

## 均相时间分辨荧光法检测德谷胰岛素生物学活性

高婧<sup>1,2#</sup>, 王绿音<sup>2#</sup>, 李晶<sup>2</sup>, 吕萍<sup>2</sup>, 高向东<sup>1\*</sup>, 梁成罡<sup>2\*</sup>

(1. 中国药科大学生命科学与技术学院, 江苏南京 211198; 2. 中国食品药品检定研究院, 药品监管科学全国重点实验室, 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)

**摘要:** 本研究以 CHO\_INSR\_1284 转基因细胞系为靶细胞, 利用均相时间分辨荧光技术建立德谷胰岛素生物学活性检测方法。对关键参数进行优化, 并依据中国药典 (2020 版四部通则 9401、1431) 进行验证。结果表明, 德谷胰岛素在本方法中存在良好的剂量效应关系, 符合四参数曲线。经优化, 细胞种板密度为每毫升  $3.5 \times 10^5$  个, 德谷胰岛素初始浓度为  $57.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 稀释倍数为 4 倍, 刺激时间为 45 min, 孵育时间为 4 h。本方法专属性强, 5 个效价水平几何变异系数 GCV% 为 4.1%~10.6%, 线性拟合的直线回归方程为  $y = 1.015x - 0.0277$ ,  $R^2 = 0.9996$ , 结果证明此方法具有的较好中间精密度和线性。且回归项非常显著 ( $P < 0.01$ ), 偏离平行项和模型失拟项均不显著 ( $P \geq 0.05$ ), 均符合中国药典要求。本研究建立了一种基于均相时间分辨荧光技术的德谷胰岛素生物学活性检测方法, 该方法可用于德谷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; 德谷胰岛素; 脂肪酸修饰胰岛素; 转基因细胞; 均相时间分辨荧光技术

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)12-3347-07

## Detection of biological activity of insulin degludec by homogeneous time-resolved fluorescence

GAO Jing<sup>1,2#</sup>, WANG Lü-yin<sup>2#</sup>, LI Jing<sup>2</sup>, LÜ Ping<sup>2</sup>, GAO Xiang-dong<sup>1\*</sup>, LIANG Cheng-gang<sup>2\*</sup>

(1. College of Life Science and Technology, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. State Key Laboratory of Drug Regulatory Science, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

**Abstract:** In this study, the CHO\_INSR\_1284 transgenic cell line was employed as the target cell, utilizing homogeneous time-resolved fluorescence technology to establish a method for detecting the biological activity of insulin degludec. Key parameters were optimized, and validation was conducted in accordance with general principles 9401 and 1431 of the fourth section of the 2020 edition of the Chinese Pharmacopoeia. Results indicated a good dose-response relationship for insulin degludec in this method, aligning with a four-parameter curve. Following optimization, the cell seeding density was set at  $3.5 \times 10^5 \text{ cell} \cdot \text{mL}^{-1}$ , the initial concentration of insulin degludec at  $57.18 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , with a four-fold dilution, a stimulation period of 45 minutes, and an incubation duration of 4 hours. This method demonstrated strong specificity, with the geometric variation coefficient (GCV%) for the five potency levels ranging from 4.1% to 10.6%. The linear regression equation from the linear fitting was  $y = 1.015x - 0.0277$ , and  $R^2 = 0.9996$ . The results confirmed the method's good intermediate precision and linearity. The regression term was highly significant ( $P < 0.01$ ), neither the deviation from parallel terms nor the model mismatch terms were significant ( $P \geq 0.05$ ), complying with general rule 1431 of the fourth section of the 2020

收稿日期: 2024-04-24; 修回日期: 2024-08-25.

基金项目: 2024 年度国家药品标准制修订研究课题 (2024S09).

#共同第一作者.

\*通讯作者 E-mail: xdgao@cpu.edu.cn; liangchenggang@nifdc.org.cn

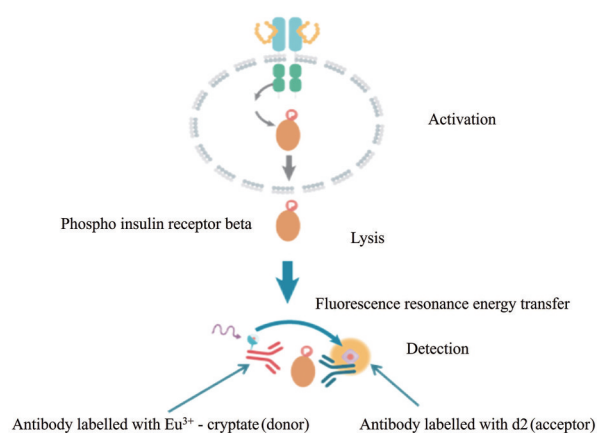
DOI: 10.16438/j.0513-4870.2024-0397

edition of the Chinese Pharmacopoeia. This study established a method for detecting the biological activity of insulin degludec using homogeneous time-resolved fluorescence technology, suitable for evaluating the biological activity and quality control of insulin degludec products.

**Key words:** biological activity; insulin degludec; fatty acid modified insulin; transgenic cell; homogeneous time-resolved fluorescence technique

普通胰岛素作用时间短,需每天规律注射,容易引起注射部位皮肤硬结、脂肪增生或萎缩,给患者带来较大痛苦<sup>[1,2]</sup>。为了保证药物治疗效果并降低给药频率,脂肪酸修饰型胰岛素类似物应运而生<sup>[3]</sup>。德谷胰岛素(insulin degludec, IDeg)是一种长效胰岛素类似物,在人胰岛素的基础上去掉B链30位的苏氨酸,在B链29位赖氨酸上通过L- $\gamma$ -谷氨酸连接子连接一个十六碳脂肪二酸。辅料中的锌离子有利于IDeg形成稳定的可溶性双六聚体,苯酚能促进多六聚体沉积在皮下组织中,形成药物储存库, IDeg单体随着锌离子的扩散缓慢释放入血发挥作用,这是IDeg长效作用的主要机制;另外, B链29位的赖氨酸可与血液中的白蛋白结合,起到次要作用<sup>[4,5]</sup>。诺和诺德公司生产的德谷胰岛素注射液诺和达已在全球上市,我国的同类产品也在注册申请过程中。开发一种生物学活性检测方法,对于生产工艺开发、产品质量研究、放行检测及潜在的生物类似药可比性研究有重要意义。

胰岛素与受体(insulin receptor, IR)结合后,IR $\beta$ 亚基发生磷酸化并激活下游信号通路<sup>[6,7]</sup>。均相时间分辨荧光技术(homogeneous time-resolved fluorescence, HTRF)结合了时间分辨荧光(time-resolved fluorescence, TRF)和荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)两种技术<sup>[8]</sup>。方法检测原理如图1所示,磷酸化的IR $\beta$ 与抗体混合物形成双抗夹心复合物,



**Figure 1** The mechanism of homogeneous time-resolved fluorescence (HTRF) assay to determine the bioactivity of insulin degludec (IDeg)

在320 nm的激发光下,能量供体的荧光基团发射波长620 nm的荧光,光子可从供体荧光基团转移至受体荧光基团,被激发的受体荧光基团发射波长665 nm的荧光,荧光值与磷酸化的IR $\beta$ 水平呈正相关<sup>[9]</sup>。

HTRF较TRF的优势在于其反应体系小且均匀,荧光在数小时内恒定,可进行高通量检测,实验周期短,易于操作等<sup>[10-12]</sup>。HTRF凭借其高效快速、灵敏度高、稳定性好等优点被广泛应用<sup>[13-15]</sup>。

本研究以HTRF为平台,利用CHO\_INSR\_1284转基因细胞系,建立了一种准确、灵敏、稳定、高效的德谷胰岛素生物学活性检测方法。

## 材料与方法

**细胞** CHO\_INSR\_1284 (ATCC<sup>®</sup>CRL-3307<sup>TM</sup>) 购自美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)。

**样品** 德谷胰岛素对照品(BG20211102)、德谷胰岛素(013C220210903、013C220211004、013C220211005)、人胰岛素(202203B51)、甘精胰岛素(GLA2022021)、门冬胰岛素(023C220210501)、赖脯胰岛素(202107A02)均为中国食品药品检定研究院激素室留样。

**主要试剂** 人表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF, 62253-63-8)购自德国Sigma-Aldrich公司;重组人胰岛素样生长因子1(recombinant human insulin-like growth factor-1, IGF-1, 062301F2923)购自美国Peprotech公司;牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA, A8010)购自德国Sigma公司;0.25% trypsin-EDTA(2376021)、F-12(1 $\times$ )+GlutaMAX<sup>TM</sup>-1培养基(2276947)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, 2396297P)、PBS(2492861)购自美国Gibco公司;IR betap-Y1150-kit-10000 tests试剂盒(18A)购自法国Cisbio公司;潮霉素B(H044-31US)购自美国Invitrogen公司;乙腈(B2304000668)购自美国Solvslchro公司。

**试剂配制** 完全培养基:F-12(1 $\times$ )+GlutaMAX<sup>TM</sup>-1培养基+0.3 mg $\cdot$ mL<sup>-1</sup>潮霉素B+10% FBS;样品稀释液:F-12(1 $\times$ )+GlutaMAX<sup>TM</sup>-1培养基+0.1% BSA。

**仪器与材料** 离心机(德国Eppendorf公司, Centrifuge 5702);多功能酶标仪(美国Perkin Elmer公

司, 2104 Envision); 恒温水浴锅 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 152-1138); 生物安全柜 (美国 Nuair 公司, NU-543-600S); 高效液相色谱仪 (日本 Shimadzu 公司, LC-20A); CO<sub>2</sub> 培养箱 (德国 Eppendorf 公司, CellXpertC170i); 96 孔低容量白板 (美国 Perkin Elmer 公司, 66PL96025)。

**检测方法** 取处在对数生长期的 CHO\_INSR\_1284 细胞系, 加入 1 mL 0.25% trypsin-EDTA 置 37 °C 消化 1 min, 加入完全培养基终止消化, 1 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 5 min, 制成密度为每毫升 3.5×10<sup>5</sup> 个的细胞悬液, 接种至 96 孔板, 每孔 100 μL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 16~24 h 后取出, 弃培养基, 用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶液将 IDeg 对照品溶解, 以样品稀释液制成 57.18 μg·mL<sup>-1</sup> 的初始浓度, 进行 4 倍稀释, 共 8 个稀释度, 加至已接种细胞的 96 孔板中, 每孔 100 μL, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中刺激 45 min 后取出, 弃上清, 每孔加入 50 μL 裂解液, 室温裂解 30 min。在 96 孔低容量白板中加入抗体混合液, 每孔 4 μL, 再将裂解液转入板中, 每孔 16 μL, 室温避光孵育 4 h。设置多功能酶标仪激发波长 320 nm, 读取发射波长 620 及 665 nm 处的荧光信号值。利用 Softmax 7.1 软件进行四参数计算, 利用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图, 以 IDeg 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  $Y = (A-D)/[1+(X/C)^B] + D$ 。A 为上渐近线值, B 为曲线的斜率, C 为半数有效浓度 (50% effective concentration, EC<sub>50</sub>), D 为下渐近线值, 样品的相对生物学活性% = 标准品 EC<sub>50</sub> / 样品 EC<sub>50</sub> × 100%, 信噪比 (signal-to-noise ratio) = A/D。

**实验参数的优化** 取对数生长期的 CHO\_INSR\_1284 细胞, 用完全培养基制成密度分别为每毫升 1.5×10<sup>5</sup>、2.5×10<sup>5</sup>、3.5×10<sup>5</sup>、4.5×10<sup>5</sup> 个的细胞悬液, 接种于 96 孔板中, 每孔 100 μL, 按照上述检测方法进行检测, 确定最佳种板密度; 设定 IDeg 初始浓度为 28.59、57.18、85.77、114.36 μg·mL<sup>-1</sup>, 以样品稀释液分别进行 4 倍系列稀释后测定, 探究 IDeg 的最佳初始浓度; 将 IDeg 初始浓度配至 57.18 μg·mL<sup>-1</sup>, 分别进行 2、3、4、5、6 倍系列稀释后测定, 确定 IDeg 的最佳稀释倍数; 设置 15、25、35、45、55、65 min 等 6 个不同的刺激时间, 以及 2、3、4、5、6、7 h 等 6 个不同的孵育时间, 按上述方法进行检测, 确定药物刺激时间和孵育时间。

**方法学验证** 依据中国药典 (2020 年版, 四部通则 9401) 对本方法的专属性、相对准确度、中间精密度、线性和范围进行考察。依据中国药典 (2020 年版, 四部通则 1431) 对检测结果进行可靠性判断。

**专属性** 选取样品稀释液、IGF-1、EGF、IDeg 辅

料, 与 IDeg 对照品一同进行专属性考察, 根据各自相对分子量, 制成相同初始摩尔浓度 9.367 nmol·mL<sup>-1</sup>, 按上述方法进行检测。

**相对准确度、中间精密度、线性和范围** 将 IDeg 对照品用 0.01 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸溶解, 以样品稀释液配至初始浓度为 57.18 μg·mL<sup>-1</sup>, 作为方法验证参比品, 再分别制备参比品浓度的 50%、80%、100%、125%、200% 作为 5 个效价水平的待测样品, 做 4 倍系列稀释, 共 8 个稀释度, 每个稀释度做 2 孔, 按上述方法进行检测。每个效价水平由两名分析人员在不同日期使用 4 个细胞代次进行相对效价测定, 每个效价水平重复测定 2 次。

利用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图, 以 IDeg 浓度对数为横坐标, 以  $\Delta F$  为纵坐标绘制四参数曲线, 计算各效价水平的相对效价、几何均值及相对偏倚。相对偏倚用于评价相对准确度; 以各效价水平测定结果的对数值计算几何变异系数 (geometric coefficient of variation, GCV), 考察中间精密度; 采用卡方检验计算 GCV 的 95% 置信区间上限; 以各效价水平理论值的自然对数 (x) 对其相应的效价测定值的自然对数 (y) 作直线回归, 采用最小二乘法进行线性拟合, 考察该方法的线性及范围。

**可靠性结果检测** 中国药典 (2020 年版, 四部通则 1431 生物检定统计法) 要求, 用约束模型验证测定结果的可靠性, 要求回归项非常显著 ( $P < 0.01$ ); 偏离平行项和模型失拟项应均不显著 ( $P \geq 0.05$ )。个别情况下, 当误差项的方差非常小时, 模型失拟检验结果可能判为显著, 可以误差平均水平替代该次试验水平进行计算。遂对回归项、偏离平行项、模型失拟项、 $R^2$  进行统计。

**细胞代次耐用性研究** 同时复苏第 5、15、25、36 代细胞, 连续传代 2 次, 进行 IDeg 生物学活性测定, 验证不同细胞代次的耐用性。

**破坏性试验** 将 IDeg 对照品用 20 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸盐缓冲液 (pH 8.0) 制成 8 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品溶液, 于 60 °C 水浴锅中加热 2、8、16、36、60 h, 以未经处理的对照品溶液为参比, 进行生物学活性测定, 计算相对效价; 取上述处理后的样品进行 SEC-HPLC 分析, 方法为: 采用 SHIMADZU LC-20A 高效液相色谱仪, Waters Symmetry Shield TM RP 8 色谱柱 (4.6 mm × 150 mm, 3.5 μm), 以硫酸钠溶液 (pH 5.7)-乙腈 (9:1) 为流动相 A, 乙腈-水 (5:5) 为流动相 B, 梯度洗脱条件: 0~45 min, 52% A; 45~50 min, 52% A→20% A; 20% A, 1 min; 51~51.1 min, 20% A→52% A; 52% A, 10 min。流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温为 40 °C, 进样量为 10 μL, 进样器温度为 4 °C。测定样品的主成分含量。

**不同批次德谷胰岛素生物学活性测定** 选取3批德谷胰岛素原料药,用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解后,按上述方法进行生物学活性检测,重复3次。

**多种胰岛素的体外生物学活性检测** 将德谷、赖脯、甘精、门冬、人胰岛素原料药用 $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶解,按其相对分子质量制成相同初始浓度 $9.367 \text{ nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,做4倍系列稀释,共12个稀释度,按照检测方法进行生物学活性测定。

## 结果

### 1 方法学的优化

**1.1 种板密度** 细胞种板密度分别设定为每毫升 $1.5\times 10^5$ 、 $2.5\times 10^5$ 、 $3.5\times 10^5$ 、 $4.5\times 10^5$ 个,测定同一份样品的生物学活性,结果如图2A所示,细胞种板密度为每毫升 $3.5\times 10^5$ 个时曲线上各点分布均匀,信噪比(11.88)、拟合曲线 $R^2$ (0.998)相对较好,确定种板密度为每毫升 $3.5\times 10^5$ 个。

**1.2 初始浓度** 设定IDeg初始浓度为28.59、57.18、85.77、114.36  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,测定不同样品的生物学活性,结果如图2B所示,初始浓度为 $57.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时,曲线上各点分布均匀,EC<sub>50</sub>值较小(0.873 5),拟合曲线 $R^2$ (0.997)最好,选取 $57.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 为最佳初始浓度。

**1.3 稀释倍数** 设定稀释倍数为2、3、4、5、6倍,测定不同样品的生物学活性,结果如图2C所示,4倍稀释时曲线上各点分布均匀,拟合曲线 $R^2$ (0.994)较好,故选最佳稀释倍数为4倍。

**1.4 刺激时间** 设定刺激时间为15、25、35、45、55、65 min,测定不同样品生物学活性,结果如图2D所示,刺激时间为45 min时,EC<sub>50</sub>值(0.563 4)最小,确定刺

激时间为45 min。

**1.5 孵育时间** 设定孵育时间为2、3、4、5、6、7 h,测定不同样品的生物学活性,结果如图2E所示,孵育时间为4 h时,信噪比(11.9)、拟合曲线 $R^2$ (0.998)较好,确定4 h为最佳孵育时间。

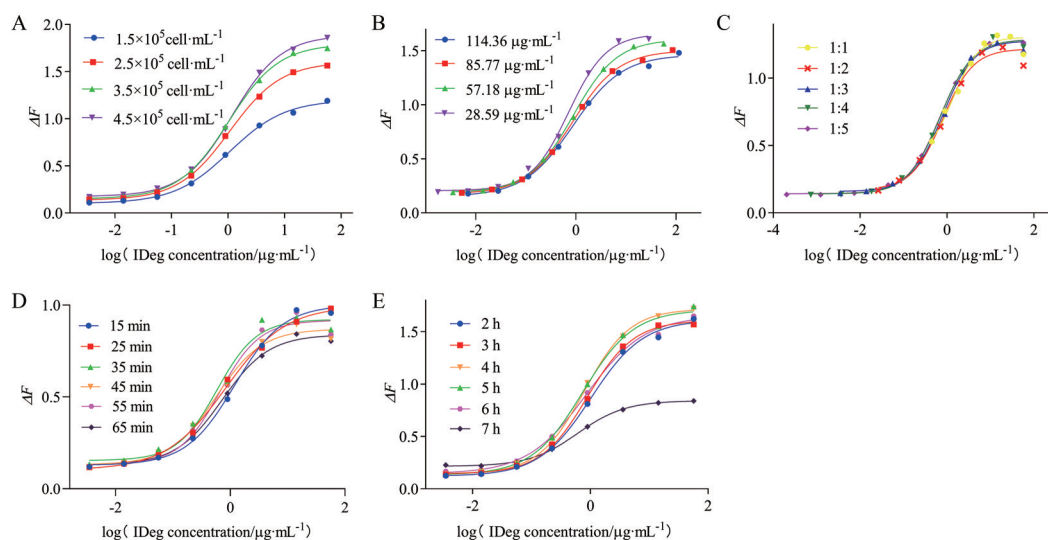
### 2 方法学验证

**2.1 专属性** 结果如图3A所示,IGF-1有响应,但未到达上平台,EGF、辅料空白、样品稀释液均无明显响应,表明本方法专属性良好。

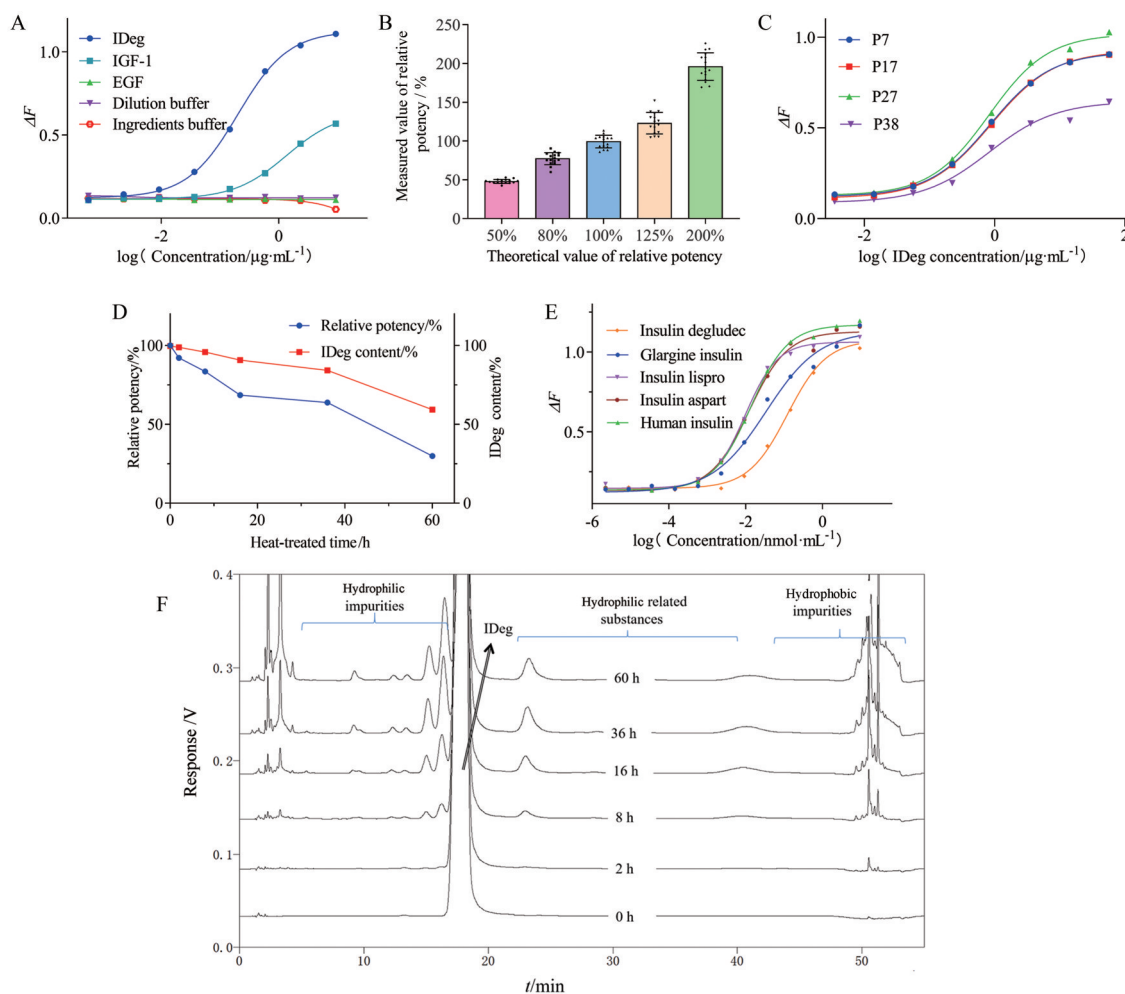
**2.2 相对准确度、中间精密性、线性和范围** 计算5种效价水平的相对效价,结果如图3B所示,5个效价水平相对效价测定值的平均相对偏倚范围在 $-4.1\%$ ~ $-0.9\%$ ,表明方法的相对准确度好;5个效价水平的GCV%均小于11%,说明该方法的中间精密性较好;以5个不同效价水平理论值的自然对数( $x$ )对其相应的效价测定值的自然对数( $y$ )作直线回归,采用最小二乘法进行线性拟合,拟合的直线回归方程为 $y = 1.015x - 0.0277$ , $R^2 = 0.9996$ ,斜率在 $0.8\sim 1.25$ 之间, $R^2$ 不低于0.98,表明该方法在 $50\%\sim 200\%$ 的效价水平内线性较好。

**2.3 可靠性结果检测** 本课题对 $R^2$ 、回归项、偏离平行项、模型失拟项进行统计,以回归与模型失拟评估模型的系统适用性,偏离平行评估样品适用性,结果均符合中国药典(2020年版)规定: $R^2 \geq 0.98$ ,回归项非常显著( $P < 0.01$ );偏离平行项和模型失拟项均不显著( $P \geq 0.05$ )。

**2.4 细胞代次耐用性研究** 不同代次细胞对同一份样品的生物学活性测定结果如图3C所示:拟合得到的



**Figure 2** Dose effect curve of method optimization. A: Different cell numbers; B: Initial concentrations; C: Dilution time; D: Stimulation time; E: Incubation time



**Figure 3** Results of methodology validation. A: Specific dose effect curve; B: Histogram and scatter data distribution of relative biological activity determination results at five titer levels; C: Dose effect curve of cell durability study; D: Broken line diagram of monomer content biological activity of sample damaged by heating; E: Biological activity of insulin analogues; F: SEC-HPLC chromatogram of heating damaged sample

四参数曲线 $EC_{50}$ 值、信噪比无明显差异,说明该细胞株耐用性良好。

**2.5 破坏性试验** 如图3F所示,采用面积归一化法计算,加热0、2、8、16、36、60 h后主成分含量为99.67%、98.87%、95.82%、90.76%、84.22%、59.33%,呈下降趋势,亲水性杂质、疏水性杂质、有关物质含量上升。主成分含量下降导致样品生物学活性发生改变,将上述破坏性样品进行生物学活性检测,结果如图3D所示,加热2、8、16、36、60 h后的IDeg的生物学活性分别为92.16%、83.54%、68.51%、63.85%、29.99%,经破坏处理的样品生物学活性与主成分含量呈正比趋势,表

明本方法具有一定的灵敏度。

**2.6 不同批次德谷胰岛素生物学活性测定** 结果如表1所示:分别测定3批IDeg的生物学活性,每批平行测定3次,所测结果的RSD ( $n=3$ ) 小于10%。

**2.7 多种胰岛素的体外生物学活性检测** 结果如图3E所示,胰岛素类似物在本方法中均存在剂量效应关系,但 $EC_{50}$ 值存在差异,从高到低依次为德谷胰岛素(0.133 5)、甘精胰岛素(0.033 6)、人胰岛素(0.013 4)、门冬胰岛素(0.012 2)、赖脯胰岛素(0.009 7)。结果表明,本方法可用于区分脂肪酸修饰型的胰岛素类似物。

**Table 1** Biological activity test results of different batches of IDeg. STD: Standard deviation; RSD: Relative standard deviation

Lot No.	Potency level	Average	STD	RSD		
013C220210903	80.80%	84.50%	92.10%	85.80%	5.76%	6.71%
013C220211004	106.50%	101.10%	101.80%	103.13%	2.94%	2.85%
013C220211005	101.60%	112.90%	116.00%	110.17%	7.59%	6.88%

## 讨论

EGF与胰岛素同属于生长因子,能够调节各种细胞的增殖和分化。二者的特异性受体不同,但都是跨膜蛋白且具有酪氨酸激酶活性<sup>[16]</sup>。胰岛素和IGF-1通过胰岛素受体和IGF-1受体(IGF-1R)介导其生物学效应。IGF-1R与IR是高度同源的酪氨酸激酶受体,都由两个胞外 $\alpha$ 亚基和两个跨膜 $\beta$ 亚基组成,通过二硫键连接。在配体与 $\alpha$ 亚基结合时,IR和IGF-1R构象发生变化,诱导 $\beta$ 亚基的激活。胰岛素和IGF-1优先与自身受体结合,但也可以低亲和力与替代受体结合。胰岛素和IGF-1在体内的差异效应主要反映了不同组织中激素浓度和受体的相对表达水平,而不是IR和IGF-1R传递不同信号的能力<sup>[17-20]</sup>。所以在专属性验证部分,IGF-1有响应但未到达上平台,其余均无响应。

目前,对于强制降解研究,ICH Q1B中对高温、高湿、酸/碱水解及氧化等条件均无明确规定。蛋白类药物受温度影响较大,蛋白构象可能会随着温度的升高而展开或者部分展开,以至于发生降解或者聚集。持续升高的温度会达到蛋白质融化温度,导致蛋白质发生不可逆的聚集,同时还会伴随其他化学反应,如氧化、脱酰胺等<sup>[21]</sup>。在本研究中,将IDeg对照品用 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 8.0)溶解后,在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下加热2、8、16、36、60 h与未加热的对照品进行比较,主成分的含量和生物学活性都随加热时间的增加而降低。提示IDeg有可能发生了降解或聚集,使得有关物质和高分子蛋白质含量显著增加。

综上所述,本研究成功建立了一种基于HTRF的可用于检测IDeg生物学活性的新方法,该方法准确度高,稳定性好,高效快速,可用于研发、过程控制、终产品放行及生物类似药研究,为IDeg体外生物学活性测定提供一种新的选择。

**作者贡献:**高婧负责实验设计、完成实验主要内容和文章撰写;王绿音负责前期实验条件摸索;李晶、吕萍负责提供技术和材料支持;高向东、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] Penchala SC, Miller MR, Pal A, et al. A biomimetic approach for enhancing the *in vivo* half-life of peptides [J]. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 793-798.
- [2] Frid AH, Hirsch LJ, Menchior AR, et al. Worldwide injection technique questionnaire study: injecting complications and the role of the professional [J]. *Mayo Clin Proc*, 2016, 91: 1224-1230.
- [3] Fosgerau K, Hoffmann T. Peptide therapeutics: current status and future directions [J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20: 122-128.
- [4] Thuillier P, Alavi Z, Kerlan V. Long-term safety and efficacy of insulin degludec in the management of type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2015, 8: 483-493.
- [5] Tambascia MA, Eliaschewitz FG. Degludec: the new ultra-long insulin analogue [J]. *Diabetol Metab Syndr*, 2015, 7: 57.
- [6] Schlessinger J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor [J]. *Cell*, 2002, 110: 669-672.
- [7] Weis F, Menting JG, Margetts MB, et al. The signalling conformation of the insulin receptor ectodomain [J]. *Nat Commun*, 2018, 9: 4420.
- [8] Einhorn L, Krapfenbauer K. HTRF: a technology tailored for biomarker determination—novel analytical detection system suitable for detection of specific autoimmune antibodies as biomarkers in nanogram level in different body fluids [J]. *EPMA J*, 2015, 6: 3223-3228.
- [9] Wang LY, Yang YF, Zhang XM, et al. Determination of biological activity of human insulin by a homogeneous time-resolved fluorescence method [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2022, 57: 3223-3228.
- [10] Yang YF, Wang LY, Liang YL, et al. Time-resolved fluorescence immunoassay for the determination of the biological activity of human insulin [J]. *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2022, 42: 51-59.
- [11] 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.
- [12] Hong L, Quinn MC, Jia Y. Evaluating the utility of the HTRF<sup>®</sup> Transcreeper<sup>™</sup> ADP assay technology: a comparison with the standard HTRF assay technology [J]. *Anal Biochem*, 2009, 391: 31-38.
- [13] Kolb AJ, Kaplita PV, Hayes DJ, et al. Tyrosine kinase assays adapted to homogeneous time-resolved fluorescence [J]. *Drug Discov Today*, 1998, 3: 333-342.
- [14] Li XG, Wang GF, Zhang JY, et al. Establishment of homogeneous time-resolved fluorescence immunoassay for high throughput screening of protein tyrosine kinase inhibitors [J]. *J Southern Med Univ (南方医科大学学报)*, 2009, 29: 1612-1614.
- [15] Wang HJ, Zhou ZH, Xu JC, et al. HTRF-based method for determination of HSP90-HOP inhibition activity and its application [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2017, 52: 592-597.
- [16] Hu HL, Hu XF, Lin JH. Relationship between PTEN mutations and protein kinase B phosphorylation caused by insulin or recombinant human epidermal growth factor stimulation [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2016, 32: 1065-1068, 1072.
- [17] Belfiore A, Frasca F, Pandini G, et al. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids

- in physiology and disease [J]. *Endocr Rev*, 2009, 30: 586-623.
- [18] Boucher J, Tseng YH, Kahn CR. Insulin and insulin-like growth factor-1 receptors act as ligand-specific amplitude modulators of a common pathway regulating gene transcription [J]. *J Biol Chem*, 2010, 285: 17235.
- [19] Kenneth S. Molecular basis of signaling specificity of insulin and IGF receptors: neglected corners and recent advances [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2012, 3: 34.
- [20] Boucher J, Kleinridders A, Kahn CR. Insulin receptor signaling in normal and insulin-resistant states [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2014, 6: a009191.
- [21] Zhang XT, Han JJ, Bai Y. Research progress on forced degradation of biopharmaceuticals [J]. *Curr Biotechnol (生物技术进展)*, 2022, 12: 236-242.