Оригинальная статья / Research article

УДК 615.011; 576.08

https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-2084

Check for updates

CC BY 4.0

Первый дженерик тирзепатида GP30931: физико-химическое и биологическое сходство с референтным лекарственным средством

И. А. Луговик[1]✉, А. В. Бабина[1], С. С. Арутюнян[1], Д. О. Ермолаева[1], В. Б. Сапарова[1, 2], Т. Н. Кобелева[1], П. Г. Заикин[1], А. Д. Микушина[3], А. С. Букатин[3], И. Е. Елисеев[4], Б. Ц. Зайчик[5], Я. К. Керученко[5], И. С. Охрименко[6, 7], Э. В. Бочаров[6, 7], А. Х. Тальдаев[6, 7], В. А. Лушпа[6, 7], И. Е. Макаренко[1, 2], Р. В. Драй[1]

[1] Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, поселок Стрельна, ул. Связи, д. 34, литера А

[2] Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 1127006, Россия, г. Москва, ул. Долгоруковская, д. 4

[3] Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования и науки «Санкт-Петербургский национальный исследовательский Академический университет имени Ж. И. Алферова Российской академии наук» (СПбАУ РАН им. Ж. И. Алферова; Академический университет им. Ж. И. Алферова, Алферовский университет). 194021, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Хлопина, д. 8, корпус 3, литера А

[4] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики» (НИУ ВШЭ). Школа информатики, физики и технологий. 199106, Россия, Санкт-Петербург, 25-я линия Васильевского острова, д. 6, крпус 1

[5] Научно-исследовательский центр компании «АкваХром». 117198, Россия, г. Москва, Ленинский пр-т, д. 113/1, помещение 210Е-211Е

[6] Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)» (МФТИ, Физтех). Центр исследований молекулярных механизмов старения и возрастных заболеваний. 141701, Россия, Московская обл., г. Долгопрудный, Институтский переулок, д. 9

[7] Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный Научный Центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). Лаборатория биомолекулярной ЯМР-спектроскопии. 117997, Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10

✉ **Контактное лицо:** Луговик Илья Алексеевич. **E-mail:** Ilia.Lugovik@geropharm.com

ORCID: И. А. Луговик – https://orcid.org/0000-0003-3840-5049;
А. В. Бабина – https://orcid.org/0000-0003-3024-4009;
С. С. Арутюнян – https://orcid.org/0000-0002-9384-8064;
Д. О. Ермолаева – https://orcid.org/0009-0005-8083-7154;
В. Б. Сапарова – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
Т. Н. Кобелева – https://orcid.org/0009-0006-2654-7874;
П. Г. Заикин – https://orcid.org/0009-0008-8467-9781;
А. Д. Микушина – https://orcid.org/0000-0002-9110-1813;
А. С. Букатин – https://orcid.org/0000-0002-5459-1438;
И. Е. Елисеев – https://orcid.org/0000-0002-3344-2513;
Б. Ц. Зайчик – https://orcid.org/0000-0003-4934-8801;
Я. К. Керученко – https://orcid.org/0009-0002-6889-9000;
И. С. Охрименко – https://orcid.org/0000-0002-1053-2778;
Э. В. Бочаров – https://orcid.org/0000-0002-3635-1609;
А. Х. Тальдаев – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963;
В. А. Лушпа – https://orcid.org/0000-0002-1788-1153;
И. Е. Макаренко – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608;
Р. В. Драй – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

© Луговик И. А., Бабина А. В., Арутюнян С. С., Ермолаева Д. О., Сапарова В. Б., Кобелева Т. Н., Заикин П. Г., Микушина А. Д., Букатин А. С., Елисеев И. Е., Зайчик Б. Ц., Керученко Я. К., Охрименко И. С., Бочаров Э. В., Тальдаев А. Х., Лушпа В. А., Макаренко И. Е., Драй Р. В., 2025

© Lugovik I. A., Babina A. V., Arutyunyan S. S., Ermolaeva D. O., Saparova V. B., Kobeleva T. N., Zaikin P. G., Mikushina A. D., Bukatin A. S., Eliseev I. E., Zajchik B. Ts., Keruchenko Y. K., Ohrimenko I. S., Bocharov E. V., Taldaev A. Kh., Lushpa V. A., Makarenko I. E., Drai R. V., 2025

Статья поступила: 17.04.2025 **Статья принята в печать:** 19.05.2025 **Статья опубликована:** 20.05.2025

Резюме

Введение. Метаболический синдром – мультифакторный комплекс метаболических нарушений, сопровождающийся сахарным диабетом 2 типа и абдоминальным ожирением. В фармакологической коррекции ожирения и сахарного диабета 2 типа наибольший эффект демонстрируют двойные агонисты глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1) и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP), в частности тирзепатид. Оригинальный препарат («Мунджаро», мнн: тирзепатид) не зарегистрирован в Евразийском экономическом союзе (ЕАЭС), что ограничивает его доступность для пациентов и приводит к необходимости разработки отечественного дженерика.

Цель. Проведение физико-химической и биологической характеризации препарата Седжаро® (GP30931) в сравнении с оригинальным препаратом Мунджаро® для установления их сопоставимости.

Материалы и методы. Исследованы три серии каждого препарата (раствор для подкожного введения, 25 мг/мл). Первичную структуру проверяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс спектрометрией (ВЭЖХ-МС), пептидного картирования и ЯМР (2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY). Вторичную структуру, структуры высшего порядка и агрегацию оценивали методами кругового дихроизма (КД), ядерного магнитного резонанса высокого разрешения (ЯМР), квантового выхода флуоресценции (КФ) и динамического рассеяния света (DLS). Профиль примесей анализировали с использованием эксклюзионной и обращенно фазовой ВЭЖХ. Функциональную активность определяли в клеточных тестах по активации кальциевых потоков через рецепторы GLP-1 и GIP с оценкой полумаксимальной эффективной концентрации (EC_{50}); эквивалентность подтверждали методом двух односторонних тестов (TOST, 90 % доверительный интервал).

Результаты и обсуждение. ВЭЖХ-МС и картирование подтвердили идентичные массу (4 810,52 Да) и аминокислотную последовательность. Спектры ЯМР, профили КД и КФ, а также ДЛС полностью совпадали, что позволяет заключить, что вторичные и третичные структуры препаратов структурно идентичны. Содержание всех видов примесей у GP30931 не превышало значений «Мунджаро». Различие значений EC_{50} для активации GLP-1 и GIP рецепторов составило ≤5 %, сравнительная биологическая активность находились в пределах 0,80–1,25.

Заключение. Комплекс проведенных исследований с использованием ортогональных методов показал, что «Седжаро» (GP30931) и «Мунджаро» структурно идентичны, сопоставимы по профилю примесей и биологически эквивалентны. Полученные данные вносят значимый вклад в научное обоснование эквивалентности воспроизведенного препарата тирзепатида и референтного оригинального препарата, тем самым обеспечивая надежную основу для дальнейшей регистрации и клинического применения Седжаро® без проведения дополнительных клинических исследований.

Ключевые слова: тирзепатид, GLP-1, GIP, воспроизведенный пептид, физико химическая характеризация, ЯМР, дженерик

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

Вклад авторов. И. А. Луговик, А. В. Бабина, И. Е. Макаренко и С. С. Арутюнян разработали программу исследования и метод ранжирования рисков. Р. В. Драй осуществлял общее руководство проектом и критический обзор всех этапов работы. Д. О. Ермолаева и В. Б. Сапарова выполнили клеточные *in-vitro*-тесты на активацию рецепторов GLP-1 и GIP и первичный анализ результатов. Т. Н. Кобелева и П. Г. Заикин провели экспериментальные работы по определению профиля родственных примесей методом обращенно-фазовой и эксклюзионной ВЭЖХ. А. Д. Микушина, А. С. Букатин и И. Е. Елисеев провели измерения динамического рассеяния света и кругового дихроизма и интерпретировали спектры. Б. Ц. Зайчик и Я. К. Керученько определили молекулярную массу, выполнили пептидное картирование с HPLC-MS и измерили квантовый выход флуоресценции. И. С. Охрименко, Э. В. Бочаров, А. Х. Тальдаев и В. А. Лушпа записали и обработали одно- и двумерные NMR-спектры, подготовили пространственную модель белка. Все авторы проводили интерпретацию результатов. Все авторы принимали участие в обсуждении результатов и написании текста статьи.

Финансирование. Спонсор данного исследования – ООО «ГЕРОФАРМ».

Для цитирования: Луговик И. А., Бабина А. В., Арутюнян С. С., Ермолаева Д. О., Сапарова В. Б., Кобелева Т. Н., Заикин П. Г., Микушина А. Д., Букатин А. С., Елисеев И. Е., Зайчик Б. Ц., Керученько Я. К., Охрименко И. С., Бочаров Э. В., Тальдаев А. Х., Лушпа В. А., Макаренко И. Е., Драй Р. В. Первый дженерик тирзепатида GP30931: физико-химическое и биологическое сходство с референтным лекарственным средством. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2025;14(2):54–74. https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-2084

The first generic tirzepatide GP30931: physicochemical and biological similarity to the reference drug

Ilya A. Lugovik[1]✉, Anna V. Babina[1], Sona S. Arutyunyan[1], Darya O. Ermolaeva[1], Valeriya B. Saparova[1, 2], Tatyana N. Kobeleva[1], Pavel G. Zaikin[1], Anna D. Mikushina[3], Anton S. Bukatin[3], Igor E. Eliseev[4], Boris Ts. Zajchik[5], Yan S. Keruchenko[5], Ivan S. Ohrimenko[6, 7], Eduard V. Bocharov[6, 7], Amir Kh. Taldaev[6, 7], Vladislav A. Lushpa[6, 7], Igor E. Makarenko[1, 2], Roman V. Drai[1]

[1] Closed Joint Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelna settlement, Saint Petersburg, 198515, Russia
[2] Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "A. I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry" of the Ministry of Healthcare of the Russion Federation. 4, Dolgorukovskaya str., Moscow, 1127006, Russia

[3] Alferov Federal State Budgetary Institution of Higher Education and Science Saint Petersburg National Research Academic University of the Russian Academy of Sciences (Alferov University). 8/3A, Khlopina str., Saint Petersburg, 194021, Russia
[4] Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "National Research University "Higher School of Economics". School of Informatics, Physics and Technology. 6/1, 25 liniya Vasil'evskogo ostrova, Saint Petersburg, 199106, Russia
[5] Research and development center of the company "AquaChrom". room 210E-211E, 113/1, Leninsky prospekt, Moscow, 117198, Russia
[6] Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education "Moscow Institute of Physics and Technology (National Research University)" (MIPT, Phystech). Center for Research of Molecular Mechanisms of Aging and Age-Related Diseases. Institutsky pereulok, 9, Dolgoprudny, Moscow region, 141701, Russia
[7] Shemyakin-Ovchinnikov Institute of bioorganic chemistry. Laboratory of Biomolecular NMR Spectroscopy. 16/10, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117997, Russia

✉ **Corresponding author:** Ilya A. Lugovik. **E-mail:** Ilia.Lugovik@geropharm.com

ORCID: Ilya A. Lugovik – https://orcid.org/0000-0003-3840-5049;
Anna V. Babina – https://orcid.org/0000-0003-3024-4009;
Sona S. Arutyunyan – https://orcid.org/0000-0002-9384-8064;
Darya O. Ermolaeva – https://orcid.org/0009-0005-8083-7154;
Valeriya B. Saparova – https://orcid.org/0000-0002-8445-1129;
Tatyana N. Kobeleva – https://orcid.org/0009-0006-2654-7874;
Pavel G. Zaikin – https://orcid.org/0009-0008-8467-9781;
Anna D. Mikushina – https://orcid.org/0000-0002-9110-1813;
Anton S. Bukatin – https://orcid.org/0000-0002-5459-1438;
Igor E. Eliseev – https://orcid.org/0000-0002-3344-2513;
Boris Ts. Zajchik – https://orcid.org/0000-0003-4934-8801;
Yan S. Keruchenko – https://orcid.org/0009-0002-6889-9000;
Ivan S. Ohrimenko – https://orcid.org/0000-0002-1053-2778;
Eduard V. Bocharov – https://orcid.org/0000-0002-3635-1609;
Amir Kh. Taldaev – https://orcid.org/0000-0003-2593-1963;
Vladislav A. Lushpa – https://orcid.org/0000-0002-1788-1153;
Igor E. Makarenko – https://orcid.org/0000-0003-2308-0608;
Roman V. Drai – https://orcid.org/0000-0003-4594-6097.

Received: 17.04.2025 **Accepted:** 19.05.2025 **Published:** 20.05.2025

Abstract

Introduction. Metabolic syndrome is a multifactorial complex of metabolic disorders accompanied by type 2 diabetes mellitus and abdominal obesity. In the pharmacological correction of obesity and type 2 diabetes mellitus, the greatest effect is demonstrated by dual agonists of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) and glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP), in particular tirzepatide. The original drug (Mundjaro, pln: tirzepatide) is not registered in the Eurasian Economic Union (EAEU), which limits its availability to patients and leads to the need to develop a domestic generic.

Aim. Conducting a physicochemical and biological characterization of the drug Sejaro® (GP30931) in comparison with the original drug Mundjaro® to establish their comparability.

Materials and methods. Three batches of each drug (solution for subcutaneous administration, 25 mg/ml) were studied. The primary structure was verified using high-performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC-MS), peptide mapping and NMR (2D-NMR-^{1}H-^{1}H TOCSY). Secondary structure, higher order structures and aggregation were assessed by circular dichroism (CD), high-resolution nuclear magnetic resonance (NMR), fluorescence quantum yield (FQY) and dynamic light scattering (DLS). Impurity profiles were analyzed using size-exclusion and reversed-phase HPLC. Functional activity was determined in cellular tests for activation of calcium currents through GLP-1 and GIP receptors with an assessment of the half-maximal effective concentration (EC_{50}); equivalence was confirmed by the two-sided test (TOST, 90 % confidence interval).

Results and discussion. HPLC-MS and mapping confirmed identical mass (4,810.52 Da) and amino acid sequence. NMR spectra, CD and CF profiles, and DLS were completely consistent, which allows us to conclude that the secondary and tertiary structures of the preparations are structurally identical. The content of all types of impurities in GP30931 did not exceed the Munjaro values. The difference in EC_{50} values for activation of GLP-1 and GIP receptors was ≤5 %, the comparative biological activity was within 0.80–1.25.

Conclusion. The complex of studies conducted using orthogonal methods showed that "Sejaro" (GP30931) and "Mundjaro" are structurally identical, comparable in impurity profile and biologically equivalent. The obtained data make a significant contribution to the scientific substantiation of the equivalence of the reproduced drug tirzepatide and the reference original drug, thereby providing a reliable basis for further registration and clinical use of Sejaro® without conducting additional clinical studies.

Keywords: tirzepatide, GLP-1, GIP, recombinant peptide, physicochemical characterization, NMR, generic

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. Ilya A. Lugovik, Anna V. Babina, Igor E. Makarenko and Sona S. Arutyunyan developed the research program and the risk ranking method. Roman V. Drai provided overall project management and critical review of all stages of the work. Darya O. Ermolaeva and Valeriya B. Saparova performed in vitro cellular tests for GLP-1 and GIP receptor activation and the initial analysis of the results. Tatyana N. Kobeleva and Pavel G. Zaikin conducted experimental work to determine the profile of related impurities using reversed-phase and size-exclusion HPLC. Anna D. Mikushina, Anton S. Bukatin and Igor E. Eliseev measured dynamic light scattering and circular dichroism and interpreted the spectra. Boris Ts. Zajchik and Yan S. Keruchenko determined the molecular mass, performed peptide mapping with HPLC-MS and measured the fluorescence quantum yield. Ivan S. Ohrimenko, Eduard V. Bocharov, Amir Kh. Taldaev, Vladislav A. Lushpa recorded and processed one- and two-dimensional NMR spectra and prepared a spatial model of the protein. All authors interpreted the results. All authors participated in the discussion of the results and writing the text of the article.

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

For citation: Lugovik I. A., Babina A. V., Arutyunyan S. S., Ermolaeva D. O., Saparova V. B., Kobeleva T. N., Zaikin P. G., Mikushina A. D., Bukatin A. S., Eliseev I. E., Zajchik B. Ts., Keruchenko Y. K., Ohrimenko I. S., Bocharov E. V., Taldaev A. Kh., Lushpa V. A., Makarenko I. E., Drai R. V. The first generic tirzepatide GP30931: physicochemical and biological similarity to the reference drug. *Drug development & registration*. 2025;14(2):54–74. (In Russ.) https://doi.org/10.33380/2305-2066-2025-14-2-2084

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром – комплекс метаболических, гормональных и клинических нарушений на фоне инсулинорезистентности и компенсаторной гиперинсулинемии, выявляемый у 25–35 % взрослого населения развитых стран [1–3]. К наиболее значимым его проявлениям относятся сахарный диабет 2 типа, абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия и прогрессирующий неалкогольный стеатогепатит [2]. Современная модель патогенеза СД2, помимо прогрессирующей утраты β-клеточной массы и функции, включает дисфункцию гастроинтестинальных инкретинов GIP и GLP-1, модулирующих глюкозозависимую секрецию инсулина и подавление глюкагона [4–7]. У здоровых лиц инкретиновый эффект формирует 50–70 % постпрандиальной инсулиновой секреции, тогда как при СД2 его вклад снижается до 20–35 % [8]. В рамках клинических исследований было продемонстрировано, что коагонист GLP-1-/GIP-рецепторов тирзепатид превосходит имеющиеся на рынке моноагонисты GLP-1 (влияние на HbA1c и снижение массы тела), такие как дулаглутид (2 фаза клинических исследований) и семаглутид (3 фаза клинических исследований). При этом профиль безопасности препаратов был схож, частота нежелательных явлений не возрастала у тирзепатида по сравнению с моноагонистами [9].

Учитывая высокое влияние метаболического синдрома на качество и продолжительность жизни, вопрос доступа к терапии тирзепатидом является критическим для пациентов ЕАЭС, при этом единственный препарат, содержащий тирзепатид («Мунджаро»), официально в ЕАЭС не зарегистрирован и в страны Союза не поставляется. Все это привело к необходимости разработки собственных дженериков препарата тирзепатид для обеспечения доступа пациентов к наиболее современной терапии метаболического синдрома.

Химически тирзепатид представляет собой линейный пептид из 39 аминокислот, конъюгированный с фрагментом жирной двухкислотной группы 2 через линкер, соединенный с остатком лизина в положении 20. Пептидная последовательность LY3298176 также содержит два некодируемых аминокислотных остатка в положениях 2 и 13 (Aib, α-аминоизомасляная кислота), а С-конец амидирован (рисунок 1). Технология ацилирования обеспечивает связывание альбумина, что обеспечивает режим дозирования для человека один раз в неделю. Молекулярная масса составляет 4810,52 Да [10].

Согласно определению FDA любой альфа-аминополимер, который включает 40 и менее аминокислот, представляет собой не белок, а пептид. В научных публикациях зачастую фиксируется, что воспроизведенные пептиды занимают промежуточную позицию между классическими биосимилярами и дженериками, их структура значительно сложнее любой малой молекулы, получаемой классическим химическим синтезом, однако пептиды могут быть в полной мере охарактеризованы современными методами (ЯМР, ВЭЖХ-МС высокого разрешения), и их идентичность оригинальному препарату может быть однозначно доказана[1] [11, 12]. Это отличает их от вос-

[1] ANDAs for Certain Highly Purified Synthetic Peptide Drug Products That Refer to Listed Drugs of rDNA Origin Guidance for Industry. Available at: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/andas-certain-highly-purified-synthetic-peptide-drug-products-refer-listed-drugs-rdna-origin. Accessed: 10.04.2025.

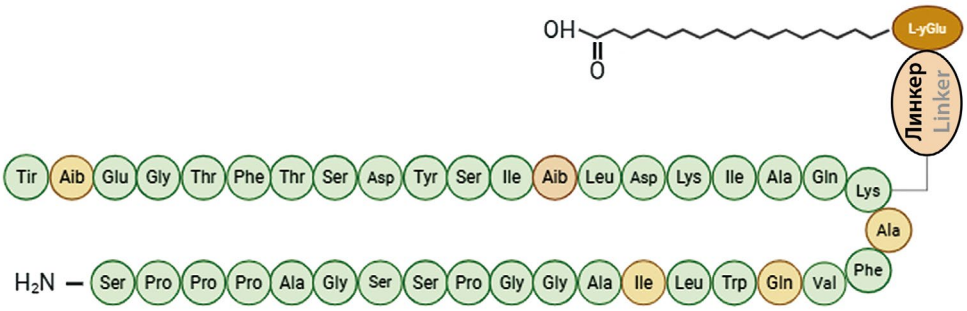


Рисунок 1. Последовательность молекулы тирзепатида. Аминокислоты, которые либо модифицированы, либо отличаются как от GLP-1, так и от GIP, выделены оранжевым цветом

Figure 1. Amino acid sequence of the tirzepatide molecule. Amino acids that are either modified or differ from both GLP-1 and GIP are highlighted in orange

произведенных белков, когда чаще можно говорить лишь о биоподобии (возможные различия в структуре молекулы при их наличии не влияют на ФК, ФД и безопасность)[1, 2, 3]. С точки зрения FDA, это позволяет подавать сокращенную заявку на одобрение нового препарата (ANDA) в соответствии с разделом 505(j) Федерального закона о пищевых продуктах, лекарственных средствах и косметических средствах (FD&C Act), что аналогично подходу к «традиционным» дженерикам [11]. В ЕАЭС схожий подход, как к стандартным дженерикам: согласно 85 решению ЕЭК для химических соединений можно регистрировать по процедуре «Эвиденс биовейвер», что предполагает избыточность проведения клинических исследований при доказательстве сопоставимости физико-химическими и *in-vitro*-методами[4]. Однако также критически повышает значимость проведения исследований качества воспроизведенных пептидов.

При этом подходы к исследованиям воспроизведенных пептидов (в отличие от биосимиляров) в настоящий момент на территории ЕАЭС в полной мере не устоялись. Если же обратиться к рекомендациям FDA, то можно отметить, что в целом подходы к исследованиям сопоставимости достаточно похожи на классические подходы к биосимилярам, описанным в 89 решении (с поправкой на природу молекулы), и базируются на всесторонней характеризации молекулы по сравнению с оригинатором по следующим критериям [11, 12]: «первичная структура и базовые физико-химические свойства»; «вторичная структура и структуры высшего порядка»; «олигомеризация/агрегация»; «биологическая активность».

В данной работе представлены результаты исследования сопоставимости лекарственного препарата Седжаро® (GP30931, МНН: тирзепатид) в сравнении с оригинальным препаратом Мунджаро®. Физико-химическая характеризация препаратов включала изучение структуры тирзепатида на нескольких уровнях: исследования первичной и вторичной структуры пептида, а также структур более высокого порядка; содержания родственных примесей. Функциональная характеризация включала оценку биологической активности по отношению к основным молекулярным мишеням препарата (GLP-1- и GIR-рецепторы).

Цель: проведение физико-химической и биологической характеризации препарата Седжаро® (GP30931) в сравнении с оригинальным препаратом Мунджаро® для установления их сопоставимости.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследуемые объекты

Для сравнительного анализа были использованы 3 серии воспроизведенного препарата Седжаро® (GP30931) (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и 3 серии оригинального препарата Мунджаро® (Eli Lilly, США). Все объекты испытания были представлены в лекарственной форме «раствор для подкожного введения,

[1] European Medicines Agency (EMA). Guideline on similar biological medicinal products (CHMP/437/04 Rev. 1). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-rev1_en.pdf. Accessed: 16.04.2025.

[2] European Medicines Agency (EMA). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues (EMEA/CHMP/BMWP/42832/2005 Rev. 1). Available at: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-similar-biological-medicinal-products-containing-biotechnology-derived-proteins-active-substance-non-clinical-and-clinical-issues-revision-1_en.pdf. Accessed: 16.04.2025.

[3] Решение Совета ЕЭК № 89 от 3 ноября 2016 года «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (пп. 9.1, 15.7). Доступно по: https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0089. Ссылка активна на 16.04.2025.

[4] Решение Совета Евразийской экономической комиссии № 85 от 3 ноября 2016 г. «Об утверждении Правил проведения исследований биоэквивалентности лекарственных препаратов в рамках Евразийского экономического союза». Доступно по: https://www.alta.ru/tamdoc/16sr0085/ Ссылка активна на 16.04.2025.

25 мг/мл». Разработка препарата Седжаро® (GP30931) была проведена в R&D-центре ООО «ГЕРОФАРМ» (ЗАО «Фарм-Холдинг»). Референтный препарат Мунджаро® был приобретен у зарубежных поставщиков на рынке Европейского союза.

Установление критических показателей качества

Критические атрибуты качества Седжаро® (GP30931) были определены для проверки стратегии контроля в процессе производства, которая дала бы индикаторы, наиболее релевантные для клинической безопасности и эффективности для пациентов (таблица 1). Ранжирование риска было основано на принципах управления рисками качества, опубликованных Международным советом по гармонизации (ICH) технических требований к регистрации фармацевтических препаратов для использования человеком[1, 2]. Оценка критичности для атрибута качества рассчитывалась как функция воздействия и неопределенности [13].

Метод ранжирования рисков позволил задать для каждого показателя диапазоны допустимых отклонений исследуемого препарата от референтного, а атрибуты, распределенные по трем уровням критичности (Tier) в зависимости от влияния на биологическую активность, фармакокинетику/фармакодинамику, иммуногенность и безопасность, подвергались статистической оценке с более жесткими пределами приемлемости для более значимых параметров. Результаты ранжирования рисков и назначения уровня для каждого из атрибутов в исследовании сопоставимости между воспроизведенным препаратом Седжаро® (GP30931) и Мунджаро® представлены в таблице 1.

Определение молекулярной массы и анализ первичной структуры

Молекулярную массу нативного белка тирзепатида определяли без проведения протеолиза масс-спектрометром высокого разрешения SYNAPT XS HDMS (Waters Corporation, США). Спектры получали в диапазоне масс 100–2000 m/z. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки составляла до 5 ppm. Для обработки масс-спектров использовали программное обеспечение MassLynx, v. 4.2.

[1] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Pharmaceutical Development Q8(R2). Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q8_R2_Guideline.pdf. Accessed: 16.04.2025.

[2] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Quality Risk Management Q9. Available at: https://database.ich.org/sites/default/files/Q9%20Guideline.pdf. Accessed: 16.04.2025.

Пептидное картирование

Пептидное картирование проводили для подтверждения аминокислотной последовательности. Для проведения пептидного картирования белок подвергали ферментативному гидролизу трипсином (Fluka # 93611, "Trypsin from bovine pancreas", DPCC treated), затем проводили анализ методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) с ионизацией электрораспылением, совмещенным с хроматографом ACQUITY Premier UPLC (Waters Corporation, США). Хроматографическое разделение проводили в градиентной системе «вода – ацетонитрил» с добавлением муравьиной кислоты (A: 0,042%-я муравьиная кислота в воде; B: 0,050%-я муравьиная кислота в ацетонитриле) на колонке Waters ACQUITY BEH300 C18, 2,1 × 50 мм, размер частиц 1,7 мкм, со скоростью потока 0,3 мл/мин. Масс-спектры получали в диапазоне масс 100–2000 m/z.

Сравнительный структурно-динамический анализ методом гетероядерной ЯМР-спектроскопии высокого разрешения

Для перевода тирзепатида воспроизведенного препарата GP30931 и Мунджаро® из состава готовой лекарственной формы (ГЛФ) в буфер для проведения измерений методом ЯМР-спектроскопии использовали хроматографическую колонку HiPrep™ 26/10 Desalting (17-5087-01 Cytiva, США), заполненную хроматографическим сорбентом Sephadex® G-25 fine. Хроматографический сорбент был предварительно уравновешен в 20 мМ Na/K PO_4, 50 мМ NaCl с добавлением 0,1 мМ EDTA согласно инструкции производителя. Препараты тирзепатида наносились на сорбент при скорости потока 5 мл/мин. В результате элюции были получены фракции тирзепатида концентрацией 1,3–1,5 мМ, помещенные затем в стандартные 5 мм ЯМР-ампулы в объеме 500 мкл с добавлением 5%-й D_2O.

Гетероядерные ЯМР-спектры тирзепатида для очищенных от низкомолекулярных примесей ГЛФ препаратов дженерика тирзепатида GP30931 и референтного лекарственного средства Мунджаро® были накоплены при 298 K на спектрометре AVANCE 700 MHz (Bruker, Германия), оснащенном гелиевым криодатчиком: одномерные ^{1}H-спектры в течение 30 мин, $^{1}H/^{1}H$-NOESY (с временем смешивания 100 мс) – 4 ч, $^{1}H/^{1}H$-TOCSY (с временем смешивания 80 мс) – 3 ч, $^{1}H/^{13}C$-HSQC-alif (алифатика) – 4 ч, $^{1}H/^{13}C$-HSQC-aro (ароматика) – 3 ч, $^{1}H/^{15}N$-HSQC – 3 ч.

Пространственная модель молекулы тирзепатида получена на основе крио-ЭМ структуры белка тирзепатида в комплексе с рецептором (PDB ID: 7RGP) [14] и структурно-динамических данных ЯМР с использованием PyMOL (2.5.0 Open-Source Build) и программного обеспечения OpenBabel.

Таблица 1. **Ранжирование рисков**

Table 1. **Tier ranking**

Параметр молекулы Molecule Parameter	**Атрибут** Attribute	**Метод** Method	**Tier**	**Статистика** Statistics
Первичная структура Primary structure	Масса нативного белка Native protein mass	ВЭЖХ-МС HPLC-MS	3	–
	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	ВЭЖХ-МС, 2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY HPLC-MS, peptide mapping, 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY	3	–
	Пептидное картирование Peptide mapping	ВЭЖХ-МС HPLC-MS	3	–
	Изомеризация аминокислот (замена L ↔ D, цис-/транс-) Amino acid isomerization (L-to-D conversion and cis/trans isomerization)	2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY	3	–
Вторичная структура, структуры высшего порядка и агрегация Secondary structure, higher-order structures, and aggregation	Вторичная структура Secondary structure	Круговой дихроизм Circular Dichroism	1	mean ± 2SD range
	Квантовый выход флуоресценции Fluorescence quantum yield	Спектрофотометрия Spectrophotometry	1	mean ± 2SD range
	Пик распределения частиц Particle size peak	DLS Dynamic Light Scattering	1	mean ± 2SD range
	Вторичная и третичная структура Secondary structure and tertiary structure	1D-ЯМР-^{1}H 1D ^{1}H-NMR	3	–
		2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H NOESY 2D ^{1}H-^{1}H NMR NOESY	3	–
		2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY	3	–
		2D-ЯМР ^{13}C-HSQC 2D ^{13}C-HSQC NMR	3	–
		2D-ЯМР ^{15}N-HSQC (HN, H_2N) 2D ^{15}N-HSQC NMR (HN, H_2N)	3	–
Родственные примеси Related impurities	Содержание ВМБ HMW content	Эксклюзионная хроматография SEC	1	mean ± 2SD range
	G27-IM129	ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	1	mean ± 2SD range
	G27-IM127	ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	1	mean ± 2SD range
	G27-IM027	ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	1	mean ± 2SD range
	Максимальная единичная примесь Maximum single impurity	ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	1	mean ± 2SD range
	Сумма примесей Total impurities	ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	1	mean ± 2SD range
Биологическая активность Biological activity	Активация кальциевых токов через GLP-1 Activation of GLP-1–mediated calcium currents	Клеточный тест Cell assay	1	mean ± 2SD range
	Активация кальциевых токов через GIP Activation of GIP–mediated calcium currents	Клеточный тест Cell assay	1	mean ± 2SD range

Анализ вторичной структуры методом кругового дихроизма

Измерение спектров кругового дихроизма было проведено на спектрометре Chirascan™ (Applied Photophysics Ltd., Великобритания) в диапазоне длин волн 180–260 нм с шагом 1 нм и шириной полосы пропускания 1 нм. Непосредственно перед экспериментом образцы были переведены в 10 мМ фосфатный буфер с pH 8,0 при помощи гель-фильтрации на Bio-Gel P4 (Bio-Rad, США). Концентрация оценивалась спектрофотометрически по поглощению на длине волны 280 нм и была в диапазоне 0,1–0,2 мг/мл для всех проб. Для измерения была использована кварцевая кювета с длиной оптического пути 0,1 мм (Hellma Analytics, Германия). В общей сложности было изучено по 3 образца для каждой из трех различных серий препаратов GP30931 и Мунджаро®, спектры каждого образца измерены в пяти технических повторах. После съемки были выполнено усреднение спектров по 5 повторам, вычитание фонового спектра и конвертация в единицы молярного кругового дихроизма (Δε) в расчете на одну пептидную связь. Обработанные спектры были проанализированы при помощи алгоритма BeStSel [15, 16] для определения долей элементов вторичной структуры.

Анализ третичной структуры методом флуоресцентной спектрофотомерии

Для анализа третичной структуры определяли квантовый выход флуоресценции. Измерения проводили на спектрофлуориметре RF-5301 (Shimadzu, Япония) и спектрофотометре UV-1800 (Shimadzu, Япония) при ширине спектра 250–300 нм. Так как в исследуемом препарате присутствуют аминокислотные остатки тирозина и триптофана, в качестве стандартных растворов сравнения были выбраны растворы тирозина и триптофана, спектры поглощения и флуоресценции которых практически совпадает со спектрами исследуемого вещества.

Анализ четвертичной структуры методом динамического рассеяния света (DLS)

Эксперимент был проведен на приборе Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания). Интенсивность обратно рассеянного света от образца в кювете регистрировалась под углом 175° относительно первичного лазера, все эксперименты проводились при температуре 25 °C. Полученные автокорреляционные функции интенсивности проанализированы с использованием мультимодальной модели анализа, в основе которой лежит аппроксимация методом наименьших квадратов. В результате были получены распределения интенсивности рассеянного света в зависимости от размеров частиц. По полученному распределению интенсивности был рассчитан средний гидродинамический диаметр частиц.

Определение примесей

В соответствии с руководством FDA исследование примесей является критически важным для демонстрации фармацевтической эквивалентности синтетического пептида по отношению к оригинальному препарату [11]. Аналитическая характеристика профиля примесей необходима для подтверждения сопоставимости безопасности, эффективности и качества, особенно в условиях, когда даже следовые количества структурно близких или неидентифицированных компонентов могут влиять на клинические свойства препарата.

Для исследования высокомолекулярных белков (ВМБ) был применен метод эксклюзионной хроматографии (SEC). Разделение проводили на колонке AdvanceBio SEC, 7,8 × 300 мм, размер частиц 2,7 мкм (Agilent Technologies, США, кат. № PL1180-5301), с защитной предколонкой AdvanceBio SEC, 7,8 × 50 мм, размер частиц 2,7 мкм (Agilent Technologies, США кат. № PL1180-1301), при температуре 30 °C со скоростью потока 0,7 мл/мин в течение 30 мин. Для идентификации G27-IM129, G27-IM127, G27-IM027 и других родственных примесей был выбран метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Разделение проводили с помощью колонки AdvanceBio Peptide Mapping, 4,6 × 150 мм, размер частиц 2,7 мкм (Agilent Technologies, США), при температуре 50 °C со скоростью потока 0,6 мл/мин в течение 70 мин. УФ-детектирование для определения примесей проводили на жидкостном хроматографе LC-30 Nexera (Shimadzu, Япония), спектры регистрировали при длине волны 215 нм.

Биологическая активность in vitro

В методиках оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатида в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R в качестве тест-системы использовали клеточную линию эпителия эмбриональной почки человека HTS163L (Eurofins Scientific, Люксембург), экспрессирующую рецептор GLP-1R, в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GIP-R использовали клеточную линию HTS134C (Eurofins Scientific, Люксембург), экспрессирующую рекомбинантный рецептор GIPR на своей поверхности. Клеточную линию HTS163L рассевали в черные 96-луночные планшеты с концентрацией 5000 клеток/лунку в питательной среде Basal Medium (DMEM/F12 + NEAA + 10 % FBS). Клеточную линию HTS134C рассевали с концентрацией 25 000 клеток/лунку в питательной среде Basal Medium (DMEM + 10 % FBS + NEAA + HEPES). Планшеты инкубировали при 37 °C и 5 % CO_2 24 ± 4 ч. На следующий день среду меняли на буфер, в основе которого раствор Хенкса, содержащий 20 мМ ХЕПЕС, 2,5 мкМ пробенецид, 2 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM (для HTS163L) или 5 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM (для HTS134C). Планшеты инкубировали в течение

30 мин (HTS163L) или 60 мин (HTS134C) при комнатной температуре, защищая от света. Разведения исследуемых образцов готовили в буфере, содержащем раствор Хенкса, 20 мМ ХЕПЕС, 2,5 мкМ пробенецид, и вносили в лунки планшета в виде 3-кратных стоков. Для клеточной линии HTS163L концентрации образцов в лунках составили: 500, 1000, 2000, 4000, 10 000, 15 000, 22 500, 60 000, 500 000, 2 000 000 пМ. Для HTS134C концентрации образцов в лунках составили: 1000, 2000, 4000, 8000, 16 000, 32 000, 64 000, 128 000, 500 000, 2 000 000 пМ. Сразу после внесения проводилось снятие флуоресценцентного сигнала на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия) при длине волны 480, излучении 520 нм, 100 вспышках на лунку, усилении сигнала 2000. Результаты обсчитывали в программе MARS, используя метод параллельных кривых. F-test: Global fit used – 4-параметрическая кривая (4PL), CI 95 %.

Статистическая обработка данных

Как указано выше, при помощи метода ранжирования рисков для каждого из исследуемых показателей были определены допустимые диапазоны отклонений исследуемого препарата от референтного.

TIER 1 – Включает в себя качественные признаки, определяемые как имеющие наибольший потенциальный клинический эффект. Диапазон: среднее значение референтного препарата ± 2SD.

TIER 2 – Менее критичные атрибуты качества. Диапазоны: среднее значение ± 3SD.

TIER 3 – Атрибуты соответствуют либо показателям с наименьшим риском потенциального клинического воздействия, либо тем признакам, которые важны, но не поддаются количественной оценке.

Для результатов биологических тестов дополнительно были построены кривые «доза – эффект» в логарифмических координатах и рассчитаны значения EC50 с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., США). Дополнительно для оценки эквивалентности биологической активности (БА%) использован метод двух односторонних тестов (TOST, Two One-Sided Tests). Статистический анализ проведен в среде Python (версия 3.11.8) с использованием библиотеки statsmodels (версия 0.13.5).

Визуализация графиков TOST выполнена с помощью библиотеки matplotlib (версия 3.6.3). Анализ выполнялся на логарифмированных данных с использованием 90 % доверительных интервалов и границ эквивалентности 0,80–1,25 (в логарифмической шкале: от −0,2231 до +0,2231).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сводные результаты по всем проведенным физико-химическим исследованиям представлены в таблице 2.

Молекулярная масса и первичная структура

С помощью метода ВЭЖХ-МС были получены спектры для нативного белка. Во всех исследуемых образцах Седжаро® (GP30931) и референтного препарата присутствовали идентичные сигналы, соответствующие ожидаемым расчетным молекулярным массам нативного белка тирзепатида (таблица 2). Далее были получены спектры фрагментации белка (ВЭЖХ-МС) и было показано, что его аминокислотная последовательность полностью соответствует заявленной для всех образцов (рисунок 2).

Первичная структура также была подтверждена методом пептидного картирования. При протеолизе в невосстанавливающих условиях происходило образование семи ожидаемых пептидов (таблица 3). Кроме ожидаемых пептидов, детектировались и фрагменты автолиза трипсина (обозначены в таблице как TR), а определенная часть белка оставалась интактной (таблица 3).

Полученные пептидные карты для образцов Седжаро® (GP30931) были идентичны образцам препарата Мунджаро®, о чем свидетельствует сравнение хроматограмм после протеолиза тирзепатида (рисунок 3).

На основании полученного одинакового профиля пептидных фрагментов и данных по молекулярной массе и аминокислотной последовательности тирзепатида Седжаро® (GP300931) и Мунджаро® можно сделать вывод об идентичности их первичной структуры.

Структуры высокого порядка

Для проведения сравнения полипептиды всех партий препаратов были переведены в одинаковый буфер для исключения влияния pH и возможного влияния компонентов ГЛФ на структуру белков [12]. Для всех шести партий были получены одномерные ^{1}H-спектры (рисунок 4, А), двумерные ^{1}H/^{1}H-NOESY (рисунок 4, Б, В), 1H/1H-TOCSY (рисунок 4, Г, Д), ^{1}H/^{15}N-HSQC (рисунок 4, Е) и ^{1}H/^{13}C-HSQC (рисунок 4, Ж).

Для анализа использовались препараты с высокой концентрацией белка (более 1 мМ), что позволило эффективно накопить одномерные ^{1}H-спектры [17], двумерные спектры ^{1}H/^{1}H-NOESY и ^{1}H/^{1}H-TOCSY, а также гетероядерные ^{1}H/^{13}C-HSQC и ^{1}H/^{15}N-HSQC с использованием естественного содержания изотопов ^{13}C и ^{15}N [18, 19]. (Последний метод получения спектров ^{1}H/^{15}N-ЯМР эффективен в случае исследования белков с узкими пиками в амидной области от подвижных NH- и NH_2-групп белка.)

Из сравнительного анализа одномерных и двумерных ЯМР-спектров (см. рисунок 4) очищенных от низкомолекулярных соединений состава готовой лекарственной формы препаратов тирзепатида Мунджаро® и Седжаро® (GP30931) следует, что белки из препаратов имеют идентичный аминокислотный состав, пространственную структуру и конформационную подвижность в одинаковых условиях (практически идентичные «спектральные отпечатки» в буфере 20 мМ Na/KPO_4, 50 мМ NaCl, 0,1 мМ ЭДТА).

Таблица 2. **Физико-химическая характеризация**

Table 2. **Physicochemical characterization**

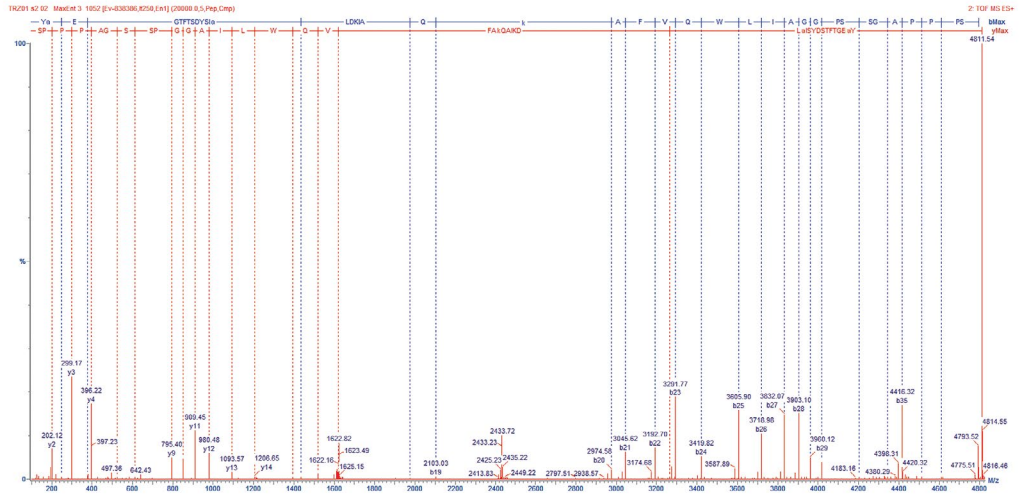
Метод Method	**Атрибут** Attribute	**GP30931**	**Мунджаро®** Mounjaro®
Первичная структура и базовые физико-химические свойства **Primary structure and basic physicochemical properties**			
ВЭЖХ-МС HPLC-MS	Масса нативного белка, Да Native protein mass, Da	4810,52–4810,53	4810,52–4810,53
ВЭЖХ-МС, пептидное картирование, 2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY HPLC-MS, peptide mapping, 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	Подтверждена Confirmed	Подтверждена Confirmed
2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY	Изомеризация аминокислот (замена L ↔ D, цис-/транс-) Amino acid isomerization (L-to-D conversion and cis/trans isomerization)	Отсутствует Absent	–
Вторичная структура, структуры высшего порядка и агрегация **Secondary structure, higher-order structures, and aggregation**			
Круговой дихроизм Circular Dichroism	α-спираль, % α-helix, %	17,5–21,6	17,7–21,0
	β-слой, % β-sheet, %	21,9–27,2	20,8–24,7
	β-повороты, % β-turns, %	15,3–16,9	15,4–17,1
	Неупорядоченная структура, % Random coil, %	38,6–41,3	39,3–42,2
1D-ЯМР-^{1}H 1D ^{1}H-NMR	Вторичная и третичная структура Secondary structure and tertiary structure	Вториная и третичная структура дженерика идентична оригинатору The secondary and tertiary structures of the generic are identical to those of the reference product.	–
2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H NOESY 2D ^{1}H-^{1}H NMR NOESY			
2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY 2D ^{1}H-^{1}H NMR TOCSY			
2D-ЯМР ^{13}C-HSQC 2D ^{13}C-HSQC NMR			
2D-ЯМР ^{15}N-HSQC (HN, H_2N) 2D ^{15}N-HSQC NMR (HN, H_2N)			
Флуоресцентная спектрофотомерия Fluorescence spectrophotometry	Квантовый выход флуоресценции по триптофану Tryptophan fluorescence quantum yield	0,5–0,5	0,4–0,5
Динамическое рассеяние света Dynamic Light Scattering, DLS	Пик распределения частиц, нм Hydrodynamic intensity diameter, nm.	6,7–9,5	6,6–10,2
Родственные примеси **Related impurities**			
SEC Size-Exclusion Chromatography	ВМБ, % High Molecular Weight Species, %	0,25–0,26	0,11–0,14
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM129, %	0,63–0,64	0,09–0,11
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM127, %	0,59–0,60	0,12–0,14

Окончание таблицы 2

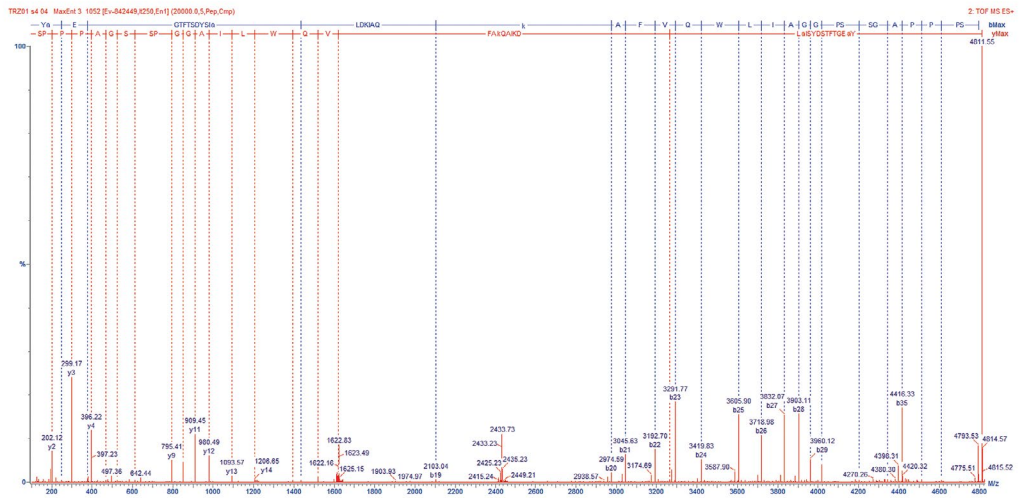
Метод Method	**Атрибут** Attribute	**GP30931**	**Мунджаро®** Mounjaro®
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	G27-IM027, %	0,75–0,77	0,12–014
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Максимальная единичная примесь, % Maximum single impurity, %	0,37–0,46	0,05–0,12
ОФ-ВЭЖХ RP-HPLC	Сумма примесей, % Total impurities, %	3,84–3,93	0,59–0,87

Примечание. Данные представлены как минимальное и максимальное значение, во всех указанных методиках было использовано по 3 серии каждого препарата.

Note. Data are presented as minimum and maximum values. All methods included 3 batches of each drug product.



А
A



Б
B

Рисунок 2. Спектры фрагментации для исследуемых образцов. Образцы:
А – Мунджаро® (репрезентативная серия); Б – GP30931 (репрезентативная серия)

Figure 2. Fragmentation spectra for analyzed samples. Samples:
A – Mounjaro® (representative batch); B – GP30931 (representative batch)

Таблица 3. Перечень пептидных фрагментов, регистрируемых после проведения гидролиза препаратов тирзепатида трипсином

Table 3. List of peptide fragments registered after hydrolysis of tirzepatide preparations with trypsin

Время удержания, мин Retention time, min	Определяемая масса, Да Measured mass, Da	Теоретическая масса, Да Theoretical mass, Da	Положение Position	Последовательность Sequence
4,12	1205,6388	1205,6404	26–39	(W)LIAGGPSSGAPPPS-NH2
4,87			TR	
5,07	1125,5558	1125,5554	7–16	(F)TSDYSIaLDK(I)
5,13	700,3060	700,3068	1–6	YaEGTF(T)
5,51			TR	
5,75			TR	
6,27			TR	
6,38	1807,8504	1807,8516	1–16	YaEGTFTSDYSIaLDK(I)
6,53			TR	
11,14	4128,2235	4128,2286	7–39	(F)TSDYSIaLDKIAQkAFVQWLIAGG PSSGAPPPS-NH2
11,38	4810,5219	4810,5249	1–39	YaEGTFTSDYSIaLDKIAQkAFVQWLI AGGPSSGAPPPS-NH2
11,55	3020,6846	3020,6838	17–39	(K)IAQkAFVQWLIAGGPSSGAPPPS-NH2
11,76	1833,0504	1833,0539	17–25	(K)IAQkAFVQW(L)

Характерное распределение ^{1}H,^{13}C,^{15}N-резонансов (химических сдвигов) указывает, что в обоих видах препаратов белок тирзепатида имеет в основном α-спиральную конформацию, дополненную высокоподвижным участком, что соответствует пространственной модели белка (рисунок 5). Наблюдаемая сильно варьирующая ширина и расщепление ЯМР-сигналов является, по-видимому, следствием медленного конформационного обмена (в микро-миллисекундном диапазоне) из-за присутствия 4 остатков пролина в высокоподвижном С-концевом участке и цис-транс-изомеризации пептидных связей Xxx-Pro.

Спектроскопия кругового дихроизма (КД) в дальнем УФ-диапазоне является стандартным методом изучения пространственной структуры белков и пептидов, и конформационные изменения в пептидных связях отражаются в соответствующих спектральных изменениях [20]. Соответственно, для изучения сопоставимости вторичных структур препаратов Седжаро® (GP30931) и Мунджаро® были измерены и изучены спектры кругового дихроизма для данных молекул. Существующие подходы к анализу спектров КД и применению данного метода для анализа белковых и пептидных препаратов были исчерпывающе рассмотрены в недавнем обзоре [21].

В данной работе для изучения сопоставимости препаратов Седжаро® (GP30931) и Мунджаро® были применены два подхода. Во-первых, спектры КД были сравнены напрямую путем расчета среднего спектра для референсного препарата (Мунджаро®) и наложения спектров референсного препарата для каждой длины волны. Из рисунка 6 видно, что все спектры препаратов Седжаро® (GP30931) качественно соответствуют спектру для Мунджаро®, что говорит о сопоставимости структур исследуемых препаратов. Важно отметить, что при обработке данных не применялись методы сглаживания.

Во-вторых, спектры КД были подвергнуты так называемой деконволюции для количественной оценки вклада различных элементов вторичной структуры и сравнения полученных значений для препаратов Седжаро® (GP30931) и Мунджаро®. Процентные доли всех элементов вторичной структуры (рисунок 7, А–Г) для исследуемых образцов GP30931 попали в доверительный интервал в 2 стандартных отклонениях относительно средних значений для Мунджаро®, за исключением двух измерений для неупорядоченных структур (снижение на 0,08 и 0,48 %) и двух измерений для b-слоев (превышение на 0,26 и 1,46 %). С учетом погрешности методики (до 5 %) и полной сопоставимости вторичной структуры по данным ЯМР можно заключить, что данное отклонение не явля-

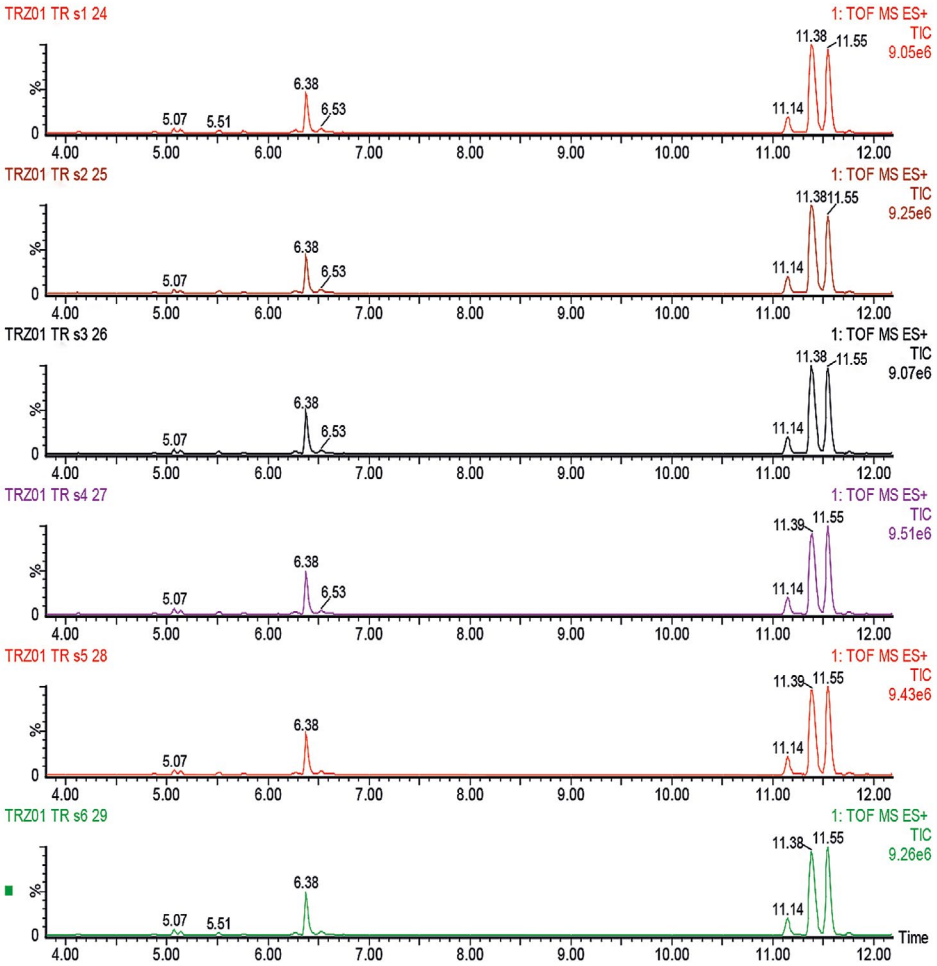


Рисунок 3. Хроматограммы продуктов протеолиза тирзепатида. TRZ01 TR S1-S3 (Мунджаро®), TRZ01 TR S1-S3 (GP30931)

Figure 3. Chromatograms of tirzepatide proteolysis products. TRZ01 TR S1–S3 (Mounjaro®), TRZ01 TR S1–S3 (GP30931)

ется значимым. Таким образом, и прямое количественное сравнение спектров КД, и сравнение определенных долей элементов вторичной структуры указывают на структурную сопоставимость препаратов GP30931 и Мунджаро®.

Собственная флуоресценция белков, обусловленная наличием ароматических аминокислотных остатков (триптофан, тирозин, фенилаланин), крайне чувствительна к конформационным изменениям белка, поэтому определение относительного квантового выхода флуоресценции является важным и информативным параметром характеризации молекул. Обобщенные квантовые выходы по триптофану для исследуемых образцов были сопоставимы между препаратами Мунджаро® и Седжаро® (GP30931), что позволяет сделать вывод о сопоставимости третичной структуры белка исследованных препаратов (рисунок 8, А).

Метод динамического лазерного рассеяния позволяет определить размер частиц и изучить их агрегацию в растворе и уже стал классическим методом анализа фармпрепаратов, что отразилось на его включении в фармакопею[1]. В данной работе с использованием стандартного протокола динамического лазерного рассеяния были получены автокорреляционные функции флуктуации интенсивности рассеянного света по времени для препаратов GP30931 и Мунджаро®. Распределение интенсивности рассеянного света по размеру (гидродинамическому диаметру) частиц показало, что все образцы обоих препаратов имеют основной пик и незначительные минорные фракции. Существенной агрегации не было обнаружено ни в одном образце. Средний гидродинамический диаметр частиц в образцах GP30931 практически не отличается от значения для референсного препарата Мунджаро® (рисунок 8, Б). Полученные данные свидетельствуют о высокой чистоте всех исследованных образцов и отсутствии агрегации белка.

[1] USP 430 Particle Size Analysis by Dynamic Light Scattering. Available at: https://www.usp.org/harmonization-standards/pdg/general-chapters/particle-size-analysis-by-dynamic-light-scattering. Accessed: 16.04.2025.

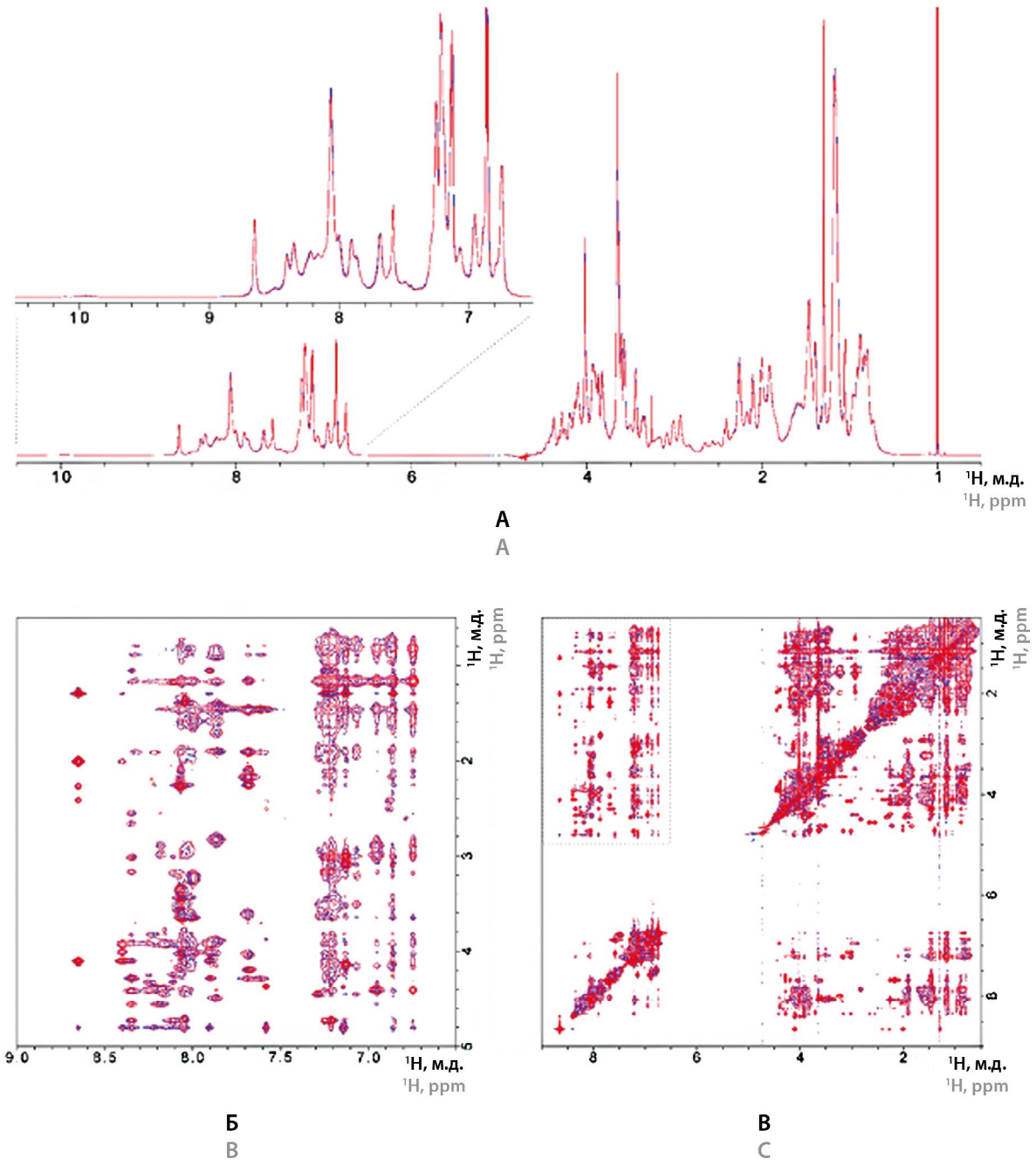
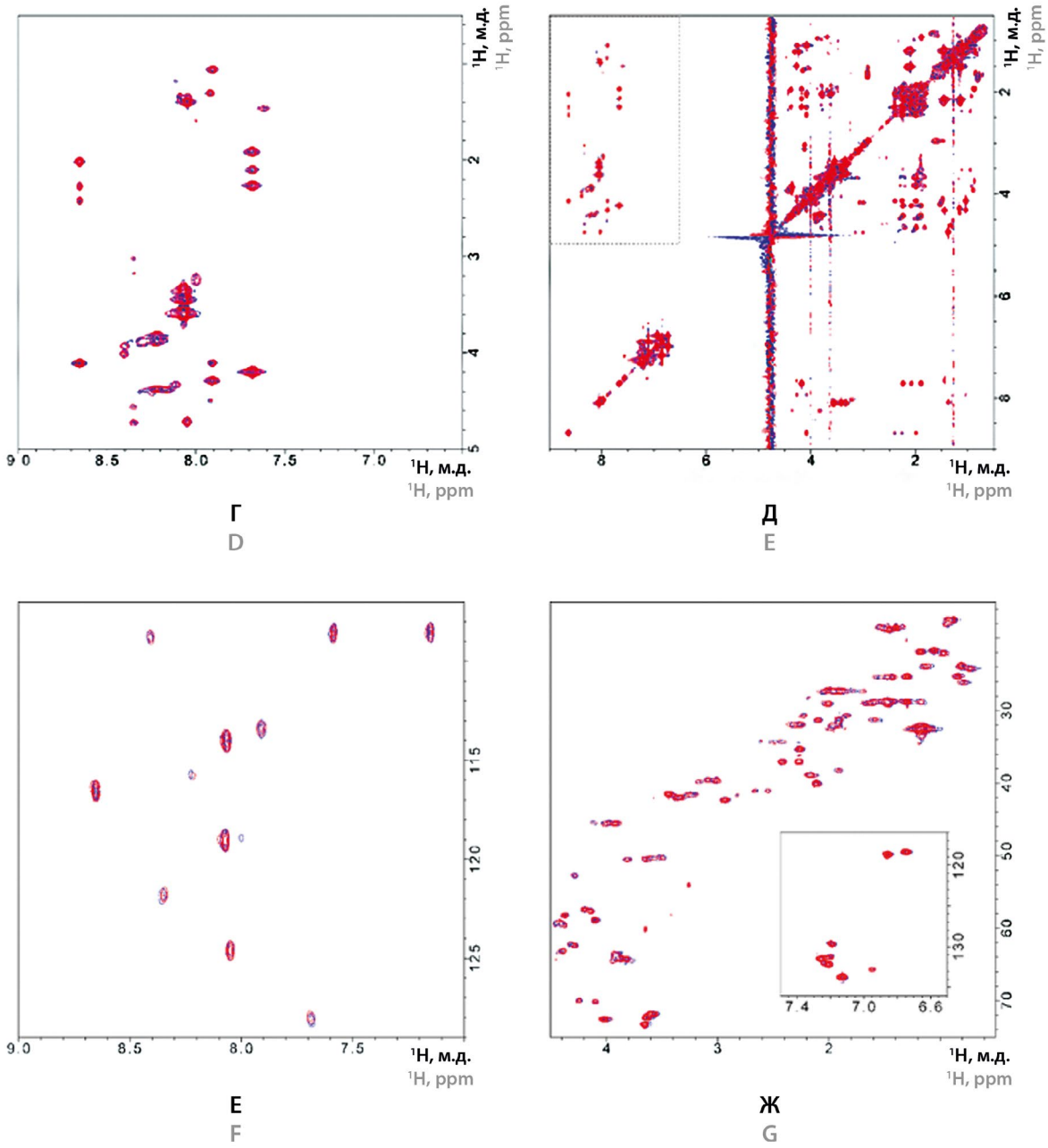


Рисунок 4. **Сравнение гетероядерных ЯМР-спектров препаратов (репрезентативные серии) тирзепатида – Мунджаро® (синий цвет) и Седжаро® (GP300931) (красный цвет).**

А – наложение одномерных ^{1}H-ЯМР-спектров препаратов тирзепатида. Увеличенная область спектра с сигналами от NH- и NH_2-групп основной и боковых цепей белка и CH-групп ароматических колец остатков белка представлена сверху. Б и В – наложение двумерных ЯМР-спектров ^{1}H/^{1}H-NOESY препаратов тирзепатида. На (Б) отдельно расширена область спектра (обведена пунктиром на (В)) с кросс-пиками (посредством ЯЭО-взаимодействий (ядерный эффект Оверхаузера) между протонами) от CH-, CH_2- и CH_3-групп на NH-, NH_2- и CH- (ароматика) группы белка.

Figure 4. **Comparison of heteronuclear NMR spectra of tirzepatide drug products (representive batches) – Mounjaro® (blue) and Sedzaro® (GP30931) (red).**

A – Overlay of 1D ^{1}H NMR spectra of tirzepatide products. An enlarged spectral region containing signals from NH and NH_2 groups of the protein backbone and side chains, as well as CH groups of aromatic rings of the residues, is shown above. B and C – Overlay of 2D ^{1}H/^{1}H-NOESY spectra of tirzepatide products. In (B), the region highlighted with a dashed line in (C) is enlarged, showing cross-peaks arising from NOE (nuclear Overhauser effect) interactions between CH, CH_2, and CH_3 protons and NH, NH_2, and CH (aromatic) protons.



Продолжение рисунка 4. **Г и Д – наложение двумерных ЯМР-спектров $^{1}H/^{1}H$-TOCSY препаратов тирзепатида. На (Г) отдельно расширена область спектра (обведена пунктиром на (Д)) с кросс-пиками (посредством констант спин-спинового взаимодействия между протонами через ковалентные связи) от CH-, CH_2- и CH_3-групп на NH-группы белка. Е – наложение двумерных ЯМР-спектров $^{1}H/^{15}N$-HSQC препаратов тирзепатида, накопленных на естественном содержании ^{15}N-изотопа (~0,36 %). Зарегистрированы только интенсивные кросс-пики от высокоподвижных NH- и NH_2-групп основной и боковых цепей белка. Ж – наложение двумерных ЯМР-спектров $^{1}H/^{13}C$-HSQC препаратов тирзепатида, накопленных на естественном содержании ^{13}C-изотопа (~1,1 %). Зарегистрированы кросс-пики от CH-, CH_2- и CH_3-групп основной и боковых цепей белка. В ставке показан отдельно накопленный $^{1}H/^{13}C$-HSQC-спектр для CH-групп ароматических боковых цепей остатков**

Continuation of Figure 4. **D and E – Overlay of 2D $^{1}H/^{1}H$-TOCSY spectra of tirzepatide products. In (D), the region highlighted with a dashed line in (E) is enlarged, showing cross-peaks arising from scalar (through-bond) spin-spin couplings between CH, CH_2, and CH_3 groups and NH groups. F – Overlay of 2D $^{1}H/^{15}N$-HSQC spectra of tirzepatide products, acquired at natural ^{15}N abundance (~0.36 %). Only intense cross-peaks from highly mobile NH and NH_2 groups of the backbone and side chains were detected. G – Overlay of 2D $^{1}H/^{13}C$-HSQC spectra of tirzepatide products, acquired at natural ^{13}C abundance (~1.1 %). Cross-peaks from CH, CH_2, and CH_3 groups of the backbone and side chains were detected. The inset shows a separately acquired $^{1}H/^{13}C$-HSQC spectrum of CH groups from aromatic side chains**

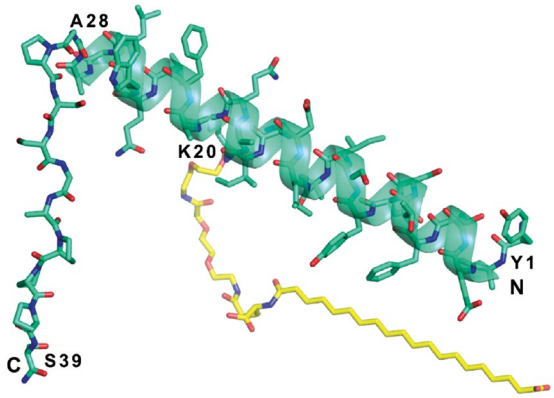


Рисунок 5. Пространственная модель белка тирзепатида, созданная на основе крио-ЭМ- (PDB ID: 7RGP) и собственных ЯМР-данных. Подписаны остатки белка, соответствующие N- и C-концам белка и его α-спирали, а также остаток лизина, конъюгированный через линкер с фрагментом жирной двухкислотной группы 2 (выделены желтым цветом)

Figure 5. Spatial model of the tirzepatide protein constructed based on cryo-EM data (PDB ID: 7RGP) and in-house NMR results. Labeled are the amino acid residues corresponding to the N- and C-termini of the protein, its α-helices, and the lysine residue conjugated via a linker to the fatty diacid fragment 2 (highlighted in yellow)

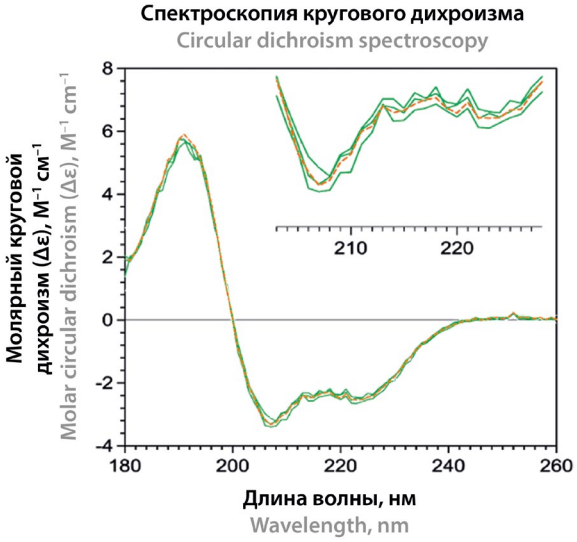


Рисунок 6. Изучение вторичной структуры препаратов GP30931 и Мунджаро® при помощи спектроскопии кругового дихроизма. Приведен усредненный спектр для 9 независимых образцов препарата Мунджаро® (оранжевым пунктиром). Усредненные по 3 независимым образцам спектры для 3 различных серий GP30931 (зеленые линии) полностью повторяют спектр для Мунджаро® по форме и амплитуде. Математические методы сглаживания и нормировки при обработке спектров не применялись. Более крупно показан диапазон с характерными для α-спирали минимумами на длинах волн 207 и 222 нм

Figure 6. Analysis of the secondary structure of GP30931 and Mounjaro® using circular dichroism spectroscopy. The averaged spectrum of 9 independent Mounjaro® samples is shown as an orange dashed line. Averaged spectra of three different GP30931 batches (3 independent samples per batch; green lines) fully match the Mounjaro® spectrum in both shape and amplitude. No mathematical smoothing or normalization was applied during spectral processing. The lower panel shows an enlarged region with characteristic α-helix minima at 207 and 222 nm

Примеси

Содержание родственных примесей и высокомолекулярных белков (ВМБ) – это один из важнейших параметров качества лекарственных препаратов. Повышенный уровень примесей потенциально может повлиять на эффективность и безопасность препарата. По результатам анализа было выявлено сниженное содержание всех исследованных примесей в образцах всех серий препарата Седжаро® (GP30931) по сравнению с сериями препарата Мунджаро® (рисунок 9, А–Г). Учитывая, что именно повышение содержания примесей оказывает негативное влияние на профиль безопасности и иммуногенности, незначительно более низкий уровень примесей у воспроизведенного препарата не вызывает опасений и может свидетельствовать о его более высокой степени очистки по сравнению с оригинальным препаратом.

Биологическая характеризация

Метаболическую активность исследуемых образцов оценивали в двух клеточных тестах, отражающих фармакологически релевантные механизмы действия препарата – активацию рецепторов GLP-1 и GIP. Для каждого теста было проведено 3 независимых повтора. Усредненные кривые «доза – эффект» для всех проведенных тестов представлены на рисунках 10, А и 11, А.

Средние значения EC_{50} для препаратов Седжаро® (GP30931) и Мунджаро® в тестах активация кальциевых токов через GIP составили 47,1 нМ и 48,6 нМ соответственно, а в тесте активация кальциевых токов через GLP-1-рецепторы – 35,0 нМ и 35,2 нМ. Все значения EC_{50} для всех протестированных серий GP30931 находились в пределах допустимых значений референтного препарата для всех повторностей (рисунки 10, Б и 11, Б).

При проведении анализа методом TOST по показателю биологической активности (БА, %) воспроизведенный препарат продемонстрировал полную эквивалентность оригинальному препарату по активности как к рецептору GIP (Ratio = 1,042; 90 % CI [0,9992; 1,0868]), так и к рецептору GLP-1 (Ratio = 1,010; 90 % CI [0,9848; 1,0363]). Во всех случаях доверительные интервалы полностью находились в пределах заранее заданных границ эквивалентности (0,80–1,25) (рисунки 10, В и 11, В).

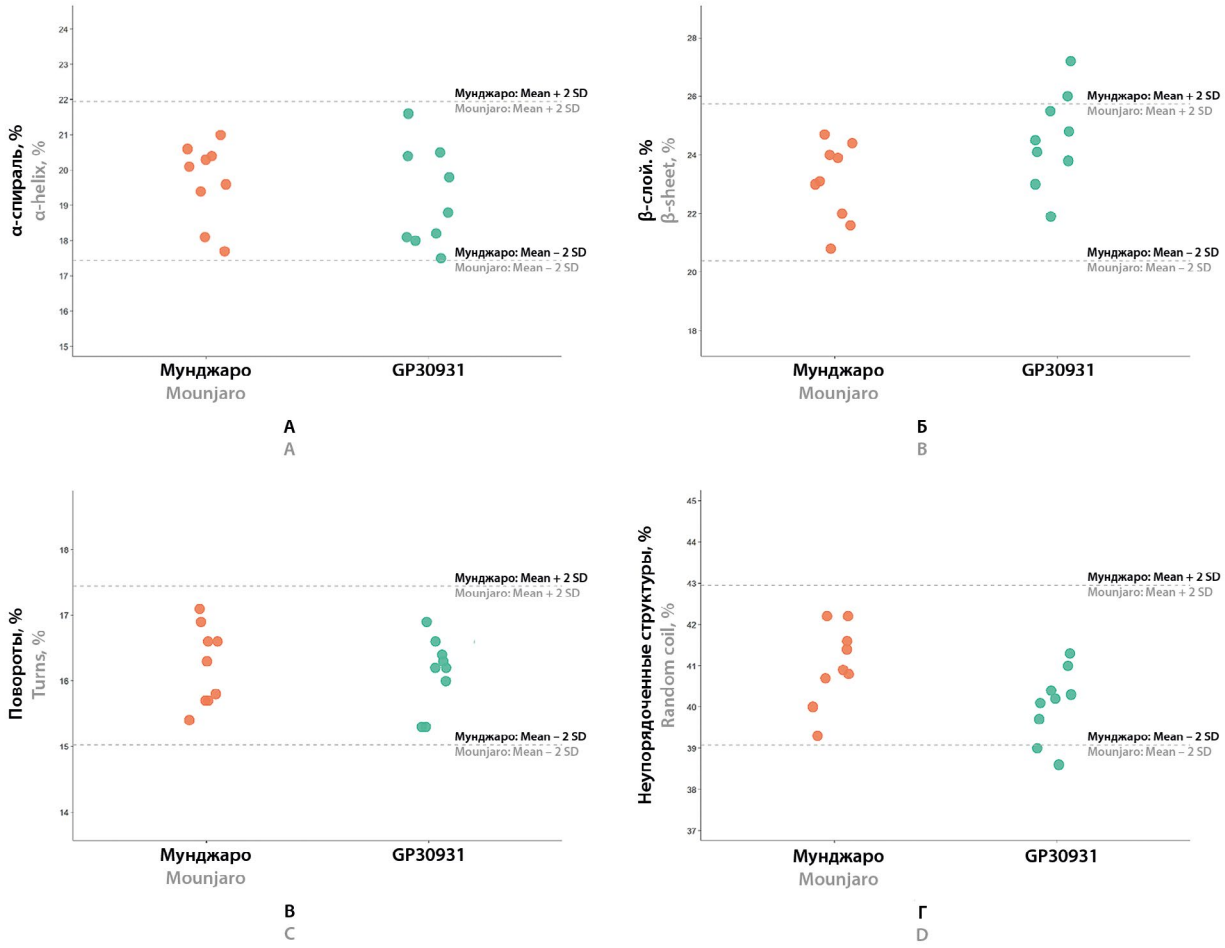


Рисунок 7. **Результаты исследования вторичной структуры:**
А – α-спираль, %; Б – β-слой, %; В – повороты, %; Г – неупорядоченная структура, %

Figure 7. **Results of secondary structure analysis:**
A – α-helix, %; B – β-sheet, %; C – turns, %; D – random coil, %

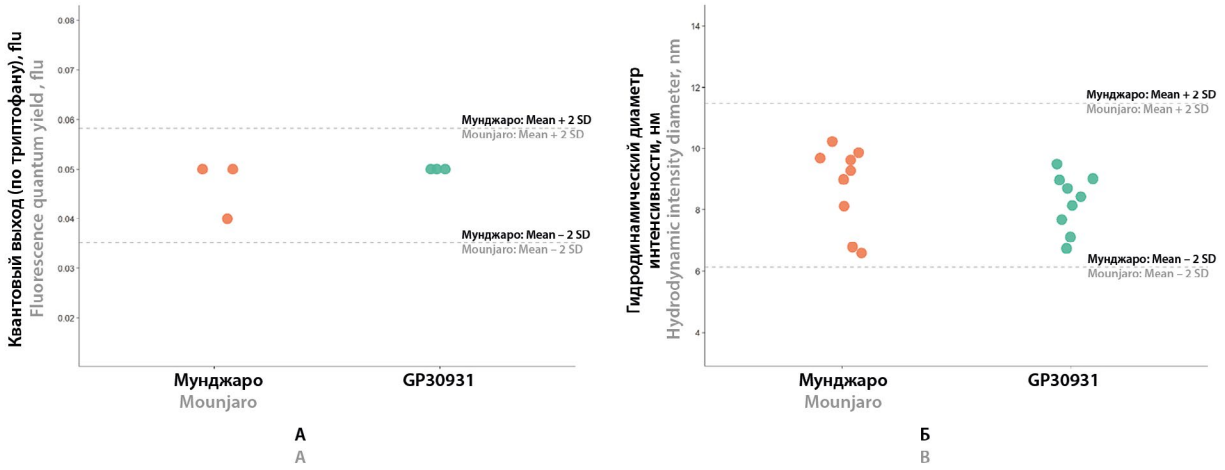


Рисунок 8. **Результаты исследования высших структур пептида:**
А – квантовый выход по триптофану; Б – динамическое рассеяние света

Figure 8. **Results of higher-order structure analysis of the peptide:**
A – tryptophan quantum yield; B – dynamic light scattering

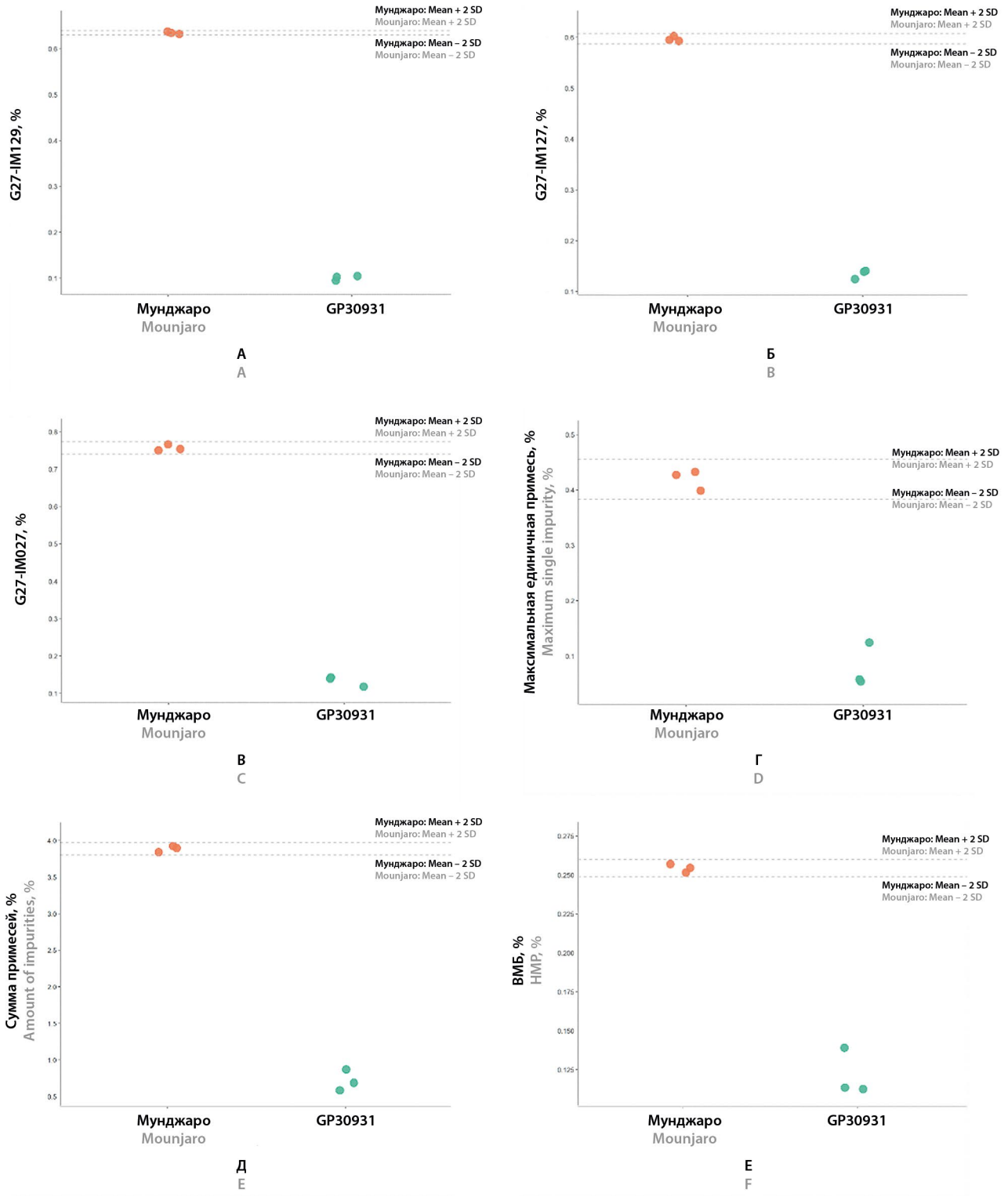


Рисунок 9. **Анализ содержания примесей:**

А – G27-I 12; Б – G27-I 12; В – G27-I 02; Г – максимальная единичная примесь; Д – сумма примесей; Е – ВМБ

Figure 9. **Impurity content analysis:**

A – G27-I 12; B – G27-I 12; C – G27-I 02; D – maximum single impurity; E – total impurities; F – high molecular weight proteins (HMWPs)

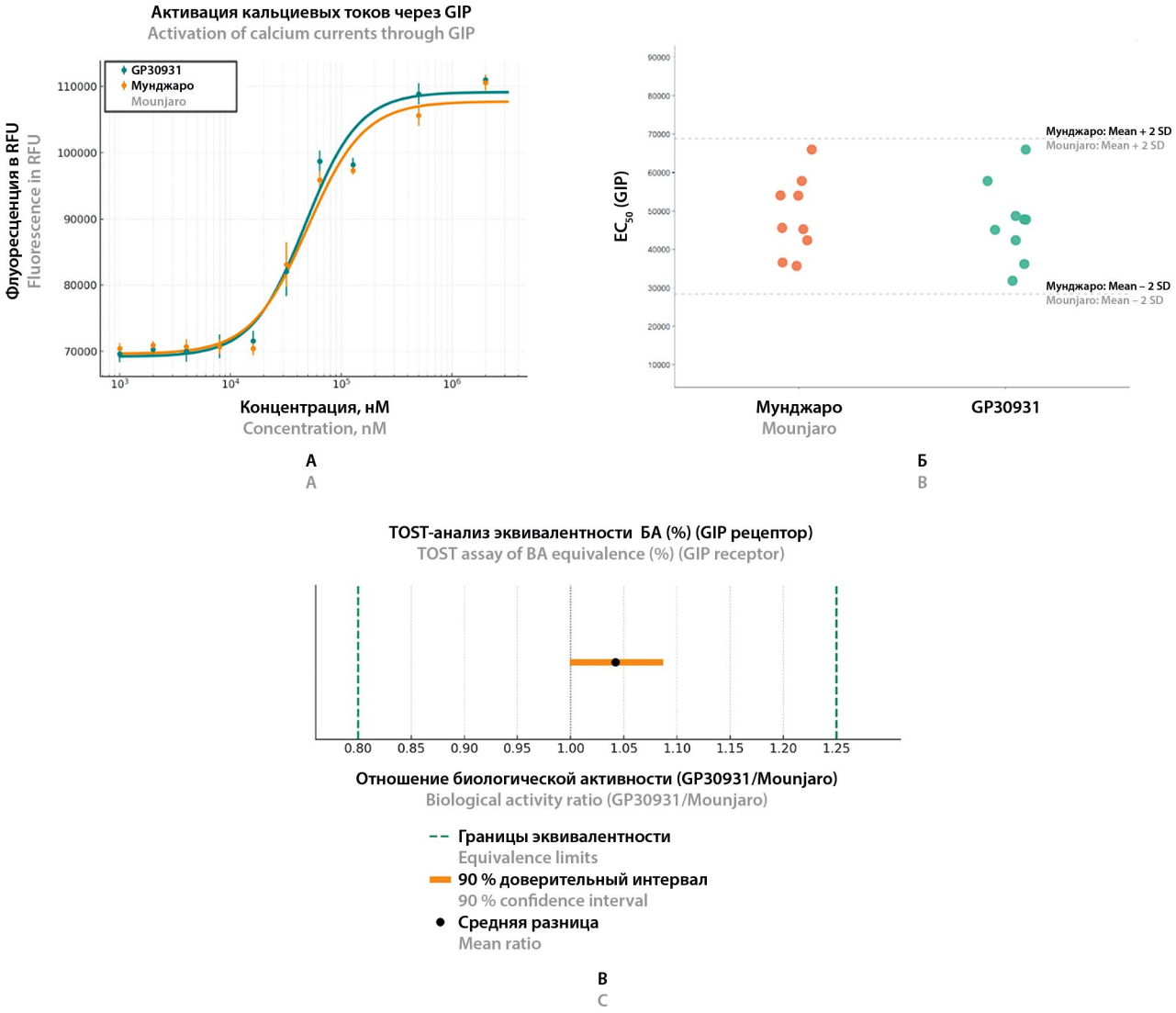


Рисунок 10. Клеточный тест «Активация кальциевых токов через GIP»:
А – усредненные кривые «доза – эффект», Mean ± SEM; Б – точечное распределение значений EC_{50}; В – TOST

Figure 10. Cell-based assay "calcium flux activation via GIP":
A – averaged dose – response curves, Mean ± SEM; B – scatter plot of IC_{50} values; C – equivalence analysis (TOST)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование сопоставимости, направленное на подтверждение высокой степени аналогичности воспроизведенного пептидного препарата Седжаро® (GP30931) и референтного оригинального препарата Мунджаро® с точки зрения физико-химических и функциональных характеристик. Впервые опубликованы исчерпывающие данные по аналитической характеризации как оригинального препарата Мунджаро®, так и его дженерика Седжаро® с использованием наиболее передовых аналитических методов.

Работа включала всестороннюю и детальную оценку критических характеристик пептидной молекулы, включая анализ первичной структуры, структур более высокого порядка, а также профиль примесей. Дополнительно была проведена оценка функциональных свойств и биологической активности, учитывающая механизм действия тирзепатида как двойного агониста рецепторов GLP-1 и GIP. Исследования включали анализ активации рецепторов на клеточной модели и тесты по регистрации кальциевых потоков, что позволило достоверно подтвердить функциональную эквивалентность препаратов Седжаро® и Мунджаро®.

Для обеспечения высокой точности, надежности и воспроизводимости результатов, а также возможности выявления даже минимальных различий в структурных и функциональных характеристиках пептида в работе было использовано несколько «орто-

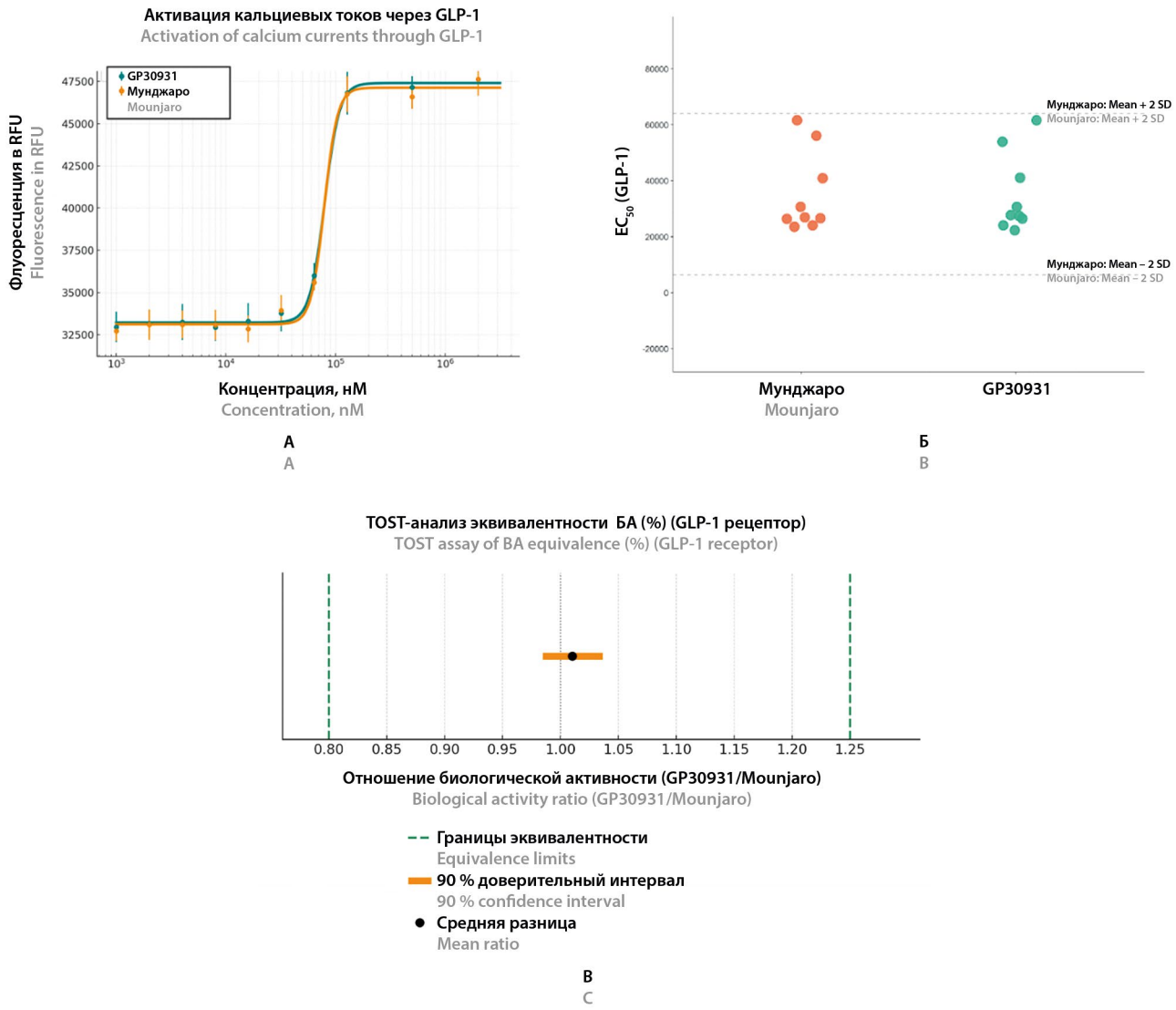


Рисунок 11. Клеточный тест «Активация кальциевых токов через GLP-1»:
А – усредненные кривые «доза – эффект», Mean ± SEM; Б – точечное распределение значений EC_{50}; В – TOST

Figure 11. Cell-based assay "calcium flux activation via GLP-1":
A – averaged dose–response curves, Mean ± SEM; B – scatter plot of EC_{50} values; C – equivalence analysis (TOST)

гональных» методов анализа (включая ВЭЖХ-МС, круговой дихроизм, ЯМР (1D-ЯМР-^{1}H, 2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H NOESY, 2D-ЯМР-^{1}H-^{1}H TOCSY, 2D-ЯМР ^{13}C-HSQC, 2D-ЯМР ^{15}N-HSQC), DLS и т. д.). Это позволило объективно оценить степень сопоставимости исследованных препаратов.

По результатам проведенного исследования была продемонстрирована структурная идентичность препаратов Седжаро® (GP30931) и Мунджаро®. Полученные данные вносят значимый вклад в научное обоснование эквивалентности воспроизведенного препарата тирзепатида и референтного оригинального препарата, тем самым обеспечивая надежную основу для дальнейшей регистрации и клинического применения Седжаро® без проведения дополнительных клинических исследований.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Hirode G., Wong R. J. Trends in the prevalence of metabolic syndrome in the United States, 2011-2016. *Jama*. 2020;323(24):2526–2528. DOI: 10.1001/jama.2020.4501.
2. Wang H. H., Lee D. K., Liu M., Portincasa P., Wang D. Q.-H. Novel insights into the pathogenesis and management of the metabolic syndrome. *Pediatric Gastroenterology, Hepatology & Nutrition*. 2020;23(3):189–230. DOI: 10.5223/pghn.2020.23.3.189.
3. Belenkov Yu. N., Privalova E. V., Kaplunova V. Y., Zektser V. Y., Vinogradova N. N., Ilgisonis I. S., Shakaryants G. A., Kozhevnikova M. V., Lishuta A. S. Metabolic Syndrome: Development of the Issue, Main Diagnostic Criteria. *Rational Pharmacotherapy in Cardiology*. 2018;14(5):757–764. (In Russ.) DOI: 10.20996/1819-6446-2018-14-5-757-764.

4. Schwartz S. S., Epstein S., Corkey B. E., Grant S. F. A., Gavin III J. R., Aguilar R. B. The time is right for a new classification system for diabetes: rationale and implications of the β-cell–centric classification schema. *Diabetes Care*. 2016;39(2):179–186. DOI: 10.2337/dc15-1585.
5. Schwartz S. S., Epstein S., Corkey B. E., Grant S. F. A., Gavin III J. R., Aguilar R. B., Herman M. E. A unified pathophysiological construct of diabetes and its complications. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 2017;28(9):645–655. DOI: 10.1016/j.tem.2017.05.005.
6. Tsygankova O. V., Veretyuk V. V., Ametov A. S. Incretins today: multiple effects and therapeutic potential. *Diabetes mellitus*. 2019;22(1):70–78. (In Russ.) DOI: 10.14341/DM9841.
7. DeFronzo R. A. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Diabetes*. 2009;58(4):773–795. DOI: 10.2337/db09-9028.
8. Kim W., Egan J. M. The role of incretins in glucose homeostasis and diabetes treatment. *Pharmacological Reviews*. 2008;60(4):470–512. DOI: 10.1124/pr.108.000604.
9. Coskun T., Sloop K. W., Loghin C., Alsina-Fernandez J., Urva S., Bokvist K. B., Cui X., Briere D. A., Cabrera O., Roell W. C., Kuchibhotla U., Moyers J. S., Benson C. T., Gimeno R. E., D'Alessio D. A., Haupt A. LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: from discovery to clinical proof of concept. *Molecular Metabolism*. 2018;18:3–14. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.09.009.
10. Sweta, Gupta S., Bansal S., Devi S., Sharma S., Laxmi, Deepa. Tirzepatide a novel anti diabetic molecule unfold dual action. *Discover Public Health*. 2024;21(1):75. DOI: 10.1186/s12982-024-00200-2.
11. Fernández-Carneado J., Vallès-Miret M., Arrastia-Casado S., Almazán-Moga A., Macias M. J., Martin-Malpartida P., Vilaseca M., Díaz-Lobo M., Vazquez M., Sanahuja R. M., Gambús G., Ponsati B. First generic Teriparatide: structural and biological sameness to its reference medicinal product. *Pharmaceutics*. 2024;16(4):537. DOI: 10.3390/pharmaceutics16040537.
12. Rogers-Crovak J. A., Delaney E. J., Detlefsen D. J. Recommendation for Clarifying FDA Policy in Evaluating "Sameness" of Higher Order Structure for Generic Peptide Therapeutics. *The AAPS Journal*. 2024;27(1):8. DOI: 10.1208/s12248-024-00994-8.
13. Demmon S., Bhargava S., Ciolek D., Halley J., Jaya N., Joubert M. K., Koepf E., Smith P., Trexler-Schmidt M., Tsai P. A cross-industry forum on benchmarking critical quality attribute identification and linkage to process characterization studies. *Biologicals*. 2020;67:9–20. DOI: 10.1016/j.biologicals.2020.06.008.
14. Sun B., Willard F. S., Feng D., Alsina-Fernandez J., Chen Q., Vieth M., Ho J. D., Showalter A. D., Stutsman C., Ding L., Suter T. M., Dunbar J. D., Carpenter J. W., Mohammed F. A., Aihara E., Brown R. A., Bueno A. B., Emmerson P. J., Moyers J. S., Kobilka T. S., Coghlan M. P., Kobilka B. K., Sloop K. W. Structural determinants of dual incretin receptor agonism by tirzepatide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2022;119(13):e2116506119. DOI: 10.1073/pnas.2116506119.
15. Micsonai A., Wien F., Kernya L., Lee Y.-H., Goto Y., Réfrégiers M., Kardos J. Accurate secondary structure prediction and fold recognition for circular dichroism spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015;112(24):E3095–E3103. DOI: 10.1073/pnas.1500851112.
16. Micsonai A., Moussong É., Wien F., Boros E., Vadászi H., Murvai N., Lee Y.-H., Molnár T., Réfrégiers M., Goto Y., Tantos Á., Kardos J. BeStSel: webserver for secondary structure and fold prediction for protein CD spectroscopy. *Nucleic Acids Research*. 2022;50(W1):W90–W98. DOI: 10.1093/nar/gkac345.
17. Wang D., Park J., Patil S. M., Smith C. J., Leazer Jr. J. L., Keire D. A., Chen K. An NMR-based similarity metric for higher order structure quality assessment among U.S. marketed insulin therapeutics. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020;109(4):1519–1528. DOI: 10.1016/j.xphs.2020.01.002.
18. Arbogast L. W., Brinson R. G., Marino J. P. Application of natural isotopic abundance ^{1}H-^{13}C- and ^{1}H-^{15}N-correlated two-dimensional NMR for evaluation of the structure of protein therapeutics. In: Methods in enzymology. New York: Academic Press; 2016. Volume 566. P. 3–34. DOI: 10.1016/bs.mie.2015.09.037.
19. Levy G. C., Godwin A. D., Hewitt J. M., Sutcliffe C. Natural abundance ^{15}N and ^{13}C spectroscopy. Aminobenzoic acids, substituted anilines, and related compounds. *Journal of Magnetic Resonance*. 1978;29(3):553–562. DOI: 10.1016/0022-2364(78)90013-6.
20. Kelly S. M., Jess T. J., Price N. C. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*. 2005;1751(2):119–139. DOI: 10.1016/j.bbapap.2005.06.005.
21. Jones C. Circular dichroism of biopharmaceutical proteins in a quality-regulated environment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2022;219:114945. DOI: 10.1016/j.jpba.2022.114945.