

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-254

**РАЗРАБОТКА МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА GLP-1R НА КЛЕТОЧНОЙ ЛИНИИ *IN VITRO* ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПРЕПАРАТОМ ТИРЗЕПАТИД В ТЕСТЕ «КАЛЬЦИЕВЫЕ ТОКИ»****DEVELOPMENT OF A METHOD FOR ASSESSING GLP-1R RECEPTOR ON A CELL LINE *IN VITRO* UPON STIMULATION WITH TIRZEPATIDE IN THE “CALCIUM FLUX” ASSAY**

Д. О. Ермолаева, В. Б. Сапарова, А. Н. Афанасьева, А. С. Гончарова, Т. А. Сельменских

ЗАО «Фарм-Холдинг», Санкт-Петербург

D. O. Ermolaeva, V. B. Saparova, A. N. Afanaseva, A. S. Goncharova, T. A. Selmenskikh

Pharm Holding CJSC, Saint Petersburg

✉ Daria.Ermolaeva@geropharm.com

**Аннотация**

Для проведения исследований сопоставимости биоэквивалентных лекарственных препаратов тирзепатид была разработана методика оценки активации рецептора GLP-1R в тесте «кальциевые токи». Нами был использован *in vitro* метод определения активации рецептора и регистрации тока кальция с помощью зеленого флуоресцентного кальций связывающего красителя Fluo-8 AM.

**Abstract**

To conduct comparability studies of bioequivalent tirzepatide drugs, a method for assessing GLP-1R receptor activation in the Calcium Flux assay was developed. We used an *in vitro* method for determining receptor activation and recording calcium flux using the green fluorescent calcium-binding dye Fluo-8 AM.

Тирзепатид — инновационный препарат, являющийся агонистом как глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), так и глюкозозависимого инсулинотропного полипептида (GIP). GIP и GLP-1 являются инкретиновыми гормонами: они высвобождаются в кишечнике в ответ на потребление питательных веществ и стимулируют активность  $\beta$ -клеток поджелудочной железы, секретирующих инсулин, тем самым участвуя в регуляции гомеостаза глюкозы [1].

В методике оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R в качестве тест-системы использована клеточная линия HTS163L (Eurofins, Франция) с экспрессией человеческого рецептора GLP-1. Наличие рецептора на поверхности клеточной мембраны позволяет осуществляться биологическому эффекту GLP-1 и его аналогов, выражающемуся в повышении внутриклеточного уровня цАМФ, запуску кальциевого сигналинга и росту концентрации кальция в клетке.

Клеточную линию культивировали согласно инструкции производителя. Рассев производили в черные 96-луночные планшеты по 5 000 клеток на лунку в питательной среде. Планшеты инкубировали при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub> 24 ± 4 ч. На следующий день к клеткам вносили буфер, содержащий 2 мкМ флуоресцентного красителя Fluo-8 AM, инкубировали 30 мин, защищая от света. Готовили разведения препаратов в финальных концентрациях от 500 до 2 000 000 пМ. В качестве отрицательного контроля выступали лунки с клетками в буфере, не содержащем флуоресцентного красителя, к которым не добавляли препарат. После внесения препаратов проводили снятие флуоресцентного сигнала на мультимодальном микропланшетном ридере CLARIOstar (BMG Labtech, Германия) при длинах волн возбуждения 480 нм и эмиссии 520 нм.

Анализ данных проводили в программе MARS (BMG Labtech, Германия) по методу параллельных кривых с использованием 4-параметрической логистической модели (4PL) и доверительного интервала 95 %. В рамках разработки методики был подобран диапазон концентраций тирзепатида, позволяющий наблюдать нижнее и верхнее плато на кривых доза-эффект, а также обеспечивающий коэффициент детерминации  $R^2 > 0,9$ . График зависимости RFU (относительных единиц флуоресценции) относительно концентрации тирзепатида представлен на рисунке.

Анализ данных продемонстрировал, что разработанная методика позволяет выявлять индуцируемое тирзепатидом увеличение внутриклеточной концентрации кальция. Величина ответа препарата в максимальной концентрации составила от 47 до 76 % относительно сигнала, наблюдаемого в отрицательном контроле.

Значение коэффициента детерминации  $R^2$  составило 0,944. Таким образом, разработанная методика позволяет оценить активацию рецептора GLP-1R на клеточной линии *in vitro* при стимуляции препаратом тирзепатид.

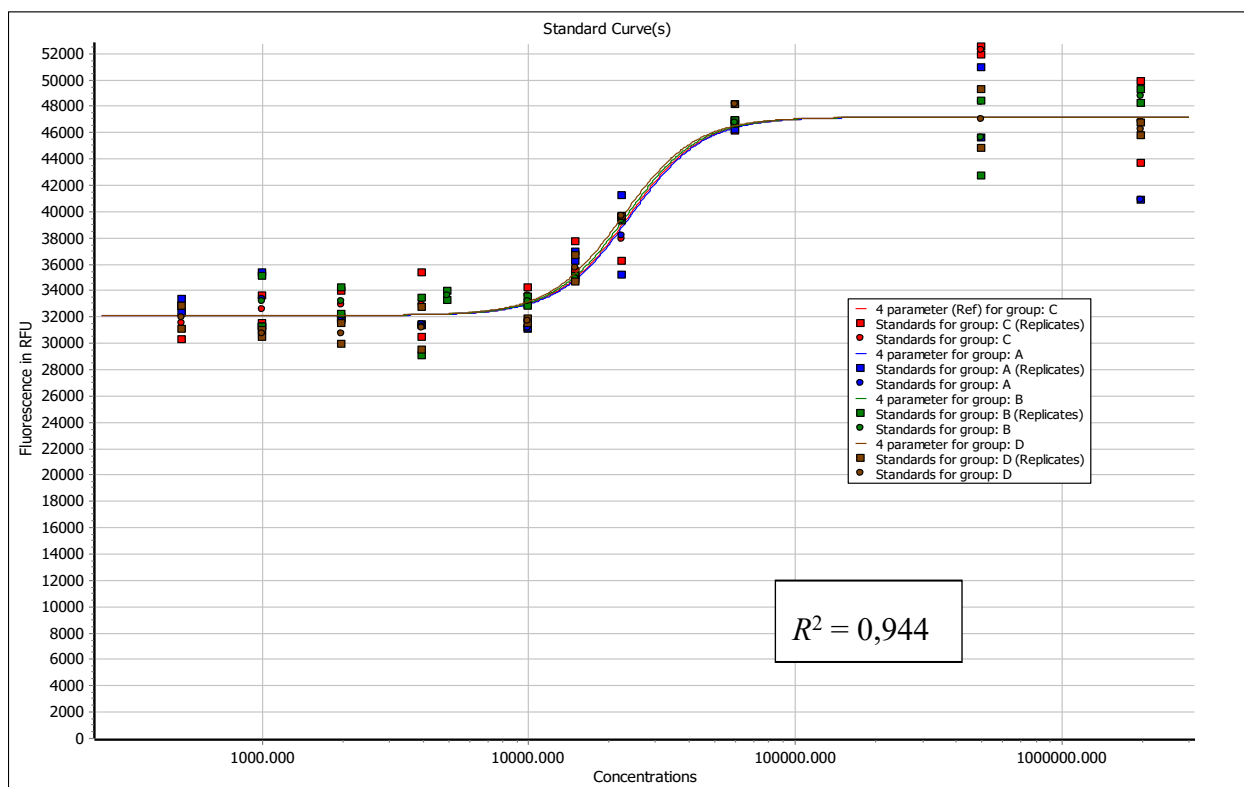


График зависимости RFU от концентрации

### Литература

1. Forzano I., Varzideh F., Avvisato R. et al. Tirzepatide: A Systematic Update // Int. J. Mol. Sci. 2022. Vol. 23, No. 23. URL: <https://www.mdpi.com/1422-0067/23/23/14631> (accessed: 01.07.2025).