



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102276717 B

(45) 授权公告日 2015. 09. 09

(21) 申请号 201110221442. 5

(22) 申请日 2004. 10. 06

(30) 优先权数据

60/514018 2003. 10. 27 US

60/523335 2003. 11. 20 US

(62) 分案原申请数据

200480038753. 6 2004. 10. 06

(73) 专利权人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 S·孙 C·加洛 B·凯利

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 张萍 刘健

(51) Int. Cl.

C07K 16/00(2006. 01)

C07K 1/16(2006. 01)

C07K 1/18(2006. 01)

C07K 1/22(2006. 01)

(56) 对比文件

GIOVANNINI ROBERTO ET AL. isolation
of a recombinant antibody from cellcultu
resupernatant:continuous annular versus

batchandexpanded-bed chromatography.

《BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING》. 2001, 第
37 卷(第 6 期), 第 524 页右栏第二段-第 525 页
右栏第一段, 图 2-3.

严自助. 羟磷灰石纯化单克隆抗体.《上海免
疫学杂志》. 1989, 第 9 卷(第 6 期), 第 368-369
页.

邹岳奇等. 国产羟基磷灰石纯化单克隆抗体
的探讨.《生物化学与生物物理进展》. 1991, 第
18 卷(第 2 期), 第 164-165 页.

审查员 杨光

权利要求书2页 说明书21页 附图2页

(54) 发明名称

使用羟磷灰石层析除去高分子量聚集体

(57) 摘要

本发明涉及羟磷灰石层析在从含有高分子量
聚集体的制剂纯化至少一种抗体的应用。此外,本
发明涉及陶瓷羟磷灰石层析整合到组合层析方案
用于从抗体制剂除去高分子量聚集体。

1. 一种从含有高分子量聚集体的抗体制剂中纯化至少一种抗体单体的方法,其包括:
使所述抗体制剂经受羟磷灰石层析,其中所述羟磷灰石层析包括使在柱中的羟磷灰石树脂接触溶于包含 1 至 20mM 磷酸钠和 0.2 至 2.5M NaCl 的加样缓冲液中的抗体制剂并允许纯化的抗体单体流出所述柱,其中所述高分子量聚集体是至少两个抗体的结合,所述加样缓冲液具有 6.4 至 7.6 的 pH。
2. 权利要求 1 的方法,其进一步包括使所述抗体制剂经受 (a) A 蛋白亲和层析和 (b) 离子交换层析。
3. 权利要求 2 的方法,其中首先进行 A 蛋白亲和层析,和最后进行羟磷灰石层析。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述加样缓冲液含有 3mM 至 5mM 磷酸钠。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述加样缓冲液含有 0.35M 至 1M NaCl。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述加样缓冲液具有 6.8 至 7.2 的 pH。
7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述抗体单体是 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 抗体。
8. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述抗体单体是单克隆的、多克隆的、嵌合的、人源化的或其片段。
9. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述抗体单体是抗 IL-21 受体、抗 GDF-8、抗 Abeta、抗 CD22、抗 Lewis Y、抗 IL-13 或抗 IL-22 抗体。
10. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述抗体单体具有碱性 pI。
11. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述树脂是 I 型或 II 型陶瓷羟磷灰石。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述树脂是 I 型陶瓷羟磷灰石。
13. 权利要求 2 的方法,其中所述离子交换层析是阴离子交换层析。
14. 权利要求 1 的方法,其中洗涤所述柱,以允许另外的纯化的抗体单体流出所述柱。
15. 一种从含有高分子量聚集体的抗体制剂中纯化至少一种抗体单体的方法,其包括:
 - (a) 使所述制剂接触 A 蛋白支持体;
 - (b) 允许所述抗体吸附于 A 蛋白支持体;
 - (c) 用至少一种 A 蛋白洗涤缓冲液洗涤 A 蛋白支持体和吸附的抗体;
 - (d) 用至少一种 A 蛋白洗脱缓冲液洗脱吸附的抗体;
 - (e) 使 A 蛋白洗脱物接触离子交换支持体;
 - (f) 允许抗体流过离子交换支持体;
 - (g) 用至少一种离子交换洗涤缓冲液洗涤离子交换支持体;
 - (h) 将步骤 (g) 获得的离子交换流通物更换入含有 1 至 20mM 磷酸钠和 0.2 至 2.5M NaCl 的加样缓冲液;
 - (i) 使步骤 (h) 获得的离子交换流通物接触羟磷灰石树脂;
 - (j) 允许抗体单体流过羟磷灰石树脂;和
 - (k) 用至少一种羟磷灰石洗涤缓冲液洗涤羟磷灰石树脂,其中所述高分子量聚集体是至少两个抗体的结合,所述加样缓冲液具有 6.4 至 7.6 的 pH。
16. 权利要求 15 的方法,其中所述加样缓冲液含有 5mM 磷酸钠。
17. 权利要求 15 的方法,其中所述加样缓冲液含有 350mM NaCl。

18. 权利要求 15 的方法,其中所述加样缓冲液具有 6.8 的 pH。
19. 权利要求 15 的方法,其中所述抗体单体是 IgG、IgA、IgD、IgE 或 IgM 抗体。
20. 权利要求 15 的方法,其中所述抗体单体是单克隆的、多克隆的、嵌合的、人源化的或其片段。
21. 权利要求 15 的方法,其中所述抗体单体是抗 IL-21 受体、抗 GDF-8、抗 Abeta、抗 CD22、抗 Lewis Y、抗 IL-13 或抗 IL-22 抗体。
22. 权利要求 15 的方法,其中所述抗体单体具有碱性 pI。
23. 权利要求 15 的方法,其中所述树脂是 I 型或 I I 型陶瓷羟磷灰石。
24. 权利要求 23 的方法,其中所述树脂是 I 型陶瓷羟磷灰石。
25. 权利要求 15 的方法,其中所述离子交换层析是阴离子交换层析。
26. 权利要求 15 的方法,进一步包括在应用于羟磷灰石树脂之前,过滤离子交换流通物,从而减少病毒污染物。
27. 权利要求 15 的方法,进一步包括使羟磷灰石流通物经受超滤或渗滤中的至少一种。

使用羟磷灰石层析除去高分子量聚集体

[0001] 本申请是申请号为 200480038753.6 (国际申请号为 PCT/US2004/032883)、申请日为 2004 年 10 月 6 日、发明名称为“使用羟磷灰石层析除去高分子量聚集体”的中国专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求 2003 年 11 月 20 日申请的美国临时专利申请号 60/523,335 和 2003 年 10 月 27 日申请的美国临时专利申请号 60/514,018 的优先权的利益,它们的公开内容在此全部引入作为参考。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用羟磷灰石层析从抗体制剂中除去高分子量聚集体的方法。在本发明的某些实施方案中,最终制剂中存在的高分子量聚集体的量可以显著降低,如从 40% 至小于 1%。

背景技术

[0004] 期望鉴定不含破坏或显著降低蛋白生物活性的纯化蛋白的有用方法。在抗体制剂用于诊断应用、治疗应用、应用细胞生物学和功能研究之前,必须从它们中除去污染物。例如,从杂交瘤细胞系收获的抗体制剂常常含有不需要的组分,如由细胞系制备的抗体的高分子量聚集体(HMWA)。这种聚集体的形成通过施用后引起补体激活或过敏性,可以不利地影响产物安全。此外,聚集体形成通过引起产物产量降低、峰加宽和活性丧失可以阻碍制造过程。

[0005] 最常见的蛋白纯化方法以待纯化的蛋白和污染物之间在大小、电荷和可溶性上存在差异为基础。基于这些参数的方案包括亲和层析、离子交换层析、大小排阻层析和疏水作用层析。然而,这些层析方法在分离聚集或多聚种类的抗体中有时存在技术困难。例如,诸如离子交换和疏水作用层析的技术可以诱导聚集体形成,这是由于蛋白浓度增加或洗脱过程中所需缓冲液浓度和/或 pH 的改变。此外,几种情况下,抗体显示出太小的等电点差异,以至于不允许用离子交换层析分离它们。Tarditi, J. Immunol. Methods 599: 13-20 (1992)。大小排阻层析麻烦且引起产物显著稀释,它是大规模、基于效率的制造方法中的障碍。配体从亲和层析柱泄漏也可能发生,它引起洗脱产物不合需要的污染。Steindl, J. Immunol. Methods 235:61-69 (2000)。申请人企图使用阴离子交换层析、阳离子交换层析以及疏水作用层析从抗 GDF-8 抗体制剂中除去 HMWA。然而,所有这些方法基本上不能从抗 GDF-8 抗体制剂中除去 HMWA。

[0006] 羟磷灰石层析是利用不溶的羟基化磷酸钙 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 纯化蛋白的方法,不溶的羟基化磷酸钙形成基质和配体。功能基团由正电荷钙离子(C 位点)对和负电荷磷酸根基团(P 位点)簇组成。羟磷灰石和蛋白之间的相互作用是复杂和多模式的。然而在相互作用的一个方法中,蛋白上的正电荷氨基与负电荷 P 位点结合,且蛋白羧基通过配位络合至 C 位点而相互作用。Shepard, J. of Chromatography 891:93-98 (2000)。

[0007] 结晶羟磷灰石是用于层析的第一种羟磷灰石类型,但是它被结构难点所限。开发

了陶瓷羟磷灰石 (cHA) 层析来克服与结晶羟磷灰石相关的一些困难,如有限的流速。陶瓷羟磷灰石具有高耐用性、蛋白结合力好和可以在比结晶羟磷灰石更高的流速和压力使用。Vola 等人, *BioTechniques* 14:650-655(1993)。

[0008] 羟磷灰石已被用于蛋白、核酸以及抗体的层析分离。在羟磷灰石层析中,柱于低浓度磷酸盐缓冲液中被正常平衡和施加样品,并接着以磷酸盐缓冲液浓度梯度洗脱吸附的蛋白。Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529(2000)。有时浅梯度磷酸钠成功用于洗脱蛋白,而在其它情况下,已经成功使用最高达到 400mM 磷酸钠的浓度梯度。参见例如 Stanker, *J. Immunological Methods* 76:157-169(1985) (10mM 至 30mM 磷酸钠洗脱梯度);Shepard, *J. Chromatography* 891:93-98(2000) (10mM 至 74mM 磷酸钠洗脱梯度);Tarditi, *J. Chromatography* 599:13-20(1992) (10mM 至 350mM 磷酸钠洗脱梯度)。虽然盐如 NaCl 已被掺入结合缓冲液,以使用羟磷灰石层析纯化抗体, Giovannini, R. *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529(2000), 但是不知晓盐如 NaCl 和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 影响羟磷灰石层析中的蛋白洗脱。Karlsson 等人, *Exchange Chromatography, in Protein Purification*, VCH Publishers, Inc. (Janson and Ryden eds., 1989)。

[0009] 在几种情况下,研究者已不能从羟磷灰石选择性洗脱抗体或发现羟磷灰石层析不产生足够纯的产物。Junbauer, *J. Chromatography* 476:257-268(1989);Giovannini, *Biotechnology and Bioengineering* 73:522-529(2000)。申请人失败地企图使用基于现有技术教导的陶瓷羟磷灰石层析和磷酸钠洗脱将高分子量聚集体与抗体制剂分离(图 1)。此外,已知苛刻的洗脱条件当用于企图打破蛋白与基质的紧密结合时破坏蛋白的生物活性。因此,需要从抗体制剂除去杂质如高分子量聚集体的有效方法,所述方法不破坏抗体生物活性。

发明内容

[0010] 申请人意外地发现 NaCl 可以用在新的羟磷灰石层析方法中用于纯化免疫球蛋白和从不同原材料中除去 HMWA(图 2)。因此,本发明涉及从抗体制剂除去高分子量聚集体的方法,其通过使所述制剂接触羟磷灰石树脂和从树脂选择性洗脱抗体来实现。可供选择地,抗体制剂可被缓冲液更换入平衡缓冲液,然后允许其流过羟磷灰石树脂。这些结合/流通羟磷灰石层析方法的组合也可以用来纯化抗体制剂。

[0011] 本发明特征为含有 1 至 20mM 磷酸钠和 0.2 至 2.5M NaCl 的洗脱缓冲液或加样缓冲液,其中洗脱缓冲液或加样缓冲液具有 6.4 至 7.6 的 pH。

[0012] 在结合/流通组合模式中,本发明特征为含有 1 至 20mM 磷酸钠、0.01 至 2.0M NaCl、0 至 200mM 精氨酸和 0 至 200mM HEPES 的平衡缓冲液和洗涤缓冲液,其中平衡缓冲液和洗涤缓冲液具有 6.2 至 8.0 的 pH。

[0013] 在一个实施方案中,纯化的抗体含有小于 5% 的高分子量聚集体。

[0014] 在又一个实施方案中,纯化的抗体含有小于 1% 的高分子量聚集体。

[0015] 在另外的实施方案中,抗体制剂含有至少一个 IgG 抗体。更具体而言,抗体制剂含有选自抗 IL-21 受体、抗 GDF-8、抗 Abeta、抗 CD22、抗 Lewis Y、抗 IL-13 或抗 IL-22 的至少一个抗体。

[0016] 至少一种纯化方法可以与本发明的羟磷灰石层析组合使用。可以使用各种纯化方

法,包括但不限于 A 蛋白层析、亲和层析、疏水作用层析、固定化金属亲和层析、大小排阻层析、渗滤、超滤、病毒除去过滤、阴离子交换层析和 / 或阳离子交换层析。

[0017] 在一个实施方案中,阴离子交换和 A 蛋白层析与陶瓷羟磷灰石层析组合使用。阴离子交换和 A 蛋白层析可以组合使用,例如通过使抗体制剂接触 A 蛋白支持体,允许抗体吸附于支持体,用至少一种 A 蛋白洗涤缓冲液洗涤支持体和吸附的抗体,用至少一种 A 蛋白洗脱缓冲液洗脱吸附的抗体,使制剂接触离子交换支持体,允许抗体流过支持体,用至少一种离子交换洗涤缓冲液洗涤支持体,使离子交换流通物 (flow-through) 接触羟磷灰石树脂,允许流通物吸附于树脂,用至少一种羟磷灰石洗涤缓冲液洗涤树脂和用至少一种羟磷灰石洗脱缓冲液从树脂洗脱纯化的抗体。

[0018] 在又一实施方案中,阴离子交换和 A 蛋白层析可以组合使用,例如通过使制剂接触 A 蛋白支持体,允许抗体吸附于 A 蛋白支持体,用至少一种 A 蛋白洗涤缓冲液洗涤 A 蛋白支持体和吸附的抗体,用至少一种 A 蛋白洗脱缓冲液洗脱吸附的抗体,使 A 蛋白洗脱物接触离子交换支持体,允许抗体流过离子交换支持体,用至少一种离子交换洗涤缓冲液洗涤离子交换支持体,离子交换流通物被更换入包含 1 至 20mM 磷酸钠和 0.2 至 2.5M NaCl 的加样缓冲液,使离子交换流通物接触羟磷灰石树脂,允许抗体流过羟磷灰石树脂和用至少一种羟磷灰石洗涤缓冲液洗涤羟磷灰石树脂。

[0019] 在又一个实施方案中,阴离子交换和 A 蛋白层析与陶瓷羟磷灰石层析组合使用。阴离子交换和 A 蛋白层析可以组合使用,例如通过使抗体制剂接触 A 蛋白支持体,允许抗体吸附于支持体,用至少一种 A 蛋白洗涤缓冲液洗涤支持体和吸附的抗体,用至少一种 A 蛋白洗脱缓冲液洗脱吸附的抗体,使制剂接触离子交换支持体,允许抗体流过支持体,用至少一种离子交换洗涤缓冲液洗涤支持体,使离子交换流通物接触羟磷灰石树脂,允许流通物吸附于树脂,允许 HMWA 比抗体单体更紧密地结合,和当继续加样时,用 HMWA 替换结合的单体,用至少一种羟磷灰石洗涤缓冲液洗涤树脂,和收集替换的抗体单体。

[0020] 本发明另外的目的和优点将在随后的说明书中部分阐述和由说明书本发明将部分显而易见,或可以从本发明的实践中学习。本发明的目的和优点将依靠特别是在所附权利要求中指出的要素和组合来实现和完成。

[0021] 应当理解上述一般说明和下列详细说明仅仅是示范和说明性的,并没有限制要求保护的本发明。

[0022] 并入和组成本说明书一部分的附图连同说明书用来解释本发明的原理。

附图说明

[0023] 图 1 显示了现有技术磷酸盐梯度洗脱不能将 HMWA 和抗 GDF-8 抗体制剂分离。

[0024] 图 2 显示了使用 NaCl 梯度洗脱导致大部分 HMWA 和抗 GDF-8 抗体制剂分离。

[0025] 图 3 显示了使用 cHA 层析将 HMWA 和抗 CD22 抗体制剂分离。

[0026] 图 4 显示了使用 cHA 层析将 HMWA 和抗 Abeta 抗体制剂分离。

具体实施方式

[0027] A. 定义

[0028] 为了可以更容易地理解本发明,首先定义某些术语。另外的定义贯穿详述来阐述。

[0029] 术语“抗体”是指任何免疫球蛋白或其片段,并包括包含抗原结合部位的任何多肽。该术语包括但不限于多克隆的、单克隆的、单特异性的、多特异性的、非特异性的、人源化的、人的、单链的、嵌合的、合成的、重组的、杂合的、突变的、嫁接的和体外产生的抗体。术语“抗体”也包括抗体片段,如 Fab、F(ab')₂、Fv、scFv、Fd、dAb 和保留抗原结合功能的其它抗体片段。一般地,这种片段将包含抗原结合结构域。

[0030] 本发明也可以纯化的抗体包括化学修饰的形式,如通过用 PEG 处理,和包含免疫球蛋白部分的融合蛋白。抗体或其片段可以选自任何已知抗体同型和它们的构象,例如 IgA、IgG、IgD、IgE、IgM 单体、IgA 二聚体、IgA 三聚体或 IgM 五聚体。

[0031] 术语“抗体制剂”是指含有抗体和 / 或不需要的组分的任何组合物,该组分如这种抗体的高分子量聚集体。

[0032] “陶瓷羟磷灰石”或“cHA”是指式 $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ 的不溶羟基化磷酸钙,它已在高温下烧结为球状、大孔陶瓷形式。术语“cHA”包括但不限于 I 型和 II 型陶瓷羟磷灰石。除非具体说明,“cHA”是指任何颗粒大小,包括但不限于 20、40 和 80 μm 。

[0033] 术语“高分子量聚集体”或“HMWA”是指至少两种抗体的结合。可以用任何方法发生所述结合,包括但不限于共价的、非共价的、二硫键或非还原交联。至少两种抗体可以结合相同或不同的抗原。至少两种抗体可以是抗体、抗体片段的形式,或上面“抗体”定义中描述的其它形成。

[0034] 术语“流通模式”是指抗体制剂分离技术,其中制剂中所含的至少一种抗体意欲流过层析树脂或支持体,而至少一种潜在污染物或杂质与层析树脂或支持体结合。流通模式可以用于例如羟磷灰石层析和离子交换层析中。

[0035] “结合模式”指抗体制剂分离技术,其中制剂中所含的至少一种抗体与层析树脂或支持体结合,而至少一种污染物或杂质流过。结合模式可以用于例如羟磷灰石层析和离子交换层析中。

[0036] B. 方法描述

[0037] 本发明提供了使用羟磷灰石层析以结合模式、流通模式或其组合从抗体制剂除去高分子量聚集体 (HMWA) 的方法。本发明在大规模抗体制剂纯化中具有应用。

[0038] 在结合模式中,该方法使用装载着中性 pH 和低离子强度的磷酸盐的羟磷灰石支持体以结合抗体和 HMWA 两者。然后用磷酸盐缓冲液洗涤柱以除去松弛结合的杂质。接下来,使用含有 0.2 至 2.5M NaCl、在弱酸性至弱碱性 pH 的高离子强度磷酸盐缓冲液选择性洗脱抗体。任选随后使用中性 pH 的甚至更高离子强度和高磷酸盐浓度缓冲液从树脂洗掉 HMWA。最后,任选使用氢氧化钠和磷酸钾溶液再生树脂。

[0039] 在流通模式中,抗体制剂被缓冲液更换入含有 0.2 至 2.5M NaCl 的弱酸至弱碱性 pH 的加样缓冲液。然后允许抗体制剂流过羟磷灰石柱,而杂质如 HMWA 与柱结合。任选随后洗涤柱以允许另外的纯化的抗体流过柱。最后,任选解吸 (strip) 柱,然后使用氢氧化钠和磷酸钾溶液再生柱。

[0040] 在结合 / 流通组合模式中,允许抗体制剂流过羟磷灰石柱,其中抗体单体和 HMWA 最初结合。然而,当继续加样时,进来的 HMWA 能够比抗体单体更紧密结合,并因此替换结合的单体。因此,替换的单体流过柱。任选随后洗涤柱以允许另外的替换的抗体流过柱。最后,任选用高盐高磷酸盐溶液解吸该柱,并然后使用氢氧化钠和磷酸钾溶液再生该柱。

[0041] 在本发明的一个实施方案中,纯化的抗体含有小于 5% HMWA,在一个实施方案中,小于 3% HMWA,和在另一个实施方案中,小于 1% HMWA。

[0042] 1. 抗体

[0043] 本发明的抗体制剂可以从很多来源分离,所述来源包括但不限于免疫动物的血清、腹水、杂交瘤或骨髓瘤上清液、来源于培养表达抗体分子的重组细胞系的条件培养基,和从所有抗体产生性细胞的细胞提取物中分离。在本发明的一个实施方案中,来自各种抗体产生性重组细胞系的条件细胞培养基的抗体被纯化。尽管人们可以预期细胞系与细胞系间和各种抗体产物间的一些变异,但是基于在此公开的内容,使在此的发明适应于抗体蛋白和产生细胞系的特定组合是在本领域普通技术人员的范围之内。

[0044] 仅仅为了例证,本发明应用于 IgG 同型和碱性 pI 的几个抗体的纯化。更具体而言,本发明应用于美国临时专利申请号 60/419,964 描述的抗 GDF-8 的单克隆抗体(在下文中称为“Myo-29”)、美国专利申请号 10/428,894 描述的与 CD22 抗原特异性反应的单克隆抗体(在下文中称为“抗 CD22”)和国际申请号 PCT/US01/46587 描述的抗 Abeta 抗原的单克隆抗体(在下文中称为“抗 Abeta”)。上面提及的申请中详述了生产 Myo-29 和 CD22 和 Abeta 抗体的重组系统的构建。

[0045] 2. 羟磷灰石树脂

[0046] 各种羟磷灰石层析树脂是商业上可获得的,和任何可获得形式的材料可以用于本发明的实施。在本发明的一个实施方案中,羟磷灰石是结晶形式。用于本发明的羟磷灰石可以是附聚以形成颗粒和高温下烧结为稳定多孔的陶瓷块的羟磷灰石。

[0047] 羟磷灰石的颗粒大小可以广泛变化,但是一般的颗粒大小范围是直径 1 μm 至 1,000 μm ,和可以是 10 μm 至 100 μm 。在本发明的一个实施方案中,颗粒大小是 20 μm 。在本发明的另一个实施方案中,颗粒大小是 40 μm 。在本发明的又一个实施方案中,颗粒大小是 80 μm 。

[0048] 很多层析支持体可以用于 cHA 柱的制备,最广泛使用的是 I 型和 II 型羟磷灰石。I 型具有高蛋白结合能力和酸性蛋白的较好能力。然而,II 型具有较低的蛋白结合能力,但是具有较好的核酸和某些蛋白的分辨率。II 型材料也对清蛋白具有非常低的亲和力并特别适于很多种和类别的免疫球蛋白的纯化。特定羟磷灰石类型的选择可以由本领域技术人员确定。

[0049] 本发明可以使用疏松的、填充于柱中的或位于连续环形层析仪中的羟磷灰石树脂。在本发明的一个实施方案中,陶瓷羟磷灰石树脂被填充于柱中。柱尺寸的选择可以由本领域技术人员确定。在本发明的一个实施方案中,床高度约 20cm 的至少 0.5cm 的柱直径可以用于小规模纯化。在本发明另外的实施方案中,可以使用约 35cm 至约 60cm 的柱直径。在本发明又一个实施方案中,可以使用 60cm 至 85cm 的柱直径。在本发明的某些实施方案中,陶瓷羟磷灰石树脂在 pH9.0 的 200mM Na_2HPO_4 溶液中的浆液可用于以约 4cm/ 分钟的恒定流速或以重力填充柱。

[0050] 2. 缓冲液组成和加样条件

[0051] 在羟磷灰石树脂接触抗体制剂之前,可能需要调节参数,如 pH、离子强度和温度,和在有些情况下添加不同种类的物质。因此,用给抗体制剂纯化带来必要特征的溶液(例如用于调节 pH、离子强度等,或用于引入去污剂的缓冲液)洗涤羟磷灰石基质来实施它的

平衡是任选步骤。

[0052] 在结合 / 流通组合模式羟磷灰石层析中,用溶液平衡和洗涤羟磷灰石基质,从而给抗体制剂纯化带来必要特征。在本发明一个实施方案中,可以使用含有 0.01 至 2.0M NaCl 的弱酸至弱碱性 pH 的溶液平衡基质。例如,平衡缓冲液可以含有 1 至 20mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 1 至 10mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 2 至 5mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 2mM 磷酸钠,和在另一个实施方案中,可以含有 5mM 磷酸钠。平衡缓冲液可以含有 0.01 至 2.0M NaCl,在一个实施方案中,0.025 至 0.5MNaCl,在另一个实施方案中,0.05M NaCl,和在另一个实施方案中,0.1M NaCl。加样缓冲液的 pH 可以是 6.2 至 8.0 的范围。在一个实施方案中, pH 可以是 6.6 至 7.7,和在另一个实施方案中, pH 可以是 7.3。平衡缓冲液可以含有 0 至 200mM 精氨酸,在另一个实施方案中,它可以含有 120mM 精氨酸,和在另一个实施方案中,它可以含有 100mM 精氨酸。平衡缓冲液可以含有 0 至 200mM HEPES,在另一个实施方案中,它可以含有 20mM HEPES,和在另一个实施方案中,它可以含有 100mM HEPES。

[0053] 在流通模式羟磷灰石层析制备中,抗体制剂也可以被缓冲液更换入适当的缓冲液或加样缓冲液。在本发明的一个实施方案中,抗体制剂可以被缓冲液更换入含有 0.2 至 2.5M NaCl 的弱酸至弱碱性 pH 的加样缓冲液。例如,加样缓冲液可以含有 1 至 20mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 2 至 8mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 3 至 7mM 磷酸钠,和在另一个实施方案中,可以含有 5mM 磷酸钠。加样缓冲液可以含有 0.2 至 2.5M NaCl,在一个实施方案中,0.2 至 1.5M NaCl,在另一个实施方案中,0.3 至 1.0M NaCl,和在另一个实施方案中,350mM NaCl。加样缓冲液的 pH 可以是 6.4 至 7.6 的范围。在一个实施方案中, pH 可以是 6.5 至 7.0,和在另一个实施方案中, pH 可以是 6.8。

[0054] 抗体制剂以结合模式、流通模式或其组合的任一模式接触羟磷灰石树脂,可以在填充床柱、含有固相基质的流化 / 膨胀床柱和 / 或固相基质与溶液混合的简单分批操作中进行某一段时间。

[0055] 在羟磷灰石树脂接触抗体制剂后,任选实施洗涤步骤。然而,在非常高纯度免疫球蛋白并不关键或不需要另外流通抗体的一些情况下,可以省去洗涤步骤,从而节约加工步骤以及洗涤溶液。使用的洗涤缓冲液将取决于羟磷灰石树脂的性质、使用的羟磷灰石层析模式,并因此可以由本领域普通技术人员确定。在流通模式和结合 / 流通组合模式中,任选柱洗涤后获得的纯化的抗体流通物可以与其它纯化的抗体级分合并。

[0056] 在结合模式下,在任选的洗涤步骤后,抗体可以从柱洗脱。为了从柱洗脱抗体,本发明使用含有约 0.2 至 2.5M NaCl 的弱酸至弱碱性 pH 的高离子强度磷酸盐缓冲液。例如,洗脱缓冲液可以含有 1 至 20mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 2 至 8mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,它可以含有 2 至 6mM 磷酸钠,在另一个实施方案中,可以含有 3mM 磷酸钠,和在另一个实施方案中,可以含有 5mM 磷酸钠。洗脱缓冲液可以含有 0.2 至 2.5M NaCl,在一个实施方案中,0.2 至 1.5M NaCl,在另一个实施方案中,0.3 至 1.1M NaCl,在另一个实施方案中,1.0M NaCl,和在另一个实施方案中,0.35MNaCl。洗脱缓冲液的 pH 可以是 6.4 至 7.6 的范围。在一个实施方案中, pH 可以是 6.5 至 7.3,在另一个实施方案中, pH 可以是 7.2,和在另一个实施方案中, pH 可以是 6.8。为从柱以连续梯度或阶式梯度洗脱抗体,洗脱缓冲液可以改变。

[0057] 在结合、流通模式及其组合中,在抗体洗脱或流通之后,可以任选净化固相基质,即解吸和再生。一般有规律地进行这个步骤以使杂质在固相表面上的建立最小化和 / 或对基质进行灭菌以避免微生物对产物的污染。

[0058] 缓冲液组分可以根据本领域普通技术人员知识来调节。表 1、表 2 和表 3 分别提供了结合模式、流通模式和结合 / 流通组合模式的样品缓冲液组成范围和实例。不是所有缓冲液或步骤都是必要的,但仅仅为了例证而提供。例如,可能不必具有两种不同的平衡步骤,和可能不必解吸、再生或保存羟磷灰石树脂。如实施例 11 描述的高通量筛选可以用来有效最优化 cHA 柱层析的缓冲条件。

[0059] 表 1. 结合模式的实例缓冲液组成范围

[0060]

缓冲液	组成范围	实例组成
平衡1	10 mM 至 500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4 至 7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
平衡2	1 至 20 mM 磷酸钠 0 至 200 mM NaCl pH 6.4 至 7.4	5.0 mM 磷酸钠 50 mM NaCl pH 7.2
洗涤	1 至 20 mM 磷酸钠 0 至 200 mM NaCl pH 6.4 至 7.4	5.0 mM 磷酸钠 50 mM NaCl pH 7.2
洗脱	1 至 20 mM 磷酸钠 0.2 至 2.5 M NaCl pH 6.4 至 7.6	5.0 mM 磷酸钠 350 mM NaCl pH 6.8; or 3.0 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 7.2
解吸	10 mM 至 500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4 至 7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
再生	0.5 至 1.0 M 磷酸钾 1.0 M NaOH	0.5 M I 磷酸钾 1.0 M NaOH
保存	10 至 50 mM NaOH	20 mM NaOH

[0061] 表 2. 流通模式的实例缓冲液组成范围

[0062]

缓冲液	组成范围	实例组成
平衡1	10 mM至500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4至7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
平衡2	1至20 mM 磷酸钠 0.2至2.5 M NaCl pH 6.4至7.6	5.0 mM 磷酸钠 350 mM NaCl pH 6.8
加样缓冲液	1至20 mM 磷酸钠 0.2至2.5 M NaCl pH 6.4至7.6	5.0 mM 磷酸钠 350 mM NaCl pH 6.8
洗涤	1至20 mM 磷酸钠 0.2至2.5 M NaCl pH 6.4至7.6	5.0 mM 磷酸钠 350 mM NaCl pH 6.8
解吸	10 mM至500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4至7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
再生	0.5至1.0 M 磷酸钾 1.0 M NaOH	0.5 M 磷酸钾 1.0 M NaOH
保存	10至50 mM NaOH	20 mM NaOH

[0063] 表 3. 结合 / 流通组合模式的实例缓冲液组成范围

[0064]

缓冲液	组成范围	实例组成
平衡1	10 mM至500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4至7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
平衡2	1至20 mM 磷酸钠 0.01至2.0 M NaCl 0至200 mM 精氨酸 0至200 mM HEPES pH 6.2至8.0	2.0 mM 磷酸钠 50 mM NaCl, 100 mM 精氨酸 100 mM HEPES, pH 7.3; 或 5.0 mM 磷酸钠 100 mM NaCl, 120 mM 精氨酸, 20 mM HEPES, pH 7.3
洗涤	1至20 mM 磷酸钠 0.01至2.0 M NaCl 0至200 mM 精氨酸 0至200 mM HEPES pH 6.2至8.0	2.0 mM 磷酸钠 50 mM NaCl, 100 mM 精氨酸 100 mM HEPES, pH 7.3; 或 5.0 mM 磷酸钠 100 mM NaCl, 120 mM 精氨酸, 20 mM HEPES, pH 7.3
解吸	10 mM至500 mM 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.4至7.4	0.3 M 磷酸钠 1.0 M NaCl pH 6.8
再生	0.5至1.0 M 磷酸钾 1.0 M NaOH	0.5 M 磷酸钾 1.0 M NaOH
保存	10至50 mM NaOH	20 mM NaOH

[0065] 在本发明的一个实施方案中, cHA 树脂上的加样可以例如在 $\leq 20\text{mg/ml}$ 的加样挑战 (load challenge) 和加样中 $\leq 40\%$ HMWA 的起始聚集体水平下。在本发明的某些实施方

案中,1.8 至 10.4mg/ml 的加样挑战可以与加样中约 15%的起始聚集体水平使用。

[0066] 在本发明另外的实施方案中,cHA 树脂可以在至少 20mg/ml 的加样挑战和加样中 $\leq 40\%$ HMWA 的起始聚集体水平下加样。在本发明的某些实施方案中,30 至 40mg/ml 的加样挑战可以与加样中约 27%的起始聚集体水平使用。

[0067] 3. 另外的任选步骤

[0068] 尽管已经发现可以单独使用羟磷灰石层析来将单体 IgG 和聚集体分离,如上所述,但是本发明的纯化方法可以与其它蛋白纯化技术组合使用。在本发明的一个实施方案中,期望羟磷灰石步骤之前的一个或多个步骤降低污染物或杂质的加样挑战。在本发明的另一个实施方案中,可能期望羟磷灰石步骤之后的一个或多个纯化步骤以除去另外的污染物或杂质。

[0069] 任选所述 cHA 纯化方法与其它纯化步骤组合,包括但不限于 A 蛋白层析、亲和层析、疏水作用层析、固定化金属亲和层析、大小排阻层析、渗滤、超滤、病毒除去过滤和 / 或离子交换层析。

[0070] 在一个实施方案中,在 cHA 纯化步骤之前,任选用 A 蛋白层析步骤初步纯化收获物培养基。例如,可以有用地使用由与受控多孔玻璃共价偶联的 A 蛋白组成的 PROSEP-ATM(Millipore, 英国)。其它有用的 A 蛋白制剂包括 A 蛋白 Sepharose FAST FLOWTM(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)、TOYOPEARLTM650M A 蛋白 (TosoHaas Co., Philadelphia, PA) 和 MABSELECTM柱 (Amersham Biosciences,Piscataway,NJ)。

[0071] 作为 cHA 纯化前的任选步骤,可以使用离子交换层析。在这个方面,为了形成用于层析的阴离子或阳离子支持体,各种阴离子或阳离子取代基可以附着于基质。阴离子交换取代基包括二乙氨乙基 (DEAE)、三甲氨乙基丙烯酰胺 (TMAE)、四级氨乙基 (QAE) 和季铵类 (Q) 基团。阳离子交换取代基包括羧甲基 (CM)、磺乙基 (SE)、磺丙基 (SP)、磷酸根 (P) 和磺酸根 (S)。纤维素离子交换树脂如 DE23、DE32、DE52、CM-23、CM-32 和 CM-52 可从 Whatman Ltd. Maidstone, Kent, 英国获得。基于 Sephadex 的和交联的离子交换剂也是已知的。例如,DEAE-、QAE-、CM- 和 SP-Sephadex,和 DEAE-、Q-、CM- 和 S-Sepharose,和 Sepharose 都可以从 Amersham Biosciences,Piscataway,NJ 获得。此外,DEAE 和 CM 衍生的乙二醇-异丁烯酸共聚物如 TOYOPEARLTM DEAE-650S 或 M 和 TOYOPEARLTMCM-650S 或 M 可以从 Toso Haas Co., Philadelphia, PA 获得。

[0072] 在本发明的一个实施方案中,离子交换层析可以用于结合模式或流通模式。

[0073] 在某些实施方案中,首先实施 A 蛋白层析步骤,其次实施阴离子交换步骤和第三步实施 cHA 步骤。

[0074] 4. 另外杂质的除去

[0075] 除 HMWA 除去之外,已表明 cHA 层析对从抗体制剂除去其它杂质有用。本发明 cHA 层析方法可以除去的其它杂质包括但不限于来自在以前纯化步骤的 DNA、宿主细胞蛋白、外来病毒和 A 蛋白污染物。

[0076] 在本发明的一个实施方案中,本发明能够从抗体制剂除去 A 蛋白。在本发明的某些实施方案中,最终制剂中存在的 A 蛋白的量可以显著降低,如 300ppm 至小于 1ppm。

[0077] 实施例

[0078] 下列实施例仅为例证目的而提供。

[0079] 实施例 1 :抗 GDF-8 抗体的纯化

[0080] 以下概述的纯化方法是为抗 GDF-8 单克隆抗体 (在此称作“Myo-29”) 开发的。Myo-29 抗体是 IgG1 亚型抗体并具有大约 8.1 的 pI。纯化方法包括三个层析步骤 (A 蛋白亲和、阴离子交换和羟磷灰石)、病毒灭活步骤和超滤 / 渗滤步骤以浓缩和更换产物进入最终缓冲液。所有步骤都在 18 至 25℃ 进行,除了 A 蛋白层析步骤在 2 至 8℃ 运行。

[0081] 纯化方法可以规格化为任何规模。列出的线性流速与柱直径无关,且加样比是每单位体积的质量。A 蛋白层析步骤每批可以循环多次以容纳收获生物反应器中变化量的细胞培养效价。认为每个循环是独立单位操作并保存洗脱库用于下一步骤。A 蛋白步骤具有每升 MabSelect 大约 35 克 Myo-29 的能力。该方法的下步步骤 (例如阴离子交换层析和陶瓷羟磷灰石层析) 被调整为容纳每升阴离子交换树脂大约 15g Myo-29 和每升陶瓷羟磷灰石树脂大约 10g Myo-29。

[0082] 1. 从培养物除去细胞

[0083] Myo-29 抗体在中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中表达并生长在搅拌的 2500L 罐式生物反应器中。为收获培养物流体,使用 ProstaK 微量过滤装置 (Millipore, Billerica, MA) 取出细胞。收集澄清的条件培养基 (CCM) 进行第一个层析步骤 -A 蛋白层析。

[0084] 2. A 蛋白亲和层析纯化步骤

[0085] 用 5 柱体积的平衡缓冲液 (10mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.5) 平衡重组 A 蛋白树脂的 17.7L (30cm 直径 x 25cm 高度) MabSelect 柱。CCM 以 2.5cm/ 分钟的流速和每升树脂 35g Myo-29 的加样挑战应用于柱。柱加样后,用 5 柱体积的高盐洗涤缓冲液 (20mM Tris, 1.0M NaCl, pH 7.5), 然后用 10 柱体积低盐洗涤缓冲液 (10mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.5) 洗涤。通过应用 6 柱体积洗脱缓冲液 (100mM 精氨酸, 50mM NaCl, pH 3.0) 洗脱 Myo-29。然后将洗脱库保持在 3.6±0.5 的 pH 下 1.5±0.5 小时作为预防措施以促进潜在外来病毒污染物的灭活。接着用 pH 8.0 的 2M HEPES 缓冲液中和洗脱库至 pH 7.3, 以防止 Myo-29 的酸不稳定部分的降解。

[0086] 用几个参数监控柱流出物,包括肉眼检查 UV 吸光度和传导率层析谱,和用于加样效价的使用 A 蛋白 HPLC 的产物回收和用于洗脱库浓度的 280nm 吸光度。

[0087] 用 6M 盐酸胍解吸柱,然后用解吸洗涤缓冲液 (10mM Tris, 100mM NaCl, pH 7.5) 洗涤该柱。将柱保存在 16% 乙醇中。

[0088] 3. 阴离子交换层析纯化步骤

[0089] 在 Q SEPHAROSE FF 树脂的 75L 柱 (80cm 直径 X 15cm 长度) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) 上通过阴离子交换层析进一步纯化 A 蛋白柱洗脱物。用 5 柱体积的第一平衡缓冲液 (20mM HEPES, 1000mM NaCl, pH 7.3), 然后用 5 柱体积第二平衡缓冲液 (100mM 精氨酸、50mM NaCl, 100mM HEPES, pH 7.3) 平衡柱。A 蛋白柱洗脱物以 2.5cm/ 分钟的流速和每升树脂 15 克 Myo-29 的加样比应用于平衡的柱。加样后,用 5 柱体积的第二平衡缓冲液洗涤柱。收集阴离子交换柱流通物。

[0090] 用几个参数监控收集的柱流通物,包括肉眼检查 UV 吸光度和传导率层析谱,和使用 280nm 吸光度的产物回收。

[0091] 用解吸缓冲液 (20mM HEPES, 1M NaCl, pH 7.3) 解吸阴离子交换柱和用再生缓冲液 (500mM NaOH, 1M NaCl, pH 13.3) 再生该柱。将柱保存在 0.01M NaOH 中。

[0092] 4. 病毒保留过滤

[0093] 这个任选步骤的目的是除去可能存在于 CHO 细胞培养物中的逆转录病毒样颗粒和通过除去潜在外来病毒污染物提供另外的安全。收集阴离子交换柱流通物并使其通过 35nm Planova 一次性使用的过滤器 (Asahi-Kasei Corp., New York, NY)。通过使阴离子交换柱洗涤缓冲液 (100mM 精氨酸, 50mM NaCl, 100mM HEPES, pH 7.3) 通过该装置来回收组件中的剩余产物。

[0094] 通过与历史性能数据相比的 Planova 库 280nm 吸光度和 SDS-PAGE 分析来估计病毒保留过滤后的产物回收。

[0095] 5. cHA 层析纯化步骤

[0096] 用 40 μ M 颗粒大小的 cHA II 型树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充的羟磷灰石柱 (60cm x 20cm) 进一步纯化病毒被滤过的溶液。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (0.3M 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 平衡柱。用 4 柱体积平衡缓冲液 2 (5mM 磷酸钠, 50mM NaCl, pH 7.2) 进行第二个平衡步骤。部分纯化的培养基于加样缓冲液 1 : 1 (v/v) (10mM 磷酸钠, pH 7.2) 中, 并以 2.5cm/ 分钟的流速加样于树脂上。用 3 柱体积洗涤缓冲液 (5mM 磷酸钠, 50mM NaCl, pH 7.2) 洗涤 cHA 柱。使用 6 柱体积洗脱缓冲液 (5mM 磷酸钠, 350mM NaCl, pH 6.8) 从 cHA 树脂洗脱 Myo-29 抗体。

[0097] 通过肉眼检查 UV 吸光度和传导率层析谱、由 280nm 吸光度确定的产物回收、大小排阻层析 (SEC) 分析测定的 HMWA 的除去和竞争性酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定的 A 蛋白的除去来监控 cHA 纯化步骤。

[0098] 用解吸缓冲液 (0.3M 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸 cHA 柱和用再生缓冲液 (0.5M 磷酸钾, 1.0M NaOH, pH 13.3) 再生该柱。将柱保存在 0.02M NaOH 中。表 4 证明了 cHA 层析从抗体制剂有效地除去了 HMWA 杂质。此外, cHA 层析能够除去其它杂质, 如 A 蛋白。

[0099] 表 4. HMWA 清除率和抗体单体产量

[0100]

样品	HMWA 加样 %	HMWA 峰 %	ProA 加样 (ppm)	ProA 峰
1	14.6	1.0	17	BLOQ*
2	16.4	0.7	20	BLOQ
3	15.1	1.6	23	BLOQ
4	16.0	0.9	13	BLOQ

[0101] *BLOQ = 低于 1ng/ml 的定量限度。

[0102] 6. 超滤 / 渗滤和最终过滤

[0103] 使 cHA 洗脱库通过切向流超滤系统, 其中使用由标称分子量限度为 30,000 的复合再生纤维素膜组成的 PLCK Pellicon 2 盒 (Millipore, Billerica, MA)。这个步骤的目的是将 cHA 产物库浓缩和缓冲液更换入制剂缓冲液。用 50% 蔗糖溶液 (w/v) 掺入 cHA 产物库导致蔗糖浓度至 2%。将 Myo-29 抗体浓缩至大约 20g/L, 然后用大约 ≥ 9 洗涤体积的

制剂缓冲液 (0.01M L- 组氨酸, 2% 蔗糖, pH 6.0) 渗滤。渗滤完成后, 进一步浓缩产物至大约 60g/L⁻¹ 并通过重力下水和向下吹气, 之后用制剂缓冲液冲洗保留物通道而从该装置中回收产物。药物物质中 Myo-29 的浓度目标是 $\geq 35\text{g/L}$ 。

[0104] Myo-29 药物物质最终通过 0.22 微米过滤器过滤, 用制剂缓冲液 (0.01M L- 组氨酸, 2% 蔗糖, pH 6.0) 平衡, 等分试样入瓶中, 然后保存在 -80°C。

[0105] 实施例 2: 使用 I 型树脂 cHA 纯化抗 GDF-8 抗体制剂

[0106] 也成功地使用 40 μM 颗粒大小、填充于 3.1L 柱中的 I 型 cHA 树脂纯化了 Myo-29 抗体。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (0.3M 磷酸钠、1.0M NaCl、pH 6.8) 平衡柱。用 4 柱体积平衡缓冲液 2 (5mM 磷酸钠、50mM NaCl、pH 7.2) 进行第二个平衡步骤。将从阴离子交换纯化步骤部分纯化的介质以 35mg/ml 的加样挑战和 1.5cm/ 分钟的流速加样于树脂上。用 3 柱体积洗涤缓冲液 (5mM 磷酸钠, 50mM NaCl, pH 7.2) 洗涤 cHA 柱。使用 6 柱体积洗脱缓冲液 (3mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 7.2) 从 cHA 树脂洗脱 Myo-29 抗体。

[0107] 用解吸缓冲液 (0.3M 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸 cHA 柱和用再生缓冲液 (0.5M 磷酸钾, 1.0M NaOH, pH 13.3) 再生该柱。将柱保存在 0.02M NaOH 中。

[0108] 通过肉眼检查 UV 吸光度和传导率层析谱、由 280nm 吸光度确定的产物回收、大小排阻层析 (SEC) 分析测定的 HMWA 的除去和竞争性酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定的 A 蛋白的除去来监控 cHA 纯化步骤。如表 5 所示, 使用 I 型树脂的 cHA 纯化能够使第一个循环中 HMWA 百分比从 27% 降低至 0.9%, 和第二个循环中 HMWA 百分比进一步降低至 0.6%。此外, I 型树脂容纳比 I I 型树脂更高的加样挑战, 同时仍产生足够的单体产量。最后, 使用 I 型树脂的 cHA 纯化能够降低 A 蛋白杂质的量。

[0109] 表 5. 使用 I 型树脂的 HMWA 清除率和抗体单体产量

[0110]

样品	HMWA %	单体产量 %	A 蛋白 (ppm)
cHA 加样	27.0	N/A	169
cHA 峰 (#1 循环)	0.9	86.6	BLOQ*
cHA 峰 (#2 循环)	0.6	86.6	BLOQ

[0111] *BLOQ = 低于 1ng/ml 的定量限度

[0112] 实施例 3: 使用 I 型树脂 cHA 纯化抗 CD22 抗体制剂和抗 Abeta 抗体制剂

[0113] 实施例 2 描述的 cHA 纯化方法也能够充分地从抗 CD22 和抗 Abeta 抗体制剂除去 HMWA。使用的方法类似于实施例 2 描述的, 只是除了纯化的抗体单体在 15 柱体积的洗脱缓冲液 (3mM 磷酸钠, 1.5M NaCl, pH 7.2) 中梯度洗脱。

[0114] 如表 6 所证明, 使用 I 型树脂的 cHA 纯化能够使抗 CD22 抗体制剂中的 HMWA 降低至 0.5% 和抗 Abeta 抗体制剂中的 HMWA 降至低于检测极限。此外, cHA 纯化步骤能够从抗体制剂除去 A 蛋白污染物。

[0115] 表 6. 使用 I 型树脂纯化抗 CD22 和抗 Abeta 抗体制剂的 HMWA 清除率和抗体单体产量

[0116]

样品	HMWA%	单体产量%	A 蛋白 (ppm)
抗 CD22 加样	3.7	N/A	30
抗 CD22 峰	0.5	87	BLOQ*
抗 Abeta 加样	1.87	N/A	40
抗 Abeta 峰	0.0	89	BLOQ

[0117] *BLOQ = 低于 1ng/ml 的定量限度

[0118] 实施例 4 : 抗 GDF-8 抗体的流通模式 cHA 纯化

[0119] 也成功地使用流通模式 cHA 纯化方案纯化了 Myo-29 抗体。在 200mM 磷酸氢二钠, pH 9.0 中, 使用 Macro-Prep 陶瓷羟磷灰石 II 型, 40 μ M 颗粒大小树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充 1.6x20cm Vantage 柱 (Millipore, Billerica, MA)。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 和 3 柱体积平衡缓冲液 2 (350mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 平衡柱。Myo-29 抗体制剂被缓冲液更换入含有 350mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8 的加样缓冲液, 然后加样于 cHA 柱上。用洗涤缓冲液 (350mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 洗涤柱, 用解吸缓冲液 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸该柱, 然后用再生缓冲液 (500mM 磷酸钾, 1.0M NaOH, pH 13.3) 再生该柱。所有流速均保持在 2.5 至 3cm/ 分钟。使用 HPLC 系统通过 SEC-HPLC 分析柱流出物。

[0120] 表 7 提供了 Myo-29 回收和从抗体制剂除去 HMWA 的概要。该制剂最初含有 14.4% HMWA (加样), 其使用本发明的 cHA 纯化方法降低为 0.2% HMWA (流通)。

[0121] 表 7. myo-29 回收和 HMWA 的除去

[0122]

样品	Myo-29 回收率%	样品中 HMWA%
加样	N/A	14.4
流通	79.6	0.2
洗涤	12.2	1.9
洗涤后	1.5	5.6
解吸	10.3	84.3

[0123] 实施例 5 : 使用 I 型树脂, 流通模式 cHA 纯化抗 GDF-8 抗体

[0124] 在 200mM 磷酸氢二钠, pH 9.0 中, 使用 Macro-Prep 陶瓷羟磷灰石 I 型, 40 μ M 颗粒大小树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充 1.1x 21cm Vantage 柱 (Millipore, Billerica, MA)。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 和 3 柱体积平衡缓冲液 2 (1.0M NaCl, 3mM 磷酸钠, pH 7.2) 平衡柱。Myo-29 抗体制剂被缓冲液更换入含有 1.0M NaCl, 3mM 磷酸钠, pH 7.2 的加样缓冲液, 然后以 26mg/ml 的加样挑战加样于 cHA 柱上。用

洗涤缓冲液 (1.0M NaCl, 3mM 磷酸钠, pH 7.2) 洗涤柱, 用解吸缓冲液 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸该柱, 然后用 5 柱体积再生缓冲液 (500mM 磷酸钾, 1.0M NaOH, pH 13.3) 再生该柱。加样和洗涤流速保持小于 90cm/ 小时, 且其余纯化过程流速小于 240cm/ 小时。使用 HPLC 系统通过 SEC-HPLC 分析柱流出物。

[0125] 该抗体制剂最初含有 27.2% HMWA (加样), 其降低为 6.1% HMWA (流通)。此外, 抗体单体回收是 72%。

[0126] 实施例 6 : 抗 CD22 抗体制剂的 cHA 纯化

[0127] 也表明陶瓷 HA 层析纯化对纯化抗 CD22 抗体制剂有用。在 200mM 磷酸氢二钠, pH 9.0 中, 使用 Macro-Prep 陶瓷羟磷灰石 II 型, 40 μ M 颗粒大小树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充 1.6x 20cm Vantage 柱 (Millipore, Billerica, MA)。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 和 3 柱体积平衡缓冲液 2 (50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 平衡柱。抗 CD22 抗体制剂被缓冲液更换入 50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8 中, 然后加样于 cHA 柱上。用 3 柱体积洗涤缓冲液 (50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 洗涤柱, 然后用 15 柱体积的 5mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8 对该柱进行梯度洗脱。用解吸缓冲液 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸 cHA 柱, 然后用再生缓冲液 (500mM 磷酸钾, 1.0M NaOH) 再生该柱。所有流速均保持在 2.5 至 3cm/ 分钟。使用 HPLC 系统通过 SEC-HPLC 分析柱流出物。

[0128] 如图 3 所示, cHA 纯化从抗 CD22 抗体制剂成功除去 HMWA。加样中 HMWA 百分比是 1.7%, 而 cHA 洗脱物中 HMWA 百分比是 0.0%。

[0129] 实施例 7 : 抗 Abeta 抗体的 cHA 纯化

[0130] 也表明陶瓷 HA 层析纯化对纯化抗 Abeta 抗体制剂有用。在 200mM 磷酸氢二钠, pH 9.0 中, 使用 Macro-Prep 陶瓷羟磷灰石 II 型, 40 μ M 颗粒大小树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充 1.6x 20cm Vantage 柱 (Millipore)。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 和 5 柱体积平衡缓冲液 2 (50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 平衡柱。抗 Abeta 抗体制剂被缓冲液更换入 50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8, 然后加样于柱上。用 5 柱体积洗涤缓冲液 (50mM NaCl, 5mM 磷酸钠, pH 6.8) 洗涤柱, 然后用 15 柱体积的 5mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8 对该柱进行梯度洗脱。用解吸缓冲液 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸柱, 然后用再生缓冲液 (500mM 磷酸钾, 1.0M NaOH) 再生该柱。所有流速均保持在 2.5 至 3cm/ 分钟。使用 HPLC 系统通过 SEC-HPLC 分析柱流出物。

[0131] 如图 4 所示, cHA 纯化从抗 Abeta 抗体制剂成功除去 HMWA。加样中 HMWA 百分比是 2.6%, 而 cHA 洗脱物中 HMWA 百分比是 0.0%。

[0132] 实施例 8 : 纯化的 Myo-29 抗体活性的评估

[0133] 使用竞争性酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定根据实施例 1 所述方法纯化的抗 GDF-8 抗体 Myo-29 的结合活性。可以修改竞争性 ELISA 以测试其它纯化抗体的结合活性。参见例如 Antibodies : A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.。GDF-8 受体 -ActRII β .Fc (2 μ g/mL) 以 100 μ l/ 孔的体积吸附到 96 孔微量滴定板上。然后板在 2 至 8°C 温育过夜。板用洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Tween 20) 洗涤两次, 并用 4% 牛血清清蛋白 (BSA) 溶液封闭以使非特异性结合最小化。板在室温下温育 1.5 至 3.0 小时并用洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Tween 20) 洗涤两次。

[0134] 将 Myo-29 抗体参照标准在测定稀释剂 (0.5% BSA, 137mM NaCl, 2.7mM KCl) 中连续稀释 4 倍, 产生共 8 个标准点。测试样品含有 A 蛋白层析步骤纯化的 Myo-29 抗体级分以及另外的 cHA 纯化步骤后纯化的级分。也将这些测试样品在测定稀释剂中连续稀释 2 倍, 产生落在标准曲线范围内的 8 个点。将标准样品和测试样品以 50 μ l/孔添加至适当的测定孔中。然后将生物素化竞争剂 - 生物素标记的 GDF-8 (50ng/mL) 以 50 μ l/孔添加至每个孔。在板式摇床上室温下温育板过夜。

[0135] 板用洗涤缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.05% Tween 20) 洗涤四次, 并添加 100 μ l/孔链霉抗生物素蛋白缀合的辣根过氧化物酶 (1 : 5,000 ;Southern Biotech, Birmingham, Alabama) 检测结合的生物素标记的 GDF-8。板在板式摇床上室温下温育 50 至 70 分钟, 然后通过添加 100 μ l/孔 3,3',5,5' - 四甲联苯胺 (BioFX, Owings Mills, MD) 显色。在 450nm 下用 ELISA 板读出器 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) 测定每孔的吸光度。测试样品中有活性的 Myo-29 的量与测定中产生的信号成反比。通过添 100 μ l/孔 0.18M H₂SO₄来终止反应。

[0136] 能够结合测试样品中生物素化的 GDF-8 的 Myo-29 浓度从使用 4 参数逻辑方程拟合的标准曲线内推得来。活性蛋白浓度 (通过 ELISA 测定的) 除以总蛋白浓度 (通过 A₂₈₀ 测定的) 和用 100 乘这个比率来计算测试样品的生物活性值 (活性蛋白%)。如果相同样品在分开批次中纯化, 那么计算生物活性平均值。表 8 报道了生物活性值。

[0137] 表 8. 抗 GDF-8 抗体结合活性 (活性蛋白%)

[0138]

样品	A 蛋白纯化后	cHA 纯化后
1	88	108
2	86	104
3	94	108

[0139] 如表 8 证明的, 在用实施例 1 所述方法纯化后, Myo-29 保持了它结合 GDF-8 的能力。来自 A 蛋白纯化的峰洗脱液级分中的纯化的 Myo-29 的结合活性稍低。然而, 如实施例 1 所述的另外 cHA 纯化步骤后, 结合活性超过参照 Myo-29 抗体。

[0140] 实施例 9 : 抗 GDF-8 抗体的结合 / 流通组合模式 cHA 纯化

[0141] 也表明结合 / 流通组合模式的陶瓷 HA 层析纯化对纯化抗 GDF-8 抗体制剂有用。下面详述的实验在 **ÄKTA** FPLC 系统 (General Electric) 上运行。在 200mM 磷酸氢二钠, pH 9.0 中, 使用 Macro-Prep 陶瓷羟磷灰 II 型, 40 μ m 颗粒大小树脂 (BioRad, Hercules, CA) 填充 1.1x21cm Vantage 柱 (Millipore)。用 3 柱体积平衡缓冲液 1 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 和 5 柱体积平衡缓冲液 2 (50mM NaCl, 2.0mM 磷酸钠, 100mM 精氨酸, 100mM HEPES, pH 7.3) 平衡柱。抗 GDF-8 抗体制剂 20mg/ml 的加样挑战加样于柱上。用平衡缓冲液 2 洗涤柱, 用解吸缓冲液 (300mM 磷酸钠, 1.0M NaCl, pH 6.8) 解吸该柱, 然后用再生缓冲液 (500mM 磷酸钾, 1.0M NaOH, pH 13.3) 再生该柱。加样和洗涤的流速是 1.5cm/分钟。其余纯化步骤的流速保持在 2.5 至 3.0cm/分钟。使用 HPLC 系统通过 SEC-HPLC 分析柱流出物。

[0142] 结果证明结合/流通组合模式中 cHA II 型树脂的操作从抗体制剂有效除去 HMWA。该制剂最初含有 27% HMWA (加样), 其使用本发明的 cHA 纯化方法降低为 1.1% HMWA (流通)。

[0143] 实施例 10: 使用 I 型树脂, 结合/流通组合模式 cHA 纯化抗 GDF-8 抗体

[0144] 使用 I 型 cHA 树脂代替 II 型 cHA 树脂重复实施例 9 描述的方法。缓冲条件与实施例 9 中使用的相同, 只是除了平衡缓冲液 2, 其由 5.0mM 磷酸钠, 100mM NaCl, 120mM 精氨酸, 20mM HEPES, pH 7.3 组成。

[0145] 如表 9 所示, 结合/流通组合模式中 I 型 cHA 树脂的操作从抗体制剂有效除去 HMWA, 同时保持抗体单体产量。此外, 结合/流通组合模式有效除去 A 蛋白杂质。最后, I 型 cHA 树脂允许 55mg/ml 的增加的加样挑战。

[0146] 表 9. 结合/流通组合模式操作的 I 型 cHA 树脂的 HMWA 清除率和抗体单体产量

[0147]	样品		HMWA %	单体产量 %	A 蛋白 (ppm)
	运行 1	加样	27.0	NA	236
		峰	0.9	75	3.3
	运行 2	加样	27.2	NA	---
		峰	0.7	78	---

[0148] 实施例 11: cHA 缓冲条件的高通量筛选

[0149] 进行高通量筛选以最优用于使用 cHA I 型树脂纯化 Myo-029 抗体制剂的缓冲条件。筛选改变了磷酸钠、氯化钠、精氨酸和 I 型 cHA 树脂上 Myo-29 的水平, 并检查了 Myo-029 和高分子量聚集体 (HMWA) 与树脂结合的程度。

[0150] 将 I 型 cHA 树脂 (50 μ L) 添加至 96 孔滤板的每孔中。表 10-12 中标记为 A1、A2...H11、H12 的每孔在由 20mM HEPES, pH 7.2 和磷酸盐 (表 10)、氯化钠 (表 11) 和精氨酸 (表 12) 的独特组合制成的平衡缓冲液中进行平衡。

[0151] 表 10. 每孔中的磷酸盐水平

[0152]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
B	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
C	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
D	1mM	1mM	1mM	6mM	5mM	4mM	1mM	1mM	1mM	3mM	2mM	1mM
E	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
F	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM

G	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM
H	2mM	3mM	4mM	8mM	10mM	16mM	2mM	3mM	4mM	5mM	6mM	8mM

[0153] 表 11. 每孔中的 NaCl 水平

[0154]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
B	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
C	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1, 250mM	1, 750mM	2, 500mM	600mM	800mM	1, 000mM
D	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1, 250mM	1, 750mM	2, 500mM	600mM	800mM	1, 000mM
E	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
F	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	25mM	750mM	625mM	500mM	500mM	400mM	300mM
G	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1, 250mM	1, 750mM	2, 500mM	600mM	800mM	1, 000mM
H	50mM	100mM	200mM	50mM	100mM	200mM	1, 250mM	1, 750mM	2, 500mM	600mM	800mM	1, 000mM

[0155] 表 12. 每孔中的精氨酸水平

[0156]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
B	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
C	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
D	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
E	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
F	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM
G	350mM	300mM	200mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	12mM	75mM	50mM	25mM
H	450mM	500mM	600mM	40mM	120mM	200mM	40mM	120mM	200mM	125mM	150mM	300mM

[0157] 将独特的平衡缓冲液添加至每孔后,将 Myo-029 和聚集体的混合物添加至每孔。加样挑战中的聚集体水平是 25%。缓冲液成分保持在与平衡过程中相同的水平。将材料振荡 20 分钟,允许达到平衡。从滤板的每孔除去上清液。进行添加抗体制剂的另一个阶段,和振荡板,并除去上清液。进行最多七个阶段。分析每个阶段尚未结合的蛋白以测定总蛋白浓度(通过 A280nm 的吸光度)。通过大小排阻 HPLC 测量单体和聚集体的量。聚集体的任何减少都表明有助于纯化的条件。表 13 和 14 显示了前四个阶段的库中每孔的聚集体和单体的百分比。

[0158] 表 13. 聚集体水平 (%)

[0159]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	8%	6%	3%	4%	7%	16%	3%	3%	3%	5%	3%	3%
B	12%	15%	17%	3%	3%	5%	3%	4%	4%	6%	5%	5%
C	7%	6%	3%	4%	4%	3%	5%	4%	4%	6%	6%	4%
D	13%	14%	14%	6%	4%	7%	5%	6%	4%	8%	8%	7%
E	11%	10%	6%	4%	19%	11%	5%	6%	7%	9%	8%	6%
F	15%	19%	20%	4%	3%	10%	6%	8%	10%	10%	10%	17%
G	10%	9%	6%	6%	3%	7%	8%	14%	17%	10%	16%	22%
H	16%	18%	20%	4%	5%	17%	9%	15%	17%	12%	17%	18%

[0160] 表 14. 单体回收 (%)

[0161]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	51%	44%	24%	3%	3%	2%	43%	34%	25%	53%	32%	11%
B	64%	70%	78%	4%	24%	43%	42%	40%	38%	57%	42%	44%
C	49%	43%	27%	4%	6%	23%	60%	62%	62%	58%	60%	48%
D	65%	68%	75%	5%	35%	54%	61%	64%	64%	63%	63%	62%
E	61%	58%	44%	3%	3%	5%	58%	62%	64%	66%	65%	63%
F	70%	76%	88%	5%	33%	63%	59%	63%	68%	67%	68%	74%
G	57%	57%	50%	4%	7%	65%	72%	82%	85%	70%	80%	83%
H	71%	75%	85%	5%	48%	75%	69%	82%	88%	71%	80%	87%

[0162] 高通量筛选能够定性预测柱纯化方案中单体回收和 HMWA 的除去。在用 cHA I 型树脂填充的柱上测试例如,孔 C8 的条件 (20mM HEPES, 1mM 磷酸盐, 1750mM NaCl 和 12mM 精氨酸, pH 7.2)。柱纯化后,聚集体水平降至 2.5% 且单体产量是 72%。也在用 cHA-I 型树脂填充的柱上测试孔 D5 的条件 (20mM HEPES, 5mM 磷酸盐, 100mM NaCl 和 120mM 精氨酸, pH 7.2)。柱纯化后,聚集体水平降至 0.7% 且单体产量是 73%。最后,在用 cHA-1 树脂填充的柱上测试等同于孔 C3 的条件 (100mM HEPES, 1mM 磷酸盐, 120mM NaCl 和 200mM 精氨酸, pH 7.2, 其中高水平 HEPES 促成类似于 NaCl 的离子强度)。纯化柱后,聚集体水平降至 4%, 单体回收为 69%。这些结果证明高通量筛选低估了由单体回收和 HMWA 的除去所测量的柱性能。然而,高通量筛选能够定性预测产量和纯度。

[0163] 在此引用的所有参考文献的全部内容在此并入作为参考,且为了所有目的,达到如同为了所有目的,将每个单独的出版物或专利或专利申请的全部内容具体和单独地在此并入作为参考的程度。在并入作为参考的出版物和专利或专利申请与说明书中含有的公开内容相矛盾的方面来说,说明书意欲代替和 / 或优先于这种矛盾材料。

[0164] 说明书和权利要求中使用的表达成分的量、反应条件等的数字被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。因此,除非相反指出,说明书和所附权利要求中阐述的数字参数是近似值,且可以依赖由本发明寻求获得的期望性质而变化。至少,且不是企图限制相当于权利要求范围的学说应用,应当在考虑到有效数字的数目和通常的四舍五入方法的情况下解释每个数字参数。

[0165] 如将对本领域技术人员显而易见的,可以进行本发明的很多修改和变化,而不背离它的精神和范围。在此描述的具体实施方案仅仅是作为举例提供的且不意味着以任何方式限制。意图是说明书和实施例被认为仅仅是示范性的,本发明的真实范围和精神由下列权利要求指出。

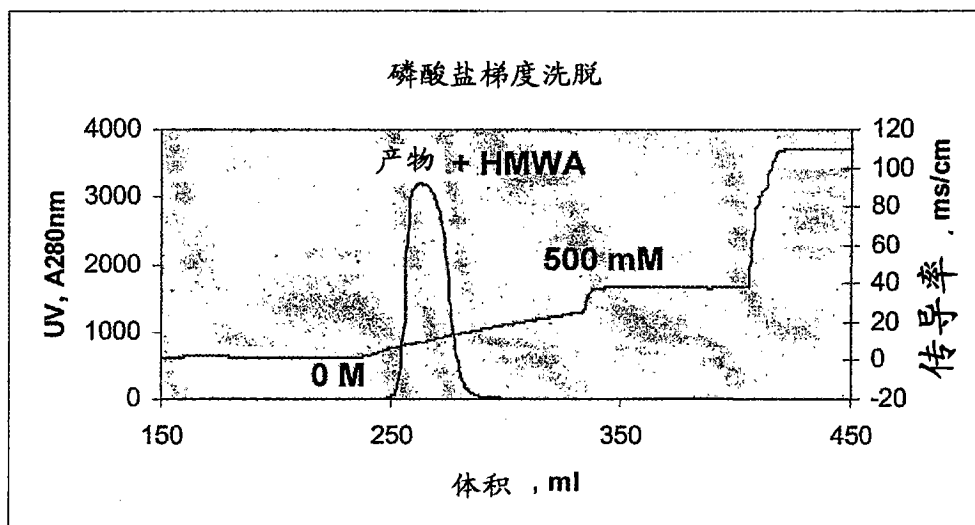


图 1

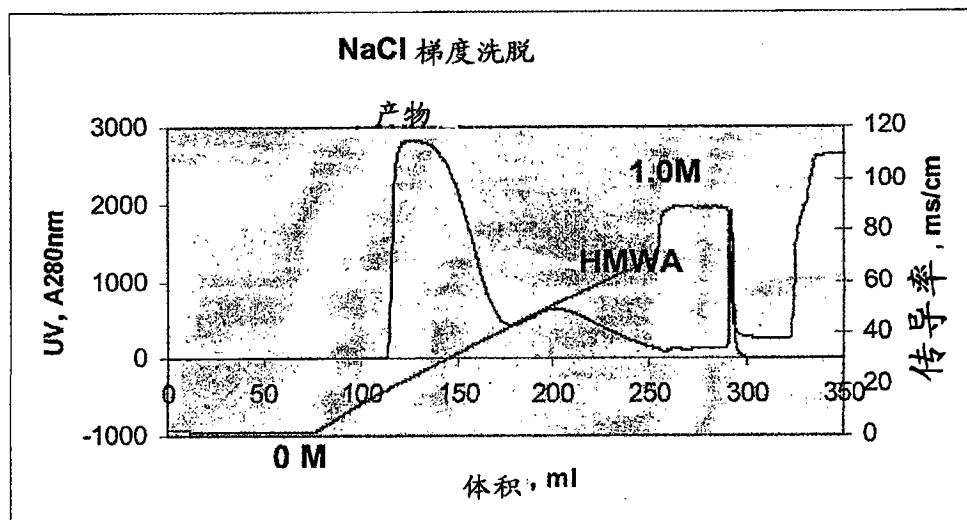


图 2

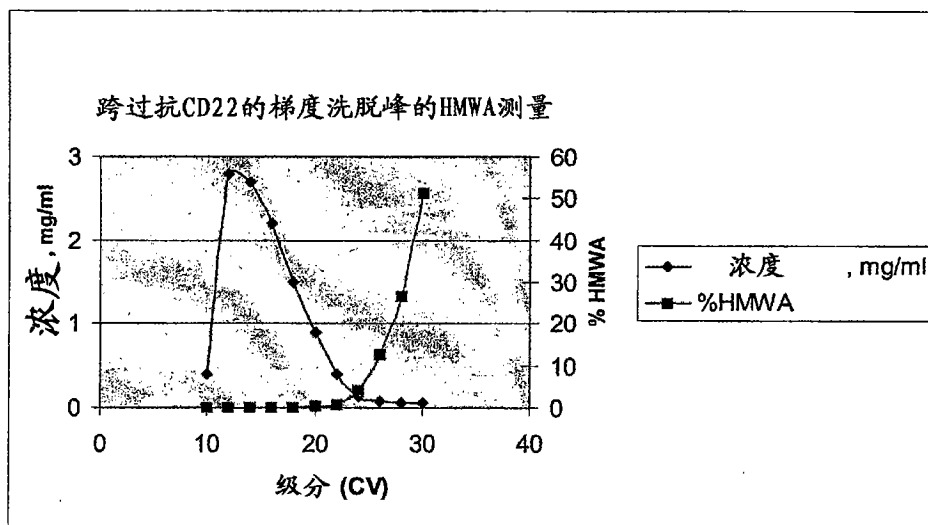


图 3

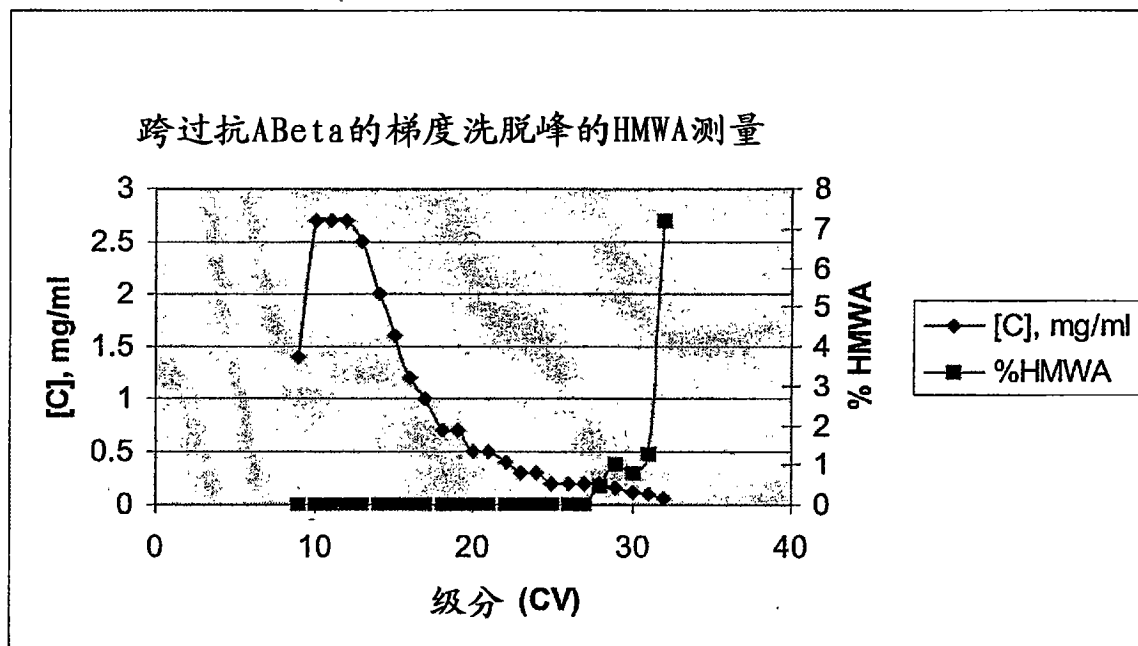


图 4