

# 二重特異性抗体の精製は、これで決まり！（2）



## 混入する凝集体、抗体関連不純物の分離に適したクロマトグラフィーの選択

二重特異性抗体(BsAb)は、異なる二つの抗原に同時に結合できる人工の抗体で、がん細胞と免疫細胞の表面抗原などに同時に作用させることで、高い治療効果が期待できます。これまで BsAb は分子設計技術により、50種類以上の形態が考案されてきました。一方で BsAb 生産時には、ミスペアリング抗体のほか凝集体や不完全抗体、断片抗体などの不純物が多く生じます。そのため BsAb の下流（ダウンストリーム）精製工程では、これらのさまざまな生成物由来不純物や、工程由来不純物をクロマトグラフィーにより効果的に分離・除去することが重要です。表 1 にこれまでに報告<sup>1-9</sup>されている BsAb の分離精製におけるクロマトグラフィーの分離モードと、それに対応可能な充填剤および分離条件等を示します。

表 1 二重特異性抗体の凝集体および抗体関連不純物の除去のための分離モード、充填剤および溶離液条件

抗体	抗体の構造	不純物の種類	分離モード*	対応可能なTOYOPEARL® 充填剤	溶離液および分離条件
IgG型	非対称型	凝集体	アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	PEG/CaCl <sub>2</sub> またはNaClの溶離液への添加
				Protein G (弊社該当品なし)	pHグラジエント溶離
				AF-rProtein L-650F	pHグラジエント溶離、アルギニンの添加
			陽イオン交換	GigaCap® S-650, Sulfate-650F	塩濃度グラジエント溶離、塩基性pHの溶離液
			陰イオン交換	NH <sub>2</sub> -750F	溶離液pHと塩濃度の至適化、フロースルー分離
			疎水性相互作用	Phenyl-650/750, Butyl-650	グリコールやアルギニン添加
		マルチモード	MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA <sup>TM**</sup>	pHまたは塩濃度グラジエント溶離	
		ホモダイマー (H・L鎖のミスペアリング)	アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	pHグラジエント溶離、Fc部分の非結合性の違い
				AF-rProtein L-650F	VL鎖の違いによりpHグラジエント溶離
				GigaCap Q-650, NH <sub>2</sub> -750F	低pI型、pIの違うホモダイマーはpHグラジエント溶離
			陽イオン交換	GigaCap S-650, Sulfate-650F	静電作用型、pIの違うホモダイマーはpHグラジエント溶離
			疎水性相互作用	Phenyl-600/650, Butyl-600/650	Knob/Hole型は酸性pHで分離、アルギニン等の添加
			マルチモード	MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA	pHまたは塩濃度グラジエント溶離
		ホモダイマー (κ鎖型抗体)	アフィニティー	VHHリガンド固定（弊社該当品なし）	CLK鎖、λ鎖結合用AFCによる二段階分離法
			陰イオン交換	NH <sub>2</sub> -750F	溶離液pHと塩濃度の至適化、フロースルー分離も応用可能
			疎水性相互作用	Phenyl-600/650, Butyl-650/600	MXC-HICの二段階精製法（低コスト）
		マルチモード	MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA	MXC-HICの二段階精製法（低コスト）	
			アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	pHグラジエント溶離、NaCl, CaCl <sub>2</sub> の添加
	VHHリガンド固定（弊社該当品なし）		CH1部位へのアフィニティー分離		
	陽イオン交換		GigaCap S-650, Sulfate-650F	pHまたは塩濃度グラジエント溶離	
	陰イオン交換		NH <sub>2</sub> -750F	溶離液pHと塩濃度の至適化、フロースルー分離も応用可能	
	疎水性相互作用		Phenyl/Butyl-650/600	pHまたは塩濃度グラジエント溶離	
	マルチモード	MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA	ProA-AFC精製後に使用		
	抗体断片	アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	pHグラジエント溶離	
		陽イオン交換	GigaCap S-650, Sulfate-650F	塩濃度グラジエント溶離、PEGの添加	
		陰イオン交換	NH <sub>2</sub> -750F	溶離液pHと塩濃度の至適化、フロースルー分離も応用可能	
		疎水性相互作用	Phenyl-600/650, Butyl-650/600	塩濃度グラジエント溶離	
		マルチモード	Ca <sup>++</sup> Pure-HA	塩濃度グラジエント溶離	
		Ca <sup>++</sup> Pure-HA	塩濃度グラジエント溶離		
	対称型	凝集体	アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	PEG/CaCl <sub>2</sub> やNaClの添加
陰イオン交換			NH <sub>2</sub> -750F	高pH、高塩濃度、低試料負荷量、フロースルー分離	
陽イオン交換			GigaCap S-650, Sulfate-650F	酸性pHで塩濃度グラジエント溶離、PEGの添加	
疎水性相互作用			Phenyl-, Butyl-, PPG-600/650	対称型は凝集体が多い、疎水性の弱い充填剤も効果的	
マルチモード			MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA	pH、塩濃度依存（HAPはPEG添加）	
Ca <sup>++</sup> Pure-HA			pH、塩濃度依存		
Diabody, scFv型		陽イオン交換	Sulfate-650F, GigaCap S-650	pH、塩濃度依存	
		Ca <sup>++</sup> Pure-HA	pH、塩濃度依存		
Fab-scFv型		scFv-Fc, ダイマー	アフィニティー	VHHリガンド固定（弊社該当品なし）	CLK鎖結合アフィニティー充填剤の使用
		半抗体	アフィニティー	Super A, AF-rProtein A HC-650F	Fcが片方の場合（pHグラジエント溶離）
マルチモード			MX-Trp-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA	塩濃度またはpHグラジエント溶離（HAPはPEG添加）	
非IgG型 (断片)		scFv型 BiTE型など	凝集体	アフィニティー	AF-rProtein L-650F
	AF-Chelate 650M			ZnCl <sub>2</sub> 溶液による金属配位、His-tag導入抗体	
	陰イオン交換			NH <sub>2</sub> -750F, GigaCap Q-650	溶離液pHと塩濃度の至適化、フロースルー分離
陽イオン交換	Sulfate-650F, GigaCap S-650	酸性pHでの塩濃度グラジエント溶離、PEGの添加			

\* イオン交換体には塩耐性型イオン交換体（マルチモード類似）を含む；TOYOPEARL Sulfate-650F, TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F

\*\*マルチモードにはハイドロキシアパタイト（HAP）を含む

## ●二重特異性抗体(BsAb)の 200 L スケールにおけるダウンストリーム精製例 (文献紹介<sup>9)</sup>)

細胞培養上清から非対称 Knob-into-hole 型の 3 種類の BsAb(いずれも IgG 型)の精製法の検討を行いました。キャプチャー工程の Protein A によるアフィニティークロマトグラフィー(AFC)に続き、2 段階のポリッシング工程を用いました。ポリッシング工程 1 には陽イオン交換体(CEC)による吸・脱着溶出、または陰イオン交換体(AEC)によるフロースルー分離を、ポリッシング工程 2 には疎水クロマトグラフィー(HIC)を用いました。

分離条件を検討した結果、Protein A-AFC では hole/hole 型ホモダイマーや断片抗体の除去、CEC(SP-型)では凝集体や LC 欠損断片の除去、AEC (TOYOPEARL NH<sub>2</sub>-750F)では凝集体および半抗体の除去、HIC (TOYOPEARL Butyl-650M)では LC 欠損断片や脱グリカン抗体、宿主由来のたんぱく質(HCP)除去が効果的であることがわかりました。また精製された抗体の純度は SE-HPLC により約 97 %でした。

表 2 に、3 種の BsAb 精製工程における凝集体(HMW)および低分子 (断片) 抗体(LMW)の比率を示します。

表 2 二重特異性抗体 BsAb2, BsAb3, BsAb4 のダウンストリームの精製工程

工程	BsAb2		BsAb3		BsAb4	
	SE-HPLC	Non-red CE	SE-HPLC	Non-red CE	SE-HPLC	Non-red CE
凝集体/断片	HMW (%)	LMW (%)	HMW (%)	LMW (%)	HMW (%)	LMW (%)
キャプチャー (Protein A-AFC)	19.9	4.7	9.5	5.2	5.6	5.7
低 pH によるウイルス不活化	20.8	4.1	6.6	5.8	8.1	4.6
ポリッシング 1 (CEC)	14.3	3.8	-	-	-	-
(AEC)	-	-	5.0	6.0	1.7	2.4
ポリッシング 2 (HIC)	3.6	1.3	4.7	2.6	1.0	2.7
ナノフィルターろ過	2.7	1.4	2.7	3.3	1.0	2.2
原薬	1.9	1.1	1.4	3.4	0.9	2.1

SE-HPLC; size-exclusion HPLC, Non-red CE; non-reduced capillary electrophoresis

Ref. Y. Wen et al., Asian J. Complementary and Alternative Medicine, 2025, 4, <http://dx.doi.org/10.53043/2347-3894.acam13002> を一部改変

## ●参考文献、技術情報

- 東ソー、テクニカルノート (トヨパール) No. 21、「二重特異性抗体の精製は、これで決まり！」
- Y. Li et al., A roadmap for IgG-like bispecific antibody purification, Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics, 2020, p.167-179, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00008-4>
- S. W. Chen et al., Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies, Antibody Therapeutics, 2021, 4, 73-88, <https://doi.org/10.1093/abt/tbab007>
- Y. Li, General strategies for IgG-like bispecific antibody purification, Biotechnol. Prog. 41 (2025) 41:e3515, <https://doi.org/10.1002/btpr.3515>
- M. S. Karbyshev et al., Trends and challenges in bispecific antibody production, J. Chromatogr., A, 1744 (2025) 465722, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2025.465722>
- Q. Li et al., The downstream purification of bispecific antibodies, Anal. Biochem., 696 (2025) 115692, <https://doi.org/10.1016/j.ab.2024.115692>
- K. Mix et al., Rapid affinity-based purification of multi-specific antibodies using Kappa Select and Protein L, MABS 17 (2025) 2483272, <https://doi.org/10.1080/19420862.2025.2483272>
- N. Ingavat et al., Affinity resin selection for efficient capture of bispecific antibodies as guided by domain composition, Process Biochemistry 154 (2025) 1-11, <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2025.04.007>
- Y. Wen et al., Removal of Antibody-Related Fragments During Asymmetric Bispecific Antibody Purification, Asian Journal of Complementary and Alternative Medicine, 2025, 4, <http://dx.doi.org/10.53043/2347-3894.acam13002>



※ “トヨパール”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap” は日本等における東ソー株式会社の登録商標です

“Ca<sup>++</sup>Pure-HA” は日本等における Tosoh Bioscience LLC の登録商標です

※ 掲載のデータ等はその数値を保証するものではありません。お客様の使用環境・条件・判断基準に合わせてご確認ください

## 東ソー株式会社 バイオサイエンス事業部

東京本社 営業部 ☎ (03) 6636-3733 〒104-0028 東京都中央区八重洲2-2-1  
 大阪支店 内村工務 ☎ (06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
 名古屋支店 内村工務 ☎ (052) 211-5730 〒460-0008 名古屋市中区栄1-2-7  
 福岡支店 ☎ (092) 710-6694 〒812-0011 福岡市博多区博多駅前3-8-10  
 仙台支店 ☎ (022) 266-2341 〒980-0014 仙台市青葉区本町1-11-1  
 カスタマーサポートセンター ☎ (0467) 76-5384 〒252-1123 神奈川県綾瀬市早川2743-1

お問い合わせe-mail [tskgel@tosoh.co.jp](mailto:tskgel@tosoh.co.jp)

バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>