

## АНАЛИЗ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА И СТРАТЕГИЯ ИХ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

©2018 г. О. М. СЕЛИВАНОВА<sup>1</sup>, С. Ю. ГРИШИН<sup>1,2</sup>,  
А. В. ГЛЯКИНА<sup>1,3</sup>, А. С. САДГЯН<sup>4</sup>, Н. И. УШАКОВА<sup>4</sup>,  
О. В. ГАЛЗИТСКАЯ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Институт белка РАН, Пуццино, Московская область

<sup>2</sup> Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,  
Москва

<sup>3</sup> Институт математических проблем биологии РАН – филиал  
Института прикладной математики им. М.В. Келдыша РАН,  
Московская обл., Пуццино

<sup>4</sup> АО «Научно-Производственная Корпорация Биоран», Москва

I. Введение. II. Биосинтез и секреция инсулина. III. Структурные особенности и поверхностные контакты молекулы инсулина, взаимодействие с рецептором. IV. Аналоги инсулина. V. Фибриллообразование инсулиновых препаратов. VI. Заключение.

### I. ВВЕДЕНИЕ

Инсулин – это пептидный гормон (51 а.о.), образующийся в  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы. Мономер инсулина состоит из двух полипептидных цепей – А (21 а.о.) и В (30 а.о.), которые соединены между собой через остатки цистеина 2-мя S–S связями в положениях А7–В7 и А20–В19, кроме того 3-я S–S связь присутствует в А-цепи между А6 и А11 остатками. С момента открытия инсулина в начале XX века [1] и по сей день актуально изучение функций этого гормона.

*Принятые сокращения:* а.о. – аминокислотный остаток; ГЛФ – готовая лекарственная форма; ИМТ – индекс массы тела; НПХ – нейтральный протамин Хагедорна; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ЭПР – эндоплазматический ретикулум;  $\alpha$ СТ – карбоксиконцевой домен  $\alpha$ -субъединицы рецептора инсулина; IGFR – рецептор инсулиноподобного фактора роста 1-го типа; IRA – изоформа А инсулинового рецептора; IRB – изоформа В инсулинового рецептора; L1 – богатый лейциновыми повторами домен  $\alpha$ -субъединицы рецептора инсулина; ThT – тиофлавин Т.

\* Адрес для корреспонденции: [ogalzit@vega.protres.ru](mailto:ogalzit@vega.protres.ru)

Работа выполнена при поддержке программы МКБ (01201353567).

Инсулин регулирует целый ряд метаболических процессов, таких как синтез белков, жиров и нуклеиновых кислот, а также рост и дифференцировку клеток. Тем не менее, главной его функцией является регулирование поглощения глюкозы клетками. Инсулин вырабатывается в ответ на повышение концентрации глюкозы в крови, затем связывается с рецептором инсулина и активирует транспортеры глюкозы, в основном Glut4, в жировых тканях, сердечной и скелетных мышцах. Мобилизованные транспортеры переходят из внутриклеточных компартментов в плазматическую мембрану для облегчения транспорта глюкозы внутрь клетки [2]. При нарушении выработки инсулина в крови повышается концентрация глюкозы (хроническая гипергликемия), что и является основным диагностическим признаком диабета 1-го типа [3]. Однако при нарушениях передачи сигнала от инсулиновых рецепторов, даже если гормон вырабатывается в достаточных количествах, развивается диабет 2-го типа, обусловленный снижением чувствительности тканей к действию инсулина (инсулинорезистентность) [4–6].

Обычно под диабетом подразумевают группу метаболических заболеваний, характеризующихся гипергликемией, вызванной дефектами секреции инсулина или действием инсулина [7]. Снижение чувствительности клеток и недостаточный уровень инсулина при сахарном диабете обоих типов приводят к развитию таких осложнений, как сосудистые заболевания, в частности, ишемическая болезнь сердца, цереброваскулярные заболевания и характерные для диабета ретинопатия, нефропатия и невропатия [8]. Нарушения секреции и функционирования инсулина могут присутствовать у одного и того же пациента, что усложняет выявление основной причины гипергликемии. Иммунную реакцию организма по отношению к собственным  $\beta$ -клеткам поджелудочной железы можно определить с помощью аутоантител – к инсулину, островковым клеткам, к тирозинфосфатазам IA2, IA2 $\beta$  и глутаматдекарбоксилазе GAD 65. На повышенный риск развития диабета 1-го типа могут также указать результаты молекулярно-генетического анализа аллелей гена *HLA-DQB1*. [9, 10]. Как правило, на последней стадии заболевания секреция инсулина незначительна или вообще отсутствует, что проявляется низким уровнем С-пептида в плазме крови. Пациенты, у которых был выявлен сахарный диабет 1-го типа, в конечном итоге становятся зависимыми от введения дополнительного инсулина.

Как правило, на сахарный диабет 1-го типа приходится лишь 5–10% больных, страдающих диабетом, основную же часть составляют пациенты с сахарным диабетом 2-ого типа [7]. Хотя аутоиммунная

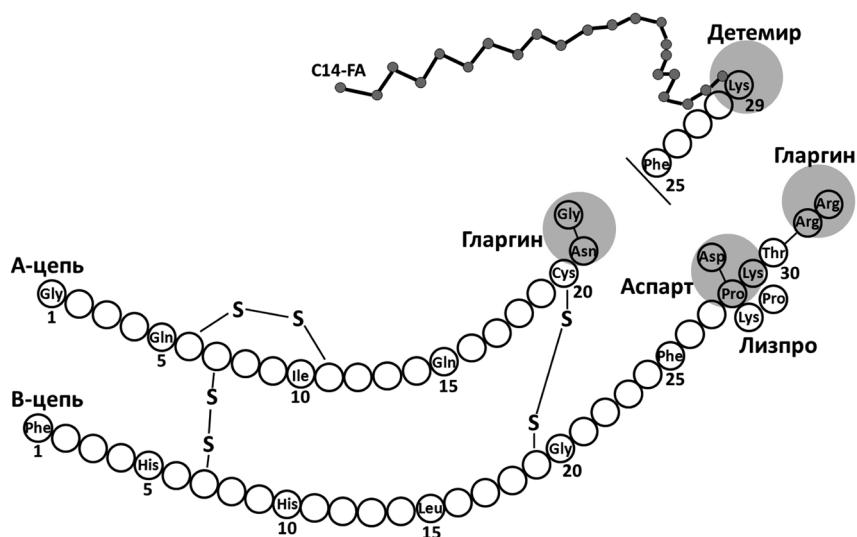


Рис. 1. Схема инсулина и его аналогов ([19] с модификациями).

деструкция клеток не происходит, существует множество других причин этого типа диабета, точные механизмы которых активно изучаются [11–15]. Большинство случаев использования инсулина связано с сахарным диабетом 2-ого типа, поскольку он более распространен.

Эффективность инсулина в лечении сахарного диабета, обусловленная способностью этого гормона снижать уровень глюкозы в крови, была доказана в течение десятилетий его применения в медицинской практике. Тем не менее, в настоящее время актуально проводить поиск новых подходов к терапии сахарного диабета в связи с увеличением количества случаев заболевания и необходимостью учета индивидуальных особенностей и предпочтений пациентов [16].

Ограничение использования инсулина связаны с тем, что он должен, как правило, вводиться контролируемыми дозами несколько раз в день с целью поддержания физиологически нормального уровня глюкозы в крови. Кроме того, гормон имеет узкое терапевтическое окно, связанное с риском развития гипогликемии, а также может приводить к набору веса, что опасно для больных с высоким индексом массы тела (ИМТ) [17, 18].

Вышеперечисленные трудности, связанные с особенностями нативного инсулина человека, во многом определили необходимость создания его аналогов (рис. 1).

Аналогами инсулина называют искусственно модифицированные молекулы, которые за счет своей более быстрой или более продолжительной активности по сравнению с регулярным инсулином позволяют усовершенствовать метаболический контроль уровня глюкозы в крови при заболевании диабетом [20]. В настоящее время созданы различные инсулиновые препараты на основе аналогов и смесей инсулина для терапии сахарного диабета.

В данной работе представлен обзор существующих аналогов инсулина. Описываются две основных стратегии разработки аналогов инсулина: первая – создание болюсных инсулинов (быстрого действия), вторая – создание базальных инсулинов (продленного действия). Возможно комбинирование этих типов аналогов для нормализации уровня глюкозы крови и доставки инсулинового препарата в удобной для пациента форме.

Впервые инсулин в качестве лекарственного препарата был применен почти сразу после его открытия [1]. С тех пор началось интенсивное биохимическое и биомедицинское исследование инсулина с целью совершенствования инсулиновых препаратов

## II. БИОСИНТЕЗ И СЕКРЕЦИЯ ИНСУЛИНА

Биосинтез инсулина начинается с трансляции его предшественника – препроинсулина. Пептид длиной 110 а.о. кодируется геном *INS*, единственная копия которого локализована в геноме человека в коротком плече 11 хромосомы [21]. Препроинсулин синтезируется на полирибосомах, причем только на тех из них, которые связаны с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР). После переноса белка в люмен ретикулума сигнальная пептидаза отщепляет от него N-концевой фрагмент из 24 аминокислотных остатков с образованием проинсулина [22]. Затем происходит сворачивание молекулы проинсулина с образованием трех дисульфидных связей (B7–A7, B19–A20, A6–A11) (рис. 1). В дальнейшем образование мономерного инсулина и C-пептида связано с переносом проинсулина от ЭПР к аппарату Гольджи, где проинсулин расщепляется пептидазами в секреторных везикулах. В  $\beta$ -клетках островков Лангерганса поджелудочной железы инсулин хранится в виде гексамера, координированного двумя ионами  $Zn^{2+}$  [23, 24].

Увеличение концентрации глюкозы в крови является сигналом для секреции инсулина. Процесс, как правило, начинается с того, что независимый от инсулина белок-переносчик Glut2 связывается с молекулами глюкозы и транспортирует их внутрь  $\beta$ -клеток островков

Лангерганса. В  $\beta$ -клетке глюкоза фосфорилируется ферментом глюкокиназой, подвергается гликолизу до пирувата, как конечного продукта реакции. Пируват окисляется в цикле трикарбоновых кислот с образованием АТФ. Увеличение соотношения АТФ/АДФ приводит к закрытию АТФ-зависимых калиевых каналов, деполяризации плазматической мембраны. В результате потенциал-зависимые кальциевые каналы открываются и позволяют кальцию входить внутрь клетки. Высокий уровень кальция в клетке стимулирует каталитическую активность фосфолипазы C, которая в ходе протеолиза расщепляет фосфатидилинозитол-4,5-бифосфат на инозитол-1,4,5-трифосфат, а также диацилглицерат. Инозитолтрифосфат в свою очередь выступает лигандом для рецепторных белков ЭПР, ответственных за высвобождение внутриклеточного кальция, что приводит к повышению концентрации последнего в цитоплазме клетки. Наконец, ионы кальция стимулируют процесс выделения инсулина из секреторных гранул. Кроме основного, опосредованного глюкозой, известны и другие сигналы секреции инсулина: никотинамидадениндинуклеотидфосфат (НАДФ), глутамат и малонил-КоА [25, 26], глицерол-3-фосфат [27] и жирные кислоты [28, 29]. Выделение инсулина из клетки происходит путём экзоцитоза – зрелая секреторная гранула сливается с плазматической мембраной и освобождает свое содержимое наружу.

### **III. СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ И ПОВЕРХНОСТНЫЕ КОНТАКТЫ МОЛЕКУЛЫ ИНСУЛИНА, ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С РЕЦЕПТОРОМ**

Как только гексамеры секретируются из  $\beta$ -клеток островков Лангерганса и диффундируют в кровь, комбинация электростатического отталкивания и градиента концентрации инсулина способствует диссоциации гексамера на димеры и мономеры, при этом именно последние проявляют биологическую активность. Следовательно, гексамер является формой хранения инсулина, тогда как мономер является активной формой гормона (рис. 2.).

Мономерный инсулин состоит из А и В цепей, связанных дисульфидными связями. Вторичная структура А-цепи содержит две антипараллельные  $\alpha$ -спирали, образованные между остатками А2–А8 и А13–А19, соединенные петлевыми остатками в положении А9–А12. Вторичная структура В-цепи содержит как  $\beta$ -тяжи, так и  $\alpha$ -спираль. Аминокислотные остатки в В1–В5 образуют вытянутый участок, а центральной  $\alpha$ -спирали предшествует резкий  $1 \rightarrow 4$  поворот, обусловленный глицином В8. Поэтому  $\alpha$ -спираль В-цепи стянута

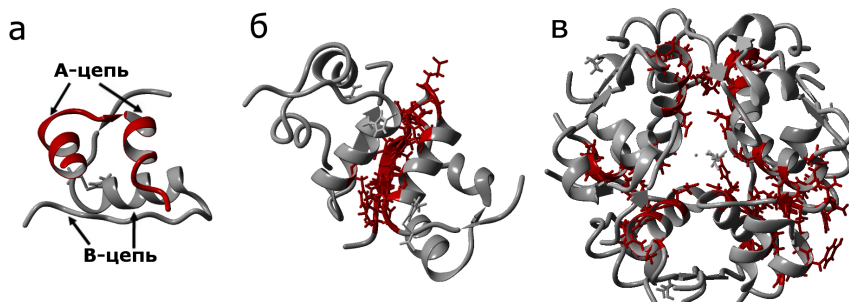


Рис. 2. Рентгеновская структура человеческого рекомбинантного инсулина с разрешением 0,92 Å: (а) мономер, (б) – димер, (в) – гексамер, координированный двумя ионами  $Zn^{2+}$  (PDB-код 5E7W, визуализация в YASARA). Красным выделены а.о., участвующие в димерных и гексамерных контактах.

по типу  $3_{10}$  водородными связями, образованными В7, В8 и В9 [30]. Начиная с а.о. Ser в положении В9 спиральная структура водородных связей соответствует  $1 \rightarrow 5$  и  $\alpha$ -спираль поддерживается до В19. Далее формируется  $1 \rightarrow 4$   $\beta$ -поворот за счет водородных связей между карбонильным кислородом В19 и амидным водородом В22, и таким же образом между В20 и В23. Остатки В23–В30 имеют структуру  $\beta$ -тяжа. Остатки PheB24 и TyrB26 взаимодействуют с Leu В11 и Leu В15  $\alpha$ -спирали В-цепи. На каждом конце спирального сегмента В-цепи остатки цистеина стабилизируют нативную структуру инсулина дисульфидными связями с А-цепью (А7–В7 и А20–В19).

В-цепь может существовать в двух различных состояниях при кристаллизации [30]. В Т-конформации в центральную  $\alpha$ -спираль вовлечены остатки от В9 до В19, в то время как N-конец В-цепи, образованный остатками В1–В8, развернут. В R-конформации  $\alpha$ -спираль непрерывна на участке В1–В19. Конформационный переход от Т- к R-состоянию изучался в растворах гексамерного инсулина, изменение содержания  $\alpha$ -спиралей отслеживали методом кругового дихроизма [31] или 2D-ЯМР [32, 33]. Было показано, что переход Т6  $\rightarrow$  R6 осуществляется в присутствии фенольных соединений и некоторых других циклических спиртов [34], в том числе циклогексанола [35]. Добавление фенольных лигандов индуцирует конформационный переход N-конца В-цепи не только в нативном инсулине, но и в его аналоге лизпро (LysB28, ProB29) [36]. Известно, что мономерные формы инсулина принимают R-подобную конформацию в растворе. Вторичная структура обеих цепочек А и В определяет сродство к рецептору инсулина, поэтому в этих исследованиях был поднят вопрос о значении перехода Т  $\rightarrow$  R при связывании и активации инсулиновых рецепторов.

Рецептор инсулина представляет собой гомодимер, каждая субъединица которого состоит из двух полипептидных цепей  $\alpha$  и  $\beta$ . Внеклеточная  $\alpha$ -субъединица связывает инсулин, тогда как трансмембранная  $\beta$ -субъединица содержит внутриклеточный домен тирозинкиназы [37]. Мономерный инсулин связывается с охватывающим обе  $\alpha$ -субъединицы сайтом, в состав которого входит богатый лейциновыми повторами домен L1 одной  $\alpha$ -субъединицы и карбоксиконцевой домен ( $\alpha$ CT) другой. Связывание с инсулином вызывает репозиционирование спирали  $\alpha$ CT домена на поверхности L1 таким образом, что она с одной стороны взаимодействует с инсулином, а другой стороной с L1. В свою очередь, в структуре инсулина происходит смещение C-конца В-цепи относительно остальной части молекулы при связывании с  $\alpha$ CT [38, 39]. При этом PheB24 играет роль якоря в неполярном кармане, образованном поверхностью L1,  $\alpha$ CT и центральной  $\alpha$ -спиралью В-цепи инсулина [40]. Предполагается, что за взаимодействие с рецептором отвечают всего три участка вблизи поверхности молекулы инсулина: N-конец А-цепи (GlyA1–IleA2–ValA3–GluA4), C-конец А-цепи (TyrA19–CysA20–AsnA21) и C-конец В-цепи (GlyB23–PheB24–PheB25–TyrB26), поскольку было установлено, что остатки в этих регионах эволюционно консервативны [41]. Кроме того, в этих регионах было обнаружено несколько генетических мутаций, которые приводили к синтезу пептидов с низкой аффинностью связывания с инсулиновым рецептором (1–5% от нормальной). Пациенты, у которых были обнаружены замена Phe на Leu в положении B25 (инсулин Чикаго), Phe на Ser в B24 (инсулин Лос-Анджелес) и замена Val на Leu в A3 (инсулин Вакаяма), страдали сахарным диабетом 2-го типа [42–46].

Активность связывания гормона с рецептором снижалась на 30%, когда ацетилировали азот пептидной связи на N-конце А-цепи, что указывает на важность свободной положительно заряженной аминогруппы в A1 [33]. Удаление Gly в A1 снижало аффинность инсулина к рецептору на 15%, указывая на то, что солевой мостик, образованный между GlyA1 и карбоксильным концом В-цепи, значим для правильного позиционирования пептида [47]. Важно отметить, что конформация может иметь большее значение, чем конкретный боковой аминокислотный остаток. Так, замена GlyA1 на L-аминокислоты (Ala, Val, Leu, Pro, Trp, Lys или Glu) приводит к уменьшению связывания с рецептором до 2–20% от нормального значения, однако замена GlyA1 на D-аминокислоты (D-Phe, D-Leu, D-Trp, D-Ala, D-Lys или D-Glu) не снижает биологическую активность аналогов [48–51]. Мутации, нарушающие сворачивание  $\alpha$ -спирали



А-цепи, также приводят к снижению биологической активности, что определялось по уменьшению молярной эллиптичности кругового дихроизма [52].

Структура В-цепи является наиболее изученной. Показано, что первые четыре остатка В-цепи практически не влияют на активность связывания инсулина с рецептором, однако удаление HisB5 приводит к ее значительному снижению [52, 53]. LeuB6 является критически важным, так как делеция по данному а.о. приводила к 99% потере сродства к рецептору инсулина [54]. Показано, что синтетический аналог инсулина, содержащий замену His на Asp в B10, проявляет 500%-ное увеличение сродства к рецептору по сравнению с инсулином «дикого типа» [55]. Однако, следует отметить, что HisB10 является ключевым для биосинтеза инсулина, и когда он заменен на AspB10, созревания инсулина из проинсулина не происходит, что приводит к увеличению концентрации последнего [56, 57]. Карбоксильный конец В-цепи содержит эволюционно консервативные а.о., важные для связывания с рецептором, включая GlyB23, PheB24, PheB25 и TyrB26. В частности, PheB24 образует водородные связи, которые являются критическими для образования димера, а PheB25 демонстрирует различные конформации в двух молекулах, входящих в димер, что указывает на то, что он важен для нативной структуры инсулина [47]. Замена PheB24 на метионин или циклогексаналанин приводила к уменьшению времени разборки гексамеров аналогов инсулина [40].

Согласно данным кристаллографии доказана важность С-конца В-цепи инсулина для формирования димерных контактов. Было показано, что в формирование димерных контактов вовлечены а.о. в положениях B8, B9, B12, B13, B16, B23–B28. Исследование влияния мутаций в местах, отвечающих за формирование димерных контактов, привело к обнаружению наиболее важных мест в молекуле инсулина, точечные замены в которых приводят к значительному снижению способности инсулина формировать димеры [58]. Последовательным уменьшением длины молекулы инсулина с С-конца В-цепи установлено, что Pro в положении B28 критичен для инсулиновой самоассоциации в растворе. Удаление Pro в положении B28 или его замена, а особенно перестановка аминокислот в положении B28 и B29 (Lys–Pro) практически полностью редуцирует способность инсулина к формированию димеров, но при этом сохраняется способность инсулина формировать гексамеры [59]. Следует отметить, что во всех коммерческих препаратах инсулин для фармацевтических целей находится в гексамерной форме [60].



#### IV. АНАЛОГИ ИНСУЛИНА

Изучение структуры инсулина и определение важных участков молекулы, ответственных за формирование димерных, гексамерных контактов, а также участвующих во взаимодействии с инсулиновым рецептором, способствовало разработке аналогов инсулина. Поскольку инсулин функционирует в мономерной форме, то создание аналогов инсулина с модифицированной структурой должно было привести к изменению длительности и времени начала действия инсулиновых препаратов.

##### БАЗАЛЬНЫЕ И БОЛЮСНЫЕ АНАЛОГИ ИНСУЛИНА

Заместительная инсулиноterapia имеет целью максимальное приближение к физиологической секреции инсулина, при которой происходит постоянное выделение инсулина в малых объемах (количествах) – это так называемая базальная или фоновая секреция, и быстрое выделение инсулина  $\beta$ -клетками в ответ на прием пищи – болюсная секреция [61]. Терапия инсулином признана как эффективный способ предотвратить макро- и микрососудистые осложнения у пациентов, страдающих сахарным диабетом 1-го типа. Для того чтобы свести к минимуму дегенеративные изменения органов, больные диабетом должны поддерживать уровень глюкозы в крови в диапазоне, имитирующем нормальную секрецию инсулина [62]. В то же время, в ходе применения регулярного инсулина были выявлены такие негативные эффекты, как увеличение риска тяжелой гипогликемии, набор веса, изменчивость профиля действия [16, 63]. При внутривенном введении регулярного инсулина в кровь гексамеры практически немедленно диссоциируют на мономеры и могут взаимодействовать с рецепторами инсулина в тканях-мишенях, поэтому снижение уровня глюкозы наступает практически мгновенно. При подкожной инъекции инсулина гексамеры должны диссоциировать на мономеры в месте введения прежде, чем может произойти всасывание в кровоток. Такая задержка начала действия инсулина, в зависимости от места инъекции, вызывает вариabельность профиля действия и несоответствие между временем введением инсулина и приемом пищи. Пациенты вынуждены вводить дозу инсулина за 15–30 минут перед едой, что неудобно в повседневной жизни [64]. Для того чтобы улучшить контроль уровня глюкозы в крови, были разработаны различные по времени действия инсулиновые препараты (табл. 1).

Ослабление димерных контактов мономеров инсулина привело к получению аналогов короткого/быстрого действия (болюсные инсу-

Таблица 1. Характеристики инсулиновых препаратов [65–68]

| Болюсные препараты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Инсулин короткого действия                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              | Аналоги инсулина быстрого действия                                                                                                                                                                                                                                      |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>– Длительность действия – 6 часов и более.</li> <li>– Начало действия через 30 минут.</li> <li>– Часто действует дольше, чем необходимо для покрытия приема пищи, поэтому у некоторых людей возникает риск гипогликемии.</li> </ul>                                                                              | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Быстро усваивается и действует в течение 3–4 часов.</li> <li>– Работают быстрее, чем инсулин короткого действия и используются во время приема пищи, чтобы предотвратить резкое повышение сахара в крови после еды.</li> </ul> |
| Базальные препараты                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| Нейтральный протамин Хагедорна (НПХ)                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    | Аналоги инсулина длительного действия                                                                                                                                                                                                                                   |
| <ul style="list-style-type: none"> <li>– Длительность действия – 8-12 часов.</li> <li>– Принимается дважды в день.</li> <li>– Возможно помутнение препарата, который необходимо суспендировать встряхиванием флакона/ручки.</li> <li>– Некоторые люди могут быть более склонны к гипогликемии, чем при приеме инсулина длительного действия.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>– Длительность действия – 24 часа.</li> <li>– Усваивается медленно.</li> <li>– Принимается один раз в день, иногда дважды.</li> </ul>                                                                                            |

лины). Таковыми являются инсулин лизпро (Humalog®), инсулин аспарт (NovoRapid®) и инсулин глулизин (Apidra®). Эти инсулины начинают действовать через 5–15 мин после их подкожного введения, пик действия наступает через 1–2 часа, общая длительность действия не превышает 4-х часов. Таким образом, эти инсулины предназначены для эффективного контроля гипергликемии сразу после приема пищи.

Замедление диссоциации гексамерного инсулина на мономеры привело к получению инсулина длительного/ультрадлительного действия, например, инсулин гларгин (Lantus®) и инсулин детемир (Levemir®), уникальность которых заключается в отсутствии пикового повышения концентрации инсулина в крови и поддержании его стабильной концентрации в течение 24 часов. Иными словами такие инсулины практически полностью восполняют базальную секрецию инсулина, имеющую место у здоровых людей. Низкая скорость абсорбции инсулиновых аналогов длительного действия позволяет применять препараты один раз в сутки. После подкожного введения начало их действия наступает через 1 час, а продолжительность действия может достигать до 24 часов (рис. 3).

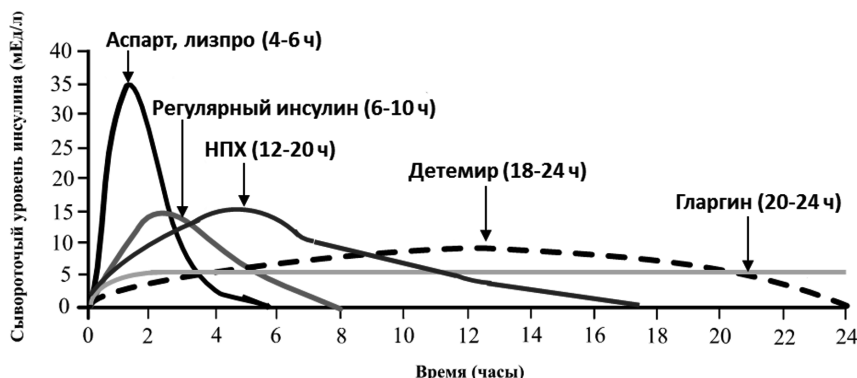


Рис. 3. Схематически показаны фармакокинетические профили аналогов инсулина ([19] с модификациями).

Таким образом, совместное применение аналогов инсулина ультракороткого и длительного действия практически полностью имитирует 2-х фазную физиологическую секрецию инсулина, характерную для здорового организма. Кроме того, применение этих инсулинов сопровождается значимо меньшей частотой развития гипогликемии, являющейся наиболее опасным осложнением инсулинотерапии.

Инсулин Humulin® был первым инсулином, произведенным с помощью технологии рекомбинантной ДНК [69]. Затем появились различные инсулиновые препараты: нейтральный протамин Хагедорна (НПХ), быстродействующие аналоги, базальные аналоги и предварительно смешанные аналоги инсулина от таких компаний, как «Eli Lilly and Company», «Novo Nordisk» и «Sanofi» [70].

#### ПРОИЗВОДСТВО И ПРИМЕНЕНИЕ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА

Способы получения лекарственного препарата инсулина были первоначально разработаны с использованием экстрактов из поджелудочной железы животных. Однако, инсулин быка и свиньи по составу аминокислот отличается от инсулина человека. В результате, использование таких инсулинов для человека приводит к нежелательным эффектам (например, к аллергии). Кроме того, потребности в данном препарате не могут быть покрыты инсулином животного происхождения из-за ограниченности сырьевой базы.

С появлением технологии рекомбинантных ДНК впервые стало возможным крупномасштабное производство, полностью соответствующего природному генно-инженерного инсулина человека и его аналогов, с заданными свойствами и управляемыми сроками действия.

Производство инсулинов разного срока действия важно, поскольку позволяет при сочетании в одном препарате обоих инсулинов осуществлять прием пациентами препарата непосредственно перед едой и уменьшить количество инъекций, что является удобным для диабетических больных.

В развитых странах мира и Европы практически все больные сахарным диабетом, нуждающиеся в инсулинотерапии, получают генноинженерные аналоги инсулинов. В России дети, больные сахарным диабетом, нуждающиеся в инсулинотерапии, на 100% обеспечиваются аналогами генноинженерных инсулинов человека, как наиболее эффективными и безопасными препаратами.

Наиболее важная особенность российского рынка препаратов инсулина заключается в том, что более двадцати лет он практически полностью контролируется иностранными производителями, с постоянным лидерством трёх фармацевтических компаний: «Novo Nordisk» (Дания), «Eli Lilly and Company» (США) и «Sanofi» (Франция) [71] (табл. 2).

Критерием локального препарата от Минпромторга РФ до настоящего времени остается признание упаковочной стадии, достаточной для «прописки» иностранного препарата в России. Наиболее распространенными препаратами инсулина в российском импорте являются Актрапид НМ и Протафан НМ («Novo Nordisk»), Хумулин регуляр и Хумулин НПХ («Eli Lilly and Company»). Эти препараты являются аналогами соответственно Инсурана Р и Инсурана НПХ (Институт биоорганической химии им. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова).

Окончание сроков действия в 2014 году патентов на продукты Levemir® и NovoLog® (активные компоненты – детемир и аспарт соответственно) компании «Novo Nordisk», также, как и на препарат Humalog® (лизпро инсулин) «Eli Lilly and Company», позволяет компаниям по всему миру начать производство аналогичных инсулиновых продуктов – биосимиляров (табл. 3).

Биосимиляры изготавливаются с характеристиками, аналогичными соответствующим оригинальным препаратам. Для получения разрешения регулирующих органов применительно к биосимилярам необходимо подтверждение таких характеристик как сходство, безопасность и эффективность, а также определение патентного статуса оригинальных биофармацевтических препаратов. Биосимиляр может не быть точной копией своего предшественника, но быть только похожим на него с точки зрения терапевтического действия. Сроки патентной защиты и монопольного использования рынка должны быть завершены в зоне действия патентов.

**Таблица 2. Процентное соотношение производителей  
инсулинов и аналогов в РФ**

(по данным информационно-аналитической системы  
«Клифар-Госзакупки» за 2015–2016 г.г.)

| <b>Производители инсулинов и аналогов в РФ</b>                                                   | <b>2015</b> | <b>2016<br/>(первое<br/>полугодие)</b> |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|----------------------------------------|
| «НОВО НОРДИСК» (датская субстанция фирмы «Novo Nordisk»)                                         | 37,1%       | 40,1%                                  |
| «САНОФИ» (немецкая субстанция «Sanofi»)                                                          | 35,9%       | 34,4%                                  |
| «ЭЛИ ЛИЛЛИ» (американская субстанция «Eli Lilly and Company»)                                    | 18,2%       | 16,6%                                  |
| «ФАРМСТАНДАРТ» (субстанция от «Sanofi»)                                                          | 3,9%        | 3,7%                                   |
| ЗАВОД «МЕДСИНТЕЗ» (возможно, китайская субстанция)                                               | 2,5%        | 2,3%                                   |
| «Р-ФАРМ» (стадия упаковки ГЛФ от «Eli Lilly and Company»)                                        | 1,2%        | 0,7%                                   |
| «GLAXOSMITHKLINE» (Британия поставляет ГЛФ от польской компании «Bioton S.A.»)                   | 0,5%        | 0,2%                                   |
| «ГЕРОФАРМ» (РФ, полный цикл – собственная субстанция)                                            | 0,4%        | 1,9%                                   |
| «MARVEL LIFESCIENCES» (Индия)                                                                    | 0,2%        | 0,1%                                   |
| «WOCKHARDT» (Индия, планирует локализацию производства стадии упаковки через компанию «ФармЭко») | 0,2%        | 0,1%                                   |
| <i>Итого ТОП-3</i>                                                                               | 91,3%       | 91%                                    |
| <i>Итого ТОП-10</i>                                                                              | 100%        | 100%                                   |

К биосимилярам относятся коммерчески доступные копии гларгина – Basalog® (Biocon Ltd., Бангалор, Индия), Basalin® (Gan & Lee, Пекин, Китай), а также предварительно смешанные инсулиновые составы Gensulin® (Bioton S.A., Варшава, Польша), Insugen® (Biocon Ltd, Бангалор, Индия), Wosulin® (Wockhardt Ltd, Мумбаи, Индия) и Biosulin® (MJ Biopharm Pvt Ltd, Мумбаи, Индия) [72].

В Российской Федерации с начала 2000-х годов наблюдался существенный рост числа разработок биоаналогичных препаратов генно-инженерного человеческого инсулина и последующая их государственная регистрация на территории РФ. При подтверждении безопасности и эффективности препаратов генно-инженерного человеческого инсулина, зарегистрированных в Российской Федерации, подход доказательства биоаналогичности в процессе пред-

Таблица 3. Основные текущие разработки инсулиновых биосимиляров [16, 72]

| Разработчик             | Продукты компании                                | Фаза испытаний                              |
|-------------------------|--------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| «Eli Lilly and Company» | LY2963016                                        | Предъявлен в ЕС (июль 2013)                 |
|                         | Новаторский базальный инсулин LY2605541          | Фаза III                                    |
| «Sanofi»                | U-300 (Лантус)                                   | Фаза III                                    |
|                         | Lixisenatide + Лантус                            | Фаза I / II                                 |
| «Novo Nordisk»          | Tresiba (degludec)<br>Ryzodeq (Tresiba+Novolog)  | Продолжается для США, зарегистрированы в ЕС |
|                         | IDegLira (liraglutide+degludec)                  | Предъявлен                                  |
|                         | Базальный пероральный инсулин (таблетки)         | Фаза I                                      |
|                         | Расширение ассортимента, FIAsp (Novorapid)       | Фаза III                                    |
| «Biocon»/ (Милан)       | Биосимиляры (на основе Лантус, Хумалог, Новолог) | Фаза I                                      |
| «Biocon»/ (BMS)         | IN-105, Prandial пероральный инсулин             | Фаза I / II (ЕС)                            |
| «Biodel»                | Хумалог-биосимиляр                               | Фаза II                                     |
|                         | Лантус-биосимиляр                                | Фаза I (США)                                |
| «MannKind Corporation»  | Afrezza - ультра-короткий вдыхаемый инсулин      | Фаза III (США)                              |

регистрационных исследований не применялся. Поэтому зарегистрированные в настоящее время в РФ биоаналогичные препараты генно-инженерного инсулина человека, по сути, таковыми не являются. Однако их нельзя признать и оригинальными лекарственными препаратами, так как объем предрегистрационных исследований был существенно сокращен.

Для подтверждения биоаналогичности новых препаратов генно-инженерного инсулина человека и его аналогов оригинальному лекарственному препарату, необходимо придерживаться как ранее выработанных рекомендаций [73–75], так и использовать новые.

Кроме того, наметившаяся гармонизация с европейскими подходами к подтверждению биоаналогичности лекарственных препаратов позволит разработать научно-методические подходы и программу качественных доклинических и клинических исследований биоаналогичных препаратов генно-инженерного инсулина человека и его аналогов, а также подходы к экспертизе их результатов с целью оценки отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения указанных лекарственных препаратов.

#### СТРАТЕГИИ И РЕЗУЛЬТАТЫ РАЗРАБОТКИ АНАЛОГОВ ИНСУЛИНА

Различия в профилях аналогов инсулина теоретически позволяют пациентам, страдающим диабетом 1-го типа, динамическим образом контролировать уровень глюкозы в крови, чтобы избежать негативных последствий гипер- и гипогликемии. Однако, для этого нужно решить проблему имитации действия здоровой поджелудочной железы – поддержание базальных уровней и достижение пиковых уровней концентрации гормона во время приема пищи [76, 77].

Первым разработанным аналогом был быстродействующий инсулин лизпро, который был запущен в продажу в 1996 году. Как уже описывалось выше, инсулин лизпро основан на принципе ослабленной самоассоциации, вызванной инверсией а.о. в последовательности ProB28 LysB29 [78]. Инверсия двух остатков пролина и лизина в последовательности лизпро инсулина приводит к локальным конформационным изменениям на С-конце В-цепи, устраняющим два критических гидрофобных взаимодействия и ослабляющим две концевые водородные связи в бета-листе, которые стабилизируют димер [79]. Добавление фенольных лигандов индуцирует конформационный переход путем связывания со специфическими сайтами на гексамере инсулина, в результате чего N-концевые восемь аминокислот В-цепи превращаются из удлиненной конформации в альфа-спираль [80]. Наряду с лизпро, классическими аналогами инсулина короткого и ультракороткого действия считаются аспарт и глулизин, которые быстрее диссоциируют на димеры и мономеры, чем обычный инсулин человека, поэтому быстро всасываются, но имеют более короткую продолжительность действия [81–83].

Фармакокинетический профиль концентрации лизпро в плазме в первый час после инъекции в 2 раза выше чем у обычного инсулина человека, однако время достижения максимальной концентрации лизпро составляет половину от обычной максимальной для инсулина. Через 3–4 часа после инъекции концентрация быстродействующих инсулинов падает до 20% от максимальной, в то время как



регулярный инсулин все еще поглощается в месте введения [84]. В то же время инсулин лизпро быстрее и лучше снижает пиковый уровень глюкозы в течение 0–4 часов после еды, что позволяет вводить инсулин лизпро в течение 15 мин после начала приема пищи. В отличие от обычного инсулина человека, место инъекции лизпро инсулина менее важно в отношении скорости начала действия. Однако для быстродействующих аналогов инсулина рекомендуются инъекции в брюшную стенку, поскольку абсорбция при введении в дельтовидную и четырехглавые мышцы происходит медленнее, чем при введении в брюшную полость и приводит к увеличению продолжительности действия как обычного инсулина, так и лизпро инсулина в соответствии с фармакокинетическими и фармакодинамическими данными [66].

Вторым существенным компонентом контроля уровня глюкозы при инсулинозависимом диабете является применение аналогов инсулина длительного действия для замещения базальной потребности в инсулине, что снижает риск ночной гипогликемии по сравнению с препаратами инсулина человека [85, 86]. Первыми препаратами для реализации стратегии замещения базального уровня гормона были использованы нейтральный протамин Хагедорна (НПХ), а также инсулины ленте и ультраленте [67, 87]. Для производства НПХ к инсулину добавляют протамин и  $Zn^{2+}$ , что приводит к образованию неоднородных суспензий и несколько продлевает время их действия, в то же время воспроизводимость профилей таких инсулинов остается низкой, что частично объясняется необходимостью ресуспендирования инсулина во флаконе перед его введением. Различия в продолжительности действия этих инсулинов связаны со стохастическим высвобождением гексамеров из агрегатов [88].

Более эффективной оказалась стратегия разработки базальных инсулинов, основанная на снижении растворимости в месте инъекции. Представителем такой стратегии является инсулин гларгин, модификация которого приводит к сдвигу изоэлектрической точки для резкого снижения растворимости при физиологических значениях pH, делая инсулин гораздо менее растворимым при инъекции [68, 89, 90]. Рост значения изоэлектрической точки достигается за счет двух дополнительных остатков Arg в положениях B31 и B32, кроме того Gly вводится в A21 для поддержания химической стабильности лекарственной формы. В работах, описывающих сравнение эффективности действия инсулина человека с его аналогами, показаны схожие уровни контроля глюкозы, при этом аналоги лучше справлялись с гипогликемией, особенно ночью. Однако о гларгине

сообщалось, что его прием приводил к увеличению веса больных сахарным диабетом [91]. В настоящее время использование стратегии, примененной для разработки гларгина, было прекращено, так как отмечались воспалительные реакции в местах инъекции [16].

Альтернативным подходом, используемым для получения аналогов инсулина пролонгированного действия, является ацилирование LysB29 жирнокислотным хвостом. Такая модификация, приводящая к обратимому связыванию с альбумином, циркулирующим в крови и увеличивающая длительность действия гормона, была использована для разработки детемира [92], а также инсулина деглудек [93, 94]. Инсулин деглудек (Tresiba, «Novo Nordisk») является человеческим инсулином, у которого к LysB29 присоединен остаток пальмитиновой кислоты, а Thr в положении B30 удален (de-B30). Для изготовления лекарственной формы используется фенол и цинк, в их присутствии аналог находится в стабильной дигексамерной форме, жирные кислоты расположены между гексамерами, взаимодействуя также с остатками PheB1 каждой цепи [95]. Олигомерная структура инсулина деглудек в основном отвечает за его продолжительность действия, в то время как его сродство с альбумином плазмы, как полагают, обеспечивает эффект амортизации и уменьшает изменчивость профиля действия за счет более равномерного поглощения в кровоток [93]. Клиническая оценка применения в терапии инсулина деглудек показала эффект снижения глюкозы, который сохраняется до 42 часов с одновременным снижением эпизодов ночной гипогликемии по сравнению с применением инсулина гларгин [96].

Другим возможным направлением создания базальных инсулинов является разработка гепатоселективных аналогов, которые имеют высокий потенциал для снижения уровня глюкозы, риска гипогликемии и массы тела по сравнению с обычным инсулином [97]. Так, разработанный «Eli Lilly and Company» инсулин пеглизпро основан на присоединении к молекуле инсулина полиэтиленгликоля (ПЭГ) [98]. Такая модификация приводит к увеличению гидродинамического радиуса молекулы, что с одной стороны еще позволяет мономерам пеглизпро проникать через капилляры печени, но с другой стороны препятствует проникновению через капилляры других тканей, таких как жировая или мышечная. Фармакокинетические исследования показали длительный период полувыведения – в течение 2–3 дней. При этом не наблюдалось разницы в общей частоте гипогликемии у больных, получающих инсулин пеглизпро по сравнению с пациентами, получавшими инсулин гларгин, хотя первые демонстрировали более низкую частоту ночной гипогликемии [99]. Однако, работы

над этим типом аналогов были прекращены, так как в ходе клинических испытаний были выявлены нарушения функции печени, особенно повышенный уровень ферментов аланина и аспартатаминотрансферазы [100].

Важным направлением является разработка аналогов, специфичных к изоформам рецепторов инсулина, так как были высказаны предположения, что некоторые аналоги могут увеличивать активацию рецептора IGF-1, что может приводить к стимуляции роста опухоли [101, 102]. Известно, что инсулин связывается с высоким сродством ( $K_d \sim 5 \times 10^{-11} \text{ M}$ ) к инсулиновому рецептору (IR) и с низким, но все же значительным сродством ( $K_d \sim 10^{-8} \text{ M}$ ) к IGFR [33]. В свою очередь изоформы инсулинового рецептора – IRA и IRB отличаются по функциям и экспрессии в органах и тканях. Отмечено, что требуемый метаболический эффект инсулина опосредуется IRB, в то время как избыточное связывание с IRA, также как и с IGFR может приводить к значительному митогенному эффекту. Модели *in vitro* показывают, что аналоги короткого действия связываются с рецепторами IRA, IRB и IGFR аналогично инсулину. Напротив, аналоги длительного действия как гларгин, так и детемир часто демонстрируют сниженное связывание с IR и повышенное связывание с IGFR. Отличия во внутриклеточной передаче сигнала от естественного инсулина заключаются в преобладающей активации киназы ERK, а не AKT [20].

Увеличить рецептор-связывающую активность можно за счет следующих модификаций гормона: удаление с C-конца B-цепи остатков B27–B30 с одновременным амидированием C-конца в положении B26 и включением N-метиловой аминокислоты или D-энантиомера. Однако, метилирование Туг в положении B26 или его замена на N-метилованный аланин в инсулине приводит к снижению рецептор-связывающей активности, также, как и объемные аминокислоты в укороченных инсулиновых аналогах – N-MePheB26, N-MeTyrB26 [103].

Новые стратегии разработки базальных препаратов инсулина развиваются в основном в трех направлениях: 1) связывание инсулина с реагирующими на глюкозу полимерами для регулируемого высвобождения гормона [62], 2) реорганизация гексамеров инсулина [104], 3) pH-зависимое связывание ионов цинка сконструированными сайтами His-X3-His («гистидиновыми скобами») на поверхности гексамера [105, 106].

Таким образом, по профилю действия существующие аналоги инсулина можно подразделить следующим образом:

- короткого и ультракороткого действия, которые имитируют так называемую прандиальную (после приема пищи) секрецию инсулина;
- длительного действия (беспиковые), которые предназначены для имитации устойчивого (базального) профиля секреции здоровой поджелудочной железы.

В настоящее время используется базально-болюсная терапия, поскольку она более гибкая, чем другие режимы [107–110]. Что касается инсулина промежуточного действия, то распространение аналогов инсулина длительного действия сделало его сегодня уже не актуальным.

## **V. ФИБРИЛЛООБРАЗОВАНИЕ ИНСУЛИНОВЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Инсулин имеет большую склонность к агрегации и формированию фибрилл. Данная способность инсулина к полимеризации и возможность получать воспроизводимые кинетические данные обусловила большое внимание к инсулину как к модельному объекту для изучения процесса формирования фибрилл. При поиске различных мономерных форм инсулина также исследовалась способность инсулина к агрегации и формированию фибрилл.

Фибриллообразование инсулина является нежелательным явлением при использовании инсулина в терапевтических целях. Немутантный инсулин для инъекций склонен при различных внешних воздействиях формировать фибриллы. Частое явление при получении, хранении, транспортировке инсулина – его спонтанная полимеризация. Кроме того, существует еще проблема инъекционного амилоидоза инсулина, наблюдаемая при частых инъекциях препаратов.

Агрегация инсулина в нерастворимые фибриллы (фибрилляция) может приводить к осложнениям у пациентов с диабетом, таким как снижение терапевтического эффекта инсулина, закупорка устройств доставки инсулина или потенциально повышенный иммунологический ответ. Образование фибрилл может влиять на гликемический контроль, кроме того удорожает процедуру лечения и снижает ее эффективность [111].

Выявление участков молекулы инсулина, ответственных за агрегацию и стабильность, будет способствовать разработке новых аналогов, лучше контролирующих уровень глюкозы в крови, поможет снизить склонность к фибриллогенезу инсулина в местах инъекций путем уменьшения вероятности самоассоциации [112]. При этом наиболее важными для исследования являются ранние стадии образования инсулиновых фибрилл [113].

Предполагается, что в процессе роста фибрилл инсулина ключевую роль играет механизм конформационного смещения С-конца В-цепи, который приводит к экспонированию на поверхность домена с алифатическими а.о. А2, А3, В11 и В15. Выступающий домен в свою очередь взаимодействует с другим гидрофобным доменом, содержащим а.о. А13, В6, В14, В17 и В18. [114]. Замена Thr в положении А8 на His способствовала снижению фибрилляции аналога инсулина [115].

Показана роль дисульфидных связей для фибриллогенеза инсулина. Разрушение S–S связи в положении А7–В7 индуцирует разворачивание структуры инсулина и более высокую фибрилляцию, чем разрушение внутрицепочечной S–S связи А6–А11 [116]. По-видимому, с этим связана низкая склонность к фибриллогенезу одноцепочечных аналогов инсулина [117].

Несмотря на то, что кинетика образования фибрилл нативным инсулином активно изучалась [118–120], данных о фибриллогенезе его аналогов не так много. Как отмечалось, в настоящее время существуют аналоги инсулина разного срока действия: инсулины быстрого действия (лизпро, аспарт и др.); длительного действия (гларгин, деглудек и др.). Для большинства инсулиновых аналогов в различных условиях показано, что формирование фибрилл происходит в основном медленнее, чем исходного инсулина [115].

Наиболее изучена фибрилляция быстродействующих аналогов. Выявлены различия в скорости и характере фибриллообразования для лизпро, аспарта и глулизина. Все три аналога демонстрировали более длительный лаг-период и более низкую скорость фибрилляции по сравнению с обычным инсулином. При этом различия между аналогами по скорости фибриллогенеза в разных исследованиях могут быть противоречивы [121, 122]. Как правило, при конструировании инсулинов быстрого действия, основное внимание уделяется на дизайну а.о., задействованных в формировании димерных контактов и не влияющих на гексамерные контакты. Одновременно учитываются а.о., ответственные за взаимодействие с инсулиновыми рецепторами (табл. 4).

Нами для изучения процесса фибриллообразования был выбран рекомбинантный инсулин и инсулин лизпро. Оба препарата были предоставлены Научно-Производственной Корпорацией Биоран. Выше было сказано, что лизпро инсулин является аналогом инсулина быстрого действия. Первичная структура лизпро инсулина отличается от регулярного инсулина человека перестановкой а.о. в В-цепи в положении 28 и 29 (инверсия LysB28(Pro) и ProB29(Lys)). Эти остатки

**Таблица 4. Определение контактирующих поверхностей, данные по а.о., участвующих в димерных, гексамерных контактах и контактах с инсулиновым рецептором [58, 104, 114, 123]**

| <b>Димерные контакты</b>                          | <b>Гексамерные контакты</b>                        | <b>Контакты с инсулиновым рецептором</b>                           |
|---------------------------------------------------|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| A21, B8, B9, B12, B16, B20, B21 и сегмент B23–B28 | A13, A14, A17, B1, B2, B4, B10, B13, B14 и B17–B20 | A1, A5, A19, A21, B12, B16, B23, B24, B25.<br>Основные – B24 и B25 |

участвуют в димеризации молекул инсулина и при этом не мешают формированию гексамера инсулина.

При изучении фибриллярных структур основными методами исследования являются флуоресцентная спектроскопия (связывание тиюфлавина Т (ThT)), электронная микроскопия (формирование фибрилл) и рентгеноструктурный анализ (наличие характерных рефлексов).

Наш опыт работы с рекомбинантным инсулином человека и его лизпро-аналогом показал, что скорость формирования фибрилл для этих инсулинов отличается [124]. Согласно данным флуоресцентной спектроскопии лаг-период для рекомбинантного инсулина составляет около 8–10 часов и активная полимеризация фибрилл инсулина происходит после 10–12 часов инкубации (2 мг/мл, 20 % уксусной кислоты (рН 2), 140 мМ NaCl, 37 °С). При этом формирование крупных кластеров фибрилл происходит после 24 часов инкубации. В то же время для лизпро-инсулина отмечается удлинение лаг-периода на 5 часов. Однако, по данным электронной микроскопии морфология инсулина и лизпро-инсулина идентична и в обоих случаях зрелые фибриллы достигают длины 10–12 мкм, при этом диаметр самых тонких (одиночных) фибрилл составляет около 6–7 нм (рис. 4 и рис. 5).

При удлинении времени инкубации наблюдается значительный полиморфизм зрелых фибрилл. Фибриллы в данных условиях имеют тенденцию взаимодействовать друг с другом латерально, что приводит к формированию лент разной ширины, перекрученных лент, пучков разного диаметра, а при увеличении времени инкубации к формированию крупных кластеров фибрилл, составленных из инсулиновых фибрилл [125, 126].



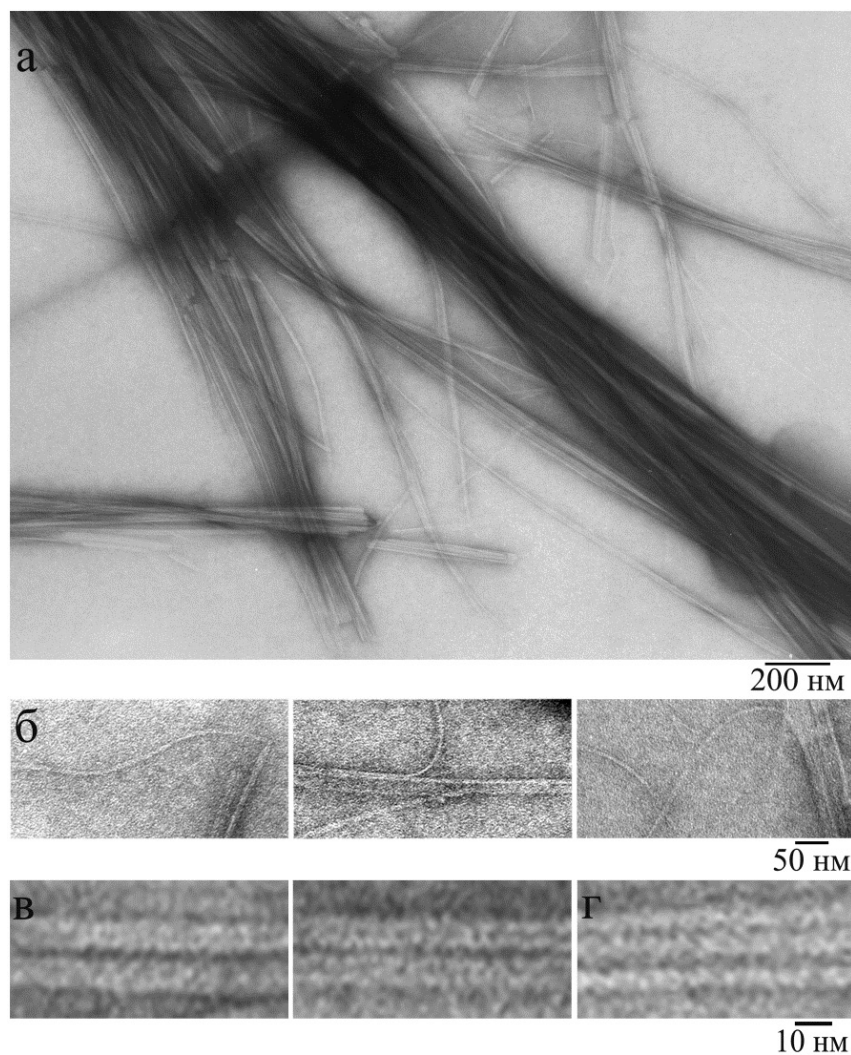


Рис. 4. Электронно-микроскопические изображения рекомбинантного цинк-свободного инсулина человека в условиях 20 %-ной уксусной кислоты (рН 2,0), 140 мМ NaCl после 24 часов инкубации при 37°C (2 мг/мл) (модифицировано и адаптировано по [123]).

(а) – поле препарата;

(б) фрагменты фибрилл с наименьшим диаметром;

(в, г) – одиночные фибриллы с большим увеличением: (в) – укладка кольцевых олигомеров кольцо к кольцу, вид сверху (два изображения); (г) – вид сбоку.



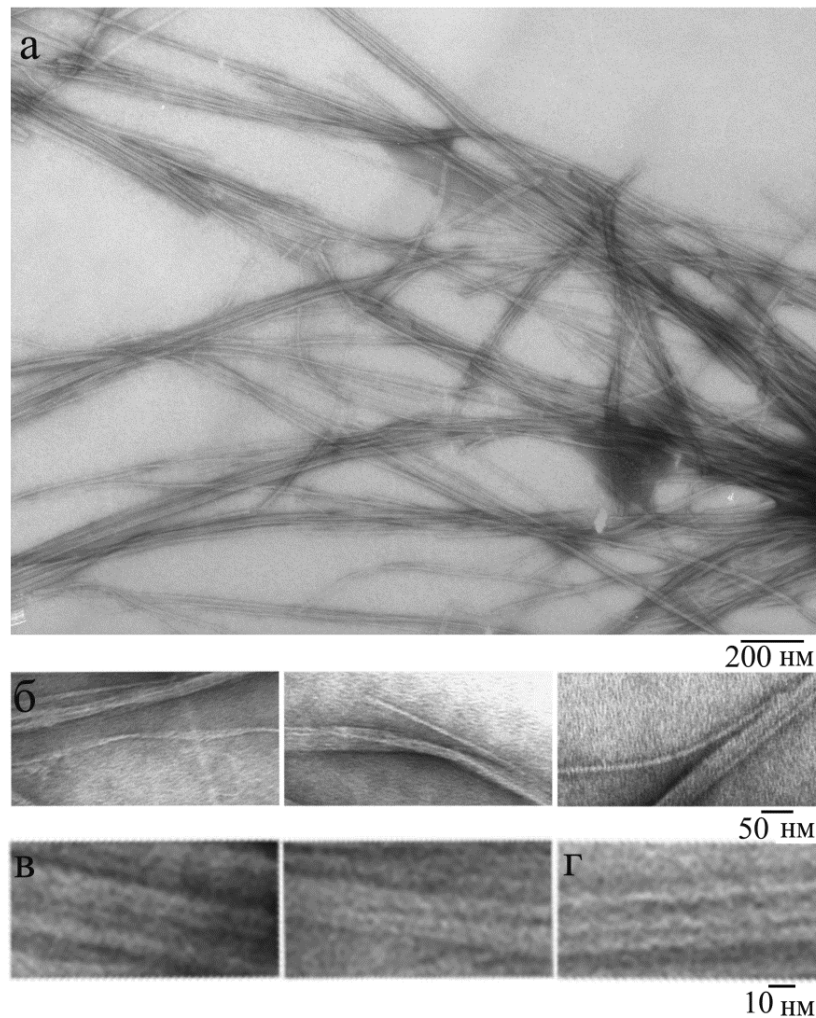


Рис. 5. Электронно-микроскопические изображения рекомбинантного лизпро аналога инсулина человека в условиях 20 %-ной уксусной кислоты (рН 2,0), 140 мМ NaCl после 24 часов инкубации при 37°C (2 мг/мл) (модифицировано и адаптировано по [123]).

- (а) – поле препарата;
- (б) фрагменты фибрилл с наименьшим диаметром;
- (в, г) – одиночные фибриллы с большим увеличением;
- (в) – укладка кольцевых олигомеров кольцо к кольцу, вид сверху (два изображения);
- (г) – вид сбоку.

Согласно упрощенной схеме формирование фибрилл происходит в следующей последовательности: дестабилизированные мономеры, олигомеры, зрелые фибриллы, агрегаты фибрилл разной морфологии. По данным электронной микроскопии олигомерные частицы наблюдаются на ранних этапах формирования фибрилл. С появлением фибрилл и их удлинением олигомерные частицы постепенно исчезают. В схеме формирования фибрилл именно переход от олигомеров в фибриллы является самым загадочным. Однако, если рассмотреть зрелые одиночные фибриллы при большом увеличении (рис. 4в и 5в), то можно заметить, что они сформированы из кольцевых олигомеров с диаметром, совпадающим с диаметром олигомеров на начальном этапе формирования фибрилл. Если такая фибрилла будет лежать кольцевыми олигомерами на подложке, то мы можем оценить размеры кольцевого олигомера. Для обоих инсулинов наружный диаметр кольцевого олигомера (диаметр фибриллы) составляет около 6–7 нм, внутренний около 2 нм. При этом кольцевые олигомеры уложены в фибрилле либо кольцо к кольцу своими боковыми сторонами, либо слегка перекрывая друг друга (домино). Если кольцевые олигомеры в фибрилле адсорбируются на подложке боковыми сторонами, то мы можем оценить приблизительную высоту кольцевого олигомера, которая составляет около 3–4 нм. Следует отметить, что при формировании лент, пучков одиночные фибриллы в них ассоциированы латерально, при этом, сформированные из кольцевых олигомеров фибриллы взаимодействуют друг с другом так, что мы видим только боковые поверхности олигомеров, высота которых составляет около 3 нм. Именно такой диаметр одиночной фибриллы наблюдается в лентах и пучках [126]. Согласно данным рентгеноструктурного анализа на рентгенограмме фибриллярного инсулина наблюдается наличие двух характерных для кросс- $\beta$  структуры рефлексов: меридионального 4,8 Å и экваториального 10,7 Å. Однако, экваториальный рефлекс для инсулина сильно диффузный, кроме того отмечается наличие рефлекса 30 Å. Данный рефлекс ранее приписывался расстоянию между латерально уложенными фибриллами. Эти данные совпадают с ранее полученными в других работах [127, 128]. Кросс- $\beta$  структура подразумевает, что фибрилла состоит из  $\beta$ -листов, идущих параллельно оси фибриллы на расстоянии 9–11 Å друг от друга, а сам  $\beta$ -лист сформирован из  $\beta$ -участков, расположенных на расстоянии 4,6–4,8 Å и идущих перпендикулярно оси фибриллы [129]. Тогда возникает вопрос о способе формирования фибрилл длиной 10–15 мкм из бета-листов, проходящих вдоль всей оси фибриллы при ее диаметре 8–10 нм. В этой связи следует обратить внимание на то, что еще в 1953 г. Колтуном при

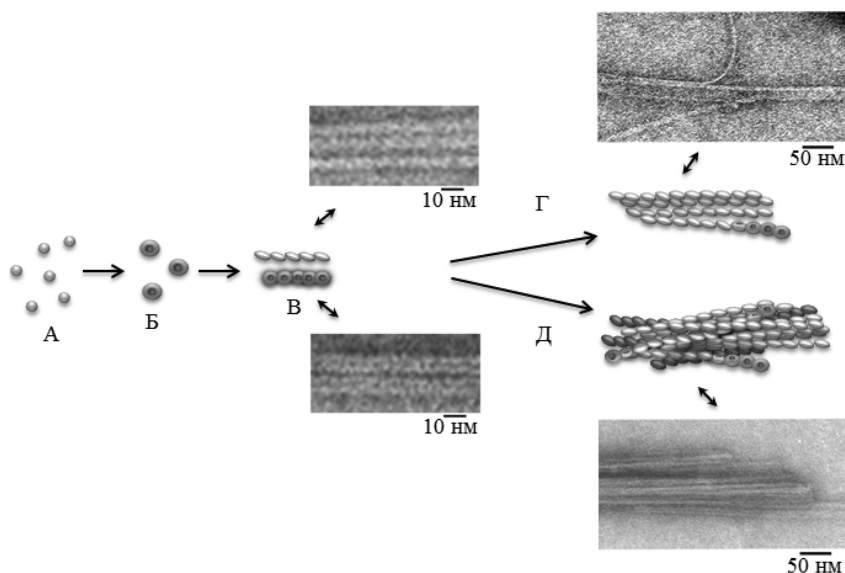


Рис. 6. Схематическое изображение механизма формирования амилоидных фибрилл инсулина человека и его лизпро аналога (модифицировано и адаптировано по [123]).

- А – дестабилизированные мономеры;
- Б – кольцевые олигомеры;
- В – фрагменты одиночных фибрилл в разной ориентации;
- Г – ленты (латеральная ассоциация фибрилл);
- Д – пучки фибрилл.

рентгеноструктурном анализе фибрилл инсулина было показано, что в фибриллярном инсулине молекулы находятся в нормально свернутой конформации [130]. На основании полученных данных, нам представляется, что основным строительным блоком при формировании фибрилл инсулина может быть кольцевой олигомер – гексамер (рис. 6. и рис. 7.). Согласно предложенной нами модели формирования фибрилл легче можно объяснить полиморфизм фибрилл, дробление, ветвление, шероховатость поверхности (при нерегулярной ассоциации кольцевых олигомеров) и т.д. При этом стоит отметить, что гексамер, участвующий в построении фибриллы, отличается по структуре от цинк-связанного кристаллического гексамера. На это косвенно указывают данные о том, что при сшивке остатков А1 и В29 пептидной связью не происходит формирование фибрилл [114]. Скрепленные концы препятствуют структурной перестройке

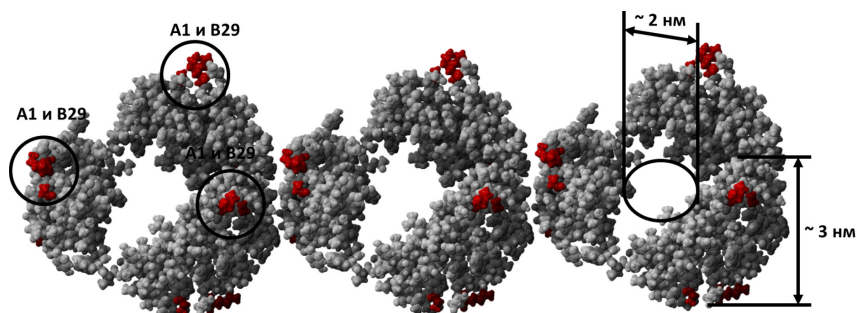


Рис. 7. Модель укладки трёх гексамеров инсулина.

Модель была построена с помощью программы YASARA. В качестве минимальной структурной единицы была использована структура димера инсулина из банка белковых структур (PDB-код 5E7W). Выделены а.о. GlyA1 и LysB29, важные для образования фибрилл.

мономера, тем самым мешая принимать конформацию, способную к фибриллообразованию. Кроме того, закреплённые концы, не позволяют такому модифицированному мономерному инсулину связываться с инсулиновым рецептором [131].

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Потребности заместительной инсулиновой терапии сахарного диабета стимулировали интерес к разработке структурных аналогов инсулина. Исследования, которые были проведены за рубежом, а также в нашей стране, позволили создать различные инсулиновые препараты болюсного и базального действия. Тем не менее, нормализация контроля уровня глюкозы в крови без риска гипогликемии и доставка препарата в удобной для пациента форме по-прежнему остаются важными стратегическими задачами в лечении сахарного диабета. При получении аналогов инсулина для терапевтических целей следует учитывать:

1. Гексамерная форма инсулина более стабильна, следовательно, замены а.о. не должны производиться в местах гексамерных контактов.
2. При замене а.о. в местах димерных контактов следует учитывать, что часть а.о. в этих местах отвечают за взаимодействие с инсулиновым рецептором.
3. Поскольку мономерная форма инсулина более склонна к формированию фибрилл, следует исследовать различные инсулиновые мутанты на их склонность к формированию фибрилл.

В целом создание рецептор-селективных аналогов инсулина с пониженной склонностью к амилоидообразованию представляет большой интерес, поскольку наряду с восстановлением нормального уровня глюкозы в крови, позволит избежать побочных эффектов, связанных с возможными митогенными эффектами и фибрилляцией инсулиновых препаратов.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Banting, F.G., Best, C.J. (1922) The internal secretion of the pancreas [Reprinted in Vol. 80, 1972, to mark 50th anniversary of the discovery], *J. Lab. Clin. Medicine*, **7**, 251–266.
2. De Meyts, P. (2004) Insulin and its receptor: structure, function and evolution, *Bioessays*, **26**, 1351–1362.
3. Cabrera, S.M., Chen, Y.G., Hagopian, W.A., Hessner M.J. (2016) Blood-based signatures in type 1 diabetes, *Diabetologia*, **59** (3), 414–425.
4. Edelman, S., Pettus, J. (2014) Challenges associated with insulin therapy in type 2 diabetes mellitus, *Am. J. Med.*, **127**, 11–16.
5. Ткачук В.А., Воротников А.В. (2014) Молекулярные механизмы развития резистентности к инсулину, *Сахарный диабет*, **2**, 29–40.
6. Титов В.Н. (2012) Становление в филогенезе, этиология и патогенез синдрома резистентности к инсулину. Отличия от сахарного диабета второго типа, *Вестник РАМН*, **4**, 65–73.
7. American Diabetes Association. (2012) Diagnosis and classification of diabetes mellitus, *Diabetes Care*, **35**, Suppl 1, 64–71.
8. Chin, J.A., Sumpio, B.E. (2014) Diabetes mellitus and peripheral vascular disease: diagnosis and management, *Clin. Podiatr. Med. Surg.*, **31**, 11–26.
9. Todd, J.A. (1990) Genetic control of autoimmunity in type 1 diabetes, *Immunol. Today*, **11**, 122–129.
10. Redondo, M.J., Fain, P.R., Eisenbarth, G.S. (2001) Genetics of type 1A diabetes, *Recent Prog. Horm. Res.*, **56**, 69–89.
11. Ohtsubo, K., Chen, M.Z., Olefsky, J.M., Marth, J.D. (2011) Pathway to diabetes through attenuation of pancreatic beta cell glycosylation and glucose transport, *Nat. Med.*, **17**, 1067–1075.
12. Ye, J. (2013) Mechanisms of insulin resistance in obesity, *Front. Med.*, **7**, 14–24.
13. Chakraborty, C., Doss, C.G.P., Bandyopadhyay, S., Agoramoorthy, G. (2014) Influence of miRNA in insulin signaling pathway and insulin resistance: micro-molecules with a major role in type-2 diabetes, *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, **5**, 697–712.
14. Feng, X., Tang, H., Leng, J., Jiang, Q. (2014) Suppressors of cytokine signaling (SOCS) and type 2 diabetes, *Mol. Biol. Rep.*, **41**, 2265–2274.
15. Cheng, K., Andrikopoulos, S., Guntton, J.E. (2013) First phase insulin secretion and type 2 diabetes, *Curr. Mol. Med.*, **13**, 126–139.
16. Zaykov, A.N., Mayer, J.P., DiMarchi, R.D. (2016) Pursuit of a perfect insulin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **15**, 425–439.
17. Home, P., Riddle, M., Cefalu, W.T., Bailey C.J., Bretzel R.G., Del Prato, S., Leroith, D., Schernthaner, G., van Gaal, L., Raz, I. (2014) Insulin therapy in people with type 2 diabetes: opportunities and challenges?, *Diabetes Care* **37**, 1499–1508.



18. Джавахишвили Т.Ш., Романцова Т.И., Роик О.В. (2010) Динамика массы тела у больных сахарным диабетом 2 типа в течение первого года инсулинотерапии, *Ожирение и метаболизм*, **4**, 13–19.
19. Дедов И.И., Шестакова М.В., Моисеев С.В. (2005) Аналоги инсулина, *Клиническая фармакология и терапия*, **14** (2), 49–55.
20. Vigneri, R., Squatrito, S., Sciacca, L. (2010) Insulin and its analogs: actions via insulin and IGF receptors, *Acta Diabetol.*, **47**, 271–278.
21. Bell, G.I., Pictet R.L., Rutter, W.J., Cordell, B., Tischer, E., Goodman H.M. (1980) Sequence of the human insulin gene, *Nature*, **284**, 26–32.
22. Alarcón, C., Leahy, J.L., Schupp, G.T., Rhodes, C.J. (1995) Increased secretory demand rather than a defect in the proinsulin conversion mechanism causes hyperproinsulinemia in a glucose-infusion rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus, *J. Clin. Invest.*, **95**, 1032–1039.
23. Greider, M.H., Howell, S.L., Lacy, P.E. (1969) Isolation and properties of secretory granules from rat islets of Langerhans. II. Ultrastructure of the beta granule, *J. Cell Biol.*, **41**, 162–166.
24. Michael, J., Carroll, R., Swift, H.H., Steiner, D.F. (1987) Studies on the molecular organization of rat insulin secretory granules, *J. Biol. Chem.*, **262**, 16531–16535.
25. Chang, T.W., Goldberg, A.L. (1978) The metabolic fates of amino acids and the formation of glutamine in skeletal muscle, *J. Biol. Chem.*, **253**, 3685–3693.
26. Eto, K., Tsubamoto, Y., Terauchi, Y., Sugiyama, T., Kishimoto, T., Takahashi, N., Yamauchi, N., Kubota, N., Murayama, S., Aizawa, T., Akanuma, Y., Aizawa, S., Kasai, H., Yazaki, Y., Kadowaki, T. (1999) Role of NADH shuttle system in glucose-induced activation of mitochondrial metabolism and insulin secretion, *Science*, **283**, 981–985.
27. Bender, K., Newsholme, P., Brennan, L., Maechler, P. (2006) The importance of redox shuttles to pancreatic beta-cell energy metabolism and function, *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 811–814.
28. Nolan, C.J., Leahy, J.L., Delghingaro-Augusto, V., Moibi, J., Soni, K., Peyot, M.L., Fortier, M., Guay, C., Lamontagne, J., Barbeau, A., Przybytkowski, E., Joly, E., Masiello, P., Wang, S., Mitchell, G.A., Prentki, M. (2006) Beta cell compensation for insulin resistance in Zucker fatty rats: increased lipolysis and fatty acid signalling, *Diabetologia*, **49**, 2120–2130.
29. Prentki, M., Joly, E., El-Assaad, W., Roduit, R. (2002) Malonyl-CoA signaling, lipid partitioning, and glucolipotoxicity: role in beta-cell adaptation and failure in the etiology of diabetes, *Diabetes*, **51 Suppl 3**, 405–413.
30. Baker, E.N., Blundell, T.L., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.M., Hubbard, R.E., Isaacs, N.W., and Reynolds, C.D. (1988) The structure of 2Zn pig insulin crystals at 1.5 Å resolution, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **319**, 369–456.
31. Wood, S.P., Blundell, T.L., Wollmer, A., Lazarus, N.R., and Neville, R.W. (1975) The relation of conformation and association of insulin to receptor binding: x-ray and circular-dichroism studies on bovine and hystricomorph insulins, *Eur. J. Biochem.*, **55**, 531–542.
32. Williamson, K.L., and Williams, R.J. (1979) Conformational analysis by nuclear magnetic resonance: insulin, *Biochemistry*, **18**, 5966–5972.
33. Ramesh, V., and Bradbury, J.H. (1987) <sup>1</sup>H NMR studies of insulin: histidine residues, metal binding, and dissociation in alkaline solution, *Arch. Biochem. Biophys.*, **258**, 112–122.

34. Wollmer, A., Rannefeld, B., Johansen, B.R., Hejnaes, K.R., Balschmidt, P., and Hansen, F. B. (1987) Phenol-promoted structural transformation of insulin in solution, *Biol. Chem. Hoppe. Seyler.*, **368**, 903–911.
35. Pittman, I., and Tager, H.S. (1995) A spectroscopic investigation of the conformational dynamics of insulin in solution, *Biochemistry*, **34**, 10578–10590.
36. Bakaysa, D.L., Radziuk, J., Havel, H.A., Brader, M.L., Li, S., Dodd, S.W., Beals, J.M., Pekar, A.H., and Brems, D.N. (1996) Physicochemical basis for the rapid time-action of LysB28ProB29-insulin: dissociation of a protein-ligand complex, *Protein Sci.*, **5**, 2521–2531.
37. De Meyts, P., and Whittaker, J. (2002) Structural biology of insulin and IGF1 receptors: implications for drug design, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**, 769–783.
38. Menting, J.G., Whittaker, J., Margetts, M. B., Whittaker, L. J., Kong, G. K., Smith, B. J., Watson, C.J., Záková, L., Kletvíková, E., Jiráček, J., Chan, S.J., Steiner, D.F., Dodson, G.G., Brzozowski, A.M., Weiss, M.A., Ward, C.W., and Lawrence, M.C. (2013) How insulin engages its primary binding site on the insulin receptor, *Nature*, **493**, 241–245.
39. Menting, J.G., Yang, Y., Chan, S.J., Phillips, N.B., Smith, B.J., Whittaker, J., Wickramasinghe, N.P., Whittaker, L.J., Pandeyarajan, V., Wan, Z.L., Yadav, S.P., Carroll, J.M., Strokes, N., Roberts, C.T.Jr., Ismail-Beigi, F., Milewski, W., Steiner, D.F., Chauhan, V.S., Ward, C.W., Weiss, M.A., and Lawrence M.C. (2014) Protective hinge in insulin opens to enable its receptor engagement, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **111**, 3395–3404.
40. Pandeyarajan, V., Smith, B.J., Phillips, N.B., Whittaker, L., Cox, G.P., Wickramasinghe, N., Menting, J.G., Wan, Z.L., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., Lawrence, M.C., Weiss M.A. (2014) Aromatic Anchor at an Invariant Hormone-Receptor Interface, *J. Biol. Chem.*, **289**, 34709–34727.
41. Pullen, R.A., Lindsay, D.G., Wood, S.P., Tickle, I.J., Blundell, T.L., Wollmer, A., Krail, G., Brandenburg, D., Zahn, H., Gliemann, J., Gammeltoft, S. (1976) Receptor-binding region of insulin, *Nature*, **259**, 369–373.
42. Kwok, S.C., Steiner, D.F., Rubenstein, A.H., and Tager, H.S. (1983) Identification of a point mutation in the human insulin gene giving rise to a structurally abnormal insulin (insulin Chicago), *Diabetes*, **32**, 872–875.
43. Shoelson, S., Haneda, M., Blix, P., Nanjo, A., Sanke, T., Inouye, K., Steiner, D., Rubenstein, A., Tager, H. (1983) Three mutant insulins in man, *Nature*, **302**, 540–543.
44. Shoelson, S., Fickova, M., Haneda, M., Nahum, A., Musso, G., Kaiser, E.T., Rubenstein, A.H., Tager, H. (1983) Identification of a mutant human insulin predicted to contain a serine-for-phenylalanine substitution, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80**, 7390–7394.
45. Kobayashi, M., Ohgaku, S., Iwasaki, M., Maegawa, H., Shigeta, Y., Inouye, K. (1982) Supernormal insulin: [D-PheB24]-insulin with increased affinity for insulin receptors, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **107**, 329–336.
46. Nanjo, K., Sanke, T., Miyano, M., Okai, K., Sowa, R., Kondo, M., Nishimura, S., Iwo, K., Miyamura, K., Given, B.D. (1986) Diabetes due to secretion of a structurally abnormal insulin (insulin Wakayama). Clinical and functional characteristics of [LeuA3] insulin, *J. Clin. Invest.*, **77**, 514–519.
47. Blundell, T.L., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.C., Mercola D.A. (1972) Three-dimensional atomic structure of insulin and its relationship to activity, *Diabetes*, **21**, 492–505.



48. Cosmatos, A., Cheng, K., Okada, Y., Katsoyannis, P.G. (1978) The chemical synthesis and biological evaluation of [1-L-alanine-A]- and [1-D-alanine-A]insulins, *J. Biol. Chem.*, **253**, 6586–6590.
49. Geiger, R., Geisen, K., Summ, H.D., Langer, D. (1975) [(A1-D-alanine) insulin (author's transl)], *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.* **356**, 1635–1649.
50. Geiger, R., Geisen, K., Summ, H.D. (1982) [Exchange of A1-glycine in bovine insulin with L- and D-tryptophan], *Hoppe. Seylers. Z. Physiol. Chem.*, **363**, 1231–1239.
51. Nakagawa, S.H., Tager, H.S. (1989) Perturbation of insulin-receptor interactions by intramolecular hormone cross-linking. Analysis of relative movement among residues A1, B1, and B29, *J. Biol. Chem.*, **264**, 272–279.
52. Ogawa, H., Burke, G.T., Chanley, J.D., Katsoyannis, P.G. (1987) Effect of N-methylation of selected peptide bonds on the biological activity of insulin. [2-N-methylisoleucine-A] insulin and [3-N-methylvaline-A] insulin, *Int. J. Pept. Protein Res.*, **30**, 460–473.
53. Schwartz, G., Katsoyannis, P.G. (1978) Synthesis of des(tetrapeptide B(1-4)) and des(pentapeptide B(1-5)) human insulins. Two biologically active analogues, *Biochemistry*, **17**, 4550–4556.
54. Nakagawa, S.H., Tager, H.S. (1991) Implications of invariant residue LeuB6 in insulin-receptor interactions, *J. Biol. Chem.*, **266**, 11502–11509.
55. Schwartz, G.P., Burke, G.T., Katsoyannis, P.G. (1987) A superactive insulin: [B10-aspartic acid]insulin(human), *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 6408–6411.
56. Chan, S.J., Seino, S., Gruppuso, P.A., Schwartz, R., Steiner, D.F. (1987) A mutation in the B chain coding region is associated with impaired proinsulin conversion in a family with hyperproinsulinemia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **84**, 2194–2197.
57. Gruppuso, P.A., Gorden, P., Kahn, C.R., Cornblath, M., Zeller, W.P., Schwartz, R. (1984) Familial hyperproinsulinemia due to a proposed defect in conversion of proinsulin to insulin, *N. Engl. J. Med.*, **311**, 629–634.
58. Brange, J., Ribel, U., Hansen, J.F., Dodson, G., Hansen, M.T., Havelund, S., Melberg, S. G., Norris, F., Norris, K., Snel, L. (1988) Monomeric insulins obtained by protein engineering and their medical implications, *Nature*, **333**, 679–682.
59. Brems, D.N., Alter, L.A., Beckage, M.J., Chance, R.E., DiMarchi, R.D., Green, L.K., Long, H.B., Pekar, A.H., Shields, J.E., Frank, B.H. (1992) Altering the association properties of insulin by amino acid replacement, *Protein Eng.*, **5**, 527–533.
60. Blundell, T.L., Cutfield, J.F., Cutfield, S.M., Dodson, E.J., Dodson, G.G., Hodgkin, D.C., Mercola, D.A. (1972) Three-Dimensional Atomic Structure of Insulin and Its Relationship to Activity, *Diabetes*, **21**, 492–505.
61. Nathan, D.M., Genuth, S., Lachin, J., Cleary, P., Crofford, O., Davis, M., Rand, L., Siebert, C. (1993) The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus, *N. Engl. J. Med.*, **329**, 977–986.
62. Chou, H.S., Larsson, M., Hsiao, M.H., Chen, Y.C., Röding, M., Nydén, M., Liu, D.M. (2016) Injectable insulin-lysozyme-loaded nanogels with enzymatically-controlled degradation and release for basal insulin treatment: In vitro characterization and in vivo observation, *J. Control. Release*, **224**, 33–42.
63. Ионовa Т.И., Один В.И., Никитина Т.П., Курбатова К.А., Шабловская Н.Е. (2013) Качество жизни и проблемы, связанные с

- гипогликемией, у больных сахарным диабетом 2-го типа на фоне пероральной сахароснижающей терапии, *Клиническая медицина*, **9**, 34–40.
64. Hirsch, I.B., Farkas-Hirsch, R., Skyler, J.S. (1990) Intensive Insulin Therapy for Treatment of Type I Diabetes, *Diabetes Care*, **13**, 1265–1283.
65. Гусаров А.Д., Гусарова В.Д., Баирамашвили Д.И., Миронов А.Ф. (2008) Генно-инженерный инсулин и его фармацевтические аналоги, *Биомедицинская химия*, **54** (6), 624–642.
66. Home, P.D. (2012) The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences, *Diabetes. Obes. Metab.*, **14**, 780–788.
67. Oakley, W., Hill, D., Oakley, N. (1966) Combined use of regular and crystalline protamine (NPH) insulins in the treatment of severe diabetes, *Diabetes*, **15**, 219–222.
68. Rosenstock, J., Schwartz, S.L., Clark, C.M.Jr, Park, G.D., Donley, D.W., Edwards, M.B. (2001) Basal insulin therapy in type 2 diabetes: 28-week comparison of insulin glargine (HOE 901) and NPH insulin, *Diabetes Care*, **24**, 631–636.
69. Johnson, I.S. (1983) Human insulin from recombinant DNA technology, *Science*, **219**, 632–637.
70. Peters, A.L., Pollom, R.D., Zielonka, J.S., Carey, M.A., Edelman, S.V. (2015) Biosimilars And New Insulin Versions, *Endocr. Pract.*, **21**, 1387–1394.
71. Мирошников А.И. (2009) Рецепт для российского инсулина, *Acta Naturae*, **3**, 18–20
72. Owens, D.R., Landgraf, W., Schmidt, A., Bretzel, R.G., Kuhlmann, M.K. (2012) The emergence of biosimilar insulin preparations--a cause for concern?, *Diabetes Technol. Ther.*, **14**, 989–996.
73. Habriev, R.U. (2005) in *Manual on experimental (preclinical) study of new pharmacological substances*, (Habriev, R.U., ed.), Meditsina, Moscow.
74. Mironov, A.N. (2012) in *Manual on preclinical trials of medicines. Part I*. (Mironov, A.N., ed.) Grif i K, Moscow.
75. Mironov, A.N. (2013) in *Manual on expertise of medicines. Part V I*. (Mironov, A.N., ed.) Grif i K, Moscow.
76. Atkinson, M.A., Eisenbarth, G.S., Michels, A.W. (2014) Type 1 diabetes, *Lancet (London, England)*, **383**, 69–82.
77. Кураева Т.Л. (2010) Аналоги инсулина в достижении компенсации и улучшении качества жизни детей и подростков с сахарным диабетом 1 типа, *Сахарный диабет*, **3**, 147–152.
78. Howey, D.C., Bowsher, R.R., Brunelle, R.L., Woodworth, J.R. (1994) [Lys(B28), Pro(B29)]-human insulin. A rapidly absorbed analogue of human insulin, *Diabetes*, **43**, 396–402.
79. Ciszak, E., Beals, J.M., Frank, B.H., Baker, J.C., Carter, N.D., Smith, G.D. (1995) Role of C-terminal B-chain residues in insulin assembly: the structure of hexameric LysB28ProB29-human insulin, *Structure*, **3**, 615–622.
80. Bakaysa, D. L., Radziuk, J., Havel, H.A., Brader, M.L., Li, S., Dodd, S.W., Beals, J.M., Pekar, A.H., Brems, D.N. (1996) Physicochemical basis for the rapid time-action of Lys B28 Pro B29 -insulin: Dissociation of a protein-ligand complex, *Protein Sci.*, **5**, 2521–2531.
81. Becker, R.H.A., Frick, A.D., Burger, F., Potgieter, J.H., Scholtz, H. (2005) Insulin glulisine, a new rapid-acting insulin analogue, displays a rapid time-action profile in obese non-diabetic subjects, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, **113**, 435–443.
82. Dreyer, M., Prager, R., Robinson, A., Busch, K., Ellis, G., Souhami, E., Van Leendert, R. (2005) Efficacy and safety of insulin glulisine in patients

- with type 1 diabetes, *Horm. Metab. Res.*, **37**, 702–707.
83. Павлова М.Г. (2008) Апидра (инсулин глулизин) в терапии сахарного диабета 1 типа, *Сахарный диабет*, **2**, 65–68.
  84. Heinemann, L., Heise, T., Wahl, L.C., Trautmann, M.E., Ampudia, J., Starke, A.A., Berger, M. (1996) Prandial glycaemia after a carbohydrate-rich meal in type I diabetic patients: using the rapid acting insulin analogue [Lys(B28), Pro(B29)] human insulin, *Diabet. Med.*, **13**, 625–629.
  85. Owens, D.R., Matfin, G., Monnier, L. (2014) Basal insulin analogues in the management of diabetes mellitus: What progress have we made?, *Diabetes. Metab. Res. Rev.*, **30**, 104–119.
  86. Zinman, B. (2013) Newer insulin analogs: advances in basal insulin replacement, *Diabetes. Obes. Metab.*, **15 Suppl 1**, 6–10.
  87. Hallas-Moller, K. (1956) The lente insulins, *Diabetes*, **5**, 7–14.
  88. Heise, T., Nosek, L., Rønn, B.B., Endahl, L., Heinemann, L., Kapitza, C., Draeger, E. (2004) Lower within-subject variability of insulin detemir in comparison to NPH insulin and insulin glargine in people with type 1 diabetes, *Diabetes*, **53**, 1614–1620.
  89. Петеркова В.А., Кураева Т.Л., Титович Е.В. (2003) Лантус (инсулин гларгин): реальные преимущества и перспективы применения в педиатрии, *Сахарный диабет*, **3**, 26–28.
  90. Климонтов В.В., Мякина Н.Е. (2014) Инсулин гларгин: фармакокинетические и фармакодинамические основы клинического эффекта, *Сахарный диабет*, **4**, 99–107.
  91. Migdalis, I.N. (2011) Insulin analogs versus human insulin in type 2 diabetes, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **93 Suppl 1**, 102–104.
  92. Swinnen, S.G., Simon, A.C., Holleman, F., Hoekstra, J.B., Devries, J.H. (2011) Insulin detemir versus insulin glargine for type 2 diabetes mellitus, *Cochrane database Syst. Rev.*, **7**, 63–83.
  93. Jonassen, I., Havelund, S., Hoeg-Jensen, T., Steensgaard, D.B., Wahlund, P.O., Ribel, U. (2012) Design of the novel protraction mechanism of insulin degludec, an ultra-long-acting basal insulin, *Pharm. Res.*, **29**, 2104–2114.
  94. Дедов И.И., Шестакова М.В. (2014) Инсулин деглудек – новый аналог инсулина сверхдлительного действия, *Сахарный диабет*, **2**, 91–104.
  95. Whittingham, J.L., Havelund, S., Jonassen, I. (1997) Crystal structure of a prolonged-acting insulin with albumin-binding properties, *Biochemistry*, **36**, 2826–2831.
  96. Sorli, C., Warren, M., Oyer, D., Mersebach, H., Johansen, T., Gough, S.C. (2013) Elderly patients with diabetes experience a lower rate of nocturnal hypoglycaemia with insulin degludec than with insulin glargine: a meta-analysis of phase IIIa trials, *Drugs Aging*, **30**, 1009–1018.
  97. Henry, R.R., Mudaliar, S., Ciaraldi, T.P., Armstrong, D.A., Burke, P., Pettus, J., Garhyan, P., Choi, S.L., Jacober, S.J., Knadler, M.P., Lam, E.C., Prince, M.J., Bose, N., Porsken, N., Sinha, V.P., Linnebjerg, H. (2014) Basal insulin peglispro demonstrates preferential hepatic versus peripheral action relative to insulin glargine in healthy subjects, *Diabetes Care*, **37**, 2609–2615.
  98. Mathieu, C., Gillard, P., Benhalima, K. (2017) Insulin analogues in type 1 diabetes mellitus: getting better all the time, *Nat. Rev. Endocrinol.* [Epub ahead of print].
  99. Bergenstal, R. M., Rosenstock, J., Bastyr, E.J., Prince, M.J., Qu, Y., Jacober, S.J. (2014) Lower glucose variability and hypoglycemia measured by continuous glucose monitoring with novel long-acting insulin LY2605541 versus insulin glargine, *Diabetes Care*, **37**, 659–665.

100. Caparrotta, T.M., Evans, M. (2014) PEGylated insulin Lispro, (LY2605541) – a new basal insulin analogue, *Diabetes. Obes. Metab.*, **16**, 388–395.
101. Ciaraldi, T.P., Sasaoka, T. (2011) Review on the in vitro interaction of insulin glargine with the insulin/insulin-like growth factor system: potential implications for metabolic and mitogenic activities, *Horm. Metab. Res.*, **43**, 1–10.
102. Monnier, L., Colette, C., Owens, D. (2013) Basal insulin analogs: from pathophysiology to therapy. What we see, know, and try to comprehend?, *Diabetes Metab.*, **39**, 468–476.
103. Kurupkat, G., Siedentop, M., Gattner, H.G., Hagelstein M, Brandenburg, D., Grötzinger J., Wollmer A. (1999) The solution structure of a superpotent b-chain-shortened single-replacement insulin analogue, *Protein Sci.*, **8**, 499–508.
104. Jiráček, J., Záková, L., Antolíková, E., Watson, C.J., Turkenburg, J.P., Dodson, G.G., Brzozowski, A.M. (2010) Implications for the active form of human insulin based on the structural convergence of highly active hormone analogues, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 1966–1970.
105. Phillips, N.B., Wan, Z.L., Whittaker, L., Hu, S.Q., Huang, K., Hua, Q.X., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., Weiss, M.A. (2010) Supramolecular protein engineering: design of zinc-stapled insulin hexamers as a long acting depot, *J. Biol. Chem.* **285**, 11755–11759.
106. Berenson, D.F., Weiss, A.R., Wan, Z., Weiss, M.A. (2011) Insulin analogs for the treatment of diabetes mellitus: therapeutic applications of protein engineering, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1243**, 40–54.
107. Morishita, H. (2015) [Premixed insulin and intermediate-acting insulin], *Nihon Rinsho*, **73**, 453–457.
108. Арина Е.Е., Рашид М.А. (2012) Клинические и экономические преимущества применения аналогов человеческих инсулинов, *Фармакоэкономика*, **5** (3), 41–46.
109. Дедов И.И., Шестакова М.В. (2014) Инсулин деглудек/инсулин аспарт – первый комбинированный препарат базального и прандиального аналогов инсулина, *Сахарный диабет*, **4**, 108–119.
110. Родионова Т.Н., Орлова М.М. (2014) Оценка эффективности применения различных аналогов инсулина в лечении сахарного диабета 2-го типа, *Саратовский научно-медицинский журнал*, **10** (3), 461–464.
111. Nilsson, M.R. (2016) Insulin amyloid at injection sites of patients with diabetes, *Amyloid*, **23**, 139–147.
112. Berhanu, W.M., Masunov, A.E. (2012) Controlling the aggregation and rate of release in order to improve insulin formulation: molecular dynamics study of full-length insulin amyloid oligomer models, *J. Mol. Model.*, **18**, 1129–1142.
113. Amdursky, N., Gazit, E., Rosenman, G. (2012) Formation of low-dimensional crystalline nucleus region during insulin amyloidogenesis process, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **419**, 232–237.
114. Brange, J., Andersen, L., Laursen, E.D., Meyn, G., Rasmussen, E. (1997) Toward understanding insulin fibrillation, *J. Pharm. Sci.*, **86**, 517–525.
115. Yang, Y., Petkova, A., Huang, K., Xu, B., Hua, Q.X., Ye, I.J., Chu, Y.C., Hu, S.Q., Phillips, N.B., Whittaker, J., Ismail-Beigi, F., Mackin, R.B., Katsoyannis, P.G., Tycko, R., Weiss, M.A. (2010) An Achilles' heel in an amyloidogenic protein and its repair: insulin fibrillation and therapeutic design, *J. Biol. Chem.*, **285**, 10806–10821.
116. Li, Y., Gong, H., Sun, Y., Yana, J., Cheng, B., Zhang, X., Huang, J., Yua, M., Guoa, Y., Zheng, L., Huang, K. (2012) Dissecting

- the role of disulfide bonds on the amyloid formation of insulin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **423**, 373–378.
117. Huang, K., Maiti, N.C., Phillips, N.B., Carey, P.R., Weiss, M.A. (2006) Structure-specific effects of protein topology on cross-beta assembly: studies of insulin fibrillation, *Biochemistry*, **45**, 10278–10293.
  118. Foderà, V., Librizzi, F., Groenning, M., van de Weert, M., Leone, M. (2008) Secondary nucleation and accessible surface in insulin amyloid fibril formation, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 3853–3858.
  119. Groenning, M., Frokjaer, S., Vestergaard, B. (2009) Formation mechanism of insulin fibrils and structural aspects of the insulin fibrillation process, *Curr. Protein Pept. Sci.*, **10**, 509–528.
  120. Ahmad, A., Uversky, V.N., Hong, D., Fink, A.L. (2005) Early events in the fibrillation of monomeric insulin, *J. Biol. Chem.*, **280**, 42669–42675.
  121. Zhou, C., Qi, W., Lewis, E.N., Carpenter, J.F. (2016) Characterization of Sizes of Aggregates of Insulin Analogs and the Conformations of the Constituent Protein Molecules: A Concomitant Dynamic Light Scattering and Raman Spectroscopy Study, *J. Pharm. Sci.*, **105**, 551–558.
  122. Woods, R.J., Alarcón, J., McVey, E., Pettis, R.J. (2012) Intrinsic fibrillation of fast-acting insulin analogs, *J. Diabetes Sci. Technol.*, **6**, 265–76.
  123. Blundell, T., Dodson G., Hodgkin, D., Mercola, D. (1972) Insulin: The Structure in the Crystal and its Reflection in Chemistry and Biology, *Adv. Protein Chem.*, **26**, 279–402.
  124. Selivanova, O.M., Suvorina, M.Y., Surin, A.K., Dovidchenko, N.V., Galzitskaya, O.V. (2017) Insulin and Lispro Insulin: What is Common and Different in their Behavior? *Curr. Protein Pept. Sci.*, **18**, 57–64.
  125. Селиванова, О.М., Галзитская, О.В. (2012) Структурный полиморфизм и возможные пути амилоидообразования на примере белка инсулина. *Биохимия*, **77**, 1237–1247.
  126. Selivanova, O.M., Suvorina, M.Y., Dovidchenko, N.V., Eliseeva, I.A., Surin, A.K., Finkelstein, A.V., Schmatchenko, V.V., Galzitskaya, O.V. (2014) How to determine the size of folding nuclei of protofibrils from the concentration dependence of the rate and lag-time of aggregation. II. Experimental application for insulin and LysPro insulin: aggregation morphology, kinetics, and sizes of nuclei, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 1198–1206.
  127. Burke, M.J., Rougvie, M.A. (1972) Cross- $\beta$  protein structures. I. Insulin fibrils, *Biochemistry*, **11** (13), 2435–2439.
  128. Bouchard, M., Zurdo, J., Nettleton, E.J., Dobson, C.M., Robinson, C.V. (2000) Formation of Insulin Amyloid Fibrils Followed by FTIR Simultaneously with CD and Electron Microscopy, *Protein Sci.*, **9**, 1960–1967.
  129. Jimenez, J.L., Nettleton, E.J., Bouchard, M., Robinson, C.V., Dobson, C.M., Saibil, H.R. (2002) The Protofilament Structure of Insulin Amyloid Fibrils, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **99**, 9196–9201.
  130. Koltun, W.L., Waugh, D.F., Bear, R.S. (1954) An X-Ray Diffraction Investigation of Selected Types of Insulin Fibrils, *J. Am. Chem. Soc.*, **76**, 413–417.
  131. Winocour, P.H., Mitchell, W.S., Gush, R.J., Taylor, L.J., Baker, R.D. (1988) Altered hand skin blood flow in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus, *Diabet. Med.*, **5**, 861–866.