



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 02 020 425 T1** 2004.07.15

(12)

Veröffentlichung der Patentansprüche

der europäischen Patentanmeldung mit der
(97) Veröffentlichungsnummer: **1 400 533**
in deutscher Übersetzung (Art. II § 2 Abs. 1 IntPatÜG)
(96) Europäisches Aktenzeichen: **02 020 425.1**
(96) Europäischer Anmeldetag: **11.09.2002**
(97) Veröffentlichungstag
der europäischen Anmeldung: **24.03.2004**
(46) Veröffentlichungstag der Patentansprüche
in deutscher Übersetzung: **15.07.2004**

(51) Int Cl.7: **C07K 14/505**
C07K 17/10, C08B 31/00, C07K 17/06,
C12N 15/12, A61K 38/18, C07K 14/55,
C07K 14/54, C07K 14/56, C07K 14/565,
C07K 14/53

(71) Anmelder:
**Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61352 Bad
Homburg, DE**

(72) Erfinder:
Conradt, Harald S., 38100 Braunschweig, DE;
Grabenhorst, Eckart, 38104 Braunschweig, DE;
Nimtz, Manfred, 38300 Wolfenbüttel, DE; Zander,
Norbert, 38524 Sassenburg, DE; Frank, Ronald,
38527 Meine-Grassel, DE; Eichner, Wolfram, 35510
Butzbach, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

(54) Bezeichnung: **Hasylierte Polypeptide, besonders hasyliertes Erythropoietin**

(57) Hauptanspruch: Hydroxyalkylstärke (HAS)-Erythropoietin (EPO)-Konjugat (HAS-EPO), umfassend ein oder mehrere HAS-Moleküle, wobei jedes HAS an das EPO über
a) eine Kohlenhydratgruppe; oder
b) einen Thioether
konjugiert ist.

Patentansprüche

1. Hydroxyalkylstärke (HAS)-Erythropoietin (EPO)-Konjugat (HAS-EPO), umfassend ein oder mehrere HAS-Moleküle, wobei jedes HAS an das EPO über

- a) eine Kohlenhydratgruppe; oder
- b) einen Thioether konjugiert ist.

2. HAS-EPO nach Anspruch 1, wobei das EPO die Aminosäuresequenz von humanem EPO hat.

3. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das EPO eine oder mehrere Kohlenhydratseitenketten, die an das EPO über N- und/oder O-verknüpfte Glykosylierung angebracht sind, umfasst.

4. HAS-EPO nach Anspruch 3, wobei die Kohlenhydratseitenketten an das EPO während der Herstellung in Säuger-, insbesondere humanen, Insekten- oder Hefezellen angebracht wurden.

5. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 4, wobei HAS an das EPO über ein Linker-Molekül konjugiert ist.

6. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 3 bis 5, wobei HAS an das EPO über eine Kohlenhydratgruppe, die Teil der Kohlenhydratseitenketten ist und die vorzugsweise oxidiert ist, konjugiert ist.

7. HAS-EPO nach Anspruch 6, wobei HAS an einen Galaktose- oder einen Sialinsäurerest der Kohlenhydratseitenketten konjugiert ist.

8. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das S-Atom im Thioether von einem natürlich vorkommenden Cystein oder von einem hinzugefügten Cystein stammt.

9. HAS-EPO nach Anspruch 8, wobei das EPO die Aminosäuresequenz von humanem EPO hat und die natürlich vorkommenden Cysteine die Cysteine 29 und/oder 33 sind.

10. HAS-EPO nach Anspruch 9, wobei HAS an Cystein 29 konjugiert ist und Cystein 33 durch eine andere Aminosäure ersetzt ist.

11. HAS-EPO nach Anspruch 9, wobei HAS an Cystein 33 konjugiert ist und Cystein 29 durch eine andere Aminosäure ersetzt ist.

12. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 8 bis 11, wobei das hinzugefügte Cystein hinzugefügt wurde, indem eine natürlich vorkommende Aminosäure durch ein Cystein ersetzt wurde.

13. HAS-EPO nach Anspruch 12, wobei das EPO humanes EPO ist und der ersetzte Aminosäurerest Serin 126 ist.

14. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 13, umfassend 1–12, vorzugsweise 1–6 oder 1–3, am meisten bevorzugt 1–4 HAS-Moleküle pro EPO-Molekül.

15. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 1 bis 14, wobei die HAS ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke und Hydroxybutylstärke.

16. HAS-EPO nach Anspruch 15, wobei die HAS Hydroxyethylstärke (HES) ist.

17. HAS-EPO nach Anspruch 16, wobei die HES ein Molekulargewicht von 1 bis 300 kDa hat, vorzugsweise 5 bis 100 kDa.

18. HAS-EPO nach irgendeinem der Ansprüche 16 oder 17, wobei die HES einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis zwischen C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2–20, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, aufweist.

19. Verfahren zur Herstellung eines Hydroxyalkylstärke (HAS)-Erythropoietin (EPO)-Konjugats (HAS-EPO), umfassend die Schritte:

- a) Bereitstellen von EPO, das in der Lage ist, sich mit modifiziertem HAS umzusetzen,
- b) Bereitstellen von modifiziertem HAS, das in der Lage ist, sich mit dem EPO von Schritt a) umzusetzen, und
- c) Umsetzen des EPO von Schritt a) mit der HAS von Schritt b), wobei ein HAS-EPO, umfassend ein oder mehrere HAS-Moleküle, hergestellt wird, wobei jedes HAS an das EPO über
 - i) eine Kohlenhydratgruppe; oder
 - ii) einen Thioether konjugiert ist.

20. Verfahren nach Anspruch 19, wobei das EPO die Aminosäuresequenz von humanem EPO hat.

21. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 oder 20, wobei das EPO rekombinant hergestellt ist.

22. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 21, wobei das EPO eine oder mehrere Kohlenhydratseitenketten, die an das EPO über N- und/oder O-verknüpfte Glykosylierung angebracht sind, umfasst.

23. Verfahren nach Anspruch 22, wobei die Kohlenhydratseitenketten an das EPO während der Herstellung in Säuger-, insbesondere humanen, Insekten- oder Hefezellen angebracht wurden.

24. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 22 oder 23, wobei die HAS an das EPO über eine Kohlenhydratgruppe, die Teil der Kohlenhydratseitenketten ist, konjugiert ist.

25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei in Schritt a) das EPO modifiziert wird durch Oxidieren von mindestens einer Kohlenhydratgruppe, vorzugsweise zumindest einer endständigen Zuckereinheit, stärker bevorzugt Galaktose, der einen oder mehreren Kohlenhydratseitenketten des EPO.

26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei die endständige Zuckereinheit nach teilweiser oder vollständiger (enzymatischer und/oder chemischer) Entfernung der endständigen Sialinsäure oxidiert wird.

27. Verfahren nach den Ansprüchen 25 oder 26, wobei in Schritt c) die modifizierte HAS an die oxidierte endständige Zuckereinheit konjugiert wird.

28. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 27, wobei das EPO mindestens eine freie SH-Gruppe umfasst.

29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die freie SH-Gruppe Teil eines natürlich vorkommenden Cysteins oder eines hinzugefügten Cysteins ist.

30. Verfahren nach Anspruch 29, wobei das EPO die Aminosäuresequenz von humanem EPO hat und die natürlich vorkommenden Cysteine Cystein 29 und/oder 33 sind.

31. Verfahren nach Anspruch 30, wobei Cystein 33 durch eine andere Aminosäure ersetzt ist und in Schritt c) die modifizierte HAS an Cystein 29 konjugiert wird.

32. Verfahren nach Anspruch 30, wobei Cystein 29 durch eine andere Aminosäure ersetzt ist und in Schritt c) die modifizierte HAS an Cystein 33 konjugiert wird.

33. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 29 bis 32, wobei das hinzugefügte Cystein hinzugefügt wurde, indem eine natürlich vorkommende Aminosäure durch ein Cystein ersetzt wurde.

34. Verfahren nach Anspruch 33, wobei das EPO humanes EPO ist und der ersetzte Aminosäurerest Serin 126 ist.

35. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 33 oder 34, wobei in Schritt c) die modifizierte HAS an das hinzugefügte Cystein konjugiert wird.

36. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 35, wobei die HAS modifiziert wird, so dass sie eine freie Hydrazid-, Hydroxylamin-, Thiol- oder Se-

micarbazid-Funktionalität umfasst, wenn die HAS an die oxidierten Kohlenhydratgruppen konjugiert wird, oder eine freie Maleimid-, Disulfid- oder Halogenacetamid-Funktionalität umfasst, wenn die HAS an die SH-Gruppe konjugiert werden soll.

37. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 36, wobei Schritt c) in einem Reaktionsmedium umfassend zumindest 10 Gew.-% H₂O durchgeführt wird.

38. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 37, wobei die HAS an das EPO über ein Linker-Molekül konjugiert wird.

39. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 19 bis 38, wobei die HAS Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke oder Hydroxybutylstärke, vorzugsweise Hydroxyethylstärke (HES) ist.

40. Verfahren nach Anspruch 39, wobei die HES die in irgendeinem der Ansprüche 17 oder 18 definierten Eigenschaften hat.

41. HAS-EPO, erhältlich durch das Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 19 bis 40.

42. HAS-EPO nach Anspruch 41, das die in irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18 definierten Eigenschaften hat.

43. HAS-EPO gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18, 41 oder 42 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers.

44. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend das HAS-EPO gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18, 41 oder 42.

45. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 44, weiter umfassend mindestens einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

46. Verwendung eines HAS-EPO gemäß irgendeinem der Ansprüche 1 bis 18, 41 oder 42 zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von anämischen Störungen oder hämatopoietischer Dysfunktion-Störungen.

47. Hydroxyalkylstärke (HAS)-Polypeptid-Konjugat (HAS-Polypeptid), umfassend ein oder mehrere HAS-Moleküle, wobei jedes HAS an das Polypeptid über
c) eine Kohlenhydratgruppe; oder
d) einen Thioether konjugiert ist.

48. HAS-Polypeptid nach Anspruch 47, wobei das Polypeptid humanen Ursprungs ist.

49. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 oder 48, wobei das Polypeptid ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Erythropoietin, Interleukine, insbesondere Interleukin-2, IFN- β , IFN-alpha, CSF, Interleukin-6 und therapeutische Antikörper.

50. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 bis 49, wobei das Polypeptid eine oder mehrere Kohlenhydratseitenketten, die an das EPO über N- und/oder O-verknüpfte Glykosylierung angebracht sind, umfasst.

51. HAS-Polypeptid nach Anspruch 50, wobei die Kohlenhydratseitenketten an das Polypeptid während der Herstellung in Säuger-, insbesondere humanen, Insekten- oder Hefezellen angebracht wurden.

52. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 bis 51, wobei die HAS an das Polypeptid über ein Linker-Molekül konjugiert ist.

53. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 49 bis 52, wobei die HAS an das Polypeptid über eine Kohlenhydratgruppe, die Teil der Kohlenhydratseitenketten ist und die vorzugsweise oxidiert ist, konjugiert ist.

54. HAS-Polypeptid nach Anspruch 53, wobei die HAS an einen Galaktoserest der Kohlenhydratseitenketten konjugiert ist.

55. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 bis 54, wobei das S-Atom im Thioether von einem natürlich vorkommenden Cystein oder von einem hinzugefügten Cystein stammt.

56. HAS-Polypeptid nach Anspruch 55, wobei das hinzugefügte Cystein hinzugefügt wurde, indem eine natürlich vorkommende Aminosäure durch ein Cystein ersetzt wurde.

57. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 bis 56, umfassend 1–12, vorzugsweise 1–6 oder 1–3, am meisten bevorzugt 1–4 HAS-Moleküle pro Polypeptid-Molekül.

58. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der Ansprüche 47 bis 57, wobei die HAS ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke und Hydroxybutylstärke.

59. HAS-Polypeptid nach Anspruch 58, wobei die HAS Hydroxyethylstärke (HES) ist.

60. HAS-Polypeptid nach Anspruch 59, wobei die HES ein Molekulargewicht von 1 bis 300 kDa hat, vorzugsweise 5 bis 100 kDa.

61. HAS-Polypeptid nach irgendeinem der An-

sprüche 59 oder 60, wobei die HES einen molaren Substitutionsgrad von 0,1 bis 0,8 und ein Verhältnis zwischen C₂:C₆-Substitution im Bereich von 2–20, bezogen auf die Hydroxyethylgruppen, aufweist.

62. Verfahren zur Herstellung eines Hydroxyalkylstärke (HAS)-Polypeptid-Konjugats (HAS-Polypeptid), umfassend die Schritte:

d) Bereitstellen eines Polypeptids, das in der Lage ist, sich mit modifiziertem HAS umzusetzen,

e) Bereitstellen von modifiziertem HAS, das in der Lage ist, sich mit dem Polypeptid von Schritt a) umzusetzen, und

f) Umsetzen des Polypeptids von Schritt a) mit der HAS von Schritt b), wobei ein HAS-Polypeptid, umfassend ein oder mehrere HAS-Moleküle, hergestellt wird, wobei jedes HAS an das Polypeptid über
i) eine Kohlenhydratgruppe; oder
ii) einen Thioether konjugiert ist.

63. Verfahren nach Anspruch 62, wobei das Polypeptid humanen Ursprungs ist.

64. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 oder 63, wobei das Polypeptid ausgewählt ist aus der Gruppe umfassend Erythropoietin, Interleukine, insbesondere Interleukin-2, IFN- β , IFN-alpha, CSF, Interleukin-6 und therapeutische Antikörper.

65. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 64, wobei das Polypeptid rekombinant hergestellt ist.

66. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 65, wobei das Polypeptid eine oder mehrere Kohlenhydratseitenketten, die an das Polypeptid über N- und/oder O-verknüpfte Glykosylierung angebracht sind, umfasst.

67. Verfahren nach Anspruch 66, wobei die Kohlenhydratseitenketten an das Polypeptid während der Herstellung in Säuger-, insbesondere humanen, Insekten- oder Hefezellen angebracht wurden.

68. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 66 oder 67, wobei die HAS an das Polypeptid über eine Kohlenhydratgruppe, die Teil der Kohlenhydratseitenketten ist, konjugiert ist.

69. Verfahren nach Anspruch 68, wobei in Schritt a) das Polypeptid modifiziert wird durch Oxidieren von mindestens einer Kohlenhydratgruppe, vorzugsweise zumindest einer endständigen Zuckereinheit, stärker bevorzugt Galaktose, der einen oder mehreren Kohlenhydratseitenketten des Polypeptids.

70. Verfahren nach Anspruch 69, wobei die endständige Zuckereinheit nach teilweiser oder vollständiger (enzymatischer und/oder chemischer) Entfer-

nung der endständigen Sialinsäure oxidiert wird.

71. Verfahren nach den Ansprüchen 69 oder 70, wobei in Schritt c) die modifizierte HAS an die oxidierte endständige Zuckereinheit konjugiert wird.

72. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 71, wobei das Polypeptid mindestens eine freie SH-Gruppe umfasst.

73. Verfahren nach Anspruch 72, wobei die freie SH-Gruppe Teil eines natürlich vorkommenden Cysteins oder eines hinzugefügten Cysteins ist.

74. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 73, wobei das hinzugefügte Cystein hinzugefügt wurde, indem eine natürlich vorkommende Aminosäure durch ein Cystein ersetzt wurde.

75. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 73 oder 74, wobei in Schritt e) die modifizierte HAS an das hinzugefügte Cystein konjugiert wird.

76. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 75, wobei die HAS modifiziert wird, so dass sie eine freie Hydrazid-, Hydroxylamin-, Thiol- oder Semicarbazid-Funktionalität umfasst, wenn die HAS an die oxidierten Kohlenhydratgruppen konjugiert wird, oder eine freie Maleimid-, Disulfid- oder Halogenacetamid-Funktionalität umfasst, wenn die HAS an die SH-Gruppe konjugiert werden soll.

77. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 76, wobei Schritt c) in einem Reaktionsmedium umfassend zumindest 10 Gew.-% H₂O durchgeführt wird.

78. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 78, wobei die HAS an das Polypeptid über ein Linker-Molekül konjugiert wird.

79. Verfahren nach irgendeinem der Ansprüche 62 bis 78, wobei die HAS Hydroxyethylstärke, Hydroxypropylstärke oder Hydroxybutylstärke, vorzugsweise Hydroxyethylstärke (HES) ist.

80. Verfahren nach Anspruch 79, wobei die HAS die in irgendeinem der Ansprüche 60 oder 61 definierten Eigenschaften hat.

81. HAS-Polypeptid, erhältlich durch das Verfahren gemäß irgendeinem der Ansprüche 62 bis 80.

82. HAS-Polypeptid nach Anspruch 41, das die in irgendeinem der Ansprüche 47 bis 61 definierten Eigenschaften hat.

83. HAS-Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 47 bis 61, 81 oder 82 zur Verwendung in einem Verfahren zur Behandlung des menschlichen

oder tierischen Körpers.

84. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend da HAS-Polypeptid gemäß irgendeinem der Ansprüche 47 bis 61, 81 oder 82.

85. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 84, weiter umfassend zumindest einen pharmazeutisch verträglichen Träger.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen