

FSH: Recombinant (rhFSH) vs Urinary (uFSH)

울산대학교 의과대학 서울중앙병원 산부인과학교실

김 정 훈

1. 서 론

남성이나 여성의 생식계는 뇌하수체 전엽의 기능적 조절하에 있다는 것이 1920년대 중반에 인식되기 시작한 이후,¹ 성선자극호르몬에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다. 1954년 폐경기 여성의 소변내에는 다량의 FSH와 LH가 함유되어 있음이 보고되었으며, 이러한 소변으로부터의 추출물은 뇌하수체가 절제된 쥐에서 난포의 성장 및 황체의 생성을 유도할 수 있다는 것이 입증되었다.² 1958년에는 Gemzell 등이 사람의 뇌하수체로부터 분리한 성선자극호르몬을 이용하여 5명의 무배란 환자들중 3명에서 성공적으로 배란을 유도하였음을 최초로 보고하였다.³ 이후 1962년 Lunenfeld 등은 소변으로부터 호르몬을 분리하기 위하여 1947년 Pietro Donini 교수가 개발한 kaolin의 사용을 적용하는 방법을 기초로 하여 폐경기 여성의 소변에서 성선자극호르몬을 정제하게 되었다. 그들은 이를 human menopausal gonadotropin (hMG)이라고 최초로 명명하였으며, 이를 이용하여 저성선자극호르몬성 저성호르몬 (hypogonadotropic hypogonadal) 여성에서 배란 및 임신을 성공적으로 유도하였다. 이같은 hMG의 정제 방법은 오늘날까지도 상당부분 이용되고 있는 실정이며, 이같이 소변으로부터 성선자극호르몬을 추출하는 방법의 개발은 곧 성선자극호르몬의 대량생산을 가능하게 하였고, 생산에 많은 제한을 받고 또한 Creutzfeldt-Jakob 질환의 위험성이 있는 뇌하수체 성선자극호르몬의 생산을 폐기하도록 하였다.

1980년대 초, 특정 호르몬에 특이적으로 결합하는 항체를 사용하여 폐경기 여성의 소변으로부터 FSH를 보다 효율적으로 추출해낼 수 있게 됨으로써 75 IU의 FSH당 0.1 IU 미만의 LH를 함유한 순수 FSH가 개발 생산되었다. 이후 소변으로부터 FSH만을 특이적으로 정제해내는 방법이 보다 발달함에 따라 1990년대 초에는 LH 활성도를 거의 가지고 있지 않으며, non-FSH co-purified protein을 극소량만 함유하고 있는 고순도 FSH (highly purified FSH)가 생산되기에 이르렀다.

체외수정기술이 1978년 첫 출산의 개가를 올린 이후 체외수정기술을 포함한 여러 보조생식술이 전세계로 급속히 확산됨으로써 hMG와 소변내에서 추출된 FSH (uFSH, urofollitropin)의 수요가 급증하게 되었다. 이같은 현상은 생명공학을 이용한 새로운 방법에 의한 성선자극호르몬의 생산 필요성을 보다 절실히 인식하도록 하였다. 1985년 생쥐의 fibroblast cell line을 이용한 유전자 재조합을 통하여 rhFSH가 최초로 생산되었으나, 이는 상업적으로 활용하기에는 생산성이 매우 떨어졌다. 이후 1988년 Chinese hamster ovary (CHO) cell line을 이용한 rhFSH의 생산법이 성공적으로 개발되었으며, 1991년 건강한 여성을 대상으로 시행한 임상 약리 검사에서 rhFSH는 흡수, 분포, 배설에 있어 uFSH와 동일한 작용을 한다는 것이 입증되었다. 이후 rhFSH에 대한 많은 임상시험이 진행되었고 이 과정에서 임신에 성공한 여성이 1992년 10월 첫 출산

을 하게 되었다. 향후 rhFSH는 uFSH에 비하여 대량생산이 용이하고, LH 활성도가 없으며 non-FSH human urinary protein을 거의 갖고 있지 않으며, batch간에 일치도가 우수하고, FSH 특이적 활성도가 우수하다는 장점들로 인하여 주도적인 성선자극호르몬으로 활용될 것으로 기대된다.

2. FSH의 구조 및 rhFSH의 Recombinant DNA technology

사람의 FSH는 분자량이 약 33,000인 acidic glycoprotein으로 hormone-specific β subunit와 hormone-nonspecific α subunit로 구성되어 있다. α subunit의 경우 92개의 amino acids로 구성되어 있으며 52번과 78번의 asparagine에 부착된 2개의 carbohydrate 성분을 가지고 있다. 반면 β subunit는 111개의 amino acids로 구성되며, 7번과 24번 asparagine에 부착된 2개의 carbohydrate residue를 갖고 있다. 사람의 FSH는 약 27%의 carbohydrate와 73%의 단백질로 형성되어 있다. 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성된 α gene의 경우 첫 번째 intron은 종 (species)에 따라 많은 차이를 보이는 반면, FSH β gene의 경우는 nucleotide와 amino acid sequence에 있어 종간에 유사성을 갖는다. FSH에 부착된 sialic acid residue의 수는 FSH 분자의 산성도 (acidity), 수용체 결합 친화력 및 반감기 등에 영향을 준다. 예를 들어 estrogen이 상승되어 있는 상황은 뇌하수체로부터 sialic acid 양이 적은 FSH (less acidic FSH isoform)의 분비를 유도하며, 따라서 이러한 형태의 FSH는 짧은 반감기를 갖게 된다. 반면, 남성이나 폐경기 여성의 경우에는 다량의 sialic acid를 함유한 FSH (more acidic FSH isoform)가 분비되는데, 이 FSH는 estrogen이 상승되어 있는 조건에서 분비되는 FSH에 비하여 반감기는 길지만 생물학적 활성도는 떨어진다. 또한 폐경기 여성에서의 FSH 경우 4시간과 70시간의 biphasic disappearance curve를 갖는다. 이같은 현상은 낮은 FSH 활성도를 가진 uFSH의 제조를 초래할 수 있으며, uFSH의 제재간 그리고 batch간에 효력 (potency), 반감기 및 임상적 반응 등에 있어 차이를 유발할 수 있다. 그렇지만 유전자 재조합에 의하여 생산된 rhFSH의 경우는 우수한 생물학적 일치성 (biologic consistency)을 보인다는 장점이 있다.

uFSH의 경우는 이의 생산을 위해서는 폐경기 여성의 소변을 수집하는 것이 필연적이고, 따라서 소변의 공급에 제한을 받는 경우에는 생산이 중단될 수 있다는 위험성이 있다. 유전자 재조합에 의하여 rhFSH를 생산하는 경우는 uFSH와 달리 소변을 수집해야 할 필요가 없으므로 과배란유도를 위한 성선자극호르몬의 수요가 급증하고 있는 오늘날에는 rhFSH의 생산은 적절한 대안이 될 수 있다. 더욱이 rhFSH는 LH와 같은 다른 glycoprotein과 사람의 소변내 단백질 등의 오염 및 bacteria나 virus에 의한 오염을 확실히 피할 수 있으므로 보다 효과적이고 안전한 제재로 자리잡을 수 있을 것이다.

RhFSH는 크게 네가지의 과정을 거쳐 생산될 수 있다. 첫째, 유전자 분리 (gene isolation), 둘째, 숙주세포의 선택 (host cell choice), 셋째, process development, 넷째, product characterization의 과정이다. 유전자의 분리를 위해서는 우선적으로 박테리아의 효소 즉 제한 효소 (restriction enzyme, endonucleases)를 이용하여 source material 즉 background host genomic DNA로부터 필요로 하는 DNA의 특정 위치를 절단해 내야 한다. 얻어진 DNA 절편을 일차 전사 (primary transcription)시켜 primary RNA 즉 pre-mRNA로 만든다. 이후 intron 부위를 제거하기 위한 splicing을 시행하여 mRNA로 만들고 이를 다시 역전사 (reverse transcription)시켜 complementary DNA (cDNA)로

만든다.³ 이를 특정 vector 즉 plasmid (bacterial) DNA나 phage (viral) DNA의 일부를 제한 효소로 절단해낸 후 이 위치에 transformation, transduction, conjugation의 과정을 거쳐 주입해 넣음으로써 hybrid (recombinant) DNA를 만들게 된다. Cloning에 필요한 DNA 절편의 크기, 절편을 만들기 위하여 사용되는 제한 효소의 종류 등에 의하여 특정 vector가 선택되나, 박테리아의 plasmid가 사람의 유전자를 host cell내로 이동시키기 위하여 흔히 사용된다.^{4,5} 이 유전자 재조합된 bacteriophage는 증폭되어진 후 사람의 genomic library에 보관된다. RhFSH를 생산하기 위해서는 첫 번째로 α -hCG subunit에 해당되는 cDNA probe를 이용하여 사람의 genomic library로부터 4개의 exon과 3개의 intron으로 구성된 α -hFSH 유전자를 분리, 확인한다. 동시에 β -FSH subunit에 해당되는 cDNA를 이용하여 genomic library로부터 3개의 exon과 2개의 intron으로 구성된 β -hFSH 유전자를 분리, 확인한다. α -hFSH 유전자와 β -hFSH 유전자를 각각 expression vector내로 주입하고 이들을 host cell내로 co-transfection시킨다. 이때 선택되어지는 host cell은 유전적으로 안정적이고 안전하면서도 충분한 양의 hFSH를 생산해 낼 수 있어야 한다. 따라서 host cell은 짧은 reproductive cycle을 가져야 하고, 체외에서 용이하게 성장이 되어야 하며, vector에 대한 수용성 (acceptability)이 있어야 하며, host cell로부터 vector가 손실되는 것을 막을 수 있어야 한다.⁶

Host cell로는 박테리아와 yeasts가 널리 사용되어 왔다. 그런데 E. coli와 같은 박테리아는 carbohydrate side chain을 첨가, 변형 (modification)시키는 glycosylation system이 없으며, 또한 생산한 단백질을 cytoplasm이나 periplasm내에 저장하고 분비하지 못함으로 박테리아의 용해나 osmotic shock과 같은 세포를 파열시키기 위한 추가 조작을 필요로 하며, E. coli와 같은 prokaryotes는 methionine의 splicing에 필요한 효소 체계를 갖추고 있지 못하므로 supplementary terminal amino acid로 methionine을 함유할 수 있다는 단점이 있다. Yeast의 경우는 glycosylation이 가능하기는 하나 high-mannose type의 glycosylation을 수행한다는 단점이 있다. 반면 포유류 세포의 경우는 prokaryotes에 비하여 유전자의 크기가 커서 증식 (multiplication)이 느리고 세포 배양이 까다롭다는 단점이 있으나 이 세포들은 RNA polymerase의 결합 위치의 인식과 같은 사람의 DNA에 존재하는 regulatory signal을 인지할 수 있으며, 사람의 mRNA의 sequence coding을 방해하는 intervening sequence를 제거할 수 있는 적절한 체계를 갖추고 있을 뿐 아니라 단백질의 번역 후 변형 (post-translational modification)을 유도하는 peptide signal을 인지할 수 있기 때문에 복합적인 적절한 glycosylation이 가능하며, 두 개의 subunit 하나로 조립할 수 있고, 생성한 단백질을 분비 소낭 (secretory vesicle)을 통하여 세포 밖으로 분비할 수 있다는 장점들이 있다. 특히 CHO cell의 경우는 다른 유전자의 주입이 용이하고 유전자의 증폭이 효율적이며, serum-free media에서 배양, 생산이 가능하여 안전성이 높다는 장점이 있다. 따라서 rhFSH의 생성을 위해서는 CHO cell line이 이용되고 있다. α -hFSH 유전자와 β -FSH 유전자를 함유한 vector들을 dihydrofolate reductase (DHFR) deficient CHO cell로 co-transfection시킨 후, 이 세포들을 MTX가 함유된 배양액내에서 배양한다. 배양시 MTX의 농도를 점차 증가시킴으로써 MTX에 대한 저항이 있는 DHER 유전자를 함유한 clone을 선택하고 이 유전자를 증폭시켜 나간다. 배양된 host cell들중 FSH의 생산성이 높고, 생산된 FSH가 적절한 생물학적 활성 (biological activity)을 갖으며, 동시에 유전적 안정성 (genetic stability)이 있는 CHO cell transfectant를 선택한다. 이때 선택될 수 있는 transfected cell은 대개 1% 미만이다. 이 세포로부터 master cell bank (MCB)가 설정되며, 이 MCB vial은 충분한 검사를 거쳐 안전성과 효율성을 검증한 후 필요시까지 동결보존해

둔다. 하나의 MCB vial로부터 세포의 증식, 발달과정을 거쳐 working cell bank (WCB)가 설정되어진다.

RhFSH를 상업적으로 생산하고자 하는 경우 WCB로부터 취해진 세포의 배양 과정과 세포로부터 분비되어진 자연 상태의 단백질을 정제 (purification)시키기 위한 downstream 과정이 반드시 필요하다. WCB로부터 유전자 재조합된 plasmid를 갖는 host cell을 취한 후 이를 flask내에서 culture expansion시킨 후 특별히 고안된 영양소가 혼합된 배양액내에서 세포배양을 하여 세포를 복제, 증식시킨다. 그런데 CHO 세포는 배양 과정에서 깨지기 쉽고, 성장이 느리며, 여러 가지의 혼합 영양소를 필요로 하고 또한 surface attachment를 필요로 하므로 이를 배양하기 위해서는 이 세포들을 microcarrier beads의 suspension과 혼합한 후 bioreactor vessel로 옮기는 과정이 필요하다. 이 bioreactor에서 세포의 부착 및 성장, rhFSH의 생성, rhFSH를 함유한 배양액의 수집 과정을 걸쳐 rhFSH가 생산된다. CHO 세포 내의 ribosome에 의하여 α -subunit와 β -subunit가 합성되고 이들은 endoplasmic reticulum (ER)에서 disulphide bond가 형성됨으로써 조립되며 이렇게 하여 생성된 단백질은 ER을 통하여 이동하는 과정에서 carbohydrate moiety가 부착되어 재형성이 시작되고 이후 이들은 골지체 (Golgi apparatus)로 이동하여 최종적인 glycosylation 과정을 거친 후 분비 소낭에서 단백질의 "packaging" 과정을 거쳐 세포밖의 배양액내로 분비된다. RhFSH를 함유한 배양액을 수집한 후 이 단백질 혼합물로부터 바람직한 형태의 rhFSH만을 분리, 정제해 내는 과정이 필수적이다. 이 정제 과정을 통하여 배양액내의 여러 저분자량 물질들, pH indicator, transferrin, insulin 등을 제거하고, host cell 성분의 단백질과 DNA를 제거하며, 또한 생산된 rhFSH중 aggregates와 조립되지 않은 subunit들, 원하지 않는 형태의 FSH isoform들을 제거하게 된다. 이 정제 과정은 대부분 1단계 ultrafiltration, 2단계 chromatography, 3단계 murine-derived anti-FSH monoclonal antibody를 이용한 immunoaffinity chromatographic step, 4, 5, 6단계는 rhFSH의 순도를 증가시키기 위한 chromatography, 최종적인 ultrafiltration 과정으로 구성되며, 이 과정들을 통하여 정제된 대량의 rhFSH가 얻어진다. 이 과정들중 immunoaffinity chromatographic step은 고순도 uFSH인 Metrodin HP의 생산 과정에서 사용되는 방법과도 유사하다.

이와 같은 과정을 거쳐 오늘날 상업적으로 생산되어 임상적으로 사용이 가능한 rhFSH제제는 follitropin α (Gonal-F, Serono, Switzerland)와 follitropin β (Puregon, Organon, The Netherlands)의 두가지 제제가 있는데, 이 두가지 제제를 생리, 화학적 측면, 임상적 효과 및 안전성의 측면에서 비교한 연구들은 대부분 두 제제간에 어떠한 점에서도 차이가 없었던 것으로 보고하고 있다. 단지 일부 연구자는 약제가 주사된 부위에서의 국소 반응 (local reaction)에 있어 follitropin α 가 follitropin β 보다 다소 경미하고 드물게 나타났던 것으로 보고한 바 있다.⁷

3. RhFSH와 uFSH의 약리화학적 특성 및 Pharmacokinetics

CHO cell-derived rhFSH는 amino acid sequence, glycosylation 위치, 수용체 결합 활성도, 체외에서의 생물학적 활성도 (in vitro biologic activity) 등에 있어 pituitary FSH 및 uFSH와 거의 동일한 것으로 보고되고 있다.^{8,9} 그렇지만 rhFSH는 uFSH에 비하여 deaminated degradation form이 훨씬 적고 carbohydrate 구조에 있어 일치도가 높다는 장점이 있다. RhFSH 제제는 immunoaffinity chromatography에 의한 정제 단계를 마치고 나면 1 mg 단백질당 평균 10,000 IU의 FSH를 함유하게 되는데 이는 uFSH의 평균 150 IU와 비교할 때 매우 높은 특이적 활성도 (specific activity)

Table 1. Physicochemical analysis of uFSH and rhFSH preparation

	uFSH (Metrodin)	uFSH-HP (Metrodin-HP)	rhFSH
Source of FSH	urine	urine	CHO cells
Specific activity (FSH IU/mg protein)	≡ 150	≡ 10,000	≡ 10,000
Protein content/75 IU (micg)	370~750	6~11	6~11
Active protein content (% FSH) in bulk	< 3%	> 95%	≥ 97%
Residual LH activity/75 IU FSH	0.7 IU	< 0.001 IU	none
IEF range	?	3.0~5.5	3.3~6.1

Table 2. Pharmacokinetic parameters of immunoreactive FSH after single dose i.m. administration of rhFSH isohormones

Fraction	pI	C _{max} (IU/l)	T _{max} (h)	AUC (IU/h/l)	Clearance rate (ml/h/kg)	T _{1/2-elim} (h)
15	5.49	36.7	0.8	186	82.0	ne
17	5.22	44.9	1.7	500	34.5	11.8
19	4.99	29.0	5.0	558	26.1	12.3
21	4.75	39.6	4.1	1026	14.5	17.8
23	4.51	65.5	7.0	1814	8.8	20.5
24-26	4.27	130.0	2.5	2841	5.9	24.1

ne; could not be estimated

AUC; area-under-plasma-concentration curve (extent of absorption)

pI; isoelectric point

C_{max}; maximum plasma concentrations of immunoreactive FSH (rate of absorption)

T_{max}; time at which the immunoreactive FSH concentrations peaked

T_{1/2-elim}; terminal elimination half life

를 나타내는 것이다 (Table 1).¹⁰ 반면 immunogenicity는 uFSH에 비하여 매우 낮다.

RhFSH는 3.3-6.1사이의 isoelectric point (pI)에서 FSH immunoreactivity의 분포가 이루어지는데, 이는 uFSH에 비하여 isoelectric focusing (IEF)이 다소 높은 것으로 상대적으로 basic isoform의 비율이 높은 경향을 띄게 되는데 (Table 1), 이는 정상 배란주기를 가진 여성에서의 midcycle에 분비되는 자연적인 FSH와 보다 유사한 형태이다. FSH의 isoform은 basic composition을 가질수록 반감기는 짧아지고 clearance rate는 증가되며 (Table 2), 수용체 결합 활성도와 내재적 생물학적 활성도 (intrinsic bioactivity)도 증가하는 경향을 보이거나 in vivo bioactivity는 감소될 수 있다.¹¹

Table 3은 쥐를 대상으로 rhFSH와 uFSH의 약물역동학적 특성을 비교, 분석한 한 연구 자료의 결과를 나타낸다.¹¹ 쥐를 대상으로 한 이 연구에서 흡수율 (absorption rate, C_{max}), 흡수도 (absorption extent, AUC), 혈중 FSH 농도가 최고치에 도달하는 시간 (T_{max}), 반감기 (T_{1/2-elim}) 등에 있어 rhFSH와 uFSH 두 제제간에 유의한 차이를 보이지 않았던 것으로 보고된다.¹¹ 그렇지만 흡수도를 immunoreactive dose로 보정한 값 (immunoreactive dose-normalized values of AUC)에 있

Table 3. Pharmacokinetics of immunoreactive FSH after single-dose i.v. and i.m. of rhFSH and uFSH in rats

Preparation	Dose and route (IU/kg)	C _{max} (IU/l)	T _{max} (h)	AUC (IU/h/l)	nAUC (IU/h/l)	T _{1/2-elim} (h)
rhFSH	50 i.v	—	—	1066±298	126±41	5.7±0.9
uFSH	50 i.v.	—	—	917±238	150±45	6.2±1.0
rhFSH	50 i.m.	23.4±10.4	7.5±2.6	466±223	54±26	11.4±3.9
uFSH	50 i.m.	28.2±8.7	6.3±2.0	498±142	73±22	10.4±3.8

nAUC represent immunoreactive dose-normalized values

어서는 rhFSH가 uFSH에 비하여 유의하게 낮은 값을 보였다. 이는 아마도 rhFSH가 uFSH보다 acidic isoform을 덜 함유하고 있으므로 동일한 *in vivo* bioactivity에 도달하기 위해서는 보다 많은 양의 immunoreactive hormone을 필요로 하기 때문인 것으로 생각된다. 이같은 FSH의 약물역동학 결과는 *Cynomolgus* monkey를 대상으로 한 rhFSH와 uFSH의 비교연구에서도 유사하게 나타났다.¹²

사람을 대상으로 rhFSH와 uFSH의 약물역동학을 비교한 Mannaerts 등의 연구는 다음과 같은 결과를 보였다.¹³ 저성선자극호르몬 상태의 남성과 여성을 대상으로 한 경우 rhFSH나 uFSH를 1회 i.m.한 후의 FSH 흡수율 (absorption rate, AUC)은 남성에서보다 여성에서 유의하게 낮았으며, rhFSH 1회 투여후의 FSH 흡수율은 uFSH에 비하여 유의하게 낮았다. 성선자극호르몬이 결핍된 남성과 여성 모두에서 rhFSH가 투여된 후의 peak concentration (C_{max})은 uFSH 투여후 값의 약 65%로 유의하게 낮았고, FSH 제제에 관계없이 여성에서의 C_{max}는 남성에 비하여 유의하게 낮았다. 반면 이들 대상 여성에서의 T_{max}는 rhFSH와 uFSH를 투여한 경우 모두에서 남성에 비하여 유의하게 더 길었는데, 이는 남성에 비하여 여성에서의 피하지방 비율이 더 크기 때문인 것으로 생각된다. 방출 반감기 (elimination half-life, T_{1/2-elim})는 30~40시간으로 남성과 여성간에는 물론 rhFSH와 uFSH간에도 차이를 보이지 않았다. 그렇지만 rhFSH를 투여한 후 혈청 immunoreactive FSH 농도는 uFSH에 비하여 유사하거나 낮은 반면 FSH의 *in vitro* bioactivity는 rhFSH가 유의하게 높았다. 즉 rhFSH 투여후의 *in-vitro* bio:immuno ratio는 성선자극호르몬이 결핍된 남성과 여성에서 모두 uFSH에 비하여 유의하게 높았다 (Table 4). *In vitro* bioactivity level은 immature rat *in vitro* granulosa cell bioassay를 통하여 이루어졌는데, rhFSH는 uFSH에 비하여 상대적으로 basic isohormone profile을 나타내기 때문에 plasma residence time이 더욱 짧고, 수용체 결합능과 post-receptor signal transduction은 뛰어나므로 *in vitro* bioactivity가 증가된다. FSH 제제 1회 투여후 성선자극호르몬이 결핍된 남성과 여성간의 immunoreactive FSH 농도 비교에 있어서는 여성보다 남성에서 농도가 높은 것으로 나타났다. RhFSH의 일정 용량 (fixed dose)을 매일 투여하는 경우, 3~5일내 steady state level에 도달한다. RhFSH의 초기 투여 용량을 75 IU로 하여 매주 용량을 75 IU씩 증가시켜 225 IU까지 올리는 경우 (multiple rising-dose), 혈청 FSH 농도는 용량 의존성 (dose-dependent)을 보이며 증가하고 투여 시작후 4일경에 steady state level에 도달한다. RhFSH 투여후의 steady state level 및 C_{max}는 모두 체중과 음의 상관 관계를 보이는 경향이 있다. 저성선자극호르몬 상태의 여성에게 rhFSH를 투여하는 경우, 충분한 양의 LH가 존재하지 않음에도 불구하고 정상적인 난포 성장을 유도할 수 있다. 그렇지만 estrogen,

Table 4. Bio:immuno ratios of serum FSH in hypogonadotropic patients measured prior to injection and 6, 24 and 72 hr after the injection of 300 IU rhFSH and 300 IU uFSH¹³

Time (h)	Hypogonadotropic men		Hypogonadotropic women	
	rhFSH	uFSH	rhFSH	uFSH
0	—	—	—	—
6	4.1* (2.2-5.5)	2.4 (1.4-3.5)	3.4* (nd-14.5)	1.8 (0.5-4.7)
24	4.4* (3.1-5.6)	2.5 (nd-2.7)	3.7* (nd-7.7)	1.6 (0.7-2.7)
72	5.5* (nd-21.0)	1.1 (nd-6.4)	4.6* (nd-9.7)	0.9 (nd-3.8)

nd; not detectable, *p<0.05 versus uFSH

androstenedione의 합성 및 자궁내막의 발달은 장애를 받을 수 있다. 고용량의 경구피임제를 2~3주간 투여하여 뇌하수체의 억제를 유도한 여성에게 rhFSH 또는 uFSH를 매일 150 IU씩 7일간 투여했을 때, uFSH에 비하여 rhFSH를 투여한 경우에 성장 난포의 수와 크기가 모두 증가되었다. 이는 uFSH에 비하여 rhFSH의 in vitro bioactivity가 더 높다는 연구 결과와 일맥 상통한다.

1998년 Cotonnec 등¹⁴은 rhFSH와 uFSH의 사람 체내에서의 약물역동학적 특성은 서로 유사하고 이들의 $T_{1/2-elim}$ 는 모두 약 하루이며 분포 반감기 (distribution $T_{1/2}$)는 2시간 가량 되고, rhFSH 또는 uFSH를 1회 주사시 주사 직후에는 잔존하는 내인성 FSH pool에 외인성 FSH가 희석됨으로써 혈청 FSH bio:immunoassay ratio가 일시적으로 감소하는 현상을 나타내나 이후로는 점진적으로 증가하는 양상을 보인다고 보고한 바 있다. 따라서 상기와 같이 두 제제간에 약물역동학적 유사성이 존재하므로 현재 사용되고 있는 uFSH의 과배란유도 protocol에 rhFSH를 적용시켜 임상적으로 사용할 수 있을 것이라 하였다. RhFSH 150 IU를 1회 정맥주사하는 경우 bio:immunoassay ratio가 약 1.6인 rhFSH가 혈액내로 투여될 때 bio:immunoassay ratio가 약 2.7인 내인성 FSH와 혼합됨으로써 주사직후에는 혈청 FSH bio:immunoassay ratio가 약 15% 가량 감소한다. 이같은 상태가 약 2시간동안은 변하지 않는 상태로 유지되나 이후 2일간은 지속적으로 증가하는 양상을 보이고 이후 다시 감소하기 시작하여 주사후 약 7일째에는 정상치로 돌아오게 된다. RhFSH를 매일 반복적으로 피하주사하는 경우에도 1회 주사하는 경우처럼 혈청 FSH bio:immunoassay ratio가 주사직후 일시적으로 감소하였다가 첫 24시간동안 급격히 증가하는 양상을 나타낸다. 이후 매일 rhFSH의 반복 투여로 인하여 혈청 bio:immunoassay ratio는 rhFSH 투여기간동안에는 기저치 정도에서 큰 변화없이 안정되어 있으나, rhFSH의 마지막 투여후에는 1회 피하주사때와 유사한 양상을 보이는데 즉 최종 투여후 약 4일째까지는 bio:immunoassay ratio가 약 3.5로 최고치에 도달하게 되고, 이후 다시 감소하기 시작하여 투여 종료후 약 7일째까지는 기저치로 복귀한다.¹⁵

GnRH agonist를 투여하여 뇌하수체의 억제를 유도한 후 rhFSH로 과배란유도를 시행하는 경우, 비록 rhFSH에는 LH가 전혀 함유되어 있지 않으나 GnRH agonist로 뇌하수체가 down-regulation된 후의 residual LH만으로도 난포의 성장 및 estrogen 합성은 충분한 것으로 알려져 있다. Down-regulation이 유도된 여성에게 하루 150 IU의 rhFSH를 7일간 피하주사할 때, 난포의 성장이 유도될 수 있으며 이때 혈중 inhibin의 최고치와 전체 난포 부피의 최고치간에 그리고

혈청 estradiol의 최고치와 전체 난포 부피의 최고치간에는 모두 유의한 상관 관계가 존재한다. 그렇지만 혈청 FSH 농도의 최고치는 inhibin, estradiol 그리고 전체 난포 부피들중 어느 것과는 상관 관계를 보이지 않는다. 이 과배란유도 과정에서 inhibin의 증가는 난포의 성장, 발달을 나타내는 초기 지표로 알려져 있다.¹⁶ RhFSH 투여시 반복 투여 약 3~4일까지는 rhFSH의 최대 효과가 나타나질 않는다. 따라서 과배란유도를 시행하는 의사는 일정 용량의 rhFSH를 일단 주사 시작하면 이 용량의 rhFSH 효과를 평가하기 위해서는 적어도 4일간은 기다려 봐야만 한다. 즉 rhFSH를 이용한 과배란유도시 투여 용량을 빈번히 조절하는 것은 바람직하지 않으며 일단 투여 용량을 설정하면 적어도 4일간은 지속적으로 동일 용량을 투여하는 것이 좋다.

4. rhFSH와 uFSH의 임상적 사용 및 비교, 평가

현재까지 주로 사용되어 왔던 uFSH는 95% 이상의 요단백질을 함유하고 있어 FSH 분자와 난소 내의 표피성장인자 (epidermal growth factors, EGF)에 영향을 미침으로써 그 효과에 좋지 않은 영향을 초래할 수 있는 반면, rhFSH는 요단백질과 같은 anti-FSH substance를 함유하지 않는 장점이 있다. 또한 rhFSH는 uFSH에 비하여 대량생산이 용이하고, LH 활성도가 없으며, batch간에 일치도가 우수하다. RhFSH는 uFSH와 polypeptide alpha와 beta chain이 유사하고 carbohydrate level이 큰 차이가 없으며 uFSH에 비하여 상대적으로 basic isohormone profile을 나타내기 때문에 plasma residence time이 더욱 짧고, 수용체 결합능과 post-receptor signal transduction이 뛰어나므로 in vitro bioactivity가 증가된다. 이같이 rhFSH는 FSH 특이적 활성도가 우수하므로 uFSH에 비하여 강력하면서도 안전한 배란유도제로 자리매김을 할 수 있을 것으로 생각된다.

uFSH를 사용하는 경우 이의 초기 투여 용량을 대개 150~300 IU/d로 사용하게 된다. 정상 반응군에 해당되는 환자들에서의 초기 투여 용량은 150 IU/d, 36~40세 환자의 첫 번 시술주기에서는 225 IU/d, 40세가 넘는 환자들에서의 첫 번 시술주기에서는 300 IU/d, 시상하부-뇌하수체 기능부전과 같은 저성선자극호르몬 상태의 환자에서는 225 IU/d 등으로 사용하는 것이 바람직한 것으로 추천되어 진다 (Table 5).

RhFSH를 이용한 과배란유도시 standard FSH 용량으로 규정되어 있는 것은 없다. 초기부터 고용량을 사용한다고 해서 임상 결과가 좋은 것은 아니다. 가장 효율적인 최저 용량을 선택하는 것이 경제적 측면과 부작용을 최소화한다는 측면에서 이상적일 것이다. 현재까지 발표된 여러 연구 자료들을 종합해 볼 때 정상 반응군 환자들에서는 초기 투여 용량을 100~200 IU/d로 설정하는 것이 바람직한 것으로 생각되며, 저자는 그간의 국외의 여러 연구 보고 자료들과 저자의 연구 자료들을 기초로 하여 Table 5에 제시된 바와 같이 초기 투여 용량을 설정하였다. 일단 초기 용량을 설정하면 적어도 4일간은 동일 용량을 유지하도록 하는 것이 바람직하다. 이후 rhFSH 투여 용량의 조절은 주로 질식 초음파로 관찰되는 난포의 성장, 발달 정도에 따라 결정되며 이 기준은 uFSH를 사용하는 경우와 다를 바 없어 대개의 경우 step-down fashion으로 이루어 진다.

RhFSH는 근육주사 또는 피하주사로 모두 투여가 가능하다. 피하주사로 투여하는 경우 근육주사로 투여하는 경우에 비하여 C_{max} 가 낮고 T_{max} 은 다소 길다는 등의 약물역동학적 차이는 있을 수 있으나, 효율성 및 부작용의 측면에서 볼 때 두 투여 경로간에 차이를 나타내지 않는 것으로 보고되고 있다.¹⁷ RhFSH의 투여 경로에 따른 부작용 및 치료 효과를 비교 분석한 Out 등

Table 5. Starting dose of rhFSH and uFSH

COH protocol	FSH alone		GnRH agonist long protocol	
	uFSH (IU/d)	rhFSH (IU/d)	uFSH (IU/d)	rhFSH (IU/d)
Previous normal response (> 5 oocytes)	150	100	225	150
Previous low response	300	200	375	250
H-P failure	225	150	-	-
1st cycle, < 36 years	150	100	225	150
1st cycle, 36-40 years	225	150	300	200
1st cycle, > 40 years	300	200	375	250
PCOS	32.5-150	50-100	75-150	50-150
Previous OHSS	32.5-75	50-75	75-107.5	50-100

의 다른 연구¹⁸에서도 국소 증상들중 좌상 (bruising)만이 IM 군에서 37.7%로 SC 군의 54.2%에 비하여 유의하게 낮았을 뿐, 나머지 국소 증상인 동통, 발적, 부종, 소양증 등은 두군간에 유사한 것으로 나타났다 (31.2% vs 28.0%, 13.0% vs 16.1%, 7.8% vs 5.9%, 6.5% vs 3.4%, respectively). 더욱이 회수된 난자 수와 진행성 임신율에 있어서도 IM 군과 SC 군간에 유의한 차이를 보이지 않았던 것으로 보고되었다 (9.8 vs 10.4, 27.1% vs 26.1%, respectively).

1998년 Bennink 등은 rhFSH와 uFSH의 안전성과 효과를 비교하기 위하여 clomiphene에 반응하지 않는 무배란성 불임 환자를 대상으로 시행한 assessor-blind, randomized multicenter study에 대하여 보고한 바 있다.¹⁹ 여기에 포함된 국가는 모두 9개국이었고 대상군의 수는 200명이었으며 rhFSH와 uFSH 각각의 사용군에 포함된 대상군의 연령, 신장, 체중, 그리고 비만지수 (body mass index, BMI) 등의 비교에서는 유의한 차이가 없었다. 또한 LH와 FSH의 기저 농도 비에 따라 각 군을 세 개의 군으로 세분하였을 때, rhFSH와 uFSH 각각의 사용군 내의 각 세분된 군의 비율에 있어서도 차이가 없었다. 그 결과를 보면, 난소 반응이 관찰되지 않아 중도에 주기를 취소해야 했던 경우가 rhFSH군에서는 1.9%였으나, uFSH군에서는 4.5%로 높게 나타났다. 그러나 과반응으로 인하여 취소한 경우는 각각 11.4%와 10.4%로 유사하였다. 각 약제의 총 투여 용량은 rhFSH군이 10.0 앰플, uFSH군이 13.8 앰플, 그리고 총 투여일은 각각 10.0일과 13.0일로 rhFSH 사용시 더 짧은 기간에 더 적은 용량으로 성공적인 배란을 유도할 수 있었으며 (p<0.001, p<0.001, respectively), 총 14일 이상의 배란 기간이 필요했던 경우가 rhFSH군에서는 10%에 불과했던 반면, uFSH군에서는 20%로 나타났다. HCG 투여일에 측정된 난포의 직경이 15 mm 이상 난포의 수와 18 mm 이상인 난포의 수에 있어 양 군간에 차이를 보이지 않았으나 10 mm 이상의 난포의 총 수에 있어서는 rhFSH군에서 3.6개로 uFSH군의 2.6개에 비하여 유의하게 증가되어 있었다. 이는 중간 크기의 난포의 의미있는 증가는 난소과자극증후군 (ovarian hyperstimulation syndrome, OHSS)의 발생에 영향을 미친다는 이론에 비추어 볼 때, 우려할 수도 있는 결과로 추측되었으나, 결과적으로 과자극으로 인한 주기 취소는 양 군간 유사하였고, 실제 OHSS의 발생률은 rhFSH군에서 7.6%로, uFSH군의 4.5%에 비하여 다소 높은 듯

이 보이나 통계적인 의미는 없었으며 중증의 OHSS는 단 1예에 불과하였다고 보고되고 있다. 그럼에도 rhFSH를 사용해서 배란유도를 하는 경우 OHSS의 발생을 방지하기 위한 주의깊은 monitoring이 필요함은 주지의 사실이라 할 수 있다. 양 군간의 누적배란율 (cumulative ovulation rate)은 rhFSH군에서 각각 72%, 89%, 95%였고, uFSH군에서 각각 63%, 88%, 96%로서 양 군간 유의한 차이는 없었다. 또, rhFSH와 uFSH 사용군 각각의 전체적인 배란율을 비교하였을 때에도 69.5%와 66.7%로서 양 군간 통계적인 의미는 발견할 수 없었다. 누적임신율 (cumulative pregnancy rate)에 있어서는 rhFSH군이 27%, uFSH 사용군은 24%로 양 군간 유의한 차이는 없었다. 자연유산율에 있어서도 양 군간 31%와 32%로 차이를 발견할 수 없었고 다태임신율도 의미 있는 차이는 보이지 않았다. RhFSH의 사용으로 생화학적, 혈액학적 이상이나 소변 검사나 활력징후 등에서의 특이한 변화는 나타나지 않았다.

한편 IVF-ET를 시행받는 환자들을 대상으로 시행한 Out 등²⁰의 연구 결과는 다음과 같았다 (Table 6). RhFSH군에서 uFSH군에 비하여 약제의 총 투여 용량 (2139 IU vs. 2385 IU)과 총 투여 기간 (10.7일 vs. 11.3일)이 유의하게 적었음은 물론, 채취된 난자의 총 수 (10.8개 vs. 8.9개)와 양질의 배아의 수 (3.1개 vs. 2.6개)에 있어서도 유의하게 증가되었다. 또한 동일 연구자들에게 의한 다른 보고¹⁷에서 양 군간 배아이식당 착상률과 임신율은 차이를 보이지 않았으나 rhFSH군에서 동결보존한 배아의 수가 유의하게 많았으며 이러한 동결 배아를 사용한 배아이식을 결과에 고려하면, rhFSH군에서 진행 임신율이 유의하게 높았던 것으로 보고하였다. Bergh 등도 IVF-ET를 시행받는 환자들을 대상으로 rhFSH와 uFSH간의 효율성과 안전성을 비교 연구하였다 (Table 6).²¹ 이들은 uFSH로 고순도 uFSH (Metrodin HP)를 사용하였음에도 rhFSH 군이 uFSH 군에 비하여 FSH 투여 기간 및 투여 용량이 유의하게 적었으며, 회수된 난자의 수는 rhFSH 군에서 유의하게 많았다. 회수된 난자의 성숙도에 있어서는 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 얻어진 배아의 수는 rhFSH 군에서 유의하게 많았다. 시술주기당 임상적 임신율과 OHSS 발생 빈도에 있어서는 두 군간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 즉 rhFSH는 고순도 uFSH에 비해서도 효과적이고 효율적인 것으로 나타났다.

그간 발표되어진 여러 연구 결과들을 종합해 보면, clomiphene에 반응하지 않는 무배란성 불임 환자를 위한 배란유도시는 물론 IVF-ET를 시행받는 환자들에서의 과배란유도시에도 rhFSH가 uFSH에 비하여 보다 효과적인 것으로 생각된다 (Table 6). 약제의 안전성 및 부작용도 rhFSH가 uFSH에 비하여 나쁘지는 않은 것으로 생각된다.

5. Conclusion

1980년대와 1990년대를 거치면서 외인성 성선자극호르몬의 수요는 점차 증가하게 되어 그간 폐경기 여성의 소변으로부터 추출해 내어 사용되던 hMG와 uFSH는 그 공급 물량에 있어 한계를 보이기 시작하였다. 이러한 가운데 생명공학 및 분자생물학의 급속한 발전은 새로운 방법에 의한 성선자극호르몬의 생산을 가능하게 하였다. 즉 CHO cell line을 이용한 유전자 재조합으로 rhFSH의 생산이 가능해졌다. RhFSH는 대량 생산이 용이하고 요단백질과 같은 anti-FSH substance를 함유하지 않으며, LH 활성도가 없고, batch간에 일치도가 우수하다. 또한 rhFSH는 근육 주사와 피하주사가 모두 가능하고 어떤 경로로 투여하여도 과배란유도 효과나 부작용에 있어서는 차이가 없는 것으로 알려져 있으므로 환자가 스스로 보다 용이하게 피하주사를 맞을 수

Table 6. Clinical results (rhFSH versus uFSH) in patients undergoing IVF-ET

	COH duration (d)	Total FSH (IU)	No. of follicles ≥14mm (or aspirated)	No. of oocytes retrieved	Preg. rate/cycle	Implantation rate (%)	OHSS incidence (%)
Out et al (1995) ²⁰							
Puregon (n=585)	10.7*	2,138*	7.5*	10.8*	25.7	0.1	3.2
Metrodin (n=396)	11.3	2,385	6.7	9.0	20.4	0.09	2.0
Hedon et al (1995) ²²							
Puregon (n=57)	10.2	2,265	7.3	9.7	30.2	?	5.3
Metrodin (n=33)	10.3	2,213	7.2	8.9	17.4	?	0
Bergh et al (1997) ²¹							
Gonal-F (n=119)	11.0*	1,642.5*	?	12.2*	44.5	32	5.2
Metrodin HP (n=114)	13.5	2,392.5	?	7.6	36.8	31	1.7
Jacob et al (1998) ²³							
Puregon (n=158)	9.5*	2,400*	11*	9*	13.9	?	?
Humegon (n=191)	9.0	3,000	13	10	20.0	?	?
+Orgafol							
Devroey et al (1998) ²⁴							
Puregon (n=51)	13.3	1807	?	11.7	32.6	?	3.9
(low starting dose, 100 IU)							

*p<0.05 versus uFSH (Metrodin or Metrodin HP)

있다. RhFSH는 uFSH에 비하여 상대적으로 basic isohormone profile을 나타내기 때문에 plasma residence time이 더욱 짧고, 수용체 결합능과 post-receptor signal transduction이 뛰어나므로 in vitro bioactivity가 증가된다. 따라서 rhFSH는 강력하면서도 안전한 과배란유도제로 사용될 수 있으리라 생각된다. 실제로 rhFSH와 uFSH의 효과와 안전성을 비교한 여러 임상 연구들은 rhFSH는 uFSH에 비하여 배란유도 및 과배란유도시 더 적은 용량으로 더욱 우수한 난소 반응을 유도할 수 있었던 것으로 보고한 바 있다. 그렇지만 아직까지 임상적으로 사용되어온 rhFSH의 역사가 짧은 까닭에 아직은 과배란유도 protocol이 완전히 정립되어 있지 않으나 기존의 uFSH 사용 protocol과 그 기본틀은 함께 하여도 무방한 것으로 사료된다. UFSH에 비하여 rhFSH가 많은 장점을 갖고 있음에도 불구하고 아직까지는 가격적 부담으로 인하여 모든 환자에게 rhFSH를 사용하는 것은 무리가 따르는 것으로 생각된다. 치료에는 항상 cost-benefit의 측면이 고려되어야만 하므로 환자의 선정에 보다 신중을 기해야 할 것이다. 하지만 향후 rhFSH의 가격적 부담은 상대적으로 줄어들 것이며 rhFSH의 많은 장점들이 더욱 부각될 수 있을 것으로 기대된다. 또한 rhFSH는 한층 더 개발의 소지를 갖고 있는데, 예를 들면 유전자 재조합의 기법을 사용하여 FSH coding sequence의 3' end에 hCG subunit의 carboxy terminus를 연결하여 확장시키게 되면 C_{max}와 T_{1/2-elim}를 더욱 증가시킬 수 있으며, 반대로 site-directed mutagenesis에 의하여 FSH의

α subunit에 부착된 oligosaccharide chain을 잘라내면 C_{max} 와 $T_{1/2-elim}$ 를 극도로 감소시킨 rhFSH를 생산할 수 있을 것이다. 이같이 약물역동학적 특성상의 변화를 준 다양한 rhFSH가 생산되면 저반응군 환자나 PCOS 환자들에서 보다 적절한 형태의 rhFSH를 선택하여 사용할 수 있게 될 것이다. 따라서 종국적으로는 rhFSH가 주된 외인성 성선자극호르몬으로 자리잡게 되리라 사료된다.

참 고 문 헌

1. Smith PE, Engle ET. Experimental evidence regarding the role of anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *Am J Anat* 1927; 40: 159-217.
2. Borth R, Lunenfeld B, de Watteville H. Activite gonadotrope d'un extrait d'urines de femmes en menopause. *Experientia* 1954; 10: 264-8.
3. Carroll WL. Introduction to recombinant-DNA technology. *Am J Clin Nutr* 1993; 58(suppl): 249s-58s.
4. Simpson AJ, Walker T, Terry R. An introduction to recombinant DNA technology. *Parasitology* 1986; 92(suppl): 7s-14s.
5. Shoham Z, Insler V. Recombinant technique and gonadotropins production: new era in reproductive medicine. *Fertil Steril* 1998; 69(suppl 2): 3s-15s.
6. Ogura T, Hiraga S. Partition mechanism of F plasmid: two plasmid gene-encoded products and a cis-acting region are involved in partition. *Cell* 1983; 32: 351-60.
7. Loumaye E, Howles C. Superovulation for assisted conception: the new gonadotropins. In: Brinsden PR, editor. *A textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction*. 2nd ed. New York: Parthenon Publishing, 1999. p.103-7.
8. Keene JL, Matzuk MM, Otani T, Fauser BC, Galway AB, Hsueh AJ, et al. Expression of biologically active human follitropin in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 1989; 264: 4769-75.
9. Galway AB, Hsueh AJ, Keene JL, Yamoto M, Fauser BC, Boime I. In vitro and in vivo bioactivity of recombinant human follicle-stimulating hormone and partially deglycosylated variants secreted by transfected eukaryotic cell lines. *Endocrinology* 1990; 127: 93-100.
10. Mannaerts B, De Leeuw R, Geelen J, Van Ravesrein A, Van Wezenbeek P, Schuurs A, et al. Comparative in vitro and in vivo studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1991; 129: 2623-30.
11. De Leeuw R, Mulders J, Voortman G, Rombout F, Damm J, Kloosterboer L. Structure-function relationship of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon[®]). *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 361-9.
12. Porchet HC, LeCotonnec JY, Canali S, Zanolio G. Pharmacokinetics of recombinant human follicle stimulating hormone after intravenous, intramuscular, and subcutaneous administration in monkeys, and comparison with intravenous administration of urinary follicle stimulating hormone. *Drug Metab Dispos* 1993; 21: 144-50.
13. Mannaerts BMJL, Rombout F, Out HJ, Bennink HJTC. Clinical profiling of recombinant follicle

- stimulating hormone (rFSH; Puregon): relationship between serum FSH and efficacy. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 153-61.
14. LeCotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Khan A, Toon S, Rowland M. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone (FSH). I. Comparative pharmacokinetics with urinary human FSH. *Fertil Steril* 1998; 69(suppl 2): 16s-24s.
 15. LeCotonnec JY, Porchet HC, Beltrami V, Khan A, Toon S, Rowland M. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone. II. Single doses and steady state pharmacokinetics. *Fertil Steril* 1998; 69(suppl 2): 25s-31s.
 16. Porchet HC, LeCotonnec JY, Loumaye E. Clinical pharmacology of recombinant human follicle-stimulating hormone. III. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling after repeated subcutaneous administration. *Fertil Steril* 1998; 69(suppl): 32s-9s.
 17. Out HJ, Mannaerts BMJL, Driessen SGAI, Bennink HJTC. Recombinant follicle stimulating hormone (rFSH; Puregon) in assisted reproduction: more oocytes, more pregnancies. Results from five comparative studies. *Hum Reprod Update* 1996; 2: 162-71.
 18. Out HJ, Reimitz PE, Bennink HJTC. A prospective, randomized study to assess the tolerance and efficacy of intramuscular and subcutaneous administration of recombinant follicle-stimulating hormone (Puregon). *Fertil Steril* 1997; 67: 278-83.
 19. Bennink HJTC, Fauser BCJM, Out HJ. Recombinant follicle-stimulating hormone (FSH; Puregon) is more efficient than urinary FSH (Metrodin) in women with clomiphene citrate-resistant, normogonadotropic, chronic anovulation: a prospective, multicenter, assessor-blind, randomized, clinical trial. *Fertil Steril* 1998; 69: 19-25.
 20. Out HJ, Mannaerts BMJL, Driessen SGAI, Bennink HJTC. A prospective, randomized, assessor-blind, multicentre study comparing recombinant and urinary follicle stimulating hormone (Puregon versus Metrodin) in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1995; 10: 2534-40.
 21. Bergh C, Howles CM, Borg K, Hamberger L, Josefsson B, Nilsson L, et al. Recombinant human follicle stimulating hormone (r-hFSH; Gonal-F) versus highly purified urinary FSH (Metrodin HP): results of a randomized comparative study in women undergoing assisted reproductive techniques. *Hum Reprod* 1997; 12: 2133-9.
 22. Hedon B, Out HJ, Hugues JN, Camier B, Cohen J, Lopes P, et al. Efficacy and safety of recombinant FSH (Puregon) in infertile women pituitary-suppressed with triptorelin undergoing in-vitro fertilization: a prospective, randomized assessor-blind multicenter trial. *Hum Reprod* 1995; 10: 3102-6.
 23. Jacob S, Drudt L, Conroy R, Harrison RF. Outcome from consecutive in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection attempts in the final group treated with urinary gonadotrophins and the first group treated with recombinant follicle stimulating hormone. *Hum Reprod* 1998; 13: 1783-7.
 24. Devroey P, Tournaye H, Van Steirteghem A, Hendrix P, Out HJ. The use of a 100 IU starting dose of recombinant follicle stimulating hormone (Puregon) in in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 1998; 13: 565-6.