



## Физико-химическая и биологическая характеристика лекарственного препарата РинЛиз®

С. С. Арутюнян<sup>1</sup>✉, Р. В. Драй<sup>1</sup>, И. А. Луговик<sup>1</sup>, А. В. Бабина<sup>1</sup>, В. Б. Сапарова<sup>1,2</sup>, Т. А. Сельменских<sup>1</sup>, П. Г. Заикин<sup>1</sup>, Т. Э. Елтышева<sup>1</sup>, И. Е. Макаренко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Закрытое акционерное общество «Фарм-Холдинг». 198515, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Стрельна, ул. Связи, д. 34, лит. А

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет медицины» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО «Российский университет медицины» Минздрава России). 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20, стр. 1

✉ Контактное лицо: Арутюнян Сона Смбаговна. E-mail: [Sona.Arutiunian@geropharm.com](mailto:Sona.Arutiunian@geropharm.com)

ORCID: С. С. Арутюнян – <https://orcid.org/0000-0002-9384-8064>;

Р. В. Драй – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>;

И. А. Луговик – <https://orcid.org/0000-0003-3840-5049>;

А. В. Бабина – <https://orcid.org/0000-0003-3024-4009>;

В. Б. Сапарова – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;

Т. А. Сельменских – <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>;

П. Г. Заикин – <https://orcid.org/0009-0008-8467-9781>;

Т. Э. Елтышева – <https://orcid.org/0000-0002-1931-9455>;

И. Е. Макаренко – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>.

Статья поступила: 27.05.2025

Статья принята в печать: 24.10.2025

Статья опубликована: 15.05.2026

### Резюме

**Введение.** Доступ к инсулину ограничен глобальными барьерами, среди которых ключевым является монопольное ценообразование транснациональных компаний-оригинаторов. Утрата патентной защиты открывает путь для производства биоаналогов – более доступных препаратов, сопоставимых по качеству, эффективности и безопасности. Императивом разработки биоаналогов является проведение комплексных исследований сопоставимости с оригинальным препаратом, включающих физико-химическую и биологическую характеристику. Разработка программы исследований сопоставимости, а именно выбор атрибутов и ортогональных методов для изучения структуры и функциональной состоятельности молекулы инсулина, должна основываться на глубоком понимании структуры и свойств молекулы, а также на последних научных знаниях.

**Цель.** Провести физико-химическую и биологическую характеристику препарата РинЛиз® (GP40011) в сравнении с оригинальным препаратом Хумалог® (инсулин лизпро) для установления их сопоставимости в рамках оценки биоаналогичности.

**Материалы и методы.** Первичную структуру белка подтверждали с помощью времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией и пептидного картирования. Структуры белка более высокого порядка были исследованы следующими методами: капиллярным изоэлектрофокусированием, методом Элмана, круговым дихроизмом, флуоресцентной спектроскопией, динамическим рассеянием света. Сопоставимость профилей примесей исследуемых препаратов изучали с помощью методов эксклюзионной хроматографии и обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии. Для характеристики функциональных свойств и биологической активности препаратов оценивали кинетику связывания с инсулиновыми рецепторами IR-A и IR-B, аутофосфорилирование инсулинового рецептора и проводили метаболические клеточные тесты («Захват глюкозы», «Инсулининдуцированный липогенез», «Ингибирование стимулированного липолиза»).

**Результаты и обсуждение.** По результатам оценки физико-химических свойств для препарата GP40011 была установлена высокая степень сходства с референтным препаратом Хумалог® по первичной структуре белка, структурам более высокого порядка, а также по профилю примесей. Оценка функциональных характеристик показала, что препараты GP40011 и Хумалог® имели идентичную кинетику связывания с инсулиновыми рецепторами IR-A и IR-B и демонстрировали сопоставимую биологическую активность.

© Арутюнян С. С., Драй Р. В., Луговик И. А., Бабина А. В., Сапарова В. Б., Сельменских Т. А., Заикин П. Г., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е., 2026

© Arutyunyan S. S., Drai R. V., Lugovik I. A., Babina A. V., Saparova V. B., Selmenskikh T. A., Zaikin P. G., Eltyшева T. E., Makarenko I. E., 2026

**Заключение.** По результатам проведенного исследования была продемонстрирована полная аналитическая сопоставимость препаратов РинЛиз® и Хумалог®. Проведенное исследование внесло значимый вклад в научное обоснование эквивалентности биосимиляра РинЛиз® и референтного препарата Хумалог®, тем самым обеспечив надежную основу для успешной регистрации и последующего клинического применения.

**Ключевые слова:** инсулин лизпро, биосимиляр, биоаналог, биоподобие, аналитическая сопоставимость, характеристика, физико-химические свойства, биологическая активность

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

**Вклад авторов.** С. С. Арутюнян, И. А. Луговик – написание и редактирование текста рукописи, обзор литературы. А. В. Бабина – разработка программы исследования, анализ данных, интерпретация результатов. В. Б. Сапарова, Т. А. Сельменских, П. Г. Заикин, Т. Э. Елтышева – проведение исследований. И. Е. Макаренко – редактирование и критический пересмотр рукописи. Р. В. Драй – утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

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

**Для цитирования:** Арутюнян С. С., Драй Р. В., Луговик И. А., Бабина А. В., Сапарова В. Б., Сельменских Т. А., Заикин П. Г., Елтышева Т. Э., Макаренко И. Е. Физико-химическая и биологическая характеристика лекарственного препарата РинЛиз®. *Разработка и регистрация лекарственных средств.* 2026;15(2):190–205. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2103>

## Physicochemical and biological characterization of the medicinal product RinLis®

Sona S. Arutyunyan<sup>1</sup>✉, Roman V. Drai<sup>1</sup>, Ilya A. Lugovik<sup>1</sup>, Anna V. Babina<sup>1</sup>, Valeriya B. Saparova<sup>1,2</sup>, Tatyana A. Selmenskikh<sup>1</sup>, Pavel G. Zaikin<sup>1</sup>, Tatyana E. Eltyшева<sup>1</sup>, Igor E. Makarenko<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Closed Joint-Stock Company "Pharm-Holding". 34A, Svyazi str., Strelina settlement, Saint Petersburg, 198515, Russia.

<sup>2</sup> Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education "Russian University of Medicine" of the Ministry of Health of the Russian Federation. 20/1, Delegatskaya str., Moscow, 127473, Russia

✉ **Corresponding author:** Sona S. Arutyunyan. **E-mail:** Sona.Arutiunian@geropharm.com

**ORCID:** Sona S. Arutyunyan – <https://orcid.org/0000-0002-9384-8064>;  
Roman V. Drai – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>;  
Ilya A. Lugovik – <https://orcid.org/0000-0003-3840-5049>;  
Anna V. Babina – <https://orcid.org/0000-0003-3024-4009>;  
Valeriya B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;  
Tatyana A. Selmenskikh – <https://orcid.org/0000-0001-7073-311X>;  
Pavel G. Zaikin – <https://orcid.org/0009-0008-8467-9781>;  
Tatyana E. Eltyшева – <https://orcid.org/0000-0002-1931-9455>;  
Igor E. Makarenko – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>.

**Received:** 27.05.2025

**Accepted:** 24.10.2025

**Published:** 15.05.2026

### Abstract

**Introduction.** Access to insulin is limited by global barriers, the most crucial of which is the pricing monopoly of multinational originator companies. The expiry of patent on the originator product opens the way for the production of biosimilars being affordable products with comparable quality, effectiveness and safety. The imperative for the development of biosimilars is to conduct comprehensive comparability studies with the originator product, including physicochemical and biological characterization. The development of a comparability study program, specifically the selection of attributes and orthogonal methods for analyzing the structure and the functional integrity of the insulin molecule, should be based on a deep understanding of the structure and properties of the molecule, as well as on the latest scientific knowledge.

**Aim.** To conduct physicochemical and biological characterization of the medicinal product RinLis® (GP40011) in comparison with the originator medicinal product Humalog® (insulin lispro) to establish their comparability within the framework of the biosimilarity assessment.

**Materials and methods.** The primary protein structure was confirmed using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) and peptide mapping. Higher-order protein structures were investigated using capillary isoelectric focusing, Ellman's method, circular dichroism, fluorescence spectrophotometry and dynamic light scattering. The comparability of impurity profiles of the tested batches was studied using size-exclusion chromatography (SEC) and reversed-phase high-performance liquid chromatography (RP HPLC). Insulin receptor (IR-A and IR-B) binding kinetics assay, insulin receptor phosphorylation assay and metabolic cell-based assays (glucose uptake, insulin-induced lipogenesis, inhibition of stimulated lipolysis) were performed to characterize the functional properties and biological activity of the insulin products.

**Results and discussion.** GP40011 was found to have high similarity to the reference product Humalog® in terms of the primary protein structure, higher-order structures and impurity profile based on the results of the evaluation of the physicochemical properties. Functional characterization studies showed that GP40011 and Humalog® had identical insulin receptor binding kinetics to IR-A, IR-B and comparable biological activity.

**Conclusion.** The study results demonstrated full analytical similarity of RinLis® to Humalog®. The study made a significant contribution to the scientific substantiation of the equivalence of the biosimilar RinLis® and the reference product Humalog®, thereby providing a reliable basis for successful approval and subsequent clinical use.

**Keywords:** insulin lispro, biosimilar, bioanalogue, biosimilarity, analytical comparability, characterization, physicochemical properties, biological activity

**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.** Sona S. Arutyunyan, Ilya A. Lugovik – writing and editing of the manuscript, literature review. Anna V. Babina – development of the research program, data analysis, interpretation of results. Valeriya B. Saparova, Tatyana A. Selmenskikh, Pavel G. Zaikin, Tatyana E. Eltysheva – conducting the experiments. Igor E. Makarenko – editing and critical revision of the manuscript. Roman V. Drai – approval of the final version of the manuscript for publication.

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

**For citation:** Arutyunyan S. S., Drai R. V., Lugovik I. A., Babina A. V., Saparova V. B., Selmenskikh T. A., Zaikin P. G., Eltysheva T. E., Makarenko I. E. Physicochemical and biological characterization of the medicinal product RinLis®. *Drug development & registration*. 2026;15(2):190–205. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2103>

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет по настоящее время остается глобальной проблемой системы здравоохранения, приобретающей черты кризиса ввиду стремительного роста заболеваемости. Согласно данным Международной диабетической федерации, в 2021 году количество людей с диабетом в возрасте 20–79 лет в мире достигло 537 млн, при этом 81 % людей, страдающих диабетом, проживают в странах с низким и средним уровнем дохода (СНСД)<sup>1</sup>. К 2045–2050 годам, по различным оценкам, ожидается, что диабет затронет 783 млн – 1,31 млрд человек [1]. Проведенное исследование по оценке охвата лечением диабета в 55 СНСД показало, что только 4,6 % людей с диабетом (то есть примерно 1 из 20), проживающих в СНСД, сообщили, что их потребности в рекомендуемом лечении были полностью удовлетворены. При этом в отношении потребности в гипогликемических лекарственных препаратах (включая препараты инсулина) было показано, что только 50,5 % людей с диабетом располагают доступом к данному лечению [2]. В глобальном масштабе можно сказать, что каждый второй человек, нуждающийся в инсулине, не имеет доступа к нему.

Доступ к инсулину затрудняют различные глобальные барьеры, но одним из наиболее существенных вопросов является ценообразование. На ми-

ровом рынке инсулина доминируют три транснациональные компании, которые создают монополию в отношении ценообразования на продукцию [3]. Высокая стоимость оригинальных препаратов инсулина ограничивает доступность лечения среди пациентов. Утрата патентной защиты компаний-оригинаторов на оригинальные препараты позволяет другим компаниям производить биоаналогичные препараты (биоаналоги, биосимиляры). Достоинством биоаналогов является не только их сниженная стоимость и сокращенные сроки разработки и одобрения по сравнению с оригинаторами [4], но и то, что биоаналоги создают конкурентную среду, стимулирующую производителей-оригинаторов снижать цены на свои оригинальные препараты [5].

Императивом фармацевтической разработки биосимиляров является проведение комплексных исследований сопоставимости с референтным препаратом. Этот процесс включает всестороннюю сравнительную характеристику молекулы по физико-химическим и биологическим свойствам, что позволяет доказать ее высокую степень подобия оригинальному препарату, а также выявить любые возможные различия с целью прогнозирования их потенциального влияния на безопасность и эффективность для человека.

Разработка программы исследований сопоставимости, а именно выбор атрибутов и ортогональных методов для изучения структуры и функциональной состоятельности молекулы инсулина, должна быть основана на глубоком понимании структуры и свойств

<sup>1</sup> International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, 10th edn. Brussels, Belgium: 2021. Available at: [https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF\\_Atlas\\_10th\\_Edition\\_2021.pdf](https://diabetesatlas.org/idfawp/resource-files/2021/07/IDF_Atlas_10th_Edition_2021.pdf). Accessed: 02.2025.

молекулы, а также на основании последних научных знаний.

В данной работе представлены результаты исследования сопоставимости лекарственного препарата РинЛиз® (МНН: инсулин лизпро) в сравнении с оригинальным препаратом Хумалог®. Инсулин лизпро – это аналог человеческого инсулина, в котором аминокислотные остатки лизин и пролин в положении 28 и 29 В-цепи соответственно представлены в обратном порядке. Благодаря данной модификации инсулин лизпро характеризуется слабой тенденцией к самоассоциации молекул, что обуславливает повышенную абсорбцию из места инъекции и более короткую продолжительность действия по сравнению с человеческим инсулином [6].

Физико-химическая характеристика препаратов включала изучение структуры инсулина на нескольких уровнях: исследования первичной структуры белка, а также вторичной, третичной и структур более высокого порядка. Функциональная характеристика включала оценку кинетики связывания с рецепторами инсулина (IR-A и IR-B), а также оценку биологической активности. Для препаратов инсулина биологическая активность является интегральным показателем, характеризующим результат взаимодействия инсулина, обладающего определенными фармацевтическими характеристиками, с инсулиновыми рецепторами. После активации рецептор инсулина запускает масштабный каскад биохимических реакций, заключающийся в фосфорилировании множества внутриклеточных белков. Результатом этих биохимических реакций в том числе является усиление транспорта глюкозы через клеточную мембрану и ее утилизации тканями, а также влияние на липидный обмен [7]. Исходя из этих биологических предпосылок, согласно решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»), биологическую активность требуется сравнить на двух уровнях: аутофосфорилирования рецептора и метаболической активности. При этом приводятся следующие методики изучения метаболической активности: «методы определения образования гликогена, липогенеза, ингибирования стимулированного липолиза, а также транспорта глюкозы» (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»). Свидетельством научной значимости и общепризнанности использованных физико-химических методик (таблица 1) и биологических тестов на конкретных клеточных культурах (таблица 2) могут служить многочисленные публикации в научной литературе [8–15]. Дополнительным подтверждением информативности и релевантности методов, выбранных для оценки сопоставимости препаратов, является тот факт,

что аналогичные методологические подходы применялись в программах аналитической сопоставимости биоподобных продуктов инсулина, успешно зарегистрированных в Европейском союзе за последние 10 лет (таблицы 1 и 2)<sup>1,2,3,4</sup> [13, 16, 17].

## Цель

Проведение физико-химической и биологической характеристики препарата РинЛиз® (GP40011) в сравнении с оригинальным препаратом Хумалог® для установления их сопоставимости в рамках оценки биоаналогичности.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Исследуемые объекты

Для сравнительного анализа были использованы в общей сложности 9 серий биоподобного препарата РинЛиз® (GP40011) (ООО «ГЕРОФАРМ», Россия) и 7 серий оригинального препарата Хумалог® (Lilly France, Франция). Все объекты испытания были представлены в лекарственной форме «раствор для внутривенного и подкожного введения, 100 МЕ/мл». Разработка препарата GP40011 была проведена в R&D-центре ООО «ГЕРОФАРМ» (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия). Референтный препарат Хумалог® был приобретен у местных дистрибьюторов.

### Определение молекулярной массы и анализ первичной структуры

Молекулярную массу нативного белка инсулина и его цепей определяли без проведения протеолиза с помощью MALDI-TOF/TOF-масс-спектрометра Ult-

<sup>1</sup> Insulin lispro Sanofi (INN: insulin lispro). European Public Assessment Report, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Procedure No: EMEA/H/C/004303/0000. EMA Document No: EMA/351195/2017. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/insulin-lispro-sanofi-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/insulin-lispro-sanofi-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed: 02.2025.

<sup>2</sup> Insulin aspart Sanofi (INN: insulin aspart). European Public Assessment Report, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Procedure No. EMEA/H/C/005033/0000. Document No: EMA/CHMP/269410/2020. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/insulin-aspart-sanofi-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/insulin-aspart-sanofi-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed: 02.2025.

<sup>3</sup> Kixelle (INN: insulin aspart). European Public Assessment Report, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Procedure No: EMEA/H/C/004965/0000. Document No: EMA/64677/2021. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kixelle-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/kixelle-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed: 02.2025.

<sup>4</sup> Semglee (INN: insulin glargine). European Public Assessment Report, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Procedure No. EMEA/H/C/004280/0000. Document No: EMA/119474/2018. Available at: [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/semglee-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/semglee-epar-public-assessment-report_en.pdf). Accessed: 02.2025.

**Таблица 1.** Пересечение физико-химических методов, использованных в исследованиях аналитической сопоставимости GP40011 и инсулиновых продуктов, зарегистрированных в Европейском союзе

**Table 1.** Intersection of physicochemical methods used in analytical comparability studies of GP40011 and insulin products approved in the European Union

Атрибут Attribute	Метод Method	Продукты Products					
		Инсулин лизпро Insulin lispro		Инсулин аспарт Insulin aspart			Инсулин гларгин Insulin glargine
		GP40011	Insulin lispro Sanofi®	Insulin aspart Sanofi®	Kirsty®	BGL-ASP [16]	Semglee® [17]
<b>Первичная структура Primary structure</b>							
Масса нативного белка Intact mass	МАЛДИ-МС / ВЭЖХ-МС MALDI-MS/ HPLC-MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Масса А-цепи Mass of A chain	МАЛДИ-МС / ВЭЖХ-МС MALDI-MS/ HPLC-MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Масса В-цепи Mass of B chain	МАЛДИ-МС / ВЭЖХ-МС MALDI-MS/ HPLC-MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	МАЛДИ-МС / Пептидное картирование MALDI-MS / Peptide mapping	✓	-	-	✓	✓	✓
<b>Вторичная структура и структуры более высокого порядка Secondary and higher order structure</b>							
Дисульфидные мостики Disulfide linkages	Пептидное картирование Peptide mapping	✓	-	✓	✓	✓	✓
Свободные сульфгидрильные группы Free sulfhydryl groups	Метод Элмана Ellman's method	✓	-	-	-	-	-
Изоэлектрическая точка Isoelectric point	Капиллярное изоэлектрофокусирование Capillary isoelectric focusing	✓	✓	-	✓	-	✓
Вторичная структура Secondary structure	Круговой дихроизм Circular dichroism	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Квантовый выход флуоресценции Fluorescence quantum yield	Спектрофотометрия Spectrophotometry	✓	✓	-	✓	✓	✓
Пик распределения частиц Peak of the particle size distribution	Динамическое рассеяние света Dynamic light scattering	✓	-	✓	✓	-	-

rafleXtreme (Bruker, Германия). Для получения отдельных масс А-цепи и В-цепи и подтверждения их аминокислотных последовательностей по спектрам фрагментации проводили восстановление дисульфидных связей дитиотреитолом (Promega Corporation, США). Спектры получали в диапазоне масс 500–6500 m/z (отраженный режим). Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки составляла 20 ppm (0,002 %). Для обработки масс-спектров использовали программное обеспечение FlexAnalysis 3.3 (Bruker

Daltonik GmbH, Германия). При помощи программы BioTools 3.2 (Bruker Daltonik GmbH, Германия) проводили идентификацию в локальной базе данных.

### Пептидное картирование

Пептидное картирование проводили для подтверждения аминокислотной последовательности и локализации положения дисульфидных связей. Для проведения пептидного картирования белок под-

**Таблица 2.** Пересечение биологических методов, использованных в исследованиях аналитической сопоставимости GP40011 и инсулиновых продуктов, зарегистрированных в Европейском союзе

**Table 2.** Intersection of biological methods used in analytical comparability studies of GP40011 and insulin products approved in the European Union

Биологический тест Biological activity study	Клеточная культура Cell line	Продукты Products					
		GP40011	Insulin lispro Eli Lilly [13]	Insulin aspart Sanofi®	Kirsty®	Semglee®	Abasaglar® [15]
Инсулинзависимый захват глюкозы Insulin dependent glucose uptake	L6	✓	✓	✓	–	–	–
Аутофосфорилирование инсулинового рецептора Autophosphorylation of insulin receptor	L6	✓	✓	–	–	–	–
Инсулининдуцированный липогенез Insulin induced lipogenesis	3T3-L1	✓	–	–	✓	✓	✓
Ингибирование стимулированного липолиза Inhibition of stimulated lipolysis	3T3-L1	✓	–	–	✓	✓	–

вергали ферментативному гидролизу эндопротеиназой Glu-C (протеаза V8) (Sigma-Aldrich, США) в условиях, исключающих дисульфидный обмен (кислая среда), затем проводили анализ в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС) с ионизацией электрораспылением. Для восстановления дисульфидных связей использовали дитиотреитол (Promega, США). Анализ ВЭЖХ-МС выполняли с помощью масс-спектрометра с ионной ловушкой Varian 500-MS IT, совмещенного с хроматографом Waters ACQUITY UPLC. Хроматографическое разделение проводили в градиентной системе вода – ацетонитрил с добавлением муравьиной кислоты (А: 0,041%-я муравьиная кислота в воде; В: 0,050%-я муравьиная кислота в ацетонитриле) на колонке Waters ACQUITY VEN300 C18, 2,1 × 50 мм, размер частиц 1,7 мкм, со скоростью потока 0,3 мл/мин. Масс-спектры получали в диапазоне масс 200–2000 m/z.

### Определение свободных сульфгидрильных групп

Определение количества свободных сульфгидрильных (тиоловых) групп для установления наличия неполных дисульфидных связей было проведено методом Элмана. К исследуемым образцам добавляли 0,2 мМ раствор реактива Элмана (5,5'-дитиобис-2-нитробензойная кислота) (Sigma-Aldrich, США), перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 15 мин. После инкубации измеряли оптическую плотность образцов с помощью анализатора Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific Oy, Финляндия) при длине волны 405 нм.

### Капиллярное изоэлектрофокусирование

Изоэлектрическую точку (pI) определяли методом капиллярного изоэлектрофокусирования с использованием системы капиллярного электрофореза Beckman Coulter PA 800 Plus, геля eCAP cIEF Gel, нейтрального капилляра, пептидных маркеров pI производителя Beckman Coulter, Inc., США. Спектрофотометрическое детектирование проводили при длине волны 280 нм.

### Анализ вторичной структуры методом кругового дихроизма

Вторичную структуру белка определяли по спектрам кругового дихроизма (КД) с помощью спектрометра Chirascan CD (Applied Photophysics Ltd., Великобритания). Перед проведением анализа препараты инсулина были обессолены. Измерение спектров КД проводили в кварцевой кювете (0,1 мм) в диапазоне длин волн 178–260 нм с шагом 0,5 нм и спектральной шириной щели 1 нм. Запись спектров КД проводили в трех повторах, обработку полученных данных выполняли с использованием программ Origin 8.1 и MS Excel 2016 с вычислением молярного коэффициента кругового дихроизма. Для количественной оценки элементов вторичной структуры в белке полученные графики молярного коэффициента кругового дихроизма были обработаны на информационном портале Dichroweb<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Dichroweb. Available at: <http://dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/html/home.shtml> Accessed: 27.05.2025.

### Анализ третичной структуры методом флуоресцентной спектроскопии

Для анализа третичной структуры определяли квантовый выход флуоресценции с использованием спектрофлуориметра FluoroMax Plus (HORIBA Scientific, Франция – Япония) и спектрофотометра Carry 300 Bio (Varian Australia Pty Ltd., Австралия) при ширине спектра 250–300 нм. В качестве стандартного раствора использовали раствор тирозина.

### Анализ четвертичной структуры методом динамического рассеяния света (DLS)

Для определения полидисперсности и гидродинамических параметров образцов использовали метод динамического рассеяния света. Измерения проводили с помощью лазерного анализатора размера частиц Zetasizer Nano (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания). Интенсивность рассеянного света регистрировали под углом 173° при температуре 25 °С. Анализ результатов проводили с помощью программного обеспечения Malvern Software 7.11 (Malvern Panalytical Ltd., Великобритания).

### Определение примесей

Определение высокомолекулярных белков (ВМБ), то есть примесей с молекулярной массой, превышающей молекулярную массу инсулина, проводили методом эксклюзионной жидкостной хроматографии. Разделение проводили с помощью колонки Insulin HMWP (Waters Corporation, США) (30 × 7,8 мм, размер частиц 10 мкм, диаметр пор 125 Å) при температуре 40 °С со скоростью потока 0,5 мл/мин в течение 35 мин. Для идентификации А21-дезамидоинсулина лизпро и других родственных примесей был выбран метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ-ВЭЖХ). Разделение проводили на колонке SunFire C18 (Waters Corporation, США) (150 × 4,6 мм, размер частиц 3,5 мкм) при температуре 40 °С со скоростью потока 0,9 мл/мин в течение 60 мин. УФ-детектирование проводили на жидкостном хроматографе LC-30 Nexera (Shimadzu Corporation, Япония), спектры регистрировали при длине волны 276 нм (ВМБ) и 214 нм (А21-дезамидоинсулин лизпро и другие примеси).

### Биологическая активность *in vitro*

Оценку кинетики связывания с рецепторами IR-A и IR-B выполняли с помощью метода безмаркерной интерферометрии в биослое с использованием 96-луночного планшетного интерферометра Octet RED96 (Pall ForteBio, США). Для проведения анализа использовали биосенсоры HIS1K (Anti-Penta-HIS) (Sartorius), гидратированные в течение 10 мин в фосфатно-солевом буфере с 0,05%-м твин-20 (PBST). Растворы инсулиновых рецепторов IR-A и IR-B готовили в кон-

центрации 25 мкг/мл. Для оценки связывания инсулина лизпро с IR-A использовали концентрации инсулина 2,5, 5, 10, 20, 40 нМ. Для оценки связывания инсулина лизпро с IR-B использовали концентрации инсулина 2,5, 5, 10, 30, 70 нМ. Ассоциация инсулинового рецептора с образцами препаратов происходила в течение 50 с, за ней следовала диссоциация в течение 90 с. Анализ данных проводили с помощью программного обеспечения Octet System Data Acquisition с использованием модели взаимодействия 1:1. Аффинность связывания определялась по константе скорости ассоциации ( $k_a$ ), константе скорости диссоциации ( $k_d$ ) и равновесной константе диссоциации ( $K_D$ ), выраженной как отношение  $k_d/k_a$ .

Исследование аутофосфорилирования инсулинового рецептора проводили на клеточной культуре дифференцированных в миотубулы миоцитов крысы L6J1 (Институт цитологии РАН). Уровень активации (аутофосфорилирования) инсулинового рецептора оценивали в лизатах дифференцированных клеток L6J1, стимулированных различными концентрациями препаратов (10, 25, 50, 100, 300 нМ). После лизирования адгезионных культур полученные лизаты центрифугировали при +4 °С 20 мин при 13 500g. Концентрацию белка в супернатанте определяли с помощью набора DC Protein Assay Kit II (Bio-Rad, США). Разделение белков по массе проводили в полиакриламидном геле по Лэммли, переносили на ПВДФ-мембрану и инкубировали с первичными и вторичными антителами. Для контроля равномерности загрузки дорожек геля и переноса на мембрану использовали уровень белка актина в каждом лизате. Для визуализации использовали хемотропный набор Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific, США). Количественную оценку интенсивности сигнала проводили с помощью программного обеспечения ImageJ 1.47v.

Метаболический тест «Инсулининдуцированный захват глюкозы» проводили на клеточной линии дифференцированных миоцитов крысы L6J1 (Институт цитологии РАН). Оценку индуцированного инсулином поглощения глюкозы осуществляли при добавлении исследуемых образцов в концентрациях 2, 10, 25, 50, 100, 400, 800, 1600 нМ. Подробно методика теста была описана ранее [18].

Метаболический тест «Инсулининдуцированный липогенез» проводили на клеточной линии фибробластов мыши 3T3-L1 (ATCC), дифференцированных в адипоциты. Клетки 3T3-L1 рассевали в 96-луночные планшеты с концентрацией 2,5 тысячи/луноку в преадипоцитной питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л и 10 % фетальной бычьей сыворотки (FBS) и инкубировали в течение 48 ч. На 3-й день начинали дифференцировку: преадипоцитную культуральную среду заменяли на среду для дифференцировки, состоящую из среды DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10 % FBS,

1,0 мкМ дексаметазона, 0,05 мМ 3-изобутил-1-метилксантина (IBMX), 1,0 мкг/мл инсулина. Стимуляцию липогенеза проводили на 5-й день с использованием растворов исследуемых препаратов инсулина в питательной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л и 10 % FBS. Разведения исследуемых образцов готовили в соответствующей среде и вносили в лунки планшета в виде 10-кратных стоков. Концентрации образцов в лунках составили: 0,1, 1, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 нМ. Стимуляцию проводили 3 раза каждые 48–72 ч. Затем клетки фиксировали в 10 % растворе формальдегида при комнатной температуре в течение 1 ч. Для количественного определения уровня липогенеза внутриклеточные липиды окрашивали флуоресцентным красителем Nile Red (феноксазон). Клетки промывали раствором PBS, затем вносили раствор флуоресцентного красителя Nile Red в концентрации 1 мкг/мл, инкубировали 1 ч при комнатной температуре на планшетном шейкере при 300 rpm. Интенсивность флуоресценции измеряли на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Германия) при длине волны 550 нм, излучении 640 нм, усилении сигнала 2000.

*Метаболический тест «Ингибирование стимулированного липолиза»* проводили на клеточной линии фибробластов мыши 3T3-L1 (ATCC), дифференцированных в адипоциты. Спустя 48 ч после посева в 96-луночные планшеты клетки 3T3-L1 переводили на дифференцировочную среду DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л, 10 % FBS, 1,0 мкМ дексаметазона, 0,05 мМ IBMX, 1,0 мкг/мл инсулина (среда DM). Через 48 ч среду DM заменяли на среду для накопления липидов DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л в присутствии 10 % FBS + 1 мкг/мл инсулина (среда AMM) и каждые 48–72 ч ее обновляли (всего 3 раза). После последней смены среды AMM на следующий день клетки подвергали старвации в бессывороточной среде DMEM с содержанием глюкозы 4,5 г/л. Спустя 20–24 ч добавляли исследуемые препараты в лунки с концентрациями 0,01, 0,1, 0,5, 2, 10, 30 и 100 нМ, инкубировали 1 ч, затем добавляли индуктор липолиза в концентрации 20 нМ (изопротеренон) и инкубировали 3 ч. Детекцию свободных жирных кислот (FFA), которые высвобождаются в процессе гидролиза триглицеридов, осуществляли с помощью набора ZenBio (Lipolysis Assay KIT LIP-1-RB). Концентрацию FFA определяли по оптической плотности, измеренной при 540 нм, на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH GmbH, Германия).

### Статистическая обработка данных

Для оценки сопоставимости исследуемого препарата были использованы интервальные границы  $\pm 3SD$  от среднего значения референтного препарата. В тех случаях, где оценка диапазона, основанная на среднем  $\pm 3SD$ , была неприемлема (молекулярная

масса), был применен заранее определенный диапазон. Для результатов биологических тестов были построены кривые «доза – эффект» в логарифмических координатах и рассчитаны значения  $EC_{50}/IC_{50}$  с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Молекулярная масса и первичная структура

С помощью метода МАЛДИ были получены спектры для нативного белка и его А- и В-цепей. Во всех исследуемых образцах GP40011 и образцах референтного препарата присутствовали идентичные сигналы, соответствующие ожидаемым расчетным молекулярным массам нативного инсулина и его цепей (таблица 3).

Методом МАЛДИ были получены спектры фрагментации пептидов массой 2383,0 и 3428,7 Да, и было показано, что аминокислотная последовательность А-цепи и В-цепи полностью соответствует заявленной для всех образцов (рисунок 1).

Первичная структура была подтверждена методом пептидного картирования. При протеолизе в невосстанавливающих условиях происходило образование четырех ожидаемых пептидов с массой 416,2; 1115,6; 1376,5; 2967,2 Да. В невосстанавливающих условиях протеолиз белка затруднен за счет наличия дисульфидных сшивок и плотной упаковки молекулы инсулина. Кроме четырех ожидаемых пептидов, детектировались и частичные фрагменты, а определенная часть белка оставалась интактной (таблица 4). Стоит отметить, что наиболее легко проходит гидролиз по Glu21B, в то время как связь справа от Glu4A гидролизует с трудом из-за близкого расположения цистина, поэтому пептиды A1-A4 и A5-A17/B1-B13 присутствовали лишь в небольших количествах, а в основном наблюдался продукт частичного гидролиза A1-A17/B1-B13. Проведение протеолиза в восстанавливающих условиях приводило к образованию шести ожидаемых пептидов с массой 416,2; 512,1; 866,4; 1115,6; 1481,7; 1489,6 Да (таблица 4).

Полученные пептидные карты для образцов GP40011 были идентичны образцам препарата Хумалог®, о чем свидетельствует наложение хроматограмм после протеолиза инсулина (рисунок 2).

На основании полученного одинакового профиля пептидных фрагментов и данных по молекулярной массе и аминокислотной последовательности инсулина GP40011 и Хумалог® можно сделать вывод об идентичности их первичной структуры.

### Структуры высокого порядка

Определение количества и положения дисульфидных связей является одним из критических параметров структуры, стабильности и биологической активности инсулина. Определение дисульфидных связей

Таблица 3. Физико-химическая характеристика

Table 3. Physicochemical characterization

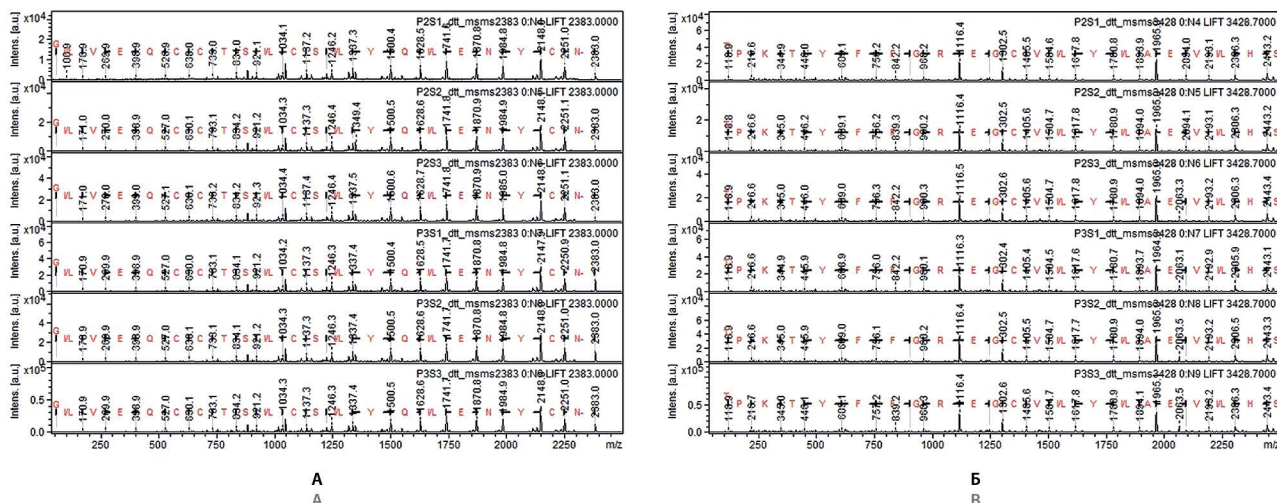
Метод Method	Атрибут Attribute	GP40011	Хумалог® Humalog®
<b>Молекулярная масса и первичная структура</b> Molecular mass and primary structure			
МАЛДИ MALDI	Масса нативного белка, Да Intact protein mass, Da	5804,6	5804,6
МАЛДИ MALDI	Масса А-цепи, Да A-chain mass, Da	2383,0	2383,0
МАЛДИ MALDI	Масса В-цепи, Да B-chain mass, Da	3428,7	3428,7
МАЛДИ, пептидное картирование MALDI, peptide mapping	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence	Подтверждена Confirmed	Подтверждена Confirmed
<b>Структуры более высокого порядка</b> Higher order structures			
Метод Элмана Ellman's method	Свободные сульфгидрильные группы, моль/моль инсулина Free sulfhydryl groups, mol/insulin mol	0,002–0,008	0,002–0,004
Капиллярное изоэлектро-фокусирование Capillary isoelectric focusing	Изоэлектрическая точка, рI Isoelectric point, pI	6,10–6,11	6,10–6,11
Круговой дихроизм Circular dichroism	α-спираль, % α-helix, %	37–41	40–42
	β-слой, % β-sheet, %	16–17	15–17
	β-повороты, % β-turn, %	15–16	14–16
	Неупорядоченная структура, % Random coil, %	28–30	27–28
Флуоресцентная спектрофотометрия Fluorescence spectrophotometry	Квантовый выход флуоресценции, Flu Fluorescence quantum yield, Flu	0,28–0,30	0,10–0,20
Динамическое рассеяние света Dynamic light scattering	Пик распределения частиц, нм Peak of the particle size distribution, nm	5,6–6,1	5,6–5,8
<b>Родственные примеси</b> Product-related impurities			
Эксклюзионная хроматография Size exclusion chromatography	Высокомолекулярные белки (ВМБ), % Higher molecular weight protein (HMWP), %	0,19–0,19	0,19–0,20
Обращенно-фазовая ВЭЖХ Reversed-phase HPLC	A21-дезамидоинсулин лизпро, % A21-desamido insulin lispro, %	0,18–0,29	0,21–0,27
Обращенно-фазовая ВЭЖХ Reversed-phase HPLC	Сумма примесей, % Total impurities, %	1,10–1,40	0,89–1,30

**Примечание.** Данные представлены как минимальное и максимальное значение. Во всех указанных методиках было использовано по три серии каждого препарата.

**Note.** The data are presented as minimum and maximum. Three batches of each product were used in all the mentioned methods.

в исследуемых образцах проводили путем сравнения набора протеолитических фрагментов инсулина, присутствующих в смеси после ферментативного гидролиза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. Наличие пептидов А18-А21/В14-В21 однозначно подтверждает точное положение дисульфидной связи между Cys20А и Cys19В, поскольку пептиды

А18-21 и В14-21 содержат только по одному остатку цистеина. Другая дисульфидная связь образована Cys7В и одним из остатков Cys6А, Cys7А, Cys11А, о чем говорит наличие пептидов А5-А17/В1-В13. Наличие дисульфидной связи внутри А-цепи косвенно подтверждается изменением массы пептидов при восстановлении участка А5-А17.



**Рисунок 1.** Спектры фрагментации А-цепи (А) и В-цепи (Б) для всех исследуемых образцов. Образцы сверху вниз: GP40011 (3 серии), Хумалог® (3 серии)

**Figure 1.** The fragmentation mass spectra of A-chain (A) and B-chain (B) for all tested samples. Samples (top to bottom): GP40011 (3 batches), Humalog® (3 batches)

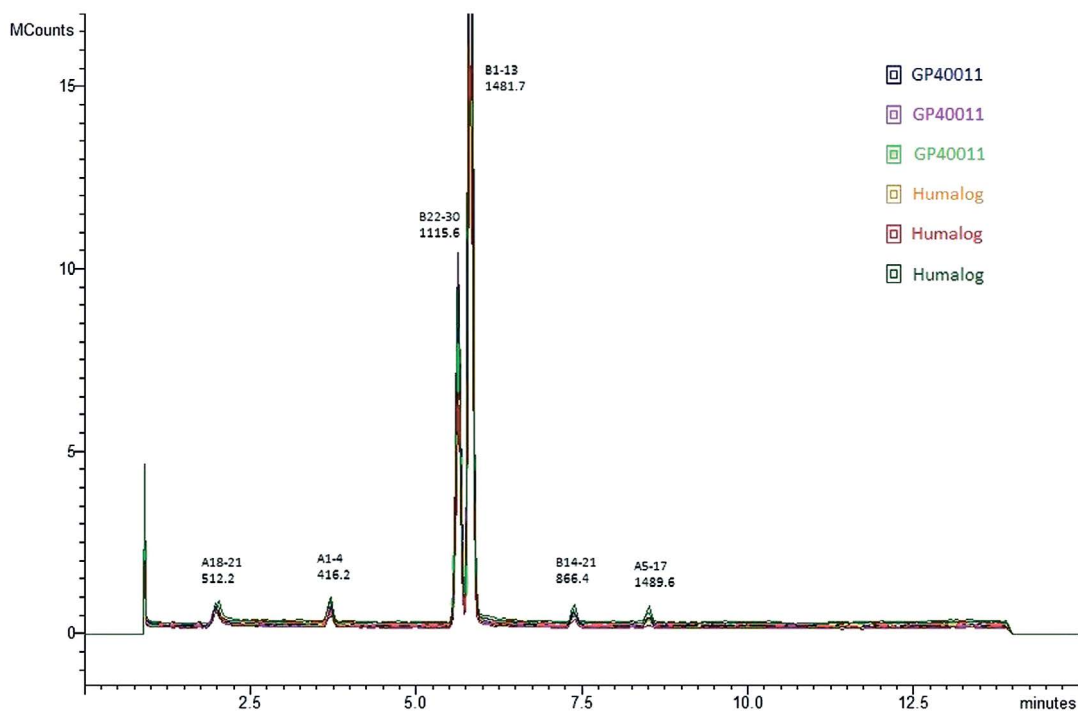
**Таблица 4.** Профиль пептидных фрагментов, регистрируемых после проведения гидролиза препаратов инсулина протеиназой Glu-C в невосстанавливающих и восстанавливающих условиях

**Table 4.** Profile of peptide fragments formed after hydrolysis of insulin products by proteinase Glu-C under non-reducing and reducing conditions

Время удержания, мин Retention time, min	Определяемая масса, Да Registered mass, Da	Теоретическая масса, Да Theoretical mass, Da	Положение Position	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence
<b>Целевые продукты гидролиза, невосстанавливающие условия</b> Target hydrolysis products, non-reducing conditions				
3.7	416.2	416.2	A1-A4	GIVE
5.6	1115.6	1115.6	B22-B30	RGFFYTKPT
6.8	1376.5	1376.6	A18-A21 / B14-A21	[A20-B19]
7.8	2967.2	2967.3	A5-A17 / B1-B13	[A7-B7, A6-A11]
<b>Целевые продукты гидролиза, восстанавливающие условия</b> Target hydrolysis products, reducing conditions				
2.0	512.1	512.2	A18-A21	NYCN
3.7	416.2	416.2	A1-A4	GIVE
5.6	1115.6	1115.6	B22-B30	RGFFYTKPT
5.8	1481.7	1481.7	B1-B13	FVNQHLCGSHLVE
7.4	866.4	866.4	B14-B21	ALYLVCGE
8.5	1489.6	1489.6	A5-A17	QCCTSICSLYQLE
<b>Продукты частичного гидролиза, невосстанавливающие условия</b> Partial hydrolysis products, non-reducing conditions				
7.8	2474.1	2474.2	A18-A21 / B14-B30	[A20-B19]
8.1	3365.8	3365.5	A1-17 / B1-B13	[A7-B7, A6-A11]
8.9	4726.8	4727.3	A1-A21 / B1-B21	[A7-B7, A6-A11, A20-B19]
9.2	5807.4	5807.6	A1-A21 / B1-B30	[A7-B7, A6-A11, A20-B19]
9.3	4708.8	4709.3	A1-A21 / B1-B21	[A7-B7, A6-A11, A20-B19]

**Примечание.** В квадратных скобках указано положение дисульфидных связей.

**Note.** The position of disulfide bonds is indicated in square brackets.



**Рисунок 2.** Хроматограммы продуктов протеолиза инсулина в восстанавливающих условиях (указаны расчетные массы)

**Figure 2.** Chromatograms of proteolysis products of insulin under reducing conditions (calculated masses indicated)

С помощью метода Элмана для GP40011 и Хумалога® было проведено определение количества свободных сульфгидрильных групп, которые могут являться показателем наличия свободного цистеина и, соответственно, признаком неполных дисульфидных связей, что критично для структуры инсулина и его стабильности. Количество свободных сульфгидрильных групп составило в среднем  $0,005 \pm 0,003$  и  $0,003 \pm 0,001$  моль/моль инсулина для препаратов GP40011 и Хумалог® соответственно. По результатам определения все серии исследуемых препаратов показали результат ниже предела обнаружения ( $0,075$  моль/моль), что свидетельствует об отсутствии неполных дисульфидных связей и о полной сопоставимости препаратов по данному показателю.

Анализ вторичной структуры проводили путем измерения спектров кругового дихроизма, которые затем подвергались математической обработке для расчета процентного содержания вторичных структурных элементов (таблица 3). Совпадение полученных спектров в дальней УФ-области 180–260 нм свидетельствует о неразличимой вторичной структуре белка в исследуемых образцах.

При анализе рассчитанного процентного содержания структурных элементов выявлено незначительное отличие в процентном содержании  $\alpha$ -спиралей в структуре молекул одной из серий GP40011 (37 % при диапазоне допустимых значений 37,9–44,8 %), что

повлияло также и на содержание неупорядоченных структур (30 % при диапазоне допустимых значений 25,6–29,1 %). С учетом погрешности методики (до 5 %) можно заключить, что вторичные структуры образцов GP40011 и Хумалог® сопоставимы.

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 характеристики молекул. Для анализа третичной структуры регистрировали спектры флуоресценции стандартного раствора тирозина и исследуемых образцов. В диапазоне длин волн 270–280 нм происходит максимум поглощения света, а соответственно, и максимум флуоресценции. Для минимизации ошибки метода возбуждение флуоресценции проводилось в диапазоне длин волн максимального поглощения света – 275, 280, 285 нм.

Обобщенные квантовые выходы исследуемых образцов были сопоставимы или больше квантового выхода чистого тирозина, что свидетельствует о не тушении флуоресценции и о поверхностном положении тирозина в молекуле. Значения флуоресценции для образцов GP40011 были в пределах рассчитанных допустимых значений (0–0,30 Flu), что позволяет

сделать вывод о сопоставимости третичной структуры белка исследованных препаратов.

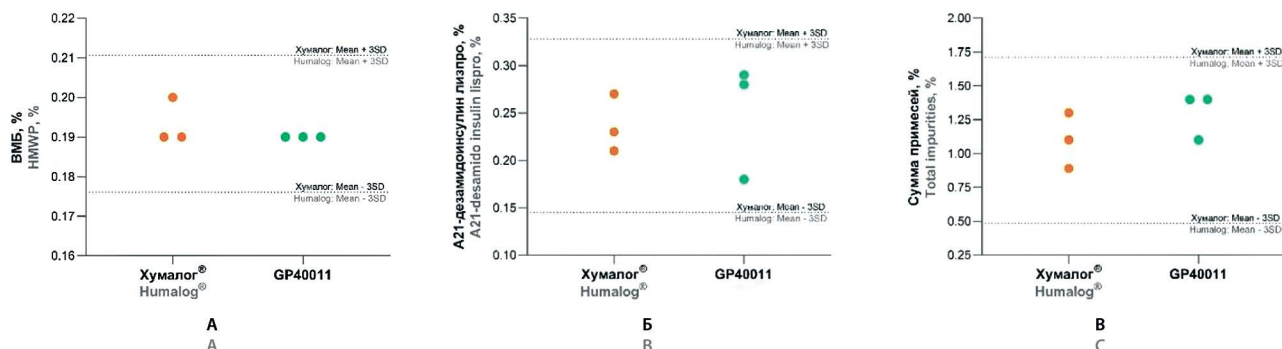
Показатели изоэлектрической точки составляли в среднем  $6,11 \pm 0,01$  pI для препаратов GP40011 и Хумалог® и были полностью сопоставимы между всеми исследованными сериями.

С помощью метода динамического рассеяния света (DLS) определяли полидисперсность и гидродинамические параметры образцов. Метод DLS часто используется в качестве мониторинга агрегации белковых молекул и является достаточно чувствительным даже к следовым количествам крупных агрегатов [19]. Для определения гидродинамических размеров препаратов были построены графики зависимости интенсивности рассеяния от гидродинамического диаметра частиц. Значения среднего гидродинамического диаметра для серий GP40011 находились в пределах допустимых значений для препарата Хумалог® (5,4–6,1 нм), что опосредованно свидетельствует о сопоставимости четвертичных структур белка исследуемых препаратов.

### Примеси

Согласно фармакопейным требованиям для генно-инженерных препаратов инсулина человека (ОФС.1.7.1.0017.18) определяют содержание высокомолекулярных белков, родственных соединений и сумму примесей, не учитывающую количество родственных примесей. Основной родственной примесью препаратов инсулина является 21-дезамидоинсулин, который образуется путем дезамидирования остатка аспарагина в 21-м положении А-цепи. Содержание ВМБ не должно превышать 1,0%, А21-дезамидоинсулина и других родственных белков – не более 2,0%.

По всем исследуемым параметрам образцы GP40011 укладывались в пределы допустимых значений (рисунок 3), что говорит о сопоставимости GP40011 и Хумалога® по содержанию примесей.



**Рисунок 3.** Анализ содержания примесей: высокомолекулярные белки (А), А21-дезамидоинсулин лизпро (Б) и сумма примесей (В)

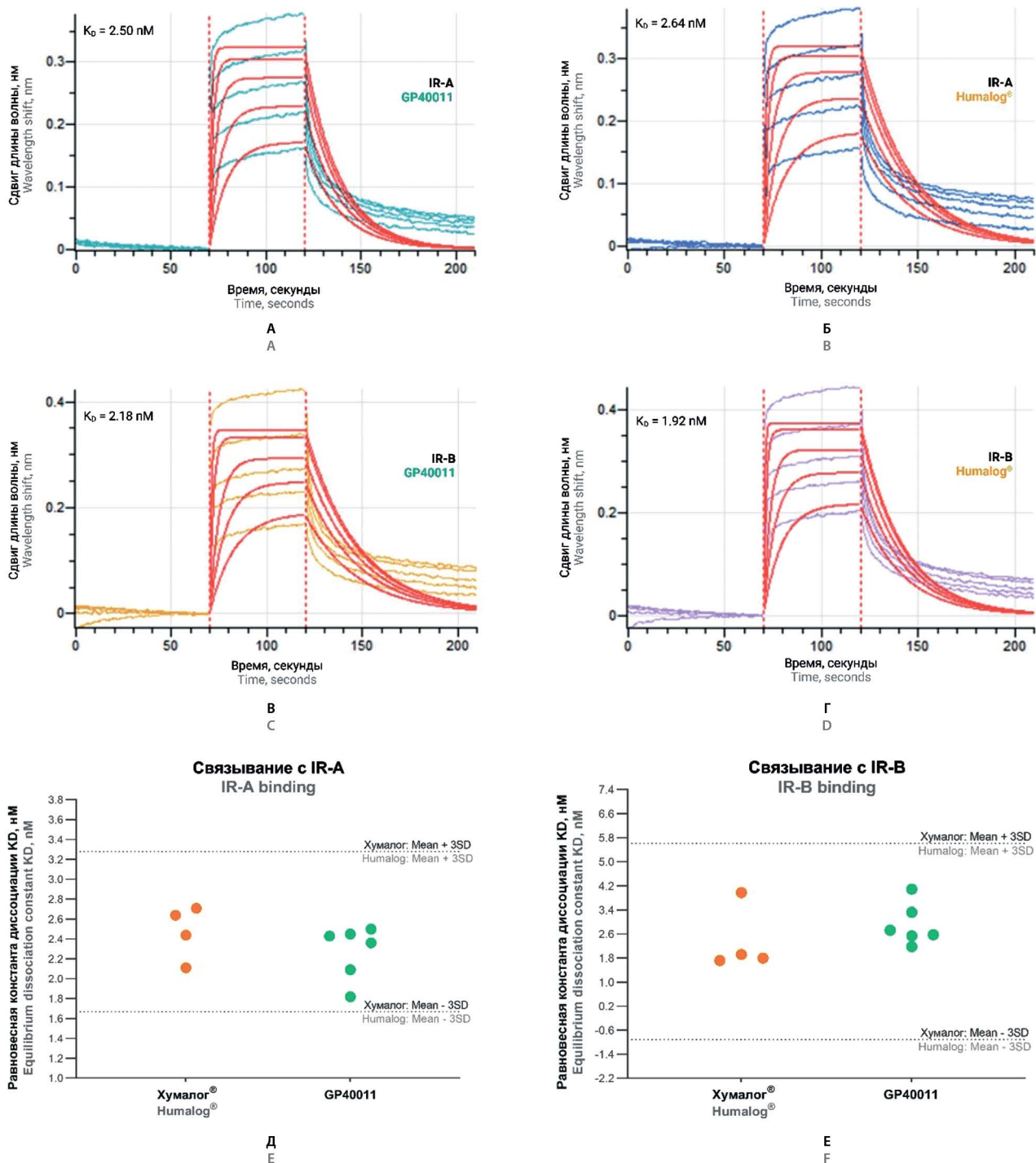
**Figure 3.** Analysis of impurities: high molecular weight proteins (А), А21-desamido insulin lispro (Б) and total of impurities (С)

### Биологическая характеристика

В соответствии с требованиями решения Совета ЕЭК от 03.11.2016 № 89 (решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 №89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза») и руководства ЕМА (European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues, 2015) к разработке биоаналогичных лекарственных препаратов, содержащих аналоги инсулина, в целях подтверждения сходства функциональных характеристик биоаналогичного и референтного лекарственного препарата необходимо подтвердить сопоставимость связывания с обоими рецепторами инсулина человека (IR-A и IR-B), а также сравнить биологическую активность на двух уровнях: аутофосфорилирования рецептора и метаболической активности. Для подтверждения сопоставимости требуется использовать по меньшей мере три различных метода оценки метаболической активности.

Для оценки сопоставимости кинетики лиганд-рецепторного взаимодействия исследуемых образцов были получены сенсограммы связывания исследуемых препаратов инсулина с инсулиновыми рецепторами IR-A и IR-B в 5 концентрациях (рисунок 4, А–Г). Рассчитанные значения равновесной константы диссоциации KD для исследуемых препаратов были весьма схожи, показатели всех серий препарата GP40011 укладывались в пределы допустимых значений (рисунок 4, Д–Е).

Репрезентативные кривые зависимости «доза – эффект» в тесте оценки активации (аутофосфорилирования) инсулинового рецептора представлены на рисунке 5, А. По результатам сравнительного анализа значений EC<sub>50</sub> было продемонстрировано, что исследуемые препараты обладают сопоставимой фармакологической активностью по данному параметру (рисунок 5, Б).

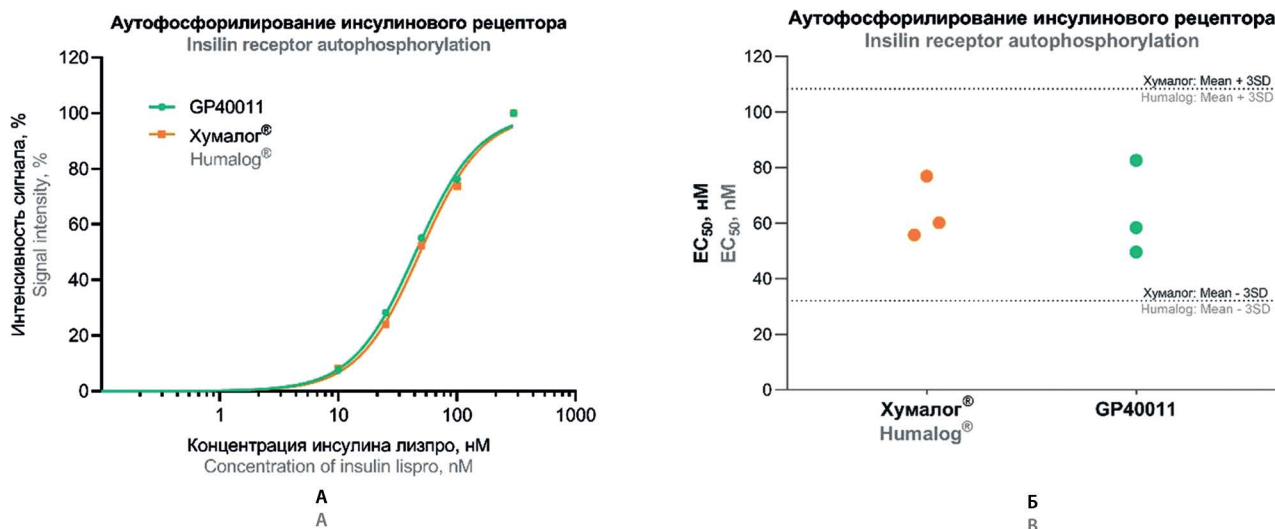


**Рисунок 4.** Репрезентативные сенсограммы связывания с IR-A (А – GP40011, Б – Хумалог®) и с IR-B (В – GP40011, Г – Хумалог®) и точечное распределение константы KD для IR-A (Д) и IR-B (Е)

**Figure 4.** Representative sensorgrams of IR-A binding (А – GP40011, В – Humalog®) and IR-B binding (С – GP40011, Д – Humalog®) and scatter plot distribution of the KD constant for IR-A (Е) and IR-B (F)

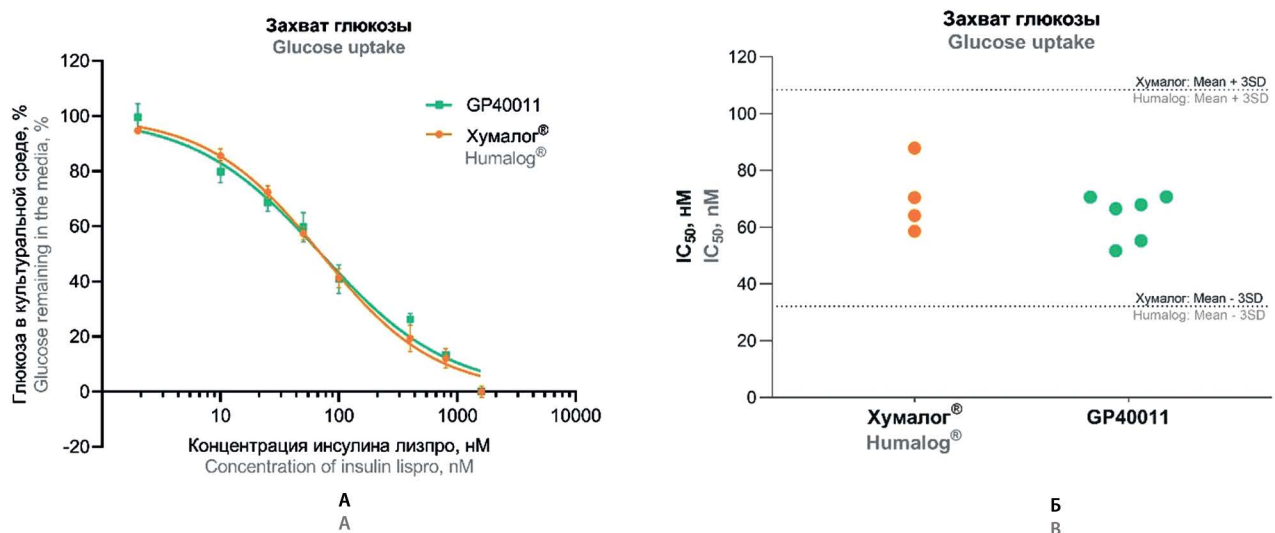
Метаболическую активность исследуемых образцов оценивали в трех клеточных тестах. Репрезентативные кривые «доза – эффект» для всех проведенных тестов представлены на рисунках 6, А; 7, А; 8, А. Средние значения  $IC_{50}/EC_{50}$  для препарата GP40011

в тестах «Захват глюкозы», «Инсулининдуцированный липогенез» и «Ингибирование стимулированного липолиза» составили 63,8 нМ, 11,6 нМ, 420,7 пМ соответственно, для препарата Хумалог® – 70,3 нМ, 14,6 нМ, 488,5 пМ. Показатели  $EC_{50}/IC_{50}$  для всех про-



**Рисунок 5.** Аутофосфорилирование инсулинового рецептора: репрезентативные кривые «доза – эффект», Mean (А), точечное распределение значений EC<sub>50</sub> (Б)

**Figure 5.** Autophosphorylation of the insulin receptor: representative dose – response curves, Mean (A), scatter plot distribution of EC<sub>50</sub> values (B)



**Рисунок 6.** Клеточный тест «Захват глюкозы»: репрезентативные кривые «доза – эффект», Mean ± SEM (А), точечное распределение значений IC<sub>50</sub> (Б)

**Figure 6.** Cell-Based Assay "Glucose uptake": representative dose – response curves, Mean ± SEM (A), scatter plot distribution of IC<sub>50</sub> values (B)

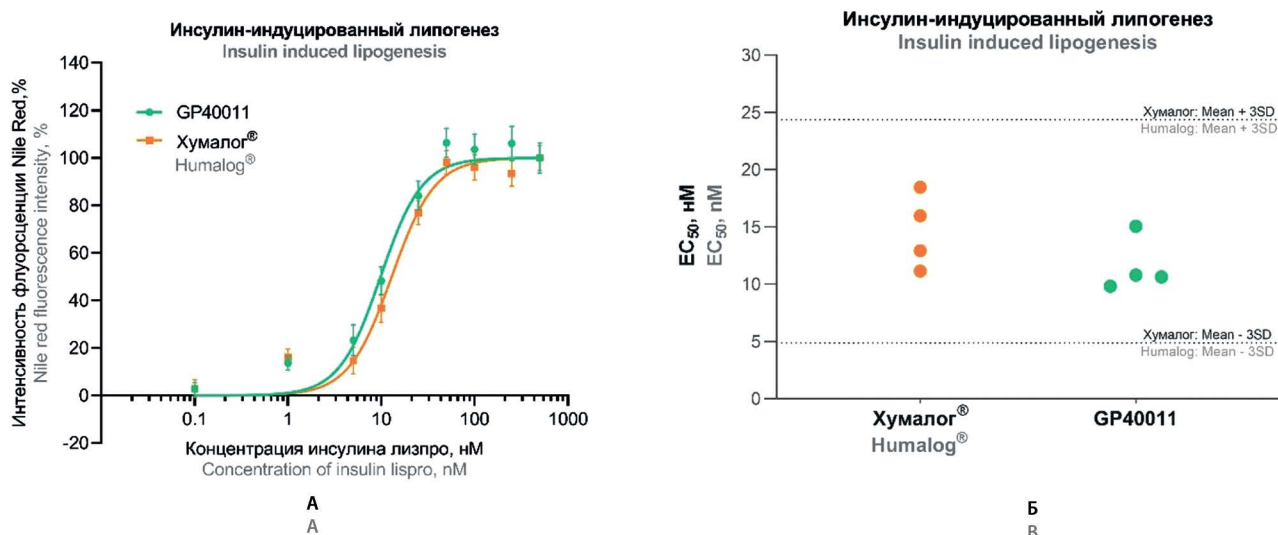
тестируемых серий GP40011 находились в пределах допустимых значений референтного препарата (рисунки 6, Б; 7, Б; 8, Б).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведено комплексное исследование сопоставимости, направленное на подтверждение высокой степени аналогичности препарата-биосимиляра Рин-Лиз® и референтного оригинального препарата Хума-

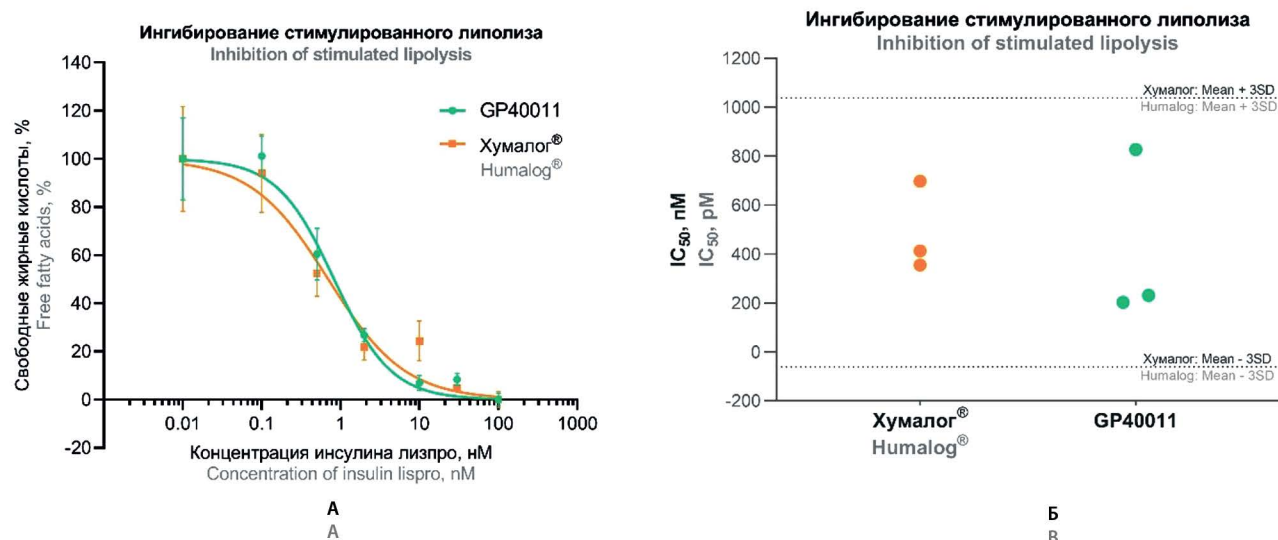
лог® с точки зрения физико-химических и функциональных характеристик.

Работа включала всестороннюю и детальную оценку критических характеристик белковой молекулы, включая анализ первичной структуры белка, структур более высокого порядка, профиля примесей. Также была проведена оценка функциональных свойств и биологической активности, учитывающая механизм действия инсулина. Исследования включа-



**Рисунок 7.** Клеточный тест «Инсулин-индуцированный липогенез»: репрезентативные кривые «доза – эффект», Mean ± SEM (А), точечное распределение значений EC<sub>50</sub> (Б)

**Figure 7.** Cell-based assay "Insulin-induced lipogenesis": representative dose – response curves, Mean ± SEM (A), scatter plot distribution of EC<sub>50</sub> values (B)



**Рисунок 8.** Клеточный тест «Ингибирование стимулированного липолиза»: репрезентативные кривые «доза – эффект», Mean ± SEM (А), точечное распределение значений EC<sub>50</sub> (Б)

**Figure 8.** Cell-based assay "Inhibition of stimulated lipolysis": representative dose – response curves, Mean ± SEM (A), scatter plot distribution of EC<sub>50</sub> values (B)

ли анализ кинетики связывания с инсулиновыми рецепторами, аутофосфорилирования инсулинового рецептора и оценку метаболической активности в нескольких ключевых метаболических клеточных тестах, что позволило достоверно подтвердить функциональную эквивалентность препаратов РинЛиз® и Хумалог®. Для обеспечения высокой точности, надежности и достоверности результатов, а также возможности выявления минимальных различий в структур-

ных и функциональных характеристиках инсулина были использованы ортогональные методики анализа, что позволило объективно оценить степень сопоставимости исследованных препаратов.

По результатам проведенного исследования была продемонстрирована полная сопоставимость препаратов РинЛиз® и Хумалог®. Проведенное исследование внесло значимый вклад в научное обоснование эквивалентности биосимиляра РинЛиз® и рефе-

рентного препарата Хумалог®, тем самым обеспечив надежную основу для успешной регистрации и последующего клинического применения.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- GBD 2021 Diabetes Collaborators. Global, regional, and national burden of diabetes from 1990 to 2021, with projections of prevalence to 2050: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet*. 2023;402(10397):203–234. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)01301-6.
- Flood D., Seiglie J. A., Dunn M., Tschida S., Theilmann M., Marcus M. E., Brian G., Norov B., Mayige M. T., Singh Gurung M., Aryal K. K., Labadarios D., Dorobantu M., Silver B. K., Bovet P., Jorgensen J. M. A., Guwatudde D., Houehanou C., Andall-Brereton G., Quesnel-Crooks S., Sturua L., Farzadfar F., Saeedi Moghaddam S., Atun R., Vollmer S., Bärnighausen T. W., Davies J. I., Wexler D. J., Geldsetzer P., Rohloff P., Ramírez-Zea M., Heisler M., Manne-Goehler J. The state of diabetes treatment coverage in 55 low-income and middle-income countries: a cross-sectional study of nationally representative, individual-level data in 680 102 adults. *The Lancet Healthy Longevity*. 2021;2(6): E340–E351. DOI: 10.1016/S2666-7568(21)00089-1.
- Beran D., Ewen M., Laing R. Constraints and challenges in access to insulin: a global perspective. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2016;4(3):275–285. DOI: 10.1016/S2213-8587(15)00521-5.
- 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 & Biotechnology*. 2019;46(9–10):1297–1311. DOI: 10.1007/s10295-019-02216-z.
- Morolla D., Beran D., Ewen M., Raviglione M., von Schoen-Angerer T. Role of biosimilar introduction on insulin glargine prices: a retrospective analysis in 28 European countries. *BMJ Open*. 2025;15(1):e090484. DOI: 10.1136/bmjopen-2024-090484.
- Koivisto V. A. The human insulin analogue insulin lispro. *Annals of Medicine*. 1998;30(3):260–266. DOI: 10.3109/07853899809005853.
- Posner B. I. Insulin Signalling: The Inside Story. *Canadian Journal of Diabetes*. 2017;41(1):108–113. DOI: 10.1016/j.cjcd.2016.07.002.
- Hsu J.-C., Lai B.-Y., Hsieh W.-L., Wang D.-Y., Shih D. Y.-C., Lo C.-F. Identification of recombinant insulin analogues by peptide mapping method. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2012;20(4):7. DOI: 10.6227/jfda.2012200427.
- Sklepari M., Rodger A., Reason A., Jamshidi S., Prokes I., Blindauer C. A. Biophysical characterization of a protein for structure comparison: methods for identifying insulin structural changes. *Analytical Methods*. 2016;8(41):7460–7471. DOI: 10.1039/C6AY01573E.
- Patil S. M., Keire D. A., Chen K. Comparison of NMR and Dynamic Light Scattering for Measuring Diffusion Coefficients of Formulated Insulin: Implications for Particle Size Distribution Measurements in Drug Products. *The AAPS Journal*. 2017;19(6):1760–1766. DOI: 10.1208/s12248-017-0127-z.
- 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. DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134. [Babina A. V., Drai R. V., Saparova V. B., Afanasyeva A. N., Zaikin P. G., Shmurak V. I., Eltysheva T. E., Makarenko I. E. Physicochemical and functional characterization of medicinal product Rinsulin® R. *Drug development & registration*. 2023;12(2):124–134. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2023-12-2-124-134.]
- Korn M., Wohlfart P., Gossas T., Kullman-Magnusson M., Niederhaus B., Dedio J., Tennagels N. Comparison of metabolic and mitogenic response in vitro of the rapid-acting insulin lispro product SAR342434, and US- and EU-approved Humalog®. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2019;109:104497. DOI: 10.1016/j.yrtph.2019.104497.
- Somwar R., Sweeney G., Ramlal T., Klip A. Stimulation of glucose and amino acid transport and activation of the insulin signaling pathways by insulin lispro in L6 skeletal muscle cells. *Clinical Therapeutics*. 1998;20(1):125–140. DOI: 10.1016/s0149-2918(98)80040-4.
- Owens R. A., Hansen R. J., Kahl S. D., Zhang C., Ruan X., Koester A., Li S., Qian H.-R., Farmen M. W., Michael M. D., Moyers J. S., Cutler G. B. Jr., Vick A., Beals J. M. In Vivo and In Vitro Characterization of Basal Insulin Peglispro: A Novel Insulin Analog. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2016;357(3):459–465. DOI: 10.1124/jpet.115.231035.
- Byrd R. A., Owens R. A., Blackbourne J. L., Coutant D. E., Farmen M. W., Michael M. D., Moyers J. S., Schultze A. E., Sievert M. K., Tripathi N. K., Vahle J. L. Nonclinical pharmacology and toxicology of the first biosimilar insulin glargine drug product (BASAGLAR®/ABASAGLAR®) approved in the European Union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2017;88:56–65. DOI: 10.1016/j.yrtph.2017.05.013.
- Ghade N. S., Thappa D. K., Lona J., Krishnan A. R., Sonar S. M. Comparative physicochemical and structural characterisation studies establish high biosimilarity between BGL-ASP and reference insulin aspart. *Scientific Reports*. 2024;14(1):4224. DOI: 10.1038/s41598-024-54819-x.
- Goyal P., Pai H. V., Kodali P., Vats B., Vajpai N., Annegowda S., Mane K., Mohan S., Saxena S., Veerabhadraia A. B., Palande M., Nair P. S., More D. C., Rao Karudumpa U., Jyothirmai K., Bhattacharya A., Almeida F., Khyade S. G., Gouda S., Ranayhossaini D. J., Reddy Moole P., Smith J. P., Barve A., Melarkode R., Ullanat R. Physicochemical and functional characterization of MYL-1501D, a proposed biosimilar to insulin glargine. *PLoS ONE*. 2021;16(6):e0253168. DOI: 10.1371/journal.pone.0253168.
- Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Макаренко И. Е., Драй Р. В., Сельменских Т. А. Опыт проведения валидации *in vitro* методики оценки инсулинозависимого захвата глюкозы. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023;13(1):77–88. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398. [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. DOI: 10.30895/1991-2919-2022-398.]
- Zhou C., Qi W., Lewis E. N., Carpenter J. F. Characterization of sizes of aggregates of insulin analogs and the conformations of the constituent protein molecules: a concomitant dynamic light scattering and Raman spectroscopy study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2016;105(2):551–558. DOI: 10.1016/j.xphs.2015.10.023.