

Сравнительная фармакология нового рекомбинантного ФСГ, экспрессируемого линией клеток человека

Вольфганг Кекхлинг^{1,*}, Даниель Плаксин^{2,*}, Гленн Е Кростон³, Янни В Джепсен⁴, Кирстен Т. Маклон⁴ и Клаус Идинг Андерсен⁴

¹ «Ферринг Фармасьютикалс А/С», Копенгаген, Дания

² «Био-Технолоджи Дженерал Израиль Лтд.», «Ферринг Фармасьютикалс», Кирият-Малахи, Израиль

³ «Кростон Консалтинг», Сан-Диего, Калифорния, США

⁴ Лаборатория репродуктивной биологии, Отделение репродукции The Juliane Marie Centre, Rigshospitalet, Университетская больница Копенгагена и Копенгагенский университет, Копенгаген, Дания * (В. Кекхлинг и Д. Плаксин внесли вклад равной степени в этой работе)

Корреспонденцию следует направлять В. Кекхлинг по адресу электронной почты wkg@ferring.com

Резюме

Рекомбинантные белки ФСГ являются важными терапевтическими агентами для лечения бесплодия, включая фоллитропин альфа, экспрессируемый в клетках яичников китайского хомяка (ЯКХ), и, в последнее время, фоллитропин дельта, экспрессируемый линией человеческих клеток PER.C6. Эти рекомбинантные белки ФСГ обладают отчетливым гликозилированием и демонстрируют отчетливые фармакокинетические и фармакодинамические профили у женщин. Сравнительные эксперименты показали, что фоллитропин дельта и фоллитропин альфа проявляют одинаковую активность *in vitro* в отношении рецептора человеческого ФСГ, но различаются по их фармакокинетике у мышей и крыс. В то время как клиренс фоллитропина дельта из сыворотки частично зависел от печеночного рецептора асиалогликопротеина (АСГПР), на клиренс фоллитропина альфа не влияло ингибирование АСГПР у крыс или генетическая абляция у мышей. Различные свойства фоллитропина дельта и фоллитропина альфа, вероятно, вносят вклад в различные фармакокинетические и фармакодинамические профили, наблюдаемые у женщин, и влияют на их эффективность в терапевтических протоколах лечения бесплодия.

Ключевые слова фолликулостимулирующий гормон, фоллитропин, дельта, гонадотропин, клиренс, рекомбинантный ФСГ, гликозилирование ФСГ.

Введение

Фолликулостимулирующий гормон (ФСГ), выделяемый передней долей гипофиза в ответ на гонадотропин-рилизинг-гормон (ГнРГ), играет центральную роль в репродукции у женщин, стимулируя рост и созревание фолликулов в яичниках и регулируя в них стероидогенез (1). Кроме того, экзогенный ФСГ играет центральную роль в лечении бесплодия (2), включая экстракорпоральное оплодотворение (ЭКО) или интрацитоплазматическую инъекцию сперматозоидов (ИЦИС), причем протокол антагонистов ГнРГ становится все более распространенным благодаря безопасности и удобству (3). В результате постоянные инновации в терапии бесплодия, вероятно, будут включать как новые белки ФСГ, так и новые протоколы лечения.

ФСГ состоит из двух сильно гликозилированных белковых субъединиц, и при экспрессии рекомбинантного ФСГ (рФСГ) для терапевтического использования гены, кодирующие

человеческие субъединицы ФСГ, вводятся в линию клеток млекопитающих, из которых секретируется и очищается белок ФСГ (4). Ранние рекомбинантные белки ФСГ, экспрессируемые в клетках яичника китайского хомяка (ЯКХ), называются фоллитропин альфа или фоллитропин бета (4, 5, 6), и проявляют отличное гликозилирование по сравнению с эндогенным человеческим ФСГ, полученным из мочи, встречаются в виде ряда изоформ различной кислотности которые в среднем немного менее кислые при изоэлектрической фокусировке (7). По сравнению с человеческим ФСГ из мочи, рФСГ, полученный из клеток ЯКХ, не содержит остатков GlcNAc, имеет более низкий процент альфа-1-6 фукозы и не содержит альфа-2,6-связанной сиаловой кислоты, тогда как ФСГ в моче содержит как альфа 2,3-, так и альфа 2,6-связанную сиаловую кислоту (7, 8, 9).

Недавно был описан фоллитропин дельта (FE 999049), первый рекомбинантный белок ФСГ, находящийся в клинической разработке, который экспрессируется в линии клеток человека (PER.C6), с индивидуальной дозировкой, оптимизированной в зависимости от веса каждого пациента и уровня антимюллерова гормона (АМГ) (10, 11, 12). У женщин-добровольцев фоллитропин дельта демонстрировал отличную фармакокинетику и фармакодинамику, с более высокой экспозицией и более низким клиренсом в сыворотке, чем фоллитропин альфа (13). Более того, результаты этого исследования фазы 1 продемонстрировали, что биоактивность фоллитропина дельта в тесте Стилмана-Поли на крысах по сравнению с эталонным стандартом не позволяла прямо прогнозировать пропорциональную фармакодинамическую активность у женщин (13). Эти наблюдения предполагают, что более глубокое понимание различий фармакодинамики и фармакокинетики этих рекомбинантных белков ФСГ поможет в их терапевтическом применении.

Хотя фоллитропин альфа и фоллитропин дельта имеют одинаковую аминокислотную последовательность ФСГ, они различаются по их гликозилированию (14). Фоллитропин дельта имеет более высокую долю три- и тетрасиалированных гликанов, содержащих как альфа-2,3-, так и альфа-2,6-связанную сиаловую кислоту, в то время как фоллитропин альфа содержит только альфа-2,3-связанную сиаловую кислоту в дополнение к другим различиям в гликозилировании. Более кислые изоформы ФСГ с большей модификацией сиаловой кислоты и более низкой изоэлектрической точкой менее эффективны *in vitro* в отношении рецептора человеческого ФСГ по сравнению с более основными изоформами ФСГ, а также демонстрируют более низкий клиренс сыворотки и более длительный период полураспада в кровотоке (15, 16, 17, 18, 19).

Чтобы изучить, как различное гликозилирование фоллитропина альфа и фоллитропина дельта влияет на их фармакологическую активность, было проведено прямое сравнение биоактивности обоих рекомбинантных препаратов ФСГ *in vitro* и *in vivo*. Для этой цели определяли аффинность связывания фоллитропина дельта и фоллитропина альфа с рецептором человеческого ФСГ, и их биоактивность была протестирована на клеточной линии НЕК-293, стабильно экспрессирующей рецептор ФСГ человека, и в гранулезных клетках человека, выделенных во время отбора ооцитов перед ЭКО. Фармакокинетическое поведение двух белков рФСГ также проанализировали на грызунах, изучили роль рецептора АСПП у мышей и крыс в выведении рФСГ из кровообращения.

Методы

Фоллитропин альфа и фоллитропин дельта

Фоллитропин альфа, продуцируемый в клетках ЯКХ, закупили (Гонал Ф, «Мерк Сероно», партии ВА018199А, АУ009535, АУ003768, ВАD 04143, PS-3577, Y02A9111), разбавили и

протестировали, как указано в каждом экспериментальном методе. Образцы фоллитропина дельта, полученные из линии клеток человека PER.C6, были предоставлены «Ферринг Фармасьютикалс» (партии FSMB01 / 2, G16641, G11105, CE0041, 1178-160), оценены и разведены для тестирования, как указано в каждой экспериментальной процедуре. Первый международный стандарт рекомбинантного ФСГ (NIBSC 92/642) был получен от NIBSC (Национальный институт биологических стандартов и контроля).

Связывание с человеческим рецептором ФСГ

Анализ замещения связывания для рецептора человеческого ФСГ выполняли с использованием [пропионил-3H] ФСГ в качестве радиоактивной метки («Квотиент Ресерч», Великобритания). Буфер для инкубации и стоп-буфер представляли собой 10 мМ Трис, 25 мМ MgCl₂, 0,5% BSA, pH 7,5. Фоллитропин дельта, используемый в этих экспериментах, имел концентрацию белка 0,62 мг / мл и предполагаемую молекулярную массу 33000 г / моль. Образец фоллитропина альфа с предполагаемой молекулярной массой 31000 г / моль, с 5,5 мкг или 75 МЕ порошка, растворенным в 1,2 мл инкубационного буфера, и маточный раствор с концентрацией 0,15 мкМ, разделяли на аликвоты и хранили при -20 ° С. Для обоих соединений все разведения проводили в инкубационном буфере.

Для изготовления мембран замороженный осадок клеток НЕК-293, экспрессирующих человеческий рецептор ФСГ (приблизительно 600 миллионов клеток), суспендировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, 5 мМ ЭДТА-Трис, 20 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 5 мМ MgCl₂, 1,5 мМ CaCl₂, 10 мкг / мл ингибитора трипсина, 1 мкг / мл лейпептина, 75 мкг / мл PMSF, pH 7,4. После центрифугирования при 50000 g в течение 15 мин (4 ° С) осадок суспендировали в том же буфере с добавлением 10% глицерина. Концентрацию белка определяли по методике Брэдфорда, и аликвоты хранили при -80 ° С.

Для инициации связывания мембраны рецепторов ФСГ, содержащие 180 мкг белка, инкубировали в течение одного часа при 37°C с 0,4 нМ [пропионил-3H] ФСГ и указанным количеством фоллитропина альфа или фоллитропина дельта. Фильтры Unifilter GF / В (Уотман, Великобритания) предварительно пропитывали 10 мМ трис-НСl, 25 мМ MgCl₂, 0,5% BSA, pH 7,5. Инкубированные смеси фильтровали через предварительно пропитанные фильтры, используя коллектор «Паккарл ФилтэМэйт», и промывали 3–4 раза тем же буфером. Затем фильтры сушили, добавляли сцинтилляционную жидкость МИКРОСЦИНТ 0 («ПеркинЭлмер») (30 мкл на лунку) и проводили подсчет сцинтилляций с использованием прибора «Паккард Топкаунт эНэКсТ» (1 мин на лунку).

K_d оценивали по уравнению Ченга-Прусова (20).

Биоактивность in vitro с использованием клеточной линии НЕК-293, экспрессирующей рецептор человеческого ФСГ

Клетки эмбриональной почки человека 293 (НЕК-293), стабильно трансфицированные рецептором человеческого ФСГ (21), размораживали из замороженных аликвот, выращивали и пассировали в DMEM с 4,5 г / л d-глюкозы («Байолоджикал Индастрис», Израиль), содержащей 5% фетальной бычьей сыворотки, инактивированной нагреванием («Байолоджикал Индастрис») и 2 мМ l-глутамина («Байолоджикал Индастрис»). Для анализов клетки, экспрессирующие рецептор чФСГ, инкубировали с указанными концентрациями белков рФСГ в течение 90 мин. В конце инкубации клетки лизировали и цАМФ, продуцируемый в ответ на стимуляцию рФСГ, количественно определяли с помощью набора для анализа цАМФ XS + цАМФ DiscoverX HitHunter («Дискаверэкс», Фремонт, Калифорния, США), измеряя люминесценцию с помощью планшет-ридера

TECAN Infinite F200 и сообщая RLU. Данные анализировали с использованием четырехпараметрического подбора кривой («Графпед Призм»).

Биоактивность *in vitro* с использованием свежих лютеинизированных гранулезных клеток пациентов ЭКО

Для определения активности белков рФСГ клетки гранулезы человека отбирали у 13 женщин в возрасте 26–39 лет ($34,5 \pm 1,2$ года, среднее \pm СОС), проходящих лечение для ЭКО в Университетской больнице Копенгагена, с одобрения проекта этическим комитетом муниципалитетов Копенгагена и Фредериксберга (Н-32013-201). В исследованиях, в которых сравнивали белки рФСГ, использовались клетки восьми из этих пациентов. Женщин стимулировали либо по протоколу длительного приема агонистов, либо по стандартному протоколу антагонистов. Во всех случаях для окончательного созревания ооцитов использовалась болюсная инъекция ХГЧ за 36 ч до сбора ооцитов. Клетки гранулезы собирали в связи с аспирацией ооцитов для лечения ЭКО. После удаления ооцитов из фолликулярных аспириатов клетки гранулезы каждого пациента собирали в пул и очищали с использованием градиента лимфопрепарата («Стемсел Текнолоджис», Гренобль, Франция), где жидкость оставалась в верхнем слое, эритроциты собирались в осадок, и клетки гранулезы располагались в промежуточном слое. После аспирации слоя клеток гранулезы большие скопления клеток удаляли под микроскопом и хранили при -80°C до использования для очистки ДНК и обнаружения полиморфизма 307/680 FSHR и -29 FSHR (22). Суспензию отдельных гранулезных клеток готовили из более мелких скоплений клеток путем добавления смеси протеолитических ферментов Трипл (в основном трипсин) на срок до 5 мин или до тех пор, пока скопления не распались. Протеазы инактивировали добавлением ФСБ, и суспензию центрифугировали (400 g 10 мин) для осаждения клеток гранулезы. Клетки гранулезы культивировали в 4-луночных чашках («Нанк», Роскильд, Дания) при 37°C с 6,5% O_2 в культуральной среде, состоящей из среды МЕМ Альфа («Джибкоу») с добавлением человеческого сывороточного альбумина 10 мг / мл («СиэСэл Беринг», Лингби, Дания); 50 мг / мл ФСБ («Джибкоу»); 2 мМ ГлютаМАКС («Джибкоу»), смесь инсулин-трансферрин-селен («Джибкоу»); и Пен/стреп («Джибкоу»). Первые 24 ч клетки оставляли прикрепляться ко дну в присутствии 50 мг / мл ФСБ, после чего культуральную среду меняли. Через 48 часов клетки стимулировали рФСГ в течение 24 часов. После этого среду собирали, быстро замораживали и хранили при -80°C до размораживания для измерения гормонов. Клетки, прикрепленные ко дну, перед лизированием промывали предварительно нагретым ФСБ («Джибкоу»). Клетки гранулезы лизировали лизисным буфером из набора для очистки мРНК (см. ниже), быстро замораживали и хранили при -80°C до очистки РНК и количественной ПЦР.

Очистку мРНК проводили с использованием набора Agilent Absolutely RNA nanoprep («Эйджилент Текнолоджис»). Все этапы выполнялись на льду, за исключением элюирования выделенной мРНК. Синтез первой цепи кДНК осуществляли с использованием набора для обратной транскрипции кДНК Applied Biosystems High Capacity («Эпплайд Биосистемс») со следующими температурными профилями: 25°C в течение 10 минут, 37°C в течение 120 минут, 85°C в течение 5 секунд и 4°C до прекращения синтеза. Все синтезы кДНК первой цепи были выполнены на термоциклере (блок термоциклера ThermoFisher Scientific Arktik). Универсальный мастер-смесь для ПЦР TaqMan («Эпплайд Биосистемс») и предварительно разработанные зонды TaqMan были помечены маркировкой FAM («Эпплайд Биосистемс»): Cyp19a1 (Hs00903412_m1), 3beta-HSD (Hs01084547_gH), INHA (HS00171410_m1) и GAP991 как конститутивный ген. Реакции кПЦР выполняли в общем объеме 10 мкл, состоящем из смеси 0,5 мкл $20 \times$ TaqMan анализ

экспрессии гена, 5,0 мкл $2 \times \text{TaqMan}$ мастер-смесь экспрессии генов, 2,0 мкл кДНК и 2,5 мкл воды без РНКазы для каждой отдельной реакции. Планшеты для количественной ПЦР («Рош Диагностикс») перед анализом центрифугировали при 1000 g с использованием LightCycler 480 («Рош») со следующей программой в течение 45 циклов; предварительная инкубация: 50 ° C в течение 2 минут, затем 95 ° C в течение 10 минут, амплификация при 95 ° C в течение 15 с и 60 ° C в течение 1 минуты, с последующим количественным измерением, заканчивающимся охлаждением до 40 ° C за 30 с. Все образцы были проанализированы в двух экземплярах и нормализованы до соответствующего значения экспрессии гена GAPDH.

Расчет уровня экспрессии каждого отдельного гена проводили в соответствии с методом сравнительной КТ для относительной количественной оценки экспрессии гена (23). Концентрации эстрадиола и прогестерона измеряли с помощью имеющихся в продаже наборов для ELISA («НоваТек Иммунодиагностика», Германия). Для разведения образцов среды перед измерениями использовали раствор ФСБ, содержащий 1% BSA. При разведении эстрадиола 1:10 и прогестерона 1: 500 значения находились внутри стандартной кривой. Все образцы проанализированы в двух экземплярах, и использовалось среднее значение повторностей. Ингибин А и ингибин В измеряли с использованием имеющихся в продаже наборов для ELISA («ЭншЛабс», Вебстер, США). Для разбавления образцов использовалась сыворотка от женщин в постменопаузе, лишенная ингибина А и ингибина В.

Анализ Стилмана-Поли

Фоллитропин альфа был получен из флакона лиофилизата, который, по заявлению производителя, содержал 600 МЕ рФСГ каждый, и был заполнен по массе таким образом, чтобы содержать 44 мкг ФСГ на 1 мл. Фоллитропин дельта измеряли с помощью гель-хроматографии ВЭЖХ, чтобы он содержал 39 мкг ФСГ на мл и 600 МЕ / мл в жидком виде.

Анализ Стилмана-Поли (24) проводили в соответствии с монографией Фармакопеи США для менотропинов и монографией Фармакопеи ЕС для урофоллитропина (Монография Фармакопеи США: Менотропины 4/30/08, Фармакопеи ЕС: Урофоллитропин 01/2008/0958) незрелых самок крыс Sprague-Dawley («Харлан», Иерусалим, Израиль) в возрасте 20–21 дня (35–45 г), имеющих такой вес, что разница между самой тяжелой и самой легкой крысой не превышает 10 г. Животных содержали на стандартной диете и предоставляли свободный доступ к воде, случайным образом распределяя животных для эксперимента по семь в каждой группе.

Раствор А, использованный для разведения белков для инъекций, представлял собой 130 mM NaCl, 75 mM Na₂HPO₄–2H₂O, 0,1% BSA, pH 7,5. ХГЧ разводили до 700 МЕ / мл в растворе В, который включает 130 mM NaCl, 75 mM Na₂HPO₄–2H₂O, 1% BSA, pH 7,5, а затем разбавляли в растворе А до 70 МЕ / мл, который затем использовали для приготовления белков и контроля для инъекций. Для каждого белка рФСГ один раз в день в течение трех дней вводили объем 0,2 мл с тремя уровнями доз подкожно в область спины у каждого животного, в соответствии с установленными руководящими принципами анализа, при этом инъекция также содержала 14 МЕ ХГЧ («Сероно»). Вес каждого животного регистрировали в начале и в конце каждого эксперимента. Через 24 часа после последней инъекции животных умерщвляли, удаляли яичники и очищали от посторонних тканей, осушали и взвешивали пары яичников.

Специализированная фармакокинетика у крыс (конкуренция ASF)

Идентичные объемы (0,5 мл) и концентрации (4 мкг / мл) фоллитропина дельта и фоллитропина альфа вводили внутривенно самцам крыс Sprague-Dawley массой 80-85 г («Харлан») в присутствии и в отсутствие асиалофетуина («Сигма»). У животных (2 в каждой группе лечения) брали кровь в определенные моменты времени (0,25, 1, 2 и 4 часа после инъекции), и сыворотку тестировали на концентрацию ФСГ с помощью ELISA в двух повторностях («ДиаРДжи Инструментс ГмбХ», Марбург, Германия). Для ELISA к образцам добавляли 100 мкл конъюгата фермента против ФСГ, и планшеты инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре. Содержимое лунок удаляли и 5 раз промывали водой, переворачивая планшеты для просушки. Добавляли раствор субстрата и инкубировали 5 мин при комнатной температуре перед добавлением 50 мкл стоп-раствора, оптическую плотность считывали при 450 нМ. Антитело против человеческого ФСГ, используемое в ELISA для обнаружения рекомбинантных белков человеческого ФСГ, не показало измеримого вмешательства со стороны сыворотки крови крысы или мыши (данные не показаны). Результаты при наличии и отсутствии АЧС сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента при $P < 0,05$.

Специализированная фармакокинетика у мышей (модель нокаута АСГПР)

Гомозиготные мыши с нокаутом рецептора асиалогликопротеина (КО) (B6; 129S7-Asgr2tm1Her / J) (25) были получены из лаборатории «Джексон», а мыши C57Bl / 6J дикого типа были получены из лабораторий «Харлан». Вес мышей составлял от 22 до 24 г. Лиофилизированный порошок фоллитропина альфа в лаборатории восстановили добавлением раствора для разведения. Препарат фоллитропина дельта получили в виде раствора. Одинаковые объемы (0,5 мл) и концентрации (6 мкг / мл) фоллитропина альфа и фоллитропина дельта вводили подкожно (п / к) как самцам мышей C57Bl / 6J, так и самцам мышей с нокаутом АСГПР. У животных ($n = 3$ в каждой группе лечения) брали кровь в определенные моменты времени (0,5, 3, 6, 9 и 24 ч после введения дозы), и сыворотку тестировали на концентрацию ФСГ с помощью ELISA в трех повторностях.

Средние сывороточные концентрации фоллитропина дельта были нормализованы на основе концентрации ELISA в исходных флаконах по сравнению с фоллитропином альфа. Строили график зависимости концентрации ФСГ в сыворотке от времени и использовали классическое правило трапеций для вычисления площади под кривой (AUC) с помощью программного обеспечения «PK Solutions 2.0». Значение AUC FE фоллитропина дельта представлено в виде процента от значения AUC, рассчитанного для фоллитропина альфа. Результаты в каждый момент времени сравнивали между животными дикого типа и животными с нокаутом АСГПР, используя t-критерий Стьюдента с $P < 0,05$ в качестве критерия значимости.

Результаты

Связывание с человеческим рецептором ФСГ

Аффинность связывания рецептора ФСГ измеряли путем вытеснения радиоактивно меченного ФСГ из рецептора ФСГ человека. Меченый пропионил-3H ФСГ использовался в качестве радиоактивно меченного лиганда в этих исследованиях с мембранами, полученными из рекомбинантных клеток HEK 293, экспрессирующих рецептор человеческого ФСГ. Значение K_d [пропионил-3H] FSH в этом анализе составляло 0,2 нМ с B_{max} 28 фмоль / мг белка (данные не показаны). Средняя IC50 в трех экспериментах по замещению пропионил-3H ФСГ практически идентична для двух белков рФСГ, 0,302 нМ для фоллитропина альфа и 0,299 нМ для фоллитропина дельта, с результатами

репрезентативного эксперимента, показанными на Рис.1, рассчитанная K_i составляет приблизительно 0,1 нМ для обоих белков.

Рисунок 1

Вытеснение радиоактивно меченного пропионил-3Н ФСГ из человеческого рецептора ФСГ измеряли как уменьшение количества связанных DPM при указанных концентрациях фоллитропина дельта (белые кружки, синий) и фоллитропина альфа (белые квадраты, красный) или общего связывания в отсутствие немеченого рекомбинантного белка ФСГ (белый треугольник, черный). Каждую концентрацию тестировали дважды, с указанием среднего значения и стандартного отклонения. Данные были скорректированы с использованием подбора кривой по четырем параметрам. Показаны результаты одного эксперимента, без результатов двух других тестов, дающих аналогичные показатели.

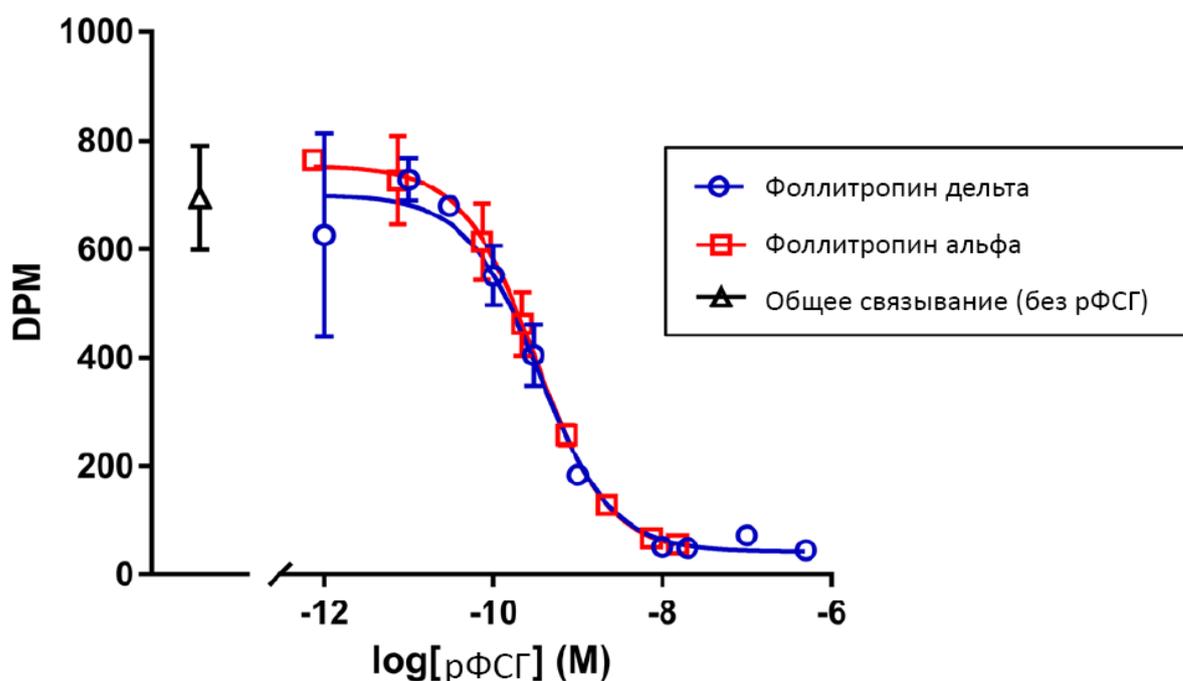
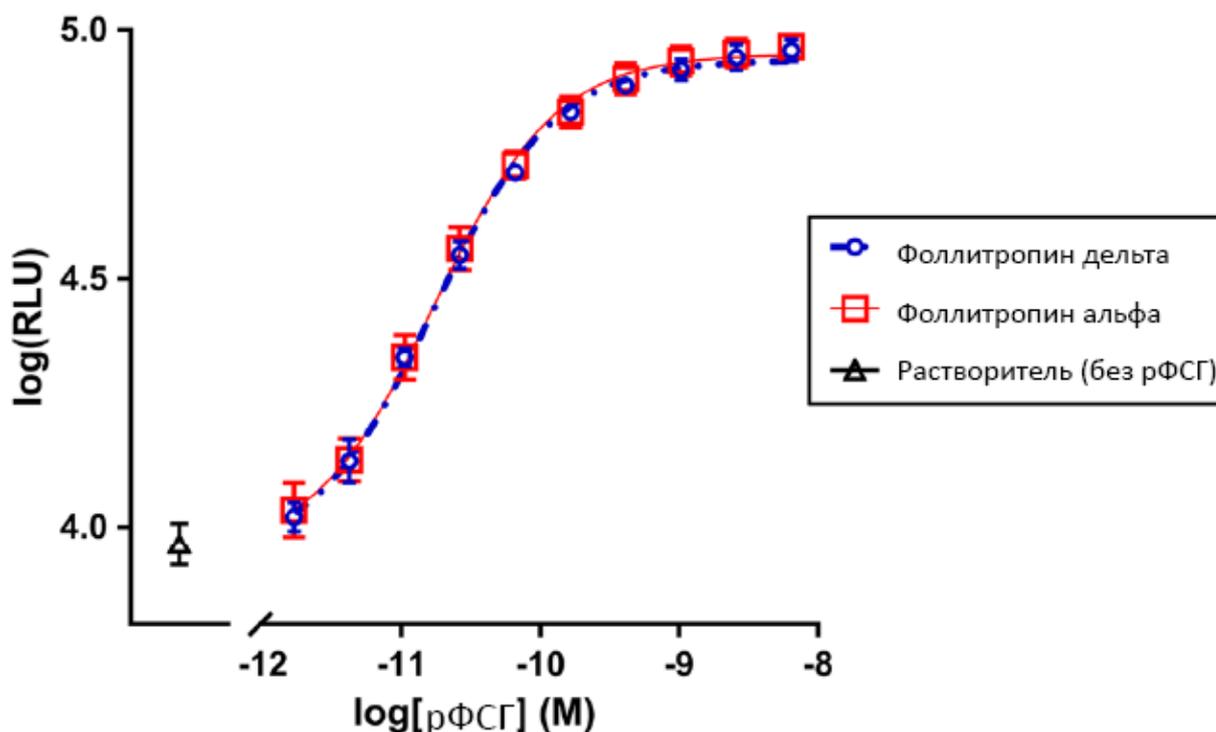


Рисунок 2

Производство цАМФ в ответ на активацию рецептора человеческого ФСГ в стабильно трансфицированных клетках HEK-293 измеряли при указанных концентрациях фоллитропина дельта (белые кружки, синий), фоллитропина альфа (белые квадраты, красный) или в отсутствие рекомбинантного ФСГ (белые треугольники, черный) с увеличением люминесценции (RLU), пропорциональным увеличению присутствующего цАМФ. Каждую концентрацию белков рФСГ тестировали в четырех повторностях с указанием среднего значения и стандартного отклонения.



Оценка биоактивности *in vitro* с использованием линии клеток НЕК-293, экспрессирующих рецептор ФСГ у человека

Чтобы сравнить биологическую активность фоллитропина дельта и фоллитропина альфа *in vitro*, оба белка рФСГ инкубировали *in vitro* с эмбриональными клетками почки человека (клетки НЕК-293), сконструированными для стабильной экспрессии рецептора человеческого ФСГ, измеряя продукцию второго мессенджера цАМФ. Эффективность двух белков рФСГ была практически идентична в этом анализе (Рис. 2), при этом фоллитропин альфа активировал рецептор чФСГ с EC50 0,0174 нМ, а фоллитропин дельта продуцировал EC50 0,0171 нМ. Во втором независимом эксперименте фоллитропин альфа давал EC50 0,0182 нМ, а фоллитропин дельта давал EC50 0,0181 нМ (данные не показаны).

Оценка биоактивности *in vitro* с использованием свежих лютеинизированных клеток гранулезы от пациентов ЭКО

Затем сравнивали биологическую активность фоллитропина дельта и фоллитропина альфа *in vitro* с использованием лютеинизированных клеток гранулезы, выделенных из фолликулов пациентов с ЭКО и экспрессирующих эндогенный рецептор ФСГ человека. В этих экспериментах изучали влияние белков рФСГ на продукцию эстрадиола, прогестерона, ингибина А и ингибина В гранулезными клетками, а также на экспрессию генов, включая CYP19a1, 3B-HSD и Inh A. Клетки гранулезы собирали после запуска окончательного созревания фолликулов при отборе ооцитов у 13 женщин, которым перед ЭКО проводилась контролируемая стимуляция яичников. Оба белка рФСГ индуцировали выработку прогестерона примерно на 300%, нормализованные к базовым уровням, в отсутствие рФСГ ($P > 0,1$) и с аналогичной эффективностью (рис. 3А). Ингибин А в супернатанте был увеличен обоими белками рФСГ примерно на 35-40% по сравнению с базовым уровнем (рис. 3В), в то время как эстроген и ингибин В не были значительно повышены ни одним из белков рФСГ (данные не показаны). Экспрессию генов, регулируемых ФСГ, изучали в тех же исследованиях клеток гранулезы человека, при этом в конце инкубационного периода получали РНК для количественного определения.

Экспрессия 3 β -HSD индуцировалась примерно на 200% обоими белками рФСГ (рис. 3С), ген CYP19a1 индуцировался на 40–50% обоими белками рФСГ (данные не показаны), а экспрессия INHA индуцировалась обоими белками рФСГ на 50–100 % от исходного уровня (данные не показаны).

Анализ Стилмана-Поли

Концепция биотеста Стилмана-Поли использовалась для демонстрации биоактивности фоллитропина дельта у крыс по сравнению с международным эталонным стандартом рекомбинантного ФСГ, продуцируемого в клетках ЯКХ. При сравнении фоллитропина дельта и фоллитропина альфа с помощью анализа Стилмана-Поли, основанного на дозировании с ранее оцененной биоактивностью, два соединения образуют параллельные кривые и, таким образом, очень похожи по своей фармакодинамике у крыс (рис. 4).

Рисунок 3

Индукцию высвобождения гормона и повышение экспрессии генов измеряли в клетках гранулезы человека, подвергнутых действию белков рФСГ *in vitro*. Были включены клетки от восьми пациентов, с дублированными образцами клеток от каждого пациента, протестированными при каждой концентрации рФСГ, нормализация ответов относительно уровня, наблюдаемого в отсутствие рФСГ (100%), с точками данных, отражающими среднее значение и СОС. Ответ на фоллитропин дельта (белые кружки, синий) и фоллитропин альфа (белые квадраты, красный) показан в отношении секреции прогестерона (А), секреции ингибина А (В) и экспрессии гена 3 β -HSD (С).

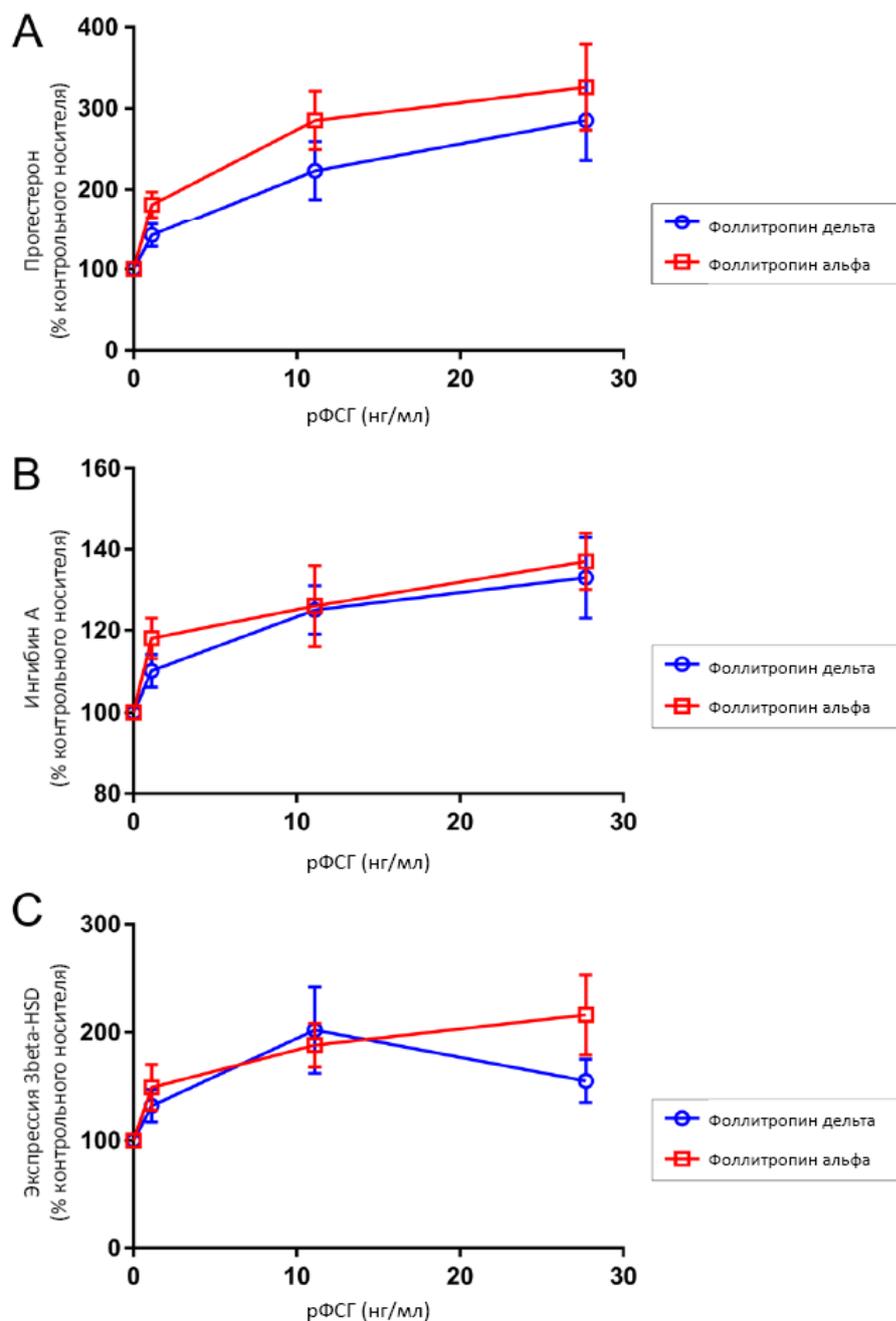


Рисунок 4

Биоактивность фоллитропина дельта (синие столбцы) и фоллитропина альфа (красные столбцы) сравнивали *in vivo* на крысах в биотесте Стилмана-Поли, измеряя увеличение веса яичников при введении указанной общей дозы белков рФСГ. Столбцы представляют собой среднее значение для 14 животных в каждой дозовой группе, а столбцы ошибок представляют стандартное отклонение.

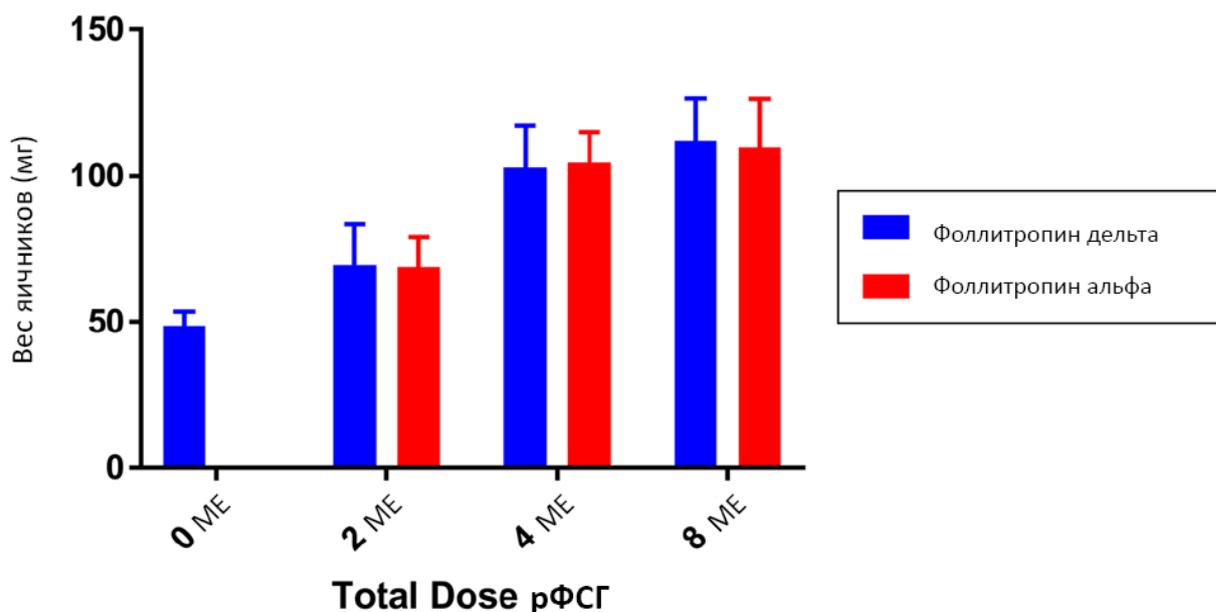
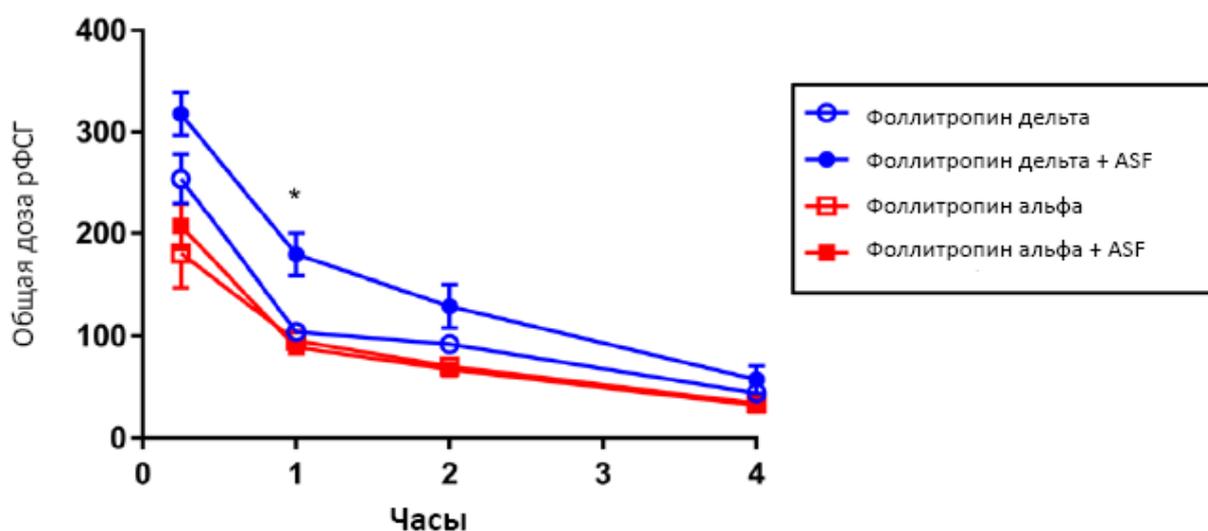


Рисунок 5

Клиренс фоллитропина дельта (синие кружки) и фоллитропина альфа (красные квадраты) сравнивали после внутривенной инъекции крысе, в присутствии насыщающей дозы ASF (закрашенные символы) или в отсутствие совместно введенной ASF (открытые символы). Сыворотку, взятую в указанные моменты времени, анализировали на концентрацию рФСГ. С помощью t-критерия Стьюдента сравнивались результаты в присутствии или отсутствии АЧС, при этом звездочка (*) указывает на значительную разницу ($P < 0,05$).



Специализированная фармакокинетика у крыс (конкуренция ASF)

Чтобы изучить роль АСГПР в клиренсе фоллитропина дельта и фоллитропина альфа, белки рФСГ вводили крысам внутривенно в присутствии или в отсутствие насыщающей дозы асиалофетуина (ASF), лиганда АСГПР, который может конкурировать и блокировать печеночный клиренс других лигандов АСГПР. Совместная инъекция насыщающей дозы ASF снижает клиренс фоллитропина дельта из сыворотки, что приводит к увеличению AUC на 42% по сравнению с отсутствием ASF (рис. 5) и значительной разнице в уровне ASF в

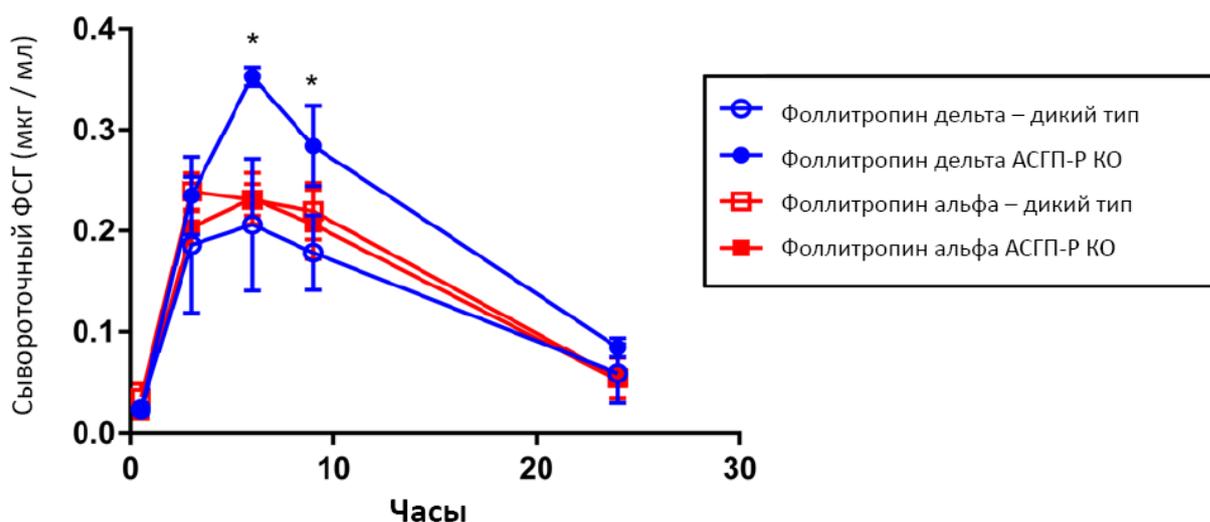
плазме через один час, в то время как совместная инъекция с ASF существенно не влияла на клиренс или уровень в плазме фоллитропина альфа.

Специализированная фармакокинетика у мышей (модель нокаута АСГПР)

Для дальнейшего изучения роли АСГПР в клиренсе фоллитропина альфа и фоллитропина дельта их фармакокинетику сравнивали у мышей дикого типа и мышей с нокаутом АСГПР, которым подкожно вводили идентичные объемы и концентрации белка (рис. 6). Фоллитропин альфа и фоллитропин дельта показали сходные фармакокинетические профили после подкожной инъекции мышам дикого типа. Однако у мышей с дефицитом АСГПР клиренс фоллитропина дельта из сыворотки был снижен, а AUC в сыворотке после инъекции фоллитропина дельта увеличилась на 40% по сравнению с фоллитропином альфа со значительной разницей в концентрациях в плазме через шесть и девять часов, что подтверждает гипотезу о том, что клиренс фоллитропина дельта из сыворотки включает АСГПР, в то время как клиренс фоллитропина альфа меньше полагается на этот механизм.

Рисунок 6

Клиренс фоллитропина дельта (синие кружки) и фоллитропина альфа (красные квадраты) сравнивали у мышей дикого типа (пустые символы) и мышей с нокаутом АСГПР (закрашенные символы), определяя концентрацию рФСГ в сыворотке крови в различные моменты времени. С помощью t-критерия Стьюдента сравнивались результаты в присутствии или отсутствии ASF, при этом звездочка (*) указывает на значительную разницу ($P < 0,05$).



Обсуждение

Фоллитропин дельта и фоллитропин альфа проявляют различные фармакокинетические и фармакодинамические свойства у здоровых женщин-добровольцев, при этом фоллитропин дельта демонстрирует более низкий клиренс из сыворотки, вызывая большую экспозицию и больший фармакодинамический ответ (13). Кроме того, фоллитропин дельта показывает не меньшую частоту наступления беременности и живорождаемости по сравнению с фоллитропином альфа, с пониженной частотой таких осложнений, как СГЯ (39). Различия, клинически наблюдаемые между двумя белками рФСГ, могут быть вызваны различиями в их гликозилировании (14), поскольку вариации гликозилирования влияют на фармакокинетику и фармакодинамику ФСГ (15, 16, 17, 18, 19). Чтобы лучше понять

клинические различия, наблюдаемые между двумя белками рФСГ, мы сравнили их передачу сигналов через рецептор человеческого ФСГ и их фармакокинетику у грызунов.

При прямом сравнении было обнаружено, что фоллитропин дельта и фоллитропин альфа вызывают неразличимую активность в отношении рецептора человеческого ФСГ *in vitro*. Два белка рФСГ показали одинаковую очевидную аффинность связывания с человеческим рецептором ФСГ и практически одинаковую активность в активации рецептора человеческого ФСГ в анализе на основе клеток НЕК-293, измеряющем индукцию продукции цАМФ в ответ на агонистический лиганд. Различия в клинической активности двух белков рФСГ вряд ли могут быть вызваны различиями в их связывании и активации рецептора ФСГ.

Далее, при сравнении двух белков рФСГ, они вырабатывали аналогичные ответы *in vitro* в лютеинизированных клетках гранулезы, полученных от пациентов, измеряя продукцию гормона, индуцированную ФСГ, и регуляцию генов. Помимо индукции выработки прогестерона до аналогичных уровней, оба белка рФСГ увеличивали экспрессию 3 β -HSD, фермента, ответственного за превращение прегненолона в прогестерон (26). Умеренная индукция экспрессии гена CYP19a1 обоими белками рФСГ согласуется с предыдущими сообщениями о клетках гранулезы (27, 28, 29), как и индукция как экспрессии гена INHA, так и секреции белка ингибина А (30). Отсутствие повышения эстрогена и ингибина В в этих исследованиях согласуется со стадией, на которой были собраны клетки гранулезы, после того, как пациенты прошли через контролируемую стимуляцию яичников и запуск окончательного созревания ооцитов, смещая их от экспрессии фолликулярных генов и выработки гормонов к экспрессии гена лютеиновой фазы (31). Кроме того, отсутствие источника стероидных предшественников для биосинтеза эстрогенов в этой системе *in vitro* предотвращало значительную продукцию эстрогена (32).

Различия в ответах на фоллитропин дельта и фоллитропин альфа у крыс и человека могут быть частично связаны с различиями в фармакокинетики, включая клиренс. Потенциальным механизмом клиренса рФСГ из сыворотки крови является рецептор асиалогликопротеина (АСГПР) в печени, который опосредует быстрый клиренс из сыворотки гликопротеинов, содержащих терминальную галактозу, GalNac или сиаловую кислоту альфа_{2,6}, и GalNac с сиаловой кислотой 2,6, причем последняя имеет высокое сродство к крысиному АСГПР (33, 34).

Ингибирование АСГПР-зависимого клиренса у крыс путем совместной инъекции насыщающей дозы ASF (35) снижало клиренс фоллитропина дельта из сыворотки, но не влияло на клиренс фоллитропина альфа. Точно так же клиренс фоллитропина дельта был снижен у мышей с нокаутом АСГПР по сравнению с мышами дикого типа, что дополнительно подтверждает роль печеночного АСГПР в клиренсе фоллитропина дельта, но не фоллитропина альфа из сыворотки. Это различие в печеночном клиренсе рФСГ из сыворотки, вероятно, приведет к разным метаболическим последствиям для двух белков рФСГ.

Другие факторы также могут играть роль в особой фармакокинетики фоллитропина дельта. У человека экспрессия печеночного АСГПР ниже, чем у мышей или грызунов, что предполагает меньшую зависимость от этого механизма клиренса у людей (36). Почечный клиренс также играет роль в фармакокинетики ФСГ, и большее содержание сиаловой кислоты в фоллитропине дельта по сравнению с фоллитропином альфа, с увеличенным зарядом и размером, вероятно, приведет к более низкому почечному клиренсу (37, 38), а также к влиянию на печеночный клиренс.

Отличительные свойства фоллитропина дельта имеют важное значение для его фармакологии и клинического использования. В анализе Стилмана – Поли для определения биоактивности ФСГ используется рекомбинантный эталонный стандарт (1-й IS FSH, рекомбинантный 92/642), экспрессируемый в клетках ЯКХ. В результате биоактивность в анализе Стилмана – Поли по сравнению с эталонным стандартом напрямую не прогнозирует фармакодинамический ответ фоллитропина дельта у людей. В результате важно дозирование фоллитропина дельта в соответствии с массой, а не биологической активностью, измеренной у крысы. Этот принцип реализуется при клинической разработке фоллитропина дельта с индивидуальным дозированием по массе, оптимизированным для каждого пациента в зависимости от его уровня АМГ и веса (11, 12). Различия между фармакологией фоллитропина дельта и фоллитропина альфа также предполагают, что один не должен напрямую заменяться другим в одной клинической процедуре. Будущие инновации в лечении бесплодия должны учитывать влияние уникальных свойств белков рФСГ на их терапевтическое использование.

Заявление о конфликте интересов

Гленн Кростон - консультант в компании «Ферринг Фармасьютикалс». Даниэль Плаксин - сотрудник компании «БиТиДжи Израиль», дочерней компании «Ферринг Фармасьютикалс». Клаус Йдинг Андерсен, Янни В. Джепсен и Кирстен Т. Маклон получили финансирование от «Ферринг Фармасьютикалс». Вольфганг Кекхлинг - сотрудник «Ферринг Фармасьютикалс А/С».

Финансирование

Это исследование финансировалось «Ферринг Фармасьютикалс» и ее дочерними компаниями.