

DOI: 10.25205/978-5-4437-1843-9-255

**ВАЛИДАЦИЯ МЕТОДИКИ ОЦЕНКИ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА GLP-1R
IN VITRO ПРИ СТИМУЛЯЦИИ ПРЕПАРАТОМ ТИРЗЕПАТИД****VALIDATION OF A METHOD FOR ASSESSING GLP-1R RECEPTOR
IN VITRO UPON STIMULATION WITH TIRZEPATIDE**

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

Была разработана и валидирована методика оценки активации рецептора GLP-1R тирзепатидом в тесте «Кальциевые токи» с помощью регистрации тока кальция флуоресцентным методом. Валидированная методика является специфичной, правильной, линейной, сохраняется предел количественного определения, прецизионность, определяется аналитическая область.

Abstract

A method for assessing GLP-1R receptor activation by tirzepatide in the «Calcium Flux» assay using fluorescent-based calcium current recording was developed and validated. The validated method is specific, correct, linear, the limit of quantitative determination and precision are preserved, and the analytical range is determined.

Клеточную линию HTS163L (Eurofins, Франция) с экспрессией человеческого рецептора GLP-1 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 % CO₂ 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. 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 %.

Валидацию биоаналитической методики оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ, ICH и EMA. В рамках валидации были оценены следующие параметры: специфичность, предел количественного определения, аналитическая область, линейность, правильность и прецизионность (сходимость, внутрилабораторная прецизионность).

Методика является специфичной, если в нижней точке концентрации сигнал образца, не содержащего анализируемого вещества (плацебо), не превышает 20 % сигнала препарата. Для оценки специфичности было проведено сравнение сигнала для плацебо Седжаро® (ЗАО «Фарм Холдинг», Россия) и препарата Мунджаро® (Eli Lilly Inc., Канада) в концентрации 500 пМ. Ответ для плацебо соответствует 2 % сигнала для исследуемого вещества, что удовлетворяет критериям приемлемости.

Критерий приемлемости для предела количественного определения (ПКО) сохраняется, если сигнал анализируемого вещества из образца в нижней точке концентрации не менее чем на 20 % превышает сигнал холостого образца. ПКО оценивался при сравнении сигнала для препарата в концентрации 500 пМ и холостой пробы (лунки с клетками без Fluo-8 AM). Сигнал анализируемого вещества для препарата превосходит величину сигнала холостой пробы на 43 %.

Линейность методики подтверждалась коэффициентом детерминации $R^2 \geq 0,9$ для 4-параметрической нелинейной калибровочной модели в пределах аналитической области методики. Пропорциональность отклика препарата Мунджаро® была оценена в концентрациях от 500 до 2 000 000 пМ. Коэффициент детерминации составил 0,981, что удовлетворяет критерию приемлемости.

Для оценки правильности определяли значения EC_{50} — концентрации Мунджаро®, при которой достигается 50 % активации кальциевых токов — на четырех уровнях разведений: 175; 100; 50 и 25 % от номинальной концентрации. Правильность характеризуется показателем открываемости и должна находиться в диапазоне 100 ± 25 % от номинального значения. Правильность методики находится в диапазоне от 77 до 119 %, что согласуется с критерием приемлемости.

Прецизионность оценивали по результатам повторных измерений, выполненных одним исполнителем в один день (сходимость) и по трем циклам повторных измерений, выполненных разными исполнителями в разные дни (внутрилабораторная прецизионность). Разброс оценивали с помощью коэффициента вариации CV, его значение должно быть ≤ 20 % для нижней точки концентрации и ≤ 15 % для остальных концентраций. Результаты по параметру сходимость находятся в диапазоне от 3 до 5 %, по параметру внутрилабораторная прецизионность — в диапазоне от 4 до 9 %, что соответствует критериям приемлемости.

Для диапазона концентраций Мунджаро® от 500 до 2 000 000 пМ определена прецизионность, линейность и правильность, которые удовлетворяют критериям приемлемости. Таким образом, аналитическая область методики установлена на уровне от 500 до 2 000 000 пМ.

По итогам проведенной валидации биоаналитическая методика оценки специфической биологической активности препаратов тирзепатид в тесте «Кальциевые токи» по активации рецептора GLP-1R является специфичной, линейной, правильной и высокопрецизионной, сохраняется предел количественного определения, определяется аналитическая область, что делает методику пригодной для применения в доклинических исследованиях биоэквивалентных и аналогичных препаратов.