

T/HNBX

海南省标准化协会团体标准

T/HNBX XXXX—XXXX

T/CIET XXXX—XXXX

GLP-1 多肽药物长效化修饰技术要求

Technical requirements for long-term modification of GLP-1 polypeptide drugs

(征求意见稿)

XXXX - XX - XX 发布

XXXX - XX - XX 实施

海南省标准化协会 发布
中国国际经济技术合作促进会

目 次

前言	II
引言	III
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 总则	2
4.1 核心技术目标	2
4.2 基本原则	2
4.3 质量控制要求	3
5 具体修饰技术要求	4
5.1 PEG 化修饰技术要求	4
5.2 脂肪酸酰化修饰技术要求	5
5.3 融合蛋白修饰技术要求	6
5.4 氨基酸序列优化修饰技术要求	8
5.5 聚合物缓释剂修饰技术要求	9
5.6 其他修饰技术（如微球包埋、化学交联）	10
6 稳定性	10
6.1 原则	10
6.2 影响因素试验	10
6.3 加速试验	10
6.4 长期试验	11
6.5 配伍稳定性	11
6.6 包装材料相容性	11
7 数据处理、报告与归档	11
7.1 数据处理	11
7.2 报告	12
7.3 归档	12
参考文献	13

前 言

本文件按照 GB/T 1.1—2020 《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国国际经济技术合作促进会标准化工作委员会提出。

本文件由海南省标准化协会、中国国际经济技术合作促进会共同归口。

本文件起草单位：

本文件主要起草人：

引 言

本指导原则基于当前的科学认知和审评认识，不能涵盖在这类药物药学研发中遇到的所有情况，申请人亦可基于药物研发的实际情况，采用其他更有效的技术和方法开展符合药物研发规律的药学研究，并及时与药审中心进行沟通交流。随着技术的发展、认知的深入和经验的积累，本指导原则的相关内容将逐步完善和更新。

GLP-1 多肽药物长效化修饰技术要求

1 范围

本文件规定了GLP-1 多肽药物长效化修饰技术的总则、具体修饰技术要求、修饰后产物的质量研究、质量控制要求、工艺开发与验证要求、稳定性研究要求。

本文件适用于采用化学修饰（如PEG化、脂肪酸酰化）、生物学修饰（如白蛋白融合、Fc片段融合）等技术实现长效化的GLP-1 多肽药物，包括但不限于GLP-1 类似物及衍生物。

2 规范性引用文件

本文件没有规范性引用文件。

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

胰高血糖素样肽-1 glucagon-like peptide-1, GLP-1

是人体中通过与胰高血糖素样肽-1 受体（GLP-1 受体）结合发挥生物学功能的一种肽类激素。

3.2

GLP-1 受体 glucagon-like peptide -1 receptor, GLP-1R

是一种广泛分布于人体多个器官和组织细胞膜上的 G 蛋白偶联受体，是 GLP-1 及其类似物发挥生物效应的唯一且必需的特异性分子靶点。

3.3

GLP-1 受体激动剂 glucagon-like peptide -1 receptor agonist, GLP-1RA

天然GLP-1以及其他以天然GLP-1 序列为基础的、经改造的GLP-1 类似物，通过激活GLP-1受体发挥生物活性，统称为GLP-1 受体激动剂。

3.4

长效化修饰 long-acting modification

是通过化学、生物学等技术手段对药物（尤其蛋白/多肽类药物）的分子结构进行改造，核心目标是延长药物在体内的作用时间（半衰期）、降低清除速率，同时保留其生物活性，最终减少用药频率、提升治疗便利性与效果的一类技术总称。

3.5

半衰期 half-life , t_{1/2}

药物、放射性物质等在体内或体系中，浓度、活性或数量下降到初始值的一半所需要的时间。

3.6

修饰度 degree of modification

在药物（尤其蛋白/多肽类药物）的结构修饰过程中，被成功修饰的药物分子占总药物分子的比例，或单个药物分子上被连接的修饰基团数量。

3.7

生物利用度 bioavailability

生物利用度是指药物活性成分从制剂释放吸收进入全身循环的程度和速度，分为绝对生物利用度和相对生物利用度。

3.8

PEG 化 PEGylation

通过化学方法将聚乙二醇（Polyethylene Glycol，简称PEG）分子以共价键连接到药物（如蛋白、多肽、小分子药物）分子上的一种化学修饰技术。

3.9

脂肪酸酰化 fatty acid acylation

通过化学或酶促反应，将脂肪酸分子的酰基（-CO-R）以共价键形式连接到药物（如蛋白、多肽）分子特定氨基酸残基上的一种化学修饰技术。

3.10

融合蛋白 fusion protein

通过基因工程技术，将两个或多个不同基因的编码序列串联融合，转入宿主细胞（如细菌、酵母、哺乳动物细胞）后，经表达、翻译形成的单一多肽链蛋白质。

4 总则

4.1 核心技术目标

4.1.1 药效保留与增强

修饰后药物需维持与GLP-1受体的特异性结合能力，确保原本核心生物学活性不被削弱。体外实验中，基于GLP-1受体的细胞报告基因法检测显示，其 EC_{50} 值与未修饰原型药的偏差应 $\leq 30\%$ （即活性保留率 $\geq 70\%$ ）；体内药效方面，在糖尿病模型动物（如db/db小鼠、ZDF大鼠）中，单次给药后降血糖持续时间需覆盖修饰前的5倍以上，且糖化血红蛋白（HbA1c）降低幅度不低于原型药的80%。

4.1.2 半衰期显著延长

需通过修饰实现体内药动学的突破性改善：血浆半衰期（ $t_{1/2}$ ）较原型药延长至少5倍（如从2小时延长至 ≥ 10 小时），理想状态下达到每周给药1次（ $t_{1/2} \geq 7$ 天）或每月给药1次（ $t_{1/2} \geq 30$ 天）的目标。同时，药动学曲线应呈现平稳态势，峰浓度（ C_{max} ）与谷浓度（ C_{min} ）的比值 ≤ 5 （避免峰浓度过高引发不良反应），且达稳态时间 ≤ 3 个半衰期，确保临床给药方案的可预测性。

4.1.3 安全性与耐受性良好

修饰不得引入新的安全性风险，具体包括：

- 免疫原性可控：在动物重复给药实验中，抗药抗体（ADA）阳性率 $\leq 10\%$ ，且无中和性抗体导致的药效减弱或过敏反应（如皮疹、呼吸困难）；
- 毒性无新增：急性毒性实验中，最大耐受剂量（MTD）不低于原型药的50%，长期毒性实验（6个月以上）中未出现与修饰相关的靶器官损伤（如肝肾功能障碍、胰腺细胞增生）；
- 不良反应发生率：在I期临床研究中，恶心、呕吐等胃肠道反应的发生率需低于原型药的30%，且无严重低血糖风险（血糖 < 3.9 mmol/L的发生率 $\leq 5\%$ ）。

4.1.4 理化性质与生产特性适配

在进行多肽药物的制剂研究时，需要充分了解原料药的理化性质，如溶解度、pH值、pI、比旋度、高级结构、水分、油/水分配系数等，应关注原料药在不同pH值、离子强度、光、热、湿、氧化等条件下的稳定性情况。结合拟开发药物的关键质量属性，有针对性地进行研究。在整个处方工艺开发过程中需关注多肽药物的化学和物理稳定性。

4.2 基本原则

GLP-1多肽药物长效化修饰技术应遵循以下原则：

- 有效性原则：修饰过程不得破坏GLP-1与GLP-1受体的结合位点，需通过分子设计、模拟及实验验证，确保修饰后的药物仍能有效激动受体，发挥其生理功能。
- 安全性原则：所采用的修饰基团（如PEG、脂肪酸、白蛋白、Fc片段等）需具有良好的生物相容性和可降解性，避免在体内产生毒性代谢产物或引发免疫反应。修饰工艺应避免引入有害杂质，且药物在储存和使用过程中应保持稳定，不产生具有毒性的降解产物。

- 质量可控原则：修饰工艺应稳定可控，关键工艺参数需明确且在合理范围内波动，确保批次间产品质量的一致性。同时，应建立完善的质量控制体系，对修饰产物的理化性质、生物学活性、安全性等进行全面检测和评估。
- 可生产性原则：修饰工艺应适合规模化生产，具备较高的生产效率和较低的生产成本，且所用设备和原材料易于获取和控制，以满足工业化生产的需求。

4.3 质量控制要求

4.3.1 原则

GLP-1 受体激动剂的质量研究与质量控制应遵循重组蛋白类药物的一般原则。在参考重组蛋白相关技术指导原则的基础上，基于质量源于设计的原则，结合产品分子结构和作用机制开展有针对性的研究。分析方法是杂质控制策略有效实施的基础。应选择灵敏先进的分析方法进行杂质的测定，并选择具有代表性的，可充分反映杂质谱的样品开展分析方法验证。在验证时，需特别关注方法检测限、定量限、准确度、精密度、线性以及范围的验证。原则上，杂质分析范围需涵盖定量限至规定限度的120%。应结合杂质峰的特征情况，评估分析方法对杂质的检出能力。对于脂肪酸链修饰的GLP-1受体激动剂，通常使用分子排阻高效液相色谱法（SEC-HPLC）、反相高效液相色谱法（RP-HPLC）开展产品相关杂质的测定。SEC-HPLC可实现高分子蛋白和目的蛋白的有效分离，RP-HPLC可实现亲水、疏水杂质的有效分离。结合产品特性，如有其它灵敏的分析方法也可应用于产品的质量控制在。

4.3.2 理化性质检测

应包含以下内容：

- 纯度与均一性：采用反相高效液相色谱（RP-HPLC）和离子交换色谱（IEC）联合检测，总纯度需 $\geq 95\%$ ，其中单修饰体比例 $\geq 90\%$ （减少多修饰体或未修饰肽的干扰）；通过体积排阻色谱（SEC-HPLC）检测聚集物含量，单体含量 $\geq 98\%$ ，二聚体及以上聚集物 $\leq 1\%$ 。
- 结构确证：利用基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱（MALDI-TOF MS）验证分子量，与理论值偏差需 $\leq 0.5\%$ ；通过核磁共振（NMR）或X射线光电子能谱（XPS）确认修饰位点（如PEG化的N端或特定赖氨酸残基），确保修饰特异性；对于融合蛋白类修饰，需通过肽图分析（如胰蛋白酶酶解后RP-HPLC检测）验证氨基酸序列完整性。
- 电荷异质性：采用等电聚焦（IEF）或毛细管区带电泳（CZE）检测电荷变体，主成分含量 $\geq 90\%$ ，酸性/碱性变体总和 $\leq 10\%$ ，避免因修饰不完全或降解导致的电荷分布异常。
- 修饰度精准量化：对于PEG化修饰，采用比色法（如蒽酮法）测定PEG含量，结合多肽浓度计算修饰度（ $\text{修饰度} = \text{实际PEG/多肽摩尔比} \div \text{理论摩尔比} \times 100\%$ ），要求修饰度在 $90\% \sim 110\%$ 范围内；脂肪酸酰化修饰则通过气相色谱（GC）检测脂肪酸含量，确保酰化率 $\geq 95\%$ 。

4.3.3 生物学活性测定

应包含以下内容：

- 体外活性验证：基于GLP-1受体的细胞模型（如CHO-K1/GLP-1受体稳转细胞），采用cAMP生成实验或报告基因法（如Luciferase）测定EC₅₀值，要求修饰后药物与未修饰原型药的EC₅₀比值 ≤ 2.0 （即活性保留率 $\geq 50\%$ ），且量效曲线趋势一致。
- 体内药效关联：在糖尿病模型动物（如db/db小鼠）中，单次给药后监测血糖变化，要求修饰后药物的降血糖持续时间较原型药延长 ≥ 5 倍，且最大降糖幅度不低于原型药的80%；对于减重适应症，在高脂饮食诱导的肥胖大鼠中，每周给药1次的体重降低量需不劣于原型药每日给药组（以等效剂量计）。

4.3.4 安全性相关控制

应包含以下内容：

- 杂质限量：未修饰GLP-1原型药残留 $\leq 3\%$ ，修饰副产物（如水解的PEG、游离脂肪酸） $\leq 0.5\%$ ；有机溶剂残留（如DMSO、乙腈）需符合ICH Q3C指导原则，其中一类溶剂（如苯）不得检出，二类溶剂（如甲醇） ≤ 300 ppm。

- 宿主残留控制：对于融合蛋白类修饰，宿主细胞蛋白（HCP）残留 ≤ 10 ng/mg，宿主细胞 DNA 残留 ≤ 10 pg/mg；抗生素残留（如氨苄青霉素） ≤ 0.1 ppm，避免免疫原性风险；
- 免疫原性评估：采用酶联免疫吸附试验（ELISA）检测抗药抗体（ADA），方法灵敏度需达到 1ng/mL；在动物重复给药实验中，ADA 阳性率需 $\leq 10\%$ ，且无中和性抗体（Nab）产生（通过体外活性抑制实验验证）。
- 毒性筛查：细菌内毒素含量 ≤ 0.5 EU/mg（鲎试剂法）；溶血率 $\leq 5\%$ （体外红细胞溶血实验），确保无急性毒性风险。

4.3.5 稳定性监测

应包含以下内容：

- 加速稳定性：在 $40\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相对湿度 $75\%RH \pm 5\%RH$ 条件下储存 6 个月，需满足：纯度下降 $\leq 5\%$ ，活性保留率 $\geq 90\%$ ，聚集物增长 $\leq 1\%$ ，pH 值波动 ≤ 0.5 个单位。
- 长期稳定性：在 $2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存条件下，每 3 个月取样检测，有效期需 ≥ 24 个月，且末期各项指标（纯度、活性、聚集物）仍符合放行标准。
- 运输稳定性：模拟运输条件（ $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温度波动，持续 72 小时）后，药物质量需无显著变化，确保供应链中的稳定性。

5 具体修饰技术要求

5.1 PEG 化修饰技术要求

5.1.1 PEG 原料的关键特性要求

应包含以下内容

- 分子量与结构类型：可采用基质辅助激光解吸附飞行时间质谱（MALDI-TOF-MS）、凝胶渗透色-多角度激光散射（GPC-MALLS）检测器或凝胶渗透色谱-示差检测器（GPC-RID）等方法测定聚乙二醇的重均/数均分子量及多分散性。根据半衰期目标选择合适分子量，如追求每周给药周期时；结构上可选择线性 PEG（减少空间位阻）或分支型 PEG（提高分子量效率），且分支型需验证其与 GLP-1 受体的结合无干扰。
- 活化基团与靶向性：PEG 的分子末端需经活性基团取代后方可与蛋白质和多肽上的反应基团发生修饰，可采用核磁共振（NMR）或液相色谱柱前衍生法进行测定。需采用位点特异性活化基团，如针对巯基的马来酰亚胺基（Maleimide）等，根据靶分子的活性位点选择合适的 PEG 衍生物，避免非特异性修饰。
- 纯度与杂质控制：应对 PEG 中可能存在的二醇、断裂与非活化聚乙二醇等特定杂质及其他需要控制的相关杂质进行分析及限量控制。

5.1.2 修饰反应的工艺参数控制

5.1.2.1 反应体系优化应符合以下内容：

- 缓冲液选择：采用磷酸缓冲液（pH 6.0 ~ 7.0）或硼酸盐缓冲液（pH 7.5 ~ 8.5），避免使用含氨基或巯基的缓冲液（如 Tris、DTT）干扰反应。
- 投料比例：GLP-1 与 PEG 的摩尔比需控制在 1:1.2 ~ 1:2.0（根据活化基团反应效率调整），过量 PEG 需 $\leq 10\%$ （减少多修饰体生成）。

5.1.2.2 反应条件限定应符合以下内容：

- 温度： $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ （马来酰亚胺修饰）或 $30\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ （NHS 酯修饰），避免高温导致多肽降解。
- 时间：1 ~ 4 小时（通过实时 HPLC 监测，当单修饰体比例达到 90% 时终止反应）。
- 搅拌速率：100 rpm ~ 200 rpm，确保反应体系均一，避免局部浓度过高。

5.1.3 修饰产物的核心质量属性

应符合以下要求：

- 修饰位点与均一性：对于单位点和多位点随机修饰产物，应确定主要丰度的修饰位点和比例，并说明主要修饰位点是否位于活性中心内。必要时，应明确次要修饰位点及其含量，以保证工艺稳定和批间一致性。对于定点修饰的修饰产物，应确证目标修饰位点并规定其所占比例的限度要求。修饰位点的确定可通过直接比较修饰前后蛋白质的质量肽图，也可采用适宜的色谱分离手段分离修饰物或异构体，再对其进行质谱肽图比对或氨基酸测序、质谱分析、实时成像毛细管等电聚焦电泳（cIEF-WCID）分析等。
- 理化稳定性：修饰后产物在 2 °C~8 °C 储存条件下，30 天内纯度下降 ≤ 3 %；在加速条件（40 °C）下，7 天内聚集物增长 ≤ 1 %（SEC-HPLC 检测）。且制品应符合生物制品分包装及贮存管理（通则 0239）的规定，在适宜的环境条件下贮存和运输。自生产之日起，按批准的有效期执行。
- 生物学相容性：PEG 化重组蛋白及多肽药物的体内生物学活性测定，可在重组原型蛋白体内生物效价的评价方法基础上，摸索修饰产物的血药浓度-时间曲线，建立新的测定方法，必要时可重新定义效价单位。对于酶的活性测定，应对修饰后的酶类制剂重新测定其特征反应动力学参数，即 k_{cat} 值（催化常数）、 K_m 值（米氏常数）与 V_m （最大反应速率）。必要时应设定亲和力和免疫反应性（包括与其他类似结构蛋白的交叉反应性）检测项目，以及对目标分子中与相应表位作用部分的生物学鉴别。

5.1.4 纯化与表征方法

应包括以下内容：

- 纯化工艺：根据修饰产物的理化特性确定分离、纯化和反应条件。如可依据修饰产物电荷的变化或分子量的变化选择相应的分离纯化手段，工艺参数建立的目标为尽可能获得组分一致的修饰产物。采用两步纯化策略，第一步通过离子交换色谱去除未反应 PEG，第二步通过反相 HPLC 分离单修饰体与多修饰体。
- 结构表征：根据制品特性，选择理化、生物/免疫学方法，对修饰产物进行鉴别试验。修饰位点研究中所建立的液相肽图部分，可用于原液的鉴别检查。应建立产品专属的反相液相肽图法，采用通则或原型蛋白相关各论的肽图方法，应进行方法适用性验证和实验条件优化，使得通过比较修饰前后的肽图，可直观分析发生主要修饰的肽段。除常规分子量（MALDI-TOF MS）和纯度检测外，需通过氢核磁共振（¹H-NMR）验证 PEG 与多肽的连接方式（如酰胺键或硫醚键），并通过圆二色谱（CD）确认多肽二级结构。

5.2 脂肪酸酰化修饰技术要求

5.2.1 分子结构设计的要求

应符合以下要求：

- 修饰位点选择要求：优先选择远离 GLP-1 的受体结合核心区域的 26 位赖氨酸（Lys26）作为修饰位点，且严禁在 GLP-1 与受体结合的关键区域（N 端 7-13 位或 C 端 28-29 位）进行修饰。
- 脂肪酸侧链：脂肪酸侧链可有多种来源，如申请人自制、委托生产或购买商业化产品等。无论来源如何，申请人均应进行严格的供应商审计，同时结合实际生产工艺，建立对脂肪酸侧链的有效控制策略，保证其工艺稳健性和质量可控性。对于含有手性碳的脂肪酸侧链，应选择合理的生产工艺和控制方法，严格控制手性异构体的生成。同时，应对其他的杂质进行分析，明确起源，必要时进行定性研究，并说明如何去除，应对生产工艺的杂质去除能力进行评估。特别关注具有与蛋白发生连接反应活性的杂质的去除，尽量在生产用原材料部分将其控制在极低范围内，减少后续杂质分析的复杂性。

5.2.2 生产工艺

脂肪酸修饰多肽药物生产过程主要包括未修饰的 GLP-1 的生产、修饰工艺和原液生产以及制剂工艺这三个关键环节。其中修饰工艺是此类产品区别于其他产品的关键工艺步骤。脂肪酸链修饰多肽类药物通常为定点修饰。在进行修饰反应时，应确定修饰反应的化学反应方程式，在保证修饰反应合理性的同时，明确理论上修饰反应过程中可能引入的所有反应副产物。除了考虑脂肪酸链与多肽的主反应外，还

需关注在拟定的反应条件下是否可能有其他杂质与多肽发生连接反应。建议采用风险评估工具,明确修饰反应各参数(如反应温度、时间、pH、蛋白/脂肪酸链投料比例、物料浓度、投料顺序和速率等)对工艺性能(如修饰反应率副产物、蛋白回收率等)和对产品CQA的影响。明确生产工艺的关键工艺参数和性能参数。在工艺开发中应对杂质特性进行充分的分析,根据杂质特性进行纯化工艺设计,并尽早除去修饰反应中引入的脂肪酸链相关杂质,以避免后续可能产生的非预期反应,保证后续工艺的稳定进行。

在生产过程中,如有需暂存的中间产物,应开展相应的稳定性考察,以支持中间产物的暂存条件和时间。结合当前此类产品的研究情况,重点关注的稳定性研究内容包括:未修饰GLP-1、原液和制剂的稳定性,建议尽量采用不间断生产,缩短未修饰GLP-1的放置时间。

5.2.3 修饰产物的核心质量属性

通常情况下可参考《中华人民共和国药典》2025年版和ICH Q6B等相关指导原则,依据产品整体开发过程中研究数据,特别是非临床和临床批次的放行和稳定性研究数据来拟定原液和制剂的质量标准。检定项目除包括一般检项(如外观、pH、渗透压、不溶性微粒、可见异物、装量、水分等)、鉴别、纯度、活性和安全性检项等,还应根据产品特点对产品相关杂质/物质进行控制,如有机溶剂残留、亲水杂质、疏水杂质、总杂质以及特殊的单个杂质,另外还建议增加对游离脂肪酸链、未修饰蛋白残留等的控制。对方剂中重要辅料的含量如抑菌剂等,应进行控制。对于制剂通则中不适用的检项,应充分说明理由并提供数据支持。

5.2.4 纯化与表征方法

应包含以下内容:

- 纯化工艺:采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)为主纯化手段,固定相为C18柱,流动相梯度洗脱(乙腈/水(含0.1%三氟乙酸)),收集单酰化主峰,去除未反应脂肪酸(保留时间短于产物)和多酰化杂质(保留时间长于产物);纯化总回收率 $\geq 65\%$,且脂肪酸残留 $\leq 0.1\%$;
- 结构表征:通过MALDI-TOF MS验证分子量(较未修饰肽增加对应脂肪酸分子量), $^1\text{H-NMR}$ 确认酰化键(酰胺键特征峰);采用差示扫描量热法(DSC)检测热稳定性,熔融温度(T_m)较原型药提高 $\geq 5^\circ\text{C}$,确保储存稳定性。

5.2.5 生物学活性

与GLP-1受体的结合是GLP-1受体激动剂发挥生物学功能的关键机制。可采用表面等离子体共振(SPR)、或生物层干涉(BLI)等技术方法测定GLP-1与其受体的亲和力、酶联免疫吸附法(ELISA)等测定受体结合活性、基于受体结合建立的细胞法进行生物活性测定等;如有其他灵敏的、先进的方法,亦可用于生物学功能的表征研究。脂肪酸链与白蛋白的结合是脂肪酸链修饰的GLP-1受体激动剂延长半衰期的关键机制,应对该类分子与白蛋白的结合能力进行确证。

5.3 融合蛋白修饰技术要求

5.3.1 融合伴侣与分子设计要求

5.3.1.1 融合伴侣选择应符合以下内容:

- 优先选择人源化蛋白以降低免疫原性:HSA(半衰期19天)或IgG4 Fc片段(避免ADCC/CDC效应),其中Fc片段需进行去糖基化改造(如N297A突变)以减少炎症风险;
- 分子量适配性:融合后总分子量宜控制在60 kDa~120 kDa(避免肾小球滤过同时减少聚集),如HSA(66 kDa)与GLP-1(4 kDa)融合产物约70 kDa;
- 功能兼容性:需通过分子模拟验证融合伴侣与GLP-1的空间位阻,确保GLP-1的活性中心(His7-Ala8-Glu9)暴露率 $\geq 90\%$ 。

5.3.1.2 连接肽设计应符合以下内容:

- 采用柔性序列(Gly4Ser)₃作为连接子,长度15~20个氨基酸,避免 α -螺旋结构导致的空间干扰。
- 连接肽需不含蛋白酶敏感位点(如Arg-Pro),且通过稳定性预测模型(如ProtParam)验证其在血清中半衰期 ≥ 72 小时。

5.3.2 基因构建与表达工艺控制

重组载体构建要求应符合以下内容：

- 启动子选择 CMV 或 EF-1 α 启动子，确保在 CHO 细胞中表达量 ≥ 5 g/L；
- 引入信号肽（如 HSA 的天然信号肽）提高分泌效率，cleavage 位点需经质谱验证切割效率 $\geq 95\%$ ；
- 密码子优化需符合 CHO 细胞偏好性（如 Arg 优先使用 CGU/CGC），GC 含量控制在 45%–55% 以避免 mRNA 二级结构；
- CHO 细胞表达参数
 - 采用补料分批培养：初始细胞密度 5×10^5 cells/mL，培养温度 37 $^{\circ}$ C（前 5 天）后降至 32 $^{\circ}$ C 以提高表达量，pH 维持 7.10 ± 0.05 ；
 - 碳源调控：用半乳糖部分替代葡萄糖（比例 1:1），减少乳酸积累，使融合蛋白表达量提升 $\geq 40\%$ ；
 - 补料策略：每日添加 2% 酵母水解物（YE），可使产物滴度翻倍并维持细胞活率 $\geq 90\%$ （培养 14 天内）。

5.3.3 产物核心质量属性

应符合以下要求：

——结构完整性：

与其他蛋白融合的 GLP-1 受体激动剂，可参考重组蛋白类产品的相关指导原则开展质量研究，结合产品特点开展结构确证、杂质研究和活性确证。在开展结构确证时，需特别关注对突变位点、连接位点（如涉及连接反应）的确证，并应确证突变达到了预期的目的。其中一级结构可以通过 LC-MS/MS 肽图分析确认融合位点连接正确，序列覆盖率 $\geq 98\%$ ，无缺失或错配；翻译后修饰的 CHO 细胞表达的 Fc 融合蛋白需控制岩藻糖含量 $\leq 20\%$ （提高 FcRn 结合力），HSA 融合蛋白的糖基化位点占有率 $\geq 95\%$ ；

——生物学活性：

- 在进行生物学活性确证时，除需关注 GLP-1 与受体的亲和力及结合活性、GLP-1 的细胞生物学活性外，对于不同结构的分子，需结合其分子特点和活性功能开展研究。
- 对于双受体或三受体激动剂，如可同时激活 GLP-1 受体胰高血糖素受体（GCGR）、或葡萄糖依赖性促胰岛素多肽受体（GIPR）的受体激动剂，或靶向其他位点的活性功能区域需对其与多种受体/靶点的亲和力和结合活性分别开展研究并开发与其作用机制相关的细胞生物学活性测定方法对于与抗体或抗体 Fc 段融合的 GLP-1 受体激动剂，还应对 Fc 段的功能进行确证，如与 Fc 相关受体（FcRn、FcYRIFcYRIL、FcYRI、C1q）的亲和力、ADCC 活性、ADCP 活性、CDC 活性等。
- 对于与其他蛋白融合的 GLP-1 受体激动剂，如与有活性功能的蛋白融合，则需对其生物学活性开展研究，明确融合对不同结构域的生物学活性的影响。如与白蛋白融合，需考察白蛋白对典型药物的结合力，以评价其作为药物载体的作用活性。

——质量控制：

- 重组 GLP-1 受体激动剂的质量控制应符合重组蛋白类产品的一般要求。原液和制剂质量标准中应包括鉴别、检查含量、纯度/杂质控制、活性测定、微生物安全性等检项，并符合现行版《中国药典》的相关要求。
- 应特别关注该类产品质量标准中对杂质的控制，结合质量研究和稳定性研究情况，制定杂质的控制策略。对于稳定性研究中有变化的产品相关杂质，如 GLP-1 短肽、脱落的脂肪酸链、脂肪酸链降解产物等，以及可能对产品生物活性产生影响的特定产品相关杂质，应在风险评估的基础上在质量标准中有针对性的进行控制或结合分析方法对杂质进行分类控制。另外，质量标准中还应包括对杂质总量的控制。

——均一性控制：

聚集体含量 $\leq 1.0\%$ （SEC-HPLC 检测），二聚体 $\leq 0.5\%$ ；电荷异质性：酸性变体 $\leq 15\%$ ，碱性变体 $\leq 10\%$ （IEC-HPLC 检测），避免因脱酰胺或氧化导致的电荷变异。

5.3.4 纯化与表征方法

应符合以下要求：

- 亲和捕获：Fc 融合蛋白采用 Protein A 层析（洗脱 pH 3.5 ~ 4.0），HSA 融合蛋白采用蓝胶层析，收率 ≥ 90 %；
- 精纯：离子交换层析（如 Q Sepharose）去除宿主细胞蛋白（HCP），残留 HCP ≤ 10 ng/mg；
- 精制：疏水相互作用层析（HIC）去除聚集体，最终纯度 ≥ 99.0%（RP-HPLC 检测）。
- 关键表征技术：
 - 结构验证：采用 X 射线小角散射（SAXS）确认融合蛋白的溶液构象，GLP-1 结构域柔性指数需 ≥ 0.8（确保受体结合能力）；
 - 稳定性评估：加速试验（40℃，RH 75 %）1 个月内，活性保留率 ≥ 95%，聚集物增长 ≤ 0.3 %；
 - 免疫原性预测：通过 T 细胞表位预测软件（如 NetMHCII）筛选，潜在表位数量 ≤ 1 个/100 氨基酸。

5.4 氨基酸序列优化修饰技术要求

5.4.1 序列设计核心原则

应符合以下要求：

- 稳定性导向：针对天然 GLP-1 易被 DPP-4 酶降解（cleavage 位点 Ala8-Gly9）的特性，优先对 Ala8 进行突变（如替换为 Gly、Aib 或 Val），使 DPP-4 酶解半衰期延长 ≥ 10 倍；同时避免突变 His 7（受体结合关键位点），确保活性保留率 ≥ 80 %；
- 结构兼容性：突变后需维持 GLP-1 的 α-螺旋结构（20 ~ 30 位氨基酸），通过圆二色谱（CD）验证螺旋含量 ≥ 60 %（与天然序列偏差 ≤ 10%），避免因结构松散导致的受体结合力下降；
- 免疫原性规避：利用 T 细胞表位预测工具（如 NetMHCpan）筛选突变位点，确保优化序列中新增表位数量 ≤ 1 个，且与人体自身蛋白同源性 ≥ 85 %（降低交叉免疫风险）。

5.4.2 关键位点优化策略

酶解抗性突变：

- Ala8→Gly8：保留 80%活性的同时，DPP-4 抗性提升 5 倍（适用于短期长效需求）；
- Ala8→Aib8（α-氨基异丁酸）：立体位阻效应显著，酶解半衰期延长 ≥ 20 倍，但需验证与 GLP-1 受体的结合能（偏差 ≤ 1.5 kcal/mol）。
- 受体结合增强突变：
 - Arg36→Lys36：通过增加正电荷相互作用，使受体结合亲和力（KD 值）降低 ≥ 30 %（即结合力增强）；
 - Glu21→Asp21：缩短侧链长度以减少空间位阻，体外活性（EC50）可提升 1.5 ~ 2 倍。
- 半衰期延长突变：
 - 在 C 端引入 Pro38 或 Gly38：增强与白蛋白的疏水相互作用，体内半衰期延长至 ≥ 12 小时（较天然序列提升 3 倍）；
 - 替换 Asn28 为 Gln28：避免非酶促脱酰胺反应，提高储存稳定性（4℃ 储存 6 个月纯度下降 ≤ 3 %）。

5.4.3 序列筛选与验证标准

5.4.3.1 体外筛选体系应符合以下内容：

- 采用高通量 ELISA 检测突变体与 GLP-1 受体的结合率，筛选结合率 ≥ 90% 的候选序列；
- 进行 DPP-4 酶解实验（37℃，24 小时），保留酶解剩余率 ≥ 80% 的序列。

5.4.3.2 体内验证指标应符合以下内容：

- 在正常小鼠中单次给药（10 nmol/kg），测定药时曲线下面积（AUC_{0-t}）需较天然 GLP-1 增加 ≥ 5 倍；
- 在 db/db 小鼠中验证降血糖效果，给药后 8 小时血糖降幅 ≥ 30 %（与原型药相当）。

5.4.4 质量控制要求

应符合以下要求：

- 序列确证：通过 Edman 降解法测定 N 端 15 个氨基酸序列，与设计序列完全一致；采用 LC-MS/MS 全序列覆盖分析（覆盖率 $\geq 99\%$ ），无未预期突变。
- 结构均一性：反相 HPLC 纯度 $\geq 98\%$ ，主峰单一且无异构峰（如 Asp 异构导致的双峰）；等电点（pI）与理论值偏差 ≤ 0.2 （IEF 测）。
- 稳定性监测：加速试验（40 °C，RH75%）1 个月，氧化产物（如 Met 氧化） $\leq 1\%$ ，水解产物 $\leq 0.5\%$ ，活性保留率 $\geq 95\%$ 。

5.5 聚合物缓释剂修饰技术要求

5.5.1 聚合物材料选择标准

5.5.1.1 生物相容性与降解特性应符合以下内容：

- 优先选用美国 FDA 批准的可降解聚合物，如聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA，乳酸/羟基乙酸比例 50：50 至 85：15）、聚己内酯（PCL）或聚乙二醇-聚乳酸共聚物（PEG-PLA）；
- 材料降解周期需与释药目标匹配（如每周给药需降解周期 2 ~ 4 周，每月给药需 8 ~ 12 周），降解产物（如乳酸、羟基乙酸）需无毒性，pH 缓冲能力需 $\geq 0.1 \text{ mmol/g}$ （避免局部酸性环境引发炎症）。

5.5.1.2 分子量与纯度控制应符合以下内容：

- PLGA 分子量范围 5kDa-50kDa（分子量分布指数 $\text{PDI} \leq 1.5$ ），低分子量碎片（ $< 1\text{kDa}$ ）含量 $\leq 5\%$ ；
- 残留单体（乳酸、羟基乙酸） $\leq 0.1\%$ ，有机溶剂残留（如二氯甲烷） $\leq 500 \text{ ppm}$ ，重金属 $\leq 1 \text{ ppm}$ 。

5.5.2 载药体系构建工艺

5.5.2.1 包埋技术应符合以下内容：

- 乳化-溶剂挥发法：水相为 GLP-1 缓冲液（pH 7.0 - 7.4），油相为聚合物有机溶液（如 PLGA 的二氯甲烷溶液，浓度 5%-20%），乳化速率 10000-15000 rpm，形成粒径均一的 W/O 型乳剂；
- 喷雾干燥法：进风温度 40 - 60 °C（避免多肽变性），雾化压力 0.2-0.4MPa，所得微球粒径分布 Span 值 ≤ 1.5 （ $\text{Span} = (\text{D}_{90} - \text{D}_{10}) / \text{D}_{50}$ ）。

5.5.2.2 共价结合工艺应符合以下内容：

- 聚合物需预先活化（如引入马来酰亚胺或 NHS 酯基团），活化度 $\geq 90\%$ ；
- GLP-1 与聚合物的摩尔比 1:1-1:5，反应 pH6.5~8.0，温度 $25^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ ，反应时间 2 ~ 4 小时，结合率 $\geq 80\%$ 。

5.5.3 缓释性能调控指标

5.5.3.1 释药动力学要求应符合以下内容：

- 初期突释率 $\leq 10\%$ （24 小时内累积释放量），避免血药浓度骤升引发不良反应；
- 缓释阶段（2 ~ 28 天）每日释放量波动 $\leq 15\%$ ，确保药效平稳；
- 累计释放率 $\geq 80\%$ （至聚合物完全降解时），减少药物残留。

5.5.3.2 体内外相关性应符合以下内容：

- 体外释放实验（37°C，PBS 缓冲液 pH 7.4）与犬或猴体内药代动力学数据的相关系数（ R^2 ） ≥ 0.85 ；
- 体内半衰期需较未修饰药延长 ≥ 10 倍（如从 2 小时至 ≥ 20 小时），达峰时间（ T_{max} ） ≥ 48 小时。

5.5.4 质量控制要求

5.5.4.1 理化性质检测应符合以下内容：

- 微球制剂：粒径 $\text{D}_{50} = 5 - 50 \mu\text{m}$ （激光粒度仪检测），表面光滑度（扫描电镜观察无裂缝），封装率 $\geq 85\%$ 。
- 共价结合物：分子量分布（SEC-HPLC）单峰，游离 GLP-1 含量 $\leq 5\%$ ，聚合物结合率 $\geq 80\%$ 。

5.5.4.2 生物学活性应符合以下内容：

- 释放药物的体外活性（EC₅₀）与未修饰 GLP-1 偏差≤30%（因聚合物包裹可能导致活性轻微下降）。
- 体内药效（如 db/db 小鼠降血糖实验）：单次给药后血糖维持正常水平≥7 天。

5.5.4.3 安全性验证应符合以下内容：

- 局部刺激性：家兔肌肉注射后 48 小时内注射部位无红肿、坏死（评分≤1 级，按 Draize 标准）。
- 全身毒性：大鼠重复给药（每月 1 次，持续 3 个月）后，肝肾功能指标（ALT、BUN）与对照组偏差≤20%。

5.6 其他修饰技术（如微球包埋、化学交联）

5.6.1 微球载体材料应符合以下内容：

微球载体材料可选用聚乳酸-羟基乙酸共聚物（PLGA），其分子量及降解速率应符合规定。

5.6.2 包封率应符合以下内容：

GLP-1 在微球中的包封率≥85%，突释率 10%~20%。

6 稳定性

6.1 原则

稳定性研究贯穿产品全生命周期，为产品的储存、运输和使用提供支持，为产品有效期和使用方法的制定提供依据。

GLP-1 受体激动剂的稳定性研究，可参照稳定性研究相关指导原则的技术要求开展研究。

对于多剂量注射剂，应考察有效期末期制剂使用过程中的稳定性，以支持制剂的临床应用；如采用其他研究方案需提供充足数据支持。在设计模拟使用稳定性研究方案时，应采用临床实际的最差使用条件开展研究，如最高使用频率、最差放置条件等。研究过程中，除关注外观、不溶性微粒、纯度、微生物限度、细菌内毒素、生物活性、抑菌剂含量等项目外，还应考察使用末期的抑菌效力，应能保证在制剂使用过程中的微生物安全性。

合成多肽药物稳定性研究的基本原则应遵循《化学药物（原料药和制剂）稳定性研究技术指导原则（修订）》的一般性要求。结合工艺开发过程中发现的药物不稳定性因素，在稳定性考察中重点关注。

6.2 影响因素试验

通过剧烈条件下的稳定性考察，识别药物的敏感因素（如温度、湿度、光照），为处方设计和包装选择提供支持。

——高温试验：

- 条件：将供试品置于 60℃±2℃、40℃±2℃ 环境中，分别于第 0、5、10 天取样检测；
- 检测指标：外观（如微球制剂是否聚集、溶液剂是否变色）、纯度（RP-HPLC 纯度下降≤10%）、活性保留率（≥80%）、聚集物含量（≤2%）。
- 要求：若 60℃ 条件下 10 天内关键指标无显著变化，可简化后续加速试验设计。

——高湿试验：

- 条件：在 25℃±2℃、相对湿度（RH）92.5%±5%（饱和 KNO₃ 溶液）和 75%±5%（饱和 NaCl 溶液）环境中放置 10 天，期间第 5、10 天取样。
- 检测重点：吸湿性（增重≤5%，避免潮解）、粉末制剂的流动性变化（休止角变化≤10°）、化学稳定性（如交联产物的游离药物含量增幅≤3%）。

——强光照试验：

- 条件：置于 4500 Lux±500 Lux 光照箱中（同时控制温度 25℃±2℃），0、5、10 天取样；
- 关键考察：光氧化产物（如 Met 残基氧化率≤2%）、多肽二级结构变化（CD 光谱 α-螺旋含量下降≤5%）、微球表面是否出现裂纹（扫描电镜观察）。

6.3 加速试验

模拟药物在运输或储存条件偏离规定时的稳定性，预测短期稳定性趋势：通用条件：40℃±2℃、RH 75%±5%，考察时间为6个月，每1个月取样检测；

针对不同修饰技术的特殊要求：

- 微球/聚合物缓释制剂：需额外监测释放曲线变化（与0月相比，各时间点释放量偏差≤15%）、载体降解程度（PLGA分子量下降≤20%）。
- 蛋白融合修饰药物：重点检测聚集物增长（SEC-HPLC聚集物含量≤2%）、糖基化变体变化（如岩藻糖含量波动≤5%）。
- 化学交联产物：关注交联键稳定性（游离交联剂含量增幅≤0.03%）、溶出度变化（7天累计溶出率偏差≤10%）。
- 合格标准：6个月内各项指标需符合质量标准，若出现轻微超标（如纯度下降至92%-95%），需结合长期试验数据评估是否放宽条件。

6.4 长期试验

6.4.1 稳定性考察

在规定储存条件下考察药物的长期稳定性，直接支持有效期确定储存条件设定：

- 常规条件：2℃~8℃（冰箱冷藏），考察时间至少24个月，每3个月取样。
- 特殊制剂（如冻干品）：可增加-20℃±5℃条件作为备选储存方案，对比不同温度下的稳定性差异。

6.4.2 核心检测项目

应符合以下内容：

- 理化指标：纯度（下降幅度≤5%）、分子量分布（无新增杂峰）、pH值（波动≤0.5个单位）。
- 生物学活性：体外EC₅₀值变化≤30%，体内药效（如小鼠降血糖模型）保留率≥80%。
- 安全性相关：内毒素含量（≤0.5 EU/mg）、无菌性（需符合药典无菌检查要求）。
- 数据评估：当24个月数据显示关键指标仍稳定（如活性保留率≥90%），可延长考察至36个月以支持更长有效期。

6.5 配伍稳定性

评估药物在临床使用过程中（如稀释、混合）的稳定性，保障给药安全：

- 物理相容性：是否出现沉淀、浑浊（浊度仪检测OD值≤0.1）、粒径变化（微球制剂粒径增幅≤10%）；
- 化学稳定性：稀释后药物纯度下降≤3%，活性损失≤5%；
- 特殊要求：对于静脉用制剂，需检测不溶性微粒（≥10μm微粒数≤25个/mL）。

6.6 包装材料相容性

确保包装材料不影响药物稳定性，且药物成分不被包装吸附。

——包装材料选择应符合以下内容：

- 液体制剂：优先选用低吸附的硼硅玻璃或cyclic olefin polymer (COP) 塑料瓶，瓶盖垫片需为丁基橡胶（避免增塑剂迁移）；
- 冻干制剂：采用西林瓶+胶塞组合，胶塞需经硅化处理（减少蛋白吸附）。

——相容性试验应符合以下内容：

- 提取试验：将包装材料与模拟溶剂（如pH 7.4 PBS）在40℃下接触14天，检测提取物（如重金属、塑化剂）含量≤0.1 ppm；
- 吸附试验：药物溶液在包装中于2℃-8℃放置30天，浓度损失≤2%（HPLC检测）。

7 数据处理、报告与归档

7.1 数据处理

所有原始数据应妥善保存，并建立标准化数据记录模板。数据分析应使用专业软件，实验方法与关键参数、数据处理与分析方法、数据分析软件数据库访问编号等信息应清晰记录。进行数据分析与处理时，应对各指标参数进行明确定义，并选择恰当的结果呈现方式，所呈现用的图表应进行清晰备注。

7.2 报告

报告中应含有以下信息：

——研究方法部分：

修饰工艺中应明确修饰试剂种类、来源、纯度，反应体系配方，关键工艺参数的设定依据及控制方法；样品制备中应包括样品的纯化步骤、保存条件及稳定性控制措施；各指标的检测依据（如中国药典标准、国际标准方法）、仪器型号及参数、试剂来源及批号、方法学验证结果（专属性、检测限、定量限、线性范围、精密度、准确度、稳定性等）；以及动物模型选择依据、分组方案、给药剂量及途径、样本采集时间点设计。

——研究结果部分：

按数据分类逐一呈现结果，如修饰工艺部分需说明不同工艺参数对修饰率的影响，明确最优工艺条件；使用规范的图表辅助说明，如用折线图展示血药浓度-时间曲线，柱状图对比修饰前后的半衰期差异，表格汇总关键药代动力学参数；且所有数据需标注统计学意义；以及如实记录实验过程中的异常情况（如部分样品纯度不达标），分析原因并说明对研究结论的影响。

7.3 归档

实验过程中所产生的所有文件、记录、报告等资料，应妥善保管在符合条件的档案室中，确保资料的可溯源性。档案的保存期限应参照相关标准或规定执行。

参 考 文 献

- [1] 国家药品监督管理局药品审评中心. 重组胰高血糖素样肽-1受体激动剂药学研究与评价技术指导原则（试行）. 2025年9月12日
- [2] 国家药典委员会. 《中华人民共和国药典》（2025年版）. 2025.
- [3] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学合成多肽药物药学研究技术指导原则（试行）. 2023年2月17日
- [4] ICH Q7. Good Manufacturing Practice for Active Pharmaceutical Ingredients. 2000.
- [5] ICH Q8. Pharmaceutical Development. 2009.
- [6] ICH Q9. Quality Risk Management. 2005.
- [7] ICH Q11. Development and Manufacture of Drug Substances（Chemical Entities and Biotechnological/Biological Entities）. 2011.
- [8] ICH Q12. Technical and Regulatory Considerations for Pharmaceutical Product Lifecycle Management. 2019.
-