



## Опыт проведения валидации методики оценки активации рецептора GLP-1R *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид

А. Н. Афанасьева<sup>1</sup>✉, В. Б. Сапарова<sup>1,2</sup>, Д. О. Ермолаева<sup>1</sup>, И. Е. Макаренко<sup>1,2</sup>, Р. В. Драй<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации. 127473, Россия, г. Москва, ул. Делегатская, д. 20/1

✉ Контактное лицо: Афанасьева Алина Николаевна. E-mail: [Alina.Afanaseva@geropharm.com](mailto:Alina.Afanaseva@geropharm.com)

ORCID: А. Н. Афанасьева – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>;

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

Д. О. Ермолаева – <https://orcid.org/0009-0005-8083-7154>;

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

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

Статья поступила: 11.07.2025

Статья принята в печать: 02.04.2026

Статья опубликована: 03.04.2026

### Резюме

**Введение.** Тирзепатид – это молекула, способная контролировать уровень глюкозы в крови за счет объединения двойного агонизма рецепторов глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP) и глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1). GLP-1 и GIP – инкретиновые гормоны, участвующие в регуляции гликемии и энергетического обмена. Их комбинированная агонизация усиливает инсулиновый ответ, снижает секрецию глюкагона и аппетит, что делает ее эффективной стратегией при лечении сахарного диабета 2 типа (СД2) и ожирения. Специфическую биологическую активность таких соединений можно оценить *in vitro* на клеточных линиях, экспрессирующих рецепторы GLP-1R или GIPR.

**Цель.** Провести валидацию методики определения активации рецептора GLP-1R *in vitro* с использованием клеточной линии при стимуляции тирзепатидом в тесте «Кальциевые токи». Данный подход необходим для последующего исследования сопоставимости биоэквивалентных препаратов.

**Материалы и методы.** В качестве модели была применена генно-инженерная клеточная линия HTS163L, экспрессирующая человеческий рецептор GLP-1. Активацию рецептора регистрировали по изменению флуоресцентного сигнала, вызванного увеличением внутриклеточной концентрации кальция, после инкубации клеток с тирзепатидом в различных концентрациях. Валидация методики проводилась в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ, ICH и EMA. Статистическую обработку полученных результатов проводили с применением программного обеспечения MARS (BMG LABTECH).

**Результаты и обсуждение.** Данная методика показала высокий уровень специфичности (сигнал плацебо <2 % от сигнала препарата), удовлетворительный предел количественного определения (сигнал превышает сигнал холостой пробы на 43 %), хорошую линейность ( $R^2 = 0,981$ ), правильность (в пределах 77–119 % от номинального  $EC_{50}$ ) и прецизионность ( $CV \leq 5$  % внутри серии,  $\leq 15$  % между сериями). Все исследуемые валидационные показатели соответствовали установленным критериям приемлемости, что подтверждает корректность выбранного подхода.

**Заключение.** Предложенный метод обладает высокой чувствительностью и воспроизводимостью, что делает его пригодным для функционального анализа биологической активности агонистов рецептора GLP-1, включая тирзепатид, в *in-vitro*-моделях.

**Ключевые слова:** сахарный диабет 2 типа (СД2), GLP-1-рецептор, агонисты инкретинов, фармакологическая активность, биологическая активность,  $EC_{50}$ , флуоресцентный анализ, биоэквивалентность, доклинические исследования

**Конфликт интересов.** Исследование *in vitro* было организовано ЗАО «Фарм-Холдинг», входит в группу компаний ООО «ГЕРОФАРМ».

**Вклад авторов.** А. Н. Афанасьева – написание и редактирование текста, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. В. Б. Сапарова – критический пересмотр содержания статьи, анализ и интерпретация результатов исследования *in vitro*. Д. О. Ермолаева – постановка экспериментов *in vitro*, анализ результатов валидационных тестов.

И. Е. Макаренко – критический пересмотр содержания статьи, утверждение окончательного варианта статьи для публикации. Р. В. Драй – руководство исследованием, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

**Благодарность.** Работа выполнена при финансовой поддержке ООО «ГЕРОФАРМ». Спонсор не оказывал влияния на ход исследования и интерпретацию результатов.

**Соответствие принципам этики.** Исследование проводилось *in vitro* на клеточной линии; одобрение этической комиссии не требуется.

**Для цитирования:** Афанасьева А. Н., Сапарова В. Б., Ермолаева Д. О., Макаренко И. Е., Драй Р. В. Опыт проведения валидации методики оценки активации рецептора GLP-1R *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2026;15(2). <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2145>

## Experience in validating a method for assessing GLP-1R receptor activation *in vitro* upon stimulation with tirzepatide

Alina N. Afanaseva<sup>1</sup>✉, Valeria B. Saparova<sup>1,2</sup>, Daria O. Ermolaeva<sup>1</sup>, Igor E. Makarenko<sup>1,2</sup>, Roman V. Dray<sup>1</sup>

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

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

✉ **Corresponding author:** Alina N. Afanaseva. **E-mail:** Alina.Afanaseva@geropharm.com

**ORCID:** Alina N. Afanaseva – <https://orcid.org/0000-0002-1443-4294>;

Valeria B. Saparova – <https://orcid.org/0000-0002-8445-1129>;

Daria O. Ermolaeva – <https://orcid.org/0009-0005-8083-7154>;

Igor E. Makarenko – <https://orcid.org/0000-0003-2308-0608>;

Roman V. Dray – <https://orcid.org/0000-0003-4594-6097>.

**Received:** 11.07.2025

**Accepted:** 02.04.2026

**Published:** 03.04.2026

### Abstract

**Introduction.** Tirzepatide is a molecule capable of controlling blood glucose levels by combining dual agonism of the glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) and glucagon-like peptide-1 (GLP-1) receptors. GLP-1 and GIP are incretin hormones involved in the regulation of glycemia and energy metabolism. Their combined agonism enhances the insulin response, reduces glucagon secretion and appetite, making it an effective strategy for the treatment of type 2 diabetes mellitus (T2DM) and obesity. The specific biological activity of such compounds can be evaluated *in vitro* using cell lines expressing GLP-1R or GIPR.

**Aim.** To validate a method for determining GLP-1R receptor activation *in vitro* using a cell line stimulated with tirzepatide in the "Calcium Flux" assay. This approach is necessary for subsequent studies of the comparability of bioequivalent drugs.

**Materials and methods.** A genetically engineered HTS163L cell line expressing the human GLP-1 receptor was used as the model. Receptor activation was recorded by changes in fluorescence signal caused by an increase in intracellular calcium concentration after incubation of cells with tirzepatide at various concentrations. Method validation was carried out in accordance with the requirements of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation, ICH, and EMA. Statistical analysis of the results was performed using MARS software (BMG LABTECH).

**Results and discussion.** The applied method demonstrated a high level of specificity (placebo signal <2 % of the drug signal), a satisfactory limit of quantification (signal exceeded the blank by 43 %), good linearity ( $R^2 = 0.981$ ), accuracy (within 77–119 % of nominal  $EC_{50}$ ), and precision ( $CV \leq 5\%$  within runs,  $\leq 15\%$  between runs). All validation parameters met the established acceptance criteria, confirming the correctness of the chosen approach.

**Conclusion.** The proposed method demonstrates high sensitivity and reproducibility, making it suitable for functional analysis of the biological activity of GLP-1 receptor agonists, including tirzepatide, in *in vitro* models.

**Keywords:** type 2 diabetes mellitus (T2DM), GLP-1 receptor, incretin agonists, pharmacological activity, biological activity,  $EC_{50}$ , fluorescence assay, bioequivalence, preclinical studies

**Conflict of interest.** The *in vitro* study was organized by CJSC "Pharm-Holding", part of the LLC "GEROPHARM" group of companies.

**Contribution of the authors.** Alina N. Afanaseva – writing and editing of the manuscript, analysis and interpretation of *in vitro* study results. Valeria B. Saparova – critical revision of the article content, analysis and interpretation of *in vitro* study results. Daria O. Ermolaeva – *in vitro* experiment setup, analysis of validation test results. Igor E. Makarenko – critical revision of the article content, approval of the final version of the article for publication. Roman V. Dray – study supervision, approval of the final version of the article for publication.

**Acknowledgment.** This work was supported by "GEROPHARM". The sponsor had no influence on the study or interpretation of the results.

**Compliance with the principles of ethics.** The study was conducted *in vitro* on a cell line; ethical approval is not required.

**For citation:** Afanaseva A. N., Saparova V. B., Ermolaeva D. O., Makarenko I. E., Dray R. V. Experience in validating a method for assessing GLP-1R receptor activation *in vitro* upon stimulation with tirzepatide. *Drug development & registration*. 2026;15(2). (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2026-15-2-2145>

## ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет 2 типа (СД2) представляет собой наиболее часто встречающуюся форму данного заболевания, поражающего практически все возрастные группы [1–3]. СД2 клинически диагностируется с кардинальным признаком хронической гипергликемии (избыточный уровень сахара в крови). Хроническая гипергликемия в сочетании с дисфункциями  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, резистентностью к инсулину и иммунным воспалением еще больше усугубляют патологию СД2 [2], что вызывает гликемическую нагрузку, резистентность к инсулину и ожирение [4].

Эпидемия сахарного диабета и его осложнений представляет собой серьезную угрозу для здоровья в мире. Глобальная распространенность диабета и нарушенной толерантности к глюкозе увеличилась в четыре раза за последние три десятилетия. Этот темп изменения распространенности диабета во многих странах был усилен быстрой урбанизацией [5–7]. Более 90 % случаев сахарного диабета составляет сахарный диабет 2 типа (СД2) [8], что подчеркивает необходимость поиска новых эффективных стратегий диагностики, профилактики и лечения.

Одним из перспективных направлений терапии СД2 является воздействие на рецептор глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1R) – ключевой регулятор гомеостаза глюкозы. Глюкозозависимый инсулинотропный полипептид (GIP) и глюкагоноподобный пептид – 1 (GLP-1), также известные как инкретины, представляют собой гормоны, выделяемые в кишечнике в ответ на поступление питательных веществ, и они способны стимулировать бета-клетки поджелудочной железы к выделению инсулина, тем самым участвуя в регуляции гомеостаза глюкозы [9–11]. Благодаря этим эффектам агонисты рецепторов GLP-1 обладают выраженной способностью снижать концентрацию глюкозы в крови и способствуют уменьшению массы тела, что делает их использование ключевым направлением в фармакотерапии сахарного диабета 2 типа и ожирения.

*Тирзепатид* – современный лекарственный препарат, сочетающий свойства агониста рецепторов GIP и GLP-1. В клинических испытаниях он продемонстрировал высокую эффективность как в контроле уровня гликемии, так и в снижении массы тела [12, 13].

При этом сродство тирзепатида к рецепторам GIP сопоставимо с естественным GIP, а его аффинность к рецепторам GLP-1 примерно в пять раз ниже по сравнению с нативным GLP-1 [14, 15]. Тирзепатид также может улучшить параметры, связанные с сердечно-сосудистым риском, включая артериальное давление [16], окружность талии, уровень липопротеинов низкой плотности и циркулирующих триглицеридов [17, 18]. Однако для более глубокого понимания механизмов действия препарата и разработки аналогов необходимы валидированные клеточные модели, позволяющие оценить фармакологическую активность тирзепатида *in vitro*.

Одним из подходов к функциональной оценке активности GLP-1R является регистрация кальциевых токов в клетках, экспрессирующих данный рецептор. Активация GLP-1R, сопряженного с G-белками, может индуцировать внутриклеточный каскад сигнализации с повышением концентрации ионов кальция, что делает метод оценки кальциевого ответа чувствительным инструментом для скрининга лигандов рецептора [19, 20].

**Цель исследования.** Настоящая работа направлена на валидацию метода, позволяющего оценивать активацию рецептора GLP-1R в клеточной линии *in vitro* при стимуляции тирзепатидом с использованием теста «Кальциевые токи» для дальнейшего проведения исследований сопоставимости биоэквивалентных лекарственных средств. Результаты позволят разработать воспроизводимую и чувствительную модель для доклинической оценки потенциальных GLP-1-агонистов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для оценки специфической биологической активности тирзепатида в тесте «Кальциевые токи» в качестве модельной системы применяли клеточную линию HTS163L (кат. № HTS163L, Eurofins, Франция). Генно-модифицированные клетки, экспрессирующие человеческий рецептор GLP-1, были получены путем стабильной трансфекции. Клетки получены из материнской линии HEK293, представляющей собой эпителий эмбриональной почки человека. В геном линии клеток были встроены участки, кодирующие три белка: клитин, рецептор GLP-1 и G-белок – для установления связи между рецептором и кальциевым

сигнальным путем. Наличие рецептора на поверхности клеточной мембраны позволяет осуществляться биологическому эффекту GLP-1 и его аналогов, выражающемуся в повышении внутриклеточного уровня цАМФ, запуске кальциевого сигналинга и росте концентрации кальция в клетке<sup>1</sup>.

Культивирование клеточной линии HTS163L проводили в питательной среде DMEM/F12 (кат. № 1.3.7.4, ООО «Биолот», Россия) с добавлением раствора неосновных аминокислот 100X (кат. № Ф115/100п, НПП «ПанЭко», Россия) и 10%-й эмбриональной бычьей сыворотки (FBS, кат. № LTFBS-500, LT Biotech Ltd., Литва) (далее – Basal Medium). Рабочую суспензию клеток рассеивали в стерильные черные 96-луночные планшеты (кат. № 3340, Corning, США) по 5000 клеток на лунку в среде Basal Medium. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5%-м CO<sub>2</sub> 24 ± 4 ч. На следующий день среду меняли на буферный раствор Хенкса (кат. № 1.2.1.7, ООО «Биолот», Россия) с добавлением в финальной концентрации 20 мМ ХЕПЕС (кат. № Ф134Е-100, НПП «ПанЭко», Россия), 2,5 мкМ пробенцида (кат. № р8761, Sigma-Aldrich, Германия) и 2 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM (кат. № АВ142773, Abcam, Великобритания). Планшеты инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре, защищая от света. В лунки планшета вносили заранее приготовленные 3-кратные растворы исследуемых препаратов в концентрациях 500, 1000, 2000, 4000, 10 000, 15 000, 22 500, 60 000, 500 000 и 2 000 000 пМ. Сразу после внесения проводилось снятие флуоресцентного сигнала на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG LABTECH, Германия), параметры флуоресценции: длина волны возбуждения – 480 нм, эмиссии – 520 нм; число вспышек – 100, усиление сигнала (gain) – 2000. Результаты обрабатывали при помощи программы MARS (BMG LABTECH, Германия), используя метод параллельных кривых для расчета EC<sub>50</sub> (концентрация тирзепатида, при которой достигается 50 % максимального ответа в виде активации кальциевых токов). Оценка параллельности кривых проводилась с использованием F-теста: глобальное приближение осуществлялось с помощью четырехпараметрической логистической модели (4PL), доверительный интервал – 95 % (CI 95 %).

Валидационные параметры. Критерии валидации методики были определены на основании требований Государственной фармакопеи Российской Федерации, рекомендаций Совета Евразийской экономической комиссии, а также руководств Международного совета по гармонизации технических требований к лекарственным средствам для медицинского применения (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, ICH) и Европейского агентства по лекарст-

венным средствам (EMA). В рамках процедуры проводилась оценка следующих параметров: специфичности, предела количественного определения, аналитической области, линейности, правильности, а также прецизионности, включающей сходимость и внутрилабораторную воспроизводимость.

Оценку специфичности выполняли посредством сравнения получаемого сигнала между образцами, содержащими плацебо, и образцами, в которые вносили исследуемый препарат. Для подтверждения специфичности значение сигнала плацебо не должно превышать 20 % от величины сигнала, полученного для препарата. Предел количественного определения определяли на основании различий между сигналом препарата в минимальной концентрации и сигналом холостой пробы (ХП; лунки с клетками без красителя). Критерием приемлемости считалось превышение сигнала препарата над ХП не менее чем на 20 %. Линейность оценивали по коэффициенту детерминации (R<sup>2</sup>) в пределах установленного аналитического диапазона; значение R<sup>2</sup> должно составлять не менее 0,9. Для оценки правильности определяли значения EC<sub>50</sub> – концентрации тирзепатида, при которой достигается 50 % активации кальциевых токов, – на четырех уровнях разведений: 175, 100, 50 и 25 % от номинальной концентрации. Показатель правильности считался соблюденным, если рассчитанные значения EC<sub>50</sub> на всех уровнях находились в пределах 100 ± 25 % от номинального. Прецизионность оценивали по результатам шести повторных измерений, проведенных в один день одним исполнителем (сходимость), а также по трем независимым сериям, выполненным разными исполнителями в разные дни (внутрилабораторная прецизионность). Допустимое значение коэффициента вариации (CV) составляло ≤15 % для всех концентраций и ≤20 % для нижней границы диапазона. Аналитическая область определялась как диапазон концентраций, в пределах которого одновременно соблюдаются критерии правильности, прецизионности и линейности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Валидация методики оценки активации рецептора GLP-1R на клеточной линии *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» проводили на препаратах Мунджаро® (Eli Lilly Canada Inc., Канада) и плацебо препарата Седжаро® (ЗАО «Фарм-Холдинг», Россия).

**Специфичность** методики определяется как ее способность точно идентифицировать и количественно оценивать целевое вещество на фоне присутствия сопутствующих компонентов. В рамках проведенной валидации проанализировали активацию кальциевых токов при сравнении препарата и плацебо. Оценивали сигнал по относительным единицам флуоресценции (RFU) для препарата и плацебо (таблица 1). Для плацебо использовали разведения, идентичные разведениям препарата Мунджаро® каждой концентрации.

<sup>1</sup> ChemiBRITE GLP-1 Receptor Stable Cell Line. Available at: <https://emea.discoverx.com/catalog/chemibrite-glp-1-receptor-stable-cell-line/hts1631/> Accessed: 28.06.2025.

**Таблица 1. Специфичность методики: ответ для плацебо и препарата Мунджаро®**

**Table 1. Specificity of the method: response to placebo vs. Mounjaro®**

Препарат Medicine	Mean ОЕФ Mean RFU	Мунджаро®/ Плацебо, % Munjaro®/ Placebo, %
Мунджаро® (точка 500 пМ) Mundjaro® (500 pM point)	30299	2
Плацебо препарата Седжаро® (точка 500 пМ) Placebo of the drug Sejaro® (point 500 pM)	29673	

**Примечание.** ОЕФ – относительные единицы флуоресценции; Mean – среднее арифметическое значение.

**Note.** RFU – relative fluorescence units; Mean – arithmetic mean value.

Ответ для плацебо соответствует 2 % сигнала для исследуемого вещества, то есть влияние компонентов плацебо составляет 2 %, что согласуется с критериями приемлемости менее 20 %.

**Предел количественного определения (ПКО)** представляет собой минимальную концентрацию вещества в образце, которую можно достоверно выявить с помощью валидированной аналитической методики. Для оценки ПКО рассматривали RFU для препарата и ХП (лунки с клетками без красителя Fluo-8 AM), данные представлены в таблице 2.

**Таблица 2. Предел количественного определения: ответ для препарата Мунджаро® и холостой пробы**

**Table 2. Limit of quantification: response for Munjaro® and blank**

Препарат Medicine	Mean ОЕФ Mean RFU	Мунджаро®/ Плацебо, % Munjaro®/ Placebo, %
Мунджаро® (точка 500 пМ) Mundjaro® (500 pM point)	31321	43
Холостая проба Blank sample	21961	

**Примечание.** ОЕФ – относительные единицы флуоресценции; Mean – среднее арифметическое значение.

**Note.** RFU – relative fluorescence units; Mean – arithmetic mean value.

Сигнал анализируемого вещества из образца в нижней точке концентрации превосходит величину сигнала ХП на 43 %, что удовлетворяет критериям приемлемости.

**Линейность методики** характеризуется прямой зависимостью аналитического сигнала от концентрации или количества исследуемого вещества в образце в пределах определенной аналитической об-

ласти. Пропорциональность отклика для препарата Мунджаро® была оценена в концентрациях от 500 до 2000 000 пМ. Для оценки линейности был использован коэффициент детерминации ( $R^2$ ). Результаты представлены на рисунке 1.

Зависимость аналитического сигнала от концентрации анализируемого образца с коэффициентом детерминации  $R^2$  равна 0,981, что соответствует критериям приемлемости.

**Правильность** методики определяется как степень соответствия среднего значения результатов, полученных с использованием данного метода, истинному (номинальному) значению вещества. Правильность характеризуется показателем «открываемость», который выражается в процентах. Методика предполагает нахождение значения концентрации препарата, при которой достигается 50 % активации кальциевых токов ( $EC_{50}$ ), то есть для определения параметра «правильность» были оценены значения  $EC_{50}$  для препарата Мунджаро® на четырех уровнях разведения: 175, 100, 50 и 25 %. Результаты представлены в таблице 3.

**Таблица 3. Правильность определения  $EC_{50}$  для Mounjaro®**

**Table 3. Accuracy of  $EC_{50}$  Determination for Mounjaro®**

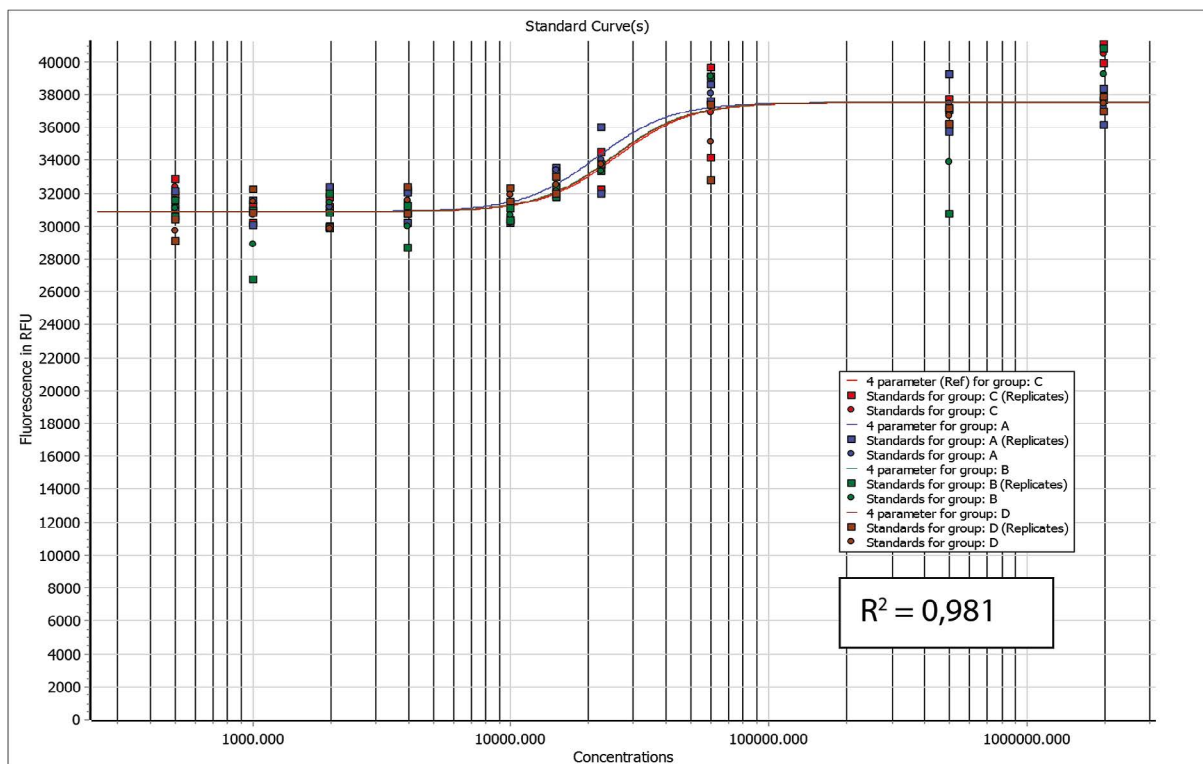
Уровень разведения, % Dilution level, %	$EC_{50}$ пМ $EC_{50}$ pM	Биологическая активность, % от CO Мунджаро® Biological activity, % of Mounjaro®	Открываемость, % Recovery, %
175	18338,9	135	77
	18338,9	153	88
100	30227,9	96	96
	26497,1	110	110
50	57274,4	43	86
	59271,1	47	95
25	100362,2	29	115
	97778,0	30	119

**Примечание.**  $EC_{50}$  – полумаксимальная эффективная концентрация; открываемость – показатель, отражающий отклонение от номинального значения.

**Note.**  $EC_{50}$  – half-maximal effective concentration; recovery – a parameter reflecting the deviation from the nominal value.

Правильность методики находится в диапазоне от 77 до 119 % что удовлетворяет критериям приемлемости  $100 \pm 25$  %.

**Прецизионность** методики отражает степень вариабельности результатов между сериями измерений, выполненных в заранее определенных условиях. Прецизионность характеризуется величиной относи-



**Рисунок 1.** График зависимости концентрации тирзепатида и сигнала флуоресценции. Данные представлены для каждой точки повтора.

Группа С – стандартный образец (СО) Мунджаро® серии D745983; группа В – внутренний контрольный образец (ВКО) Мунджаро® серии D745983; группы А и D – испытуемый образец (ИО) Мунджаро® серии D745983

**Figure 1.** Graph of the relationship between tirzepatide concentration and fluorescence signal. Data are presented for each replicate point.

Group C represents the reference standard sample of Mounjaro® (batch D745983); Group B represents the internal control sample of Mounjaro® (batch D745983); Groups A and D represent the test sample of Mounjaro® (batch D745983)

тельного стандартного отклонения / коэффициента вариации (RSD/CV – отношение стандартного отклонения к среднему, выражаемое в процентах). Во всех экспериментах для стимуляции активации кальциевых токов использовали тирзепатид в раститровке концентраций в диапазоне от 500 до 2000 000 пМ.

**Сходимость (повторяемость)** отражает степень согласованности результатов, полученных с использованием одного и того же метода на идентичных образцах в одной лаборатории одним исследователем с применением одного и того же оборудования, то есть в полностью одинаковых условиях проведения эксперимента. При оценке рассматривали 6 повторов для каждой концентрации на четырех уровнях: НПКО (500 нМ), низкий (2000 пМ), средний (22 500 пМ) и высокий уровень (2000 000 пМ), результаты представлены в таблице 4.

Результаты по параметру «сходимость» находятся в диапазоне от 3 до 5 %, что удовлетворяет критериям приемлемости  $CV \leq 15\%$  для расчетных концентраций и  $CV \leq 20\%$  для нижнего уровня концентрации.

**Внутрилабораторная прецизионность (промежуточная)** определяется как воспроизводимость результатов при проведении эксперимента в одной лаборатории с варьированием условий проведения. В рамках валидации проанализировали внутрилабораторную прецизионность в условиях работы одной лаборатории в разные дни и с разными исполнителями. Результаты представлены в таблице 5.

Результаты по параметру «внутрилабораторная прецизионность» находятся в диапазоне от 4 до 9 %, что удовлетворяет критериям приемлемости  $CV \leq 20\%$ .

**Аналитическая область методики** определяет как диапазон концентраций исследуемого вещества между минимальным и максимальным значениями, в пределах которых сохраняются допустимые аналитические характеристики метода. Для интервала от 500 до 2000 000 пМ препарата тирзепатид определена прецизионность, линейность и правильность (см. результаты выше), которые удовлетворяют критериям приемлемости, аналитическая область подтверждается.

**Таблица 4. Оценка сходимости результатов**

**Table 4. Repeatability Assessment**

Концентрации препарата, пМ Concentration of the drug, pM	ОЕФ RFU						CV, %
	Исполнитель 1 Performer 1						
500	32392	31090	29731	32852	32901	31681	4
2000	31445	31393	29882	32528	30847	32163	3
22 500	33401	35856	33773	32257	31591	32065	5
2000 000	40491	39235	37429	37922	36511	38286	4

**Примечание.** CV – коэффициент вариации; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

**Note.** CV – coefficient of variation; RFU – relative fluorescence units.

**Таблица 5. Оценка внутрилабораторной воспроизводимости**

**Table 5. Inter-assay Precision**

Концентрации препарата, пМ Concentration of the drug, pM	ОЕФ RFU												CV, %
	Исполнитель 2 Performer 2				Исполнитель 1 Performer 1				Исполнитель 2 Performer 2				
	19.11.2024				21.11.2024				26.11.2024				
500	30059	31122	28633	28723	32696	30356	29552	28593	31908	32876	31931	33773	6
1000	29140	31690	27950	27810	30735	30412	29807	27058	30178	31185	30721	32679	6
2000	28741	29833	27163	30759	31724	29706	28826	29206	31739	31150	33453	31603	6
4000	29093	29733	28181	29300	31037	30802	28885	26809	30758	32163	30739	33250	6
10 000	28368	30195	29174	29641	31553	29467	28948	28411	30416	31447	31527	31437	4
15 000	29214	34003	28222	29570	30424	30182	28927	27473	32983	31891	33143	32908	7
22 500	32330	33416	28947	30450	30217	31150	28441	27842	32269	34532	31180	33334	7
60 000	31214	33114	32720	32604	33783	34901	32976	32509	39613	34158	38635	38379	8
500 000	33967	32766	37654	32204	34989	32250	33382	32055	37731	36139	34382	35605	6
2000 000	32839	33337	30900	34469	34583	32705	33714	32651	39907	41075	36076	39767	9

**Примечание.** CV – коэффициент вариации; ОЕФ – относительные единицы флуоресценции.

**Note.** CV – coefficient of variation; RFU – relative fluorescence units.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящее исследование демонстрирует успешную валидацию методики оценки активации GLP-1R на клеточной линии HTS163L при стимуляции тирзепатидом с использованием флуоресцентного анализа кальциевых токов. Полученные результаты подтверждают, что методика является специфичной, линейной, правильной, сохраняется предел количественного определения, сходимость и внутрилабораторная прецизионность, определяется аналитическая область, что делает ее пригодной для применения в доклинических исследованиях биоэквивалентных и аналогичных препаратов. Данный подход может быть использован в фармацевтической разработке для сравнительной оценки эффективности новых молекул, воздействующих на рецептор GLP-1, а также как инструмент скрининга потенциальных лекарственных кандидатов при лечении сахарного диабета 2 типа.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Misra S., Ke C., Srinivasan S., Goyal A., Nyriyenda M.J., Florez J.C., Khunti K., Magliano D.J., Luk A. Current insights and emerging trends in early-onset type 2 diabetes. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. 2023;11(10):768–782. DOI: 10.1016/S2213-8587(23)00225-5.
- Singh A., Shadangi S., Gupta P.K., Rana S. Type 2 Diabetes Mellitus: A Comprehensive Review of Pathophysiology, Comorbidities, and Emerging Therapies. *Comprehensive Physiology*. 2025;15(1):e70003. DOI: 10.1002/cph4.70003.
- The Lancet Diabetes Endocrinology. Undiagnosed type 2 diabetes: an invisible risk factor. *Lancet Diabetes Endocrinol*. 2024;12(4):215. DOI: 10.1016/S2213-8587(24)00072-X.
- Pandey A., Chawla S., Guchhait P. Type-2 diabetes: Current understanding and future perspectives. *IUBMB Life*. 2015;67(7):506–513. DOI: 10.1002/iub.1396.
- Thanikachalam M., Fuller C.H., Lane K.J., Sunderarajan J., Harivanzan V., Brugge D., Thanikachalam S. Urban environment as an independent predictor of insulin resistance in a South Asian population. *International Journal of Health Geographics*. 2019;18(1):5. DOI: 10.1186/s12942-019-0169-9.

6. Majety P., Lozada Orquera F. A., Edem D., Hamdy O. Pharmacological approaches to the prevention of type 2 diabetes mellitus. *Frontiers in Endocrinology*. 2023;14:1118848. DOI: 10.3389/fendo.2023.1118848.
7. Gassasse Z., Smith D., Finer S., Gallo V. Association between urbanisation and type 2 diabetes: an ecological study. *BMJ Global Health*. 2017;2(4):e000473. DOI: 10.1136/bmjgh-2017-000473.
8. Holman N., Young B., Gadsby R. Current prevalence of Type 1 and Type 2 diabetes in adults and children in the UK. *Diabetic Medicine*. 2015;32(9):1119–1120. DOI: 10.1111/dme.12791.
9. Holst J. J. From the Incretin Concept and the Discovery of GLP-1 to Today's Diabetes Therapy. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10:260. DOI: 10.3389/fendo.2019.00260.
10. Bulum T. Nephroprotective Properties of the Glucose-Dependent Insulinotropic Polypeptide (GIP) and Glucagon-like Peptide-1 (GLP-1) Receptor Agonists. *Biomedicines*. 2022;10(10):2586. DOI: 10.3390/biomedicines10102586.
11. Rehfeld J. F. The Origin and Understanding of the Incretin Concept. *Frontiers in Endocrinology*. 2018;9:387. DOI: 10.3389/fendo.2018.00387.
12. Frías J. P., Davies M. J., Rosenstock J., Pérez Manghi F. C., Fernández Landó L., Bergman B. K., Liu B., Cui X., Brown K. Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Patients with Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2021;385(6):503–515. DOI: 10.1056/NEJMoa2107519.
13. Jastreboff A. M., Aronne L. J., Ahmad N. N., Wharton S., Connerly L., Alves B., Kiyosue A., Zhang S., Liu B., Bunck M. C., Stefanski A. Tirzepatide Once Weekly for the Treatment of Obesity. *New England Journal of Medicine*. 2022;387(3):205–216. DOI: 10.1056/NEJMoa2206038.
14. Willard F. S., Douros J. D., Gabe M. B. N., Showalter A. D., Wainscott D. B., Suter T. M., Capozzi M. E., van der Velde W. J. C., Stutsman C., Cardona G. R., Urva S., Emmer-son P. J., Holst J. J., D'Alessio D. A., Coghlan M. P., Rosenkilde M. M., Campbell J. E., Sloop K. W. Tirzepatide is an imbalanced and biased dual GIP and GLP-1 receptor agonist. *JCI Insight*. 2020;5(17):e140532. DOI: 10.1172/jci.insight.140532.
15. Coskun T., Sloop K. W., Loghin C., Alsina-Fernandez J., Urva S., Bokvist K. B., Cui X., Briere D. A., Cabrera O., Roell W. C., Kuchibhotla U., Moyers J. S., Benson C. T., Gimeno R. E., D'Alessio D. A., Haupt A. LY3298176, a novel dual GIP and GLP-1 receptor agonist for the treatment of type 2 diabetes mellitus: From discovery to clinical proof of concept. *Molecular Metabolism*. 2018;18:3–14. DOI: 10.1016/j.molmet.2018.09.009.
16. Patoulias D., Papadopoulos C., Doumas M. Tirzepatide versus Semaglutide Once Weekly in Type 2 Diabetes. *New England Journal of Medicine*. 2022;386(7):e17. DOI: 10.1056/NEJMc2114590.
17. De Block C., Bailey C., Wysham C., Hemmingway A., Allen S. E., Peleshok J. Tirzepatide for the treatment of adults with type 2 diabetes: An endocrine perspective. *Diabetes, Obesity and Metabolism*. 2023;25(1):3–17. DOI: 10.1111/dom.14831.
18. Forzano I., Varzideh F., Avvisato R., Jankauskas S. S., Monne P., Santulli G. Tirzepatide: A Systematic Update. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022;23(23):14631. DOI: 10.3390/ijms232314631.
19. Hauge-Evans A. C., King A. J., Carmignac D., Richardson C. C., Robinson I. C. A. F., Low M. J., Christie M. R., Persaud S. J., Jones P. M. Somatostatin Secreted by Islet  $\delta$ -Cells Fulfills Multiple Roles as a Paracrine Regulator of Islet Function. *Diabetes*. 2009;58(2):403–411. DOI: 10.2337/db08-0792.
20. Ehlert F. J. Functional studies cast light on receptor states. *Trends in Pharmacological Sciences*. 2015;36(9):596–604. DOI: 10.1016/j.tips.2015.05.008.