

重组糖蛋白激素类药物的质量控制和评价关注点： 糖基化修饰的“宏观”和“微观”异质性

李怡君, 胡莹莹, 韦薇

(国家药品监督管理局药品审评中心, 北京 100076)

[摘要] 糖蛋白激素包括促卵泡激素、促黄体生成素、绒毛膜促性腺激素和促甲状腺激素,是由非共价结合的 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体。糖基化复杂性和结构不均一性是糖蛋白激素类药物结构表征和质量控制的关注点。糖基化修饰位点、修饰类型、唾液酸含量与糖蛋白激素在机体的受体结合、信号转导、生物功能和清除速率密切相关。本文将梳理重组糖蛋白激素类药物的上市产品概况,解析该类物质糖基化修饰的“宏观”和“微观”复杂性,阐明结构异质性与生物功能的关系,梳理用于结构确证和糖链鉴定的分析技术,结合其质量控制难点提出研发路径和药学研究的相关考虑。

[关键词] 糖蛋白激素;促卵泡激素;糖基化修饰;生物效力;质量控制

[中图分类号] R95 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)24-2467-10

Quality control and evaluation concerns of recombinant glycoprotein hormones: “macro” and “micro” heterogeneity of glycosylation modifications

LI Yi-jun, HU Ying-ying, WEI Wei

(Center for Drug Evaluation, National Medical Products Administration, Beijing 100076, China)

[Abstract] Glycoprotein hormones, including follicle-stimulating hormone, luteinizing hormone, chorionic gonadotropin, and thyroid stimulating hormone, are heterodimers consisting of non-covalently bound α and β subunits. Glycosylation complexity and structural heterogeneity are the focus of structural characterization and quality control of glycoprotein hormones. The modification sites, modification types, and sialic acid content of glycosylation are closely related to the receptor binding, signaling, biological function, and clearance rate of glycoprotein hormones in the body. In this paper, we summarize the marketed products of recombinant glycoprotein hormones, analyze the “macro” and “micro” complexity of glycosylation modification of these drugs, clarify the relationship between structural heterogeneity and biological function, sort out the analytical techniques used for structural confirmation and glycan chain identification, and put forward the relevant considerations of R&D pathway and CMC research based on their quality control difficulties.

[Key words] glycoprotein hormone; follicle-stimulating hormone; glycosylation modification; biological potency; quality control

糖蛋白激素(glycoprotein hormones, GPHs)包括促卵泡激素(follicle-stimulating hormone, FSH)、促黄体生成素(luteinizing hormone, LH)、绒毛膜促性腺激素(chorionic gonadotropin, CG)和促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, TSH),是人体内一类

重要的激素蛋白。GPHs通过作用于细胞膜上特定的富含亮氨酸的重复G蛋白偶联受体(leucine-rich repeat G protein-coupled receptors, LGRs),激活下游信号通路,调控多种腺体分泌,对生长发育具有重要调节作用,在临床治疗、辅助生殖等多方面具有重要的应用价值^[1]。

GPHs是由相同的 α 亚基和特异性的 β 亚基组成的异源二聚体,其中FSH, LH和CG又合称为促性腺激素(gonadotropin, Gn),在卵泡发生过程中对

[作者简介] 李怡君,女,硕士,助理研究员,主要从事生物制品药审评工作。联系电话:(010)80996153,E-mail:liyj@cde.org.cn。

[通讯作者] 韦薇,女,博士,主任药师,主要从事生物制品药审评工作。联系电话:(010)80996186,E-mail:weiw@cde.org.cn。

其募集和生长有增强的作用,可以刺激卵泡的生长和成熟,对于机体的生殖内分泌系统具有十分重要的意义,临床主要用于辅助生殖和治疗不孕不育。TSH 是反映甲状腺功能的重要指标,临床可用于甲状腺癌患者的辅助诊断和辅助治疗。

为了获得安全有效且满足大规模临床使用的 GPHs 药物,研究人员进行了大量的探索和科研工作,经历了从人垂体提取促性腺激素、尿液提取促性腺激素到重组 GPHs 的研发历程和产品迭代^[2]。随着基因工程和蛋白质工程技术的兴起和成熟应用,制药企业可以选择合适的宿主细胞表达并纯化出质量均一性较好的重组蛋白制品,减少对尿液收集和激素提取的依赖,提高产品的安全性。

一直以来,糖基化复杂性和结构不均一性是 GPHs 类药物结构表征和质量控制的关注点。本文将梳理重组 GPHs 类药物的上市产品概况,解析该类糖基化修饰的“宏观”和“微观”复杂性,分析其结构异质性与生物功能的关系,结合其质量控制关注点提出研发路径和药学研究的相关考虑。

1 国内上市产品概况

长期以来,GPHs 类药物被广泛应用于辅助生殖和不孕不育患者。人 FSH 通过刺激促使卵泡发育的卵巢颗粒细胞来诱导卵泡发育;人 LH 在提高晚期卵泡雌二醇生成、诱导活性激增期间的卵泡破裂和维持黄体素等方面发挥重要作用,可用于支持早期妊娠^[3]。对于严重缺乏 LH 和 FSH 的患者,推荐 LH 与 FSH 联合使用以刺激卵泡的发育。人 CG 也可以在刺激卵泡生长后触发最终的卵泡成熟和黄体化,并具有更长的半衰期,临床与 FSH 联合使用促进卵泡生成和成熟、诱发排卵^[4]。

2021 年 7 月,中共中央和国务院公布《关于优化生育政策促进人口长期均衡发展的决定》,将鼓励生育提高到国家战略高度。在我国当前鼓励生育和不孕不育高发的形势下,促性腺激素[重组人促卵泡激素(r-hFSH)、重组人促黄体激素(r-hLH)和重组人绒毛膜促性腺激素(r-hCG)]作为辅助生殖技术的常用药物,具有巨大的市场发展潜力。目前,国内的促性腺激素市场仍然主要被国外进口原研药占据,国产化替代的空间巨大。部分地区临床仍需要使用尿源产品,尚未完成重组产品的全面替代。

用于治疗不育不孕症的促性腺激素经历了从人垂体提取物、尿液提取物到重组 GPHs 的重要研发历程。临床上最早使用的 FSH 从人脑垂体中提取

而来,由于脑垂体来源有限且垂体提取物存在生物活性低、外源因子污染等缺点,最终在临床治疗上被尿源性 FSH(u-FSH)取代^[2]。尿液提取促性腺激素来自绝经后女性的尿液,经历了人绝经期促性腺激素(hMG)、u-FSH 和高度纯化(HP)的 u-FSH 的产品替代。在这个发展过程中,尿液提取产品的纯度和比活得到了显著提升。尿源提取物的糖基化修饰更接近于人体本身的修饰类型,但是其糖基化修饰、电荷异质性等质量属性也更加复杂和不均一^[5]。此外,高纯度 u-FSH 仍含有 <0.1 IU LH 和 <5% 的未经鉴定的尿液杂蛋白。重组 DNA 技术的出现使得重组促性腺激素产品实现商业化并应用于临床,从而满足大规模的市场需求。当前,重组 GPHs 及长效分子的开发是该类产品主要的发展方向,因此本文将针对该类药物进行介绍和分析。

1.1 r-hFSH

最早在国内市场销售的 r-hFSH 有 2 家,分别是默克雪兰诺公司(Merck Serono)的注射用 r-hFSH(商品名:果纳芬[®])和美国默克公司(Merck & Co.)的 FSH β (商品名:普丽康[®]),两者均采用中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary, CHO)细胞表达、制备的与天然 FSH 具有相同氨基酸序列及糖基化位点的 GPHs。此后,长春金赛药业有限责任公司、LG Life Sciences 公司和齐鲁药业公司等的 r-hFSH 陆续获批上市,均采用 CHO 细胞表达,其中齐鲁药业公司的注射用 r-hFSH 是首个按照“生物类似药”获批的 r-hFSH。辉凌制药有限公司(Ferring pharmaceuticals A/S)采用胎儿视网膜来源的人类细胞系(PER.C6[®])开发的 r-hFSH δ 注射液于 2016 年获得欧洲 EMA 的上市许可,目前已在我国递交上市申请。

1.2 r-hLH

目前在国内上市的唯一产品是默克雪兰诺公司的注射用 r-hLH α ,规格为 75 IU·支⁻¹,商品名为乐芮[®](Luveris[®])。该产品于 2013 年 5 月获得进口药品注册证,批准用于治疗严重缺乏 LH 和 FSH 的患者,即内源性的血清 LH 水平 <1.2 IU·L⁻¹ 的患者,推荐与 FSH 联合使用以刺激卵泡的发育。

1.3 r-hCG

我国最早上市的 r-hCG 是默克雪兰诺公司开发的 r-hCG 注射液,规格为 250 $\mu\text{g}\cdot 0.5\text{ mL}^{-1}$,商品名为艾泽[®](Ovidrel[®]),给药途径为皮下注射,临床适用于:① 接受辅助生殖技术如体外授精(IVF)之前进行超排卵的妇女:注射本品可在刺激卵泡生长后

触发最终的卵泡成熟和黄体化。② 无排卵或稀发排卵妇女:注射本品可在刺激卵泡生长后触发排卵及黄体化。珠海市丽珠单抗生物技术有限公司开发的注射用重组人绒毛膜促性腺激素于2021年4月获批上市,剂型为冻干制剂,规格为 $250\ \mu\text{g}(6\ 500\ \text{IU})\cdot\text{瓶}^{-1}$,商品名为丽得宝[®],为国内首个批准的 r-hCG 生物类似药,市面上的其他产品均为尿源提取物。

1.4 重组人促甲状腺激素 (r-hTSH)

TSH 与正常的甲状腺上皮细胞或甲状腺分化癌组织上的促甲状腺素受体结合后,促进细胞的环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 合成,最终促进碘离子的摄取和有机化,以及甲状腺球蛋白 (Tg)、三碘甲状腺原氨酸 (T3)、四碘甲状腺原氨酸 (T4) 的分泌和合成。TSH 活化甲状腺细胞可以增加放射碘的摄取,利于扫描检查或放射碘杀死甲状腺细胞。TSH 的激活作用也导致甲状腺细胞释放可作为血液检测肿瘤标记物的 Tg。因此 r-hTSH 临床上可用于分化型甲状腺癌 (DTC) 患者甲状腺切除术后随访期间的血清 Tg 诊断以及无远处转移 DTC 患者甲状腺近全切或全切术后放射性碘去除残余甲状腺组织的治疗。

目前,国内市场尚未有 r-hTSH 上市。全球唯一获批上市的 r-hTSH 药物为 Genzyme 公司研发的注射用重组人促甲状腺素 α (thyrogen),我国尚未进口该产品。国内已批准进入临床试验的药物有苏州智核生物医药科技有限公司和苏州泽璟生物制药有限公司的 r-hTSH,其中苏州智核生物医药科技有限公司研发的 r-hTSH 注射液 (SNA001) 已提交上市申请。

1.5 长效制剂

目前研发最多的 GPHs 长效制剂主要是 r-hFSH 的长效制剂。普通 r-hFSH 在人体内的半衰期约 30 h,患者需要每天进行 1~2 次皮下注射。因此,长效制剂的开发可降低频繁注射给患者带来的不便,提高患者依从性。目前,用于长效 FSH 设计的有效技术手段主要有多糖基化修饰融合蛋白以及 IgG Fc 片段融合蛋白 2 种方式。多糖基化修饰的策略是在天然 FSH 蛋白结构上面融合 1 个富含 O 糖的蛋白片段羧基末端肽 (CTP),增加的唾液酸水平能够增加蛋白质的负电荷,降低肾小球过滤并减少受体介导的内吞作用。Fc 片段融合蛋白的策略是将 IgG 的 Fc 结构域与 r-hFSH 相连接,融合分子能够与 Fc 受体结合从而通过 FcRn 介导的再循环机制逃避内吞作用和随后的溶酶体降解,从而延长半衰期。

我国目前尚未有长效 r-hFSH 上市,但已有多个药物正在临床试验阶段。最先在全球上市的长效 FSH 制剂是默克公司的 corifollitropin alfa (商品名:Elonva[®])。该产品通过将 hCG 的 β 亚基的 CTP 添加到 FSH 的 β 亚基从而延长体内半衰期,于 2010 年 1 月被欧洲 EMA 批准上市,目前尚未在美国和中国获批上市^[6]。Elonva[®] 在刺激疗程 d 1 以单次皮下注射方式给药,在刺激疗程 d 5 或 d 6 需要使用促性腺激素释放素 (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 拮抗剂治疗,以避免 LH 早发性激增。在注射 Elonva[®] 7 d 后可能需要继续每日注射 r-hFSH 直至达到诱发卵细胞成熟的标准^[7]。在辅助生殖治疗中,单次注射 Elonva[®] 取代了每日 rFSH 的前 7 次注射,从而在第一周减轻治疗负担,减少给药频率,增加患者依从性^[8]。由于 Elonva[®] 的半衰期较长,生物利用度较高,与传统的 rFSH 治疗相比,卵巢过度刺激综合征 (OHSS) 的发生率略有上升,并且给药后至少在 1 周内无法进行干预,因此卵巢刺激综合征风险较高的妇女应谨慎使用^[7,9]。

2 结构异质性与生物功能关系

GPHs 是由非共价结合的 α 亚基和 β 亚基组成的异源二聚体。相比于重组 DNA 技术药物, GPHs 类产品的结构和糖基化修饰更加复杂。同一种属的 GPHs 的 α 亚基具有相同的 92 个氨基酸序列和二硫键连接方式并包含 2 个 N-糖基化位点,分别在 N52 和 N78 上, α 亚基 N52 位点的糖基化修饰对 GPHs 的信号转导起关键作用^[10-11]。然而, GPHs 的 β 亚基具有不同的氨基酸序列和 N 糖位点,决定了不同 GPHs 受体结合和生物学活性的特异性。GPHs 的结构及其糖基化位点如图 1 所示,图中标示了肽链的氨基酸数量和聚糖位置。

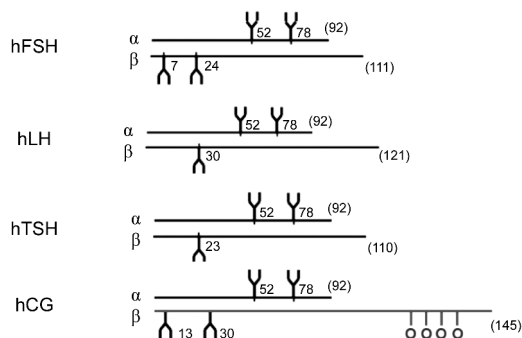


图 1 由 α 亚基和 β 亚基组成的人 FSH, LH, TSH 和 CG 的异二聚体

糖基化修饰对 GPHs 的正确折叠、组装、分泌、代谢、清除和发挥生物学活性起关键作用^[12-14]。许多研究揭示了不同 GPHs 的糖基化异质性与其活性功能之间的联系^[15-19]。科研人员通过对内源性、尿提取和重组 GPHs 的充分研究,将 GPHs 的糖基化修饰定义为“宏观”和“微观”2 个层面异质性^[16-17,19]。

大量研究表明,内源性 GPHs 的变体分布情况受其来源、年龄、性别、女性生理周期或病理因素影响而发生变化^[20]。宏观异质性方面,年轻女性含有更多不完全糖基化修饰形式,完全糖基化 FSH 和高度唾液酸化形式在绝经后女性中更占主导地位。采用人颗粒细胞系 KGN 进行细胞活性测定,结果表明,低糖基化形式比完全糖基化形式的激素有更高的体外生物学活性,同时半衰期也更短^[17,21-22]。这种内源性的糖基化修饰差异在 hCG 中也存在,并显示出与妊娠结局相关的不同生物活性和功能^[23]。人垂体和尿中提取的促性腺激素也检测到不完全糖基化修饰现象^[19]。微观异质性方面,hFSH 的各种糖型组成在整个女性生理周期中呈现出有规律的波动,具有特定生理作用,从而调节激素-受体结构相互作用和下游信号转导。在卵泡早期,以唾液酸含量较高的糖型占主导地位,中期(即排卵期)则转变

为酸性较低的糖型。一般来说,FSH 的生物学活性与唾液酸的含量密切相关,随着唾液酸含量降低,激素与受体的结合能力增强,体外生物学活性升高,但由于体内血浆中的半衰期缩短,体内生物学活性反而会下降。反之,随着唾液酸含量的增强,等电点下降,在体内的半衰期会有所延长,体内生物学活性也会增强。

2.1 糖基化修饰的宏观异质性

GPHs 的糖基化修饰宏观异质性是指在 β 亚基上潜在的糖基化位点存在未被糖基化的现象,这种复杂的寡糖侧链不均一性会影响激素的代谢清除率和生物活性。目前关于内源性 GPHs 的这种宏观异质性已被充分研究和证实,在人体内除了完全糖基化的 GPHs 外,还在血清样品中鉴定到 β 亚基缺失一个 N 糖的不完全糖基化形式^[21,24-25]。以 FSH 为例,完全和部分糖基化的 FSH β 亚基条带在 FSH β 特异性蛋白质印迹中表现出 24,21 和 18 kDa 的分子量。研究者通常使用 FSH β 分子量来指定相应的不同糖型的异二聚体:FSH24(完全糖基化形式)、FSH21(β 亚基 N24 聚糖缺失)和 FSH18(β 亚基 N7 聚糖缺失),见图 2。垂体提取物中还具有 β 亚基完全非糖基化的 15 kDa 变体^[16],但是研究人员认为 FSH15 可能与生理功能无关^[19]。



图 2 FSH 的糖基化修饰宏观异质性示例^[24]

越来越多的研究者在对 GPHs 进行全面表征和结构鉴定研究中,发现了 β 亚基存在这种不完全糖基化修饰的宏观异质性。国内研究报道,r-hCG 的原研药和生物类似药中均发现 β 亚基有 2 种变体,除了在 β 亚基的 N13 和 N30 位点均具有完全糖基化的变体外,还存在 N13 位点非糖基化的变体,还原毛细管凝胶电泳(CE-SDS)显示这种不完全糖基化变体的比例超过了 15%,结合文献报道和体内外活性试验判断 hCG 的动物体内活性随着不完全糖基化亚基的增加而明显下降^[26]。此外,在某一 FSH 候选药与参照药果纳芬[®]的药学相似性研究中发现二者的 β N7 位点均存在少量未发生 N-糖基化修饰

的组分,约占 3%~5%。当前,监管机构和工业界尚未完全了解这种 β 亚基 N 位点不完全糖基化导致的糖基化修饰宏观异质性,这种不完全糖基化修饰差异可以进一步影响唾液酸化水平, β 亚基的 N-糖基化占有率还会受生产工艺影响呈现出批次间的波动。考虑到 β 亚基的糖基化修饰参与了受体结合、体内清除以及发挥生物活性等关键环节,因此当不完全糖基化修饰比例较高时,可能会影响 GPHs 的疗效和半衰期^[26]。在这种情况下,研究者应将 β 亚基的 N-糖基化占有率作为产品开发的关键质量属性,进一步对不同变体分离、鉴定并进行深入表征研究和生物活性评估,确定结构与生物功能的相关性,

并结合临床疗效和代谢确定是否需要将其纳入质量标准进行常规监测。

2.2 糖基化修饰的微观异质性

GPHs 的微观异质性是指 α 和 β 亚基上 *N*-聚糖结构的多样性,这种复杂的多样性可能会影响其体内生物学功能和清除速率。GPHs 的 *N*-聚糖主要是复合型聚糖,一般具有 2,3 或 4 个糖基化分支(又称为天线)。 *N*-聚糖的复杂程度与核心甘露糖上 *N*-乙酰葡萄糖胺的分支数量、碳水化合物残基、是否具有岩藻糖基化修饰以及末端是否存在唾液酸化等因素相关。研究表明,分支末端的触角会影响 GPHs 与其受体的结合:体积大和延伸的聚糖可能导致受体反应延迟,而相对体积小而紧凑的聚糖具有更快速的受体结合能力^[16]。唾液酸分布在糖基化分支的

最末端,在 GPHs 的体内功能和代谢、稳定性和免疫原性中发挥关键作用^[27]。不同糖基化分支的末端唾液酸化程度存在差异,这种修饰程度按照修饰数量可以分为中性唾液酸化、单唾液酸化、二唾液酸化、三唾液酸化和四唾液酸化糖型,唾液酸的修饰程度影响了 GPHs 的酸度水平和等电点,进而影响其体内清除速率。唾液酸化增加可增强 GPHs 的代谢稳定性,通过降低肾小球滤过率和肝脏中唾液酸蛋白受体的清除率来延长其半衰期。人垂体、血清和尿源性 FSH 同时含有 $\alpha 2,3$ -连接形式和 $\alpha 2,6$ -连接形式,不同的唾液酸连接形式可能影响 FSH 的清除,进一步增加了微观层面的复杂性^[28]。图 3 展示了 GPHs 糖基化微观异质性与生物功能的关系^[17]。

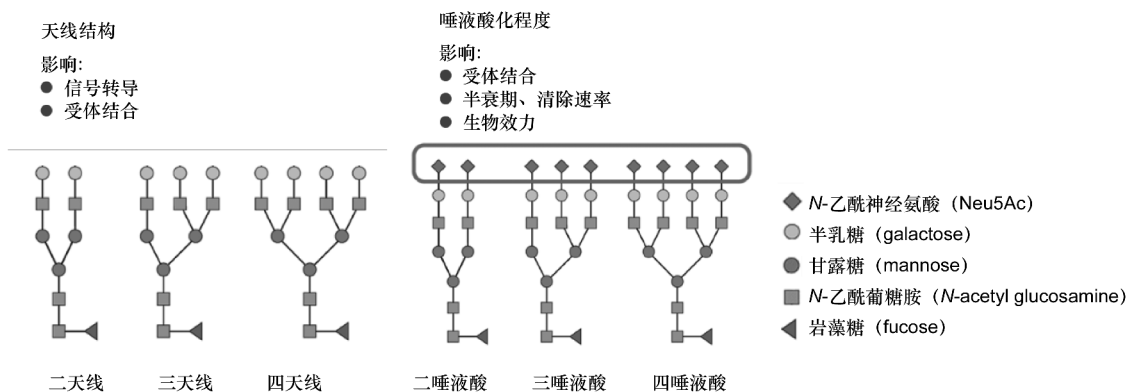


图 3 GPHs 糖基化微观异质性与生物功能^[17]

重组 GPHs 的糖基化修饰类型很大程度上取决于宿主细胞固有的糖基化能力,即宿主细胞内糖基转移酶的功能专属性和特异性。与尿源和垂体来源的 GPHs 相比,由于缺乏相关糖基转移酶,CHO 细胞表达的重组制品在结构中不存在 *N*-乙酰半乳糖胺及其硫酸化衍生物,并且仅含有 $\alpha 2,3$ -连接的唾液酸。辉凌制药有限公司采用胎儿视网膜膜来源的人类细胞系 (PER. C6[®]) 开发的 FSH δ 的糖基化模式与 CHO 细胞产物明显不同。相对于果纳芬[®] 和普丽康[®], FSH δ 显示出更复杂的聚糖修饰类型,它同时包含 $\alpha 2,3$ -连接和 $\alpha 2,6$ -连接的唾液酸,仅包含 *N*-乙酰神经氨酸 (NANA) 唾液酸结构,并且具有更多的四天线分支和更高的唾液酸化程度。因此,等剂量的 FSH δ 和果纳芬[®] 在动物模型和人体中表现出不同的药动学 (PK) 和药效学 (PD) 特性^[20,29],提示重组卵泡素糖基化修饰可能影响到体内作用,需要进

一步关注并加强糖基化修饰的质量研究与控制。

除了宿主细胞的固有糖基化能力外,GPHs 的糖基化修饰也会受到上游和纯化生产工艺条件的影响,如培养基、培养条件和层析介质等。因此,糖基化修饰水平是生产工艺一致性和稳定性的反映。果纳芬[®] 和普丽康[®] 均为 CHO 细胞表达经纯化获得的 r-hFSH,但由于表达载体和纯化工艺的不同,二者的糖基化、唾液酸组成和等电点均存在差异。研究人员比较了 2 种产品在接受 IVF 的女性卵巢刺激中的头对头临床研究和回顾性研究,结果显示 2 种制剂在有效性或安全性方面没有显著差异^[30-31]。欧洲 EMA 分别于 2013 和 2014 年批准了 2 个 FSH α 生物类似药:Ovaleap[®] (Teva Pharma B. V. 公司) 和 Bemfola[®] (Finox Biotec AG 公司),二者均与参照药果纳芬[®] 之间存在一些可以观察到糖基化差异。与果纳芬[®] 相比,Bemfola[®] 具有更高水平的天线分支、唾液

酸化程度,同时生物活性的批间变异性较大;Ovaleap[®]则在 *N*-羟乙酰基神经氨酸(NGNA)及总唾液酸含量上高于原研药^[20,32]。上述糖基化修饰方面的差异引发了研究者对潜在临床影响的讨论,一些文献报道了 Bemfola[®]和果纳芬[®]之间的临床差异,例如:观察到 Bemfola[®]的雌二醇反应略高,卵巢过度刺激综合征的发生率略有增加,着床率、每次胚胎移植的临床妊娠率和持续妊娠率较低^[20]。研究者们认为应在更广泛的受试者人群中进一步研究这些差异的临床相关性,特别是在非理想患者中,比如对 r-hFSH 反应不佳的老年女性或患有多囊卵巢综合征(PCOS)的年轻女性。这些研究和讨论说明糖基化修饰的异质性对 GPHs 药物的质量和临床应用的影响。糖基化修饰影响着 GPHs 在体内的受体结合、信号转导、发挥生物效力及体内清除速率,进而体现出临床安全性和有效性的相关性。

2.3 结构异质性的其他方面

除了宏观和微观层面的糖基化异质性外,GPHs 还具有不同程度的末端不均一性,这种末端异质性同时存在于内源性激素和重组激素中,进一步增加了结构鉴定和解析的难度。此外 hCG 的 β 亚基的羧基末端还含有 4 个具有丰富唾液酸的 O 糖修饰,这些 O-糖基化修饰的结构更加复杂并且分析鉴定难度较大。此外,GPHs 在一定的外部环境条件下(如有机溶剂、高温、光照、强酸碱等)容易发生解离、聚集和氧化,进而影响其生物学活性和安全性。下文将针对 GPHs 结构异质性的其他方面逐一讨论。

2.3.1 N 端异质性 GPHs 的 α 亚基和 β 亚基常常存在一定比例的 N 端和 C 端不均一性。GPHs 共有的 α 亚基的 N 端通常存在缺失 2 个氨基酸(-AP)的组分,比例从 2%~20% 不等; β 亚基 N 端也存在截短 2 个氨基酸残基的形式,r-hFSH 的 β 亚基 N 端缺失比例可高达 50%~60%。由此可见,N 端异质性广泛存在于内源性和重组 GPHs 中,未见可能对生物学活性和功能产生影响的相关报道。

2.3.2 C 端异质性 研究表明,GPHs 共有的 α 亚基的 C 端高度保守,对受体结合、激活 cAMP 下游信号通路和发挥生物学活性有着重要作用,因此 α 亚基的 C 端需要保持完整性^[33-35]。GPHs 的 β 亚基可能存在一定比例的 C 端缺失,C 端缺失具有更加多样化的截短形式,如 r-hLH 的 β 亚基 C 端存在缺失 1,2 和 4 个氨基酸的复杂组成。一般认为 β 亚基

的 C 端不参与受体的结合,因此 β 亚基 C 端截短不影响生物学活性^[36-37]。

2.3.3 O-糖基化修饰 CG β 亚基与其他 GPHs β 亚基的区别在于其 CTP 含有 4 条 O-连接寡糖链。O-糖侧链比 N-糖侧链更加多样复杂化,没有共同的核心结构,常见的 O-糖基化类型是 N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)通过 α -糖苷键连接到蛋白质的丝氨酸(Ser)或苏氨酸(Thr)上^[38]。由于缺乏有效的酶切手段以及固有的结构多样性,O 糖的系统性分析仍然面临较大的挑战^[39]。研究表明,O 糖在 GPHs 的受体结合和信号转导过程中作用较小,但是对体内半衰期和生物学活性至关重要^[18]。如前文所述,将带有 4 个 O-糖位点的 CTP 序列与蛋白连接可提高体内生物活性和半衰期,是设计长效制剂的一种有效策略^[40-41]。

2.3.4 解离亚基 GPHs 的 α 亚基和 β 亚基通过非共价键结合,在一定的外部环境条件下(有机溶剂、高温、光照、强酸碱等)容易发生解离^[42]。 α 亚基和 β 亚基解离将引起 GPHs 的生物学活性降低。单个亚基也可能产生非预期的生物功能,如 α 亚基可参与不同组织的催乳素产生;hCG 的 β 亚基在胎盘形成以及癌症发展和转移中起相关作用^[43]。因此,解离亚基含量是该类产品质量和稳定性的重要指标,需要在放行检测和稳定性研究中进行控制。

2.3.5 氧化亚基 GPHs 的 α 亚基和 β 亚基的氨基酸序列中的甲硫氨酸在细胞培养、纯化工艺过程中易于被氧化,而且纯化工艺无法完全去除。氧化是重组蛋白制品降解的重要途径之一,氧化组分可能影响产品的生物学活性和安全性。因此,氧化比例是产品质量和稳定性的重要指标,需要在放行检测和稳定性研究中进行控制^[37]。

2.3.6 聚体和片段 聚体和片段是重组蛋白的降解途径之一,聚体可能导致免疫原性升高,片段可能导致 GPHs 失活,因此分子大小异质性是生产过程控制及产品放行检测和稳定性评价的重要指标之一。

2.4 特性鉴定和分析技术

由于 GPHs 结构存在末端不均一性、复杂糖基化修饰和电荷异质性等特性,GPHs 的结构确证、表征研究和质量控制一直以来具有较大困难。用先进的分析技术手段建立科学的质量控制体系是 GPHs 药学研发的关键内容。全面完整的结构鉴定和特性分析通常包含一级结构(完整分子量、还原分子量、

脱糖分子量、氨基酸覆盖率、N/C 端异质性分析)、高级结构(二级结构、三级结构、二硫键、自由疏基)、糖基化修饰(*N*-糖基化位点、*N* 糖结构分析、单糖组成分析、唾液酸含量和 *Z* 值)、翻译后修饰(氧

化、脱酰胺、环化、异构化)、杂质(聚体和降解片段、氧化产物、解离亚基)等。表 1 提供了重组 GPHs 药物的结构确证和特性鉴定基本内容及常用的分析方法示例。

表 1 重组 GPHs 药物的特性鉴定和常用分析方法示例

产物特性	分析工具
一级结构和翻译后修饰 (PTM)	
异二聚体和/或 α 和 β 亚基、N/C 端异质性、其他可能的修饰变体的分子量确认	LC-MS 分析
一级结构确认和覆盖率、PTM(氧化、脱酰胺等)变体、N/C 末端异质体	LC-MS/MS 肽谱分析
N 末端异质体,剪接形式,截短的变异体	Edman 降解法
高级结构	
二级和三级结构评价	圆二色谱(远紫外、近紫外)、差示扫描量热(DSC)
三级结构	荧光光谱
二硫键的鉴定	通过 LC-MS/MS 分析非还原型肽谱
糖基化分析	
唾液酸含量的测定	DMB 标记唾液酸的 RP-HPLC
<i>N</i> -糖基化位点占有率	LC-MS/MS 肽谱分析
根据 <i>N</i> -糖基化位点的糖肽分布	LC-MS 糖肽谱分析
<i>O</i> -糖基化位点、 <i>O</i> 糖修饰鉴定和相对含量	LC-MS/MS, LC-MS, UPLC-MS/MS, UPLC-MS
产物变体	
单体纯度与高分子量蛋白(HMW)	AUC, SEC-HPLC, SDS-PAGE
解离亚基	非还原 CE-SDS, SDS-PAGE
氧化亚基	RP-HPLC

GPHs 的糖基化修饰研究通常包括糖基化位点确定、聚糖分析、侧链单糖组成分析、唾液酸化分析等。研究者可以采用多种分析技术从不同层面分析蛋白质的糖基化修饰,包括完整的糖蛋白分子、蛋白水解产生的糖肽以及化学或酶法释放的游离糖。

对于 *N*-糖基化修饰类型的分析,常用的分析方法是使用色谱方法对酶促释放和标记的游离聚糖进行聚糖谱分析,确定不同修饰类型占比。然而,这种酶促释放会使不同位点的 *N* 糖全部释放并混合在一起,无法区分特定位点的修饰类型和水平。如前文所述, α 亚基和 β 亚基不同糖基化位点的糖基化修饰类型存在差异并发挥着不同的功能,如受体结合、信号转导、延长半衰期等。因此,研究者应尽可能采用先进的技术手段定量检测 α 亚基和 β 亚基的不同位点的唾液酸化、岩藻糖基化修饰、触角分布等修饰程度,从而更好地描绘和反映不同糖基化位点的相对分布,更加全面地进行工艺和质量一致性评估及生物类似药相似性评价。

O 糖基化修饰鉴定也包括糖基化类型、糖基化

位点、糖链结构以及定量分析。相对于丰度较高且仅有一个核心结构的 *N*-糖蛋白,*O*-糖蛋白具有丰度较低、核心结构多且复杂等特点,缺乏可以将 *O*-糖链整体从多肽链上切割下来的内切酶,因此 *O*-糖蛋白的质谱分析更为困难和具有挑战性。目前,完整 *O*-糖肽分子水平和单糖组成层次上的基于串级质谱的 *O*-糖蛋白质组学是 *O*-糖基化分析的主要方法。考虑到 *O*-糖蛋白丰度非常低且有更高丰度 *N*-糖蛋白的存在,*O*-糖基化的分析一般需要先使用酶(如 PNGase F)去除 *N* 糖。

3 生物效力与临床疗效

GPHs 的生物效力通过“比活性”衡量,以“ $U \cdot mg^{-1}$ ”或“ $IU \cdot mg^{-1}$ ”表示,用来衡量产品实现预期生物学效应的特定能力。不同于其他治疗性重组蛋白制品,目前促性腺激素的生物学活性检测仍以体内动物试验法为国际通用标准方法。例如 Steelman-Pohley 生物测定法是测定 r-hFSH 生物效力的标准方法^[44],通过测量未成熟雌性大鼠卵巢重量的增加来评估生物效力。体内动物法存在耗时较长、

操作繁琐、精密度与准确度较差等问题。为减少实验动物的使用数量,降低动物间固有的变异性对研究的影响,研究人员逐渐采用体外生物测定法替代体内动物法来评价 GPHs 的生物学活性^[45-47]。GPHs 与其受体结合后通常会激活腺苷酸环化酶,使 cAMP 水平升高,通过测量 cAMP 响应信号可以反映体外生物活性。有研究者采用体外和体内生物活性分析方法同步测定了不同样品(包括强制降解产物),结果表明 2 种方法均能够有效识别 r-hFSH 变体之间关键质量属性水平的差异(如唾液酸化、氧化、游离亚基水平的差异),从而初步说明体外报告基因法同样用于产品放行检测和质量控制的可行性^[45]。

事实上,受 GPHs 的宏观和微观异质性影响,动物法和体外报告基因法均不能保证与临床疗效的直接相关性。首先,动物模型和人体的肝脏代谢及肾清除率存在差异^[48]。Olsson 等^[29]报道大鼠体内测得的 r-hFSH 的生物效力更高并不一定意味着临床效果更好。其次,体外细胞法也仅是对上游信号通路激活的一种指示,然而 hFSH 的人体实际疗效由多种复杂因素相互作用产生,并受 hFSH 血浆半衰期和受体相互作用的影响。如前文所述,随着唾液酸含量降低,FSH 与受体的结合能力增强,体外生物学活性升高,但体内半衰期下降,体内生物学活性反而会降低。

因此,研究者在选择合适的活性检测方法时,应充分探索体内和体外的相关性,选择多种方法进行正交、互补的分析,更有利于反映真实效力情况。当采用体外法代替体内法用于生物学活性分析时,需要谨慎评估风险并用大量的研究数据作为支撑,应说明用体外活性方法替代动物法的科学性和合理性,充分证明 2 种方法的相关性及体外活性测定方法的可行性。同时,研究者应将生物效力与纯度、糖基化修饰、唾液酸含量、Z 值、电荷异构体等关键质量属性结合起来,建立全面的质量控制策略,综合反映和评价产品质量概况。临床试验数据和不良反应监测结果及同类产品知识和文献报道也可以作为质量属性分析评估的有力支持。

4 生物类似药研发的药学考虑

目前 CHO 细胞表达的 r-hFSH, r-hCG 和 r-hLH 均已上市并广泛应用于临床。还有多个 GPHs 药物及长效制剂正处于临床研发的不同阶段。一方面, GPHs 在患者中具有明确的药理作用机制,即代替

内源性的激素发挥生物作用。另一方面,随着先进分析技术的发展,研究者可以全面、准确、灵敏地进行结构鉴定和特性研究。综合以上 2 点, GPHs 按照生物类似药开发具有充分的科学基础和技术支持。质量属性的相似性评价和药学对比研究是生物类似药研发的基础和前提^[49-50]。药学比对研究应当以证明候选药与参照药的质量相似性为目的,进行科学合理的研究设计。由于 GPHs 结构的高度复杂性和异质性,研究者应采用正交、灵敏的分析手段选择代表性批次开展候选药和参照药“头对头”的质量相似性评估,充分证明候选药和参照药在一级和高级结构(包括三级构象、二硫键、糖基化模式和其他翻译后修饰)、理化性质、纯度和杂质水平、体外和体内生物活性、稳定性和降解趋势等方面的相似性研究。

对于药学比对检测到的差异,研究者可进一步结合临床表现判断是否影响二者的相似性,在非临床和临床研究中关注质量差异是否对产品安全性、有效性、免疫原性和 PK 产生影响。在以下案例中,某公司的候选药含 NGNA 的 N 糖含量略高于原研药,经过全面分析,候选药和原研药中含 NGNA 的 N 糖均属较低水平(不超过 5%),并且 NGNA 含量检测结果与文献报道的 Ovaleap[®]的 NGNA 含量相似。在候选药与参照药的临床疗效和安全性对比研究中,候选药组与参照药组的卵母细胞数最小二乘均值差值的 95% 置信区间在等效界值范围内,满足方案规定的等效要求,证明二者疗效相似;虽然有报道 NGNA 可能与蛋白的免疫反应有关,但候选药与原研药两组内均未检测出抗药抗体,未发现非预期的严重不良反应。综合以上内容,研究者认为候选药与参照药在 NGNA 及总唾液酸含量上的差异不会对候选药在 PK、安全性、免疫原性、有效性方面与原研药的相似性产生影响。

5 总结

重组 GPHs 药物的“宏观”和“微观”糖基化异质性以及其他的不稳定因素共同造成了该类产品结构和组成的高度异质性,这种结构方面的不均一性通常与生物学活性和疗效密切相关,也可以用来解释不同重组治疗产品在临床疗效、安全性和 PK 方面的差异。用先进的分析技术手段建立科学的质量控制体系是 GPHs 药学研发的关键内容。研究者应尽可能定量检测 α 亚基和 β 亚基的不同位点的糖基化修饰程度,全面描绘和反映不同糖基化位点的

相对分布,从而更好地进行工艺和质量一致性评估及生物类似药相似性评价。在进行生物学活性研究时,应充分探索体内和体外活性分析方法的相关性,选择多种方法进行正交、互补的分析^[51]。同时,研究者应将生物效力与纯度、糖基化修饰、唾液酸含量、Z 值、电荷异构体等关键质量属性结合起来,建立全面的质量控制策略,综合反映和评价产品质量概况。

[参 考 文 献]

- [1] CAHOREAU C, KLETT D, COMBARNOUS Y. Structure-function relationships of glycoprotein hormones and their subunits' ancestors[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2015, 6: 26.
- [2] PRACTICE COMMITTEE OF AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE B. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives[J]. *Fertil Steril*, 2008, 90 (Suppl 5): S13 - S20.
- [3] COSS D. Regulation of reproduction via tight control of gonadotropin hormone levels[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2018, 463: 116 - 130.
- [4] 张迎春, 石玉华, 陈子江. 常用促排卵药物及作用机制[J]. *山东医药*, 2009, 49(15): 110.
- [5] BOUSFIELD GR, BUTNEV VY, RUEDA-SANTOS MA, et al. Macro- and micro-heterogeneity in pituitary and urinary follicle-stimulating hormone glycosylation[J]. *J Glycomics Lipidomics*, 2014, 4: 1000125.
- [6] EMA. Elonva[EB/OL]. (2022 - 07 - 05). <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/elonva>.
- [7] LOUTRADIS D, VLISMAS A, DRAKAKIS P. Corifollitropin alfa: a novel long-acting recombinant follicle-stimulating hormone agonist for controlled ovarian stimulation[J]. *Womens Health (Lond)*, 2010, 6(5): 655 - 664.
- [8] FAUSER BCJM, MANNAERTS BMJL, DEVROEY P, et al. Advances in recombinant DNA technology: corifollitropin Alfa, a hybrid molecule with sustained follicle-stimulating activity and reduced injection frequency[J]. *Hum Reprod Update*, 2009, 15 (3): 309 - 321.
- [9] BLUMENFELD Z. Corifollitropin- α is useful for low and normal responders, but what about hyperresponders? [J]. *Fertil Steril*, 2019, 111(4): 675 - 676.
- [10] BISHOP LA, ROBERTSON DM, CAHIR N, et al. Specific roles for the asparagine-linked carbohydrate residues of recombinant human follicle stimulating hormone in receptor binding and signal transduction[J]. *Mol Endocrinol*, 1994, 8(6): 722 - 731.
- [11] FLACK MR, FROELICH J, BENNET AP, et al. Site-directed mutagenesis defines the individual roles of the glycosylation sites on follicle-stimulating hormone[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269 (19): 14015 - 14020.
- [12] THOTAKURA NR, BLITHE DL. Glycoprotein hormones: glycobiochemistry of gonadotrophins, thyrotrophin and free α subunit[J]. *Glycobiology*, 1995, 5(1): 3 - 10.
- [13] ULLOA-AGUIRRE A, MALDONADO A, DAMIÁN-MATSUMURA P, et al. Endocrine regulation of gonadotropin glycosylation[J]. *Arch Med Res*, 2001, 32(6): 520 - 532.
- [14] SAIRAM MR, LINGGEN J, SAIRAM J, et al. Influence of carbohydrates on the antigenic structure of gonadotropins: distinction of agonists and antagonists[J]. *Biochem Cell Biol*, 1990, 68 (5): 889 - 893.
- [15] DAVIS JS, KUMAR TR, MAY JV, et al. Naturally occurring follicle-stimulating hormone glycosylation variants[J]. *J Glycomics Lipidomics*, 2014, 4(1): e117.
- [16] BOUSFIELD GR, HARVEY DJ. Follicle-stimulating hormone glycobiochemistry[J]. *Endocrinology*, 2019, 160(6): 1515 - 1535.
- [17] LISPI M, HUMAIDAN P, BOUSFIELD GR, et al. Follicle-stimulating hormone biological products: does potency predict clinical efficacy? [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 9020.
- [18] FARES F. The role of O-linked and N-linked oligosaccharides on the structure-function of glycoprotein hormones: development of agonists and antagonists[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2006, 1760 (4): 560 - 567.
- [19] BOUSFIELD GR, MAY JV, DAVIS JS, et al. In vivo and in vitro impact of carbohydrate variation on human follicle-stimulating hormone function[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018, 9: 216.
- [20] BERGANDI L, CANOSA S, CAROSSO AR, et al. Human recombinant FSH and its biosimilars: clinical efficacy, safety, and cost-effectiveness in controlled ovarian stimulation for in vitro fertilization[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2020, 13(7): 136.
- [21] WIDE L, ERIKSSON K. Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation[J]. *Ups J Med Sci*, 2018, 123(2): 100 - 108.
- [22] JIANG C, HOU XY, WANG C, et al. Hypoglycosylated hFSH has greater bioactivity than fully glycosylated recombinant hFSH in human granulosa cells[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(6): E852 - E860.
- [23] FOURNIER T, GUIBOURDENCHE J, EVAÏN-BRION D. Review: hCGs: different sources of production, different glycoforms and functions[J]. *Placenta*, 2015, 36(Suppl 1): S60 - S65.
- [24] WIDE L, ERIKSSON K. Molecular size and charge as dimensions to identify and characterize circulating glycoforms of human FSH, LH and TSH[J]. *Ups J Med Sci*, 2017, 122(4): 217 - 223.
- [25] WIDE L, ERIKSSON K. Low-glycosylated forms of both FSH and LH play major roles in the natural ovarian stimulation[J]. *Ups J Med Sci*, 2018, 123(2): 100 - 108.
- [26] DENG QP, HE LX, XU FY, et al. Characterization of beta subunit variants of recombinant human chorionic gonadotrophin[J]. *Anal Biochem*, 2023, 668: 115089.
- [27] BORK K, HORSTKORTE R, WEIDEMANN W. Increasing the sialylation of therapeutic glycoproteins: the potential of the sialic acid biosynthetic pathway[J]. *J Pharm Sci*, 2009, 98(10): 3499 - 3508.
- [28] STEIRER LM, PARK EI, TOWNSEND RR, et al. The asialoglycoprotein receptor regulates levels of plasma glycoproteins terminating with sialic acid α 2, 6-galactose[J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(6): 3777 - 3783.
- [29] OLSSON H, SANDSTRÖM R, GRUNDEMAR L. Different pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of recombinant follicle-stimulating hormone (rFSH) derived from a human cell line compared with rFSH from a non-human cell line[J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54(11): 1299 - 1307.
- [30] HARLIN J, CSEMICZKY G, WRAMSBY H, et al. Recombinant follicle stimulating hormone in in-vitro fertilization treatment-clinical experience with follitropin alpha and follitropin beta[J]. *Hum Reprod*, 2000, 15(2): 239 - 244.
- [31] BRINSDEN P, AKABOSU F, GIBBONS LM, et al. A comparison of the efficacy and tolerability of two recombinant human follicle-stimulating hormone preparations in patients undergoing in vitro fertilization-embryo transfer[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73(1): 114 - 116.
- [32] DE MORA F, FAUSER BCJM. Biosimilars to recombinant human FSH medicines: comparable efficacy and safety to the original biologic[J]. *Reprod Biomed Online*, 2017, 35(1): 81 - 86.
- [33] GROSSMANN M, SZKUDLINSKI MW, ZENG H, et al. Role of the carboxy-terminal residues of the alpha-subunit in the expression and bioactivity of human thyroid-stimulating hormone[J].

- Mol Endocrinol*, 1995, 9(8): 948 - 958.
- [34] ZENG H, JI I, JI TH. Lys91 and His90 of the alpha-subunit are crucial for receptor binding and hormone action of follicle-stimulating hormone (FSH) and play hormone-specific roles in FSH and human chorionic gonadotropin [J]. *Endocrinology*, 1995, 136(7): 2948 - 2953.
- [35] RYU KS, JI I, CHANG L, *et al.* Molecular mechanism of LH/CG receptor activation [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 1996, 125(1 - 2): 93 - 100.
- [36] KLEINAU G, KRAUSE G. Thyrotropin and homologous glycoprotein hormone receptors; structural and functional aspects of extracellular signaling mechanisms [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30(2): 133 - 151.
- [37] SENDAK RA, GANESA C, LEE KL, *et al.* The effect of posttranslational modifications on the *in vitro* activity of recombinant human thyroid-stimulating hormone [J]. *Thyroid*, 2003, 13(12): 1091 - 1101.
- [38] PETER-KATALINIĆ J. Methods in enzymology: O-glycosylation of proteins [J]. *Methods Enzymol*, 2005, 405: 139 - 171.
- [39] YANG S, ONIGMAN P, WU WW, *et al.* Deciphering protein O-glycosylation; solid-phase chemoenzymatic cleavage and enrichment [J]. *Anal Chem*, 2018, 90(13): 8261 - 8269.
- [40] BOIME I, BEN-MENAHEN D. Glycoprotein hormone structure-function and analog design [J]. *Recent Prog Horm Res*, 1999, 54: 271 - 288.
- [41] FURUHASHI M, SHIKONE T, FARES FA, *et al.* Fusing the carboxy-terminal peptide of the chorionic gonadotropin (CG) beta-subunit to the common alpha-subunit; retention of O-linked glycosylation and enhanced *in vivo* bioactivity of chimeric human CG [J]. *Mol Endocrinol*, 1995, 9(1): 54 - 63.
- [42] 邓钦培, 安然, 徐通泽, 等. 毛细管电泳用于测定人绒毛膜性素的解离亚基及其质量控制 [J]. *药学学报*, 2017, 52(3): 430 - 435.
- [43] QUERAT B. Unconventional actions of glycoprotein hormone subunits; a comprehensive review [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 731966.
- [44] STEELMAN SL, POHLEY FM. Assay of the follicle stimulating hormone based on the augmentation with human chorionic gonadotropin [J]. *Endocrinology*, 1953, 53(6): 604 - 616.
- [45] NEVELLI F, PALMESE A, GLEIXNER R, *et al.* Biological assay to determine gonadotropin potency: from *in vivo* to *in vitro* sustainable method [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8040.
- [46] 王绿音, 吕萍, 张慧, 等. 重组人促卵泡激素体外生物学活性测定方法的联合验证 [J]. *药学学报*, 2023, 58(3): 760 - 766.
- [47] 孙爽, 王绿音, 李晶, 等. 基于报告基因的重组人促卵泡激素 Fc 融合蛋白生物学活性测定方法研究 [J]. *药物分析杂志*, 2022, 42(1): 60 - 67.
- [48] POULIN P. A single-species approach considering additional physiological information for prediction of hepatic clearance of glycoprotein derivate therapeutics [J]. *Clin Pharmacokinet*, 2011, 50(10): 665 - 674.
- [49] CDE. 生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则 [S]. 2021.
- [50] 李思鹏, 张仲理, 许圣昌, 等. 单抗生物类似药与原研药质量相似性研究解析 [J]. *中国新药杂志*, 2022, 31(6): 523 - 531.
- [51] 张孝明, 黄盈, 梁誉龄, 等. 基于 Nb2-11 细胞增殖的重组人生长激素生物学活性测定方法考察 [J]. *中国医药工业杂志*, 2022, 53(12): 1726 - 1734.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-12-04