

Maria Ciliberti

**LA TECNOLOGIA IBSA
E LE GONADOTROPINE
ALTAMENTE PURIFICATE:
FOSTIMON, GONASI HP
E MERIOFERT**



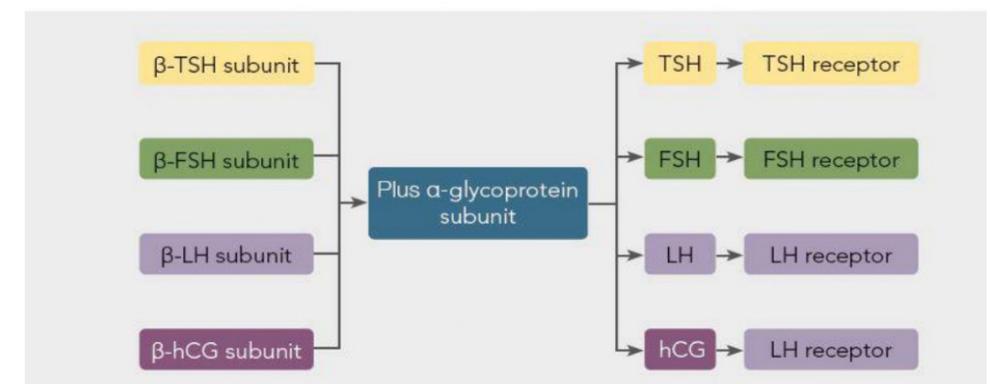
La tecnologia IBSA e le gonadotropine altamente purificate: Fostimon, Gonasi HP e Meriofert

Maria Ciliberti

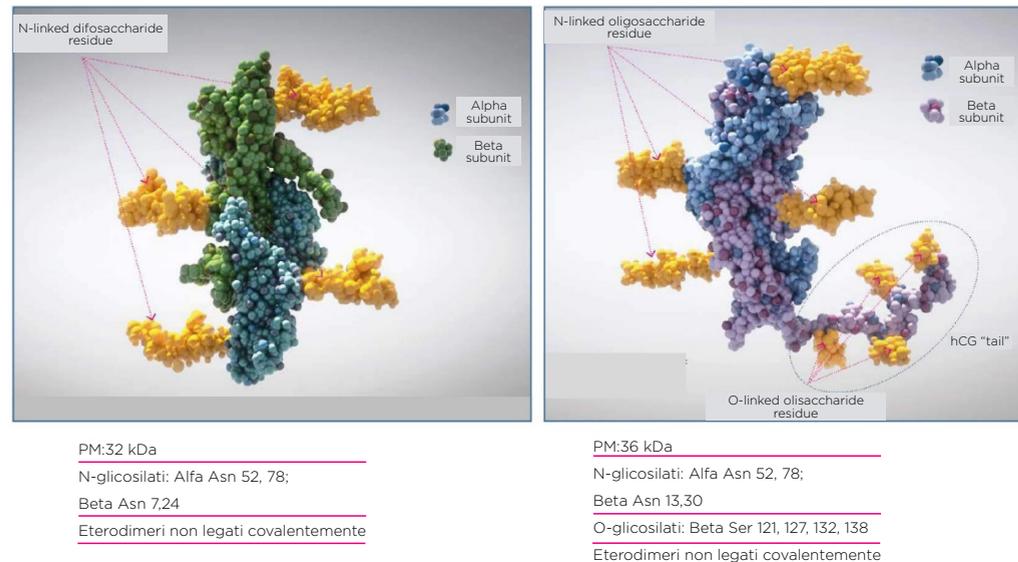
Le **gonadotropine (FSH, LH e hCG)** sono **ormoni di natura glicoproteica**, appartenenti alla stessa famiglia delle glicoproteine del TSH. Sono **accomunati dalla presenza di unità proteiche e oligosaccaridiche**: la subunità α glicoproteica è comune per tutte, mentre la subunità β è quella che conferisce le caratteristiche di affinità per lo specifico recettore e, quindi, la diversa attività biologica (**figura 1**).

L'**FSH è l'ormone follicolo stimolante**, un complesso glicoproteico la cui parte glucidica rappresenta circa il 30% del peso molecolare e la parte proteica il 70%. È **rappresentato da due catene polipeptidiche, la α e la β** . Quest'ultima, come già accennato, conferisce la specificità per il recettore. L'FSH è caratterizzato da 4 siti di glicosilazione: 4 residui di asparagina (Asn), due per la subunità α e due per quella β , a livello dei quali si legano le catene di oligosaccaridi.

© **Figura 1.** La famiglia delle glicoproteine



© **Figura 2.** FSH e hCG

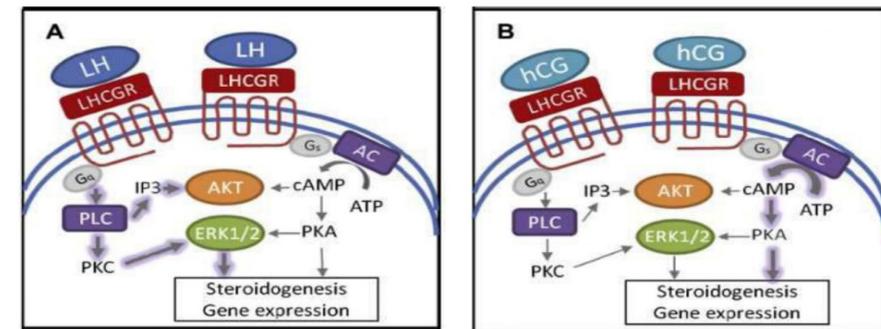


La **figura 2** rappresenta uno schema riassuntivo delle differenze di conformazione tra l'ormone follicolo stimolante FSH e la gonadotropina corionica hCG.

La struttura dell'FSH (illustrata a sinistra), che ha un peso molecolare di circa 32 kDa, presenta le catene polipeptidiche α e β . In giallo sono rappresentati i 4 residui di asparagina in cui è possibile la N-glicosilazione: a livello della subunità α Asn 52 e 78 e a livello della subunità β Asn 7 e 24. La struttura dell'FSH presenta anche eterodimeri non legati tra di loro tramite legami covalenti.

L'**ormone hCG** (a destra) ha invece un peso molecolare più alto dell'FSH, pari a 36 kDa. La differenza di peso è dovuta alla presenza di una coda, visibile in figura, che rende ragione del fatto che a livello di una catena polipeptidica si possono avere ulteriori siti di glicosilazione, in questo caso di ortoglicosilazione. Quanto alla struttura dell'hCG, si **ha una catena α in analogia alla catena α dell'FSH**, con due residui di asparagina 52 e 78 N-glicosilabili dai quali originano legami con altre frazioni zuccherine, **e una catena β con altri due residui di asparagina in posizione 13 e 30**. A livello della subunità β si ha una **coda C-terminale supplementare**, in cui c'è la possibilità di ortoglicosilare le serine in posizioni 121, 127, 132 e 138. E, come per l'FSH, sono presenti gli eterodimeri non legati covalentemente.

© **Figura 3.** hCG vs LH



Quando sia hCG che LH interagiscono con LHCGR, il recettore accoppiato alla proteina G, una delle due vie principali viene attivata in maniera preferenziale. LH attiva preferenzialmente la via della fosfolipasi C, mentre hCG attiva principalmente la via dell'adenilato ciclasi.

Fonte: Choi, Smitz, 2014.

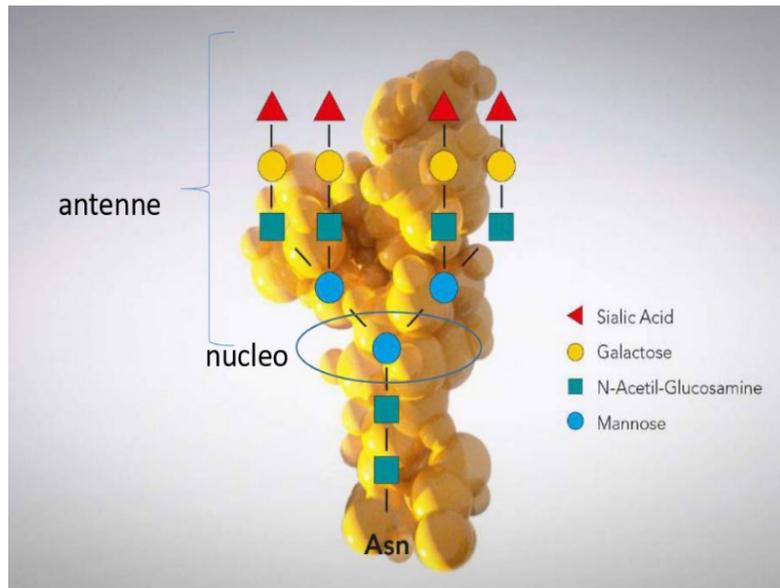
L'**LH** (ormone luteinizzante) presenta un'affinità strutturale con l'hCG. Ha un peso molecolare intorno a 33 kDa. A livello della catena α si hanno due residui di N-glicosilazione di asparagina in posizione 52 e 78, a livello della catena β , invece, si ha un unico residuo di asparagina a cui può legarsi un residuo zuccherino. In analogia con FSH e hCG, l'LH presenta nella sua struttura eterodimeri non legati covalentemente.

Data l'affinità strutturale tra LH e hCG, questi agiscono attraverso un legame sullo stesso recettore, l'**LHCGR**, innescando una via di trasduzione del segnale tramite l'attivazione della proteina G accoppiata al recettore. Quando è l'LH a legarsi con il recettore LHCGR si attiva preferenzialmente la **fosfolipasi C** che porta all'attivazione dei secondi messaggeri che esitano nell'espressione genica della steroidogenesi. Quando invece è l'hCG a legarsi con il recettore LHCGR si attiva preferenzialmente la via dell'**adenilato ciclasi** (**figura 3**).

Le differenze nell'interazione di queste due molecole con il loro recettore comune si riflettono sulle differenze biologiche tra le molecole stesse. L'hCG, infatti, è almeno 6 volte più potente dell'LH e ha anche un'emivita più lunga: per questo motivo basse dosi di hCG possono essere utilizzate per simulare l'attività di LH.

La **catena oligosaccaridica** dell'FSH (**figura 4**) presenta diversi residui:

⊙ **Figura 4.** La catena oligosaccaridica

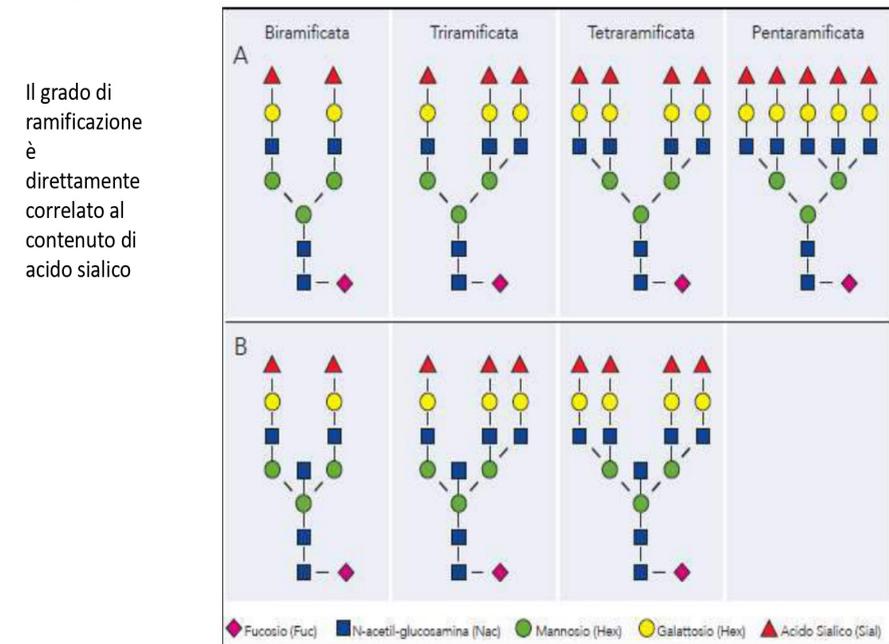


la N-acetilglucosammina costituisce la base su cui si agganciano nuclei di mannosio, che possono essere a loro volta ramificati culminando con residui terminali di N-acetilglucosammina, galattosio e acido sialico, costituendo la frazione finale della ramificazione della componente oligosaccaridica delle gonadotropine (antenne).

Il grado di ramificazione è direttamente correlato al contenuto di acido sialico: maggiore è il contenuto di acido sialico, maggiore è la ramificazione della componente glucidica dell'ormone (**figura 5**). L'acido sialico è costituito da un gruppo carbossilico terminale che conferisce carica negativa alla molecola, perché tende a dissociarsi dando origine all'anione carbossilato.

La presenza di diversi gradi di ramificazione dell'FSH e, quindi, la presenza di un pattern differenziato di acidità sono messe in evidenza mediante un'analisi di separazione elettroforetica, l'**elettroforesi**, grazie alla tecnica di isoelettrofocalizzazione che viene utilizzata per differenziare le isoforme di FSH in base al loro grado di acidità determinato dal contenuto di acido sialico che, a sua volta, è un indice dell'espressione del grado di ramificazione.

⊙ **Figura 5.** Ramificazione dell'FSH



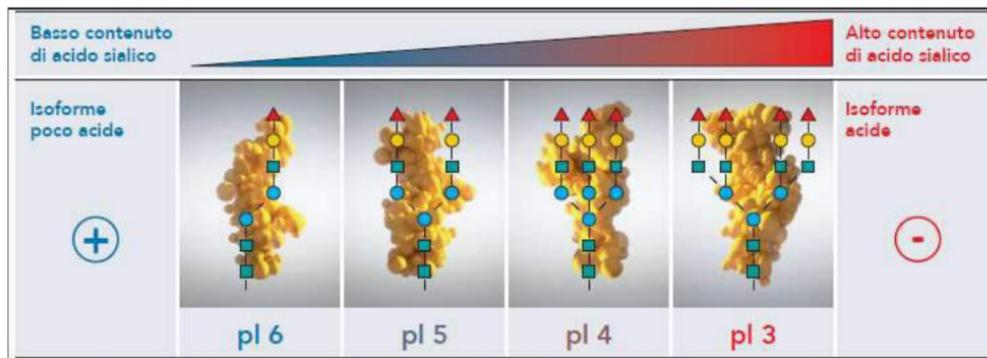
Fonte: Lombardi *et al.*, 2013.

L'ipofisi produce un pattern di isoforme di FSH diversamente glicosilate e sializzate, che copre un ampio intervallo di acidità, da 3 a 6 circa: si parla, pertanto, di **eterogeneità specie-specifica dell'FSH** (**figura 6**).

In particolare, nella donna sono presenti 7 isoforme di FSH, che determinano l'eterogeneità di distribuzione del pattern che dipende non solo dall'età (in menopausa si produce FSH in un range di isoforme più acide), ma anche dalle diverse fasi del ciclo mestruale (le isoforme altamente glicosilate di FSH, quelle più acide, sono prodotte durante la fase follicolare precoce, ovvero nella fase di reclutamento follicolare).

Nella fase follicolare precoce, infatti, si producono dosi crescenti e più acide di FSH utili a stimolare il reclutamento ovcitario. Nella fase periovulatoria, cioè in prossimità dell'ovulazione, si ha un decremento di produzione delle isoforme più acide che si mantiene fino alla fase luteale tardiva. Alla ripresa del ciclo successivo, si avrà nuovamente la produzione del pattern più acido di FSH. La distribuzione verso le forme meno acide di FSH all'approssimarsi dell'ovulazione ha un significato specifico: **il mag-**

◉ **Figura 6.** Gamma di isoforme di FSH

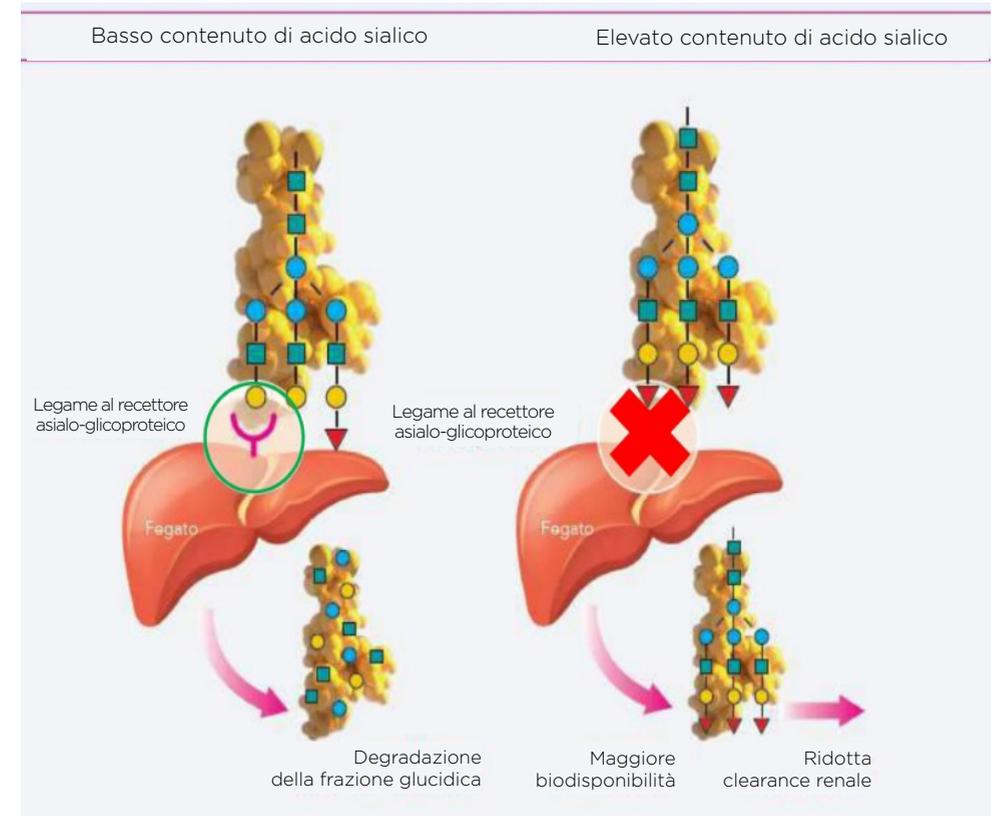


L'adenipofisi produce un pattern di isoforme di FSH diversamente glicosilate/sializzate, che coprono un ampio range di acidità → eterogeneità FSH specie-specifica!

gior pattern di isoforme acide dell'FSH viene infatti attribuito a una maggiore capacità di reclutamento ovocitario, mentre le forme meno acide di FSH sono associate a una maggiore produzione di estradiolo. L'estradiolo, in prossimità dell'ovulazione, retroverte il feedback negativo per provocare l'incremento della produzione di LH. Il significato biologico di avere una prevalenza di isoforme meno acide in corrispondenza dell'ovulazione è dunque probabilmente dovuto alla maggiore capacità delle isoforme meno acide dell'FSH di provocare la maturazione finale del follicolo di Graaf, a sua volta dovuta a una maggiore capacità di stimolare ulteriormente la produzione di estradiolo.

Il grado di glicosilazione – e quindi l'isoforma dell'FSH – è in grado di avere delle ripercussioni sull'emivita dell'ormone in funzione del ridotto catabolismo epatico. Nella **figura 7** a sinistra è rappresentato **un residuo oligosaccaridico dell'FSH che culmina con un'unica antenna terminale di acido sialico**, mentre gli altri terminano con un altro residuo. Proprio per la presenza di un residuo diverso dall'acido sialico si determina un legame al recettore asialoglicoproteico epatico, provocando una degradazione della frazione glucidica dell'FSH. A destra invece è rappresentato **un residuo oligosaccaridico con più terminali di acido sialico**, maggiormente ramificato rispetto al caso precedente. La presenza di

◉ **Figura 7.** Emivita delle isoforme di FSH



Fonte: Wide, 1986; Wide et al., 2009.

questo residuo di acido sialico determina un ingombro sterico che impedisce alle estremità di legarsi con il recettore asialoglicoproteico epatico. Questo ridotto legame a livello recettoriale nel fegato si traduce in una maggiore biodisponibilità dell'ormone, che non viene quindi degradato nella sua frazione glucidica e presenta pertanto una maggiore emivita.

Un'altra caratteristica del pattern di isoforme dell'FSH riguarda la loro capacità di promuovere la secrezione di estrogeni: le isoforme meno acide di FSH favoriscono una produzione più elevata e rapida di estrogeni, a causa di una minore dissociazione recettoriale. La capacità di secernere estrogeni è sfruttata proprio a ridosso dell'ovulazione, in cui si manifesta una preponderanza del pattern di isoforme meno acide.

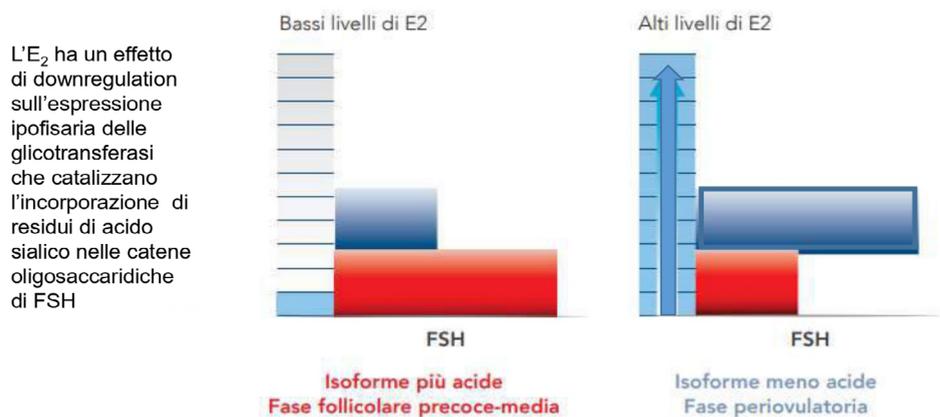
A determinare il passaggio durante il ciclo mestruale dall'isoforma meno

acida e quella più acida è il livello di **estradiolo** a sua volta **indotto dall'azione dell'FSH**. Nella fase follicolare precoce-media, infatti, caratterizzata dalla prevalenza delle isoforme più acide, il livello di estrogeni è basso perché stimolato in maniera più lenta. Man mano che avviene il reclutamento e aumenta la produzione di estradiolo, quando si raggiunge una determinata concentrazione di questo ormone si ha un **effetto di downregolazione**. L'estradiolo ha in generale un effetto di downregolazione sull'espressione ipofisaria delle glicotransferasi, enzimi che catalizzano l'incorporazione di residui di acido sialico nelle catene oligosaccaridiche di FSH. Per effetto di questa azione inibente sulle glicotransferasi viene prodotto FSH con meno ramificazioni e si ha quindi uno **shift**, ovvero il **passaggio dell'FSH dalla forma più acida a quella meno acida** (figura 8).

Il ciclo mestruale è regolato dagli ormoni. Gli estrogeni, in particolare, hanno un effetto di feedback negativo sulla produzione delle gonadotropine, tranne che in prossimità della fase periovulatoria, e interferiscono anche sullo sviluppo endometriale. L'estradiolo e il progesterone giocano un ruolo fondamentale nel mantenimento della morfologia e della recettività endometriale. Il **processo di maturazione endometriale deve essere graduale e in sincronia rispetto alla maturazione ovocitaria**.

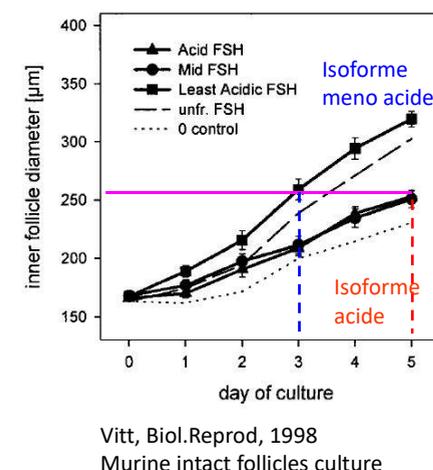
Studi su modelli animali hanno dimostrato che le isoforme acide di FSH sono caratterizzate da un più graduale tasso di crescita follicolare: i folli-

© **Figura 8.** Livelli estrogenici durante il ciclo mestruale e pattern di rilascio naturale delle isoforme di FSH



Fonte: Padmanabhan, 1988 (mod.).

© **Figura 9.** Tasso di crescita follicolare



coli stimolati con le isoforme acide di FSH richiedono in genere 5 giorni per raggiungere le stesse dimensioni (circa 250 micron di diametro interno) registrate al terzo giorno con le isoforme meno acide (figura 9). La somministrazione di isoforme meno acide potrebbe pertanto determinare un'accelerazione eccessiva della folliculogenesi e della produzione di progesterone, che potrebbe non rendere sincrona la morfologia endometriale con il grado di maturazione ovocitaria.

L'ovocita, come il follicolo, è in continua evoluzione dallo stato primordiale all'ovulazione. Sembra che anche quando l'ovocita raggiunga la sua dimensione finale il processo di trasformazione continui. L'ultima variazione si verifica quando l'ovocita diminuisce progressivamente le sue attività di trascrizione. La fase in cui il nucleolo viene circondato dallo strato di cromatina condensata corrisponde al declino progressivo del processo trascrizionale. Solo al termine di questa ultima trasformazione l'ovocita dispone di tutto l'RNA messaggero sufficiente per proseguire il suo sviluppo, altrimenti la sua capacità di sviluppo può essere compromessa. Pertanto la qualità ottimale ovocitaria richiede tempismo e differenziazione follicolare perfetti.

Le isoforme meno acide di FSH hanno capacità di produrre maggiori quantità di estradiolo a livello delle cellule della granulosa del ratto in tempi più rapidi, mentre le isoforme più acide sono in grado di indurre

la **produzione di inibina-B** che esercita effetti sia endocrini che paracrini. A livello endocrino, provoca la downregolazione della produzione di FSH. Ma attraverso un meccanismo di tipo paracrino, in sinergia con l'LH, è responsabile della produzione di androgeni che, diventando substrato di aromatasi, rappresentano il passaggio preliminare della produzione di estrogeni. In altre parole, **le isoforme acide dell'FSH**, prevalenti nella fase follicolare precoce, **sono in grado esse stesse di stimolare la produzione di estrogeni ma attraverso un meccanismo di tipo inibina-B-mediato**. Questo effetto paracrino dell'inibina-B responsabile dell'induzione della produzione di ormoni androgeni da parte delle cellule tecali in sinergia con l'LH è uno degli aspetti emergenti nell'ambito della PMA.

In sintesi, vale la pena evidenziare ancora una volta l'importanza delle diverse isoforme di FSH necessarie per un corretto sviluppo follicolare e un'appropriata maturazione ovocitaria: **le isoforme più acide favoriscono un aumento graduale degli estrogeni, le isoforme meno acide inducono un più rapido aumento dei livelli di estrogeni per una minore dissociazione dal loro recettore**. Eccessive concentrazioni di estrogeni e progesterone, secondari alla stimolazione ovarica, potrebbero influenzare la morfologia dell'endometrio e, quindi, la sua recettività (ad esempio, anticipando la fase secretiva e causando asincronia dell'endometrio verso l'impianto dell'embrione).

Le gonadotropine IBSA

IBSA è impegnata da oltre 25 anni nella produzione di ormoni impiegati nelle tecniche di PMA. Le gonadotropine prodotte da IBSA, caratterizzate tutte per la loro origine estrattiva, sono **Fostimon** (l'ormone FSH ricavato da urine menopausali) e **Gonasi HP** (ormone placentare hCG ricavato da urine di donne in gravidanza). L'ultimo prodotto arrivato in casa IBSA è **Meriofert** che raggruppa le peculiarità dei due prodotti precedenti, essendo ricavato da urina menopausale arricchita con hCG (in rapporto 1:1).

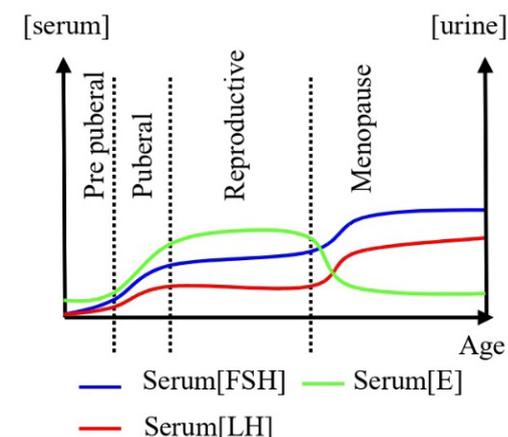
Il razionale della raccolta delle urine delle donne in menopausa è che, con l'avanzare dell'età, l'ovaio diventa meno sensibile all'azione delle gonadotropine, pertanto aumentano le quantità secrete di questi ormoni a livello urinario (**figura 10**).

Man mano che aumenta l'età e ci spostiamo dalla vita riproduttiva della donna alla menopausa, **i livelli sierici di estradiolo diminuiscono e aumentano quelli sierici di FSH ed LH**. Questo perché **in menopausa l'ovaio diventa meno sensibile alla stimolazione delle gonadotropine**. Di conseguenza, **i livelli di estradiolo rimangono bassi**. La mancanza di questo feedback negativo estradiolo-mediato porta a un **aumento della secrezione ulteriore di gonadotropine**. **L'eccesso di questi ormoni viene eliminato attraverso le urine e pertanto grandi quantità di FSH e LH possono essere estratte in menopausa**.

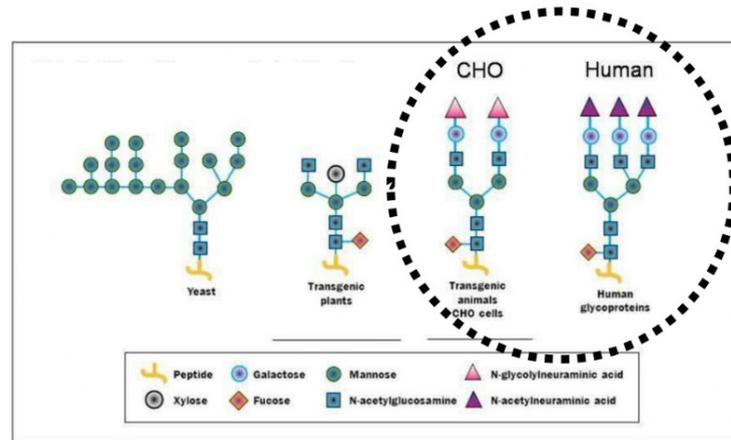
Uno degli aspetti più importanti della produzione di gonadotropine di origine estrattiva riguarda da sempre il loro grado di purezza. L'evoluzione del **processo di purificazione delle gonadotropine** si è evoluto nel tempo e un grado di purezza vicino al 100% è stato raggiunto da prodotti sia di derivazione urinaria che ricombinante. Ma mentre è stato raggiunto questo traguardo per le gonadotropine, nessuna attenzione veniva posta alla frazione glucidica della molecola: gli zuccheri erano poco rappresentati in origine (ricombinanti) o persi nel corso del processo di purificazione (estrattivi).

Di seguito vengono analizzate le principali differenze tra l'FSH ricombinante e l'FSH urinario di origine estrattiva in termini di materia prima, processo di purificazione e intervallo di glicosilazione.

© **Figura 10**. Rappresentazione della fluttuazione di FSH, LH ed E2 con l'età



© **Figura 11.** Glicosilazione specie-specifica del criceto cinese (CHO) e umano



A causa del differente pool enzimatico, rec-FSH ottenuto dalle cellule CHO presenta strutture di carboidrati meno ramificate rispetto all' FSH umano

Fonte: Ulloa-Aguirre, 2003.

La **tecnologia ricombinante**, relativamente recente, rappresenta il termine di paragone in termini di purezza. Con questa tecnologia, **il gene per FSH umano** (sequenza che codifica per frazione proteica) **viene inserito nel genoma delle linee cellulari di cellule ovariche di criceto cinese (CHO), messe in cultura in un bioreattore**. Tali cellule arricchite di frazioni di geni che codificano per le catene proteiche dell'FSH umano **producono, assieme alle loro proteine, anche le subunità α e β dell'FSH**. Successivamente, sfruttando il pool enzimatico delle cellule ospitanti del criceto cinese, le subunità proteiche α e β sono replicate attraverso enzimi cellulari. Infine, sempre sfruttando il pool enzimatico delle cellule ospitanti, **le subunità α e β sono poi glicosilate attraverso enzimi cellulari. Tutto avviene grazie agli enzimi delle cellule ospitanti del criceto cinese, non a quelli umani**. Pertanto, essendo la tipologia di glicosilazione specie-specifica, a causa del differente pool enzimatico, **l'FSH ricombinante ottenuto dalle cellule CHO presenta strutture di carboidrati meno ramificate rispetto all'FSH umano (figura 11)**.

In sintesi, dal confronto tra FSH ricombinante e umano, si può affermare che **l'FSH ricombinante presenta una struttura uguale a quello umano**, essendo la porzione del gene che codifica per le catene α e β umano,

ma una diversa glicosilazione essendo quest'ultima specie-specifica.

Poiché l'FSH ricombinante ha un contenuto inferiore di catene glicosilate, la loro distribuzione è nel range delle isoforme meno acide, perché meno ramificazioni si traducono in pochi residui di acido sialico. Anche la conformazione e la configurazione spaziale dei legami sialici di tipo α 2,3 e α 2,6 sono diversamente rappresentate nelle specie: nell'FSH umano si ha la presenza di residui di galattosio e acido neuroamminico, legati tra di loro da legami di tipo α 2,6. Nell'FSH delle cellule CHO, invece, si ha una diversa conformazione (α 2,3).

Dunque, l'FSH ricombinante rispetto a quello di origine urinario si caratterizza per una bassa glicosilazione dovuta a una minore ramificazione. I processi di purificazione comportano una minor perdita di principio attivo. L'intervallo di glicosilazione è ristretto, spostato verso le isoforme meno acide, anche se non sono del tutto assenti le forme più acide.

Con l'invecchiamento, si producono quantità crescenti di FSH, con livelli medi di glicosilazione aumentati. Durante la menopausa, quasi tutto l'FSH circolante è altamente glicosilato e, pertanto, più acido. Questo diverso isomorfismo fisiologico nella donna non può essere riprodotto nel ricombinante.

Nel **processo estrattivo delle gonadotropine, le urine vengono sottoposte a un complesso processo di purificazione che potrebbe comportare il distacco di più o meno zuccheri**. Prima che le tecniche di purificazione venissero affinate, le perdite di glicosilazione erano maggiori e si verificava pertanto la perdita delle isoforme acide più estreme.

La tecnologia IBSA ha cercato di superare questo divario puntando da un lato a mantenere alti gli standard di purezza, dall'altro a evitare la perdita delle isoforme che si trovano nei range più estremi, mantenendo un intervallo di glicosilazione tale da rappresentare l'intera gamma delle isoforme di FSH.

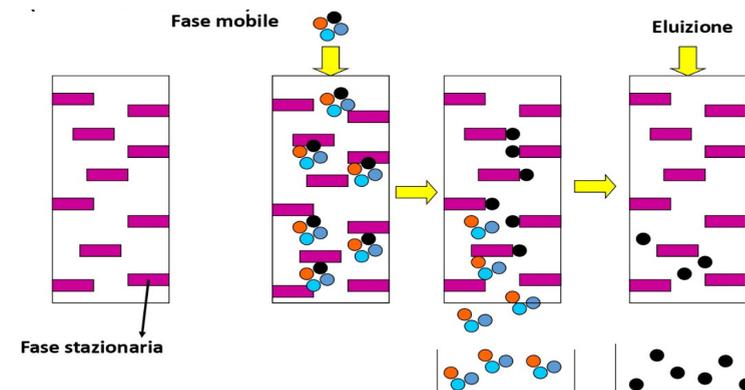
Le gonadotropine IBSA, prodotte in Svizzera in impianti dedicati, sono oggi sviluppate attraverso un processo di purificazione all'avanguardia brevettato. Si tratta di **un processo di purificazione non aggressivo ba-**

sato sulla solubilizzazione e sulla precipitazione selettiva, in grado di eliminare ogni altro componente urinario, preservando l'intera struttura delle gonadotropine. Preliminare a tale processo è la **raccolta urinaria**: ogni giorno per 10 mesi l'anno sotto il controllo diretto di IBSA vengono raccolte in Cina le urine di donne in post-menopausa. **Nell'arco di due giorni si raggiunge un volume di circa 200.000 litri, che rappresenta il lotto iniziale da cui si ottengono 3 kg di estratto grezzo. Alla fine dell'intero processo, 1 grammo di FSH altamente purificato viene liofilizzato in fiale monodose per ottenere il prodotto finito (circa 140000 fiale da 75UI).**

Naturalmente, le donatrici vengono sottoposte a **controlli periodici di idoneità** e vengono ammesse solo quelle che rispondo a determinati test qualitativi. In un primo step, avviene un rapido controllo di qualità per ogni singola donazione prima dell'inserimento in sub-pool di 50 donazioni ciascuno; le urine raccolte vengono immediatamente trasportate presso lo stabilimento IBSA e sottoposte a un controllo più approfondito; vengono quindi eseguite delle cromatografie iniziali per i sub-pool risultati idonei. In un secondo step, avviene poi un ulteriore controllo sul prodotto di purificazione intermedio, comprese rigorose analisi per verificare l'assenza di contaminazioni da virus. **Solo il materiale certificato viene processato presso lo stabilimento a Lamone, in Svizzera, attraverso cromatografie finali.**

Il processo di purificazione non aggressivo inizia con la riduzione del contenuto proteico delle urine attraverso un sistema validato di rimozione virale che inizia con la precipitazione selettiva di piccole molecole urinarie in ambiente alcalino a pH 11. Attraverso un ulteriore processo di ultrafiltrazione, avviene poi il **recupero del surnatante e la sua successiva ultrafiltrazione** che consente l'eliminazione anche delle molecole urinarie più piccole. Successivamente avviene un ulteriore processo di **precipitazione selettiva in etanolo che consente l'eliminazione di alcune categorie di virus potenzialmente presenti e di piccole molecole urinarie.** Infine, un **processo di essiccazione del precipitato dopo trattamento con acetone consente un'ulteriore eliminazione di virus.** La frazione risultante così ottenuta, contenente un mix poco purificato di FSH e LH/hCG, viene

© **Figura 12.** Cromatografia a scambio ionico (DEAE-sefariosio)



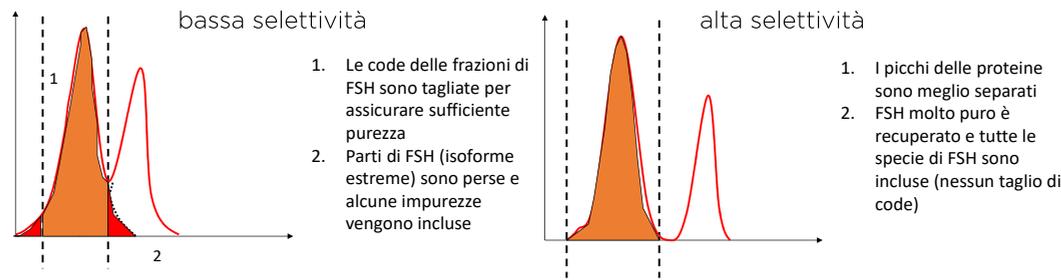
poi sottoposta alle **cromatografie iniziali che consentono l'eliminazione di tutte le proteine urinarie diverse dall'FSH.**

Il prodotto fin qui ottenuto (900 gr di FSH da 200.000 litri di urina raccolta) viene inviato **in Svizzera dove subisce i processi di purificazione finale, con ulteriori passaggi di cromatografie sempre più sensibili che culminano con il processo della nanofiltrazione.** La prima cromatografia è quella a scambio ionico con dietilamminoetanolo sefariosio (DEAE-sefariosio), una cromatografia che sfrutta il principio dell'attrazione elettrostatica dei contaminanti urinari verso la fase stazionaria e la loro rimozione dalla fase mobile (**figura 12**). Con questo passaggio si ottiene la rimozione completa della maggior parte delle proteine contaminanti urinarie.

La cromatografia utilizzata è una **cromatografia ad alta selettività** in cui i picchi delle proteine risultano meglio separati nel cromatogramma: si ottiene così un FSH molto puro in cui sono incluse tutte le isoforme di FSH.

In un processo standard di cromatografia a bassa selettività le code delle frazioni di FSH vengono tagliate per assicurare sufficiente purezza. Ma parti di FSH (ovvero le isoforme più estreme che si trovano proprio a livello della coda) vengono perse e alcune impurezze vengono incluse. Nelle cromatografie ad alta selettività, invece, i picchi delle proteine sono meglio separati: si ottiene così un FSH molto puro e tutte le specie di FSH sono incluse (nessun taglio di code) (**figura 13**).

⊙ **Figura 13.** Cromatografia standard



La vera innovazione del brevetto IBSA consiste proprio nelle cromatografie ad alta selettività. La prima è la **cromatografia ad elevata affinità su blu di sefarosio** che consente la purificazione del materiale risultante mediante cromatografia di affinità su resina di blu sefarosio, un processo fondamentale per mantenere un alto livello di purificazione. Tale processo consente una netta separazione dai contaminanti urinari residui e il recupero delle frazioni di FSH altamente purificate, preservando tutte le isoforme, comprese quelle molto acide: vi è pertanto l'estrazione del range completo delle isoforme di FSH di tipo umano. La seconda è la **cromatografia per affinità su fenil sefarosio** che consente l'eliminazione delle ultime tracce di attività LH residua, ovvero la rimozione finale di LH e hCG residui ancora presenti, a questo stadio, in basse concentrazioni.

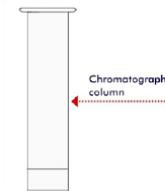
Tutti gli step di cromatografia servono per mantenere il contributo offerto da tutte le isoforme di FSH preservate nei vari step di purificazione. L'ultimo passaggio – anche questo brevettato da IBSA – è la **nanofiltrazione**, che rappresenta attualmente l'esclusivo parametro di riferimento in termini di sicurezza in quanto è in grado di rimuovere anche i virus più resistenti eventualmente sopravvissuti agli stadi preliminari di purificazione, ovvero eventuali prioni o virus non incapsulati. La nanofiltrazione IBSA sfrutta l'impiego di un nanofiltro dalle dimensioni di circa 18 nm, notevolmente ridotte rispetto ai diametri dei filtri convenzionali (che si aggirano intorno ai 220 nm circa). Alla fine del processo si ottiene l'FSH umano altamente purificato IBSA.

La capacità di questi step di rimuovere anche i virus più resistenti (prioni) è stata provata da **studi di validazione** che prevedono l'utilizzo di sor-

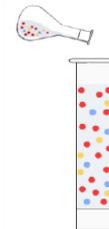
genti sperimentali d'infettività (cosiddetti **studi spike**) **che riproducono in laboratorio**, quindi su piccola scala, **fasi di processi industriali**. Tali studi di validazione, pur non essendo richiesti per i prodotti di derivazione urinaria, sono stati condotti su iniziativa volontaria di IBSA, in collaborazione con un laboratorio accademico, e approvati dalle autorità regolatorie. In questi studi spike viene ricreata in laboratorio una potenziale sorgente virale che è poi sottoposta a processi di rimozione virale in modo da misurarne l'infettività residua, ovvero la differenza tra l'amount iniziale e quello finale (**figura 14**).

⊙ **Figura 14.** Fasi dello studio spike

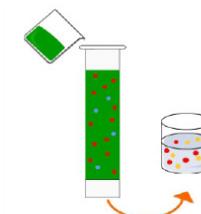
Una fase di purificazione selezionata viene replicata su scala di laboratorio



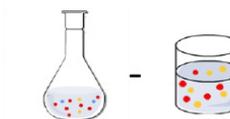
Una quantità nota di agenti infettivi (spike) viene aggiunta a monte



Il processo viene eseguito e il materiale a valle viene raccolto per le analisi



Gli agenti infettivi recuperati (infettività residua) sono dati dalla differenza tra l'amount iniziale e quello finale. Il risultato, espresso in scala logaritmica, fornisce il potere di decontaminazione.



➤ **Tabella 1.** Controlli qualità

Crudo	Principio attivo	Prodotto finito
<ul style="list-style-type: none"> •Identificazione FSH (EIA) •Conta aerobica totale (metodo Lowry) •Test sicurezza: HIV, HBV, HCV-Ag (PCR- ELISA) 	<ul style="list-style-type: none"> •Identificazione FSH (EIA) •attività FSH (in vivo bioassay, BIO) •Proteine Totali (Lowry) •Impurezze totali (RP-HPLC) •Attività LH residua (ELISA) •Endotossine (LAL test) •Immunoglobulina G (ELISA) •Conta aerobica totale •Etanolo residuo (Gas chromatografia) •Purezza (SDS-PAGE, IEF) 	<ul style="list-style-type: none"> •Liofilizzato: <ul style="list-style-type: none"> –aspetto (esame visivo), –peso, –pH, – umidità, – aggregati FSH •SE HPLC), –catene alfa ossidate (RP HPLC) •Identificazione FSH (BIO) •Sterilità •Endotossine (LAL test) •Contaminazione of particulates (microscopico)

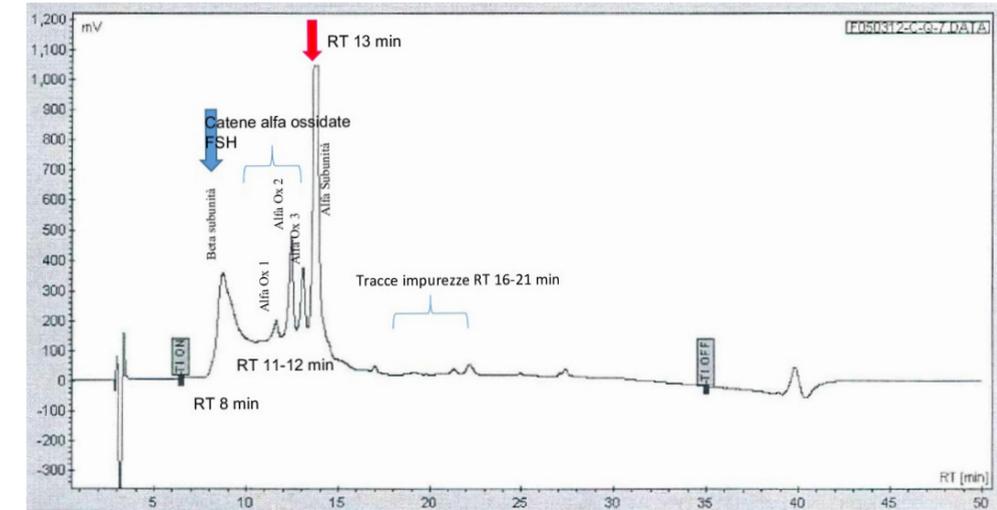
Anche la **qualità** è un aspetto essenziale delle **gonadotropine IBSA**. Controlli di qualità, sia intermedi che di processo, vengono regolarmente effettuati durante i diversi stadi di produzione e comprovati da **certificati di idoneità per ciascun lotto**. Tali lotti in fase di rilascio devono essere accompagnati dalla documentazione attestante la conformità con le specifiche aziendali, che a loro volta sono conformi alle specifiche approvate a livello europeo. I test qualitativi sono identici per le gonadotropine ricombinanti, pertanto la sicurezza è equivalente.

La **tabella 1** riepiloga schematicamente i controlli di qualità eseguiti sul principio attivo crudo (FSH non purificato), sul principio attivo (FSH purificato) e sul prodotto finito (FSH liofilizzato). Su tutti e tre, a prescindere dal grado di purezza dell'FSH, vengono eseguiti test di sicurezza per accertare la non contaminazione da virus quali HIV, epatite B ed epatite C.

Le ultime fasi della produzione del prodotto finito comprendono la **solubilizzazione** delle gonadotropine altamente purificate in acqua p.p.i. e lattosio, la fase di **sterilizzazione per filtrazione** preliminare al successivo **riempimento** di circa 36.000 flaconcini, la **liofilizzazione** per 24 ore a bassi valori di pressione e temperatura, l'**etichettatura**, il **confezionamento** e la **spedizione del lotto**.

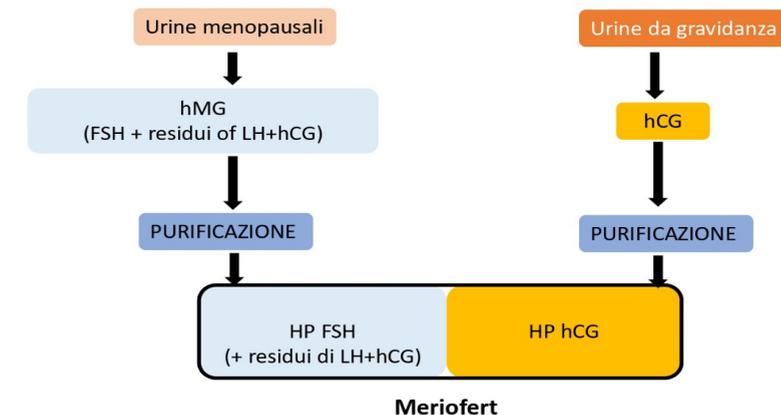
Riportando quanto esposto fin qui sulle caratteristiche delle gonadotropine IBSA, la **figura 15** mostra il tracciato cromatografico RP-HPLC di **Fostimon**. Il **grado di purezza è pari a 97,6%**: a un tempo di eluizione di

⊙ **Figura 15.** Fostimon RP-HPLC



8 minuti si ha il picco della catena polipeptidica β dell'FSH, a 13 minuti si ha il picco della catena polipeptidica α dell'FSH, preceduto tra gli 11 e i 12 minuti dai picchi delle catene α -ossidate dell'urofollitropina. In tempi di eluizione compresi tra 16 e 21 minuti si trovano piccole tracce di impurezza, quasi indistinguibili, per questo il grado di purezza è intorno al 100%. In **Meriofert**, invece, si ha una **doppia fonte estrattiva di urine (menopausali e da gravidanza)** che subiscono entrambe un processo di purificazione da cui originano l'FSH altamente purificato e l'hCG altamente purificato (**figura 16**). L'hCG può essere di origine ipofisaria o placentare.

⊙ **Figura 16.** Processo di purificazione di Meriofert



L'hCG ipofisario è sintetizzato dall'ipofisi durante il ciclo mestruale (independentemente dallo stato di gravidanza) e controlla la steroidogenesi e l'ovulazione. L'ipofisi produce normalmente hCG solfato, ovvero hCG che contiene residui di solfato piuttosto che residui di acido sialico. Come conseguenza della solfatazione, la gonadotropina corionica umana hCG di origine ipofisaria ha un'aumentata clearance *in vivo* che ne giustifica l'emivita più breve per il legame con il recettore asialoglicoproteico a livello epatico, ha una bioattività *in vitro* più bassa rispetto al derivato sializzato e ha anche una potenza di legame recettoriale più bassa. La forma solfata dell'hCG è facilmente rilevata nelle donne in menopausa per l'assenza di feedback negativo steroideo sull'ipotalamo.

L'hCG placentare è un ormone essenziale per la gravidanza perché promuove la trasformazione del corpo luteo in corpo luteo gravidico. Stimola le ovaie a produrre progesterone, estradiolo ed estrone durante le prime sei settimane di gravidanza e agisce come superagonista dell'LH, stimolando le cellule del corpo luteo attraverso il recettore comune LHCGR, fino a quando l'unità placentare-fetale compensa le funzioni ovariche materne.

L'hCG placentare esiste in due isoforme, quella normalmente glicosilata (hCG) e quella altamente glicosilata (hCG-H). Entrambe sono rintracciabili nelle urine durante la gravidanza. **L'hCG normalmente glicosilata** è prodotta per la maggior parte dal sinciziotrofoblasto, l'epitelio di rivestimento dei villi placentari-embriionali altamente vascolarizzati, che invade la parete uterina per stabilire lo scambio di nutrienti tra l'embrione e la madre. Il 99% dell'hCG normalmente glicosilata è secreto nel sangue materno a partire dalla seconda settimana di gestazione e raggiunge il picco di massima concentrazione a 10-12 settimane di gravidanza. La **forma iperglicosilata di hCG-H** contiene invece residui oligosaccaridici più grandi N- e O-linked ai siti di glicosilazione. Questa forma è sintetizzata dal citotrofoblasto extravilloso invasivo, coinvolto nell'ancoraggio della placenta e nel rimodellamento dell'arteria uterina. Contribuisce per l'87% all'hCG placentare totale a partire dalla terza settimana di gestazione e per il 51% durante la quarta settimana; successivamente la proporzione di hCG-H declina.

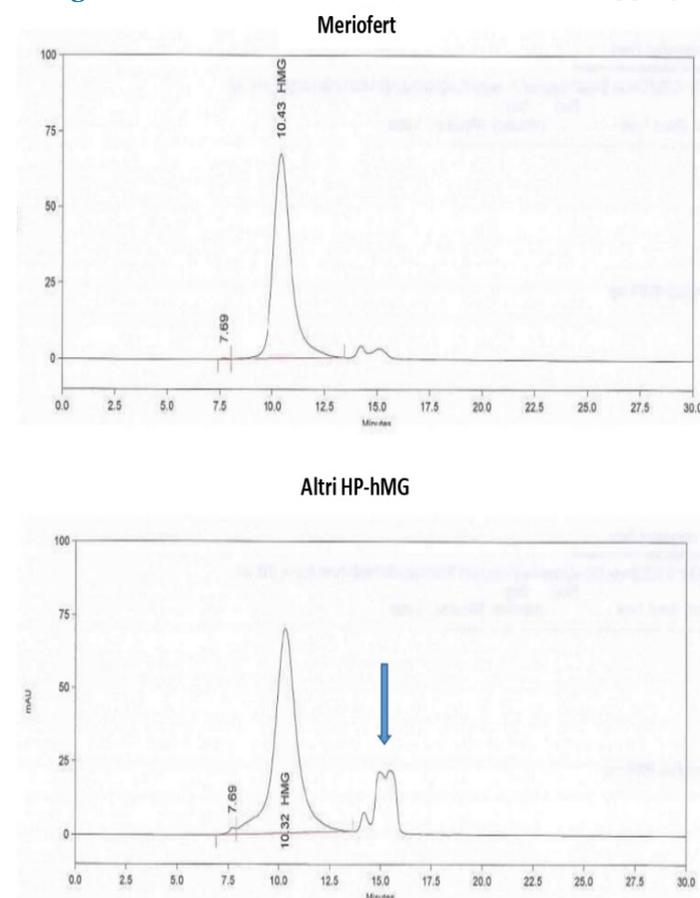
Per quanto riguarda il grado di purezza, da un confronto tra un lotto di Meriofert con altre menotropine altamente purificate si ottengono all'a-

nalisi SE-HPLC risultati in termini percentuali inferiori allo 0,6% relativamente agli aggregati (impurezze ad alto peso molecolare) (**tabella 2**). La freccia blu (**figura 17**) mette in evidenza la presenza di forme di impurezza nelle altre menotropine di riferimento nel mercato, il cui valore tende ad assestarsi intorno a 1,6%.

➤ **Tabella 2.** Confronto sul grado di purezza

Prodotto	Lotto	Risultati (%)
Meriofert	130822	<0.6
	131121	<0.6
	130324	<0.6
Altri HP-hMG	H12775	1.6

© **Figura 17.** Impurezze ad alto peso molecolare: aggregati (SE-HPLC)



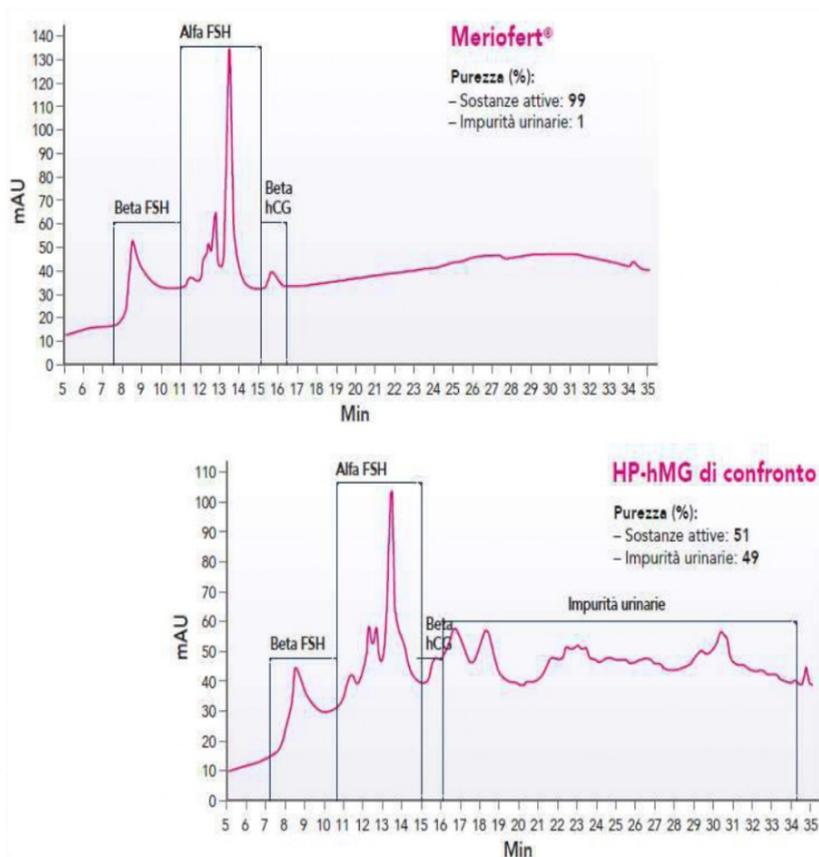
Anche per quanto riguarda le forme proteiche delle impurezze, dal confronto tra Meriofert e le altre menotropine si ottengono risultati in termini percentuali tra 11,5 e 10,5, valori comunque notevoli considerando che questo parametro nel ricombinante si aggira intorno a 5 µg/vial (**tabella 3**).

Da un'analisi comparativa RP-HPLC sulla purezza (**figura 18**) nei tracciati di Meriofert e di un'altra HP-hMG di riferimento, si eviden-

➤ **Tabella 3.** Analisi comparativa sulla purezza (protein content)

Drug product	Batch	Results (µg/vial)	
Meriofert	130822	11.5	recFSH contains ~6 µg/vial of pure FSH thus 11 µg/vial of FSH+hCG is almost pure
	131121	12.6	
	130324	10.5	
Other HP-hMG	H12775	16.8	More than 5 µg/vial of proteins other than those expected!

⊙ **Figura 18.** Analisi comparativa sulla purezza

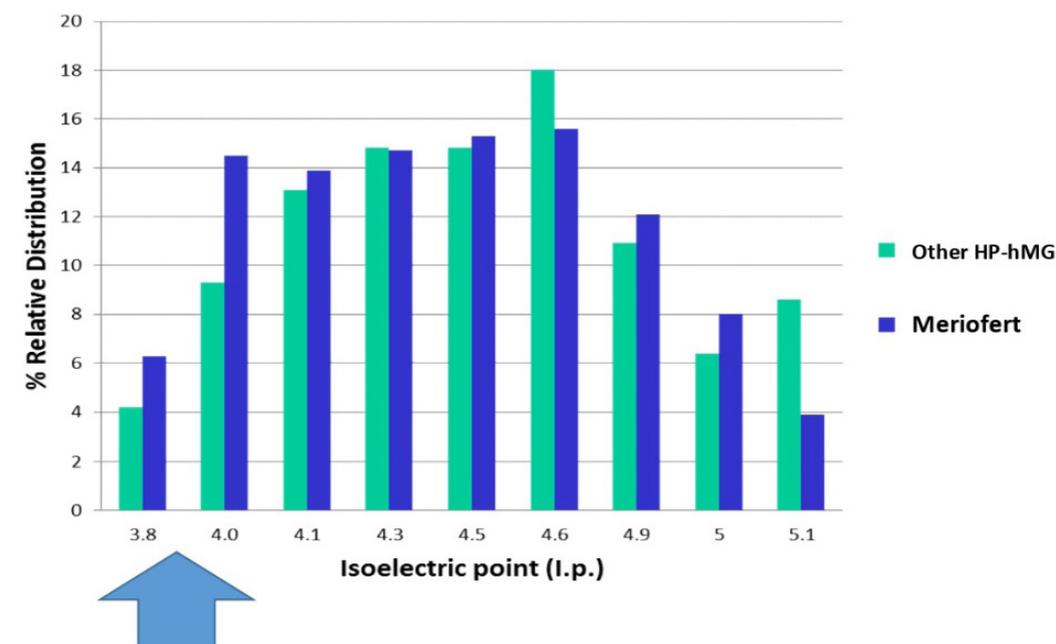


zia tra 8 e 11 minuti il picco tipico della frazione β proteica dell'FSH; successivamente tra i minuti 11 e 15 si evidenziano i picchi relativi alla catena α dell'FSH, comprensivi delle frazioni α-ossidate. Rispetto al Fostimon, nel tracciato di Meriofert si riscontra un ulteriore picco tra i 15 e i 17 minuti dovuto alla comparsa della βhCG. In riferimento all'analogo, oltre a ritrovare i picchi caratteristici delle subunità α e β, si riscontra la presenza di picchi poco separati e meno definiti, caratteristici delle impurità proteiche e della minore selettività del processo di purificazione.

Il grafico seguente (**figura 19**) rappresenta invece una comparazione sul grado di glicosilazione tra Meriofert e altri analoghi mettendo in evidenza la **maggiore rappresentanza in Meriofert del pattern delle isoforme più acide rispetto all'analogo sul mercato.**

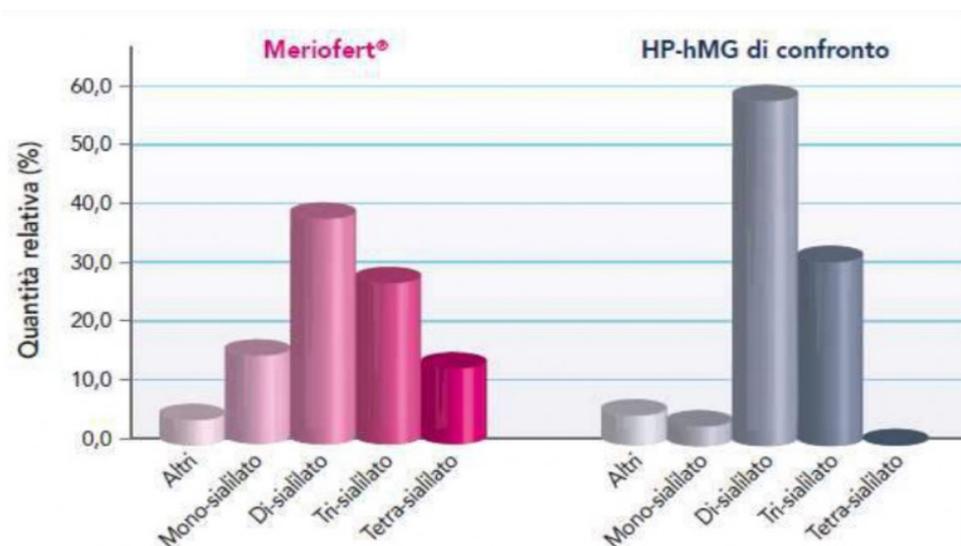
Come già approfondito, **il grado di glicosilazione delle gonadotropine dipende dal grado di ramificazione.** Nell'HP-hMG di riferimento il profilo oligosaccaridico ricade maggiormente nelle forme di-sialilate

⊙ **Figura 19.** Distribuzione isoforme FSH+hCG



e tri-sialilate, invece in Meriofert è ben rappresentato tutto il pattern di isoforme, anche le più estreme. Come mostra la **figura 20**, infatti, **in Meriofert è presenta anche la componente tetra-sialilata, quasi assente nell'HP-hMG di confronto.**

© **Figura 20.** Dati comparativi di glicosilazione



Bibliografia

Choi J, Smitz J. *Luteinizing hormone and human chorionic gonadotropin: Origins of difference.* Mol Cell Endocrinol 2014 Mar 5;383(1-2):203-13.

Lombardi A, Andreozzi C, Pavone V *et al.* *Evaluation of the oligosaccharide composition of commercial follicle stimulating hormone preparations.* Electrophoresis. Wiley Online Library 2013;34:2394-406.

Padmanabhan V, Lang LL, Sonstein J *et al.* *Modulation of serum follicle-stimulating hormone bioactivity and isoform distribution by estrogenic steroids in normal women and in gonadal dysgenesis.* J Clin Endocrinol Metab. 1988 Sep;67(3):465-73.

Ulloa-Aguirre A, Carlos Timossi, Barrios-de-Tomasi J *et al.* *Impact of Carbohydrate Heterogeneity in Function of Follicle-Stimulating Hormone: Studies Derived from in Vitro and in Vivo Models.* Biology of Reproduction, Volume 69, Issue 2, 1 August 2003, 379-89.

Wide L. *The regulation of metabolic clearance rate of human FSH in mice by variation of the molecular structure of the hormone.* Acta Endocrinol (Copenh). 1986 Jul;112(3):336-44.

Wide L, Eriksson K, Sluss PM, Hall JE. *Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women.* J Clin Endocrinol Metab. 2009 Mar;94(3):958-64.