PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
XXXX,XX(XX):1~18
www.pibb.ac.cn

双特异抗体结构设计与应用*

张 丁 郑悦亭** 张 维**
（河南农业大学动物医学院，河南省兽医生物技术重点实验室，郑州 450046）

摘要 双特异抗体通过工程设计可以同时结合两个抗原或同一抗原的两个表位，目前广泛应用于肿瘤治疗等各个领域。双特异抗体根据不同的作用机制可以设计不同的结构类型，其中包括具有Fc的IgG样双特异抗体，Fc可以产生相应的免疫效应以及影响体内药代动力学特征。对称IgG样双特异抗体结构对称，对每个抗原结合都是二价的，不需要考虑重链配对问题，易于生产，由于两个抗体可变区连接在同一条链，设计需要考虑抗体同时结合抗原的空间位阻效应。不对称IgG样双特异抗体两条Fc链不同，其携带的特异抗体识别不同的抗原或表位，因此结构设计灵活，设计需考虑重链配对和轻链配对问题。非IgG样双特异抗体不带Fc，体积分子质量小，具有较好的组织穿透能力，药代动力学清除快，结构设计灵活。目前研究双特异抗体作用机制包括T细胞重新靶向，阻断导致疾病的双信号通路，阻断免疫检查点，结合两种分子形成复合物等。双特异抗体在癌症治疗领域有着广泛的应用，除此之外也应用于自身免疫疾病、传染病、血液疾病和其他疾病，不同结构设计的双特异抗体在不同的治疗领域具有不同的优势。本文对不同类型双特异抗体结构设计进行阐述，并进一步综述其作用机制以及在治疗领域的应用。

关键词 抗体，IgG样双特异抗体，非IgG样双特异抗体，结构设计
中图分类号 Q7，Q81，R392 **DOI**：10.3724/j.pibb.2025.0342 **CSTR**：32369.14.pibb.20250342

抗体是指机体由于抗原的刺激而产生的具有保护作用的蛋白质。它（免疫球蛋白不仅仅只是抗体）是一种由浆细胞分泌，被免疫系统用来鉴别与中和外来物质如细菌、病毒等的大型Y形蛋白质，仅被发现存在于脊椎动物的血液等体液中及其B细胞的细胞膜表面。

单克隆抗体是由单一B细胞克隆产生的高度均一、仅针对某一特定抗原表位的抗体[1]。可以采用杂交瘤技术和噬菌体展示技术来制备，单克隆抗体以其特异性强、纯度高、均一性好等优点，广泛应用于酶联免疫吸附分析、放射免疫分析、免疫组化和流式细胞术等技术，可用于各种抗原检测，包括病原微生物抗原、肿瘤抗原的检测[2]。治疗性单克隆抗体可以通过多种机制起作用，包括阻断靶分子功能，诱导表达靶点细胞凋亡，或者调节信号通路[3-4]。

双特异抗体近来在治疗应用上越来越受到关注[5-7]，不同于单克隆抗体只结合一个抗原或者表位，双特异抗体是一种工程抗体，通过工程设计双特异抗体可以同时结合两个抗原或者同一抗原的两个表位[8]，双特异抗体概念最早在1960年代提出[9]，早期的研究工作主要集中在探索其在癌症治疗领域的潜在应用，第一个双特异抗体Catumaxomab于2009年4月在欧盟被批准用于治疗腹腔内恶性腹水[10]，2014年，美国食品药品监督管理局（Food and Drug Administration，FDA）批准了首个双特异抗体Blinatumomab，标志着这类治疗药物进入了一个新时代[11]。

目前有多种上市双特异抗体和多种临床阶段以及临床前阶段的双特异抗体在开发[8]，其作用机制包括连接效应细胞与靶细胞，效应细胞包括T细胞[12]和自然杀伤细胞（natural killer cell，NK cell）[13]等免疫细胞，靶细胞一般为肿瘤细胞，通

* 国家自然科学基金（32302838）资助项目。
** 通讯联系人。
张维 Tel：0371-56990180，E-mail：zhangweiest@126.com
郑悦亭 Tel：0371-56990180，E-mail：yuetingzheng@henau.edu.cn
收稿日期：2025-07-19，接受日期：2025-10-21

过双特异抗体激活免疫细胞攻击肿瘤细胞；另外一些双特异抗体靶点为信号通路受体或配体，可以同时抑制两个致病信号通路或者激活两个协同信号[14-15]；另外通过抗体与药物偶联双特异抗体可以携带药物或毒素到靶细胞，与单克隆抗体药物偶联相比可以减少脱靶毒性[16-18]。双特异抗体在治疗领域有着广泛的应用，在肿瘤治疗领域包括免疫细胞重新定向肿瘤细胞，比如Blinatumomab靶向CD3×CD19使T细胞重新定向治疗B细胞白血病[19]，另外一些在肿瘤治疗中通过靶向信号通路，比如表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）×细胞间充质上皮转化因子（cellular mesenchymal-epithelial transition factor，cMET）双抗，阻断肿瘤细胞的双重生长信号[20]；除了在肿瘤治疗领域在自身免疫疾病治疗也在研究和应用，比如IL-17×IL-23双抗可以同时抑制两种促炎症因子[21]；在治疗感染性疾病开发双特异抗体可以结合病毒两个保守表位，防止病毒变异逃逸[22-25]；另外在代谢疾病方面通过调节靶点，比如葡萄糖转运蛋白2（glucose transporter 2，GLUT2）×细胞毒性T淋巴细胞抗原-4（cytotoxic T lymphocyte antigen-4，CTLA-4）双抗，改善糖尿病治疗[26]。除了治疗疾病双特异抗体也应用于疾病诊断，如Diabody由于具有较小的分子质量和较强的组织穿透能力，设计肿瘤特异性靶点和通过标记可以用于诊断肿瘤[27]。双特异抗体结构主要包括带Fc的双特异抗体和不带Fc的双特异抗体[6]，两者的差异在于Fc可以与免疫细胞受体结合介导抗体依赖细胞介导的细胞毒作用（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity，ADCC）以及抗体依赖性细胞吞噬作用（antibody-dependent cellular phagocytosis，ADCP），另外Fc可以激活补体，双特异抗体由于Fc分子质量以及可以与受体结合影响其在体内半衰期[28-29]。本文主要介绍不同双抗体设计结构特点，也对双特异抗体作用机制以及应用进展综述。

1 Fc在抗体中的功能

目前双特异抗体设计有很多不同结构形式，目前主要根据其结构是否含有IgG抗体的Fc区域划分为两类，一类是包含Fc的IgG样双特异抗体，另一类是不包含Fc的非IgG样双特异抗体[30-31]。

抗体Fc在重链C端恒定区，在同种类型抗体中高度保守，其氨基酸序列和糖基化模式的细微变化会影响其生物学功能。Fc区域通过与免疫细胞受体或可溶性免疫成分结合产生免疫效应。它招募巨噬细胞、NK细胞和中性粒细胞等效应细胞，这些细胞表达Fc受体（FcR），识别与抗原结合的抗体的Fc结构域。这种接触触发了免疫机制，如吞噬和细胞毒性。例如，IgG抗体与巨噬细胞上的Fcγ受体结合，增强病原体清除，而NK细胞利用FcγRIIIa启动ADCC效应，这是抗病毒防御和癌症免疫治疗的关键机制；抗体的Fc区域连接了适应性免疫和补体系统，当抗体的Fab段与病原体表面的抗原特异结合后，抗体的Fc区域发生构象改变，暴露出能与补体系统中C1复合物结合的位点，启动经典补体途径[32]。

糖基化通过调节受体亲和力和下游信号转导，进一步优化了Fc段的功能。唾液酸化的IgG优先与抑制性的FcγRIIb受体结合，从而抑制免疫激活，这是静脉注射用免疫球蛋白（intravenous immunoglobulin，IVIG）治疗自身免疫性疾病的作用机制[33]。相比之下，岩藻糖缺失的IgG增强了与FcγRIIIa受体的结合，放大ADCC效应，这一特性在针对癌细胞的单克隆抗体疗法中得到了应用[34]。这些依赖于聚糖的修饰突显了Fc段相互作用在精确调节免疫反应方面的动态调控机制。IgG D297是具有保守的N糖基化位点，其会影响抗体稳定性，受体结合能力和效应功能，人IgG1和IgG3缺少N糖基化影响结合FcγRI和FcγRII，突变N297会影响抗体对蛋白酶敏感性和补体激活能力[35]。

Fc除了产生上述免疫效应之外，带有Fc抗体的特点是其在体内的系统清除缓慢，且终末消除半衰期长，这主要取决于它们与新生儿Fc受体（neonatal Fc receptor，FcRn）介导的再循环途径结合并通过该途径再循环的能力。FcRn介导的再循环机制包括IgG和白蛋白非特异性地通过胞饮作用进入细胞，在酸性内体中与FcRn结合，随后在中性pH条件下再循环回到细胞表面[36]。由于具有Fc的抗体具有较大分子质量（如IgG分子质量150 ku）影响其组织穿透能力，尤其是对于实体肿瘤，而不带Fc的单链可变区片段（single chain fragment variable，scFv）分子质量约25 ku左右具有更好的组织穿透能力。

在双特异抗体设计中是否带有Fc片段需要根据应用综合考虑。该双特异抗体是否需要Fc片段介导的受体效应、补体效应等免疫效应，以及Fc对抗体在体内保留周期和组织穿透的影响。另外

Fc片段也会影响双特异抗体的组装和纯化，目前发展的一些技术对Fc片段进行改造，比如设计电荷作用、空间位阻作用可以显著提高带Fc的双特异抗体的组装效率。

2　对称IgG样双特异抗体

带Fc片段的双特异抗体根据两条重链Fc的对称性可以分为对称的和非对称的IgG样双特异抗体，对称的带有Fc的双特异抗体结合每一种抗原或表位是双价的，在生成上由于带Fc的两条链相同不用考虑错配问题，从而简化了生成和纯化过程，另外两条相同的天然Fc链形成的配对之间可以形成二硫键具有更稳定的结构，同时Fc上氨基酸糖基化修饰是天然状态，不影响ADCC效应和补体依赖的细胞毒性（complement dependent cytotoxicity，CDC）。由于两个抗体可变区连接在同一条重链或者轻链，很多设计需要考虑抗体同时结合抗原的空间位阻效应，因而会影响双特异抗体设计的灵活性。不同对称IgG样双特异抗体设计如图1所示。

2.1　双可变区免疫球蛋白

双可变区免疫球蛋白被称为DVD-Ig™分子，最早由Wu等[37]于2007年描述。与传统的IgG一样，DVD-Ig™分子由两条重链和两条轻链组成。然而，与IgG不同的是，DVD-Ig™分子的重链和轻链都含有一个额外的可变结构域（variable domain，VD），通过现有单克隆抗体（monoclonal antibody，mAb）的重链可变区（variable heavy chain，VH）和轻链可变区（variable light chain，VL）的N端连接子序列连接。因此，当重链和轻链结合时，生成的DVD-Ig™分子包含4个抗原识别位点。最外层或N端可变区称为VD1，最内层可变区称为VD2；VD2靠近C端CH1或轻链恒定区（constant region of light chain，CL）。该方法制造的抗体可以特异性地结合两种抗原或者同一抗原两种表位。由于连接了第二个抗体可变结构域，其分子质量比传统IgG大50 ku左右，具有较长的体内半衰期和清除时间，在生产工艺上，CHO重组表达DVD-Ig™与重组表达IgG抗体产量相当，并且抗体可以组装成四价双特异性结构形式，这种均一形式的DVD-Ig™分子有利于规模化生产和下游纯化。通过该方法生产的DVD-Ig™分子抗IL-12和IL-18对两种抗原均具有结合活性。DVD-Ig™分子在抗原选择上需要考虑其中一个VD结合一个抗原对另一个VD结合另一个抗原的影响，抗原的大小需要考虑，通常结合较大抗原的VD在N端或外层，结合较小抗原的VD在内层或靠近C端CH1或CL，比如在IL-12和IL-18的DVD-Ig™分子中，抗IL-18的VD在N端设计可以降低VD对IL-12的结合能力2~5倍。还需要考虑N端VD和C端VD的连接，通常选用不形成固定折叠形式的肽链来连接，连接肽链长度越长越能减少2个VD结合抗原的空间位阻，但是也要考虑连接肽链的体内免疫原性以及肽链越长越容易被体内酶降解[38]。

研究从新型冠状病毒感染（corona virus disease 2019，COVID-19）康复者或疫苗接种者分离了9种抗体构建了18种DVD-Ig™结构的双特异抗体，筛选到一个DVD-Ig™与刺突S1亚基结合能力强，对不同的严重急性呼吸综合征冠状病毒2（severe acute respiratory syndrome coronavirus 2，SARS-CoV-2）变异株具有广谱结合能力，该双特异性抗体可以与受体结合区域（receptor binding region，RBD）的结合，并阻止了人血管紧张素转化酶2（human angiotensin-converting enzyme 2，hACE2）与RBD的结合。该方法开发的双特异抗体有望开发成治疗和预防正在进化的SARS-CoV-2的候选药物[39]。

2.2　IgG连接Fab

通过不同方式的IgG连接另一抗体的Fab可以形成对称双特异抗体。其中串联Fab免疫球蛋白（FIT-Ig™）结构最初于2017年被描述[40]。这种独特的设计提供了一种对称的四价IgG样双特异性分子，其两组重链可变区VH/轻链可变区VL对能正确结合，其中两个Fab片段以交叉的方式直接融合，无需任何突变，也无需使用肽接头。FIT-Ig™可以利用基本的分子生物学技术，由两种现有的单克隆抗体制备而成，在哺乳动物细胞中具有高表达水平，并且可以使用标准方法轻松纯化至均质状态，无需进行大量优化。FIT-Ig™分子展现出良好的类药性质、体外和体内功能，以及适用于商业开发的生产效率。一个FIT-Ig™分子的构建及初步表征的实例，研究了抗cMet×EGFR的FIT-Ig™抑制人非小细胞肺癌细胞系（NCI-H292）中肝细胞生长因子（hepatocyte growth factor，HGF）诱导的蛋白激酶B（protein kinase B， PKB /AKT）磷酸化的能力。该分子对磷酸化AKT表现出强大的抑制作用，其半抑制浓度值（IC_{50}）处于亚纳摩尔水平。此外，cMet×EGFR FIT-Ig™抑制了80%的AKT磷

酸化，而 EGFR 和 cMet 单抗的组合仅抑制了 60% 的 AKT 磷酸化[41]。

另一种 IgG 连接另一抗体的 Fab 称为 REGULGENT™，在一条抗体重链上可以在 N 端或 C 端设计连接子连接第二个抗体的重链可变区 VH 和恒定区 CH1，该抗体由两个 Fab 结构域组成，并使用了一条通用轻链。重链片段编码了抗原结合决定簇。由于使用了相同的轻链，REGULGENT™的设计和生产较为简单，不会出现不对称双特异性抗体中常见的重链和轻链错配现象。在细胞培养和低 pH 条件下的应激处理过程中，REGULGENT™表现出高表达和低聚集的特性。实验表明，REGULGENT™分子具有较高的构象稳定性。表面等离子体共振数据显示，REGULGENT™能够同时结合两种抗原，并且对这两种抗原表现出高亲和力。总之，REGULGENT™的对称双特异性抗体形式赋予了其理想的类似 IgG 的物理化学性质，因此使其成为商业开发的极佳候选药物[42]。

2.3　Fc上串联scFv或单域的纳米抗体

另外具有相似对称结构的抗体可以在 Fc 上串联 scFv 或单域纳米抗体（single-domain antibody，VHH），通过基于甘氨酸-丝氨酸接头连接而成的单链融合体，scFv 和 VHH 单独编码，从而能够产生双特异、三特异抗体分子，通过相同的 Fc 配对，对每个抗原或表位结合都是双价的，如果 VHH 或 scFv 编码抗体识别相同抗原或表位，可以产生四价或六价抗体，这种不同价位的抗体可以根据对靶抗原结合亲和力需要灵活设计[43]。使用该方法开发的程序性死亡受体配体 1（programmed death-ligand 1，PD-L1）×EGFR 对称型双特异性抗体，这种类似 IgG 的六价双特异抗体，命名为 IgTT-1E，能够同时结合 EGFR 和 PD-L1 抗原，抑制表皮生长因子（epidermal growth factor， EGF）介导的细胞增殖，有效阻断程序性死亡受体 1（programmed death-1，PD-1）/PD-L1 的相互作用，IgTT-1E 在两种不同的人源化小鼠模型中均显示出强大的治疗效果，肿瘤生长得到控制，同时 CD8+ T 细胞的比例显著增加[44]。

2.4　scFv或单域抗体融合IgG

通过将 scFv 融合到 IgG 轻链的 C 端，从而构建出一种 IgG-scFv 双功能抗体。当这种双特异性抗体在哺乳动物细胞中表达，并通过一步法蛋白 A 层析进行纯化后，它保留了每个结合结构域的亲本亲和力，展现出类似 IgG 的稳定性，并且在体内表现出类似 IgG 的肿瘤靶向性和血液清除特性。IgG 的轻链可以用一个 scFv 进行延伸，而不影响 IgG 的功能和稳定性，这种 scFv 在轻链 C 端融合对比在重链或轻链 N 端融合可以有效的降低双特异抗体结合抗原的空间位阻，从而对抗原的结合更具有灵活性。由于 scFv 重链可变区和轻链可变区通过肽链连接，通过该方法构建的双特异抗体只有一对相同的轻链，不存在重链轻链错配情况[45]。

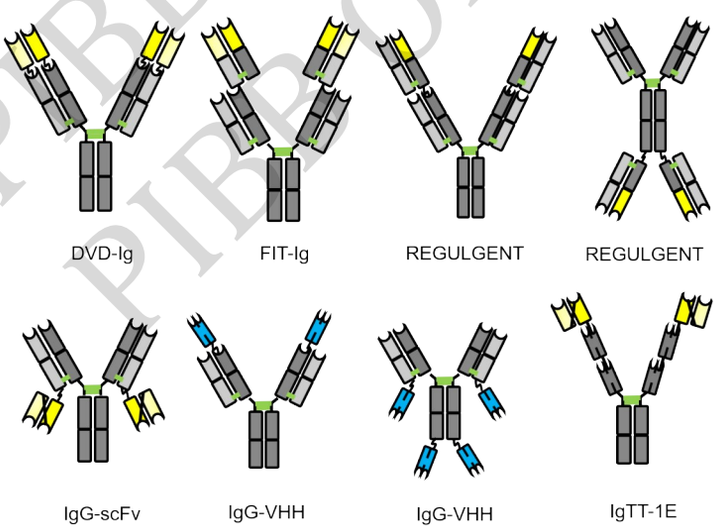


Fig.1　different designs of Symmetrical IgG−like bispecific antibodies

图1　不同设计的对称IgG样双特异抗体

另一个抗体可变区，单域纳米抗体，DVD：双可变区 （dual variable domain），FIT：串联Fab（Fabs in tandem），VHH：单域抗体（single-domain antibody），scFv：单链可变区片段（single chain Fragment variable），Ig：免疫球蛋白（immunoglobulin）；REGULGENT、IgTT-1E为抗体平台名。

通过10个氨基酸的柔性连接子将单域抗体VHH融合到IgG支架上，从而形成副产物极少的双特异性抗体。研究了对称型αPD-L1×αHER2抗体分子几何结构如何影响抗体的生产、稳定性、抗原结合以及与CD16a的结合，为了促进良好的表达、较高的生物物理稳定性以及保持对两种抗原的有效结合，单域抗体与重链的融合通常优于与轻链的融合。通过将单域抗体融合到IgG可以获得没有重链轻链错配并且稳定的单体形式的对称双特异抗体，可以作为双特异抗体开发的良好平台[46-47]。

3　非对称IgG样双特异抗体

针对不同的双特异抗体治疗靶点和原理不同，其对抗原结合抗体价位和结构要求不同。不对称的带有Fc的双特异抗体两条Fc链不同，其携带的特异抗体识别不同的抗原或表位。非对称IgG样双特异抗体具有Fc，可以发挥Fc的免疫功能。由于非对称IgG样双特异抗体每一个抗原结合可变区位于不同链上，所以设计灵活，一般对每个抗原的结合不相互影响。但是非对称IgG样双特异抗体重链间结合以及重链与轻链的结合具有多种组合形式，除了目标双特异抗体还可以形成多种副产物，所以在设计上需要考虑重链配对问题以及重链和轻链的配对问题，以及下游纯化方案。非对称IgG样双特异抗体结构设计如图2所示。

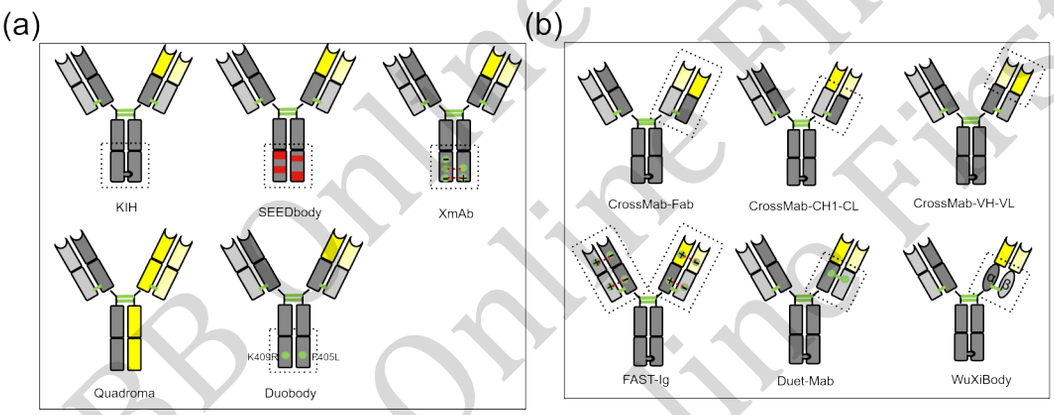


Fig.2　The design of asymmetric bispecific antibody

图2　不对称双特异抗体设计

（a）解决重链间配对设计；（b）解决重链与轻链间配对设计；旋钮入孔KiH结构，IgA和IgG链交换，位点突变，TCR恒定结构域；KIH：旋钮入孔（Knob into Hole），SEEDbody：链交换工程抗体（strand exchange engineered domain antibody），Quadroma：四源杂交瘤，FAST：净电力链组装（Four chain Assembly by electrostatic Steering Technology），Duet-Mab:；XmAb、Duobody、CrossMab、Duet-Mab、WuXiBody均为抗体平台名。

3.1　解决重链配对的设计

两条不同的Fc链组装方式有三种情况，即两种相同的Fc组装方式和一种相异的Fc组装方式，这样会产生很多相同Fc组装的副产物，增加了生成和纯化的难度。为提高相异Fc组装产物的比例，在Fc上有不同的设计，电荷相互作用、空间位阻以及片段取代来降低相同Fc组装副产物；另外利用不同物种Fc结合蛋白A情况不同方便目标双特异抗体纯化；利用IgG4存在天然的Fab链交换解决异源Fc组装。

3.1.1　四源杂交瘤产生不同物种配对双特异抗体

每个杂交瘤细胞可以表达一种特异性的单克隆抗体，将两个或两种表达不同抗体的杂交瘤融合称作四源杂交瘤或Quadroma，四源杂交瘤会表达来自双亲细胞的免疫球蛋白重链和轻链[48]。通过组装可形成亲本免疫球蛋白和杂交免疫球蛋白。两种不同重链和两种不同轻链的随机组装，理论上可产生10种不同的分子构型，而其中只有一种是有功能的双特异性抗体。由于该技术产生的具有功能的双特异抗体只占不同抗体类型的一部分，其产率难以预测，并且下游分离目标双特异抗体困难。通过融合小鼠和大鼠杂交瘤细胞系，开发出了嵌合四源杂交瘤技术。由于大鼠小鼠重链和轻链之间存在较大差异，所以重链和轻链配对方式不是随机的，具

有物种限制性偏好，由此提高了正确配对的双特异抗体的比例[49]。由于大鼠抗体重链不能与蛋白A结合进行纯化，双特异抗体含有一条小鼠重链，蛋白A纯化可以在pH5.8洗脱，含有两条小鼠重链的亲本抗体可以在pH3.5洗脱。这一特性可以通过蛋白A亲和方便的纯化双特异抗体产物。Catumaxomab（EpCAM×CD3）于2009年成为首个上市的IgG样双特异性抗体，用于恶性腹水患者的腹腔内治疗。Catumaxomab通过四源杂交瘤技术产生，由小鼠IgG2a和大鼠IgG2b组成[50]。

3.1.2 Fc设计空间结合结构

Fc在同源二聚体结合的界面上通过位点突变，其中一条Fc设计凸起结构，另一条Fc对应位置设计凹陷结构，这样相同的Fc链会产生互斥，而相异的两条Fc链则可以配对相结合。利用该思路设计了“旋钮入孔”（Knob-into-Holes，KiH）抗体，“旋钮入孔”最初是由克里克在1952年提出的，作为氨基酸侧链在相邻α螺旋之间堆积的模型[51]，首先通过用抗CD4的IgG的CH3结构域中的一个较大的酪氨基酸替换一个小的苏氨基酸来获得一个“旋钮”变体，即CD4-IgG T366Y。该旋钮被设计用于插入人源抗CD3抗体CH3结构域的“孔”，该抗体的“孔”是通过用较小的残基Y407T替换大残基而产生的。这两种不同的重链与抗CD3轻链共同表达，双特异抗体产率可达92%[52]。利用该方法产生的抗体对每个抗原结合是单价的，这种抗体不会引起同种抗原聚集，由于单价降低了对靶抗原的亲和力可以潜在降低对非靶组织的毒性，同样可以结合两种抗原，具有双特异抗体的普遍特性。这种策略产生的双特异抗体可以在不同的蛋白质表达体系中生产，包括哺乳动物细胞系统，细菌表达系统以及无细胞体系[53-54]。

为进一步为提高旋钮入孔Fc异源二聚体产率，通过建模，在Knob重链再引入S354Y突变，在Hole重链再引入Q347E突变，构建双特异抗体，在蛋白A纯化的抗CD20×CD3的双特异抗体从50%提高到93.8%，抗体保持了Fab和Fc区域的活性[55]。

3.1.3 利用Fab链交换设计

生物体内一些抗体可以通过Fab链交换形成天然的双特异抗体。IgG4分子结构通过Fab交换形成天然双特异抗体[56-57]，Labrijn等[58]通过分析和筛选的方法，在IgG1 CH3寻找可以提高异源聚合稳定性和降低同源聚合稳定性的突变位点，在其中一条链上突变F405L，另一条链上突变K409R。首先产生CH3携带相应突变的两种不同特异性的完整单克隆抗体分子，之后在还原条件下通过Fab交换形成双特异抗体分子。因为是通过单克隆抗体重新组合Fab，所以这种方式产生的双特异抗体具有正确的重链轻链配对。另外在重链CH3仅有2个点突变，该方法产生的抗体更接近天然抗体[59-60]。Genmab公司发展该技术平台Duobody用于产生双特异抗体[61]，一些抗体已经上市和临床研究[62-64]。

3.1.4 IgG和IgA链交换工程设计

二价IgG依赖于其重链的体内二聚化，由其CH3结构域介导聚合。通过设计链交换工程结构域（strand exchange engineered domain， SEED） CH3异源二聚体，开发了异源二聚体Fc平台。人IgG和IgA的CH3结构域的衍生物产生互补的人SEED CH3异源二聚体，由人IgA和IgG的CH3序列的交替片段组成。由此产生的一对SEED CH3结构域在哺乳动物细胞中表达时优先结合形成异源二聚体。通过该方法产生的双特异抗体在NS/0细胞中高水平表达，经重组蛋白A树脂纯化，在溶液中表现良好。当静脉注射给小鼠时，双特异抗体的药代动力学表现出较长的血清半衰期延长，这是类似含Fc免疫融合和IgG1对照组的典型特征[65-66]。

3.1.5 Fc电荷改造

XmAb®双特异性平台，用于有效开发含有异二聚体Fc区域的双特异抗体和多种形式的Fc融合物。通过Fc链突变改变其等电点，这样同源Fc和异源Fc聚合形成不同的等电点，设计专门纯化异源二聚Fc的溶液和纯化条件。

首先对Fc进行等电点改造，预期改造之后Fc形成异源二聚体与形成同源二聚体等电点有明显差异。因为改变等电点的是Fc而不是Fv，所以这种设计方案可以用于同样的离子交换纯化方案来纯化。设计考虑避开Fc结合FCγ受体、C1q、FcRn和结合蛋白A区域，同时引入突变点之后不影响Fc结构和免疫原性，在低等电点Fc中引入了N208D、Q295E、N384D、Q418E和N421D，在高等电点Fc中引入了E357Q。

在等电点改造基础上，进一步改造Fc结合界面促进形成异源二聚体，在低等电点Fc上引入L368D和K370S，在高等电点Fc上引入E357Q和S364K，通过结构分析这些突变破坏了原来同源二聚体之间的分子间的盐键和电荷引力并且引入了电荷斥力，从而降低了同源二聚体的形成，而在异源

二聚体之间引入盐键和电荷吸引力更有利于形成异源二聚体。改造的Fc链在HEK293E细胞系中表达，蛋白A纯化获得了95.1%的Fc异源二聚体[67]。

在双特异抗体纯化方面，另外一个策略是对蛋白A结合位点突变，H435R引入一个Fc链消除了该链对蛋白A的结合，在抗体纯化时，H435R形成的同源二聚体不结合蛋白A，而野生型结合蛋白A最强，异源二聚体结合蛋白A能力适中，通过对蛋白质结合能力不同而纯化异源二聚体[68]。

3.2　解决重链与轻链配对的设计

抗体重链和轻链配对依靠重链CH1与轻链CL之间的界面以及VH和VL之间的界面结合，由于双特异抗体两条轻链和两条重链在结合界面上没有明显差异，所以会形成重链和轻链的随机配对。为解决重链轻链配对问题有不同的设计。Duetmab在CH1-CL间设计不同的二硫键[69]；Crossmab设计VH、VL以及CH1、CL互换[70]；FAST-Ig™在重链轻链配对上引入电荷作用[71-72]；WuXiBody设计T细胞受体（T cell receptor，TCR）替换CH1、CL[73-74]。

3.2.1　DuetMab：CH1-CL之间二硫键工程

DuetMab在对单价双特异IgG抗体设计上，解决正确的重链和轻链配对的复杂性而进行的新型设计。该平台使用旋孔（KiH）技术实现2条不同重链的异二聚化，并通过用工程二硫键取代CH1-CL界面中的天然二硫键来提高同源重链和轻链配对的效率。利用Cetuximab单抗（抗EGFR）和Trastuzumab单抗（抗HER2）两对抗体，以及抗CD40和抗CD70抗体，实验证明了DuetMab抗体可以以高度纯化和活性的形式产生，并首次表明单价双特异性IgG可以在同一细胞上同时结合两种抗原。这一特性弥补了单价带来的亲和力损失，并提高了对目标细胞的选择性[69]。

3.2.2　CrossMab：通过VH、VL以及CH1、CL互换

双特异抗体涉及两条轻链和两条重链组装的问题，轻链错配的发生是由于异二聚化界面在重链可变区VH和轻链可变区VL之间以及重链恒定区CH1和轻链恒定区CL结构域之间的分子结构在抗体的两个臂上是相同的。通过抗体一条臂上重排重链和轻链结构域，使抗体两条臂产生差异，从而消除轻链错配问题。

这种设计的双特异抗体，在一边，保留重链1和轻链1不变。在另一边，设计新的“重”链2由Fc和轻链（CL和VL）部分组成，而新设计的“轻”链2则使用重链结构域的Fab（CH1和VH）。由于设计的重链序列现在在轻链和重链结构域之间交叉，使用术语“交叉”来描述这种结构域交换，并使用术语“CrossMab”来描述基于该技术的抗体。用KiH法实现了这两条重链的异二聚化。作为这种域重排的结果，交叉侧新的“轻”链2仅由重链结构域组成；因此，它不能与原始重链1组装。另一方面，未修饰侧的原轻链1不能与交叉侧的新“重”链2相互作用，因为双方都含有相同的轻链异二聚化界面，它们不相互作用。因此，获得了双特异性抗体，在两个Fab中都具有正确的轻/重链配对，并且与原始IgG几乎没有偏差。在这个“CrossMab-Fab”中，链交叉应用于含有两个异源二聚化界面（VH-VL和CH1-CL）的抗体部分。然而，两臂轻链与重链结合的差异也可以通过交换这些异源二聚化对中的一个来实现。VH被VL取代，反之亦然，导致“CrossMab-VH-VL”；CH1和CL的交换导致“CrossMab-CH1-CL”。总的来说，这种设计获得了三种不同的CrossMab形式。这种方法是通用的，因为它可以应用于任何两种现有抗体，而无需进一步优化单个蛋白质序列[70]。

3.2.3　FAST-Ig™：通过重链轻链配对电荷设计

为解决重链轻链正确配对问题FAST-Ig™技术在重链VH、CH1区域以及VL、CL区域引入电荷，通过电荷引入可以形成重链和轻链之间的电荷作用力，从而形成特异的重链和轻链配对。研究显示，这种CH1/CL界面工程改造的抗体变体实现了超过95%的正确重链轻链配对效率，并且具有良好的药理学特性和可开发性。晶体结构分析表明，这种设计并未影响Fab的整体结构。

在Fc区域引入电荷作用力比KiH结构在酸性条件下更稳定，FAST-Ig™也适用于工业生产的稳定的中国仓鼠卵巢（CHO）细胞系，并且可以用于不同亚类IgG的重链轻链配对。因此，它可以广泛应用于临床前和临床的各种双特异性抗体[71-72]。

3.2.4　WuXiBody：TCR取代CH1/CL

WuXiBody是药明生物开发的一种双特异性抗体平台。其关键特点在于用TCR取代了一个亲本抗体的CH1/CL区域，这可防止非同源重链和轻链之间发生错误配对。此外，在不对称的WuXiBody分子中，重链异源二聚化是通过KiH技术来促进的。尽管KiH策略在提高异源二聚体形成方面取得了巨大成功，但仍会有低水平的同源二聚体产生，

WuXiBody中TCR恒定区具有相对较低的等电点，所以WuXiBody具有比常规抗体更低的等电点，可以通过离子交换层析分离区分非TCR副产物（包括半抗体或者同型聚合分子）。因此导入TCR恒定区不但促进重链轻链正确配对而且促进产物纯化[73-74]。

4　非IgG样双特异抗体

不带Fc片段的双特异抗体特点，没有Fc片段，体积分子质量小，药代动力学清除快，从肾脏排泄清除，不会象IgG抗体那样直接参与Fc受体或激活补体系统，治疗效果依赖他们同时结合两个特定靶标能力。非IgG样双特异抗体主要形式包括以下几种。a. 化学连接抗原结合片段（fragment antigen binding， Fab）：两个不同抗体Fab通过化学方式连接；b. scFv串联和双特异T细胞接合子；c. Diabody：不同抗体VH-VL串联再相互配对，和Diabody增加二硫键设计的双亲和重靶向（dual affinity re-targeting， DART）形式；d. 纳米抗体：源自骆驼科动物的单域抗体，可以设计成双特异或多特异形式。各种设计的非IgG样双特异抗体如图3所示。

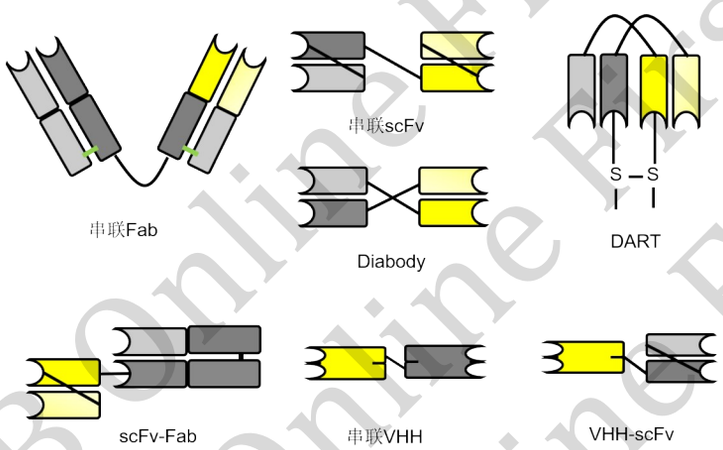


Fig.3　The different design forms of non−IgG−like bispecific antibodies

图3　不同设计形式的非IgG样双特异抗体

另一个抗体可变区，单域纳米抗体，Fab：抗原结合片段（fragment antigen binding），scFv：单链可变区片段（single chain fragment variable），VHH：单域抗体（single-domain antibody），DART：双亲和重靶向（dual affinity Re-targeting），Diabody：双体抗体。

4.1　Fab形式双特异抗体

Fab包含重链可变区VH和重链恒定区CH1，以及轻链可变区VL和轻链恒定区CL，Fab串联形式的双特异抗体也需要解决重链轻链错配问题，通过重新设计重链和轻链结合界面[75]，这种重新设计的重链和轻链结合界面具有特有的空间结合结构和电荷作用，使其与野生型重链和轻链结合界面区分开，从而避免了重链轻链错配问题。制备了一种EGFR×CD3串联Fab蛋白，其形式与串联scFv类似。研究表明，与基于scFv的双特异性抗体相比，基于Fab的双特异性抗体具有更优越的生物物理性质[76]。

4.2　scFv串联和双特异T细胞接合子

scFv称为抗体单链可变区片段，由重链可变区VH和轻链可变区VL通过短的柔性多肽连接，在scFv基础的双特异抗体中两个可以结合不同抗原的scFv通常串联在一起。由于scFv对比全长抗体具有较小的分子质量，scFv形式的双特异抗体具有较好的肿瘤和组织穿透能力[77-78]。

其中一种类型的scFv双特异抗体设计称为双特异T细胞接合器（bispecific T-cell engager，BiTE），这些分子由两个scFv组成，通过一个短而灵活的接头连接。一个scFv与癌细胞上的肿瘤相关抗原结合，而另一个scFv与T细胞上的CD3受体结合，有效的桥接两种细胞类型并将T细胞的细胞毒性重定向到肿瘤细胞[79]。该方法开发的双特异抗体广泛应用于肿瘤治疗和临床研究[80-81]。

4.3　不同抗体VH连接VL的Diabody和DART形式

通过串联scFv形成的双特异抗体在很多方面取得成功，但该策略仍存在局限性，包括以“非天

然”方式连接可变区（V区）的连接序列所带来的限制，这会导致抗原识别能力和效力降低或改变。此外，基于scFv的构建体由于可变区与其他分子的伙伴发生“结构域交换”，往往容易形成聚集体。为解决现有双特异性分子在功能和结构上的局限性，Diabody是由两条多肽链组成的二聚体。每条链包含一个VH结构域，通过一个短链连接来自不同抗体的VL结构域，连接链通常太短而无法在同一链上的结构域之间配对。这迫使VH和VL结构域与另一条链上的对应结构域配对，从而产生具有两个抗原结合位点的双特异性分子，其分子质量大约50 ku。由于Diabody的结构形式，使得分子质量很小，并且具有刚性易于结晶。与其他双特异抗体相比，Diabody具有高亲和力、高稳定性、高渗透性、低免疫原性和制备方便等优点，在诊断和治疗方面具有广泛的应用潜力[82-83]。

两个Diabody可以通过灵活的肽接头串联形成TandAb，这样每个抗原结合为二价，大大增强了对抗原的亲和力，其分子质量超出了肾清除的阈值，因此与较小的抗体结构相比，具有更长的半衰期[84]。

在Diabody基础上开发了DART平台。DART平台在Diabody基础上在重链可变区C端设计链间二硫键，结构紧凑，非常适合在靶细胞和效应细胞之间形成稳定的细胞间接触，在并行比较中表现出比串联scFv有更大的效力[85-86]。这类双特异性分子在体内的有效剂量比单克隆抗体通常使用的剂量低许多倍[87]，并且已被证明具有临床效力和有效性，具有可接受的安全性，如批准用于治疗复发或难治性B细胞急性淋巴细胞白血病（acute lymphoblastic leukemia，ALL）的Blinatumomab（CD19×CD3 BiTE）[88-89]。

4.4　纳米抗体及其它形式的双多特异抗体

骆驼科动物抗体只有重链没有轻链，来源于这些抗体的的重链可变区称为VHH或者纳米抗体，纳米抗体具有体积小、稳定性高的特点[90]。通过串联纳米抗体可以制作双特异抗体，Li等[22]研究了一种双特异性纳米抗体，该抗体能够同时结合单个Omicron变体受体结构域上2个区域，该双特异性抗体可通过吸入给药有效递送至肺部，在SARS-CoV-2感染小鼠模型中表现出良好的中和广度和治疗效果[22]。另外利用内含肽环化连接方法Hemmi等[91]构建了一种环状连接的双特异性纳米抗体，称之为环体抗体（Clobody），该环体抗体能够抵御蛋白质水解作用，同时保留双特异性。

双特异抗体可以有多种连接方式，可以由Fab与scFv串联形成双特异抗体[92]，纳米抗体可以与scFv串联形成双特异或多特异抗体，Tapia-Galisteo等[93]设计了一种用于治疗结直肠癌（colorectal cancer，CRC）的新型串联T细胞募集三特异性抗体。这种构建体被称为三特异性T细胞衔接器（trispecific T-cell engager，TriTE），由一个CD3特异性scFv组成，其两侧分别是抗EGFR和抗上皮细胞黏附分子（epithelial cell adhesion molecule，EpCAM）的单域重链抗体。

5　双特异抗体作用机制及应用领域

5.1　双特异抗体作用机制

双特异抗体基本功能是可以同时结合两个不同的靶分子，这些靶分子可以是不同的抗原，或者不同的表位，另外双特异抗体分子结构设计可以是对称IgG样结构、非对称IgG样结构以及非IgG样结构，对于抗原的结合价位可以是单价，也可以是二价甚至三价，这些不同的设计对比单克隆抗体大大拓展了功能和应用范围[6]。

不同的双特异抗体通过不同的机制发挥治疗效果，往往取决于其结构设计以及其结合的靶点。目前应用和研究最广泛的机制之一是T细胞定向到肿瘤细胞起到靶向治疗作用，双特异抗体可以与T细胞上CD3结合同时与肿瘤相关抗原结合[94-95]。另一种重要的机制设计阻断导致疾病进展的双信号通路[96-97]，在癌症治疗中，双特异抗体抗体可以同时靶向两种不同的受体酪氨酸激酶（receptor tyrosine kinase，RTK）或其配体，从而抑制肿瘤生长并克服肿瘤的耐药机制[98]。另外一些双特异抗体机制为阻断免疫检查点，癌症细胞同免疫检查点分子作用抑制免疫细胞的攻击，通过双特异抗体靶向两种不同的肿瘤免疫检查点分子，可以增强机体的抗肿瘤反应[99-101]。有一类双特异抗体的设计是结合两种蛋白质分子形成蛋白质复合物。其中一个例子是Emicizumab[102]，它在凝血级联反应中桥接因子IXa和X，在A型血友病患者因为缺失因子VIII而导致IXa和X无法结合[103-104]。其他机制包括可溶性配体的中和，阻止它们与受体相互作用[105]，作为辅助因子模拟促进生物过程。作用机制的多功能性使双特异抗体能够针对广泛的治疗应用进行设计，解决单一途径的干预措施可能不足应对各种疾病的复杂性。一些双特异抗体作用机制如

图4所示。

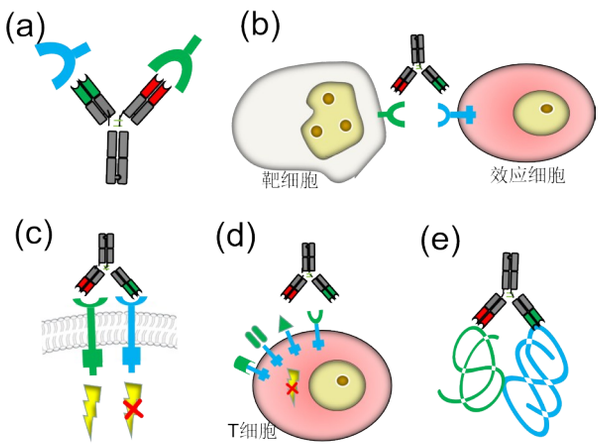


Fig.4　Action mechanism of bispecific antibodies

图4　双特异抗体作用机制

（a） 结合两种抗原或表位；（b） 重新定向效应细胞和靶细胞，双特异抗体同时靶细胞和效应细胞表面抗原，使效应细胞重新靶向；（c） 激活或抑制双信号通路，双特异抗体同时结合两个细胞表面受体，引起细胞内两个信号通路的激活或抑制；（d） 双免疫检查点抑制，双特异抗体同时结合两个免疫检查点分子阻断T细胞与肿瘤细胞间的抑制信号，如程序性死亡受体1（programmed death-1，PD-1、细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4 （cytotoxic T lymphocyte-associated antigen-4， CTLA-4）、淋巴细胞活化基因3（lymphocyte activation gene-3， LAG-3）、T细胞免疫球蛋白黏蛋白3（T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 3， TIM3）；（e） 结合两个蛋白质并形成复合物。

5.2　双特异抗体的主要医学应用

双特异抗体在癌症治疗领域有着广泛的应用，除此之外也应用于自身免疫疾病、传染病和其他疾病。

在癌症治疗中，双特异抗体被用于治疗血液系统恶性肿瘤，包括白血病和淋巴瘤[11，106]，通过重新定向T细胞以杀伤肿瘤细胞。另外应用领域也扩大到实体肿瘤的治疗，包括肺癌、乳腺癌和黑色素瘤，它们可以靶向肿瘤特异性抗原并增强免疫反应[80，101，107]。

除了肿瘤之外，一些研究双特异抗体应用于自身免疫疾病治疗，如类风湿性关节炎和系统性红斑狼疮，通过靶向特异免疫细胞或炎性细胞因子[108-109]。

在治疗传染病领域，靶点包括病原体不同抗原来降低病原体突变的免疫逃逸，同时双靶点的联合作用增强治疗效果，在人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus， HIV）、SARS-CoV-2治疗上显示出较好的效果[110-111]。

在眼科治疗方面，双特异抗体通过靶向血管生长因子来治疗新生血管性老年相关的黄斑病和糖尿病性黄斑水肿等疾病[112]。

在血液疾病方面，Emicizumab在凝血级联反应中桥接因子IXa和X来治疗血友病[113]。一些双特异抗体已经获得批上市（表1）。

5.3　不同结构设计双特异抗体在不同疾病治疗中的优势及问题

前述不同双特异抗体结构设计分类为IgG样双特异抗体和非IgG样双特异抗体，其主要差异在于是否包含Fc结构，而Fc一方面可以引起ADCC效应和补体效应等功能，另一方面带Fc结构的双特异抗体在体内清除缓慢，终末半衰期长，在治疗上减少给药次数和给药剂量，另外Fc增大了双特异抗体分子质量，影响其组织穿透能力。IgG样双特异抗体可以分为对称和非对称结构。对称IgG样双特异抗体结合每一种抗原或表位是双价的，在生成上由于带Fc的两条链相同不用考虑错配问题，从而简化了生成和纯化过程，由于两个抗体可变区连接在同一条重链或者轻链，很多设计需要考虑抗体同时结合抗原的空间位阻效应，因而会影响双特异抗体设计的灵活性。不对称IgG样双特异抗体两条Fc链不同，其携带的特异抗体识别不同的抗原或表位，设计灵活，一般对每个抗原的结合不相互影响。设计上解决重链配对问题以及重链与轻链配对问题的不同平台和方案已经在前面论述介绍。非IgG样双特异抗体没有Fc片段，没有Fc的ADCC效应和补体效应，体积和分子质量小，具有较强的组织穿透能力，药代动力学清除快。不同结构设计的双特异抗体具有不同的药效学特点，使其在不同的疾病治疗领域具有不同的应用场景和不同的优势。

在血液肿瘤治疗方面，非IgG样双特异抗体Blinatumomab 2014年美国获批上市用于治疗淋巴细胞白血病，该抗体结构为抗CD19×CD3的scFv串联结构，该抗体的小分子结构能够高效的在血液中将T细胞招募到表达CD19的白血病细胞旁，形成免疫突触，高效激活T细胞杀伤肿瘤细胞。但是该药具有极短的半衰期（约2 h）要求患者必须通过微型输液泵进行长达数周的持续静脉输注，极大地影响了患者的生活质量[114]。为了克服半衰期短的问题，IgG样双特异抗体也越来越多地应用于血

表1　全球已经上市的双特异抗体药物

Table 1　bispecific antibody drugs on market

商品名	药物名称	靶点	结构特点及价位	作用机制	适应症	获批时间	研发公司
Removab	Catumaxomab	CD3×EpCAM	非对称IgG样，四源杂交瘤，1+1	T细胞靶向肿瘤	癌性腹水	2009欧洲2017退市	Trion
Blincyto	Blinatumomab	CD3×CD19	非IgG样，scFv串联，1+1	T细胞靶向肿瘤	淋巴细胞白血病	2014美国	Amgen
Hemlibra	Emicizumab	X×IXa	非对称IgG样，共轻链，1+1	形成蛋白复合物	A型血友病	2017美国	Roche
Rybrevant	Amivantamab	EGFR×c-Met	非对称IgG样，Duobody，1+1	双信号抑制	非小细胞肺癌	2021美国	Johnson
Kimmtrak	Tebentafusp	gp100×CD3	非Ig样，scFv-TCR融合，1+1	T细胞靶向肿瘤	葡萄膜黑色素瘤	2022美国	Immunocore
Vabysmo	Faricimab	Ang-2×VEGFA	非对称IgG样，CrossMab，1+1	双配体抑制	黄斑变性、水肿	2022美国	Roche
Lunsumio	Mosunetuzumab	CD3×CD20	非对称IgG样，KiH，1+1	T细胞靶向肿瘤	滤泡性淋巴瘤	2022美国	Roche
开坦尼	Cadonilimab	PD-1×CTLA-4	对称IgG样，IgG-scFv，2+2	双信号抑制	转移性宫颈癌	2022中国	康方生物
Tecvayli	Teclistamab	CD3×BCMA	非对称IgG样，Duobody，1+1	T细胞靶向肿瘤	多发性骨髓瘤	2022欧洲	Johnson
Nanozora	Ozoralizumab	TNFα× HSA	非IgG样，VHH串联，2+1	配体抑制	类风湿性关节炎	2022日本	Taisho， Ablynx
Epkinly	Epcoritamab	CD3×CD20	非对称IgG样，Duobody，1+1	T细胞靶向肿瘤	大B细胞淋巴瘤	2023美国	Genmab， AbbVie
Columvi	Glofitamab	CD3×CD20	非对称IgG样，CrossMab，2+1	T细胞靶向肿瘤	大B细胞淋巴瘤	2023美国	Roche
Talvey	Talquetamab	CD3×GPRC5D	非对称IgG样，Duobody，1+1	T细胞靶向肿瘤	多发性骨髓瘤	2023美国	Johnson
Elrexfio	Elranatamab	CD3×BCMA	非对称IgG样，修饰IgG，1+1	T细胞靶向肿瘤	多发性骨髓瘤	2023美国	Pfizer
Imdelltra	Tarlatamab	CD3×DLL3	非IgG样，Fc连接scFv，1+1	T细胞靶向肿瘤	小细胞肺癌	2024美国	Amgen
依达方	Ivonescimab	PD1×VEGF-A	对称IgG样，IgG-scFv，2+2	双信号抑制	非小细胞肺癌	2024中国	康方生物
Ordspono	Odronextamab	CD3×CD20	非对称IgG样，1+1	T细胞靶向肿瘤	大B细胞淋巴瘤	2024欧洲	Regeneron
Ziihera	Zanidatamab	HER2×HER2	非对称IgG样，scFv取代1个Fab，1+1	双信号抑制	HER2阳性胆管癌	2024美国	Zymeworks，Jazz
Bizengri	Zenocutuzumab	HER2×HER3	非对称IgG样，共轻链，1+1	双信号抑制	非小细胞肺癌	2024美国	Merus

资料来源FDA/EMA/NMPA，DrugBank（drugbank.com），Drugs（drugs.com），PubChem数据库，专利，以及制药公司网站

液肿瘤。例如，靶向CD20和CD3的Mosunetuzumab、Epcoritamab、Glofitamab和Odronextamab，它们都是非对称IgG样抗体，具有完整的IgG结构，拥有更长的半衰期，允许间歇性静脉给药，便利性显著提高。同时，可以通过对Fc片段的改造来降低非特异性激活的风险。

实体瘤治疗方面一个主要考虑的问题是肿瘤的渗透性，非IgG样结构其小分子质量被认为更利于穿透致密的肿瘤基质，到达肿瘤细胞。然而，其快速的肾脏清除又限制了药物在肿瘤部位的累积，一些研究工作通过改造非IgG样结构来改变其药效学和药代动力学特征。目前上市的非IgG样结构双特

异抗体 Tebentafusp 结合 gp100×CD3，分子结构为 scFv 与 TCR 融合，使 T 细胞重靶向肿瘤用来治疗葡萄膜黑色素瘤。Tarlatamab 结合 CD3×DLL3，其作用使 T 细胞重靶向肿瘤用来治疗小细胞肺癌，其结构为 Fc 连接 scFv，这个 Fc 片段经过了特殊改造，去除了其效应功能（如 ADCC），从而避免了不必要的免疫激活，其唯一目的是与新生儿 Fc 受体（FcRn）结合。这种结合机制可以保护 Tarlatamab 不被机体快速清除，从而将其半衰期延长至大约 1 周[115]。IgG 样结构 Fc 区域保留具有较长的半衰期和稳定性，一些 Fc 工程改造增强 ADCC 效应，但是其分子较大，肿瘤穿透相对较差。一些 IgG 样双特异抗体已经在临床应用，包括 Amivantamab、Ivonescimab 和 Zenocutuzumab 用于非小细胞肺癌治疗，Cadonilimab 用于治疗转移性宫颈癌治疗，Zanidatamab 用于 HER2 阳性胆管癌治疗，其作用机制均为双信号抑制。

在自身免疫性疾病中，双特异抗体的目标是抑制或调节异常的免疫反应，IgG 样结构通过 Fc 片段与抑制性 FcγRIIb 受体结合，同时其可变区结合自身反应性 B 细胞表面的靶点，可以递送抑制信号，从而“关闭”这些有害的 B 细胞。长半衰期对于需要长期用药的慢性自身免疫病至关重要。在大多数自免疾病治疗中，ADCC 等杀伤效应是有害的，因此通常需要对 Fc 片段进行改造，以消除其与激活型 Fcγ 受体的结合能力。目前，已有多个针对银屑病、系统性红斑狼疮等疾病的双特异抗体进入临床研究阶段[109, 116]。

在传染性疾病治疗方面，可以针对病毒（如 HIV、流感病毒、新型冠状病毒）等易变异的病原体，可以设计同时靶向两个不同保守表位的双特异抗体，从而有效应对病毒突变，提供更广谱的保护。也可以设计桥接免疫细胞清除感染细胞，利用双特异抗体将 NK 细胞或 T 细胞招募到被病毒感染的细胞旁，以清除病毒库（如 HIV 潜伏感染的细胞）。结构选择方面对于急性感染的治疗或预防，IgG 样结构的长半衰期和可能的效应功能（如 ADCC）是有益的。对于需要穿透特定组织屏障（如血脑屏障）以清除中枢神经系统感染的场景，非 IgG 样的小分子结构可能更具优势。

6　结论和未来展望

双特异抗体在单克隆抗体基础上通过抗体工程实现同时结合两种不同抗原或表位，这种功能拓展了抗体的应用范围，在医疗领域的应用包括癌症、自身免疫疾病以及传染病的治疗。

双特异抗体结构形式多样，包括 IgG 样式和非 IgG 样式，由于其结构具有 Fc 或缺失 Fc 从而影响双特异抗体的分子质量，进而影响双特异抗体的药代动力学以及药效学特征、组织渗透性，以及 Fc 具有的补体效应、ADCC 效应[32]。可以根据治疗需要设计不同的抗体类型。在具有 Fc 的双特异抗体中，对称型双特异抗体对每个抗原结合是二价的，具有亲和力增强效应，在生产上不需要考虑重链配对问题。另一类 IgG 样双特异抗体是非对称的，非对称双特异抗体具有设计更加灵活，适用治疗领域更加广泛，设计上需要考虑重链配对问题，解决办法包括旋钮入孔结构，以及电荷作用解决异源 Fc 配对问题。另外由于轻链和重链配对界面是相似的，为了解决轻链重链错配问题，发展了一些技术平台，包括 Crossmab 技术，交换重链轻链区域，另外通过引入电荷以及重链轻链结合界面改造工程来解决错配问题，WuXiBody 通过引入 TCR 替换 CH1-CL 来解决错配问题。另外在不对称 IgG 样抗体纯化方面也有一些挑战，其中一个技术是设计 IgG 不同重链具有不同等电点，从而纯化出只有异源二聚体的抗体。另外有设计利用 IgG 与蛋白 A 结合能力来纯化双特异抗体。

非 IgG 样双特异抗体由于不带 Fc 区域，可以是 scFv 或 Fab、VHH 等多种形式的串联，形成多种形式的双特异抗体。

双特异抗体作用机制同样是多种多样的，包括免疫细胞的募集、多种信号通路的阻断、蛋白质复合物的强制结合以及可溶性配体的中和。

与传统单克隆抗体相比，双特异抗体具有多项优势，可以同时靶向多种疾病驱动因素，诱导协同治疗并克服耐药机制。但是研究和临床应用仍然存在挑战，包括潜在的免疫原性和制造过程的复杂性[117]。

展望未来，双特异抗体领域有望持续增长和创新，正在进行的研究侧重于开发具有更高稳定性的治疗新形式，探索新的治疗靶点以及治疗靶点的组合，研究双特异抗体与其它疗法联合治疗更广泛疾病的潜力。抗体工程的不断进步和对疾病机制的更深入理解推动双特异抗体治疗的发展，为更多疾病提供有效治疗方案。

参 考 文 献

[1] Liu J K H. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations. Ann Med Surg (Lond), 2014, **3**(4): 113-116

[2] Baquiran D C, Dantis L, McKerrow J. Monoclonal antibodies: innovations in diagnosis and therapy. Semin Oncol Nurs, 1996, **12** (2): 130-141

[3] Castelli M S, McGonigle P, Hornby P J. The pharmacology and therapeutic applications of monoclonal antibodies. Pharmacol Res Perspect, 2019, **7**(6): e00535

[4] Goulet D R, Atkins W M. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. J Pharm Sci, 2020, **109**(1): 74-103

[5] Cao W, Ma S, Han L, *et al*. Bispecific antibodies in immunotherapy for acute leukemia: latest updates from the 66th annual meeting of the American society of hematology, 2024. Front Oncol, 2025, **15**: 1566202

[6] Brinkmann U, Kontermann R E. The making of bispecific antibodies. MAbs, 2017, **9**(2): 182-212

[7] Labrijn A F, Janmaat M L, Reichert J M, *et al*. Bispecific antibodies: a mechanistic review of the pipeline. Nat Rev Drug Discov, 2019, **18**(8): 585-608

[8] Ma J, Mo Y, Tang M, *et al*. Bispecific antibodies: from research to clinical application. Front Immunol, 2021, **12**: 626616

[9] Nisonoff A, Rivers M M. Recombination of a mixture of univalent antibody fragments of different specificity. Arch Biochem Biophys, 1961, 93: 460-462

[10] Frampton J E. Catumaxomab: in malignant ascites. Drugs, 2012, **72**(10): 1399-1410

[11] Kantarjian H, Stein A, Gökbuget N, *et al*. Blinatumomab versus chemotherapy for advanced acute lymphoblastic leukemia. N Engl J Med, 2017, **376**(9): 836-847

[12] Wu Z, Cheung N V. T cell engaging bispecific antibody (T-BsAb): From technology to therapeutics. Pharmacol Ther, 2018, 182: 161-175

[13] Zhang M, Lam K P, Xu S. Natural killer cell engagers (NKCEs): a new frontier in cancer immunotherapy. Front Immunol, 2023, **14**: 1207276

[14] Li T, Niu M, Zhou J, *et al*. The enhanced antitumor activity of bispecific antibody targeting PD-1/PD-L1 signaling. Cell Commun Signal, 2024, **22**(1): 179

[15] Uliano J, Corvaja C, Curigliano G, *et al*. Targeting HER3 for cancer treatment: a new horizon for an old target. ESMO Open, 2023, **8**(1): 100790

[16] Ma Y, Huang Y, Zhao Y, *et al*. BL-B01D1, a first-in-class EGFR-HER3 bispecific antibody-drug conjugate, in patients with locally advanced or metastatic solid tumours: a first-in-human, open-label, multicentre, phase 1 study. Lancet Oncol, 2024, **25**(7): 901-911

[17] Tsuchikama K, Anami Y, Ha S Y Y, *et al*. Exploring the next generation of antibody-drug conjugates. Nat Rev Clin Oncol, 2024, **21**(3): 203-223

[18] Gu Y, Wang Z, Wang Y. Bispecific antibody drug conjugates: making 1+1>2. Acta Pharm Sin B, 2024, **14**(5): 1965-1986

[19] Burt R, Warcel D, Fielding A K. Blinatumomab, a bispecific B-cell and T-cell engaging antibody, in the treatment of B-cell malignancies. Hum Vaccin Immunother, 2019, **15**(3): 594-602

[20] Vijayaraghavan S, Lipfert L, Chevalier K, *et al*. Amivantamab (JNJ-61186372), an fc enhanced EGFR/cMet bispecific antibody, induces receptor downmodulation and antitumor activity by monocyte/macrophage trogocytosis. Mol Cancer Ther, 2020, **19** (10): 2044-2056

[21] Wang R, Maksymowych W P. Targeting the interleukin-23/interleukin-17 inflammatory pathway: successes and failures in the treatment of axial spondyloarthritis. Front Immunol, 2021, **12**: 715510

[22] Li C, Zhan W, Yang Z, *et al*. Broad neutralization of SARS-CoV-2 variants by an inhalable bispecific single-domain antibody. Cell, 2022, **185**(8): 1389-1401.e18

[23] Wang Y, Hao A, Ji P, *et al*. A bispecific antibody exhibits broad neutralization against SARS-CoV-2 Omicron variants XBB.1.16, BQ.1.1 and sarbecoviruses. Nat Commun, 2024, **15**(1): 5127

[24] Nordstrom J L, Ferrari G, Margolis D M. Bispecific antibody-derived molecules to target persistent HIV infection. J Virus Erad, 2022, **8**(3): 100083

[25] Moshoette T, Papathanasopoulos M A, Killick M A. HIV-1 bispecific antibody iMab-N6 exhibits enhanced breadth but not potency over its parental antibodies iMab and N6. Virol J, 2022, **19** (1): 143

[26] Bhattacharya P, Fan J, Haddad C, *et al*. A novel pancreatic β-cell targeting bispecific-antibody (BsAb) can prevent the development of type 1 diabetes in NOD mice. Clin Immunol, 2014, **153**(1): 187-198

[27] Girgis M D, Kenanova V, Olafsen T, *et al*. Anti-CA19-9 diabody as a PET imaging probe for pancreas cancer. J Surg Res, 2011, **170** (2): 169-178

[28] Heyman B. Regulation of antibody responses *via* antibodies, complement, and Fc receptors. Annu Rev Immunol, 2000, 18: 709-737

[29] Gunn B M, Bai S. Building a better antibody through the fc: advances and challenges in harnessing antibody fc effector functions for antiviral protection. Hum Vaccines Immunother, 2021, **17**(11): 4328-4344

[30] Krah S, Kolmar H, Becker S, *et al*. Engineering IgG-like bispecific antibodies-an overview. Antibodies (Basel), 2018, **7**(3): 28

[31] Segués A, Huang S, Sijts A, *et al*. Opportunities and challenges of bi-specific antibodies. Int Rev Cell Mol Biol, 2022, 369: 45-70

[32] Vidarsson G, Dekkers G, Rispens T. IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions. Front Immunol, 2014, **5**: 520

[33] Tanigaki K, Sacharidou A, Peng J, *et al*. Hyposialylated IgG activates endothelial IgG receptor FcγRIIB to promote obesity-induced insulin resistance. J Clin Invest, 2018, **128**(1): 309-322

[34] Pereira N A, Chan K F, Lin P C, *et al*. The "less-is-more" in therapeutic antibodies: afucosylated anti-cancer antibodies with

enhanced antibody-dependent cellular cytotoxicity. MAbs, 2018, **10**(5): 693-711

[35] Peschke B, Keller C W, Weber P, *et al*. Fc-galactosylation of human immunoglobulin gamma isotypes improves C1q binding and enhances complement-dependent cytotoxicity. Front Immunol, 2017, **8**: 646

[36] Aertker K M J, Pilvankar M R, Prass T M, *et al*. Exploring molecular determinants and pharmacokinetic properties of IgG1-scFv bispecific antibodies. MAbs, 2024, **16**(1): 2318817

[37] Wu C, Ying H, Grinnell C, *et al*. Simultaneous targeting of multiple disease mediators by a dual-variable-domain immunoglobulin. Nat Biotechnol, 2007, **25**(11): 1290-1297

[38] Jakob C G, Edalji R, Judge R A, *et al*. Structure reveals function of the dual variable domain immunoglobulin (DVD-Ig™) molecule. MAbs, 2013, **5**(3): 358-363

[39] Chang F, Wu Q, Hu Y, *et al*. Engineered bispecific antibodies with enhanced breadth and potency against SARS-CoV-2 variants and SARS-related coronaviruses. Med Microbiol Immunol, 2024, **213**(1): 24

[40] Gong S, Wu C. Generation of Fabs-in-tandem immunoglobulin molecules for dual-specific targeting. Methods, 2019, 154: 87-92

[41] Gong S, Ren F, Wu D, *et al*. Fabs-in-tandem immunoglobulin is a novel and versatile bispecific design for engaging multiple therapeutic targets. MAbs, 2017, **9**(7): 1118-1128

[42] Saito S, Nakayama M, Yamazaki K, *et al*. Engineering and physicochemical characterization of a novel, stable, symmetric bispecific antibody with dual target-binding using a common light chain. Protein Sci, 2024, **33**(10): e5121

[43] Rubio-Pérez L, Lázaro-Gorines R, Harwood S L, *et al*. A PD-L1/EGFR bispecific antibody combines immune checkpoint blockade and direct anti-cancer action for an enhanced anti-tumor response. Oncoimmunology, 2023, **12**(1): 2205336

[44] Rubio-Pérez L, Frago S, Compte M, *et al*. Characterization of a trispecific PD-L1 blocking antibody that exhibits EGFR-conditional 4-1BB agonist activity. Antibodies (Basel), 2024, **13**(2): 34

[45] Orcutt K D, Ackerman M E, Cieslewicz M, *et al*. A modular IgG-scFv bispecific antibody topology. Protein Eng Des Sel, 2010, **23**(4): 221-228

[46] Madsen A V, Kristensen P, Buell A K, *et al*. Generation of robust bispecific antibodies through fusion of single-domain antibodies on IgG scaffolds: a comprehensive comparison of formats. MAbs, 2023, **15**(1): 2189432

[47] Madsen A V, Kristensen P, Goletz S. IgG-VHH bispecific fusion antibodies: challenges and opportunities as therapeutic agents. Expert Opin Biol Ther, 2024, **24**(4): 203-206

[48] Suresh M R, Cuello A C, Milstein C. Bispecific monoclonal antibodies from hybrid hybridomas. Methods Enzymol, 1986, 121: 210-228

[49] Lindhofer H, Mocikat R, Steipe B, *et al*. Preferential species-restricted heavy/light chain pairing in rat/mouse quadromas. Implications for a single-step purification of bispecific antibodies. J Immunol, 1995, **155**(1): 219-225

[50] Linke R, Klein A, Seimetz D. Catumaxomab: clinical development and future directions. MAbs, 2010, **2**(2): 129-136

[51] Crick F H C. Is alpha-keratin a coiled coil?. Nature, 1952, **170**(4334): 882-883

[52] Ridgway J B, Presta L G, Carter P. 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH_3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng, 1996, **9**(7): 617-621

[53] Spiess C, Merchant M, Huang A, *et al*. Bispecific antibodies with natural architecture produced by co-culture of bacteria expressing two distinct half-antibodies. Nat Biotechnol, 2013, **31**(8): 753-758

[54] Xu Y, Lee J, Tran C, *et al*. Production of bispecific antibodies in "knobs-into-holes" using a cell-free expression system. MAbs, 2015, **7**(1): 231-242

[55] Wang B, Lin J, Hoag M R, *et al*. A novel IgG Fc by computer-aided design enhances heavy-chain heterodimerization in Bi- or trispecific antibodies. Antib Ther, 2022, **5**(3): 216-225

[56] van der Neut Kolfschoten M, Schuurman J, Losen M, *et al*. Anti-inflammatory activity of human IgG4 antibodies by dynamic Fab arm exchange. Science, 2007, **317**(5844): 1554-1557

[57] Rispens T, Ooijevaar-de Heer P, Bende O, *et al*. Mechanism of immunoglobulin G4 fab-arm exchange. J Am Chem Soc, 2011, **133**(26): 10302-10311

[58] Labrijn A F, Meesters J I, Priem P, *et al*. Controlled Fab-arm exchange for the generation of stable bispecific IgG1. Nat Protoc, 2014, **9**(10): 2450-2463

[59] van den Bremer E T J, Labrijn A F, van den Boogaard R, *et al*. Cysteine-SILAC mass spectrometry enabling the identification and quantitation of scrambled interchain disulfide bonds: preservation of native heavy-light chain pairing in bispecific IgGs generated by controlled fab-arm exchange. Anal Chem, 2017, **89**(20): 10873-10882

[60] 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. MAbs, 2013, **5**(6): 962-973

[61] Neijssen J, Cardoso R M F, Chevalier K M, *et al*. Discovery of amivantamab (JNJ-61186372), a bispecific antibody targeting EGFR and MET. J Biol Chem, 2021, **296**: 100641

[62] Engelberts P J, Hiemstra I H, Jong B D, *et al*. DuoBody-CD3xCD20 induces potent T-cell-mediated killing of malignant B cells in preclinical models and provides opportunities for subcutaneous dosing. EBioMedicine, 2020, **52**: 102625

[63] Martens A W J, Rietveld J M, de Boer R, *et al*. Redirecting T-cell activity with anti-BCMA/anti-CD3 bispecific antibodies in chronic lymphocytic leukemia and other B-cell lymphomas. Cancer Res Commun, 2022, **2**(5): 330-341

[64] Bajaj G, Shchelokov D, Demin O, *et al*. Dose selection for DuoBody®-CD40x4-1BB (GEN1042/BNT312) using a mPBPK/RO model leveraging preclinical and clinical data. Clin Pharmacol Ther, 2025, **118**(2): 418-427

[65] Davis J H, Aperlo C, Li Y, *et al*. SEEDbodies: fusion proteins based

on strand-exchange engineered domain (SEED) CH_3 heterodimers in an Fc analogue platform for asymmetric binders or immunofusions and bispecific antibodies. Protein Eng Des Sel, 2010, **23**(4): 195-202

[66] Muda M, Gross A W, Dawson J P, *et al*. Therapeutic assessment of SEED: a new engineered antibody platform designed to generate mono- and bispecific antibodies. Protein Eng Des Sel, 2011, **24**(5): 447-454

[67] Moore G L, Bernett M J, Rashid R, *et al*. A robust heterodimeric Fc platform engineered for efficient development of bispecific antibodies of multiple formats. Methods, 2019, 154: 38-50

[68] Sasso E H, Silverman G J, Mannik M. Human IgM molecules that bind staphylococcal protein A contain VHIII H chains. J Immunol, 1989, **142**(8): 2778-2783

[69] Mazor Y, Oganesyan V, Yang C, *et al*. Improving target cell specificity using a novel monovalent bispecific IgG design. MAbs, 2015, **7**(2): 377-389

[70] Schaefer W, Regula J T, Bähner M, *et al*. Immunoglobulin domain crossover as a generic approach for the production of bispecific IgG antibodies. Proc Natl Acad Sci USA, 2011, **108**(27): 11187-11192

[71] Koga H, Yamano T, Betancur J, *et al*. Efficient production of bispecific antibody by FAST-Ig™ and its application to NXT007 for the treatment of hemophilia A. MAbs, 2023, **15**(1): 2222441

[72] Koga H, Kuroi H, Hirano R, *et al*. Rapid generation of murine bispecific antibodies using FAST-Ig™ for preclinical screening of HER2/CD3 T-cell engagers. Antibodies (Basel), 2024, **13**(1): 3

[73] Dong W, Li Y. Complementary methods for monitoring hole-hole homodimer associated with a WuXiBody-based asymmetric bispecific antibody. Protein Expr Purif, 2023, **210**: 106316

[74] Guo G, Han J, Wang Y, *et al*. A potential downstream platform approach for WuXiBody-based IgG-like bispecific antibodies. Protein Expr Purif, 2020, **173**: 105647

[75] Lewis S M, Wu X, Pustilnik A, *et al*. Generation of bispecific IgG antibodies by structure-based design of an orthogonal Fab interface. Nat Biotechnol, 2014, **32**(2): 191-198

[76] Wu X, Sereno A J, Huang F, *et al*. Fab-based bispecific antibody formats with robust biophysical properties and biological activity. MAbs, 2015, **7**(3): 470-482

[77] Ahmad Z A, Yeap S K, Ali A M, *et al*. scFv antibody: principles and clinical application. Clin Dev Immunol, 2012, **2012**: 980250

[78] Hornig N, Färber-Schwarz A. Production of bispecific antibodies: diabodies and tandem scFv. Methods Mol Biol, 2012, 907: 713-727

[79] Einsele H, Borghaei H, Orlowski R Z, *et al*. The BiTE (bispecific T-cell engager) platform: Development and future potential of a targeted immuno-oncology therapy across tumor types. Cancer, 2020, **126**(14): 3192-3201

[80] Ogieuhi I J, Ajekiigbe V O, Oladipo T C, *et al*. Bispecific T-cell engagers (BiTE): a review of tarlatamab in small cell lung cancer. Clin Transl Oncol, 2025

[81] Kitidee K, Amonyingcharoen S, Preedagasamzin S, *et al*. Combining CD3/GD2 bispecific T cell engager with human Vγ 9Vδ2 T cells facilitates neuroblastoma cell targeting and killing *in vitro*. PLoS One, 2025, **20**(6): e0325389

[82] Bansal A, Lavoie R R, Lucien F, *et al*. Synthesis and evaluation of anti-PD-L1-B11 antibody fragments for PET imaging of PD-L1 in breast cancer and melanoma tumor models. Sci Rep, 2024, **14**(1): 19561

[83] Eissenberg L G, Ritchey J K, Rettig M P, *et al*. Control of acute myeloid leukemia and generation of immune memory *in vivo* using AMV564, a bivalent bispecific CD33 x CD3 T cell engager. PLoS One, 2024, **19**(5): e0300174

[84] Reusch U, Harrington K H, Gudgeon C J, *et al*. Characterization of CD33/CD3 tetravalent bispecific tandem diabodies (TandAbs) for the treatment of acute myeloid leukemia. Clin Cancer Res, 2016, **22**(23): 5829-5838

[85] Moore P A, Zhang W, Rainey G J, *et al*. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. Blood, 2011, **117**(17): 4542-4551

[86] Rader C. DARTs take aim at BiTEs. Blood, 2011, **117**(17): 4403-4404

[87] Chichili G R, Huang L, Li H, *et al*. A CD3xCD123 bispecific DART for redirecting host T cells to myelogenous leukemia: preclinical activity and safety in nonhuman Primates. Sci Transl Med, 2015, **7**(289): 289ra82

[88] Topp M S, Gökbuget N, Zugmaier G, *et al*. Phase II trial of the anti-CD19 bispecific T cell-engager blinatumomab shows hematologic and molecular remissions in patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukemia. J Clin Oncol, 2014, **32**(36): 4134-4140

[89] Cech P, Skórka K, Dziki L, *et al*. T-cell engagers-the structure and functional principle and application in hematological malignancies. Cancers (Basel), 2024, **16**(8): 1580

[90] Koch-Nolte F. Nanobody-based heavy chain antibodies and chimeric antibodies. Immunol Rev, 2024, **328**(1): 466-472

[91] Hemmi S, Asano R, Kimura K, *et al*. Construction of a circularly connected VHH bispecific antibody (cyclobody) for the desirable positioning of antigen-binding sites. Biochem Biophys Res Commun, 2020, **523**(1): 72-77

[92] Lu D, Jimenez X, Zhang H, *et al*. Fab-scFv fusion protein: an efficient approach to production of bispecific antibody fragments. J Immunol Methods, 2002, **267**(2): 213-226

[93] Tapia-Galisteo A, Sánchez Rodríguez Í, Aguilar-Sopeña O, *et al*. Trispecific T-cell engagers for dual tumor-targeting of colorectal cancer. Oncoimmunology, 2022, **11**(1): 2034355

[94] Chari A, Minnema M C, Berdeja J G, *et al*. Talquetamab, a T-cell-redirecting GPRC5D bispecific antibody for multiple myeloma. N Engl J Med, 2022, **387**(24): 2232-2244

[95] Nitta T, Yagita H, Azuma T, *et al*. Bispecific F $(ab')_2$ monomer prepared with anti-CD3 and anti-tumor monoclonal antibodies is most potent in induction of cytolysis of human T cells. Eur J Immunol, 1989, **19**(8): 1437-1441

[96] Dong J, Sereno A, Aivazian D, *et al*. A stable IgG-like bispecific

antibody targeting the epidermal growth factor receptor and the type I insulin-like growth factor receptor demonstrates superior anti-tumor activity. MAbs, 2011, **3**(3): 273-288

[97] Ma X, Zhang S, Ren X, *et al*. Dual blockade of IL-17A and IL-36 pathways *via* a bispecific antibody exhibits enhanced anti-inflammatory potency. Front Immunol, 2024, **15**: 1434127

[98] Park K, Haura E B, Leighl N B, *et al*. Amivantamab in EGFR exon 20 insertion-mutated non-small-cell lung cancer progressing on platinum chemotherapy: initial results from the CHRYSALIS phase I study. J Clin Oncol, 2021, **39**(30): 3391-3402

[99] Wang R, Zhang C, Cao Y, *et al*. Blockade of dual immune checkpoint inhibitory signals with a CD47/PD-L1 bispecific antibody for cancer treatment. Theranostics, 2023, **13**(1): 148-160

[100] Wang C, Huang H, Song Z, *et al*. A novel bispecific antibody CVL006 superior to AK112 for dual targeting of PD-L1 and VEGF in cancer therapy. Antib Ther, 2025, **8**(3): 189-196

[101] Bielski P, Barczyński J, Mikitiuk M, *et al*. The bispecific antibody targeting VISTA and PD-L1 shows enhanced tumor inhibitory activity in pancreatic, endometrial and breast cancers compared to mono- and combination immune checkpoint blockade. Front Immunol, 2025, **16**: 1486799

[102] Alcedo Andrade P E, Mannucci P M, Kessler C M. Emicizumab: the hemophilia A game-changer. Haematologica, 2024, **109**(5): 1334-1347

[103] Mahlangu J. Emicizumab for the prevention of bleeds in hemophilia A. Expert Opin Biol Ther, 2019, **19**(8): 753-761

[104] Young G, Callaghan M, Dunn A, *et al*. Emicizumab for hemophilia A with factor VIII inhibitors. Expert Rev Hematol, 2018, **11**(11): 835-846

[105] Kasturirangan S, Rainey G J, Xu L, *et al*. Targeted fcγ receptor (FcγR)-mediated clearance by a biparatopic bispecific antibody. J Biol Chem, 2017, **292**(10): 4361-4370

[106] Budde L E, Sehn L H, Matasar M, *et al*. Safety and efficacy of mosunetuzumab, a bispecific antibody, in patients with relapsed or refractory follicular lymphoma: a single-arm, multicentre, phase 2 study. Lancet Oncol, 2022, **23**(8): 1055-1065

[107] Xu J, Wang R, Cheng S, *et al*. Bispecific targeting of 4-1BB and CCR8 boosts antitumor immunity *via* Ti-Treg depletion and $CD8^+$ activation. iScience, 2025, **28**(7): 112829

[108] Keam S J. Ozoralizumab: first approval. Drugs, 2023, **83**(1): 87-92

[109] Huang H, Wei X. Therapeutic potential of CD20/CD3 bispecific antibodies in the treatment of autoimmune diseases. Rheumatol Immunol Res, 2025, **5**(4): 209-216

[110] Board N L, Yuan Z, Wu F, *et al*. Bispecific antibodies promote natural killer cell-mediated elimination of HIV-1 reservoir cells. Nat Immunol, 2024, **25**(3): 462-470

[111] Li Z, Li S, Zhang G, *et al*. An engineered bispecific human monoclonal antibody against SARS-CoV-2. Nat Immunol, 2022, **23**(3): 423-430

[112] Penha F M, Masud M, Khanani Z A, *et al*. Review of real-world evidence of dual inhibition of VEGF-A and ANG-2 with faricimab in NAMD and DME. Int J Retina Vitreous, 2024, **10**(1): 5

[113] Kitazawa T, Shima M. Emicizumab, a humanized bispecific antibody to coagulation factors IXa and X with a factor VIIIa-cofactor activity. Int J Hematol, 2020, **111**(1): 20-30

[114] Bumma N, Papadantonakis N, Advani A S. Structure, development, preclinical and clinical efficacy of blinatumomab in acute lymphoblastic leukemia. Future Oncol, 2015, **11**(12): 1729-1739

[115] Kong S, Minocha M, Chen P W, *et al*. Population pharmacokinetics of tarlatamab, a half-life extended DLL3-directed bispecific T-cell engager in patients with previously treated small cell lung cancer. Clin Pharmacokinet, 2025, **64**(5): 729-741

[116] Dogra S, Singh S. Assessing the clinical progress of the bispecific nanobody sonelokimab. Expert Opin Investig Drugs, 2025, **34**(4): 253-258

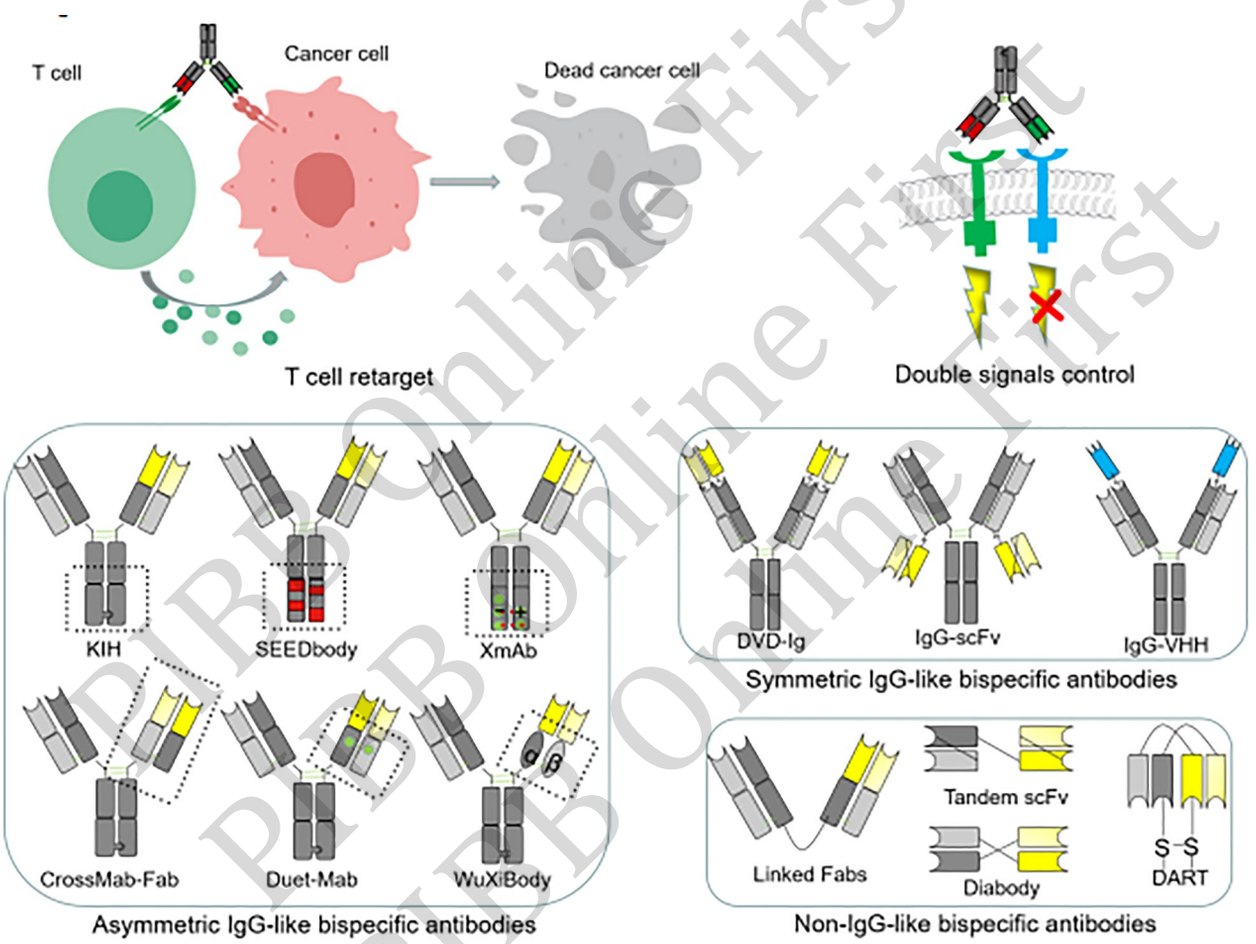
[117] Thakur A, Huang M, Lum L G. Bispecific antibody based therapeutics: strengths and challenges. Blood Rev, 2018, **32**(4): 339-347

Structural Design and Application of Bispecific Antibodies*

ZHANG Ding, ZHENG Yue-Ting**, ZHANG Wei**

(*Key Laboratory of Veterinary Biotechnology of Henan Province, College of Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou* 450046, China)

Graphical abstract



Abstract　Bispecific antibodies, engineered to simultaneously bind two distinct antigens or two epitopes on the same antigen, are now widely utilized in tumor therapy and various other fields. Depending on their mechanisms of action, bispecific antibodies can be designed into diverse structural formats, including IgG-like bispecific antibodies containing an Fc region. The Fc region mediates immune effector functions by interacting with receptors on immune cells or soluble immune components. However, antibodies containing an Fc region have a relatively high molecular weight, which limits their tissue penetration. They also exhibit slow systemic clearance in vivo and possess pharmacokinetic characteristics marked by a long terminal elimination half-life. Symmetric IgG-like bispecific antibodies feature a symmetric structure and are bivalent for each target antigen. During production, since the two heavy chains carrying the Fc region are identical, issues related to chain mispairing do not arise, thereby simplifying the manufacturing and purification processes. Moreover, the pairing of two identical

natural Fc chains allows for correct disulfide bond formation, resulting in a more stable structure. Glycosylation of the Fc region remains in its natural state, preserving Fc-mediated functions. However, as the variable regions of the two antigen-binding sites are linked to the same heavy chain, the design must account for potential steric hindrance when the antibody binds both antigens simultaneously. In contrast, asymmetric IgG-like bispecific antibodies consist of two different heavy chains, each carrying antigen-binding domains that recognize distinct antigens or epitopes, offering greater structural design flexibility. Their development, however, requires addressing challenges related to heavy chain and light chain pairing. Strategies to prevent heavy chain mispairing include engineering the spatial configuration of the Fc region, facilitating Fab arm exchange, applying IgG-IgA chain exchange techniques, and introducing charge modifications in the Fc domain. To ensure correct light chain–heavy chain pairing, approaches such as introducing electrostatic interactions or novel disulfide bonds between the chains, swapping the CH1 and CL domains, or replacing the CH1-CL module with a T-cell receptor-derived structure have been employed. Non-IgG-like bispecific antibodies lack an Fc region. They are characterized by their small size and low molecular weight, which confer enhanced tissue penetration, rapid systemic clearance, and high structural versatility. Unlike IgG-based formats, they do not bind Fc receptors or activate the complement system directly. Different bispecific antibodies exert therapeutic effects through distinct mechanisms, which are largely determined by their structural design and target specificity. Currently recognized mechanisms of action include T cell redirection, dual signaling pathway blockade, immune checkpoint inhibition, formation of ternary complexes by binding two molecules, neutralization of soluble ligands, and acting as cofactors to mimic or enhance biological processes. Bispecific antibodies are extensively applied in cancer therapy. Beyond oncology, they are also being developed for the treatment of autoimmune diseases, infectious diseases, hematological disorders, and other conditions. Different structural designs offer unique advantages across therapeutic areas. This article elaborates on the structural designs of various types of bispecific antibodies and reviews their mechanisms of action and applications in therapeutics.

Key words antibody, IgG-like bispecific antibody, non-IgG-like bispecific antibody, structural design
DOI：10.3724/j.pibb.2025.0342 **CSTR**：32369.14.pibb.20250342

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32302838).
** Corresponding author.
ZHANG Wei Tel：86-371-56990180，E-mail：zhangweiest@126.com
ZHENG Yue-Ting Tel：86-371-56990180，E-mail：yuetingzheng@henau.edu.cn
Received：July 19，2025 Accepted：October 21，2025