抗体偶联药物中药物 - 抗体比的检测方法以及均一性的设计策略

樊梦妮，张婷婷，秦国宏 *
（南京正大天晴制药有限公司，芳华药物研究院，江苏南京 210046）

摘要：药物 - 抗体比（DAR）是抗体偶联药物的核心质量属性，直接影响其疗效、安全性和药代动力学特性。文章系统总结了 DAR 的检测方法及均一性 ADC 的优化策略。现有检测技术包括疏水作用色谱、反相高效液相色谱、质谱法、紫外 - 可见光谱法及新兴的多维液相联用技术等。在均一性优化方面，工程化定点偶联（如 THIOMAB、酶催化偶联等）可实现 DAR 的精确控制；连接子的亲水性修饰与有效载荷结构的优化，均有助于提高载药量并维持抗体稳定性。确定最佳 DAR 时，需综合考虑靶标表达、肿瘤异质性及有效载荷性质等因素。该文可为 ADC 的工艺开发与质量控制提供参考。

关键词：抗体偶联药物；药物 - 抗体比；抗肿瘤药；检测方法；偶联策略；均一性；研究进展
中图分类号：R917；R979.1^{+}9　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2026)09-1030-09
引用：樊梦妮, 张婷婷, 秦国宏．抗体偶联药物中药物-抗体比的检测方法以及均一性的设计策略[J]．中国医药工业杂志, 2026, **57**(9): 1030-1038．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2026.09.002

Detection Methods for the Drug-antibody Ratio in Antibody-drug Conjugates and Design Strategies for Homogeneity

FAN Mengni, ZHANG Tingting, QIN Guohong*
(*Fanghua Pharmaceutical Research Institute, Nanjing Chia Tai Tianqing Pharmaceutical Company, Nanjing 210046*)

ABSTRACT: The drug-to-antibody ratio (DAR) is a critical quality attribute of antibody-drug conjugates (ADCs), directly affecting their efficacy, safety, and pharmacokinetic properties. This review systematically summarizes the analytical methods for DAR determination and optimization strategies for homogeneous ADCs. Current detection technologies include hydrophobic interaction chromatography, reversed-phase high-performance liquid chromatography, mass spectrometry, ultraviolet-visible spectroscopy, and emerging multi-dimensional liquid chromatography hyphenated techniques. In terms of homogeneity optimization, engineered site-specific conjugation approaches (e.g., THIOMAB, enzymatic conjugation) enable precise control of DAR. Hydrophilic modification of linkers and optimization of payload structure help improve drug loading while maintaining antibody stability. The optimal DAR should be determined by comprehensively considering target expression levels, tumor heterogeneity, and payload properties. This review provides references for ADC process development and quality control.

Key Words: antibody-drug conjugate; drug-to-antibody ratio; antineoplastics; detection method; conjugation strategy; homogeneity; research progress

抗体偶联药物（antibody-drug conjugate，ADC）是新型靶向治疗药物，被广泛用于治疗多种恶性肿瘤[1]。ADC 由具有靶向性的单克隆抗体与具有细胞毒性的有效载荷或小分子药物，经连接子连接组成[2-3]。与一般化疗药物不同，ADC 在恶性肿瘤治疗中通过单克隆抗体与抗原特异性结合，靶向杀伤肿瘤细胞，从而可显著减少对健康细胞的伤害，降低不良反应风险[4-8]。

1983 年，首个 ADC，抗癌胚抗原抗体 - 长春地

收稿日期：2025-08-12
作者简介：樊梦妮，工程师，硕士，从事新药相关的质量研究。
通信作者：秦国宏，副研究员，博士，从事新药研发工作。

辛偶联物进入临床试验[9]。2000 年，辉瑞公司的吉妥珠单抗奥唑米星（Mylotarg）经 FDA 批准上市，标志着 ADC 的正式诞生，为不能耐受传统化疗不良反应的患者提供了新的治疗策略[10]。目前，ADC 的适应证不仅包括多种恶性肿瘤，而且扩展至其他种类疾病，如动脉粥样硬化、菌血症和炎症性疾病等[11-12]。

药物 - 抗体比（drug-to-antibody ratio，DAR）反映了单个抗体分子所携带的细胞毒性小分子数量。其分析与表征在 ADC 的设计、开发和制造过程中发挥着重要作用。FDA 和 EMA 等药品监管机构已将 DAR 作为 ADC 产品的关键质量属性。由于抗体和毒性小分子间偶联方式的不同，DAR 呈现随机或离散分布特征：赖氨酸偶联型 ADC 因抗体表面存在 80 ～ 90 个可修饰赖氨酸残基，偶联过程呈现随机性，最终产物为 DAR 0 ～ 8 的混合物；而半胱氨酸偶联型 ADC 通过还原抗体的链间二硫键实现定点偶联，理论上可形成 DAR 为 0、2、4、6、8 的离散分布[13]。DAR 与药物稳定性之间的关联呈非线性关系。一般而言，当 DAR 超过 4 时，ADC 分子的疏水性显著增加，易引发聚集，加速体内清除[14]。例如，恩美曲妥珠单抗（T-DM1）中 DAR ⩾ 6 的组分在血浆中的半衰期较 DAR 2 ～ 4 的组分缩短 40% 以上。这种清除速率的差异源于高 DAR ADC 组分更易被肝脏网状内皮系统识别、捕获，同时连接子 - 有效载荷复合物有可能削弱抗体 Fc 段与新生儿 FcRn 受体的结合能力[15]。此外，DAR 升高会加剧脱靶效应。临床前数据显示，DAR 8 的 ADC 在正常组织中的游离毒素释放量是 DAR 4 制品的 2.3 倍[16]。此类脱靶效应可能与有效载荷过早脱落导致的骨髓抑制和肝毒性直接相关。

本文总结了当前代表性的 DAR 分析表征方法，梳理了 DAR 均一性的优化和确定策略，并分析了 ADC 的开发现状和局限性，旨在为 ADC 的研发和质量控制提供研发方向及方法参考。

1 DAR 的检测方法

DAR 的常用测定方法包括 HPLC 法、LC-MS 法和紫外 - 可见光谱（ultraviolet-visible spectroscopy，UV-Vis）法。

1.1 HPLC 法

有效载荷的偶联会改变 ADC 分子内抗体重链（H 链）与轻链（L 链）的疏水性，因此可通过 HPLC 色谱图中的各峰面积计算 DAR。HPLC 法因准确性和可重现性，已被广泛应用于 DAR 分析。DAR 测定通常采用 2 种典型的 HPLC 法：疏水相互作用色谱（hydrophobic interaction chromatography，HIC）- 和反相（reversed phase，RP）-HPLC 法。这 2 种方法均采用 280 nm 吸收波长下测得的峰面积比计算 DAR 值。

1.1.1 HIC-HPLC 法

HIC 法利用偶联不同数量有效载荷的 ADC 的疏水性差异分离异构体，各组分的保留时间与 DAR 值呈正相关。该方法可直接分析完整 ADC，无需预先对样品进行还原处理，且所需样品量少。HIC-HPLC 法被认为是研究半胱氨酸偶联型 ADC 中药物分布、裸抗含量和平均 DAR 的标准方法。

由于 HIC 法可在温和且不变性的条件下分离 DAR 值不同的 ADC，因此不仅可用于测定 DAR，而且可用于 ADC 的分离与纯化。制备型 HIC 技术可通过纯化获得位点特异性和 DAR 均一的 ADC[17]。然而，HIC-HPLC 法所用流动相中低挥发性盐的初始浓度较高，导致其与 MS 分析平台不兼容；且流动相中的高浓度盐通常会对分离度产生负面影响，导致重现性降低。引入异丙醇[18]或乙腈[18-19]作为有机改性剂可改善峰形、提高分离度。此外，采用 HIC 法纯化时，ADC 的回收率较低。通过优化 HIC 流动相的盐浓度、pH 值，以及添加剂和固定相种类，并引入膜色谱[20]等平台，可提高 ADC 的回收率、缩短处理时间、减少缓冲液消耗，改善工艺的可放大性。

1.1.2 RP-HPLC 法

RP-HPLC 法虽然需要对样品进行还原处理，但借助高柱温和含有三氟乙酸的流动相，可提高各组分间的分离度，因而实用性较强。ADC 通常具有 4 个链间二硫键，经还原预处理后会产生 L 链（相对分子质量 25 000）和 H 链（相对分子质量 50 000）的抗体片段。在免疫球蛋白 G（immunoglobulin G，IgG）中，L 链和 H 链在相对分子质量和疏水性方面存在

很大差异，因而可通过 HPLC 法进行分离。在还原条件下，可从色谱图中辨识出未偶联的链亚群（L0、H0）及偶联不同数目小分子的链亚群（L1、H1、H2等），再依据各峰面积比计算链水平 DAR。半胱氨酸偶联型 ADC 的链间二硫键已被破坏，无法进行还原处理；而未经还原预处理的 ADC，其残余链间二硫键可能在 RP-HPLC 分析过程中发生断裂或重排。因此，若色谱图中可观察到 L 链、H 链、轻 - 重链（HL 链）、重 - 重链（HH 链）及重 - 重 - 轻链（HHL 链）等组分的特征峰，应进一步判断上述片段究竟是样品在色谱条件下因化学不稳定性新产生的，还是溶液中原本存在的游离链片段。因此，RP-HPLC 法既适用于还原型 ADC 中 L 链和 H 链药物分布的定量分析，又适用于评价非还原条件下 ADC 链组装体的结构完整性。

在 RP-HPLC 法分析过程中，使用的盐酸胍、二硫苏糖醇（dithiothreitol，DTT），以及高温条件，都可能导致 ADC 降解，从而使测得的 DAR 值低于 HIC-HPLC 法或其他分析方法所得结果 [20-21]。为解决这一问题，Chen 等 [22] 构建了一种基于低疏水性聚甲基丙烯酸甲酯［poly（methyl methacrylate），PMMA］固定相的非变性反相色谱（native reversed phase liquid chromatography，nRPLC）法，采用 50 mmol/L 乙酸铵（pH 7.0）、水和异丙醇为流动相，梯度洗脱，柱温为 30 ℃。以半胱氨酸偶联型 ADC 及维布妥昔单抗（brentuximab vedotin，Adcetris®）为分析对象，联用该 nRPLC 法与 MS 法进行分析，结果证实 DAR 1～8 的 ADC 组分均可在该色谱柱上保持稳定，并可进一步分辨部分 DAR 4 及 DAR 6 的位置异构体。nRPLC 法可直接测定游离抗体含量、平均 DAR 及有效载荷的分布情况，尤其适用于需要提高分离度并获得 MS 结构确证的位点特异性 ADC 的分析。

1.1.3　亲和捕获色谱法

HPLC 法无法识别各 DAR 组分的相对分子质量，通常需与 MS 法结合使用。亲和捕获 LC-MS 法已被广泛用于评估完整 ADC 或 ADC 亚片段在血清及体内的脱偶联、有效载荷代谢、水解等生物转化过程。Srikanth 等 [23] 开发了一种通用的亲和捕获 LC-MS 法，适用于具有不同抗体类型、偶联位点（L 链、H 链 Fab 区及 H 链 Fc 区）和多类连接子 - 有效载荷复合物的 ADC 分析。该方法借助用生物素化抗人抗体包被的链霉亲和素磁珠，对血清样品实施单重或双重亲和捕获；捕获后直接在磁珠上按需酶切，继而还原链间二硫键，生成相对分子质量约为 25 000 的 ADC 亚片段，用于 LC- 飞行时间质谱（time-of-flight mass spectrometry，TOF-MS）检测。与直接分析相对分子质量约 150 000 的完整 ADC 相比，该策略通过降低分析物相对分子质量，显著提升了质谱分辨率与检测灵敏度，克服了依赖特异性抗原或抗独特型捕获抗体的局限。亲和捕获色谱法目前虽主要用于 ADC 的生物转化分析，但其在 DAR 的精准表征方面亦具潜力。

1.2　MS 法

不同 DAR 的 ADC 组分具有不同的质荷比（*m*/*z*），可采用高分辨质谱（high resolution mass spectrometry，HRMS）法识别；根据输出的质谱信号峰强度或峰面积，可计算受试 ADC 的平均 DAR。文献 [24] 报道，HRMS 不仅可区分不同 DAR 值的 ADC，还可以分辨不同糖型及部分低质量差的组分。此外，现代质谱技术平台的多属性同步分析特性大幅提高了检测效率，如 Wang 等 [25] 开发的一种药物脱偶联辅助肽图 LC-MS/MS 法，只需单次肽图分析，即可同时获取偶联位点定位、位点占有率 / 偶联水平、DAR 相关分布、连接子中琥珀酰亚胺环的开环 / 水解状态，以及部分蛋白质翻译后修饰等关键质量属性数据。其技术核心在于，在肽图分析前利用木瓜蛋白酶选择性切除强疏水的有效载荷，同时在抗体骨架上保留连接子的残余基团。这样可有效规避有效载荷偶联肽段因疏水性过强而引发的色谱保留行为异常、电喷雾离子化效率差异及串联质谱碎裂不充分等问题，显著提升了偶联位点鉴定的准确度与位点占有率定量结果的可靠性。在定点偶联 ADC 的开发中，MS 法还能用于监测工程化突变引入的额外修饰（如糖基化变异体），为工艺优化提供多维数据支撑。常用的 MS 法可分为变性与非变性 2 种。

1.2.1 变性质谱法

变性质谱法常使用含有机试剂的流动相和较高的柱温，这些条件可能会破坏 ADC 中由非共价键连接的空间结构。该法常用于赖氨酸偶联型 ADC 的分析。这类 ADC 分子异质性较高，分析前常需进行去糖基化处理或使用羧肽酶去除 C 端赖氨酸，以简化质谱分析过程，便于峰归属分析和平均 DAR 计算。如 RP-HPLC- 四极杆飞行时间串联质谱（quadrupole time-of-flight mass spectrometry，Q-TOF/MS）法，可通过检测不同 DAR ADC 组分的精确质量及去卷积质谱信号，测定待测物的平均 DAR 和有效载荷分布。该方法不要求色谱实现完全分离，所需样品量较低[26]，适用于 ADC 偶联反应的早期条件筛选及实验设计优化。然而，潜在的变性条件（有机相和高柱温）可能导致 ADC 的柱上降解，因此针对结构稳定性较差的抗体（如部分双特异性抗体或掩蔽抗体），需验证 RP-HPLC-QTOF/MS 法的适用性。

1.2.2 非变性质谱法

非变性质谱法采用质谱兼容的挥发性流动相体系、相对较低的柱温，以及温和的电离方式（如电喷雾电离），可在不破坏 ADC 中由非共价键连接的立体空间结构的前提下，使其在气相中最大程度地维持自然折叠状态。因此，非变性质谱法可用于半胱氨酸偶联型和赖氨酸偶联型 ADC 的 DAR 分析。

非变性尺寸排阻色谱 - 质谱（native size exclusion chromatography-mass spectrometry，nSEC-MS）法适用于半胱氨酸偶联型 ADC 的 DAR 值准确定量。Jones 等[27]对 nSEC-MS 法进行了有限的方法稳健性评估，结果显示，ADC 的糖基化状态会影响基于缬氨酸 - 瓜氨酸接头的单甲基奥瑞他汀 E（monomethyl auristatin E）ADC 的 DAR 分析：考察范围为 DAR 2.8 ～ 5.7 时，相比于 HIC 法，保留糖基化的处理方式可导致 nSEC-MS 法测得的 DAR 值被低估约 12%。因此，建议在采用 nSEC-MS 法分析该类半胱氨酸偶联型 ADC 时，先进行去糖基化预处理，以降低糖型异质性造成的定量偏差。值得注意的是，尺寸排阻色谱（size exclusion chromatography，SEC）法对 DAR 不同的 ADC 组分的分离度往往不佳。尽管 MS 法可提供额外的相对分子质量维度信息以辅助鉴别，但仍不足以达到高精确度的 DAR 分析要求。

离子交换色谱法可基于 ADC 的电荷差异实现电荷异构体的分离，与 MS 法联用时可实现 DAR 分析[28]。Matsuda 等[29]采用非变性离子交换色谱 - MS 法，对采用 AJICAP 技术［一类利用 Fc（抗体可结晶片段）亲和试剂对天然抗体开展位点特异性化学修饰的偶联技术］制备的位点特异性 ADC 进行了完整分子分析。该方法可在一次分析中同时完成 DAR 分析和电荷异构体分析。

1.3 UV-Vis 法

采用 UV-Vis 法时无需对样品进行前处理，且可实现大通量检测。UV-Vis 法通过测定 ADC 在 2 个或多个适宜波长处的吸光度值，结合抗体和连接子 - 有效载荷的摩尔吸光系数，计算平均 DAR。但适用 UV-Vis 法检测的 ADC 中的有效载荷需满足 3 个条件：①在紫外 - 可见光区内存在发色团；②最大吸收波长与抗体的主要吸收波长不重叠；③样品中的游离分子、聚集体或其他吸收性杂质不会产生显著干扰。例如，对于 MMAE 类组分，在约 248 nm 处有较强吸收，而其相关 ADC 中的抗体在 280 nm 处有主要吸收峰。上述两类组分的紫外吸收光谱存在一定程度重叠，但在 248 和 280 nm 处的相对吸收贡献不同；在已知相应摩尔吸光系数的条件下，通过双波长 UV-Vis 法可计算 ADC 的平均 DAR。Zong 等[30]采用 UV-Vis 法检测人表皮生长因子 2（human epidermal growth factor receptor 2，HER2）/HER3 双特异性 ADC 在 248 和 280 nm 处的吸光度值，再结合相应的摩尔吸光系数，计算得该 ADC 的平均 DAR 为 3.08。此外，利用 Ellman 试剂能与游离巯基反应、产生 2- 硝基 -5- 巯基苯甲酸（最大吸收波长为 412 nm）的特性，预先使半胱氨酸偶联型 ADC 发生该反应，再用 UV-Vis 法检测 412 nm 处的吸光度值，可间接定量测定游离巯基的残留量，进而推算 ADC 的偶联效率及 DAR 值[31]。

1.4 新兴技术的发展

传统 HIC 法依赖高浓度非挥发性盐缓冲液（如 2.5 mol/L 硫酸铵和 0.1 mol/L PBS），与 MS 检

测系统存在兼容性矛盾。借助二维液相色谱技术，将 HIC 与 SEC 在线耦合，可在第二维度实现快速脱盐并保留蛋白质的完整结构。例如，在线多维 HIC×SEC- 离子淌度（ion mobility，IM）×MS 已被用于 ADC 的概念验证性表征 [32]。该法首先利用 HIC，依据疏水性差异分离具有不同载药水平和 / 或载药位置异构体的 ADC 组分，再通过 SEC 在线脱盐，以消除 HIC 高盐流动相对非变性质谱法的干扰；最后结合 IM 和 MS 法，获得与 ADC 气相构象、离子迁移率及准确相对分子质量相关的多维正交信息。

Kempen 等 [33] 进一步报道了一种简化的在线非变性 HIC-SEC-MS 平台：采用酒石酸铵作为 HIC 流动相中的促盐析组分，以实现不同 DAR 组分的有效分离；再利用超短 SEC 柱和 50 mmol/L 乙酸铵流动相进行在线样品清洁 / 脱盐，最后进行非变性质谱法分析。该法可用于工程化半胱氨酸偶联型 ADC 中不同 DAR 组分的分离和鉴定。

2 DAR 均一性的提升与确定策略

DAR 及其均一性会直接影响 ADC 的有效性、稳定性和安全性。低药物负荷会导致 ADC 效力降低，而高药物负荷会增加 ADC 的毒性和清除速率。因此，需通过选择合适的偶联方式或多因素协同设计，调整 ADC 的 DAR 及其均一性，使 ADC 发挥最大治疗作用。

2.1 偶联方式的选择

传统偶联方法采用表面暴露的赖氨酸或链间半胱氨酸残基作为连接有效载荷的附着位点。IgG 包含约 100 个存在偶联可能性的赖氨酸残基 [34]，而通过赖氨酸偶联的 ADC 异质性强，导致药效不可控性增加。半胱氨酸偶联则发生在 4 个链间二硫键还原后，通常会产生 2 ～ 8 个可用于连接有效载荷的巯基，且多为偶数。因此，半胱氨酸偶联型 ADC 的 DAR 分布相对集中。然而，链间二硫键的破坏可能会降低抗体结构的稳定性。

近期研究显示，工程化定点偶联技术 [35-36]（工程化半胱氨酸残基、非天然氨基酸和酶法等）可制备均一性 ADC，将 DAR 精确控制在 2 ～ 4。例如，THIOMAB 技术（一种位点特异性抗体偶联技术）通过突变 H 链 220 位半胱氨酸（HC-C220S）制备了 DAR 为 2 的均一性 ADC。Dolasynthen 平台采用定点偶联技术，制备了经亲水性结构优化的 MMAE 类似物与连接子的复合物，构建了 DAR 2 ～ 18 的均一性 ADC。在 HER2 异种移植瘤小鼠模型中，该 ADC 显示出具有可比性的药代动力学特征。AJICAP™ 技术则利用 Fc 亲和化合物获得位点特异性偶联的 ADC，再与制备型 HIC 纯化策略相结合，获得了高纯度的、DAR 为 1 和 2 的均一性 ADC[37]。

微生物转谷氨酰胺酶（microbial transglutaminase，mTG）可催化抗体中可及谷氨酰胺残基的 γ- 羧酰胺基，与携带伯胺基团的连接子 - 有效载荷发生反应，形成稳定的异肽键 [38]。通过引入特异性谷氨酰胺标签或设计适宜的谷氨酰胺偶联位点，可实现有效载荷的位点特异性连接，并获得 DAR 可控、组成相对均一的 ADC。Ou 等 [39] 以游离唾液酸化糖链为原料，制备了携带可偶联功能基团的寡糖氧唑啉供体；随后利用具有高效转糖基活性的内切糖苷酶突变体 Endo-S2 D184M，将修饰后的寡糖定向转移至抗体 Fc 区保守的 *N*- 糖基化位点，构建了糖基化位点特异性的均一性 ADC。该策略避免了对抗体氨基酸侧链的随机修饰，可获得偶联位点和 DAR 均较明确的 ADC。采用该策略构建的抗 HER2 ADC 表现出良好的血清稳定性，并对 HER2 过表达的肿瘤细胞呈现出选择性细胞毒性 [40]。

与通过增加抗体修饰数量提高 DAR 的传统策略不同，Dannheim 等 [41] 开发了一种基于 TetraDVP 接头的全二硫键桥接生物偶联平台。该接头可与 IgG1 经还原后暴露的 8 个半胱氨酸残基反应，并且单个接头分子可同时桥接全部 4 个链间二硫键。该平台将 DAR 调控转移至接头分子的模块化设计，在保持抗体与接头 1 ∶ 1 偶联比例不变的条件下，分别在接头上引入 1 ～ 4 个有效载荷的连接手柄，可选择性构建 DAR 为 1 ～ 4 的荧光标记物或细胞毒性有效载荷偶联物。该策略既可通过单一接头实现四对链间二硫键的一体化再桥接，减少多接头随机连接的结构异质性；又可通过增加同一接头上的手柄数目，实现 DAR 的整数化、可预测调节。

这些位点特异性的偶联技术可制备 DAR 明确的 ADC，有效降低异质性，提高了 ADC 的均一性、稳定性和治疗潜力。

2.2 连接子与有效载荷的理化性质协同优化

连接子 - 有效载荷复合物的疏水性是影响 ADC 理化稳定性的关键因素：疏水性较强的有效载荷或连接子可增加 ADC 的表面疏水性，而较高的 DAR 会进一步放大这一效应，导致 ADC 聚集倾向增加、溶解性和制剂稳定性下降 [42]，并限制了临床可耐受的 DAR 水平。通过在连接子中引入 PEG、带电基团或两性离子等亲水性结构，可部分掩蔽有效载荷，减弱疏水性，降低聚集风险，同时还支持高 DAR ADC 的构建。戈沙妥珠单抗（IMMU-132）可靶向滋养层细胞表面抗原 -2（trophoblast cell-surface antigen 2，TROP-2），由人源化抗 TROP-2 单抗 hRS7、可水解连接子 CL2A 和伊立替康的活性代谢物 SN-38 组成。因 SN-38 具有较强的疏水性，在 CL2A 连接子中引入短 PEG 链以增强连接子 - 有效载荷复合物的水溶性，可有效降低 ADC 聚集风险。结合抗体链间二硫键温和还原后产生的多个巯基偶联位点，该设计支持制备平均 DAR 约为 7.6 的高载药 ADC[43]。

DAR 高的 ADC，体外细胞毒性通常较强；但对于携带疏水性有效载荷的 ADC，过高的 DAR 会加快血浆清除，导致体内暴露减少、治疗效应降低。通过优化有效载荷 - 连接子结构 [44]、降低整体疏水性，可获得均一的高 DAR ADC，并改善其药代动力学特征和治疗指数。Nadkarni 等 [45] 研究显示，携带疏水性有效载荷的 ADC，其高 DAR 组分的靶抗原结合能力低于未偶联抗体及平均 DAR 约为 4 的异质性 ADC；而携带亲水性有效载荷的 ADC，在相同条件下未见显著的靶向结合能力降低。与此同时，细胞毒性试验显示，ADC 效力随载药量增加而增强。

除疏水性外，ADC 连接子及其偶联化学仍面临多项关键挑战。首先，连接子若在循环过程中稳定性不足，可导致有效载荷过早释放，从而增加脱靶毒性、降低肿瘤递送效率；反之，连接子若过于稳定，或其结构设计不利于肿瘤细胞内的切割，则可能妨碍有效载荷在内吞—溶酶体途径中的有效释放 [46]，进而削弱抗肿瘤活性。其次，传统的半胱氨酸与马来酰胺偶联形成的硫代琥珀酰亚胺键，在生理条件下可能发生逆迈克尔消除反应及巯基交换 [47]，导致有效载荷脱偶联或转移至血浆蛋白，进而影响 ADC 的体内稳定性、安全性及药代动力学。

有效载荷的理化性质还会影响 ADC 的旁观者效应。一般而言，细胞内释放的疏水性小分子易穿过细胞膜并扩散至邻近细胞，杀伤周围抗原低表达或抗原阴性的肿瘤细胞；而亲水性或带电荷的有效载荷跨膜扩散能力相对较弱，旁观者效应有限 [42]。Nittoli 等 [48] 以美登素为骨架，在保持其大环核心结构不变的前提下，在 *N*- 甲基丙氨酸氮原子这一可修饰位点上连接不同侧链和连接臂，筛选得到一系列有效载荷候选物，并将其中较优的一个候选结构偶联到抗 EGFR 第Ⅲ型突变体（EGFRv Ⅲ）抗体上，得到了 EGFRv Ⅲ -16。该 ADC 在 2 种表达 EGFRv Ⅲ的小鼠异种移植瘤模型中均可诱导肿瘤消退，而同型对照 ADC 无抗肿瘤效果。这表明围绕有效载荷可修饰位点开展构效关系优化，并协同设计连接子 - 有效载荷结构，可获得兼具药理活性与可开发性的 ADC 候选物。

2.3 最佳 DAR 的确定

最佳 DAR 取决于靶标表达水平、肿瘤内异质性、靶标内化效率，以及连接子和有效载荷的理化性质等因素。

一些靶标除在病灶组织中表达外，亦可在正常组织中以较低水平表达。靶标在正常组织中的表达可诱导靶标介导的药物处置（target-mediated drug disposition，TMDD），造成 ADC 在正常组织中发生非预期的结合和清除，从而降低 ADC 的肿瘤递送效率和深层渗透。对于表现出 TMDD 的靶标，DAR 的最优值并非越高越好，适度降低 DAR 可能更具优势。Kerstin 等 [49] 利用可同时结合人和鼠叶酸受体 α（FRα）的嵌合抗鼠 FRα 抗体，建立了正常组织和病灶组织均表达靶标的交叉反应模型。结果显示，在多个异种移植瘤模型中，DAR 2.0 的 ADC 在按有效载荷剂量给药时，抗肿瘤活性优于 DAR 3.5 的 ADC。低 DAR 是一种可能补偿 TMDD、改善治

疗窗的靶标依赖性策略，只是其适用性仍需在具备物种交叉反应性的药效和安全性模型中进行验证。

肿瘤内异质性是ADC面临的另一挑战。例如，乳腺癌通常由具有不同基因表达谱的多种细胞组成；其异质性是化疗后耐药、复发和转移的主要因素之一[50]。为解决这个问题，Yamazaki等[51]通过化学酶法和正交点击化学，在同一抗体上定量偶联MMAE与单甲基奥瑞他汀（monomethyl auristatin F，MMAF），构建了DAR组成明确的双有效载荷ADC（MMAE/MMAF连接数为2+2、4+2和2+4的可调有效载荷配比）。在HER2异质性及耐药乳腺癌异种移植模型中，该ADC在1 mg/kg剂量下的抑瘤和生存获益均优于单有效载荷ADC（DAR4、DAR6），以及2种单有效载荷ADC联合给药。这种“总DAR与2种有效载荷配比均可编程调控”的特点，使双有效载荷ADC的设计不再仅是追求提高总载药量，而是能够根据靶点表达异质性、肿瘤细胞的耐药机制及2种有效载荷的理化和药理学特征，对ADC的有效性和安全性进行协同优化。

近年来，吡咯并苯二氮䓬类药物（pyrrolobenzodiazepine，PBD）二聚体因作用方式和高效力在ADC的合成中受到了广泛关注[42]。然而，高效力也是一把双刃剑。因为存在有效载荷过早释放或其他脱靶毒性的风险，高DAR可能导致剂量限制性毒性。部分PBD-ADC项目的开发曾因疗效与安全性间的平衡性不理想而终止[52]。针对PBD二聚体等超高效有效载荷，采用低DAR的均一性ADC可能是一种有潜力的改善疗效-安全性平衡的策略。de Bever等[53]利用GlycoConnect技术制备了基于PBD、DAR 1的均一性ADC。在HCC-1954肿瘤球模型中，当有效载荷剂量相同时，该DAR 1 ADC较DAR 2 ADC的肿瘤内穿透程度更深。

DAR的选择应基于“抗体—靶点—连接子—有效载荷—模型”的整体组合，而不是将DAR视为可脱离具体分子属性而独立优化的固定参数。对于同一抗体和有效载荷平台，较高的DAR理论上可提高单个ADC分子进入细胞后可释放的有效载荷量；但这也可能增加疏水性、聚集效应、非特异性摄取和系统毒性。相反，低DAR也可能具有更优的暴露量和耐受性，但在低抗原密度、内吞较弱或肿瘤组织渗透受限等情况下，可能导致有效载荷递送量不足。因此，最佳DAR取决于靶点表达水平与异质性、内吞及胞内转运效率、连接子稳定性、有效载荷效力和理化属性，以及给药剂量和治疗窗等因素。比如Clardy等[54]通过THIOMAB蛋白质工程技术，将含有1、2或3个工程化半胱氨酸位点的曲妥珠单抗IgG1 THIOMAB变体，分别与单体或三聚体Dolasynthen模块偶联，获得了一系列均一性、位点特异性且DAR明确（分别为2、4、6、12和18）的ADC。单次给药后，各DAR构建体均表现出具有可比性的药代动力学特征，且在不同给药剂量下均显示出剂量依赖性抗肿瘤活性。该结果表明，通过适当的位点特异性偶联和有效载荷平台设计，高DAR通常伴随的药代动力学缺点并非无法解决。

3　结论与展望

DAR作为ADC的关键质量属性，其精准检测与严格控制是保障疗效和安全性的核心。现有检测技术各有优劣，HPLC法和UV法具有可重复、准确性高的特点，而MS法因高分辨率和多属性分析，在目前的检测方法中占据主流地位。近年来，多维色谱技术的联用也逐渐受到青睐，且在DAR的动态监测中提供了新思路。由于减少混合物有利于获得药代动力学明确和安全性更高的ADC，故未来可能更倾向于制备DAR均一的ADC。未来，应结合当前的定点偶联技术、连接子-有效载荷理化性质进行协同设计，实现对DAR均一性的调控，进一步改善药物的理化性质并扩大治疗窗口。通过持续的技术创新与标准化体系建设，ADC的临床价值将进一步释放，有望为恶性肿瘤及其他疾病的治疗带来革命性突破。

参考文献：

[1] Ducry L, Stump B. Antibody—drug conjugates: LINking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies [J]. *Bioconjug Chem*, 2010, **21**(1): 5-13.

[2] Kvirkvelia N, Chikadze N, Makinde J, *et al*. Investigation of

factors influencing the immunogenicity of hCG as a potential cancer vaccine [J]. *Clin Exp Immunol*, 2018, **193**(1): 73-83.

[3] Dan N, Setua S, Kashyap V K, *et al*. Antibody-drug conjugates for cancer therapy: chemistry to clinical implications [J]. *Pharmaceuticals*, 2018, **11**(2): 32.

[4] 郭立红, 王金朋, 翟立海, 等. 抗体偶联药物和小分子偶联药物的研究进展[J]. 中国医药工业杂志, 2019, **50**(8): 842-851.

[5] Casi G, Neri D. Antibody-drug conjugates: basic concepts, examples and future perspectives [J]. *J Control Release*, 2012, **161**(2): 422-428.

[6] Sassoon I, Blanc V. Antibody-drug conjugate (ADC) clinical pipeline: a review [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, **1045**: 1-27.

[7] Ducry L. Antibody-drug conjugates [M]. Berlin/Heidelberg: Springer Science, 2013.

[8] Hinrichs M J M, Dixit R. Antibody drug conjugates: nonclinical safety considerations [J]. *AAPS J*, 2015, **17**: 1055-1064.

[9] Hamilton G S. Antibody-drug conjugates for cancer therapy: the technological and regulatory challenges of developing drug-biologic hybrids [J]. *Biologicals*, 2015, **43**(5): 318-332.

[10] Lambert J M. Antibody-drug conjugates (ADC): magic bullets at last! [J]. *Mol Pharm*, 2015, **12**(6): 1701-1702.

[11] Diamantis N, Banerji U. Antibody-drug conjugates: an emerging class of cancer treatment [J]. *Br J Cancer*, 2016, **114**: 362-367.

[12] Mahmood I. Clinical pharmacology of antibody-drug conjugates [J]. *Antibodies*, 2021, **10**(2): 20.

[13] Hussain A F, Grimm A, Sheng W J, *et al*. Toward homogenous antibody drug conjugates using enzyme-based conjugation approaches [J]. *Pharmaceuticals*, 2021, **14**(4): 343.

[14] Guo J X, Kumar S, Chipley M, *et al*. Characterization and higher-order structure assessment of an interchain cysteine-based ADC: impact of drug loading and distribution on the mechanism of aggregation [J]. *Bioconjug Chem*, 2016, **27**(3): 604-615.

[15] Aoyama M, Tada M, Yokoo H, *et al*. Linker and conjugation site synergy in antibody-drug conjugates: impacts on biological activity [J]. *Bioconjug Chem*, 2024, **35**(10): 1568-1576.

[16] Metrangolo V, Engelholm L H. Antibody-drug conjugates: the dynamic evolution from conventional to next-generation constructs [J]. *Cancers*, 2024, **16**(2): 447.

[17] Matsuda Y, Leung M, Okuzumi T, *et al*. A purification strategy utilizing hydrophobic interaction chromatography to obtain homogeneous species from a site-specific antibody drug conjugate produced by AJICAP™ first generation [J]. *Antibodies*, 2020, **9**(2): 16.

[18] Haverick M, Mengisen S, Shameem M, *et al*. Separation of mAbs molecular variants by analytical hydrophobic interaction chromatography HPLC: overview and applications [J]. *mAbs*, 2014, **6**(4): 852-858.

[19] Matsuda Y, Robles V, Malinao M C, *et al*. Comparison of analytical methods for antibody-drug conjugates produced by chemical site-specific conjugation: first-generation AJICAP [J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(20): 12724-12732.

[20] Cordova J C, Sun S, Bos J, *et al*. Development of a single-step antibody-drug conjugate purification process with membrane chromatography [J]. *J Clin Med*, 2021, **10**(3): 552.

[21] XU Y R, JISNG G F, TRAN C, *et al*. RP-HPLC DAR characterization of site-specific antibody drug conjugates produced in a cell-free expression system [J]. *Org Process Res Dev*, 2016, **20**(6): 1034-1043.

[22] Chen T H, Yang Y, Zhang Z R, *et al*. Native reversed-phase liquid chromatography: a technique for LCMS of intact antibody-drug conjugates [J]. *Anal Chem*, 2019, **91**(4): 2805-2812.

[23] Srikanth K, David P, Sayumi Y, *et al*. Universal affinity capture liquid chromatography-mass spectrometry assay for evaluation of biotransformation of site-specific antibody drug conjugates in preclinical studies [J]. *Anal Chem*, 2020, **92**(2): 2065-2073.

[24] Chen L X, Wang L, Shion H, *et al*. In-depth structural characterization of Kadcyla® (ado-trastuzumab emtansine) and its biosimilar candidate [J]. *mAbs*, 2016, **8**(7): 1210-1223.

[25] Wang T D, Huang Z A, Zhou M Y, *et al*. Drug deconjugation-assisted peptide mapping by LC-MS/MS to identify conjugation sites and quantify site occupancy for antibody-drug conjugates [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2024, **243**: 116098.

[26] Källsten M, Hartmann R, Artemenko K, *et al*. Qualitative analysis of antibody-drug conjugates (ADCs): an experimental comparison of analytical techniques of cysteine-linked ADCs [J]. *Analyst*, 2018, **143**(22): 5487-5496.

[27] Jones J, Pack L, Hunter J H, *et al*. Native size-exclusion chromatography-mass spectrometry: suitability for antibody-

drug conjugate drug-to-antibody ratio quantitation across a range of chemotypes and drug-loading levels [J]. *mAbs*, 2019, **12**(1): 1682895.

[28] Leblanc Y, Faid V, Lauber M A, *et al*. A generic method for intact and subunit level characterization of mAb charge variants by native mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B*, 2019, **1133**: 121814.

[29] Matsuda Y, Kliman M, Mendeisohn B A. Application of native ion exchange mass spectrometry to intact and subunit analysis of site-specific antibody-drug conjugates produced by AJICAP first generation technology [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2020, **31**(8): 1706-1712.

[30] Zong H F, Li X, Han L, *et al*. A novel bispecific antibody drug conjugate targeting HER2 and HER3 with potent therapeutic efficacy against breast cancer [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2024, **45**(8): 1727-1739.

[31] Andris S, Rüdt M, Rogalla J, *et al*. Monitoring of antibody-drug conjugation reactions with UV/Vis spectroscopy [J]. *J Biotechnol*, 2018, **288**: 15-22.

[32] Botzanowski T, Erb S, Hernandez-Alba O, *et al*. Insights from native mass spectrometry approaches for top- and middle-level characterization of site-specific antibody-drug conjugates [J]. *mAbs*, 2017, **9**(5): 801-811.

[33] Kempen T, Cadang L, Fan Y C, *et al*. Online native hydrophobic interaction chromatography-mass spectrometry of antibody-drug conjugates [J]. *mAbs*, 2024, **17**(1): 2446304.

[34] Alicja M, Świderska K W, Otlewski J. Current methods for the synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates [J]. *Biotechnol Adv*, 2015, **33**(6): 775-784.

[35] Gao W L, Zhang J X, Xiang J, *et al*. Recent advances in site specific conjugations of antibody drug conjugates (ADC) [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2016, **16**(6): 469-479.

[36] Sun X X, Ponte J F, Yoder N C, *et al*. Effects of drug-antibody ratio on pharmacokinetics, biodistribution, efficacy, and tolerability of antibody-maytansinoid conjugates [J]. *Bioconjug Chem*, 2017, **28**(5): 1371-1381.

[37] D'Atri V, Peli R, Clarke A, *et al*. Is hydrophobic interaction chromatography the most suitable technique to characterize site-specific antibody-drug conjugates? [J]. *J Chromatogr A*, 2019, **1586**: 149-153.

[38] Panowski S, Bhakta S, Raab H, *et al*. Site-specific antibody drug conjugates for cancer therapy [J]. *mAbs*, 2014, **6**(1): 34-45.

[39] Ou C, Li C, Zhang R S, *et al*. One-pot conversion of free sialoglycans to functionalized glycan oxazolines and efficient synthesis of homogeneous antibody-drug conjugates through site-specific chemoenzymatic glycan remodeling [J]. *Bioconjug Chem*, 2021, **32**(8): 1888-1897.

[40] Farràs M, Miret J, Camps M, *et al*. Homogeneous antibody-drug conjugates: DAR 2 anti-HER2 obtained by conjugation on isolated light chain followed by mAb assembly [J]. *mAbs*, 2020, **12**(1): 1702262.

[41] Dannheim F M, Stephen W, Orozco C T, *et al*. All-in-one disulfide bridging enables the generation of antibody conjugates with modular cargo loading [J]. *Chem Sci*, 2022, **13**(30): 8781-8790.

[42] Wang Z J, Li H X, Gou L T, *et al*. Antibody-drug conjugates: recent advances in payloads [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2023, **13**(10): 4025-4059.

[43] Goldenberg D M, Cardillo T M, Govindan S V, *et al*. Trop-2 is a novel target for solid cancer therapy with sacituzumab govitecan (IMMU-132), an antibody-drug conjugate (ADC) [J]. *Oncotarget*, 2015, **6**(26): 22496-22512.

[44] 马骏威, 刘永辉, 任连杰. 抗体偶联药物的小分子部分药学研究考虑 [J]. 中国医药工业杂志, 2025, **56**(11): 1464-1470.

[45] Nadkarni D V, Lee J, Jiang Q P, *et al*. Impact of drug conjugation and loading on target antigen binding and cytotoxicity in cysteine antibody-drug conjugates [J]. *Mol Pharm*, 2021, **18**(3): 889-897.

[46] Deslignière E, Diemer H, Erb S, *et al*. A combination of native LC-MS approaches for the comprehensive characterization of the antibody-drug conjugate trastuzumab deruxtecan [J]. *Front Biosci* (Landmark Ed), 2022, **27**(10): 290.

[47] Szijj P A, Bahou C, Chudasama V. Addressing the retro-Michael instability of maleimide bioconjugates [J]. *Drug Discovery Today: Technol*, 2018, **30**: 27-34.

[48] Nittoli T, Kelly M P, Delfino F, *et al*. Antibody drug conjugates of cleavable amino-alkyl and aryl maytansinoids [J]. *Bioorg Med Chem*, 2018, **26**(9): 2271-2279.

[49] Kerstin W S, Leanne L, Jenny L, *et al*. Abstract 219: the potential benefit of lower drug-antibody ratio (DAR) on antibody-maytansinoid conjugate *in vivo* efficacy [J]. *Cancer Res*, 2019, **79**(13_Supplement): 219.

（下转第 1048 页）

［51］ 高豪峥．基于物料特性的干法制粒仿真分析及质量预测研究[D]．温州：温州大学, 2021.

［52］ Stamato H J, Sprockel O L．Design and scale-up of dry granulation processes［M]// Am Ende M T, Am Ende D J. Chemical engineering in the pharmaceutical industry: drug product design, development, and modeling．Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2019: 81-118.

［53］ 李奥运．干法滚压压片质量属性调控关键技术研究[D]．南昌：南昌大学, 2022.

［54］ Muliadi A R, Litster J D, Wassgren C R．Validation of 3-D finite element analysis for predicting the density distribution of roll compacted pharmaceutical powder［J]．*Powder Technol*, 2013, **237**: 386-399.

［55］ Mazor A, Orefice L, Michrafy A, *et al*．A combined DEM & FEM approach for modelling roll compaction process［J]．*Powder Technol*, 2018, **337**: 3-16.

［56］ 丁涵, 徐忠坤, 王振中, 等．基于AHP-CRITIC混合加权法和Box-Behnken设计-响应面法优化羌芩颗粒成型工艺及其物理指纹图谱研究[J]．中草药, 2024, **55**(3): 787-797.

［57］ Paulausks A, Kolisnyk T, Mohylyuk V．The increase in the plasticity of microcrystalline cellulose spheres' when loaded with a plasticizer［J]．*Pharmaceutics*, 2024, **16**(7): 945.

［58］ Vasudevan K V, Pu Y E, Amini H, *et al*．Using a model-based material sparing approach for formulation and process development of a roller compacted drug product［J]．*Pharm Res*, 2022, **39**(9): 2083-2093.

［59］ 何坦, 叶彬, 杨超, 等．中药浸膏片干法制粒工艺研究[J]．山东化工, 2024, **53**(21): 41-43.

［60］ Yu M Z, Omar C S, Weidemann M, *et al*．Relationship between powder properties and uniformity of ribbon property using feeding guider designs with thermography (PAT) in roller compaction［J]．*Powder Technol*, 2022, **398**: 117134.

（上接第 1038 页）

［50］ Gu T Q, Xiao Y L, Shao Z M．Intratumor heterogeneity in breast cancer: tracing its origins and translating findings into clinical practice［J]．*Precis Med Eng*, 2024, **1**: 100006.

［51］ Yamazaki C M, Yamaguchi A, Anami Y, *et al*．Antibody-drug conjugates with dual payloads for combating breast tumor heterogeneity and drug resistance［J]．*Nat Commun*, 2021, **12**: 3528.

［52］ Nguyen T D, Bordeau B M, Balthasar J P．Mechanisms of ADC toxicity and strategies to increase ADC tolerability［J]．*Cancers* (Basel), 2023, **15**(3): 713.

［53］ de Bever L, Popal S, van Schaik J, *et al*．Generation of DAR1 antibody-drug conjugates for ultrapotent payloads using tailored GlycoConnect technology[J]．*Bioconjugate Chem*, 2023, **34**(3): 538-548.

［54］ Clardy S M, Uttard A, Du B, *et al*．Site-specific Dolasynthen antibody-drug conjugates exhibit consistent pharmacokinetic profiles across a wide range of drug to antibody ratios［J]．*Mol Cancer Ther*, 2024, **23**(1): 84-91.