodynamics of GX-G3 in healthy and neutropenia-induced rats [J]. *Drug Dev Res*, 2019, 80: 807-813.
- [50] Park SH, Kim MY, Lim HK, et al. Conjugate of biologically active polypeptide monomer and immunoglobulin Fc fragment with reduced receptor-mediated clearance, and the method for preparing the same: US, 10487128 [P]. 2019-11-26.
- [51] Shin KH, Kim TE, Lim KS, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of a new long-acting granulocyte colony-stimulating factor (HM10460A) in healthy volunteers [J]. *Bio-Drugs*, 2013, 27: 149-158.
- [52] Vacirca JL, Chan A, Mezei K, et al. An open-label, dose-ranging study of Rolontis, a novel long-acting myeloid growth factor, in breast cancer [J]. *Cancer Med*, 2018, 7: 1660-1669.
- [53] Barrett JA, Greene D, Lakshmiathan S, et al. Justification for a fixed dose of eflapegrastim, a long-acting G-CSF, in patients receiving docetaxel-cyclophosphamide chemotherapy [J]. *J Clin Pharmacol*, 2020, 61: 204-210.
- [54] Stehle G, Sinn H, Wunder A, et al. Plasma protein (albumin) catabolism by the tumor itself-implications for tumor metabolism and the genesis of cachexia [J]. *Crit Rev Oncol Hemat*, 1997, 26: 77-100.
- [55] Ghidini M, Hahne JC, Trevisani F, et al. New developments in the treatment of chemotherapy-induced neutropenia: focus on balugrastim [J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2016, 12: 1009-1015.
- [56] Avisar N, Adar L, Bock J, et al. First-in-human, phase I/IIa dose-escalation and safety study of balugrastim in breast cancer patients receiving myelosuppressive chemotherapy [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2015, 75: 929-939.
- [57] Gladkov O, Moiseyenko V, Bondarenko IN, et al. Phase II dose-finding study of balugrastim in breast cancer patients receiving myelosuppressive chemotherapy [J]. *Med Oncol*, 2015, 32: 623.
- [58] Gladkov O, Moiseyenko V, Bondarenko IN, et al. A phase III study of balugrastim *versus* pegfilgrastim in breast cancer patients receiving chemotherapy with doxorubicin and docetaxel [J]. *Oncologist*, 2016, 21: 7-15.
- [59] Xu X, Yang J, Liu Y, et al. The induction of prolonged myelopoietic effects in monkeys by GW003, a recombinant human granulocyte colony-stimulating factor genetically fused to recombinant human albumin [J]. *J Pharm Sci*, 2015, 104: 760-767.
- [60] Wen XF, Wu YL, Wang YF, et al. Fusion protein of G-CSF variant, preparation method and application: CN, ZL200910199337.9 [P]. 2013-09-18.
- [61] Chen SS, Han YQ, Ouyang QC, et al. Randomized and dose-escalation trials of recombinant human serum albumin/granulocyte colony-stimulating factor in patients with breast cancer receiving anthracycline-containing chemotherapy [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21: 341.
- [62] Huang YS, Wen XF, Wu YL, et al. Engineering a pharmacologically superior form of granulocyte-colony-stimulating factor by fusion with gelatin-like-protein polymer [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2010, 74: 435-441.
- [63] Mickiene G, Dalgėdienė I, Zvirblis G, et al. Human granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF)/stem cell factor (SCF) fusion proteins: design, characterization and activity [J]. *PeerJ*, 2020, 8: e9788.
- [64] Mickiene G, Dalgediene I, Dapkunas Z, et al. Construction, purification, and characterization of a homodimeric granulocyte colony-stimulating factor [J]. *Mol Biotechnol*, 2017, 59: 374-384.
- [65] Ai G, Du LN, Mei XG. The development of new dosage form and novel technique for protein and peptide drugs [J]. *Chin J Biochem Pharm (中国生化药物杂志)*, 2004, 25: 366-369.
- [66] Machida M, Sano K, Arakawa M, et al. Absorption of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) from rat nasal mucosa [J]. *Pharm Res*, 1993, 10: 1372-1377.
- [67] Nomura H, Akamisaka S, Maruyama K. Effects of a dosing solution on the nasal absorption of non-glycosylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 1490-1493.
- [68] Machida M, Hayashi M, Awazu S. The effects of absorption enhancers on the pulmonary absorption of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2000, 23: 84-86.
- [69] Machida M, Hayashi M, Awazu S. Pulmonary absorption of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) after intratracheal administration to rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 1996, 19: 259-262.
- [70] Eiamtrakarn S, Itoh Y, Kishimoto J, et al. Gastrointestinal muco-adhesive patch system (GI-MAPS) for oral administration of G-CSF, a model protein [J]. *Biomaterials*, 2002, 23: 145-152.
- [71] Takaya T, Ikeda C, Imagawa N, et al. Development of a colon delivery capsule and the pharmacological activity of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rhG-CSF) in beagle dogs [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1995, 47: 474-478.
- [72] Maeda H, Nakagawa T, Adachi N, et al. Design of long-acting formulation of protein drugs with a double-layer structure and its application to rhG-CSF [J]. *J Controlled Release*, 2003, 91: 281-297.

- [73] Chen SX, Zhan SP, Wang LQ, et al. Progress of carrier materials in drug delivery system for proteins [J]. *Chin J Pharm (中国医药工业杂志)*, 2014, 45: 789-794.
- [74] Kim HK, Park TG. Comparative study on sustained release of human growth hormone from semi-crystalline poly(L-lactic acid) and amorphous poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres: morphological effect on protein release [J]. *J Control Release*, 2004, 98: 115-125.
- [75] Murty SB, Goodman J, Thanoo BC, et al. Identification of chemically modified peptide from poly(D,L-lactide-co-glycolide) microspheres under *in vitro* release conditions [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2003, 4: E50.
- [76] Choi SH, Park TG. G-CSF loaded biodegradable PLGA nanoparticles prepared by a single oil-in-water emulsion method [J]. *Int J Pharm*, 2006, 311: 223-228.
- [77] Liu G, Hong X, Jiang M, et al. Sustained-release G-CSF microspheres using a novel solid-in-oil-in-oil-in-water emulsion method [J]. *Int J Nanomedicine*, 2012, 7: 4559-4569.
- [78] Bailon P, Won CY. PEG-modified biopharmaceuticals [J]. *Expert Opin Drug Deliv*, 2009, 6: 1-16.
- [79] Turecek PL, Bossard MJ, Schoetens F, et al. PEGylation of biopharmaceuticals: a review of chemistry and nonclinical safety information of approved drugs [J]. *J Pharm Sci*, 2016, 105: 460-475.
- [80] Shimizu T, Abu Lila AS, Awata M, et al. A cell assay for detecting anti-PEG immune response against PEG-modified therapeutics [J]. *Pharm Res*, 2018, 35: 223.
- [81] Zhang P, Sun F, Liu S, et al. Anti-PEG antibodies in the clinic: current issues and beyond PEGylation [J]. *J Control Release*, 2016, 244: 184-193.
- [82] Ping QN. The development of new dosage forms of protein drugs [J]. *Food Drug (食品与药品)*, 2005, 7: 1-5.
- [83] Wang Y, Zhao W, Xin ZS, et al. Advances in research on modification of protein and peptide drugs with fatty acids [J]. *Prog Pharm Sci (药学进展)*, 2015, 39: 651-658.
- [84] Cho J, Lim SI, Yang BS, et al. Generation of therapeutic protein variants with the human serum albumin binding capacity *via* site-specific fatty acid conjugation [J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 18041.
- [85] Goldenberg RM, Steen O. Semaglutide: review and place in therapy for adults with type 2 diabetes [J]. *Can J Diabetes*, 2019, 43: 136-145.
- [86] Schultz HS, Østergaard S, Sidney J, et al. The effect of acylation with fatty acids and other modifications on HLA class II: peptide binding and T cell stimulation for three model peptides [J]. *PLoS One*, 2018, 13: e0197407.
- [87] Menacho-Melgar R, Decker JS, Hennigan JN, et al. A review of lipidation in the development of advanced protein and peptide therapeutics [J]. *J Control Release*, 2019, 295: 1-12.
- [88] Raslova K, Bogoev M, Raz I, et al. Insulin detemir and insulin aspart: a promising basal-bolus regimen for type 2 diabetes [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2004, 66: 193-201.
- [89] Kanazawa I, Notsu M, Tanaka K, et al. An open-label longitudinal study on the efficacy of switching from insulin glargine or detemir to degludec in type 2 diabetes mellitus [J]. *Intern Med*, 2015, 54: 1591-1598.
- [90] Sjöholm A. Liraglutide therapy for type 2 diabetes: overcoming unmet needs [J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2010, 3: 764-781.
- [91] Cornes P, Gascon P, Vulto AG, et al. Biosimilar pegfilgrastim: improving access and optimising practice to supportive care that enables cure [J]. *Biodrugs*, 2020, 34: 255-263.
- [92] Yang JY, Liu RZ, Granghaud A, et al. Biosimilar pegfilgrastim may offer affordable treatment options for patients in France: a budget impact analysis on the basis of clinical trial and real-world data [J]. *J Med Econ*, 2021, 24: 665-674.
- [93] Yang WY, Liu TF, Chen XJ, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of PEGylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in children with acute lymphoblastic leukemia: a prospective control trial [J]. *Chin J Contemp Pediatr (中国当代儿科杂志)*, 2020, 22: 1172-1177.
- [94] Zou DL, Guo MF, Zhou Q. A clinical study of pegylated recombinant human granulocyte colony stimulating factor (PEG-rhG-CSF) in preventing neutropenia during concurrent chemoradiotherapy of cervical cancer [J]. *BMC Cancer*, 2021, 21: 661.
- [95] Hu CY, Ji BX, Hu X, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of two formulations of pegylated recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in healthy Chinese subjects: an open-label, randomized, parallel-design bioavailability study [J]. *Clin Pharmacol Drug Dev*, 2021, 10: 291-298.
- [96] Song YY, Shi YK, Zhang CL, et al. A phase I study to evaluate the pharmacokinetics and pharmacodynamics of Y-PEGylated recombinant human granulocyte-colony stimulating factor [J]. *Chin J New Drug (中国新药杂志)*, 2013, 1: 68-74.