

引用:潘志远,任雨乐,徐进,等. 基于高低亲和力抗犬 PD-L1 抗体与肿瘤微环境响应性连接子的抗体偶联药物制备及初步性能评估[J]. 聊城大学学报(自然科学版),2026,39(1):94-105.

Citation: PAN Zhiyuan, REN Yule, XU Jin, ZHU Weifan, ZHUANG Huangzhen, GAO Tianyu, CHEN Yi, GUO Menghui, LIU Tao, WANG Chenguang, QIAN Weizhu, HOU Sheng, JI Lusha, LI Jun, SUN Ziqiao, WANG Xuekun, XIE Lei, ZHANG Dapeng, GUO Huaizu, GUO Qingcheng. Preparation and preliminary evaluation of antibody-drug conjugates targeting canine PD-L1 using high/low affinity anti-PD-L1 antibodies and tumor microenvironment-responsive linkers[J]. Journal of Liaocheng University (Natural Science Edition), 2026, 39(1): 94-105.

文章编号 1672-6634(2026)01-0094-12

DOI 10.19728/j.issn1672-6634.2025030005

基于高低亲和力抗犬 PD-L1 抗体与肿瘤微环境响应性连接子的抗体偶联药物制备及初步性能评估

潘志远^{1,2}, 任雨乐^{1,2}, 徐进^{1,2,3}, 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^{1,2,3,4}, 王晨光^{1,2,3,5}, 钱卫珠^{1,2,3}, 侯盛^{1,2,3}, 冀芦沙^{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}, 张大鹏^{1,2,3}, 郭怀祖^{1,2,3,6}, 郭清城^{1,2,3,5}

(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. 复旦大学 华山医院 肿瘤科, 上海 200040; 5. 泰州迈博太科药业有限公司, 江苏 泰州 225316; 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 免疫检查点阻断疗法在人类肿瘤治疗中取得了突破性进展,然而犬类肿瘤免疫治疗药物的开发仍面临重大挑战。随着宠物市场的崛起以及宠物医疗技术的发展,针对犬类肿瘤的抗体偶联药物(ADC)的需求愈加迫切。然而,目前针对犬类程序性死亡受体配体 1(PD-L1)靶点的 ADC 研究尚处于起步阶段,耐药性和疗效不足问题亟待进一步探索,特别是不同抗体类型及药物抗体偶联比(DAR)对新型 ADC 的影响。本研究首次制备了两种靶向犬 PD-L1 的新型 ADC,采用高/低亲和力抗犬类 PD-L1 抗体(A 单抗与 T 单抗)、肿瘤微环境响应型连接子以及新一代拓扑异构酶 I 抑制剂 Dxd,并通过控制偶联参数,实现了不同 DAR 值 ADCs 的制备。经过初步鉴定后,本研究对不同 DAR 值的两种 ADCs 进行了初步表征、稳定性分析、结合活性及细胞杀伤性能评估。结果显示,两种抗体 ADCs 各 DAR 值控制良好,均具有良好的成药性,DAR 值和抗体类型对于 ADCs 的稳定性和活性均具有一定影响,高低亲和力抗体均具有一定的杀伤性能,且随着 DAR 值增加,杀伤性能增强。本研究为犬类肿瘤 PD-L1 ADC 的开发打下了基础,并为后续的犬源化 ADC 开发提供了候选药物。

关键词 抗体药物偶联物;犬类肿瘤;免疫疗法;程序性死亡受体配体 1;药物抗体偶联比

中图分类号 S859.7

文献标志码 A

开放科学(资源服务)标识码(OSID)



收稿日期:2025-03-10

基金项目:国家自然科学基金项目(22304067);上海东方英才项目(CYQN2023031);山东省自然科学基金(ZR2023QB257, ZR2023QB196);山东省高等学校“青创团队计划”团队(2022KJ111);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;郭清城,男,汉族,博士,副教授,研究方向:抗体药物质量控制,E-mail: qingcheng_guo@mabpharm.net;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.

Preparation and preliminary evaluation of antibody-drug conjugates targeting canine PD-L1 using high/low affinity anti-PD-L1 antibodies and tumor microenvironment-responsive linkers

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

(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. Department of Oncology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China; 5. Taizhou Mabtech Pharmaceuticals Co., Ltd., Taizhou 225316, China; 6. State Key Laboratory of Macromolecular Drugs and Large-scale Preparation, Shanghai Zhangjiang Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract Immune checkpoint blockade therapies have made groundbreaking progress in human cancer treatment, but the development of immunotherapeutic drugs for canine tumors remains a significant challenge. With the rise of the pet market and advancements in veterinary medical technology, the demand for antibody-drug conjugates (ADCs) targeting canine tumors is growing. However, research on ADCs targeting canine Programmed Death-Ligand 1 (PD-L1) is still in its infancy, with issues such as drug resistance and insufficient therapeutic efficacy requiring further exploration, particularly the impact of different antibody types and drug-to-antibody ratio (DAR) on novel ADC performance. This study pioneers the preparation of two novel canine PD-L1-targeting ADCs by integrating high/low-affinity anti-canine PD-L1 monoclonal antibodies (A-mAb and T-mAb), tumor microenvironment-responsive linkers, and the next-generation topoisomerase I inhibitor Dxd. Through controlled conjugation parameters, ADCs with distinct DAR values were successfully prepared. Subsequent characterization, stability analysis, binding activity, and cytotoxicity evaluation revealed that both ADCs exhibited well-controlled DAR values and favorable developability. DAR values and antibody types influenced ADC stability and activity, while both high- and low-affinity antibodies demonstrated dose-dependent cytotoxicity that intensified with increasing DAR values. This study lays the foundation for developing PD-L1-targeting ADCs for canine tumors and provides candidate drugs for future caninized ADC development.

Keywords antibody-drug conjugates (ADCs); canine tumors; immunotherapy; programmed death-ligand 1 (PD-L1); drug-to-antibody ratio (DAR)

0 引言

程序性死亡配体 1 (CD274, PD-L1) 作为免疫逃逸的关键调控因子, 在人类肿瘤治疗中已展现出显著临床价值^[1-2]。通过阻断 PD-L1 与 PD-1 的相互作用, 免疫检查点抑制剂可有效恢复 T 细胞对肿瘤的杀伤功能, 这一机制已在多种实体瘤中取得突破性进展^[3-4]。为解决单一免疫检查点抑制剂的效能不足难题, 一系

列新型免疫检查点抑制剂或组合疗法等相继被开发,为肿瘤治疗带来了新的希望^[5-7]。

当今社会,宠物犬已经成为人类不可或缺的伙伴,且在人类生活中扮演着重要角色。随宠物犬数量的增加,相关产业也快速发展^[8]。得益于经济水平的提高犬类医疗设施的完善,大多数犬类疾病都得到了有效治疗。然而,犬类肿瘤依然是一个严峻的问题^[9]。据统计,癌症已经成为犬类死亡的首要原因,其发病率与死亡率远高于人类(一岁以上犬类肿瘤致死率高达 30%)^[10]。现有治疗手段(如手术、化疗)常伴随严重副作用且难以根治^[11]。因此,开发高效、低毒的犬类肿瘤靶向药物迫在眉睫。尽管,宠物医疗市场的快速增长(预计 2034 年市场规模达 11.8 亿美元)^[12],但犬类免疫治疗研究仍然滞后^[13],亟待新的治疗策略和靶向药物的创新。

抗体偶联药物(Antibody-Drug Conjugate, ADC)通过精准递送细胞毒素至肿瘤微环境,在人类癌症治疗中已实现革命性突破^[14-16]。以 PD-L1 为靶点的 ADC 凭借其“靶向杀伤”与“免疫激活”的双重效应,展现出独特优势^[17-18]。其中,新一代拓扑异构酶 I 抑制剂 Dxd 因其高活性、低毒性及强旁观者效应备受关注^[19-22],其亲水性连接子不仅可提升药物抗体偶联比(Drug-to-Antibody Ratio, DAR),还能通过水解后非带电结构穿透邻近低抗原肿瘤细胞,显著扩大杀伤范围^[23-26]。然而,目前全球包括已获批的 17 种 ADC 均针对人类适应症,犬类新一代 PD-L1 ADC 的研究仍属空白。

犬类 PD-L1 与人 PD-L1 的同源性以及靶向抗体的交叉反应性为跨物种疗法开发提供了潜在路径^[27]。研究表明,阿替利珠单抗(Atezolizumab)^[28]可有效阻断犬外周血单个核细胞(PMBC)的 PD-L1 信号通路^[29],提示利用交叉抗体进行靶向犬 PD-L1 ADC 制备具有可行性。然而,犬类 ADC 开发仍面临两大核心挑战:其一,抗体亲和力与 DAR 值对药物稳定性及疗效的影响尚未明确;其二,传统连接子是否适配犬类肿瘤微环境的特异性生理特征还有待研究。

基于此,本团队从已有的抗人 PD-L1 抗体中筛选出系列与犬类 PD-L1 具有交叉反应性的抗体,并选取两株高低亲和力抗体用于犬类肿瘤 PD-L1 抗体的初步开发。考虑到 DAR 值和连接子可能对药物效能的影响,团队采用了新一代肿瘤微环境响应型连接子及 Dxd 毒素^[30],并通过优化偶联工艺实现了 DAR 值的精准调控。最终,制备了两类高低亲和力的犬类 PD-L1 ADC,并为每类抗体制备了不同 DAR 值的样品。通过系统评估不同 DAR 值 ADCs 的理化性质、结合活性及体外杀伤效能,本研究旨在揭示抗体类型与 DAR 值对犬类 ADC 功能的影响,并为后续犬源化 ADC 的临床转化提供理论依据和潜在候选分子。

1 实验材料和方法

1.1 实验设备

本研究所用主要仪器包括:AKTA avant 25 层析系统(Cytiva,美国)、ACQUITY BioAccord LC-MS 超高效液相液质联用仪(Waters,美国)、FACS Canto II 流式细胞仪(BD,美国)、Powerpac 电泳仪及 Gel DocTM EZ Imager 凝胶成像系统(Bio-Rad,美国)、超高效液相色谱系统 UPLC(Waters,美国)、Evolution 300 紫外分光光度计(ThermoFisher Scientific,美国)、SpectraMax M5 酶标仪(Molecular Devices,美国)、Biacore T200 表面等离子共振仪器(GE Healthcare,美国)、MICROCAL VP-CAPILLARY DSC 仪器(Malvern,美国)。

1.2 实验材料

C4 反相色谱柱(Waters, ACQUITY UPLC Protein BEH C4 (1.7 μm , 2.1 $\times$ 50 mm, 美国);分子排阻色谱柱(Waters, ACQUITY UPLC[®] Protein BEH SEC Colimn, 200 nm, 1.7 μm , 4.6 mm $\times$ 150 mm, 美国)。关键试剂包括:抗犬类 PD-L1 高亲和力 A 单抗及低亲和力 T 单抗(上海张江生物技术有限公司)、Deruxtecan, Dxd-Linker 复合物(MCE, 美国)、组织蛋白酶 B(MCE, 美国)、三(2-羧乙基)膦酸盐(Tris(2-carboxyethyl)phosphine, TCEP, 分析纯)(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、Mabcapture-R 重组耐碱蛋白 A 层析介质(上海迈泰君奥生物技术有限公司)、Series S Sensor Chip CM5(Cytiva)、Cell Counting Kit-8(CCK-8)试剂盒(GLPBIO)、RPMI1640/DMEM 培养基(上海张江生物技术有限公司)等。缓冲体系采用 pH 6.0 磷酸盐缓冲液(PB)及 HEPES 溶液(Sigma, 分析纯)。

1.3 细胞系

犬乳腺肿瘤细胞系(PETCC2478)和犬头部隆突性皮肤纤维瘤细胞系(PETCC2477)均由公益组织 PETCC(全球宠物培养物保藏中心)提供。A549 为人 PD-L1 阳性肿瘤细胞系和 MC38(鼠源结肠癌细胞系)

均由上海迈泰君奥生物技术有限公司提供。

1.4 方法

1.4.1 ADC 制备、表征及稳定性分析。(1) 抗体还原与偶联:用移液器量取 1 mg A 单抗和 T 单抗,按抗体 TCEP 1 : 20 的摩尔比即 14 μL 加入 10 mM TCEP,然后用 50 mM PB 将还原体系补至 500 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 300 rpm 振荡 1.5 h。取 7.2 μL Deruxtecanc(抗体药物摩尔比 1 : 20),加入反应体系,混匀后 37 $^{\circ}\text{C}$ 300 rpm 振荡 6 h 即得 ADC(结构见图 1)。采用 G25 脱盐柱脱盐至 pH 6.0 的 PB 缓冲液用于后续实验。通过调节偶联参数(药物/抗体摩尔比、反应时间)获得 DAR 值为 2、4、6、8 的 ADC 样品,详细条件见表 1。

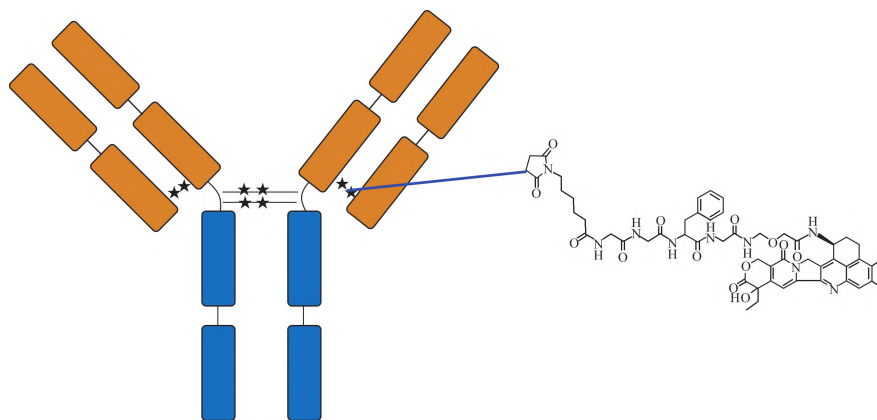


图 1 抗 PD-L1 ADC 结构示意图

Fig. 1 Structural diagrams of two different anti-PD-L1 ADC

(2) DAR 值检测:使用紫外分光光度法进行 DAR 值测定。基于抗体在 280 nm 的特征吸收峰和连接子药物复合物在 370 nm 处的特定吸收特征,将待测 ADC 样品用 PB 缓冲液稀释至 0.5~1.0 mg/mL 浓度范围,分别记录 280 nm (A_{280}) 和 370 nm (A_{370}) 处的吸光值。根据 Beer-Lambert 定律建立的双波长定量模型,通过式(1)计算 DAR 值^[31]

$$\text{DAR} = \frac{[A_{280} - \text{ADC}\epsilon_{Ab} - 370 - A_{370} - \text{ADC}\epsilon_{Ab} - 280 / (\epsilon_D - 280\epsilon_{Ab} - 370 - \epsilon_D - 370\epsilon_{Ab} - 280)]}{[A_{280} - \text{ADC}\epsilon_D - 370 - A_{370} - \text{ADC}\epsilon_D - 280 / (\epsilon_{Ab} - 280\epsilon_D - 370 - \epsilon_{Ab} - 370\epsilon_D - 370)]}, \quad (1)$$

其中 $\epsilon_{Ab370}=2042$: 抗体在 370nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{Ab280}=234900$: 抗体在 280nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{D280}=6650$: 药物复合物在 280 nm 处的摩尔消光系数; $\epsilon_{D370}=19000$: 药物复合物在 370 nm 处的摩尔消光系数。

(3) 质谱分析(LC-MS):采用 ACQUITY UPLC Protein BEH C4 色谱柱,80 $^{\circ}\text{C}$ 柱温下进行梯度洗脱(0.1%甲酸水溶液/0.1%甲酸乙腈溶液,B 相 10%~95%,12 min),正离子全扫描模式(m/z 400~7000),通过 UNIFI 软件进行去卷积分析(分子量误差 $\pm 50\text{ppm}$)。

(4) SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分析:非还原电泳采用 10% 分离胶,还原电泳采用 12% 分离胶。样品稀释至 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$,每孔上样 2 μg ,电泳条件为 100 V,20 min 后 200 V,45 min。考马斯亮蓝染色后,使用 Image Lab 软件分析条带。

(5) 尺寸排阻色谱谱二聚体(SEC):色谱柱为 ACQUITY UPLC C^{TM} Protein BEH SEC Colimn,200 nm,1.7 μm ,4.6 mm $\times$ 150 mm,流动相为含 15% 异丙醇的 200 mmol/L 磷酸盐缓冲液,流速:0.2 mL/min;检测波长 280 nm。数据由 Epower3 软件处理分析。

(6) 差示扫描量热法(DSC):将 DAR 值为 0、2、4、6、8 的 ADC 稀释至 0.8 mg/mL 的浓度,以 PBS 作为空白对照,扫描范围 10~100 $^{\circ}\text{C}$ (升温速率 80 $^{\circ}\text{C}/\text{h}$)。数据经 MicroCal Analysis Launcher 软件分析。

1.4.2 肿瘤微环境响应性连接子释放机制分析。取 DAR 值为 8 的 ADC,分别置换到 50 mmol/L 醋酸盐

表 1 不同 DAR 值抗犬 PD-L1 ADC 偶联工艺参数优化

Tab. 1 Optimization of conjugation parameters for anti-canine PD-L1 ADCs with varied DAR values

抗体/药物/(mol $\cdot$ mol $^{-1}$)	偶联时间/h	DAR
1 : 4	4	2
1 : 6	4	4
1 : 10	5	6
1 : 15	6	8

缓冲液和 pH 为 7.35 的 PBS 中,其中醋酸模拟弱酸性环境,PBS 模拟常规血液环境。醋酸盐缓冲液加入 5 $\mu\text{g/mL}$ 的组织蛋白酶 B,PBS 溶液不加酶同处理,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴酶切 4 h。水浴完离心取上清进行质谱亚单位检测,检测参数同上。

1.4.3 重组犬类 PD-L1 蛋白制备。基于 NCBI 数据库犬 PD-L1 序列,通过密码子优化构建 pL101 表达载体,HindIII/NheI 双酶切位点载体构建,与小鼠 Fc 片段融合表达,采用 ExpiCHO-Sh 瞬时表达系统转染 14 天后,经 Mabcapture-R 蛋白 A 亲和层析纯化,最终获得可溶性犬 PD-L1-Fc 融合蛋白。

1.4.4 抗体及 ADC 功能评估。(1) 细胞结合试验:将犬 PD-L1 蛋白(10 $\mu\text{g/mL}$,1.4.2 步骤制备)包被于酶标板(pH 9.6 碳酸盐缓冲液,37 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 h),封闭后依次加入梯度稀释抗体(初始浓度 50 $\mu\text{g/mL}$,2 倍比稀释,10 个稀释度)、HRP 标记二抗及显色液,酶标仪测定 450/630 nm 吸光值。数据由 SoftMax Pro 6.3 采集,GraphPad Prism 分析。(2) 表面等离子共振 (SPR) 亲和力检测:在 CM5 传感芯片固定 500 RU 犬 PD-L1 蛋白,以 HBS-EP 为缓冲液,根据亲和力不同,采用多循环(A 单抗)和单循环(T 单抗)模式进行动力学分析,数据经 Biacore T200 Evaluation Software 拟合获得 KD 值。(3) 流式检测:将 PETCC2478 和 PETCC2477 细胞($1.5\times 10^6/\text{mL}$),与梯度浓度抗体共孵育(45 min,避光),洗涤后加入 FITC 标记二抗(45 min,冰浴),流式细胞仪检测,FACSDiva Software 软件分析。(4) 细胞毒性实验:将肿瘤细胞($5\times 10^3/\text{孔}$)与梯度浓度 ADC 共培养 72 h,CCK-8 法测定 450 nm 吸光值,通过 GraphPad Prism 计算 IC_{50} 值。

2 结果与讨论

2.1 ADC 的制备、初步表征及稳定性分析

本研究采用新一代肿瘤微环境响应性连接子,将新型拓扑异构酶 I 抑制剂 Dxd 与抗犬 PD-L1 单抗进行偶联,成功制备了 DAR 值 0~8 的系列抗犬 PD-L1 ADC(A 单抗 ADC 分别命名为 A,A-2,A-4,A-6,A-8;T 单抗 ADC 分别命名为 T,T-2,T-4,T-6,T-8),肿瘤微环境响应型连接子的特异性裂解依赖于特异性蛋白酶。相较于传统的 ADC 的载药量限制^[19],本研究通过工艺优化获得高 DAR 值 ADC,结合肿瘤微环境响应性连接子,可能显著提升对肿瘤微环境的渗透杀伤能力^[32-33],展现了强的旁观者效应。

表 2 ADC DAR 值确认

Tab.2 ADC determination of DAR values for anti-canine PD-L1 ADCs

系列	UV 法(吸光值)		DAR	质谱法(加权峰积%)	DAR
	280 nm	370 nm			
A-2	0.47	0.15	4.70	452.80	4.50
A-4	0.69	0.31	6.60	651.40	6.50
A-6	0.50	0.23	6.80	720.20	7.20
A-8	0.40	0.23	8.50	787.80	7.90
T-2	0.51	0.12	3.40	240.20	2.40
T-4	0.50	0.17	5.00	560.40	5.60
T-6	0.32	0.15	6.90	666.20	6.70
T-8	0.43	0.23	7.80	750.30	7.50

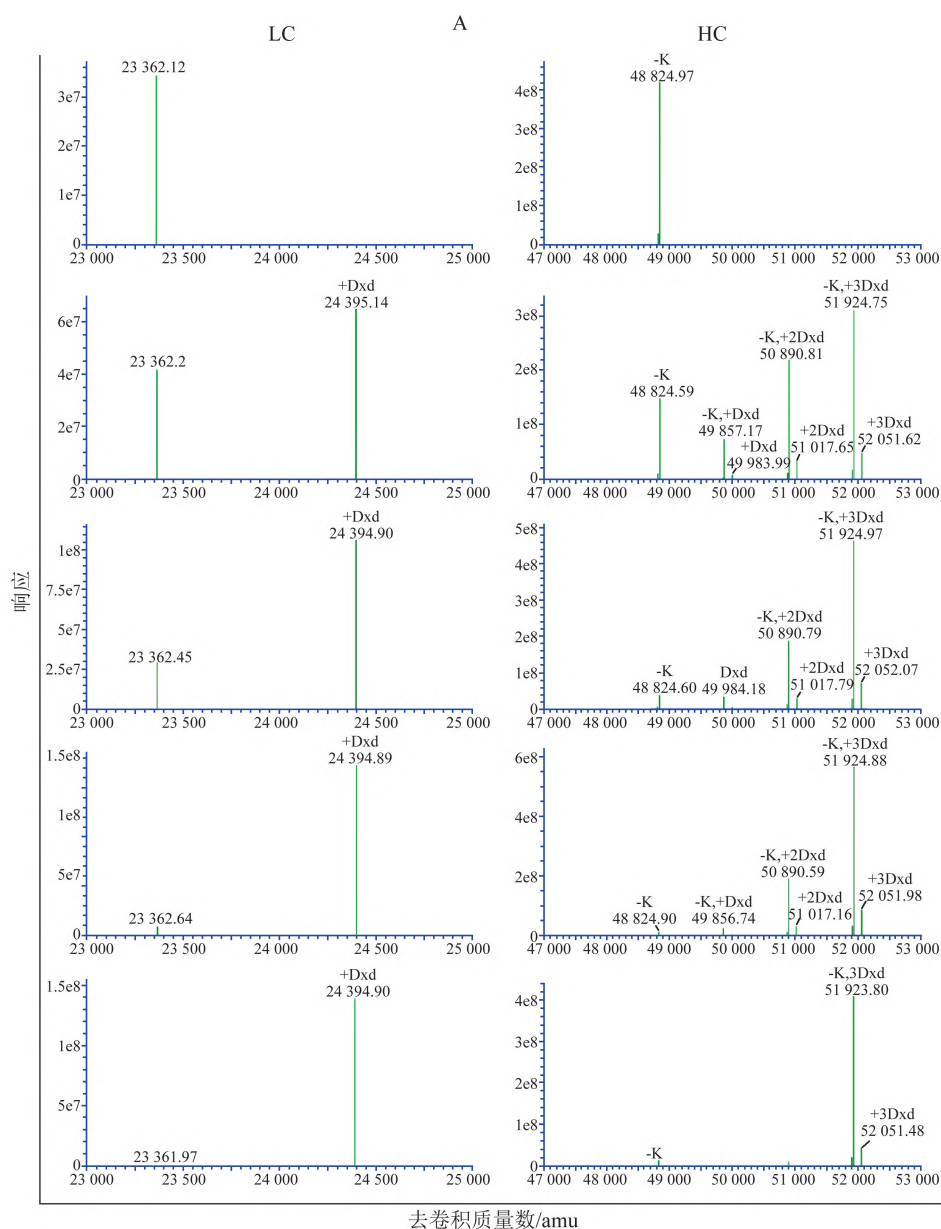
为确保不同 DAR 值的 ADC 具有良好的可比性,本团队在工艺控制中,充分还原了链间二硫键,确保偶联位置具有一定的随机性,从而排除了偶联位点偏差对后续功能比较的干扰。通过紫外光谱法和质谱分析(表 2,图 2)对 DAR 值进行了验证,结果表明各 ADC 的载药量符合设计预期。值得注意的是,质谱结果显示,低 DAR(≤ 4)值样品呈现明显的轻重链异质性,随着 DAR 值增加,游离的链间巯基逐渐被偶联,而呈现更高的均一性,这和团队设计的工艺预期相符,为不同 DAR 值之间的可比性提供了保障。

高 DAR 值的 ADC 有着更好的均一性,所以团队使用 DAR 值为 8 的 ADC 进行肿瘤微环境连接子特异性切割实验,实验结果(图 3)显示肿瘤微环境连接子在模拟酶环境下被部分切割,而在 PBS 等接近血液环境中不会释放毒素,因此可以在增加疗效的基础上,减少了 ADC 的脱靶毒性及对机体的毒副作用。其潜在机制为,肿瘤微环境响应型连接子通过特异性酶解实现精准药物释放,减少非靶向毒性及脱靶耐药风险;强旁观者效应可有效杀伤邻近低抗原或耐药性肿瘤细胞,突破抗原异质性限制,同时改善免疫微环境,协同激活

免疫^[34-35]。

为进一步验证工艺的可靠性,避免偶联过程影响抗体的纯度,团队进一步进行了 SEC 与 SDS-PAGE 分析,结果显示(图 4),所有 DAR 值 ADC 样品的聚体含量均低于 3%,证明偶联过程未显著破坏抗体结构完整性,低 DAR 值样品的偶联异质性并未对纯度产生显著影响。非还原电泳显示分子量随 DAR 值增加,二硫键逐渐被占据,分子量分布趋于均一。还原电泳结果则显示,随着 DAR 值增加,两种抗体重链条带有一定的分子量增加趋势,符合理论预期。所有 DAR 值 ADC 均呈现大小均一的上下两个条带,说明偶联过程未造成共价聚体的生成。初步表征结果显示各 DAR 值 ADC 符合预期,均具有较好的纯度。

为了验证各 DAR 值 ADC 进一步的成药性,以及偶联和抗体因素对 ADC 的热稳定性影响,团队进行了 DSC 分析(图 5,表 3),分析结果揭示了抗体类型与 DAR 值对 ADC 构象稳定性有双重影响。不管是高亲和力的 A 抗体还是低亲和力的 T 抗体,不同 DAR 值的偶联均导致 T_m 和 T_m Onset 相较未偶联抗体有所下降。而且随着 DAR 增高,偶联均一性的提升,特别是在 DAR 8 时,相对于低 DAR 值,两抗体均表现出 T_m Onset 显著提升。而其在 T 抗体上, T_m 也显著提升。说明新型连接子的偶联,高 DAR 值未造成 ADC 的稳定性风险。不同抗体对于结构稳定性的影响也不同。A 抗体虽然比 T 抗体在未偶联状态下,具有更高的 T_m 以及 T_m Onset,但随着偶联 DAR 值的提升,A-8 和 T-8 具有类似的 T_m 和 T_m Onset,表明 T 抗体在高 DAR 值偶联中表现出更大的优势。



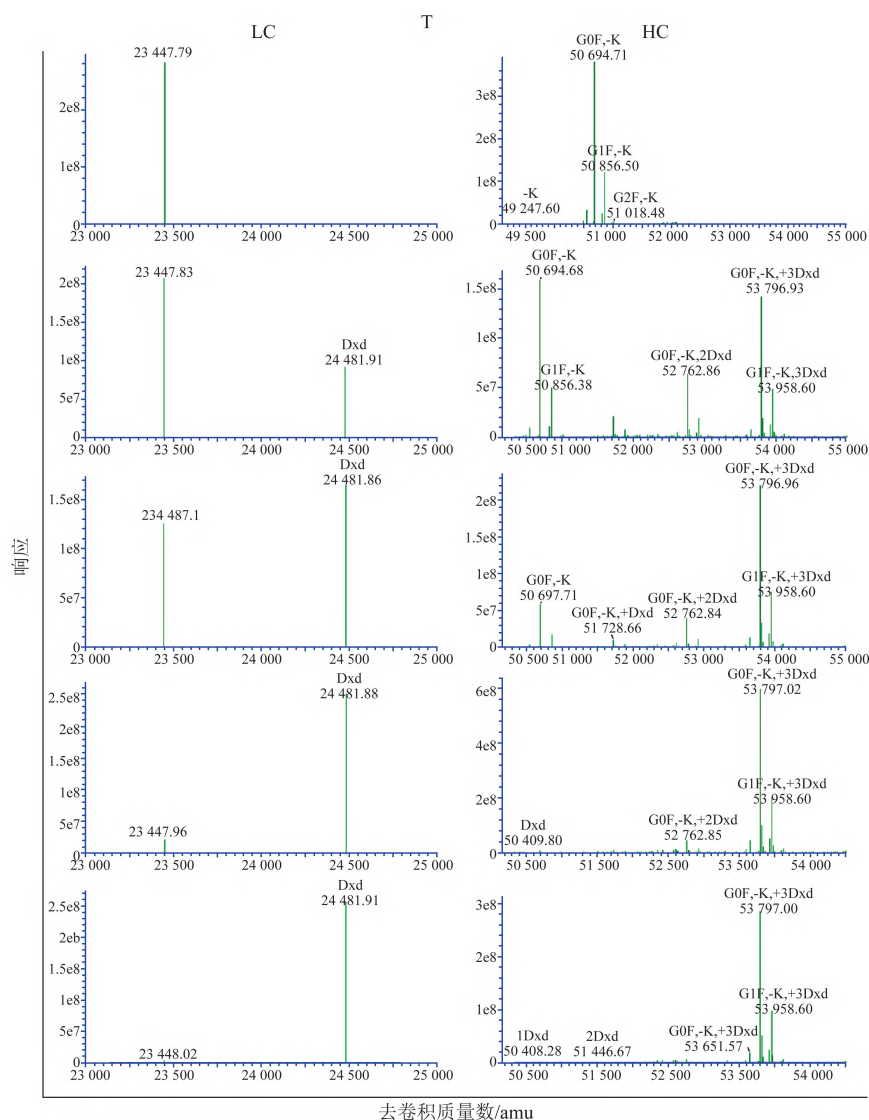
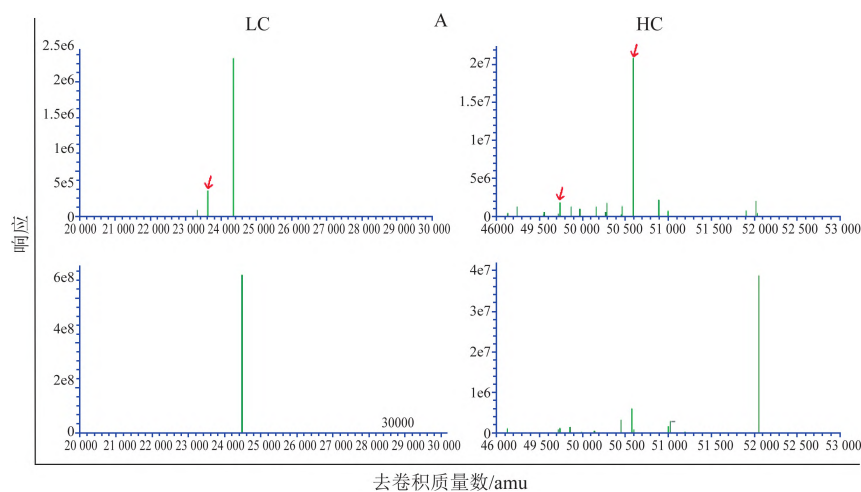


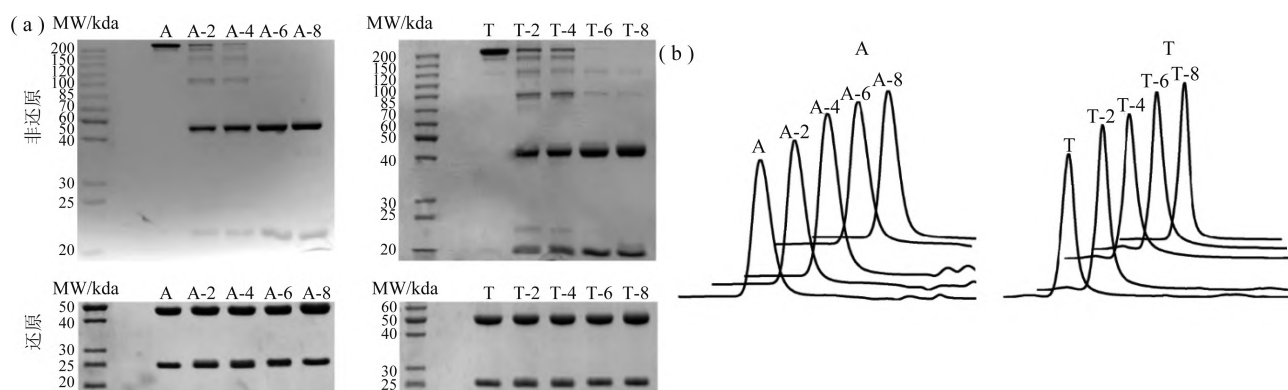
图 2 基于质谱的 ADC 药物偶联效率验证高(上)/低(下)亲和力抗犬 PD-L1 抗体偶联 Dxd 后去卷积质谱图
Fig. 2 Mass spectrometry validation of drug conjugation efficiency deconvoluted mass spectra of high (up)/low-affinity (low) anti-canine PD-L1 antibodies conjugated with Dxd



注:A 为 DAR 值为 8 的 A 单抗 ADC, 上为加酶酶切质谱图, 下为不加酶酶切质谱图。

图 3 基于质谱的 ADC 连接器毒素释放机制 A 单抗去卷积质谱图

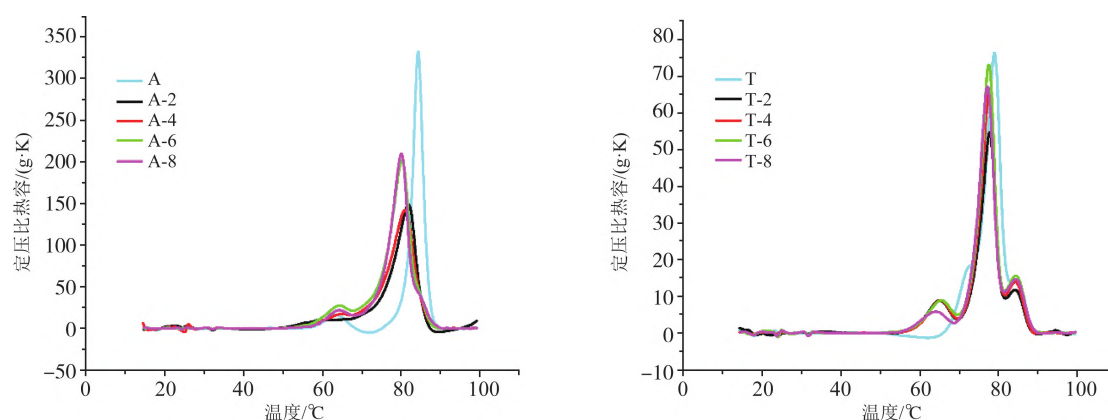
Fig. 3 Mass spectrometry-based analysis of ADC linker toxin release mechanism: deconvoluted mass spectrogram of monoclonal antibody A



注:(a) 非还原/还原 SDS-PAGE 分析;(b) SEC-HPLC 检测显示所有 ADC 聚体含量<3%。

图 4 ADC 初步表征

Fig. 4 Preliminary characterization of ADCs



注: ADC 0.8 mg/mL, 10~100 °C, 80 °C/h。

图 5 DSC 热稳定性分析

Fig. 5 DSC analysis

2.2 抗体及 ADC 靶向结合特性分析

为了评估抗体对于犬类 PD-L1 的靶向结合特性,团队通过真核表达制备了犬类 PD-L1 蛋白,该系统能够保留了 PD-L1 蛋白的糖基化翻译后修饰,这对其功能至关重要^[36-38]。为了确认 ADC 与犬类肿瘤 PD-L1 的结合特异性^[25,39-40],团队通过 ELISA 及 SPR 检测,如图 6(a~d),确认了高亲和力 A 抗体和犬类 PD-L1 的结合亲和力可达 0.3 nmol/L 级别,而 T 抗体则与犬类 PD-L1 的亲和力约为 μ M 级别。值得注意的是,对于犬类细胞膜上的 PD-L1,高低亲和力的 A 抗体还是 T 抗体,在一定浓度下,均能饱和结合图 6(e)。这种表面结合能力与溶液相检测结果的差异,可能源于:(1) 细胞膜表面 PD-L1 的构象异质性;(2) T 单抗对糖基化修饰表位的识别偏好;(3) 肿瘤微环境中辅助蛋白对表位暴露的调控作用。该现象提示在 ADC 功能评价中需综合多维度结合检测数据。

本研究还分析了不同 DAR 值的偶联对抗体和 PD-L1 结合性能的影响,结果显示(表 4),偶联对于 PD-L1 的结合活性影响不明显。经过初步表征及靶向特性分析,为后续的活性评估提供了基础。

表 3 基于 DSC 的抗犬 PD-L1 ADC 热力学稳定性分析

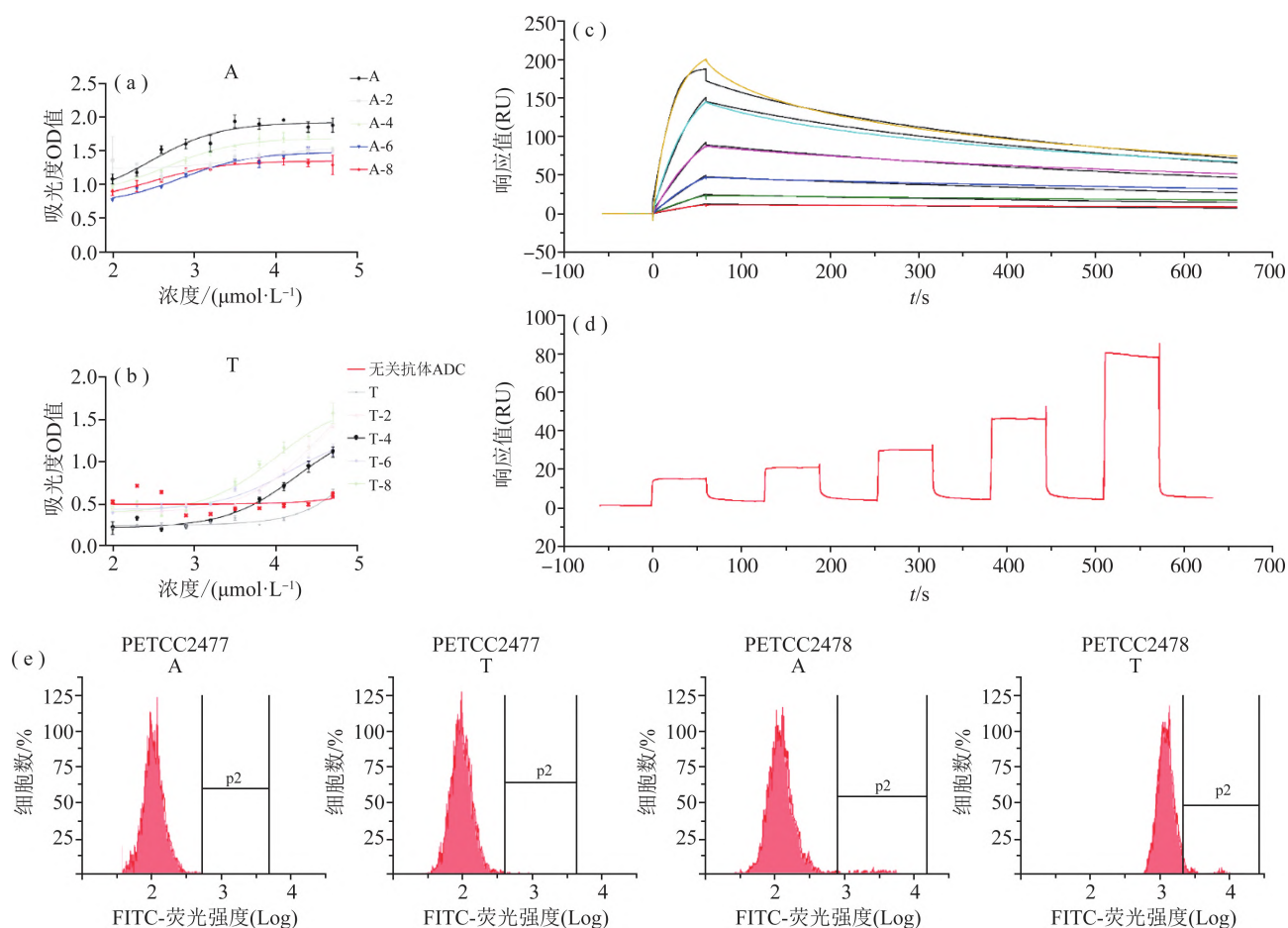
Tab. 3 Thermodynamic stability analysis of anti-canine PD-L1 ADCs via DSC

抗体	T _m 1/°C	T _m Onset/°C
A	84.45	76.85
A-2	81.80	52.52
A-4	81.08	54.17
A-6	80.27	56.35
A-8	80.05	58.15
T	79.02	67.18
T-2	64.98	55.59
T-4	65.65	55.14
T-6	65.73	52.10
T-8	77.30	57.63

2.3 体外抗肿瘤活性评价

CCK-8 实验表明,如图 7(a、b),ADC 的细胞杀伤效能呈现明显的 DAR 值依赖性:DAR 6-8 ADC 对 PETCC2478 细胞的杀伤效能较 DAR2-4 显著提升。细胞杀伤结果显示,其中杀伤活性随 DAR 值的提升而增加,且不受抗体类型和亲和力影响,两个抗体具有相似的 DAR 值依赖性表现。考虑到 A 抗体和 T 抗体均和人 PD-L1 具有高亲和力,本研究进一步在人细胞系和鼠源细胞系中进行评估,结果具有类似性,如图 7(c)。值得注意的是,尽管 T 单抗和犬 PD-L1 溶液相亲和力较低,其 DAR 为 8 ADC 仍展现出与 A 抗体 ADC 相当的杀伤效果,这可能归因于:(1)抗原交联效应;(2)连接子裂解释放的游离 Dxd 通过旁观者效应杀伤邻近低抗原细胞;(3)膜表面多价结合补了单一位点亲和力不足;(4)不同的内存特性可能补偿亲和力的不足。具体机制尚需进一步研究。基于 T 单抗在膜表面结合中的优势,其亲和力优化可通过抗体工程策略实现,后续研究中,在抗体犬源化的过程中同步引入突变策略,系统性调节 T 单抗的亲和力与功能特性,可进一步提升 ADC 的治疗指数^[41-42]。同时,低亲和力抗体也有其潜在优势,T 单抗(低亲和力)的膜表面结合能力或可减少因高亲和力导致的“结合位点屏障效应”,从而改善穿透性。

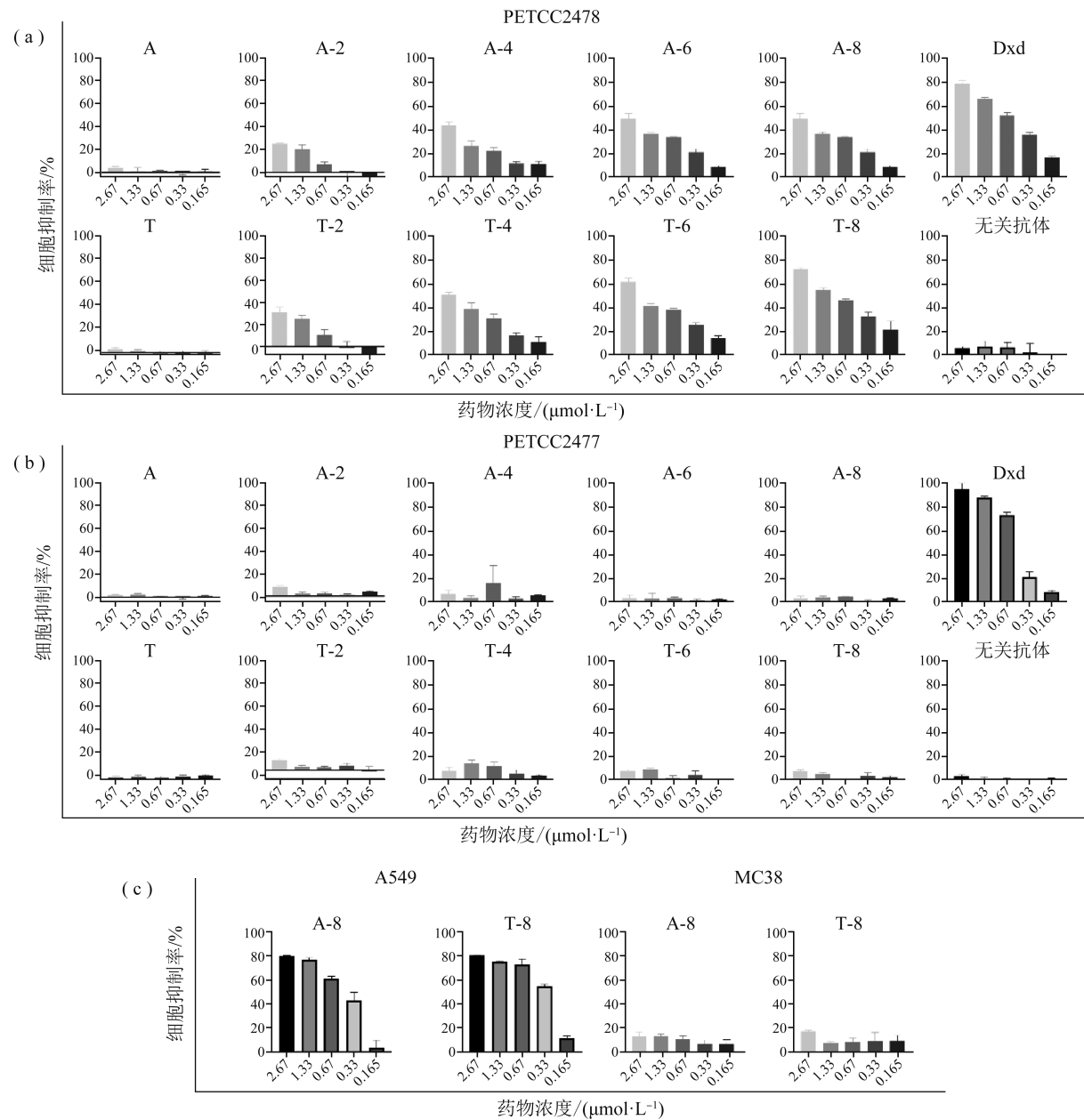
对照实验证实,无关抗体 ADC 及低游离 Dxd 均未表现显著细胞毒性,证明杀伤作用具有靶向特异性。ADC 通过抗体靶向递送与 Dxd 的高效旁观者效应协同作用,解决了游离 Dxd 系统毒性高、肿瘤蓄积不足的局限性,为犬类肿瘤治疗提供了更优策略。同时,这也说明不同的抗体对于 ADC 的活性具有一定的影响,不同的亲和力并不是评估 ADC 性能的唯一可靠指标。



注:(a) A 单抗 ELISA 结合曲线;(b) T 单抗 ELISA 结合曲线;(c) A 单抗 SPR 动力学分析(Biacore T200 Evaluation 软件);(d) T 单抗 SPR 动力学分析(Biacore T200 Evaluation 软件);(e) 流式细胞术验证膜表面结合(FACSDiva 软件)。

图 6 两种抗体与犬类 PD-L1 蛋白结合活性评价

Fig. 6 Multidimensional evaluation of targeting efficacy



注:(a) 不同 DAR 值 ADCs 犬 PD-L1 阳性表达肿瘤细胞的增殖抑制率;(b) 不同 DAR 值 ADCs 对犬 PD-L1 阴性表达肿瘤细胞的增殖抑制率;(c) ADCs 对人源 PD-L1 阳性和鼠源 PD-L1 阴性肿瘤细胞的跨物种活性验证。

图 7 抗犬 PD-L1 ADC 的体外细胞毒性评估

Fig. 7 In vitro cytotoxicity evaluation of anti-canine PD-L1 ADCs

3 结论

本研究通过高低亲和力两种抗犬 PD-L1 抗体 ADC 的制备,系统地探讨了 DAR 值和抗体类型对 ADC 稳定性和活性的影响。首次证实了高 DAR 值新型 PD-L1 ADC 在犬类肿瘤治疗中的可行性,其独特优势包括:(1) 肿瘤微环境响应型连接子实现精准药物释放;(2) Dxd 的高效旁观者效应突破抗原异质性限制;(3) 载药量调控可平衡稳定性与药效。尽管 T 单抗的溶液相结合能力有待优化,但其膜表面活性提示通过抗体工程(如表位优化、Fc 改造)可进一步提升治疗指数。这些发现为犬源化 ADC 的转化提供了重要理论依据和技术路径。

表 4 不同 DAR 值的 ADC 亲和力

Tab. 4 Affinity of ADCs with different DAR values

抗体	亲和力/($\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)
A	2.79E-10
A-2	3.214E-10
A-4	2.860E-10
A-6	3.033E-10
A-8	3.150E-10
T	5.068E-5
T-2	1.813E-7
T-4	3.864E-7
T-6	2.138E-7
T-8	2.087E-7

参 考 文 献

- [1] ZHU Z Y, JIN Y G, ZHOU J, et al. PD1/PD-L1 blockade in clear cell renal cell carcinoma: mechanistic insights, clinical efficacy, and future perspectives[J]. *Molecular Cancer*, 2024, 23(1): 146.
- [2] LIN X, KANG K, CHEN P, et al. Regulatory mechanisms of PD-1/PD-L1 in cancers[J]. *Molecular Cancer*, 2024, 23(1): 108.
- [3] KIEM D, OCKER M, GREIL R, et al. Enhancing anti-CD274 (PD-L1) targeting through combinatorial immunotherapy with bispecific antibodies and fusion proteins: from preclinical to phase II clinical trials[J]. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2024, 33(3): 229-042.
- [4] GOU Q, DONG C, XU H, et al. PD-L1 degradation pathway and immunotherapy for cancer[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, 11(11): 955.
- [5] LIU B N, GUO H, XU J, et al. Elimination of tumor by CD47/PD-L1 dual-targeting fusion protein that engages innate and adaptive immune responses[J]. *mAbs*, 2018, 10(2): 315-324.
- [6] YANG Y, LI J Q, ZHANG J, et al. PPAB001, a novel bispecific antibody against CD47 and CD24, enhances anti-PD-L1 efficacy in triple-negative breast cancer via reprogramming tumor-associated macrophages towards M1 phenotype[J]. *International Immunopharmacology*, 2025, 144: 113740.
- [7] CHEN X, XU J, GUO Q C, et al. Therapeutic efficacy of an anti-PD-L1 antibody based immunocytokine in a metastatic mouse model of colorectal cancer[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 2016, 480(2): 160-165.
- [8] PEARCE H, NEILL C L, ROYAL K, et al. Can dogs help chickens? Pet owners' willingness to pay for animal welfare-friendly pet food in the United States[J]. *Animal Welfare*, 2023, 32: e11.
- [9] WIDMAR N O, BIR C, SLIPCHENKO N, et al. Online procurement of pet supplies and willingness to pay for veterinary telemedicine [J]. *Preventive Veterinary Medicine*, 2020, 181: 105073.
- [10] DHEIN E S, HEIKKILÄ U, OEVERMANN A, et al. Incidence rates of the most common canine tumors based on data from the Swiss Canine Cancer Registry (2008 to 2020)[J]. *PLoS One*, 2024, 19(4): e0302231.
- [11] NOSALOVA N, HUNIADI M, HORŇÁ KOVÁ L, et al. Canine mammary tumors: classification, biomarkers, traditional and personalized therapies[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(5): 2891.
- [12] STRAKOVA A, MURCHISON E P. The changing global distribution and prevalence of canine transmissible venereal tumour[J]. *BMC Veterinary Research*, 2014, 10(1): 168.
- [13] BERGMAN J P. Cancer immunotherapy[J]. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 2024, 54(3): 441-468.
- [14] LIU B N, GUO H Z, ZHANG J J, et al. In-depth characterization of a pro-antibody-drug conjugate by LC-MS[J]. *Molecular Pharmaceutics*, 2016, 13(8): 2702-2710.
- [15] DONG Y J, ZHANG Z L, LUAN S Y, et al. Novel bispecific antibody-drug conjugate targeting PD-L1 and B7-H3 enhances antitumor efficacy and promotes immune-mediated antitumor responses[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2024, 12(10): e009710.
- [16] YANG Y, GUO Q C, CHEN X, et al. Preclinical studies of a pro-antibody-drug conjugate designed to selectively target EGFR-overexpressing tumors with improved therapeutic efficacy[J]. *mAbs*, 2016, 8(2): 405-413.
- [17] ZANELLO A, BORTOLOTTI M, MAIELLO S, et al. Anti-PD-L1 immunoconjugates for cancer therapy: are available antibodies good carriers for toxic payload delivering? [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13: 972046.
- [18] DUMONTET C, REICHERT J M, SENTER P D, et al. Antibody-drug conjugates come of age in oncology[J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2023, 22(8): 641-661.
- [19] OKAJIMA D, YASUDA S, MAEJIMA T, et al. Datopotamab deruxtecan, a novel TROP2-directed antibody-drug conjugate, demonstrates potent antitumor activity by efficient drug delivery to tumor cells[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2021, 20(12): 2329-2340.
- [20] JO U, MURAI Y, AGAMA K K, et al. TOP1-DNA trapping by exatecan and combination therapy with ATR inhibitor[J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2022, 21(7): 1090-1102.
- [21] LI L, XU M Z, WANG L, et al. Conjugating MMAE to a novel anti-HER2 antibody for selective targeted delivery[J]. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 2020, 24(24): 12929-12937.
- [22] JÄNNE P A, BAIK C, SU W C, et al. Efficacy and safety of patritumab deruxtecan (HER3-DXd) in EGFR inhibitor-resistant, EGFR-mutated non-small cell lung cancer[J]. *Cancer discovery*, 2022, 12(1): 74-89.
- [23] SIDAWAY P. T-DXd improves PFS versus T-DM1[J]. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 2022, 19(5): 283.
- [24] GIUGLIANO F, CORTI C, TARANTINO P, et al. Bystander effect of antibody-drug conjugates: fact or fiction? [J]. *Current Oncology Reports*, 2022, 24(7): 809-817.

- [25] GOLDENBERG D M, CARDILLO T M, GOVINDAN S V, et al. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab go- vitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC)[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(26): 22496-22512.
- [26] MODI S, JACOT W, YAMASHITA T, et al. Trastuzumab deruxtecan in previously treated HER2-Low advanced breast cancer[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2022, 387(1): 9-20.
- [27] 郑慧华. 犬乳腺肿瘤内菌群与消化道菌群的关联及其对肿瘤发展的影响[D]. 长春:吉林大学,2023.
- [28] POWLES T, DURÁN I, VAN DER HEIJDEN M S, et al. Atezolizumab versus chemotherapy in patients with platinum-treated locally advanced or metastatic urothelial carcinoma (IMvigor211): a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial[J]. *Lancet*, 2018, 391(10122): 748-757.
- [29] PANTELYUSHIN S, RANNINGER E, GUERRERA D, et al. Cross-reactivity and functionality of approved human immune checkpoint blockers in dogs[J]. *Cancers (Basel)*, 2021, 13(4):785.
- [30] PAUL S, KONIG M F, PARDOLL D M, et al. Cancer therapy with antibodies[J]. *Nature Reviews Cancer*, 2024, 24(6): 399-426.
- [31] 白露, 陈苗苗, 王远芝, 等. 紫外可见光谱法测定抗体偶联药物药物-抗体偶联比的方法建立和验证[J]. *中国医药生物技术*, 2024, 19(1): 22-29.
- [32] YU X, LONG Y R, CHEN B, et al. PD-L1/TLR7 dual-targeting nanobody-drug conjugate mediates potent tumor regression via eleva- ting tumor immunogenicity in a host-expressed PD-L1 bias-dependent way[J]. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 2022, 10(10): e004590.
- [33] FUJII T, MATSUDA Y. Novel formats of antibody conjugates: recent advances in payload diversity, conjugation, and linker chemistry [J]. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 2023, 23(11): 1053-1065.
- [34] CHANG H L, SCHWETTMANN B, MCARTHUR H L, et al. Antibody-drug conjugates in breast cancer: overcoming resistance and boosting immune response[J]. *The Journal of Clinical Investigation*, 2023, 133(18).
- [35] JIANG M X, LI Q H, XU B. Spotlight on ideal target antigens and resistance in antibody-drug conjugates: Strategies for competitive ad- vancement[J]. *Drug Resistance Updates*, 2024, 75: 101086.
- [36] BENICKY J, SANDA M, BRNAKOVA KENNEDY Z, et al. PD-L1 glycosylation and its impact on binding to clinical antibodies[J]. *Journal of Proteome Research*, 2021, 20(1): 485-497.
- [37] WANG Y N, LEE H H, HSU J L, et al. The impact of PD-L1 N-linked glycosylation on cancer therapy and clinical diagnosis[J]. *Jour- nal of Biomedical Science*, 2020, 27(1): 77.
- [38] 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.
- [39] GUO Y, SHEN Z Y, ZHAO W B, et al. Rational identification of novel antibody-drug conjugate with high bystander killing effect a- gainst heterogeneous tumors[J]. *Advanced Science (Weinh)*, 2024, 11(13): e2306309.
- [40] CHOI J W, WITHERS S S, CHANG H, et al. Development of canine PD-1/PD-L1 specific monoclonal antibodies and amplification of canine T cell function[J]. *PLoS One*, 2020, 15(7): e0235518.
- [41] YU X T, ORR C M, CHAN H T C, et al. Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody agonism[J]. *Nature*, 2023, 614(7948): 539-547.
- [42] HANNING K R, MINOT M, WARRENDER A K, et al. Deep mutational scanning for therapeutic antibody engineering[J]. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2022, 43(2): 123-135.

(责任编辑:刘庆松)