

# 二重特異性抗体の精製は、これで決まり！

各種クロマトグラフィーを用いた抗体類似物、副産物の効率的な除去



抗体は本来、一種類の抗原結合部位しか持たないたんぱく質ですが、組換え技術により、二つの異なる抗原結合性を有する二重特異性抗体(bsAb)の作製とその医薬品への応用がなされるようになってきました。bsAb を用い、がん細胞の表面抗原と、エフェクター細胞の表面抗原とを同時に認識、結合させることで、これらの細胞を接触させ抗腫瘍作用を増強することが可能です。一方、bsAb はその構造の複雑さから、類似構造を持つ副産物（不純物）も多数産生されてしまうため、ダウンストリーム工程で、これらの不純物を効果的に除去する必要があります。bsAb には類似構造の不純物として凝集体のほか、ホモ・ヘテロダイマー、半抗体や抗体断片が含まれ、これら不純物の除去には各種のクロマトグラフィーが用いられます。不純物の除去例および、対応可能なクロマトグラフィー用充填剤を以下の表に、また代表的な不純物のクロマトグラフィー分離戦略例<sup>1</sup>を以下の図に示します。

クロマトグラフィー分離モード	不純物の除去例			対応可能な充填剤(TOYOPEARL® 等)
	凝集体	ホモダイマー	半抗体・断片	
アフィニティー (ProA, -L, -Gなど)	○	○	○	AF-rProtein A HC-650F, AF-rProtein L-650F
アフィニティー (金属キレート; IMAC)	○	—	—	Chelate-650M
陽イオン交換 (塩耐性含む)	○	○	○	GigaCap S-650M, Sulfate-650F (塩耐性)
陰イオン交換 (塩耐性含む)	○	○	—	GigaCap Q-650M, NH <sub>2</sub> -750F (塩耐性)
疎水性相互作用	○	○	○	Butyl-600/650, Phenyl-600/650/750, PPG-600
マルチモード*	○	○	○	MX-Trip-650M, Ca <sup>++</sup> Pure-HA <sup>TM</sup>

\*ハイドロキシアパタイトを含む

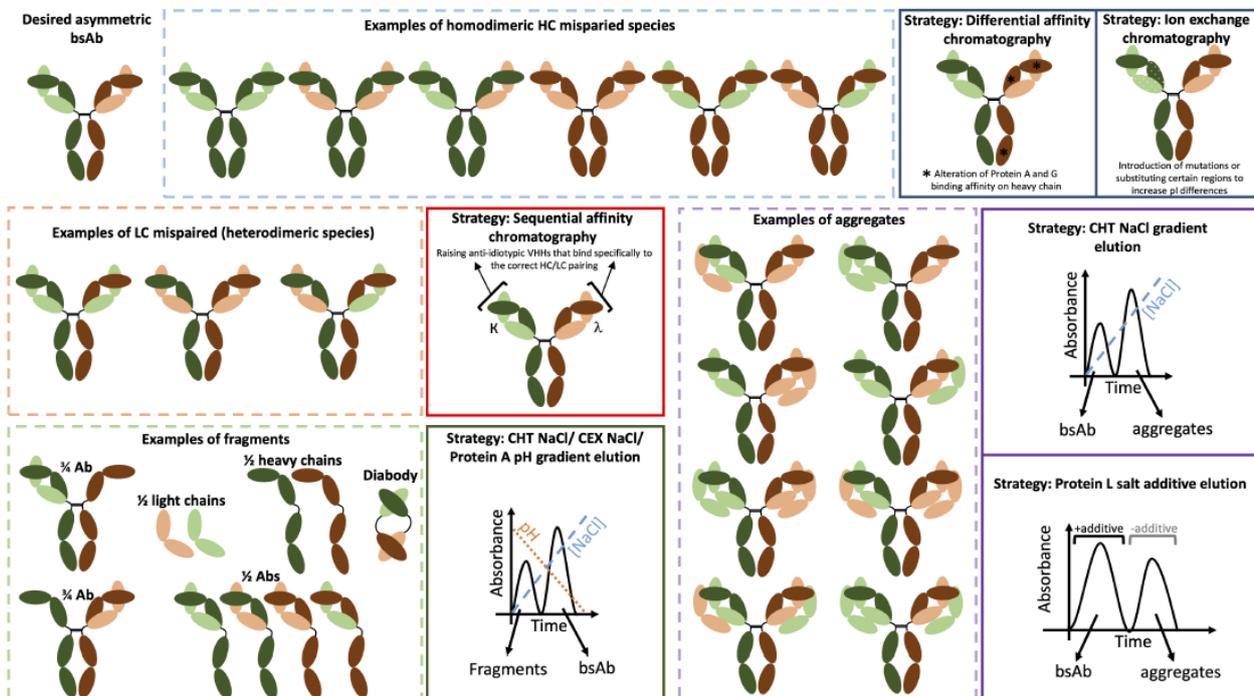


Figure 2. Impurities formed as a result of HC mispairing (light blue dotted box), LC mispairing (light red dotted box), fragmentation (light green dotted box) and aggregation (light purple dotted box) are illustrated here for a representative desired asymmetric bsAb, with the proposed strategies to remove them shown in the corresponding dark colored non-dotted boxes. Not shown here: (1) for a Fab × scFv bsAb, differential KappaSelect affinity and CH1-based chromatographic methods have proven to be useful [59, 60]; (2) diabody-IgG mispaired products can be separated from scFv-IgG bsAb targets through the use of an alkaline pH near the pI of the bsAb using cation exchange chromatography [71]; (3) hydrophobic and mixed-mode resins have been proposed to provide good separation for certain homodimer mispaired products from their bsAb targets [77, 78]. Examples listed here are not exhaustive.

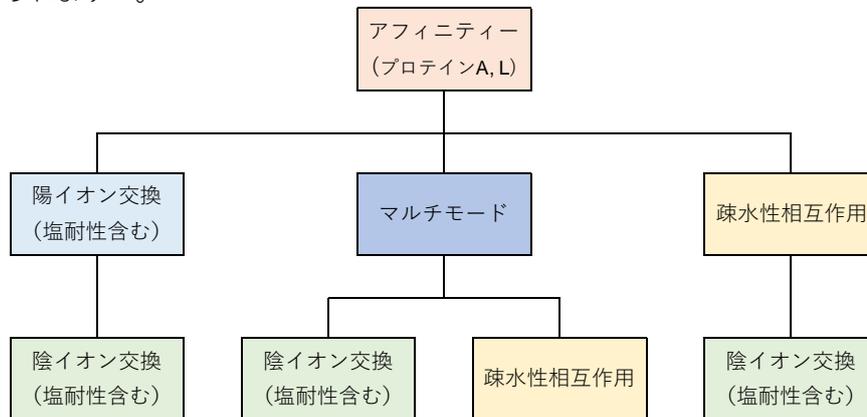
図. 二重特異性抗体とその不純物のクロマトグラフィー分離戦略例（文献 1 より抜粋引用）

文献 1 : S. W. Chen et al., Current trends and challenges in the downstream purification of bispecific antibodies, Antibody Therapeutics, 2021, 4, 73-88, CC BY,

<https://doi.org/10.1093/abt/tbab007>

## ●二重特異性抗体のクロマトグラフィー精製工程

モノクローナル抗体の製造におけるダウンストリーム精製では、キャプチャー工程にプロテイン A やプロテイン L によるアフィニティークロマトグラフィー(AFC)が良く使用されます。特に bsAb の精製では、AFC においても pH や塩のグラジエント分離などを至適化することにより、前述の抗体類似不純物を効果的に除去できるとの報告もなされています<sup>1-3</sup>。また抗体 H 鎖、L 鎖に特異的に結合する AFC 充填剤<sup>4, 5</sup>のほか、イオン交換クロマトグラフィー(IEC)<sup>6</sup>や疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)<sup>7, 8</sup>、ハイドロキシアパタイトを含むマルチモードクロマトグラフィー(MXC)を効果的に組み合わせて精製します<sup>9-12</sup>。粗精製の bsAb は抗体凝集体を多く含むことが多いため、AFC 工程の直後に、陰イオン交換クロマトグラフィー（塩耐性型充填剤を含む）によるフロースルー(FT)分離により凝集体を除くことも有効と考えられます<sup>13</sup>。



## ●参考文献

1. 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>
2. X. Chen et al., Protein L chromatography, A useful tool for monitoring/separating homodimers during purification of IgG-like asymmetric bispecific antibodies, *Protein Expression and Purification*, 175 (2020) 105711, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2020.105711>
3. C. Chen et al., Controlled conductivity at low pH in Protein L chromatography enables separation of bispecific and other antibody formats by their binding valency, *MABS*, 2019, 11, 632-638, <https://doi.org/10.1080/19420862.2019.1583996>
4. U. Brinkmann et al., The making of bispecific antibodies, *MABS* 2017, 9, 182-212, BY NC ND, <https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1268307>
5. S. M. Chamow et al., Capture of CH1-containing bispecific antibodies, *BioProcess International*, 18(5), May 2020, <https://bioprocessintl.com/downstream-processing/chromatography/capture-of-ch1-containing-bispecific-antibodies-evaluating-an-alternative-to-protein-a/>
6. C. Andrade et al., An integrated approach to aggregate control for therapeutic bispecific antibodies using an improved three column Mab platform-like purification process, *Biotechnol. Progress*, 2019, 35, 1-13, BY NC ND, <https://doi.org/10.1002/btpr.2720>
7. Process analytics and intermediate purification of bispecific antibodies with a non-affinity platform, *Tosh Application Note*, a19p09a, <https://www.separations.eu.tosohbioscience.com/OpenPDF.aspx?path=~/File%20Library/TBG/Products%20Download/Application%20Note/a19p09a.pdf>
8. L. K. Kimerer et al., Chromatographic behavior of bivalent bispecific antibodies on hydrophobic interaction chromatography columns, *J. Chromatogr., A*, 1617 (2020) 460836, <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.460836>
9. Y. Li et al., A roadmap for IgG-like bispecific antibody purification, *Approaches to the Purification, Analysis and Characterization of Antibody-Based Therapeutics*, 2021, 167-179, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-103019-6.00008-4>
10. Y. Wan et al., Application of pH-salt dual gradient elution in purifying a WuXiBody-based bispecific antibody by MMC ImPres mixed-mode chromatography, *Protein Expression and Purification*, 181 (2021) 105822, <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105822>
11. S. W. Chen et al., Excellent removal of knob-into-hole bispecific antibody byproducts and impurities in a single-capture chromatography, *Bioresources and Bioprocessing*, 2022, 9:72, CC BY, <https://doi.org/10.1186/s40643-022-00562-y>
12. J. A. Waller et al., Ceramic hydroxyapatite chromatography plays a critical role in bispecific antibody purification process for impurity removal, *Antibody Therapeutics*, 2023, 6, 30-37, <https://doi.org/10.1093/abt/tbac030>
13. 東ソー、テクニカルノート TOYO No. 2 「抗体精製用充填剤は、これで決まり！！(2)」



※ “トヨパール”、“TOYOPEARL”、“TOYOPEARL GigaCap”、“トヨパール”は日本等における東ソー株式会社の登録商標です  
 ※ “Ca++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) 5427-5180 〒105-8623 東京都港区芝3-8-2  
 大阪支店 バイオサイエンス ☎(06) 6209-1948 〒541-0043 大阪市中央区高麗橋4-4-9  
 名古屋支店 バイオサイエンス ☎(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  
 バイオサイエンス事業部ホームページ <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/>  
 HPLC Applications Database <https://www.separations.asia.tosohbioscience.com/applications-database-jp>  
 お問い合わせE-mail ●製品全般、カタログに関するお問い合わせ hlc@tosoh.co.jp  
 ●カラム、分離に関するお問い合わせ tskgel@tosoh.co.jp  
 ●装置の技術相談に関するお問い合わせ csc@tosoh.co.jp

