



Оригинальная статья / Research article

## Физико-химическая и функциональная характеристика лекарственного препарата Ринсулин® Р

А. В. Бабина✉, Р. В. Драй, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, П. Г. Заикин, В. И. Шмурак, Т. Э. Елтышева, И. Е. Макаренко

ЗАО «Фарм-Холдинг», 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34-А

✉ Контактное лицо: Бабина Анна Владимировна. E-mail: Anna.Babina@gropharm.com

ORCID: А. В. Бабина – <https://orcid.org/0000-0003-3024-4009>; Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>; В. Б. Сапарова – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>; А. Н. Афанасьева – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>; П. Г. Заикин – <https://orcid.org/0009-0008-8467-9781>; В. И. Шмурак – <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>; Т. Э. Елтышева – <https://orcid.org/0000-0002-1931-9455>; И. Е. Макаренко – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>.

Статья поступила: 10.08.2022

Статья принята в печать: 19.05.2023

Статья опубликована: 25.05.2023

### Резюме

**Введение.** В настоящее время биосимиляры обрели довольно широкое применение в терапии ряда хронических и опасных для жизни заболеваний. Благодаря им происходит значительное снижение экономического давления биологических препаратов на систему здравоохранения и обеспечивается широкая доступность пациентов к эффективному и безопасному лекарственным средствам. Одним из важнейших этапов доказательства биосимилярности является проведение физико-химической и функциональной характеристики белков. Данный комплекс исследований является общепринятым, максимально чувствительным и позволяет дать заключение о соответствии биосимиляра оригинальному препарату.

**Цель.** Проведение физико-химической и функциональной характеристики препарата Ринсулин® Р (GP40051) в сравнении с оригинальным препаратом Хумулин® Регуляр.

**Материалы и методы.** Первичная структура была исследована методами высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации. Идентичность более высоких белковых структур была доказана методами кругового дихроизма, капиллярного изофокусирования, спектрометрии и динамического рассеяния света. Сопоставимость профилей примесей препаратов оценивали при помощи методов эксклюзионной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Функциональная характеристика включала в себя метаболический клеточный тест «захват глюкозы» и анализы связывания с рецептором инсулина (кинетика связывания с рецепторами типа А и В, фосфорилирование инсулинового рецептора).

**Результаты и обсуждение.** В ходе данной работы была показана идентичность физико-химических и функциональных характеристик GP40051. Между препаратом сравнения GP40051 и референтным препаратом Хумулин® Регуляр было продемонстрировано полное совпадение первичной последовательности, структур высокого порядка и профилей примесей. Функциональные исследования показали, что GP40051 и Хумулин® Регуляр обладают одинаковой активностью.

**Заключение.** По результатам исследования подтверждена аналитическая биосимилярность препарата Ринсулин® Р (GP40051) оригинальному препарату Хумулин® Регуляр, что обеспечило научную основу для проведения специально разработанной клинической программы, и явилось основанием для регистрации в РФ.

**Ключевые слова:** аналитическая сопоставимость, биоаналог, биосимиляр, генно-инженерный инсулин человека, ГИИЧ

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** А. В. Бабина, И. Е. Макаренко осуществляли разработку программы исследования. В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, П. Г. Заикин, В. И. Шмурак, Т. Э. Елтышева являются исполнителями исследования. Все авторы проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

**Финансирование.** Спонсор данного исследования ООО «ГЕРОФАРМ».

**Для цитирования:** Бабина А. В., Драй Р. В., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Заикин П. Г., Шмурак В. И., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е. Физико-химическая и функциональная характеристика лекарственного препарата Ринсулин® Р. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2023;12(2):124–134. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134>

## Physicochemical and Functional Characterization of Medicinal Product Rinsulin® R

Anna V. Babina✉, Roman V. Drai, Valerya B. Saparova, Alina N. Afanasyeva, Pavel G. Zaikin, Vladimir I. Shmurak, Tatyana E. Eltysheva, Igor E. Makarenko

CJSC "Pharm-Holding", 34-A, Svyazi str., Strel'na settlement, Saint-Petersburg, 198515, Russia

✉ Corresponding author: Anna V. Babina. E-mail: Anna.Babina@gropharm.com

© Бабина А. В., Драй Р. В., Сапарова В. Б., Афанасьева А. Н., Заикин П. Г., Шмурак В. И., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е., 2023

© Babina A. V., Drai R. V., Saparova V. B., Afanasyeva A. N., Zaikin P. G., Shmurak V. I., Eltysheva T. E., Makarenko I. E., 2023

ORCID: Anna V. Babina – <https://orcid.org/0000-0003-3024-4009>; Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>; Valerya B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>; Alina N. Afanasyeva – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>; Pavel G. Zaikin – <https://orcid.org/0009-0008-8467-9781>; Vladimir I. Shmurak – <https://orcid.org/0000-0003-0282-9843>; Tatyana E. Eltyshcheva – <https://orcid.org/0000-0002-1931-9455>; Igor E. Makarenko – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>.

Received: 10.08.2022    Revised: 19.05.2023    Published: 25.05.2023

## Abstract

**Introduction.** Currently, biosimilars have found quite widespread use in the treatment of a number of chronic and life-threatening diseases. Thanks to them, there is a significant decrease of the economic pressure of biological drugs on the health care system and wide access of patients to effective and safe medicines is ensured. One of the most important stages of proving biosimilarity is the physicochemical and functional characterization of proteins. This set of studies is generally accepted, as sensitive as possible and allows us to give a conclusion about the compliance of the biosimilar with the original drug.

**Aim.** Conducting physicochemical and functional characterization of medicinal product Rinsulin® R (GP40051) in comparison with the original drug Humulin® Regular.

**Materials and methods.** Primary structure was analyzed by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection and matrix assisted laser desorption/ionization. The identity of the higher protein structures was proved by the methods of circular dichroism, capillary isoelectric focusing, spectrometry and dynamic light scattering. The comparability of the impurity profiles of the preparations was evaluated using the methods of exclusive chromatography and reverse-phase high-performance liquid chromatography. Functional characterization included a metabolic cell test "glucose uptake" and insulin receptor-binding assay (kinetics of binding to type A and B receptors, phosphorylation of insulin receptor).

**Results and discussion.** In the course of this research, the identity of the physicochemical and functional characteristics of GP40051 was shown. A complete overlap of primary sequence, high-order structures and impurity profiles was demonstrated between the comparison drug GP40051 and the reference drug Humulin® Regular. Functional studies have shown that GP40051 and Humulin® Regulars have the same activity.

**Conclusion.** The results of the quality comparability study demonstrated similarity of Rinsulin® R to the reference medicinal product Humulin® Regular, providing the scientific basis for conducting a specifically designed clinical programme, and supported registration in Russian Federation.

**Keywords:** analytical comparability, biosimilar, genetically engineered human insulin

**Conflict of interest.** The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Contribution of the authors.** Anna V. Babina, Igor E. Makarenko carried out the development of the research program. Valerya B. Saparova, Alina N. Afanasyeva, Pavel G. Zaikin, Vladimir I. Shmurak, Tatyana E. Eltyshcheva are researchers. All authors interpreted the results. All the authors took part in the discussion of the results and writing the text of the article.

**Funding.** The sponsor of this study is LLC "GEROPHARM".

**For citation:** Babina A. V., Drai R. V., Saparova V. B., Afanasyeva A. N., Zaikin P. G., Shmurak V. I., Eltyshcheva T. E., Makarenko I. E. Physicochemical and functional characterization of medicinal product Rinsulin® R. *Drug development & registration*. 2023;12(2):124–134. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134>

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря достижениям в области биотехнологий стало возможным разрабатывать специализированные препараты, используемые в различных областях медицины, таких как эндокринология, ревматология, дерматология, гастроэнтерология и онкология [1]. Их появление значительно изменило прогноз многих тяжелых заболеваний. Создание биофармацевтических препаратов сопряжено с высокими затратами на разработку, производство, оборудование, клинические и неклинические испытания. Вследствие чего они становятся менее доступны широкому потребителю. Эту проблему решает разработка биосимиляров. Биоаналоги имеют более короткий срок утверждения, а стоимость разработки может составлять 10–20 % от стоимости инновационного препарата [2]. Благодаря

этому препараты выпускаются по сниженным ценам по сравнению с эталонными, что обычно приводит к снижению стоимости биологического лечения в целом без снижения качества медицинской помощи, тем самым оказывая чистый положительный эффект на устойчивость здравоохранения [3].

По определению *биосимиляр* – это биологический лекарственный препарат, который содержит версию действующего вещества, зарегистрированного биологического оригинального препарата, и для которого продемонстрировано сходство (подобие) на основе сравнительных исследований с оригинальным средством по показателям качества, функциональной активности, эффективности и безопасности [4]. Создание подобных препаратов является жестко регулируемым процессом, регламенти-

руемым большим количеством как российских, так и зарубежных руководств, таких как Решение ЕЭК<sup>1</sup>, руководства FDA<sup>2</sup>, EMA<sup>3,4,5</sup>, ICH<sup>6</sup>.

В отличие от генериков лекарственных препаратов, где воспроизведение лекарственной структуры является относительно простой задачей, доказательство структуры биологических препаратов значительно затруднено. В первую очередь это обусловлено размерами биоаналогов, которые превосходят генерики в сотни, а нередко и в тысячи раз. С увеличением молекулы приходит усложнение строения и появление вариантов пространственной укладки, что также требует полного подтверждения сопоставимости [5]. Это накладывает отпечаток на взаимосвязь структуры и функции. Усложнение строения влечет за собой снижение стабильности и сильную подверженность внешним влияниям [6].

Как правило, терапевтические белки производятся в живых системах, например *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae*. Благодаря чему крупные, более 80 кДа молекулы, всегда обладают большой вариабельностью и точное повторение их структуры не всегда возможно [7–9]. Это объясняется явлением микрогетерогенности, возникающим вследствие мо-

<sup>1</sup> Решение № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина». Доступно по: [https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd\\_21112016\\_89](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89). Ссылка активна на 23.06.2022.

<sup>2</sup> Guidance for Industry: Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations. Available at: <https://www.fda.gov/media/125484/download>. Accessed: 23.06.2022.

<sup>3</sup> Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing\\_en-0.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-non-clinical-clinical-development-similar-biological-medicinal-products-containing_en-0.pdf). Accessed: 23.06.2022.

<sup>4</sup> Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active\\_en-2.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active_en-2.pdf). Accessed: 23.06.2022.

<sup>5</sup> Reflection paper on statistical methodology for the comparative assessment of quality attributes in drug development. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-statistical-methodology-comparative-assessment-quality-attributes-drug-development\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/reflection-paper-statistical-methodology-comparative-assessment-quality-attributes-drug-development_en.pdf). Accessed: 23.06.2022.

<sup>6</sup> ICH Topic Q 5 E Comparability of Biotechnological/Biological Products. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnological/biological-products-step-5\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/ich-q-5-e-comparability-biotechnological/biological-products-step-5_en.pdf). Accessed: 23.06.2022.

дификации клеткой-производителем (гликозилирование, протеолиз и т. д.), особенностей условий процесса (окисление, дезаминирование), реакций со вспомогательными веществами, частичной денатурации и агрегации [2, 10, 11]. Дальнейшая гетерогенность может возникнуть, если белок намеренно модифицирован, например путем многоузлового пегилирования [12]. Исходя из этого, даже высокоочищенные белки никогда не состоят из одного молекулярного образования, а представляют собой смеси многих близкородственных молекулярных соединений [6]. При этом вариабельность наблюдается даже в оригинальном препарате от серии к серии [11]. Таким образом, принцип молекулярной идентичности, который используется при разработке генериков, не применим к биологическим лекарственным средствам.

Мономер инсулина состоит из 51 аминокислотного остатка, то есть его молекулярная масса составляет около 5,8 кДа [13]. Такие сравнительно небольшие размеры белка позволяют стабилизировать его производственный процесс и получать максимально идентичные молекулы.

Учитывая данные особенности биологических препаратов, становится необходимым утверждение их сходства с эталонным лекарственным средством как с точки зрения физико-химических, так и функциональных свойств. Аналитическое сходство структурных и функциональных показателей имеет решающее значение и для того, чтобы мы могли предполагать отсутствие значимых различий в клинических результатах [14, 15].

Таким образом, при планировании и проведении любого исследования сопоставимости необходимо соблюдение ряда принципов, без которых невозможно объективно оценить сходство или различие испытуемых препаратов [15–17]:

1. Характеризация должна быть всесторонней и включать как физико-химические, так и функциональные показатели.
2. Использование специфичных и чувствительных методик.
3. Достаточность методов исследования.
4. Анализ препаратов проводится параллельно в одном эксперименте.
5. Необходимо оценить вариативность продукта.
6. Использование ортогональных методов.

Полная панель аналитических методов насчитывала более 20 показателей качества. В настоящей статье представлены наиболее показательные и информативные результаты.

## Цель

Проведение физико-химической и функциональной характеристики препарата Ринсулин® Р в сравнении с оригинальным препаратом Хумулин® Регуляр.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Препараты

Объектом исследования аналитической сопоставимости в качестве тестируемого препарата выступил Ринсулин® Р (GP40051), раствор для инъекций, 100 МЕ/мл. Это препарат, содержащий в качестве активной фармацевтической субстанции генно-инженерный инсулин человека, разработанный ООО «ГЕРОФАРМ» (Россия). Разработка GP40051 была проведена в R&D центре ООО «ГЕРОФАРМ» (ЗАО «Фарм-Холдинг»). Полный цикл производства осуществляется на принадлежащем ООО «ГЕРОФАРМ» заводу в России.

В качестве референтного был использован Хумулин® Регуляр, раствор для инъекций, 100 МЕ/мл, производства Lilly France (Франция). Препарат был приобретен у местных дистрибьюторов и хранился в соответствии с инструкциями производителя.

Оценка аналитической сопоставимости включала анализ в общей сложности 9 серий Ринсулин® Р (GP40051) и 6 серий Хумулин® Регуляр.

### Структура белка

**Первичная структура.** Определение массы нативного белка и его субъединиц проводили с использованием MALDI-времетра масс-спектрометра UltrafleXtreme (Bruker, США). Для получения спектров цепей инсулина молекулярные массы были проанализированы путем получения спектров образцов после восстановления дисульфидных связей дитиотреитолом. Протеолиз белка осуществлялся при помощи ферментативного гидролиза эндопротеиназой Glu-C из *Staphylococcus aureus* V8. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки составляла 0,003 % (30ppm).

Первичная структура инсулина в GP40051 и Хумулин® Регуляр была подтверждена сравнительным пептидным картированием. Этот подход обеспечил полный охват аминокислотной последовательности. Картирование проводилось в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях на масс-спектрометре Varian 500-MS IT (ионная ловушка) и хроматографе Waters ACQUITY UPLC с использованием колонки Waters ACQUITY VEN300 C18, 2,1 × 50 мм. Регистрируемые длины волн – 205 и 280 нм. Для предотвращения дисульфидного обмена ферментативный гидролиз инсулина протеазой V8 проводился в кислой среде.

Масс-спектры были обработаны с помощью программного пакета FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics GmbH, Германия). При помощи программы BioTools 3.2 (Bruker Daltonics GmbH, Германия) (опция «пептидный фингерпринт») провели идентификацию в локальной базе.

**Высшие структуры.** Вторичная структура GP40051 была охарактеризована с помощью спектроскопии кругового дихроизма (178–260 нм). Эксперименты

проводились на спектрометре Chirascan CD Spectrometer (Applied Photophysics Ltd., Англия). Измерение исследуемых образцов проводилось в 3 повторениях. Перед проведением анализа препараты инсулина были обессолены. Обработка полученных данных осуществлялась в программах Origin 8.1 и MS Excel 2016, усреднены и сглажены по методу Савитского – Голея.

Для анализа третичной структуры использовалась оценка флуоресценции спектрофотометрическим методом. Измерения проводили на спектрофлуориметре FluoroMax Plus (HORIBA Scientific, Франция – Япония) и спектрофотометре Carry 300 Bio (Varian Australia Pty Ltd., Австралия) в пределах 250–300 нм. Так как в исследуемом веществе присутствуют аминокислотные остатки тирозина, в качестве стандартного раствора сравнения был выбран раствор тирозина, спектры поглощения и флуоресценции которого практически совпадают с спектрами исследуемого вещества. В качестве ортогонального метода, характеризующего третичную структуру белка, был использован метод капиллярного изофокусирования.

Полидисперсность и гидродинамические параметры образцов были изучены методом динамического рассеяния света (DLS) посредством лазерного анализатора размера частиц Zetasizer Nano (Malvern Panalytical, Великобритания).

### Определение родственных примесей

Характеристика примесей с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу инсулина (высокомолекулярные белки), проводилась методом эксклюзионной жидкостной хроматографии. Для эксперимента была выбрана колонка Insulin HMWP (Waters Corporation, США) (300 × 7,8 мм, размер частиц 10 мкм, диаметр пор 125 Å). Детектирование осуществлялось на жидкостном хроматографе LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония) при температуре колонки 25 °C со скоростью потока 0,5 мл/мин в течение 35 мин. Спектры снимались при длине волны 276 нм.

Для идентификации A21-дезамидоинсулина и других родственных примесей был выбран метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Разделение проводили в колонке Luna C18(2) (Phenomenex, США) (250 × 4,6 мм, C18, размер частиц 5 мкм, диаметр пор 100 Å) при температуре 40 °C со скоростью потока 1,0 мл/мин в течение 50 мин.

### Функциональная характеристика *in vitro*

**Исследование кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия с рецепторами IR-A и IR-B** проводили с использованием метода безмаркерной интерферометрии на планшетном интерферометре Octet RED96. Анализ основан на оценке равновесной константы KD в сравнительном аспекте между исследуе-

мыми препаратами. Для оценки связывания готовили растворы инсулинового рецептора типа А и типа В в одинаковой концентрации. Перед выполнением анализа сенсоры гидратировали в фосфатно-солевом буфере.

Фосфорилирование инсулинового рецептора проводили на клеточной линии миоцитов L6J1, дифференцированных в миотубулы, методом Вестерн-блоттинга (Western blot). Поскольку данный метод является полуколичественным, статистическую обработку данных не проводили. В качестве критерия приемлемости использовали наличие специфического дозозависимого отклика.

Метаболический тест «захват глюкозы» был проведен на клеточной линии миоцитов L6J1, дифференцированных в миотубулы, как было описано ранее [18]. Стимуляция захвата глюкозы проводилась посредством внесения в лунки испытуемых образцов инсулина человека. Измерение концентрации глюкозы проводили при помощи набора ГЛЮКОЗА GOD-PAP (ООО НПФ «АБРИС+», Россия). Количество поглощенной глюкозы в % оценивали как разность между концентрациями глюкозы в культуральной среде клеток, обработанных препаратами инсулина, и контрольных клеток.

### Статистическая обработка данных

Итоговый анализ данных проводили с использованием метода  $\pm 3SD$ . При нормальном гауссовском распределении он включает в себя >99 % всей генеральной совокупности и, таким образом, полученные значения могут быть экстраполированы на все серии препарата. Интервальные границы  $\pm 3SD$  от среднего значения референтных препаратов были использованы для оценки сопоставимости исследуемого препарата. В тех случаях, где оценка диапазона, основанная на среднем  $\pm 3SD$ , не была приемлема, как, например, в случае подтверждения молекулярной массы, был применен заранее определенный диапазон.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Детальная структурная характеристика GP40051 и Хумулин® Регуляр была выполнена с использованием современных аналитических методов, которые предоставили информацию о первичных, вторичных и высших структурах, а также о родственных примесях. В таблице 1 представлены краткие результаты физико-химического исследования.

### Первичная структура и молекулярная масса

Одним из общих требований, предъявляемым к биоаналогичным препаратам, является соответствие первичной структуры эталонному лекарственному средству [14]. Методом матрично-активированной

лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) были подтверждены массы интактного белка и цепей А и В GP40051 и эталонного инсулина с точностью до  $\pm 0,03$  % (см. таблицу 1). Средние молекулярные массы, полученные в результате этих экспериментов, были идентичны теоретически рассчитанным для всех исследуемых продуктов.

Аминокислотная последовательность была определена при помощи пептидного картирования путем протеолитического расщепления полипептидов с последующим сравнением. В 100 % измерений была показана полная сопоставимость образуемых фрагментов. В таблице 1 представлены массы фрагментов, детектируемых после протеолиза белка в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях. Во всех сериях препаратов произошло образование 9 прогнозируемых пептидов. В спектрах присутствовали сигналы масс 1376,5 Да, 2967,4 Да, 3365,4 Да, 4707,0 Да и 5806,5 Да, соответствующие заявленным дисульфидным связям. Также выявлены сигналы масс 866,5 Да, 1481,7 Да и 1886,8 Да, соответствующие фрагментам, содержащим цистеин. Их присутствие может быть обусловлено разрушением дисульфидной связи между цепями белка под воздействием ионизации. Все значения масс пептидов для GP40051 были аналогичны значениям для Хумулина® Регуляр.

Наложение профилей хроматографических пиков после проведения гидролиза инсулина протеазой V8 демонстрировало высокое сходство между препаратами (рисунок 1).

Основываясь на результатах пептидного картирования и аминокислотной последовательности инсулина в GP40051 и Хумулин® Регуляр можно судить о идентичности их первичной структуры.

### Анализ высоких структур белка

От правильности дальнейшей упаковки пептидной цепи в пространственные структуры зависит то, какими функциональными и иммунологическими свойствами будет обладать данный белок. Оценка вторичных структурных элементов производилась путем снятия спектров кругового дихроизма (рисунок 2) с дальнейшим вычислением процентного содержания компонентов (см. таблицу 1).

После расчета интервальных границ  $\pm 3SD$  в обеих группах исследованных образцов GP40051 и Хумулин® Регуляр была продемонстрирована сходная склонность к образованию как спиралей, так и слоев.

Информация о структурах более высокого порядка была получена с использованием нескольких ортогональных методов, включая метод флуоресценции, капиллярное изoeлектрофокусирование и DLS.

Для характеристики третичной структуры и уточнения пространственного расположения отдельных аминокислотных остатков были сняты спектры флуоресценции стандартного раствора тирозина и исследуемых образцов (рисунок 3).

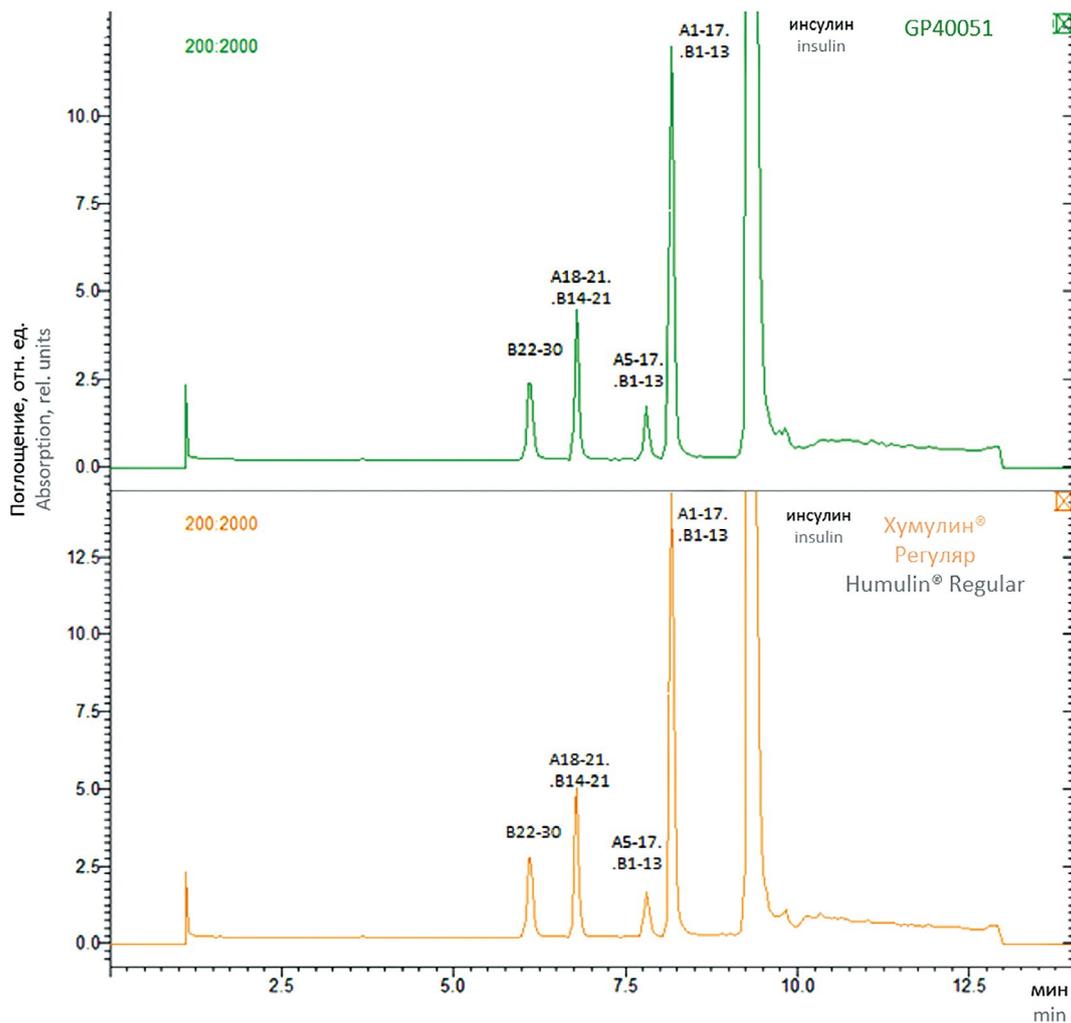
Таблица 1. Физико-химическая характеристика

Table 1. Physico-chemical characterization

Атрибут Attribute	Аналитический метод Analytical method	GP40051	Хумулин® Регуляр Humulin® Regular
<i>Первичная структура Primary structure</i>			
Масса нативного белка Intact protein mass	МАЛДИ MALDI	5804,6 Да ± 0,003 % 5804.6 Da ± 0.003 %	5804,6 Да ± 0,003 % 5804.6 Da ± 0.003 %
Масса А цепи A-chain mass	МАЛДИ MALDI	2383,0 Да ± 0,003 % 2383.0 Da ± 0.003 %	2383,0 Да ± 0,003 % 2383.0 Da ± 0.003 %
Масса В цепи B-chain mass	МАЛДИ MALDI	3428,7 Да ± 0,003 % 3428.7 Da ± 0.003 %	3428,7 Да ± 0,003 % 3428.7 Da ± 0.003 %
Первичная структура Primary structure	Пептидное картирование Peptide mapping	416,2 Да ± 0,003% 416.2 Da ± 0.003%	416,2 Да ± 0,003 % 416.2 Da ± 0.003 %
		1115,6 Да ± 0,003 % 1115.6 Da ± 0.003 %	1115,6 Да ± 0,003 % 1115.6 Da ± 0.003 %
		2967,4 Да ± 0,003 % 2967.4 Da ± 0.003 %	2967,4 Да ± 0,003 % 2967.4 Da ± 0.003 %
		1376,5 Да ± 0,003 % 1376.5 Da ± 0.003 %	1376,5 Да ± 0,003 % 1376.5 Da ± 0.003 %
		3365,4 Да ± 0,003 % 3365.4 Da ± 0.003 %	3365,4 Да ± 0,003 % 3365.4 Da ± 0.003 %
		1489,7 Да ± 0,003 % 1489.7 Da ± 0.003 %	1489,7 Да ± 0,003 % 1489.7 Da ± 0.003 %
		512,1 Да ± 0,003 % 512.1 Da ± 0.003 %	512,1 Да ± 0,003 % 512.1 Da ± 0.003 %
		1481,7 Да ± 0,003 % 1481.7 Da ± 0.003 %	1481,7 Да ± 0,003 % 1481.7 Da ± 0.003 %
		866,5 Да ± 0,003 % 866.5 Da ± 0.003 %	866,5 Да ± 0,003 % 866.5 Da ± 0.003 %
		5806,5 Да ± 0,003 % 5806.5 Da ± 0.003 %	5806,5 Да ± 0,003 % 5806.5 Da ± 0.003 %
Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	Пептидное картирование Peptide mapping	Подтверждена Confirmed	Подтверждена Confirmed
<i>Структуры высокого порядка Higher order structure</i>			
Вторичная структура The secondary structure	Круговой дихроизм Circular dichroism spectroscopy	α-спираль 39–42 % α-helix 39–42 %	α-спираль 40–42 % α-helix 40–42 %
		β-слой 18–19 % β-sheet 18–19 %	β-слой 11–16 % β-sheet 11–16 %
Изоэлектрическая точка Isoelectric point	Капиллярное изоэлектрофокусирование Capillary isoelectrofocusing	6,2	6,2
Квантовый выход флуоресценции Fluorescence quantum yield	Спектрофотометрия Spectrophotometry	0,11–0,14	0,11–0,13
Пик распределения частиц Peak of particle distribution	Динамическое рассеяние света Dynamic light scattering	3,80–4,30 нм 3.80–4.30 nm	3,90–4,50 нм 3.90–4.50 nm
<i>Родственные примеси Product-related impurities</i>			
Содержание ВМБ The content of HMP	Эксклюзионная хроматография Exclusive chromatography	0,16–0,20 %	0,09–0,21 %
A21-дезамидоинсулин A21-deamidoinsulin	Обращенно-фазная ВЭЖХ Reversed-phase chromatography	0,16–0,18 %	0,21–0,24 %

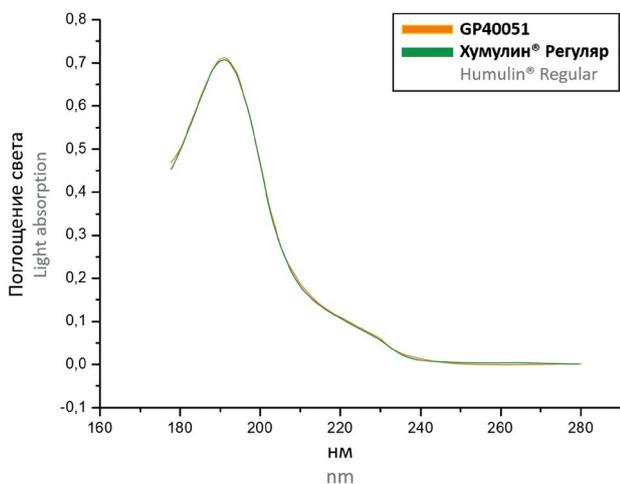
**Примечание.** Представлены минимальные и максимальные показатели для каждого из исследуемых препаратов.

**Note.** The minimum and maximum values for each of the studied drugs are presented.



**Рисунок 1.** Хроматограммы продуктов гидролиза инсулина в невосстанавливающих условиях

**Figure 1.** Chromatograms of insulin hydrolysis products under non-reducing conditions



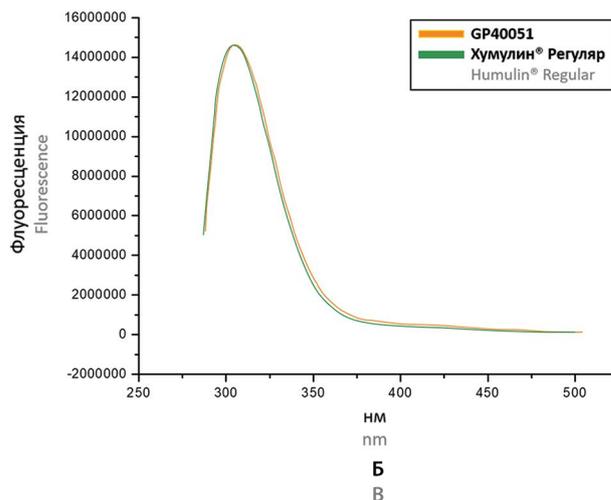
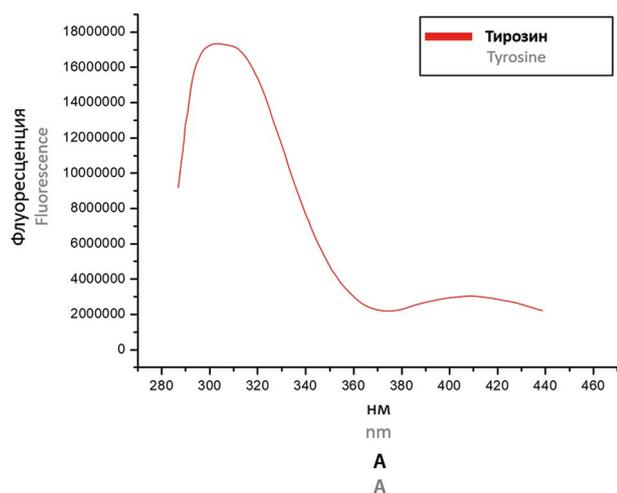
**Рисунок 2.** Сравнение поглощения света в препаратах GP40051 и Хумулин® Регуляр

**Figure 2.** Comparison of light absorption in GP40051 and Humulin® Regular

Исходя из расчетов, обобщенные квантовые выходы препаратов (см. таблица 1) сопоставимы с квантовым выходом чистого тирозина и между собой (диапазон допустимых значений 0,09–0,15 Flu). Таким образом, можно предположить, что остатки тирозина действительно расположены на поверхностных областях молекулы, а анализируемые белки имеют сопоставимую третичную структуру. Это факт так же подтверждается данными капиллярного изоэлектрофокусирования, продемонстрировавшими идентичные значения изоэлектрической точки для GP40051 и Хумулин® Регуляр, равные 6,2 pI (см. таблицу 1).

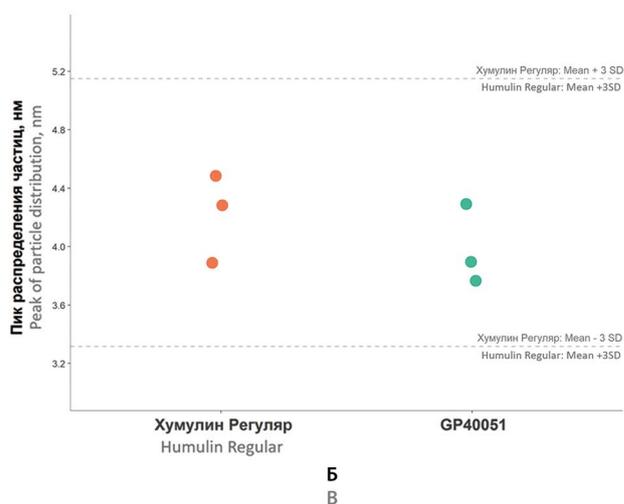
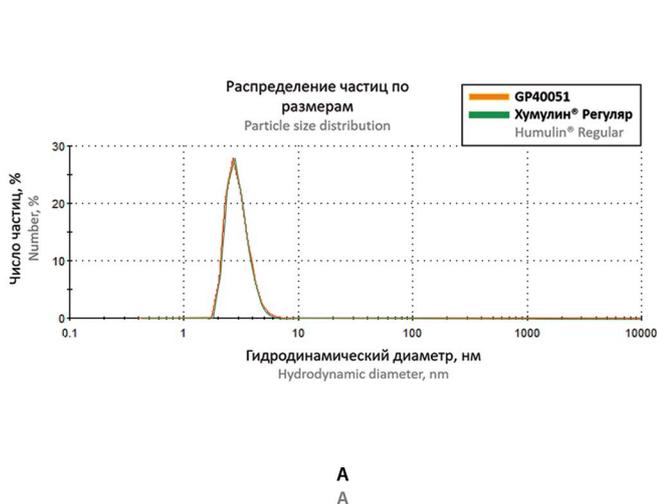
С помощью графиков зависимости интенсивности рассеяния от гидродинамического диаметра частиц методом DLS были определены гидродинамические диаметры препаратов и пики распределения частиц (рисунок 4, см. таблицу 1).

При вычислении статистических параметров было получено полное перекрытие значений GP40051



**Рисунок 3. Спектры флуоресценции:**  
А – тирозин; Б – GP40051 и Хумулин® Регуляр

**Figure 3. Fluorescence spectra:**  
A – tyrosine; B – GP40051 and Humulin® Regular



**Рисунок 4. Результаты определения гидродинамических параметров:**

А – гистограмма зависимости числа частиц от гидродинамического диаметра; Б – точечное распределение значений пика распределения частиц

**Figure 4. Results of determination of hydrodynamic parameters:**

А – histogram of the dependence of the number of particles on the hydrodynamic diameter; Б – point distribution of the values of the particle distribution time

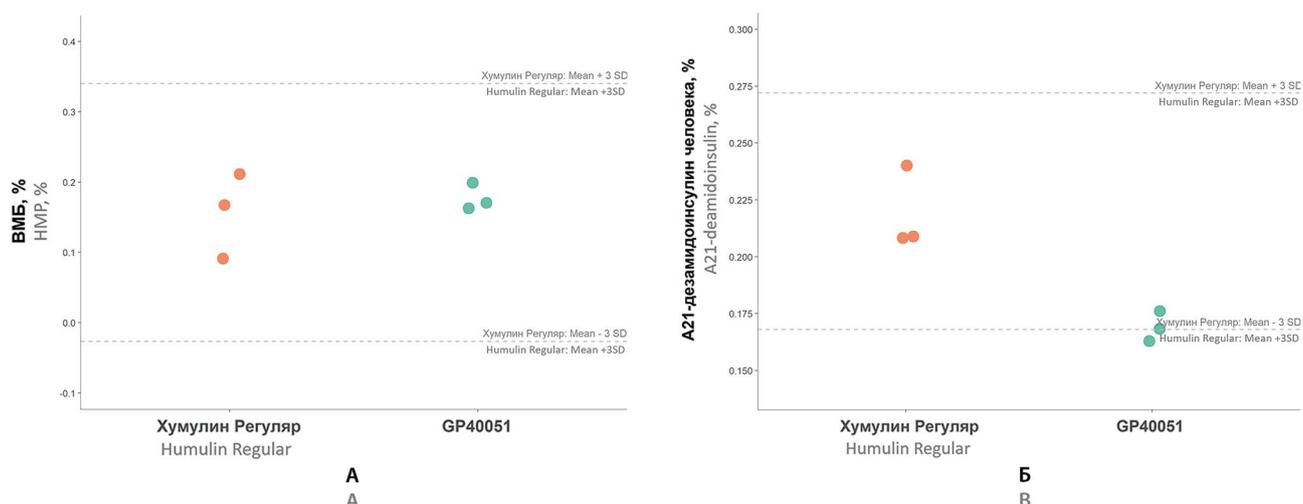
диапазоном допустимых значений (3,32–5,15 нм), что может служить косвенным подтверждением сопоставимости четвертичных структур исследуемых белков.

### Определение родственных примесей

Содержание родственных примесей это один из важнейших параметров качества и стабильности лекарственных препаратов. Повышенное содержание примесей потенциально может повлиять как на эф-

фективность, так и на безопасность препарата. На рисунке 5 представлены данные ВЭЖХ.

По результатам анализа препараты полностью сопоставимы по содержанию ВМБ. Однако были выявлены отличия в процентном содержании А21-дезамидоинсулина. Учитывая, что значения исследуемого препарата оказались ниже допустимого диапазона значений (0,16%, допустимый диапазон 0,17–0,27%), это свидетельствует о чуть более чистом составе GP40051 и не снижает качества препарата.

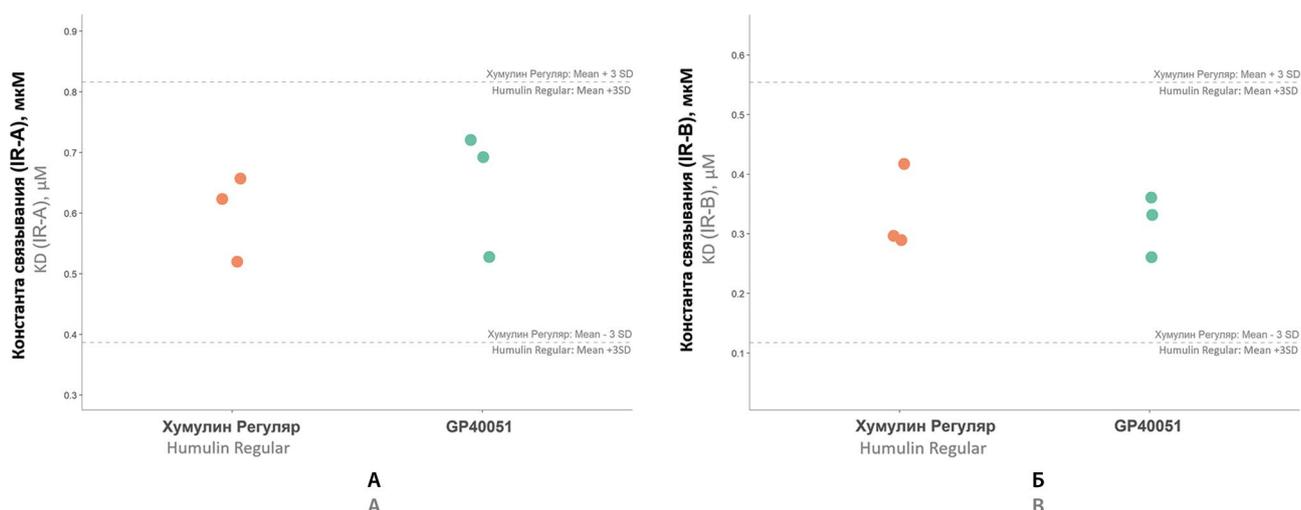


**Рисунок 5. Родственные примеси:**

**А** – высокомолекулярные белки (ВМБ); **Б** – А21-дезамидоинсулин

**Figure 5. Related impurities:**

**A** – high-molecular impurities; **B** – A21-deamidoinulin



**Рисунок 6. Значения равновесной константы связывания (KD) с инсулиновыми рецепторами типа А (А) и типа В (Б)**

**Figure 6. Values of the affinity constant (KD) with insulin receptors of type A (A) and type B (B)**

### Функциональная характеристика

Согласно правилам организации исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза<sup>1</sup>, функциональная характеристика препаратов проводилась на двух уровнях:

<sup>1</sup> Решение № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза», глава 15.7 «Доклиническая и клиническая разработка биоаналогичных (биоподобных) лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин и аналоги инсулина». Доступно по: [https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd\\_21112016\\_89](https://docs.eaeunion.org/docs/ru-ru/01411954/cncd_21112016_89). Ссылка активна на 23.06.2022.

аутофосфорилирование рецептора и метаболическая активность. Обе группы препаратов продемонстрировали идентичную способность к связыванию и активность в клеточных тестах *in vitro*.

Результаты исследования кинетики связывания с рецепторами инсулина IR-A и IR-B представлены на рисунке 6. Была оценена равновесная константа KD между ассоциацией и диссоциацией комплексов «препарат-рецептор».

Значения для GP40051 полностью вошли в диапазоны допустимых значений, рассчитанные по показателям оригинального препарата, что свидетельствует о сопоставимости серий GP40051 и Хумулин® Регуляр.

Для оценки клеточного ответа на связывание инсулина с рецептором был проведен тест фосфорилирование инсулинового рецептора (рисунок 7). В отличие от метода безмаркерной интерферометрии клеточная стенка имеет заряд, с которым взаимодействуют заряженные части молекулы инсулина. При неправильном сворачивании белковой молекулы возможно изменение заряда, приводящее к отсутствию связывания. И как следствие его реализации в виде фосфорилирования инсулинового рецептора, выражающееся на рисунке в появлении сигнала.

Чем больше концентрация инсулинов, тем сильнее детектируемый ответ. Таким образом, по результатам определения была установлена сопоставимая для всех серий GP40051 и Хумулин® Регуляр специфическая дозозависимая способность активировать (фосфорилировать) инсулиновый рецептор.

Показатели относительной метаболической активности оценивались в клеточном тесте «захват глюкозы» (рисунок 8).

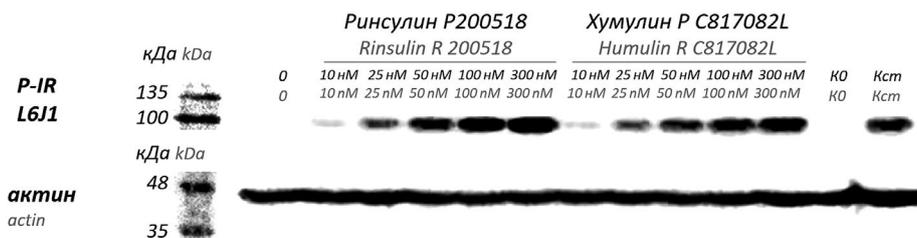
Исходя из результатов точечного распределения, а также кривой «доза-эффект», можно судить о

полной сопоставимости полученных значений  $EC_{50}$  между сериями препаратов GP40051 и Хумулин® Регуляр.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

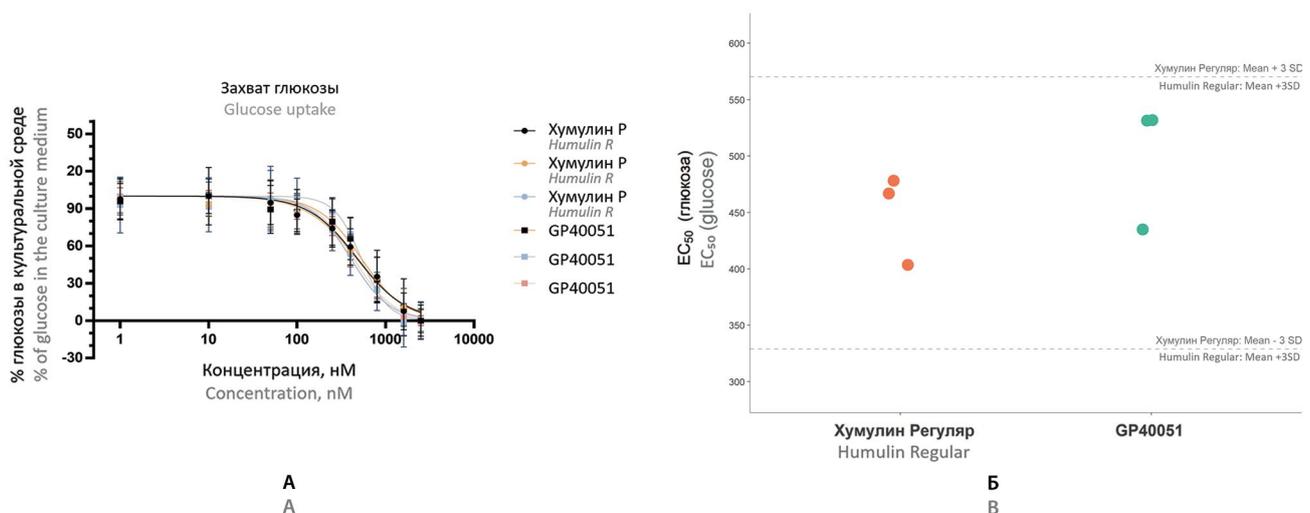
Было проведено обширное сравнительное физико-химическое и функциональное исследование препаратов Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр.

Исследование было разработано для всестороннего изучения критических показателей белка. Были проведены тесты, направленные на детальный анализ первичной структуры, структур более высокого порядка и содержания примесей. В соответствии с регуляторными требованиями для каждого из физико-химических атрибутов было использовано несколько ортогональных методов, благодаря чему были получены максимально информативные данные, позволившие сделать вывод об идентичности молекул. Также акцент был сделан на изучении функциональной характеристики препаратов, основанной на механизме действия инсулина. Изучение проводилось на уровне рецептора и метаболической активно-



**Рисунок 7.** Результаты изучения фосфорилирования инсулинового рецептора (GP40051/Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр)

**Figure 7.** Results of the study of phosphorylation of the insulin receptor (GP40051/Rinsulin® R and Humulin® Regular)



**Рисунок 8.** Результаты метаболического теста «захват глюкозы» (клетки L6J1):

**А** – график кривой «доза-эффект»; **Б** – точечное распределение  $EC_{50}$

**Figure 8.** Results of the metabolic test "glucose capture" (L6J1 cells):

**А** – graph of "dose-effect" curve; **Б** – point distribution of  $EC_{50}$

сти, что исчерпывающе отвечает на вопрос о функциональной состоятельности GP40051.

Благодаря небольшим размерам и отсутствию вариативности инсулин является одной из немногих молекул, которую можно охарактеризовать в мельчайших деталях и доказать полную биосимилярность, что и было продемонстрировано в данной работе.

По результатам проведенных исследований была показана полная идентичность между сериями препаратов Ринсулин® Р и Хумулин® Регуляр. В дальнейшем полученные данные легли в основу комплекта документов, необходимых для получения разрешения на проведение клинического исследования.

## ЛИТЕРАТУРА

- Zalberg J. Biosimilars are coming: ready or not. *Internal Medicine Journal*. 2018;48(9):1027–1034. DOI: 10.1111/imj.14033.
- Agbogbo F.K., Ecker D.M., Farrand A., Han K., Khoury A., Martin A., McCool J., Rasche U., Rau T.D., Schmidt D., Sha M., Treuheit N. Current perspectives on biosimilars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019;46(9–10):1297–1311. DOI: 10.1007/s10295-019-02216-z.
- de Mora F. Biosimilars: A Value Proposition. *BioDrugs*. 2019;33(4):353–356. DOI: 10.1007/s40259-019-00360-7.
- Бабенко А. Ю., Драй Р. В., Каронова Т. Л., Макаренко И. Е. Подходы доказательной медицины при разработке и регистрации фармакологических препаратов для лечения сахарного диабета. *Русский медицинский журнал*. 2018;1(1):48–54.
- Dranitsaris G., Amir E., Dorward K. Biosimilars of biological drug therapies: regulatory, clinical and commercial considerations. *Drugs*. 2011;71(12):1527–1536. DOI: 10.2165/11593730-000000000-00000.
- Kresse G.B. Biosimilars – science, status, and strategic perspective. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;72(3):479–486. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.014.
- Шестакова М. В., Видулова О. К. Биосимиляры: презумпция «виновности». *Сахарный диабет*. 2011;14(4):91–99.
- Harvey R. D. Science of Biosimilars. *Journal of Oncology Practice*. 2017;13(9):17–23. DOI: 10.1200/JOP.2017.026062.
- Tariman J. D. Biosimilars: Exploring the History, Science, and Progress. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2018;22(5):5–12. DOI: 10.1188/18.CJON.S1.5-12.
- Jenkins N., Murphy L., Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*. 2008;39(2):113–118. DOI: 10.1007/s12033-008-9049-4.
- Gámez-Belmonte R., Hernández-Chirlaque C., Arredondo-Amador M., Aranda C. J., González R., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Biosimilars: *Concepts and controversies*. *Pharmacological Research*. 2018;133:251–264. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.01.024.
- Caliceti P., Veronese F.M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(10):1261–1277. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00108-x.
- Hossain M. A., Bathgate R. A. D. Challenges in the design of insulin and relaxin/insulin-like peptide mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2827–2841 DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.030.
- Soldatov A. A., Avdeeva J. I., Kryuchkov N. A., Skosyreva E. S. Safety concerns of biosimilar hormone products. *Current Medical Research and Opinion*. 2019;35(6):1003–1009. DOI: 10.1080/03007995.2018.1552041.
- Kang H. N., Knezevic I. Regulatory evaluation of biosimilars throughout their product life-cycle. *Bulletin World Health Organization*. 2018;96(4):281–285. DOI: 10.2471/BLT.17.206284.
- Ishii-Watabe A., Kuwabara T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;34(1):64–70. DOI: 10.1016/j.dmpk.2018.11.004.
- Rahalkar H., Cetintas H. C., Salek S. Quality, Non-clinical and Clinical Considerations for Biosimilar Monoclonal Antibody Development: EU, WHO, USA, Canada, and BRICS-TM Regulatory Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1079. DOI: 10.3389/fphar.2018.01079.
- Afanasyeva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Drai R. V., Selmenskikh T. A. Experimental validation of an *in vitro* method for assessing insulin-dependent glucose uptake. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):77–88. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398.

## REFERENCES

- Zalberg J. Biosimilars are coming: ready or not. *Internal Medicine Journal*. 2018;48(9):1027–1034. DOI: 10.1111/imj.14033.
- Agbogbo F.K., Ecker D.M., Farrand A., Han K., Khoury A., Martin A., McCool J., Rasche U., Rau T.D., Schmidt D., Sha M., Treuheit N. Current perspectives on biosimilars. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2019;46(9–10):1297–1311. DOI: 10.1007/s10295-019-02216-z.
- de Mora F. Biosimilars: A Value Proposition. *BioDrugs*. 2019;33(4):353–356. DOI: 10.1007/s40259-019-00360-7.
- Babenko A. Yu., Drai R. V., Karonova T. L., Makarenko I. E. Evidence-based approaches for development and marketing authorization of diabetes drugs. *Russian medical journal*. 2018;1(1):48–54. (In Russ.)
- Dranitsaris G., Amir E., Dorward K. Biosimilars of biological drug therapies: regulatory, clinical and commercial considerations. *Drugs*. 2011;71(12):1527–1536. DOI: 10.2165/11593730-000000000-00000.
- Kresse G.B. Biosimilars – science, status, and strategic perspective. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2009;72(3):479–486. DOI: 10.1016/j.ejpb.2009.02.014.
- Shestakova M. V., Vikulova O. K. Biosimilars: presumption of guilt. *Diabetes mellitus*. 2011;14(4):91–99. (In Russ.)
- Harvey R. D. Science of Biosimilars. *Journal of Oncology Practice*. 2017;13(9):17–23. DOI: 10.1200/JOP.2017.026062.
- Tariman J. D. Biosimilars: Exploring the History, Science, and Progress. *Clinical Journal of Oncology Nursing*. 2018;22(5):5–12. DOI: 10.1188/18.CJON.S1.5-12.
- Jenkins N., Murphy L., Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals. *Molecular Biotechnology*. 2008;39(2):113–118. DOI: 10.1007/s12033-008-9049-4.
- Gámez-Belmonte R., Hernández-Chirlaque C., Arredondo-Amador M., Aranda C. J., González R., Martínez-Augustin O., Sánchez de Medina F. Biosimilars: *Concepts and controversies*. *Pharmacological Research*. 2018;133:251–264. DOI: 10.1016/j.phrs.2018.01.024.
- Caliceti P., Veronese F.M. Pharmacokinetic and biodistribution properties of poly(ethylene glycol)-protein conjugates. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2003;55(10):1261–1277. DOI: 10.1016/s0169-409x(03)00108-x.
- Hossain M. A., Bathgate R. A. D. Challenges in the design of insulin and relaxin/insulin-like peptide mimetics. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2018;26(10):2827–2841 DOI: 10.1016/j.bmc.2017.09.030.
- Soldatov A. A., Avdeeva J. I., Kryuchkov N. A., Skosyreva E. S. Safety concerns of biosimilar hormone products. *Current Medical Research and Opinion*. 2019;35(6):1003–1009. DOI: 10.1080/03007995.2018.1552041.
- Kang H. N., Knezevic I. Regulatory evaluation of biosimilars throughout their product life-cycle. *Bulletin World Health Organization*. 2018;96(4):281–285. DOI: 10.2471/BLT.17.206284.
- Ishii-Watabe A., Kuwabara T. Biosimilarity assessment of biosimilar therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*. 2019;34(1):64–70. DOI: 10.1016/j.dmpk.2018.11.004.
- Rahalkar H., Cetintas H. C., Salek S. Quality, Non-clinical and Clinical Considerations for Biosimilar Monoclonal Antibody Development: EU, WHO, USA, Canada, and BRICS-TM Regulatory Guidelines. *Frontiers in Pharmacology*. 2018;9:1079. DOI: 10.3389/fphar.2018.01079.
- Afanasyeva A. N., Saparova V. B., Makarenko I. E., Drai R. V., Selmenskikh T. A. Experimental validation of an *in vitro* method for assessing insulin-dependent glucose uptake. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023;13(1):77–88. (In Russ.) DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398.