综述

类 IgG 双特异性抗体纯化工艺研究进展

范宝庆，王振玉*
（杰科（天津）生物医药有限公司，天津 300480）

摘要：类 IgG 双特异性抗体是人工构建的功能性抗体，其生产工艺烦琐、副产物复杂多样，很难构建像单抗类药物一样的通用型平台工艺，常需建立针对性的分离纯化工艺。错配产物和聚集体是类 IgG 双特异性抗体生产中常见的副产品，是分离纯化的难点。该文简要概述了应用较广泛的类 IgG 双特异性抗体的分子结构及其对应的纯化工艺，重点阐述了不对称型类 IgG 双特异性抗体同源二聚体、1/2 半抗或者缺失轻链的 3/4 不完整的抗体片段，以及对称型类 IgG 双特异性抗体聚集体的去除策略，以期为类 IgG 双特异性抗体的分离纯化工艺开发提供文献参考和新思路。

关键词：双特异性抗体；类 IgG；纯化工艺；同源二聚体；聚集体
中图分类号：TQ464.7　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)06-0859-08
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.06.004

Advances in Purification Process of IgG-like Bispecific Antibodies

FAN Baoqing, WANG Zhenyu*
(*Jecho (Tianjin) BioPharmaceuticals Co., Ltd., Tianjin 300480*)

ABSTRACT: IgG-like bispecific antibodies are artificially constructed functional antibodies with complicated production processes and by-products. It is not easy to develop a generic platform process like monoclonal antibodies and needs to develop specific purification processes. Mismatching products and aggregates are typical by-products in IgG-like bispecific antibody production, which have been a nodus of purification. This review briefly overviews the structures of IgG-like bispecific antibody molecules and their corresponding purification processes, and focuses on the removal strategies of asymmetric IgG-like bispecific antibodies homodimers, 1/2 half antibody or 3/4 antibody fragments lacking light chain, and aggregates of symmetric IgG-like bispecific antibodies, in order to provide some references and new ideas for the development of purification processes for IgG-like bispecific antibodies.

Key Words: bispecific antibody; IgG-like; purification process; homodimer; aggregate

双特异性抗体（bispecific antibody，BsAb），简称双抗，是一种可同时结合 2 个不同抗原或同一抗原不同表位的人工工程化抗体，通过衔接 T 细胞和肿瘤、协同抑制信号通路、形成蛋白复合物等方式发挥生物学功能。与传统单抗药物相比，双抗药物可减少药物开发和临床试验成本，治疗效果明显优于 2 种或多种单抗联合应用，不良反应较小，已成为恶性肿瘤、炎症、病毒感染及自身免疫病等许多疾病治疗的研究热点[1—2]。

类 IgG（IgG-like）双抗是包含整个 IgG 骨架的双抗，相对分子质量较大、血浆半衰期较长，具有 Fc 介导的效应功能，如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）、补体依赖的细胞毒作用（complement dependent cytotoxicity，CDC）和抗体

收稿日期：2022-11-11
作者简介：范宝庆（1982—），男，高级工程师，从事大分子生物药的下游分离纯化研究。
通信作者：王振玉（1986—），男，博士，从事大分子生物药研发与 CMC。
E-mail：zhenyu.wang@jechobio.com

依赖性细胞介导的细胞吞噬作用（antibody dependent cellular phagocytosis，ADCP），可增强对靶细胞的毒性或其他协同作用。如图 1 所示，根据结构可将类 IgG 双抗分为对称结构和不对称结构 [3]。

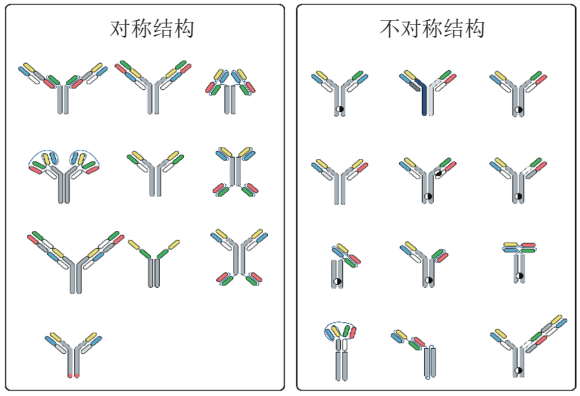


图 1　类 IgG 双抗的不同结构形式

Fig.1　Different Structure Formats of IgG-like BsAb

双抗生产过程可能产生由构成双抗的 2 条重链和 2 条轻链随机组合而成的同源二聚体，其不具有所需的双重特异性，但生化特性与目的双抗相似，难以去除。同时还可能产生聚集体、1/2 半抗或者缺失轻链的 3/4 不完整抗体片段，因此目的双抗的分离和纯化难度大。此外，宿主细胞蛋白（host cell protein，HCP）残留和宿主细胞 DNA（host cell DNA，HCD）残留等通过纯化也均应达到其质量标准的要求 [4]。与单抗药物相比，双抗药物的副产物纷繁复杂，不存在通用型的纯化工艺，需针对不同类型的双抗，设计复杂多样的分离纯化工艺。本研究重点阐述了不对称型类 IgG 双抗同源二聚体、对称型类 IgG 双抗聚集体的去除策略，以期为类 IgG 双抗下游工艺开发提供一些参考及新思路。

1　不对称型类 IgG 双抗中同源二聚体的分离纯化

1.1　杵 - 臼结构（knob-into-hole）双抗

杵 - 臼结构双抗是将一个抗体的重链 CH3 区 366 位体积较小的苏氨酸残基突变为体积较大的酪氨酸，形成突出的“杵”型结构；将另一个抗体重链 CH3 区 407 位较大的酪氨酸残基突变成较小的苏氨酸，形成凹陷的“臼”型结构；利用杵 - 臼结构实现 2 种不同抗体重链的正确装配（图 2）。由于空间位阻效应，杵 - 杵结构形成同源二聚体的概率很小。通常在合成工艺中，会尽可能控制臼 - 重链过表达，造成主要的副产物为臼 - 半抗和臼 - 臼同源二聚体。在低 pH（pH 4.5）条件下，臼 - 臼同源二聚体的稳定性比杵 - 臼结构双抗差，构象易发生转变、更疏水。因此，在下游纯化时，应用 Capto MMC ImpRes 填料可高效地分离臼 - 臼同源二聚体与杵 - 臼结构双抗。同时，研究 [5] 显示在纯化过程中添加 PEG3350 也能进一步提高纯化效果。

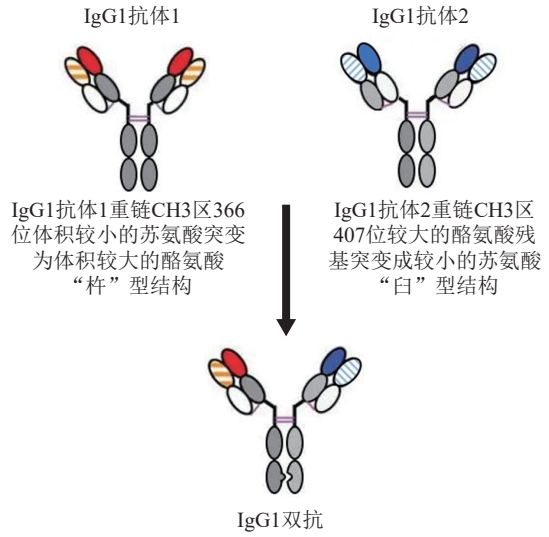


图 2　杵 - 臼结构的双抗

Fig.2　BsAb with Knob-into-hole Structure

GIESE 等 [6] 报道了美国 Genentech 公司的一种杵 - 臼结构双抗的纯化工艺。即用大肠埃希菌分别表达 2 个半抗体，采用蛋白 A 亲和填料分别捕获杵 - 半抗体和臼 - 半抗体，然后在体外组装双抗。体外组装的样品液中，聚集体的含量为 10%，双抗的纯度为 90%。采用离子交换色谱和混合模式色谱精制样品液，最后获得反相纯度 >99%、聚集体含量约为 1.1%、HCP 残留为 0.05 ng/mg 的双抗原液 [6]。

DENGL 等 [7] 在杵 - 臼结构双抗的基础上，推出了格式链交换（format chain exchange，FORCE）双抗技术，即在半抗分子上修饰了 Fc- 假链（dummy chain），避免半抗分子聚集形成同源二聚体。体外

加入 2 种修饰过的半抗和还原剂等，通过还原反应去除 Fc- 假链，使 2 个半抗体发生分子间链交换形成双抗。由于 2 个 Fc- 假链荷不同电荷，且也存在“杵”和“臼”结构，可自组装成不含有 Fab 片段的假二聚体（dummy dimmer）。因此，利用对 Fab 片段具有亲和力的 CaptoL、Kappa select 或 LamdaFab select 填料，可捕获、分离目标双抗。后续再通过一步或两步精制步骤去除过程相关杂质，即可获得满足质量要求的双抗原液。

1.2 静电转向结构双抗

日本 Chugai 制药公司利用其 ART-Ig 技术获得了 ACE910（emicizumab）双抗 [8]。ART-Ig 技术是在一条重链的 CH3 区使荷正电的氨基酸突变，在另外一条链上使荷负电的氨基酸突变，通过静电相互作用阻碍同源二聚体的形成，促进目标双抗的形成。康宁杰瑞生物制药有限公司在 ART-Ig 技术基础上创建了一种基于 Fc 的电荷排斥诱导双特异性（charge repulsion improved bispecific，CRIB）抗体研发平台 [8]，双抗的形成率可达 87%～ 100%。上游可通过控制 2 条重链的表达比例为 1 ∶ 1 来避免同源二聚体的形成；下游可通过蛋白 A 填料进行亲和捕获，由于同源二聚体与异源二聚体在电荷性质上有差异，捕获的蛋白中间体可再通过高分辨率的阳离子交换填料如：Capto SP ImpRes、Capto S Impact、Poros 50HS、Toyopearl SP-650S、Fractogel® EMD SO^{3-}（S）或阳离子交换复合模式填料 Capto MMC ImpRes 进行分离，达到去除同源二聚体的目的。

1.3 WuXi-Body 结构双抗

WuXi-Body 是药明生物具有自主知识产权的双抗技术平台 [9]，采用 T 细胞受体（T cell receptor，TCR）恒定区取代重链恒定区 CH1 部分和轻链恒定区 CL 部分（CL-CH1），避免重链和轻链的错配。同时，重链间可采用杵 - 臼结构。基于 WuXi-Body 及杵 - 臼结构策略制备双抗分子时，上游发酵时控制 TCR 结构域包含在杵 - 半抗链上，同时让臼 - 半抗稍微过表达，形成主要的副产物为臼 - 半抗和臼 - 臼同源二聚体。由于 TCR 恒定区的等电点比 CL-CH1 部分低，不含 TCR 结构域的臼 - 半抗和臼 - 臼同源二聚体等电点偏高，增大了杵 - 臼双抗与副产物的电荷差异，有利于后续纯化。GUO 等 [9] 报道了一种 WuXi-Body 结构双抗的纯化工艺。首先采用蛋白 A 亲和色谱捕获双抗，然后进行阴离子交换精制，通过选择合适的 pH 值让低等电点的杵 - 臼双抗与填料结合，而等电点偏高的臼 - 半抗和臼 - 臼同源二聚体不与填料结合而流穿。随后采用高分辨率的 Capto MMC ImpRes 混合模式填料进行精制，同时利用 pH- 盐双梯度洗脱去除痕量的臼 - 半抗和臼 - 臼同源二聚体，终收率约为 60%，体积排阻色谱（SEC）-HPLC 纯度 >99%，HCP 含量为 6 ng/mg[10]。

1.4 基于蛋白 A 亲和力差异改造的双抗

TUSTIAN 等 [11] 建立了基于标准的全人 IgG3 抗体的双抗开发平台，采用 1 条通用的轻链和 2 条不同的重链结合形成双抗，可显著降低免疫原性并改善其药动学特性。野生型 IgG3 抗体的 F_C 部分不与蛋白 A 亲和，但改造其中一条重链序列使其恒定区可与蛋白 A 的结合，改造后所得的 Fc 序列形式为 Fc*。双抗合成时可形成 F_C*×F_C*、F_C×F_C*、F_C×F_C 3 种二聚体。而 F_C×F_C* 这种嵌合形式的目的产物可依据三者对蛋白 A 填料亲和力不同而分离。针对该合成工艺，TUSTIAN 等 [11] 提供了 2 种纯化工艺。A 工艺首先采用 MabSelect SuRe 亲和填料进行捕获，F_C×F_C 同源二聚体不与填料结合而流穿，同时一部分的 HCP 和 HCD 等也被去除。MabSelect SuRe 亲和工艺可以参照单抗的结合、冲洗和洗脱条件进行，以去除产品相关杂质和过程相关杂质。洗脱后进行低 pH 孵育以灭活病毒，中和液随后通过更高分辨率的亲和填料 POROS MabCapture A 去除改造后的 F_C*×F_C* 同源二聚体，获得纯度 >95% 的 F_C×F_C* 目标双抗。然后通过 Capto MMC 复合模式填料精制，去除过程相关杂质，最后通过除病毒纳滤和超滤浓缩换液获得目标双抗的原液。B 工艺在 A 工艺基础上，通过优化 POROS Mab Capture A 的工艺条件，在洗脱液中添加 500 mmol/L 氯化钙，采用 pH 线性梯度洗脱模式提高 POROS MabCapture

A 的分辨率，通过一步亲和色谱即可去除 F_C*×F_C* 同源二聚体和 F_C×F_C 同源二聚体，纯化后双抗的纯度达到 98%以上，去除过程相关杂质的工艺同路线 A。

1.5　抗原结合片段（Fab）× 单链可变区片段（scFv）结构的双抗

单链抗体 scFv 具有分子小、穿透力强的优点，但亲和力弱、在体内半衰期短、效应功能差。以 scFv 为基础，将其与 Fc 段相连构建 scFv-Fc 融合蛋白，不仅可使其具有双价抗原结合位点，又可赋予其介导 ADCC 和 CDC 的功能，从而改善 scFv 的性能 [12]。这种结构的双抗分子在表达时通常轻链、重链和 scFv-Fc 链共表达。其中，scFv-Fc 链过表达时会导致 scFv-Fc 同源二聚体成为主要副产物。此时，可首先采用 KappaSelect 填料进行亲和捕获，该填料可特异性结合轻链的恒定区，而 scFv-Fc 不含轻链的恒定区，以此可去除 scFv×scFv 同源二聚体和 scFv- 半抗。再利用离子交换或者复合模式填料精制，进一步去除痕量的同源二聚体或半抗等杂质。武汉友芝友生物 YBODY® 平台采用此项技术，并已获得多项专利授权 [12—14]，公开的部分关键下游工艺参数中，采用 MabSelect SuRe 亲和填料进行双抗的捕获，洗脱缓冲液为 50 mmol/L 枸橼酸 - 枸橼酸钠，100 mmol/L 精氨酸，pH 3.2。随后，通过 SP 阳离子交换进行精制获得双抗原液。

1.6　通用型重链结构的 κλ-body 双抗

瑞士 Novimmune SA 公司建立了 κλ-body 双抗平台技术，采用 1 条通用的重链和 2 条不同血清型（κ 型和 λ 型）的轻链装配成双抗，通用的重链避免了重链错配的问题。在上游表达的过程中，副产物主要为重链、κ 轻链、λ 轻链、κ 同源二聚体和 λ 同源二聚体。因此，下游纯化工艺设计了三步亲和色谱，首先采用常规的蛋白 A 亲和填料 MabSelect SuRe 进行捕获，游离的轻链不含 Fc 部分而流穿。然后采用对不同血清型轻链具有选择性亲和作用的填料 KappaSelect 和 LambdaFabSelect 去除 2 种同源二聚体。KappaSelect 和 LambdaFabSelect 的顺序是可以互换的，主要取决于 2 种同源二聚体的相对量，应先去除占主要量的同源二聚体杂质。另外，由于 KappaSelect 填料与 Capto L 填料都对 κ 轻链具有亲和作用，也可相互替换。2020 年，专利 [15] 公开报道可用疏水填料和复合模式填料从单特异性 κ 和 λ 抗体中分离 κλ-body 双抗，优势是避免了亲和色谱作为最后一步色谱而产生的配基脱落风险。

1.7　利用蛋白反式剪接技术产生的不对称型类 IgG 双抗

HAN 等 [16] 构建了利用蛋白反式剪接产生不对称型类 IgG 双抗的技术平台（bispecific antibody by protein trans-splicing，BAPTS），能显著提高双抗分子的筛选效率，解决重链、轻链错配问题，还可获得天然 IgG 结构的双抗分子。目前该技术已经取得中国、欧洲和美国多项专利申请和授权。杰科生物利用该平台技术已成功筛选出 10 余种具有药效学活性的双抗候选分子 [16—20]。BAPTS 双抗首先是利用 2 个不同的细胞株分别表达 Fragment A 和 Fragment B 结构蛋白。下游纯化过程可采用 Ni 填料捕获 Fragment A 蛋白，CaptoL 亲和填料捕获 Fragment B 蛋白，纯化后的 2 个片段在 *Npu* 和 *DnaE* 酶的作用下进行自剪切组装，形成完整的双抗后再进行两步纯化，即利用 Ni 柱除去没有剪切的 FragmentA 抗体片段，再利用蛋白 A 亲和得到目标双抗，没有剪切的 Fragment B 不与蛋白 A 亲和填料结合而流穿，最终得到高纯度的蛋白中间体 [21—22]。BAPTS 双抗的自组装和纯化工艺流程如图 3 所示。

1.8　DuoBody 双抗

丹麦 Genmab 公司建立的 DuoBody 双抗生成技术平台是基于受控的 Fab 臂交换（controlled Fab-arm exchange，cFAE）原理，在 2 个 IgG1 抗体的 Fc CH3 区分别引入 K409R 和 F405L 突变位点，使非共价的 CH3-CH3 结合减弱，同源二聚体就可在温和条件下解聚；而在氧化还原的环境下可促进重链异源二聚化，实现 2 个母抗体重链间完成 Fab-arm 交换，形成双抗 [23]，且其含量 >90%。具体纯化工艺如下：突变后的 2 个 IgG1 抗体分别在 2 个中国仓鼠卵巢细胞系（CHO 细胞系）中表达，首先采用常规的蛋白 A 亲和色谱分别捕获 2 个抗体，然

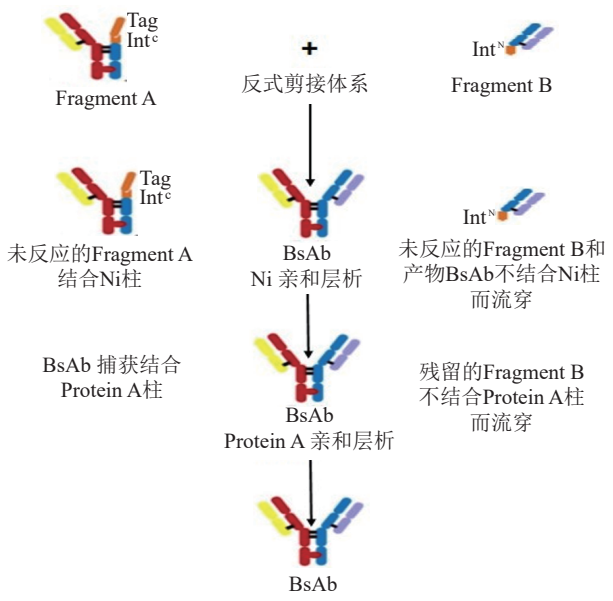


图 3 BAPTS 的纯化过程示意图

Fig.3 Schematic Diagram of Purification Process of BAPTS

后在体外装配双抗，由于双抗和 2 种单抗电荷差异较大，仅需一步离子交换色谱精制，即可去除掉同源二聚体等产品相关杂质[24—25]。

英国阿斯利康公司利用 DuoBody 双抗平台开发了直接从发酵收获液中快速生成双抗的方法[26]，将 F405L 和 K409R 突变的 2 个单抗的发酵上清液按 1 ∶ 1.2 混合，用 75 mmol/L 的 β- 巯基乙醇于 31 ℃还原 5 h，然后于 4 ℃将混合物置换至磷酸盐缓冲液中，再采用 MabSelect SuRe 捕获上清液中生成的双抗，最后通过精制步骤获得双抗原液。

2 不对称型类 IgG 双抗中 1/2 半抗或 3/4 不完整抗体片段的去除

1/2 半抗或者缺失轻链的 3/4 不完整抗体片段是双抗生产中的常见杂质，是由无法形成同源二聚体的重链过表达造成的。由于不完整的抗体片段与目标双抗分子之间差异较大，一般可以通过亲和力差异或者电荷差异进行分离。

基于亲和力差异分离不完整抗体片段主要采用蛋白 A 色谱技术。目前，应用在双抗纯化中的 3 种常用蛋白 A 亲和填料为 MabSelect PrismA、MabSelect SuRe LX 和 MabSelect SuRe pcc。其中，MabSelect SuRe pcc 和 MabSelect PrismA 的分辨率均高于 MabSelect SuRe LX，且 MabSelect PrismA 的载量和耐碱性较 MabSelect SuRe pcc 更高。1/2 半抗由于仅含 1 个 Fc 区域，结合蛋白 A 的能力比含有 2 个 Fc 区域的双抗弱，在蛋白 A 亲和色谱进行 pH 线性梯度洗脱过程中，半抗出峰较早。为了进一步提高半抗与双抗的分离效果，可向洗脱缓冲液中添加 500 mmol/L 氯化钠或 300 mmol/L 氯化钙。3/4 抗体片段亦可采用蛋白 L 色谱，pH 线性梯度洗脱去除[27—28]。

复合模式色谱填料由于其独特的选择性机制，在去除 1/2 半抗或者 3/4 抗体片段方面的应用也较广泛，能良好地分离等电点不同的双抗副产物，聚集体清除率也较好。Capto MMC ImpRes 是一种混合模式填料，具有阳离子交换和疏水作用双重机制，且有更小的粒径和配基密度，分辨率比 Capto MMC 高。Capto MMC ImpRes 能通过加入额外的 pH 和氯化钠梯度洗脱步骤去除同源二聚体和半抗体等副产物。药明生物[10,29—30]报道在 pH- 盐双梯度洗脱下进行的 Capto MMC ImpRes 混合模式色谱比 pH 或盐单梯度洗脱的分辨率高，可将产品的 SEC-HPLC 纯度从 73.3%提高到 99.0%。羟基磷灰石填料（HA）具有 Ca^{2+} 金属螯合作用和磷酸根基团的离子交换双重选择机制，去除半抗效果较好[31]。Toyopearl MX-Trp-650M 是一款兼具弱阳离子交换与疏水作用的混合模式色谱填料，可有效去除 kλ-body 双抗中的同源二聚体，使各种成分被依次洗脱出来。kλ-body 双抗在 75 mmol/L 氯化钠条件下洗脱，λ 同源二聚体于 500 mmol/L 氯化钠中洗脱，κ 同源二聚体在流穿液中而被去除[32]。

阳离子交换色谱也可用于去除双抗副产物。据研究[28]报道，使用蛋白 A 色谱可将双抗杂质降至 5%左右，而采用阳离子交换色谱则可降至 1%或更低。纯化工艺开发过程中，选择粒径小、分辨率高的阳离子交换填料如 Capto SP ImpRes，Poros 50HS 等，并采用线性 pH 梯度洗脱法，可有效去除不完整的 3/4 抗体片段等杂质。研究[32]显示，向纯化缓冲液中添加精氨酸或聚乙二醇（PEG）等可进一

步提高纯化效果。

3 对称型类 IgG 双抗中聚集体的去除策略

以天然单抗 IgG 为骨架，在抗体重链或轻链的 N 端或 C 端融合抗原结合结构域，如可变区片段（Fv）、scFv、Fab 或多肽等，形成的双抗主要为对称结构，相对分子质量大于 150 000，药动学类似天然抗体，甚至半衰期更长。

对称型类 IgG 结构双抗由于肽链较长，加剧了分子间肽链的缠绕，易形成聚集体，聚集体的含量可达 50%或更高。因此，对称型类 IgG 双抗的分离纯化工艺的难点主要在于如何去除双抗聚集体[5,33]。聚集体和双抗的电荷性质、疏水力以及对蛋白 A 的亲和力有显著差异，可通过合适的分离模式和操作条件去除[29]。

基于电荷差异分离常用的纯化填料有阳离子交换填料 SP Sepharose HP、Capto SP ImpRes、Capto SP Impact 和 Poros 50HS 等；阴离子交换填料有 Q Sepharose HP、Poros 50HQ 等。由于聚集体荷电荷比单体多，与填料配基的结合力强，通过合适的 pH 或氯化钠浓度线性梯度洗脱，通常可在双抗洗脱峰的峰尾将聚集体洗出。基于疏水力差异分离常用的填料有 Poros Benzyl、Capto Octyl 和 Capto Butyl 等。由于聚集体的疏水性比单体强，可选择性地让目的双抗从色谱柱中流穿，而聚集体结合到填料上，以实现有效分离[29]。在一些双抗的纯化工艺中，盐浓度过高可能会导致填料和目标蛋白之间形成不可逆的疏水相互作用，导致总产率降低。为了克服这一难题，可在纯化缓冲液中添加 5%的乙二醇或 1 mol/L 精氨酸来提高双抗的疏水洗脱效率[29]。基于与蛋白 A 亲和力差异分离的纯化填料有 MabSelect PrismA、MabSelect SuRe 等，采用 pH 梯度洗脱，由于聚集体与蛋白 A 填料结合更紧密，会在洗脱峰峰尾被洗出。

此外，混合模式填料在聚集体去除方面应用也较广泛，尤其是 Capto MMC ImpRes 填料，被应用在多个临床研究用双抗的生产中[34]。

4 总结与展望

双抗药物的独特作用机制使其成为生物治疗领域备受关注的一类药物。相比抗体偶联药物（antibody-drug conjugate，ADC）及单抗药物联用，双抗药物能同时结合多个靶点，实现更精准的治疗效果。因此，各药企都在争相布局双抗药物，以期在这一领域取得突破性进展。纯化工艺对类 IgG 双抗药物的药效和安全性有显著影响，需根据不同结构选择合适的纯化工艺。

本研究综述了类 IgG 双抗常用的分子结构及其对应的下游纯化工艺。目前，依然主要采用蛋白 A 亲和色谱捕获类 IgG 双抗，主要发展方向是开发高载量、高分辨率、耐碱清洗、高流速以及针对抗体不同结构域的亲和填料的填料。另外，离子交换色谱、疏水色谱和混合模式色谱依然是类 IgG 双抗精制的主要手段，可去除同源二聚体、1/2 半抗或者 3/4 不完整抗体片段以及聚集体等产品相关杂质。小粒径、高分辨率、高载量的离子交换填料及疏水填料是精制工艺的首选。混合模式的多种选择机制在类 IgG 双抗纯化中展现出独特的分离优势，在未来双抗工艺开发中有望被广泛应用。此外，纯化缓冲液中盐、吐温、精氨酸或 PEG 等辅助试剂的添加可提高双抗和杂质的分离效果。将高通量筛选技术和试验设计（DoE）方法运用到工艺开发过程中，可大幅缩短填料选型和确定操作参数的时间，快速获得稳健的下游纯化工艺。

综上所述，类 IgG 双抗结构的复杂多样增加了下游工艺开发的难度。针对不同分子类型的类 IgG 双抗，需匹配对应的下游工艺去除其错配体和聚集体等相关杂质。高效的纯化工艺可突破类 IgG 双抗的生产瓶颈，提升双抗的质量和产量，降低成本，促进类 IgG 双抗的开发和应用。

参考文献：

[1] 吕　明, 王军志, 沈倍奋. 双特异性抗体结构与作用机制研究进展[J]. 中国新药杂志, 2019, **28**(21): 7.

[2] 毛开云, 李　荣, 李丹丹, 等. 全球双特异性抗体药物研发格局分析[J]. 中国生物工程杂志, 2021, **41**(11): 110-118.

[3] LABRIJN A F, JANMAAT M L, REICHERT J M, *et al*. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline

［J］. *Nat Rev Drug Discov*, 2019, **18**(8): 585-608.

［4］ CHEN S W, ZHANG W. Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies［J］. *Antib Ther*, 2021, **4**(2): 73-88.

［5］ Li Y F, WANG Y, SHEN P, *et al*. A roadmap for IgG-like bispecific antibody purification［M］// ALLAN MATTE. Approaches to the purification, analysis and characterization of antibody-based therapeutics. Amsterdam: Elsevier, 2020: 167-179.

［6］ GIESE G, WILLIAMS A, RODRIGUEZ M, *et al*. Bispecific antibody process development: assembly and purification of knob and hole bispecific antibodies［J］. *Biotechnol Prog*, 2018, **34**(2): 397-404.

［7］ DENGL S, MAYER K, BOHRMANN F, *et al*. Format chain exchange(FORCE) for high-throughput generation of bispecific antibodies in combinatorial binder-format matrices［J］. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4974.

［8］ IGAWA T, TSUNODA H. Antibody modification method for purifying bispecific antibody: EP, 2009101A4［P］. 2009-10-21.

［9］ GUO G L, HAN J Y, WANG Y, *et al*. A potential downstream platform approach for WuXiBody-based IgG-like bispecific antibodies［J］. *Protein Expr Purif*, 2020, **173**: 105647.

［10］ WAN Y, WANG Y M, ZHANG T, *et al*. Application of pH-salt dual gradient elution in purifying a WuXiBody-based bispecific antibody by MMC ImpRes mixed-mode chromatography［J］. *Protein Expr Purif*, 2021, **181**: 105822.

［11］ TUSTIAN A D, ENDICOTT C, ADAMS B, *et al*. Development of purification processes for fully human bispecific antibodies based upon modification of protein A binding avidity［J］. *MABs*, 2016, **8**(4): 828-838.

［12］ ZHOU P F, ZHANG J, YANG Y X. Bispecific antibody: US, 9079965B2［P］. 2015-07-14.

［13］ ZHOU P F, ZHANG J, YANG Y X. Bispecific antibody: US, 9562110B2［P］. 2017-02-07.

［14］ ZHOU P F, WANG T, FANG L J, *et al*. Construction and application of bispecific antibody EpCAM×CD3: US, 9777073B2［P］. 2017-10-03.

［15］ NICOLAS F, JEAN-FRANCOIS D, KEITH W, *et al*. Methods of purifying bispecific antibodies: US, 20200181287A1［P］. 2020-06-11.

［16］ HAN L, CHEN J S, DING K, *et al*. Efficient generation of bispecific IgG antibodies by split intein mediated protein trans-splicing system［J］. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 8360.

［17］ ZONG H F, HAN L, CHEN J, *et al*. Kinetics study of the natural split *Npu* DnaE intein in the generation of bispecific IgG antibodies［J］. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2022, **106**(1): 161-171.

［18］ WANG L, QIAO Y, ZONG H F, *et al*. IgG-like bispecific antibody CD3×EpCAM generated by split intein against colorectal cancer［J］. *Front Pharmacol*, 2022, **13**: 803059.

［19］ ZHOU Y X, ZONG H F, HAN L, *et al*. A novel bispecific antibody targeting CD3 and prolactin receptor(PRLR) against PRLR-expression breast cancer［J］. *J Exp Clin Cancer Res*, 2020, **39**(1): 87.

［20］ SUN R, ZHOU Y X, HAN L, *et al*. A rational designed novel bispecific antibody for the treatment of GBM［J］. *Biomedicines*, 2021, **9**(6): 640.

［21］ HAN L, ZONG H F, ZHOU Y X, *et al*. Naturally split intein *Npu* DnaE mediated rapid generation of bispecific IgG antibodies［J］. *Methods*, 2019, **154**: 32-37.

［22］ 王 磊. 基于 “BAPTS” 技术构建双特异性抗体及其药效学研究[D]. 上海: 上海交通大学硕士学位论文, 2020.

［23］ SCHUURMAN J, VINK T, DE WINKEL J V, *et al*. Bispecific antibodies and methods for production thereof: US, 20100105874A1［P］. 2010-04-29.

［24］ GRAMER M J, VAN DEN BREMER E T J, VAN KAMPEN M D, *et al*. Production of stable bispecific IgG1 by controlled Fab-arm exchange: scalability from bench to large-scale manufacturing by application of standard approaches［J］. *Mabs*, 2013, **5**(6): 962-973.

［25］ 黎晓维, 刘慧芳, 王海彬, 等. 双特异性抗体的结构设计及其装配工艺研究进展[J]. 中国新药杂志, 2014, **23**(20): 2430-2436.

［26］ STEINHARDT J, WU Y L, FLEMING R, *et al*. Fab-arm exchange combined with selective protein A purification results in a platform for rapid preparation of monovalent bispecific antibodies directly from culture media［J］. *Pharmaceutics*, 2019, **12**(1): 3.

［27］ LI Y F. Immunoglobulin-binding protein-based affinity chromatography in bispecific antibody purification: functions beyond product capture［J］. *Protein Expr Purif*, 2021, **188**: 105976.

[28] CHEN X, WANG Y, LI Y. Removing half antibody byproduct by protein A chromatography during the purification of a bispecific antibody [J]. *Protein Expr Purif*, 2020, **172**: 105635.

[29] GAO D, WANG L L, LIN D Q, *et al*. Evaluating antibody monomer separation from associated aggregates using mixed-mode chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2013, **1294**: 70-75.

[30] LI Y F. A brief introduction of IgG-like bispecific antibody purification: methods for removing product-related impurities [J]. *Protein Expr Purif*, 2019, **155**: 112-119.

[31] GAGNON P. Improved antibody aggregate removal by hydroxyapatite chromatography in the presence of polyethylene glycol [J]. *Immunol Methods*, 2008, **336**(2): 222-228.

[32] ZHANG X D, CHEN T, LI Y F. A parallel demonstration of different resins' antibody aggregate removing capability by a case study [J]. *Protein Expr Purif*, 2019, **153**: 59-69.

[33] KLUTERS S, HAFNER M, HIRSCHHEYDT T V, *et al*. Solvent modulated linear pH gradient elution for the purification of conventional and bispecific antibodies: modeling and application [J]. *J Chromatogr A*, 2015, **1418**: 119-129.

[34] ZHENG J, WALKER J A, GHOSE S. Recovery and purification processing for bispecific antibody production [J]. *Am Pharm Rev*, 2021, **24**(2): 65-69.

