

均相时间分辨荧光法测定人胰岛素生物学活性

王绿音¹, 杨艳枫^{1,2}, 张孝明¹, 吕萍¹, 张慧¹, 李晶^{1*}, 梁成罡^{1*}

(1. 中国食品药品检定研究院激素室, 国家卫生健康委员会生物技术产品检定方法及其标准化重点实验室, 北京 102629; 2. 中国药科大学, 江苏南京 211198)

摘要: 建立基于均相时间分辨荧光免疫分析技术的人胰岛素体外生物学活性测定方法。利用 CHO-INSR B1284 转基因细胞, 通过均相时间分辨荧光免疫分析系统检测人胰岛素的体外生物学活性; 对靶细胞铺板密度、药物的量效范围、刺激时间等关键参数进行优化; 验证方法的专属性、相对准确度、中间精密密度、线性与范围, 以及细胞的传代稳定性; 以重组人胰岛素国家标准品为参比品, 将本研究建立的方法应用于其他人胰岛素类似物原料药、制剂的生物学活性测定。结果表明人胰岛素及其类似物存在剂量效应曲线, $R^2 > 0.995$, 符合四参数方程 $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$ 。本方法专属性良好, 64%、80%、100%、125%、156% 共 5 个效价浓度的待测品相对效价 ($n = 8$) 的几何均值、相对偏倚、几何变异系数 (GCV, %) 均符合《中华人民共和国药典》2020 版四部通则 9401 的要求; 且方法可适用于其他胰岛素类似物的生物学活性测定。该方法操作简便、耗时短、准确度高、精密密度好, 可用于胰岛素类产品的生物学活性评价和质量控制。

关键词: 生物学活性; 人胰岛素; 转基因细胞; 均相时间分辨荧光技术; 方法学验证

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2022)10-3223-06

Determination of biological activity of human insulin by a homogeneous time-resolved fluorescence method

WANG Lü-yin¹, YANG Yan-feng^{1,2}, ZHANG Xiao-ming¹, LÜ Ping¹, ZHANG Hui¹,
LI Jing^{1*}, LIANG Cheng-gang^{1*}

(1. NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract: We developed an *in-vitro* bioassay for determining the bioactivity of human insulin by homogeneous time-resolved fluorescence immunoassay. CHO-INSR B1284 transgenic cells were used as target cells. Key assay parameters, including the cell density, the range of working concentrations, and the stimulation time were optimized. The specificity, relative accuracy, intermediate precision, linearity, and range of the method were validated, as well as the passage stability of the CHO-INSR B1284 cell line. The national standard of recombinant human insulin was used as the benchmark to evaluate the relative potency of insulin analogues and drugs. The drugs and the reference human insulin showed a dose-response relationship, $R^2 > 0.995$, which conforms to the four-parameter equation: $y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D$. Specificity of the method was good. The geometric mean, relative bias, and geometric coefficient of variation (GCV, %) of the five concentrations ($n = 8$, 64%, 80%, 100%, 125% and 156%) met the requirements of the General Rules of Chinese Pharmacopoeia, 2020 edition, Volume IV (9401). In summary, a bioassay for determining the *in vitro* bioactivity of human insulin based on a homogeneous time-resolved fluores-

收稿日期: 2022-05-25; 修回日期: 2022-08-02.

基金项目: 国家科技重大专项课题资助项目 (2018ZX09101001-003-004).

*通讯作者 E-mail: liangchenggang@nifdc.org.cn; li_jing@nifdc.org.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-0641

cence technique was established; the method was simple, time-saving, accurate and precise, and could be used for the evaluation of biological activity and quality.

Key words: biological activity; human insulin; transgenic cell; homogeneous time resolved fluorescence; method validation

作为糖尿病第一大国,我国拥有近1.3亿糖尿病患者,占全球患者人数的四分之一^[1]。胰岛素是体内唯一具有降糖作用的内分泌激素,自1921年被发现以来,改善了无数患者的生活质量^[2,3]。胰岛素是一个由A、B两条肽链共51个氨基酸组成的蛋白质^[4],通过与胰岛素受体(insulin receptor, IR)结合发挥生理效应。IR分为A、B两种亚型,IR-A常表达于肿瘤组织中,可与胰岛素或重组人胰岛素样生长因子-II(IGF-2)结合,促进有丝分裂及细胞生长。IR-B常表达于胰岛素靶组织中,仅与胰岛素结合,参与介导细胞代谢^[5]。IR是由两个 α 亚单位和两个 β 亚单位组成的 β - α - α - β 异四聚体跨膜蛋白^[6]。 α 亚基位于细胞膜外,含胰岛素结合位点,决定了胰岛素结合的高亲和力。 β 亚基为跨膜亚单位,与信号转导相关^[7]。胰岛素与 α 亚基的特异性结合解除了 α 亚基对 β 亚基的酪氨酸激酶活性的抑制作用^[8],暴露的 β 亚基发生自磷酸化,继而磷酸化下游的受体底物蛋白,激活PI3K/Akt和MAPK/ERK信号通路^[9],最终调节细胞分化、增殖、代谢、凋亡等生物学过程^[10]。

生物学活性是生物技术产品的关键质量属性,与产品的临床疗效密切相关^[11]。国际公认的胰岛素生物活性的标准方法仍为体内动物法,该方法通过测定给药后小鼠或家兔血糖的降低来评价胰岛素效价,存在操作熟练度要求高、结果重复性差、变异系数高、需要建设动物实验室、实验成本高等不足。由于体内动物法的局限性,近年来,随着转基因细胞技术的发展,一些基于细胞的活性测定方法逐渐被用于生物技术产品的质量控制在其中,均相时间分辨荧光(homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF)技术凭借其操作简便、高效、稳定、灵敏度高、假阳性率低等优势受到越来越多的关注^[12,13]。HTRF是一种基于时间分辨技术及荧光共振能量转移原理的免疫分析技术,用于检测均相液体体系中的待测物水平^[14,15],目前尚未见该技术用于胰岛素体外活性测定的报道。

本研究利用稳定表达人胰岛素受体B的CHO-INSR B1284细胞,建立了基于HTRF技术的人胰岛素体外生物学活性质控方法。该方法具有快速简便、灵敏、稳定的特点,可用于人胰岛素及其类似物的生物学活性评价。

材料与方法

仪器 多功能酶标仪 Multimode Plate Reader Envision (Perkin Elmer公司)。

供试品与试剂 重组人胰岛素国家标准品(recombinant human insulin, 批号: 140633-201907)、人胰岛素样生长因子1国家标准品(insulin like growth factor 1, IGF-1, 批号: 360011-201601)、重组人表皮生长因子活性测定国家标准品(epidermal growth factor, EGF, 批号: 270013-9701)均来自中国食品药品检定研究院;人胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、德谷胰岛素、地特胰岛素及相应注射液(本实验室留样);Ham's F-12 营养培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、0.25% Trypsin-EDTA、潮霉素B均购自Gibco公司(美国);Phospho-IR beta (Tyr1150/1151)试剂盒(含 phospho insulin receptor beta cryptate antibody、phospho insulin receptor beta d2 antibody、blocking reagent、lysis buffer及detection buffer)购自Perkin Elmer公司(美国);牛血清白蛋白,购自Sigma公司(德国);DPBS(不含钙镁离子)购自Gibco公司(美国)。

细胞系 细胞 CHO-INSR B1284 (ATCC[®]CRL-3307TM)购自ATCC(美国),由本实验室保存。

HTRF法检测原理 胰岛素受体与配体的结合,引起胰岛素受体胞内 β 亚基发生酪氨酸磷酸化,在体系中加入以镧系元素(铈和铽)形成的穴状化合物标记的特异性抗体(能量供体),以及小分子荧光探针d2标记的特异性抗体(能量受体),磷酸化的IR β 随即与两种抗体形成双抗夹心复合物。以波长为320 nm的激发光激发上述复合物,经过特定的延迟时间后,短半衰期的背景荧光信号逐渐衰减消失^[16],能量供体的荧光基团发出的波长为620 nm的长半衰期荧光信号被采集。双抗夹心复合物的形成拉近了能量供体与能量受体的距离,使得光子从被激发的供体荧光基团转移至受体荧光基团^[17],被激发的受体荧光基团即可发射665 nm波长的荧光,荧光值与磷酸化的IR β 水平呈正相关,具体原理见图1。

检测方法 CHO-INSR B1284细胞培养至对数生长期,加入TrypLE置37 °C消化3 min,随后加入完全培养基(含10% FBS、0.6%潮霉素B的Ham's F-12营养培养基)终止消化,1 000 r·min⁻¹离心5 min后用完全培养

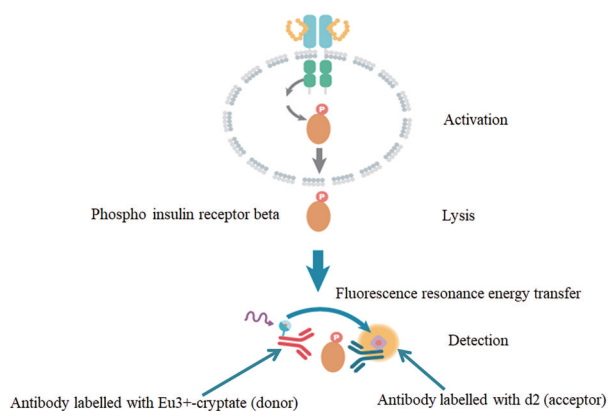


Figure 1 The mechanism of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay to determine the bioactivity of human insulin. Provided by Perkin Elmer (America)

基调整细胞密度为每毫升 2.5×10^5 个, 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 接种至 96 孔细胞培养板中, 置 37°C 、 5% CO_2 培养箱中培养 $18 \sim 24$ h 后取出, 弃培养基。用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液将人胰岛素样品、重组人胰岛素国家标准品稀释至 $3.47 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。以含 0.1% 牛血清白蛋白的 Ham's F-12 营养培养基为稀释液, 将人胰岛素及重组人胰岛素国家标准品溶液稀释至 $3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的初始浓度, 再用稀释液向下进行 3 倍系列稀释, 共 9 个稀释度, 以每孔 $100 \mu\text{L}$ 加入已接种细胞的 96 孔培养板。将培养板置于 37°C 、 5% CO_2 培养箱中孵育 35 min 后取出, 弃上清, 以每孔 $50 \mu\text{L}$ 加入含 blocking reagent 的 lysis buffer, 室温下裂解 30 min 。在 HTRF 配套的 384 孔白板中加入以 Detection buffer 预先稀释的 phospho insulin receptor beta cryptate antibody 及 phospho insulin receptor beta d2 antibody 混合液, 每孔 $4 \mu\text{L}$, 再将裂解液转入相应的 384 孔白板, 每孔 $16 \mu\text{L}$, 室温孵育 2 h 。采用多功能酶标仪, 设置激发波长 320 nm , 读取发射波长 620 、 665 nm 处的荧光信号值。利用 Softmax 5.4 软件进行四参数计算, 利用 GraphPad Prism 5 软件绘图, 以人胰岛素浓度对数为横坐标, 以 $\Delta F (A_{665 \text{ nm}}/A_{620 \text{ nm}})$ 为纵坐标绘制四参数剂量-效应曲线, 方程为 $y = (A - D) / [1 + (x/C)^b] + D$, C 为半数有效浓度 (EC_{50}), A 为曲线上渐近线值, D 值为曲线下渐近线值, 信噪比 (signal-to-noise ratio, S/N) = A/D , 样品的相对生物学活性 % = 标准品 EC_{50} / 样品 $\text{EC}_{50} \times 100\%$ 。

实验参数的优化 取对数生长期的 CHO-INSR B1284 细胞, 用完全培养基调整细胞密度分别为每毫升 1.5×10^5 、 2.0×10^5 、 2.5×10^5 、 3.0×10^5 个, 分别接种于 96 孔板中, 按照上述检测方法进行活性测定, 确定最佳靶细胞铺板密度; 将重组人胰岛素国家标准品分别稀释至 2.1 、 2.7 、 3.3 、 3.9 、 $4.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的初始浓度, 分别进行 3

倍系列稀释后测定, 将重组人胰岛素国家标准品稀释至 $3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的初始浓度, 再分别进行 2、3、4、5 倍系列稀释后测定, 比较不同初始浓度、稀释倍数的拟合曲线, 确定最优药物作用浓度; 设置 25 、 30 、 35 、 40 min 四个不同的刺激时间, 按上述检测方法测定, 选择最佳药物刺激时间。

方法学验证 参照 2020 版《中华人民共和国药典》^[18] 四部通则 9401 对所建方法进行方法学验证。

相对准确度 以含 0.1% 牛血清白蛋白的 Ham's F-12 营养培养基为稀释液, 将重组人胰岛素国家标准品分别稀释至 2.112 、 2.64 、 3.3 、 4.125 、 $5.148 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的起始浓度, 作为 5 个不同效价水平 (64% 、 80% 、 100% 、 125% 、 156%) 的待测溶液, 以 100% 效价水平的待测溶液为参比品, 两名实验人员分别测定上述 5 个待测溶液的相对效价, 每个效价水平测定 8 次, 每次 2 块 96 孔板。计算几何均值, 采用相对偏倚 (RB, 相对效价测定值/相对效价理论值 $\times 100\%$) 评价相对准确度。

中间精密度 两名实验员在同一天内分别测定上述 5 个待测溶液的相对效价, 测定 2 天。对于每一个实验员, 每天需制备 2 份同一效价水平的待测溶液, 使用 2 个细胞代次, 每个细胞代次分别进行 2 块 96 孔板测试, 计算均值。根据各效价水平测定结果的对数值计算几何变异系数 (GCV, %), 采用卡方检验计算 GCV 的 95% 置信区间上限。

线性及范围 以 5 个待测溶液的相对效价测定值的对数为横坐标, 以相应的理论相对效价的对数为纵坐标, 进行线性回归分析。

辅料基质的专属性 取人胰岛素注射液辅料溶液 (辅料空白溶液) 及含 0.1% 牛血清白蛋白的 Ham's F-12 营养培养基 (样品稀释液), 按上述检测方法进行活性测定。

降解产物的专属性 取经过 60°C 加热处理 0 、 2 、 6 、 16 、 53 h 的重组人胰岛素国家标准品溶液, 以未经加热处理的标准品溶液作为参比品, 测定不同加热处理时间标准品溶液的相对生物学活性。

样品的专属性 考虑到 IR 与 IGF-1R 同属于胰岛素受体家族成员^[19], 此二者与 EGFR 又同属于酪氨酸激酶受体家族, 故选择 IGF-1 与 EGF 考察本方法测定人胰岛素的专属性。

CHO-INSR B1284 细胞系的传代稳定性 在体外生物学活性实验中, 细胞的传代稳定性至关重要。为考察细胞传代次数对检测结果, 将连续培养的不同代次的 CHO-INSR B1284 细胞进行冻存, 同时复苏后进行 3 次传代并用于测定同批次的重组人胰岛素标准品的相对生物学活性。

HTRF法测定胰岛素类似物的体外生物学活性 取赖脯胰岛素、门冬胰岛素、甘精胰岛素、德谷胰岛素、地特胰岛素原料药及各自相应制剂,以含0.1%牛血清白蛋白的Ham's F-12营养培养基为稀释液,稀释至与人胰岛素相同的起始摩尔浓度,分别测定其生物学活性。

结果

1 实验参数的优化

分别以每毫升 1.5×10^5 、 2.0×10^5 、 2.5×10^5 、 3.0×10^5 个的细胞密度铺板,测定同一份样品的生物学活性,如图2A所示,当靶细胞铺板密度为每毫升 2.5×10^5 个时,EC₅₀值($0.080 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)及S/N(13.81)均较好;当初始浓度为 $3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,S型曲线上的点分布较均匀,EC₅₀值($0.0183 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)最低,S/N(9.9)较好,选择 $3.3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 作为药物的初始浓度(图2B);如图2C所示,比较不同的拟合曲线,当稀释倍数为3倍时,四参数曲线上的点分布较均匀,S/N较好,选择3倍作为药物稀释倍数,35 min作为刺激时间,在此条件下具有最佳S/N(14.6)及最小EC₅₀值($0.077 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)(图2D)。

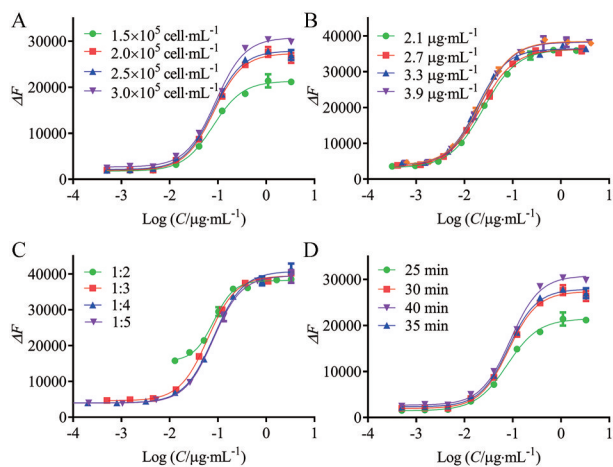


Figure 2 Optimization of the HTRF assay. Dose-responsive curve was shown in the presence of different cell numbers (A); different working concentrations (B and C), after adding into cells and incubating for 35 min, on the expression of luciferase gene; four different incubation time (D). $\Delta F = A_{665 \text{ nm}} / A_{620 \text{ nm}}$

2 方法学验证

2.1 相对准确度

相对效价的几何均值分别为: $(64.39 \pm 2.08)\%$ 、 $(79.37 \pm 2.25)\%$ 、 $(102.49 \pm 3.60)\%$ 、 $(126.80 \pm 2.21)\%$ 、 $(157.68 \pm 4.24)\%$, 相对偏倚(RB)及其90%置信区间分别为 0.40% (-2.70% , 3.70%)、 -0.80% (-3.60% , 1.90%)、 2.50% (-1.10% , 6.00%)、 1.40% (-0.40% , 3.10%)、 1.10% (-1.80% , 3.80%), RB及置信区间的绝对值均不

超过10%, 相对准确度优秀。

2.2 中间精密度

根据5个效价水平8次测定结果的对数值计算几何标准偏差(GSD)、几何变异系数(GCV)及其95%置信上限。5个效价水平的GCV%均小于6%, 相应的置信上限均小于10%, 中间精密度良好。

2.3 线性及范围

以5个待测溶液的相对效价测定值的对数为X轴, 以相应的理论相对效价的对数为Y轴, 线性回归方程为 $Y = 1.0145X + 0.0086$, R^2 为0.9991, 斜率接近于1.0, 表明本方法在64%~156%的效价水平内具有良好的线性。

2.4 专属性

2.4.1 辅料基质及样品的专属性 如图3A所示, 辅料空白溶液、样品稀释液、EGF应用本方法均无反应性, IGF-1与人胰岛素均存在一定的量效关系, 但IGF-1的剂量效应曲线的S/N远低于人胰岛素, 仅存在微弱响应。

2.4.2 降解产物的专属性 如图3B所示, 经60℃加热处理2、6、16、53 h的重组人胰岛素国家标准品溶液, 相对生物活性分别为98.6%、92.5%、80.6%和30.5%, 表明本方法能反映出热破坏样品的活性下降。

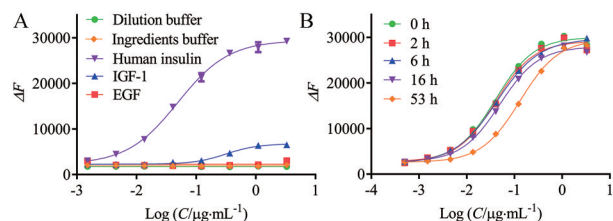


Figure 3 Specificity of the HTRF assay. Dose-response of the dilution buffer, EGF, IGF-1, human insulin, ingredients buffer solution (A), and the relative potency of heat-treated samples estimated by the HTRF assay (B). EGF: Epidermal growth factor; IGF-1: Insulin like growth factor 1

3 CHO-INSR B1284细胞系的传代稳定性

如图4所示, 采用4个CHO-INSR B1284细胞代数(P6、P12、P20、P25)对重组人胰岛素标准品进行活性测定, 得到了4条平行的剂量效应曲线, 曲线上平台点分布较均匀, 曲线的S/N依次为11.6、15.0、14.1、11.0, 第6代和第25代所得曲线的S/N很接近, 证明CHO-INSR B1284细胞系具备足够的稳定性。

4 HTRF法测定胰岛素类似物的体外生物学活性

以样品稀释液将甘精胰岛素、德谷胰岛素、地特胰岛素、赖脯胰岛素、门冬胰岛素原料药(drug substance, DS)及相应制剂(drug product, DP)稀释至与人胰岛素相同的起始摩尔浓度后, 继续向下进行3倍系列稀释,

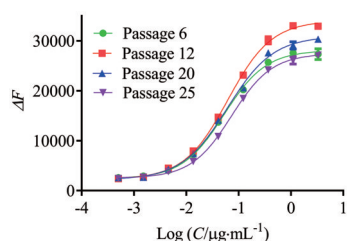


Figure 4 Stability of CHO-INSR B1284 cells under different passages

共8个稀释度,以便在同一块96孔板上测定5种胰岛素类似物及人胰岛素的活性。结果见图5,上述胰岛素类似物的原料药及制剂在本方法中均存在剂量效应曲线,除德谷胰岛素及地特胰岛素的响应值未达到曲线最大值因而无法计算 EC_{50} 值以外,其余品种的 EC_{50} 值从高到低依次为甘精胰岛素、门冬胰岛素、赖脯胰岛素、人胰岛素。上述结果表明,本方法可用于不同结构胰岛素类似物的相对生物学活性测定。

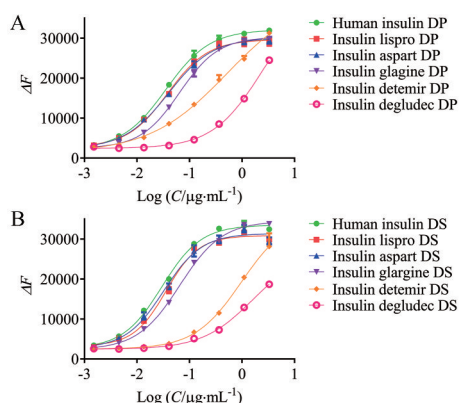


Figure 5 Dose-response curves for different types of insulin injections (A) and drugs with the same number of molecules (B). DP: Drug product; DS: Drug substance

讨论

传统的体内动物法测定胰岛素生物学活性,不仅操作复杂、变异较大,且不符合动物保护及动物福利的3R (replacement, reduction, refinement) 原则。本研究建立的基于HTRF免疫分析技术的人胰岛素体外生物学活性测定方法,无需常规ELISA的洗板操作,大大提高了检测效率,该方法检测体系灵敏且稳定,可以反复读数,且由于背景的短半衰期荧光衰减,消除了化学和生物添加剂的背景干扰。选择CHO-INSR B1284转基因细胞作为靶细胞,通过对靶细胞铺板密度、药物的量效范围、刺激时间这三个关键参数的优化,获得了最佳的实验条件。依照ICH指导原则Q2(R1)、Q6B及《中华人民共和国药典》通则(9401)进行了方法学验证,结果表明该方法对人胰岛素有较好的专属性,且可以检

测到高温处理导致的样品活性下降。该方法在64%~156%的浓度内有很好的剂量效应曲线,线性关系良好,该方法的相对准确度及精密度高,5个效价水平的相对偏倚及置信区间的绝对值均不超过10%,GCV%均小于6%,相应的置信上限均小于10%。此外,该方法使用的细胞系还具有良好的传代稳定性。采用该方法测定5种胰岛素类似物的生物学活性,结果表明该方法可区分脂肪酸修饰的胰岛素类似物分子的活性。本文采用的脂肪酸修饰的胰岛素类似物为地特胰岛素和德谷胰岛素,它们是目前较为常用的基础胰岛素,具有较长的胰岛素作用时间及平坦的药效学曲线。脂肪酸链的存在,不仅实现了其与白蛋白的可逆性结合,还降低了其与胰岛素受体的亲和力,从而降低了受体介导的清除率,增加了药物在血液中的半衰期^[20,21]。本研究通过检测胰岛素配体与受体结合后受体的自磷酸化水平评价其生物学活性,通过比较脂肪酸修饰的胰岛素类似物与人胰岛素的剂量效应曲线可知,脂肪酸修饰的胰岛素类似物具有更低的受体结合活性,分析其可能的原因是脂肪酸侧链带来空间位阻降低了其与受体结合力,初步显示本方法可以反映出脂肪酸修饰的胰岛素类似物与人胰岛素的结构差异。

综上所述,本研究成功建立了一种基于HTRF法的可用于检测人胰岛素生物学活性的新方法,可用于研发、过程控制、终产品放行及生物类似药研究,具有成为现有药典标准方法的替代方法的潜力。

作者贡献: 王绿音负责实验设计、完成实验主要内容和文章撰写;杨艳枫负责前期实验条件摸索;张孝明、吕萍、张慧负责提供技术和材料支持;李晶、梁成罡负责指导实验设计思路、提出修改意见。

利益冲突: 全体作者均同意最终的文章,无任何利益冲突。

References

- [1] Li Y, Teng D, Shi X, et al. Prevalence of diabetes recorded in mainland China using 2018 diagnostic criteria from the American Diabetes Association: national cross sectional study [J]. *BMJ*, 2020, 369: m997.
- [2] Jiang LM, Chen Y, Li HL, et al. Structure identification and biological potency analysis of recombinant insulin analog DesB30 [J]. *Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术)*, 2013, 8: 19-23.
- [3] Yu XF. The past, present and future of insulin—development and application of insulin preparations [J]. *Chin J Front Med Sci (中国医学前沿杂志)*, 2021, 13: 4-8.
- [4] Zhang ZH, Yang LX, He Y. A review on molecular mechanism of adipokines, inflammatory factors and insulin resistance [J]. *Clin J Chin Med (中医临床研究)*, 2020, 13: 144-148.

- [5] Zhong YJ, Hu Y. Insulin resistance and insulin receptor isoform A in cancer [J]. *Med Recapitul (医学综述)*, 2012, 18: 339-341.
- [6] Zheng XK, Wang WW, Feng WS. Advance in the study of the insulin-stimulated PI3K/PKB signal pathway [J]. *Chin J New Drugs (中国新药杂志)*, 2012, 21: 2763-2770.
- [7] Denley A, Cosgrove LJ, Booker GW, et al. Molecular interactions of the IGF system [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2005, 16: 421-439.
- [8] Cai XL, Ha XQ. Advances in the study of positive and negative molecular proteins regulating insulin receptors [J]. *J Med Res (医学研究杂志)*, 2019, 48: 179-181.
- [9] DeBosch BJ, Muslin AJ. Insulin signaling pathways and cardiac growth [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2008, 44: 855-864.
- [10] Li Q, Zhang N, Xu TR, et al. Research progress on structure and function of insulin receptor substrate protein family [J]. *Prog Physiol Sci (生理科学进展)*, 2021, 52: 65-71.
- [11] Yang YF, Wang LY, Liang YL, et al. Time-resolved fluorescence immunoassay for the determination of the biological activity of human insulin [J]. *J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2022, 42: 51-59.
- [12] Deng CP, Chen H, Xie JH, et al. Measurement of binding activity of adalimumab by homogeneous time-resolved fluorescence method [J]. *Chin Med Biotechnol (中国医药生物技术)*, 2022, 17: 132-137.
- [13] Rossant CJ, Matthews C, Neal F, et al. Versatility of homogeneous time-resolved fluorescence resonance energy transfer assays for biologics drug discovery [J]. *J Biomol Screen*, 2015, 20: 508-518.
- [14] Enomoto K, Nagasaki T, Yamauchi A, et al. Development of high throughput spermidine synthase activity assay homogeneous time resolved fluorescence [J]. *Anal Biochem*, 2006, 351: 229.
- [15] Enomoto K, Okamoto H, Numata D, et al. A simple and rapid assay for eparanase activity using homogeneous time-resolved fluorescence [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41: 912.
- [16] Deng CP, Qin YM, Deng QC, et al. Establishment of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) method for measurement of monoclonal antibody concentration [J]. *China Biotechnol (中国生物工程杂志)*, 2013, 33: 64-68.
- [17] Degorce F, Card A, Soh S, et al. HTRF: a technology tailored for drug discovery -a review of theoretical aspects and recent applications [J]. *Curr Chem Genomics*, 2009, 3: 22-32.
- [18] Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China (中华人民共和国药典) [S]. Part 4. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 530-535.
- [19] Ward CW, Garrett TP. Structural relationships between the insulin receptor and epidermal growth factor receptor families and other proteins [J]. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2004, 7: 630-638.
- [20] Boehm T, Gusrez S, Korn MH, et al. Insulin analogues with reduced insulin receptor binding affinity: CN, 113396157A [P]. 2021-09-14.
- [21] Cui RR, Zheng SY, Coen M, et al. An insulin analogue with reduced binding force to insulin receptor and its use: CN, 110546161A [P]. 2019-12-06.