

Современные подходы к определению биологической активности инсулина и его аналогов

Т. А. Батуашвили, Л. В. Симутенко, П. В. Шадрин*, Н. П. Неугодова

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

Резюме. Рассмотрены особенности действия инсулина на организм пациента, виды препаратов инсулина и его аналогов, применяемых для лечения сахарного диабета, и предъявляемые к ним требования. Показано, что определение биологической активности является одним из главных показателей качества данной группы препаратов. Приведено краткое описание методов анализа инсулина и его аналогов, основанных как на действии гормона на организм в целом (*in vivo*: двойной перекрест, эугликемический клэмп), так и на отдельных этапах его взаимодействия с системами организма (*in vitro*: рецепторно-связывающий анализ, фосфорилирование, метаболические методы). В связи с появлением на фармацевтическом рынке биоаналогов инсулина в статье поднимается вопрос о необходимости сохранения в нормативных документах показателя «Биологическая активность», определяемого на животных. Проведенный анализ методов определения биологической активности *in vivo* и *in vitro* убедительно показывает невозможность замены моделей с использованием животных на существующие в настоящее время методы анализа, выполняемые на клеточных культурах. Следовательно, модели на животных по-прежнему необходимы, так как только они позволяют дать адекватную оценку качества инсулинов по показателю «Биологическая активность». Принимая во внимание мировые тенденции к сокращению использования животных в испытаниях, авторы указывают на необходимость разработки методов, результаты которых будут сопоставимы с результатами определения биологической активности *in vivo*.

Ключевые слова: инсулин; аналоги инсулина; биоподобные препараты; биоаналоги; биологическая активность; методы *in vivo* и *in vitro*; ИР-1 и ИР-2; рецепторно-связывающий анализ; фосфорилирование; метаболическая активность

Для цитирования: Батуашвили ТА, Симутенко ЛВ, Шадрин ПВ, Неугодова НП. Современные подходы к определению биологической активности инсулина и его аналогов. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(2):85–92. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-85-92>

***Контактное лицо:** Шадрин Павел Валерьевич; shadrin@expmed.ru

Modern Approaches to Determination of the Biological Activity of Insulin and its Analogues

T. A. Batuashvili, L. V. Simutenko, P. V. Shadrin*, N. P. Neugodova

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

Abstract. The paper considers insulin's specific action on the patient's body, types of insulin preparations and insulin analogues which are used for the treatment of diabetes, as well as applicable requirements for these products. It was demonstrated that determination of biological activity is one of the key quality parameters of this type of medicines. The paper summarises the methods used for evaluation of insulin and its analogues, which are based both on the hormone's general action on the body (*in vivo*: double crossing, euglycemic clamp, etc.), and on certain aspects of the hormone's interaction with the body systems (*in vitro*: receptor-binding assay, phosphorylation, metabolic methods). Due to the appearance of insulin biosimilars on the pharmaceutical market, the article raises the issue that the «Biological potency» parameter tested in animals should be kept as part of the product specification. The analysis of the *in vivo* and *in vitro* methods of biological activity determination convincingly demonstrates that animal models can not be replaced with the modern analytical methods based on cell cultures. Consequently, animal models are still necessary, as they allow for an adequate assessment of the quality of insulins in terms of «Biological potency». Taking into account the global trend towards reduction of animal testing, the authors point out the need to develop modern methods, the results of which will be comparable to the results of *in vivo* determination of the biological activity.

Key words: insulin; insulin analogues; biosimilars; biological activity; *in vivo* and *in vitro* methods; IR-1 and IR-2; receptor-binding assay; phosphorylation; metabolic activity

For citation: Batuashvili TA, Simutenko LV, Shadrin PV, Neugodova NP. Modern approaches to determination of the biological activity of insulin and its analogues. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(2):85–92. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-2-85-92>

***Corresponding author:** Pavel V. Shadrin; shadrin@expmed.ru

Инсулин относится к полипептидным гормонам, и его основное действие направлено на поддержание углеводного баланса. Почти за столетний период был пройден путь от получения инсулина животного происхождения из поджелудочных желез крупного рогатого скота и свиней до синтеза инсулина человеческого, а затем производства инсулина человеческого и его аналогов методом генной инженерии [1–3].

С момента открытия инсулина и начала его применения для лечения больных сахарным диабетом гипогликемическое действие гормона лежит в основе определения его биологической активности, которая является важным показателем качества инсулина и его аналогов.

Цель работы — анализ современных методов определения биологической активности инсулина и его аналогов *in vivo* и *in vitro*.

Для поддержания у больных сахарным диабетом физиологического уровня гормона в крови были созданы препараты инсулина короткого действия (так называемые пищевые), среднего и длительного действия (базальные). Для пищевых инсулинов характерно быстрое действие после их введения в организм и создания физиологического пика. Инсулины длительного действия, представляющие собой суспензию, медленно всасываются из подкожно-жировой клетчатки, поддерживая невысокую концентрацию препарата в крови в течение длительного времени при отсутствии физиологического пика. Их вводят один или два раза в сутки.

Особенностью инсулина человека является способность его молекул образовывать димеры и гексамеры в лекарственной форме, а также склонность к агрегации и формированию фибрилл, что приводит к замедлению всасывания препарата в кровь [3–5].

Несмотря на доказанную эффективность препаратов инсулина в лечении сахарного диабета, необходимо отметить их узкий терапевтический диапазон, связанный с риском гипогликемии [2, 6].

С развитием биотехнологии стало возможно путем модификации молекулы инсулина создавать его аналоги. В отличие от инсулина человеческого, они не образуют ассоциированные молекулы и поэтому значительно быстрее всасываются в кровь. В результате направленного изменения последовательности аминокислот были получены аналоги инсулина ультракороткого действия. Включение в молекулу остатка жирной кислоты создало возможность получить аналог инсулина продолжительного действия (инсулин детемир).

Другим способом увеличения продолжительности действия препарата является образование микропреципитатов. Примером этого является инсулин гларгин, раствор которого в лекарственной форме имеет рН 4. После введения препарата в под-

кожно-жировую клетчатку рН раствора меняется на нейтральный, при этом образуются микропреципитаты, которые замедляют всасывание препарата в кровь, создавая имитацию физиологического суточного профиля инсулинемии у пациентов [7].

Таким образом, с появлением в лечебной практике аналогов инсулина стало возможным обеспечивать оптимальный уровень глюкозы в крови без риска гипогликемии [4, 8].

На основании международных рекомендаций для создания единых условий проведения фармацевтических и биологических испытаний, доклинических и клинических исследований Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 утверждены «Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза» (далее — Правила ЕАЭС). В основу данного документа легли рекомендации международных организаций: Всемирной организации здравоохранения и Комитета по лекарственным средствам при Европейском агентстве по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA). Требования к исследованиям биоподобия лекарственных препаратов, содержащих рекомбинантный инсулин, включая инсулин человека и аналоги инсулина человека, установлены в главе 15.7 Правил ЕАЭС.

Согласно Правилам ЕАЭС, биологическая активность «определяет особую способность или свойство препарата оказывать определенный биологический эффект». Для препаратов инсулина биологическая активность является интегральным показателем, характеризующим результат взаимодействия инсулина, обладающего определенными фармацевтическими характеристиками, с системами организма, участвующими в регуляции углеводного обмена.

Для определения биологической активности препаратов инсулина используют экспериментальные модели, воспроизводящие его действие на человеческий организм в целом (методы *in vivo*) и на отдельные изолированные системы или имитирующие различные этапы взаимодействия гормона с организмом (методы *in vitro*).

Действие инсулина или его аналога *in vivo* начинается с момента его введения под кожу и образования депо в подкожно-жировой клетчатке. Скорость поступления гормона в кровь и связывание с транспортными белками будут зависеть от строения молекулы и лекарственной формы. При попадании инсулина из крови в межклеточную жидкость происходят его взаимодействие с рецепторами, находящимися на мембране инсулинозависимых клеток, и активация сигнального пути внутри клетки, заканчивающаяся метаболическим ответом (рис. 1).

При оценке качества препаратов инсулина особое внимание следует уделять сравнительно недавно

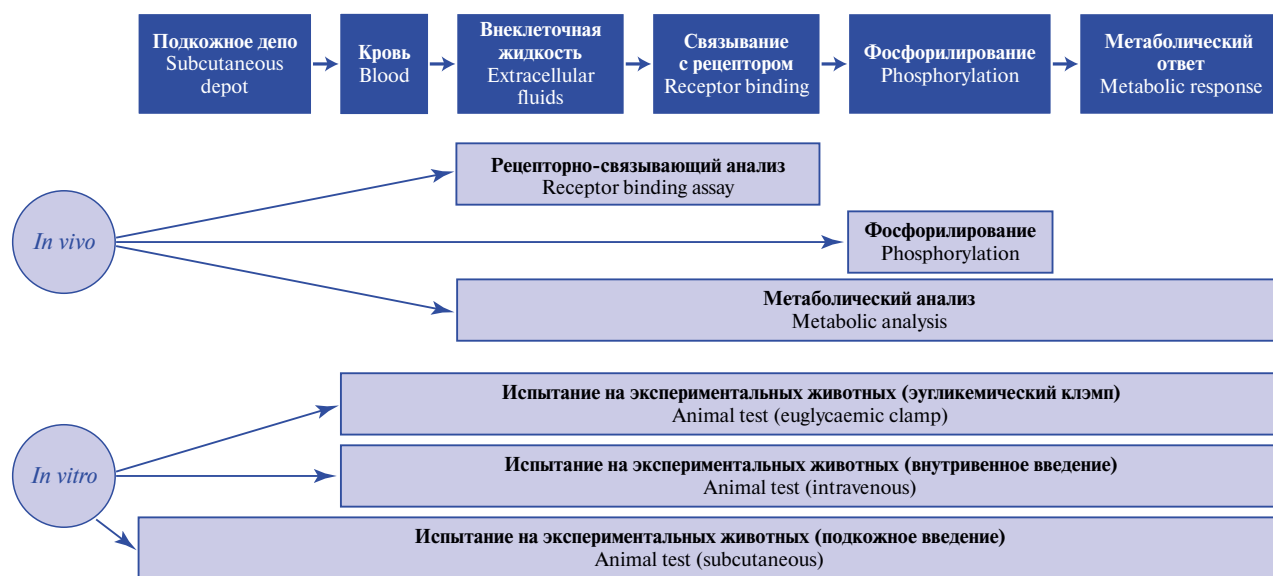


Рис. 1. Схема действия инсулина в организме и методы его оценки в условиях *in vivo* и на отдельных этапах *in vitro*. По А. Vølund с соавт. [9]

Fig. 1. The schematic illustration of insulin action and methods of its assessment *in vivo* and, at some stages, *in vitro*. By A. Vølund et al. [9]

появившимся на фармацевтическом рынке биотехнологическим биоподобным препаратам, обладающим сложной структурой. При этом каждый производитель такого препарата использует собственный технологический процесс, поэтому практически невозможно точно воссоздать оригинальный препарат, а биологическая активность биоподобного препарата не будет такой же, как у оригинального [10–12].

В руководстве ЕМА¹ указано, что о биоподобии между оригинальным препаратом и потенциальным биоаналогом можно судить только на основании клинических и доклинических исследований. В то же время во многих странах мира регистрация биоподобных препаратов проходит на основании упрощенной заявки, которая принята для воспроизведенных препаратов [13–15]. Данная процедура не может обеспечить в достаточной мере эффективность и безопасность биоподобных препаратов. В связи с этим определение биологической активности приобретает еще большую актуальность.

Для количественного определения биологической активности инсулина и его аналогов *in vivo* необходимо использование соответствующих стандартных образцов, аттестованных по данному показателю.

МЕТОДЫ *IN VIVO*

Величину биологической активности, полученную в опытах на животных, выражают в единицах действия. За единицу действия принимают специфическую активность такого количества инсулина или его аналога, которое по гипогликемическому действию эквивалентно одной международной единице (МЕ). Для инсулина человеческого и для его аналогов эти единицы действия будут отличаться. Например², для инсулина человеческого 1 МЕ = 0,0347 мг, а 1 МЕ инсулина гларгина = 0,0364 мг.

Для контроля качества препаратов инсулина и его аналогов, а также их субстанций по показателю «Биологическая активность» *in vivo* применяют метод двойного перекреста и эугликемический клэмп-тест.

Двойной перекрест. Метод основан на сравнении линий дозозависимости стандартного образца и испытуемого препарата (принцип параллельных линий) и описан в Государственной фармакопее Российской Федерации³, Европейской фармакопее⁴ и фармакопее США⁵. Испытание выполняется на мышах или кроликах и состоит из двух постановок на четырех группах животных (табл. 1).

¹ Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1). EMA/CHMP/BWP/247713/2012.

² United States Pharmacopeia. 41th ed. (Insulin Human, Insulin Glargine).

³ ОФС.1.2.4.0001.15. Биологические испытания инсулина. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV изд. Т. 1. М.: 2018. В Государственную фармакопею СССР X изд. была включена статья, регламентирующая простой перекрест. Впоследствии она была переработана в ОФС 42-0009-02, которая вошла в Государственную фармакопею Российской Федерации XII изд. и с незначительными изменениями действует в настоящее время.

⁴ European Pharmacopeia 9 (5.3. Statistical Analysis of Results of Biological Assays and Tests).

⁵ United States Pharmacopeia. 41th ed. (<121> Insulin Assays).

Таблица 1. Схема двойного перекреста по ОФС.1.2.4.0001.15 (последовательность введения рабочих растворов животным)**Table 1.** The double crossing scheme according to OFS.1.2.4.0001.15 (sequence of administration of working solutions to animals)

	Группа 1 Group 1	Группа 2 Group 2	Группа 3 Group 3	Группа 4 Group 4
I постановка (день I) Experiment I (day I)	СО ₁ RS ₁	СО ₂ RS ₂	ИП ₁ TP ₁	ИП ₂ TP ₂
II постановка (день II) Experiment II (day II)	ИП ₂ TP ₂	ИП ₁ TP ₁	СО ₂ RS ₂	СО ₁ RS ₁

Примечание. СО — стандартный образец; ИП — испытуемый препарат; индекс 1 — малая доза; индекс 2 — большая доза.
Note. RS — reference standard; TP — test product; index 1 — small dose; index 2 — high dose.

Теоретически, если значения биологической активности стандартного образца (СО) и испытуемого препарата (ИП) равны, то в течение двух дней испытания каждое животное подкожно должно получить одно и то же суммарное количество инсулина или его аналога. Разность ответов одной и той же особи в разные дни позволяет оценить биологическую активность ИП и ее доверительные границы. Данная схема позволяет максимально сгладить естественную вариабельность реакции животных и определить правильность результатов каждого испытания с помощью дисперсионного анализа.

Значение биологической активности вычисляют на основании полученной разности между средними значениями ответа СО и ИП, а также угла наклона их общей линии дозозависимости.

Для научно-исследовательских целей используют и другие варианты определения биологической активности инсулина и его аналогов, также основанные на принципе параллельных линий. Например, экспресс-метод определения биологической активности на кроликах с применением двух доз, как СО, так и ИП. В отличие от метода двойного перекреста, растворы инсулина вводят однократно, внутривенно и в уменьшенных дозах [9]. Это сокращает время проведения испытания, но исключает стадию образования подкожного депо, которая влияет на биологическую активность, определяемую фармакопейным методом.

Эугликемический клэмп-тест. Метод описан в Правилах ЕАЭС (глава 15.7) как достаточно точный и надежный. Он позволяет оценить биологическую активность инсулина и его аналогов в эксперименте на животных, а также резистентность к инсулину в клинике [16].

Суть метода заключается в достижении устойчивого равновесия между уровнем вводимой в кровь глюкозы и скоростью ее захвата тканями [17, 18]. Для достижения состояния равновесия в начале опыта резко увеличивают концентрацию инсулина в крови за счет скорости введения, а затем переходят на постоянную скорость инфузии инсулина при одновременном внутривенном введении глюкозы для поддержания эугликемии.

Тест неоднократно использовали для сравнительных испытаний эффективности аналогов инсулина и инсулина человека. Например, при исследовании инсулина детемир на фоне достижения равновесного состояния проводили сравнительную оценку действия изучаемого аналога и инсулина человека.

Для определения инсулинозависимых метаболитов в плазме, а также метаболических ответов *in vitro* на примере скорости поглощения меченой 2-дезоксиглюкозы клетками жировой и мышечной ткани также использовали клэмп-тест. Показано, что эффективность аналогов инсулина в четыре раза ниже, чем инсулина человека. Несмотря на доказанную эффективность, тест применяется редко, так как трудоемок, требует специального оборудования и обученного персонала [10, 19–23].

МЕТОДЫ *IN VITRO*

Выход в 1959 году книги У. Рассела и Р. Берча «Принципы гуманной методики эксперимента», в которой сформулирована концепция «3R», способствовал разработке и внедрению методов *in vitro*, некоторые из которых используют при разработке аналогов инсулина и их доклинических исследованиях [24].

Для унификации подходов к испытаниям субстанций и препаратов инсулина человека, а также его аналогов и биоподобных препаратов, согласно Правилам ЕАЭС, для выявления любых значимых различий между биоподобным и референтным препаратами в опытах *in vitro* необходимо провести следующие действия:

- подтвердить чувствительность используемого метода;
- выполнить испытания с необходимым числом повторностей, разведений или временных точек на кривой с целью правильного определения линии дозозависимости;
- для подтверждения эффективности аналога инсулина или биоподобного препарата провести рецепторно-связывающий анализ в сравнении с референтным лекарственным препаратом;
- сравнить биологическую активность параллельно в одном эксперименте на этапах ауто-

фосфорилирования рецептора и метаболического ответа для биоподобного и референтного препаратов. Для подтверждения значимых различий требуется достаточно широкий диапазон методов (не менее трех);

- включить во все испытания надлежащие контроли, подтверждающие валидность и пригодность метода.

В настоящее время среди исследователей и разработчиков аналогов инсулина нет единого мнения в интерпретации терминов «биологическая активность» и «эффективность»⁶.

В Правилах ЕАЭС под биологической активностью подразумеваются результаты испытаний на всех этапах сигнального пути внутри клетки, начиная с рецепторно-связывающего анализа и включая аутофосфорилирование рецептора, метаболический ответ, а также поглощение глюкозы и липогенез.

Результаты подобных испытаний свидетельствуют скорее об эффективности препарата, его способности влиять на конкретные процессы, протекающие в клетке, а не о биологической активности, которую фактически можно оценить только в опытах *in vivo*. В опытах на животных биологическая активность отражает действие гормона, определяемое по величине снижению уровня глюкозы в крови. Полученную биологическую активность можно выразить в МЕ и приравнять к определенному количеству инсулина. В то же время при работе с клеточными культурами, в зависимости от методики, полученные результаты выражают в различных единицах измерения, например в процентах, в единицах концентрации исследуемого вещества при определении средней эффективной дозы (EC_{50}), в единицах радиоактивности и др.

Следовательно, в случае испытаний *in vitro* о биологической активности можно говорить лишь условно.

Несмотря на разнообразие методик, выполняемых *in vitro* при определении активности инсулина и его аналогов, в их основе лежат общие принципы проведения испытаний:

- используют несколько доз инсулина и/или его аналогов;
- учитывают результаты опытов с помощью измерения радиоактивности;
- анализируют полученные S-образные кривые дозозависимости четырехпараметрическим методом⁷.

Рецепторно-связывающий анализ. Метод основан на количественной оценке сродства лигандов (немеченого инсулина и инсулина, меченого радиоактивными изотопами) в ходе их конкурентного взаимодействия с инсулиновыми рецепторами ИР-1

или ИР-2 разных клеточных культур, проявляющих высокую экспрессию этих рецепторов. При моделировании ситуации, когда количество лигандов больше, чем рецепторов, возникает конкуренция за них. При этом уровень связывания меченого лиганда будет ниже, так как немеченый лиганд замещает меченый в комплексе с рецептором [25]. Испытания, как правило, проводят на гепатоцитах, адипоцитах, миоцитах, яйцеклетках китайского хомячка и др. [10, 17, 18].

Силу связывания (аффинность) аналогов инсулина с рецепторами определяют при сравнении с человеческим рекомбинантным инсулином. Для ее определения проводят измерение радиоактивности исследуемых образцов и рассчитывают дозу, при которой происходит активация 50 % рецепторов (полумаксимальная эффективная концентрация IC_{50}) [10, 16, 19, 20, 26]. Относительную аффинность аналога инсулина рассчитывают как соотношение между значениями IC_{50} для референтного человеческого инсулина и испытуемого препарата.

Фосфорилирование. При взаимодействии инсулина или его аналога с α -субъединицей рецептора происходит процесс аутофосфорилирования, который позволяет судить об эффективности аналогов инсулина *in vitro*. При участии специфических ферментов-протеинкиназ и фосфатаз фосфатная группа аденозинтрифосфорной кислоты обратимо присоединяется к аминокислотным остаткам серина, треонина или тирозина β -субъединицы рецептора инсулина, то есть начинается процесс фосфорилирования, который запускает передачу сигнала в клетке. Этот процесс является основным механизмом контроля и регуляции ферментативной активности белков клетки, а также передачи сигнала при различных внеклеточных воздействиях [30].

Наиболее удобными и хорошо изученными методами определения эффективности инсулина с помощью оценки фосфорилирования белков в клетке являются изолированные адипоциты, клетки китайского хомячка и крысиные фибробласты [26, 29, 31].

Использование изотопов, например ^{32}P или ^{125}I , позволяет с помощью радиоиммунного анализа определять активность киназ, играющих ведущую роль во внутриклеточной сигнальной системе инсулиновых рецепторов [10, 27, 32, 33].

Для косвенного подтверждения степени фосфорилирования инсулинового рецептора и протеинкиназ используют колориметрический МТТ-тест, получивший свое название от одноименного красителя: 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ). Данный тест позволяет оценивать пролиферативную активность в жизнеспособных клетках [34].

⁶ Федеральный закон Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

⁷ ОФС.1.1.0014.15. Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1. М.; 2018.

Метаболическая активность. В процессе поиска эффективных аналогов инсулина изучают их метаболическую активность, которую определяют при сравнении с инсулином человека по интенсивности поглощения глюкозы или ее производных клеточными культурами, а также по количеству образующихся в них липидов. В качестве радиоактивных меток для глюкозы и ее производных применяют изотопы йода (^{125}I), водорода (^3H) и углерода (^{14}C). Тест-объектами служат адипоциты крыс, мышей или человека, иногда фибробласты человека.

Анализ литературных данных показал, что авторы, работая на разных моделях, получали крайне противоречивые результаты. Одни авторы на примере определения липогенеза и поглощения адипоцитами крыс меченой глюкозы показали, что при сравнении инсулина человека с гларгином, его метаболитами и различными экспериментальными аналогами инсулина их эффективность может как в несколько раз превышать эффективность инсулина, так и быть значительно ниже. В то же время другие авторы при исследовании активности экспериментальных аналогов инсулина по поглощению 2-дезоксид- ^{14}C -глюкозы адипоцитами мышей получили более низкие значения, чем у инсулина человека [18, 27, 31].

Изучение метаболической активности широко применяемых в настоящее время в лечебной практике аналогов инсулина показало, что в зависимости от условий испытаний и применяемых тест-объектов также можно получить абсолютно разные результаты. Например, при сравнительном исследовании на адипоцитах мышей влияния инсулина гларгина и инсулина человека на метаболизм жиров (липолиз и липогенез) было обнаружено, что эффективность инсулина гларгина была значительно ниже, чем инсулина человека [29]. В то же время в других работах, при использовании кардиомиоцитов крыс, на примере поглощения глюкозы было показано, что инсулин гларгин и другие аналоги инсулина человека по метаболической активности сравнимы с человеческим инсулином [10, 18, 19, 31, 35].

Из анализа литературных источников очевидно, что наличие противоречивых результатов свидетельствует об отсутствии стандартизованных условий проведения испытаний и является одним из основных препятствий для получения сопоставимых результатов.

Более полные сведения об эффективности аналогов инсулина могут быть получены при использовании нескольких методов *in vitro*, отражающих разные этапы сигнального пути [9, 10, 17, 26, 31]. Тем не менее даже такой подход не может полностью воспроизвести ответ целостного организма на введение инсулина.

АКТУАЛЬНОСТЬ РАЗРАБОТКИ АЛЬТЕРНАТИВНОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНСУЛИНА, АДЕКВАТНОГО ФАРМАКОПЕЙНОМУ

Анализ научной литературы и нормативной документации, касающейся методов определения биологической активности инсулина и его аналогов, показал, что при разработке и контроле качества аналогов инсулина сложилась устойчивая тенденция к сокращению использования методов *in vivo*. При этом методы *in vitro* используют в основном на этапе разработки нового продукта, а в нормативную документацию на готовый препарат включают физико-химические методы (ВЭЖХ, пептидное картирование), результаты которых стали приравнивать к величине биологической активности, что неправомерно, так как физико-химические методы контроля позволяют подтверждать первичную и вторичную структуру действующего вещества, а также количество белка, выраженное в единицах массы⁸. Однако эти методы не дают информации о конформации белка, от которой может зависеть биологическая активность, количественно характеризующая специфическое действие препарата на организм, выраженная в МЕ. Это подтверждается требованиями Фармакопеи США⁹, где говорится, что, как бы ни были точны физико-химические фармакопейные методы количественного определения инсулина (например, жидкостная хроматография), с помощью этих методов нельзя оценить биологическую активность и биоидентичность.

В проанализированных источниках не было убедительно показано, что использованные методы *in vitro* являются адекватной заменой методам *in vivo*. На сегодняшний день не удается найти закономерность между результатами определения биологической активности на животных и на клеточных культурах. В первую очередь это связано с тем, что в основе определения биологической активности *in vivo* и испытаний *in vitro* лежат разные физиологические процессы. Одним из возможных подходов в разрешении данной проблемы может быть создание стандартных образцов аналогов инсулина, аттестованных, с одной стороны, в МЕ для испытаний *in vivo*, а с другой — в соответствующих единицах измерения для каждого конкретного метода *in vitro*, учитывающих его специфику.

На сегодняшний день методики *in vitro* следует рассматривать лишь как скрининговые. Их роль, несомненно, важна на этапе разработки и исследования новых аналогов инсулина.

Другим немаловажным препятствием внедрения методов *in vitro* в рутинный контроль является то, что большинство из них трудоемки. К тому же

⁸ Правила проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утвержденные Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89.

⁹ United States Pharmacopeia. 41th ed. (<121> Insulin Assays).

их выполнение требует использования диагностических наборов, в состав которых входят радиоактивные вещества, имеющие очень короткий срок годности и требующие особых условий работы.

Исключение показателя «Биологическая активность», определяемого на животных, из большинства фармакопей мира и отсутствие в настоящее время альтернативных методов, способных адекватно оценить качество инсулина по данному показателю, вызывает опасение, особенно в связи с окончанием действия патентов на производство препаратов инсулина и его аналогов. Вследствие этого на фармацевтическом рынке наряду с аналогами инсулина появились биоподобные препараты, которые стали производить уже во многих странах мира, включая Китай, Индию, Пакистан, Перу, Таиланд, Мексику, Польшу.

При этом неизбежные различия в технологических процессах могут привести к получению препаратов со свойствами, отличными от оригинальных. Очевидно, это может относиться и к биологической активности. Согласно требованиям ЕМА, биоподобные препараты «должны обладать высокой степенью сходства с оригинальными препаратами по физико-химическим и биологическим свойствам» [13, 36, 37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, очевидно, что для оценки качества биоподобных препаратов необходим ком-

плексный подход. На сегодняшний день определение биологической активности на животных (метод двойного перекреста) остается единственным для надлежащего контроля качества препаратов инсулина и его аналогов. Только совместный контроль по физико-химическим и биологическим показателям с высокой степенью достоверности может подтвердить сходство биоподобных препаратов с оригинальными.

В то же время, учитывая мировую тенденцию сокращения использования животных в испытаниях, следует искать подходы к разработке простых и надежных методов определения биологической активности *in vitro*, результаты которых были бы сопоставимы с фармакопейным методом *in vivo*. Такие методы будут способствовать сохранению контроля качества препаратов инсулина на надлежащем уровне.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00154-19-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР АААА-А18-118021590049-0).

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of a publicly funded research project No. 056-00154-19-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. АААА-А18-118021590049-0).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Прозоровский ВН, Лохов ПГ, Маслов ДЛ, Ипатова ОМ. Структурно-функциональные особенности инсулина и механизма его действия. *Биомедицинская химия*. 2003;49(1):46–62. [Prozorovskiy VN, Lokhov PG, Maslov DL, Ipatova OM. Structurally functional features of insulin and mechanism of its action. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2003;49(1):46–62 (In Russ.)] PMID: 14569873
2. Zaykov AN, Mayer JP, DiMarchi RD. Pursuit of a perfect insulin. *Nat Rev Drug Discov*. 2016;15(6):425–39. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.36>
3. Баирамашвили ДИ. Генноинженерный инсулин человека: успехи и перспективы. *Российский химический журнал*. 2005;XLIX(1):34–45. [Bairamashvili DI. Genetically engineered human insulin: success and prospects. *Rossiyskiy khimicheskiy zhurnal = Russian Journal of General Chemistry*. 2005;XLIX(1):34–45 (In Russ.)]
4. Селиванова ОМ, Гришин СЮ, Глякина АВ, Садгян АС, Ушакова НИ, Глазлитская ОВ. Анализ аналогов инсулина и стратегия их дальнейшей разработки. *Успехи биологической химии*. 2018;58:313–46. [Selivanova OM, Grishin SYu, Glyakina AV, Sadgyan AS, Ushakova NI, Glazitskaya OV. Analysis of insulin analogues and strategy for their further development. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances in Biological Chemistry*. 2018;58:313–46 (In Russ.)]
5. Nilsson MR. Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes. *Amyloid*. 2016;23(3):139–47. <https://doi.org/10.1080/13506129.2016.1179183>
6. Home P, Riddle M, Cefalu WT, Bailey CJ, Bretzel RG, Del Prato S, et al. Insulin therapy in people with type 2 diabetes: opportunities and challenges? *Diabetes Care*. 2014;37(6):1499–508. <https://doi.org/10.2337/dc13-2743>
7. de Galan BE. Insulin glargine 300 U/mL in the management of diabetes: clinical utility and patient perspectives. *Patient Prefer Adherence*. 2016;(10):2097–106. <https://doi.org/10.2147/PPA.S92123>
8. Vigneri R, Squatrito S, Sciacca L. Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors. *Acta Diabetol*. 2010;47(4):271–8. <https://doi.org/10.1007/s00592-010-0215-3>
9. Vølund A, Brange J, Drejer K, Jensen I, Markussen J, Ribbel U, et al. *In vitro* and *in vivo* potency of insulin analogues designed for clinical use. *Diabet Med*. 1991;8(9):839–47. <https://doi.org/10.1111/j.1464-5491.1991.tb02122.x>
10. Werner H, Chantelau EA. Differences in bioactivity between human insulin and insulin analogues approved for therapeutic use — compilation of reports from the past 20 years. *Diabetol Metab Syndr*. 2011;3:13. <https://doi.org/10.1186/1758-5996-3-13>
11. EDQM: Insulin glargine [draft monograph]. *Pharmeuropa Online*. 2011;23:327–28.
12. Шестакова МВ, Викулова ОК. Биосимиляры: презумпция «виновности». *Сахарный диабет*. 2011;(4):91–9. [Shestakova MV, Vikulova OK. Biosimilars: presumption of «guilt». *Sakharny diabet = Diabetes Mellitus*. 2011;(4):91–9 (In Russ.)]
13. Heinemann L, Owens D. Biosimilar insulin and insulin antibodies. *J Diabetes Sci Technol*. 2013;7(4):806–7. PMID: 23911160
14. Gough S. Biosimilar insulins: opportunities and challenges. *Practical Diabetes*. 2013;30(4):146–7a. <https://doi.org/10.1002/pdi.1763>
15. Проскурина ИА, Майоров АЮ, Горячев ДВ, Бунятян НД. 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;19(3):251–9. [Proskurina IA, Mayorov AY, Goryachev DV, Bunyatyan ND. Modern approach to the evaluation of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of biosimilar recombinant human insulin and insulin analogues in phase I clinical study. *Sakharny diabet = Diabetes Mellitus*. 2016;19(3):251–9 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14341/DM2003446-49>

16. Творогова МГ, Яськова КН, Мычка ВБ, Чазова ИЕ. Инсулинорезистентность и методы ее диагностики. *Лабораторная медицина*. 2003;(6):48–52. [Tvorogova MG, Yas'kova KN, Mychka VB, Chazova IE. Insulin resistance and methods of its diagnosis. *Laboratornaya meditsina = Laboratory Medicine*. 2003;(6):48–52 (In Russ.)]
17. Sorensen AR, Stidsen CE, Ribel U, Nishimura E, Sturis J, Jonassen I, et al. Insulin detemir is a fully efficacious, low affinity agonist at the insulin receptor. *Diabetes Obes Metab*. 2010;12(8):665–73. <https://doi.org/10.1111/j.1463-1326.2010.01206.x>
18. Kohn WD, Micanovic R, Myers SL, Vick AM, Kahl SD, Zhang L, et al. pi-shifted insulin analogs with extended *in vivo* time action and favorable receptor selectivity. *Peptides*. 2007;28(4):935–48. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.01.012>
19. Wada T, Azegami M, Sugiyama M, Tsuneki H, Sasaoka T. Characteristics of signalling properties mediated by long-acting insulin analogue glargine and detemir in target cells of insulin. *Diabetes Res Clin Pract*. 2008;81(3):269–77. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2008.05.007>
20. Jonassen I, Havelund S, Ribel U, Plum A, Loftager M, Hoeg-Jensen T, et al. Biochemical and physiological properties of a novel series of long-acting insulin analogs obtained by acylation with cholic acid derivatives. *Pharm Res*. 2006;23(1):49–55. <https://doi.org/10.1007/s11095-005-9047-1>
21. Brunner GA, Sendhofer G, Wutte A, Ellmerer M, Sogaard B, Siebenhofer A, et al. Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of long-acting insulin analogue NN304 in comparison to NPH insulin in humans. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 2000;108(2):100–5. <https://doi.org/10.1055/s-2000-5887>
22. Plank J, Bodenlenz M, Sinner F, Magnes C, Gorzer E, Regittnig W, et al. A double-blind, randomized, dose-response study investigating the pharmacodynamic and pharmacokinetic properties of the long-acting insulin analog detemir. *Diabetes Care*. 2005;28(5):1107–12. <https://doi.org/10.2337/diacare.28.5.1107>
23. Hamilton-Wessler M, Ader M, Dea M, Moore D, Jorgensen PN, Markussen J, et al. Mechanism of protracted metabolic effects of fatty acid acylated insulin, NN304, in dogs: retention of NN304 by albumin. *Diabetologia*. 1999;42(10):1254–63. <https://doi.org/10.1007/s001250051301>
24. Russell WMS, Burch RL. *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen; 1959.
25. Ломин СН, Романов ГА. Анализ гормон-рецепторного взаимодействия. Теоретические и практические аспекты. *Физиология растений*. 2008;55(2):283–99. [Lomin SN, Romanov GA. Analysis of hormone-receptor interaction. Theoretical and practical aspects. *Fiziologiya rasteniy = Plant Physiology*. 2008;55(2):283–99 (In Russ.)]
26. Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, Kristensen C, Jonassen I, Schmid C, et al. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes*. 2000;49(6):999–1005. <https://doi.org/10.2337/diabetes.49.6.999>
27. Sommerfeld MR, Muller G, Tschank G, Seipke G, Habermann P, Kurrle R, et al. *In vitro* metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites. *PLoS One*. 2010;5(3):e9540. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009540>
28. Bahr M, Kolter T, Seipke G, Eckel J. Growth promoting and metabolic activity of the human insulin analogue [Gly^{A21}, Arg^{B31}, Arg^{B32}] insulin (HOE 901) in muscle cells. *Eur J Pharmacol*. 1997;320(2–3):259–65. [https://doi.org/10.1016/S0014-2999\(96\)00903-X](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(96)00903-X)
29. Fawcett J, Tsui BT, Krueer MC, Duckworth WC. Reduced action of insulin glargine on protein and lipid metabolism: possible relationship to cellular hormone metabolism. *Metabolism*. 2004;53(8):1037–44. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2004.02.013>
30. Завьялова МГ, Згода ВГ, Николаев ЕН. Определение роли фосфорилирования белков в развитии заболеваний. *Биомедицинская химия*. 2017;63(2):101–14. [Zavialova MG, Zgoda VG, Nikolaev EN. Analysis of contribution of protein phosphorylation in the development of the diseases. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*. 2017;63(2):101–14 (In Russ.)] <https://doi.org/10.18097/PBMC20176302101>
31. Hansen BF, Danielsen GM, Drejer K, Sorensen AR, Wiberg FC, Klein HH, et al. Sustained signalling from the insulin receptor after stimulation with insulin analogues exhibiting increased mitogenic potency. *Biochem J*. 1996;315(Pt 1):271–9. <https://doi.org/10.1042/bj3150271>
32. Freidenberg GR, Henry RR, Klein HH, Reichart DR, Olefsky JM. Decreased kinase activity of insulin receptors from adipocytes of non-insulin-dependent diabetic subjects. *J Clin Invest*. 1987;79(1):240–50. <https://doi.org/10.1172/JCI112789>
33. Sciacca L, Cassarino MF, Genua M, Pandini G, Le Moli R, Squatrito S, Vigneri R. Insulin analogues differently activate insulin receptor isoforms and post-receptor signalling. *Diabetologia*. 2010;53(8):1743–53. <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1760-6>
34. Черепович ВС, Волочник ЕВ, Антоненко УВ, Лоткова ЕС, Романовская ТВ, Гринева ВВ. Оптимизация критических параметров МТТ-теста для оценки клеточной и лекарственной токсичности. *Медицинский журнал*. 2006;(2):106–8. [Cherepovich VS, Volochnik EV, Antonenko UV, Lotkova ES, Romanovskaya TV, Grineva VV. Optimization of critical parameters of the MTT test to assess cellular and drug toxicity. *Meditsinskiy zhurnal = Medical Journal*. 2006;(2):106–8 (In Russ.)]
35. Rakatzi I, Seipke G, Eckel J. [LysB3, GluB29] insulin: a novel insulin analog with enhanced β -cell protective action. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;310(3):852–9. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.09.090>
36. Хасабов НН, Земскова НА. Биологические лекарственные средства и их биоаналоги: определение, вопросы качества, идентичности и безопасности. *Вестник Росздравнадзора*. 2008;(6):34–8. [Khasabov NN, Zemskova NA. Biological medicinal products and their biosimilars: definition, quality, identity and safety issues. *Vestnik Roszdravnadzora = Bulletin of Roszdravnadzor*. 2008;(6):34–8 (In Russ.)]
37. Спасов АА, Воронкова МП, Чепляева НИ, Проскурина ИА. Доклинические исследования аналогов инсулина. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2012;(4):58–61. [Spasov AA, Voronkova MP, Cheplyayeva NI, Proskurina IA. Preclinical studies of insulin analogues. *Vedomosti Nauchno-go tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2012;(4):58–61 (In Russ.)]

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Батуашвили Тамара Ариеловна, канд. биол. наук. *Tamara A. Batuashvili*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2656-8131>
Симутенко Людмила Васильевна, канд. биол. наук. *Ludmila V. Simutenko*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0003-2373-8756>
Шадрин Павел Валерьевич. *Pavel V. Shadrin*. **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-7143-8227>
Неугодова Наталья Петровна, канд. биол. наук. *Natalia P. Neugodova*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <http://orcid.org/0000-0001-8615-952X>

Статья поступила 29.01.2019
 После доработки 10.04.2019
 Принята к печати 24.05.2019

Article was received 29 January 2019
 Revised 10 April 2019
 Accepted for publication 24 May 2019