手持拉曼光谱仪在抗体类药物鉴别中的应用研究

段茂芹#，于传飞#，付志浩，梅玉婷，王兰*（中国食品药品检定研究院，国家卫生健康委员会生物技术产品检定及标准化重点实验室，国家药品监督管理局生物制品质量研究与评价重点实验室，北京 102629）

摘要　目的：基于主成分分析（PCA）算法的Trutools模式，利用手持拉曼光谱仪建立快速鉴别抗体类药物的方法。**方法：**通过选取抗PD-1抗体、抗VEGF抗体、抗Her-2抗体，采集拉曼光谱数据，建立数据模型，分别对3种抗体进行鉴别。选择其中一种抗PD-1抗体，采用加热和光照两种条件对其进行加速降解处理，利用手持拉曼光谱仪对加速降解的抗体进行检测，研究所建方法能否检出加速降解的抗体。并通过分子排阻色谱（SEC-HPLC）、离子交换色谱（IEC-HPLC）及竞争结合酶联免疫吸附测定（ELISA）法对加速降解的抗体进行检测，与拉曼光谱检测结果进行比较。**结果：**通过建立的拉曼光谱数据模型可以鉴别3种不同类型的抗体，且拉曼光谱可以鉴别加速降解后的抗PD-1抗体。**结论：**手持拉曼光谱仪可以用来快速鉴别抗体类药物。本研究首次将手持拉曼光谱仪引入到抗体药物大分子检测中，为抗体类药物的现场快速鉴别及打假工作提供了新的工具与方法。

关键词：主成分分析（PCA）算法；拉曼光谱；抗体；分子排阻色谱；离子交换色谱；竞争结合酶联免疫吸附测定法；鉴别

中图分类号：R917　**文献标识码：**A　**文章编号：**1002-7777(2023)10-1160-012
doi:10.16153/j.1002-7777.2023.10.008

Application of Handheld Raman Spectrometer in the Identification of Antibody Drugs

Duan Maoqin#, Yu Chuanfei#, Fu Zhihao, Mei Yuting, Wang Lan* (National Institutes for Food and Drug Control, NHC Key Laboratory of Research on Quality and Standardization of Biotech Products, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Biological Products, Beijing 102629, China)

Abstract　Objective: To establish a rapid identification method for antibody drugs by using handheld Raman spectrometer based on Trutools model of principal component analysis(PCA) algorithm. **Methods:** Raman spectrum data were collected with anti-PD1 antibody, anti-VEGF antibody and anti-HER2 antibody, and the model was established to identify these three antibodies. The accelerated degradation of anti-PD1 antibody was disposed of heating and light conditions, and the accelerated degradation antibody was tested by handheld Raman spectrometer. The antibody was detected by size exclusion chromatography (SEC-HPLC), ion exchange chromatography (IEC-HPLC) and competitive binding enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and the results were compared with those of Raman spectroscopy. **Results:** Three different types of antibodies can

作者简介：段茂芹 Tel：（010）53852640；E-mail：duanmaoqin@nifdc.org.cn
共同第一作者：于传飞 Tel：（010）53852176；E-mail：yuchuanfei@126.com
通信作者：王兰 Tel：（010）53852159；E-mail：iamouran@163.com

be identified by the established Raman spectroscopy data model, and the accelerated degradation of anti-PD1 antibody can be identified by Raman spectroscopy. **Conclusion:** Handheld Raman spectrometer can rapidly identify antibody drugs and be introduced into the test of antibody macromolecule drugs for the first time, providing a new tool and method for the rapid identification of antibodies and anti-counterfeiting work.

Keywords: principal component analysis(PCA); Raman spectroscopy; antibody; size exclusion chromatography; ion exchange chromatography; competitive binding ELISA; identification

抗体是由效应B细胞产生的一种具有靶向性的免疫球蛋白。自从体外杂交瘤细胞技术产生单克隆抗体以来，抗体药物在治疗恶性肿瘤、自身免疫疾病等不同疾病方面取得了突破性进展。1986年第一个单克隆抗体药物获得批准，近些年来抗体药物市场发展迅猛[1]。抗体类药物通过翻译后修饰而引起电荷变异体和糖基化含量的相关变化，是质量控制的关键组成部分[2]。放行质量检测中对抗体的关键质量属性进行检测，例如分子大小、电荷异质性、糖基化修饰、杂质、理化活性和生物学活性等。肽图、离子交换色谱（IEC-HPLC）、毛细管区带电泳（CZE）和结合活性等用于鉴别检测，通过与参比品特征峰图谱的保留时间比较进行鉴别确认[3]。肽图是一种自下向上的方法，采用色谱柱分离技术结合质谱或紫外检测器来分析经过酶消化的蛋白片段以确定肽段结构[4-6]。IEC-HPLC利用蛋白所带电荷数的差异测定抗体蛋白的电荷异质性。样品在低盐、低于等电点的pH环境下带正电荷，并吸附在色谱柱上，采用盐浓度或pH梯度进行洗脱，不同的电荷异质体与阳离子交换色谱柱的结合强度不同，按照等电点由低到高的顺序依次通过紫外检测器[7-8]。将酸性峰、主峰和碱性峰与参比品保留时间及比例进行比较，确定鉴别是否通过。CZE蛋白所带电性不同而导致迁移速度的不同进行分离，通过与参比品主峰保留时间等参数进行鉴别确认[9-10]。结合活性通过酶联免疫吸附测定（ELISA）鉴别，与参比品一致呈典型的“S”曲线[11]。

单克隆抗体作为大分子蛋白质药物，易受到与蛋白质性质相关的不稳定性因素的影响，例如蛋白质的结构、浓度、温度、光照、辅料和污染物，及搅拌速率等。单克隆抗体和其他治疗性蛋白药物都易在加工、储存和运输过程中受到温度变化的影响，高温可以在一定程度上扰乱天然蛋白质的构象以促进聚集体的产生。抗体的氨基酸结构中含有大量的芳香残基，例如色氨酸残基等对光非常敏感，主要通过光的氧化和氧化自由基的形式进而诱导蛋白质降解，同时也会使蛋白发生断裂和交联[12]。因此，抗体药物在储存运输过程中要低温避光，以免影响相关的蛋白结构与功能。

拉曼光谱技术至今已有100多年的历史，拉曼光谱的概念由印度物理学家Raman在1928年首次提出[13-14]。当光谱通过物质表面时会发生散射现象，有部分光波频率发生变化产生非弹性散射，这种非弹性散射光被称为拉曼光谱。在散射过程中入射光与物质发生了能量交换，光子的频率发生变化的差值称为拉曼位移。拉曼位移仅取决于散射分子的内部结构，因此可作为分子定性的分析依据。一些蛋白生物大分子中不同化学键及官能团的振动频率产生不同的拉曼位移，因此可用于分析不同成分和结构的待测蛋白样品。

拉曼光谱技术是一种对样品进行原位、非破坏性、无标记的检测技术，可快速、无损地对样品进行检测，得到了广泛的应用和研究[15-16]。因此，近十年来，拉曼光谱在药物分析领域的研究同时得到了大力发展，包括药物活性成分的鉴定、药物制剂的定性和定量研究、非法药物和化学药物的检测、中草药的鉴定以及与其他技术相结合等[17-19]。

拉曼光谱已被提出作为一种方法学，用于药物原材料及多肽类药物鉴别测试[20]。由于拉曼光谱依赖于分子的内部结构，检测时仅需要少量的样品而且不需要复杂的前处理，且能够在几秒钟到几分钟内获得产品的光谱，通过拉曼光谱对产品进行首轮的筛选鉴别，可以节省分析时间。因此拉曼光谱在药物的快速检测领域被广泛应用[21-22]。

由于抗体药物分子量大，结构复杂，手持拉曼光谱仪在抗体药物鉴别应用中尚处于空白阶段。主成分分析（PCA）是一种鉴别方法，用于测试样品是否与所选方法模型一致。Trutools PCA 方法将产生通过或失败结果。仪器鉴别过程中，各类样品均需要一个独立的PCA模型。因此，本研究将基于

主成分分析算法的Trutools模式的手持拉曼光谱仪引入到检测抗体药物大分子中，并对相关抗体药物可以鉴别到何种程度进行初步探索。

本研究选取不同类型的抗体药物，采集拉曼光谱，建立相关的模型，将不同类型的抗体进行了鉴别。选取影响蛋白不稳定因素中加热和光照两种条件对抗PD-1单抗进行加速降解处理，采用拉曼光谱技术对其进行鉴定，并通过分子排阻色谱（SEC-HPLC）、IEC-HPLC及生物学活性关键指标进行了验证，与拉曼光谱检测结果进行比较。证明拉曼光谱可以鉴别加速降解后的抗PD-1单抗。本研究所采用的易于携带的手持拉曼光谱机机身轻便，重量约为1千克左右，方便用于现场快速打假的相关工作。手持拉曼光谱仪可以用来快速鉴别抗体类药物。本研究首次将手持拉曼光谱仪引入到抗体药物大分子检测中，为抗体类药物的现场快速鉴别及打假工作提供了新的工具与方法。

1 材料

1.1 药品及试剂

G3000SWXL（7.8 mm×30 cm）购自TSK公司。磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、氯化钠、盐酸、氢氧化钠，均购自中国医药集团有限公司。牛血清白蛋白（BSA）、吐温20、乙二胺四乙酸二钠盐二水合物（$Na_2EDTA\cdot 2H_2O$）、酪蛋白、MES水合物（$C_6H_{13}NO_4S\cdot xH_2O$）、MES钠盐（$C_6H_{12}NNaO_4S$），均购自Sigma公司。Super Signal PICO化学发光底物、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素（SA-HRP）、Dionex ProPac WCX-10（4 mm×250 mm），均购自Thermo Scientific公司。色谱级乙腈购自美国Fisher Scientific公司。单抗上市药品抗PD-1抗体、抗VEGF抗体、抗Her-2抗体均为市售品。生物素化抗人B7-H1/PD-L1抗体（抗PD-L1）、B7-H1/PD-L1 Fc重组嵌合体（PD-L1）由本实验室保存。稀释板（聚苯乙烯材料制成，表面经处理使其对蛋白无亲和力）、测定板（聚苯乙烯材料制成，表面经处理使其对蛋白高亲和力），均购自于美国Corning公司。PBS溶液由磷酸二氢钠（NaH_2PO_4）0.372 g、磷酸氢二钠（Na_2HPO_4）2.414 g、氯化钠（NaCl）8.0 g，加水至1000 mL制成。检测稀释剂为1% BSA的PBS溶液。洗涤缓冲液为0.05%吐温20的PBS溶液。酪蛋白封闭缓冲液为浓度为10%酪蛋白的PBS溶液。包被工作溶液为用检测稀释剂稀释到浓度80 ng·mL^{-1}的rhPD-1/Fc嵌合体。PD-L1工作储备溶液浓度用检测稀释剂稀释到600 ng·mL^{-1}。生物素化抗PD-L1工作溶液用检测稀释剂稀释到100 ng·mL^{-1}。辣根过氧化物酶标记链霉亲和素（SA-HRP）工作溶液用检测稀释剂稀释到0.05 μg·mL^{-1}。底物溶液为Super Signal PICO化学发光底物。

1.2 拉曼光谱采集分析仪器与系统

使用装载Trutools™化学计量学软件包的TruScan™RM（TSRM）手持拉曼分析仪（由Thermo Fisher公司提供）。

利用Solo软件建立基于主成分分析（PCA）的拉曼光谱模型。用于建立模型的光谱数据是通过3次重复扫描进行收集的。在建立模型之前，通过排除检测器大于1700 cm^{-1}处的噪音来收紧光谱范围，应用Savitzky-Golay进行二阶导数。从Solo软件中导出PCA模型及光谱采集参数于TruScan™ RM拉曼分析仪上。基于2个统计量的阈值即霍特林统计量（T2）和Q残差（Qr），将2个统计量的置信区间设置为95%作为可接受标准。

1.3 SEC-HPLC色谱分析仪器与系统

使用配有紫外检测器和数据采集系统的高效液相系统，购自于Waters公司。

1.4 IEC-HPLC色谱分析仪器与系统

使用配有紫外检测器和数据采集系统的高效液相系统，购自于Waters公司。

1.5 生物学活性分析仪器与系统

酶标仪购自于MD公司，数据分析采用GraphPad Prism 7.0分析软件，拟合四参数方程为$Y=(a-d)/[1+(X/c)^b]+d$，其中系数a是在上渐近线处的最大响应（来自Y轴的值），系数d是在下渐近线处的最小响应（来自Y轴的值），系数b是在下渐近线和上渐近线之间浓度响应曲线的斜率，系数c是产生50%的响应对应的浓度，即EC_{50}（50% Effective Concentration），Y值是吸光度信号值，X值是样品浓度值。信噪比（S/N）为最高点与最低点的比值（a/d），样品相对效价=（参比品的EC_{50}/样品的EC_{50}）×100%。

2 方法与结果

2.1 样品的准备

上市药品抗PD-1抗体、抗VEGF抗体、抗Her-2抗体，各3个批次。

采用同一批次的抗PD-1抗体进行加速降解，在60 ℃金属浴处理12、24、48、96 h和光照条件（直接暴露在阳光下）处理12、24、48、96 h，作为试验研究的8个样品。未处理的样品为试验的阳性对照。

2.2 分析方法

2.2.1 拉曼光谱采集条件与分析方法

对不同类型样品及加速降解的抗PD-1抗体进行光谱采集。拉曼光谱的激发波长为785 nm，光谱分辨率均在8~10.5 cm^{-1}，拉曼位移在250~2875 cm^{-1}。样品溶液放置在检测架上避免其他光的干扰。光谱采集参数：250 mW，5000 ms，3 coadds。

2.2.2 SEC-HPLC色谱分析方法

对抗PD-1抗体及加速降解的抗PD-1抗体进行分子大小变异体的分析。流动相为20 mmol·L^{-1}磷酸盐和200 mmol·L^{-1}NaCl，pH 7.0。紫外检测波长为280 nm，进样体积为50 μL，柱温箱温度为25 ℃，样品盘温度为8 ℃，流速为0.5 mL·min^{-1}，洗脱时间为30 min，洗脱方式为等度洗脱。样品处理：用水稀释样品溶液至浓度为2.0 mg·mL^{-1}，混合均匀。样品处理完后立即上机检测。

2.2.3 IEC-HPLC色谱分析方法

对抗PD-1抗体及加速降解的抗PD-1抗体进行酸碱电荷异构体的分析。流动相A为含有4%乙腈的24 mmol·L^{-1} MES，调节pH为6。流动相B为含有4%乙腈的20 mmol·L^{-1}磷酸盐和95 mmol·L^{-1} NaCl，调节pH为8。紫外检测波长为280 nm，进样体积为10 μL，柱温箱温度为35 ℃，样品盘温度为4 ℃，流速为0.5 mL·min^{-1}和1.0 mL·min^{-1}，洗脱时间为45 min，洗脱方式为梯度洗脱（初始流速为0.5 mL· min^{-1}，0~0.6 min，22%B；0.6~15 min，22%B→29%B；15~30 min，29%B→70%B；30~34.5 min，100%B；34.5 min流速调为1.0 mL·min^{-1}，34.5~44.5 min，22%B；44.5 min流速调回0.5 mL·min^{-1}，44.5~45 min，22%B）。样品处理：用水稀释样品溶液至浓度为8.0 mg· mL^{-1}，混合均匀。样品处理完后立即上机检测。

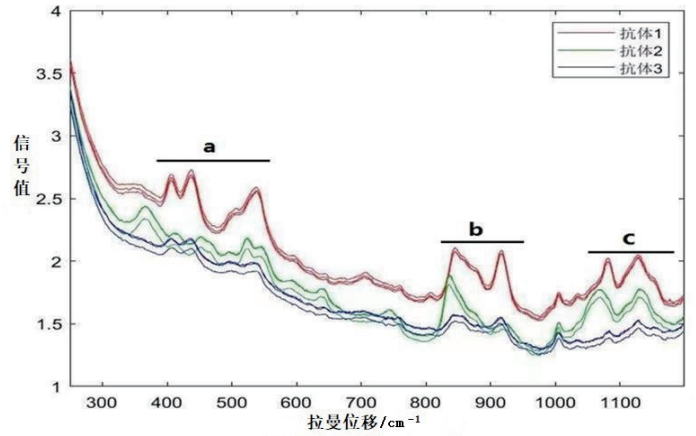
2.2.4 生物学活性分析方法

采用ELISA方法对抗PD-1抗体及加速降解的抗PD-1抗体进行效价测定。向测定板的每个孔中加入100 μL包被工作溶液，密封测定板放置在4 ℃下避光孵育21~72 h，孵育期间不搅拌。从孵育器中取出测定板，并在室温下平衡测定板15~60 min。用洗涤缓冲液洗涤测定板2次，然后翻转180°，再用洗涤缓冲液洗涤2次。使用之前，在室温下平衡20 min，每孔加入200 μL的酪蛋白封闭缓冲液封闭至少30 min。将100 μL工作样品溶液预稀释到4.5 μg·mL^{-1}，添加200 μL工作样品溶液到稀释板的首孔中，除首孔外每孔加入100 μL检测稀释剂，2倍稀释至4.395 ng·mL^{-1}，共计11个梯度，从第11列弃去100 μL溶液。稀释浓度分别为4.5 μg·mL^{-1}、2.25 μg·mL^{-1}、1.125 μg·mL^{-1}、0.562 μg·mL^{-1}、0.281 μg·mL^{-1}、0.141 μg·mL^{-1}、0.070 μg·mL^{-1}、35.16 ng·mL^{-1}、17.58 ng·mL^{-1}、8.79 ng·mL^{-1}、4.395 ng·mL^{-1}。加入100 μL的PD-L1配体工作液进行充分混合。用洗涤缓冲液洗涤测定板2次，然后翻转，再用洗涤缓冲液洗涤2次。将稀释板中的100 μL工作样品与配体混合溶液加入到相应的测定板中，密封各测定板并在37 ℃下孵育50~70 min，在孵育期间搅拌。用洗涤缓冲液洗涤测定板2次，然后翻转，再用洗涤缓冲液洗涤2次。吸干测定板。向测定板的每个孔中加入100 μL生物素化的抗PD-L1工作溶液。密封各测定板并在37 ℃下孵育50~70 min，在孵育期间搅拌。用洗涤缓冲液洗涤测定板2次，然后翻转，再用洗涤缓冲液洗涤2次。吸干测定板。向测定板的每个孔中加入100 μL辣根过氧化物酶标记链霉亲和素工作溶液。密封各测定板并在37 ℃下孵育50~70 min，在孵育期间搅拌。用洗涤缓冲液洗涤测定板2次，然后翻转，再用洗涤缓冲液洗涤2次。吸干测定板。向测定板的每个孔中加入100 μL Super Signal PICO底物溶液。在室温或25 ℃下避光孵育测定板20 min，孵育期间不搅拌。设定波长为425 nm，进行读数。

2.3 结果

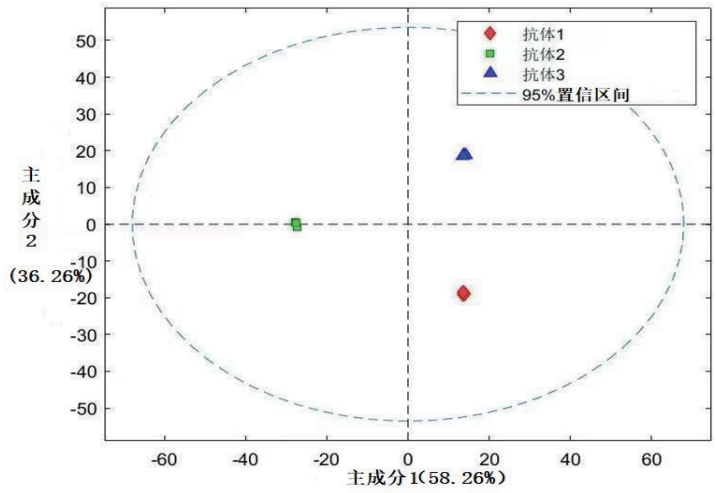
2.3.1 不同类型抗体拉曼光谱模型的建立

采集不同类型抗体的拉曼光谱图谱，图谱显示不同类型的抗体呈现不同的拉曼光谱，见图1，尤其是a、b和c部分，呈现肉眼可见的不同。采用主成分分析对数据进行处理，PCA非常明显地把不同类型的抗体区分开，见图2，通过建立的数据库模型建立了抗体快速鉴别的方法。



抗体 1. 抗 VEGF 抗体；抗体 2. 抗 PD–1 抗体；抗体 3. 抗 Her–2 抗体。

图 1　不同类型抗体的拉曼采集光谱



抗体 1. 抗 VEGF 抗体；抗体 2. 抗 PD–1 抗体；抗体 3. 抗 Her–2 抗体。

横坐标为样本在数据变异性最大部分第 1 主成分上的得分，纵坐标为样本在数据变异性次大部分第 2 主成分上的得分。

图 2　基于拉曼光谱建立的主成分分析模型

2.3.2　光照条件处理的抗PD–1抗体的拉曼光谱鉴别模型

采集相关图谱，见图3，采用主成分分析对数据进行处理，检测阈值设为1.0，利用主成分分析算法进行数据分析，残差大于1.0显示不匹配，残差小于等于1.0显示匹配。光照处理12、24、48、96 h后，拉曼光谱未发生变化，主成分分析算法进行数据分析，残差小于等于1.0，见图4，使用建立的数据模型进行回测均显示通过。

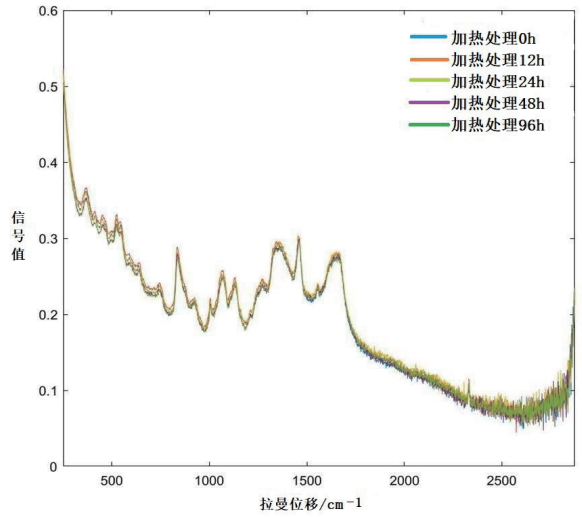


图 3 不同光照时间处理的抗 PD-1 抗体的拉曼光谱

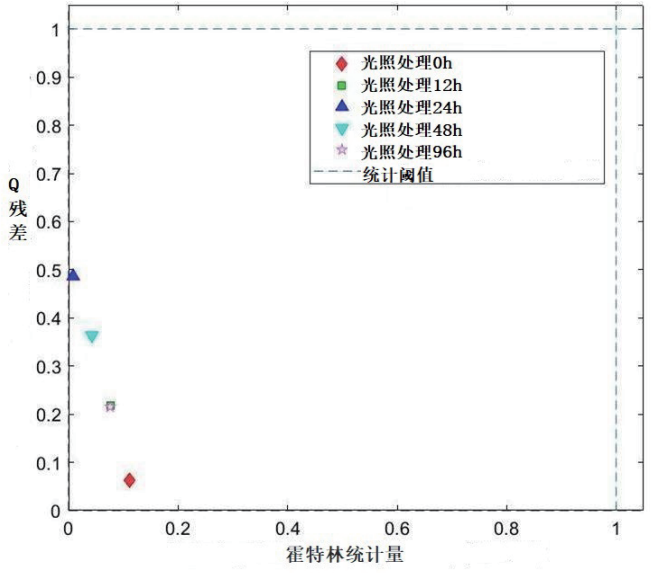


图 4 不同光照时间处理的抗 PD-1 抗体主成分分析模型

2.3.3 加热条件处理的抗PD–1抗体的拉曼光谱鉴别模型

加热不同时间后，采集样品相关光谱数据，见图5，结果表明加热12、24、48 h后，光谱数据未发生明显变化。使用建立的数据模型进行回测，均显示通过，表明样品无显著变化，主成分分析算法进行数据分析，残差小于等于1.0。而加热96 h样品则呈现明显不同的光谱，主成分分析算法进行数据分析，残差大于1.0，见图6。

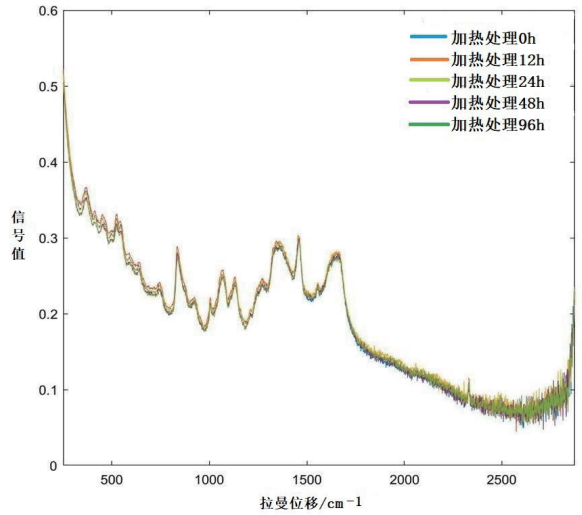


图 5　不同加热时间处理的抗 PD-1 抗体的拉曼光谱

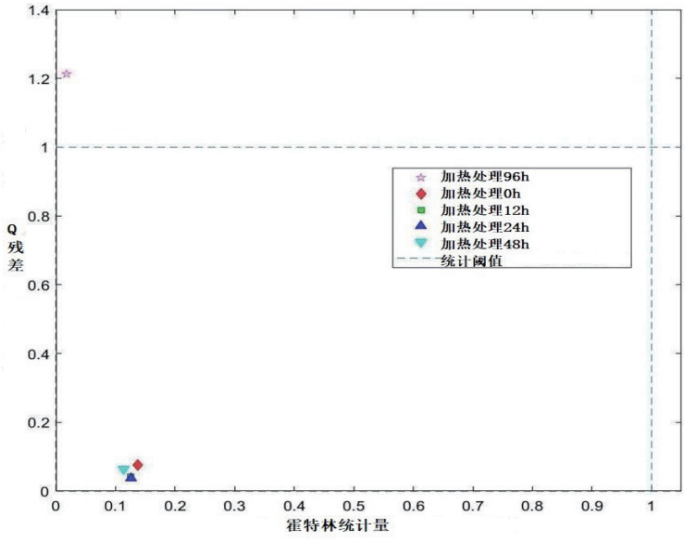


图 6　不同加热时间处理的抗 PD-1 抗体主成分分析模型

2.3.4　分子大小变异体检测结果

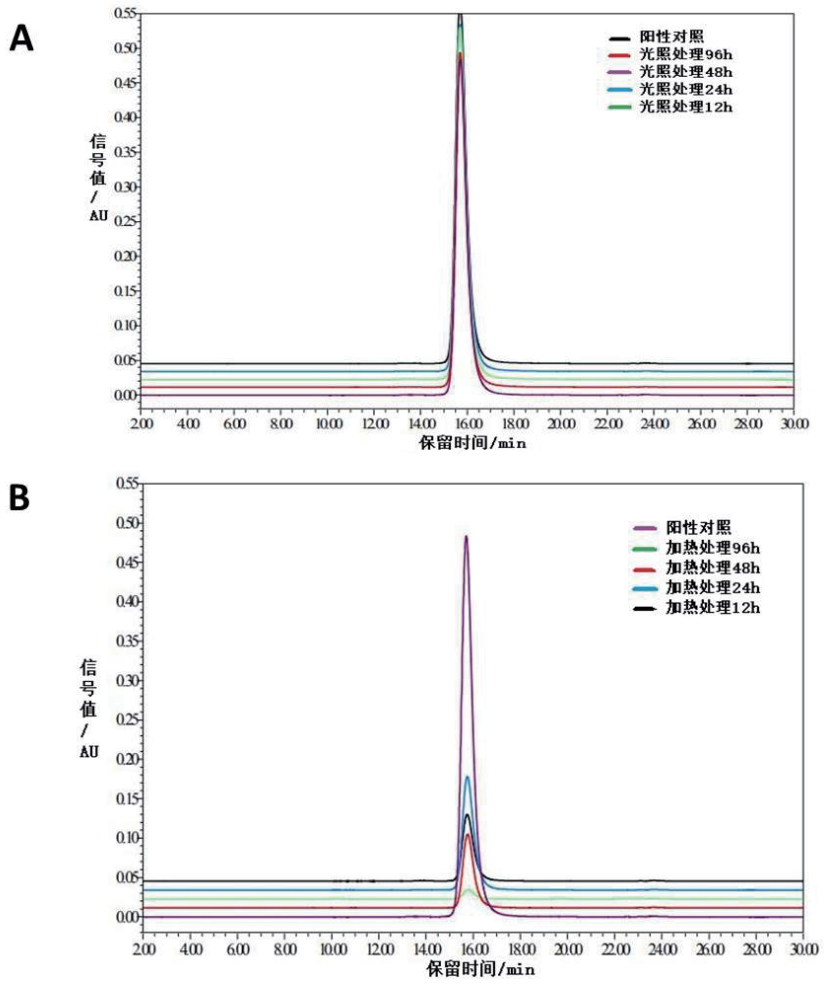
采用分子排阻色谱对抗PD–1抗体及加速降解的抗PD–1抗体进行聚体、单体和片段的含量测定。测定结果如表1所示，色谱图见图7。不同光照时间对样品未产生明显变化。随着加热时间的变化，聚体峰和片段峰含量增加，主峰含量降低。加热处理96 h后，片段峰含量达到10.88%。

2.3.5　电荷变异体检测结果

采用离子交换色谱对抗PD–1抗体及加速降解的抗PD–1抗体进行酸碱电荷异构体的含量测定。测定结果如表2所示，色谱图见图8。随着加热时间的变化，酸碱峰含量增加和主峰含量减少。加热96 h后几乎无响应值。

表 1 分子大小变异体检测结果（3 次测定结果平均值）

样品	含量 /%		
	聚体	主峰	片段
未处理样品	0.12	99.49	0.39
光照处理 12 h	0.17	99.41	0.42
光照处理 24 h	0.18	99.41	0.41
光照处理 48 h	0.18	99.58	0.24
光照处理 96 h	0.21	99.33	0.46
加热处理 12 h	1.01	97.74	1.25
加热处理 24 h	0.49	98.37	1.14
加热处理 48 h	0.25	98.21	1.54
加热处理 96 h	0	89.12	10.88

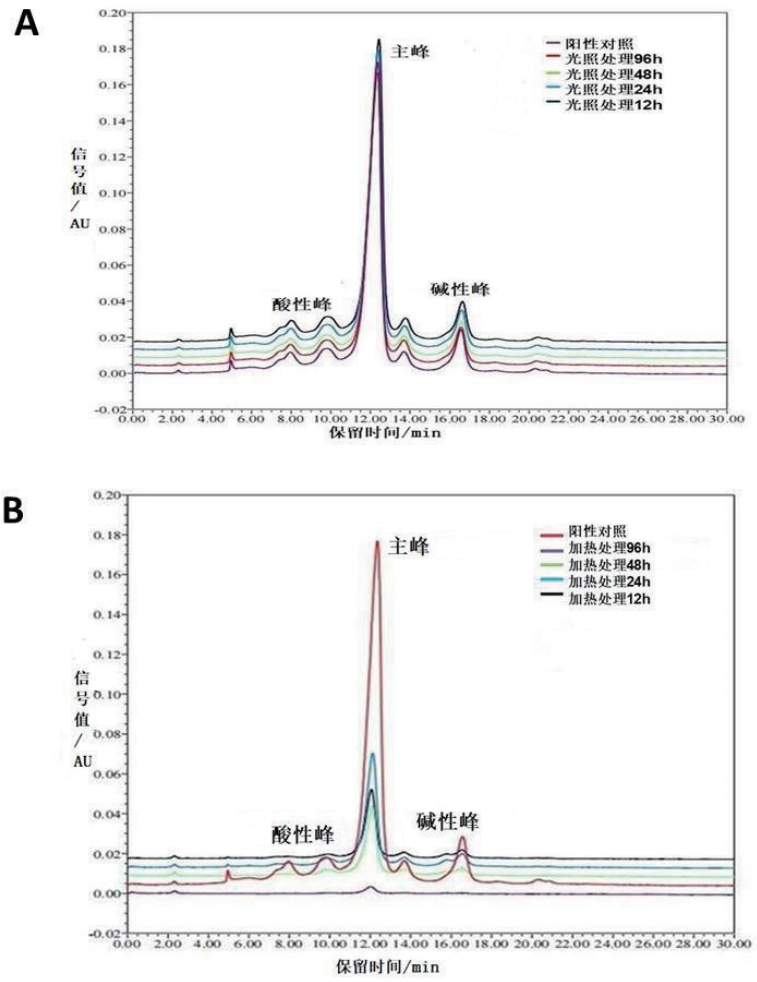


A. 不同光照时间处理的抗 PD–1 抗体的分子大小变异体检测结果；
B. 不同加热时间处理的抗 PD–1 抗体的分子大小变异体检测结果。

图 7 SEC-HPLC 检测结果

表 2 电荷变异体检测结果（3 次测定结果平均值）

样品	含量 /%		
	酸性峰	主峰	碱性峰
未处理样品	17.09	66.16	16.75
光照处理 12 h	17.93	65.84	16.23
光照处理 24 h	17.96	65.63	16.41
光照处理 48 h	18.05	65.40	16.55
光照处理 96 h	18.23	64.67	17.10
加热处理 12 h	12.61	64.02	23.37
加热处理 24 h	13.97	64.29	21.74
加热处理 48 h	14.24	62.00	23.76
加热处理 96 h	0	0	0



A. 不同光照时间处理的抗 PD–1 抗体的电荷变异体检测结果；

B. 不同加热时间处理的抗 PD–1 抗体的电荷变异体检测结果。

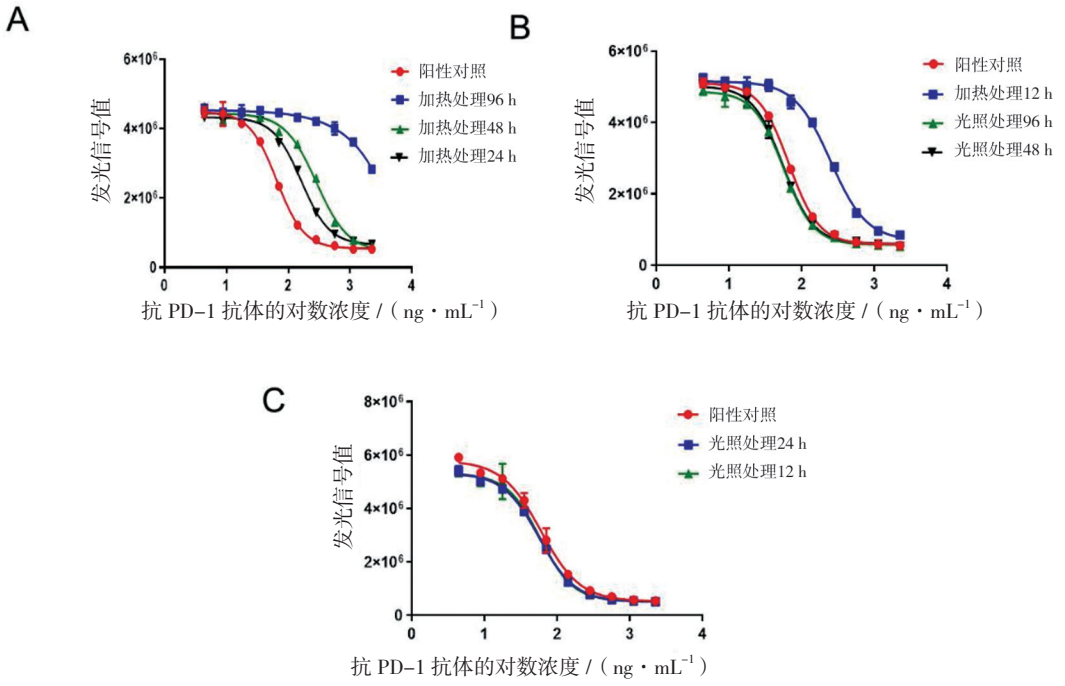
图 8 IEC-HPLC 检测结果

2.3.6 生物学活性检测结果

采用竞争结合Elisa方法对抗PD-1抗体及加速降解的抗PD-1抗体进行生物学效价测定。测定结果如表3所示，测定曲线见图9。加热12、24、48 h后，生物学活性变低；加热96 h蛋白无活性。

表 3 生物学效价测定结果（3 次测定结果平均值）

样品	生物学活性 /%
未处理样品	100
光照处理 12 h	103
光照处理 24 h	106
光照处理 48 h	120
光照处理 96 h	118
加热处理 12 h	27
加热处理 24 h	40
加热处理 48 h	23
加热处理 96 h	0



A. 加热处理的抗 PD-1 抗体 24、48、96 h 的结合活性测定结果；
B. 加热处理的抗 PD-1 抗体 12 h 和光照处理的抗 PD-1 抗体 48、96 h 的结合活性测定结果；
C. 光照处理的抗 PD-1 抗体 12、24 h 的结合活性测定结果。

图 9 竞争结合 ELISA 测定结果

3 结论

3.1 手持拉曼光谱仪在抗体类药物鉴别研究中的相关进展

本研究对拉曼光谱鉴别抗体类药物进行了初步研究，选取抗PD-1抗体、抗VEGF抗体和抗Her-2抗体建立3个抗体拉曼光谱模型，显示拉曼光谱可以鉴别上述3种抗体。并对其中抗PD-1抗体进行加速降解，研究拉曼光谱对抗体药物的鉴别程度。对加速降解处理的抗体进行分子大小变异体、电荷变异体和生物学活性的相关研究，结果加热96 h的样品分子大小变异体、电荷变异体、生物学活性和拉曼鉴别模型都显示出明显的变化。上述研究表明拉曼光谱可以对不符合质量标准的抗体药物进行鉴别。然而，目前的拉曼光谱模型鉴别抗体药物还存在一定的局限性，加热12、24、48 h的抗PD-1抗体生物学活性有变化，而拉曼光谱并没有检出明显的变化，拉曼光谱灵敏度及数据模型的建立还有待提高。国内市场已上市多种抗PD-1的生物类似药，如斯鲁利、特瑞普利、信迪利、替雷利珠等等，由于企业之间生产工艺的差异导致翻译后修饰的不同以及处方缓冲液的不同，对采集的拉曼光谱的背景有些干扰，因此目前原研药抗PD-1抗体模型仅用于检测各个批次的原研药。笔者也在开展建立相关生物类似药的数据库模型用于快速鉴别。

抗VEGF抗体和抗Her-2抗体同时采用加速降解处理条件进行相关的处理，因为抗体之间氨基酸及结构有所差异，所以由温度和光照所引起的变化不同。当抗体在分子大小变异体、电荷变异体和生物学活性上出现明显变化时，手持拉曼光谱仪均能够鉴别产生明显变化的抗体。

3.2 手持拉曼光谱仪在抗体类药物鉴别中的优势与局限性

本研究采用原位、非破坏性、无标记的拉曼光谱检测技术实现了快速、无损地对抗体药物的鉴别，并对抗体的鉴别程度进行了初步研究。在不需要样品前处理、相关实验室和其他仪器的情况下，通过可携带的手持拉曼光谱仪就能够在几秒钟到几分钟内获得产品的光谱，并与模型中的拉曼光谱进行对比，鉴别是否为此类抗体。

由于手持拉曼光谱仪本身灵敏度低于液相、毛细管区带电泳等，因此在建立数据库时应对抗体的拉曼光谱进行采集分析，研究是否适合建立相关的数据模型。例如有些抗体浓度较低，无法采集到特征性光谱，因此无法建立相关的拉曼光谱数据模型。

3.3 手持拉曼光谱仪在抗体类药物鉴别中的研究意义

目前抗体药物主要集中于治疗肿瘤及免疫病等相关领域，靶向性强，治疗效果好。由于单抗制品市场份额较大、售价较高，近年来假冒伪造的抗体在市面上不断涌现，例如假冒曲妥珠、利妥昔等严重事件[23]。因此亟需对抗体类药物快速鉴别开发新的工具与方法。

拉曼光谱在化药和中药方面已经得到非常广泛的应用。例如药物活性成分的鉴定、药物制剂的定性和定量研究、非法药物和化学药物的检测、中草药的鉴定等等，但是在生物大分子抗体类药物方面还处于空白阶段。本研究将基于PCA的Trutools模式拉曼光谱法引入到生物大分子检测中，用于抗体类药物的质量控制，为抗体类药物鉴别提供了新的工具和方法。

参考文献：

[1] Mullard A. FDA Approves 100th Monoclonal Antibody Product[J]. Nat Rev Drug Discov，2021，20（7）：491-495.

[2] Rogers RS, Nightlinger NS, Livingston B, et al. Development of a Quantitative Mass Spectrometry Multi-attribute Method for Characterization, Quality Control Testing and Disposition of Biologics[J]. MAbs，2015，7（5）：881-890.

[3] Cao L, Fabry D, Lan K. Rapid and Comprehensive Monoclonal Antibody Characterization Using Microfluidic CE-MS[J]. J Pharm Biomed Anal，2021，204：114251.

[4] Badgett MJ, Boyes B, Orlando R. The Separation and Quantitation of Peptides with and without Oxidation of Methionine and Deamidation of Asparagine Using Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography with Mass Spectrometry（HILIC-MS）[J]. J Am Soc Mass Spectrom，2017，28（5）：818-826.

[5] Bern M, Kil YJ, Becker C. Byonic: Advanced Peptide and Protein Identification Software[J]. Curr Protoc Bioinformatics，2012，doi：10.1002/0471250953.bi1320s40.

[6] Lokhov PG, Tikhonova OV, Moshkovskii SA, et al. Database Search Post-processing by Neural Network: Advanced Facilities for Identification of Components in Protein Mixtures using Mass Spectrometric Peptide Mapping[J]. Proteomics, 2004, 4(3): 633-642.

[7] Fekete S, Beck A, Fekete J, et al. Method Development for the Separation of Monoclonal Antibody Charge Variants in Cation Exchange Chromatography, Part I: Salt Gradient Approach[J]. J Pharm Biomed Anal, 2015, 102: 33-44.

[8] He Y, Isele C, Hou W, et al. Rapid Analysis of Charge Variants of Monoclonal Antibodies with Capillary Zone Electrophoresis in Dynamically Coated Fused-silica Capillary[J]. J Sep Sci, 2011, 34(5): 548-555.

[9] Valentine H, Dawnay A. The Effect of Paraprotein Polymerisation on Quantitation by Capillary Zone Electrophoresis and Hevylite®[J]. Ann Clin Biochem, 2021, 58(6): 586-592.

[10] Li M, Zhao X, Shen D, et al. Identification of a Monoclonal Antibody Clipping Variant by Cross-Validation using Capillary Electrophoresis-Sodium Dodecyl Sulfate, Capillary Zone Electrophoresis-mass Spectrometry and Capillary Isoelectric Focusing-mass Spectrometry[J]. J Chromatogr A, 2022, 1684: 463560.

[11] Chen X, Xue L, Ding X, et al. An Fc-competent Anti-human TIGIT Blocking Antibody Ociperlimab (BGB-A1217) Elicits Strong Immune Responses and Potent Anti-tumor Efficacy in Pre-clinical Models[J]. Front Immunol, 2022, 13: 828319.

[12] Le Basle Y, Chennell P, Tokhadze N, et al. Physicochemical Stability of Monoclonal Antibodies: A Review[J]. J Pharm Sci, 2020, 109(1): 169-190.

[13] Kudelski A. Analytical Applications of Raman Spectroscopy[J]. Talanta, 2008, 76(1): 1-8.

[14] Rantanen J. Process Analytical Applications of Raman Spectroscopy[J]. J Pharm Pharmacol, 2007, 59(2): 171-177.

[15] Lunter D, Klang V, Kocsis D, et al. Novel Aspects of Raman Spectroscopy in Skin Research[J]. Exp Dermatol, 2022, 31(9): 1311-1329.

[16] Cailletaud J, De Bleye C, Dumont E, et al. Critical Review of Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Applications in the Pharmaceutical Field[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 147: 458-472.

[17] Wang WT, Zhang H, Yuan Y, et al. Research Progress of Raman Spectroscopy in Drug Analysis[J]. AAPS PharmSciTech, 2018, 19(7): 2921-2928.

[18] Zhang S, Chen H, Li R, et al. Raman Spectroscopy and Mapping Technique for the Identification of Expired Drugs[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020, 224: 117407.

[19] Chen DD, Xie XF, Ao H, et al. Raman Spectroscopy in Quality Control of Chinese Herbal Medicine[J]. J Chin Med Assoc, 2017, 80(5): 288-296.

[20] McAvan BS, Bowsher LA, Powell T, et al. Raman Spectroscopy to Monitor Post-translational Modifications and Degradation in Monoclonal Antibody Therapeutics[J]. Anal Chem, 2020, 92(15): 10381-10389.

[21] Zhang C, Springall JS, Wang X, et al. Rapid, Quantitative Determination of Aggregation and Particle Formation for Antibody Drug Conjugate Therapeutics with Label-free Raman Spectroscopy[J]. Anal Chim Acta, 2019, 1081: 138-145.

[22] Makki AA, Massot V, Byrne HJ, et al. Understanding the Discrimination and Quantification of Monoclonal Antibodies Preparations using Raman Spectroscopy[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021, 194: 113734.

[23] 卢林峰，苏天福，乌兰察夫. 整治假冒抗癌药品乱象——厦门市稽查“3·17刘某江等人制售假药、非法经营药品案”启示[J]. 中国食品药品监管，2016(2)：28-32.

（收稿日期 2023年3月17日 编辑 王雅雯）