基于 MALDI 质谱成像的肿瘤内游离载荷时空分布研究：对抗体 - 药物偶联物药物抗体比优化的启示

IMScope-041

摘要： 在抗体偶联药物（ADC）的药物抗体比（DAR）优化中，较低的 DAR 值配合较高的抗体剂量被认为能改善肿瘤渗透，但其对最终有效载荷释放的影响尚不明确。本文利用成像质谱显微镜（iMScope QT），对比了等摩尔载荷剂量给药条件下，不同 DAR 值（DAR4、DAR8）ADC 药物荷瘤小鼠肿瘤组织内游离载荷的空间分布特征，结果发现，不同 DAR 值的 ADC 在肿瘤内释放的有效载荷在强度和分布模式上高度一致，且给药 24 h 的载荷信号强度略高于 2 h。这表明肿瘤内的有效载荷释放和分布是决定疗效的关键，而非单纯的抗体渗透深度。本研究为 ADC 药物的 DAR 优化提供了直接的空间分布依据。

关键词： 成像质谱显微镜　有效载荷　ADC　DAR　空间分布

技术特点：

- ❖ 首次利用 MALDI-MSI 技术直接对比了不同 DAR 值 ADC 在肿瘤组织切片中的游离载荷原位分布，可特异性区分肿瘤内游离活性载荷与抗体结合态载荷，直观获取载荷原位空间分布信息，弥补 LC- MS/MS 匀浆定量无空间维度、免疫组化无法分辨载荷存在形态的短板。
- ❖ 具备高空间分辨成像能力，能够同步对比不同给药时长、不同 DAR 值 ADC 的载荷时空分布规律，直接关联组织载荷水平与药效响应，为 ADC 分子机制研究提供可视化依据。

抗体偶联药物（ADC）的药物抗体比（DAR）是影响其药代动力学和组织分布的关键参数。传统的观点认为较低的 DAR 配合较高的抗体剂量能改善肿瘤渗透，但其对最终有效载荷释放的影响尚不明确。前期药效实验显示，在等摩尔载荷剂量给药条件下，DAR4 型与 DAR8 型 ADC 抑制肿瘤效果相近；多项机制研究也表明，决定 ADC 抗肿瘤疗效的核心是肿瘤内游离载荷 * 的水平。因此，亟需能够原位、空间分辨观测载荷释放的分析技术。目前的评估方法，如组织匀浆 LC-MS/MS，只能提供整体含量数据，丢失了关键的空间分布信息；而免疫组化（IHC）虽然能展示抗体分布，却无法区分结合态与游离态的有效载荷。

为阐明 DAR 优化背后的机制，本研究采用成像质谱显微镜（iMScope QT），对小鼠等摩尔载荷剂量给药条件下，不同 DAR 值 ADC 药物肿瘤内游离载荷的空间分布进行了解析，结果显示，给药后 2 h 与 24 h 时，DAR4 和 DAR8 组肿瘤内游离载荷的信号强度和分布模式相近，证实肿瘤组织内游离载荷水平是决定体内抗肿瘤效果的核心因素。本研究为生物活性有效载荷的动态变化和空间分布提供了直接的可视化依据，为临床前 ADC 研发中疗效决定因素的解析提供了强有力的平台。

* 本文所述“游离载荷”，指 ADC 经内吞进入肿瘤细胞、连接子裂解后在肿瘤组织内解离产生的活性载荷，区别于血液循环中提前非特异性解离的游离载荷。

■ 实验部分

1.1 仪器

成像质谱显微镜 iMScope QT

1.2 仪器参数

分　析　模　式：正离子模式
像　素　间　距：25 μm*25 μm
激　光　能　量：55（范围 0-100）
扫　描　频　率：5000 Hz
检 测 器 电 压：2.8 kV
激　　光　　器：355 nm YAG 激光器
激光照射直径：10 μm
激光照射次数：200 shots
扫　描　范　围：m/z 500-600

1.3 试剂与样品

基质：CHCA（α- 氰基 -4- 羟基肉桂酸）。

标准品：DXd 类载荷药物标准品（载荷药物结构为百济神州企业专有，浓度为 50 μg/mL）。

样品：小鼠 H1975 细胞异种移植模型肿瘤组织，共包括三组：空白对照组（注射 20 mM 组氨酸缓冲液）、DAR8 组（3 mg/kg DAR8 ADC 给药 ）、DAR4 组（6 mg/kg DAR4 ADC 给药），其中 DAR8 组与 DAR4 组为等摩尔载荷剂量给药。小鼠在给药后 2 h、24 h 安乐处死，完整剥离肿瘤组织，液氮速冻保存。

1.4 样品前处理

冰冻切片：使用冷冻切片机（徕卡 CM1950）制作切片（厚度：10 μm）后，固定在导电载玻片上，干燥。

基质涂敷：使用岛津基质升华仪 iMLayer 在样品切片表面进行基质涂敷，CHCA 基质沉积厚度设定为 0.7 μm，升华温度为 220℃。然后用喷笔在切片表面均匀喷洒 200 μL 基质溶液（0.8%（w/v）CHCA 溶解于 50% ACN 水溶液中）。

1.5 数据分析

所有采集的数据均使用 IMAGEREVEAL MS 软件进行数据可视化和相对定量分析，质量误差设定为 10 ppm。为最大化检测灵敏度，质谱成像图中对分析物相关离子（+H、+K、+Na）的信号进行相加。

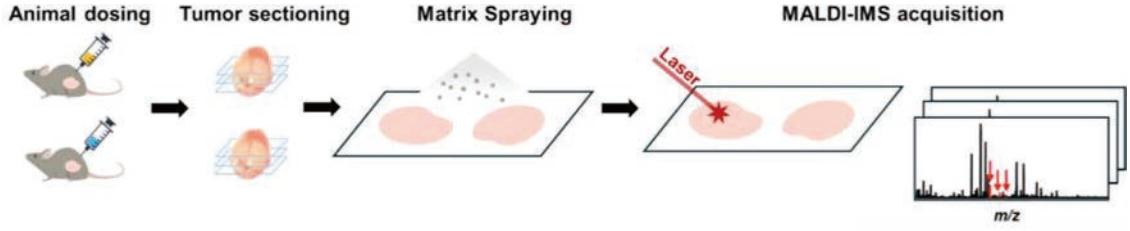

图 1　样品分析流程

■ 结果与讨论

2.1 载荷药物标准品分析与基质条件的筛选优化

质谱采集过程中，载荷药物可产生质子化分子离子，同时产生信号强度相近的钠离子、钾离子加合峰（图 2A）。为提升检出效果，本研究将载荷药物全部特征离子（m/z 536.2186、558.2009、574.1747）的叠加信号用于成像对比分析。为解决检测灵敏度不足的问题，分别以 DHB、CHCA、9-AA、1,5-DAN、DCTB、蒽三酚为基质，测试 DXd 类载荷药物标准品在正、负离子模式的质谱响应，进行基质条件筛选。结果显示，目标分析物在 CHCA 正离子模式下电离效率最高（图 2C），选定 CHCA 为最优基质。

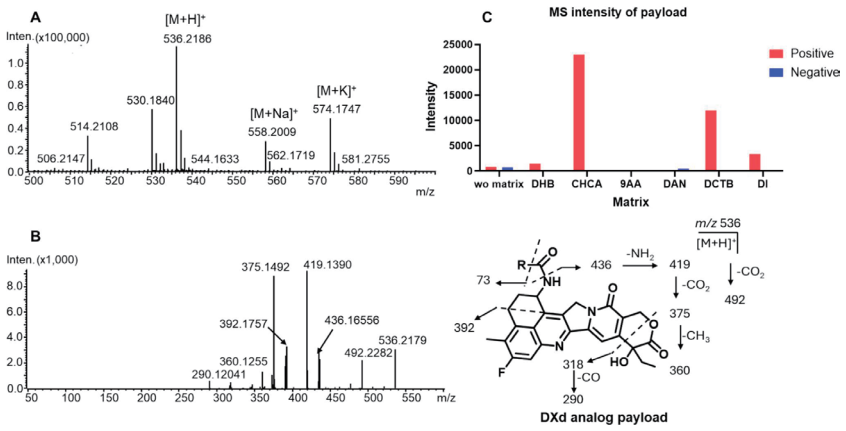

图 2　DXd 类载荷药物标准品的结构式、质谱图及不同基质下标准品质谱信号强度对比

A：采用 CHCA 基质开展 MALDI 成像质谱检测所得载荷药物标准品的完整一级质谱图（取代基 R = C_4H_9O-，理论质子化分子离子峰 $[M+H]^+$ 质荷比 m/z 536.2191）；B：载荷药物标准品的二级碎片质谱图；C：正、负离子模式下使用不同基质检测该载荷药物（m/z 536.2186）得到的质谱信号强度对比。

以空白给药组肿瘤切片作为阴性对照，验证当前检测条件下无本底干扰；直接在组织切片点涂纯载荷标准品作为阳性对照。阴性对照组几乎无检出信号（图 3B），证明本方法特异性良好。

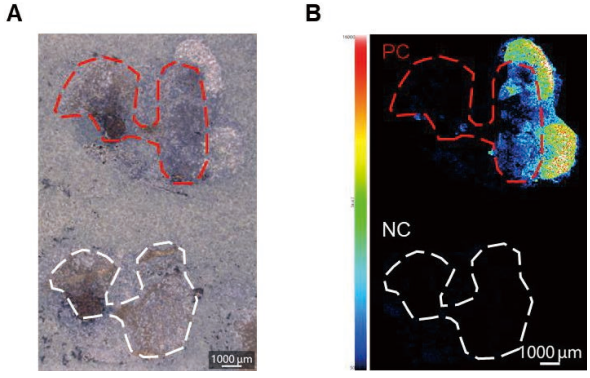

图 3　空白给药组肿瘤切片的光学明场图像（A）与 MALDI 成像质谱测得的载荷药物分布成像图（B）

（红色虚线框区域为滴加载荷标准品的空白组织切片，作为阳性对照（PC），在切片右侧滴加 2 µL 浓度 50 µM、溶于二甲基亚砜（DMSO）的载荷药物标准溶液；白色虚线框区域为未做处理的空白组织切片，作为阴性对照（NC）。成像所用离子信号为载荷药物全部相关特征离子的叠加信号（ m/z536.2186、558.2009、574.1747））

2.2 肿瘤组织内游离载荷药物的空间分布

完整 MALDI 成像流程包含组织制备、基质涂布、质谱信号采集。同一时间点 DAR4、DAR8 组肿瘤切片放置在同一块靶板检测，消除批次间质谱信号波动；依据组织光学图像划定感兴趣区域（ROI）（图 4）。载荷药物的质谱成像分布图与明场组织光学图如图 4 所示。成像结果显示，药物分子在肿瘤内部均匀分布，与药效标志物免疫组化结果一致 [1]，质谱成像图分子离子信号与组织学边界完全对应，DAR4、DAR8 给药组肿瘤内药物

信号强度相近，给药 24 h 的载荷信号强度略高于 2 h，该变化趋势与肿瘤匀浆 LC-MS/MS 定量结果完全一致[1]，证实空间分辨成像与整体组织药代定量数据可相互印证。本研究可特异性区分肿瘤内游离活性载荷与抗体结合态载荷，直观获取载荷原位空间分布信息，同时这套检测体系可实现 ADC 载荷释放、组织分布的时空动态与机制层面系统评估。

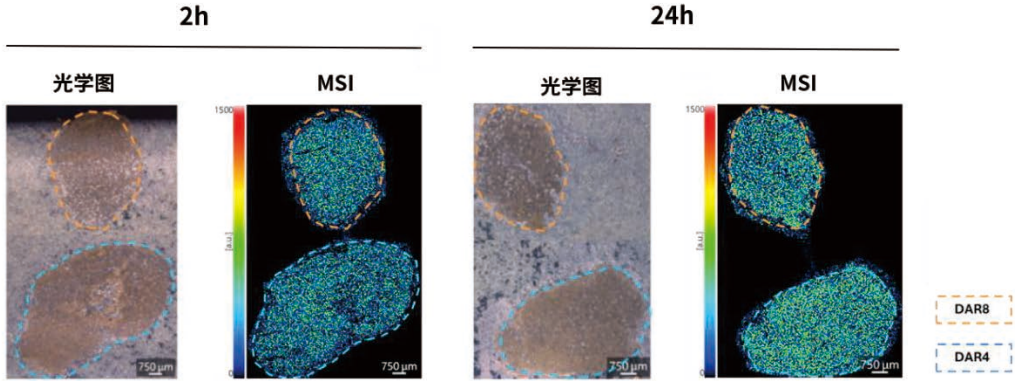

图 4　ADC 给药 2 小时和 24 小时后肿瘤切片的光学图像及有效载荷分布

（橙色点黄色虚线区域是 3 mg/kg 剂量 DAR8 ADC 给药组，蓝色点线区域是 6 mg/kg 剂量 DAR4 ADC 给药组。采用载荷药物全部特征离子叠加信号进行成像分析（m/z 536.2186、558.2009、574.1747）。）

结论

本研究基于 MALDI 成像质谱平台检测 DAR4、DAR8 ADC 给药后肿瘤切片内游离载荷药物的时空分布。经优化的 MALDI-IMS 方法可高灵敏检出微量游离载荷，无论 ADC DAR 数值高低，肿瘤内载荷药物分布都均匀一致；DAR4、DAR8 两组载荷信号定量无显著区别，该结果与肿瘤匀浆药代定量、统一药效结果相互印证。本研究建立的 MALDI 成像载荷图谱技术，为 ADC 理性分子设计提供不可或缺的空间分析工具，将行业优化思路从“仅关注抗体分布”转向“聚焦肿瘤微环境内载荷释放动态”。该方法可指导结构活性优化，优先保障靶向位点游离载荷有效递送，为新一代 ADC 研发提供可落地的转化研究策略。

❖ 本研究由百济神州（北京）生物科技有限公司和岛津分析中心合作完成，研究成果已发表在《The AAPS Journal》：

[1] Cai T , Li Z , Yan Q ,et al. Spatiotemporal Profiling of Intratumoral Free Payload Distribution via MALDI Imaging Mass Spectrometry: Implications for Drug-to-Antibody Ratio Optimization in Antibody–Drug Conjugates[J].The AAPS Journal, 2026, 28(3).DOI:10.1208/s12248-026-01235-w

岛津应用云

岛津企业管理（中国）有限公司 –分析中心
Shimadzu (China) Co., LTD. – Analytical Applications Center

Email: dr_jin@shimadzu.com.cn　Tel: 86(21)34193983　http://www.shimadzu.com.cn