

# 重组糖蛋白激素类产品药学研究与评价技术 指导原则（征求意见稿）

国家药品监督管理局药品审评中心

2024年9月

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

## 一、前言

糖蛋白激素（glycoprotein hormones, GPHs）是人体内一类重要的激素蛋白，包括促卵泡激素（follicle-stimulating hormone, FSH）、促黄体素（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）。糖蛋白激素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，对人体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。

糖蛋白激素产品结构基本相似，都是由一条保守的  $\alpha$  链和一条激素特异性的  $\beta$  链通过非共价作用形成的异二聚体。该类产品的糖基化修饰复杂，比活性高且唾液酸及糖型与生物学活性和代谢密切相关。为进一步指导和规范重组糖蛋白激素类药物的研发和申报，制定本指导原则。总体上，该产品应在符合《中华人民共和国药品管理法》、《中华人民共和国药品注册管理办法》、《中华人民共和国药典》等相关法律法规的前提下，参照本指导原则开展研究，必要时可综合借鉴、参考国内外其他相关指导原则。随着科学技术的发展和监管知识经验的积累，相关内容将不断完善与更新。

## 二、适用范围

23 本指导原则适用于采用重组技术表达和制备的糖蛋白  
24 激素类产品，包括重组人促卵泡激素(rhFSH)、重组人促黄体  
25 素 (rhLH)、重组人促甲状腺激素(rhTSH)、重组人绒毛膜促  
26 性腺激素(rhHCG)以及长效重组人促卵泡激素 CTP 融合蛋白  
27 (rhFSH-CTP)。复方制剂、经其他修饰或改构设计的糖蛋白  
28 激素类产品以及天然原材料提取的糖蛋白激素类药物可酌  
29 情参考本指导原则。

### 30 三、一般原则

31 重组糖蛋白激素类产品的生产工艺和质量应基于全面  
32 的质量风险评估，确定目标产品质量概况和关键质量属性，  
33 根据“质量来源于设计”的理念充分开展工艺表征研究，制定  
34 合理的生产工艺和质量控制策略，建立全过程质量控制和全  
35 生命周期管理体系，确保产品安全有效、质量可控。

36 本指导原则适用的糖蛋白激素类产品，如按照生物类似  
37 药开发，药学研究还应符合《生物类似药研发与评价技术指  
38 导原则（试行）》和《生物类似药相似性评价和适应症外推技  
39 术指导原则》等指导原则的相关要求。如采用不同表达体系  
40 导致表达产物的质量、药代动力学和生物学活性与原研药存  
41 在显著差异，则不宜再按照生物类似药开发。对于境外已上  
42 市境内未上市的重组糖蛋白激素类产品（如 rhTSH、rhFSH-  
43 CTP），如按照治疗用生物制品 3 类申报，建议参照生物类似  
44 药的相关技术要求开展药学相似性研究和评价。

#### 45 四、生产用原材料

##### 46 (一) 上游构建和细胞库的建立

47 重组糖蛋白激素类产品的上游构建和细胞库应符合《中  
48 国药典》的相关要求。

49 糖蛋白激素类药物具有复杂的糖基化修饰和高水平的  
50 唾液酸含量，其糖基化修饰类型很大程度上取决于宿主细胞  
51 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  
52 和特异性），同时受细胞培养和发酵条件的影响。因此，上游  
53 构建过程中应重点关注可能影响糖基化修饰的方面，如宿主  
54 细胞的选择、生产用细胞株的筛选等。

##### 55 1. 宿主细胞

56 重组糖蛋白激素类产品通常采用哺乳动物表达系统进行  
57 表达，从而实现目的蛋白正确折叠及准确的翻译后修饰，  
58 获得与天然结构和功能接近的目的蛋白。目前商业化生产所  
59 应用的宿主细胞有中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和人源细胞系。  
60 在糖蛋白激素类药物开发过程中需要关注种属来源不同导  
61 致的糖基化修饰类型及水平的差异及不同的药代动力学和  
62 药效学特性。例如，CHO 细胞表达产物在结构中不存在 N-  
63 乙酰半乳糖胺及其硫酸化衍生物，仅含有  $\alpha 2, 3$ -连接的唾液  
64 酸，具有低水平的 N-羟乙酰神经氨酸(NGNA)。人源细胞  
65 表达产物含有  $\alpha 2, 3$ -连接和  $\alpha 2, 6$ -连接的唾液酸，仅包含  
66 N-乙酰神经氨酸(NANA)唾液酸结构，并且具有更高水平

67 的四天线分支和唾液酸化程度。

68 用于构建生产用细胞株的宿主细胞，应具有清晰的细胞  
69 来源证明及传代操作驯化历史。如对宿主细胞进行了基因改  
70 造（如糖基化路径改造），应说明细胞引入、改造或敲除基因  
71 的理由和依据，评估改造过程对细胞正常生理功能、代谢过  
72 程和表达产物的影响，关注改造过程使用的动物源性材料可  
73 能引入的安全性风险。

## 74 2. 目的基因和表达载体

75 重组糖蛋白激素类产品的目的基因序列通常与天然来  
76 源糖蛋白激素序列一致。长效重组人促卵泡激素 CTP 融合蛋  
77 白（rhFSH-CTP）在天然氨基酸序列上进行了改构，通过在  
78 FSH 的  $\beta$  亚基 C 末端融合一段富含 O 糖的 hCG  $\beta$  亚基羧基  
79 末端肽 CTP 蛋白片段来延长半衰期。

80 申请人应明确目的基因序列的来源，提供目的基因序列  
81 和氨基酸序列，说明是否与天然来源序列一致。如发生在天  
82 然序列基础上进行的氨基酸位点突变、增加或改造的序列及  
83 结构域等，应说明改造的目的和依据。应提供表达载体的构  
84 建过程、主要控制元件及其功能信息，对表达载体插入基因  
85 进行酶切鉴定和测序确认。

## 86 3. 工程细胞株的构建筛选

87 在细胞株的筛选过程中，需要重点关注不同单克隆细胞  
88 株之间表达产物糖型分布比例的差异。在开展相应充分研究

89 基础上，应在申报资料中详细说明工程细胞株的构建过程，  
90 并提供扩增细胞克隆来源于单个细胞的证据。

91 在宿主细胞选择、重组工程细胞构建、生产细胞培养、  
92 扩增、监测等过程中，除了关注细胞的适用性和目标产品的  
93 表达和生产能力，还应注意内源性病毒、宿主细胞残留蛋白  
94 和 DNA 以及细胞培养产生的致瘤成分等潜在风险因素对重  
95 组产品安全性的影响。

#### 96 4. 细胞库的建立及检定

97 为保证生产的可持续性和产品质量的稳定性，细胞库应  
98 在符合《药品生产质量管理规范》的条件下制备，检定合格  
99 后用于生产。细胞库的检定应符合《中国药典》的相关要求。  
100 细胞库的病毒安全性检测应以细胞系来源为基础进行广泛  
101 的检测，包括内外源病毒、种属特异性病毒和细胞库建立过  
102 程中可能从原材料中引入的病毒。

103 传代稳定性研究应模拟商业化实际生产条件开展，确保  
104 细胞持续稳定生产目标产品的能力，并根据研究结果合理拟  
105 定细胞库的体外限传代次。

#### 106 （二）其他生产用原材料

107 糖蛋白激素类产品的生产用原材料应符合《中国药典》  
108 的相关要求。应在充分的研究基础上，分析生产用原材料使  
109 用的必要性、合理性和安全性，并在申报资料中提供原材料  
110 的来源、主要成分、使用阶段、质量标准等信息，根据原材

111 料对产品质量的影响进行分级管理，建立合理的控制策略，  
112 加强对供应商的管理和审计。生产过程中应避免使用牛血清、  
113 猪胰蛋白酶等动物来源或人源的原材料及  $\beta$ -内酰胺类抗生  
114 素。

## 115 五、生产工艺

### 116 (一) 原液

#### 117 1. 工艺开发

118 重组糖蛋白激素类产品的工艺开发应以生产具有所需  
119 质量属性的糖蛋白激素为目标，遵循“质量源于设计”的理念，  
120 深入探索工艺参数与质量属性的关系，确定关键工艺参数和  
121 过程中控制，建立基于风险和科学的整体控制策略。

122 上游发酵工艺的培养基、培养条件和下游纯化工艺的层  
123 析介质选择等均会对糖蛋白激素的糖基化修饰类型和比例  
124 有较大影响，因此在工艺开发过程中应予以重点关注。此外，  
125 还需关注工艺条件对解离亚基、氧化亚基、聚体和片段等产  
126 品相关杂质水平的影响。

127 对于生产过程中潜在的工艺相关杂质，包括亲和配基残  
128 留、宿主蛋白残留、宿主 DNA 残留、工艺添加物等，应充分  
129 评估纯化工艺对相关杂质的去除能力，开展杂质安全性评估  
130 并根据评估结果在工艺过程或放行检测中予以控制。

131 由于糖蛋白激素类产品对低 pH 的敏感性，病毒灭活去  
132 除验证研究应充分考虑灭活 pH 的选择对产品结构稳定性的

133 影响。若低 pH 病毒灭活工艺无法满足病毒灭活/去除要求，  
134 可采用其他适当的类似机理的方式进行。

## 135 2. 工艺验证

136 原液的生产工艺应经过充分验证以证明具有可控性和  
137 稳健性。原液的工艺验证还应包括产品相关杂质和工艺相关  
138 杂质的去除、中间产品暂存时间验证、培养基/缓冲液制备和  
139 放置条件验证、层析介质和超滤膜包的使用寿命验证等内容。

140 对于生产过程中使用的耗材和容器，应结合耗材的材质、  
141 使用阶段、相容性研究等因素综合评估安全性风险。如采用  
142 自产羊驼亲和层析填料，应充分评估使用风险并制定合理的  
143 控制策略，重点关注自产填料的质量一致性、病毒安全性控  
144 制和亲和配基残留的安全性评价。

## 145 (二) 制剂

### 146 1. 制剂处方

147 重组糖蛋白激素类产品在一定的外部环境条件下（如高  
148 温、光照、氧化等），容易发生亚基解离、聚集和氧化，进而  
149 影响其生物学活性和安全性。制剂处方通常包含表面活性剂、  
150 蛋白稳定剂、抗氧化剂、缓冲剂和 pH 调节剂等。申请人应  
151 根据处方筛选、稳定性研究和方便临床使用等因素综合考虑  
152 开发为液体剂型或冻干剂型。虽然糖蛋白激素类产品的结构  
153 相似，但确保每种产品稳定性的最佳稳定剂和缓冲系统可能  
154 不同，因此需要针对特定目标产品进行筛选和验证。



155 辅料的使用应符合现行版《中国药典》的相关规定。对  
156 于多剂量产品中抑菌剂种类和含量的确定，应参照现行版  
157 《中国药典》规范开展研究，结合稳定性研究结果、使用时  
158 可能发生的污染和开启后推荐的最长使用时间来进行综合  
159 评估，在保证抑菌效力的前提下，降低抑菌剂使用量。

## 160 2. 生产工艺

161 制剂生产工艺一般包括原液解冻、配制、无菌过滤、灌  
162 装、加塞、冻干（如有）、压塞、轧盖、贴签包装等步骤。如  
163 生产过程需过量投料，应说明过量投料的依据，结合生产工  
164 艺的机械损失和吸附损失等开展过量投料的相关验证。

165 制剂的生产工艺应经过充分验证以证明具有可控性和  
166 稳健性，还应进行无菌灌装工艺验证、冻干工艺验证、运输  
167 验证、生产接触组件相容性验证。对于在生产线上组装成注  
168 射笔的产品，应进行注射笔组装工艺验证。

## 169 六、质量研究与质量标准

170 相比于一般的重组 DNA 技术药物，重组糖蛋白激素类  
171 药物的结构和糖基化修饰更加复杂。同一种属的糖蛋白激素  
172 具有相同的  $\alpha$  亚基和不同的  $\beta$  亚基。 $\alpha$  亚基均有相同的 92 个  
173 氨基酸序列和二硫键连接方式并包含两个 N 糖基化位点，分  
174 别在 N52 和 N78 上。 $\alpha$  亚基 N52 位点的糖基化修饰对糖蛋  
175 白激素的信号转导起关键作用。 $\beta$  亚基具有不同的氨基酸序  
176 列和 N 糖基化位点，决定了不同糖蛋白激素受体结合和生物

177 学活性的特异性。糖基化修饰对该类药物的体内信号传导、  
178 代谢清除和发挥生物学活性起关键作用。rhCG 和 rhFSH-  
179 CTP 中含有 4 个具有丰富唾液酸的 O 糖修饰,可增加唾液酸  
180 水平和蛋白质的负电荷,降低肾小球过滤并减少受体介导的  
181 内吞作用,从而起到提高体内生物活性和延缓半衰期的作用。

182 申请人应充分评估重组糖蛋白激素产品的质量属性对  
183 临床安全性和有效性的潜在影响,确定关键质量属性,建立  
184 起全面的基于风险的质量控制策略,将理化分析方法与生物  
185 学活性分析方法充分结合起来,保证全生命周期质量可控。

## 186 (一) 特性鉴定和质量研究

### 187 1. 结构确证和理化性质

188 应采用先进的分析技术手段进行全面的结构鉴定和特  
189 性分析,通常包含一级结构、高级结构、二硫键、糖基化修  
190 饰(N糖基化位点、糖基化位点占有率、N糖结构分析、单  
191 糖组成分析、唾液酸含量和 Z 值)、其他翻译后修饰(氧化、  
192 脱酰胺、环化、异构化)等。理化性质研究一般包括鉴别、  
193 纯度和产品相关杂质(聚体和片段、氧化产物、解离亚基)、  
194 等电点、蛋白质含量等内容。如存在 O 糖修饰,还应开展 O  
195 糖修饰的相关研究。

#### 196 1.1 一级结构和高级结构

197 一级结构的研究通常包括完整分子量、脱糖分子量、氨  
198 基酸覆盖率、肽指纹图谱、N 端/C 端序列和异质性分析、翻

199 译后修饰。糖蛋白激素类药物的  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基存在一定比  
200 例的 N 端和 C 端不均一性，应分别对  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基的 N  
201 端/C 端缺失比例进行研究，充分评估 N 端/C 端异质性对发  
202 挥生物学活性的影响。翻译后修饰包括氧化、脱酰胺、天冬  
203 氨酸异构化、琥珀酰亚胺化、糖化等，翻译后修饰位点和比  
204 例应具有批间一致性。

205 高级结构的研究通常包括二级结构和三级结构。可用于  
206 高级结构研究的分析方法包括圆二色谱、差示扫描量热分析、  
207 荧光光谱等。

208 由于半胱氨酸在序列中分布较近及高糖基化水平结合  
209 的复杂性，常用的二硫键分析技术对该类药物可能不完全适  
210 用。在这种情况下，应采用其他方法，如新的分析技术、缺  
211 乏游离巯基的证明或通过生物活性证明其正确的折叠结构。

## 212 1.2 纯度和产品相关杂质

213 糖蛋白激素类药物的  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基通过非共价键结合，  
214 在一定的外部环境条件下（高温、光照、氧化等）容易发生  
215 解离、氧化和聚集，形成解离亚基、氧化亚基、聚集体等产  
216 品相关杂质。纯度检查是质量研究的重要指标之一，通常选  
217 用两种或两种以上不同原理的方法进行测定。

218 聚集体和解离亚基：聚集体可能导致免疫原性升高， $\alpha$  亚  
219 基和  $\beta$  亚基解离会造成生物学活性降低并可能产生其他非预  
220 期的生物学功能。因此，聚集体和解离亚基含量是质量研究

221 和稳定性评价的重要指标。纯度和聚集体分析方法的选择  
222 （例如 SDS-PAGE 或 SEC-HPLC/UPLC）应综合分析方法的  
223 灵敏度及成品辅料干扰情况确定。

224 氧化亚基：糖蛋白激素类产品的  $\alpha$  亚基和  $\beta$  亚基氨基酸  
225 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，  
226 而且无法通过纯化工艺完全去除，可采用 RP-HPLC 分析方  
227 法进行氧化亚基的质量控制。

### 228 1.3 蛋白质含量

229 根据糖蛋白激素类产品的性质，蛋白质含量可选用  
230 HPLC 法、紫外吸收法、凯式定氮法等方法进行测定，三种  
231 方法均适用于原液含量测定。因成品辅料的干扰，从方法专  
232 属性的角度推荐使用 HPLC 法。随着技术的发展，也可以采  
233 用其他适用的检测方法。

### 234 1.4 糖基化修饰

235 糖蛋白激素类药物的 N-聚糖主要是复合型聚糖，一般具  
236 有两个、三个或四个糖基化分支。N-聚糖的复杂程度与核心  
237 甘露糖上 N-乙酰葡萄糖胺的分支数量、碳水化合物残基、是  
238 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  
239 相关。天线结构影响着受体结合和信号传导，唾液酸化程度  
240 影响着受体结合、清除速率和生物效力。N-糖基化修饰的研  
241 究通常应包括 N 糖基化位点、N 糖结构分析、单糖组成分析、  
242 唾液酸含量和 Z 值等。 $\beta$  亚基的糖基化位点可能存在未完全

243 糖基化的现象，进而影响体内代谢和生物学活性，因此应对  
244  $\beta$  亚基的 N-糖基化占有率进行分析。糖蛋白激素类产品含多  
245 个糖基化位点且在每个糖基化位点具有显著的异质性，鼓励  
246 采用先进的技术对  $\alpha$  和  $\beta$  亚基不同位点的具体修饰类型进行  
247 鉴定，并结合体内生物作用和功能进行分析。

248 rhCG 及 rhFSH-CTP 的  $\beta$  亚基羧基末端肽含有四条 O-  
249 连接寡糖链。O-糖基化修饰鉴定包括 O 糖基化位点、糖基化  
250 位点占有率、O 糖结构分析、单糖组成分析等。由于缺乏有  
251 效的酶切手段以及固有的结构多样性，O 糖的系统性分析存  
252 在难度，鼓励尽可能使用先进的分析方法进行 O 糖修饰的相  
253 关研究。

## 254 1.5 电荷异构体

255 糖蛋白激素的电荷异构体受其唾液酸修饰的影响呈现  
256 出多条带分布，可以通过等电聚焦电泳（IEF）、全柱成像毛  
257 细管等电聚焦电泳（icIEF）或毛细管区带电泳（CZE）对图  
258 谱和主要条带进行控制。基于分析方法的迭代更新，鼓励采  
259 用 icIEF/CZE 替代 IEF 进行电荷异构体的鉴定和控制。

## 260 2. 生物学活性

261 糖蛋白激素类药物生物学活性的测定可采用体内动物  
262 试验或体外细胞试验。分析方法的选择应根据《中国药典》  
263 要求、产品作用机制和药效学特点等综合考虑。

264 当采用体外细胞法代替体内动物法进行活性检测时，应

265 规范进行变更前后分析方法桥接研究，采用不同的产品变体  
266 （去唾液酸化变体、强制降解变体、不同唾液酸化水平的变  
267 体等）进行体内外活性检测的对比研究并对结果进行分析，  
268 结合方法学验证的结果择优选择合适的分析方法。

## 269 （二）质量标准

270 糖蛋白激素类产品的质量控制项目一般包括鉴别、纯度、  
271 等电点、蛋白质含量、糖基化修饰相关检项（如唾液酸含量、  
272 N-聚糖分布）、产品相关杂质（如氧化亚基、解离亚基、聚集体等）、  
273 工艺相关杂质（如亲和配基残留量、宿主蛋白残留、  
274 宿主 DNA 残留及工艺添加剂残留量等）、生物学活性、安全  
275 性检查（如细菌内毒素、微生物限度、无菌）等。根据制剂  
276 剂型和处方的不同，还应纳入外观、pH 值、渗透压摩尔浓度、  
277 不溶性微粒、可见异物、装量、水分残留、关键辅料含量等  
278 检项。用于质量控制的分析方法应满足检测要求并经过全面的  
279 的方法学验证/确认。应根据临床应用经验、生产工艺能力、  
280 分析方法变异性及稳定性研究等合理拟定原液和制剂的质量  
281 量标准可接受范围，并充分说明质量标准制定的依据。

282 为确保检测结果的可靠性和准确性，应规范建立理化参  
283 比品和活性标准品用于鉴别、理化和效价测定，对参比品/标  
284 准品进行检验、标定和稳定性研究。

## 285 七、稳定性研究

286 应根据《中国药典》及国内外生物制品稳定性研究相关

287 指导原则，采用代表性批次规范开展原液和制剂的稳定性研  
288 究。多剂量产品应开展有效期末使用中稳定性研究，证明产  
289 品在实际多次使用过程中的质量一致性。多剂量产品中一般  
290 含有抑菌剂，为验证产品在长期储存和模拟使用条件下防止  
291 微生物污染的有效性，应在长期稳定性研究的关键时间点和  
292 模拟使用条件下，参照《中国药典》开展抑菌效力检查。

## 293 八、包装材料和容器

294 为避免直接接触的包装材料和容器对产品质量产生非  
295 预期影响，应规范开展包装系统相容性研究和密闭完整性研  
296 究。重组糖蛋白激素类药物通常对硅油敏感，易发生亚基解  
297 离进而影响产品质量。对于使用硅油进行硅化处理的预填充  
298 包装制剂，应关注硅油来源及质量控制，结合临床使用充分  
299 评估硅油对质量和安全性的影响。

300 产品所使用的多次给药装置应满足给药的安全性和便  
301 利性要求。申请人应评估注射笔和笔芯(卡式瓶)的适配性，  
302 并开展相应的剂量准确度和注射笔功能性研究。

## 303 九、质量相似性研究

304 按照生物类似药开发的重组糖蛋白激素类产品应参考  
305 《生物类似药研发与评价技术指导原则(试行)》和《生物类  
306 似药相似性评价和适应症外推技术指导原则》等相关指导原  
307 则，采用正交、灵敏的分析手段选择代表性批次开展候选药  
308 和参照药的药学相似性研究。由于糖蛋白激素类药物结构复

309 杂性和糖基化异质性特点，在进行相似性评价时，应保证主  
310 要糖基化种类和唾液酸水平（含量和分布）相似。对于药学  
311 相似性评价中观察到的微小质量属性差异，应进一步结合非  
312 临床和临床研究评估是否对产品安全性、有效性、免疫原性  
313 和代谢产生影响。

## 314 十、参考文献

- 315 1. 《中华人民共和国药典》三部（2020 版）
- 316 2. 《生物类似药研发与评价技术指导原则（试行）》  
317 （2015）
- 318 3. 《生物类似药相似性评价和适应症外推技术指导原则》  
319 （2021）