

引用:任雨乐,郭清城,潘志远,等. 不同 DAR 值肿瘤微环境响应型抗 PD-L1 抗体偶联药物的制备及初步稳定性研究[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2025, 38(6): 945-955.

Citation:REN Yule, GUO Qingcheng, PAN Zhiyuan, ZHU Weifan, ZHUANG Huangzhen,GAO Tianyu, CHEN Yi, GUO Menghui, LIU Tao, WANG Chenguang, JI Lusha, QIAN Weizhu, HOU Sheng, LI Jun, SUN Ziqiao, WANG Xuekun, XIE Lei, XU Jin, ZHANG Dapeng, GUO Huaizu. Preparation and preliminary stability study of tumor microenvironment-responsive PD-L1 antibody-drug conjugates with different drug-antibody ratios[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition),2025,38(6):945-955.

文章编号 1672-6634(2025)06-0945-11

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025020010

不同 DAR 值肿瘤微环境响应型抗 PD-L1 抗体偶联药物的制备及初步稳定性研究

任雨乐^{1,2},郭清城^{1,2,3,4},潘志远^{1,2},朱漳帆^{1,2},庄煌圳^{1,2},高天宇^{1,2},陈一^{1,2},
郭梦慧^{1,2},刘涛^{1,2,3,5},王晨光^{1,2,3,4},冀芦沙^{1,2,3},钱卫珠^{1,2,3},侯盛^{1,2,3},李军^{1,2,3},
孙梓乔^{1,2,3},王学堃^{1,2,3,6},谢磊^{1,2,3},徐进^{1,2,3},张大鹏^{1,2,3},郭怀祖^{1,2,3,6}

(1. 聊城大学 药学与食品工程学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,山东 聊城 252059; 2. 国家药品监督管理局治疗类单抗质量控制重点实验室,上海 201203; 3. 温州医科大学 药学院 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,浙江温州 325035; 4. 泰州迈博太科药业有限公司,江苏 泰州 225316; 5. 复旦大学华山医院 肿瘤科,上海 200040; 6. 张江生物技术有限公司 大分子药物与规模化制备全国重点实验室,上海 201203)

摘要 PD-1/PD-L1 免疫疗法的快速发展为肿瘤治疗开辟了新的方向,但如何进一步提升其抗肿瘤效能仍面临诸多挑战。抗体药物偶联物(ADC)能够显著拓宽化疗药物的治疗窗口,协同激活免疫,但不同的药物抗体偶联比(DAR)可能对其活性和稳定性等关键属性产生影响。目前,关于不同 DAR 值的新一代靶向 PD-L1 ADC 的研究尚较为匮乏。本研究首次采用不同类型的抗 PD-L1 抗体,制备了不同 DAR 值的肿瘤微环境响应型 PD-L1 ADC,并进行了初步表征、活性评估及初步稳定性分析。研究结果表明,抗体类型和 DAR 值显著影响 PD-L1 ADC 的活性和稳定性。新一代 PD-L1 ADC 的开发,需要综合考虑效能和成药性等多种因素。本研究为新一代 PD-L1 ADC 的设计、开发及机制研究提供了基础数据和理论支持。

关键词 PD-1/PD-L1 免疫疗法;抗体药物偶联物;药物抗体偶联比;肿瘤微环境响应;稳定性;活性评估

中图分类号 R943

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



Preparation and preliminary stability study of tumor microenvironment-responsive PD-L1 antibody-drug conjugates with different drug-antibody ratios

收稿日期:2025-02-23

基金项目:国家重点研发计划(2021YFC2501700);国家自然科学基金项目(22304067);上海东方英才项目(CYQN2023031);光岳青年学者创新团队项目(LCUGYTD 2022-04)资助

通信作者:郭怀祖,男,汉族,博士,教授,博士生导师,上海产业菁英高层次人才,研究方向:抗体药物与靶向治疗,E-mail:guo-huaizu@163.com;张大鹏,男,汉族,博士,教授,研究方向:抗体药物与靶向治疗,E-mail:bigbirdzcn@163.com;徐进,男,汉族,博士,副教授,研究方向:抗体药物分析,E-mail:xujinn_1985@163.com;谢磊,男,汉族,博士,研究方向:金属催化有机合成,E-mail:xielei@lcu.edu.cn.

REN Yule^{1,2}, GUO Qingcheng^{1,2,3,4}, PAN Zhiyuan^{1,2}, ZHU Weifan^{1,2},
ZHUANG Huangzhen^{1,2}, GAO Tianyu^{1,2}, CHEN Yi^{1,2}, GUO Menghui^{1,2},
LIU Tao^{1,2,3,5}, WANG Chenguang^{1,2,3,4}, JI Lusha^{1,2,3}, QIAN Weizhu^{1,2,3},
HOU Sheng^{1,2,3}, LI Jun^{1,2,3}, SUN Ziqiao^{1,2,3}, WANG Xuekun^{1,2,3,6},
XIE Lei^{1,2,3}, XU Jin^{1,2,3}, ZHANG Dapeng^{1,2,3}, GUO Huaizu^{1,2,3,6}

(1. State key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-Scale Preparation, School of Pharmaceutical Sciences and Food Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China; 2. NMPA Key Laboratory for Quality Control of Therapeutic Monoclonal Antibodies, Shanghai 201203, China; 3. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-Scale Preparation, School of Pharmaceutical Sciences, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China; 4. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 5. Department of Oncology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 6. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-Scale Preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract The rapid development of PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors has revolutionized cancer therapy, yet challenges persist in enhancing their therapeutic efficacy. Antibody-drug conjugates (ADC) have the potential to significantly expand the therapeutic window of chemotherapy agents while synergistically activating immune responses. However, the drug-antibody ratio (DAR) may affect key attributes such as activity and stability. To date, research on next-generation PD-L1-targeted ADC with varying DAR values remains limited. In this study, we first developed tumor microenvironment-responsive PD-L1 ADC with different DAR values using various anti-PD-L1 antibodies. These conjugates were subjected to preliminary characterization, activity evaluation, and stability analysis. Our findings demonstrate that both the antibody type and DAR significantly influence the activity and stability of PD-L1 ADC. The development of next-generation PD-L1 ADC requires a comprehensive consideration of efficacy, drugability, and other factors. This study provides crucial experimental evidence and conceptual frameworks for the rational design and mechanistic exploration of PD-L1-targeted ADC.

Keywords PD-1/PD-L1 immunotherapy; antibody-drug conjugates (ADC); drug-antibody ratio (DAR); tumor microenvironment-responsive; stability; activity evaluation

0 引言

自 1990 年首个抗体偶联药物(ADC)临床应用报道,以及 2000 年首个 ADC 获批上市,ADC 领域历经近 40 年的发展,已有 17 种 ADC 获批上市,数百种 ADC 候选药物进入临床研究^[1-2]。ADC 的核心设计理念通过“靶向递送+精准释放”突破传统化疗的治疗窗口限制,其技术革新主要体现在载荷迭代与连接子优化,近年来高药物抗体偶联比(DAR)喜树碱类载荷以及定点偶联肿瘤微环境响应型连接子凭借其独特的杀伤机制成为临床开发的主流^[1]。当前 ADC 药物的研发主要集中在 HER2、EGFR、Trop2 等成熟靶点^[3],但免疫检查点(如 PD-L1)因其独特的生物学特性逐渐成为新兴研究热点^[4]。

PD-L1 靶点表达具有典型的时空异质性,除胞膜表达外,在外泌体,细胞质以及细胞间隙均存在分布,其动态表达受多重机制调控^[5]。受限于此复杂的表达模式以及多重免疫逃逸机制,传统抗 PD-L1 单抗临床响应率受限,促使研究者探索多种新型联合策略,协同激活免疫。其中,化疗药物可通过破坏肿瘤基质屏障增强免疫检查点抑制剂疗效,在多种肿瘤,如非小细胞肺癌、小细胞肺癌和三阴性乳腺癌(PD-L1 阳性)等中已成功临床应用^[6]。然而,抗 PD-L1 单抗联合白蛋白紫杉醇或紫杉醇的临床疗效差异提示,简单的药物联用有时难以实现协同效应优化^[6]。这为 ADC 技术提供了机遇,通过靶向递送一定剂量的高效载荷,同时增强免疫微环境调控,可能突破现有治疗瓶颈。

近年来 PD-L1 ADC 研究初现端倪,酸响应性 PD-L1-Dox ADC 将多柔比星的 EC_{50} 从 $4\text{ }\mu\text{mol/L}$ 降至 $1.25\text{ }\mu\text{mol/L}$,提示 ADC 的靶向增效潜力^[7];采用经典的二肽连接子偶联单甲基溴瑞他汀 E(MMAE)的 PD-L1 ADC,具有较优的稳定性和可内吞性, EC_{50} 达 nmol/L 水平,但其骨髓抑制与神经毒性等毒副作用提示载荷及连接子选择需平衡效价与安全性^[8-9]。随着依喜替康衍生物(Dxd)载荷及新型连接子的应用,凭借温和毒性、亲水性与旁观者效应等优势,在曲妥珠单抗 ADC 中展现出高 DAR 值下的良好耐受性^[10-11],为抗 PD-L1 单抗、多抗等 ADC 的开发提供了思路。

ADC 的开发需系统性考量抗体特性,Atezolizumab(Tecentriq)相较于 Avelumab(Bavenciq)、Durvalumab(Imfinzi)等抗 PD-L1 抗体,具有更优的内吞效率,这对依赖溶酶体酶切的 ADC 尤为重要^[8],值得注意的是,不同的抗体或工程化改造均可能显著影响 ADC 性能——糖基化修饰可改变亲水性,而铰链区柔性序列改变或者 Fc 突变影响维持稳定性的同时改变 Fc 功能效应^[12]。不同的抗体以及 DAR 值等均可能对其活性、稳定性等关键属性产生影响。目前,关于不同 PD-L1 抗体及 DAR 值的新一代靶向 PD-L1 ADC 的研究尚较为匮乏。

本研究采用非糖基化的 Atezolizumab(Ab1)与创新的抗人 PD-L1 人源化抗体 T0004(Ab2,IgG1)作为抗 PD-L1 模型抗体,结合肿瘤微环境响应型连接子(酶响应)与 Dxd 载荷,制备了不同 DAR 值的肿瘤微环境响应型 PD-L1 ADC,随后对新型 PD-L1 ADC 进行初步表征、活性评估及初步稳定性分析。揭示了 PD-L1 ADC 中抗体类型与 DAR 值对药物理化性质、体外活性及稳定性的影响,为新一代免疫检查点靶向 ADC 的设计提供理论依据与实践指导。

1 材料与方法

1.1 设备

AKTA Avant 25 层析系统(GE Healthcare);Powerpac 电泳系统及 Gel DocTM EZ Imager 凝胶成像系统(Bio-Rad);FACSCantoTM II 流式细胞仪(BD);SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices);差示扫描量热仪(Malvern MicroCal VP-Capillary);Maurice 蛋白分析系统(Bio-Techne brand);紫外分光光度计(Evolution 300)

1.2 材料

G25 脱盐柱(Cytiva);TSKgel Phenyl-5PW($7.5\text{ mm}\times 75\text{ mm}$)疏水色谱柱(TOSOH);ACQUITY UP-LC BEH 30 nm C4 $1.7\text{ }\mu\text{m}$, $2.1\text{ }\times 50\text{ mm}$ 反向色谱柱(Waters);ACQUITY UPLC[®]Protein BEH SEC Column, 20 nm , $1.7\text{ }\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\times 150\text{ mm}$ 分子排阻色谱柱(Waters);ciEF Cartridge(Maurice);二甲基亚砜(阿拉丁);Dxd(MCE 公司);重组人 PD-L1 胞外域-Fc 融合蛋白、Ab1、T0004(上海张江生物技术有限公司);羊抗人 HRP 抗体(Solarbio);吐温 20(Sigma);牛血清白蛋白(翊圣生物);细胞培养基、胰蛋白酶(上海迈泰君奥生物技术有限公司);A431 细胞、MC38(本实验室保藏)、CCK-8 细胞增殖试剂盒(碧云天)

1.3 ADC 制备

1.3.1 抗体还原与偶联。抗体还原与偶联。取 Ab1 和 Ab2 各 2 mg ,分别置于 1.5 mL 离心管中($n=4/\text{组}$);加入 20 倍摩尔浓度的三(2-羧乙基)膦(TCEP)(50 mmol/L PB 稀释), $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 还原 2 h ;补充 $300\text{ }\mu\text{L}$ PB 缓冲液及 $200\text{ }\mu\text{L}$ DMSO 后,按预设摩尔比(药物:抗体= $1:4$ 至 $1:15$)加入 Dxd; $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 偶联 $4\sim 5\text{ h}$ 后,经 G25 脱盐柱纯化(流速 0.5 mL/min)。

1.3.2 DAR 值控制。通过调节抗体/载荷摩尔比获得不同 DAR 值 ADC。Ab1 组:DAR2($1:4$)、DAR4($1:6$)、DAR6($1:10$)、DAR8($1:15$);Ab2 组:同上梯度设置。

1.3.3 DAR 值检测。采用 UV 初步对 ADC 的 DAR 值进行确认。采用 SEC 双波长(紫外 280 nm 峰面积/ 370 nm 峰面积)检测法对 ADC 的 DAR 值进行监控。

1.4 分析方法

1.4.1 理化分析。UV(紫外可见光谱法):将 ADC 浓度稀释至 0.2 mg/mL ,吸取 1 mL 待测样品于光程为 1 cm 的石英皿中,设置 280 nm 、 370 nm 两个吸收波长进行检测,公式 1 进行计算。

SEC-HPLC (体积排阻色谱法): ACQUITY SEC 色谱柱(20 nm),流动相为含 30%异丙醇的 200 mmol/L PB(pH 6.8),流速 0.2 mL/min,双波长检测(280/370 nm);

SDS-PAGE:12%分离胶,考马斯亮蓝染色,成像分析片段分布;

iCIEF(全柱成像毛细管等电聚焦电泳):在 ciEF Cartridge 上建立 3~10 的 pH 梯度,上样 50 μg,预聚焦电压 1 500 V,10 min,聚焦电压 3 000 V,25 min;

HIC-HPLC (疏水色谱层析法):TSKgel Phenyl-5PW 柱,梯度洗脱(1.5 mol/L 硫酸铵→200 mmol/L Tris-HCl+30%异丙醇,0.3 mol/L 硫酸铵),1 mL/min,20 min^[13];

热稳定性:差示扫描量热法(DSC)分析(0.4 mg/mL,10~100 ℃扫描,速率 80 ℃/h),MicroCal Analysis Launcher 软件进行数据分析。

1.4.2 功能活性检测。结合活性:将重组人 PD-L1 胞外域-Fc 融合蛋白稀释至 0.01 μg/mL,100 μL 每孔包被,37 ℃水浴 2 h;封闭过夜;待测样品初始浓度稀释至 1.25 μg/mL 后 3 倍比稀释 8 个梯度,每孔 100 μL,3 复孔,37 ℃水浴 2 h;洗板 5~7 次;羊抗人 HRP 抗体稀释 8 000 倍,每孔 100 μL 加入洗好的酶标板中,37 ℃水浴 2 h;50 μL 显色液避光孵育 5 min,50 μL 终止液终止,Molecular Devices 酶标仪,450 nm 扫描波长,630 nm 参比波长进行扫描读数,Graph Pad 软件进行数据分析;

流式细胞法检测细胞表面抗原:0.25%的胰酶消化细胞,PBS 洗涤 3~5 次,抗 PD-L1 抗体加入到细胞悬液中,孵育 30 min,PBS 洗涤 3~5 次,流式细胞仪进行检测,FACSDiva Software 进行数据分析;

细胞毒性检测:CCK-8 法测定 A431/MC38 细胞存活率(72 h 处理, $n=3$ 重复),Molecular Devices 酶标仪检测波长 450 nm,参比波长 600 nm 读数,Graph pad 软件进行数据分析。

1.5 2~8 ℃初步稳定性评估

Ab1 组:DAR2、DAR4、DAR6、DAR8;Ab2 组:同上梯度设置;每种 DAR 值 ADC 浓度稀释至 1 mg/mL 且重复 4 组,分别避光保存于 2~8 ℃,在 0、20、40、60 d 时间点取样检测。

2 结果与讨论

2.1 PD-L1 ADC 制备及初步鉴定

2.1.1 不同 DAR 值 PD-L1 ADC 制备。在本研究中,我们采用巯基偶联法进行 ADC 制备[图 1(a)]。通过 TCEP 还原抗 PD-L1 抗体(Ab1、Ab2)链间二硫键,暴露出游离巯基位点。将肿瘤微环境响应型连接子-Dxd 定向偶联至这些位点^[8]。通过调节药物/抗体摩尔比以及反应条件,成功制备了 DAR 值梯度约为 0(仅含连接子)、2、4、6、8 的 PD-L1 ADC (Abs1、Abs2)(表 1)^[14]。

表 1 PD-L1 ADC DAR 值
Tab. 1 DAR Values of PD-L1 ADC

抗体	稳定性实验 0 天				稳定性实验 60 天	
	SEC 法		UV 法		SEC 法	
	R 值	DAR	R 值	DAR	R 值	DAR
Abs1-0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0
Abs1-2	0.26	3.4	0.18	2.3	0.26	3.4
Abs1-4	0.35	4.8	0.29	4.0	0.34	4.6
Abs1-6	0.48	7.0	0.4	5.8	0.49	7.2
Abs1-8	0.57	8.6	0.54	8.1	0.53	7.9
Abs2-0	0.00	0.0	0.0	0.0	0.00	0.0
Abs2-2	0.28	3.7	0.24	3.2	0.28	3.7
Abs2-4	0.34	4.6	0.28	3.8	0.33	4.5
Abs2-6	0.49	7.1	0.45	6.5	0.48	7.0
Abs2-8	0.57	8.7	0.55	8.4	0.53	7.9
公式	SEC 法:DAR = (2 042-R * 234 900)/(R * 6 650-19 000);R 为峰面积之比 UV 法:DAR = (2 042-R * 234 900)/(R * 6 650-19 000);R 为吸光值之比					

弱酸性环境可以减少抗体类药物的降解,益于 ADC 的稳定性^[15-16]。制备好的不同 DAR 值 PD-L1 ADC 初步保存弱酸性缓冲液^[17],以此条件样品进行后续初步表征以及稳定性评估。

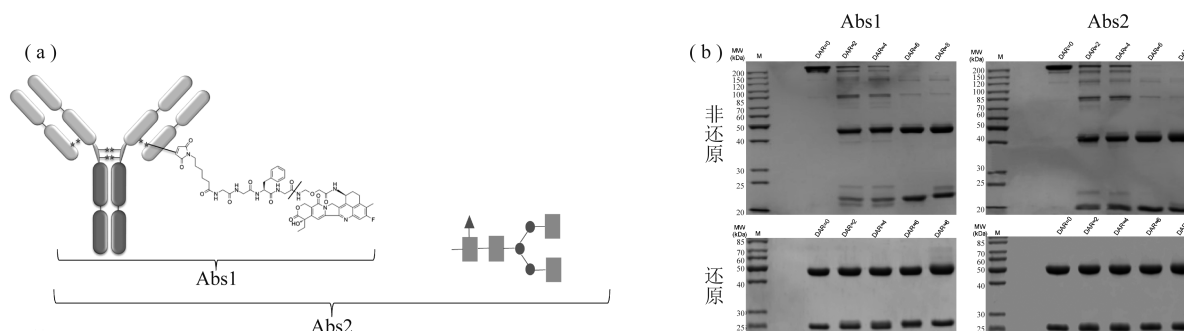
2.1.2 DAR 值测定。我们首先采用 UV 法进行 DAR 值测定,测定结果见表 1,各样本基本符合预期。为了进一步准确测定 ADC 的 DAR 值,同时避免可能的游离药物影响,我们采用 SEC 结合双波长检测技术进行了 DAR 值检测。抗体在 280 nm 处具有最大吸收值,而 Dxd 在紫外 370 nm 处具有最大吸收值。通过分别在目标波长下测量相应的峰面积,并将其代入公式 1 进行计算,即可获得相应的 DAR 值

$$\text{DAR} = (\epsilon_{\text{Ab}370} - R \cdot \epsilon_{\text{Ab}280}) / (R \cdot \epsilon_{\text{D}280} - \epsilon_{\text{D}370}), \quad (1)$$

其中 $R = \frac{A_{370}}{A_{280}}$, $\epsilon_{\text{Ab}370} = 2\,042$: 抗体在 370 nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{\text{Ab}280} = 234\,900$: 抗体在 280 nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{\text{D}280} = 6\,650$: 药物 Dxd 在 280 nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{\text{D}370} = 19\,000$: 药物 Dxd 在 370 nm 处的摩尔消光系数; R : ADC 在紫外 370 nm 处吸收峰面积与 280 nm 处吸收峰面积的比值。

实验结果表明,两种抗体(Ab1 和 Ab2)的 ADC 均符合预期的 DAR 值梯度^[18]。这表明该制备工艺能够有效控制 DAR 值的均匀性和准确性,为后续的活性评估和稳定性分析提供了可靠的基础。

2.1.3 SDS-PAGE 初步鉴定。为了进一步鉴定 ADC 的制备质量,我们对偶 ADC 进行了 SDS-PAGE 分析。结果显示,两种抗体在偶联药物后并未表现出明显的聚集,图 1(b)。通过电泳条带分析发现,低 DAR 值 ADC 的巯基未被 Dxd 完全占据,去除还原剂后,游离巯基被重新氧化成二硫键。因此,在非还原电泳中,随着 DAR 值的减少,抗体二硫键逐渐恢复,完整抗体的条带随 DAR 值的减少而逐渐增多。同时,在还原电泳中,电泳条带从左到右逐渐升高,这与 DAR 值的增加趋势一致。



注:(a) 抗 PD-L1 ADC 结构示意图;(b) Abs1、Abs2 不同 DAR 值电泳图。

图 1 PD-L1 ADC 制备及初步鉴定

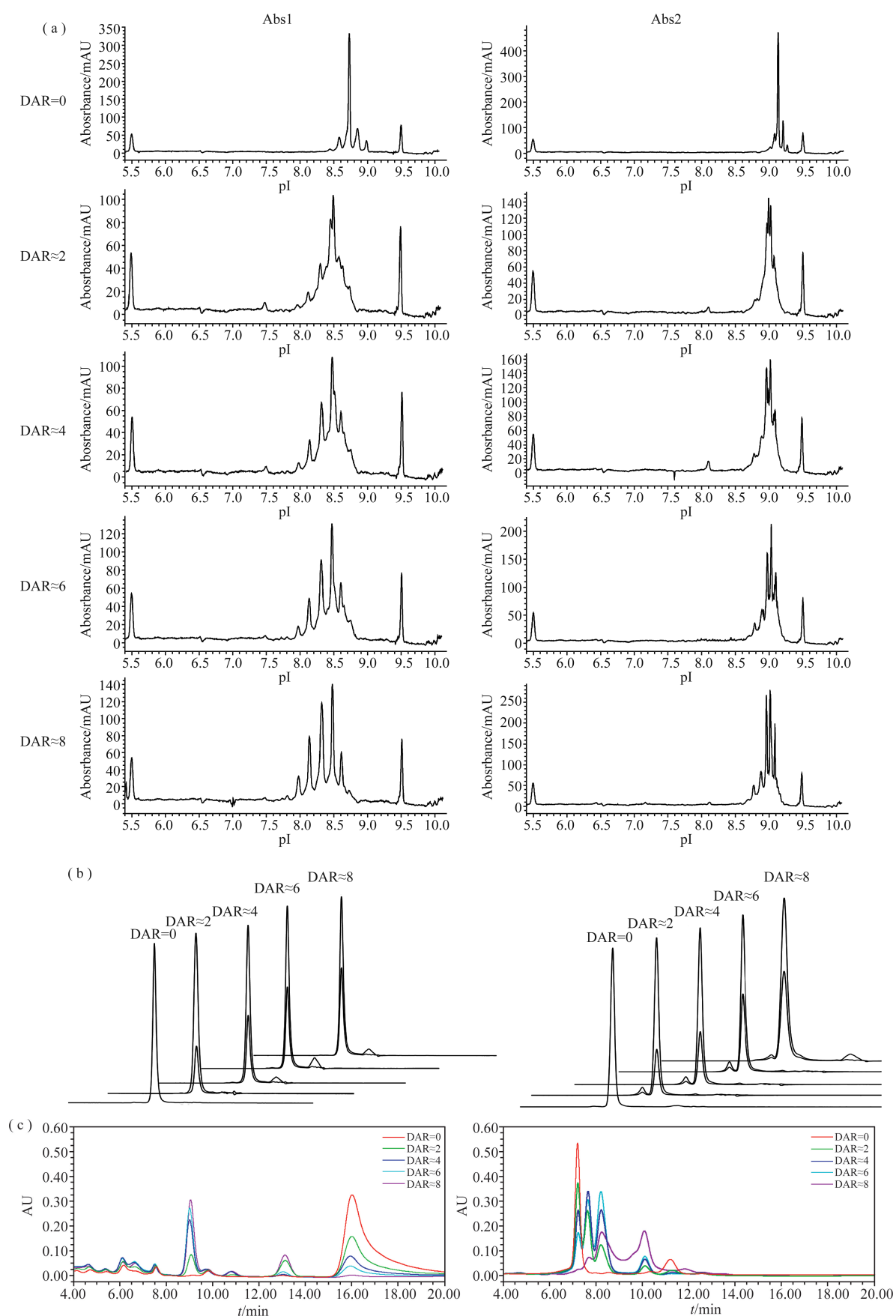
Fig. 1 Preparation and SDS-PAGE analysis of PD-L1 ADC

此外,电泳结果还表明 ADC 无明显降解现象^[19]。这一结果进一步验证了我们的制备工艺能够有效维持 ADC 的完整性和稳定性。

本研究通过巯基偶联法成功制备了不同 DAR 值的 PD-L1 ADC,并对其进行了初步鉴定。DAR 值测定和 SDS-PAGE 分析结果均表明,制备工艺能够有效控制 ADC 的 DAR 值均匀性及其完整性。这些结果为进一步的活性评估和稳定性分析提供了坚实的基础。

2.2 PD-L1 ADC 的初步表征

2.2.1 pI 分析。通过等电聚焦电泳分析发现,Ab2 的等电点(pI)集中在 9.0 附近,图 2(a),显著高于 Ab1 的 8.7,表明两者在表面电荷分布上存在差异。偶联 Dxd 后,Ab1 的 pI 随 DAR 值升高从 8.7 逐渐降低至 8.1~8.5 区间,而 Ab2 偶联物的 pI 仅轻微下降(DAR=8 时为 8.9,DAR=2 时为 9.1)。这一现象提示,Dxd 的负电荷基团(如羧酸基团)可影响 ADC pI,但不同的抗体影响程度不一。值得注意的是,抗体 $pI > 9$ 时易与带负电荷的容器表面发生静电吸附,导致不可逆聚集^[10],因此需要考虑合适的制剂缓冲液保存 ADC。相对于抗体,各 DAR 值 ADC 均呈现一定的 pI 异质性特性增加,说明药物偶联对于 ADC 电荷异质性有一定影响。同时,高 DAR(DAR=6/8)和低 DAR(DAR=2/4)之间也存在一定的差异,且高 DAR 之间具有一定的相似性,说明药物偶联对于电荷异质性具有一定影响,而随着偶联的饱和,电荷异质性趋于稳定。



注:(a) 等电点检测图谱;(b) SEC 检测图谱;(c) 疏水层析检测图谱。

图 2 PD-L1 ADC 初步表征

Fig. 2 Preliminary Characterization of PD-L1 ADC

2.2.2 纯度分析。SDS-PAGE 进行初步鉴定后,我们进一步进行了 SEC 纯度分析,结果显示,Abs2 存在少量聚体,如图 2(b),并且二聚体的含量随 DAR 值的减少而增加,无糖基化修饰的 Ab1 不同 DAR 值 ADC 均无明显二聚体。这一结果与初始假设相悖,Abs2 相比 Abs1 表现出易聚集的倾向,说明抗体的亲疏水性不是影响 ADC 偶联工艺聚集稳定性的决定因素^[21]。这一发现为 ADC 工艺开发提供了新思路,除连接子及 DAR 值相关的优化外,还可通过优化抗体调控 ADC 的聚集行为。

2.2.3 ADC 异质性分析。两种抗体 ADC 呈现出不同的初始聚体含量,我们进一步对不同 DAR 值 Abs1/Abs2 进行疏水异质性分析。木瓜蛋白酶处理可以呈现更多结构域疏水特性,酶切后疏水色谱分析显示,Abs2 整体出峰时间早于 Abs1,说明 Abs2 整体疏水性要小于 Abs1 图 2(c)。Abs2、Abs1 疏水性差异的主要原因可能是抗体的不同。

值得注意的是,不同 DAR 值的 Abs1 以及 Abs2 呈现出不同的峰型表现,特别是随着 DAR 值增加,Abs2 高疏水性峰比例逐渐增加,如图 2(c),说明偶联的药物量是影响 PD-L1 ADC 疏水性的又一重要因素。在疏水的特性表现上,Abs1 和 Abs2 还存在差异,Abs1 层析分离区域可观测的峰比例未呈现 Abs2 同样的规律。由于 Ab2 抗体亲水性好于 Ab1,Abs1 更高 DAR 值的 ADC 可能由于更强的疏水性而结合在分析柱上,未能在标准的 HIC 分析中有效分离。Ab1、Ab2 可变区有较多氨基酸的差异,Ab2 高变区含有更多的碱性氨基酸,这可能是其亲水性差异的又一因素。这种随着 DAR 值增加,不同抗体疏水表现的差异也为抗体工程化改造提供了方向,通过 CDR 区电荷优化可能突破 DAR 值对 ADC 疏水性及稳定性的限制。

2.3 不同 DAR 值 PD-L1 ADC 活性评估

2.3.1 结合活性。通过酶联免疫吸附试验(ELISA)可以评估不同 DAR 对于抗原结合能力的影响,如图 3(a)。结果显示,无论 DAR 值为 0、2、4、6 或 8,Abs1 和 Abs2 的 EC_{50} 均稳定在亚 nmol/L 水平,与先前报道(Atezolizumab-MMAE $EC_{50}=0.9$ nmol/L)相似^[8]。这表明肿瘤微环境响应型连接子及 Dxd 载荷的引入未显著改变抗体的 CDR 区构象或表位可及性,偶联后抗体对 PD-L1 的亲合力没有明显影响,两种抗体具有相似的表现。同时,新型 Abs2 具有同类药物相似的结合活性,验证了 Ab2 作为 ADC 载体的可行性^[16],这也为后续进一步的开发评估打下了基础。

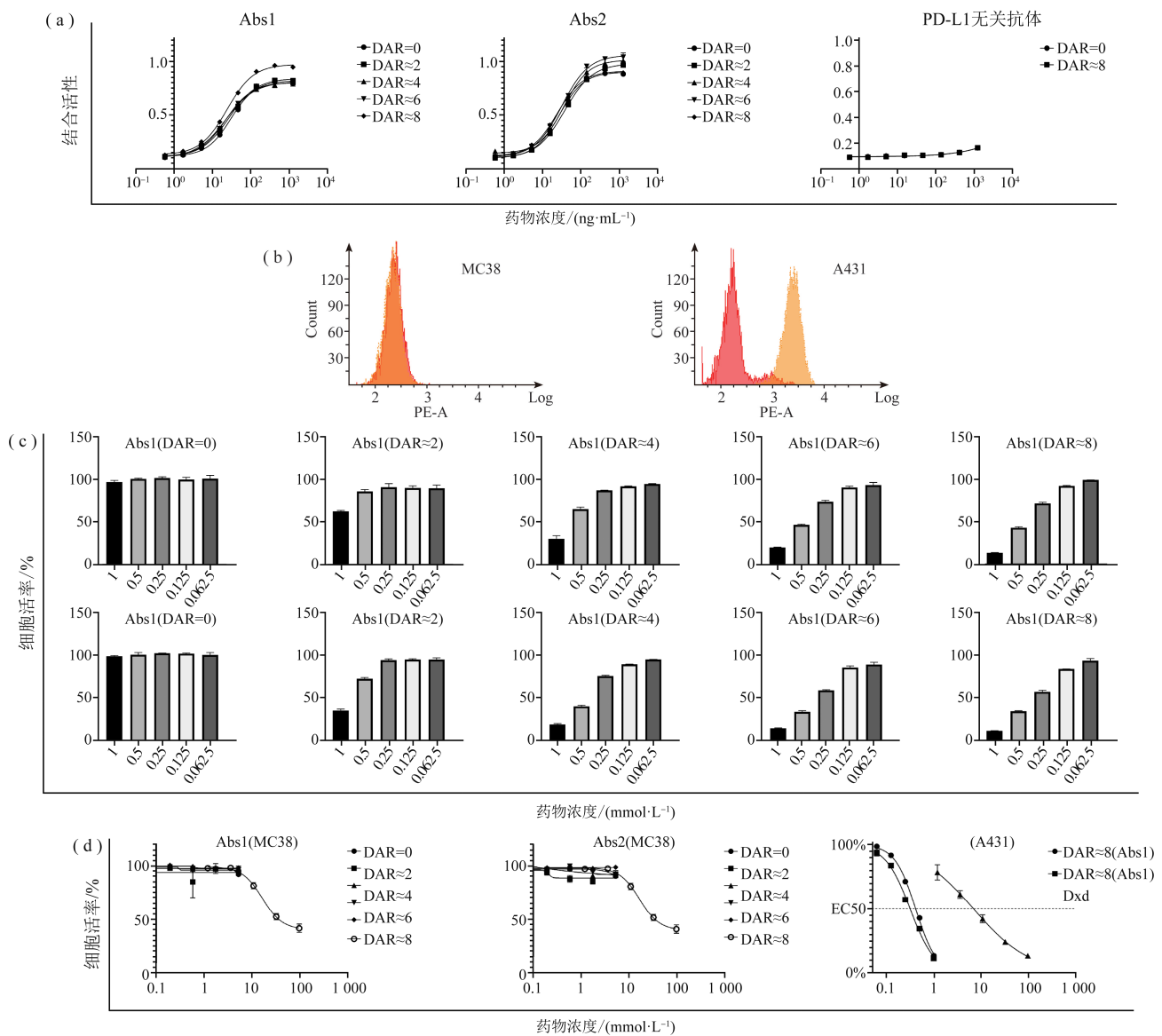
值得注意的是,高 DAR 值 ADC 仍能维持与裸抗相当的结合活性,提示载荷连接位点远离抗原结合域,虽然为提升亲水性以及肿瘤微环境释放性能,对连接子进行了改造。该较长的连接子不影响抗体的结合域。类似于经典 HER2 ADC^[22],这为后续 PD-L1 ADC 开发提供了重要参考。

2.3.2 细胞毒性。为明确 DAR 值对 ADC 生物学效能的影响,采用 PD-L1 阳性细胞以及 PD-L1 阴性细胞系进行体外细胞杀伤实验,图 3(b~d)。在 PD-L1 阳性细胞中,Abs1 与 Abs2 的细胞毒性均随 DAR 值增加细胞杀伤活性显著增强,Abs1 EC_{50} :DAR=8 时为 $0.4 \mu\text{mol/L}$,DAR=2 时为 $1.2 \mu\text{mol/L}$;Abs2 EC_{50} :DAR=8 时为 $0.3 \mu\text{mol/L}$,DAR=2 时为 $1.0 \mu\text{mol/L}$,符合“旁观者效应”中高载药量提升杀伤效率的预期^[23]。两种 ADC 对 PD-L1 阴性细胞均无明显杀伤,证实其毒性依赖于 PD-L1 介导的内吞及肿瘤微环境响应性药物释放。同时,DAR 值在 6~8 之间,细胞毒性结果相似,说明 DAR 值和活性的关系并非简单的线性,每一种 ADC 据需要形成最优的 DAR,保证安全性有效性以及成药性特性统一。Abs2 在 DAR 8 时 EC_{50} ($0.3 \mu\text{mol/L}$)较 Abs1($0.4 \mu\text{mol/L}$)具有相似或稍强的杀伤效能,可能与抗体相关的差异相关,如结合表位、Fc 受体功能甚至非特异性杀伤等,虽然对于 PD-L1 阴性细胞未呈现特异性的杀伤性能,可以在一定程度上排除一些相关差异因素,在后续的研究中还需进一步予以确认^[24]。

与游离 Dxd($EC_{50}=6.9 \mu\text{mol/L}$)相比,ADC 的细胞毒性提升显著,如图 3(d),这一增效幅度显著高于传统 ADC 药物,凸显了肿瘤微环境响应型连接子与高活性载荷的协同优势。

2.4 PD-L1 ADC 初步稳定性评估

ADC 相比于经典抗体类药物具有更高的化学不稳定性^[25],而 ADC 的稳定性是其成药性的核心指标之一^[26],尤其对于靶向免疫检查点的 ADC 而言,需平衡高 DAR 值带来的活性优势与潜在稳定性风险。因此,在药物开发的早期阶段进行 ADC 初步稳定性评估至关重要。研究通过热力学稳定性分析和初步储存稳定性评估,系统研究抗体类型与 DAR 值对 PD-L1 ADC 稳定性的影响,明确不同因素在 ADC 稳定性中的作用。



注:(a) Abs1,Abs2,无关抗体结合活性;(b) 细胞系 PD-L1 表达流式检测图;(c) Abs1,Abs2 不同 DAR 值 ADC 杀伤 A431 细胞毒性检测;(d) 不同 DAR 值 ADC 细胞毒性比对。

图 3 不同 DAR 值 PD-L1 ADC 活性评估

Fig. 3 Activity Evaluation of PD-L1 ADC with Different DAR Values

2.4.1 热稳定性分析。DSC 是评估抗体类药物热稳定性的重要工具^[27],通过对不同 DAR 值 Abs1、Abs2 进行 DSC 分析,结果显示(表 2),与对照(DAR=0)相比,各 DAR 值 PD-L1 ADC 的 T_m onset 和 T_m1 均显著降低,表明药物偶联对抗体的天然构象造成了一定的扰动,而且仅偶联连接子既可以呈现这种扰动。然而,DAR 值对热稳定性的影响呈现非线性特征。在较低 DAR 值和较高 DAR 值之间, T_m onset 或 T_m1 呈现一定差异,提示偶联的异质性还可能加剧低载药量下的构象不稳定性。Abs1 和 Abs2 之间也呈现出热稳定性的差异。具体来说,Abs1 和 Abs2 呈现出相似的 T_m onset,但 Abs1 的 T_m1 略高,且高 DAR ADC 具有稍高的 T_m onset 或 T_m1 ,这些结果突破传统低 DAR 值更稳定认知,表明

表 2 不同 DAR 值 PD-L1 ADC 热稳定性分析

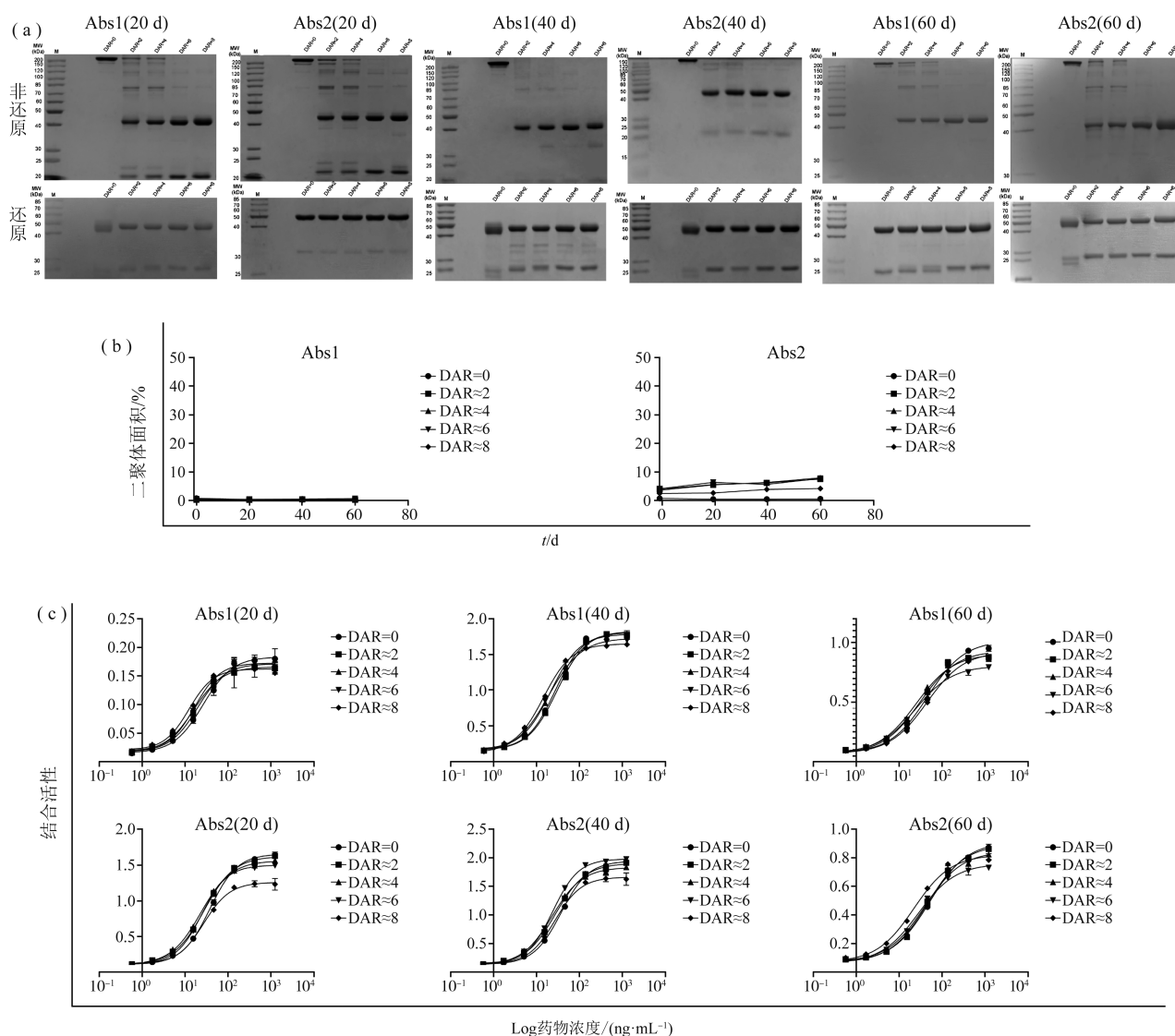
Tab. 2 Thermal Stability Analysis of PD-L1 ADC with Different DAR Values

ADC	T_m onset/ $^{\circ}$ C	T_m 1/ $^{\circ}$ C
Abs1-0	76.14	84.64
Abs1-2	54.11	82.04
Abs1-4	55.36	81.06
Abs1-6	56.48	80.40
Abs1-8	60.43	80.31
Abs2-0	66.71	79.00
Abs2-2	55.11	65.40
Abs2-4	56.82	65.54
Abs2-6	56.53	78.00
Abs2-8	56.93	77.71

适度高 DAR 值可能通过提高结构均一性补偿偶联损伤^[28-29]。

因此,在不同 DAR 值的 Abs1 与 Abs2 分析中,高 DAR 值的 ADC 未表现出热稳定性下降的趋势,且两种 ADC 在热稳定性方面呈现相似性。该偶联策略和连接子可以支持较高 DAR 值 PD-L1 ADC 的制备,并未对稳定性产生显著负面影响。

2.4.2 初步稳定性评估。基本上所有的商业化 ADC 均为冻干制剂,为了进一步以较差的条件确认 PD-L1 ADC 的长期稳定性,我们将不同 DAR 值的 PD-L1 ADC 在弱酸性(目前 ADC 的平均制剂 pH)缓冲液中,2~8 °C 下进行加速稳定性评估^[30]。不同 DAR 值的 PD-L1 ADC 分别在 0、20、40、60 d 进行取样检测。SDS-PAGE 分析结果显示,2~8 °C 存放 60 d 内,各 DAR 值的 PD-L1 ADC 均未出现明显降解,见图 4(a)。



注:(a) SDS-PAGE 分析;(b) SEC 聚体结果分析;(c) 结合活性比对。

图 4 不同 DAR 值 PD-L1 ADC 初步稳定性评估

Fig. 4 Preliminary Stability Evaluation of PD-L1 ADC with Different DAR Values

进一步通过 SEC 分析,随着存放时间的增加,分别对四个时间内不同 DAR 值的 ADC 进行 SEC 检测,两种 ADC 聚体比例均保持在 5% 左右或以内,尽管 Abs2 初始二聚体高于 Abs1,但高 DAR 值 Abs2 相比低 DAR 值的 Abs2 的二聚体增长明显缓慢,这和 DSC 热稳定性分析的结果一致,明确了 Ab2 作为新型 PD-L1 抗体支持新型 PD-L1 ADC 制备的优势,并且两种高 DAR 值的 ADC 在稳定性评估中均展现出良好的稳定性,见图 4(b)。

为验证 ADC 连接子的稳定性,我们进一步采用 SEC 双波长进行 DAR 值检测,结果显示 DAR 值变化

不明显,特别是对于 $DAR=6$ 的 ADC(见表 1)。此外,为验证存储期间不会对抗体的结合活性产生影响,我们又对四个时间点的 ADC 进行 ELISA 检测,结果表明,不同 DAR 值的 ADC 在 $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 液体状态存储两个月,不影响其结合活性,见图 4(c)。

通过初步稳定性评估,我们发现 ADC 在未优化的基础缓冲液中, $2\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 储存两个月以内,各 DAR 值 ADC 的基本功能保持稳定,这为后续 PD-L1 ADC 的研究提供了基本的质量保证。

3 结论

本研究通过新一代连接子毒素巯基定点偶联技术,首次成功构建了基于糖基化和非糖基化 PD-L1 模型抗体的肿瘤微环境响应型 PD-L1 ADC。我们初步探讨了不同 DAR 值对 ADC 理化性质、体外活性及稳定性的影响,为新一代 PD-L1 ADC 的设计和开发提供了重要的理论支持。

研究表明,DAR 值与抗体类型以及连接子协同影响 PD-L1 ADC 效能及稳定性。特别是高 DAR 值($DAR=6\sim 8$)的 ADC 兼具效能与稳定性优势,验证了“靶向递送-微环境响应释放”的协同增效机制。此外,高 DAR 值 ADC 在热稳定性及储存稳定性方面表现更优,突破了传统上“低 DAR 更稳定”的认知,提示适度高 DAR 值可通过结构均一性补偿偶联损伤,从而在疗效和稳定性之间实现良好的平衡。

综上所述,本研究为新一代 PD-L1 ADC 的设计、优化及后续开发提供了宝贵的理论依据,并为进一步拓宽抗肿瘤治疗窗口与提高成药性提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] COLOMBO R, TARANTINO P, RICH J R, et al. The journey of antibody-drug conjugates: lessons learned from 40 years of development[J]. *Cancer Discovery*, 2024, 14(11): 2089-2108.
- [2] TARANTINO P, CARMAGNANI PESTANA R, CORTI C, et al. Antibody-drug conjugates: smart chemotherapy delivery across tumor histologies[J]. *CAA Cancer Journal for Clinicians*, 2022, 72(2): 165-182.
- [3] COY S, LEE J S, CHAN S J, et al. Systematic characterization of antibody-drug conjugate targets in central nervous system tumors[J]. *Neuro-oncology*, 2024, 26(3): 458-472.
- [4] ZHOU K I, PETERSON B, SERRITELLA A, et al. Spatial and temporal heterogeneity of PD-L1 expression and tumor mutational burden in gastroesophageal adenocarcinoma at baseline diagnosis and after chemotherapy[J]. *Clinical Cancer Research*, 2020, 26(24): 6453-6463.
- [5] WANG Y Z, ZHOU Y, YANG L Y, et al. Challenges coexist with opportunities: spatial heterogeneity expression of PD-L1 in cancer therapy[J]. *Advomced Science*, 2024, 11(1): e2303175.
- [6] MERIC-BERNSTAM F, LARKIN J, TABERNEIRO J, et al. Enhancing anti-tumour efficacy with immunotherapy combinations[J]. *The Lancet*, 2021, 397(10278): 1010-1022.
- [7] SAU S, PETROVICI A, ALSAAB H O, et al. PDL-1 antibody drug conjugate for selective chemo-guided immune modulation of cancer[J]. *Cancers*, 2019, 11(2):232.
- [8] XIAO D, LUO L L, LI J G, et al. Development of bifunctional anti-PD-L1 antibody MMAE conjugate with cytotoxicity and immunostimulation[J]. *Bioorganic Chemistry*, 2021, 116: 105366.
- [9] SHAO Q H, MAO X Y, ZHOU Z X, et al. Research progress of pharmacogenomics in drug-induced liver injury[J]. *Frontiers pharmacology*, 2021, 12: 735260.
- [10] INDINI A, RIJAVEC E, GROSSI F. Trastuzumab deruxtecan: changing the destiny of HER2 expressing solid tumors[J]. *International Journal Molecular Science*, 2021, 22(9).
- [11] NAKADA T, SUGIHARA K, JIKOH T, et al. The latest research and development into the antibody-drug donjugate, [fam-] trastuzumab deruxtecan (DS-8201a), for HER2 cancer therapy[J]. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 2019, 67(3): 173-185.
- [12] LI M H, ZHAO R Q, CHEN J X, et al. Next generation of anti-PD-L1 Atezolizumab with enhanced anti-tumor efficacy in vivo[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 5774.
- [13] 徐梦娇,刘涛,徐进,等. 英夫利西单抗糖化方法开发验证及其在抗体药物中的普适性[J]. *聊城大学学报(自然科学版)*, 2024, 37(5): 155-168.

- [14] NAKADA T, MASUDA T, NAITO H, et al. Novel antibody drug conjugates containing exatecan derivative-based cytotoxic payloads [J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2016, 26(6): 1542-1545.
- [15] GUPTA S, JISKOOT W, SCHÖNEICH C, et al. Oxidation and deamidation of monoclonal antibody products: potential impact on stability, biological activity, and efficacy[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2022, 111(4): 903-918.
- [16] JOHANN F, WÖLL S, GIESELER H. "Negative" impact: the role of payload charge in the physicochemical stability of auristatin antibody-drug conjugates[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2024, 113(8): 2433-2442.
- [17] YADAV S, LAUE T M, KALONIA D S, et al. The influence of charge distribution on self-association and viscosity behavior of monoclonal antibody solutions[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2012, 9(4): 791-802.
- [18] 王文波,武刚,崔永菲,等. 双波长分子排阻色谱测定半胱氨酸偶联一甲基溴瑞他汀 E 抗体药物偶联物的药物抗体偶联比[J]. *药物分析杂志*, 2018, 38(8): 1432-1436.
- [19] ZHANG H, WANG Y X, WU Y P, et al. Therapeutic potential of an anti-HER2 single chain antibody-DM1 conjugates for the treatment of HER2-positive cancer[J]. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2017, 2: 17015.
- [20] AYOUBI R, RYAN J, GONZALEZ BOLIVAR S, et al. A consensus platform for antibody characterization[J]. *Nature Protocols*, 2024, 20(6): 1509-1545.
- [21] 王传杰,冯健男,王晶. 单克隆抗体药物稳定性影响因素及优化策略[J]. *中国免疫学杂志*, 2021, 37(17): 2154-2160.
- [22] SWAIN S M, SHASTRY M, HAMILTON E. Targeting HER2-positive breast cancer: advances and future directions[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(2): 101-126.
- [23] OGITANI Y, HAGIHARA K, OITATE M, et al. Bystander killing effect of DS-8201a, a novel anti-human epidermal growth factor receptor 2 antibody-drug conjugate, in tumors with human epidermal growth factor receptor 2 heterogeneity[J]. *Cancer Science*, 2016, 107(7): 1039-1046.
- [24] HASAN M M, LAWS M, JIN P Q, et al. Factors influencing the choice of monoclonal antibodies for antibody-drug conjugates[J]. *Drug Discovery Today*, 2022, 27(1): 354-361.
- [25] LYON R P, SETTER J R, BOVEE T D, et al. Self-hydrolyzing maleimides improve the stability and pharmacological properties of antibody-drug conjugates[J]. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(10): 1059-1062.
- [26] ROSS P L, WOLFE J L. Physical and chemical stability of antibody drug conjugates: current status[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2016, 105(2): 391-397.
- [27] WEN J, ARTHUR K, CHEMMALIL L, et al. Applications of differential scanning calorimetry for thermal stability analysis of proteins: qualification of DSC[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012, 101(3): 955-964.
- [28] KARUNARATNE S P, MOUSSA E M, MILLS B J, et al. Understanding the effects of site-specific light chain conjugation on antibody structure using hydrogen exchange-mass spectrometry (HX-MS)[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2024, 113(8): 2065-2071.
- [29] AMASH A, VOLKERS G, FARBER P, et al. Developability considerations for bispecific and multispecific antibodies[J]. *mAbs*, 2024, 16(1): 2394229.
- [30] MIECZKOWSKI C A. The evolution of commercial antibody formulations[J]. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2023, 112(7): 1801-1810.

(责任编辑:刘庆松)