

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ФАКУЛЬТЕТ ЕКОЛОГІЧНОЇ БЕЗПЕКИ, ІНЖЕНЕРІЇ ТА ТЕХНОЛОГІЙ
КАФЕДРА БІОТЕХНОЛОГІЇ

ДОПУСТИТИ ДО ЗАХИСТУ
Завідувач випускової кафедри
_____ М.М. Барановський
«__» _____ 2021р.

ДИПЛОМНА РОБОТА

(ПОЯСНЮВАЛЬНА ЗАПИСКА)

ЗДОБУВАЧА ВИЩОЇ ОСВІТИ ОСВІТНЬОГО СТУПЕНЯ «БАКАЛАВР»
СПЕЦІАЛЬНІСТЬ 162 «БІОТЕХНОЛОГІЇ ТА БІОІНЖЕНЕРІЯ»
ОСВІТНЬО-ПРОФЕСІЙНА ПРОГРАМА «ФАРМАЦЕВТИЧНА БІОТЕХНОЛОГІЯ»

**Тема: «Встановлення структур білку при доведенні біосимілярності
біофармацевтичних препаратів білкової природи»**

Виконавець: студентка 4 курсу ФЕБІТ

Савченко М.О.

Керівник: к.ф.–м.н. доцент

Чубко Л.С.

Нормоконтролер:.

Дражнікова А.В.

КИЇВ 2021

НАЦІОНАЛЬНИЙ АВІАЦІЙНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

Факультет екологічної безпеки, інженерії та технологій

Кафедра біотехнології

Спеціальність 162 «Біотехнології та біоінженерія»

ОПП: «Фармацевтична біотехнологія»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ М.М. Барановський

«___» _____ 2021 р.

ЗАВДАННЯ

на виконання дипломної роботи

Савченко Марії Олександрівни

1. Тема дипломної роботи: **«Встановлення структур білку при доведенні біосимілярності біофармацевтичних препаратів білкової природи»** затверджена наказом ректора від «11» травня 2021 р. № 715/ст.
2. Термін виконання роботи: з «10» травня 2021 р. по «20» червня 2021 р. 3. Вихідні дані роботи: біосиміляри, референтний біологічний лікарський препарат, структура білку біофармацевтичні препарати білкової природи.
4. Зміст пояснювальної записки: ВСТУП; РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД; РОЗДІЛ 2. БІОСИНТЕЗ ІНСУЛІНУ ТА ЙОГО АНАЛОГІ; РОЗДІЛ 3 МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОСИМІЛЯРІВ; ВИСНОВКИ; СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.
5. Перелік обов'язкового графічного (ілюстративного) матеріалу: 9 таблиць рисунків.

6. Календарний план-графік

| № | Завдання | Термін виконання |
|---|--|-------------------|
| 1 | Вибір теми дипломної роботи, узгодження змісту з дипломним керівником | 11.05- 12.05.2021 |
| 2 | Літературний огляд та збір інформації за темою дипломної роботи; «Встановлення структур білку при доведенні біосимілярності біофармацевтичних препаратів білкової природи» | 12.05.-15.05.2021 |
| 3 | Складання плану виконання бакалаврської дипломної роботи | 16.05-17.05.2021 |
| 4 | Написання розділу 2 «МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ» | 17.05-19.05.2021 |
| 5 | Написання розділу 3 «МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОСИМІЛЯРІВ» | 19.05-21.05.2021 |
| 6 | Формулювання висновків та рекомендацій | 21.05-26.05.2021 |
| 7 | Перевірка дипломної роботи керівником | 27.05-30.05.2021 |
| 8 | Попередній захист дипломної роботи | 01.06.2021 |
| 9 | Захист дипломної роботи | 16.06.2021 |

8. Дата видачі завдання «11» травня 2021 р.

Керівник дипломної роботи

(підпис керівника)

/Чубко Л.С./

Завдання прийняв до виконання

(підпис випускника)

Савченко М.О.

РЕФЕРАТ

Пояснювальна записка до дипломної роботи «Встановлення структур білку при доведенні біосимілярності біофармацевтичних препаратів білкової природи»: 72 сторінок, 9 таблиць, 11 рисунків, 40 використаних джерел.

Об'єкт дослідження: білкова структура препаратів інсуліну.

Предмет дослідження: біосиміляр

Методи дослідження: мікробіологічні, аналітичні.

Зроблений порівняльний аналіз оригінальних біологічних лікарських препаратів, біосимілярів і дженериків. Проведено розширений пошук технологій отримання біосимілярів інсуліну. Досліджені причини відмінності у будові біосимілярів і оригінальних біологічних лікарських препаратів. Зроблені висновки щодо застосування біосимілярів у медичній практиці.

Основними положеннями, що викладені в даній роботі, є сучасні дослідження біосимілярів, та визначення можливості заміни біосимілярами оригінальних біологічних лікарських препаратів.

*БІОСИМІЛЯРИ, БІОТЕХНОЛОГІЯ, БІОТЕХНОЛОГІЧНІ ПРЕПАРАТИ,
ДЖЕНЕРИКИ, ІНСУЛІН.*

СПИСОК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

ЦД - цукровий діабет

НПХ - інсулін - нейтральний протамін Хагедорна (ізофан-інсулін, НПХ-інсулін)

ХЛЗ - Низькомолекулярні синтезовані лікарські засоби («звичайні», «хіміосинтетичні», «хімічні лікарські засоби») - лікарські засоби, що отримуються шляхом послідовних стадій хімічного синтезу.

БЛЗ - біологічний лікарський засіб (біосиміляр)

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП | 8 |
| РОЗДІЛ 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД | 9 |
| 1.1. Низькомолекулярні синтетичні лікарські засоби біотехнологічні лікарські препарати – характерні особливості. | 9 |
| 1.2. Відмінності в будові діючої речовини ХЛЗ і БЛЗ | 10 |
| 1.3. Відмінності в технології виробництва ХЛЗ і БЛЗ | 11 |
| 1.4. Біосиміляри і дженерики: принципові відмінності. | 12 |
| 1.5. Порівняння молекули синтетичного і біотехнологічних препаратів..... | 15 |
| 1.6. Законодавча база реєстрації біосимілярів..... | 17 |
| 1.7. Висновок до розділу 1..... | 21 |
| РОЗДІЛ 2. БІОСИНТЕЗ ІНСУЛІНУ ТА ЙОГО АНАЛОГІВ. | 22 |
| 2.1. Історичний нарис..... | 22 |
| 2.2. Хімічний амінокислотний склад інсуліну. | 24 |
| 2.3. Біосинтез інсуліну. | 24 |
| 2.4. Особливості синтезу біотехнологічних препаратів..... | 29 |
| 2.5. Біосиміляр - як версія оригінального біопрепарату | 31 |
| 2.6. Біосиміляри людського інсуліну та його аналогів: підтвердження відповідності. | 32 |
| 2.7. Варіабельність дії аналогів інсуліну і біосимілярів. | 35 |
| 2.8. Імуногенна і мітогенна активність аналогів інсуліну і біосимілярів..... | 38 |
| 2.9. Висновок до розділу 2..... | 40 |
| РОЗДІЛ 3. МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОСИМІЛЯРІВ..... | 41 |
| 3.1. Протидіабетична терапія. | 41 |
| 3.2. Сучасна класифікація інсулінів | 42 |
| 3.3. Порівняльна характеристика інсулінів | 42 |
| 3.4. Класифікація інсулінів..... | 43 |

| | |
|--|----|
| 3.5. Отримання інсуліну генно-інженерним методом | 45 |
| 3.6. Біотехнологічний процес виробництва рекомбінантних і аналогових інсулінів | 48 |
| 3.7. Схема виробництва біосимілярів..... | 48 |
| 3.8. Імуногенність..... | 50 |
| 3.9. Біосиміляри інсуліну..... | 51 |
| 3.10. Характеристика біотехнологічних препаратів..... | 56 |
| 3.11. Специфіка біотехнологічного виробництва | 56 |
| 3.12. Метод достовірної оцінки біотехнологічних продуктів, ефективності та безпеки їх застосування..... | 58 |
| 3.13. Висновки до розділу | 61 |
| ВИСНОВКИ..... | 62 |
| СПИСОК БІБЛІОГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ... | 63 |

ВСТУП

Сьогодні зареєстровано понад 200 біотехнологічних лікарських засобів, тисячі нових препаратів вивчаються в клінічних дослідженнях і близько 300 з них знаходяться на завершальних стадіях досліджень. Близько половини всіх розроблюваних в світі препаратів - це біотехнологічні лікарські засоби.

Біотехнологічні препарати перевернули уявлення людства про можливості медицини, оскільки вони відкрили шляхи лікування захворювань, які ще недавно вважалися повністю невиліковними. Пацієнти з такими страшними діагнозами, як онкологічні захворювання, діабет, розсіяний склероз, хронічна хвороба нирок в стадії ниркової недостатності і інші, отримали можливість повністю вилікуватися або істотно підвищити якість життя і збільшити її тривалість.

Перші покоління біотехнологічних препаратів представляли собою продукти тваринного або рослинного походження, наприклад, бичачий інсулін, стрептокіназа та інші. Потім з'явилися продукти людського походження - гормон росту, антигемофільний фактор VIII. Першим біотехнологічним лікарським засобом став рекомбінантний людський інсулін, випущеним на фармацевтичний ринок в 1982 році.

Сьогодні під біотехнологічними лікарськими засобами в зарубіжній практиці (наприклад, згідно з документами Європейського медичного агентства, ЕМА - European Medicines Agency) маються на увазі імунобіологічні лікарські засоби, вироблені за допомогою генної інженерії. Зокрема, при їх виробництві застосовується технологія рекомбінантних ДНК, метод контрольованої експресії генів і інші. Переважна більшість застосовуваних сьогодні біотехнологічних препаратів є рекомбінантні білки, отримані методом генної інженерії.

РОЗДІЛ 1

ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

В перших документах Європейського фармацевтичного кодексу, біосіміляри були віднесені до "подібних біологічних лікарських засобів" ("*similar biological medicinal product*").

Основою БЛП є речовина, отримана за допомогою біотехнологій [1-2]. Визначення біосіміляра дається в директиві Євросоюзу 2003 року.

Біосіміляр - сполука, схожа з оригінальними ліками, зареєстрованими після закінчення терміну дії патенту оригінального препарату. В онкології БЛЗ з групи моноклональних антитіл діють сильніше, ніж хіміотерапія [2- 4]. Крім того, лікування БЛЗ немає таких побічних ефектів, як хіміопрепарати.

БЛЗ належать до дорогих ліків завдяки високотехнологічним схемам отримання. Заміна БЛП на біосіміляри зробить лікі більш доступними.

Закінчення патентного захисту БЛЗ надає можливість виходу на ринок їх відтворених копій [4]. У зв'язку з цим питання про взаємозамінність оригінальних і відтворених БЛЗ має актуальність.

1.1. Низькомолекулярні синтетичі лікарські засоби і біотехнологічні лікарські препарати – характерні особливості

Оригінальний (інноваційний) препарат - це лікарський препарат, який вперше в світі був зареєстрований на підставі повної документації, що стосується його ефективності, безпеки та якості (повного реєстраційного досьє) [4-5].

Оригінальний лікарський препарат в залежності від технології виробництва може бути як хіміосинтетичним, так і біотехнологічним.

Низькомолекулярні синтезовані лікарські засоби («звичайні», «хіміосинтетичні», ХЛЗ) - лікарські засоби, що отримуються шляхом послідовних стадій хімічного синтезу.

Високотехнологічні (біотехнологічні) лікарські препарати - це лікарські препарати, що містять діючі речовини, отримані за допомогою методів біотехнології, таких як: генна інженерія, клітинна інженерія, гібридомні технології, інженерна ензимологія, інженерна імунологія [5].

Між БЛЗ і звичайними ХЛЗ існують значні відмінності як в будові, так і в технології виробництва.

1.2. Відмінності в будові діючої речовини ХЛЗ і БЛЗ

Розміри: молекули БЛЗ значно більше звичайних ХЛЗ.

Так, молекулярна маса ацетилсаліцилової кислоти 180, еритропоетину - 18 400, а ритуксимабу - 150 000.

Структура:

- Молекули ХЛЗ відносно прості, їх властивості практично повністю визначаються атомарним складом.

- Молекули БЛЗ мають вторинну (складаються з двох ланцюгів), а також складну просторову третинну і четвертинних структуру.

Наприклад, в препараті Пегасіс молекула інтерферону є димер, що складається з двох ланцюгів розгалуженого монометоксі-ПЕГ-білка, з'єднаного з інтерфероном альфа-2а.

Молекула ритуксимабу (препарат Мабтера), який відноситься до імуноглобулінів класу G1, складається з двох легких (по 213 амінокислот) і двох важких (по 451 амінокислоті) поліпептидних ланцюгів, з'єднаних між собою дісульфідними зв'язками [5].

Здатність до ізомеризації - зміни просторової будови хімічної речовини при збереженні сталості його складу - властивість абсолютної більшості молекул.

Ізомери однієї і тієї ж хімічної сполуки за рахунок різної просторової структури мають неоднакову спорідненість до відповідних молекул організму людини («ключ не відповідає замку»), як наслідок - володіють різною ефективністю і безпекою.

Наприклад, лівообертаючий ізомер амлодипіну має гіпотензивну активність в 1000 разів більшою, ніж правообертальний ізомер.

Правообертальні ізомер морфіну не має знеболюючої дії.

Чим більша і складніша молекула, тим більше варіантів просторової структури вона може мати. У такої простої хімічної сполуки, як ацетилсаліцилова кислота, всього кілька ізомерів. Холестерин може утворювати 256 оптичних ізомерів, з яких тільки один володіє біологічною активністю. Для ритуксимабу потенційно можливе існування близько 285млн просторових ізомерів [5-7].

Посттрансляційна модифікація і гетерогенність. Для складних білкових молекул БЛЗ також властиві посттрансляційна модифікація і гетерогенність. Молекула білка може трансформуватися за рахунок внутрішньо молекулярних зшивок, олігомеризації, а також приєднання різних груп (глікозилування, сульфування, фосфорилування) [6]. Найбільша гетерогенність характерна для складних глікозильованих білків. БЛЗ ритуксимабу може містити до 108 різних глікозильованих варіантів однієї і тієї ж молекули. Глікозилування БЛЗ значимо впливає на його біологічну активність [5,8].

Унікальна просторова структура молекул БЛЗ, яка визначає їх біологічну активність і терапевтичний ефект, здатність зберігати стабільність і викликати імунні реакції, істотно залежить від особливостей технологічного процесу виробництва БЛЗ і схильна до змін при найменшій його модифікації.

1.3. Відмінності в технології виробництва ХЛЗ і БЛЗ

ХЛЗ виробляють шляхом хімічного синтезу. Кожна стадія відома і описана у відповідному патенті. Кількість стадій невелика (наприклад, для ацетилсаліцилової кислоти - 1 стадія, глімепіриду - 4), процес синтезу триває відносно недовго - кілька

годин. При належних умовах виробництва всі стадії синтезу можуть бути чітко відтворені.

БЛЗ виробляють при безпосередній участі живих організмів з використанням генно-інженерних та клітинних методів, технологій створення і використання генетично трансформованих біологічних об'єктів.

Виробництво моноклональних антитіл за технологією рекомбінантної ДНК складається з безлічі складних послідовних стадій і триває 8-9 місяців.

1.4. Біосиміляри і дженерики: принципові відмінності

Істотні відмінності між оригінальними ХЛЗ і БЛЗ пояснюють відмінності між їх відтвореними копіями. Різниця закріплена вже в самій термінології.

Копії синтетичних низькомолекулярних лікарських препаратів називаються генериками, а копії БЛЗ - Біосиміляр референтний рітуксімаб амі.

Генеричний лікарський препарат (дженерик) - лікарський препарат, який має той самий кількісний та якісний склад діючих речовин і ту ж лікарську форму, що й референтний препарат, і чия взаємозамінність з референтним препаратом доведена відповідними дослідженнями [6].

Подібний біологічний лікарський препарат (біосиміляр) - біологічний лікарський препарат, подібний по ефективності, безпечності та якості зареєстрованому референтного біологічного лікарського препарату, період патентного захисту якого закінчився [5,9].

Поняття «дженерик» не застосовується до копій БЛЗ, так як між дженериками і біосимілярами є принципова відмінність в ступені їх схожості з референтними (оригінальними) препаратами.

При дотриманні певних умов - належній якості діючої субстанції, допоміжних речовин і технології виробництва - дженерик може бути практично ідентичний оригіналу. Підтвердження біоеквівалентності (схожості фармакокінетичних

параметрів оригінального і генеричного препарату) є достатньою підставою для визнання можливості взаємозаміни препаратів.

Відносно біосимілярів ситуація принципово інша.

Біосиміляр ніколи не може бути ідентичний до референтного препарату - він може бути тільки подібний до нього. Саме подібний, але не ідентичний.

Біосиміляри схожі на оригінальні БЛЗ за такими параметрами:

- однакова молекула (маса, набір амінокислот);
- однакове походження (біотехнологічний процес).

Біосиміляри відрізняються від референтних БЛП за такими параметрами:

- різні штами живих клітин,
- різні поживні середовища,
- різні технологічні цикли виробництва,
- різні способи очищення «діючої» молекули від компонентів цитоплазми клітини, що виробляє біологічний лікарський препарат.

Біосиміляри не можуть відтворювати оригінальні БЛЗ на 100%, отже, не можна виключити відмінності у властивостях - ефективності і безпеки біосимілярів і референтних препаратів.

Біосимілярам, як і оригінальним БЛЗ, властива гетерогенність. Так само, як виробник оригіналу, виробник копії (біосиміляра) повинен мати весь обсяг даних по кожному етапу виробництва - від власного банку клітин і процесу виробництва, включаючи найважливіші проміжні продукти, до системи внутрішнього контролю і стандартів.

Але у нього немає доступу до даних про оригінальний БЛЗ, його клітинних субстратів і банку клітин, найважливішим проміжним продуктом, референтним стандартом, комплексним і поетапним методам аналізу продукції, до еталонних зразків якості оригінального БЛЗ.

Експериментальні дані свідчать про те, що точно повторити будь-який з етапів виробництва БЛЗ, не знаючи протоколу, практично неможливо.

Виробник біосиміляра створює і патентує свій варіант отримання рекомбінантних ДНК, свій штам клітин, живильне середовище для клітинної культури та ін. Тому така висока ймовірність відмінностей між оригінальним БЛЗ і його біосимілярами.

Однією з найбільш серйозних проблем безпеки терапії біосимілярами є імуногенність - потенційна можливість розвитку імунних реакцій.

Сучасні методи не завжди можуть повністю ідентифікувати всі нюанси будови молекули БЛЗ і його біосиміляра, визначити домішки, що містяться в дуже малих кількостях. Таким чином, імунна система може формувати відповідь, обумовлену невеликими відмінностями в структурі діючої речовини референтного БЛЗ і біосиміляра, що не були виявлені за допомогою доступних методів. Це важливо враховувати ще й тому, що імуногенність БЛЗ може привести до тяжких побочних ефектів, а також до резистентності пацієнта до цілого класу препаратів [6].

Таким чином, біосиміляри не можна ототожнювати з дженериками: так само, як їх прототипи - оригінальні БЛЗ - біосиміляри характеризуються набагато більш складною структурою і технологією виробництва, а також гетерогенність і імуногенність, ніж низькомолекулярні лікарські препарати, створені шляхом хімічного синтезу.

Те, що біосиміляри не ідентичні, а тільки подібні оригінальним препаратам, означає, що їх рівна клінічна ефективність і безпека може бути доведена лише при проведенні порівняльних клінічних досліджень «*head-to-head*». Якщо такі дослідження не проводилися, говорити про рівну клінічної ефективності та безпеки біосиміляра і оригінального БЛЗ не можна категорично [7].

Так, наприклад, вивчено якість, ефективність і безпеку 47 біоаналогів еритропоєтину, вироблених різними фармкомпаніями в 16 країнах світу. Встановлено, що рН 9 зразків і осмолярність 21 препарату перевищували допустимі норми. За вмістом білка 1 зразок не відповідав специфікації по концентрації загального білка, і в 8 препаратах його рівень був вищий за норму. При оцінці

ефективності (на мишах) 9 зразків не відповідали нормі, а 6 - перевищували межі допустимих норм. У 2 зразках виявлено бактеріальний ендотоксин [8].

1.5. Порівняння молекули синтетичного і біотехнологічних препаратів

Молекула диклофенаку наведена на рис.1.1.

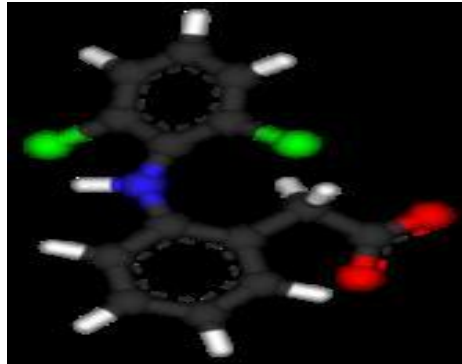


Рис. 1.1 Диклофенак

Таблиця 1.1

Диклофенак

| | |
|-----------------------|---------------------|
| Назва | Диклофенак |
| Тип сполуки | Синтетична молекула |
| Вага молекули | 318 Дальтон |
| Кількість амінокислот | 0 |

Молекула Кальцитоніну рис. 1.2



Рис.1.2. Кальцитонін

Кальцитонін

| | |
|-----------------------|------------------------------------|
| Назва | Кальцитонін |
| Тип сполуки | Прості біопрепарати |
| Вага молекули | 3455 Дальтон |
| Кількість амінокислот | 32 |
| Виробляється | без модифікації клітки-хозяїна |
| Форма випуску | виробляється в дріжджах, бактеріях |

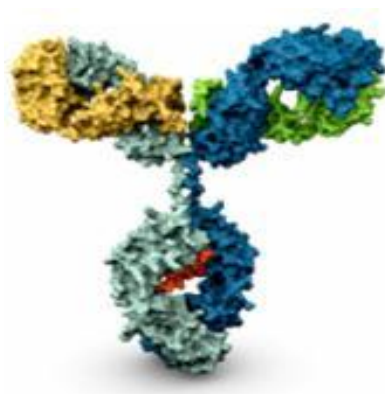


Рис. 1.3. Моноклональні антитіла (IgG)

Моноклональні антитіла (IgG)

| | |
|-----------------------|--|
| Назва | Моноклональні антитіла (IgG) |
| Тип сполуки | Складні біопрепарати |
| Вага молекули | 150 000 Дальтон |
| Кількість амінокислот | 1300 |
| Виробляється | з модифікацією клітини-господаря (Гликозилювання і т.д.) |
| Місце утворення | Виробляється в клітинах ссавців |

В таблиці 1.4 представлено порівняння молекули синтетичного і біотехнологічних препаратів.

Порівняння молекули синтетичного і біотехнологічних препаратів.

| Характеристики молекули | Хімічний препарат | Біотехнологічний препарат |
|---------------------------------|------------------------------------|---|
| Розмір молекули | 300–1000 Да | До 150 000 Да |
| Складність | Проста молекула, немає амінокислот | Первинна, вторинна, третинна, четвертинна структура: понад тисячу амінокислот в первинній структурі поліпептидного ланцюга + додаткові молекули (наприклад, цукру), складна просторова конфігурація |
| Стабільність | Стабільний | Часто нестабільний, стабільність залежить від безлічі умов |
| Модифікації | Певна молекула | Багато варіантів, що розрізняються за властивостями, ефективністю та безпекою |
| Виробництво | Передбачуваний хімічний синтез | Складний процес |
| Контроль якості | Менше 500 тестів | Більше 2000 тестів |
| Характеризація продукту | Легко здійсненна | Дуже складна, так як це суміш близькоспоріднених молекул |
| Створення ідентичного препарату | Можливе | Скрутно в зв'язку зі складністю будови молекули і складністю процесу виробництва |

1.6. Законодавча база реєстрації біосимілярів

Не всі біосиміляри однакові. Виробництво біотехнологічного лікарського засобу - дуже складний процес, який триває зазвичай більше 10 років. У створенні

нового біотехнологічного препарату беруть участь сотні фахівців, а вартість його виробництва досягає мільярда доларів.

Процес виробництва біотехнологічного препарату дуже складний. Для створення білка, який буде використаний в якості діючої речовини в біотехнологічному препараті, використовується унікальна лінія живих клітин.

Процес виробництва включає більше 5000 критичних етапів, а для контролю якості препарату використовується понад 2000 тестів.

При виробництві біосиміляра точно відтворити всю складну технологію виробництва діючої речовини дуже складно.

Процес виробництва унікальний, і відмінності на кожному етапі можуть впливати на ефективність і безпеку препарату. У кожному виробничому процесі використовують свою оригінальну комбінацію розчинників, ферментів, матеріалів для буферних розчинів.

В результаті в отриманій діючій речовині залишаються індивідуальні «відбитки» домішок. Практично неможливо створити два абсолютно ідентичних банку клітин для виробництва препарату.

Також на якість кінцевого продукту може вплинути будь-яка зміна умов культивування клітин, методи очищення речовини та інші етапи виробництва. У підсумку на виході біосиміляр повинен бути дуже схожим з оригінальним препаратом.

В Євросоюзі на сьогоднішній день детально опрацьовано законодавство, яке регламентує допуск в сферу медичного застосування біотехнологічних препаратів і їх відтворених копій - біосимілярів.

Не всі біосиміляри, які надаються для реєстрації в Євросоюзі, проходять етапи експертизи до кінця. Наприклад, ЕМА в 2007 році відмовило в реєстрації трьом біоаналогам інсуліну, виробленим компанією Marvel, також було відмовлено в реєстрації препарату «Інтерферон альфа» компанії Bio Partners.

До чого може привести зміни структури діючої речовини в біотехнологічних препаратах?

Наслідки можуть бути дуже серйозними - від зниження ефективності препарату до виникнення алергічних реакцій.

Наприклад, в 2008 році було опубліковано дослідження рекомбінантних еритропоєтинів, яке виявило, що деякі біосиміляри цього препарату мали іншу фармакокінетику, швидкість виведення з організму, біологічну та терапевтичну активність і імуногенність [8,10].

Європейське медичне агентство (EMA) розробило жорсткі вимоги до реєстрації біосимілярів. В Євросоюзі для отримання реєстрації біосиміляра необхідно провести практично такий же обсяг досліджень, як і для оригінального препарату. Виробник повинен довести, що ефективність, профіль безпеки і рівень імуногенності препарату можна порівняти з відповідним оригінальним препаратом. Для цього необхідно провести доклінічні дослідження, клінічні дослідження, дослідження імуногенності і ін.

EMA розробило спеціальні вимоги для реєстрації препаратів навіть за окремими групами біосимілярів: соматостатин, еритропоєтин, інсуліни, гепарини, інтерферони та ін.

З метою однозначної ідентифікації жорсткі вимоги застосовуються і до присвоєння назв біосимілярів. Крім того, експерти в ЄС вважають, що заміна оригінального препарату на біосиміляр повинна бути обґрунтована, вона не може проводитися автоматично як синонімічна заміна. Остаточне рішення про застосування біосиміляра приймає лікар під свою відповідальність.

Спеціальні процедури експертизи та допуску біосимілярів в сферу медичного застосування розроблені і в інших країнах, наприклад в Австралії, Малайзії, Туреччини, Японії, Ізраїлі, Канаді, Південній Кореї та ін.

Флагманами у сфері регулювання процесу розробки і виведення на ринок біосимілярів є Європейське агентство з лікарських засобів (European Medicines Agency - EMA) і Управління з контролю за харчовими продуктами і лікарськими засобами США (Food and Drug Administration - FDA).

У 2013-2014 рр. Державним експертним центром МОЗ України розроблено та затверджено блок нормативних документів, що стосуються всього кола питань, пов'язаних з фармацевтичною розробкою, визначенням якості та стабільності біотехнологічних продуктів, необхідних критеріїв порівнянності БЛЗ при змінах в технології виробництва.

Розроблено детальні методичні рекомендації, в яких розглянуті особливості біотехнологічних продуктів і біосимілярів, принципи доклінічного і клінічного вивчення [9].

Особливу увагу слід приділяти питанням фармаконагляду за застосуванням біосимілярів. Рутинний фармаконагляд - обов'язкова умова перебування біосиміляра на фармацевтичному ринку [14-19]. Він передбачає збір спонтанних повідомлень про несприятливі побічні реакції і подачу звітів з безпеки, які регулярно оновлюються (Periodic Safety Update Report - PSUR).

Для всіх біосимілярів повинен складатися план управління ризиками - програма довгострокового контролю безпеки терапії, спрямована на виявлення всіх клінічно значущих ознак імуногенності та інших несприятливих побічних реакцій після реєстрації препарату [9].

При цьому для адекватного обліку інформації по побічних ефектів необхідно використовуватись не міжнародна непатентована назва, а торгова назва препарату.

Всі зазначені документи розроблені в повній відповідності з положеннями, прийнятими в ЄС і закріпленими в «Керівництві по подібним біологічним лікарським препаратам, які містять в якості активних речовин білки, отримані методом біотехнології: питання якості» [10].

В нормативних документах МОЗ України чітко зазначено, що «... на відміну від стандартного генеричного підходу, простого порівняння біосиміляра з загальнодоступним стандартом недостатньо для доказу їх схожості. Біосиміляри повинні продемонструвати свою подобу референтного лікарського препарату, зареєстрованому відповідно до повного реєстраційного досьє. Таким чином, для наявних принципових відмінностей біосимілярів від генериків необхідний зовсім

інший підхід до контролю якості, вимогам до реєстрації, фармаконадзору і особливо взаємозамінності БЛП.

Аналіз світового фармацевтичного ринку свідчить, що різниця у вартості оригінального БЛЗ і якісного біосиміляра не перевищує 10-15%. Більш значне зниження вартості біосиміляра вимагає пильної уваги до питання досягнення такого здешевлення [11].

1.7. Висновок до розділу 1

Основною відмінністю біотехнологічних лікарських препаратів (БЛП) є їх висока специфічність. Дані систематичних оглядів і метааналізу переконливо свідчать про достовірно більш високу ефективність лікування БЛП в порівнянні зі звичайними лікарськими препаратами [26, 32]. Так, наприклад, показано, що БЛП рітуксімаб є найбільш ефективним і безпечним препаратом для лікування ревматоїдного артриту, починаючи з самих ранніх етапів захворювання. В онкології БЛП з групи моноклональних антитіл ефективні навіть у разі резистентності до всіх інших хіміопрепаратів, що застосовуються при певному типі пухлини [12, 13, 15-17]. Крім того, таргетная терапія БЛП в більшості випадків не супроводжується такими значними побічними ефектами, які притаманні хіміопрепаратів. Можна з упевненістю стверджувати, що подальший прогрес в лікуванні цілої низки захворювань, в першу чергу онкологічних, буде багато в чому залежати від можливості застосування БЛП, більш ефективних і безпечних, вибірково діючих на патологічні процеси в організмі [15, 35].

На сьогодні більшість БЛП є оригінальними препаратами. Складність процесу їх розробки і виробництва обумовлює високу вартість даних лікарських засобів. Стандартний шлях вирішення проблеми доступності сучасних ліків для широких верств населення - заміна оригінальних препаратів на більш дешеві відтворені копії. Закінчення термінів патентного захисту цілого ряду оригінальних БЛП надає можливість виходу на ринок їх відтворених копій [19, 23].

РОЗДІЛ 2

БІОСИНТЕЗ ІНСУЛІНУ ТА ЙОГО АНАЛОГІВ

2.1. Історичний нарис

У 1899р. Йозеф фон Мерінг і Мінковський показали, що видалення підшлункової залози у собак призводить до розвитку важких порушень обміну глюкози з підвищенням її концентрації в крові і клінічною картиною цукрового діабету. Припущення про те, що цей ефект є наслідком випадання дьг необхідного гормону, було підтверджено в 1921 р, коли Бантінг і Бест приготували екстракт підшлункової залози, здатний знижувати рівень цукру в крові. Ця речовина, назване інсуліном, було отримано в кристалічному вигляді Абелем в 1926 р Sanger визначив амінокислотний склад інсуліну - першого білка, послідовність якого була повністю розшифрована. У 1965 р Katsoyannis зумів здійснити хімічний синтез інсуліну. У 1969 р. за допомогою методик рентгенодифракції була визначена тривимірна структура інсуліну. Steiner в 1967 р виявив проінсулін - біологічний попередник інсуліну більшого розміру. Пізніше за допомогою методів рекомбінації ДНК вдалося домогтися синтезу інсуліну бактеріями.

2.2. Амінокислотний склад інсуліну

Молекула інсуліну складається з двох поліпептидних ланцюгів, що позначають як А- і В-ланцюги, з'єднані двома дисульфідними містками.

Крім того, є дисульфідний місток між 6-м і 11-м амінокислотним залишком А-ланцюга (рис. 2.1.).

Молекула інсуліну містить 51 амінокислоту і володіє відносною молекулярною масою 5800 та ізоелектричною точкою 5,35; 1 мг чистої речовини містить 24 МЕ.

Амінокислотний склад інсуліну у різних видів сталий, за винятком залишків в положеннях 4, 8, 9 і 10 А-ланцюга і 1, 2, 3, 27, 29 і 30 В-ланцюга.

Найчастіше інсуліни, що застосовують у клінічних цілях - гормони, що екстрагуються з підшлункової залози свиней і великої рогатої худоби.

Свинячий інсулін відрізняється від гормону людини тільки присутністю аланіну замість треоніну в термінальному положенні В-ланцюга, тоді як між бичачим і людським інсуліном існують ще дві відмінності [в 8-му (аланін) і 10-му (валін) положеннях А-ланцюга] (див. рис. 2.1.). Згідно з результатами рентгенокристаллографічних досліджень одинична комірка кристалічного свинячого інсуліну складається з інсулінового гексамеру, що побудований з трьох димерів, розташованих навколо осі, на якій лежать два атома цинку.

Вміст цинку в більшості кристалічних препаратів інсуліну становить приблизно 0,4-0,5%. У слабких розчинах інсулін адсорбується на склі або пластмасі (наприклад, на стінках системи для внутрішньовенних інфузій). Цю адсорбцію вдається звести до мінімуму шляхом додавання альбуміну.

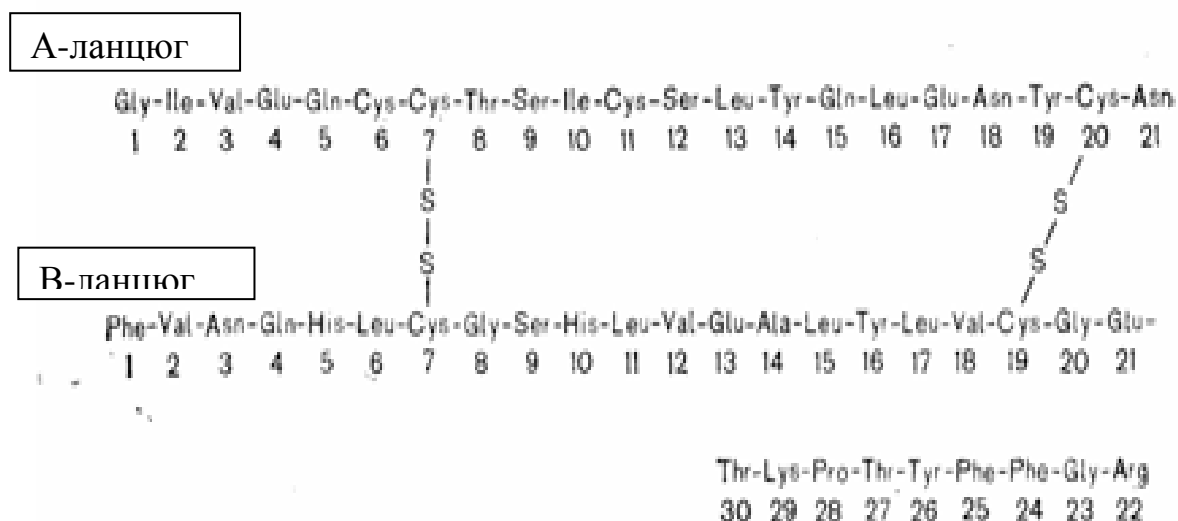


Рис. 2.1. Амінокислотна послідовність інсуліну людини

Свинячий інсулін в якості термінальної амінокислоти В-ланцюга містить не треонін, а аланін.

Відмінність бичачого інсуліну в тому, що містить аланін в положенні 30 В-ланцюга, а також аланін (замість треоніна) в положенні 8 і валін (замість ізолейцина) в положенні 10 А-ланцюга.

Розщеплення інсуліну на його складові А - і В - ланцюги шляхом окислення або відновлення дисульфідних містків призводить до повної втрати їм біологічної активності.

З іншого боку, видалення амідної групи аспарагіну на карбоксильному кінці А-ланцюга або термінального аланіну В-ланцюга практично не впливає на активність молекули інсуліну.

При видаленні всього аспарагіну (або аспартату) з карбоксильного кінця А-ланцюга і аланіну з відповідної ділянки В-ланцюга втрачається приблизно 95% активності гормону.

Видалення послідовності з 8 амінокислот (з 23-го по 30-й залишок) з карбоксильного кінця В-ланцюга (інсулін-дезоксиаптапептид) за допомогою трипсिनного гідролізу призводить до зникнення всієї визначної активності.

Вважається, що ділянка між 22-м і 26-м залишком В-ланцюга має визначальне значення для зв'язування інсуліну з його рецептором, як і для дії інсуліну взагалі.

2.3. Біосинтез інсуліну

Інсулін має багатогранний вплив на обмін речовин практично у всіх тканинах.

Інсулін синтезується у вигляді одноланцюжкових попередників - проінсуліну з молекулярною масою близько 9000 [12].

Сучасні дослідження на безклітинних системах показують, що найближчим продуктом транскрипції проінсулінової мРНК є більший пептид з молекулярною масою 11 500, що містить 23 додаткових амінокислотних залишків на амінокінці молекули.

Цей попередник отримав назву препроінсуліну, і вважають, що він швидко (протягом декількох хвилин після синтезу) розщеплюється мікросомними протеазами до проінсуліну. Додатковий пептид в препроінсуліну за своїм розміром, вмістом окремих амінокислот і положенню на амінокінці схожий з додатковими послідовностями, знайденими в продуктах трансляції *in vitro* мРНК різних гормонів, таких, як пропаратіреоїдний гормон і гормон росту, так само, як і негормональних білків, таких, як легкі ланцюги імуноглобулінів [13].

Проінсулін є спіральною молекулою, в якій А- і В-ланцюги складають єдину послідовність за рахунок з'єднувального пептиду (С-пептиду), що складається з 26-31 амінокислотних залишків (рис. 2.1.). Якщо амінокислотні послідовності А- і В-ланцюгів у різних видів мають невеликі відмінності, то будова відповідних С-пептидів різниться набагато більше.

Так, інсулін свині відрізняється від інсуліну людини тільки однією амінокислотою, тоді як С-пептид людини - ланцюг з 23 амінокислотних залишків з молекулярною масою 3021 - відрізняється від свинячого С-пептиду 10 залишками і містить на 2 амінокислоти менше [14]. Настільки висока «Мутабельність» узгоджується з відсутністю у С-пептиду специфічної гормональної функції.

Ген проінсуліну представлений у верхній частині рисунка. Ці гени містять інтрони, продукти яких виключаються зі складу зрілої мРНК.

Транскрипція препроінсулінової мРНК вимагає присутності ферменту РНК-полімерази. Ця мРНК служить матрицею для утворення ланцюгів препроінсуліну на полірибосомі.

Препроінсулін розщеплюється до проінсуліну (середня частина малюнка), який потім переноситься в апарат Гольджі (пластинчастий комплекс), де і відбувається його перетворення в інсулін [14].

Хоча проінсулін виявляє невелику перехресну реакцію з антитілами до інсуліну, він володіє всього 3-5% від біологічної ефективності нативного інсуліну, Не ясно, чи належить ця невелика біологічна, активність безпосередньо проінсуліну, або вона обумовлена його перетворенням тканинами-мішенями в інсулін.

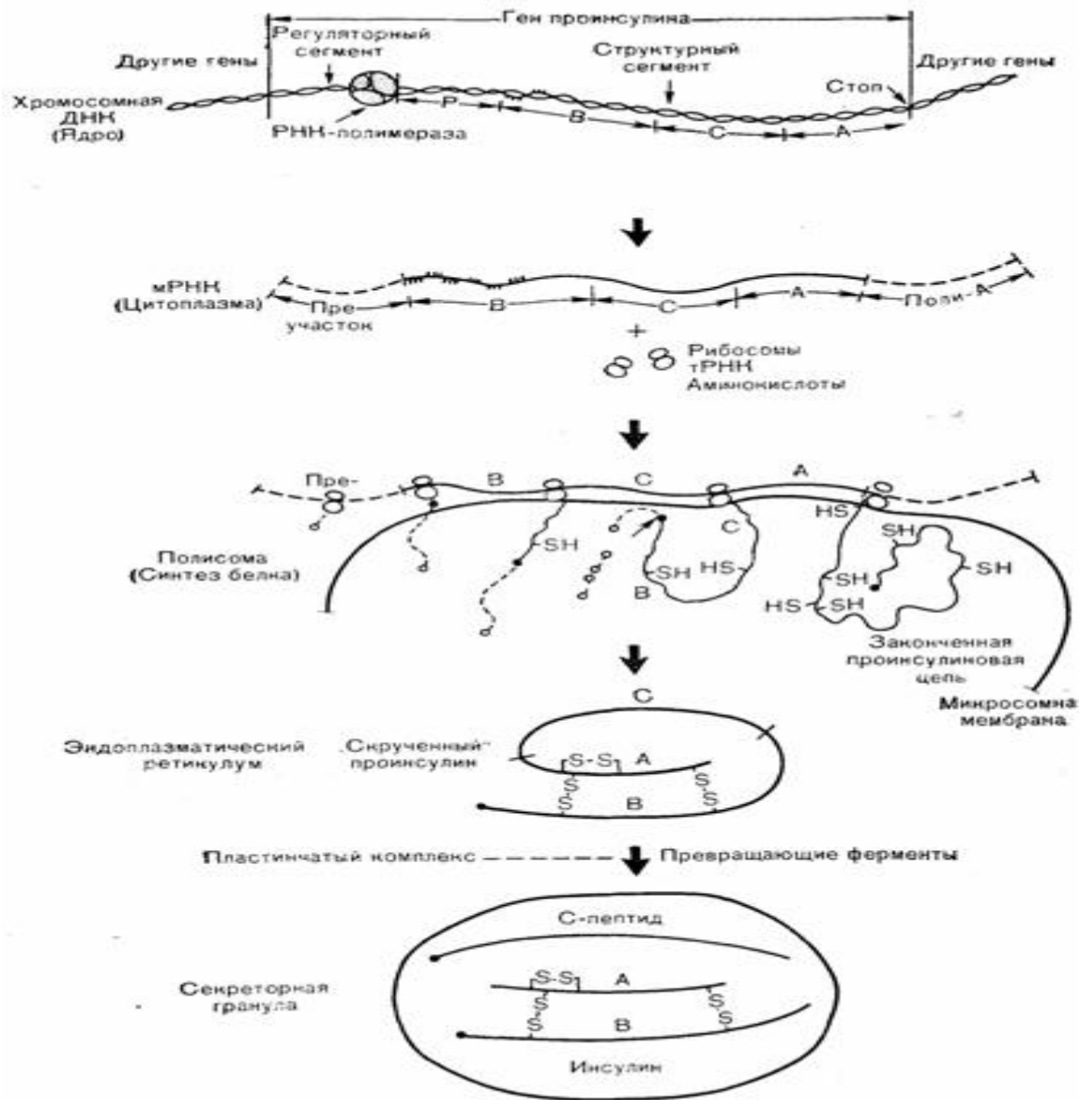


Рис. 2.2. Схематичне зображення біосинтезу проінсуліну, його перетворення в інсулін і С-пептид

Синтез препроінсуліну в клітці і його швидке розщеплення до проінсуліну відбувається на полісомах шорсткого ендоплазматичного ретикулума. Потім в ході енергозалежного процесу проінсулін переноситься в пластинчастий комплекс (апарат Гольджі), де відбувається його упаковка в мікропухирці з гладкою поверхнею, в формі яких і здійснюється зберігання і секреція (Рисунок 2.2).

З моменту потрапляння в пластинчатий комплекс і в секреторних гранулах мембранні протеази розщеплюють проінсулін на еквімолярні кількості інсуліну і С-пептиду. Інсулін разом з цинком накопичується в центральній області секреторної гранули, яка дозріваючи набуває все більшої електронної щільності; С-пептид локалізується в периферичному прозорому просторі секреторної гранули.

Звільнення вмісту зрілих секреторних гранул відбувається шляхом поступового їх просування до плазматичної мембрани клітини, слідом за чим інсулін і С-пептид виштовхуються назовні.

Рух гранул до плазматичної мембрани в цитозолі бета-клітин направляється мікротрубочками - структурами, що мають діаметр 24 нм і складаються з димеризованих субодиниць білка з молекулярною масою 120 000, відомого під назвою тубулін.

Поблизу плазматичної мембрани, оточуючи секреторні гранули, розташовується мережа мікрониток - структур з діаметром 4-8 нм, які складаються, як вважають, з скорочувального білка актину.

Прийнято вважати, що на кінцевому загальному етапі секреції бета-клітин починається надходження кальцію всередину клітини, що призводить до скорочення мікрониток [13-16].

В результаті секреторні гранули наближаються до поверхні клітин, де їх мембрани зливаються з плазматичною мембраною, а їх вміст викидається в позаклітинний простір. Цей процес злиття мембран називається еміоцитозом або екзоцитозом.

Недавня розробка методів хімічного синтезу ДНК в сполученні з використанням рекомбінації ДНК зумовила можливість отримання шурячого проінсуліну або окремих А- і В-ланцюгів інсуліну людини за допомогою бактеріальних клітин (*Escherichia coli*) [24].

План синтезу передбачає або зворотню транскрипцію проінсулінової мРНК з тим, щоб отримати кДНК (ДНК «копію») для проінсуліну, або хімічний синтез менших фрагментів ДНК, які кодують А- і В-ланцюги інсуліна людини.

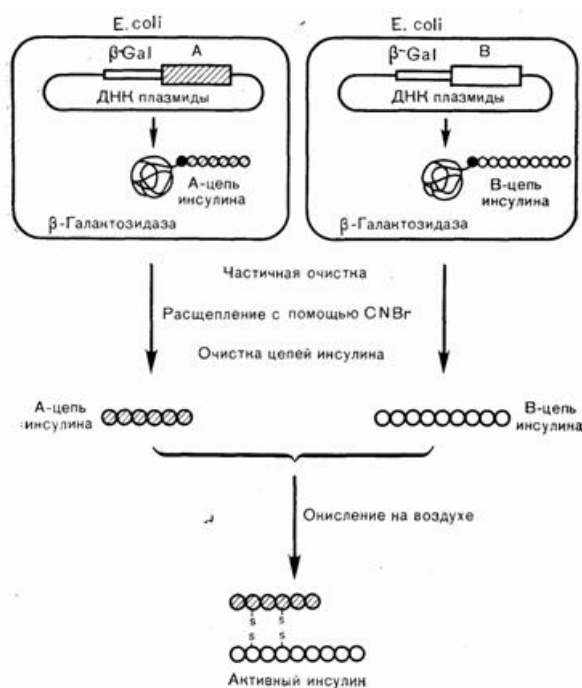


Рис. 2.3. Схематичне зображення синтезу А- і В-ланцюгів інсуліну бактерій (*E. coli*) за допомогою методики рекомбінації ДНК

Синтетичні гени потім об'єднуються з геном, в нормі експресованим в клітині *E. coli* (наприклад, геном пеніцилінази або бета-галактозидази), що забезпечує ефективну транскрипцію і трансляцію, утворення стабільного білка-попередника, або (в разі периплазматичного білка, такого, як пеніциліназа) сприяє транспорту продукту з клітки.

Векторами, що застосовуються для внесення чужорідної і бактеріальної ДНК в бактеріальну клітину, служать або бактеріофаги, або плазмідні.

Бактерія, яка містить плазмідну, транскрибує свій власний ген, рівно, як і впроваджену послідовність, продукуючи тим самим потрібний поліпептид (рис, 2.3).

Той факт, що послідовність еукаріотичної ДНК вдається клонувати і експресувати в прокаріотичних (бактеріальних) клітинах, може знайти найбільш швидке застосування в галузі використання бактеріального синтезу для продукції інсуліну людини, потрібного для лікування хворих з інсулінозалежним діабетом. Така технологія тим самим може забезпечити створення альтернативного джерела

інсуліну і в кінці кінців витіснити сучасні способи отримання гормону, які полягають в екстракції свинячих і бичачих підшлункових залоз.

2.4. Особливості синтезу біотехнологічних препаратів

Технічний прогрес в області біології і медицини, що прискорюється з кожним десятиліттям, радикально змінив прогноз багатьох важких захворювань.

Так, на початку минулого століття абсолютно нові можливості в лікуванні цукрового діабету (ЦД) дало відкриття інсуліну.

У 1974 р був здійснений повний хімічний синтез людського інсуліну [14], а трохи пізніше з'явився генно-інженерний людський інсулін, який став першим патентованим препаратом, синтезованим за допомогою технології рекомбінантної ДНК. У 1982 р. він був схвалений для клінічного використання [15].

Всі сучасні препарати інсуліну відносяться до класу лікарських засобів, вироблених за допомогою біотехнологій.

Медичною біотехнологією називають методи отримання ліків з живих клітин - бактерій, вірусів, дріжджових грибів, культур клітин різних тканин.

На відміну від хімічного синтезу препаратів процес створення біоінженерних препаратів набагато більш чутливий до деталей технології:

- потрібен ретельний вибір і очищення субстрату,
- найточніше дотримання температурного режиму,
- використання суворо визначених концентрацій розчинів і т.д.

Препарати, що синтезуються хімічним шляхом, мають порівняно просту хімічну структуру і спосіб виробництва.

Відтворена копія такого препарату (дженерик) повинна містити активну речовину з тієї ж молекулярною структурою і фізико-хімічними, фармакокінетичними властивостями, мати таку ж активність, лікарську форму та шлях введення, що і оригінальний препарат.

Через гарну відтворюваність технології отримання хімічних ліків доказів біоеквівалентності досить, щоб вважати дженерик ідентичним оригінальному препарату, додаткових клінічних випробувань не потрібно [16]. Тому для дженериків передбачена скорочена процедура реєстрації, що призводить до зниження їх собівартості.

По іншому з біотехнологічними препаратами. Відтворити точну копію молекули такого препарату практично неможливо, так як біоінженерні препарати представляють собою білки.

Білки мають високу молекулярну масу (в 100-1000 разів більше, ніж у звичайних хімічних препаратів) і вкрай складну структуру молекули, що включає первинний, вторинний, третинний і іноді четвертинний рівні.

У процесі формування просторової структури, яка відповідає за біологічні властивості, молекула білка значно модифікується за рахунок внутрішньо молекулярних зшивок, вирізання частин молекули, приєднання різних хімічних груп. Саме тому навіть очищений оригінальний препарат неоднорідний і представлений цілим рядом білкових молекул, які незначно відрізняються між собою [14-16], а найменші зміни технології синтезу можуть істотно змінити біологічні властивості кінцевого продукту [15-17].

Крім того, культури клітин, в яких відбувається біосинтез, високо мінливі. Впровадження в клітину потрібного фрагмента ДНК кожного разу призводить до отримання дещо відмінної рекомбінантної ДНК. Одного разу створена лінія рекомбінантних клітин унікальна. Ця лінія дає початок оригінальному банку клітин, до характеристик якого пристосовується весь подальший процес виробництва препарату [25, 17]. Отже, отримати точну копію біопрепарату, використовуючи інший банк клітин, принципово неможливо.

2.5. Біосиміляр - як версія оригінального біопрепарату

Закінчення строку патентного захисту оригінального біопрепарату відкриває можливість для створення його версії, або біосиміляра (англ. *Biological drug* - біологічний препарат і *similar* - схожий).

Біосиміляр - це відтворений за допомогою біотехнологій лікарський засіб, схожий з оригінальним біотехнологічним лікарським засобом і представлений на реєстрацію після закінчення терміну дії патенту оригінального лікарського засобу.

Цю відмінність важливо розуміти, призначаючи неоригінальні синтетичні і біотехнологічні препарати.

Біосиміляри - це не дженерики. Та ступінь подібності, яка існує між оригінальним хімічним препаратом і його дженериками, недосяжна в області біотехнологічних продуктів. Введення окремого терміна для версій біопрепаратів жорстко розмежовує групи відтворюваних препаратів.

Наслідки, до яких може привести відміна структури біосиміляра від структури відповідного оригінального препарату, непередбачувані.

Є дані про розвиток смертельно небезпечного ускладнення після невеликої зміни технології виробництва рекомбінантного еритропоетину [17].

Саме тому європейські фахівці відзначають, що скорочена процедура реєстрації, прийнята для дженериків, неприйнятна для біосимілярів [18, 19].

Назву і визначення «біосиміляр» вперше застосували в 2003 р в директиві Європейського союзу, де наголошувалося на важливості відмінностей біосимілярів від дженериків [20].

Згодом Європейське агентство з лікарських засобів (European Medicines Agency - ЕМА) розробило ряд посібників, що стосуються біопрепаратів і біосимілярів, які регулярно переглядаються і оновлюються [21-23].

Дані керівництва містять вимоги до проведення доклінічних і клінічних досліджень біосимілярів [22], оцінці імуногенності [23] та ін.

Відповідно до вимог ЕМА біосиміляр насамперед повинен мати високий ступінь подібності з оригінальним препаратом як за фізико-хімічними, так і за біологічними властивостями.

Рекомендується ступінчастий підхід до порівняння оригінальних препаратів і біосимілярів, що включає доклінічні та клінічні етапи. При цьому обсяг досліджень на кожному наступному етапі залежить від результатів попереднього [23]. Принципи, закладені в цих документах, відбилися в законодавстві деяких країн.

2.6. Біосиміляри людського інсуліну та його аналогів: підтвердження відповідності

В даний час проблеми створення та оцінки ефективності біосимілярів особливо актуальні для аналогів людського інсуліну.

З початку 2000-х рр. цілий ряд компаній почав виробництво неоригінальних препаратів рекомбінантного людського інсуліну в країнах, де регулюють правові норми щодо біопрепаратів були розвинені або відсутні.

Так, в Польщі був виведений на ринок Генсулін, в Індії - Інсуген, Восулін, Біосулін N, Біосулін R і Біосулін 30/70 [23].

Порівняльний аналіз їх фармакокінетичних характеристик показав, що різні препарати інсуліну з однаковим міжнародними непатентованим найменуванням мають колосальні розбіжності за часом початку дії, піку і тривалості дії, а також складу додаткових інгредієнтів [24], що, безсумнівно, впливає на ефективність інсулінотерапії.

Саме тому для біосимілярів інсуліну ЕМА рекомендує проведення наступного мінімуму клінічних досліджень [25]:

- фармакокінетики - не менше одного однодозового перехресного дослідження з підшкірним введенням, переважно у пацієнтів з ЦД 1 типу;
- фармакодинаміки.

Проведення тестів, що демонструють еквівалентність інсулінів, зокрема подвійних сліпих перехресних досліджень з використанням еуглікемічного гіперінсулінемічного Клемпа, що відображають співвідношення «час - ефект», з наданням даних про швидкість інфузії глюкози і концентрації інсуліну, а також обґрунтуванням вибору популяції;

- ефективності біосиміляра і оригінального інсуліну (досить порівняти рівень глікованого гемоглобіну (HbA1c));

- імуногенності інсуліну (тривалість дослідження не менше шести місяців).

В даний час біосиміляри аналогів інсуліну, у тому числі інсуліну гларгіну, отримали доступ на ринок в таких країнах, як Китай, Індія, Пакистан, Перу, Таїланд, Мексика і Кенія [22,26].

У більшості з них версії інсуліну зареєстровані без дотримання вимог до демонстрації ідентичності оригінального препарату Лантус (компанія «Санофі») [36].

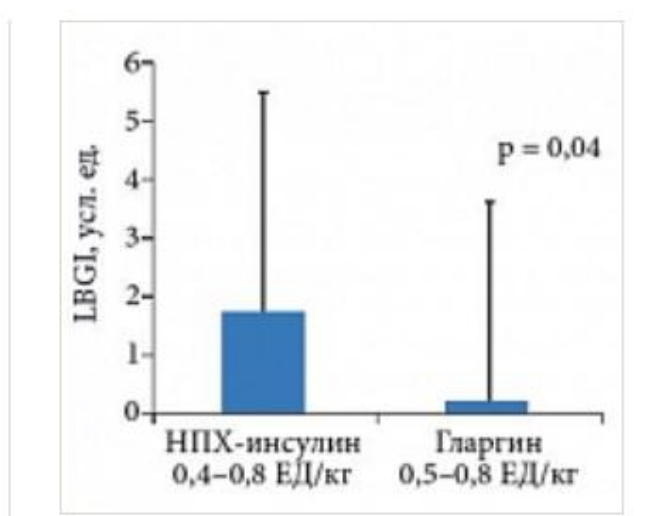


Рис. 2.3. Значення LBG1 в нічні години на різних видах базального інсуліну (показані медіани і квартили)

Так, в Китаї ефективність Базаліну (препарату, що позиціонується як «вітчизняний» гларгін) і його біоеквівалентність Лантусу були встановлені тільки на підставі результатів еуглікемічного Клемпа у здорових добровольців.

В іншому дослідженні біоеквівалентність відтвореного в Китаї препарату і оригінального гларгіну була встановлена на підставі показників тощакової і постпрандіальної глікемії у пацієнтів з ЦД 2 типу при застосуванні інсуліну в комбінації з пероральними цукрознижувальними препаратами.

У 2006 р виробництво Базаліна розпочато китайсько-корейською корпорацією.

У 2009 р в Колумбії заявка місцевого виробника на реєстрацію Базаліна була відхилена в зв'язку з відсутністю імуногенетичних досліджень [21,26].

В Індії зареєстровали Гларітус, (компанія «Вокхард») в 2009 р [26]. В даний час його імуногенність та безпека в порівнянні з Лантусом ще оцінюються в рандомізованому відкритому дослідженні фази III за участю пацієнтів з ЦД 1 типу (NCT01352663). Завершення роботи планується не раніше січня 2016 г. [27].

Для демонстрації біоеквівалентності Гларітуса Лантусу проводилося порівняльне дослідження фази I з використанням клемп-методів (NCT01357603). Дослідження завершено в серпні 2012 р, проте його результати поки не опубліковані [28].

Ще одна неоригінальна версія гларгіну, яка виробляється в Індії з 2009р. компанією «Біокон», - препарат Базалог.

У багатоцентровому рандомізованому відкритому дослідженні фази III за участю 215 пацієнтів з ЦД 1 типу було показано, що застосування Базалога і Лантуса дозволяє досягти порівнянного глікемічного контролю.

Такий висновок зроблено на підставі рівня HbA_{1c}, частоти епізодів гіпоглікемії, тощакової і постпрандіальної глікемії. Однак в протоколі дослідження не передбачалося проведення еуглікемічного Клемпа [23,29].

З аналогів інсуліну тривалої дії потенційним зразком для створення біосимілярів є Гларгин і Детемір. Однак дані про розробку версій останнього поки відсутні. При цьому є відомості про спроби створити версії аналогів інсуліну ультракороткої дії, таких як Лізпро і Аспарт [29].

2.7. Варіабельність дії аналогів інсуліну і біосимілярів

Відомо, що метаболічні ефекти, індуковані однією і тією ж дозою інсуліну, істотно розрізняються у різних людей (міжіндивідуальна варіабельність дії) і навіть у однієї людини (інтраіндивідуальна варіабельність дії).

Це залежить від швидкості абсорбції і метаболізму інсуліну (фармакокінетичний аспект варіабельності), а також дії інсуліну на чутливі клітини (фармакодинамічний аспект).

Для оцінки фармакокінетичної варіабельності визначають концентрацію інсуліну в плазмі крові, для оцінки фармакодинамічної варіабельності застосовують клемп-методи.

Висока варіабельність кінетики і дії інсуліну ускладнює підбір дози і підвищує ризик розвитку гіпоглікемії [24]. Саме тому ЕМА вимагає при порівнянні біосиміляра з оригінальним інсуліном приводити результати еуглікемічного гіперінсулінемічного Клемпа, в тому числі тимчасової профіль введення розчину глюкози [24,29].

У дослідженнях з використанням клемп-методів у гларгіну у порівнянні з НПХ-інсулінами було показано більш ранній початок і більш рівномірний профіль дії с досягненням стабільного плато [25-27].

У хворих на ЦД 1 типу міжіндивідуальна фармакокінетична і фармакодинамічна варіабельність гларгіну в дозі 0,3 ОД / кг була достовірно нижче такої НПХ-інсуліну ($p < 0,05$) і виявилася порівнянна з варіабельністю ефекту подачі інсуліну в режимі безперервної підшкірної інфузії [30].

Варіабельність глікемії залежить від її (її коливання протягом доби), для оцінки якої сьогодні існує близько 30 різних методів [25].

Так, в багатоцентровому дослідженні, що включало 116 хворих на ЦД 2 типу (рівень HbA1c 4,5-8%), оцінювався вплив перекладу з НПХ-інсуліну на гларгін на показники варіабельності глікемії, розраховані за даними безперервного моніторингу. Після переходу на гларгін спостерігалось значне збільшення площі під

кривою глікемії (AUC), обмеженою нормальними значеннями, зменшення AUC в зоні гіперглікемії, а також зниження добових коливань рівня глюкози [26].

При оцінці дії пролонгованих аналогів інсуліну найбільш показовими є дані по варіабельності глікемії в нічні години і натщесерце. Так, аналіз показників нічної варіабельності глікемії, зокрема високочутливого індексу ризику гіпоглікемії (low blood glucose index - LBGI), у пацієнтів з ЦД 2 типу, які отримували гларгін (n = 27) і НПХ-інсулін (n = 22), продемонстрував значне зниження LBGI на тлі застосування гларгіну у порівнянні з НПХ-інсуліном (p = 0,04) (рис. 2. 3) [27].

Таким чином, зниження варіабельності глікемії, що досягається за рахунок зниження варіабельності дії препарату, - одне з головних переваг гларгіну перед пролонгованими людськими інсулінами. Це служить підставою для переведення на гларгін тих пацієнтів, у яких відзначаються різкі коливання глікемії.

Однак чи можна стверджувати, що описаний ефект буде виражений в тій же мірі у біосимілярів Гларгіну?

Феномен варіабельності дії різних препаратів одного і того ж інсуліну зумовлений низкою чинників. Перший - особливості виробництва і зберігання інсуліну.

Виробництво інсуліну - складний багатостадійний процес, що включає [6, 18]:

- 1) підготовку відрізка ДНК, що кодує молекулу інсуліну (вектора);
- 2) вибір платформи або «господаря», тобто тих клітин, в ДНК яких буде інтегрований вектор і які потім будуть виробляти інсулін. Зазвичай це бактерії (*Escherichia coli*) або гриби (*Saccharomyces cerevisiae* або *Pichia pastoris*);
- 3) трансфекцію, тобто перенесення векторної ДНК в генетичний апарат «господаря»;
- 4) відбір клітин і виділення клітинної лінії, що містять рекомбінантний ДНК;
- 5) культивування клітин в живильному середовищі, в якій напрацьовуються продукти їх життєдіяльності, в тому числі білок, закодованої векторної ДНК;
- 6) витяг і очищення продукту від С-пептиду (при використанні *E. coli*);

7) формування вторинної структури інсуліну шляхом утворення дисульфідних містків і відщеплення непотрібних амінокислотних послідовностей (при використанні *E. coli*, при використанні грибів білок секретується в живильне середовище вже сформованим в потрібну просторову структуру);

8) очищення і концентрацію з використанням кристалізації і хроматографії, ліофілізацію, виготовлення лікарської форми.

Експресія вектора, що призводить до відмінностей в процесингу білка (наприклад, окислення і гликозилування). Так, для виробництва Лантуса, оригінального гларгіну, в якості платформи використовується *E. coli*, а для синтезу Базалога - гриби *Pichia pastoris*. Це призводить до прикріплення трьох додаткових полісахаридних залишків до молекули Базалога.

Відомо, що інші відмінності у використовуваних матеріалах, що використовують і методах біосинтезу і зберігання продукту (умови культивування, склад живильного середовища, дизайн обладнання) також вносять вклад в варіабельність властивостей кінцевого продукту [26].

Ще одне важливе завдання - зберегти незмінність препарату. Дані кристалографії свідчать, що позиція А21 в молекулі інсуліну Аргінін-В31-Аргінін-В32 втягується в кілька межгексамерних контактів. Заміна Аспарагіну в позиції А21 на гліцин (гліцин А21) привела до зменшення кількості межгексамерних зв'язків, тобто меншої кристалізації, що забезпечило стабільність при тривалому зберіганні [1].

Проводилось порівняння рівня білків з високою молекулярною масою (high molecular weight proteins - НМWP) до і після зберігання при температурі +25 °С в оригінальному і неоригінальних препаратах Гларгіну. Виявилось, що рівень НМWP початково знаходився в межах допустимих значень у всіх зразках, через 28 днів зберігання він значно перевищував норму в зразках Гларітуса і Базаліна, залишаючись практично незмінним в зразку Лантуса [26].

Другий фактор варіабельності дії - техніка ін'єкції інсуліну. Згідно керівництву ЕМА пристрої для введення інсуліну також підлягають жорсткому контролю якості [27-28].

2.8. Імуногенна і мітогенна активність аналогів інсуліну і біосимілярів

Інсулін, як і будь-який біопрепарат, може викликати реакцію імунної системи. Серед можливих причин виділяють змінену структуру білка діючої речовини і наявність домішок (наприклад, фрагментів клітин-продуцентів або продуктів реакції з допоміжними речовинами). Імунна реакція може проявлятися по-різному - від вироблення антитіл, які не знижують ефективність терапії, до повної нейтралізації і інактивації інсуліну антитілами.

Є припущення, що основна причина вироблення антитіл на рекомбінантний людський інсулін - його здатність до агрегації в мультимери. Можливою причиною агрегації вважається взаємодія інсуліну з покриттями, що зустрічаються в процесі виробництва, зберігання та введення.

ЕМА наказує ретельно вивчати імуногенність біопрепаратів [13]. При цьому первинною кінцевою точкою є формування антитіл до біопрепаратів. В даний час імуногенні властивості більшості біосимілярів вивчені недостатньо.

Як і людський інсулін, Гларгін надає метаболічний і зростання-стимулюючий (мітогенний) ефекти в клітинах-мішенях. Мітогенний ефект реалізується головним чином через рецептори інсуліноподібного чинника зростання 1 (ІФР-1). Відомо, що в умовах *in vitro* здатність Гларгіну викликати активацію (автофосфорилування) рецептора ІФР-1 в п'ять - вісім разів вище, ніж у нативного інсуліну. Однак в умовах *in vivo* надлишкової стимуляції рецептора ІФР-1 не відбувається. Справа в тому, що в організмі Гларгін трансформується з утворенням двох основних метаболітів - М1 і М2, а також проміжного продукту ІМ. Спочатку з карбоксильного кінця В-ланцюга видаляється залишок аспарагіну (утворюється проміжний метаболіт ІМ), далі - ще

один аспарагіновий залишок з того ж кінця, при цьому В-ланцюг стає ідентичним молекулі інсуліну людини (метаболіт М1).

У підсумку основним метаболітом Гларгіну є М1: він швидко потрапляє в кров і його концентрація протягом 24 годин переважає над концентрацією інтактного Гларгіну і всіх інших метаболітів [30]. Відщеплення додаткових аргінінових залишків в процесі біотрансформації нівелює підвищену здатність гларгіну до стимуляції рецептора ІФР-1 [31].

Останні експерименти на двох лініях клітин раку молочної залози людини (MCF-7), в різного ступеня експресують рецептор ІФР-1 і інсуліновий рецептор, показали, що проліферативний ефект Гларгіну не відрізняється від ефекту людського інсуліну та інших інсулінових аналогів. Мітогенні властивості, пов'язані з активацією сигнального шляху ІРФ-1, не супроводжувалися посиленням проліферативної відповіді через швидке перетворення Гларгіну в метаболіти М1 і М2 [26].

Аналіз результатів експериментальних досліджень, присвячених мітогенним властивостям інсулінових аналогів, продемонстрував, що проліферативний і онкогенний потенціал Гларгіну не відрізняється від потенціалу інсуліну людини [27].

Для відомих в даний час біосимілярів Гларгіну результати подібних досліджень ще не отримані [32].

Дані останніх клінічних досліджень свідчать про ризик розвитку онкологічних захворювань при лікуванні Гларгіном і іншими інсулінами.

Метааналіз 29 рандомізованих клінічних досліджень фаз II-IV, що включали в цілому 10 880 хворих на ЦД 1 і 2 типу, з яких 5657 отримували Гларгін, показав, що терапія даними аналогом не асоціювалась зі збільшенням частоти злоякісних новоутворень [32].

Дослідження ORIGIN, найбільш масштабне за кількістю учасників (12 537 осіб) та тривалості спостереження (6,2 року), також не виявило яких-небудь змін в частоті розвитку раку і смертей від онкологічних захворювань у осіб з дисглікемією,

які отримували Гларгін (в порівнянні з стандартним лікуванням) [40]. Онкогенний потенціал біосимілярів Гларгіну ще необхідно вивчати.

2.9. Висновок до розділу 2

Аналіз наведених даних свідчить про можливість істотних відмінностей фармакокінетичних і фармакодинамічних властивостей пролонгованих аналогів інсуліну і їх біосимілярів.

Біосиміляр аналога інсуліну може безпечно замінити оригінальний препарат тільки в тому випадку, якщо він має порівняти варіабельність дії, та його онкогенні і імуногенні властивості вивчені в клінічних дослідженнях.

В ряді країн автоматично замінюють оригінальних препаратів інсуліну на біосиміляри, апріорі вважаються еквівалентами. Подібна практика, за висловом L. Heinemann, нагадує величезний експеримент, в якому учасники не давали згоди на участь і не були поінформовані про можливі наслідки [33].

Гларгін - перший і найбільш вивчений тривало діючий аналог інсуліну, здатний задовольняти потребу в базальному інсуліні протягом 24 годин. Ефективність та безпечність оригінального препарату Гларгіну (Лантуса) доведена численними клінічними дослідженнями. Однак варіабельність ефекту, імуногенні і мітогенні властивості біосимілярів Гларгіну вивчені недостатньо.

В даний час очевидна необхідність введення спеціального регулювання обігу біосимілярів, встановлення комплексних вимог до визначення їх ефективності та безпеки по кожному свідченню, здійснення спеціальних заходів щодо фармаконадзора, особливо щодо відстеження імуногенності в довгостроковому періоді, формування бази даних з безпеки вже звертаються і знову реєстрованих препаратів. Такий підхід може служити основою для прийняття рішення про можливість застосування і взаємозамінності тих чи інших біосимілярів аналогів інсуліну.

РОЗДІЛ 3

МЕТОДИ ОЦІНКИ БІОСИМІЛЯРІВ

3.1. Протидіабетична терапія

Важливою умовою протидіабетичної терапії є контроль її ефективності. Важливим показником, що характеризує ступінь компенсації цукрового діабету, є вміст у крові глікозильованого гемоглобіну (HbA1c), що утворюється при взаємодії глюкози і гемоглобіну. Процес глікозилювання різних білків (альбуміну, гемоглобіну, колагену і ін.) йде тим активніше, чим вище рівень глюкози в крові.

У нормі вміст HbA1c в крові становить 5-9% від загального рівня гемоглобіну, а при декомпенсації цукрового діабету досягає 20%.

На відміну від глікемії і глюкозурії зміст HbA1c - інтегральний показник, який дозволяє оцінити ефективність інсулінотерапії протягом попередніх 6-8 тижнів.

Зниження вмісту глюкози в крові завдяки її активному поглинання тканинами і зменшення розпаду глікогену в печінці.

При вмісті цукру в крові нижче 10 ммоль / л (або 180 мг%) припиняються глюкозурія і явища осмотичного діурезу, тобто поліурія.

Поряд з поліпшенням утилізації глюкози під впливом інсуліну посилюється поглинання клітинами амінокислот і калію, і синтез білка.

При діабеті страдають від зневоднення. Показанням до терапії інсуліном є інсулінозалежний діабет (ІЗЦД) I типу, а також деякі форми інсулінозалежного діабету

Свинячий і яловичий інсуліни, які за складом дещо відрізняються від людського (на 3 і 1 амінокислоти відповідно) багато років допомагали хворим.

Амінокислотна послідовність інсуліну різних ссавців

| Ссавці | Амінокислоти А-ланцюга в положенні | | | Амінокислоти У-ланцюга в положенні |
|---------|------------------------------------|-------|-----------|------------------------------------|
| | 8 | 9 | 10 | 30 |
| Людина | Треонін | Серин | Ізолейцин | Треонін |
| Бик | Аланін | Серин | Валіи | Аланін |
| Свиня | Треонін | Серин | Ізолейцин | Аланін |
| Собака | Треонін | Серин | Ізолейцин | Аланін |
| Кашалот | Треонін | Серин | Ізолейцин | Аланін |
| Кролик | Треонін | Серин | Ізолейцин | Серин |
| Кит | Аланін | Серин | Треонін | Аланін |

У 1960 р був встановлений амінокислотний склад гормону людини і незабаром здійснений його синтез в лабораторних умовах. Однак треба було ще 20 років для того, щоб налагодити промислове виробництво людського інсуліну.

Перевагою синтетичного людського інсуліну є повна ідентичність природному гормону людини, тому він не має імуногенних властивостей.

Людський інсулін вважають найбільш ефективним засобом лікування інсулінозалежного цукрового діабету, в зв'язку з чим в ряді країн до теперішнього часу повністю, або практично повністю відмовилися від застосування інсулінів тваринного походження.

Перспективним вважають також створення аналогів інсуліну, що відрізняються від нього за хімічною структурою. Такі препарати можуть надавати ультракоротке або, навпаки, дуже тривалу дія, або ж мають інші особливості.

3.2. Сучасна класифікація інсулінів

Розрізняють:

- пролонгований (базальний) інсулін.
- короткий (харчовий) інсулін

Пролонгований інсулін застосовується для імітації нормальної секреції інсуліну протягом доби.

Для цього використовують інсуліни середньої тривалості (НПХ і стрічки) і тривалі інсуліни (гларгин, детемір).

Щоб створити харчові піки, використовують короткий і ультракороткий інсуліни.

3.3. Порівняльна характеристика інсулінів

1. За місцем ін'єкції інсуліну

Введення пролонгованої інсуліну здійснюють в стегно (повільне всмоктування).

Введення короткого інсуліну здійснюють в живіт (найшвидше всмоктування).

2. За прив'язкою зв часі

Застосовують за 20-30 хвилин до їжі.

3. Відносно прийому їжі після ін'єкції інсуліну

Пролонгований інсулін не пов'язаний з прийомом. Прийом їжі пропускати неможна.

3.4. Класифікація інсулінів

Короткі (харчові) інсуліни діляться на 2 групи.

1. Короткий інсулін (регулятор, розчинний)

Короткий інсулін починає діяти при підшкірному введенні через 30 хвилин (тому вводять за 30-40 хвилин до їжі), пік дії настає через 2 години, зникає з організму через 6 годин.

Представники:

Інсулін розчинний (людський генно-інженерний) -

Актрапид Ім, Біоінсулін Р, Гансулін Р, Генсулін Р, Інсуран Р, Рінсулін Р, Хумулін Регуляр.

Інсулін розчинний (людський напівсинтетичний) -
Біогулін Р, Хумодар Р.

Інсулін розчинний (свинячий монокомпонентний)
Актрапид МС, Монодар, Моносуінсулін МК.

2. Ультракороткий інсулін (аналоговий, відповідає людському)

Ультракороткий інсулін починає діяти через 15 хвилин, пік через 2 години, зникають з організму через 4 години.

Він більш фізіологічний і його можна вводити безпосередньо перед прийомом їжі (за 5-10 хвилин) або відразу після їжі.

Представники:

Інсулін лізпро (Хумалог) - напівсинтетичний аналог людського інсуліну.

Інсулін аспарт (НовоРапід Пенфилл, НовоРапід ФлексПен).

Інсулін глулізін (Апідра).

Пролонговані (базальні) інсуліни Також виділяють двох видів.

1. Інсулін середньої тривалості

Починає діяти при підшкірному введенні через 1-2 години, пік дії настає через 6-8 годин, тривалість дії становить 10-12 годин. Звичайна доза - 24 ОД / добу в 2 прийоми.

Представники:

Інсулін-НПХ (людський генно-інженерний) - Біосулін Н, Гансулін Н, Генсулін Н, Інсуман база ГТ, Інсуран НПХ, Протафан НМ, Рінсулін НПХ, Хумулін НПХ.

Інсулін-НПХ (людський напівсинтетичний) - Біогулін Н, Хумодар Б.

Інсулін-НПХ (свинячий монокомпонентний) - Монодар Б, Протафан МС.

Інсулін-цинк суспензія складова - Монотард МС

Пролонговані (базальні) інсуліни

Також виділяють двох видів.

2. Тривалий інсулін

Починає діяти через 4-8 годин, пік дії настає через 8-18 годин, тривалість дії становить 20-30 годин.

Представники:

Інсулін гларгин (Лантус) - звичайна доза 12 ОД / добу.

Інсулін гларгин не володіє вираженим піком дії, оскільки вивільняється в кровотік з відносно постійною швидкістю, тому вводиться одноразово. Діяти починає вже через 1-1,5 години. Ніколи не дає гіпоглікемії.

Інсулін детемір (Левемір Пенфилл, ФлексПен) - звичайна доза 20 ОД / добу. Оскільки володіє невеликим піком, добову дозу краще розбивати на 2 прийоми.

Для лікування хворих на цукровий діабет 2 типу випускають інсуліни комбінованої дії (біфазної препарати), які представляють собою готові суміші пролонгованої і короткого інсулінів. Вони позначаються дробом, наприклад, 25/75 (де 25% - це короткий інсулін, а 70% - це пролонгований інсулін).

Зазвичай введення інсуліну у вигляді суміші здійснюється 2 рази на день (ранок і вечір), а в обід призначається препарат сульфонілсечовини 3-ої генерації. Вводять мікст-інсуліни за 30 хв до їди (це продиктовано тим, що до складу цих препаратів входить інсулін короткої дії).

Представники:

Інсулін аспарт двофазний - НовоМікс 30 Пенфилл, НовоМікс 30 ФлексПен

3.5. Отримання інсуліну генно-інженерним методом

Отримання інсуліну генно-інженерним методом включає наступні стадії:

1. Підготовка відрізка ДНК, що кодує молекулу інсуліну (вектора) з клітин людського організму.

2. Вибір «господаря», тобто тих клітин, в ДНК яких буде інтегрований вектор і які потім будуть виробляти інсулін.

Зазвичай це бактерії (*Escherichia coli*) або гриби (*Saccharomyces cerevisiae* або *Pichia pastoris*);

3. Перенесення векторної ДНК в генетичний апарат «господаря».

4. Відбір клітин, що містять рекомбінантну ДНК, і виділення спеціалізованої клітинної лінії.

5. Культивування клітин в особливому живильному середовищі, в якому напрацьовуються продукти їх життєдіяльності, в тому числі білок, закодованої векторної ДНК.

6. Витяг і очищення продукту від С-пептиду (при використанні *Escherichia coli*).

7. Формування вторинної структури інсуліну (при використанні *Escherichia coli*).

8. Очищення і концентрація отриманого інсуліну з використанням кристалізації, хроматографії, ліофілізації.

9. Виготовлення лікарської форми.

Для складних білкових молекул БЛП також властиві посттрансляційна модифікація і гетерогенність (неоднорідність).

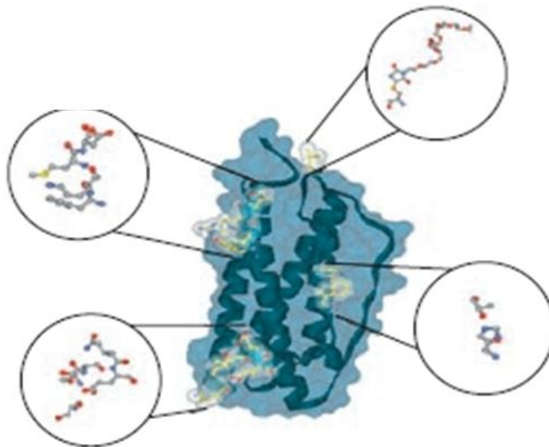


Рис.3.1. Унікальна просторова структура білків, що визначає їх основні функціональні властивості

Саме унікальна просторова конфігурація білка визначає формування локусів, відповідальних за властивості кінцевого продукту:

- Фармакокінетичні власивості
- Селективність взаємодії з рецептором
- Біологічна активність
- Імуногенність

Молекула білка може трансформуватися за рахунок внутрішньо молекулярних зшивок, олігомеризації, а також приєднання різних груп (глікозування, сульфування, фосфолування).

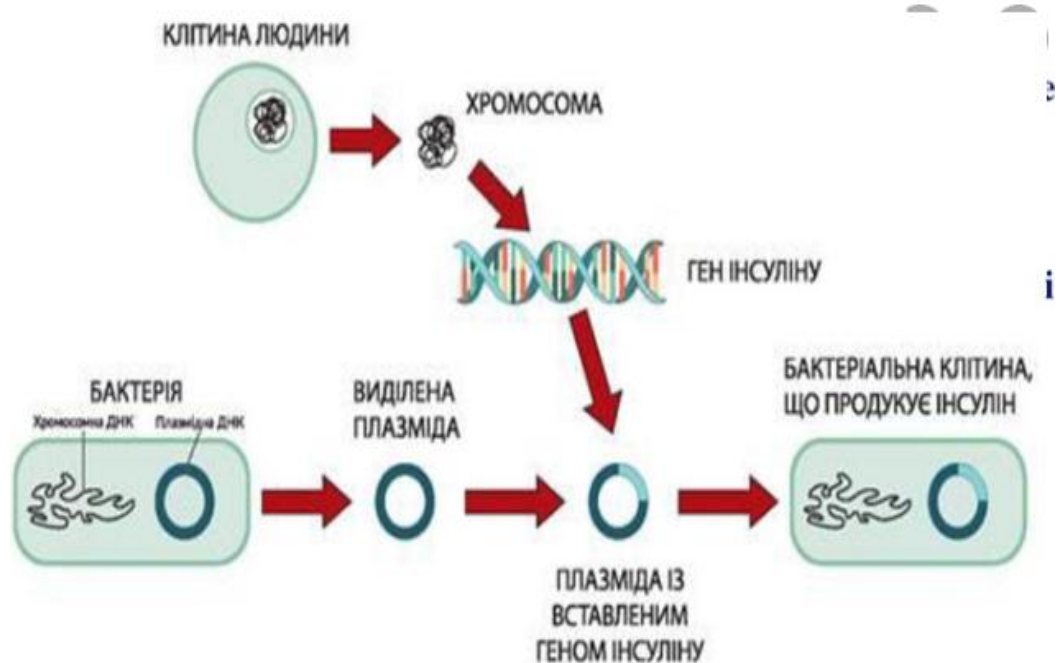


Рис. 3.2. Трансформація молекули білка

Найбільша гетерогенність характерна для глікозильованих білків. Наприклад рітуксімаб може містити більше 100 різних глікозильованих варіантів однієї і тієї ж молекули, що впливає на біологічну активність БЛП.

3.6. Біотехнологічний процес виробництва рекомбінантних і аналогових інсулінів

Біотехнологічний процес виробництва рекомбінантних і аналогових інсулінів, коли різні ланцюги інсуліну утворюються незалежно один від одного, обов'язково пов'язаний з посттрансляційною модифікацією.

Потенційно до певної міри гетерогенності можуть приводити практично всі етапи виробництва і очищення рекомбінантних і аналогових інсулінів.

У зв'язку з цим виробничий процес повинен включати багаторівневу систему жорсткого контролю як кінцевого, так і всіх проміжних продуктів .

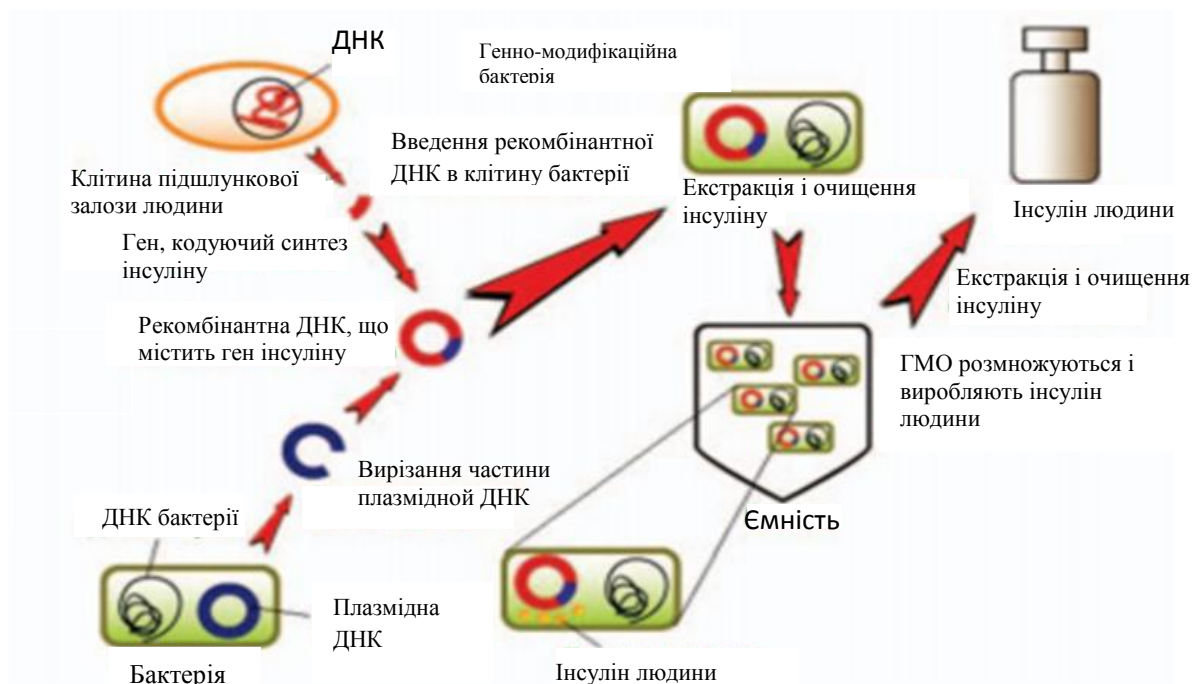


Рис. 3.3. Отримання генно-інженерного інсуліну

3.7. Схема виробництва біосимілярів

Подібний БЛП (біосиміляр) - БЛП, подібний по ефективності, безпеці та якості зареєстрованому референтному біологічному лікарському препарату, період патентного захисту якого закінчився (Міністерство охорони здоров'я України, 2013б; 2015).



Рис.3.4. Стадії виробництва біотехнологічних препаратів

Оскільки їх виробництво пов'язане з участю біологічних об'єктів, що володіють значною індивідуальністю і мінливістю, біосиміляри ніколи не можуть бути ідентичні до референтного препарату - вони можуть бути тільки подібні йому.

Біосиміляри схожі на оригінальні БЛП за такими характеристиками:

- однакова молекула (набір амінокислот, молекулярна маса);
- однакове походження (біотехнологічний процес).

Біосиміляри відрізняються від референтних БЛП за такими параметрами:

- різні штами живих клітин;
- різні поживні середовища;
- різні технологічні цикли виробництва;
- різні способи очищення «діючої» молекули від компонентів цитоплазми клітини, що виробляє БЛП.

Впровадження в клітку-виробник потрібного фрагмента ДНК кожного разу призводить до отримання дещо відмінної рекомбінантної ДНК.

Одного разу створена лінія рекомбінантних клітин унікальна. Вона дає початок унікальному оригінальному банку клітин, до характеристик якого пристосовується весь подальший процес виробництва БЛП . Отримати точну копію біопрепарату, використовуючи інший банк клітин, неможливо принципово.

Виробник копії (біосиміляра) повинен мати весь обсяг даних по кожному етапу біотехнологічного циклу - від власного банку клітин і процесу виробництва, включаючи найважливіші проміжні продукти, до системи внутрішнього контролю та стандартів кінцевого продукту.

Але у нього немає доступу до даних про оригінальний БЛП, до його клітинних субстратів і банку клітин, найважливішим проміжним продуктам, референтним стандартам, до комплексних і поетапним методів аналізу продукції, до еталонних зразків якості оригінального БЛП.

Виробник біосиміляра створює і патентує свій варіант отримання рекомбінантних ДНК, свій штам клітин, живильне середовище для клітинної культури та ін.

Саме тому біосиміляри не можуть відтворювати оригінальні БЛП на 100%, отже, висока ймовірність відмінностей в ефективності і безпеці біосимілярів і референтних БЛП.

3.8. Імуногенність

Однією з найбільш серйозних проблем безпеки терапії біосимілярами є імуногенність - потенційна можливість розвитку імунних реакцій [34].

Це пов'язано з тим, що з застосуванням сучасних аналітичних методів не завжди можна повністю ідентифікувати всі нюанси будови молекули БЛП і його біосиміляра, визначити домішки, що містяться в дуже малих кількостях.

У той же час імунна система може виявляти найменші відмінності між структурою БЛП і біосимілярів і у відповідь на ці відмінності формувати імунну відповідь [20].

Викликати реакцію імунної системи можуть і оригінальні БЛП, але ступінь їх імуногенності ретельно моніториться на етапах доклінічного і клінічного вивчення перед виведенням на фармацевтичний ринок. Важливим фактором, що сприяє розвитку імунних реакцій, є здатність біотехнологічних білків до агрегації.

Найменші відмінності виробничого процесу біосиміляра від референтного препарату можуть призвести до більш високих рівнів агрегації, що потенціє імуногенність [23].

Імуногенність біотерапевтичних препаратів надзвичайно важливо враховувати ще й тому, що вона може призвести не тільки до тяжких побічних ефектів, але також до резистентності пацієнта до цілого класу лікарських препаратів [17].

Той факт, що біосиміляри не ідентичні, а лише подібні оригінальним препаратам, означає, що їх рівна клінічна ефективність і безпека може бути доведена лише при проведенні порівняльних клінічних випробувань «head-to-head». Якщо такі дослідження не проводили, говорити про рівну клінічної ефективності та безпеки біосиміляра і оригінального БЛП категорично не можна [31].

3.9. Біосиміляри інсуліну

Є ряд доказів нееквівалентності оригінальних і відтворених БЛП рекомбінантних інсулінів [35].

У 2007 році компанія «Marvel» (Індія) представила заявки на реєстрацію в Європі трьох біосимілярів людського інсуліну: короткого (30%), тривалого (70%) дії та комбінованого інсуліну.

Всі заявки відхилені ЕМА через низку неприпустимих порушень контролю якості, в тому числі недостатніх даних про вміст домішок і імуногенності препаратів.

При перевірці реєстраційного дос'є виявлені численні порушення вимог до клінічних досліджень (відсутність контролю рівня ендогенного інсуліну), а також значну різницю фармакокінетичних і фармакодинамічних характеристик біосимілярів від референтних препаратів.

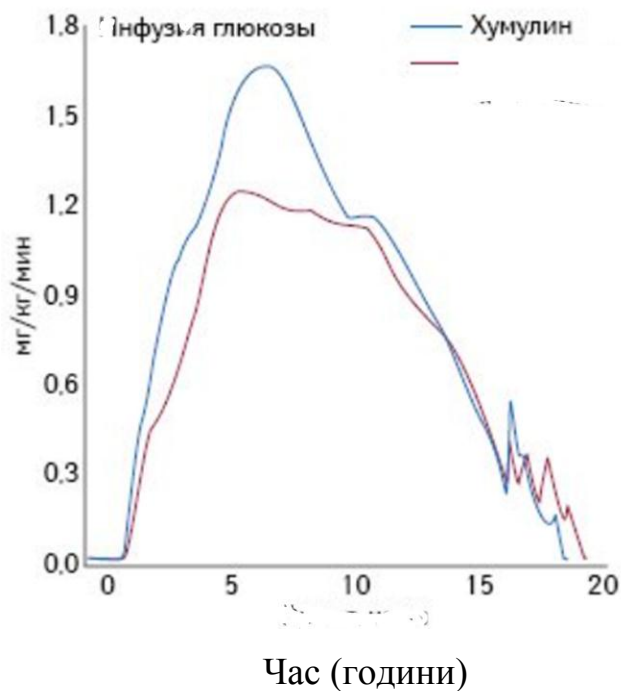


Рис. 3.5. При перевірці реєстраційного доосьє препаратів компанії «Marvel» (Індія) у порівнянні з Хумуліном

Клінічні дослідження ефективності (рівня глікозильованого гемоглобіну) підтвердили відмінності між заявленими біосимілярами і референтними оригінальними інсулінами.

При повторній подачі в 2012 р. заявка на реєстрацію також була відхилена.

На початку 2000-х років правові норми по відношенню до біопрепаратів ще не були достатньо розвинені. Саме поняття «біосиміляр» вперше з'явилося лише в 2003 р. в директиві Європейського Союзу, де наголошено на важливості відмінностей біосимілярів від генериків (Commission of the European Communities, 2003).

Перше керівництво по біосимілярам інсуліну побачило світ в 2005 р. У цей час виведені на ринок ряд копій препаратів рекомбінантного людського інсуліну: в Польщі - Генсулін, в Індії - Інсуген, Восулін, Біосулін N, Біосулін R і Біосулін 30/70.

При виведенні на ринок ці препарати досліджували і реєстрували відповідно до правил реєстрації біосимілярів - проведено тільки вивчення біоеквівалентності

Проведений пізніше порівняльний аналіз фармакокінетичних характеристик цих та ряду інших препаратів показав, що інсуліни з однаковим міжнародним

непатентованим найменуванням (МНН), але різних виробників мають істотні відмінності за часом початку дії, піку і тривалості дії, а також складу додаткових інгредієнтів, що, безсумнівно, впливає на ефективність і безпеку інсулінотерапії.

В останні роки ряд біосимілярів аналогів інсуліну, у тому числі інсуліну гларгин, отримали доступ на ринки таких країн, як Китай, Індія, Пакистан, Перу, Таїланд, Мексика і Кенія.

Це препарати Basalog, Basalin, Glargin, Glaritus.

Більшість з них зареєстровані без дотримання встановлених на даний час вимог ЕМА до біосимілярів інсуліну, без проведення належного комплексу досліджень, що демонструють їх подібність до оригінального препарату інсуліну гларгин (Лантус®, компанія «Sanofi»).

Саме тому жоден із зазначених препаратів не зареєстрований на фармацевтичному ринку ні в Європі, ні в США (таблиця 3.2).

Таблиця 3.2

Біосиміляри інсуліну гларгин, не зареєстровані на ринках Європи і США
(Owens D.R. et al., 2012)

| Торговельне найменування | Лікарська форма | Компанія виробник, країна (рік) | Клінічні дослідження |
|---------------------------------|--|--|---|
| Схвалено до застосування | | | |
| Basalin | Картриджи 3 мл Флакони 10 мл Картриджи 3 мл | «Gan & Lee», Китай (2005) «East West Pharmaceutical» («Gan & Lee»), Пакистан (2009) | Cheng S. et al., 2010 Zhu L. et al., 2009 CTRI/2010/091/000012 Фаза I Немає інформації |
| Bonglixan, застосовується | Картриджи 3 мл Флакони 10 мл | «Landsteiner Scientific» («Gan & Lee»), Мексика (2008) | Немає інформації |
| Glaritus | Картриджи 3 мл | «Wockhardt Ltd.», Індія (2009) | NCT01357603 фаза I NCT01352663 фаза III |

| | | | |
|--|--|---|---|
| Basalog | Флакони 3, 10 мл | «Biocon», Індія (2009) | CTRI/2008/091/000226 фаза III Verma M. et al., 2011 |
| Зареєстровани | | | |
| Glaritus | Картриджи 3 мл Одноразові і ручки (DispoPen) | «Pharmaris Peru», Перу (2010) | Немає інформації |
| Заявка надана на розгляд | | | |
| Glargin | Флакони 10 мл Картриджи 3 мл | «Белмедпрепарати » («Gan & Lee»), Беларусь (2011) | Немає інформації |
| Заявка відхилена внаслідок недостатніх даних щодо імуногенності | | | |
| Basalin | Розчин для ін'єкцій | «LaFranCol», Колумбія (2009) | INVIMA, 2009 |

Крім того, що спектр досліджень цих біосимілярів досить обмежений і не відповідає вимогам ЕМА, встановлено, що біосиміляри відрізняються від оригінального інсуліну гларгин за складом домішок [14].

Клінічні наслідки цих відмінностей не вивчені і, відповідно, можуть становити потенційну загрозу, особливо щодо імуногенних реакцій. До 2013 р в Європі не було зареєстровано жодного біосиміляра інсуліну гларгин.

До теперішнього моменту, відповідно до вимог ЕМА, на європейському ринку зареєстровані два нових препарату інсуліну гларгин: Toujeo (300 Од. / Мл, розчин для ін'єкцій в попередньо заповненої шприць-ручці, «Санофі-Авентіс») і Abasaglar (100 Од. / мл, розчин для ін'єкцій в картриджі і попередньо заповненої шприць-ручці, «Елі Ліллі»).

Перед реєстрацією цих препаратів в повному обсязі проведені дослідження для порівняння з референтним препаратом інсуліну гларгин (Лантус).

При цьому препарат компанії «Елі Ліллі» є біосиміляром інсуліну гларгин 100 Од. / Мл (Лантус), а препарат Toujeo (300 Од. / Мл) - новий гларгин на основі тієї ж

молекули, але в силу зміни об'єму в 1 мл, його фармакокінетичні та фармакодинамічні властивості змінилися.

У доступній літературі є звіт про проведені дослідження ефективності і безпеки нових препаратів інсуліну гларгин [20].

У резюме до звіту детально описані потенційні ризики, пов'язані з впровадженням цих препаратів в практику.

Особливу увагу приділено процедурі взаємозамінності.

Підкреслено, що при переході з референтного препарату Лантус® на будь-який з зареєстрованих біосимілярів слід проводити навчання пацієнта і персоналу щодо дозування нового препарату, особливостей застосування лікарської форми (шприц-ручки або знімного картриджа).

Слід ретельно контролювати рівню ефективність доз, особливу увагу приділяти моніторингу побічних реакцій (не менше 6 міс).

Особливо підкреслюється, що при призначенні препарату інсуліну гларгин слід використовувати виключно торгівельну назву (НЕ МНН) (UK Medicines Information, 2015).

Але з огляду на все це демонстрація взаємозамінності біосимілярів аналогів інсуліну, ймовірно, буде більш складним завданням і потребує спеціально спланованих клінічних досліджень на додаток до тих, які необхідні для підтвердження біосимілярності.

Деякі виробники неінсулінових біосимілярів вже провели окремі перехресні дослідження (з перекладом пацієнтів з одного препарату на інший), щоб підтвердити взаємозамінність з референтним лікарським засобом.

Слід також зазначити, що практика проведення перехресних досліджень вже є і для біосимілярів рекомбінантних людських інсулінів. І хоча був представлений подгруповий аналіз результатів лікування пацієнтів, які раніше отримували оригінальний інсулін гларгин, важливо розуміти, що він не був спеціально спланований для оцінки взаємозамінності препаратів.

Таким чином, в даний час немає прямих доказів на користь взаємозамінності Басаглара і оригінального інсуліну гларгин у пацієнтів з СД 1 і 2 типу. Деякі інші виробники також розробляють біосиміляри аналогів інсуліну, причому деякі з них вже вивчаються в дослідженнях III фази.

3.10. Характеристика біотехнологічних препаратів

Діючою (активною) субстанцією біотехнологічних ЛЗ є білок. Саме в силу особливих властивостей білкових молекул [2-6], яких немає у синтетичних матеріалів, клас біотехнологічних ЛЗ принципово відрізняється від звичайних хімічних препаратів.

Велика молекулярна маса, складна і дуже хрупка просторова структура, посттрансляційна модифікація молекули, нестабільність білкових молекул - всі ці властивості визначають наявність високої варіабельності як структурних, так і функціональних характеристик біотехнологічних ЛЗ.

Білкові молекули за своєю природою нестабільні, їх властивості можуть істотно змінюватися аж до повної втрати біологічної активності під впливом безлічі факторів.

Зміна технології на будь-якому етапі виробництва - від вихідних компонентів до виділення і очищення, взаємодія з допоміжними речовинами (наприклад, стабілізатором), умови зберігання - може пошкоджувати білок і змінювати його властивості.

3.11. Специфіка біотехнологічного виробництва

В самому терміні "біосиміляри" укладені два найважливіших для розуміння даної концепції ключа: 1) "біо" - живий, 2) "Сіміляр" - подібний, схожий.

Технологічна послідовність виробництва генно-інженерного інсуліну людини на ВАТ "Національні біотехнології" послідовність стадій:

1. Технологічний процес;
2. Культивування штаму-продуцента *E. coli JM109/pPINS07*;
3. Руйнування клітин;
4. Відділення осаду ГБ-сирцю центрифугуванням;
5. Розчинення ГБ з одночасним відновленням нерегулярних S-S-зв'язків;
6. Ренатурація ГБ з утворенням правильних S-S-зв'язків;
7. Хроматографічне очищення ГБ на іонообмінному сорбенті (КМ-сефароза);
8. Гідроліз ГІБРИДНИЙ БЛОК трипсином (одержання діаргіниніну суліну);
9. Хроматографічне очищення діаргіниніну суліну на іонообмінному сорбенті (SP-Sepharose FF);
10. Концентрування фракцій, що містять 90% діаргіниніну суліну;
11. Трансформація ДАІ карбоксипептидазою В (одержання первинного інсуліну);
12. Очищення первинного інсуліну методом фазової високоефективної рідинної хроматографії до чистоти >96%;
13. Хроматографічне очищення гено-інженерного інсуліну людини від високо- і низькомолекулярних домішок за допомогою гелі-фільтрації
14. Кристалізація й перекристалізація інсуліну в присутності іонів Zn^{+2}
15. Сушіння кристалів Zn -інсуліну

Виробнича схема процесу :

1. Культивування штаму *E. coli* з вбудованим геном гібридного білка, що включає повну послідовність інсуліну людини
2. Очищення й ренатурація ГБ
3. Протеолітичне розщеплення ГБ с одержанням інсуліну
4. Очищення інсуліну

Процес проходить "живих системах" клітин (бактеріях, вірусах, дріжджових грибах), схильних до природної і непереборної варіабельності [3-5, 8-9], то і продукт даного виробництва неминуче варіабелен - властивість, яка отримала назву мікрогетерогенності білків . Мікрогетерогенність може проявлятися навіть між різними серіями препарату одного і того ж виробника. Щоб нівелювати вплив цієї природної властивості білків, всі використовувані інгредієнти, технологічні процеси, склад домішок при виробництві оригінальних біопрепаратів проходять дуже жорсткий, багатоетапний контроль якості, забезпечуючи високий рівень стандартизації кінцевого продукту. Наскільки виробники біосимілярів, орієнтовані на зниження вартості і витрат на виробництво, можуть забезпечити відповідні стандарти якості - питання, яке, на жаль, не має однозначної відповіді.

Так, розроблені лінії рекомбінантних клітин - продуцентів діючої речовини, як і всі наступні стадії культивування та ферментації, абсолютно унікальні для кожного біопрепарату і є власністю виробника оригінального бренду, т. е. Предметом патенту.

Таким чином, існування відмінностей між біосимілярами і оригінальними біопрепаратами неминуче і є закономірним наслідком неможливості точного відтворення технології виробництва.

3.12. Метод достовірної оцінки біотехнологічних продуктів, ефективності та безпеки їх застосування

Найважливіше, що наслідки цих відмінностей, особливо щодо імуногенності, неможливо прогнозувати [8, 10, 11]. Справа в тому, що на відміну від простих молекул хімічних речовин, де кожен атом несе строго певне функціональне навантаження, структурно-функціональні взаємини білків відомі лише частково [33]. При цьому доступні в даний час лабораторні методи аналізу білків не завжди володіють достатньою чутливістю для детекції змін їх структури і властивостей. Таким чином, єдиним методом достовірної оцінки біотехнологічних продуктів, ефективності та безпеки їх застосування є порівняльні клінічні дослідження [40].

Таблиця 3.5

Порівняльні результати клінічні дослідження для достовірної оцінки біотехнологічних продуктів

| Параметр | Інсулін людини двохфазний (n=959) | Інсулін лізпро двохфазний | Інсулін аспарт двохфазний 30/70(n=1446) | Інсулін гларгин(n=2 478) |
|-----------------------------------|---|------------------------------|---|--------------------------------|
| Середня добова доза (M±m) (ЕД) | 48,1±10,3 | 44,5±9,2 | 46,9±12,5 | 30,1±11,7 |

Продовження таблиці 3.5

| | | | | |
|--|---|---|---|--------------------|
| Кратність призначення і кількість хворих (% до кількості хворих в підгрупі) | 1 – 88 (9,2%) 2- 836 (87,2%) 3 – 34 (3,5%) 4 – 1 (0,1%) | 1 – 6 (8,2%) 2 – 64 (87,7%) 3 – 3 (4,1%) | 1 – 156 (10,8%) 2 – 1158 (80,1%) 3 – 131 (9,0%) 4 – 1 (0,1%) | 1 – 2478 (100%) |
| Кратність призначення і кількість хворих (% до кількості хворих в підгрупі) | 1 – 88 (9,2%) 2- 836 (87,2%) 3 – 34 (3,5%) 4 – 1 (0,1%) | 1 – 6 (8,2%) 2 – 64 (87,7%) 3 – 3 (4,1%) | 1 – 156 (10,8%) 2 – 1158 (80,1%) 3 – 131 (9,0%) 4 – 1 (0,1%) | 1 – 2478 (100%) |
| Медіана дозувань (ОД / добу) в залежності від кратності призначення [max - min] | 1 – 28 2 – 48 3- 61 4 - 100 | 1 – 35 2 – 46 3 – 29 | 1 – 44 2 – 46 [3 – 58 4 - 44 | 1 - 30 |
| Вихідний рівень HbA1c (%) | 8,9±1,0 | 9,2±1,2 | 9,0±1,3 | 9,0±1,2* |
| Рівень HbA1c через 3 місяці після переводу на інсулін гларгин (%) | 7,6±1,1 | 7,3±1,4 | 7,2±1,3 | 7,4±1,0 |
| Динаміка HbA1c через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин (%) ** | 1,3 (p<0,001) | - 1,9(p<0,001) | -1,8 (p<0,001) | -1,6 (p<0,001) |

Продовження таблиці 3.5

| | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------|--|---|
| Компенсація СД через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин (хворі, n,% від числа в підгрупі) | 226 (23,5%) | 28 (38%) | 521 (36%) | 775 (31,3%) |
| Вихідний рівень HbA1c у тих, хто через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин досяг компенсації СД (%) | 8,8±0,9 | 8,9±1,3 | 8,9±0,8 | 8,9±1,1 |
| Рівень HbA1c через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин у хворих, які досягли компенсації СД (%) | 6,6±0,2 | 6,4±0,5 | 6,6±0,2 | 6,6±0,2 |
| Динаміка HbA1c через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин у хворих, які досягли компенсації СД (%) *** | -2,2 (p<0,001) | -2,5 (p<0,001) | -2,3 (p<0,001) | -2,3 (p<0,001) |
| Хворі, які досягли компенсації СД через 3 місяці після переведення на інсулін гларгин (n) **** | 2 – 194 (85%) 3 – 32 (15%) | 2 – 28 (100%) | 1 – 43 (8%) 2 – 347 (67%) 3 -131 (25%) | Загальна кількість хворих, переведених з 2-х ін'єкцій інсулінів на 1 ін'єкцію Інсуліну гларгин - 569 (73%) |

Примітки:

* - вихідний середній рівень HbA1c по всіх підгрупах хворих

** - достовірність у порівнянні з вихідним рівнем по підгрупах

*** - достовірність у порівнянні з вихідним рівнем по підгрупах хворих, у яких через 3 місяці після призначення інсуліну гларгин відбулася компенсація СД

**** - перша цифра - кількість ін'єкцій в день відповідного інсуліну до перекладу на Інсулін гларгин, друга - число хворих, які отримували відповідну кількість ін'єкцій на добу до переведення на Інсулін гларгин, третя -% хворих по підгрупі, які отримували до переведення на Інсулін гларгин відповідну кількість ін'єкцій на добу і компенсували СД на 1 ін'єкції інсуліну гларгин на добу через 3 місяці.

3.13. Висновок до розділу 3

Наслідки відмінностей між біосимілярами і оригінальними біопрепаратами, особливо щодо імуногенності, неможливо прогнозувати [8, 10, 11]. Справа в тому, що на відміну від простих молекул хімічних речовин, де кожен атом несе строго певне функціональне навантаження, структурно-функціональні взаємини білків відомі лише частково [33]. При цьому доступні в даний час лабораторні методи аналізу білків не завжди володіють достатньою чутливістю для детекції змін їх структури і властивостей. Таким чином, єдиним методом достовірної оцінки біотехнологічних продуктів, ефективності та безпеки їх застосування є порівняльні клінічні дослідження [40].

ВИСНОВКИ

1. Програма розробки кожного біосиміляра оцінюється в індивідуальному порядку, починаючи з використовуваною клітинної лінії, всіх етапів виробництва (ферментація, очищення) і контролю якості, навіть якщо діюча речовина є подібним оригінальним, і закінчуючи низкою доклінічних (з акцентом на *in vitro*) і клінічних досліджень (тільки фази I і III). Але навіть в тому випадку, коли відповідно до стандартів регуляторних органів були продемонстровані ефективність і безпека біосиміляра, залишається відкритим питання про достатність представлених даних для доказу його взаємозамінності з референтним продуктом. Взаємозамінністю називають можливість заміни одного препарату на інший, який за очікуваннями повинен забезпечити аналогічний клінічний ефект в певній клінічній ситуації у будь-якого окремо взятого пацієнта.

2. Інсулін характеризується вузьким терапевтичним вікном і вимагає дуже точного дозування для збереження балансу між ефективністю і безпекою. Крім того, ефективність, переносимість та прихильність пацієнта до інсулінотерапії в значній мірі залежать від доставочного пристрою, який застосовують, наприклад шприц-ручки або інсулінового шприца. Зручність і надійність таких пристроїв є додатковим викликом для виробників.

4. Отримані до теперішнього часу свідчення нееквівалентності відтворених і оригінальних біопрепаратів дозволяють відповідально заявляти, що біосиміляри представляють особливий клас ЛЗ, що вимагає диференційованого, відмінного від звичайних генериків підходу. Рішення про допуск біосиміляра до клінічного застосування повинно бути сфокусовано насамперед на питаннях безпеки, що вимагає підтвердження даними власних клінічних досліджень. Оскільки доступні в даний час біосиміляри не відповідають висунутим вимогам еквівалентності, заміщення на них оригінальних препаратів передчасно і невиправдано

СПИСОК БІБЛЮГРАФІЧНИХ ПОСИЛАНЬ ВИКОРИСТАНИХ

ДЖЕРЕЛ

1. Schellekens H. Biosimilar therapeutics – what do we need to consider? / Schellekens H. // *NDT Plus.* – 2009. – Vol. 2. Suppl. 1. – P. i27–i36.
2. Gough S. Biosimilar insulins: opportunities and challenges / Gough S // *Practical Diabetes.* – 2013. – Vol. 30. № 4. – P. 146–148.
3. The emergence of biosimilar insulin preparations – a cause for concern? / Owens D.R., Landgraf W., Schmidt A. et al // *Diabetes Technol. Ther.* – 2012. – Vol. 14. № 11. – P. 989–996.
4. Tyther R. Post-translational modifications of recombinant proteins: significance for biopharmaceuticals / Jenkins N., Murphy L., Tyther R. // *Mol. Biotechnol.* – 2008. – Vol. 39. № 2. – P. 113–118.
5. The evolution of insulin glargine and its continuing contribution to Diabetescare./ Hilgenfeld R., Seipke G., Berchtold H., Owens D.R. / *Drugs.* – 2014. – Vol. 74. № 8. – P. 911–927.
6. Verma M . Basalog is similar to Lantus in producing glycemic control in patients with type 1 diabetes mellitus on multiple daily insulin regimens / Verma M., Hazra P., Iyer H. et al.// *Int. J. Diabetes Dev. Countries.* – 2011. – Vol. 31. № 1. – P.26–31.
7. Casadevall N. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin / Casadevall N., Nataf J., Viron B. et al.// *N. Engl. J. Med.* – 2002. – Vol. 346. № 7. – P. 469–475.
8. Heinemann L. Time-action profile of the long-acting insulin analog insulin glargine (HOE901) in comparison with those of NPH insulin and placebo / Heinemann L., Linkeschova R., Rave K. et al // *Diabetes Care.* – 2000. – Vol. 23. № 5. – P. 644–649.
9. Lepore M. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of subcutaneous injection of longacting human insulin analog glargine, NPH insulin, and ultralente human insulin and continuous subcutaneous infusion of insulin lispro / Lepore M.,

Pampanelli S., Fanelli C. et al // *Diabetes*. –2000. –Vol. 49. № 12. – P. 2142– 2148.

10. Климонтов В.В. Вариабельность гликемии при сахарном диабете: инструмент для оценки качества гликемического контроля и риска осложнений / Климонтов В.В., Мякина Н.Е. // *Сахарный диабет*. – 2014. –№ 2. – P. 77–83.

11. Heinemann L. Biosimilar insulins: how similar is similar? / Heinemann L., Hompesch M. // *J. Diabetes Sci. Technol.* –2011. –Vol. 5. № 3. –P. 741–754.

12. Sommerfeld M.R. In vitro metabolic and mitogenic signaling of insulin glargine and its metabolites / Sommerfeld M.R., Müller G., Tschank G. et al // *PLoS ONE*. –2010. –Vol. 5. № 3. – P. e9540

13. Heinemann L.. Biosimilar insulin and insulin antibodies / Heinemann L., Owens D. // *J. Diabetes Sci. Technol.* –2013. –Vol. 7. № 4. –P. 806–807.

14. Lucidi P. Glargine metabolism over 24 h following its subcutaneous injection in patients with type 2 diabetes mellitus: a dose-response study / Lucidi P., Porcellati F., Candeloro P. et al. // *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* –2014. – Vol. 24. № 7. – P. 709–716.

15. Bordeleau L. The association of basal insulin glargine and/or n-3 fatty acids with incident cancers in patients with dysglycemia / Bordeleau L., Yakubovich N., Dagenais G.R. et al. // *Diabetes Care*. –2014. –Vol. 37. № 5. – P. 1360–1366.

16. Zdarska D.J. Comparison of glucose variability assessed by a continuous glucose-monitoring system in patients with type 2 diabetes mellitus switched from NPH insulin to insulin glargine: the COBIN2 study / Zdarska D.J., Kvapil M., Rusavy Z. et al. // *Wien. Klin. Wochenschr.* –2014–. Vol. 126. № 7–8. –P. 228– 237.

17. Home P.D. Combined randomised controlled trial experience of malignancies in studies using insulin glargine / Home P.D., Lagarenne P. // *Diabetologia*. –2009. –Vol. 52. № 12. – P. 2499–2506.

18. European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of 5 similar biological medicinal products containing 6 recombinant human insulin and insulin analogues. / European Medicines Agency // *Clinical*

development. – 2014. – Vol. 5– P. 209–216

19. Varewijck A.J. Addition of insulin glargine or NPH insulin to metformin monotherapy in poorly controlled type 2 diabetic patients decreases IGF-I bioactivity similarly/ Varewijck A.J., Janssen J.A., Vahatalo M. et al // Diabetologia. – 2012. – Vol. 55. № 4. – P. 1186–1194.

20. Министерство здравоохранения Российской Федерации:
www.rosminzdrav.ru/news/2014/11/24/2142_-proekt-federalnogo-zakona-o-vnesenii-izmeneniy-vfederalnyy-zakon-ob-obraschenii-lekarstvennyh-sredstvedinoglasno-podderzhan-deputatami-gosudarstvennoyдумы-rf-i-prinyat-vo-vtorom-chtenii.

21. Паспорт проекта федерального закона № 555485-6 «О внесении изменений в Федеральный закон “Об обращении лекарственных средств”» :
base.consultant.ru/ cons/cgi/online.cgi?req=doc;base=PRJ;n=120259.

22. U.S. National Institutes of Health. Immunogenicity safety study of wockhardt's recombinant insulin analogue in type 1 diabetic patients. /U.S. National Institutes of Health // clinicaltrials.gov/show/ NCT01352663.

23. U.S. National Institutes of Health . The Safety and Efficacy of MK-1293 Versus Lantus™ in Participants With Type 2 Diabetes Mellitus (MK-1293-006). / U.S. National Institutes of Health, // clinicaltrials.gov/ ct2/show/record/NCT02059187

24. Биологические препараты. Позиция. Российской ассоциации эндокринологов // Сахарный диабет. – 2013. – № 3. – С. 121–122.

25. Биопрепараты и биосимиляры – регуляторные и клинические аспекты применения. Современные вызовы регуляторной системе. Резолюция экспертной сессии. М. – 2014. : mda-cro.com/rus/Resolution.

26. Шестакова М.В. Биосимиляры: презумпция «виновности»/ Шестакова М.В., Викулова О.К // Сахарный диабет. – 2011. – № 4. – С. 92–99.

27. Ter Braak B. Classifying the adverse mitogenic mode of action of insulin analogues using a novel mechanism-based genetically engineered human breast cancer cell panel / Ter Braak B., Siezen C.L., Kannegieter N. et al.// Arch. Toxicol. – 2014. – Vol. 88. № 4. – P. 953–966.

28. U.S. National Institutes of Health. Comparative glucose clamp study of wockhardt's recombinant insulin analog glargine (Glaritus) with Lantus in T1DM. /U.S.National Institutes of Health.–2011.–clinicaltrials. gov/ct2/show/NCT01357603.

28. European Medicines Agency. Guideline on the suitability of the graduation of delivery devices for liquid dosage form. /European Medicines Agency// Guideline on the suitability. – 2005. – P. 95–96.

29. Tennagels N. The metabolic and mitogenic properties of basal insulin analogues/ Tennagels N., Werner U. // Arch. Physiol. Biochem. – 2013. – Vol. 119. № 1. –P. 1–14.

30. COMMISSION DIRECTIVE 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council on the Community // Official Journal of the European Union. – 2003. – L159. – P. 46–94.

31. Климонтов В.В. Предикторы эпизодов ночной гипогликемии у пожилых больных сахарным диабетом 2 типа, получающих инсулин / Климонтов В.В., Мякина Н.Е. // II Всероссийский конгресс с участием стран СНГ «Инновационные технологии в эндокринологии». – 2014. – С.15-26.

32. Facts about generic drugs. U.S. Food and Drug Administration. – 2012. : www.fda.gov/drugs/resourcesforyou/consumers/

33. European Medicines Agency . Guideline on similar biological medicinal products. –2014. : www.ema.europa.eu/docs/

34. Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology- derived proteins as active substance: non-clinical and clinical issues. European Medicines Agency. –2006. – : www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_

35. Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology- derived therapeutic proteins.Medicines Agency.2007.–: www.ema.europa.eu/docs/en_GB/

