

УДК 615.076; 615.272; 615.015.12

## СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С ИНСУЛИНОВЫМ РЕЦЕПТОРОМ РЯДА ОТЕЧЕСТВЕННЫХ СУБСТАНЦИЙ ИНСУЛИНА ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО И ЕГО АНАЛОГОВ МЕТОДОМ ПОВЕРХНОСТНОГО ПЛАЗМОННОГО РЕЗОНАНСА

И. Н. Уракова<sup>1\*</sup>, К. Л. Крышень<sup>2</sup>, О. Н. Пожарицкая<sup>1</sup>, М. В. Гаврилин<sup>3\*\*</sup>,  
А. Н. Шиков<sup>1</sup>, М. Н. Макарова<sup>2</sup>, В. Г. Макаров<sup>2</sup>

**Резюме.** Целью исследования явилось изучение взаимодействия субстанций инсулина отечественного производства, в том числе короткого и длительного действия, с инсулиновым рецептором в сравнении с субстанциями зарегистрированных препаратов методом поверхностного плазмонного резонанса. При сравнении характера кривых кинетики взаимодействия и рассчитанных равновесных констант диссоциации, определенных методом поверхностного плазмонного резонанса, статистически значимые различия между потенциально биоаналогичными субстанциями инсулина Росинсулин Р<sup>®</sup>, Росинсулин гларгин<sup>®</sup> и Росинсулин аспарт<sup>®</sup> (ООО «Завод Медсинтез») и соответствующими им субстанциями, входящими в состав зарегистрированных лекарственных препаратов, отсутствуют.

**Ключевые слова:** инсулин, инсулин гларгин, инсулин аспарт, инсулиновый рецептор, плазмонный резонанс, константа ассоциации.

### COMPARATIVE STUDY OF INTERACTION OF SOME DOMESTIC HUMAN INSULIN SUBSTANCES AND ITS ANALOGUES WITH INSULIN RECEPTOR BY METHOD OF SURFACE PLASMON RESONANCE

I. N. Urakova<sup>1\*</sup>, K. L. Kryshen<sup>2</sup>, O. N. Pozharitskaya<sup>1</sup>, M. V. Gavrilin<sup>3\*\*</sup>, A. N. Shikov<sup>1</sup>, M. N. Makarova<sup>2</sup>, V. G. Makarov<sup>2</sup>

**Abstract.** The high demand for insulin preparations by the population of the country makes it urgent to create domestic bioanalogues for the treatment of diabetes mellitus. The equivalency of the quality, safety and efficacy of the bioanalogue with the reference medicinal preparation registered in Russia is required by authority at the stage of preclinical studies. The aim of the study was to study the interaction of insulin substances of domestic production, including short and long-acting insulin with the insulin receptor in comparison with the reference substances registered in Russia by the surface plasmon resonance method. Comparing the interaction kinetics curves and calculated dissociation constants determined by the surface plasmon resonance method it was confirmed that there are no statistically significant differences between the potentially bioanalogical insulin substances Rosinsulin R, Rosinsulin Glargin and Rosinsulin Aspart (LLC "Zavod Medsintez", Russia) and the corresponding substances of registered in Russia medicines.

**Keywords:** insululin, insululin glargin, insulin aspart, insulin receptors, plasmon resonance, association constant. insululin, insululin glargin, insulin aspart, insulin receptors, plasmon resonance, association constant.

1 – ЗАО «Санкт-Петербургский институт фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

2 – АО «НПО «Дом Фармации», 188663, Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, г.п. Кузьмоловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

3 – ООО «Завод Медсинтез», 620014, Россия, г. Екатеринбург, ул. 8-е Марта, д. 90а

1 – St.-Petersburg Institute of Pharmacy, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

2 – RMC «HOUSE OF PHARMACY» JSC, 3, Zavodskaya str., Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region, 188663, Russia

3 – LLC «Zavod Medsintez», 90a, 8 Marta str., Ekaterinburg, 620014, Russia

\* адресат для переписки:

E-mail: info@doclinika.ru

Тел.: 8 (812) 603 24 32

\*\* адресат для переписки:

E-mail: farmnauka@mail.ru

Тел.: 8 (34370) 250 61

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день биотехнологические лекарственные препараты занимают от 10 до 20% мирового фармацевтического рынка. При этом большая часть из них производится зарубежными компаниями [1]. Оригинальные био-

технологические препараты чаще всего разрабатываются на основе аналогов эндогенных человеческих белков (инсулин, эритропоэтин, гормон роста и т.д.) с применением технологий синтеза рекомбинантной ДНК или методами генной инженерии [2]. Вследствие этого разработка оригинальных биотехнологических препаратов

характеризуется не только высокой наукоемкостью и существенной длительностью процесса, но и большими затратами, что находит отражение в их высокой стоимости. Возможным выходом для пациентов в сложившейся ситуации может быть использование биоаналогов, эффективность и безопасность которых соответствует оригинальным препаратам [3, 4].

Биоаналогичный (биоподобный) лекарственный препарат – это биологический лекарственный препарат, схожий по параметрам качества, эффективности и безопасности с референтным биологическим лекарственным препаратом в такой же лекарственной форме и имеющий идентичный способ введения [5].

Высокие доказательные результаты, отражающие сходство физико-химических и биологических свойств биоаналогичного препарата, позволяют уменьшить объем клинических и доклинических исследований [3]. В случае подтверждения идентичности механизма действия биоаналога по сравнению с референтным препаратом есть вероятность экстраполировать применение биоаналогичного препарата по всем показателям, описанным для референтного [6]. Таким образом, применяя поэтапный подход для доказательства биоаналогичности, можно уменьшать количество и стоимость исследований последующего этапа.

Высокая востребованность населением страны препаратов инсулина делает актуальным создание отечественных биоаналогов для лечения сахарного диабета. В Российской Федерации зарегистрированы и применяются генно-инженерные препараты человеческого инсулина различных производителей [7]. Отечественные производители пока не являются лидирующими в этом списке, но активно работают над поставленной задачей по импортозамещению.

Для подтверждения биоаналогичности генно-инженерных препаратов человеческого инсулина и аналогов инсулина человека необходимо доказать, что они по своему качеству, фармакокинетическому и фармакодинамическому профилям, безопасности и иммуногенности не отличаются от референтного препарата [8, 9]. На начальных этапах исследования должны быть изучены и подтверждены сходства физико-химических и биологических свойств препаратов инсулина и аналогов инсулина человека.

В рамках доклинических исследований биологической активности *in vitro* необходимо провести сравнительные исследования по связыванию с рецепторами [9] с использованием современных высокочувствительных методов. Одним из методов, рекомендованных руководством [9] для проведения сравнительного исследования связывания с рецепторами, является поверхностный плазмонный резонанс.

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) используется в биохимии более трех десятилетий. Образование межмолекулярных комплексов на границе

раздела двух сред сопровождается изменением показателя преломления одной из них, что приводит к модуляции параметров ППР, регистрируемой детектором [10]. Фактически ППР-детекторы являются рефрактометрами. Методы, основанные на ППР, привлекают исследователей прежде всего возможностью регистрации взаимодействий без использования меток, высокой чувствительностью, точностью и воспроизводимостью результатов. Процессы массопереноса между средой и сенсорной поверхностью в ходе образования и диссоциации межмолекулярных комплексов регистрируются в виде зависимости сигнала сенсора от времени (сенсограммы). На основании этих зависимостей можно рассчитать кинетические и равновесные константы реакции комплексообразования.

Технология ППР-детекции носит универсальный характер и позволяет регистрировать взаимодействия как низкомолекулярных объектов, так и макромолекул, их агрегатов, вирусов и даже целых клеток. Это обусловило интенсивное применение метода в фундаментальных исследованиях, медицине, экологическом мониторинге, контроле безопасности пищевых продуктов и других областях [11, 12]. В последнее время значительные усилия направлены на совершенствование ППР-техники – увеличение чувствительности детекции [13] и создание систем для одновременной регистрации многих взаимодействий [14].

Целью настоящего исследования являлось изучение взаимодействия субстанций инсулина с различной направленностью действия с инсулиновым рецептором [определение кинетических параметров связывания: констант ассоциации, констант диссоциации, равновесной константы диссоциации ( $K_a$ ,  $K_d$ ,  $K_D$ )] в сравнении с субстанциями зарегистрированных препаратов методом поверхностного плазмонного резонанса.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве исследуемых субстанций были взяты субстанции, произведенные на ООО «Завод Медсинтез», Россия:

Росинсулин P® (серия 011016P, срок годности 10.2019); Росинсулин аспарт P® (серия A040516, срок годности 05.2019) – аналог инсулина короткого действия; Росинсулин гларгин® (серия G011216, срок годности 12.2019) – аналог инсулина длительного действия.

Субстанции сравнения были выделены на ООО «Завод Медсинтез», Россия, из соответствующих референтных препаратов:

Хумулин® Регуляр (серия 010217XP, срок годности 02.2020; «Эли Лилли энд Компани», США);

НовоРапид® Пенфилл® (серия NN010217, срок годности 02.2020; «Эли Лилли энд Компани», США) – аналог инсулина короткого действия;

Лантус® СолоСтар® (серия ЛСС010217, срок годности 02.2020; «Санofi-Авентис Дойчланд ГмбХ», Германия) – аналог инсулина длительного действия.

### Оборудование

Измерения проводили на приборе SPR ProteOn XPR36™ (Bio-Rad Laboratories, США) с чипами к биосенсору GLM (Bio-Rad Laboratories, США).

### Метод

Метод поверхностного плазмонного резонанса включает в себя иммобилизацию одного из партнеров по взаимодействию (лиганда) на полимерном слое поверхности чипа биосенсора с последующим взаимодействием с другим партнером по взаимодействию (аналитом), проходящим над лигандом. В данном случае лиганд представляет собой конструкцию, содержащую аминокислотную группу, связанную с поверхностью чипа моноклональным антителом, и захваченный впоследствии рецептор eIR.

На пересечении канала аналита с каналом лиганда находится «пятно» взаимодействия, в котором происходит регистрация отклика поверхностного плазмонного резонанса во времени, что отражается на сенсограмме.

В качестве рабочего буфера использовали фосфатно-солевой раствор (137 мМ натрия хлорида, 2,7 мМ калия хлорида, 10 мМ двухосновного фосфата натрия и 2 мМ одноосновного фосфата калия), содержащий 0,005% (об./об.) твин-20 при pH 7,4, что соответствует физиологическим условиям взаимодействия инсулина и рецептора во время анализа. Температура образцов и чипа составляла 25 °С в течение всего эксперимента.

При изучении взаимодействия инсулина и рецептора растворы инсулина в концентрациях 156–2500 нМ пропускали одновременно в направлении каналов аналита при скорости потока 25 мкл/мин в течение 300 с для ассоциации. Диссоциацию изучали в течение 650 с. Перед повторной инъекцией аналита поверхность чипа регенерировалась путем пропускания раствора глицина гидрохлорида с pH 2,0 по каналам лигандов в течение 20 с (скорость потока – 25 мкл/мин) для снятия инсулина и рецептора с анти-тел. Эксперимент повторяли 3 раза.

Полученные данные обрабатывали при помощи программы ProteOn Manager™ software (Bio-Rad, США): константы ассоциации ( $k_a$ ), диссоциации ( $k_d$ ) и равновесные константы диссоциации ( $K_D$ ) были рассчитаны с применением модели анализа «two states». Степень различия между экспериментальными и теоретическими кривыми оценивают с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ). Достоверность сходства экспериментальных кривых с теоретическими при уровне значимости  $p < 0,05$  определяли путем сравнения полученных значений  $\chi^2$  с табличными.

Различия между  $K_D$  для исследуемой субстанции и соответствующей по продолжительности действия субстанции сравнения определяли в t-тесте Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$  с использованием программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Инсулиновый рецептор представляет собой мембранный белок, принадлежащий к классу трансмембранных рецепторов с тирозинкиназной активностью (RTK) [15]. Белок состоит из двух  $\alpha$ - и двух  $\beta$ -субъединиц. А-субъединицы связывают инсулин, тогда как С-концевая область  $\beta$ -субъединиц имеет тирозинкиназную каталитическую область, которая опосредует фосфорилирование тирозина [16]. Каждый инсулиновый рецептор (IR) имеет два сайта связывания для инсулина: один связывает инсулин с высокой аффинностью, второй – с низкой аффинностью. При более высоких концентрациях количество инсулина, связанного с рецептором, увеличивается, но в среднем аффинность уменьшается. Это явление упоминается как «отрицательная кооперативность» [17].

Инсулин в поджелудочной железе обычно присутствует в виде гексамера, который стабилизируется  $Zn^{2+}$ , но связывается с рецептором в виде мономера, не содержащего  $Zn^{2+}$  [18]. Инсулин имеет два участка, участвующих в связывании инсулиновым рецептором. Инсулиновые остатки, ответственные за димеризацию и гексамеризацию (олигомеризация инсулина) соответственно образуют два сайта, которые связывают рецептор [19]. В процессе связывания как инсулин, так и IR подвергаются конформационным изменениям [20], что приводит к иницированию сигнального каскада для поглощения глюкозы.

Ранние исследования 1970-х годов были посвящены связыванию инсулина с клеточными мембранами и сфокусированы на простом бимолекулярном взаимодействии: модель связывания с одним сайтом. В 80-х годах была предложена модель связывания двух сайтов, чему были получены значительные доказательства. Широко распространенная модель, принятая в настоящее время, основывается на гипотезах Шеффера (Schäffer) [20] и Де Мейтса и Виттакера (De Meyts and Whittaker's) [21].

Согласно модели Шеффера инсулин первоначально взаимодействует с двумя мономерами IR путем объединения с сайтами 1 и 2' (рисунок 1).

Эта модель дала объяснение возможности связывания второй молекулы инсулина с сайтом 2 и третьей – с сайтом 1'. Однако эта модель не дала убедительного объяснения явлению отрицательной кооперативности. Эта проблема была преодолена Де Мейтсом и Виттакером [21] благодаря их альтернативной теории высокоаффинного взаимодействия



**Рисунок 1.** Возможные сайты для связывания инсулина на инсулиновом рецепторе: 1, 2, 1' и 2' (сайты 1 и 2 – от одного мономера, а 1' и 2' – от другого)

между участками 1 и 2' в одном положении, вызывающего конформационные изменения, влияющие на соответствующие участки 1' и 2, где вторая молекула инсулина может связываться с более низким средством.

Современная модель связывания инсулина состоит в том, что каждая цепь в IR-димере содержит два инсулинсвязывающих кармана: участки 1 и 2 на одной цепи и участки 1' и 2' на другой. Связывание инсулина с одним из карманов описывается как «низкоаффинное связывание», тогда как сшивка участков 1 и 2' или 2 и 1' одной молекулой инсулина ответственна за «высокоаффинное связывание» [22–23]. В связи с этим для изучения кинетики взаимодействия инсулина и рецептора была выбрана модель «two state».

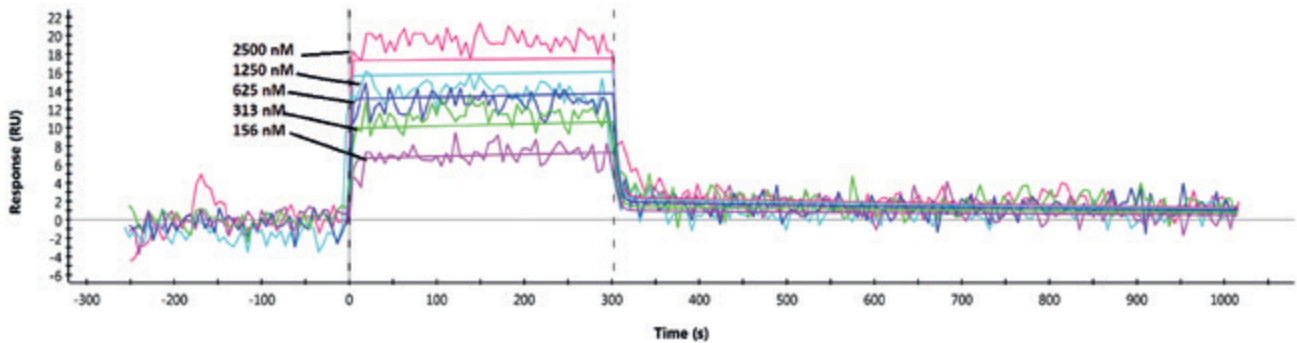
## СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА P® И ИНСУЛИНА ХУМУЛИН® РЕГУЛЯР

На рисунках 2 и 3 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр с рецептором.

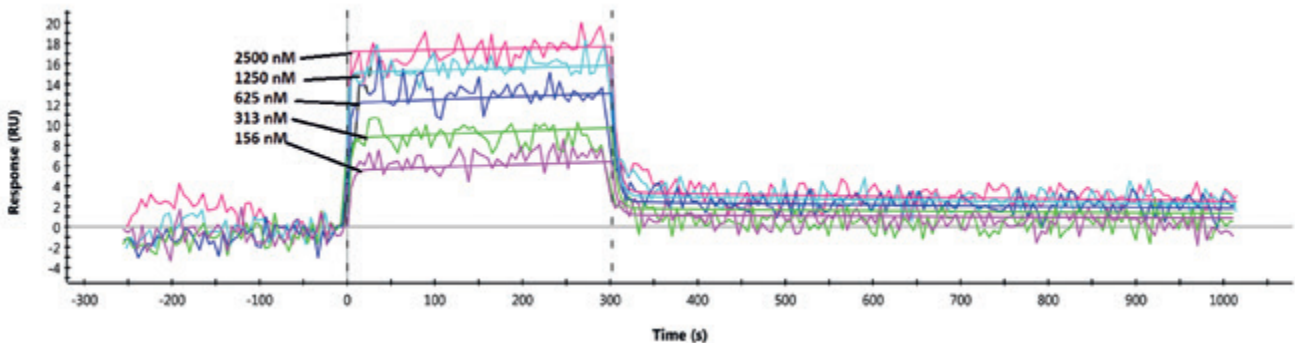
Характер взаимодействия субстанций с рецептором одинаков (рисунки 2 и 3): обе субстанции демонстрируют быструю ассоциацию с достижением равновесия уже в течение первых 20–30 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро. При диссоциации ответ (RU) полностью не возвращается к исходному уровню.

В таблицах 1 и 2 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр с рецептором.

Средние значения равновесных констант диссоциации для Росинсулина P® и инсулина Хумулин® Регуляр составляют:  $K_D = (5,79 \pm 1,31) \times 10^{-7}$  М и  $K_D = (4,37 \pm 0,41) \times 10^{-7}$  М соответственно. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.



**Рисунок 2.** Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина P® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором



**Рисунок 3.** Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина Хумулин® Регуляр (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором



Таблица 1.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина Р<sup>®</sup> с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}$ , 1/Мс	Константа диссоциации 1, $K_{d1}$ , 1/с	Равновесная константа диссоциации, $K_D$ , М	Константа ассоциации 2, $K_{a2}$ , 1/Мс	Константа диссоциации 2, $K_{d2}$ , 1/с	$\chi^2$
$8,03 \times 10^5$	$2,39 \times 10^{-1}$	$2,97 \times 10^{-7}$	$5,80 \times 10^{-4}$	$9,11 \times 10^{-4}$	1,75
$6,06 \times 10^5$	$2,51 \times 10^{-1}$	$4,14 \times 10^{-7}$	$5,62 \times 10^{-4}$	$5,92 \times 10^{-4}$	1,73
$2,81 \times 10^5$	$2,22 \times 10^{-1}$	$7,87 \times 10^{-7}$	$1,33 \times 10^{-3}$	$1,02 \times 10^{-3}$	2,33
$3,12 \times 10^5$	$2,55 \times 10^{-1}$	$8,18 \times 10^{-7}$	$1,56 \times 10^{-3}$	$8,34 \times 10^{-4}$	3,42

Таблица 2.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия инсулина Хумулин<sup>®</sup> Регуляр с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}$ , 1/Мс	Константа диссоциации 1, $K_{d1}$ , 1/с	Равновесная константа диссоциации, $K_D$ , М	Константа ассоциации 2, $K_{a2}$ , 1/Мс	Константа диссоциации 2, $K_{d2}$ , 1/с	$\chi^2$
$4,47 \times 10^5$	$1,80 \times 10^{-1}$	$4,30 \times 10^{-7}$	$7,53 \times 10^{-4}$	$4,27 \times 10^{-4}$	1,29
$1,25 \times 10^6$	$4,09 \times 10^{-1}$	$3,27 \times 10^{-7}$	$5,11 \times 10^{-3}$	$1,70 \times 10^{-2}$	1,61
$1,41 \times 10^5$	$7,16 \times 10^{-1}$	$5,09 \times 10^{-7}$	$6,84 \times 10^{-3}$	$1,87 \times 10^{-2}$	1,46
$1,38 \times 10^6$	$6,70 \times 10^{-1}$	$4,85 \times 10^{-7}$	$1,02 \times 10^{-2}$	$2,51 \times 10^{-2}$	1,08

## СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА АСПАРТ Р<sup>®</sup> И ИНСУЛИНА НОВОРАПИД<sup>®</sup> ПЕНФИЛЛ<sup>®</sup>

На рисунках 4 и 5 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина аспарт Р<sup>®</sup> и инсулина НовоРапид<sup>®</sup> Пенфилл<sup>®</sup> с рецептором.

При взаимодействии данных субстанций с рецептором наблюдалась быстрая фаза ассоциации. Равновесие достигалось уже через 20 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро, без полного возвращения ответа (RU) к исходному уровню (рисунки 4 и 5).

В таблицах 3 и 4 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обсчете кинетики взаимодействия Росинсулина аспарт Р<sup>®</sup> и инсулина НовоРапид<sup>®</sup> Пенфилл<sup>®</sup> с рецептором.

Согласно результатам, полученным по модели «two states», субстанция Росинсулин аспарт Р<sup>®</sup> характеризовалась значением  $K_D$   $(4,10 \pm 0,50) \times 10^{-7}$  М. Субстанция инсулин НовоРапид<sup>®</sup> Пенфилл<sup>®</sup> характеризовалась значением  $K_D$   $(4,57 \pm 0,17) \times 10^{-7}$  М. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.

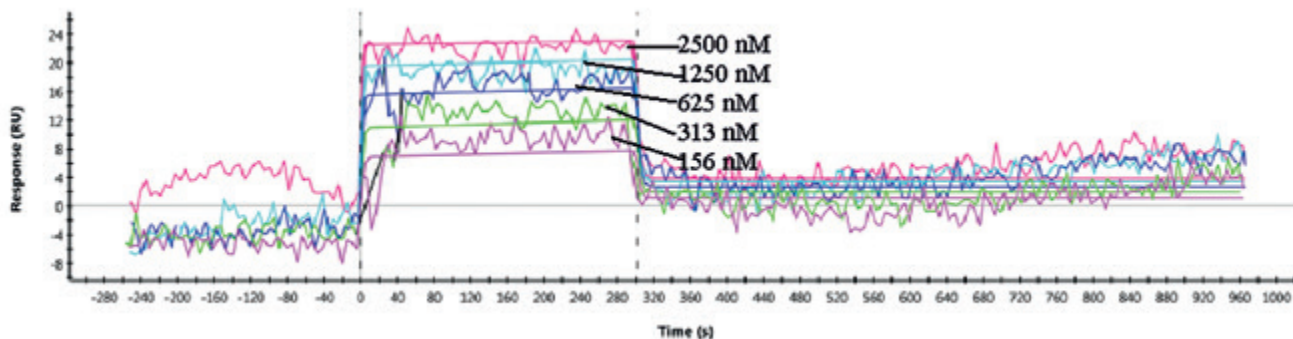


Рисунок 4. Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина аспарт Р<sup>®</sup> (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

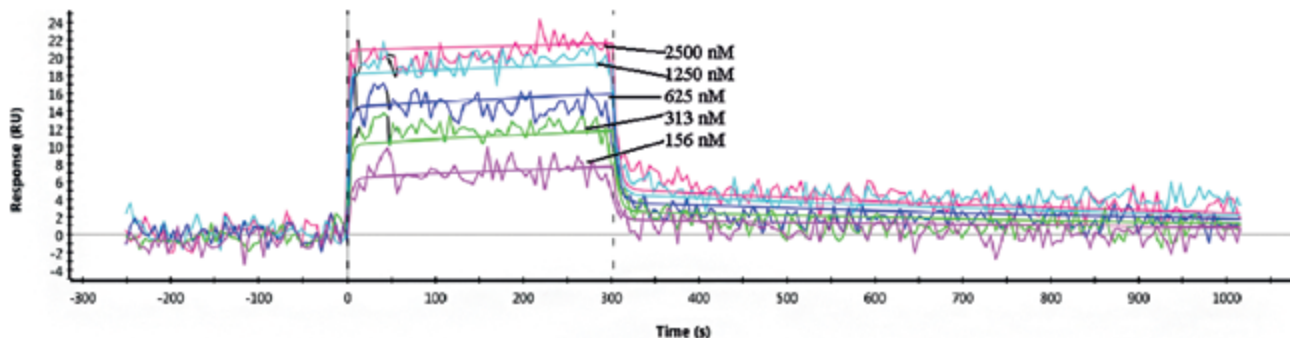


Рисунок 5. Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина НовоРапид<sup>®</sup> Пенфилл<sup>®</sup> (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

Таблица 3.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина аспарт Р® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}$ , 1/Ms	Константа диссоциации 1, $K_{d1}$ , 1/s	Равновесная константа диссоциации, $K_D$ , M	Константа ассоциации 2, $K_{a2}$ , 1/Ms	Константа диссоциации 2, $K_{d2}$ , 1/s	$\chi^2$
$7,30 \times 10^5$	$3,05 \times 10^{-1}$	$4,18 \times 10^{-7}$	$2,07 \times 10^{-14}$	$1,75 \times 10^{-5}$	5,12
$3,37 \times 10^5$	$1,70 \times 10^{-1}$	$5,04 \times 10^{-7}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$7,35 \times 10^{-4}$	8,61
$7,49 \times 10^5$	$3,35 \times 10^{-1}$	$4,48 \times 10^{-7}$	$6,14 \times 10^{-4}$	$1,42 \times 10^{-14}$	5,65
$2,93 \times 10^5$	$7,89 \times 10^{-2}$	$2,69 \times 10^{-7}$	$2,34 \times 10^{-4}$	1,57	6,96

Таблица 4.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия инсулина НовоРapid® Пенфилл® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}$ , 1/Ms	Константа диссоциации 1, $K_{d1}$ , 1/s	Равновесная константа диссоциации, $K_D$ , M	Константа ассоциации 2, $K_{a2}$ , 1/Ms	Константа диссоциации 2, $K_{d2}$ , 1/s	$\chi^2$
$4,58 \times 10^5$	$1,99 \times 10^{-1}$	$4,34 \times 10^{-7}$	$1,07 \times 10^{-3}$	$1,03 \times 10^{-3}$	1,89
$1,20 \times 10^6$	$5,76 \times 10^{-1}$	$4,79 \times 10^{-7}$	$2,42 \times 10^{-2}$	$3,52 \times 10^{-2}$	4,55
$4,15 \times 10^5$	$1,75 \times 10^{-1}$	$4,22 \times 10^{-7}$	$5,55 \times 10^{-4}$	$6,41 \times 10^{-4}$	1,87
$8,78 \times 10^4$	$4,33 \times 10^{-2}$	$4,93 \times 10^{-7}$	$8,54 \times 10^{-4}$	$4,34 \times 10^{-4}$	2,88

## СРАВНЕНИЕ КИНЕТИКИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ С РЕЦЕПТОРОМ РОСИНСУЛИНА ГЛАРГИН® И ИНСУЛИНА ЛАНТУС® СОЛОСТАР®

На рисунках 6 и 7 представлены типичные сенсограммы, полученные при изучении взаимодействия Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором.

Взаимодействие Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором демонстрирует быструю ассоциацию с достижением равновесия уже в течение первых 20 секунд инъекции инсулина. Фаза диссоциации также происходит быстро. В отличие от инсулина Лантус® СолоСтар® в случае Росинсулина гларгин® при диссоциации ответ (RU) полностью не возвращается к исходному уровню (рисунки 6 и 7).

В таблицах 5 и 6 представлены значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина гларгин® и инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором.

Согласно полученным результатам субстанция Росинсулин гларгин® характеризовалась значением  $K_D$   $(12,63 \pm 2,76) \times 10^{-7}$  M. Субстанция инсулин

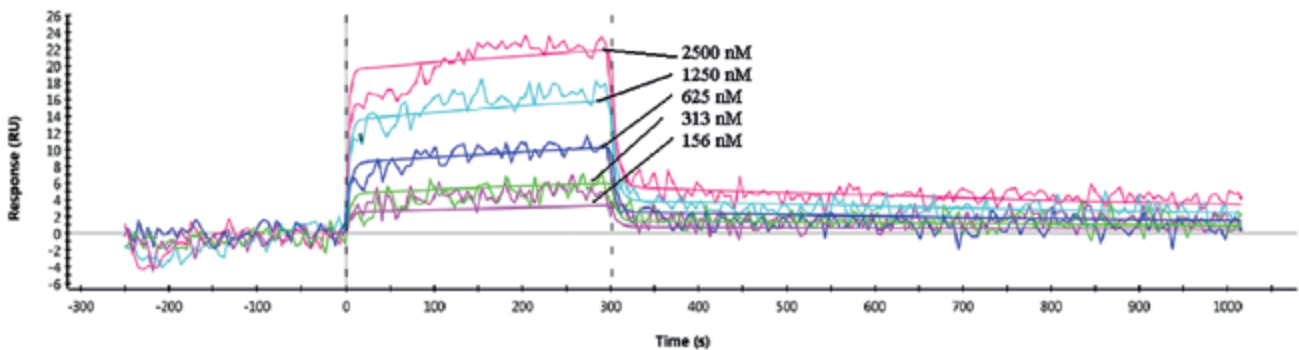


Рисунок 6. Сенсограмма, полученная при взаимодействии Росинсулина гларгин® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

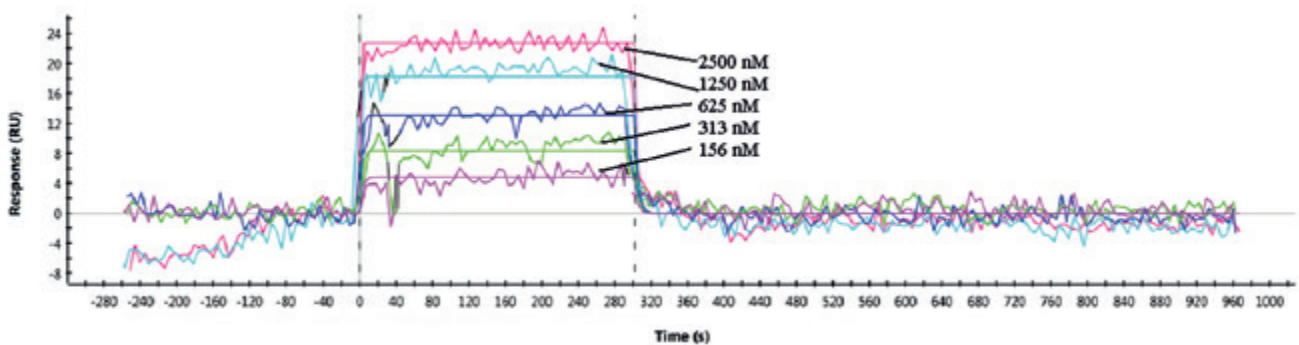


Рисунок 7. Сенсограмма, полученная при взаимодействии инсулина Лантус® СолоСтар® (в концентрациях 156–2500 нМ) с иммобилизованным рецептором

Лантус® СолоСтар® характеризовалась значением  $K_D (13,23 \pm 2,22) \times 10^{-7}$  М. Сравнение значений равновесных констант диссоциации для указанных субстанций с использованием t-теста выявило, что их различие статистически незначимо.

Таблица 5.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия Росинсулина гларгин® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}, 1/Ms$	Константа диссоциации 1, $K_{d1}, 1/s$	Равновесная константа диссоциации, $K_D, M$	Константа ассоциации 2, $K_{a2}, 1/Ms$	Константа диссоциации 2, $K_{d2}, 1/s$	$\chi^2$
$9,20 \times 10^4$	$1,79 \times 10^{-1}$	$19,5 \times 10^{-7}$	$1,13 \times 10^{-3}$	$6,89 \times 10^{-4}$	1,72
$1,40 \times 10^5$	$1,87 \times 10^{-1}$	$13,4 \times 10^{-7}$	$6,31 \times 10^{-4}$	$1,37 \times 10^{-3}$	1,93
$1,22 \times 10^5$	$1,40 \times 10^{-1}$	$11,5 \times 10^{-7}$	$3,82 \times 10^{-4}$	$1,58 \times 10^{-3}$	4,72
$2,82 \times 10^5$	$1,72 \times 10^{-1}$	$6,10 \times 10^{-7}$	$3,27 \times 10^{-4}$	$3,30 \times 10^{-11}$	1,90

Таблица 6.

Значения констант ассоциации, диссоциации и равновесной константы диссоциации, полученные при обчете кинетики взаимодействия инсулина Лантус® СолоСтар® с рецептором

Константа ассоциации 1, $K_{a1}, 1/Ms$	Константа диссоциации 1, $K_{d1}, 1/s$	Равновесная константа диссоциации, $K_D, M$	Константа ассоциации 2, $K_{a2}, 1/Ms$	Константа диссоциации 2, $K_{d2}, 1/s$	$\chi^2$
$4,84 \times 10^5$	$6,81 \times 10^{-1}$	$14,10 \times 10^{-7}$	$1,57 \times 10^{-2}$	$3,58 \times 10^{-2}$	1,83
$2,03 \times 10^5$	$2,39 \times 10^{-1}$	$11,80 \times 10^{-7}$	$5,25 \times 10^{-4}$	$2,55 \times 10^{-3}$	2,25
$3,70 \times 10^5$	$3,04 \times 10^{-1}$	$8,21 \times 10^{-7}$	$3,22 \times 10^{-15}$	$1,16 \times 10^{-5}$	2,22
$9,03 \times 10^5$	1,70	$18,88 \times 10^{-7}$	$9,58 \times 10^{-3}$	$2,24 \times 10^{-2}$	3,81

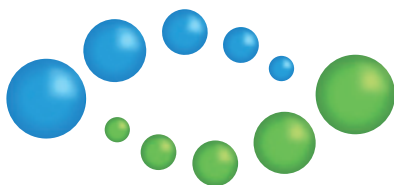
## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами впервые была проведена работа по оценке кинетики взаимодействия инсулина с рецептором методом поверхностного плазмонного резонанса в реальном времени с целью подтверждения биоаналогичности новых субстанций существующим на рынке. По результатам проведенных исследований можно сделать вывод, что при сравнении характера кривых кинетики взаимодействия и рассчитанных равновесных констант диссоциации, определенных методом поверхностного плазмонного резонанса, статистически значимые различия между потенциально биоаналогичными субстанциями инсулина и соответствующими им по времени воздействия субстанциями, входящими в состав зарегистрированных лекарственных препаратов, отсутствуют.

## ЛИТЕРАТУРА

- Хабриев Р. У., Камаев Н. О., Данилова Т. И., Кахоян Е. Г. Биофармацевтические препараты и особенности контроля их качества // Вестник Росздравнадзора. 2015. № 6. С. 55–59. [Khabriev R. U., Kamaev N. O., Danilova T. I., Kakhoyan E. G. Biopharmatsevticheskie preparaty i osobennosti kontrolya ikh kachestva // Vestnik Roszdravnadzora. [Biopharmaceuticals and the features of monitoring their quality // Bulletin of Roszdravnadzor]. 2015. № 6. С. 55–59].
- Проценко М. В., Ягудина Р. И. Биотехнологические лекарственные средства и биоподобные препараты: обзор практического применения и нормативной базы регулирования обращения // Фармакоэкономика. 2010. Т. 3. № 4. С. 13–21. [Protsenko M. V., Yagudina R. I. Biotekhnologicheskie lekarstvennyye sredstva i biopodobnyye preparaty: obzor prakticheskogo primeneniya i normativnoi bazy regulirovaniya obrashcheniya // Farmakoeconomika. [Biotechnological medicinal products and biolike preparations: a review of practical application and regulatory framework of treatment regulation // Pharmacoeconomics]. 2010. Т. 3. № 4. С. 13–21].
- Орлов С. В., Шимановский Н. Л., Фогт С. Н. Возможно ли использование биоаналога бевацизумаба при всех показаниях, зарегистрированных для оригинального препарата? // Исследования и практика в медицине. 2016. Т. 3. № 2. С. 45–52. [Orlov S. V., Shimanovskii N. L., Fogt S. N. Vozmozhno li ispol'zovanie bioanaloga bevatsizumaba pri vseh pokazaniyakh, zaregistrirrovannykh dlya original'nogo preparata? // Issledovaniya i praktika v meditsine. [Is it possible to use the bioavailable bevacizumab for all indications recorded for the original drug? // Research and practice in medicine]. 2016. Т. 3. № 2. С. 45–52].
- Маргаева Б. Ю. Подходы к оценке взаимозаменяемости биоаналогов (биосимиляров) на стадии их государственной регистрации в свете реализации стратегии «Фарма-2020» // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 3(4). С. 88–94. [Margaeva B. Yu. Podkhody k otsenke vzaimozamenyaemosti bioanalogov (biosimilyarov) na stadii ikh gosudarstvennoy registratsii v svete realizatsii strategii «Farma-2020» // Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv. [Approaches to the assessment of the interchangeability of bioanalogs (biosimilars) at the stage of their state registration in the light of the implementation of the "Pharma-2020" strategy // Development and registration of medicines]. 2013. № 3(4). С. 88–94].
- Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (ред. от 28.12.2017) «Об обращении лекарственных средств».
- Солдатов А. А., Авдеева Ж. И., Алпатова Н. А., Медуницын Н. В., Мосягин В. Д., Гайдерова Л. А., Яковлев А. К., Бондарев В. П., Миронов А. Н. Доказательство подобия рекомбинантных эпоэтинов, зарегистрированных на основе принципов «biosimilars» (физико-химические и биологические свойства) // Биопрепараты. 2014. Т. 1. № 49. С. 11–22. [Soldatov A. A., Avdeeva Zh. I., Alpatova N. A., Medunitsyn N. V., Mosyagin V. D., Gaiderova L. A., Yakovlev A. K., Bondarev V. P., Mironov A. N. Dokazatel'stvo podobiya rekombinantnykh epoetinov, zaregistrirrovannykh na osnove printsiptov «biosimilars» (fiziko-khimicheskie i biologicheskie svoistva) // Biopreparaty. [Proof of the similarity of recombinant epoetins registered on the basis of the principles of "biosimilars" (physico-chemical and biological properties) // Biopreparations]. 2014. Т. 1. № 49. С. 11–22].
- Проскурина И. А., Майоров А. Ю., Горячев Д. В., Бунятыан Н. Д. Современные подходы к оценке фармакокинетики и фармакодинамики биоподобных генно-инженерных препаратов человеческого инсулина и аналогов инсулина человека в рамках I фазы клинического исследования // Сахарный диабет. 2016. Т. 19. № 3. С. 251–259. [Proskurina I. A., Maiorov A. Yu., Goryachev D. V., Bunyatyan N. D. Sovremennyye podkhody k otsenke farmakokinetiki i farmakodinamiki biopodobnykh genno-inzhenernykh preparatov chelovecheskogo insulina i analogov insulina cheloveka v ramkakh I fazy klinicheskogo

- issledovaniya // Sakharnyi diabet. [Modern approaches to the evaluation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of biosimilar genetically engineered preparations of human insulin and human insulin analogues within the framework of the Phase I clinical trial. // Diabetes mellitus]. 2016. T. 19. № 3. S. 251–259].
8. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant human insulin and insulin analogues (EMA/CHMP/BMWP/32775/2005\_Rev. 1). URL: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2015/03/WC500184161.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184161.pdf) (дата обращения 02.08.2018).
  9. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. – М.: Полиграф-Плюс. 2014. С. 54.
  10. Schasfoort R. B. M., Tudos A. J. Handbook of Surface Plasmon Resonance. – Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 2008. 403 p.
  11. Иванов А. С., Медведев А. Е. Оптический плазмонно-резонансный биосенсор в молекулярном фишинге // Биомедицинская химия. 2015. V. 61. С. 231–238. [Ivanov A. S., Medvedev A. E. Opticheskiy plazmonno-rezonansnyi biosensor v molekulyarnom fishinge // Biomeditsinskaya khimiya. [Optical plasmon resonance biosensor in molecular phishing // Biomedical chemistry]. 2015. V. 61. С. 231–238].
  12. Mariani S., Minunni M. Surface plasmon resonance applications in clinical analysis // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2014. V. 406. С. 2303–2323.
  13. Shalabney A., Abdulhalim I. Sensitivity-enhancement methods for surface plasmon sensors // Lasers and Photonics Reviews. 2011. V. 5. С. 571–606.
  14. Situ C., Buijs J., Mooney M. H., Elliott C. T. Advances in surface plasmon resonance biosensor technology towards high-throughput, food-safety analysis // Trends in Analytical Chemistry. 2010. V. 29. С. 1305–1315.
  15. Soll R., Beck-Sickingler A. On the role of neuropeptides in the hypothalamic regulation of food intake // Current Medicinal Chemistry-Immunology, Endocrine & Metabolic Agents. 2001. V. 1(2). P. 151–169.
  16. Czech M. P. The nature and regulation of the insulin receptor: structure and function // Annu Rev Physiol. 1985. V. 47. P. 357–81.
  17. Shanik M., Xu Y., Škrha J., Dankner R., Zick Y., Roth J. Insulin resistance and hyperinsulinemia // Diabetes Care. 2008. V. 31. Suppl. 2. P. 262.
  18. Nakagawa S. H., Tager H. S., Steiner D. F. Mutational Analysis of Invariant Valine B12 in Insulin: Implications for Receptor Binding // Biochemistry. 2000. V. 39 (51). P. 15826–15835.
  19. Menting J. G., Whittaker J., Margetts M. B., Whittaker L. J., Kong GK-W., Smith B. J., Watson C. J., Žáková L., Kletvíková E., Jiráček J. How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor // Nature. 2013. V. 493 (7431). P. 241–245.
  20. Schäffer L. A model for insulin binding to the insulin receptor // Eur. J. Biochem. 1994. V. 221(3). P. 1127–1132.
  21. De Meyts P., Whittaker J. Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design // Nature Reviews Drug Discovery. 2002. V. 1(10). P. 769–783.
  22. Lawrence M. C., McKern N. M., Ward C. W. Insulin receptor structure and its implications for the IGF-1 receptor // Current Opinion in Structural Biology. 2007. V. 17(6). P. 699–705.
  23. Ward C. W., Lawrence M. C., Streltsov V. A., Adams T. E., McKern N. M. The insulin and EGF receptor structures: new insights into ligand-induced receptor activation // Trends in Biochemical Sciences. 2007. V. 32(3). P. 129–137.



## КОНГРЕССНО- ВЫСТАВОЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПОФОРУМ

# БИОИНДУСТРИЯ

## МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА-КОНКУРС ИННОВАЦИОННЫХ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ РЕШЕНИЙ



Выставка-конкурс  
проходит в рамках  
Петербургского  
международного  
форума здоровья

### РАЗДЕЛЫ ВЫСТАВКИ

**1** **БИОТЕХНОЛОГИИ  
В СФЕРЕ ИНДУСТРИИ  
ЗДОРОВЬЯ**

**3** **БИОТЕХНОЛОГИИ  
В СФЕРЕ ЭКОЛОГИЧЕСКОЙ  
БЕЗОПАСНОСТИ**

**2** **СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ  
И ПИЩЕВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИИ**

**4** **ЛАБОРАТОРНОЕ  
И АНАЛИТИЧЕСКОЕ  
ОБОРУДОВАНИЕ,  
РАСХОДНЫЕ МАТЕРИАЛЫ**

### ДЕЛОВАЯ ПРОГРАММА

- КОНКУРС  
ИННОВАЦИОННЫХ  
БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
РЕШЕНИЙ

- КОНФЕРЕНЦИЯ-ПРЕЗЕНТАЦИЯ  
ИННОВАЦИОННЫХ РАЗРАБОТОК  
«БИОИНДУСТРИЯ НА ПУТИ  
К ТЕХНОЛОГИЯМ БУДУЩЕГО»

**12+**

ОРГАНИЗАТОР  
**EXPOFORUM**

ГЕНЕРАЛЬНЫЙ  
МЕДИАПАРТНЕР  
САНКТ-ПЕТЕРБУРГ

СПОНСОР  
**ГАЗПРОМБАНК**

ПЕТЕРБУРГСКОЕ ШОССЕ, 64/1  
тел.: +7 812 240 40 40, доб. 2292

BIO@EXPOFORUM.RU  
AA.BELOUSOVA@EXPOFORUM.RU  
WWW.BIO.EXPOFORUM.RU

