República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112021001194-3 A2

(22) Data do Depósito: 24/07/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 27/04/2021

(54) Título: MÉTODOS PARA PRODUZIR UM CONJUGADO ANTICORPO-FÁRMACO E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int. Cl.: C07K 16/32; A61K 9/08; A61K 47/18; A61K 47/22; A61K 47/26; (...).

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2018 JP 2018-139633.

(71) Depositante(es): DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED.

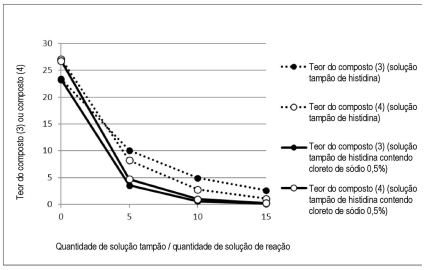
(72) Inventor(es): TATSUYA YAMAGUCHI; KENJI SAKURATANI.

(86) Pedido PCT: PCT JP2019028949 de 24/07/2019

(87) Publicação PCT: WO 2020/022363 de 30/01/2020

(85) Data da Fase Nacional: 22/01/2021

(57) Resumo: A presente invenção é: um método para fabricar um conjugado anticorpo-fármaco, no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1) (A na fórmula representando uma posição de aglutinação de anticorpo) e um anticorpo são ligados por uma ligação tioéter, o método de fabricação distinguido pelo fato de que inclui (i) uma etapa para reduzir um anticorpo com um agente redutor, (ii) uma etapa para reagir um intermediário de conector de fármaco com o anticorpo reduzido na etapa (i), (iii) uma etapa para adicionar um reagente com um grupo tiol e reagir com o intermediário de conector de fármaco residual da etapa (ii), e (iv) uma etapa para então remover um subproduto derivado do intermediário de conector de fármaco através de ultrafiltração usando uma solução tampão contendo um sal compreendendo um ácido forte e uma base forte; e um método para fabricar uma composição farmacêutica incluindo o conjugado anticorpo-fármaco supramencionado.



MÉTODOS PARA PRODUZIR UM CONJUGADO ANTICORPO-FÁRMACO E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

Campo técnico

[001] A presente invenção se refere a um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, que reduz a geração de agregados e compreende uma etapa de purificação para remover efetivamente os subprodutos, e um método para produzir uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

Fundamentos da Técnica

[002] Um conjugado anticorpo-fármaco (ADC) tendo um fármaco com citotoxicidade conjugado a um anticorpo que se liga a um antígeno expresso na superfície das células cancerosas e também é capaz de internalização celular, pode entregar o fármaco seletivamente às células cancerosas e, portanto, espera-se causar o acúmulo do fármaco dentro das células cancerosas e matar as células cancerosas (referências não patentes 1 a 5).

[003] Os exemplos nas referências de patentes 1 a 9 descrevem métodos para produzir um conjugado anticorpo-fármaco. Cada um desses métodos de produção inclui uma etapa de purificação envolvendo cromatografia, como cromatografia hidrofóbica e cromatografia de filtração em gel.

[004] Como tal conjugado anticorpo-fármaco, um conjugado anticorpo-fármaco compreendendo um anticorpo e um derivado de exatecano, que é um inibidor da topoisomerase I, como seus componentes são conhecidos (Referências de Patente 10 a 14, Referências Não Patentes 6 a 9). Como esses conjugados anticorpo-fármaco exercem um efeito antitumoral particularmente superior e são seguros, eles estão atualmente em estudos clínicos.

[005] As Referências de Patente 10 a 14 descrevem métodos para conjugar um anticorpo e um intermediário conector de fármaco como métodos para produzir o conjugado anticorpo-fármaco acima e métodos para purificar o conjugado anticorpo-fármaco obtido.

[006] Os exemplos nas Referências de Patente 11 a 13 descrevem que o conjugado anticorpo-fármaco acima foi purificado por ultrafiltração com uma solução tampão de acetato contendo sorbitol. A Referência de Patente 14 descreve que o conjugado anticorpo-fármaco acima pode ser purificado por ultrafiltração com uma solução tampão de acetato, uma solução tampão de histidina ou uma solução tampão de fosfato. No entanto, o desenvolvimento de um método industrialmente melhor para a produção de um conjugado anticorpo-fármaco ainda é necessário.

Lista de citações

Literatura de patentes

[007] Referências de Patentes 1: Publicação Internacional N° 2002/098883

Referências de Patentes 2: Publicação Internacional N° 2005/037992

Referências de Patentes 3: Publicação Internacional N° 2005/084390

Referências de Patentes 4: Publicação Internacional N° 2006/086733

Referências de Patentes 5: Publicação Internacional N° 2007/024536

Referências de Patentes 6: Publicação Internacional N° 2010/141566

Referências de Patentes 7: Publicação Internacional N° 2011/039724

Referências de Patentes 8: Publicação Internacional N°

2012/135517

Referências de Patentes 9: Publicação Internacional N° 2015/104359

Referências de Patentes 10: Publicação Internacional N° 2014/057687

Referências de Patentes 11: Publicação Internacional N° 2015/098099

Referências de Patentes 12: Publicação Internacional N° 2015/115091

Referências de Patentes 13: Publicação Internacional N° 2015/155998

Referências de Patentes 14: Publicação Internacional N° 2017/002776

Literatura não patentes

[008] Referências não patentes 1: Ducry, L., et al., Bioconjugate Chem. (2010) 21, 5-13.

[009] Referências não patentes 2: Alley, S. C., et al., Current Opinion in Chemical Biology (2010) 14, 529-537.

[0010] Referências não patentes 3: Damle N. K. Expert Opin. Biol. Ther. (2004) 4, 1445-1452.

[0011] Referências não patentes 4: Senter P. D., et al., Nature Biotechnology (2012) 30 631-637.

[0012] Referências não patentes 5: Howard A. et al., J Clin Oncol 29: 398-405.

[0013] Referências não patentes 6: Ogitani Y. et al., Clinical Cancer Research (2016) 22(20), 5097-5108.

[0014] Referências não patentes 7: Ogitani Y. et al., Cancer Science (2016) 107, 1039-1046.

[0015] Referências não patentes 8: Doi T, et al., Lancet Oncol 2017;

18: 1512-22.

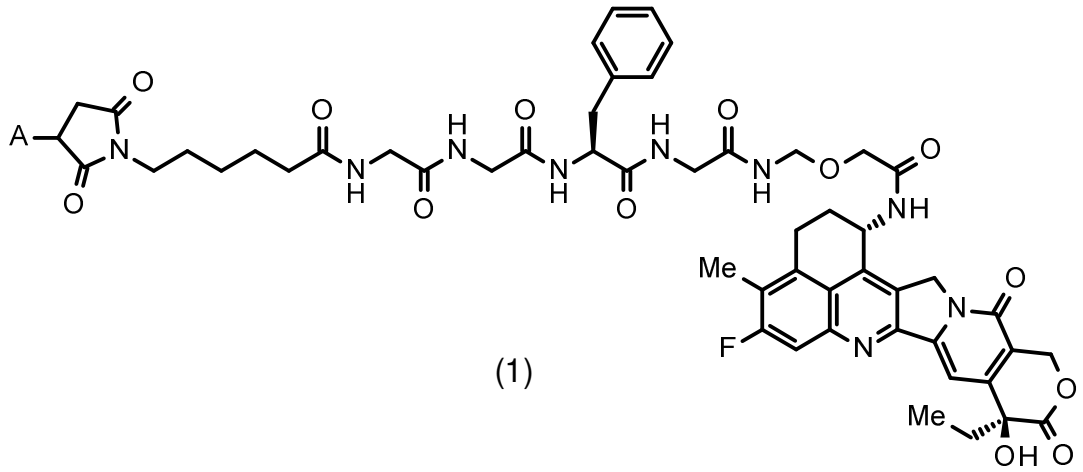
[0016] Referências não patentes 9: Takegawa N, et al., Int. J. Cancer: 141, 1682-1689 (2017).

Sumário da invenção

Problema técnico

[0017] O conjugado anticorpo-fármaco de acordo com o método para produzir da presente invenção é um conjugado anticorpo-fármaco, em que um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 1]



(1)

em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

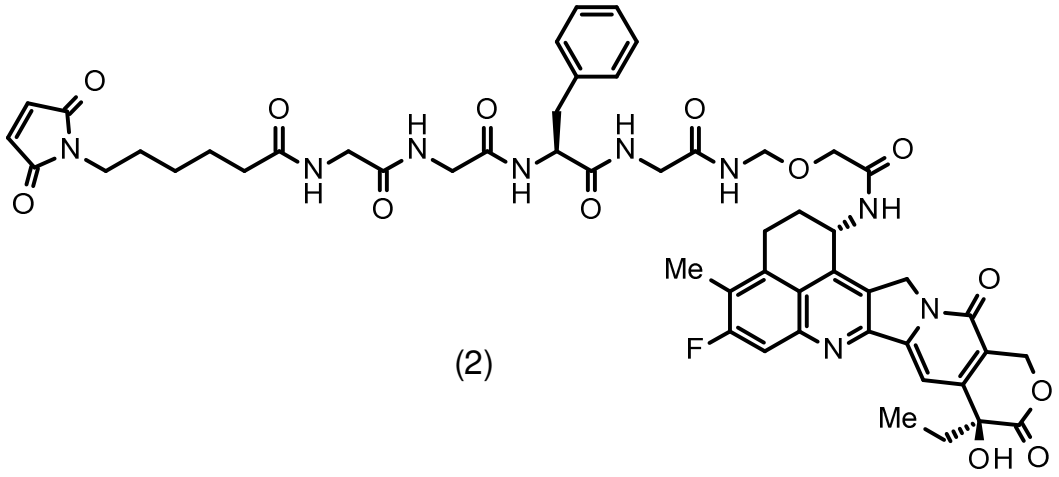
é conjugado a um anticorpo por meio de uma ligação de tioéter.

[0018] Exemplos de métodos para produzir tal conjugado anticorpo-fármaco em um método que compreende as etapas de:

(i) reduzir um anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 2]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii).

[0019] Para produzir o conjugado anticorpo-fármaco, em particular, um conjugado anticorpo-fármaco tendo um número médio de unidades do conector de ligante conjugado por molécula de anticorpo está na faixa de 7 a 8, uma grande quantidade do composto representado pela fórmula (2) é necessário, e isso pode levar à geração de uma grande quantidade de subprodutos derivados do composto representado pela fórmula (2). A supressão da geração de agregados é exigida na produção de um conjugado anticorpo-fármaco, e o exame das condições de reação/purificação é necessário, considerando as propriedades físicas exclusivas para cada uma da porção de anticorpo e porção de conector de fármaco.

[0020] Um objetivo da presente invenção é prover um método industrialmente excelente para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, que compreende uma etapa de purificação para remover efetivamente os subprodutos derivados do composto representado pela fórmula (2) e suprime a geração de agregados. Outro objetivo da presente invenção é estabelecer um método industrialmente excelente para produzir uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

Solução para o problema

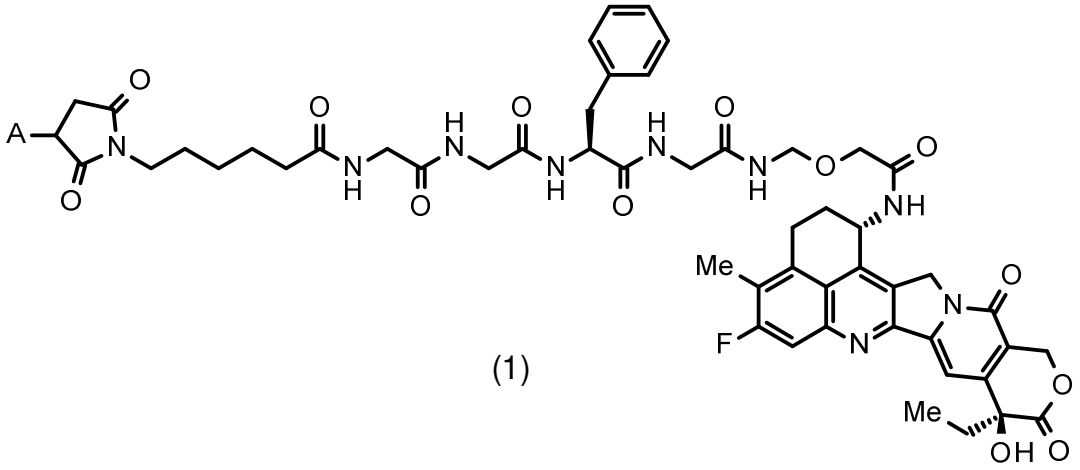
[0021] Como resultado de estudos diligentes a fim de resolver os problemas acima, os presentes inventores verificaram que os subprodutos derivados do composto representado pela fórmula (2) podem ser efetivamente removidos por meio de ultrafiltração com uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte na etapa de purificação de um conjugado anticorpo-fármaco. Além disso, os presentes inventores encontraram condições de reação/purificação que podem suprimir a geração de agregados nas etapas de produção de um conjugado anticorpo-fármaco e purificação do conjugado anticorpo-fármaco. Essas verificações proveram com sucesso um método industrialmente excelente para produzir uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[0022] Assim, a presente invenção provê os seguintes [1] a [410].

[0023] [1] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual

um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 3]



(1)

em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

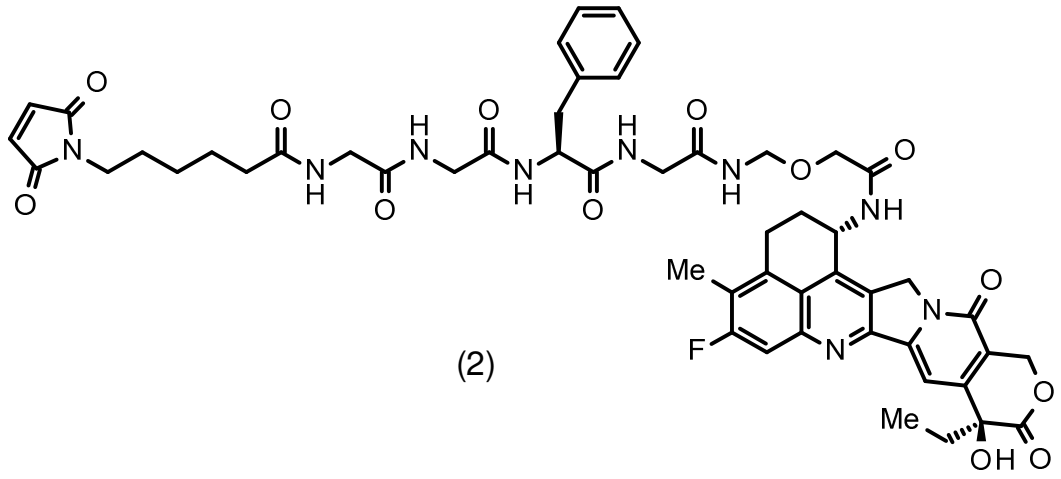
é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter,

em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 4]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

[0024] [2] O método para produzir de acordo com [1], em que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

[0025] [3] O método para produzir de acordo com [1], em que o agente redutor usado na etapa (i) é cloreto de tris(2-carboxietil)fosfina.

[0026] [4] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [3], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[0027] [5] O método para produzir de acordo com [4], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[0028] [6] O método para produzir de acordo com [4] ou [5], em que

a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[0029] [7] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [6], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[0030] [8] O método para produzir de acordo com [7], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[0031] [9] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [4] a [8], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[0032] O método para produzir de acordo com [9], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[0033] O método para produzir de acordo com [9], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[0034] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [11], em que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína.

[0035] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [12], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[0036] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [12], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[0037] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [12], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[0038] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [12], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[0039] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [12], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[0040] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [17], em que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de

histidina.

[0041] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [18], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0042] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [18], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0043] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [18], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0044] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [18], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0045] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [22], em que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

[0046] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [23], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

[0047] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[0048] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[0049] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da

solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[0050] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[0051] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[0052] O método para produzir de acordo com [24], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[0053] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [24] a [30], em que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

[0054] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [31], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[0055] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [31], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[0056] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [33], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[0057] O método para produzir de acordo com [34], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[0058] O método para produzir de acordo com [34], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1

e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[0059] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [33], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[0060] O método para produzir de acordo com [37], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[0061] O método para produzir de acordo com [38], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[0062] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [33], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[0063] O método para produzir de acordo com [40], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[0064] O método para produzir de acordo com [41], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[0065] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [33], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[0066] O método para produzir de acordo com [43], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em

uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[0067] O método para produzir de acordo com [44], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[0068] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [1] a [45], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[0069] O método para produzir de acordo com [46], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[0070] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [1] a [47], e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[0071] O método para produzir de acordo com [48], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[0072] O método para produzir de acordo com [48] ou [49], em que o

excipiente é sacarose.

[0073] O método para produzir de acordo com [48] ou [49], em que o excipiente é trealose.

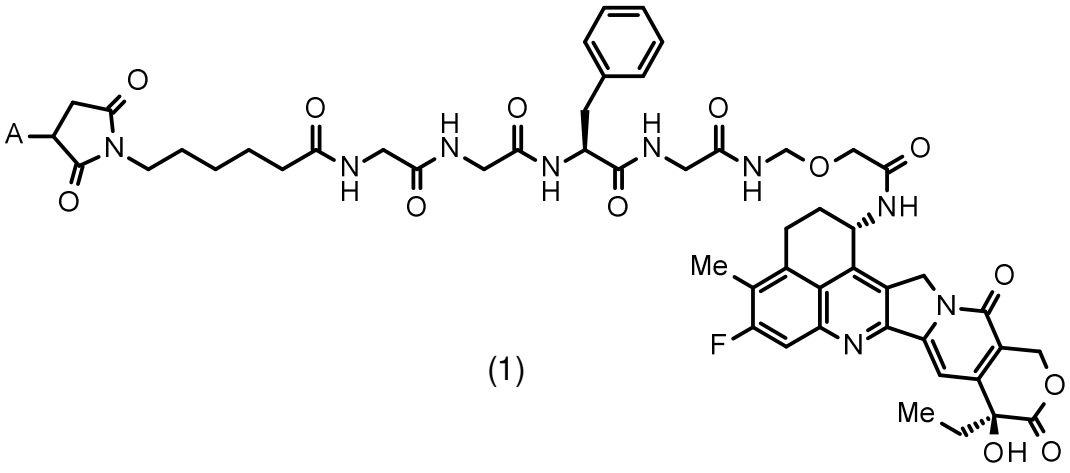
[0074] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [48] a [51], e depois realizar a etapa de (x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[0075] O método para produzir de acordo com [52], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[0076] O método para produzir de acordo com [52], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[0077] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 5]



(1)

em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter,

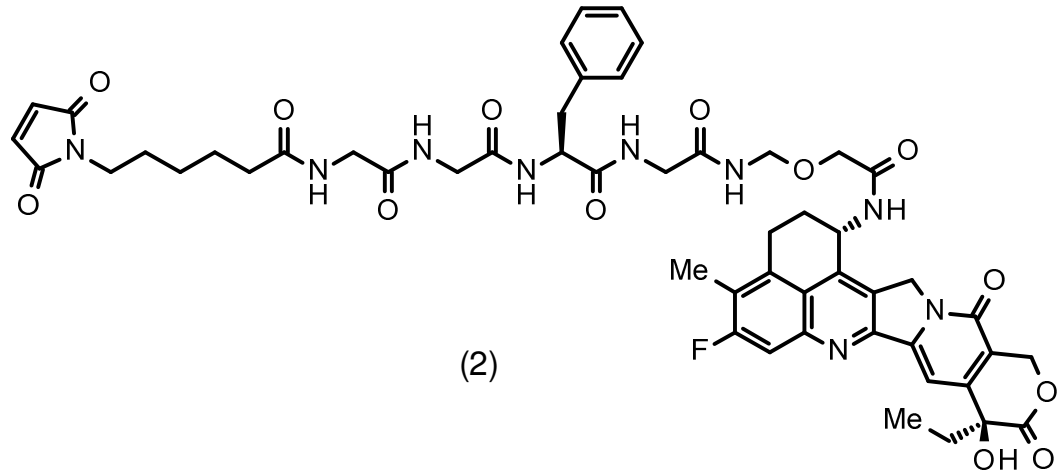
em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-

carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 6]

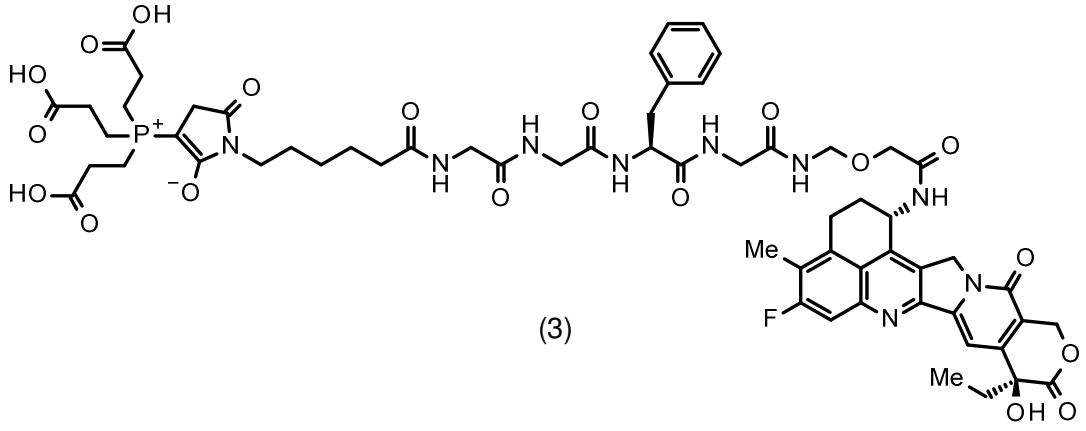


(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar N-acetilcisteína para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois (iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

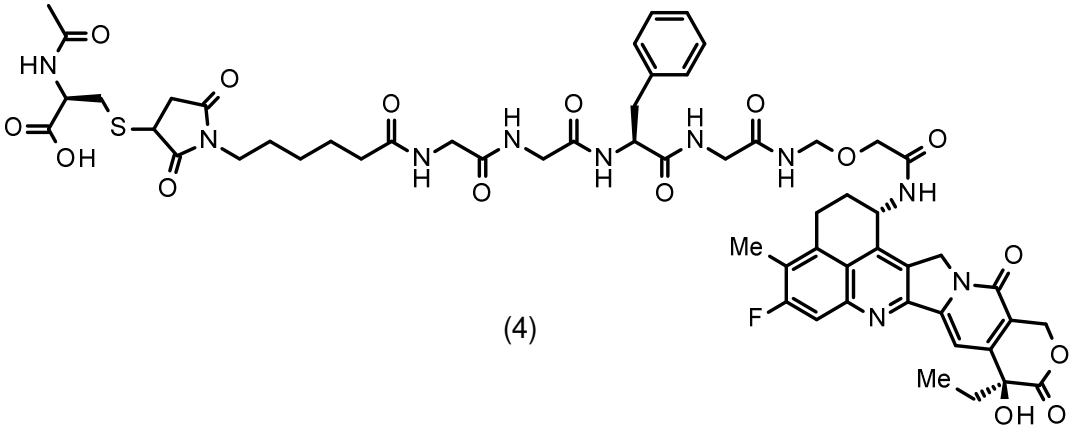
[Fórmula Química 7]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 8]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

[0078] O método para produzir de acordo com [55], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[0079] O método para produzir de acordo com [56], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[0080] O método para produzir de acordo com [56] ou [57], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[0081] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [58], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[0082] O método para produzir de acordo com [59], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[0083] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [56] a [60], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[0084] O método para produzir de acordo com [61], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[0085] O método para produzir de acordo com [61], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[0086] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [63], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[0087] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [63], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[0088] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [63], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[0089] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [63], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[0090] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [63], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[0091] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [68], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0092] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [68], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0093] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [68], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0094] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [68], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[0095] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [72], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

[0096] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[0097] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[0098] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[0099] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00100] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00101] O método para produzir de acordo com [73], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00102] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [79], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00103] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [79], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00104] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [81], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00105] O método para produzir de acordo com [82], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[00106] O método para produzir de acordo com [82], em que o

anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00107] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [81], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00108] O método para produzir de acordo com [85], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00109] O método para produzir de acordo com [86], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00110] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [81], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00111] O método para produzir de acordo com [88], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00112] O método para produzir de acordo com [89], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00113] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [81], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00114] O método para produzir de acordo com [91], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que

consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00115] O método para produzir de acordo com [92], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00116] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [55] a [93], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00117] O método para produzir de acordo com [94], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00118] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [55] a [95], e depois realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também realizar a etapa de (ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00119] O método para produzir de acordo com [96], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00120] O método para produzir de acordo com [96] ou [97], em que o

excipiente é sacarose.

[00121] O método para produzir de acordo com [96] ou [97], em que o excipiente é trealose.

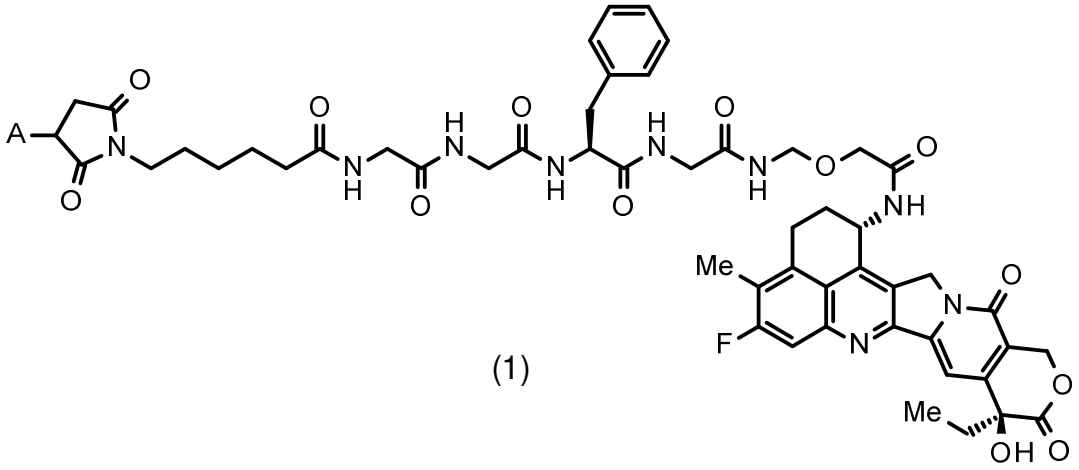
[00122] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [96] a [99], e depois realizar a etapa de (x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00123] O método para produzir de acordo com [100], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00124] O método para produzir de acordo com [100], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00125] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 9]



(1)

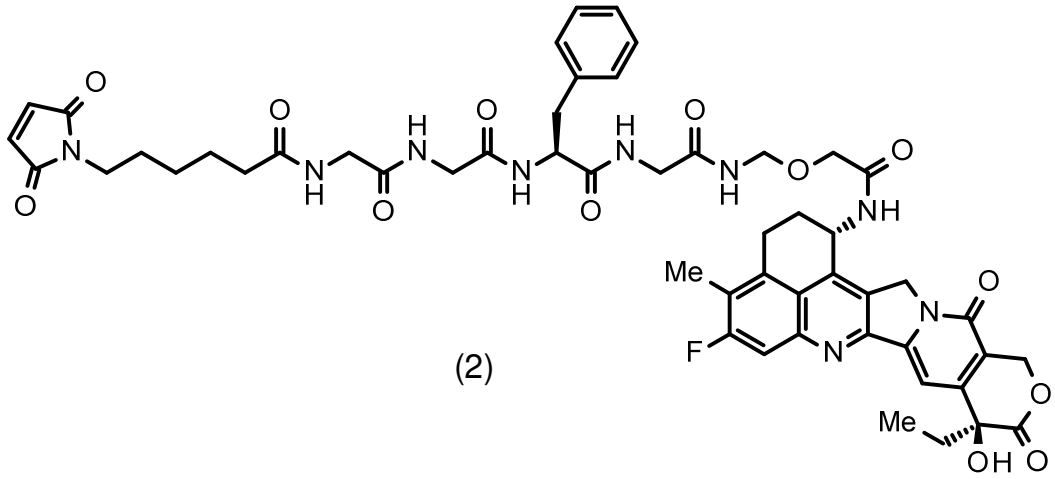
em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter, pela obtenção de uma solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio das etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 10]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol, e purificar a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio da etapa de

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

[00126] O método para produzir de acordo com [103], em que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

[00127] O método para produzir de acordo com [103], em que o agente redutor usado na etapa (i) é cloreto de tris(2-carboxietil)fosfina.

[00128] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [105], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00129] O método para produzir de acordo com [106], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[00130] O método para produzir de acordo com [106] ou [107], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00131] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [108], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00132] O método para produzir de acordo com [109], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00133] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [106] a [110], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00134] O método para produzir de acordo com [111], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00135] O método para produzir de acordo com [111], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00136] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [113], em que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína.

[00137] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [114], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00138] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [114], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00139] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [114], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00140] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [114], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00141] O método para produzir de acordo com qualquer uma das

[103] a [114], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00142] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [119], em que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de histidina.

[00143] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [120], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00144] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [120], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00145] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [120], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00146] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [120], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00147] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [124], em que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

[00148] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [125], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

[00149] (v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

[00150] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00151] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00152] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00153] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00154] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00155] O método para produzir de acordo com [126], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00156] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [126] a [132], em que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

[00157] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [133], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00158] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [133], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00159] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [135], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00160] O método para produzir de acordo com [136], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[00161] O método para produzir de acordo com [136], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00162] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [135], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00163] O método para produzir de acordo com [139], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00164] O método para produzir de acordo com [140], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00165] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [135], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00166] O método para produzir de acordo com [142], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00167] O método para produzir de acordo com [143], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00168] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [135], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00169] O método para produzir de acordo com [145], em que o

anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00170] O método para produzir de acordo com [146], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00171] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [103] a [147], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00172] O método para produzir de acordo com [148], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00173] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [103] a [149], e depois realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00174] O método para produzir de acordo com [150], em que a

solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00175] O método para produzir de acordo com [150] ou [151], em que o excipiente é sacarose.

[00176] O método para produzir de acordo com [150] ou [151], em que o excipiente é trealose.

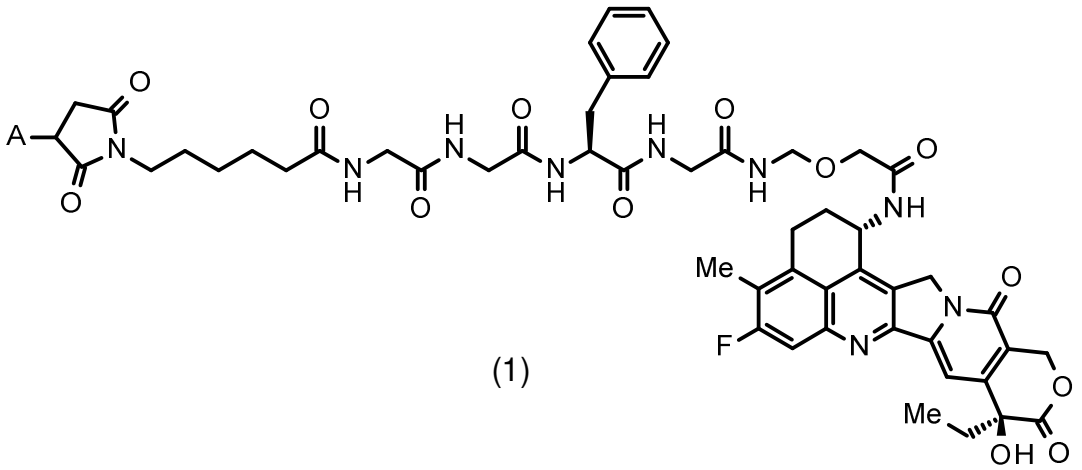
[00177] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [150] a [153], e depois realizar a etapa de (x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00178] O método para produzir de acordo com [154], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00179] O método para produzir de acordo com [154], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00180] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 11]



(1)

em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

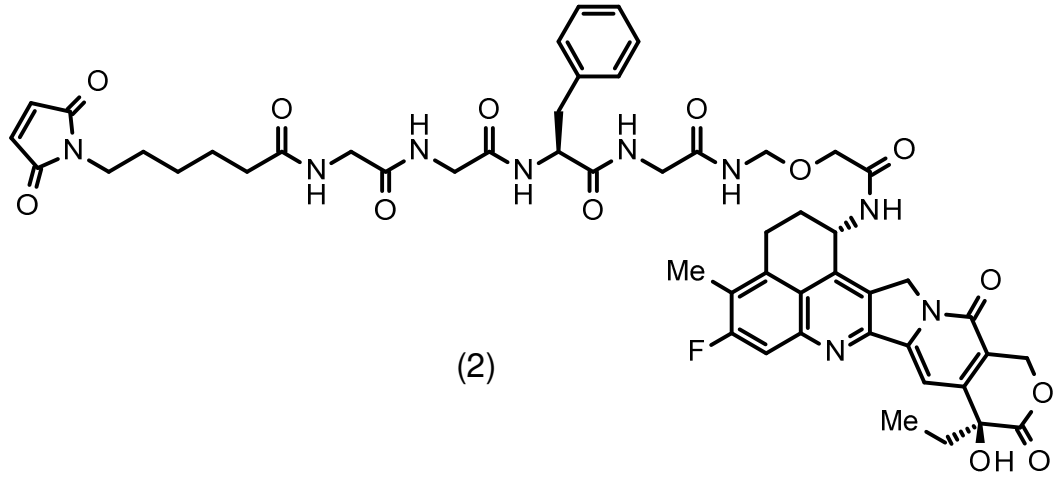
é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter, pela obtenção de uma solução contendo um produto não purificado ou

produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio das etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 12]



(2)

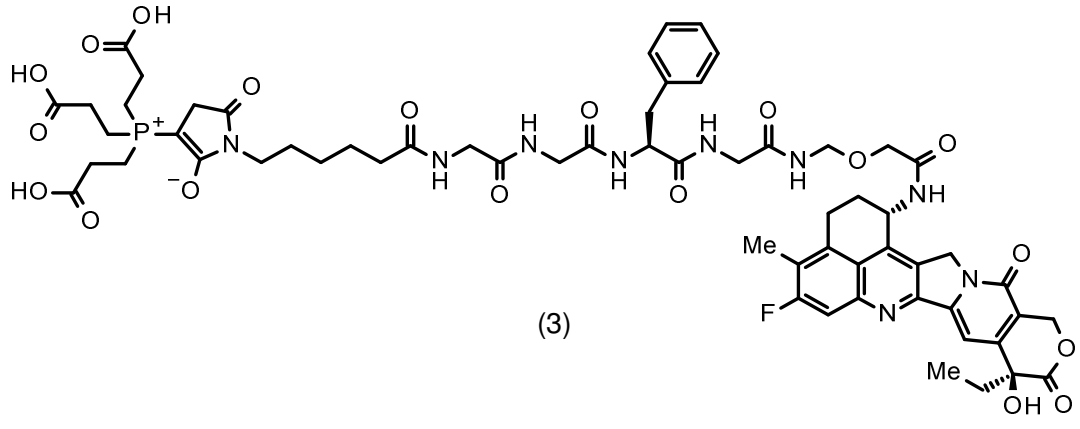
com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar N-acetilcisteína, e

purificar a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio da etapa de

(iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

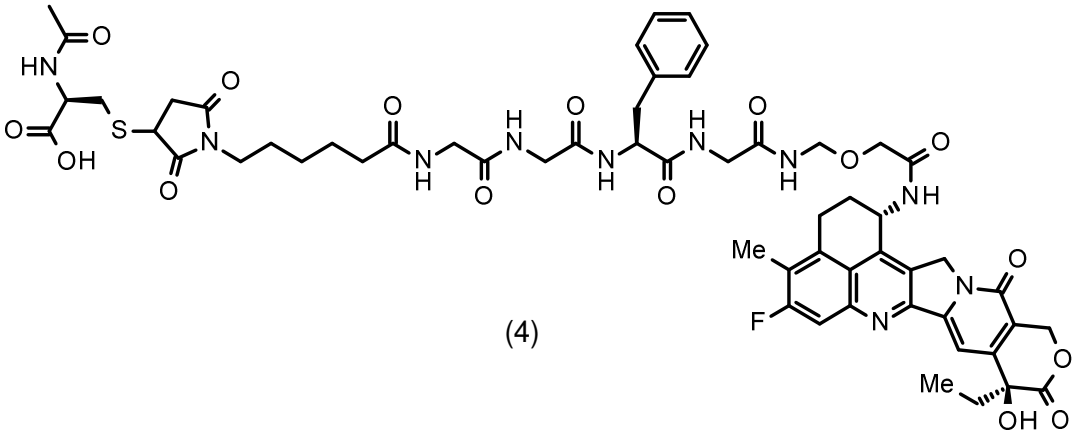
[Fórmula Química 13]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 14]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

[00181] O método para produzir de acordo com [157], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00182] O método para produzir de acordo com [158], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[00183] O método para produzir de acordo com [158] ou [159], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00184] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [160], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00185] O método para produzir de acordo com [161], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00186] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [158] a [162], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00187] O método para produzir de acordo com [163], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00188] O método para produzir de acordo com [163], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00189] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [165], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00190] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [165], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00191] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [165], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00192] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [165], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00193] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [165], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00194] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [170], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00195] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [170], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00196] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [170], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00197] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [170], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00198] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [174], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

[00199] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00200] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00201] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00202] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00203] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00204] O método para produzir de acordo com [175], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00205] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [181], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00206] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [181], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00207] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [183], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00208] O método para produzir de acordo com [184], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de

SEQ ID NO: 2.

[00209] O método para produzir de acordo com [184], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00210] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [183], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00211] O método para produzir de acordo com [187], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00212] O método para produzir de acordo com [188], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00213] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [183], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00214] O método para produzir de acordo com [190], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00215] O método para produzir de acordo com [191], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00216] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [183], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00217] O método para produzir de acordo com [193], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00218] O método para produzir de acordo com [194], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00219] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [157] a [195], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00220] O método para produzir de acordo com [196], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00221] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [157] a [197], e depois realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado

anticorpo-fármaco.

[00222] O método para produzir de acordo com [198], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00223] O método para produzir de acordo com [198] ou [199], em que o excipiente é sacarose.

[00224] O método para produzir de acordo com [198] ou [199], em que o excipiente é trealose.

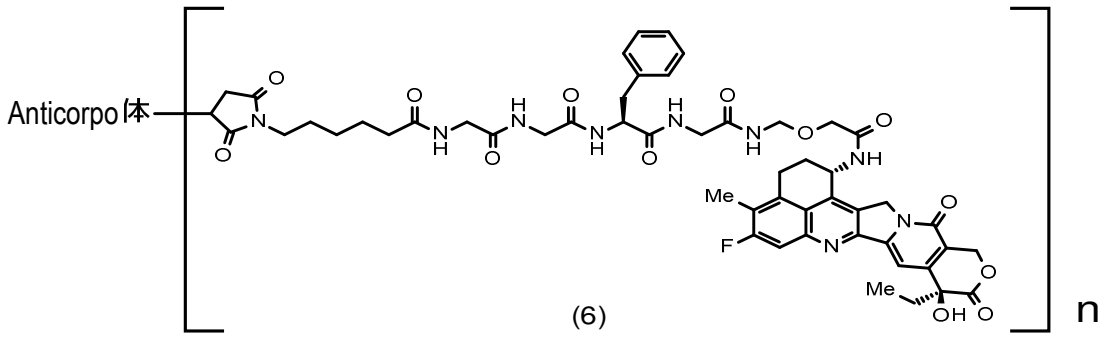
[00225] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [198] a [201], e depois realizar a etapa de (x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00226] O método para produzir de acordo com [202], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00227] O método para produzir de acordo com [202], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00228] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 15]



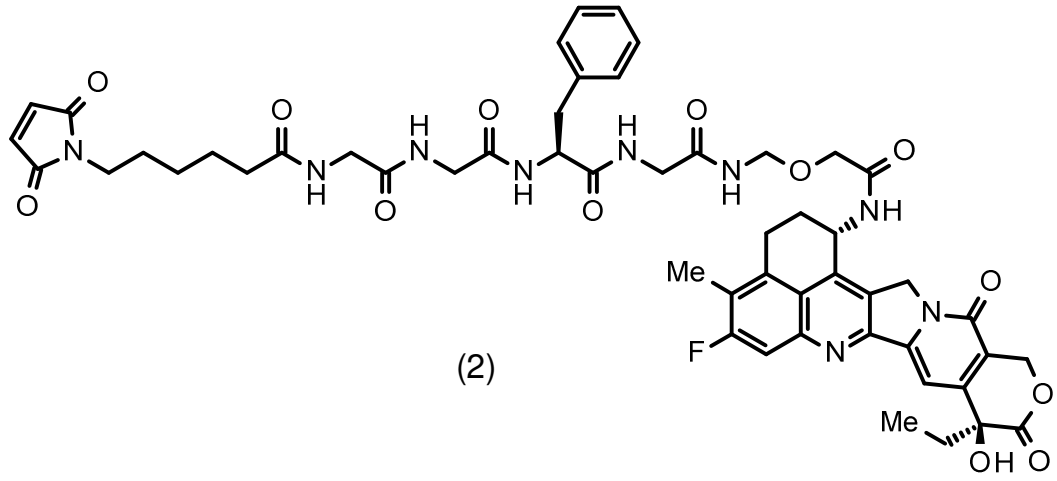
em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do conector de ligante conjugado por molécula de anticorpo,

em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 16]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

[00229] O método para produzir de acordo com [205], em que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

[00230] O método para produzir de acordo com [205], em que o agente redutor usado na etapa (i) é cloreto de tris(2-carboxietil)fosfina.

[00231] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [207], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00232] O método para produzir de acordo com [208], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de

hidrogenofosfato dissódico.

[00233] O método para produzir de acordo com [208] ou [209], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00234] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [210], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00235] O método para produzir de acordo com [211], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00236] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [208] a [212], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00237] O método para produzir de acordo com [213], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00238] O método para produzir de acordo com [213], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00239] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [215], em que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína.

[00240] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [216], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00241] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [216], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00242] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [216], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00243] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [216], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00244] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [216], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00245] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [221], em que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de histidina.

[00246] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [222], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00247] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [222], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00248] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [222], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00249] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [222], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00250] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [226], em que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

[00251] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [227], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

[00252] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da

solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00253] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00254] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00255] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00256] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00257] O método para produzir de acordo com [228], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00258] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [228] a [234], em que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

[00259] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [235], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00260] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [235], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00261] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [237], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00262] O método para produzir de acordo com [238], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de

SEQ ID NO: 2.

[00263] O método para produzir de acordo com [238], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00264] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [237], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00265] O método para produzir de acordo com [241], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00266] O método para produzir de acordo com [242], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00267] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [237], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00268] O método para produzir de acordo com [244], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00269] O método para produzir de acordo com [245], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00270] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [237], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00271] O método para produzir de acordo com [247], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00272] O método para produzir de acordo com [248], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00273] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [205] a [249], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00274] O método para produzir de acordo com [250], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00275] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [205] a [251], e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00276] O método para produzir de acordo com [252], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00277] O método para produzir de acordo com [251] ou [252], em que o excipiente é sacarose.

[00278] O método para produzir de acordo com [251] ou [252], em que o excipiente é trealose.

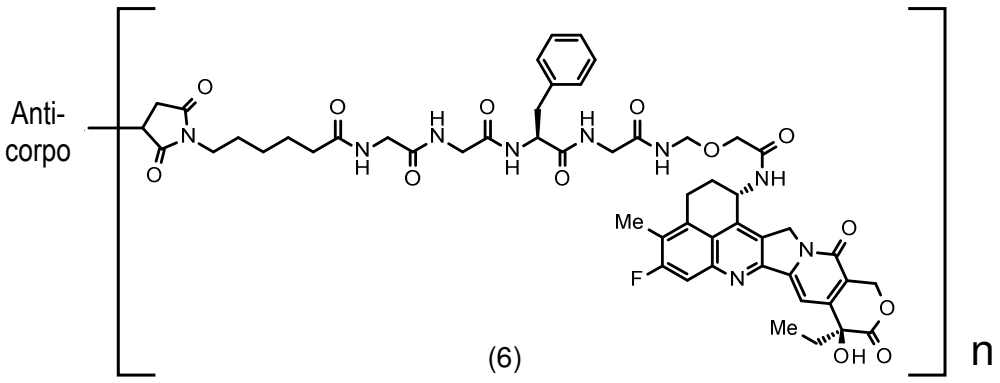
[00279] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [252] a [255], e depois realizar a etapa de (x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00280] O método para produzir de acordo com [256], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00281] O método para produzir de acordo com [256], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00282] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 17]



em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do

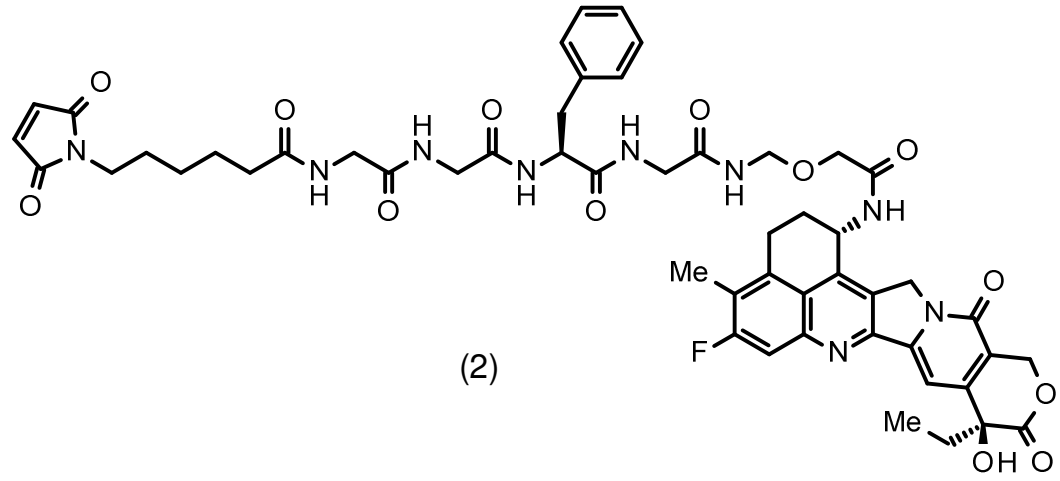
conector de ligante conjugado por molécula de anticorpo,

em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 18]



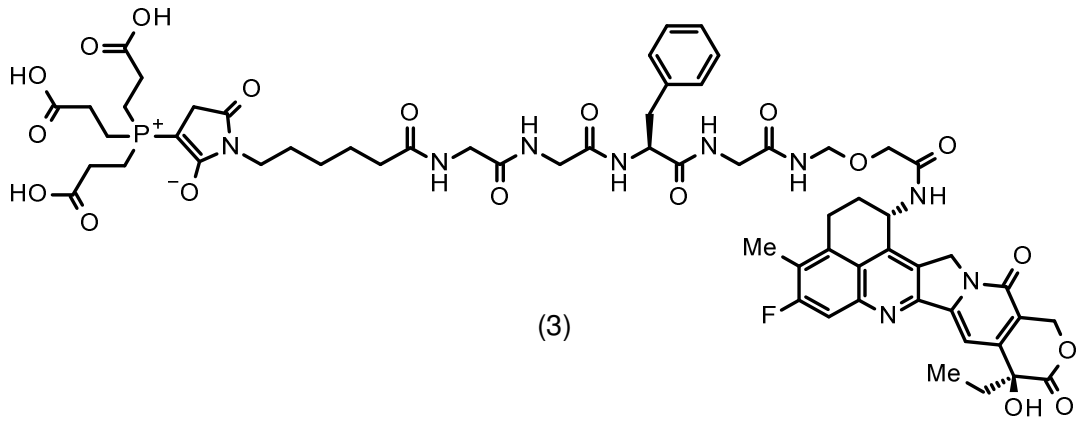
(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar N-acetilcisteína para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

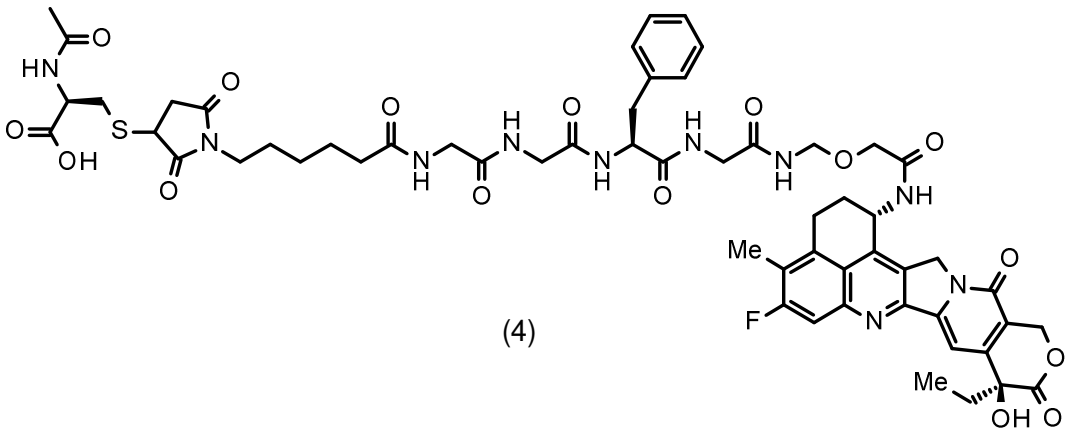
[Fórmula Química 19]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 20]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

[00283] O método para produzir de acordo com [259], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00284] O método para produzir de acordo com [260], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[00285] O método para produzir de acordo com [260] ou [261], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00286] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [262], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00287] O método para produzir de acordo com [263], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00288] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [260] a [264], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00289] O método para produzir de acordo com [265], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00290] O método para produzir de acordo com [265], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00291] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [267], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00292] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [267], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00293] 0069]

[00294] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [267], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00295] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [267], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00296] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [267], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00297] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [272], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00298] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [272], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00299] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [272], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00300] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [272], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00301] O método para produzir de acordo com qualquer uma das

[259] a [276], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de
(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

[00302] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00303] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00304] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00305] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00306] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00307] O método para produzir de acordo com [277], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00308] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [283], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00309] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [283], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00310] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [285], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00311] O método para produzir de acordo com [286], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma

sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[00312] O método para produzir de acordo com [286], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00313] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [285], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00314] O método para produzir de acordo com [289], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00315] O método para produzir de acordo com [290], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00316] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [285], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00317] O método para produzir de acordo com [292], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00318] O método para produzir de acordo com [293], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00319] O método para produzir de acordo com qualquer uma das

[259] a [285], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00320] O método para produzir de acordo com [295], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00321] O método para produzir de acordo com [296], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00322] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [259] a [297], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00323] O método para produzir de acordo com [298], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00324] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [259] a [299], e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00325] O método para produzir de acordo com [300], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00326] O método para produzir de acordo com [300] ou [301], em que o excipiente é sacarose.

[00327] O método para produzir de acordo com [300] ou [301], em que o excipiente é trealose.

[00328] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [300] a [303], e depois

realizar a etapa de

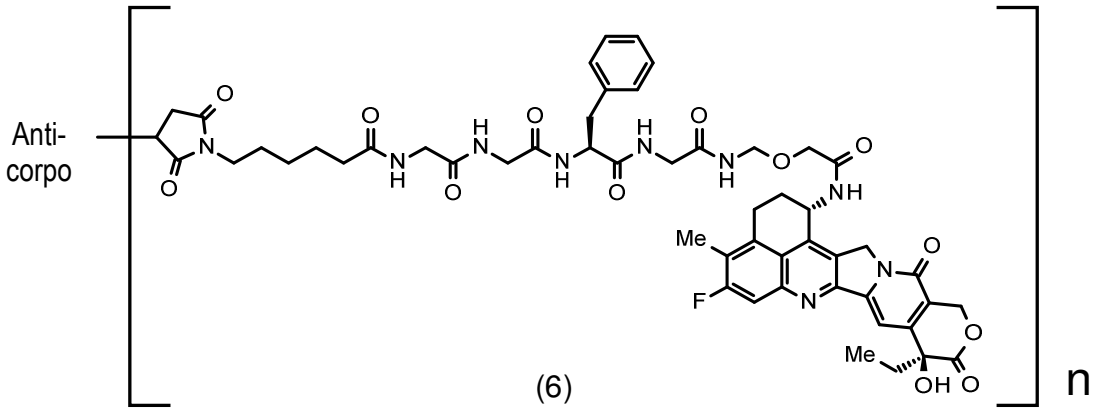
(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00329] O método para produzir de acordo com [304], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00330] O método para produzir de acordo com [304], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00331] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 21]



(6)

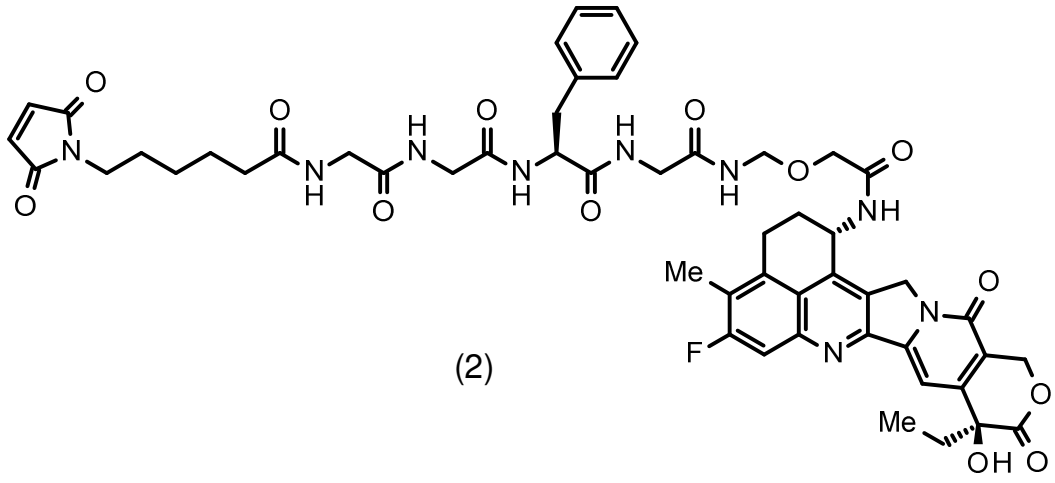
em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do conector de ligante conjugado por molécula de anticorpo,

em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 22]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para obter a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco, e purificar a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio da etapa de

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela

fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

[00332] O método para produzir de acordo com [307], em que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

[00333] O método para produzir de acordo com [307], em que o agente redutor usado na etapa (i) é cloreto de tris(2-carboxietil)fosfina.

[00334] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [309], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00335] O método para produzir de acordo com [310], em que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[00336] O método para produzir de acordo com [310] ou [311], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00337] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [312], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00338] O método para produzir de acordo com [313], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00339] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [310] a [314], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00340] O método para produzir de acordo com [315], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00341] O método para produzir de acordo com [315], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00342] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [317], em que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-

acetilcisteína.

[00343] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [318], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00344] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [318], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00345] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [318], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00346] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [318], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00347] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [318], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00348] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [323], em que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de histidina.

[00349] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [324], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00350] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [324], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00351] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [324], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00352] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [324], em que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00353] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [328], em que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

[00354] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [329], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

[00355] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00356] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00357] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00358] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00359] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00360] O método para produzir de acordo com [330], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00361] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [330] a [336], em que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

[00362] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [337], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na

faixa de 7 a 8.

[00363] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [337], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00364] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [339], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00365] O método para produzir de acordo com [340], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[00366] O método para produzir de acordo com [340], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00367] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [339], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00368] O método para produzir de acordo com [343], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00369] O método para produzir de acordo com [344], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00370] O método para produzir de acordo com qualquer uma das

[307] a [339], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00371] O método para produzir de acordo com [346], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00372] O método para produzir de acordo com [347], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00373] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [339], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00374] O método para produzir de acordo com [349], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00375] O método para produzir de acordo com [350], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00376] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [307] a [351], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00377] O método para produzir de acordo com [352], em que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00378] Um método para produzir uma composição farmacêutica

contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [307] a [353], e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00379] O método para produzir de acordo com [354], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00380] O método para produzir de acordo com [354] ou [355], em que o excipiente é sacarose.

[00381] O método para produzir de acordo com [354] ou [355], em que o excipiente é trealose.

[00382] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [354] a [357], e depois

realizar a etapa de

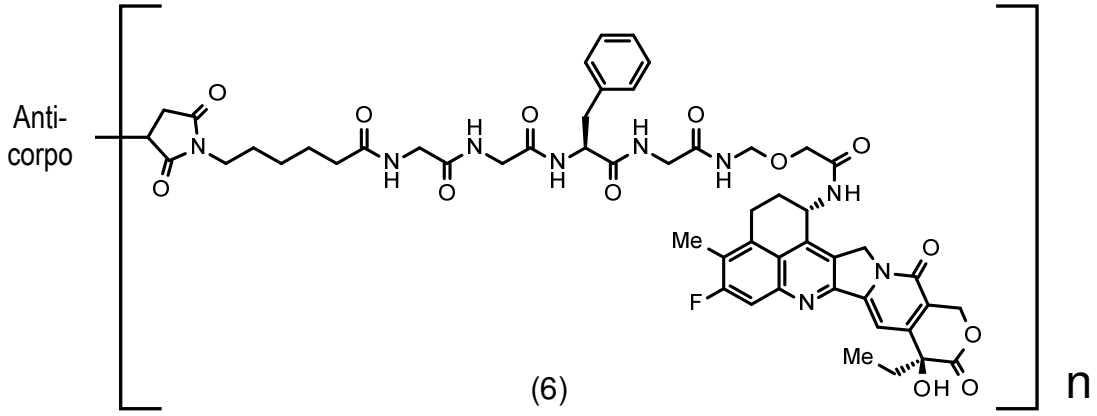
(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00383] O método para produzir de acordo com [358], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00384] O método para produzir de acordo com [358], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00385] Um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 23]



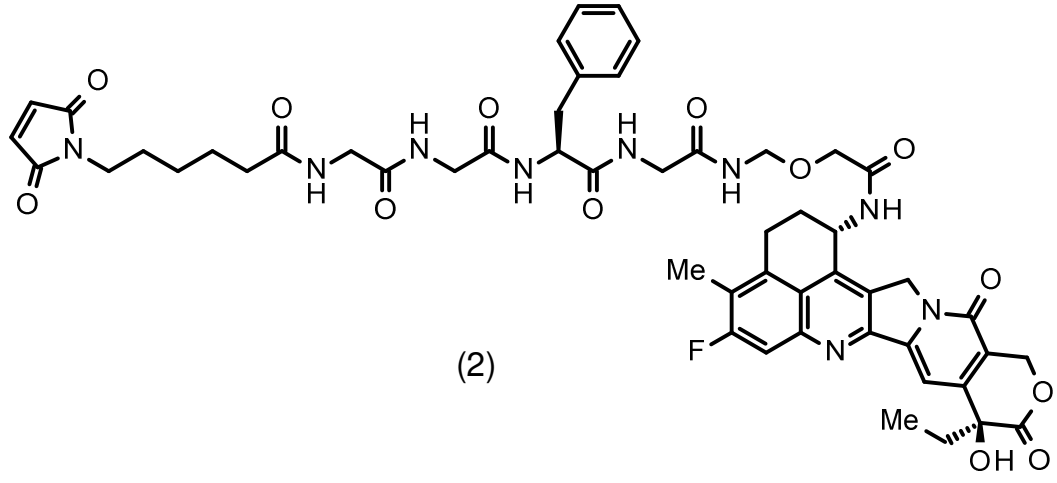
em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do conector de ligante conjugado por molécula de anticorpo,

em que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 24]



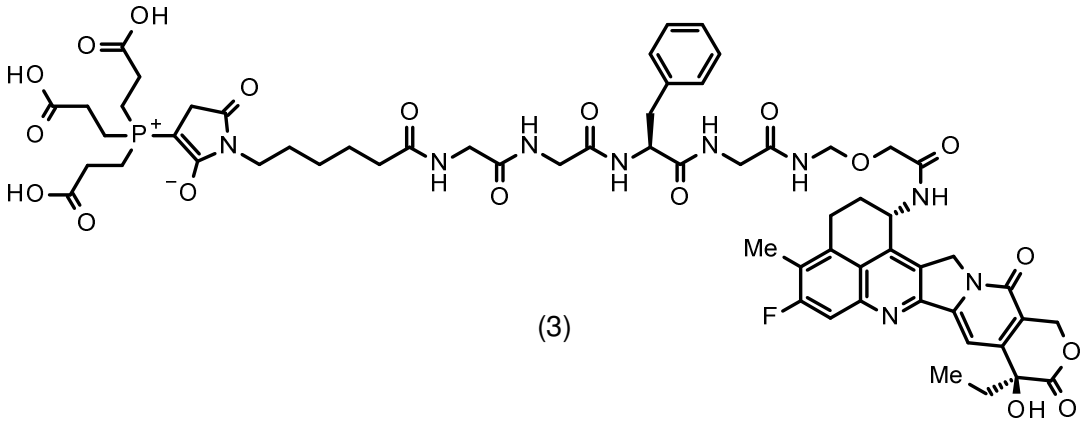
com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar N-acetilcisteína para obter a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco, e

purificar a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio da etapa de

(iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

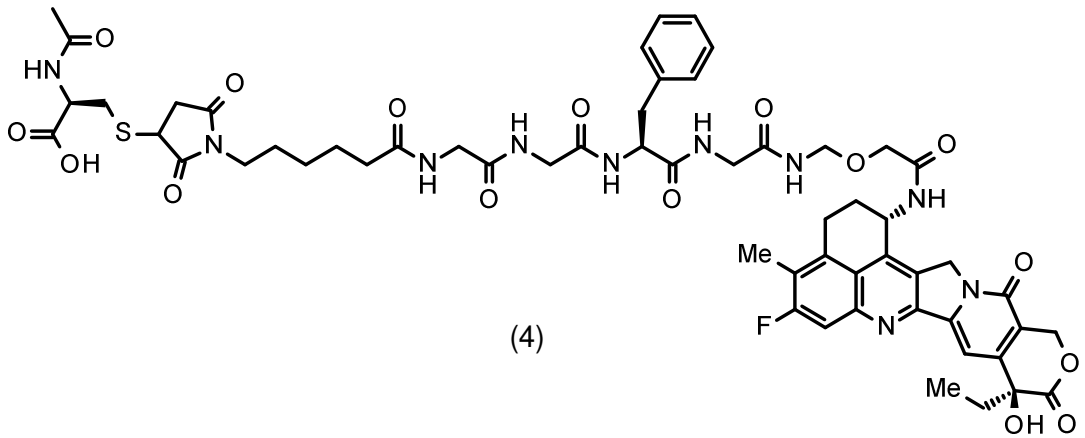
[Fórmula Química 25]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 26]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

[00386] O método para produzir de acordo com [361], em que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

[00387] O método para produzir de acordo com [362], em que o pH da

solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

[00388] O método para produzir de acordo com [362] ou [363], em que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

[00389] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [364], em que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

[00390] O método para produzir de acordo com [365], em que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

[00391] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [362] a [366], em que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

[00392] O método para produzir de acordo com [367], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00393] O método para produzir de acordo com [367], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00394] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [369], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

[00395] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [369], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00396] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [369], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00397] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [369], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00398] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [369], em que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é 5,0.

[00399] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [374], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00400] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [374], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00401] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [374], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,4% em peso a 0,6% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00402] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [374], em que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) é 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

[00403] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [378], compreendendo uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

[00404] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

[00405] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

[00406] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,7 a 5,3.

[00407] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,8 a 5,2.

[00408] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4,9 a 5,1.

[00409] O método para produzir de acordo com [379], em que o pH da

solução tampão usada na etapa (v) é 5,0.

[00410] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [385], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

[00411] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [385], em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

[00412] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [387], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

[00413] O método para produzir de acordo com [388], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

[00414] O método para produzir de acordo com [388], em que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

[00415] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [387], em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

[00416] O método para produzir de acordo com [391], em que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

[00417] O método para produzir de acordo com [392], em que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00418] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [387], em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

[00419] O método para produzir de acordo com [394], em que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

[00420] O método para produzir de acordo com [395], em que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00421] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [387], em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

[00422] O método para produzir de acordo com [397], em que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

[00423] O método para produzir de acordo com [398], em que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

[00424] O método para produzir de acordo com qualquer uma das [361] a [399], em que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

[00425] O método para produzir de acordo com [400], em que a

cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

[00426] Um método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir de qualquer uma das [361] a [401], e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00427] O método para produzir de acordo com [402], em que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

[00428] O método para produzir de acordo com [401] ou [402], em que o excipiente é sacarose.

[00429] O método para produzir de acordo com [401] ou [402], em que o excipiente é trealose.

[00430] Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir de acordo com qualquer uma das [402] a [405], e depois

realizar a etapa de

(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

[00431] O método para produzir de acordo com [406], em que o tensoativo é polissorbato 80.

[00432] O método para produzir de acordo com [406], em que o tensoativo é polissorbato 20.

[00433] Um conjugado anticorpo-fármaco produzido através do método para produzir de acordo com qualquer um de [1] a [47], [55] a [95], [103] a [149], [157] a [197], [205] a [251], [259] a [299], [307] a [353] e [361] a [401].

[00434] Uma composição farmacêutica produzida através do método para produzir de acordo com qualquer um de [48] a [54], [96] a [102], [150] a [156], [198] a [204], [252] a [258], [300] a [306], [354] a [360] e [402] a [408].

Efeitos vantajosos da invenção

[00435] A presente invenção pode prover um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, que compreende uma etapa de purificação para remover efetivamente os subprodutos derivados do composto representado pela fórmula (2) com a geração de agregados suprimidos. Além disso, a presente invenção pode prover um método industrialmente excelente para produzir uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

Breve Descrição dos Desenhos

[00436] [Figura 1] A Figura 1 é um diagrama que mostra o teor do composto (3) e do composto (4) quando a ultrafiltração foi realizada com solução tampão de histidina (pH 5,0) ou solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,5% (pH 5,0).

[00437] [Figura 2] A Figura 2 é um diagrama que mostra o teor de agregado quando a ultrafiltração foi realizada com solução tampão de

histidina (pH 5,0 ou pH 5,8) ou solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,4% (pH 5,0 ou pH 5,8).

[00438] [Figura 3] A Figura 3 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada de um anticorpo anti-HER2 (SEQ ID NO: 1).

[00439] [Figura 4] A Figura 4 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia leve de um anticorpo anti-HER2 (SEQ ID NO: 2).

[00440] [Figura 5] A Figura 5 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada de um anticorpo anti-HER3 (SEQ ID NO: 3).

[00441] [Figura 6] A Figura 6 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia leve de um anticorpo anti-HER3 (SEQ ID NO: 4).

[00442] [Figura 7] A Figura 7 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada de um anticorpo anti-GPR20 (SEQ ID NO: 5).

[00443] [Figura 8] A Figura 8 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia leve de um anticorpo anti-GPR20 (SEQ ID NO: 6).

[00444] [Figura 9] A Figura 9 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada de um anticorpo anti-CDH6 (SEQ ID NO: 7).

[00445] [Figura 10] A Figura 10 é um diagrama que mostra uma sequência de aminoácidos de uma cadeia leve de um anticorpo anti-CDH6 (SEQ ID NO: 8).

Descrição das modalidades

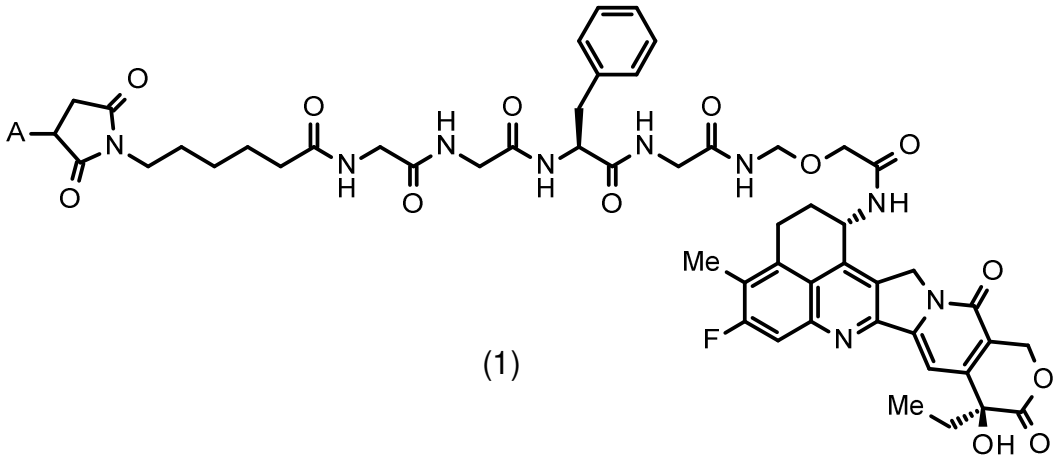
[00446] Doravante, os modos preferidos para realizar a presente invenção são descritos com referência aos desenhos. As modalidades descritas

abaixo são providas apenas para ilustrar um exemplo de uma modalidade típica da presente invenção e não se destinam a limitar o escopo da presente invenção.

1. Conjugado anticorpo-fármaco

[00447] O conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção é um conjugado anticorpo-fármaco no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 27]



(1)

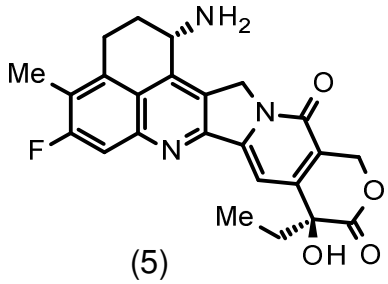
em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter.

[00448] Na presente invenção, a estrutura parcial que consiste em um conector e um fármaco no conjugado anticorpo-fármaco é referida como um "conector de fármaco". O conector de fármaco é conectado a um grupo tiol (em outras palavras, o átomo de enxofre de um resíduo de cisteína) formado em um sítio de ligação dissulfeto intercadeia (dois sítios entre as cadeias pesadas e dois sítios entre uma cadeia pesada e uma cadeia leve) no anticorpo.

[00449] O conector de fármaco do conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção inclui exatecano, que é um inibidor da topoisomerase I, como um componente. Exatecano é um derivado da camptotecina com efeito antitumoral, representado pela fórmula (5):

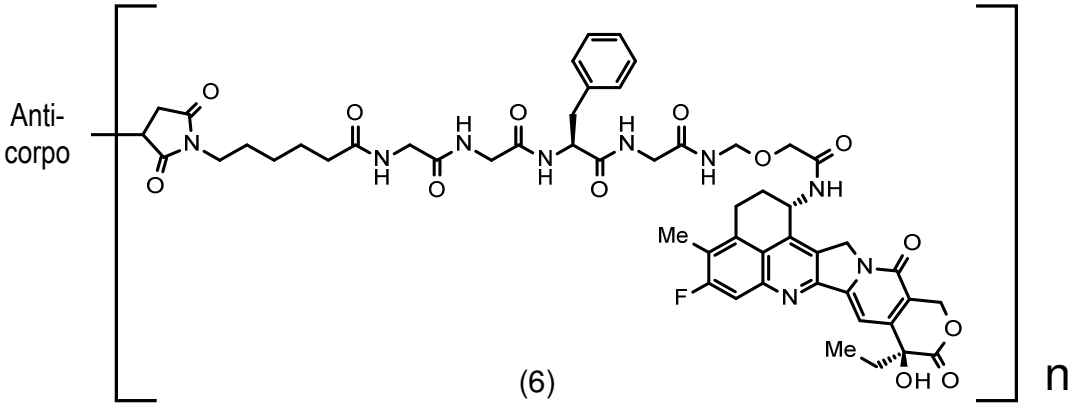
[Fórmula Química 28]



(5)

[00450] O conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção também pode ser representado pela fórmula (6):

[Fórmula Química 29]

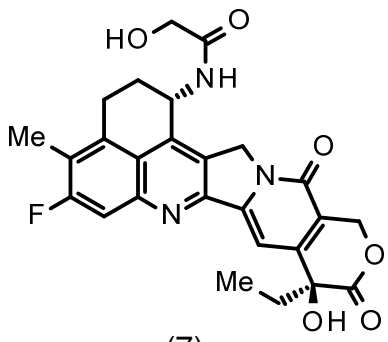


(6)

em que, o conector de fármaco é conjugado a um anticorpo por meio de uma ligação de tioéter. O significado de n é o mesmo do que é chamado de número médio de moléculas de fármaco conjugadas (DAR; razão fármaco para anticorpo) e indica o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo.

[00451] Depois de migrar para as células cancerosas, o conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção libera um composto representado pela fórmula (7):

[Fórmula Química 30]

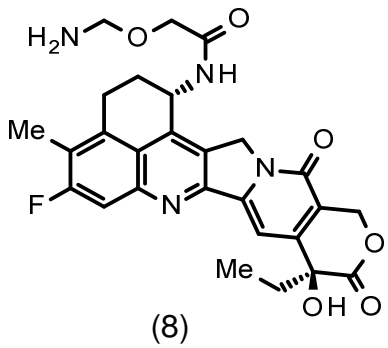


(7)

[00452] O composto representado pela fórmula (7) é inferido como a fonte original da atividade antitumoral do conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção, e foi confirmado ter efeito inibidor da topoisomerase I (Ogitani Y. et al., Clinical Cancer Research, 2016, Oct 15; 22(20): 5097-5108, Epub 2016 Mar 29).

[00453] O composto representado pela fórmula (7) é inferido como sendo formado pela decomposição de uma estrutura aminal do composto representado pela fórmula (8):

[Fórmula Química 31]



(8)

que se infere como formado por clivagem na parte de conector do conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção.

[00454] O conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção também é conhecido por ter um efeito espectador (Ogitani Y. et al., Cancer Science (2016) 107, 1039-1046). O efeito espectador é exercido por meio de um processo de modo que o conjugado anticorpo-fármaco produzido pela presente invenção seja internalizado em células cancerosas que expressam um alvo e o composto representado pela fórmula (7) é liberado e,

em seguida, exerce um efeito antitumoral também em células cancerosas que estão presentes ao redor e não expressam o alvo.

2. Anticorpo para uso na produção de conjugado anticorpo-fármaco

[00455] O anticorpo para uso na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção pode ser derivado de qualquer espécie e é, preferencialmente, um anticorpo derivado de um humano, um rato, um camundongo ou um coelho. Nos casos em que o anticorpo é derivado de espécies diferentes da espécie humana, ele é preferencialmente quimerizado ou humanizado usando uma técnica bem conhecida. O anticorpo da presente invenção pode ser um anticorpo policlonal ou um anticorpo monoclonal e é preferencialmente um anticorpo monoclonal.

[00456] O anticorpo para uso na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção é um anticorpo que possui preferencialmente uma característica de ser capaz de direcionar células cancerosas e é preferencialmente um anticorpo que possui, por exemplo, uma propriedade de reconhecer uma célula cancerosa, uma propriedade de ligação a uma célula cancerosa, uma propriedade de ser incorporado e internalizado em uma célula cancerosa e/ou atividade citocida contra células cancerosas.

[00457] A atividade de ligação do anticorpo contra as células cancerosas pode ser confirmada usando citometria de fluxo. A internalização do anticorpo em células cancerosas pode ser confirmada usando (1) um ensaio de visualização de um anticorpo incorporado em células sob um microscópio de fluorescência usando um anticorpo secundário (marcado com fluorescência) ligado ao anticorpo terapêutico (Cell Death and Differentiation (2008) 15 , 751-761), (2) um ensaio de medição de uma intensidade de fluorescência incorporada em células usando um anticorpo secundário (marcado com fluorescência) ligado ao anticorpo terapêutico (Molecular Biology of the Cell, Vol. 15, 5268-5282, December 2004), ou (3) o ensaio Mab-ZAP usando uma ligação de imunotoxina ao anticorpo terapêutico em

que a toxina é liberada após incorporação nas células para inibir o crescimento celular (Bio Techniques 28: 162-165, January 2000). Como imunotoxina, pode ser utilizada uma proteína complexa recombinante de um domínio catalítico da toxina da difteria e a proteína G.

[00458] A atividade antitumoral do anticorpo pode ser confirmada in vitro determinando a atividade inibitória contra o crescimento celular. Por exemplo, uma linha de células cancerosas que superexpressa uma proteína alvo para o anticorpo é cultivada e o anticorpo é adicionado em concentrações variáveis no sistema de cultura para determinar a atividade inibitória contra a formação de foco, formação de colônia e crescimento de esferoide. A atividade antitumoral pode ser confirmada in vivo, por exemplo, pela administração do anticorpo a um camundongo nude com uma linha de células cancerígenas transplantadas que expressam altamente a proteína alvo e determinam a mudança na célula cancerosa.

[00459] Uma vez que o composto conjugado no conjugado anticorpo-fármaco exerce um efeito antitumoral, é preferível, mas não essencial, que o próprio anticorpo tenha um efeito antitumoral. Com a finalidade de exercer específica e seletivamente a atividade citotóxica do composto antitumoral contra células cancerosas, é importante e também preferido que o anticorpo tenha a propriedade de ser internalizado para migrar para as células cancerosas.

[00460] O anticorpo para utilização na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção pode ser obtido por um procedimento conhecido na técnica. Por exemplo, o anticorpo da presente invenção pode ser obtido usando um método convencionalmente realizado na técnica, que envolve a imunização de animais com um polipeptídeo antigênico e coleta e purificação de anticorpos produzidos in vivo. A origem do antígeno não está limitada a humanos e os animais podem ser imunizados com um antígeno derivado de um animal não humano, como um camundongo, um rato e

semelhantes. Neste caso, a reatividade cruzada de anticorpos que se ligam ao antígeno heterólogo obtido com antígenos humanos pode ser testada para rastrear um anticorpo aplicável a uma doença humana.

[00461] Alternativamente, células produtoras de anticorpos que produzem anticorpos contra o antígeno são fundidas com células de mieloma de acordo com um método conhecido na técnica (por exemplo, Kohler and Milstein, Nature (1975) 256, p. 495-497; and Kennet, R. ed., Monoclonal Antibodies, p. 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) para estabelecer hibridomas, a partir dos quais os anticorpos monoclonais podem ser obtidos.

[00462] O antígeno pode ser obtido por células hospedeiras geneticamente modificadas para produzir um gene que codifica a proteína antigênica. Especificamente, os vetores que permitem a expressão do gene de antígeno são preparados e transferidos para as células hospedeiras de modo que o gene seja expresso. O antígeno assim expresso pode ser purificado. O anticorpo também pode ser obtido por um método de imunização de animais com as células que expressam o antígeno geneticamente modificadas descritas acima ou uma linha celular que expressa o antígeno.

[00463] O anticorpo para uso na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção é, preferencialmente, um anticorpo recombinante obtido por modificação artificial com o propósito de diminuir a antigenicidade heteróloga para humanos, como um anticorpo quimérico ou um anticorpo humanizado, ou é preferencialmente um anticorpo tendo apenas a sequência do gene de um anticorpo derivado de um humano, ou seja, um anticorpo humano. Esses anticorpos podem ser produzidos usando um método conhecido.

[00464] Como o anticorpo quimérico, um anticorpo em que as regiões variáveis e constantes de anticorpo são derivadas de espécies diferentes, por exemplo, um anticorpo quimérico em que uma região variável de anticorpo derivado de camundongo ou rato está conectada a uma região constante de

anticorpo derivado de humano pode ser exemplificado (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81, 6851-6855, (1984)).

[00465] Como o anticorpo humanizado, um anticorpo obtido integrando apenas a região determinante de complementaridade (CDR) de um anticorpo heterólogo em um anticorpo derivado de humano (Nature (1986) 321, pp. 522-525), e um anticorpo obtido por enxerto de uma parte dos resíduos de aminoácidos da estrutura de um anticorpo heterólogo, bem como a sequência CDR do anticorpo heterólogo para um anticorpo humano por um método de enxerto de CDR (WO 90/07861), e um anticorpo humanizado usando uma estratégia de mutagênese de conversão de gene (Patente dos EUA Nº 5821337) pode ser exemplificado.

[00466] Como o anticorpo humano, um anticorpo gerado usando um camundongo produtor de anticorpos humanos com um fragmento de cromossomo humano incluindo genes de uma cadeia pesada e uma cadeia leve de um anticorpo humano (ver Tomizuka, K. et al., Nature Genetics (1997) 16, p.133-143; Kuroiwa, Y. et. al., Nucl. Acids Res. (1998) 26, p.3447-3448; Yoshida, H. et. al., Animal Cell Technology:Basic and Applied Aspects vol.10, p.69-73 (Kitagawa, Y., Matsuda, T. and Iijima, S. eds.), Kluwer Academic Publishers, 1999; Tomizuka, K. et. al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000) 97, p.722-727, etc.) pode ser exemplificado. Como alternativa, um anticorpo obtido por exibição de fago, o anticorpo sendo selecionado de uma biblioteca de anticorpos humanos (ver Wormstone, I. M. et. al, Investigative Ophthalmology & Visual Science. (2002)43 (7), p.2301-2308; Carmen, S. et. al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1(2), p.189-203; Siriwardena, D. et. al., Ophthalmology (2002) 109(3), p.427-431, etc.) pode ser exemplificado.

[00467] Na presente invenção, variantes modificadas do anticorpo para uso na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção também estão incluídas. A variante modificada refere-se a uma variante

obtida submetendo o anticorpo de acordo com a presente invenção à modificação química ou biológica. Exemplos da variante quimicamente modificada incluem variantes incluindo uma conexão de uma porção química a um esqueleto de aminoácido, variantes incluindo uma conexão de uma porção química a uma cadeia de carboidrato conectada a N ou conectada O, etc. Exemplos da variante biologicamente modificada incluem variantes obtidas por modificação pós-tradução (tais como glicosilação conectada ao N ou conectada ao O, processamento de N- ou C-terminal, desamidação, isomerização de ácido aspártico ou oxidação de metionina) e variantes em que um resíduo de metionina foi adicionado ao terminal N por ser expresso em uma célula hospedeira procariótica. Além disso, um anticorpo marcado de modo a permitir a detecção ou isolamento do anticorpo ou um antígeno de acordo com a presente invenção, por exemplo, um anticorpo marcado com enzima, um anticorpo marcado com fluorescência e um anticorpo marcado por afinidade também estão incluídos no significado da variante modificada. Tal variante modificada do anticorpo de acordo com a presente invenção é útil para melhorar a estabilidade e retenção de sangue do anticorpo, reduzir a antigenicidade do mesmo, detectar ou isolar um anticorpo ou um antígeno, e assim por diante.

[00468] Além disso, ao regular a modificação de um glicano que está conectado ao anticorpo de acordo com a presente invenção (glicosilação, desfucosilação, etc.), é possível aumentar a atividade citotóxica celular dependente de anticorpos. Como técnica para regular a modificação de um glicano de anticorpos, são conhecidos os documentos WO 99/54342, WO 00/61739, WO 02/31140, etc. No entanto, a técnica não está limitada a isso. No anticorpo de acordo com a presente invenção, os anticorpos nos quais a modificação de um glicano é regulada também estão incluídos.

[00469] É conhecido que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada de um anticorpo produzido em uma célula de mamífero em

cultura é excluído (Journal of Chromatography A, 705: 129-134 (1995)), e também é conhecido que dois resíduos de aminoácidos (glicina e lisina) no terminal carboxila da cadeia pesada de um anticorpo produzido em uma célula de mamífero cultivada são deletados e um resíduo de prolina localizado recentemente no terminal carboxila é amidado (Analytical Biochemistry, 360: 75-83 (2007)). No entanto, tal exclusão e modificação da sequência da cadeia pesada não afetam a afinidade de ligação ao antígeno e a função efetora (a ativação do complemento, citotoxicidade celular dependente de anticorpo, etc.) do anticorpo. Portanto, no anticorpo de acordo com a presente invenção, anticorpos submetidos a tal modificação e fragmentos funcionais do anticorpo também estão incluídos, e variantes de exclusão nas quais um ou dois aminoácidos foram excluídos no terminal carboxila da cadeia pesada, variantes obtidas por amidação de variantes de exclusão (por exemplo, uma cadeia pesada na qual o resíduo de prolina do terminal carboxila foi amidado) e semelhantes também estão incluídas. O tipo de variante de exclusão possuindo uma exclusão no terminal carboxila da cadeia pesada do anticorpo de acordo com a presente invenção não está limitado às variantes acima, desde que a afinidade de ligação ao antígeno e a função efetora sejam conservadas. As duas cadeias pesadas que constituem o anticorpo de acordo com a presente invenção podem ser de um tipo selecionado a partir do grupo que consiste em uma cadeia pesada de comprimento total e a variante de deleção acima descrita, ou podem ser de dois tipos em combinação selecionados a partir delas. A razão da quantidade de cada variante de exclusão pode ser afetada pelo tipo de células de mamífero em cultura que produzem o anticorpo de acordo com a presente invenção e as condições de cultura. No entanto, um anticorpo em que um resíduo de aminoácido no terminal carboxila foi excluído em ambas as duas cadeias pesadas no anticorpo de acordo com a presente invenção pode ser exemplificado preferencialmente.

[00470] Como isotipos do anticorpo de acordo com a presente invenção, por exemplo, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) podem ser exemplificados e IgG1 ou IgG2 podem ser exemplificados preferencialmente.

[00471] Exemplos de anticorpos aplicáveis à produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção podem incluir, mas não estão particularmente limitados a, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-HER3, um anticorpo anti-TROP2, um anticorpo anti-B7-H3 anticorpo, um anticorpo anti-CD3, um anticorpo anti-CD30, um anticorpo anti-CD33, um anticorpo anti-CD37, um anticorpo anti-CD56, um anticorpo anti-CD98, um anticorpo anti-DR5, um anticorpo anti-EGFR, um anticorpo anti-EPHA2, um anticorpo anti-FGFR2, um anticorpo anti-FGFR4, um anticorpo anti-FOLR1, um anticorpo anti-VEGF, um anticorpo anti-CD20, um anticorpo anti-CD22, um anticorpo anti-CD70, um anticorpo nti-PSMA, um anticorpo anti-CEA, um anticorpo anti-mesotelina, um anticorpo anti-A33, um anticorpo anti-CanAg, um anticorpo anti-Cripto, um anticorpo anti-G250, um anticorpo anti-MUC1, um anticorpo anti-GPNMB, um anticorpo anti-integrina, um anticorpo anti-Tenascina-C, um anticorpo anti-SLC44A4, um anticorpo anti-GPR20 e um anticorpo anti-CDH6. Além disso, um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-HER3, um anticorpo anti-TROP2, um anticorpo anti-B7-H3, um anticorpo anti-GPR20 e um anticorpo anti-CDH6 podem ser exemplificados preferencialmente, e um anticorpo anti-HER2, um anticorpo anti-HER3, um anticorpo anti-GPR20 e um anticorpo anti-CDH6 podem ser exemplificados mais preferencialmente.

[00472] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-HER2" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente ao HER2 (Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano Tipo 2; ErbB-2), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em células que expressam HER2 por ligação ao HER2.

[00473] Exemplos do anticorpo anti-HER2 incluem trastuzumabe

(Patente dos EUA Nº 5821337) e pertuzumabe (Publicação Internacional Nº WO 01/00245), e trastuzumabe pode ser exemplificado preferencialmente.

[00474] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-HER3" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente ao HER3 (Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico Humano Tipo 3; ErbB-3), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em células que expressam HER3 por ligação ao HER3.

[00475] Exemplos do anticorpo anti-HER3 incluem patritumabe (U3-1287), U1-59 (Publicação Internacional Nº WO 2007/077028), MM-121 (seribantumabe), um anticorpo anti-ERBB3 descrito na Publicação Internacional Nº WO 2008/100624, RG-7116 (lumretuzumabe) e LJM-716 (elgemtumabe) e patritumabe e U1-59 podem ser exemplificados preferencialmente.

[00476] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-TROP2" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente a TROP2 (TACSTD2: Transdutor de sinal de cálcio associado a tumor 2; EGP-1), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em células que expressam TROP2 por ligação ao TROP2.

[00477] Exemplos do anticorpo anti-TROP2 incluem hTINA1-H1L1 (Publicação Internacional Nº WO 2015/098099).

[00478] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-B7-H3" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente ao B7-H3 (antígeno de célula B nº 7 homólogo 3; PD-L3; CD276), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em células que expressam B7-H3 por ligação ao B7-H3.

[00479] Exemplos do anticorpo anti-B7-H3 incluem M30-H1-L4 (Publicação Internacional Nº WO 2014/057687).

[00480] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-GPR20" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente ao GPR20 (receptor acoplado à proteína G 20), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em

células que expressam GPR20 por ligação a GPR20.

[00481] Exemplos do anticorpo anti-GPR20 incluem h046-H4e/L7 (Publicação Internacional Nº WO 2018/135501).

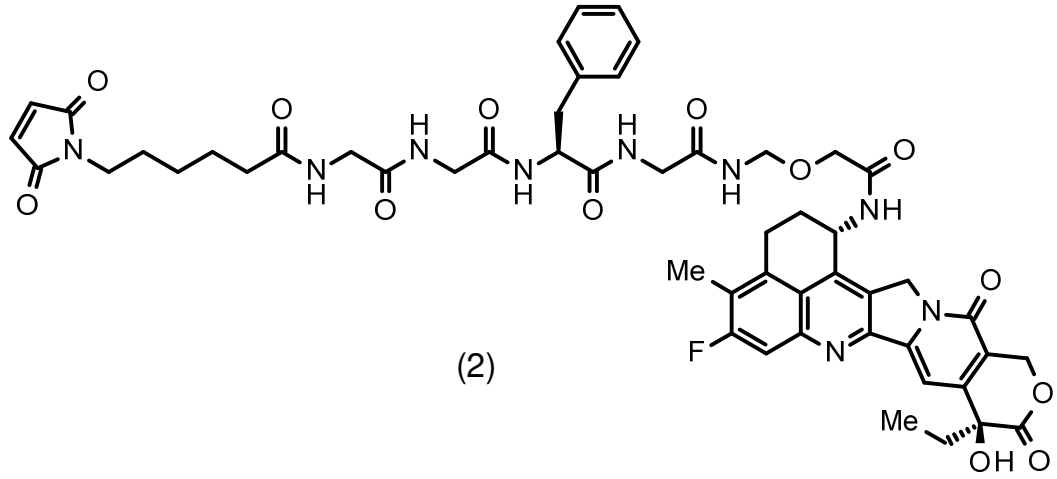
[00482] Na presente invenção, o termo "anticorpo anti-CDH6" refere-se a um anticorpo que se liga especificamente ao CDH6 (caderina-6), e, preferencialmente, tem uma atividade de internalização em células que expressam CDH6 por ligação ao CDH6.

[00483] Exemplos do anticorpo anti-CDH6 incluem H01L02 (Publicação Internacional Nº WO 2018/212136).

3. O intermediário de conector de fármaco para uso na produção de conjugado anticorpo-fármaco

[00484] Um intermediário de conector de fármaco para uso na produção do conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção é um composto representado pela fórmula (2).

[Fórmula Química 32]



(2)

[00485] O composto representado pela fórmula (2) pode ser produzido com referência às descrições na Publicação Internacional Nº WO 2014/057687, Publicação Internacional Nº WO 2015/098099, Publicação Internacional Nº WO 2015/115091, Publicação Internacional Nº WO 2015/155998, Publicação Internacional Nº WO 2019/044947, e assim por diante.

4. Conjugação de anticorpo e intermediário de conector de fármaco

[00486] A conjugação de um anticorpo e um intermediário de conector de fármaco no método para a produção de um conjugado anticorpo-fármaco na presente invenção inclui as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2) com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii).

[00487] O agente redutor usado na etapa (i) não é particularmente limitado, desde que seja capaz de reduzir um dissulfeto intercadeia do anticorpo e, por exemplo, tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo, ditiotreitol, ou 2-mercaptoetanol pode ser usado, tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo pode ser preferencialmente usado e cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina pode ser mais preferencialmente usado.

[00488] O equivalente (daqui em diante, um "equivalente" refere-se a um equivalente molar na presente invenção) do agente redutor usado na etapa (i) por molécula de anticorpo pode ser apropriadamente selecionado de acordo com o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido e o tipo de anticorpo.

[00489] Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 da SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada

consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), preferencialmente 4,1 a 5,1 equivalentes, mais preferencialmente 4,4 a 4,8 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 4,6 equivalentes, do agente redutor podem ser usados por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 4,6 equivalentes" refere-se preferencialmente a 4,5 a 4,7 equivalentes, e mais preferencialmente refere-se a 4,6 equivalentes.

[00490] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 5,5 a 6,5 equivalentes, mais preferencialmente 5,8 a 6,2 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 6 equivalentes, do agente redutor pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 6 equivalentes" refere-se preferencialmente a 5,9 a 6,1 equivalentes, e mais preferencialmente refere-se a 6,0 equivalentes.

[00491] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 da SEQ ID 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo

de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 4,3 a 5,3 equivalentes, mais preferencialmente 4,6 a 5 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 4,8 equivalentes, do agente redutor pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 4,8 equivalentes" refere-se preferencialmente a 4,7 a 4,9 equivalentes, e mais preferencialmente refere-se a 4,8 equivalentes.

[00492] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 da SEQ ID 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 4,3 a 5,3 equivalentes, mais preferencialmente 4,6 a 5 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 4,8 equivalentes, do agente redutor pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 4,8 equivalentes" refere-se preferencialmente a 4,7 a 4,9 equivalentes, e mais preferencialmente refere-se a 4,8 equivalentes.

[00493] A etapa (i) pode ser realizada preferencialmente em uma solução tampão.

[00494] O pH da solução tampão usada na etapa (i) é, preferencialmente, 6 a 8, mais preferencialmente 6,5 a 7,5, ainda mais preferencialmente 6,9 a 7,4, e ainda mais preferencialmente 7,0 a 7,3.

[00495] A solução tampão usada na etapa (i) não é particularmente limitada, desde que possa ser usada na redução de um dissulfeto intercadeia do anticorpo e, por exemplo, uma solução tampão de acetato, uma solução tampão de histidina, uma solução tampão de fosfato, uma solução tampão de

piperazina-1,4-bis(ácido 2-etanossulfônico) (doravante, também referido como "PIPES"), ou uma solução tampão de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico (doravante, também referido como "HEPES") pode ser usada.

[00496] Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6 a 8 pode ser preferencialmente usada, uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser mais preferencialmente usada, uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6,8 a 7,8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser ainda mais preferencialmente usada, e uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para cerca de 7,3 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser ainda mais preferencialmente usada. Aqui, a frase "cerca de 7,3" refere-se preferencialmente à faixa de 7,1 a 7,5, mais preferencialmente refere-se à faixa de 7,2 a 7,4, e ainda mais preferencialmente refere-se a 7,3.

[00497] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia

pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4), ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6 a 8 pode ser preferencialmente usada, uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser mais preferencialmente usada, uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para 6,5 a 7,5 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser ainda mais preferencialmente usada, e uma solução tampão de acetato com o pH ajustado para cerca de 7 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico pode ser ainda mais preferencialmente usada. Aqui, a frase "cerca de 7" refere-se preferencialmente à faixa de 6,8 a 7,2, mais preferencialmente refere-se à faixa de 6,9 a 7,1, e ainda mais preferencialmente refere-se a 7,0.

[00498] O uso de tal solução tampão pode minimizar a geração de agregados. A solução tampão usada na etapa (i) pode conter uma solução tampão derivada da produção de anticorpos.

[00499] A etapa (i) é preferencialmente realizada na presença de um agente quelante. O agente quelante não é particularmente limitado, desde que possa ser usado na redução de um dissulfeto intercadeia do anticorpo e, por exemplo, ácido etilenodiaminotetracético (doravante, também referido como "EDTA"), ácido dietilenotriaminapentacético ou ácido diaminotetracético de éter de glicol pode ser usado, e o ácido etilenodiaminotetracético pode ser usado preferencialmente.

[00500] Preferencialmente, 1 a 20 equivalentes do agente quelante podem ser usados por molécula de anticorpo, 3 a 8 equivalentes do agente quelante podem ser mais preferencialmente usados por molécula de anticorpo, 4 a 6 equivalentes do agente quelante podem ser ainda mais preferencialmente

usados por molécula de anticorpo e 5 equivalentes do agente quelante podem ser ainda mais preferencialmente usados por molécula de anticorpo.

[00501] A solução tampão usada na etapa (i) pode conter um tensoativo. O termo "tensoativo" na presente invenção refere-se a uma substância que possui um grupo hidrofílico e um grupo hidrofóbico e pode ser usada como um dos componentes de uma preparação farmacêutica. Exemplos de tais tensoativos incluem polissorbatos (incluindo polissorbato 80 (Tween 80), polissorbato 20 (Tween 20) e polissorbato 60 (Tween 60)), polioxietileno (160) polioxipropileno (30) glicol, óleo de rícino polioxietileno hidrogenado 60, óleo de rícino polioxietileno, e laurilsulfato de sódio e polissorbato 20 e polissorbato 80 podem ser exemplificados mais preferencialmente.

[00502] Inclusão ou exclusão do tensoativo na ou da solução tampão usada na etapa (i), e o tipo de tensoativo pode ser apropriadamente selecionado de acordo com o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido e o tipo de anticorpo.

[00503] Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), a solução tampão usada na etapa (i) não contém preferencialmente tensoativo.

[00504] No caso em que o número médio de unidades do conector de

fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a solução tampão usada na etapa (i) pode conter preferencialmente polissorbato 20.

[00505] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 da SEQ ID 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a solução tampão usada na etapa (i) pode conter preferencialmente polissorbato 80.

[00506] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 da SEQ ID 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a solução tampão usada na etapa (i) pode conter preferencialmente polissorbato 80.

[00507] A etapa (i) pode ser realizada de preferência a uma temperatura interna de 25 a 50°C.

[00508] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), a etapa (i) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 30 a 40°C e pode ser mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 35°C. Aqui, a frase "cerca de 35°C" refere-se preferencialmente a 33°C a 37°C, mais preferencialmente refere-se a 34°C a 36°C e ainda mais preferencialmente refere-se a 35°C.

[00509] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a etapa (i) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 30 a 40°C e pode ser mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 35°C. Aqui, a frase "cerca de

35°C" refere-se preferencialmente a 33°C a 37°C, mais preferencialmente refere-se a 34°C a 36°C e ainda mais preferencialmente refere-se a 35°C.

[00510] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 da SEQ ID 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a etapa (i) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 25 a 35°C e pode ser mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 30°C. Aqui, a frase "cerca de 30°C" refere-se preferencialmente a 28°C a 32°C, mais preferencialmente refere-se a 29°C a 31°C e ainda mais preferencialmente refere-se a 30°C.

[00511] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 da SEQ ID 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), a etapa (i) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 25 a 35°C e pode ser mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 30°C. Aqui, a frase "cerca de 30°C" refere-se preferencialmente a 28°C a 32°C, mais preferencialmente refere-se a 29°C a 31°C e ainda mais

preferencialmente refere-se a 30°C.

[00512] O tempo de reação para a etapa (i) é, preferencialmente, 1 a 4 horas.

[00513] O equivalente do composto representado pela fórmula (2) usado na etapa (ii) por molécula de anticorpo pode ser apropriadamente selecionado de acordo com o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido e o tipo de anticorpo.

[00514] Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), preferencialmente 8 a 10 equivalentes, mais preferencialmente 8,2 a 9,2 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 8,7 equivalentes, do composto representado pela fórmula (2) podem ser usados por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 8,7 equivalentes" refere-se preferencialmente a 8,5 a 8,9 equivalentes, mais preferencialmente refere-se a 8,6 a 8,8 equivalentes, e ainda mais preferencialmente refere-se a 8,7 equivalentes.

[00515] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia

pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 8 a 10 equivalentes, mais preferencialmente 9 a 10 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 9,5 equivalentes, do composto representado pela fórmula (2) pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 9,5 equivalentes" refere-se preferencialmente a 9,3 a 9,7 equivalentes, mais preferencialmente refere-se a 9,4 a 9,6 equivalentes, e ainda mais preferencialmente refere-se a 9,5 equivalentes.

[00516] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 da SEQ ID 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 8 a 10 equivalentes, mais preferencialmente 8,3 a 9,3 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 8,8 equivalentes, do composto representado pela fórmula (2) pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 8,8 equivalentes" refere-se preferencialmente a 8,6 a 9,0 equivalentes, mais preferencialmente refere-se a 8,7 a 8,9 equivalentes, e ainda mais preferencialmente refere-se a 8,8 equivalentes.

[00517] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-

fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 da SEQ ID 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), preferencialmente 8 a 10 equivalentes, mais preferencialmente 8,6 a 9,6 equivalentes, ainda mais preferencialmente cerca de 9,1 equivalentes, do composto representado pela fórmula (2) pode ser usado por molécula de anticorpo. Aqui, a frase "cerca de 9,1 equivalentes" refere-se preferencialmente a 8,9 a 9,3 equivalentes, mais preferencialmente refere-se a 9,0 a 9,2 equivalentes, e ainda mais preferencialmente refere-se a 9,1 equivalentes.

[00518] O composto representado pela fórmula (2) num estado dissolvido num solvente pode ser preferencialmente adicionado à solução de reação obtida na etapa (i). O solvente não é particularmente limitado, desde que possa ser usado na reação de ligação com o anticorpo, e dimetilsulfóxido, uma solução aquosa de dimetilsulfóxido, acetona ou uma solução aquosa de acetona pode ser preferencialmente usada, uma solução aquosa de dimetilsulfóxido pode ser mais preferencialmente usado, e uma solução aquosa a 80% de dimetilsulfóxido pode ser ainda mais preferencialmente usada. Além disso, qualquer um destes solventes pode ser preferencialmente usado com ácido acético nele contido. Preferencialmente, 9 a 10 equivalentes de ácido acético podem ser usados por molécula de anticorpo.

[00519] A etapa (ii) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 5 a 25°C, mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 10 a 20°C, e ainda mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 15°C. Aqui, a frase "cerca de 15°C"

refere-se preferencialmente a 13°C a 17°C, mais preferencialmente refere-se a 14°C a 16°C e ainda mais preferencialmente refere-se a 15°C.

[00520] O tempo de reação para a etapa (ii) é, preferencialmente, 0,5 a 2 horas.

[00521] O reagente com um grupo tiol pode ser usado na etapa (iii) para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii). Em outras palavras, o reagente com um grupo tiol pode ser utilizado na etapa (iii) para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto representado pela fórmula (2).

[00522] O reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) não é particularmente limitado, desde que possa reagir com o grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2) e, por exemplo, N-acetilcisteína ou cisteína podem ser usados, e N-acetilcisteína podem ser usados preferencialmente.

[00523] Na etapa (iii), 10 a 50 equivalentes do reagente com um grupo tiol podem ser preferencialmente usados por molécula de anticorpo, e 10 a 30 equivalentes do reagente com um grupo tiol podem ser mais preferencialmente usados.

[00524] A etapa (iii) pode ser preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 5 a 25°C, mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de 10 a 20°C, e ainda mais preferencialmente realizada a uma temperatura interna de cerca de 15°C. Aqui, a frase "cerca de 15°C" refere-se preferencialmente a 13°C a 17°C, mais preferencialmente refere-se a 14°C a 16°C e ainda mais preferencialmente refere-se a 15°C.

[00525] O tempo de reação para a etapa (iii) é, preferencialmente, 0,5 a 2 horas.

5. Purificação de conjugado anticorpo-fármaco

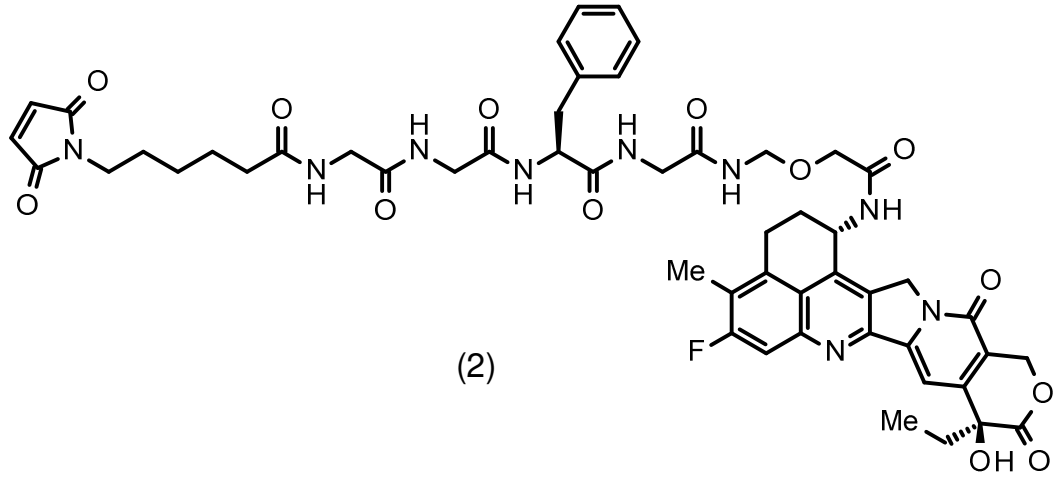
[00526] O método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco na presente invenção é distinguido pela obtenção de uma solução contendo um

produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio das etapas de:

(i) reduzir um anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 33]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i); e depois

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol,

e purificar a solução contendo um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco por meio da etapa de:

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

[00527] A frase "um produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco" na presente invenção refere-se ao conjugado anticorpo-fármaco em um estado não purificado imediatamente após realizar as etapas (i) a (iii), ou o conjugado anticorpo-fármaco em um estado parcialmente purificado por meio de uma operação diferente da cromatografia (por exemplo, filtração simples, exceto ultrafiltração). Exemplos de filtração

simples diferente da ultrafiltração incluem a microfiltração (filtração com um filtro de membrana).

[00528] O "produto não purificado ou produto bruto do conjugado anticorpo-fármaco" pode ser um produto com o pH ajustado de modo que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) possa atingir um pH adequado. Tal ajuste de pH pode ser preferencialmente realizado com uma solução aquosa de ácido acético e pode ser mais preferencialmente realizado com uma solução aquosa a 10% de ácido acético.

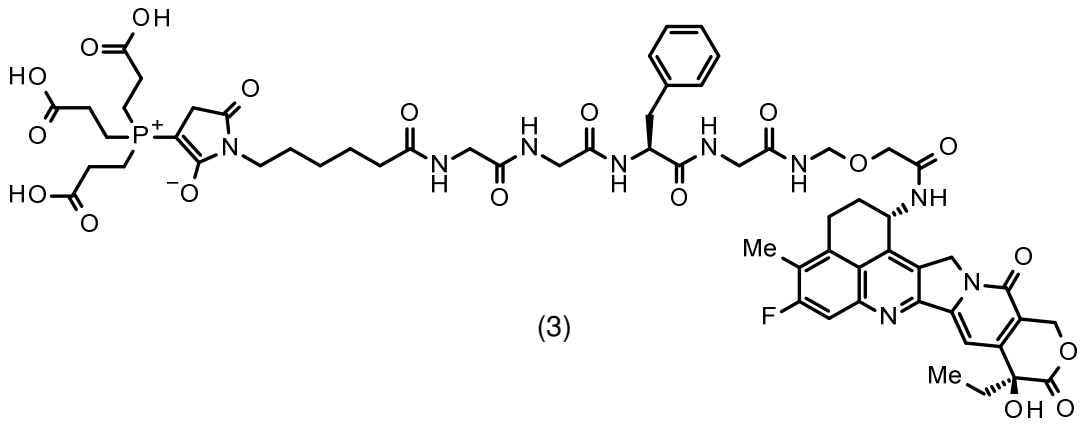
[00529] O termo "ultrafiltração" na presente invenção refere-se a um método de purificação para separar grandes moléculas de soluto e pequenas moléculas de soluto ou separar moléculas de soluto e moléculas de solvente por filtração através de uma membrana (membrana de ultrafiltração) tendo um tamanho de poro de cerca de 0,001 μm a cerca 0,05 μm. Em geral, as membranas de ultrafiltração têm um peso molecular de corte (MWCO) na faixa de 1 kDa a 1000 kDa. MWCO é geralmente definido como o peso molecular de um soluto esférico de modo que 90% das moléculas de soluto esférico sejam retidas pela membrana. A ultrafiltração na presente invenção pode ser preferencialmente realizada usando uma membrana de ultrafiltração com MWCO de 1 kDa a 100 kDa, e mais preferencialmente realizada usando uma membrana de ultrafiltração com MWCO de 30 kDa. Exemplos do material da membrana de ultrafiltração incluem celulose regenerada, acetato de celulose, poliamida aromática, álcool polivinílico, polissulfona, poliéter sulfona, fluoreto de polivinilideno, polietileno, poliacrilonitrila, nylon e cerâmica. A ultrafiltração na presente invenção pode ser preferencialmente realizada usando uma membrana de ultrafiltração cujo material é celulose regenerada, embora o material não esteja limitado a ela. Exemplos da membrana de ultrafiltração usada na presente invenção podem incluir um Pellicon (R) XL Cassette Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA), um Pellicon (R) 2 Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA) e um Pellicon (R) 3

Ultracel (R) (produzido pela Merck KGaA). A ultrafiltração pode se referir a um método de filtragem forçada por meio do controle de pressão ou centrifugação em um sentido estrito. Por outro lado, os métodos de filtragem por difusão passiva podem ser geralmente referidos como "diafiltração". No entanto, qualquer um dos métodos que utilizam uma membrana de ultrafiltração está incluído no escopo da "ultrafiltração" na presente invenção.

[00530] O termo "agregado" na presente invenção refere-se a uma partícula fina que consiste em uma associação de moléculas de proteína e qualquer outro componente e pode ser estável sob uma ampla faixa de pH e condutividade elétrica. A formação de agregados em uma formulação de conjugado de anticorpo-fármaco pode ter impactos indesejáveis do ponto de vista médico, por exemplo, possivelmente causando imunogenicidade ou distúrbio venoso em um paciente a quem a formulação será administrada. Consequentemente, é necessário suprimir a formação de agregados na formulação do conjugado anticorpo-fármaco.

[00531] No caso em que o agente redutor usado na etapa (i) é cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina, o composto em que o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2) é um composto representado pela fórmula (3).

[Fórmula Química 34]

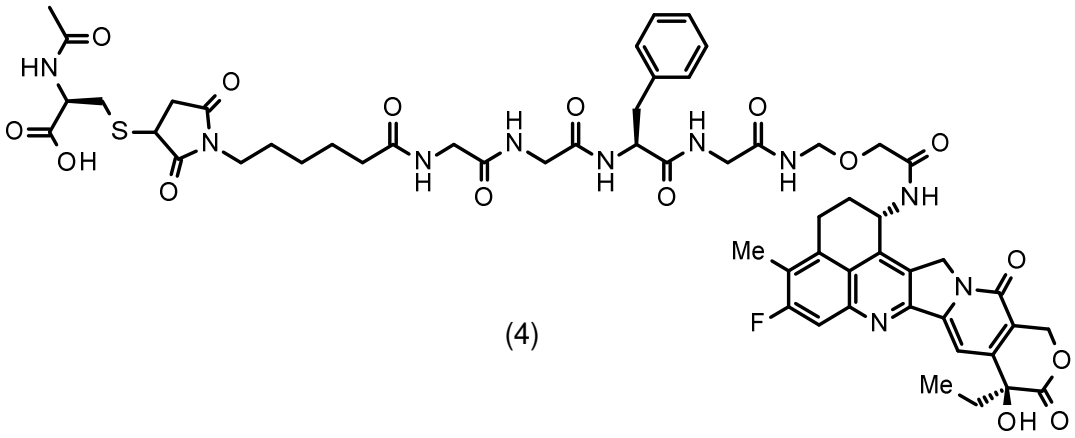


(3)

[00532] No caso em que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína, o composto em que o reagente com um grupo tiol

usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2) é um composto representado pela fórmula (4).

[Fórmula Química 35]



(4)

[00533] Preferencialmente 97%, mais preferencialmente 98%, ainda mais preferencialmente 99%, ainda mais preferencialmente 100%, do composto representado pela fórmula (3) e o composto representado pela fórmula (4) antes da etapa (iv) pode ser removido através da etapa (iv).

[00534] O pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5. Aqui, "cerca de 5" está preferencialmente na faixa de 4,7 a 5,3, mais preferencialmente na faixa de 4,8 a 5,2, ainda mais preferencialmente na faixa de 4,9 a 5,1, e ainda mais preferencialmente 5,0. A geração de agregados pode ser suprimida por ultrafiltração em tal pH. A quantidade de agregados após esta etapa é, preferencialmente, 4% ou menos, e mais preferencialmente 2% ou menos. Uma certa quantidade de agregados está contida na matéria-prima do anticorpo, e a quantidade de agregados nesta etapa é detectada como a quantidade total que os inclui.

[00535] Exemplos da solução tampão usada na etapa (iv) incluem uma solução tampão de histidina contendo um sal que consiste em um ácido forte e uma base forte, uma solução tampão de acetato contendo um sal que consiste em um ácido forte e uma base forte, e uma solução tampão de fosfato contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte, e uma

solução tampão de histidina contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte podem ser exemplificados preferencialmente.

[00536] A concentração do sal que consiste no ácido forte e na base forte é, preferencialmente, 0,2 a 1% em peso, mais preferencialmente 0,3 a 0,9% em peso, ainda mais preferencialmente 0,3 a 0,8% em peso, ainda mais preferencialmente 0,4 a 0,7% em peso, e ainda mais preferencialmente cerca de 0,5% em peso, em relação à solução tampão usada na etapa (iv). Aqui, "cerca de 0,5% em peso" é preferencialmente 0,4 a 0,6% em peso, e ainda mais preferencialmente 0,5% em peso.

[00537] O sal que consiste no ácido forte e na base forte contidos na solução tampão usada na etapa (iv) não é particularmente limitado, desde que os efeitos vantajosos da presente invenção sejam exibidos e, por exemplo, seja pelo menos um sal selecionado do grupo que consiste em cloreto de sódio, cloreto de potássio, sulfato de sódio e sulfato de potássio, ou um sal compreendendo uma combinação de dois ou mais deles, e é preferencialmente cloreto de sódio.

[00538] O método para produzir da presente invenção compreende uma etapa subsequente à etapa (iv) de (v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

[00539] O pH da solução tampão usada na etapa (v) não é particularmente limitado, desde que os efeitos vantajosos da presente invenção sejam exibidos e, por exemplo, esteja na faixa de 4 a 6, e preferencialmente cerca de 5. Aqui, "cerca de 5" está preferencialmente na faixa de 4,7 a 5,3, mais preferencialmente na faixa de 4,8 a 5,2, ainda mais preferencialmente na faixa de 4,9 a 5,1, e ainda mais preferencialmente 5,0.

[00540] A solução tampão usada na etapa (v) não é particularmente limitado, desde que os efeitos vantajosos da presente invenção sejam exibidos, e uma solução tampão de histidina é preferencialmente usada. Esta solução

tampão de histidina é substancialmente livre de um sal que consiste em um ácido forte e uma base forte.

[00541] O método acima pode remover subprodutos derivados do composto representado pela fórmula (2) através de ultrafiltração e minimizar adicionalmente a geração de agregados, e pode prover um método de purificação industrialmente excelente sem a necessidade de purificação por cromatografia (por exemplo, pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade).

6. Cálculo do número médio de moléculas de fármaco conjugadas no conjugado anticorpo-fármaco

[00542] O número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo do conjugado anticorpo-fármaco produzido pode ser determinado, por exemplo, por um método de cálculo com base na medição da absorbância de UV para o conjugado anticorpo-fármaco e o precursor de conjugação do mesmo em dois comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm (método UV), ou método de cálculo baseado na quantificação por medição por HPLC de fragmentos obtidos pelo tratamento do conjugado anticorpo-fármaco com um agente redutor (método HPLC).

[00543] O cálculo do número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo do conjugado anticorpo-fármaco pode ser realizado com referência às descrições na Publicação Internacional Nº WO 2014/057687, Publicação Internacional Nº WO 2015/098099, Publicação Internacional Nº WO 2015/115091, Publicação Internacional Nº WO 2015/155998, Publicação Internacional Nº WO 2018/135501, Publicação Internacional Nº WO 2018/212136, e assim por diante.

[00544] O método de HPLC pode ser realizado, por exemplo, da seguinte maneira.

(1) Preparação da amostra para análise de HPLC (redução do conjugado

anticorpo-fármaco)

[00545] Uma solução de conjugado anticorpo-fármaco (cerca de 1 mg/mL, 60 μL) é misturada com uma solução aquosa de ditiotreitol (DTT) (100 mM, 15 μL). Uma amostra na qual a ligação dissulfeto intercadeia do conjugado anticorpo-fármaco foi clivada por incubação da mistura por 30 minutos a 37°C é usada na análise de HPLC.

(2) Análise por HPLC

[00546] A análise de HPLC pode ser realizada em condições de medição de acordo com as características do anticorpo.

[00547] Por exemplo, no caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2), ou um anticorpo anti-HER3 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4), a análise de HPLC pode ser realizada sob as seguintes condições de medição.

[00548] Sistema HPLC: Sistema de HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

Detector: espectrômetro de absorção ultravioleta (comprimento de onda de medição: 280 nm)

Coluna: PLRP-S (2.1 × 50 mm, 8 μm, 1000 angstroms; Agilent Technologies, Inc., P/N PL1912-1802)

Temperatura da coluna: 80°C

Fase móvel A: solução aquosa contendo ácido trifluoroacético 0,04% (TFA)

Fase móvel B: solução de acetonitrila contendo TFA 0,04%

Programa de gradiente: 29%-36% (0-12,5 min), 36%-42% (12,5-15 min), 42%-29% (15-15,1 min), 29%-29% (15,1-25 min)

Volume de injeção de amostra: 15 μL

[00549] No caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou um anticorpo anti-CDH6 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8), a análise de HPLC pode ser realizada sob as seguintes condições de medição.

[00550] Sistema HPLC: Sistema de HPLC Agilent 1290 (Agilent Technologies, Inc.)

Detector: espectrômetro de absorção ultravioleta (comprimento de onda de medição: 280 nm)

Coluna: ACQUITY UPLC BEH Phenyl (2,1 × 50 mm, 1,7 μm, 130 angstroms; Waters Corporation, P/N 186002884)

Temperatura da coluna: 80°C

Fase móvel A: solução aquosa contendo ácido trifluoroacético 0,10% (TFA) e 2-propanol 15%

Fase móvel B: solução de acetonitrila contendo TFA 0,075% e 2-propanol 15%

Programa de gradiente: 14%-36% (0-15 min), 36%-80% (15-17 min), 80%-14% (17-17,01 min), 14% (17,01-25 min)

Volume de injeção de amostra: 10 μL

(3) Análise de dados

[00551] Em comparação com as cadeias leve (L_0) e pesada (H_0) de anticorpo não conjugado, as cadeias leves conjugadas com fármaco (cadeia leve conectada a uma molécula de fármaco: L_1) e pesadas (cadeia pesada conectada a uma molécula de fármaco: H_1, cadeia pesada conectada a duas moléculas de fármaco: H_2, cadeia pesada conectada a três moléculas de fármaco: H_3) exibem maior hidrofobicidade em proporção ao número de moléculas de fármaco conjugadas e, portanto, têm um maior tempo de retenção. Essas cadeias são, portanto, eluídas na ordem de L_0 e L_1 ou H_0, H_1, H_2, e H_3. Os picos de detecção podem ser atribuídos a qualquer um de L_0, L_1, H_0, H_1, H_2, e H_3 pela comparação dos tempos de retenção com L_0 e H_0.

[00552] Uma vez que o conector de fármaco tem absorção de UV, os valores de área de pico são corrigidos em resposta ao número de moléculas de conector de fármacos conjugadas de acordo com a seguinte expressão usando os coeficientes de absorção molar da cadeia leve ou pesada e do conector de fármaco.

[Fórm. mat. 1]

$$\text{Valor corrigido da área do pico da cadeia leve (Li)} = \text{Área do pico} \times \frac{\text{coeficiente de absorção molar da cadeia leve}}{\text{coeficiente de absorção molar da cadeia leve} + \text{O número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorção molar do conector de fármaco}}$$

[Fórm. mat. 2]

$$\text{Valor corrigido da área do pico da cadeia pesada (Hi)} = \text{Área do pico} \times \frac{\text{coeficiente de absorção molar da cadeia pesada}}{\text{coeficiente de absorção molar da cadeia pesada} + \text{O número de moléculas de fármaco conjugadas} \times \text{Coeficiente de absorção molar do conector de fármaco}}$$

[00553] Aqui, como o coeficiente de absorção molar (280 nm) da cadeia leve ou pesada de cada anticorpo, um valor estimado a partir da sequência de aminoácidos da cadeia leve ou pesada de cada anticorpo por um método de cálculo conhecido (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423) pode

ser usado.

[00554] Por exemplo, no caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2), um coeficiente de absorção molar de 26150 e um coeficiente de absorção molar de 81290 podem ser usados como valores estimados para as cadeias leve e pesada, respectivamente.

[00555] No caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4), um coeficiente de absorção molar de 34690 e um coeficiente de absorção molar de 95000 podem ser usados como valores estimados para as cadeias leve e pesada, respectivamente.

[00556] No caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6), um coeficiente de absorção molar de 26210 e um coeficiente de absorção molar de 68990 podem ser usados como valores estimados para as cadeias leve e pesada, respectivamente.

[00557] No caso em que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8), um

coeficiente de absorção molar de 31710 e um coeficiente de absorção molar de 79990 podem ser usados como valores estimados para as cadeias leve e pesada, respectivamente.

[00558] Como o coeficiente de absorção molar (280 nm) do conector de fármaco, o coeficiente de absorção molar medido (280 nm) de um composto no qual o grupo maleimidila é convertido em tioéter de succinimida pela reação de cada intermediário de conector de fármaco com mercaptoetanol ou N-acetilcisteína pode ser usado.

[00559] A razão da área do pico (%) de cada cadeia é calculada para o total dos valores corrigidos das áreas do pico de acordo com a seguinte expressão.

[Fórm. mat. 3]

$$\text{Razão de área de pico da cadeia leve} = \frac{A_{Li}}{A_{L0} + A_{L1}} \times 100$$

$$\text{Razão de área de pico da cadeia pesada} = \frac{A_{Hi}}{A_{H0} + A_{H1} + A_{H2} + A_{H3}} \times 100$$

A_{Li}, A_{Hi}: Valores corrigidos das áreas de pico respectivas de L_i, H_i

[00560] O número médio de moléculas de fármaco conjugadas no conjugado anticorpo-fármaco é calculado de acordo com a seguinte expressão.

[00561] Número médio de moléculas de fármaco conjugadas = (razão da área do pico $L_0 \times 0$ + razão da área do pico $L_1 \times 1$ + razão da área do pico $H_0 \times 0$ + razão da área do pico $H_1 \times 1$ + razão da área do pico $H_2 \times 2$ + razão da área do pico $H_3 \times 3$) / 100×2

[00562] Na presente invenção, o termo "conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco" refere-se a um conjugado anticorpo-fármaco de modo que o anticorpo em um conjugado fármaco-anticorpo produzido na presente invenção seja um anticorpo anti-HER2.

[00563] O anticorpo anti-HER2 é preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de

aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2.

[00564] O número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco usado na presente invenção é preferencialmente 7 a 8, mais preferencialmente 7,5 a 8, e ainda mais preferencialmente cerca de 8.

[00565] Na presente invenção, o termo "conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco" refere-se a um conjugado anticorpo-fármaco de modo que o anticorpo em um conjugado fármaco-anticorpo produzido na presente invenção seja um anticorpo anti-HER3.

[00566] O anticorpo anti-HER3 é preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada incluindo CDRH1 que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 26 a 35 de SEQ ID NO: 3, CDRH2 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 50 a 65 de SEQ ID NO: 3, e CDRH3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 98 a 106 de SEQ ID NO: 3, e uma cadeia leve incluindo CDRL1 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 24 a 39 de SEQ ID NO: 4, CDRL2 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 56 a 62 de SEQ ID NO: 4, e CDRL3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 95 a 103 de SEQ ID NO: 4,

mais preferencialmente um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada incluindo uma região variável da cadeia pesada consistindo em

uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 117 de SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve incluindo uma região variável da cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 113 da SEQ ID NO: 4,

e ainda mais preferencialmente um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído.

[00567] O número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco é preferencialmente 7 a 8, mais preferencialmente 7,5 a 8, e ainda mais preferencialmente cerca de 8.

[00568] Na presente invenção, o termo "conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco" refere-se a um conjugado anticorpo-fármaco de modo que o anticorpo em um conjugado fármaco-anticorpo produzido na presente invenção seja um anticorpo anti-GPR20.

[00569] O anticorpo anti-GPR20 é preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada incluindo CDRH1 que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 45 a 54 de SEQ ID NO: 5, CDRH2 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 69 a 78 de SEQ ID NO: 5, e CDRH3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 118 a 131 de SEQ ID NO: 5, e uma cadeia leve incluindo CDRL1 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 44 a 54 de SEQ ID NO: 6, CDRL2 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 70 a 76 de SEQ ID NO: 6, e CDRL3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 109 a 117 de SEQ ID

NO: 6, mais preferencialmente um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada incluindo uma região variável da cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 142 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve incluindo uma região variável da cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 129 da SEQ ID NO: 6, e ainda mais preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído.

[00570] O número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco é preferencialmente 2 a 8, mais preferencialmente 3 a 8, ainda mais preferencialmente 7 a 8, ainda mais preferencialmente 7,5 a 8, e ainda mais preferencialmente cerca de 8.

[00571] Na presente invenção, o termo "conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco" refere-se a um conjugado anticorpo-fármaco de modo que o anticorpo em um conjugado fármaco-anticorpo produzido na presente invenção seja um anticorpo anti-CDH6.

[00572] O anticorpo anti-CDH6 é preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada incluindo CDRH1 que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 45 a 54 de SEQ ID NO: 7, CDRH2 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 69 a 78 de SEQ ID NO: 7, e CDRH3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 118 a 130 de SEQ ID NO: 7, e uma cadeia leve incluindo CDRL1 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo

nos resíduos de aminoácidos 44 a 54 de SEQ ID NO: 8, CDRL2 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 70 a 76 de SEQ ID NO: 8, e CDRL3 consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 109 a 116 de SEQ ID NO: 8,

mais preferencialmente um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada incluindo uma região variável da cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 141 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve incluindo uma região variável da cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 128 da SEQ ID NO: 8,

e ainda mais preferencialmente um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste em resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído.

[00573] O número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco é preferencialmente 2 a 8, mais preferencialmente 3 a 8, ainda mais preferencialmente 7 a 8, ainda mais preferencialmente 7,5 a 8, e ainda mais preferencialmente cerca de 8.

7. Produção de composição farmacêutica

[00574] A composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco de acordo com a presente invenção, uma solução tampão e um excipiente.

[00575] A composição farmacêutica pode ser produzida pela produção (incluindo purificação) de um conjugado anticorpo-fármaco pelo método

descrito acima, e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

[00576] A solução tampão adicionada na etapa (vi) é preferencialmente a mesma que a solução tampão usada na etapa (v). Assim, uma solução tampão de histidina pode ser preferencialmente usada como a solução tampão usada na etapa (vi).

[00577] No caso em que a solução tampão usada na etapa (vi) é uma solução tampão de histidina, uma solução aquosa de histidina pode ser preferencialmente usada para ajuste de pH a ser realizado na etapa (viii).

[00578] O termo "excipiente" na presente invenção refere-se a uma substância a ser adicionada para prover um tamanho ou concentração específica, por exemplo, com o propósito de melhorar um produto farmacêutico no que diz respeito à moldagem, manuseio e conveniência de administração. O excipiente não é particularmente limitado, desde que os efeitos vantajosos da presente invenção sejam exibidos e exemplos dos mesmos incluem sacarose, trealose e sorbitol.

[00579] Para o excipiente adicionado na etapa (ix), a sacarose pode ser preferencialmente usada.

[00580] Preferencialmente, a composição farmacêutica de acordo com

a presente invenção adicionalmente contém um tensoativo. Assim, a composição farmacêutica de acordo com a presente invenção é mais preferencialmente uma composição farmacêutica contendo o conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo.

[00581] Esta composição farmacêutica pode ser produzida realizando as etapas, incluindo a etapa (ix) descrita acima e a etapa subsequente adicional (x) de adição de um tensoativo.

[00582] Para o tensoativo adicionado na etapa (x), polissorbato 80 ou polissorbato 20 podem ser preferencialmente usados.

[00583] A solução tampão, o excipiente, o tensoativo e a concentração do conjugado anticorpo-fármaco na composição farmacêutica e o pH da composição farmacêutica podem ser selecionados apropriadamente de acordo com o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido e o tipo de anticorpo.

[00584] Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), uma solução tampão de histidina (preferencialmente, uma solução tampão de histidina 25 mM), sacarose (preferencialmente, 9% de sacarose) e polissorbato 80 (preferencialmente, 0,03% de polissorbato 80) podem ser preferencialmente usados para a solução tampão, excipiente e

tensoativo na composição farmacêutica. Nesse caso, a concentração do conjugado anticorpo-fármaco na composição farmacêutica é preferencialmente 20 mg/mL, e o pH da composição farmacêutica é preferencialmente 5,5.

[00585] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluída), uma solução tampão de histidina (preferencialmente, uma solução tampão de histidina 25 mM), sacarose (preferencialmente, 9% de sacarose) e polissorbato 20 (preferencialmente, 0,03% de polissorbato 20) podem ser preferencialmente usados para a solução tampão, excipiente e tensoativo na composição farmacêutica. Nesse caso, a concentração do conjugado anticorpo-fármaco na composição farmacêutica é preferencialmente 20 mg/mL, e o pH da composição farmacêutica é preferencialmente 5,4.

[00586] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 da SEQ ID 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluída), uma solução

tampão de histidina (preferencialmente, uma solução tampão de histidina 10 mM), sacarose (preferencialmente, 9% de sacarose) e polissorbato 80 (preferencialmente, 0,03% de polissorbato 80) podem ser preferencialmente usados para a solução tampão, excipiente e tensoativo na composição farmacêutica. Nesse caso, a concentração do conjugado anticorpo-fármaco na composição farmacêutica é preferencialmente 20 mg/mL, e o pH da composição farmacêutica é preferencialmente 5,4.

[00587] No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 da SEQ ID 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluída), uma solução tampão de histidina (preferencialmente, uma solução tampão de histidina 10 mM), sacarose (preferencialmente, 9% de sacarose) e polissorbato 80 (preferencialmente, 0,03% de polissorbato 80) podem ser preferencialmente usados para a solução tampão, excipiente e tensoativo na composição farmacêutica. Nesse caso, a concentração do conjugado anticorpo-fármaco na composição farmacêutica é preferencialmente 20 mg/mL, e o pH da composição farmacêutica é preferencialmente 5,4.

8. Uso de composição farmacêutica

[00588] Pode-se esperar que a composição farmacêutica da presente invenção exerça um efeito terapêutico por aplicação como terapia sistêmica a pacientes e, adicionalmente, por aplicação local a tecidos cancerosos.

[00589] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser preferencialmente usada para um mamífero, mas é mais preferencialmente

usada para um humano.

[00590] Exemplos da via de administração aplicável à administração da composição farmacêutica da presente invenção podem incluir as vias intravenosa, intradérmica, subcutânea, intramuscular e intraperitoneal, e as vias intravenosas são preferidas.

[00591] No caso em que a composição farmacêutica da presente invenção é uma injeção aquosa, ela pode preferencialmente ser diluída com um diluente adequado e então administrada como uma infusão intravenosa. Para o diluente, uma solução de dextrose, soro fisiológico e semelhantes podem ser exemplificados, uma solução de dextrose pode ser preferencialmente exemplificada e uma solução de dextrose a 5% pode ser mais preferencialmente exemplificada.

[00592] No caso em que a composição farmacêutica da presente invenção é uma injeção liofilizada, ela pode preferencialmente ser dissolvida em água para injeção, subsequentemente uma quantidade necessária pode ser diluída com um diluente adequado e então administrada como uma infusão intravenosa. Para o diluente, uma solução de dextrose, soro fisiológico e semelhantes podem ser exemplificados, uma solução de dextrose pode ser preferencialmente exemplificada e uma solução de 5% pode ser mais preferencialmente exemplificada.

[00593] A composição farmacêutica da presente invenção pode exibir um efeito farmacêutico mesmo em uma dosagem pequena quando o conjugado anticorpo-fármaco da presente invenção tem uma afinidade maior para um antígeno, isto é, uma afinidade maior (= valor de Kd inferior) em termos da constante de dissociação (ou seja, o valor Kd) para o antígeno. Assim, a dosagem da composição farmacêutica da presente invenção pode ser determinada tendo em vista a situação relativa à afinidade com o antígeno. Quando a composição farmacêutica da presente invenção é administrada a um ser humano, por exemplo, cerca de 0,001 a 100 mg/kg em termos de

conjugado anticorpo-fármaco (aqui, "mg/kg" refere-se à dosagem do conjugado anticorpo-fármaco por kg de peso corporal de um humano) precisa ser administrado uma vez ou administrado em várias porções com intervalos de 1 a 180 dias, e um método de administração de 0,8 mg/kg a 8 mg/kg uma vez a cada três semanas pode ser exemplificado preferencialmente.

[00594] A dosagem e o intervalo de administração do conjugado anticorpo-fármaco podem ser apropriadamente selecionados de acordo com o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido e o tipo de anticorpo. Por exemplo, no caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER2 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 da SEQ ID 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2, ou um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 2), um método de administração de 0,8 mg/kg, 1,6 mg/kg, 3,2 mg/kg, 5,4 mg/kg, 6,4 mg/kg, 7,4 mg/kg ou 8 mg/kg do conjugado anticorpo-fármaco uma vez a cada três semanas podem ser preferencialmente exemplificadas, um método de administração de 5,4 mg/kg, 6,4 mg/kg, 7,4 mg/kg ou 8 mg/kg do conjugado anticorpo-fármaco uma vez a cada três semanas pode ser mais preferencialmente exemplificado, e um método de administração de 5,4 mg/kg ou 6,4 mg/kg do conjugado anticorpo-fármaco uma vez a cada três semanas pode ser ainda mais preferencialmente exemplificado. No caso em que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-

fármaco a ser produzido está na faixa de 7 a 8 e o anticorpo é um anticorpo anti-HER3 (preferencialmente, um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo na sequência de aminoácido pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4, ou uma variante do anticorpo em que um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada é excluído), um método de administração de 1,6 mg/kg, 3,2 mg/kg, 4,8 mg/kg, 5,6 mg/kg, 6,4 mg/kg, 8,0 mg/kg, 9,6 mg/kg ou 12,8 mg/kg do conjugado anticorpo-fármaco uma vez a cada três semanas pode ser exemplificado preferencialmente, e um método de administração de 4,8 mg/kg, 5,6 mg/kg ou 6,4 mg/kg do conjugado anticorpo-fármaco uma vez a cada três semanas podem ser exemplificados mais preferencialmente.

[00595] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada para tratar câncer e pode ser preferencialmente usada para tratar pelo menos um câncer selecionado do grupo que consiste em câncer de mama, câncer gástrico (também denominado adenocarcinoma gástrico), câncer colorretal (também chamado de câncer retal e de cólon e incluindo câncer de cólon e reto), câncer de pulmão (incluindo câncer de pulmão de células pequenas e câncer de pulmão de células não pequenas), câncer de esôfago, câncer de cabeça e pescoço (incluindo câncer de glândula salivar e câncer de faringe), adenocarcinoma de junção esofagogástrica, câncer do trato biliar (incluindo câncer do ducto biliar), doença de Paget, câncer pancreático, câncer de ovário, carcinossarcoma uterino, câncer urotelial, câncer de próstata, câncer de bexiga, tumor estromal gastrointestinal, câncer de colo uterino, carcinoma de células escamosas, câncer peritoneal, câncer de fígado, câncer hepatocelular, câncer endometrial, câncer renal, câncer vulvar, câncer de tireoide, câncer de pênis, leucemia, linfoma maligno, plasmocitoma, mieloma, glioblastoma multiforme, osteossarcoma e melanoma.

[00596] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser

usada seletivamente como um agente para terapia de fármacos, que é um método principal para o tratamento do câncer e, como resultado, pode retardar o desenvolvimento de células cancerosas, inibir o seu crescimento e adicionalmente matar as células cancerosas. Esses efeitos podem permitir que os pacientes com câncer fiquem livres dos sintomas causados pelo câncer ou alcancem melhora na QV dos pacientes com câncer e alcancem um efeito terapêutico ao sustentar a vida dos pacientes com câncer. Mesmo que a composição farmacêutica da presente invenção não consiga matar as células cancerosas, ela pode atingir uma QV mais alta de pacientes com câncer, ao mesmo tempo que atinge uma sobrevida de longo prazo, inibindo ou controlando o crescimento das células cancerosas.

[00597] Em tal terapia de fármaco, a composição farmacêutica da presente invenção pode ser usada como um agente isolado e, além disso, pode ser usada como um agente em combinação com uma terapia adicional em terapia adjuvante e pode ser combinada com operação cirúrgica, radioterapia, terapia hormonal, ou semelhante. Além disso, ela também pode ser utilizada como agente para terapia de fármaco em terapia neoadjuvante.

[00598] Além do uso terapêutico como descrito acima, por exemplo, um efeito profilático, tal como suprimir o crescimento de pequenas células cancerosas metastáticas e adicionalmente matá-las, também pode ser esperado para a composição farmacêutica da presente invenção. Por exemplo, um efeito de inibir e matar células cancerosas em um fluido corporal no curso da metástase ou um efeito de, por exemplo, inibir e matar pequenas células cancerosas imediatamente após a implantação em qualquer tecido pode ser esperado. Consequentemente, a inibição da metástase do câncer ou um efeito profilático pode ser esperado, particularmente, após a remoção cirúrgica do câncer.

[00599] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada em combinação com outros agentes de tratamento do câncer. O

efeito antitumoral pode ser aumentado em conformidade. Outros agentes de tratamento de câncer usados para tal fim podem ser administrados a um indivíduo simultaneamente com, separadamente ou subsequentemente à composição farmacêutica da presente invenção e podem ser administrados enquanto varia o intervalo de administração para cada um. Esse agente de tratamento de câncer não é limitado, desde que tenha atividade antitumoral e um exemplo do mesmo é pelo menos um selecionado do grupo que consiste em irinotecano (CPT-11), cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, fluorouracil (5-FU), gencitabina, capecitabina, paclitaxel, docetaxel, doxorrubicina, epirrubicina, ciclofosfamida, mitomicina C, um agente contendo tegafur/gimeracil/oteracil, cetuximabe, panitumumabe, bevacizumabe, ramucirumabe, regorafenibe, um agente contendo trifluridina/tipiracila, aflotinibe, gefitinibe, erlotinibe, afatinibe, metotrexato, pemetrexede, trastuzumabe, emtansina, trastuzumabe, pertuzumabe, tamoxifeno, toremifeno, fulvestrante, leuprorelina, goserelina, letrozol, anastrozol e uma formulação de progesterona.

Exemplos

[00600] A presente invenção é mais especificamente descrita com referência aos Exemplos mostrados abaixo. No entanto, a presente invenção não se limita a estes.

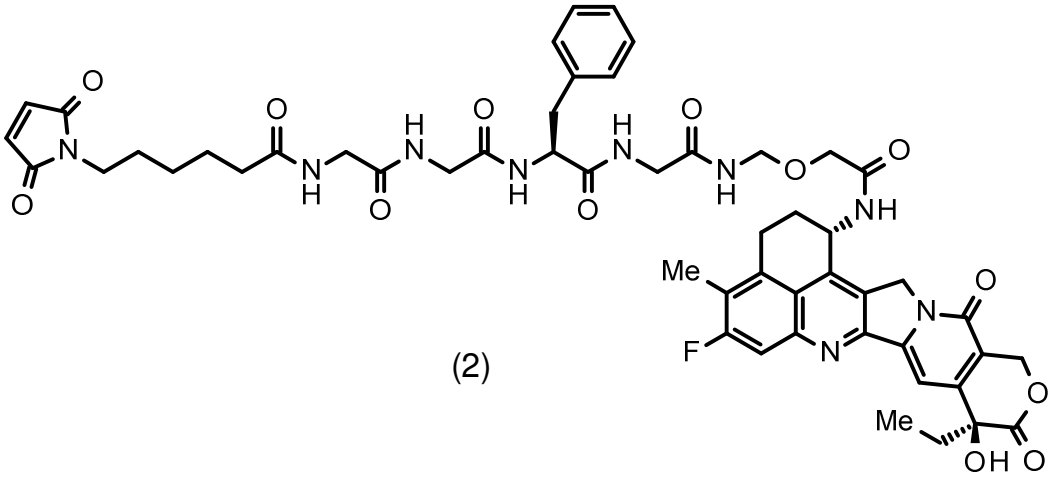
[Exemplo 1] Exame da solução tampão

[00601] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2) foi diluída com várias soluções tampão (solução tampão de acetato 10 mM, solução tampão de fosfato 10 mM ou solução tampão de PIPES 20 mM), à qual foi adicionada solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L, e várias soluções

aquosas fracamente alcalinas (solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L (doravante, também referida como "Na_2HPO_4 aq."), solução aquosa saturada de acetato de sódio (daqui em diante, também referida como "CH_3COONa aq."), ou solução aquosa de hidrogenocarbonato de sódio 0,5 mol/L (doravante, também referida como "$NaHCO_3$ aq.)), foram então adicionados a ela para ajustar o pH para 7. Sob agitação a 37°C, 4,8 equivalentes ou 4,9 equivalentes de uma solução aquosa de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (doravante, também referido como "TCEP") (1 mg/mL) por molécula de anticorpo foram adicionados, e o resultante foi agitado para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00602] Para a solução de reação obtida, 9,2 equivalentes ou 9,8 equivalentes de um composto representado pela fórmula (2):

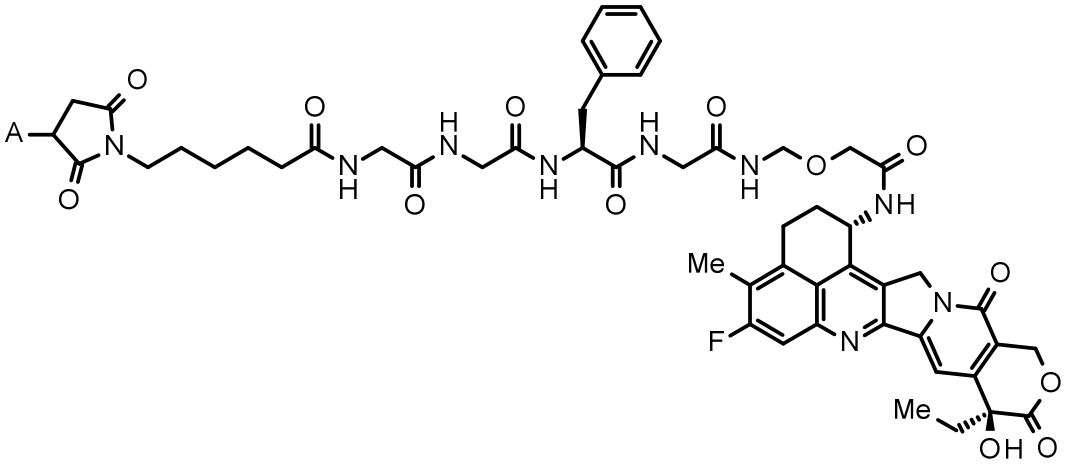
[Fórmula Química 36]



(2)

(também referido como composto (2)) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% foram adicionados com agitação a uma temperatura interna de 15°C ou 25°C para ligar o composto (2) ao anticorpo. A seguir, foi adicionada solução aquosa de N-acetilcisteína 50 mmol/L para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2). Isso proveu um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 37]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER2 por meio de uma ligação tioéter.

[00603] A DAR do conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco obtido foi medida através de um método de HPLC. O teor de agregado foi medido através da SEC.

[00604] Os resultados são mostrados na Tabela 1.

[Tabela 1]

Tampão	Ajuste de pH	Etapa de redução		Etapa de conjugação		DAR	Agregado
		TCEP	Temperatura interna	Composto (2)	Temperatura interna		
Solução tampão de acetato	Na_2HPO_4 aq.	4,8 equivalentes	37°C	9,2 equivalentes	15°C	7,89	0,66%
Solução tampão de acetato	Na_2HPO_4 aq.	4,8 equivalentes	37°C	9,2 equivalentes	25°C	7,88	0,92%
Solução tampão de fosfato	Na_2HPO_4 aq.	4,8 equivalentes	37°C	9,2 equivalentes	15°C	7,89	1,54%
Solução tampão de PIPES	Na_2HPO_4 aq.	4,8 equivalentes	37°C	9,2 equivalentes	15°C	7,89	1,61%
Solução tampão de acetato	CH_3COONa aq.	4,9 equivalentes	37°C	9,8 equivalentes	15°C	7,80	1,13%
Solução tampão de acetato	$NaHCO_3$ aq.	4,9 equivalentes	37°C	9,8 equivalentes	15°C	7,81	2,13%

[00605] Dentre os resultados da Tabela 1, destaca-se o caso em que a solução tampão de acetato submetida ao ajuste do pH por meio de solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico apresentou o menor teor de agregado.

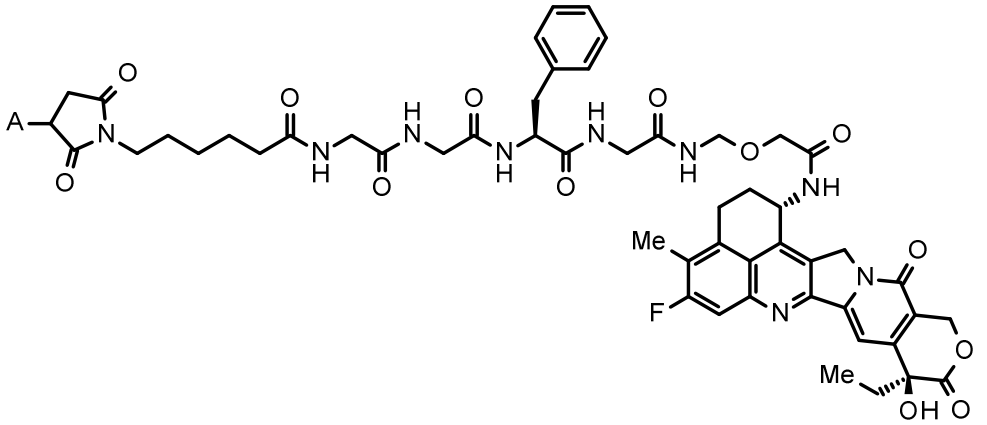
[Exemplo 2] Exame da etapa de ultrafiltração (1)

[00606] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2) foi diluída com solução tampão de acetato 10 mM (pH 5,5), à qual solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L (5 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, e solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L foi então adicionada a ela para ajustar o pH para 7,4.

[00607] Sob agitação de 35 a 39°C, solução aquosa de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina 0,010 mol/L (6 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 35 a 39°C durante 2,5 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00608] À solução de reação obtida, o composto (2) (12,5 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% foi adicionado com agitação a uma temperatura interna de 13 a 17°C para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 mol/L (35 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 1 hora para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH da solução de reação foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução de reação contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 38]



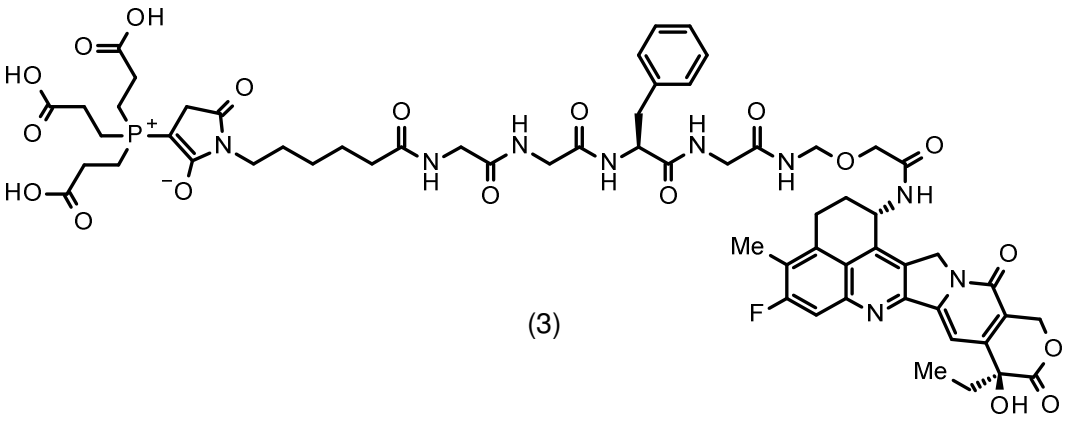
em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER2 por meio de uma ligação tioéter.

[00609] A solução de reação obtida foi circulada para ultrafiltração através da membrana de ultrafiltração Pellicon (R) XL Cassette Ultracel (R) (produzida por Merck KGaA) com uma bomba de rolete enquanto a solução tampão de histidina 26 mM (pH 5,0) ou solução tampão de histidina 26 nM contendo cloreto de sódio 0,5% (pH 5,0) foi adicionada à mesma. A solução tampão de histidina 26 mM (pH 5,0) e solução tampão de histidina 26 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) usados estavam em quantidades de 5 vezes, 10 vezes ou 15 vezes a quantidade da solução de reação obtida. O teor de subproduto derivado do composto (2) com base no conjugado anticorpo-fármaco após a ultrafiltração foi medido. Para comparação, o teor de subproduto derivado do composto (2) sem ultrafiltração foi medido (em tais casos, a quantidade de solução tampão usada foi indicada como 0).

[00610] Exemplos de subprodutos derivados do composto (2) incluem um composto no qual tris(2-carboxietil)fosfina é adicionada ao grupo maleimidila do composto (2), isto é, um composto representado pela fórmula (3):

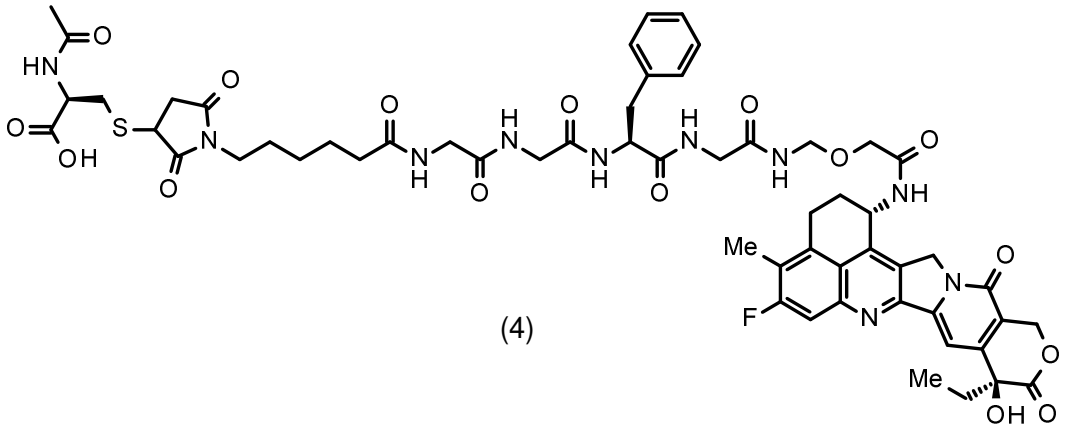
[Fórmula Química 39]



(3)

(também referido como composto (3)), e um composto no qual N-acetilcisteína é adicionada ao grupo maleimidila do composto (2), isto é, um composto representado pela fórmula (4):

[Fórmula Química 40]



(4)

(também referido como composto (4)). Na medição do teor de subproduto derivado do composto (2), um método de HPLC foi realizado para determinar o teor do composto (3) e do composto (4) com base no conjugado anticorpo-fármaco. Os resultados são mostrados na Tabela 2 e Figura 1.

[Tabela 2]

Quantidade de solução tampão / quantidade de solução de reação	Solução tampão de histidina		Solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,5%	
	Teor do Composto (3) (%)	Teor do Composto (4) (%)	Teor do Composto (3) (%)	Teor do Composto (4) (%)
0	23,37	27,12	23,25	26,78
5	10,03	8,19	3,53	4,67
10	4,91	2,76	0,58	0,98
15	2,60	1,04	0,11	0,25

[00611] A comparação dos resultados na Tabela 2 com a mesma

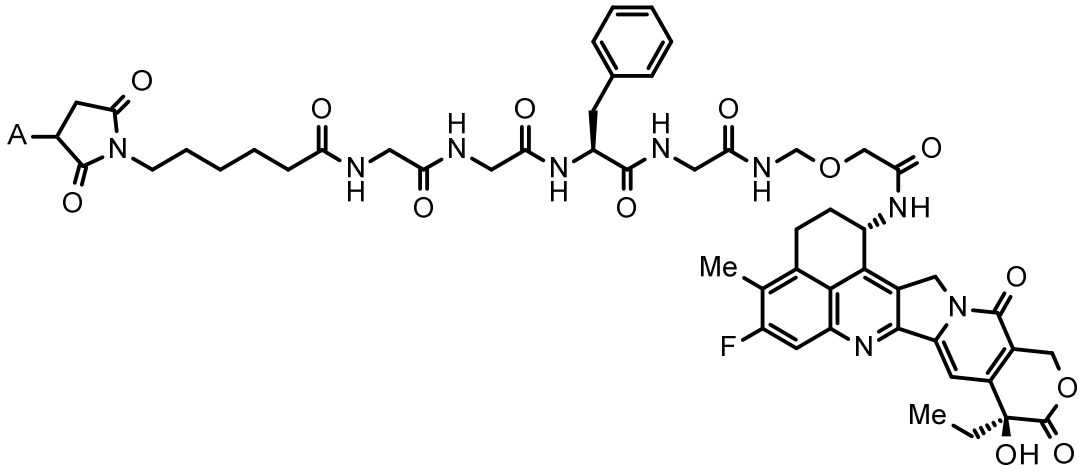
quantidade de solução tampão/quantidade de solução de reação mostra que o teor do composto (3) e do composto (4) quando a solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio foi usada foram menores do que aqueles quando a solução tampão de histidina foi usada.

[Exemplo 3] Exame da etapa de ultrafiltração (2)

[00612] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2) foi diluída com solução tampão de acetato 10 mM, à qual solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L foi adicionada, e solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L foi então adicionada a ela para ajustar o pH para 7,3. A isso, foi adicionada solução aquosa de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina 1 mg/mL e o resultante foi agitado para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00613] À solução de reação obtida, o composto (2) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% foi adicionado para ligar o composto (2) ao anticorpo. A seguir, foi adicionada solução aquosa de N-acetilcisteína 50 mmol/L para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2). Isso proveu uma solução de reação contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 41]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER2 por meio de uma ligação tioéter.

[00614] A solução de reação obtida foi circulada para ultrafiltração através de Pellicon (R) XL Cassette Ultracel (R) (produzida por Merck KGaA) com uma bomba de rolete enquanto a solução tampão de histidina (pH 5,0 ou pH 5,8) ou solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,4% (pH 5,0 ou pH 5,8) foi adicionado à mesma. As soluções tampão de histidina usadas, cada uma, tinha uma concentração de 10,8 mM. As soluções tampão de histidina (pH 5,0 e pH 5,8) utilizadas foram, cada uma, em uma quantidade de 15 vezes a quantidade da solução de reação obtida. As soluções tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,4% (pH 5,0 e pH 5,8) utilizadas foram, cada uma, em uma quantidade de 10 vezes a quantidade da solução de reação obtida. O teor de agregado após a ultrafiltração foi medido através de SEC. Para comparação, o teor de agregado sem ultrafiltração foi medido (em tais casos, a quantidade de solução tampão usada foi indicada como 0). Os resultados são mostrados na Tabela 3 e Figura 2.

[Tabela 3]

Tampão	pH	Quantidade de solução tampão / quantidade de solução de reação	Teor de agregado
Solução tampão de histidina	5,8	0	1,36
		15	1,62
Solução tampão de histidina	5,0	0	1,36

		15	1,3
Solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,4%	5,8	0	1,49
		10	2,72
Solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio 0,4%	5,0	0	1,39
		10	1,59

[00615] Os resultados na Tabela 3 mostram que, no caso de ultrafiltração realizada com solução tampão de pH 5,8, o teor de agregado quando a solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio foi usada foi maior do que quando a solução tampão de histidina foi usada. No caso da ultrafiltração realizada com solução tampão de pH 5,0, por outro lado, o teor de agregado quando se utilizou a solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio foi comparável ao da solução tampão de histidina.

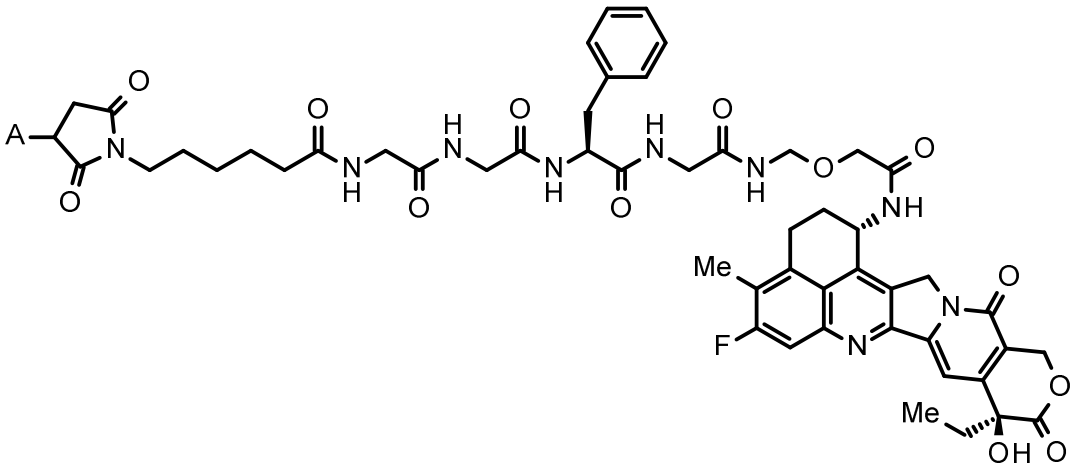
[Exemplo 4] Produção de composição farmacêutica contendo conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco (1)

[00616] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2) (peso da solução: 5,4 kg; correspondente a 120 g do anticorpo) foi colocada em um vaso de reação de vidro, e solução tampão de acetato 0,01 mol/L(4,3 L, pH 5,5) foi adicionada ao mesmo. À essa solução, solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L (8,3 mL; 5 equivalentes por anticorpo) foi adicionada, e solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L foi então adicionada a ela para ajustar o pH para 7,3. Sob agitação de 35 a 39°C, solução aquosa de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina 0,010 mol/L (390 mL; 4,7 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 35 a 39°C durante 2 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00617] A solução de reação obtida foi resfriada, e o composto (2) (8,2 g; 9,7 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% (900 mL) foi adicionado sob agitação a uma

temperatura interna de 13 a 17°C durante 20 minutos, e o resultante foi agitado à mesma temperatura durante 1 hora para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 mol/L (210 mL; 25 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 1 hora para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 42]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER2 por meio de uma ligação tioéter.

[00618] A solução obtida foi circulada para ultrafiltração através de três membranas de Pellicon (R) 2 Mini Cassette Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA, 0,1 m^2) com uma bomba de rolete enquanto a solução tampão de histidina 26 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) foi adicionada para remover subprodutos derivados do composto (2). Além disso, a solução foi circulada para ultrafiltração enquanto solução tampão de histidina 26 mM (pH 5,0) foi adicionada para remover o cloreto de sódio. Em seguida, o pH do resultante foi ajustado para 5,5 usando uma solução aquosa de histidina, e

posteriormente concentrada para obter aproximadamente 4 L de uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco.

[00619] Além disso, uma porção de 3,86 kg foi retirada da solução, à qual 364 g de sacarose foram adicionados para se dissolver nela. Além disso, a solução tampão de histidina contendo sacarose 9% (pH 5,5) foi adicionada para ajustar a concentração de proteína para aproximadamente 20 mg/mL e, assim, uma composição farmacêutica (5,7 kg) contendo o conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco foi obtida. A concentração de proteína da composição farmacêutica, o rendimento de proteína e o número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo (n) foram 20,4 mg/mL, 112 g e 7,7, respectivamente.

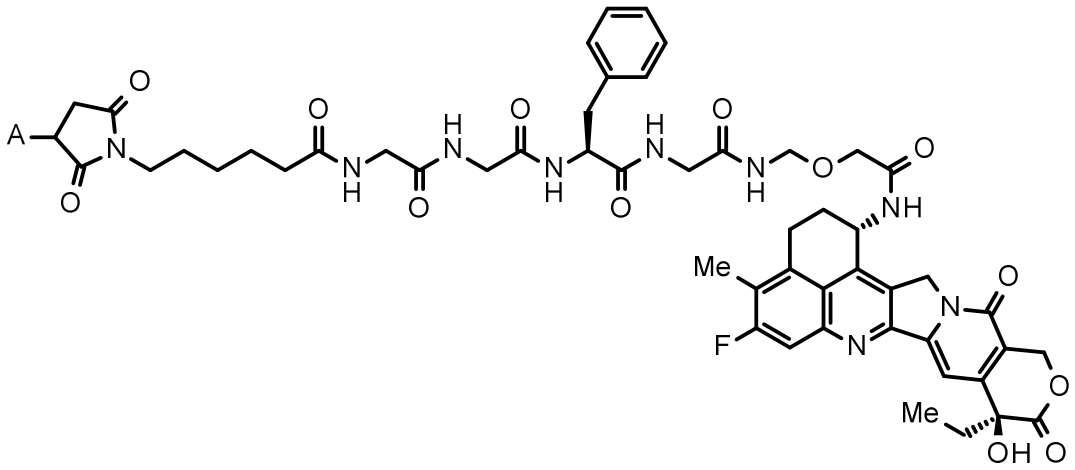
[Exemplo 5] Produção de composição farmacêutica contendo conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco (2)

[00620] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER2 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2) (peso da solução: 89 g; correspondente a 2,0 g do anticorpo) foi colocada em um vaso de reação de vidro, e solução tampão de acetato 0,01 mol/L (72 mL, pH 5,5) foi adicionada ao mesmo. À essa solução, solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L (0,14 mL; 5 equivalentes por anticorpo) foi adicionada, e solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L foi então adicionada a ela para ajustar o pH para 7,3. Sob agitação de 35 a 39°C, solução aquosa de cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina 0,010 mol/L (6,3 mL; 4,6 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 35 a 39°C durante 2 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00621] A solução de reação obtida foi resfriada, e o composto (2) (140

mg; 9,6 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% (13 mL) foi adicionado sob agitação a uma temperatura interna de 13 a 17°C, e o resultante foi agitado à mesma temperatura durante 1 hora para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 mol/L (3,4 mL; 25 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 40 minutos para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 43]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER2 por meio de uma ligação tioéter.

[00622] Após 1 g de cloreto de sódio ter sido adicionado à solução obtida, a solução foi circulada para ultrafiltração através de um Pellicon (R) XL Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA, 50 cm^2) com uma bomba de rolete enquanto a solução tampão de histidina 26 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) foi adicionada para remover subprodutos derivados do composto (2). Além disso, a solução foi circulada para ultrafiltração enquanto

solução tampão de histidina 26 mM (pH 5,0) foi adicionada para remover o cloreto de sódio. Em seguida, o resultante foi concentrado enquanto o pH foi ajustado para 5,5 usando uma solução aquosa de histidina e, assim, aproximadamente 65 g de uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco (64,5 g, 64,1 mL, concentração de proteína: 28,5 mg/mL, rendimento de proteína: 1,83 g) foram obtidas.

[00623] Adicionalmente, uma porção de 64 g foi retirada da solução, à qual foram adicionados 19 mL de solução tampão de histidina (pH 5,5) contendo 7,7 g de sacarose, e além disso, a solução tampão de histidina contendo sacarose 9% (pH 5,5) foi adicionada para ajustar a concentração de proteína para aproximadamente 20 mg/mL e, assim, uma composição farmacêutica (93 g) contendo o conjugado anticorpo anti-HER2-fármaco foi obtida. A concentração de proteína da composição farmacêutica, o rendimento de proteína e o número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo (n) foram 20,3 mg/mL, 1,8 g e 7,8, respectivamente.

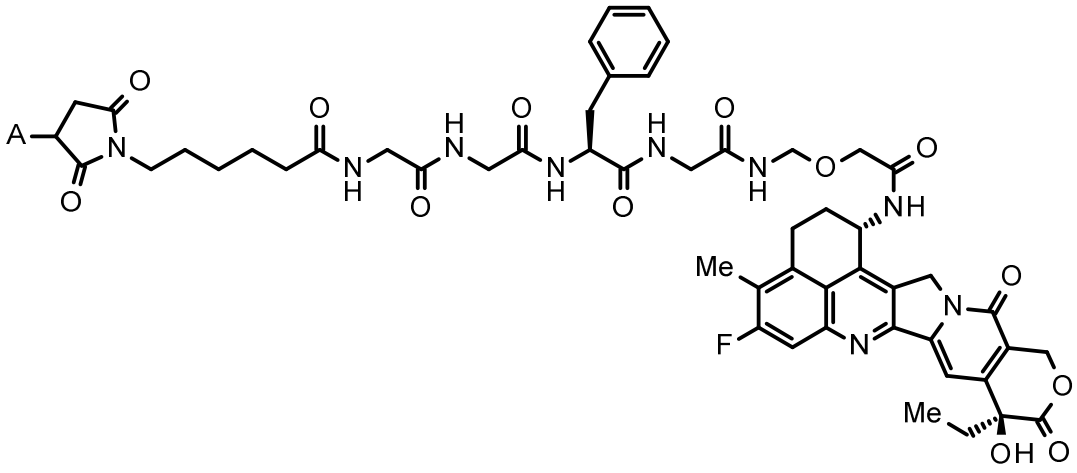
[Exemplo 6] Produção de composição farmacêutica contendo conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco

[00624] Uma solução contendo um anticorpo anti-HER3 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo na sequência de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 4) (peso da solução: 43,95 kg; correspondente a 3,00 kg do anticorpo) foi colocada em um reator de uso único de 400 L, para o qual a solução tampão de acetato 0,01 mol/L (pH 5,5, 255 kg) contendo polissorbato 20 (60,0 g) e solução aquosa de EDTA 0,5 mol/L (224,5 g; 5 equivalentes por anticorpo) foram adicionalmente adicionadas à mesma. A esta solução, foi adicionada solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico 0,3 mol/L para ajustar o pH para 7,0. Sob agitação de 33 a 37°C, uma solução aquosa (12,3 kg) contendo cloridrato de tris(2-

carboxietil)fosfina (35,1 g: 6,0 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 33 a 37°C durante 2,5 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00625] A solução de reação obtida foi resfriada, e o composto (2) (200,5 g; 9,5 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% (21,1 kg) contendo solução aquosa de ácido acético a 10% (116,4 g) foi adicionado sob agitação a uma temperatura interna de 12 a 17°C durante 50 minutos, e o resultante foi agitado à mesma temperatura durante 0,5 hora para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 mol/L (3,11 kg; 15 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 0,5 hora para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 44]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-HER3 por meio de uma ligação tioéter.

[00626] A solução obtida foi circulada para ultrafiltração através de

quatro membranas de Pellicon (R) 2 Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA, 2,5 m^2) com um aparelho de ultrafiltração automatizado enquanto a solução tampão de histidina 26,5 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) foi adicionada para remover subprodutos derivados do composto (2). Além disso, a solução foi circulada para ultrafiltração enquanto solução tampão de histidina 26,5 mM (pH 5,0) foi adicionada para remover o cloreto de sódio. Em seguida, o resultante foi concentrado enquanto o pH foi ajustado para 5,4 usando solução aquosa de histidina 26,5 mM e, assim, 97,4 kg de uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco (96,5 L, concentração de proteína: 30,5 mg/mL, rendimento de proteína: 2,94 kg) foram obtidos.

[00627] Adicionalmente, uma porção de 48,6 kg foi retirada da solução, à qual foi adicionada a solução tampão de histidina (pH 5,4, 24,3 kg) contendo 6,29 kg de sacarose, e além disso, a solução tampão de histidina contendo sacarose 9% (pH 5,4, 4,25 kg) contendo polissorbado 20 (7,6 g) foi adicionada para ajustar a concentração de proteína para aproximadamente 20 mg/mL e, assim, uma composição farmacêutica (77,1 kg) contendo o conjugado anticorpo anti-HER3-fármaco foi obtida. A concentração de proteína da composição farmacêutica, o rendimento de proteína e o número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo (n) foram 19,9 mg/mL, 1,49 kg e 7,6, respectivamente.

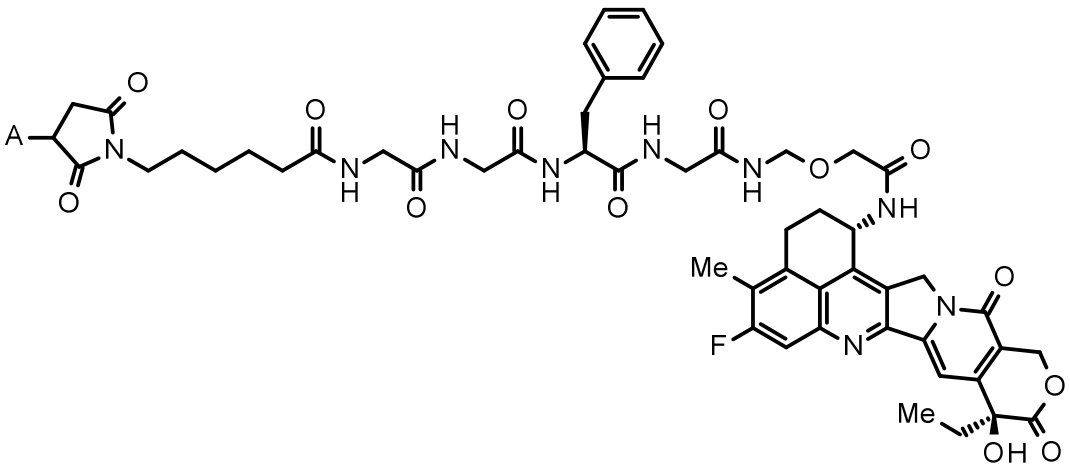
[Exemplo 7] Produção de composição farmacêutica contendo conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco

[00628] Uma solução contendo um anticorpo anti-GPR20 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6) (peso da solução: 24,2 kg; correspondente a 0,94 kg do anticorpo) foi colocada em um

reator de 200 L, ao qual foi tambpém adicionada solução aquosa de histidina 26 mM (57,6 kg) contendo polissorbato 80 (14,4 g). A temperatura foi aumentada para 30°C, uma solução aquosa (3,17 kg) contendo cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (9,06 g; 4,9 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada à mistura, e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 30°C por 3 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00629] A solução de reação obtida foi resfriada, e o composto (2) (63,5 g; 9,0 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% (7,26 kg) contendo ácido acético (3,7 g) foi adicionado sob agitação a uma temperatura interna de 15°C durante 55 minutos, e o resultante foi agitado à mesma temperatura durante 0,5 hora para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 M (1,00 kg; 15 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 0,5 hora para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 45]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-GPR20 por meio de uma ligação tioéter.

[00630] A solução obtida foi circulada para ultrafiltração através de duas membranas de Pellicon (R) 2 Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA, 2,5 m^2) com um aparelho de ultrafiltração enquanto a solução tampão de histidina 11 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) foi adicionada para remover subprodutos derivados do composto (2). Além disso, a solução foi circulada para ultrafiltração enquanto solução tampão de histidina 11 mM (pH 5,0) foi adicionada para remover o cloreto de sódio. Em seguida, o resultante foi concentrado enquanto o pH foi ajustado para 5,4 usando solução aquosa 11 mM de histidina e, assim, uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco (31,8 kg, concentração de proteína: 29,9 mg/mL, rendimento de proteína: 0,94 kg) foi obtida.

[00631] Adicionalmente, à essa solução, foi adicionada a solução tampão de histidina (pH 5,4, 14,9 kg) contendo 4,00 kg de sacarose, e além disso, a solução tampão de histidina contendo sacarose 9% (pH 5,4, 3,00 kg) contendo polissorbado 80 (4,5 g) foi adicionada para ajustar a concentração de proteína para aproximadamente 20 mg/mL e, assim, uma composição farmacêutica (49,3 kg) contendo o conjugado anticorpo anti-GPR20-fármaco foi obtida. A concentração de proteína da composição farmacêutica, o rendimento de proteína e o número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo (n) foram 19,9 mg/mL, 0,94 kg e 7,8, respectivamente.

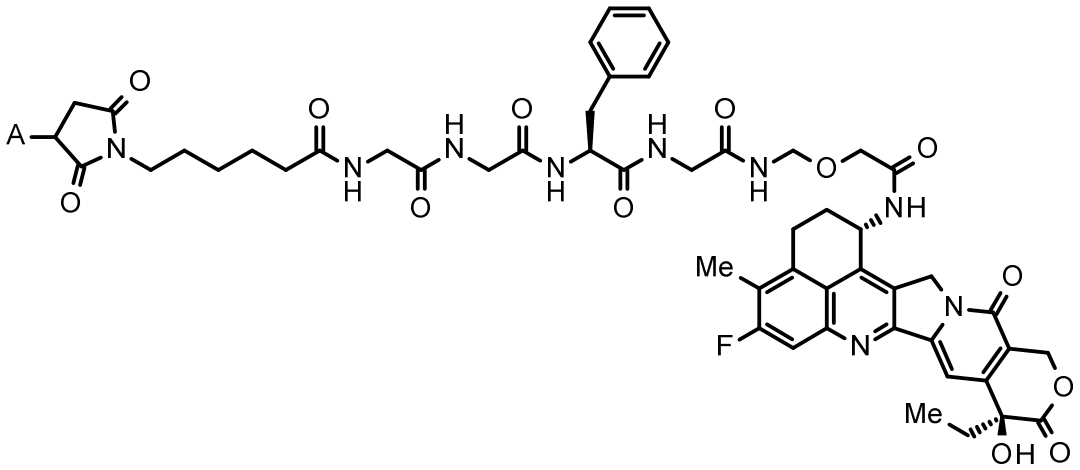
[Exemplo 8] Produção de composição farmacêutica contendo conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco

[00632] Uma solução contendo um anticorpo anti-CDH6 (um anticorpo compreendendo uma cadeia pesada consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos

consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8) (peso da solução: 2,56 kg; correspondente a 100 g do anticorpo) foi colocada em um reator de 14 L, ao qual a solução aquosa de histidina 100 mM (6,00 kg) contendo polissorbato 80 (1,50 g) e solução aquosa de EDTA 0,5 M (7,54 g; 5 equivalentes por anticorpo) foram adicionalmente adicionadas à mesma. A temperatura foi aumentada para 30°C, uma solução aquosa (330 g) contendo cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina (945 mg; 4,8 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada à mistura, e o resultante foi agitado a uma temperatura interna de 30°C por 3 horas para reduzir o dissulfeto intercadeia do anticorpo.

[00633] A solução de reação obtida foi resfriada, e o composto (2) (6,96 g; 9,1 equivalentes por molécula de anticorpo) dissolvido em solução aquosa de dimetilsulfóxido a 80% (687 g) contendo solução aquosa de ácido acético a 10% (3,89 g) foi adicionado sob agitação a uma temperatura interna de 15°C durante 41 minutos, e o resultante foi agitado à mesma temperatura durante 0,4 hora para ligar o composto (2) ao anticorpo. Em seguida, a solução aquosa de N-acetilcisteína 0,1 M (103 g; 15 equivalentes por molécula de anticorpo) foi adicionada, o resultante foi adicionado agitado à mesma temperatura durante 0,6 hora para resfriar bruscamente uma porção em excesso do composto (2) e, em seguida, o pH foi ajustado para 5,0 usando solução aquosa de ácido acético a 10%. Isso proveu uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco em que um conector de fármaco representado por uma fórmula:

[Fórmula Química 46]



em que A representa a posição de conexão a um anticorpo,

é conjugado ao anticorpo anti-CDH6 por meio de uma ligação tioéter.

[00634] A solução obtida foi circulada para ultrafiltração através de uma membrana de Pellicon (R) 2 Ultracel (R) (produzido por Merck KGaA, 0,5 m^2) com um aparelho de ultrafiltração enquanto a solução tampão de histidina 11 mM contendo cloreto de sódio a 0,5% (pH 5,0) foi adicionada para remover subprodutos derivados do composto (2). Além disso, a solução foi circulada para ultrafiltração enquanto solução tampão de histidina 11 mM (pH 5,0) foi adicionada para remover o cloreto de sódio. Em seguida, o resultante foi concentrado enquanto o pH foi ajustado para 5,4 usando solução aquosa 11 mM de histidina e, assim, uma solução contendo um conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco (2,97 kg, concentração de proteína: 31,8 mg/mL, rendimento de proteína: 93,7 g) foram obtidas.

[00635] Adicionalmente, à essa solução, foi adicionada a solução tampão de histidina (pH 5,4, 1,67 kg) contendo sacarose (401 g), e além disso, a solução tampão de histidina contendo sacarose 9% (pH 5,4, 276 g) contendo polissorbado 80 (437 mg) foi adicionada para ajustar a concentração de proteína para aproximadamente 20 mg/mL e, assim, uma composição farmacêutica (4,81 kg) contendo o conjugado anticorpo anti-CDH6-fármaco foi obtida. A concentração de proteína da composição farmacêutica, o

rendimento de proteína e o número médio de moléculas de fármaco conjugadas por molécula de anticorpo (n) foram 20,2 mg/mL, 93,2 g e 7,8, respectivamente.

Texto Livre de Listagem de Sequências

[00636] SEQ ID NO: 1 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-HER2

SEQ ID NO: 2- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-HER2

SEQ ID NO: 3 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-HER3

SEQ ID NO: 4- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-HER3

SEQ ID NO: 5 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-GPR20

SEQ ID NO: 6- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-GPR20

SEQ ID NO: 7 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-CDH6

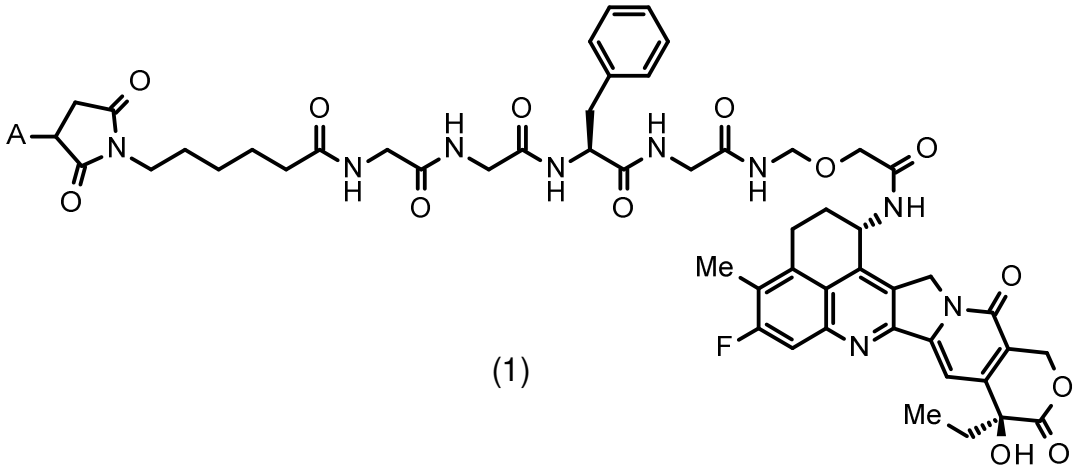
SEQ ID NO: 8- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-CDH

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual

um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 1]



(1)

no qual A representa a posição de conexão a um anticorpo,

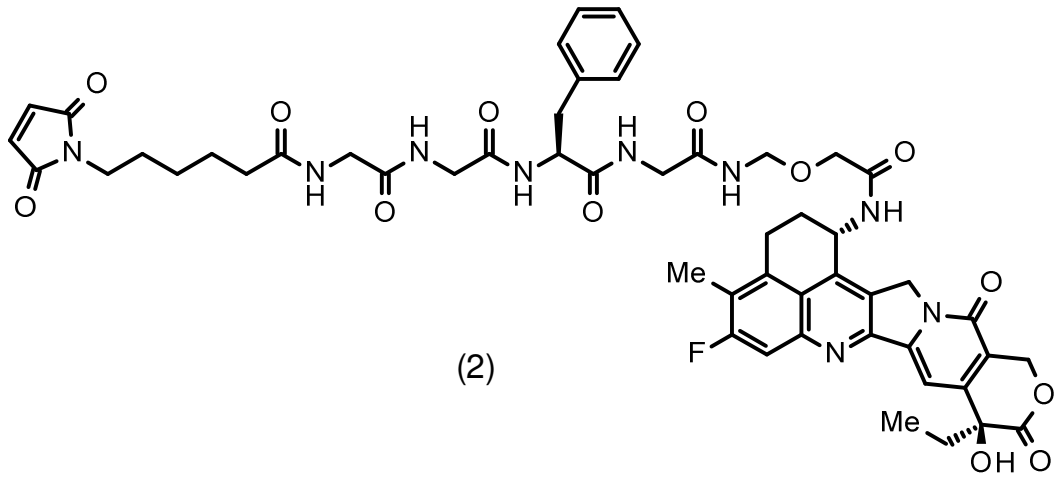
é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter,

caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 2]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

2. Método para produzir de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

3. Método para produzir de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente redutor usado na etapa (i) é cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina.

4. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

5. Método para produzir de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

6. Método para produzir de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

7. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

8. Método para produzir de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

9. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 4 a 8, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

10. Método para produzir de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

11. Método para produzir de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

12. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína.

13. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

14. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de histidina.

15. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

16. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

17. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

18. Método para produzir de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

19. Método para produzir de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

20. Método para produzir de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

21. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

22. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

23. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

24. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

25. Método para produzir de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos

consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

26. Método para produzir de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

27. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

28. Método para produzir de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

29. Método para produzir de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

30. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

31. Método para produzir de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

32. Método para produzir de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

33. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

34. Método para produzir de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

35. Método para produzir de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

36. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

37. Método para produzir de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

38. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

39. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

40. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que o excipiente é sacarose.

41. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que o excipiente é trealose.

42. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 38 a 41, e depois

realizar a etapa de

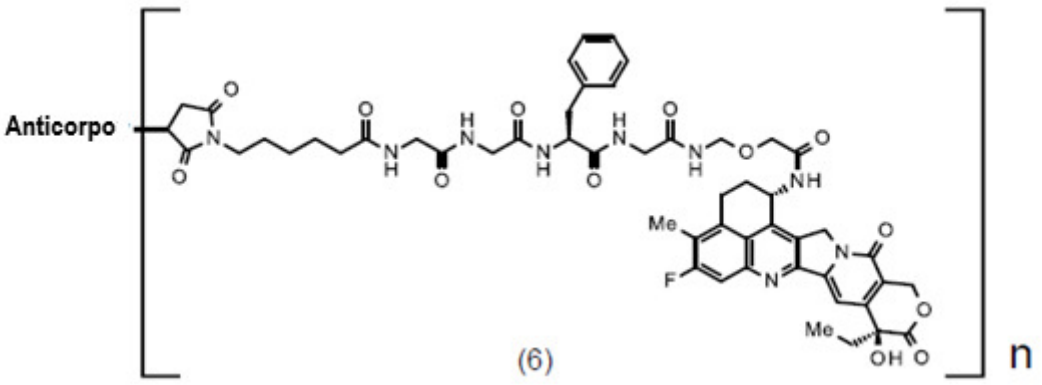
(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

43. Método para produzir de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

44. Método para produzir de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

45. Método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 3]

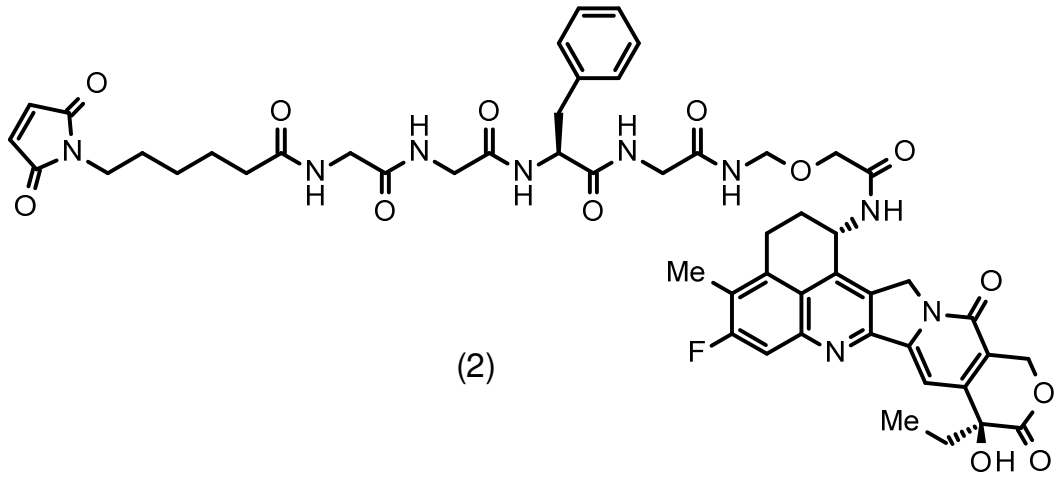


em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 4]

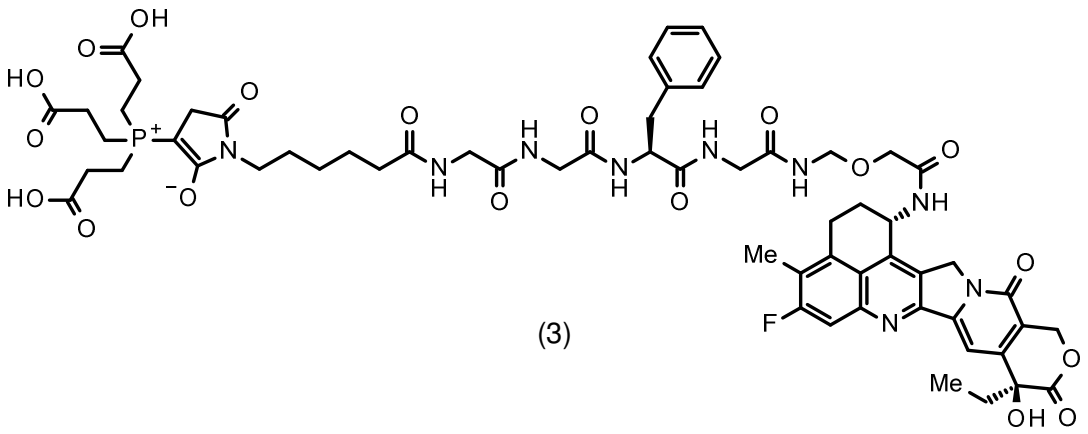


com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar N-acetilcisteína para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

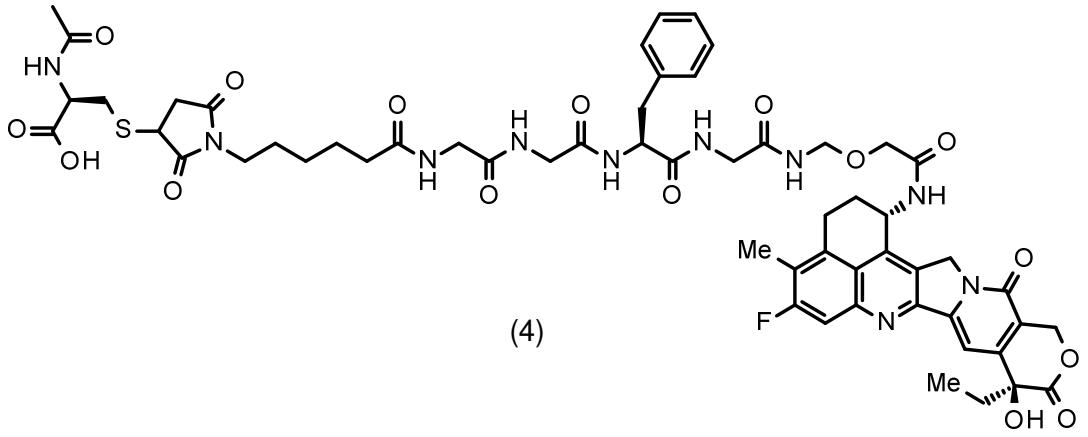
[Fórmula Química 5]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 6]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

46. Método para produzir de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

47. Método para produzir de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

48. Método para produzir de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

49. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 48, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

50. Método para produzir de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

51. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 46 a 50, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

52. Método para produzir de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

53. Método para produzir de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

54. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 53, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (i) é cerca de 5.

55. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 54, caracterizado pelo fato de que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

56. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 54, caracterizado pelo fato de que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (i) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

57. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 56, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

58. Método para produzir de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

59. Método para produzir de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

60. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 59, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

61. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 59, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

62. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

63. Método para produzir de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

64. Método para produzir de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

65. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

66. Método para produzir de acordo com a reivindicação 65,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

67. Método para produzir de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

68. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

69. Método para produzir de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

70. Método para produzir de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

71. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

72. Método para produzir de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

73. Método para produzir de acordo com a reivindicação 72,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

74. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 73, caracterizado pelo fato de que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

75. Método para produzir de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

76. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 45 a 75, e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

77. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

78. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que o excipiente é sacarose.

79. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que o excipiente é trealose.

80. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 76 a 79, e depois

realizar a etapa de

(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

81. Método para produzir de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

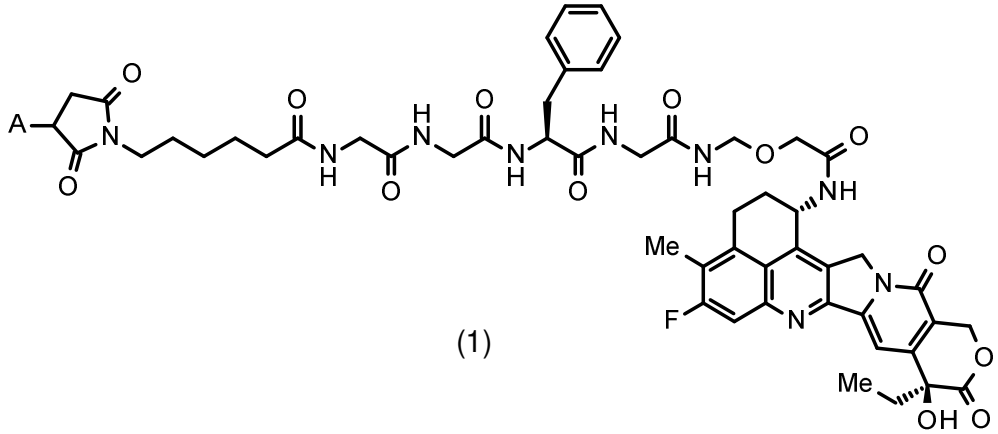
82. Método para produzir de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual

um conector de fármaco representado pela fórmula (1)

[Fórmula Química 1]



(1)

no qual A representa a posição de conexão a um anticorpo,

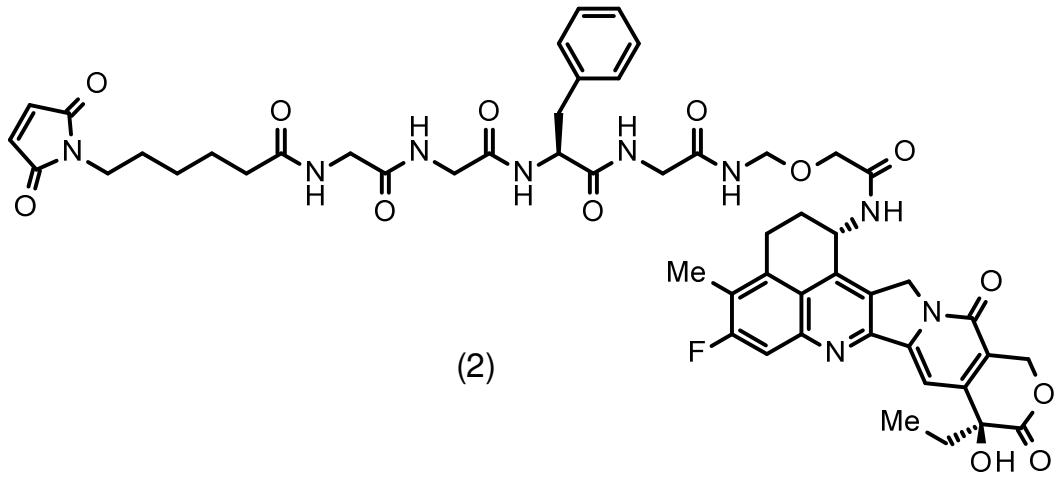
é conjugado ao anticorpo por meio de uma ligação de tioéter,

caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com um agente redutor;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 2]



(2)

com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar um reagente com um grupo tiol para reagir com

o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto no qual o agente redutor usado na etapa (i) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), e um composto em que o reagente tendo um grupo tiol usado na etapa (iii) é adicionado ao grupo maleimidila do composto representado pela fórmula (2), através de ultrafiltração utilizando uma solução tampão contendo um sal consistindo em um ácido forte e uma base forte.

2. Método para produzir de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente redutor usado na etapa (i) é tris(2-carboxietil)fosfina ou um sal do mesmo.

3. Método para produzir de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o agente redutor usado na etapa (i) é cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina.

4. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

5. Método para produzir de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

6. Método para produzir de acordo com a reivindicação 4 ou 5, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

7. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

8. Método para produzir de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

9. Método para produzir de acordo com qualquer uma das

reivindicações 4 a 8, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

10. Método para produzir de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

11. Método para produzir de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

12. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o reagente com um grupo tiol usado na etapa (iii) é N-acetilcisteína.

13. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (iv) é cerca de 5.

14. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 13, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (iv) é uma solução tampão de histidina.

15. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

16. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 14, caracterizado pelo fato de que a concentração do sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usada na etapa (iv) é de cerca de 0,5% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

17. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 16, caracterizado pelo fato de que o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte usado na etapa (iv) é o cloreto de sódio.

18. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 17, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa

subsequente à etapa (iv) de

(v) remover o sal que consiste em um ácido forte e uma base forte por meio de ultrafiltração usando uma solução tampão.

19. Método para produzir de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

20. Método para produzir de acordo com a reivindicação 18, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

21. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 18 a 20, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (v) é uma solução tampão de histidina.

22. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

23. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 21, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

24. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

25. Método para produzir de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

26. Método para produzir de acordo com a reivindicação 24, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

27. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

28. Método para produzir de acordo com a reivindicação 27, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

29. Método para produzir de acordo com a reivindicação 28, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

30. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

31. Método para produzir de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

32. Método para produzir de acordo com a reivindicação 31, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

33. Método para produzir de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 23, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

34. Método para produzir de acordo com a reivindicação 33, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo nos resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

35. Método para produzir de acordo com a reivindicação 34, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

36. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 35, caracterizado pelo fato de que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

37. Método para produzir de acordo com a reivindicação 36, caracterizado pelo fato de que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

38. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 37, e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-

fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

39. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

40. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que o excipiente é sacarose.

41. Método para produzir de acordo com a reivindicação 38 ou 39, caracterizado pelo fato de que o excipiente é trealose.

42. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 38 a 41, e depois

realizar a etapa de

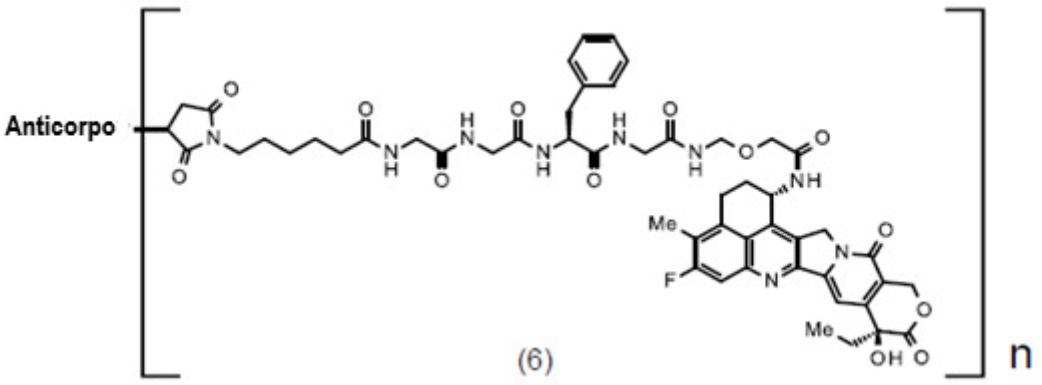
(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

43. Método para produzir de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

44. Método para produzir de acordo com a reivindicação 42, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

45. Método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco representado pela fórmula (6)

[Fórmula Química 3]

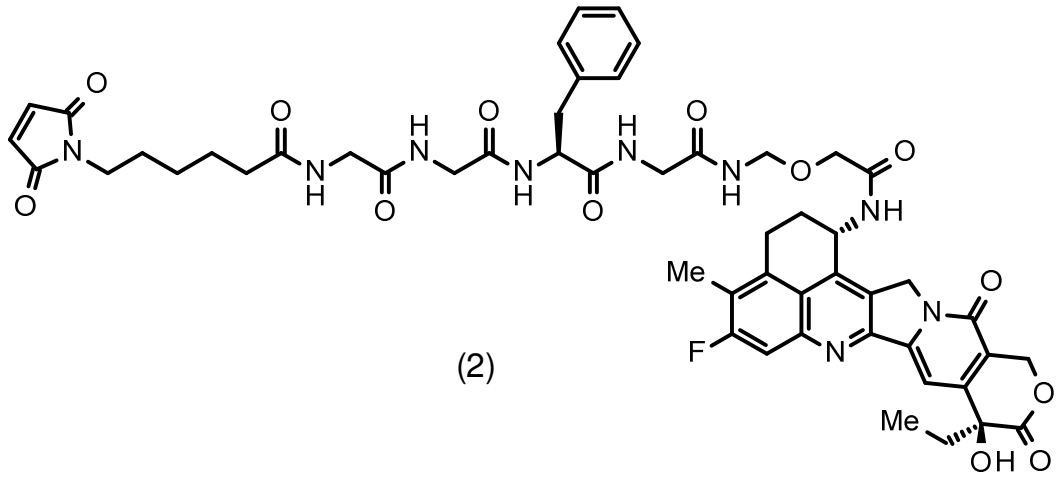


em que um conector de fármaco é conjugado ao anticorpo através de uma ligação tioéter e n representa o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo, caracterizado pelo fato de que o método compreende as etapas de:

(i) reduzir o anticorpo com cloridrato de tris(2-carboxietil)fosfina;

(ii) reagir um composto representado pela fórmula (2)

[Fórmula Química 4]

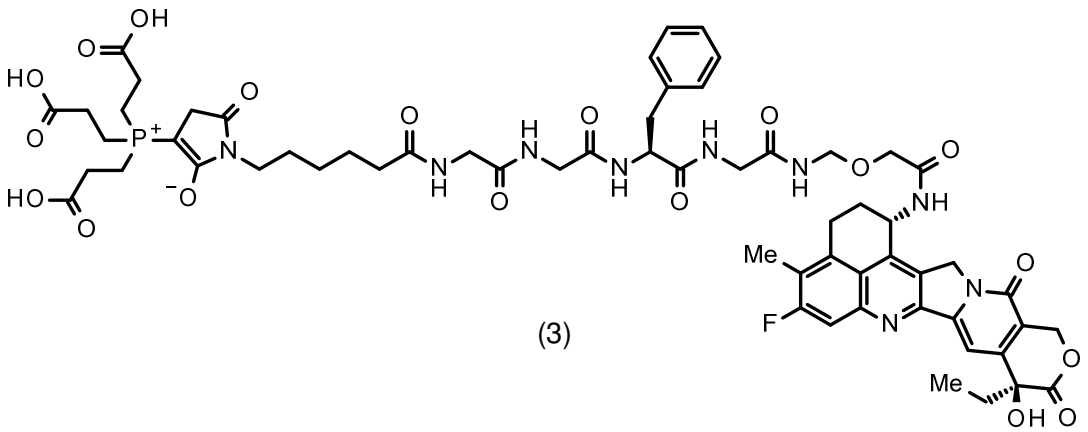


com o anticorpo reduzido na etapa (i);

(iii) adicionar N-acetilcisteína para reagir com o composto residual representado pela fórmula (2) na etapa (ii); e depois

(iv) remover um composto representado pela fórmula (3)

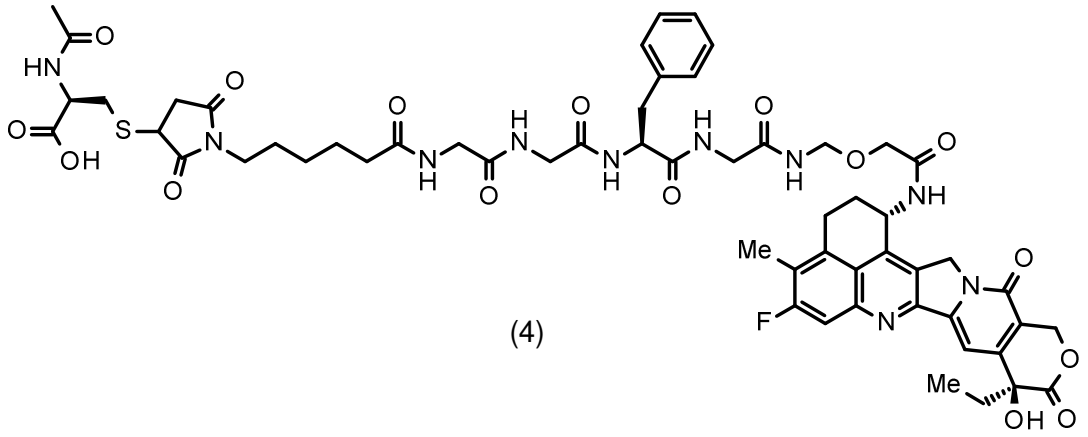
[Fórmula Química 5]



(3)

e um composto representado pela fórmula (4)

[Fórmula Química 6]



(4)

por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina contendo cloreto de sódio.

46. Método para produzir de acordo com a reivindicação 45, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada em uma solução tampão.

47. Método para produzir de acordo com a reivindicação 46, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão é ajustado para 6 a 8 usando uma solução aquosa de hidrogenofosfato dissódico.

48. Método para produzir de acordo com a reivindicação 46 ou 47, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de acetato.

49. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 48, caracterizado pelo fato de que a etapa (i) é realizada na presença de um agente quelante.

50. Método para produzir de acordo com a reivindicação 49, caracterizado pelo fato de que o agente quelante é ácido etilenodiaminotetracético.

51. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 50, caracterizado pelo fato de que a solução tampão usada na etapa (i) contém um tensoativo.

52. Método para produzir de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

53. Método para produzir de acordo com a reivindicação 51, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

54. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 53, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (i) é cerca de 5.

55. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 54, caracterizado pelo fato de que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (iv) está na faixa de 0,2% em peso a 1% em peso em relação à solução tampão usada na etapa (iv).

56. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 54, caracterizado pelo fato de que a concentração de cloreto de sódio usada na etapa (i) é cerca de 0,5% em peso com relação à solução tampão usada na etapa (iv).

57. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 56, caracterizado pelo fato de que compreende uma etapa subsequente à etapa (iv) de

(v) remover cloreto de sódio por ultrafiltração usando uma solução tampão de histidina.

58. Método para produzir de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) está na faixa de 4 a 6.

59. Método para produzir de acordo com a reivindicação 57, caracterizado pelo fato de que o pH da solução tampão usada na etapa (v) é cerca de 5.

60. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 59, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7 a 8.

61. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 59, caracterizado pelo fato de que o número médio de unidades do conector de fármaco conjugado por molécula de anticorpo no conjugado anticorpo-fármaco está na faixa de 7,5 a 8.

62. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER2.

63. Método para produzir de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 1 a 449 de SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 1 a 214 de SEQ ID NO: 2.

64. Método para produzir de acordo com a reivindicação 62, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER2 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 1 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 2.

65. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-HER3.

66. Método para produzir de acordo com a reivindicação 65,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 3 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos representada pela SEQ ID NO: 4.

67. Método para produzir de acordo com a reivindicação 66, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-HER3 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

68. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-GPR20.

69. Método para produzir de acordo com a reivindicação 68, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 472 de SEQ ID NO: 5 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 234 de SEQ ID NO: 6.

70. Método para produzir de acordo com a reivindicação 69, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-GPR20 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

71. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 61, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-CDH6.

72. Método para produzir de acordo com a reivindicação 71, caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 é um anticorpo que compreende uma cadeia pesada que consiste em uma sequência de aminoácidos que consiste nos resíduos de aminoácidos 20 a 471 de SEQ ID NO: 7 e uma cadeia leve consistindo em uma sequência de aminoácidos consistindo em resíduos de aminoácidos 21 a 233 de SEQ ID NO: 8.

73. Método para produzir de acordo com a reivindicação 72,

caracterizado pelo fato de que o anticorpo anti-CDH6 carece de um resíduo de lisina no terminal carboxila da cadeia pesada.

74. Método para produzir de acordo com qualquer uma das reivindicações 45 a 73, caracterizado pelo fato de que não compreende etapa de purificação envolvendo cromatografia.

75. Método para produzir de acordo com a reivindicação 74, caracterizado pelo fato de que a cromatografia é pelo menos uma selecionada a partir do grupo que consiste em cromatografia de filtração em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica e cromatografia por afinidade.

76. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção do conjugado anticorpo-fármaco pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 45 a 75, e depois

realizar as etapas de pelo menos um selecionado a partir do grupo que consiste em:

(vi) adicionar uma solução tampão a uma solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco;

(vii) concentrar a solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco; e

(viii) ajustar o pH da solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco a um pH predeterminado; e também

realizar a etapa de

(ix) adicionar o excipiente à solução contendo o conjugado anticorpo-fármaco.

77. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76, caracterizado pelo fato de que a solução tampão é uma solução tampão de histidina.

78. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que o excipiente é sacarose.

79. Método para produzir de acordo com a reivindicação 76 ou 77, caracterizado pelo fato de que o excipiente é trealose.

80. Método para produzir uma composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão, um excipiente e um tensoativo, caracterizado pelo fato de ser por meio da produção da composição farmacêutica contendo um conjugado anticorpo-fármaco, uma solução tampão e um excipiente pelo método para produzir como definido em qualquer uma das reivindicações 76 a 79, e depois

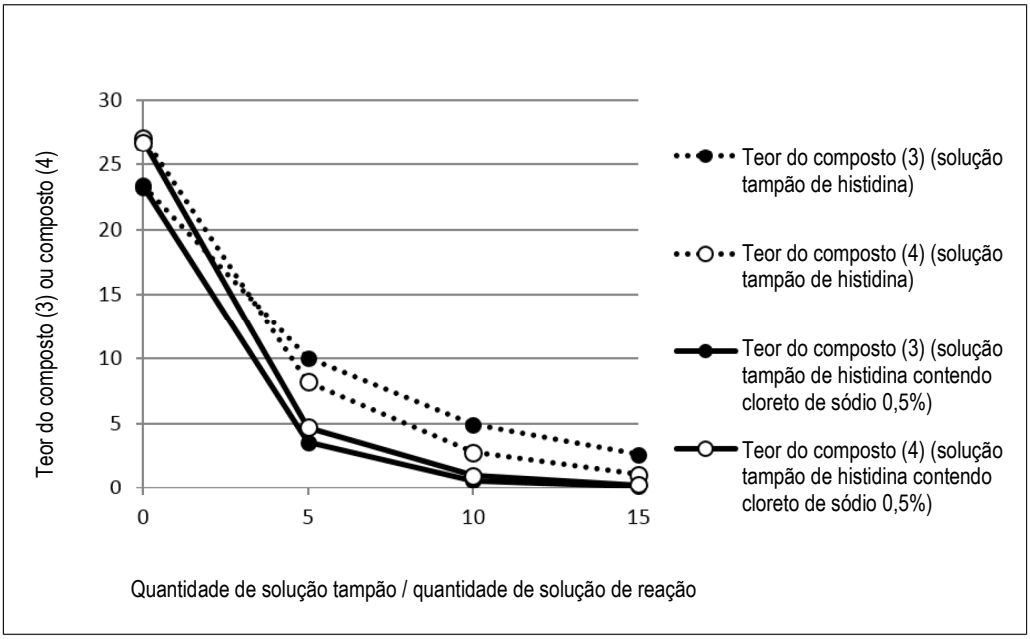
realizar a etapa de

(x) adicionar o tensoativo à composição farmacêutica.

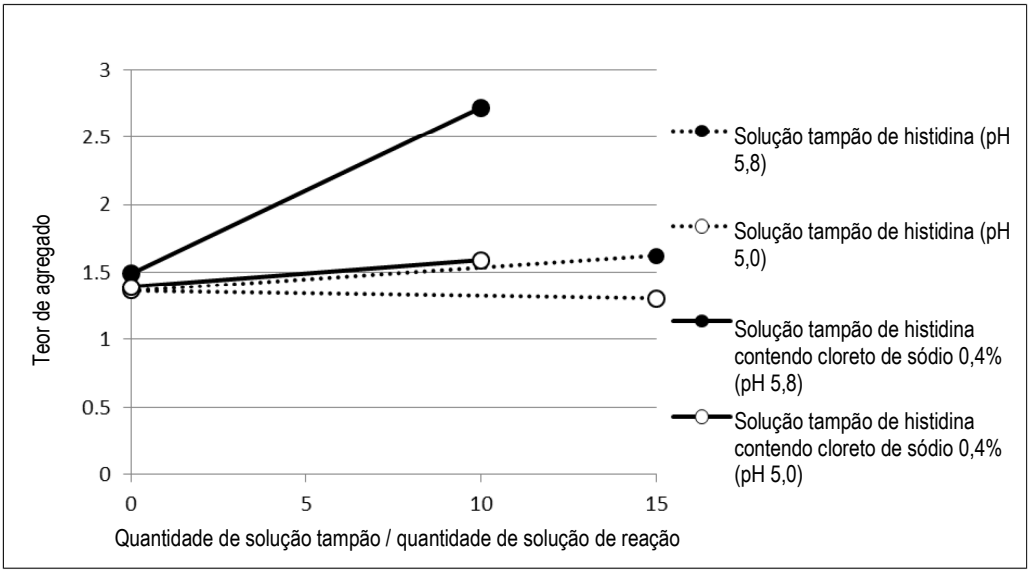
81. Método para produzir de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 80.

82. Método para produzir de acordo com a reivindicação 80, caracterizado pelo fato de que o tensoativo é polissorbato 20.

[Figura 1]



[Figura 2]



[Figura 3]

SEQ ID NO: 1 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-HER2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVR
QAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSK
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGT
LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY
FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 4]

SEQ ID NO: 2- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-HER2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQ
KPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS
VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN
ALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHK
VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 5]

SEQ ID NO: 3 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-HER3

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIR
QPPGKGLEWIGEINHSGSTNYNPSLKSRVTISVETSKN
QFSLKLSSVTAADTAVYYCARDKWTWYFDLWGRGTLVT
VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE
PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV
SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS
VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[Figura 6]

SEQ ID NO: 4- Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-HER3

DIEMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSVLYSSSNRNY
LAWYQQNPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTD
FTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPRTFGQGTKVEIKR
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV
QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKA
DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[Figura 7] SEQ ID NO: 5 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-GPR20

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTSYYISWIRQAPGQGLKYMGFINPGSGH
TNYNEKFKGRVTITADKSSSTATMELSSLRSEDTAVYY
CARGAGGFLRIITKFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFP
LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN
HKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVF
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK
EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
EEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK

Sequência sinal (1-19), região variável (20-142), região constante (143-472)

[Figura 8]

SEQ ID NO: 6 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-GPR20

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDTQLTQSPSSLSASVGDR
VTITCRASKSVSTYIHWYQQKPGKQPKLLIYSAGNLES
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFANYYCQQINEL
PYTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

Sequência sinal (1-20), região variável (21-129), região constante (130-234)

[Figura 9]

SEQ ID NO: 7 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia pesada do anticorpo anti-CDH6

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
VSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWIYPGDGE
TEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYY
CARGVYGGFAGGYFDFWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSG
VHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL
FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPGK

Sequência sinal (1-19), região variável (20-141), região constante (142-471)

[Figura 10]

SEQ ID NO: 8 - Sequência de aminoácidos de uma cadeia leve do anticorpo anti-CDH6

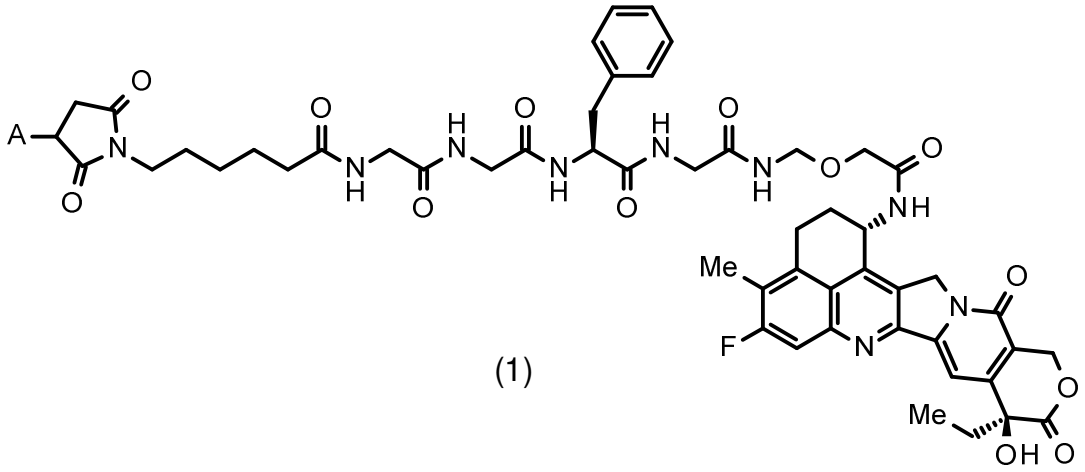
MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIQMTQSPSSLSASVGDR
VTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYDANTLQT
GVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSG
WAFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVV
CLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF
NRGEC

Sequência sinal (1-20), região variável (21-128), região constante (129-233)

RESUMO

MÉTODOS PARA PRODUZIR UM CONJUGADO ANTICORPO-FÁRMACO E PARA PRODUZIR UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA

A presente invenção é: um método para produzir um conjugado anticorpo-fármaco, no qual um conector de fármaco representado pela fórmula (1)



(1)

(A na fórmula representando uma posição de aglutinação de anticorpo) e um anticorpo são ligados por uma ligação tioéter, o método de produção distinguido pelo fato de que inclui (i) uma etapa para reduzir um anticorpo com um agente redutor, (ii) uma etapa para reagir um intermediário de conector de fármaco com o anticorpo reduzido na etapa (i), (iii) uma etapa para adicionar um reagente com um grupo tiol e reagir com o intermediário de conector de fármaco residual da etapa (ii), e (iv) uma etapa para então remover um subproduto derivado do intermediário de conector de fármaco através de ultrafiltração usando uma solução tampão contendo um sal compreendendo um ácido forte e uma base forte; e um método para produzir uma composição farmacêutica incluindo o conjugado anticorpo-fármaco supramencionado.

Este anexo apresenta o código de controle da listagem de sequências biológicas.

Código de Controle

Campo 1



Campo 2



Outras Informações:

- Nome do Arquivo: 92817873.txt
- Data de Geração do Código: 16/03/2021
- Hora de Geração do Código: 19:17:49
- Código de Controle:
  - Campo 1: 6F24B8F5BFE79B74
  - Campo 2: F4B45A4F318C2275