

## Stunner 极速解析 ADC 光谱以测定 DAR 值

### 简介

通过 UV/Vis 吸光度表征 ADC (抗体偶联药物) 是确定抗体浓度与药物-抗体比 (DAR) 最快捷、最简单的方法。此法特别适合需要在多个实验室间标准化的方法，或在筛选大量样品（早期发现与工艺开发阶段）时使用。然而，当您面对那些对抗体、药物或连接子光谱并非了然于胸的样品时，分析道路上往往会出现不少坑洼。传统的 UV/Vis DAR 值判定通常依赖于已知的药物-连接子吸收光谱与精确的摩尔消光系数，方法才能真正成熟可用，而许多 ADC 的药物与抗体吸收光谱太过相似，令经典的双波长法变得棘手——无论是方法开发还是分析读数都会更难把控。

Stunner 配备了足够的脑力、速度与灵活性，能胜任各种 ADC、偶联的片段抗体 (fAb) 或其他蛋白偶联体的 DAR 值分析（见图 1）。借助先进的光谱拆分算法，Stunner 可以将高度重叠的 ADC 光谱解卷积，提取出蛋白与药物-连接子两部分的吸收贡献——即便事先没有任何光谱信息也能搞定。这一策略使得即便对高度重叠的光谱或缺乏药物-连接子先验光谱的样品，也能实现分析。



图 1: Stunner 是一款为生物制剂打造的基于板式的动态光散射和紫外/可见光分析工具

如果您偏好更传统的做法，Stunner 的双波长应用 (ADC Dual Wvl) 支持经典的

双波长 DAR 值分析；而当已知药物–连接子光谱时，ADC Quant 应用可将完整光谱信息用于 DAR 值分析，相较仅依赖两波长可提升稳健性并减少误差。

鉴于聚集是 ADC 开发中的常见难题，每一个基于 UV/Vis 的 ADC 应用都可与动态光散射 (DLS) 联用，在同一次测量中同时筛查粒径并检测聚集体。

本应用说明演示了 Stunner 如何将 ADC 表征变得更简单：只需 2  $\mu$ L 样品、每次检测不到 1 分钟、并以 96 孔板自动化友好的形式快速、精确地给出抗体浓度、DAR 值、粒径与聚集信息。

## 材料与方法

用于本工作的试剂包括：曲妥珠单抗 (Trastuzumab, HY-P9907)、曲妥珠单抗–emtansine (HY-P9921)、曲妥珠单抗–deruxtecan (HY-138298A)、曲妥珠单抗–vedotin (HY-164992)、纳拉图珠单抗 (HY-P99374)、纳拉图珠单抗–emtansine (HY-132260)、吉妥珠单抗 (HY-P9997)、吉妥珠单抗–ozogamicin (HY-109539)，均购自 MedChemExpress。

本研究使用了 Stunner (型号：900–2003)、Stunner 板 (型号：701–2125) 以及 Stunner 客户端和分析软件 v10.1 (图 2)。实验设置和分析中使用了 ADC Quant、ADC Dual Wvl 和 ADC Decode 应用程序。

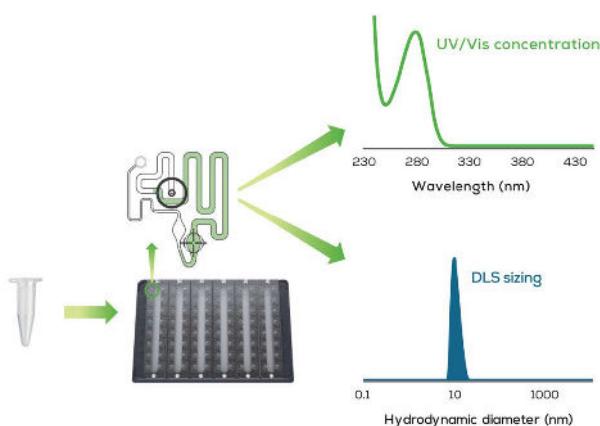


图 2：在支持自动化的 96 孔 Stunner 板中的微流控回路可以从 2  $\mu$ L 样品中收集紫外/可见光浓度、粒径和多分散指数 (PDI) 测量数据

## 结 果

### 回归基础

量化抗体浓度、药物–连接子浓度与 DAR 值的最基础方法仍依赖对两种分子在

UV/Vis 吸收行为的充分认知。若已知抗体与药物在两波长处的单位摩尔消光系数 ( $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ ), 即可通过解线性方程组计算出 DAR 值与两项浓度值。Stunner 的 Dual Wvl 应用可自动执行这些计算, 支持手动输入消光系数, 或直接调用已在 Stunner 软件中保存的 Analytes 值。

图 3 展示了 ADC Dual Wvl 在测定三种以曲妥珠单抗为母体的 ADC (曲妥珠单抗-emtansine、-deruxtecan、-vedotin) 时, 对抗体浓度、药物浓度与 DAR 值的一致性。若文献中可得摩尔消光系数, 则可直接采用。样品以 1:2 稀释系列测量, 覆盖 8 倍浓度范围 (起始抗体浓度分别为 4.8、5.0 与 2.9 mg/mL)。测得的药物与 mAb 浓度比在各样品与稀释步骤间保持 1.89–2.17; DAR 值在稀释间稳定分布于 0.98–1.04, 展现出极佳的线性与精密度。

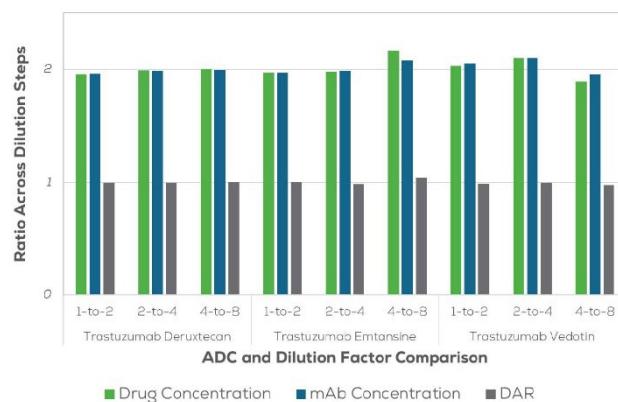


图 3: 在 1:2 稀释系列中, 抗体浓度和药物浓度均按 2 倍递减, 而 DAR 保持不变。样品通过 ADC Dual Wvl 应用进行测量

但在大批样品或对尚未充分表征的分子进行分析时, 确定正确的摩尔消光系数往往很困难。溶剂间 (如有机溶剂 vs 水相) 消光系数不可直接互换, 且药物与抗体间显著的光谱重叠会使得确定消光系数变得不切实际。此类情况下, 需要一种更灵活、更智能的分析策略。

### 解码 ADC 光谱

当摩尔消光系数与光谱未知时, Stunner 的 ADC Decode 应用可直接读取 ADC 的吸收光谱, 并利用强大的 Unmix 算法拟合出最合适的蛋白光谱成分, 同时可视化出潜在的药物-连接子吸收光谱。

在用 ADC Decode 测量 ADC 吸光度时, Stunner 通常会从其 analyte 库里调用

一个蛋白（通常是抗体）光谱作为参照。如果样品中抗体浓度本身未知，其可能取值区间由 ADC 的总体吸光度上限至 0 (见图 4)。ADC Decode 利用 280–300nm 区域与色氨酸相关的吸收特征来确定最佳拟合与最优抗体浓度。

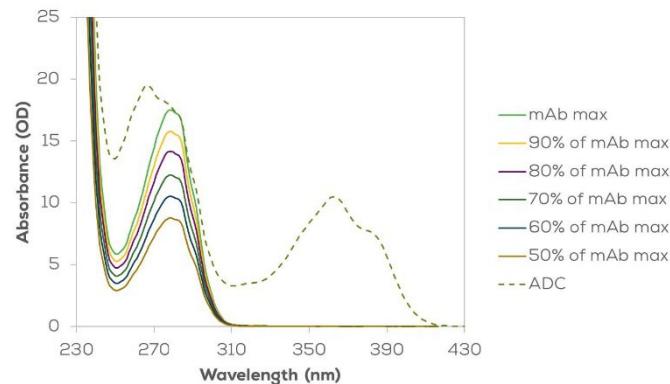


图 4：可以从 ADC (虚线, 曲妥珠单抗–deruxtecan) 吸光光谱中提取的蛋白质 (单抗) 光谱范围。每条线表示不同的蛋白质浓度可能，并对应不同的互补药物–连接子光谱 (未显示)

基于所测得的 ADC 光谱，ADC Decode 算法可寻找最佳匹配解并确定抗体浓度及相应的药物–连接子吸收谱。图 5 展示了对曲妥珠单抗–emtansine、–deruxtecan、–vedotin 进行解码后得到的谱线；右侧附图显示药物成分光谱在所有三重复中叠合得很精准。进行四重复分析时，药物吸光度的变异系数 (CV) 分别为 0.6%、0.5% 与 0.6%；测得 DAR 值的 CV 则分别为 0.5%、0.2% 与 0.5%，说明了测定的高精密度。

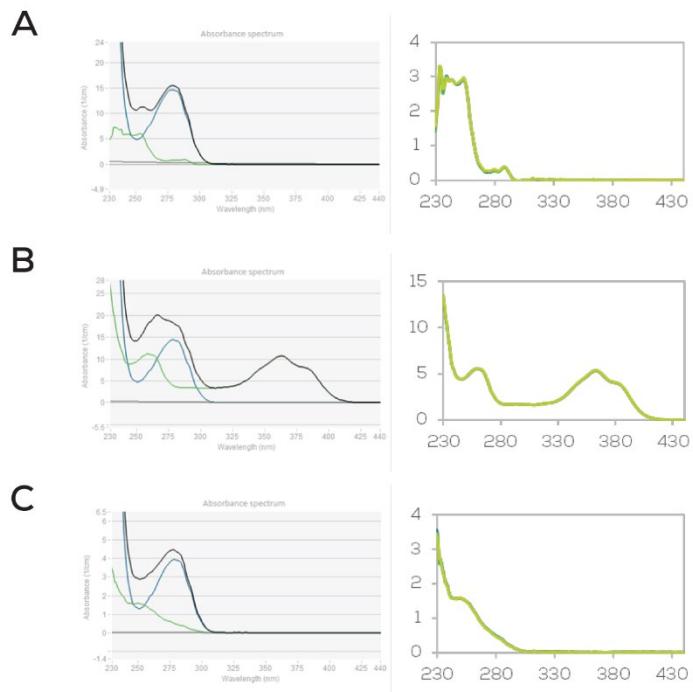


图 5: 使用 ADC 解码分析曲妥珠单抗–emtansine (A)、曲妥珠单抗–deruxtecan (B) 和曲妥珠单抗–vedotin (C) 时得到的光谱 (左)。附图 (右) 显示了药物成分光谱在所有三重复样中的精确叠加

鉴于早期化合物常缺乏摩尔消光系数, Stunner 的 ADC 应用也支持仅基于吸光度信息进行相对比较。例如上述实例中, 曲妥珠单抗–emtansine 在疏水相互作用色谱 (HIC) 测得 DAR 值为 3.6, 而 Stunner 测得为 3.3; 如果无法获得消光系数, 亦可采用药物谱与蛋白谱吸光度之比 ( $A_{252\text{nm}}/A_{280\text{nm}}=0.48$ ) 来比较工艺步骤、偶联条件或批次差异。

上文所述的三种曲妥珠单抗系 ADC 的 1:2 稀释系列已在 ADC Decode 与 ADC Dual Wvl 应用下并行分析 (见图 6)。未偶联曲妥珠单抗的抗体浓度测量 CV 为 0.2% (未列示); 而曲妥珠单抗–emtansine、–deruxtecan、–vedotin 的抗体浓度 CV 分别为 0.4%、0.3% 与 0.4%。DAR 值测量也表现精确: 最高浓度样本的 CV 在 0.5–1.4% 之间, 最低浓度样本在 0.8–4.3% 之间。

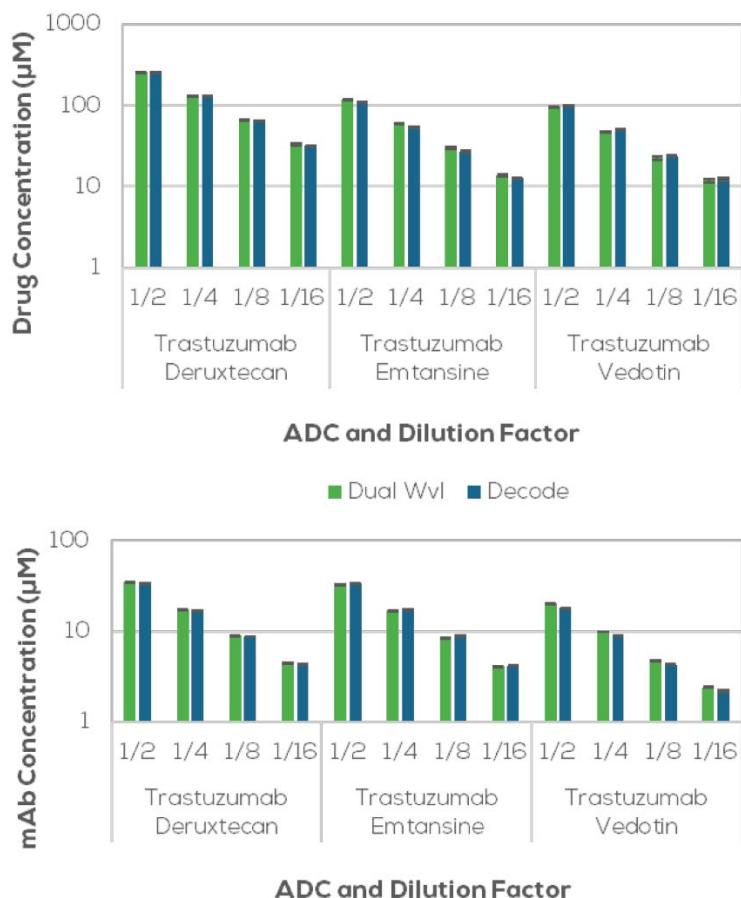


图 6: 在 1:2 稀释系列中, 对于三种曲妥珠单抗衍生的 ADC, 当通过 ADC Decode 和 ADC Dual Wvl 应用测量时, 抗体浓度和药物浓度呈线性下降。y 轴采用对数刻度, 以便在低浓度下更清晰地显示

### 解码+粒径测量

使用 ADC Decode + Sizing 应用, 可同时用 DLS 评估三种 ADC 的原始浓度下的粒径与聚集情况(图 7)。测得平均水合动力学直径: 曲妥珠单抗-emtansine 为  $11.8 \pm 0.4 \text{ nm}$ 、曲妥珠单抗-deruxtecan 为  $14.3 \pm 0.5 \text{ nm}$ 、曲妥珠单抗-vedotin 为  $10.2 \pm 0.8 \text{ nm}$ 。质量分布的重叠与可重复性表明样品主体质量在尺寸上是一致的; 但较大的 deruxtecan 尺寸提示可能存在聚集, 值得进一步调查。这类快速的聚集筛查有助于识别导致聚集的工艺或配方条件。

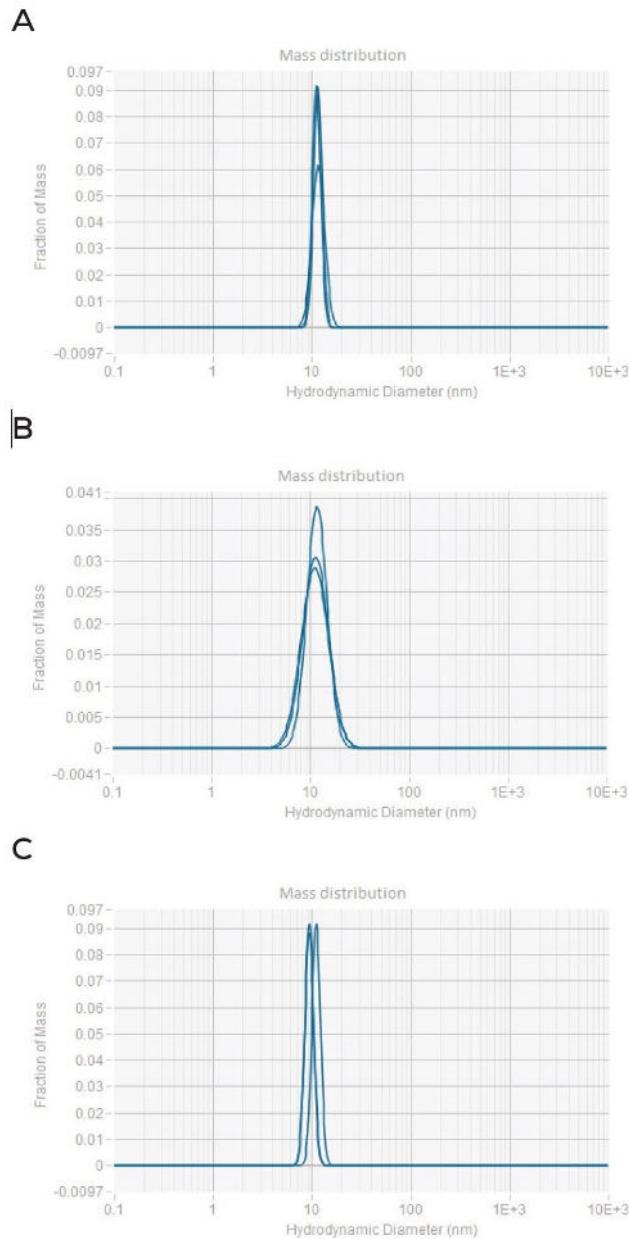


图 7: 通过 DLS 分析获得的曲妥珠单抗–emtansine (A)、曲妥珠单抗–deruxtecan (B) 和曲妥珠单抗–vedotin (C) 的质量分布, 每个样品均使用 ADC Decode + Sizing 应用程序进行三次测量

### ADC Quant

Stunner 的最终 ADC 工具是 ADC Quant (如含 DLS 则为 ADC + Sizing)。ADC Quant 能将先前实验中保存到 Stunner 数据库的抗体与药物光谱调入测量, 基于这些已知谱进行更准确的谱解卷积与抗体/药物谱确定。与双波长法相比, 使用完整的药物与抗体光谱来评估浓度通常被视为 ADC Quant 方法的一大优势。

## 结 论

Stunner 将稳健的 UV/Vis 分析与敏感的 DLS 尺寸测定合并在一次仅需 2 $\mu$ L 的测定中，极限提升了 ADC 表征的可能性。无论是用 ADC Decode 解开重叠光谱、用 ADC Dual Wvl 或 ADC Quant 应用套用已知光谱数据，还是通过增加 DLS 做聚集筛查，Stunner 在 ADC 开发流程中始终提供准确与精密的结果。凭借极小的样本用量、超简便的工作流程与快速的数据采集，Stunner 为 ADC 表征带来了全新的视角。

## 参考文献

1. Chen, Y. Drug-to-Antibody Ratio (DAR) by UV/Vis Spectroscopy. In Antibody–Drug Conjugates; Ducry, L., Ed.; Humana Press: Totowa, NJ, 2013; pp 267–273.
2. McKertish, C.; Kaysar, A. Novel Dual–Payload ADC for the Treatment of HER2+ Breast and Colon Cancer. *Pharmaceutics* 2023, 15(8), 2020.
3. Pozniak, A.; et al. The cytotoxic conjugate of highly internalizing tetravalent antibody for targeting FGFR1–overproducing cancer cells. *Molecular Medicine* 2021, 27(46).
4. Kim, M. T.; et al. Statistical Modeling of the Drug Load Distribution on Trastuzumab Emtansine (Kadcyla), a Lysine–Linked Antibody Drug Conjugate. *Bioconjugate Chemistry* 2014, 25(7), 1223–1232.
5. Nakatsuji, M.; et al. Human Lipocalin–Type Prostaglandin D Synthase–Based Drug Delivery System for Poorly Water–Soluble Anti–Cancer Drug SN–38. *PLOS ONE* 2015, 10(11), e0142206.



**Unchained Labs**  
4747 Willow Road  
Pleasanton, CA 94588  
Phone: 1.925.447.5853  
Toll-free: 1.800.815.6384  
Email: info@unchainedlabs.com

© 2026 Unchained Labs. All rights reserved. The Unchained Labs logo, Stunner and Stunner logo are trademarks and/or registered trademarks of Unchained Labs. All other brands or product names mentioned are trademarks owned by their respective organizations.

Rev A