

抗体药物偶联物设计与制备关键点控制

孙 菁^{1,2}, 王 曼^{1,2}, 刘 莹^{2*}, 曹 威^{2*}

1. 杰科(天津)生物医药有限公司, 天津 300467

2. 天津科技大学 生物工程学院, 天津 300457

摘 要: 抗体药物偶联物(ADC)将单克隆抗体的靶向性与细胞毒性药物的杀伤力相结合,已成为肿瘤治疗领域的重大突破之一。历经多轮技术迭代,ADC 在疗效与安全性上实现了跨越式提升,但设计优化与制备质控的复杂性仍制约其产业化转化与临床应用。系统梳理 ADC 技术迭代历程,从设计阶段的多环节协同控制、制备过程的质量管控 2 大核心维度,剖析靶点匹配、偶联工艺、质控标准等关键技术要点,深入探讨当前 ADC 研发面临的实体瘤穿透瓶颈、耐药性及产业化成本等核心挑战,并对人工智能(AI)辅助设计、新型偶联技术及个性化 ADC 的发展前景进行展望,以期 ADC 的研发提供全面的技术参考与前瞻性视角,为 ADC 药物的高效研发与规范化生产提供参考。

关键词: 抗体药物偶联物(ADC); 靶点选择; 连接器-有效载荷; 位点特异性偶联; 杂质控制; 人工智能

中图分类号: R979.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2026)08-2947-16

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2026.08.028

Key points in design and preparation of antibody-drug conjugates

SUN Jing^{1,2}, WANG Man^{1,2}, LIU Ying², CAO Wei²

1. Jecho Biopharmaceuticals, Tianjin 300467, China

2. College of Biotechnology, Tianjin University of Science and Technology, Tianjin 300457, China

Abstract: Antibody-drug conjugates (ADCs), which combine the targeting specificity of monoclonal antibodies with the potent lethality of cytotoxic drugs, have emerged as a major breakthrough in cancer therapy. Through generations of technological evolution, ADCs have achieved significant improvements in both efficacy and safety. However, the inherent complexities in design optimization, manufacturing, and quality control continue to pose challenges for their broader industrial translation and clinical application. This review provides a systematic review of the evolution of ADC technology. It analyzes critical technical aspects from two core perspectives: The coordinated control across multiple design stages and the quality management throughout the manufacturing process. Key elements examined include target selection, conjugation strategies, and established quality control standards. The article further delves into the central challenges currently facing ADC development, such as limited penetration into solid tumors, the emergence of drug resistance, and the high costs associated with industrial-scale production. Finally, it offers a forward-looking perspective on emerging trends, including AI-aided rational design, novel conjugation platforms, and the potential for personalized ADC therapies. This comprehensive analysis aims to serve as both a technical reference and a strategic outlook, providing insights to facilitate the efficient development and standardized production of next-generation ADC therapeutics.

Key words: antibody-drug conjugates (ADC); target selection; linker-payload; site-specific conjugation; impurity control; artificial intelligence

抗体药物偶联物(ADC)通过将单克隆抗体的靶向特异性与小分子细胞毒素的强大杀伤力相融合,已成为现代肿瘤精准治疗的重要策略。截至

2026 年 1 月,已有 12 款 ADC 获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,其在乳腺癌、尿路上皮癌及血液系统恶性肿瘤中展现出极具变革性的

收稿日期: 2026-01-17

基金项目: 中国博士后科学基金面上资助项目(2021M702453); 天津市科技计划项目(25YDTPJC00740)

作者简介: 孙 菁(1991—), 硕士, 研究方向为抗体药物分析。E-mail: sunrise0705@163.com

*通信作者: 刘 莹(1989—), 女, 讲师, 研究方向为抗原抗体的人工智能预测及优化。E-mail: yingliu@tust.edu.cn

曹 威(1985—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为细胞代谢工程。E-mail: caowei040108@tust.edu.cn

临床疗效^[1]。然而,在 ADC 临床适应证全面拓展的背景下,该领域正面临着来自化学、制造与控制方面的挑战。ADC 是由大分子抗体、小分子毒素及连接子构成的三元超分子系统,这种结构决定了其在工业化放大过程中极易产生异质性。据统计,大量临床阶段的 ADC 候选药物因治疗指数狭窄、不可预测的脱靶毒性或批次间质量一致性欠佳而未能成功上市。传统基于“终点取样、离线分析”的质量控制模式,已难以满足新一代复杂 ADC 产品高频、高精度的多属性监控需求^[2]。

面对行业痛点, FDA 于 2024 年 3 月重磅发布了《ADC 临床药理学考量指南》,首次从法规层面强制要求将 ADC 视为“多组分系统”,并对完整抗体、游离毒素、偶联物的动态监测提出了极高标准^[3]。同年,中国国家药品监督管理局(NMPA)发布了《抗体药物偶联物药学研究与评价技术指导原则》,对 ADC 的药物抗体比(DAR)分布、工艺杂质控制及分析方法桥接设定了严苛的标准^[4]。此外,国际人用药品注册技术协调会(ICH)发布的 ICH Q14《分析方法开发》指南的全面实施,标志着分析质量源于设计(AQbD)理念已深度重塑 ADC 的全生命周期管理^[5]。

在此背景下,本文立足分析、质控与监管指导的视角,深度解析 ADC 从第 1 代至第 4 代的演进脉络,尤其是在线液相色谱-质谱联用(LC-MS)等过程分析技术如何打破传统反应釜的监控黑箱方面,讨论了 ADC 设计阶段和制备过程的关键点控制,以及体外功能评价的策略,以期应对日益严格的监管要求,以及加速下一代智能集约化 ADC 制造提供兼具科学深度与合规前瞻性的理论支撑。

1 基于工艺属性与分析科学的 ADC 技术迭代途径

ADC 技术的代际更迭,表面上是细胞毒性载荷与连接子化学的演化,其本质则是一部克服大分子异质性、提升规模化制造可控性,以及革新实时分析监测手段的工业演进史。随着行业向高均一性与复杂结构迈进,分析技术的极限分辨率直接定义了新一代 ADC 工艺的设计策略。

1.1 第 1 代与第 2 代 ADC: 随机偶联的异质性与质量控制

早期的 ADC 开发(以第 1 代卡奇霉素类和第 2 代奥瑞他汀类/美登素类为代表)普遍采用基于抗体表面天然赖氨酸或链间二硫键还原生成的半胱氨酸进行非特异性随机偶联。从大分子组装与工艺

属性角度来看,这种缺乏空间位阻和反应位点控制的策略,导致 ADC 产物异质性高,其最终产物的 DAR 值通常呈现 0~8 的宽泛泊松分布,包含大量未偶联的裸抗体以及极易引发蛋白高聚与脱靶毒性的超高载药量物质。在这一阶段,工艺控制面临的最大瓶颈是过程分析工具的滞后。制造工厂高度依赖离线的紫外-可见分光光度法(UV-Vis)与传统疏水作用色谱(HIC)进行偶联反应监控^[2]。由于样品前处理与离线分析往往需要数小时甚至数天,工艺人员无法在反应釜内实时获取偶联动力学数据,导致反应终点的判定沦为经验试错,极大地增加了批次间质量属性的漂移风险,这也是早期多款 ADC 折戟临床后期的核心制造与控制原因。

1.2 第 3 代 ADC: 定点偶联技术与拓扑异构酶抑制剂的协同

为突破异质性瓶颈,第 3 代 ADC 全面迈向了“定点偶联”与高均一性时代。这一阶段的代表性技术包括通过基因工程引入非天然氨基酸或未配对半胱氨酸(如 THIOMAB 技术),以及基于酶催化(如转谷氨酰胺酶)的连接策略。近年来,无痕亲和肽介导的定点偶联技术(如 AJICAP 技术)取得了显著突破,其利用特定亲和试剂将毒素精准引导至抗体 Fc 段特定位点,实现了高度一致的均一性,且无需对抗体序列进行复杂的基因改造。此外,基于抗体天然糖基化位点重塑的 GlycoConnect 技术,通过内切糖苷酶修剪与点击化学的结合,进一步优化了 ADC 的体内稳定性和药动学特征。

在载荷方面,以德曲妥珠单抗(T-DXd)和戈沙妥珠单抗(SG)为代表的 ADC 引入了 DNA 拓扑异构酶 I 抑制剂(如 DXd 和 SN-38),在乳腺癌等实体瘤中取得了突破性疗效。值得注意的是,T-DXd 成功刷新了传统认知,实现了高达 8 的同质化高 DAR 值,这对分析科学提出了空前挑战。高均一性大分子的表征不再局限于简单的平均 DAR 值测算,而是需要利用高分辨液质联用技术(LC-HRMS)深入解析载药分布与极微量的工艺相关杂质,分析技术的升级成为保障第 3 代 ADC 高治疗指数的前提。

1.3 第 4 代及下一代 ADC: 双载荷、双特异性与复杂架构的工艺挑战

为了应对日益严峻的肿瘤异质性与单药耐药性问题,ADC 的分子设计正在向第 4 代及“下一代”多功能复杂架构演进。当前的前沿焦点主要集

中在双特异性 ADC (BsADCs) 与双载荷 ADC (Dual-payload ADCs)。然而, 这种分子复杂性的指数级上升, 对底层制造工艺提出了极限挑战。多步正交反应与复杂大分子骨架的组装, 使得传统的间歇式生产极易导致有毒物质残留或蛋白聚集。因此, 高度集约化的“一锅法”应运而生, 而确保此类复杂工艺不失控的关键, 完全依赖于下一代实时分析监测系统。

1.4 驱动工艺迭代的核心分析技术: 在线 LC-MS 与过程分析技术的应用

随着 ICH Q14 等法规对“分析 AQB”的推动, 过程分析技术 (PAT) 正在重塑 ADC 的制造工艺^[5]。PAT 的核心在于将分析设备直接嵌入生产流中, 实现对关键质量属性的秒级反馈与闭环自动干预。在 ADC 复杂的生物偶联尤其是浆料反应体系中, 极强的有机溶剂背景与未溶解的疏水性毒素会对光谱检测造成严重干扰。针对这一检测瓶颈, 近期的分析化学研究取得了诸多突破。

1.4.1 在线多属性高通量疏水作用色谱-质谱联用 (HIC-MS) 平台 传统 HIC 由于使用高浓度硫酸铵, 导致严重的质谱离子抑制, 无法实现液质直连。最新研究开发了基于酒石酸铵体系的在线 HIC-MS 系统, 在保持与传统盐类相当分离度的同时, 实现了完美的质谱兼容性^[6-7]。该 PAT 方法仅需 10 min 即可完成 1 次实时采样循环, 同步追踪 DAR、载药量分布 (DLD) 及游离药物-连接子 (DL) 浓度。通过这一技术首次发现疏水性 DL 的溶解速率才是复杂浆料偶联反应的真实限速因素, 借助实时反馈优化参数, 成功将工业级反应耗时缩短了 90%^[6]。

1.4.2 在线液相色谱-串联质谱技术 (LC-MS/MS) 与傅里叶变换离子回旋共振 (FTICR) 质谱技术 在高分辨结构确证端, 研究人员利用在线 LC-MS/MS 联合 FTICR 质谱平台, 能够在极短时间内完成还原态 ADC 的快速解析。通过精确控制的碰撞诱导解离, 该系统能够在简易前处理的前提下, 实时提供 ADC 亚基级别的碎片信息, 为单克隆抗体结构完整性及定点偶联保真度提供了强大的监控策略^[8]。

2 设计阶段的关键点控制

ADC 的设计是一个高度复杂、多变量优化的过程。抗体、细胞毒性药物、连接子作为 3 个核心组分的选择和优化, 直接决定了 ADC 的靶向性、体内稳定性、药物释放效率和最终的治疗效果^[9]。

2.1 靶点与抗体的匹配

2.1.1 靶点的选择与生物学特性 ADC 的核心目

标是提升抗肿瘤药物的治疗指数, 通过将细胞毒性药物特异性递送至表达目标抗原的细胞, 从而最大程度降低其在全身的暴露及非靶毒性^[9]。理想的 ADC 靶点应在肿瘤细胞表面高表达, 而在正常组织中表达极低或不表达, 以最大程度降低脱靶毒性。定量研究表明, 肿瘤细胞表面抗原表达量达到或超过 1×10^4 分子/细胞时, 通常被视作 ADC 有效治疗的关键阈值。靶点表达量越高, 进入肿瘤细胞的 ADC 及其释放的有效载荷就越多, 进而增强细胞杀伤的效应^[10]。例如, HER2 靶点在多种癌症中过表达, 并具备高效的受体介导内吞能力, 因而成为 ADC 研发中的重要靶点^[11]。

肿瘤内部组织抗原表达异质性是 ADC 治疗面临的重大挑战。由于肿瘤内不同癌细胞的抗原表达水平存在差异, 部分细胞高表达, 而另一些低表达或不表达, 导致 ADC 难以实现对全部肿瘤细胞的有效杀伤, 抗原阴性亚群可能因此存活并引发耐药与复发^[12-13]。研究表明, 当靶抗原在肿瘤细胞群中的表达变异系数 (CV) $\geq 15\%$ 时, 低表达或不表达抗原的肿瘤细胞逃脱 ADC 杀伤作用的风险显著增加, 可能影响治疗效果或病情发展^[14]。因此, 选择在肿瘤细胞中表达均一性高的靶点至关重要。为了应对肿瘤异质性, 具有旁观者效应的 ADC 日益受到关注。该类 ADC 通过释放具有膜渗透性的有效载荷, 不仅能杀死靶抗原阳性 (Ag^+) 的细胞, 还可扩散至邻近的抗原阴性 (Ag^-) 细胞, 从而对异质性肿瘤细胞群产生更广泛的杀伤作用, 在一定程度上弥补了靶点表达不均一的局限性, 拓宽了 ADC 的治疗潜力^[15]。

理想的 ADC 靶点不仅需要在肿瘤细胞表面高表达, 还需要具备高效的受体介导内吞能力, 以确保 ADC-抗原复合物进入细胞后能够顺利通过内体-溶酶体途径有效释放小分子细胞毒性载荷。在靶点筛选阶段, 常利用高通量内吞分析技术 (如 pHrodo 荧光探针) 来实时评估抗体的内化速率与效率^[16]。此外, 靶点抗原在细胞表面的脱落是另一个不可忽视的评估指标。通常情况下, 脱落到血液循环中的可溶性抗原会充当诱饵受体, 提前结合并中和 ADC 药物。这不仅会降低到达肿瘤部位的有效药物浓度, 还可能引发潜在的脱靶毒性。然而, 相关的动力学模型研究指出, 抗原脱落具有双面性: 在特定实体瘤致密的微环境中, 适度脱落的抗原可能作为药物的细胞外储库, 反而有助于缓冲结合位点屏障效

应,从而促进高亲和力大分子药物在肿瘤内部的均匀渗透与分布^[17]。因此,针对特定抗原的内吞动力学与脱落特性进行精细评估,是决定 ADC 分子早期设计成败的关键。

2.1.2 抗体的筛选与工程化改造 抗体的初始选择与核心步骤在于筛选出与靶点具有合适亲和力的抗体克隆。通过体外展示技术(如噬菌体展示)或杂交瘤平台,获得一系列针对靶点、具有不同结合强度的抗体克隆。抗体亲和力需要适度,低纳摩尔级别[如解离常数(KD)值在 1~10 nmol·L⁻¹内]最为合适,因为过高的亲和力(如 KD<0.1 nmol·L⁻¹)可能导致“结合屏障”效应,即抗体分子在与肿瘤组织边缘的靶点高密度结合后,会严重阻碍药物进一步向肿瘤深部扩散和渗透,从而影响对内部肿瘤细胞的杀伤效果。此外,过高亲和力也可能加剧抗体与低水平表达靶点的正常组织发生结合的风险。

ADC 的内吞速率是决定有效载荷递送效率的关键参数,因此筛选具有强效内化能力的抗体克隆十分关键,也成为了 ADC 抗体最独特、最关键的优化方向。研究表明,ADC 的内吞半衰期通常在 6~14 h,内吞速率 $\geq 0.05\text{ h}^{-1}$ (对应内吞半衰期 $\leq 13.86\text{ h}$)的靶点可确保 ADC 快速、有效地完成内吞过程,进而在溶酶体中高效释放细胞毒性药物^[18]。内吞速率与抗体结合亲和力之间存在复杂关系。尽管高亲和力抗体通常具有更高的内吞潜力,但可能引发药物在肿瘤外周细胞中因迅速内吞而发生降解,导致瘤内穿透深度受限。因此,选择具备“适中”亲和力与快速内吞特性的抗体-靶点组合,有助于药物在肿瘤积累、组织穿透以及细胞内递送效率之间的平衡^[19]。

免疫原性控制同样是 ADC 开发的核心挑战,因此抗体人源化是 ADC 开发中的重要策略^[20]。通过互补决定区移植或表面重塑等技术,可以实现 90%~95%的人源化水平^[21]。高入源化指数(>90%)是确保 ADC 长期安全性和有效性的重要质量属性。此外,抗体骨架的选择和修饰直接决定了 ADC 的体内行为与免疫原性。免疫球蛋白 G1(IgG1)因其显著的血浆半衰期优势与强大的免疫激活能力,成为最广泛应用的抗体骨架^[22]。基于此,抗体 Fc 区的糖基化修饰尤为重要,深刻影响其效应功能,如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和吞噬作用(ADCP)^[23]。其中,去岩藻糖基化,即去除 Fc 区 N-连接聚糖上的 α -1,6-岩藻糖,能显著提升 IgG1 与效应细胞表面 Fc γ RIIIa

(CD16a)受体的亲和力^[23]。这种增强作用可有效促进自然杀伤(NK)细胞介导的 ADCC 和巨噬细胞介导的 ADCP,从而在 ADC 传统的细胞毒性杀伤机制之外,引入额外的免疫系统抗肿瘤途径。

2.2 连接子与细胞毒性药物的组合设计

细胞毒性药物的有效载荷与连接子的组合是 ADC 药物毒性、药动学和治疗窗口的关键决定因素^[9]。二者的选择需要达成一种精妙的平衡状态,以充分保证药物在人体内部可以维持应有的稳定性,且在肿瘤细胞内部实现有效释放的效果。

2.2.1 连接子稳定性-裂解平衡 理想的连接子需在血液循环中保持高度稳定,以防止有效载荷提前释放造成全身毒性;当在 ADC 成功进入靶细胞并转运至溶酶体等胞内区室后,连接子又必须能够高效裂解,以释放具有生物活性的细胞毒性药物。为实现这一平衡,连接子在血清中的半衰期通常不应低于 72 h,从而确保 ADC 有足够时间靶向肿瘤病灶并被有效蓄积^[24]。例如,经典的琥珀酰亚胺-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)连接子在小鼠血浆中 120 h 后仍保留 38%,而采用 SMCC 连接子的恩美曲妥珠单抗(T-DM1)在小鼠体内 7 d 后 DAR 仅下降 29%,这充分说明连接子的稳定性对体内药动学具有重要影响^[25]。相反,当 ADC 被内吞并进入溶酶体后,连接子应在酸性环境或溶酶体酶(如组织蛋白酶 B)作用下迅速裂解,以释放有效载荷。理想的溶酶体裂解半衰期应短于 2 h,从而保障有效载荷快速释放并发挥细胞毒性作用^[26]。Valine-Citrulline-PABC(ValCitPABC)连接子系统在人血清中表现出良好的稳定性,同时可在溶酶体酶存在下高效裂解^[27]。这种兼具稳定性与可裂解特性的设计,正是 ADC 能够成功递送有效载荷关键所在。

连接子-有效载荷复合物的极性是影响 ADC 药动学和生物学行为的关键理化参数,通常用脂水分分配系数($\lg D_{7.4}$)值评价。理想情况下,连接子-有效载荷整体的 $\lg D_{7.4}$ 值应不高于 3^[28]。过高的 $\lg D_{7.4}$ 值可能导致 ADC 聚集,从而降低其在血浆中的溶解度和稳定性,并加速体内清除,增加脱靶毒性^[22]。另一方面,适当的亲脂性有助于释放后的有效载荷穿透细胞膜,进而发挥旁观者效应。因此,在连接子设计中,需要平衡亲脂性与亲水性,以确保其在循环中保持稳定,同时使有效载荷能够有效扩散并发挥作用。

2.2.2 有效载荷的效力与旁观者效应 在 ADC 中,

有效载荷犹如“弹头”一般，直接决定其抗肿瘤活性。旁观者效应是 ADC 独特的优势之一，有助于克服肿瘤异质性带来的治疗挑战。

ADC 的有效载荷须具有极强的细胞毒性，通常其半数抑制浓度 (IC_{50}) 值需小于 $100 \text{ pmol} \cdot \text{L}^{-1}$ [29]。由于即使高效能 ADC，能够进入肿瘤细胞内部的药物分子数量仍然有限，因此有效载荷的细胞膜渗透性至关重要。具有 IgD7.4 值在 $0 \sim 2$ 内适度亲脂性的有效载荷在释放后能够穿透细胞膜，扩散至邻近肿瘤细胞，从而克服肿瘤抗原表达异质性导致的治疗局限。例如，拓扑异构酶 I 抑制剂 DXd、SN-38 和有丝分裂抑制剂甲基澳瑞他汀 E (MMAE)，均因良好的膜渗透性而表现出显著的旁观者效应[30-31]。相反，高极性化合物 [如微管蛋白聚合抑制剂甲基澳瑞他汀 F (MMAF)] 则难以穿透细胞膜，旁观者效应甚微。

ADC 的有效载荷多源于传统化疗药物，主要可分为微管抑制剂以及 DNA 损伤剂 2 大类。微管抑制剂 (如奥瑞他汀类和美登素类) 是通过干扰细胞骨架功能与有丝分裂进程杀伤细胞[32]。DNA 损伤剂 [如拓扑异构酶抑制剂和吡咯苯并二氮杂卓类 (PBDs)] 则通过破坏 DNA 结构诱导细胞凋亡[33]。对于设计为具有旁观者效应的非极性有效载荷，需通过双通路验证明确其作用机制，以确认其真实的细胞杀伤途径。为克服肿瘤耐药性并提升疗效，新一代 ADC 探索的双载荷 ADC 将 2 种不同作用机制的有效载荷 (例如 DNA 损伤剂和微管抑制剂) 连接到同一抗体之上[34]。通过同时靶向肿瘤细胞的多个关键通路协同抗肿瘤，疗效提升的同时，显著降低耐药性发生的机率。

2.2.3 抗体-连接子-有效载荷的协同匹配性评估 ADC 的整体性能依赖抗体、连接子、有效载荷三模块的协同适配，需通过系统性验证评估跨模块兼容性，避免单一模块优化导致整体性能下降。协同匹配性评估首先关注偶联反应的兼容性，需确保连接子与抗体的偶联位点结合稳定，且偶联反应不影响抗体的靶向性与内吞能力，同时不改变有效载荷的生物活性。例如，位点特异性偶联需选择合适的偶联位点，避免影响抗体 Fab 段的抗原结合能力或 Fc 段的效应功能。其次需评估三模块组合后的药理学兼容性，抗体的半衰期、连接子的稳定性及有效载荷的代谢速率需相互匹配，确保 ADC 在体内有足够的循环时间富集于肿瘤部位，同时有效载荷释放

后能有效发挥作用并快速代谢，减少蓄积毒性。此外，还需验证模块组合后的物理化学稳定性，如避免偶联后 ADC 分子聚集，确保在储存与体内循环过程中保持结构完整。通过体外细胞毒性实验、动物模型药理学实验及稳定性测试，可全面评估三模块的协同匹配性，为 ADC 设计优化提供依据。

2.3 针对耐药机制的分子设计策略

尽管 ADC 药物通过结合单克隆抗体的靶向特异性与小分子有效载荷的高效杀伤力，在以乳腺癌、尿路上皮癌为代表的肿瘤治疗中取得了成功，但其长期临床疗效常受到原发性或获得性耐药的严重制约。ADC 的耐药机制是一个多维度的复杂生物学过程，涵盖了从肿瘤细胞表面抗原识别、药物-抗体复合物的内吞、细胞内囊泡转运、连接子裂解，直至有效载荷发挥作用的各个信号传导节点。新一代 ADC 的设计策略已全面转向克服这些微观限制因素，力求在药物结构设计的源头瓦解肿瘤的逃逸机制[35]。

第 1 项核心耐药机制源于靶抗原的下调与肿瘤细胞的异质性分布。长期暴露于 ADC 药物环境会引发肿瘤细胞的适应性进化，它们通过基因突变、表观遗传沉默或受体表面脱落等方式降低靶抗原的表达水平，甚至发生抗原结构变异，从而直接剥夺 ADC 的结合位点[36]。靶抗原丢失是导致 ADC 治疗失败的首要驱动力[37]。为了在设计阶段应对这一挑战，双特异性 ADC 和多特异性 ADC 的研发在稳步推进。此类创新大分子能够同时靶向肿瘤细胞表面的 2 个不同抗原，或同一抗原的 2 个不同非重叠表位 (如双表位靶向策略)。这种双重锚定机制在单一抗原表达发生下调或丢失时，仍能通过另一受体途径确保复合物的有效内吞，极大提升了治疗的容错率。此外，针对肿瘤异质性，优化载荷的旁观者效应成为标准设计。通过采用极性适中、膜穿透力强的有效载荷搭配特异性可裂解连接子，释放的游离毒素在杀伤初级靶细胞后，能够穿过细胞膜进入周围缺乏靶抗原的旁观细胞，形成区域性杀伤网络，从而在宏观上消除肿瘤异质性带来的耐药盲区[35]。

第 2 项显著的耐药机制是由药物外排泵的异常上调引起的有效载荷失效。由于多数第 1 代和第 2 代 ADC 搭载的传统细胞毒性载荷 (如微管蛋白抑制剂 MMAE) 具有高度的疏水性质，它们天然成为了细胞膜上 ABC 转运蛋白家族 (尤其是 P-糖蛋白，即 MDR1/ABCB1) 的极佳底物。肿瘤细胞在受到药

物压力后,会迅速上调这些外排泵的表达,将刚刚在胞内释放的毒素重新泵出细胞外,导致细胞内实际起效的药物浓度远低于致死浓度^[35]。在当前的分子设计优化中,新一代 ADC 的载荷选择正明确转向非外排泵底物的新型化合物,如亲水性更强或空间构型不匹配外排泵口袋的拓扑异构酶抑制剂(如 DXd 或 SN-38)。另一种策略是开发双载荷 ADC,即在同一条抗体骨架上,通过正交偶联化学技术,同时挂载 2 种作用机制完全独立的小分子毒素(例如同时引发 DNA 损伤与阻断微管聚合)。这种设计通过同时阻断多条关键生存信号通路,能够有效应对由 PI3K/Akt/mTOR 等单一通路异常突变引发的耐药^[38]。

第 3 项关键机制涉及内吞途径的改变与溶酶体功能的障碍。ADC 在结合肿瘤表面抗原后,高度依赖于受体介导的网格蛋白或小窝蛋白依赖性内吞作用进入细胞,随后需在早期体内转运至晚期溶酶体的酸性、富含组织蛋白酶的环境中完成裂解。耐药肿瘤细胞常表现出细胞膜内陷动力学下降、内体回收通路过度活跃,或溶酶体内部 pH 值异常升高,导致依赖酸性环境或特定酶(如组织蛋白酶 B)裂解的连接子失效^[36]。针对此类障碍,设计策略强调了连接子库的创新。研究人员正在引入不依赖于溶酶体途径的裂解机制,例如利用肿瘤微环境(TME)中特异性高表达的细胞外蛋白酶底物、酸性微环境响应型聚合物,乃至采用外部光催化或生物正交反应触发药物释放,彻底绕过内吞转运链条带来的不确定性。

最后,免疫微环境的调节与联合用药被视为克服晚期耐药的终极策略。ADC 不仅仅是靶向化疗的运载工具,其导致肿瘤细胞死亡的过程中可诱导强烈的免疫原性细胞死亡,释放损伤相关分子模式,从而激活树突状细胞和 T 淋巴细胞。根据最新临床开发趋势,在设计临床试验和探索性转化医学时,将 ADC 与免疫检查点抑制剂或特定激酶抑制剂(如 GSK3 抑制剂)深度联合,能够有效重塑免疫抑制性微环境,将“冷肿瘤”转化为“热肿瘤”,通过放大宿主的系统性免疫反应来消灭残存的耐药克隆^[35]。

2.4 突破实体瘤物理屏障与穿透动力学的设计策略

传统 ADC 在血液系统恶性肿瘤(如淋巴瘤和白血病)中展现出了显著的疗效,但在实体瘤中的临床获益往往未达预期。其根源在于致密的实体瘤

微环境构成了一道难以逾越的物理阻滞网络。传统 ADC 主要基于完整的人源化 IgG1 框架构建,其相对分子质量高达约 150 000。庞大的流体力学半径使得这些大分子在通过紊乱且通透性较差的肿瘤新生血管渗出后,在充满致密细胞外基质且组织间液压异常升高的肿瘤间质中扩散极其缓慢。除了物理排斥,结合位点屏障(BSB)是限制大分子 ADC 深入肿瘤核心的另一阻碍^[39]。系统药理学定量模型研究发现,当具有极高抗原亲和力(如低纳摩尔级 KD 值)的全尺寸 IgG-ADC 进入肿瘤外围时,会瞬间且不可逆地与血管周边的第一层肿瘤细胞抗原紧密结合并被快速内吞消耗。这种外围截留效应导致 ADC 分子无法继续沿着浓度梯度向缺乏血供、严重缺氧的肿瘤深层组织扩散,造成了外周药物浓度过载而内部剂量严重不足的异质性分布,深部肿瘤细胞因此逃避杀伤并成为后续复发的根源^[39-40]。

为了彻底打破上述两重屏障,ADC 分子的结构进化成为了当前最为核心的突破方向,即从传统的全长 IgG 全面扩展至相对分子质量在 1.5 000~80 000 的各类小型化抗体或蛋白质支架偶联物^[41]。这些创新形态被精准地划分为几个递进的层级。首先是源自常规 IgG 的抗原结合片段(Fab,约 50 000)和单链可变区片段(scFv,约 25 000)。去除庞大的 Fc 恒定区后,它们保留了特异性靶向能力,且 Fab 片段重链与轻链间特有的二硫键为定点偶联提供了天然的化学手柄,极大提高了产物均一性。其次是单域抗体(sdAbs,或称纳米抗体)。这些源自骆驼科动物或鲨鱼新抗原受体(VNARs)的微型蛋白仅由单一重链可变区组成,相对分子质量低至 12 000~15 000。纳米抗体极小的尺寸赋予了其与小分子化疗药物相媲美的组织穿透速率,甚至能够突破立体位阻巨大的隐蔽抗原表位口袋,这是传统全长抗体绝对无法触及的区域。多项体内药动力学实验证实,针对 EGFR 的纳米 ADC 在实体瘤深处的积累量显著超越了传统对比药物。而在最前端的设计中,多肽与抗体模拟支架[如设计锚蛋白重复蛋白 DARPs、基于金黄色葡萄球菌蛋白 A 结构域的亲和蛋白 Affibodies、基于人源 fibronectin type III domain (10Fn3)设计的结合蛋白 Adnectins,相对分子质量在 6 000~15 000]以及双环肽(1 500~2 000)正在被开发。极小的分子体积不仅使得这些载体能够在肿瘤细胞间隙中自由穿梭,其高度稳定的结构也适应更为苛刻的化学偶联条件^[41]。

在应用小型化策略提升穿透力的同时,设计阶段必须进行精密的亲和力调控与药动力学补偿。动力学建模表明,为了最大化实体瘤的总暴露量,适度降低靶向配体的亲和力(采用中等亲和力设计)反而比追求极高亲和力更具优势。中等结合强度使得抗体与周边细胞的结合处于动态可逆状态,减弱了结合位点屏障,允许未被内吞的药物继续向内扩散,从而实现整个肿瘤团块的均匀渗透。然而,相对分子质量的大幅降低不可避免地带来了血浆半衰期急剧缩短的代价。例如,某些未经修饰的 Fab 偶联物的半衰期仅为 2 h,远低于 IgG 的数周半衰期。因此,工程化补偿策略不可或缺,如引入白蛋白结合域(通过劫持内源性 FcRn 受体实现循环)、进行聚乙二醇化修饰或增加流体力学体积的聚合物融合,均是为了在极致的组织穿透能力与维持有效血药浓度之间寻找完美的平衡点^[40]。此外,联合给药策略中,在注射 ADC 前预防性或同步使用未偶联载荷的裸抗体进行短暂竞争性抑制,以预先饱和血管周围的结合位点,同样被证明是一种无需修改 ADC 分子实体即可有效克服位点屏障、促进药物深层分布的创新方案^[40]。

3 制备过程的关键点控制

ADC 的制备过程复杂,涉及抗体生产、纯化、偶联以及最终产品的纯化和质量控制。每个环节关键点的识别和控制,对于 ADC 产品的质量、均一性和批次一致性是至关重要的。

3.1 上游细胞培养与抗体表达

实现抗体高效、稳定表达是 ADC 生产的起始环节,也是关键环节,关系到后续的偶联效率和生产成本。

3.1.1 高表达细胞株筛选策略 高表达、高稳定性细胞株的筛选是 ADC 上游制备的核心,直接决定抗体产量、质量及生产成本。目前主流的宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、小鼠骨髓瘤(NS0)细胞,其中 CHO 细胞因表达量高、糖基化修饰接近人源、安全性良好,成为 ADC 抗体制备的首选。高表达克隆筛选可通过基因工程改造(如优化启动子、增强子序列,引入抗凋亡基因)提升抗体表达量,结合有限稀释法、流式细胞术等技术筛选单克隆细胞株^[42]。为了获得表达量高、均一性强的抗体生产细胞株,一般会运用多轮筛选策略。首先,借助荧光激活细胞分选(FACS)进行初筛,富集高表达细胞群。稳定性验证需进行长期传代培养(通常

50~60 代),检测各代次细胞的抗体表达量、抗体纯度及糖基化修饰一致性,确保细胞株在规模化生产过程中不发生表达量下降或表型漂移^[43]。在细胞培养过程中,低代谢副产物积累也是衡量工艺效率的重要指标。代谢副产物(如乳酸)的积累应进行严格控制。乳酸的过量积累会导致培养基酸化,细胞生长和抗体生产会受到抑制,并可能影响抗体的糖基化和产品质量。因此,需通过优化培养基组分、补料策略和发酵条件将副产物水平维持在低水平。

3.1.2 关键培养参数的实时监控 上游细胞培养过程中,关键参数的实时监控与精准调控是保障抗体质量批次一致性的核心。需监控的关键参数包括物理参数(温度、pH 值、溶氧浓度、搅拌速度)、化学参数(葡萄糖浓度、氨基酸浓度、乳酸、氨等代谢产物浓度)及生物学参数(细胞密度、活率、抗体表达量)。温度通常控制在 37℃,可通过温度转换策略(后期降至 30~34℃)延长细胞存活时间并提升抗体表达量;pH 值维持在 7.0~7.2,通过通入 CO₂或添加酸碱调节剂调控;溶氧浓度根据细胞代谢需求维持在 30%~50%空气饱和度。

过程分析技术(PAT)在生物制药生产领域的作用日益凸显,它凭借着对关键工艺参数展开实时、在线或者近线的监测方式,实现了对生产过程的精确监控^[44]。采用灌流培养或分批补料培养模式,拉曼光谱作为一种非破坏性的 PAT 工具,能够同时测量哺乳动物细胞培养中的多种重要参数,包括葡萄糖、谷氨酰胺、乳酸、谷氨酸和产品滴度^[44]。通过拉曼光谱在线监测谷氨酰胺等关键营养物质的消耗情况,可以制定精确的补料策略,维持细胞的最佳生长状态和生产效率,提高了批次间的一致性^[44]。

3.2 偶联工艺与下游纯化

偶联工艺在 ADC 生产当中处于核心地位,其对 DAR 的均一性以及产品所呈现出的复杂性起到决定性作用。而高效的纯化工艺,能够切实确保最终所产出产品具备应有的纯度以及安全性。

在偶联反应工艺中,当前产业界正从传统的随机偶联向定点偶联(如半胱氨酸烷基化或特定残基修饰)转化,以提升产物的均一性与批次间重现性。在反应的产业化放大阶段,必须借助实验设计和计算流体力学模型来严格控制关键工艺参数(CPPs),包括反应体系的 pH 值、温度、时间、共溶剂比例,以及有效载荷的加料速率与反应罐的搅拌混合速率等,以避免局部浓度过高导致的过度偶联或聚

集。DAR 的均一性是 ADC 质量的关键属性，直接影响其药动学、疗效和安全性^[45]。为准确评估 DAR，需要采用高分辨率的分析技术进行精确测定。目前常用方法包括 HIC、MS 或与多角度光散射联用的尺寸排阻色谱（SEC-MALS）。非变性尺寸排阻色谱-质谱联用（native SEC-MS）技术已成为在线监测 ADC DAR 及药物载荷分布（DLD）的有力工具^[46]。该系统能够在非变性条件下对完整 ADC 分子进行天然电喷雾质谱分析，保持非共价连接的完整性，从而实现 DAR 值及药物载荷分布的精确测定。通过在线 LC-MS 分析，可实时获取 DAR 数据，其结果与 HIC 等正交方法保持良好的一致性^[47]。实时监测能力有助于及时发现和纠正工艺偏差，确保每批次产品的 DAR 均符合预设标准，从而提高生产效率和产品质量控制水平。保持 DAR 的高度均一性对于确保批次间 ADC 产品的质量一致性至关重要，其微小变动均可能显著改变药物体内行为^[48]。

在产业化纯化工艺阶段，主要依赖 2 项核心分离

技术。首先是切向流过滤（TFF）技术，主要用于置换大体积反应缓冲液，并高效清除具有极高毒性风险的游离小分子毒素及未反应的连接子。其次是 HIC。由于挂载疏水性毒素会显著改变抗体局部的疏水表面积，HIC 能够利用这些微小的理化差异，精准分离未偶联的裸抗以及不同 DAR 值的 ADC 亚群（如分离 DAR2 与 DAR4 物种）^[49]。在 HIC 纯化放大的工艺控制中，洗脱液的盐浓度梯度、缓冲液 pH 值、树脂载量及体积流量均是确保高分辨率分离的决定性参数。

3.3 质量控制与放行标准

ADC 产品的纯度关系到其安全性和有效性，因此，严格控制杂质谱，制定明确的放行标准是 ADC 生产的关键环节。

3.3.1 2023—2025 年 ADC 监管更新要点 近年来，全球 ADC 监管法规持续更新，NMPA 以及 FDA 发布了一系列 ADC 相关的法律法规（表 1），重点聚焦质量可控性、检测方法标准化及临床安全性评估，为 ADC 研发生产提供明确指引。

表 1 近年来 ADC 相关的法律法规
Table 1 ADC-related laws and regulations in recent years

法规以及指南名称	监管机构	颁布时间
抗体偶联药物临床药理学研究技术指导原则	NMPA	2025-07
EMA Guideline on Quality, Non-clinical and Clinical Requirements for Investigational Medicinal Products for Advanced Therapies in Clinical Trials	EMA	2025-03
人用抗体偶联药物制品总论	中国国家药典委员会	2025-03
抗体偶联药物分段生产试点注册申报技术要求	NMPA	2024-11
Clinical Pharmacology Considerations for Antibody-Drug Conjugates	FDA	2024-03
抗体偶联药物药学研究与评价技术指导原则	NMPA	2024-02
抗体偶联药物非临床研究技术指导原则	NMPA	2023-09
抗肿瘤抗体偶联药物临床研发技术指导原则	NMPA	2023-04

国际监管层面，FDA 于 2024 年发布了《Clinical Pharmacology Considerations for Antibody-Drug Conjugates》，强调位点特异性偶联工艺的质量风险管理，要求提供详细的偶联反应机制与批次一致性数据；欧盟 EMA 则聚焦 ADC 杂质控制，明确游离毒素残留限度需 $\leq 0.1\%$ ，并要求对连接子-毒素杂质进行定性定量分析。此外，全球监管机构均强化了分析方法验证要求，明确专属性、准确性、精密度等核心参数的验收标准，如 DAR 测定方法需覆盖 0.5~2.5 DAR，游离毒素检测的基质效应校正需通过固相萃取净化实现。中国方面，《中国药典》2025 年版新增 ADC 质量标准通则，强化关键质量属性

（CQA）控制，明确偶联位点异质性的定量要求，新增糖谱分析项目（如唾液酸含量），并收紧宿主细胞蛋白（HCP）残留限度（ $\leq 1.00 \times 10^{-4}$ ）^[50]。同时，参考 ICH Q6B、FDA/EMA 指南，优化 ADC 生物活性测定方法，要求体外细胞毒性试验与体内 PK/PD 数据关联分析，提升效价评估的准确性^[22]。

3.3.2 游离药物与连接子-药物杂质 游离药物和连接子-药物杂质是 ADC 纯化与质控的重点，其残留会显著增加脱靶毒性，需建立严格的控制体系^[51]。由于药物通常具有极强的细胞毒性，即使微量的游离药物也可能导致严重的脱靶毒性，如骨髓抑制、肝毒性或神经毒性^[3]。

美国 FDA 在其《Comparability Protocols for Postapproval Changes to the Chemistry, Manufacturing, and Controls Information in an NDA, ANDA, or BLA》(简称 CMC 指南)草案中,已对相关杂质的限度提出了严格要求,例如,建议游离药物的含量(质量分数)应控制在 $\leq 0.5\%$ ^[51]。虽然 FDA 尚未发布 ADC 专用的 CMC 指南,但 FDA 近年来对高活性小分子杂质(如设定某些高毒性亚硝胺类杂质的每日可接受摄入量低至 $26.5 \text{ ng}\cdot\text{d}^{-1}$)的严格监管原则,反映了对此类潜在高风险成分的极度谨慎^[52]。因此,在 ADC 生产中,实现游离药物、连接子-药物杂质及其他相关杂质的最低化,是确保临床用药安全的关键前提。

为了准确检测和定量分析游离药物和连接子-药物杂质,需要采用高分辨率、高特异性的分析方法。尺寸排阻色谱-高效液相色谱-质谱联用(SEC-HPLC-MS)是一种强大的二维分离定量技术,SEC 能够根据分子大小分离蛋白质和多肽,将大分子 ADC 与小分子杂质有效分离^[53]。随后,质谱检测器能够对分离后的组分进行精确的相对分子质量测定和定量分析,从而识别并量化各种杂质^[51]。这种联用技术提供了高灵敏度和特异性,确保了对 ADC 复杂杂质谱的全面表征,满足严格的质量控制要求。

3.3.3 聚集/片段杂质 蛋白质聚集体和片段是生物制品中普遍存在的杂质,对 ADC 的质量、安全性和有效性构成显著风险^[22]。由于偶联可能导致抗体构象改变或疏水区域暴露,ADC 相较于其修饰的母体抗体,往往表现出更高的聚集倾向。蛋白聚集体(如二聚体及更高级的聚合物)不仅可能导致免疫原性增加,还会改变药动学特性(如加速体内清除)并降低药效^[22]。片段杂质通常由蛋白质降解产生,最直接的影响是削弱生物活性^[54]。基于 AQbD 原则,ADC 尺寸变异体限度需依临床暴露量与工艺能力逐案制定^[55]。监管机构强调设立合理指标,但并未强制执行统一的硬性标准^[56]。这些阈值是基于临床前和临床研究数据以及生产一致性数据确定的,旨在确保患者安全和产品疗效。

为了精确表征 ADC 产品中的聚集体和片段,SEC-MALS 已成为关键的分析手段。该技术能够检测摩尔质量在 $200\sim 1\times 10^9 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, 尺寸范围在 $10\sim 500 \text{ nm}$ 的物质。SEC-MALS 系统通过 SEC 分离分子后,MALS 检测器在多个角度测量光的散射强度,从而在不依赖于校准曲线的情况下,直接、

绝对地测定洗脱组分的摩尔质量和均方根半径^[57]。这一技术优势使研究人员能够实时、准确地识别与定量 ADC 样品中的聚集体与片段,全面评估其相对分子质量分布与构象变化,从而及时发现并纠正生产过程中出现的异常聚集或降解问题,确保终产品的质量始终符合预设的严格放行标准。

3.4 关键质量属性与关键工艺参数的精准映射与全流程控制

ICH 发布的核心药学质量指南集群,即 ICH Q8(R2)《药物研发》、Q9《质量风险管理》、Q10《制药质量体系》及 Q11《原料药开发和制造》,现代 ADC 药物的开发必须严格遵循 QbD 的系统化科学框架。QbD 框架并非事后检验,而是一种前置的预测与干预体系。其第一步是确立目标产品质量概况,即预期在临床上实现特定疗效与安全性所需的所有质量特征集合。随后,通过广泛的先验知识与风险评估矩阵,研发团队必须识别出关键质量属性(CQA)。ICH Q8(R2)《药物研发》中 CQA 被严格定义为“任何必须处于适当限制、范围或分布之内的物理、化学、生物或微生物属性,以确保预期的产品质量、安全性与有效性”。

在 ADC 的复杂生产链条(如抗体发酵、小分子合成、生物偶联反应、超滤纯化及无菌灌装)中,每一个单元操作的输出质量在物理化学层面上均被输入物料的关键材料属性和该操作过程中的关键工艺参数(CPP)所决定。ICH Q8(R2)《药物研发》中定义 CPP 为“其变异性会对 CQA 产生直接影响,因此应予以严密监测或控制以确保工艺产生所需质量的过程参数”。通过建立复杂的多元统计学函数模型,制造方可以精确测绘出设计空间。ICH Q8 对设计空间的定义为“已经证实能提供质量保证的输入变量(物料属性)和工艺参数的多维组合和相互作用”。在设计空间内进行生产参数的常规调整不被视为变更,这为企业在产品全生命周期内的持续改进和工艺优化提供了巨大的监管灵活性。

为了直观且详尽地展示 CQA-CPP 质控对应关系,表 2 总结了二者的映射关系。该矩阵涵盖了 ADC 生物偶联与下游纯化工序中最具代表性的关键质量属性,并将其与诱发这些属性变化的底层工艺参数进行了科学关联。

4 体外功能性评价

在 ADC 设计和制备完成后,严格的体外功能性

表 2 ADC 生产过程核心 CQA-CPP 及风险影响对应关系

Table 2 Correspondence between core CQA-CPP in ADC production process and risk impact				
CQA	临床疗效与安全性风险深度分析	所属关键制造工序	CPP	实时监测与过程控制技术
DAR 及其分布	DAR 决定了 ADC 的整体效价。DAR 分布过高（过度偶联）会导致分子疏水性剧增，引起血浆清除率急剧上升并引发严重的脱靶肝脏及骨髓毒性；DAR 过低则导致未达有效致死剂量，引发耐药甚至促使肿瘤进展，维持特定且窄范围的 DAR 是核心中的核心	单抗还原、活化及小分子生物偶联反应	毒素-连接子与抗体的摩尔比、反应体系温度、反应持续时间、还原剂/偶联剂浓度、缓冲液 pH 值与离子强度	LC-HRMS、UV-Vis、HIC
偶联位点与占位异质性	偶联的具体氨基酸残基位置极大地影响复合物的空间构型与连接子的血液循环稳定性；非特异性偶联若发生在互补决定区附近，将导致抗原结合亲和力大幅下降；不均一的偶联位点会导致药动学极其不可控	定点偶联反应或半胱氨酸/赖氨酸随机偶联工序	还原反应时间、化学修饰底物浓度、酶催化偶联时的特定酶活性及浓度、反应环境的氧化还原电位	中位自上而下质谱结合质子转移电荷减少 (PTCR)、底向上肽图谱分析 ^[58]
游离小分子毒素与相关衍生物	极其严重的安全红线，未共价偶联的游离毒素会绕过靶向机制直接进入体循环，引发包括中性粒细胞减少、血小板减少及外周神经毒性在内的不可逆致死性不良反应，彻底破坏治疗指数	偶联反应后处理、切向过滤、超滤/渗滤	缓冲液置换体积、截留相对分子质量选择、进液与截留液跨膜压、洗脱液体积流量与环境温度	二维液相色谱联用四极杆飞行时间质谱 (2D-LC/Q-TOF) 实现高灵敏度在线富集与定性定量 ^[59]
高相对分子质量聚集体与碎片	由于强疏水性毒素的大量挂载，ADC 分子极易发生折叠错乱与聚集；这些不溶性微粒或可溶性多聚体不仅丧失药效，更会激活免疫系统，导致抗药抗体的产生，引发速发型过敏反应并加速药物体内清除	所有液相处理步骤：搅拌、纯化、冻融循环、最终制剂灌装	搅拌剪切速率、溶液保持时间、冷冻与解冻速率、溶液 pH 漂移、冻干工艺参数 (如初级干燥温度与真空度)	SEC-HPLC、动态光散射 (DLS)、毛细管电泳 (CE-SDS) ^[60]
未偶联抗体/裸抗	反应不完全的产物，在血液中，大量无毒素负载的裸抗会与有效 ADC 竞争结合肿瘤表面的抗原靶点，占据有限的结合位点但无法诱导细胞死亡，发挥负面的竞争性拮抗作用，削弱整体疗效	生物偶联反应	连接子活化效率、反应物化学计量精确度、混合罐内流体力学均匀度、搅拌器结构设计	阳离子交换色谱 (CEX)、LC-HRMS 实时监测未修饰抗体质量峰
HCP 及细菌内毒素	生产过程带来的生物杂质，不仅会引起患者强烈的非特异性发热、免疫反应，且由于高毒性化合物设施通常为封闭隔离系统，其微生物控制难度显著高于常规生物制药	细胞培养收获液、蛋白 A 亲和色谱、设备在线清洗与灭菌 (CIP/SIP)	色谱柱吸附载量、洗脱与清洗液的电导率/pH、无菌屏障压差、消毒剂暴露时间与温度	酶联免疫吸附测定 (ELISA)、鲎试剂法 (LAL)、基于液质联用的靶向 HCP 定量分析

评价是验证其生物活性、靶向能力和细胞杀伤效果的关键步骤。这些评价不仅可确认 ADC 的预期功能，也为后续的体内研究和临床开发提供重要参考。

4.1 结合活性与表位确认

ADC 必须维持其母体抗体对靶抗原的高亲和力，同时确保偶联过程不干扰抗体对抗原表位的识别。

4.1.1 表面等离子体共振 (SPR) 和生物层干涉

(BLI) 动力学测定 SPR 和 BLI 是 2 种广泛应用的实时、无标记生物分子相互作用分析技术，用于精确测定 ADC 与其靶抗原的结合动力学参数。这些参数包括结合速率常数 (k_{on} , $\text{mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)、解离速率常数 (k_{off} , h^{-1}) 和平衡解离常数 (K_D , $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)^[18]。对于 ADC 而言，理想的结合亲和力通常要求 KD 值 $\leq 1\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，这表示 ADC 可以高亲和力且特异性地

结合靶抗原。同时,快速的结合速率($k_{on}=1\times 10^5\sim 5\times 10^5\text{ mol}^{-1}\cdot\text{L}\cdot\text{s}^{-1}$)可确保 ADC 能够迅速识别并结合肿瘤细胞表面的抗原,从而提高靶向效率和细胞内化效率^[18]。这些动力学参数的精确测定对于筛选和优化 ADC 候选药物至关重要。在 SPR/BLI 检测 ADC 结合动力学参数实验中,为确保所测信号的准确性,通常借助双参比芯片或双通道参比消除非特异性吸附、缓冲液效应和基线漂移等干扰。其中,一个通道用于固定靶抗原并进行结合实验,而另一个参比通道则不固定靶抗原或固定无关蛋白,用于扣除背景信号,从而提高数据可靠性和准确性。

4.1.2 竞争性 FACS 表位分组 偶联过程可能对抗体的构象产生影响,进而改变其抗原结合表位或亲和力。为了验证偶联后抗体表位的完整性,竞争性 FACS 表位分组是一种有效的检测方法^[61]。该方法将荧光标记的 ADC 与其未标记的母体抗体在 1:1 的摩尔比下竞争结合靶细胞上的抗原。如果偶联后的 ADC 能够有效竞争母体抗体对同一表位的结合,则表明偶联过程未显著影响抗体的表位识别能力^[61]。通过流式细胞仪检测荧光信号的降低,可以定量评估 ADC 的竞争结合能力,计算偶联后 ADC 的表位保留率。通常,要求偶联后 ADC 的表位保留率 $\geq 90\%$ ^[61],任何对抗原结合能力的损害都可能导致药物效力下降或脱靶效应增加。

4.2 内吞与溶酶体递送

ADC 的有效性高度依赖于其被靶细胞内吞并成功转运至溶酶体,并在溶酶体中释放有效载荷。

4.2.1 pH 敏感染料实时内吞追踪 pH 敏感荧光染料是实时追踪 ADC 内吞过程的强大工具。例如, pH 响应型抗体染料(pHAb 染料)具有独特的 pH 响应特性(pHAb 染料的 pK_a 为 6.2),即在细胞外中性 pH 环境($pH>7$)下荧光信号极低,而一旦进入细胞内酸性区室(如内体和溶酶体),其荧光强度会显著增强 20 倍以上^[62]。通过构建 pHAb-偶联抗体,当与细胞膜上的抗原结合并被内吞后荧光信号会随之增强,实现 ADC 内吞过程的实时可视化和定量追踪。为了量化 ADC 的内吞速率,需要进行时间尺度的内吞实验。通过在 0~4 h 的时间窗口内,使用荧光显微镜或流式细胞仪持续记录 pHAb-偶联 ADC 的荧光信号变化。基于这些时间尺度的数据计算 ADC 的内吞半衰期。例如,对于恩美曲妥珠单抗(TM-ADC),在 HER2 高表达细胞系中测得的内吞半衰期为 6~14 h^[18]。内吞半衰期数据的

测定有助于优化 ADC 的设计,以实现最佳的细胞内递送。

4.2.2 溶酶体共定位与有效载荷释放成像 ADC 在内吞后被转运到溶酶体中,通过酸性环境或溶酶体酶的作用释放有效载荷,因此,在体外功能评价中需要确认 ADC 是否可被递送至溶酶体,其中共定位成像是一种常用的评估方法。这种方法通过同时标记 ADC(例如使用荧光标记)和溶酶体(例如使用 LysoTracker 或溶酶体特异性抗体),然后进行荧光显微镜观察。皮尔逊相关系数(PCC)是衡量 2 种荧光信号共定位程度的定量指标。当 PCC 值 ≥ 0.75 时即被认为是 ADC 成功递送并与溶酶体高度共定位的指标,也是其发挥细胞毒性作用的前提^[63]。直接可视化有效载荷的释放是评估连接子裂解效率的重要策略。氟化硼二吡-类荧光素(BODIPY-FL)是一种绿色荧光染料,其荧光特性可用于构建荧光淬灭-恢复模型来追踪有效载荷释放^[64]。通过将 BODIPY-FL 偶联到有效载荷上,并设计使其在连接状态下呈现荧光淬灭状态,而当在溶酶体中连接子被裂解,BODIPY-FL-有效载荷的荧光信号便会恢复。这种荧光淬灭-恢复模型允许研究人员在活细胞中实时监测有效载荷的动态释放和空间尺度的分布。

4.3 细胞杀伤与旁观者效应

ADC 的核心功能是高效杀伤肿瘤细胞,体外细胞毒性评价时要充分考虑肿瘤的复杂性,并评估旁观者效应。

4.3.1 2D/3D 细胞毒性梯度 传统的 2D 单层细胞培养模型虽然简便,但无法完全模拟体内肿瘤的微环境,如细胞-细胞间相互作用、细胞外基质屏障和氧气/营养物质梯度等复杂因素,而 3D 肿瘤球体模型被认为是更接近体内肿瘤生理环境的体外模型,能够更好地预测 ADC 在体内的疗效^[65]。通过比较 ADC 在 2D 和 3D 模型中的 IC_{50} ,可以评估其在更复杂的肿瘤结构中的穿透性和杀伤效率。如果 2D IC_{50} 与 3D IC_{50} 的比值 ≤ 5 倍,则表明 ADC 具有良好的肿瘤球体穿透能力,以及在体内 3D 环境中有效细胞杀伤活性,较大的比值可能提示 ADC 在密集肿瘤组织中的穿透受限,需要进一步优化^[66]。为了实现高通量、标准化地评估 ADC 在 3D 模型中的细胞毒性,通常采用 96 孔球体微孔板进行同步培养以形成均一的肿瘤球体,并可以在同一块板上同时进行多个药物浓度和不同 ADC 药物的筛选^[65]。这

不仅提高了 ADC 体外功能评价的效率和可重复性,更缩短了筛选和优化周期。

4.3.2 Transwell 共培养模型评估旁观者效应 旁观者效应是 ADC 的一个重要特性,它允许释放的具细胞毒性的有效载荷扩散并杀伤邻近的抗原阴性肿瘤细胞,从而克服肿瘤异质性^[30-31]。Transwell 共培养模型是体外评估旁观者效应的常用方法^[67]。在该模型中,抗原阳性靶细胞和抗原阴性旁观者细胞被一个具有 0.4 μm 孔径的 Transwell 膜隔开。这种孔径允许小分子有效载荷自由扩散通过,但阻止细胞通过,从而确保只有释放的药物才能作用于抗原阴性细胞。通过监测抗原阴性细胞的存活率,可以评估 ADC 旁观者效应的强度。通过计算旁观者指数 (BI) 可以定量分析 ADC 的旁观者效应。该指数通过比较 ADC 对抗原阴性细胞的 IC_{50} (IC_{50_neg}) 与对抗原阳性细胞的 IC_{50} (IC_{50_pos}) 来得出 [$\text{BI} = (\text{IC}_{50_neg} - \text{IC}_{50_pos}) / \text{IC}_{50_pos}$]^[68]。BI 值越大,表明旁观者效应越强,即释放的有效载荷对非靶向细胞的杀伤能力越强。例如,膜渗透性强的有效载荷 (如 MMAE) 通常会产生显著的旁观者效应,而膜渗透性差的有效载荷 (如 MMAF) 则不具备此效应^[68]。BI 的测定有助于优化连接子和有效载荷的设计以适应肿瘤异质性。

4.4 高内涵成像 (HCI) 与人工智能 (AI) 辅助药效解析

HCI 结合 AI 技术为 ADC 的药效评价提供了前所未有的深度和广度,实现了从单细胞水平到群体水平的全面分析。

4.4.1 多参数 HCI 面板设计 借助 HCI 可同时获取和分析细胞的多个生物学参数,从而全面评估 ADC 的作用机制和药效。通过设计多参数 HCI 面板,可以同时追踪 ADC 在细胞内的关键行为模式。一个典型的 4 通道 HCI 面板可以包括: (1) Hoechst (核): 用于标记细胞核,提供细胞计数和形态学信息。(2) LysoTracker (溶酶体): 标记酸性细胞器 (如溶酶体),用于评估 ADC 的细胞内转运和溶酶体递送效率。(3) 切割型 Caspase-3 (凋亡): 作为细胞凋亡的关键标志物,用于定量评估细胞死亡的程度。(4) BODIPY 载荷 (释放): 如前所述,通过荧光淬灭-恢复模型,用于直接可视化和量化有效载荷在细胞内的释放。这种多参数分析能够提供比传统单一终点检测更丰富的信息,有助于深入理解 ADC 的作用机制,例如,是否成功内吞、是否到达溶酶

体、有效载荷是否释放以及细胞是否发生凋亡。

4.4.2 AI 模型训练与药效预测 HCI 产生的大量复杂图像数据需要先进的计算方法进行分析。AI 和机器学习 (ML) 模型,特别是深度学习 (DL),在解析这些图像数据和预测药物药效方面展现出巨大潜力。迁移学习 (TL) 是一种高效的 AI 模型训练策略,它利用在大规模图像数据集 (如 ImageNet) 上预训练的卷积神经网络 (CNN) 模型,例如 VGG-16,作为特征提取器^[69]。通过冻结 VGG-16 的卷积层权重,并在其基础上添加自定义的分类或回归层,可以针对 ADC 药效评价的特定任务进行微调。这种方法避免了从头训练模型的巨大计算成本和数据需求。为了确保 AI 模型的鲁棒性和泛化能力,训练数据集的规模至关重要,通常需要包含 ≥ 10 万张单细胞图像^[70]。大规模的训练数据能够让模型学习到更丰富、更具代表性的细胞表型特征,从而提高预测准确性。AI 模型在药效预测中的性能可以通过多个指标进行评估: (1) 分类准确度 $\geq 95\%$: 对于细胞表型分类任务 (例如区分健康细胞、凋亡细胞、坏死细胞等),基于 DL 的图像分类器在二分类或多分类任务中准确率可达 95% 以上,表明 AI 模型能够高度可靠地识别和区分不同细胞状态^[71]。这为后续的药效评估提供了坚实的基础。(2) 预测半数有效浓度 (EC_{50}) 与实测值误差 $< 15\%$: 在定量药效预测方面,DL 模型可以从细胞形态学图像特征中学习药物剂量-效应关系,其预测评分与实测药物浓度呈强相关性,可用于基准剂量 (BMD) 表征及 EC_{50} 类药效参数推断^[72]。这种精确的预测能力可以显著加速 ADC 候选药物的筛选和优化,减少传统实验的耗时和成本,从而推动药物发现进程。AI 辅助药效解析的引入,使得 ADC 研发能够从经验性筛选转向数据驱动的理性设计,极大地提升了研发效率和成功率^[73]。

5 结语与展望

ADC 已成为靶向肿瘤治疗的重要支柱,其发展历程是生物技术与药物化学深度融合的典范。从第 1 代产品的异质性挑战,到第 2 代和第 3 代通过位点特异性偶联技术实现的高均一性,ADC 技术在靶向精准性、药物递送效率和治疗安全性方面均取得了显著突破。确保 ADC 最终质量与疗效的关键,在于严格控制设计阶段的靶点选择、抗体工程化改造、连接子与有效载荷的优化,以及制备过程中的细胞培养、偶联工艺和杂质控制。同时,综合运用

先进的体外功能评价体系,特别是结合 HCI 技术和 AI 辅助分析,为深入、系统地解析 ADC 的生物学活性与药效机制提供了强大工具。

5.1 AI 辅助 ADC 多模块协同设计

AI/ML 模型为 ADC 多模块协同设计提供了新路径,有望突破传统设计的局限性^[73]。AI 可通过整合海量生物信息学数据、药物分子结构数据及临床试验数据,构建预测模型,精准筛选最优靶点-抗体-连接子-毒素组合。例如,通过 ML 预测抗体与靶点的结合亲和力、内吞效率,优化抗体设计;基于 DL 模型模拟连接子的稳定性与裂解特性,实现连接子与肿瘤微环境的精准适配;通过定量构效关系模型预测毒素的毒性强度与旁观者效应,平衡疗效与安全性^[74]。

此外,借助 ML 模型对抗体序列特征进行免疫信息学解析,可以预测潜在的 T 细胞表位和 B 细胞表位,从而识别可能诱发免疫应答的热点区域^[73]。基于这些预测结果,研究人员能够开展理性工程化突变,在不影响抗体功能和结合亲和力的前提下,对免疫原性表位进行修饰或去除,从而降低抗体的免疫原性风险^[20]。FDA 已在相关指南中建议,可在早期开发阶段使用免疫原性预测工具,以前瞻性地评估并降低临床试验中的相关风险^[75]。

5.2 新型偶联技术与载荷的开发方向

ADC 领域从经验驱动向数据驱动的理性设计演进,新的技术概念和策略正在涌现。除了已经在尝试的双载荷 ADC,可编程降解连接子是 ADC 领域的另一个新兴概念,其中与蛋白水解靶向嵌合体 (PROTACs) 技术融合所形成的降解剂-抗体偶联物 (DACs) 尤为引人关注。PROTACs 是一种新型小分子,通过招募 E3 泛素连接酶将目标蛋白泛素化,从而诱导其通过蛋白酶体降解^[76]。将 PROTACs 作为有效载荷偶联至抗体上,使得 ADC 不仅可以实现传统的细胞毒性杀伤,更增加了诱导特异性靶蛋白降解的功能。DACs 的优势在于以亚化学计量方式催化循环,有望实现更低的给药剂量和更宽的治疗窗口。此外,通过直接清除致病蛋白,DAC 有望克服传统小分子抑制剂的耐药性问题^[76]。

总而言之,ADC 领域正通过持续攻克技术瓶颈,并积极探索新型系统或模式,推动肿瘤治疗向更安全、更有效、更精准的方向发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 李伟,刘樱霞,陈赟,等. 多功能抗体疗法的组合演进与突破: 2025 年双抗/三抗与抗体偶联药物发展态势 [J]. 生命科学, 2026, 38(2): 281-293.
Li W, Liu Y X, Chen Y, et al. Combinatorial evolution and breakthroughs in multi-functional antibody therapies: Development trends of bispecific/trispecific antibody and anti-body-drug conjugate in 2025 [J]. Chin Bull Life Sci, 2026, 38(2): 281-293.
- [2] Ralbovsky N M, Dixit G, Lomont J P, et al. Process analytical technology for real-time monitoring of pharmaceutical bioconjugation reactions [J]. Org Process Res Dev, 2025, 29(2): 353-362.
- [3] FDA U S. Clinical pharmacology considerations for antibody-drug conjugates guidance for industry [EB/OL]. (2024-03)[2026-01-13]. <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-pharmacology-considerations-antibody-drug-conjugates-guidance-industry>.
- [4] 李倩,武勇凯,韦薇,等.《抗体偶联药物药学研究与评价技术指导原则》解读 [J]. 中国新药杂志, 2025, 34(6): 561-565.
Li Q, Wu Y K, Wei W, et al. Interpretation of guidance on CMC study and evaluation of antibody-drug conjugates [J]. Chin J New Drugs, 2025, 34(6): 561-565.
- [5] Guideline I C H H. Analytical procedure development Q14 [EB/OL]. (2022-03-24)[2026-01-13]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_Q14_Document_Step2_Guideline_2022_0324.pdf.
- [6] Cadang L, Li S M, Wang J, et al. Real-time bioconjugation reaction monitoring of antibody-drug conjugates with multiattribute high-throughput hydrophobic interaction chromatography [J]. Anal Chem, 2025, 97(48): 26411-26418.
- [7] Wagner E, Maurer J, Zanna L, et al. Comprehensive evaluation of the analytical toolbox for commercial cysteine-linked antibody-drug conjugates [J]. J Chromatogr A, 2026, 1777: 466966.
- [8] Buitelaar P L M, Rosing H, Beijnen J H, et al. An overview of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods for the quantification of antibody-drug conjugates [J]. Biomed Chromatogr, 2026, 40(2): e70334.
- [9] Drago J Z, Modi S, Chandarlapaty S. Unlocking the potential of antibody-drug conjugates for cancer therapy [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2021, 18(6): 327-344.
- [10] Sharma S, Li Z, Bussing D, et al. Evaluation of quantitative relationship between target expression and antibody-drug

- conjugate exposure inside cancer cells [J]. *Drug Metab Dispos*, 2020, 48(5): 368-377.
- [11] Criscitiello C, Morganti S, Curigliano G. Antibody-drug conjugates in solid tumors: A look into novel targets [J]. *J Hematol Oncol*, 2021, 14(1): 20.
- [12] Bertucci F, de Nonneville A, Finetti P, et al. The co-expression of antigen targets as a rationale for ADC combination in urothelial cancer [J]. *Ann Oncol*, 2024, 35(5): 477-478.
- [13] Loganzo F, Sung M, Gerber H P. Mechanisms of resistance to antibody-drug conjugates [J]. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2016, 15(12): 2825-34.
- [14] Bussing D, Sharma S, Li Z, et al. Quantitative evaluation of the effect of antigen expression level on antibody-drug conjugate exposure in solid tumor [J]. *AAPS J*, 2021, 23(3): 56.
- [15] Nicolaou K C, Rigol S, Pitsinos E N, et al. Uncialamycin-based antibody-drug conjugates: Unique enediyne ADCs exhibiting bystander killing effect [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, 118(25): e2107042118.
- [16] Kapoor V, Singh A K, Lewis C D, et al. Exploiting radiation induction of antigens in cancer: Targeted drug delivery [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(6): 3041.
- [17] Pak Y, Zhang Y J, Pastan I, et al. Antigen shedding may improve efficiencies for delivery of antibody-based anticancer agents in solid tumors [J]. *Cancer Res*, 2012, 72(13): 3143-3152.
- [18] Maass K F, Kulkarni C, Betts A M, et al. Determination of cellular processing rates for a trastuzumab-maytansinoid antibody-drug conjugate (ADC) highlights key parameters for ADC design [J]. *AAPS J*, 2016, 18(3): 635-646.
- [19] Shin S H, Ju E J, Park J, et al. ITC-6102RO, a novel B7-H3 antibody-drug conjugate, exhibits potent therapeutic effects against B7-H3 expressing solid tumors [J]. *Cancer Cell Int*, 2023, 23(1): 172.
- [20] Harding F A, Stickler M M, Razo J, et al. The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: Residual immunogenicity resides in the CDR regions [J]. *MAbs*, 2010, 2(3): 256-265.
- [21] Gordon G L, Raybould M I J, Wong A, et al. Prospects for the computational humanization of antibodies and nanobodies [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1399438.
- [22] Fiala J, Schuster D, Heck A J R. Antibody-drug conjugate stability probed by variable-temperature electrospray ionization mass spectrometry [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2025, 36(6): 1395-1403.
- [23] van der Horst H J, Nijhof I S, Mutis T, et al. Fc-engineered antibodies with enhanced fc-effector function for the treatment of B-cell malignancies [J]. *Cancers*, 2020, 12(10): 3041.
- [24] Alas M, Saghaidehkordi A, Kaur K. Peptide-drug conjugates with different linkers for cancer therapy [J]. *J Med Chem*, 2021, 64(1): 216-232.
- [25] Su Z, Xiao D, Xie F, et al. Antibody-drug conjugates: Recent advances in linker chemistry [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(12): 3889-3907.
- [26] Caculitan N G, Dela Cruz Chuh J, Ma Y, et al. Cathepsin B is dispensable for cellular processing of cathepsin B-cleavable antibody-drug conjugates [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(24): 7027-7037.
- [27] Balamkundu S, Liu C F. Lysosomal-cleavable peptide linkers in antibody-drug conjugates [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(11): 3080.
- [28] Landry M L, Crawford J J. LogD contributions of substituents commonly used in medicinal chemistry [J]. *ACS Med Chem Lett*, 2020, 11(1): 72-76.
- [29] Tsuchikama K, An Z Q. Antibody-drug conjugates: Recent advances in conjugation and linker chemistries [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(1): 33-46.
- [30] Conilh L, Sadilkova L, Viricel W, et al. Payload diversification: A key step in the development of antibody-drug conjugates [J]. *J Hematol Oncol*, 2023, 16(1): 3.
- [31] Lindell E, Zhong L, Zhang X N. Quiescent cancer cells: A potential therapeutic target to overcome tumor resistance and relapse [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3762.
- [32] 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.
- [33] Antonow D, Thurston D E. Synthesis of DNA-interactive pyrrolo [2, 1-c] [1, 4] benzodiazepines (PBDs) [J]. *Chem Rev*, 2011, 111(4): 2815-2864.
- [34] Duvall J R, Damelin M, Kozytska M V, et al. Abstract 232: An antibody-drug conjugate carrying a microtubule inhibitor and a DNA alkylator exerts both mechanisms of action on tumor cells [J]. *Cancer Res*, 2019, 79(13_Supplement): 232.
- [35] Inase A, Kimbara S, Imamura E, et al. Overcoming resistance to antibody-drug conjugates: Mechanisms and emerging strategies [J]. *Oncologist*, 2026, 31(4): oyag020.
- [36] Li X H, Liu J M, Meng Y T, et al. Frontiers in antibody-drug conjugates: Mechanisms, design innovations, and clinical applications in targeted cancer therapy [J]. *Pharmaceuticals*, 2026, 19(2): 324.
- [37] Liu Y, Liu Y, Wu T, et al. Drug resistance to antibody-drug conjugates: mechanisms, challenges, and perspectives [J]. *Cancer Biology & Medicine*, 2026: 20250707.

- [38] Larose É A, Hua X Y, Yu S L, et al. Antibody-drug conjugates in breast cancer treatment: Resistance mechanisms and the role of therapeutic sequencing [J]. *Cancer Drug Resist*, 2025, 8: 11.
- [39] Menezes B, Cilliers C, Wessler T, et al. An agent-based systems pharmacology model of the antibody-drug conjugate kadcyla to predict efficacy of different dosing regimens [J]. *AAPS J*, 2020, 22(2): 29.
- [40] Bordeau B M, Yang Y J, Balthasar J P. Transient competitive inhibition bypasses the binding site barrier to improve tumor penetration of trastuzumab and enhance T-DM1 efficacy [J]. *Cancer Res*, 2021, 81(15): 4145-4154.
- [41] Ma X J, Wang M K, Ying T L, et al. Reforming solid tumor treatment: The emerging potential of smaller format antibody-drug conjugate [J]. *Antibody Ther*, 2024, 7(2): 114-122.
- [42] Lee M, Han S H, Kim D, et al. Systematic identification of genomic hotspots for high-yield protein production in CHO cells [J]. *New Biotechnol*, 2025, 88: 61-72.
- [43] Combs R G, Yu E, Roe S, et al. Fed-batch bioreactor performance and cell line stability evaluation of the artificial chromosome expression technology expressing an IgG1 in Chinese Hamster ovary cells [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27(1): 201-208.
- [44] Graf A, Woodhams A, Nelson M, et al. Automated data generation for Raman spectroscopy calibrations in multi-parallel mini bioreactors [J]. *Sensors*, 2022, 22(9): 3397.
- [45] Anami Y, Otani Y, Xiong W, et al. Homogeneity of antibody-drug conjugates critically impacts the therapeutic efficacy in brain tumors [J]. *Cell Rep*, 2022, 39(8): 110839.
- [46] Wu G, Yu C F, Yin S C, et al. A native SEC-MS workflow and validation for analyzing drug-to-antibody ratio and drug load distribution in cysteine-linked antibody-drug conjugates [J]. *J Chromatogr B*, 2024, 1241: 124167.
- [47] Cadang L, Li S, Wang J, et al. Real-time bioconjugation reaction monitoring of antibody-drug conjugates with multiattribute high-throughput hydrophobic interaction chromatography [J]. *Anal Chem*, 2025, 97(48): 26411-26418.
- [48] Hingorani D V. An overview of site-specific methods for achieving antibody drug conjugates with homogenous drug to antibody ratio [J]. *Expert Opin Biol Ther*, 2024, 24(1-2): 31-36.
- [49] Debnath S, Das M, Mondal S, et al. Advances in chromatography: Contemporary techniques and applications [J]. *Essent Chem*, 2025, 2(1): 1-27.
- [50] 中国药典 [S]. 三部. 2025.
Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume III. 2025.
- [51] Hotha K K. The ABC of ADCs (antibody-drug conjugates): A comprehensive review of technical, regulatory, and clinical challenges [J]. *Adv Chem Eng Sci*, 2023, 13(4): 363-381.
- [52] Gong H H, Ihle N, Jones M T, et al. Control strategy for small molecule impurities in antibody-drug conjugates [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2018, 19(3): 971-977.
- [53] 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*, 2020, 12(1): 1682895.
- [54] 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]. *Bioconjugate Chem*, 2016, 27(3): 604-615.
- [55] Riccardi F, Dal Bo M, Macor P, et al. A comprehensive overview on antibody-drug conjugates: From the conceptualization to cancer therapy [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1274088.
- [56] Gondalia H. *Antibody Drug Conjugates: Design, Discovery, and Development* [M]. Cham: Springer Nature Switzerland, 2026: 49-71.
- [57] Deng J Z, Lancaster C, Winters M A, et al. Multi-attribute characterization of pneumococcal conjugate vaccine by size-exclusion chromatography coupled with UV-MALS-RI detections [J]. *Vaccine*, 2022, 40(10): 1464-1471.
- [58] Kristensen D B, Eskesen N S, Coll-Satue C, et al. Rapid and selective characterization of antibody-drug conjugates in complex sample matrices by native affinity liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *mAbs*, 2026, 18(1): 2618314.
- [59] Goyon A, Kim M, Dai L, et al. Streamlined characterization of an antibody-drug conjugate by two-dimensional and four-dimensional liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(23): 14896-14903.
- [60] Li W J. Analytical development and testing strategy of antibody-drug conjugates [J]. *AAPS PharmSciTech*, 2026, 27(3): 150.
- [61] Chan B M, Badh A, Berry K A, et al. Flow cytometry-based epitope binning using competitive binding profiles for the characterization of monoclonal antibodies against cellular and soluble protein targets [J]. *SLAS Discov*, 2018, 23(7): 613-623.
- [62] Nath N, Godat B, Zimprich C, et al. Homogeneous plate

- based antibody internalization assay using pH sensor fluorescent dye [J]. J Immunol Meth, 2016, 431: 11-21.
- [63] Sang H, Liu J L, Zhou F, et al. Target-responsive subcellular catabolism analysis for early-stage antibody-drug conjugates screening and assessment [J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(12): 4020-4031.
- [64] Humphries W H, Payne C K. Imaging lysosomal enzyme activity in live cells using self-quenched substrates [J]. Anal Biochem, 2012, 424(2): 178-183.
- [65] Virgone-Carlotta A, Lemasson M, Mertani H C, et al. In-depth phenotypic characterization of multicellular tumor spheroids: Effects of 5-Fluorouracil [J]. PLoS One, 2017, 12(11): e0188100.
- [66] Palma Chaundler C S, Lu H, Fu R, et al. Kinetics and efficacy of antibody drug conjugates in 3D tumour models [J]. bioRxiv, 2023, doi: 10.1101/2023.02.14.528517.
- [67] Singh A P, Sharma S, Shah D K. Quantitative characterization of *in vitro* bystander effect of antibody-drug conjugates [J]. J Pharmacokinet Pharmacodyn, 2016, 43(6): 567-582.
- [68] Li F, Emmerton K K, Jonas M, et al. Intracellular released payload influences potency and bystander-killing effects of antibody-drug conjugates in preclinical models [J]. Cancer Res, 2016, 76(9): 2710-2719.
- [69] Hopson J B, Neji R, Dunn J T, et al. Pre-training, transfer learning and pretext learning for a convolutional neural network applied to automated assessment of clinical PET image quality [J]. IEEE Trans Radiat Plasma Med Sci, 2023, 7(4): 372-381.
- [70] Addisu E G, Yirga T G, Yirga H G, et al. Transfer learning-based hybrid VGG16-machine learning approach for heart disease detection with explainable artificial intelligence [J]. Front Artif Intell, 2025, 8: 1504281.
- [71] Tandon A, Howard B, Ramaiahgari S, et al. Deep learning image analysis of high-throughput toxicology assay images [J]. SLAS Discov, 2022, 27(1): 29-38.
- [72] Ozcan I, Aydin H, Cetinkaya A. Comparison of classification success rates of different machine learning algorithms in the diagnosis of breast cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2022, 23(10): 3287-3297.
- [73] Noriega H A, Wang X S. AI-driven innovation in antibody-drug conjugate design [J]. Front Drug Discov, 2025, 5: 1628789.
- [74] Wang Y X, Guo C Y, Li W M. Artificial intelligence in antibody-drug conjugate development [J]. Trends Pharmacol Sci, 2025, 46(12): 1209-1223.
- [75] Koren E, De Groot A S, Jawa V, et al. Clinical validation of the “*in silico*” prediction of immunogenicity of a human recombinant therapeutic protein [J]. Clin Immunol, 2007, 124(1): 26-32.
- [76] Hong K B, An H C. Degradable-antibody conjugates: Emerging new modality [J]. J Med Chem, 2023, 66(1): 140-148.

[责任编辑 刘东博]