



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 697 28 046 T2** 2005.03.17

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 918 547 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **697 28 046.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US97/12977**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **97 938 031.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/04294**

(86) PCT-Anmeldetag: **24.07.1997**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **05.02.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.06.1999**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **10.03.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **17.03.2005**

(51) Int Cl.7: **A61K 51/08**
A61P 9/00

(30) Unionspriorität:
690184 **26.07.1996** **US**

(73) Patentinhaber:
**Neorx Corp., Seattle, Wash., US; University of
Washington, Seattle, Wash., US**

(74) Vertreter:
**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI,
LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**KASINA, Sudhakar, Mercer Island, US; RENO, M.,
John, Brier, US; FRITZBERG, R., Alan, Edmonds,
US; TAIT, Jonathan, Seattle, US**

(54) Bezeichnung: **RADIOAKTIV MARKIERTE ANNEXINE**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf radioaktivmarkierte Annexine, einschließlich Annexin-Hexose-Konjugate wie beispielsweise Hexose-Einheit-Konjugate und deren Bestandteile. Die vorliegende Erfindung ist auch allgemein gerichtet auf Modifikationen der Annexin-Bestandteile für die Verwendung bei der Herstellung von radioaktivmarkierten Annexinen. Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung kommen auch Aufnahmeprotokolle in Betracht, welche die Verabreichung von beispielsweise einem radioaktivmarkierten Annexin-Hexose-Einheit-Konjugat einschließen. Der Annexin-Bestandteil des Konjugats dient dazu, den radioaktivmarkierten aktiven Bestandteil des Konjugats an die vaskuläre Thrombi-Zielstelle zu liefern. Der Hexose-Einheit-Bestandteil des Konjugats erleichtert die schnelle Eliminierung der radioaktivmarkierten Annexin-Hexose-Einheit-Konjugate von dem Kreislauf eines Empfängers.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Wenn Patienten unter Brustschmerz, Herzklopfen oder irgendwelchen anderen Symptomen einer Herzkranz-Verletzung oder -Erkrankung leiden, ist die Gegenwart von vaskulären Thromben in dem Herzen ein potentieller wesentlicher Komplikations-Faktor für die Behandlung. Wenn ein Arzt nicht-invasiv bestimmen könnte, ob einer oder mehr bevorzugtere vaskuläre Thromben anwesend sind, und wenn sie anwesend sind, die Lage dieser vaskulären Thromben bestimmen könnte, wäre eine bessere Beurteilung der Behandlungsoptionen möglich. Darüber hinaus könnten, wenn ein Arzt bestimmen könnte, dass keine vaskulären Thromben anwesend waren, wodurch eine potentielle Komplikation bei der Behandlung eliminiert wird, kardiale Zustände sicherer und wirksamer behandelt werden.

[0003] Die bisherigen Techniken zur Bestimmung der Anwesenheit von vaskulären Thromben sind invasiv und/oder beschwerlich und/oder scheitern daran, dass solche Thromben mit guter Empfindlichkeit und Spezifität erfaßt werden. Deshalb ist ein Aufnahme-Mittel, das nützlich ist bei der nicht-invasiven Aufnahme von vaskulären Thromben, wünschenswert.

[0004] Annexine sind eine Klasse von Proteinen, die charakterisiert sind durch eine Calcium-vermittelte Bindung an anionische Phospholipide. Anionische Phospholipide sind um das etwas 20-fache höher verbunden mit aktivierten Blutplättchen als Blutplättchen im Ruhezustand, und aktivierte Blutplättchen sind verbunden mit vaskulären Thromben.

[0005] Es wurde gezeigt, dass radioiodiertes Annexin V vaskuläre Thromben in vivo lokalisiert, jedoch weist es nicht optimale Aufnahme-Eigenschaften auf, die möglicherweise auf die ausgeprägte Beta-Phase bei der Blut-Clearance zurückzuführen ist, infolge einer möglichen Transjodierung und/oder eines metabolischen Abbaus mit Wiedereinbau in Serum-Makromoleküle oder Nicht-Zielgewebe. Darüber hinaus setzen freies radioaktives Iod oder Iod-enthaltende metabolische Abbauprodukte Nicht-Zielgewebe insbesondere die Schilddrüse, Radioaktivität aus. Darüber hinaus leiden die Iod-Radioisotope I-123, I-124 und I-131 mit aufnehmbaren Photonen unter verschiedenen Nachteilen. Die Radioaktiv-Markierung mit I-Iod-123 mit ausgezeichneten Aufnahme-Eigenschaften ist teuer und schwierig zu erhalten und ist deshalb für eine breit gestreute Anwendung nicht geeignet. Iod-124 emittiert Positronen und Hochenergie-Gamma-Photonen. Letztendlich hat Iod-131 eine partikuläre Emission und seine Gamma-Emission ist in Bezug auf die Energie zu hoch für eine optimale Aufnahme. Folglich sind verbesserte radioaktivmarkierte Annexin-Verbindungen wünschenswert.

[0006] Darüber hinaus sind die herkömmliche Aufnahme und Therapie oft geplagt von dem Problem, dass das allgemein erreichbare Ziel-Verhältnis niedrig ist. Das Ziel-Verhältnis wird definiert als das Verhältnis von verabreichter Dosis, welche das Ziel lokalisiert, zu der verabreichten Dosis, die im Blut zirkuliert, oder das Verhältnis von verabreichter Dosis, die das Ziel lokalisiert, zu verabreichter Dosis, die in das Knochenmark übergeht. Eine Verbesserung des Target-Verhältnisses wird auch angestrebt. Aus den oben genannten Gründen besteht deshalb noch ein Bedarf an einem Produkt mit erhöhter Empfindlichkeit zur Aufnahme von Thromben, um kleine Thromben aufzunehmen, wie beispielsweise Carotid-Thromben oder intrakardiale Thromben und solche, die in Herzkranz-Arterien nach einer Angioplastie oder während Herzinfarkten oder in zerebralen Arterien während einer Apoplexie zugegen sind. Die Entwicklung eines Mittels zur Aufnahme eines radioaktivmarkierten Thrombus, das in der Lage ist, intrakoronare Thromben zu erfassen, würde ein Durchbruch-Produkt mit großer klinischer und wirtschaftlicher Bedeutung verkörpern. Die vorliegende Erfindung erfüllt dieses Erfordernis und stellt weitere ähnliche Vorteile bereit.

Zusammenfassung der Erfindung

[0007] Die vorliegende Beschreibung stellt radioaktivmarkierte Annexin-Hexose-Einheit-Konjugate und Verfahren zur Herstellung und Verwendung dieser Konjugate bereit. Die vorliegende Erfindung stellt bereit einen Annexin-Bestandteil, der in einer solchen Weise modifiziert ist, dass er eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe bereitstellt, was dazu dient, die Aufnahme-Eigenschaften von Annexin zu verbessern. Annexin enthaltende Konjugate der vorliegenden Erfindung sind geeignet zur Radiomarkierung mit einem Diagnose-Aufnahmemittel. Konjugate der vorliegenden Erfindung umfassen:

- ein modifiziertes Annexin, wobei die Modifikation eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe bereitstellt; und
- eine Hexose-Einheit, die von einem Säuger-Leber-Rezeptor erkannt wird, wobei die Hexose-Einheit an das Annexin konjugiert ist.

[0008] Durch die vorliegende Erfindung werden ebenso bereitgestellt radiomarkierte modifizierte Annexin-Hexose-Einheit-Konjugate.

[0009] Ein anderes bevorzugtes Konjugat der vorliegenden Erfindung schließt ein:

- das modifizierte Annexin; und
- eine Esterase-empfindliche N_xS_y -Chelat-Verbindung, die an das Annexin konjugiert ist.

[0010] Ein weiteres bevorzugtes Konjugat gemäß der vorliegenden Erfindung schließt ein:

- ein modifiziertes Annexin-Multimer; und
- eine N_xS_y -Chelat-Verbindung, die an das Annexin konjugiert ist.

[0011] Es versteht sich für Fachleute in diesem technischen Bereich, dass in den Fällen, in denen eine chelatisierende Verbindung eine Komponente des Konjugats ist, irgendeines der oben angegebenen bevorzugten Konjugate weiter ein Radionuklid einschließt, das durch die chelatisierende Verbindung komplexiert wird.

[0012] Das Annexin gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein modifiziertes Annexin. Der Ausdruck „ein modifiziertes Annexin“ wird um eine Zahl von Aminosäuren an dem C-Terminus oder dem N-Terminus verlängert. Die Aminosäure-Verlängerung führt zu einer Modifikation des Annexins, wodurch eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe geschaffen wird. Ein bevorzugtes modifiziertes Annexin zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung wird verlängert an dem N-Terminus. In bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sorgt die Struktur des modifizierten Annexins für die Bildung einer endogenen Radiomarkierungs-Chelatisierungs-Stelle (so dass dadurch die Notwendigkeit für die intermediäre Produktion eines Amin-gerichteten aktiven Esters zur Erleichterung der Radiomarkierung eliminiert wird). In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung erleichtert die Struktur des modifizierten Annexins die Produktion von Multimeren. Ein bevorzugtes Annexin zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung ist Annexin V. Auch ein bevorzugtes Annexin gemäß der vorliegenden Erfindung ist ein modifiziertes Annexin. So ist ein besonders bevorzugtes Annexin gemäß der vorliegenden Erfindung ein modifiziertes Annexin V.

[0013] Das modifizierte Annexin oder die Annexin-Multimer-Komponente des Konjugats ermöglicht ein schnelles Binden der Radiomarkierung an das Annexin, so dass eine vereinfachte Markierungs-Prozedur für eine klinische Anwendung geschaffen wird. In einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung sorgt die Modifikation des Annexins für eine Beschleunigung der Blut-Clearance, wodurch die Hintergrund-Radioaktivität des Blut-Pools verringert wird.

[0014] Weiter kann das modifizierte Annexin oder das Annexin-Multimer an eine Hexose-Einheit konjugiert werden, wie beispielsweise ein Hexose-Cluster. Bevorzugte Hexose-Einheiten zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung schließen Hexose-Cluster ein und inkorporieren ein Mehrfaches von 4 Galactosen. Ein anderes bevorzugtes Hexose-Cluster zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung inkorporiert ein Mehrfaches von 3 Galactosen. Es versteht sich, dass die Prototyp-artige Hexose-Einheit ein Hexose-Cluster wie beispielsweise ein Galactose-Cluster ist. Weiter weist ein Prototyp-mäßiger Galactose-Cluster als Galactose-Komponente N-Acetylgalactosamin auf.

[0015] Die Hexose-Einheit-Komponente kann an die Annexin-Komponente gebunden sein und kann gegebenenfalls an eine chelatisierende Verbindungs-Komponente über ein trifunktionelles Verknüpfungs-Molekül (Linker) wie beispielsweise Lysin gebunden sein. Ein Verlängerungs-Molekül kann zwischen der Hexose-Einheit und dem trifunktionellen Linker verwendet werden, um die Bioverfügbarkeit der Hexose-Einheit zu fördern. Diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird bevorzugt, wenn eine chelatisierende Verbindung verwendet wird und die chelatisierende Verbindung durch eine einzelne funktionelle Gruppe charakterisiert ist, die

für eine Konjugation verfügbar und geeignet ist.

[0016] Wenn eine chelatisierende Verbindungs-Komponente durch mehr als eine für eine Konjugation an andere Konjugat-Komponenten verfügbare und geeignete funktionelle Gruppe gekennzeichnet ist, wird vorzugsweise eine Struktur wie die folgende verwendet: Hexose-Einheit – bifunktionelles Verknüpfungs-Molekül (Linker) – chelatisierende Verbindung – bifunktionelles Verknüpfungs-Molekül (Linker) -Annexin.

[0017] Auch wird in einigen anderen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung eine Esterase-empfindliche Chelatisierungs-Komponente verwendet und so eine beschleunigte Ausscheidung von Radioaktivität aus der Leber geschaffen, wodurch die Hintergrund-Radioaktivität nahe dem Herzen und den Lungen verringert wird.

[0018] Bevorzugte diagnostische Radionuklide zur Verwendung in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung sind Tc-99m, Re-186 und Re-188, wobei Tc-99m besonders bevorzugt ist. Vaskuläre Thromben, die in oder nahe dem Herzen lokalisiert sind, sind speziell einer Bildgebung in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung zugänglich.

[0019] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden offensichtlich unter Bezugnahme auf die folgende Beschreibung und die beigefügten Figuren.

Kurze Beschreibung der Figuren

[0020] Fig. 1 gibt schematisch ein Verfahren zum Radiomarkieren von Annexin V wieder.

[0021] Fig. 2 zeigt die Blut-Clearance von Tc-99m-Annexin V (o) und von Tc-99m-Annexin V-Galactose (D).

[0022] Fig. 3 zeigt schematisch die Synthese von N, N'-Bis-(2-disulfidyl-4-carbonylphenyl-) 1,3-propyldiamin.

[0023] Fig. 4 zeigt schematisch die Synthese von N, N'-Bis-(disulfidyl-4-methylphenyl-) gamma, gamma-diamino-isovalerat-N-hydroxysuccinimid.

[0024] Fig. 5a und 5b zeigen schematisch die Synthese eines acht-Galactose-Moleküle enthaltenden Galactose-Clusters.

[0025] Fig. 6 zeigt schematisch die Synthese eines verlängerten acht-Galactose-Einheiten enthaltenden Galactose-Clusters.

[0026] Fig. 7 gibt schematisch eine pET-12a-Plasmid-Map wieder.

[0027] Fig. 8 gibt schematisch einen pET-12a-PAP1, 3/7/94, Klon 1, wieder.

[0028] Fig. 9 zeigt zeichnerisch ein Konjugat, das ein Annexin-Dimer, eine chelatisierende Verbindung und eine Hexose-Einheit einschließt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0029] Vor der weiteren Beschreibung der Erfindung mag es hilfreich sein, Definitionen bestimmter Begriffe anzugeben, die innerhalb der vorliegenden Offenbarung verwendet werden.

[0030] Annexin: Eine Klasse von Verbindungen, die gekennzeichnet ist durch das Vermögen, sich mit hoher Affinität an Membran-Lipide in Gegenwart von millimolaren Konzentrationen von Calcium zu binden. Es wurde gezeigt, dass Annexine antikoagulative Wirkungen zeigen, die durch das Binden von Annexinen an negativ geladene Oberflächen-Phospholipide vermittelt werden (z.B. an aktivierte Blutplättchen). Diese Annexin-Phospholipid-Bindung blockiert – wie angenommen wird – die Aktivierung von Clotting-Faktoren (Verklumpungs-Faktoren) durch derartige negativ geladene Oberflächen-Phospholipide. Vor der Erkennung der Annexin-Molekül-Klasse wurden Glieder dieser Klasse von Molekülen in der Literatur auch als Plazenta-Antikoagulations-Proteine (z.B. PAP-1, 2, 3 und 4), Lipocortine, Calpactine, vaskuläre Antikoagulanzen (alpha und beta), Calphobindin I, Plazenta-Protein 4 (PP4), Endonexin II, Anchorin C II, Calcium-abhängiges Phospholipid-Bindungs-Protein und dergleichen bezeichnet (verwiesen wird auf Crumpton et al., Nature 345, 212 (1990)). Annexin V ist ein Prototyp-artiges Annexin-Molekül, das in der Beschreibung der vorliegenden Erfindung verwen-

det wird. Der Begriff „Annexin“ schließt natives Annexin, das aus natürlichen Quellen gereinigt wurde, z.B. aus Human-Plazenta, oder Annexin-Moleküle ein, die eine native Sequenz enthalten, die durch beispielsweise Genetic Engineering, rekombinante Verfahren oder andere Mittel produziert werden. Der Begriff „Annexin“ schließt weiter modifizierte Annexine ein, wie sie nachfolgend beschrieben werden, die von irgendeiner Quelle abgeleitet oder aus irgendeiner Quelle produziert werden.

[0031] Modifiziertes Annexin: Ein Annexin-Molekül, in dem die native Sequenz oder das Molekül in einer solchen Weise verändert wird, ohne dass materiell die Membran-Bindungs-Affinität des Annexins verändert wird. Solche Annexine können hergestellt werden durch chemische, Genetic Engineering oder rekombinante Verfahrensweisen, wie sie Fachleuten in diesem technischen Bereich bekannt sind. Die Modifikation kann eine Modifikation der Sequenz durch den Zusatz von einigen Aminosäure-Resten und/oder einen Zusatz/eine Streichung einer Aminosäure an einer einzelnen Stelle auf der nativen oder einem Genetic Engineering unterworfenen Sequenz einschließen. Beispielsweise kann das Annexin am N-Terminus über den Zusatz von Aminosäure-Resten modifiziert werden, worin wenigstens eine der Aminosäuren eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe liefert. Die zugängliche Sulfhydryl-Gruppe oder die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen können während einer Konjugation verwendet werden oder bleiben für eine weitere Konjugation verfügbar. Der Begriff „modifiziertes Annexin“ schließt Annexin-Multimere ein.

[0032] Annexin-Multimer: Eine Kombination aus zwei oder mehr monomeren modifizierten Annexin-Molekülen, wobei die Komponenten des Multimers nativ oder rekombinant oder irgendeine Kombination daraus sein können; dies führt zu einer ähnlichen oder verbesserten Membran-Bindungs-Affinität, verglichen mit dem monomeren Annexin. Ein aus bis zu etwa 20 modifizierten Annexinen aufgebautes Monomer ist nützlich für die vorliegende Erfindung. Die bevorzugte Multimer-Zusammensetzung weist zwischen 2 und etwa 10 modifizierten Annexinen auf. Ein Beispiel eines Annexin-Multimers ist ein Annexin-Dimer, das aus 2 modifizierten Annexinen aufgebaut sein kann, die über Disulfid-Bindungen zwischen zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen an den modifizierten Annexinen verknüpft sind. Das Annexin-Dimer kann direkt als Fusions-Protein unter Verwendung bekannter Expressions-Systeme hergestellt werden, wobei die beiden Annexin-Moleküle über einen Peptid-Linker durch die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen verbunden werden können. Ein dimeres Molekül könnte zusätzliche funktionelle Stellen wie beispielsweise eine endogene Radiomarkierungs-Chelatisierungs-Stelle oder eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe zum Binden eines oder mehrerer Hexose-Restes) enthalten, um ein Beispiel zu nennen. Wie oben definiert, ist auch der Begriff „Annexin-Multimer“ durch den Begriff „Annexin“ abgedeckt.

[0033] Verlängerung: Eine Reihe von Aminosäuren, die an den N-Terminus des Annexin-Moleküls addiert werden, was eine Sulfhydryl-Gruppe innerhalb von zehn Aminosäuren liefert, berechnet vom N-Terminus. Vorzugsweise liegt die Sulfhydryl-Gruppe innerhalb von sechs Aminosäuren des N-Terminus. Noch mehr bevorzugt ist die Sulfhydryl-Gruppe der zweite Rest der N-terminalen Verlängerung von sechs Aminosäuren. Die Sulfhydryl-Gruppe wird vorzugsweise geliefert durch einen Cystein-Rest. Diese Addition von Aminosäuren liefert ein hochflexibles Mittel zum Binden funktioneller Einheiten an dem terminalen Bereich des Annexins.

[0034] Radiomarkiertes Annexin: Ein Annexin, das darin komplexiert ein Radionuklid aufweist.

[0035] Radiomarkierte Annexin-Galactose: Ein Galactose-derivatisiertes Annexin, das darin komplexiert ein Radionuklid aufweist.

[0036] Hexose-Einheit: Eine Zusammensetzung aus einem oder mehreren sechs Kohlenstoffe umfassenden Zucker-Rests (Hexose-Rest) oder auf solchen Einheiten basierende Derivate, die durch Ashwell-Rezeptoren oder andere Leber-Rezeptoren erkannt werden, wie beispielsweise den Mannose-/N-Acetylglucosamin-Rezeptor, der mit Endothel-Zellen und/oder Kupfer-Zellen der Leber assoziiert ist, oder durch den Mannose-6-phosphat-Rezeptor. Eine Hexose-Einheit schließt einen Hexose-Cluster ein. Eine Hexose-Einheit schließt auch mehr als eine Hexose-Einheit ein, die an separate Stellen an andere Moleküle wie beispielsweise Annexin konjugiert ist.

[0037] Hexose-Cluster: Ein Konstrukt, das eine Mehrzahl von Hexose-Einheiten (einschließlich Derivaten) aufweist, die so konfiguriert sind, dass sie durch einen Leber-Rezeptor erkannt werden. Solche Cluster sind vorzugsweise aus Hexose-Resten aufgebaut, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind (über eine Verbindungs-Einheit, die ihrerseits an eine Verzweigungs-Struktur gebunden ist), und sind an Annexin oder an andere Komponenten eines Hexose-Clusters, der ein Konjugat enthält, über einen einzelnen Befestigungspunkt (über eine Bindungs-Einheit) gebunden. Vorzugsweise besteht das verzweigende Netzwerk aus zwei oder drei gabelartigen Verzweigungen, d.h. besteht aus 2, 4, 8, 16, 32 oder 64 Hexose-Resten oder besteht

aus 3, 9, 27 oder 81 Hexose-Resten.

[0038] Galactose-Cluster: Ein Konstrukt, das von etwa 3 bis etwa 64 Galactose-Resten aufweist, die in einer verzweigten Konfiguration verbunden sind. Vorzugsweise besteht das verzweigende Netzwerk aus zwei oder drei gabelartigen Verzweigungen, d.h. besteht aus 2, 4, 8, 16, 32 oder 64 Galactose-Resten oder besteht aus 3, 9, 27 oder 81 Galactose-Resten.

[0039] Radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster: Ein Galactose-Cluster-derivatisiertes Annexin mit einem darin komplexierten Radionuklid.

[0040] N_xS_y -Chelat-Verbindungen: Wie in der vorliegenden Beschreibung definiert schließt der Begriff „ N_xS_y -Chelat-Verbindung“ bifunktionelle Chelatoren ein, die in der Lage sind (i) koordinationsmäßig ein Metall oder Radiometall zu binden; und (ii) kovalent an ein Annexin-Molekül gebunden werden zu können. Bevorzugte N_xS_y -Chelat-Verbindungen weisen die Kerne N_2S_2 (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,897,225 oder dem US-Patent Nr. 5,164,176 oder dem US-Patent Nr. 5,120,526), N_3S (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,965,392), N_2S_3 (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,988,496), N_2S_4 (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,988,496), N_3S_3 (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 5,075,099) oder N_4 (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,963,688 und dem US-Patent Nr. 5,227,474) auf. Besonders bevorzugte N_xS_y -Chelat-Verbindungen haben N_2S_2 -Kerne und N_3S -Kerne. Beispielhafte N_xS_y -Chelat-Verbindungen sind beschrieben in der Druckschrift „Fritzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4024 – 29 (1988); in: Weber et al., Bioconj. Chem. 1, 431- 37 (1990) und in den darin zitierten Druckschriften, um zwei Beispiele zu nennen. Für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung ist die Prototyp-artige N_xS_y -Chelat-Verbindung eine N_2S_2 -Chelat-Verbindung. Eine chelatisierende Verbindung, die ein Metall oder Radiometall komplexiert, wird mit „Chelat“ bezeichnet.

[0041] Esterase-empfindliche chelatisierende Verbindung: Amid-Thiolat-Acetat-Ester-Chelat-Verbindungen der N_xS_y -Familie, in denen die Esterase-empfindliche chelatisierende Verbindung das Radionuklid-Metall mit dem Annexin verbindet. Gemäß der vorliegenden Definition schließt der Begriff „Esterase-empfindliche Geltaisierungs-Verbindungen“ diejenigen ein, die beschrieben sind in den US-Patenten Nrn. 5,112,953 und 5,175,257. Die Esterase-empfindlichen chelatisierenden Verbindungen werden während des Metabolismus des radioaktivmarkierten Proteins in der Leber gespalten und erzeugen Radioaktivität, die mit Cataboliten von vorteilhafter Verteilung assoziiert ist, was zur Reduktion von Hintergrund-Radioaktivität in der Nähe des Herzens und der Lungen führt. Eine bevorzugte Esterase-empfindliche chelatisierende Verbindung ist das N_3S -Seryl-Succinat, das beschrieben ist in dem US-Patent Nr. 5,112,953.

[0042] Spaltbarer Linker: Ein bifunktionaler Linker, der durch Leber-Enzym in der Weise erkannt wird, dass der Linker enzymatisch abspaltbar ist und einen hydrophilen Cataboliten erzeugt. In einigen bevorzugten Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung bindet der abspaltbare Linker die chelatisierende Verbindung an die Hexose-Einheit. Der abspaltbare Linker wirkt in Richtung auf eine Erhöhung der renalen Exkretion und hepato biliären Exkretion und erhöht so das Ziel-zu-Hintergrund-Verhältnis, was einen frühen Nachweis arterieller und venöser Thromben ermöglicht. Beispiele dieser Arten von Linker schließen ein Polymer wie beispielsweise Monosaccharide, Polysaccharide, Polyaminosäuren, Hydroxyalkylacrylamide, Polyethylenglycol-basierte hydrophile Polymere, biologisch abbaubare Polymere, die eine Ether- oder Ester-Bindung enthalten, sowie Dextran und Hemisuccinyl-Ester ein.

[0043] Konjugat: Ein Konjugat umfasst chemische Konjugate (kovalent oder nicht-kovalent gebunden), Fusionsproteine und dergleichen.

[0044] Für Fachleute mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich ist es offensichtlich, dass im Rahmen der Anwendung Bezugnahmen auf Annexin modifiziertes Annexin sowie ein Annexin-Multimer einschließen, solange nichts anderes speziell angegeben ist oder aus dem Kontext offensichtlich ist. Weiter werden Fachleute mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich verstehen, dass trotz der Tatsache, dass Galactose nachfolgend als repräsentatives Beispiel beschrieben ist, irgendeine Bezugnahme auf Galactose auch andere Hexose-Einheiten einschließt, wie beispielsweise N-Acetylgalactosamin, sowie deren Cluster.

[0045] Die vorliegende Erfindung ist gerichtet auf Annexin-Hexose-enthaltende Konjugate und radiomarkierte Annexine, einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate, und deren Verwendung für diagnostische Bildgebungs-Zwecke. Radiomarkierte Annexine gemäß der vorliegenden Offenbarung sind gekennzeichnet durch die folgenden Eigenschaften: Schnelle Anbindung an Ziel-Zellen-Stellen, gekennzeichnet

durch anionische Phospholipide; kurze Halbwertszeit im Kreislauf; in-vivo-Stabilität gegen metabolischen Abbau oder Radionuklid-Trennung von dem Chelat (in den Fällen, in denen im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein Chelat verwendet wird); und Eignung für Verpackung in Form eines Kalt-Kits.

[0046] Radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugate zeigen auch die oben genannten charakteristischen Eigenschaften, wenn auch in unterschiedlichen Graden. Beispielsweise zeigen radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugate eine kürzere Halbwertszeit im Kreislauf als ihre radiomarkierten Annexin-Gegenstücke. Auch zeigen radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugate allgemein eine niedrigere Bindungsaffinität über Ziel-Stellen als ihre radiomarkierten Annexin-Gegenstücke. Eine erfolgreiche diagnostische Bildgebung schließt sowohl eine Signal-Akkumulation an der Ziel-Stelle als auch eine schnelle Eliminierung eines nicht auf das Ziel gerichteten Signals ein. Folglich liefert eine beschleunigte Elimination der radiomarkierten Annexin-Galactose-Konjugate vom Kreislauf eines Rezipienten eine kennzeichnende Möglichkeit zum Erhalt diagnostischer Bilder in einem kürzeren Zeitraum.

[0047] Darüber hinaus verringert sich ein Ziel-Stellen-Signal über die Zeit als Ergebnis des radioaktiven Zerfalls. Weiter verringert ein Metabolismus des Ziel-assoziierten Materials ebenfalls das Target-Signal. Folglich erhöht eine Bildgebung innerhalb eines kürzeren Zeitraums das Verhältnis Ziel : Nicht-Ziel und das gesamte Ziel-Signal, wodurch verbesserte diagnostische Information gespeichert wird.

[0048] Radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung kombinieren wünschenswerte Merkmale radiomarkierter Annexine und radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate. Beispielsweise zeigen radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate eine kürzere Halbwertszeit im Kreislauf als ihre radiomarkierten Annexin-Gegenstücke. Auch zeigen Radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate allgemein eine höhere Bindungs-Affinität gegenüber Ziel-Stellen als ihre radiomarkierten Annexin-Galactose-Konjugat-Gegenstücke. Folglich bieten die erhöhte Eliminierung vom Kreislauf eines Rezipienten und die Aufrechterhaltung einer erheblichen Bindungs-Affinität der radiomarkierten Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung die Möglichkeit, klare diagnostische Bilder in einer kürzeren Zeitspanne zu erhalten.

[0049] Eine Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist gerichtet auf Annexinenthaltende Konjugate, die für ein Radio-Labeling mit einem diagnostischen Bildgebungsmittel geeignet sind und die einschließen:

- ein modifiziertes Annexin, wobei die Modifikation eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe hat; und
- eine Hexose-Einheit, die von einem Säuger-Leber-Rezeptor erkannt wird, wobei die Hexose-Einheit an das Annexin konjugiert ist.

[0050] Radiomarkierte modifizierte Annexin-Hexose-Einheit-Konjugate, die für das Abbilden vaskulärer Thrombi geeignet sind, kommen ebenfalls in Betracht, wobei die radiomarkierten Annexin-Hexose-Einheit-Konjugate ein modifiziertes Annexin, eine Hexose-Einheit und weiter ein diagnostisches Radionuklid einschließen, das an das modifizierte Annexin konjugiert ist.

[0051] Ein anderes bevorzugtes Annexin-Konjugat gemäß der vorliegenden Erfindung ist dasjenige, das zum Radiomarkieren mit einem diagnostischen Bildgebungsmittel geeignet ist und einschließt:

- ein modifiziertes Annexin; und
- eine Esterase-empfindliche N_xS_y -Chelat-Verbindung, die an das Annexin konjugiert ist.

[0052] Radiomarkierte Annexin-Konjugate, die zum Abbilden vaskulärer Thrombi geeignet sind, werden ebenfalls in Betracht gezogen, wobei die radiomarkierten Annexin-Konjugate ein Annexin, eine Esterase-empfindliche N_xS_y -Chelat-Einheit und weiter eine Hexose-Einheit und ein diagnostisches Radionuklid einschließen, das durch die chelatisierende Verbindung komplexiert wird.

[0053] Ein weiteres bevorzugtes Konjugat gemäß der vorliegenden Erfindung schließt ein:

- ein modifiziertes Annexin-Multimer; und
- eine N_xS_y -Chelat-Verbindung, die an das Annexin konjugiert ist.

[0054] Radiomarkierte Annexin-Multimer-Konjugate, die zum Abbilden vaskulärer Thrombi geeignet sind, werden ebenfalls in Betracht gezogen, wobei die radiomarkierten Annexin-Multimer-Konjugate ein Annexin-Multimer, eine N_xS_y -Chelat-Verbindung und weiter ein diagnostisches Radionuklid einschließen, das durch die Chelat-Verbindung komplexiert wird.

[0055] Für das Sichtbarmachen von vaskulären Thromben, die mit einer Zahl von pathologischen Zuständen

assoziiert sind, wird ein radiomarkiertes Annexin wie beispielsweise ein Konjugat aus einem Annexin, das mit einem abbildenden Radionuklid komplexiert ist, wie beispielsweise Tc-99m, einem Empfänger verabreicht, für den eine derartige Diagnose gewünscht ist. Das radiomarkierte Annexin oder der Annexin-Teil des radiomarkierten Konjugats lokalisiert sich schnell an Target-Stellen, die durch negative geladene Oberflächen-Phospholipide gekennzeichnet sind, wie beispielsweise vaskuläre Thromben. Das Radionuklid wird nach seinem Vermögen ausgewählt, über eine der verschiedenen dafür geeigneten Verfahrensweisen sichtbar gemacht zu werden, beispielsweise für eine Bildgebung mit einer Gamma-Kamera. Wegen der schnellen Anbindung von Annexinen an die Target-Stelle und die kurze Halbwertszeit im Serum (allgemein weniger als 30 Minuten) von Annexinen (die durch Radiomarkierung nicht signifikant verlängert wird), läuft eine Bildgebung dieser Ziel-Stellen mit nur geringer Aussetzung der Nicht-Target-Stellen gegenüber Radioaktivität ab.

[0056] Eine diagnostische Bildgebung ist abhängig von dem Verhältnis Signal zu Geräusch. Verbesserungen, die entweder eine Akkumulation des Ziel-Signals oder eine Verringerung des Geräusche einschließen, verstärken die Wirksamkeit des Diagnose-Bildgebungs-Produkts. Für eine zielorientierte Bildgebung ist die Geräusch-Verringerung synonym mit einer Verringerung der Hintergrund-Radioaktivität, insbesondere der Blut-Pool-Aktivität. Annexine einschließlich Annexin V werden durch die Leber schnell entfernt. Jedoch nur ein Bruchteil der Aktivität wird bei jedem Durchlauf des umlaufenden Konjugats durch die Leber entfernt.

[0057] Um die Hintergrund-Aktivität noch effizienter aus dem Blut zu entfernen, könnte eine Verbesserung der Leber-Extraktion der Annexin-enthaltenden Konjugate verwendet werden. Ein bevorzugtes Verfahren zur Erhöhung der Leber-Extraktion schließt eine Derivatisierung des Annexin-enthaltenden Konjugats mit einer Hexose-Einheit wie beispielsweise Galactose ein, die von einem Leber-Rezeptor erkannt wird. Die Wirksamkeit der Leber-Rezeptor-Extraktion der Hexose-Einheit, die dadurch erkannt wird, resultiert zu einer erhöhten Entfernung von dem derivatisierten Annexin-enthaltenden Konjugat (z.B. Annexin-Galactose-Konjugat pro Durchlauf durch die Leber, verglichen mit der Menge an genauso entferntem nicht-derivatisiertem Annexin-enthaltendem Konjugat).

[0058] Eine weitere Verbesserung des Verhältnisses Signal zu Geräusch kann erreicht werden durch Derivatisieren von radiomarkiertem Annexin oder von einem Annexin-enthaltenden radiomarkierten Konjugat mit einem Cluster von Galactose-Molekülen, die von einem Leber-Rezeptor erkannt werden. Die Effizienz einer Leber-Rezeptor-Extraktion der erkannten Einheit führt dadurch zu einer erhöhten Entfernung des derivatisierten Annexin-enthaltenden Konjugats pro Durchlauf durch die Leber (z.B. eines Annexin-Galactose-Cluster-Konjugats), verglichen mit der Menge an underivatisiertem Annexin-enthaltendem Konjugat, das auf diesem Wege entfernt wird. Darüber hinaus können mehrere Galactose-Reste, die in einem Cluster angeordnet sind, an die Annexin-Konjugat-Komponente über einen einzelnen Bindungspunkt gebunden werden. In der Folge kann weniger oder gar keine Reduktion der Annexin-Zielmolekül-Bindungsaffinität, die von einer Galactose-Cluster-Derivatisierung resultiert, beobachtet werden, verglichen mit nicht in Form eines Clusters angeordneten Annexin-Galactose-Konjugaten.

[0059] Annexine liegen allgemein (wobei die am meisten bemerkenswerte Ausnahme Annexin II ist) in Form einzelkettiger, nicht-glycosylierter Proteine mit einem Molekulargewicht von etwa 33 bis 72 Kilodalton (kD) vor. Annexine besitzen eine Anzahl biologischer Aktivitäten, die mit einer durch Calciumionen vermittelten Bindung assoziiert sind.

[0060] Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Annexine mit hoher Affinität an anionische Membran-Lipide in Gegenwart millimolarer Konzentrationen Calcium binden. In der Gegenwart von Calcium haben diese Proteine eine besonders hohe Affinität gegenüber negativ geladenen Phospholipiden wie beispielsweise Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylsäure oder Phosphatidylinositol.

[0061] Hierzu wird beispielsweise verwiesen auf „Funakoshi et al., Biochem. 26, 5572 – 5578 (1987)“ und „Tait et al., Biochem. 27, 6268 – 6272 (1988)“. Derartige negativ geladene Phospholipide sind mit vaskulären Thromben assoziiert (z.B. sind auf der Oberfläche aktivierter humaner Blutplättchen angeordnet).

[0062] Annexine üben antikoagulatorische Wirkungen aus. Eine Koagulations-Inhibition wird vermittelt durch das Binden von Annexinen an negativ geladene Oberflächen-Phospholipide (z.B. wie sie auf der Oberfläche aktivierter Blutplättchen zugegen sind). Man geht davon aus, dass dieser Bindungsvorgang die Aktivierung von Gerinnungsfaktoren (Clotting-Faktoren) durch derartige negativ geladene Oberflächen-Phospholipide blockiert. Annexine ordnen sich schnell an Ziel-Stellen an, die anionische Phospholipide tragen, d.h. in einer Zeit von etwa 5 bis 30 Minuten, abhängig von deren Umlauf-Konzentrationen, bleiben jedoch im Serum für eine etwas längere Zeitdauer umlaufend (Halbwertszeit im Kreislauf < 30 min.). Das nachfolgende Beispiel III dis-

kutiert Ergebnisse von Bildgebungs-Experimenten, bei denen vaskuläre Thromben in planaren Bildern in einer mittleren Zeit (im Anschluss an die Annexin-Verabreichung) von 82 Minuten visualisiert wurden.

[0063] Aufgrund dieser Eigenschaften können Annexine oder an diagnostische oder therapeutische Mittel konjugierte Annexine in Protokollen für die in vivo-Diagnose oder -Behandlung von vaskulären Thromben verwendet werden, die mit einer Anzahl von Indikationen assoziiert sind, wie beispielsweise DVT (deep vein thrombosis), PE (pulmonary embolism), Herzinfarkt, Vorhof-Flimmern (atrial fibrillation), Probleme mit prosthetischen kardiovaskulären Materialien, Hirnschlag (Apoplexie) und dergleichen. Andere Indikationen, die mit einer Akkumulation aktivierter Blutplättchen assoziiert sind, für die die Annexin-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich sind, schließen die folgenden ein: Abszess-Bildgebung, Restenose im Anschluss an eine Ballon-Angioplastie (restenosis post balloon angioplasty; PCTA), Entzündungen von Gelenken (d.h. rheumatoide Arthritis), geschädigte Endothel-Zellen (d.h. Alzheimer-Krankheit), Abbilden von Gerinseln in cerebralen (Gehirn-)Arterien, Verschlüsse in peripheren Arterien, Abbildung von Vorhof-Thrombosen und Abbildung von Koronar- und Carotis-Arterien-Thromben.

[0064] Über das Abbilden von Blutplättchen in vivo ist es auch wichtig, Blutplättchen-Populationen in den Bereichen klinische Forschung, in vitro-Diagnoseforschung und Grundlagenforschung zu charakterisieren. Von den Zell-Oberflächen-Markern, die derzeit zum Charakterisieren von Blutplättchen verfügbar sind, sind viele nicht kreuzreaktiv zwischen Spezies und können alle Plättchen erkennen, sondern im Gegensatz dazu gerade nur die aktivierte Blutplättchen-Population. Es wird angenommen, dass sich Annexin selektiv an aktivierte Blutplättchen in vielen Spezies bindet. So können Annexin-Konjugate gemäß der Erfindung als ein alternativer Zell-Marker in den Gebieten Forschung und Diagnose verwendet werden, wie beispielsweise in der Immunohisto-Chemie und der Durchfluss-Cytometrie. Beispielsweise können Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung dazu verwendet werden, aktivierte Blutplättchen in fixierten Geweben/Tumoren, Blut-Ausstrichen, in Tieren mit Koagulopathien und in situ in Blutplättchen-Aktivierungs-Assays verwendet werden, und zwar in Response auf verschiedene chemische oder infektiöse Stimuli sowie zur Bestimmung aktivierter Blutplättchen im Blut, in Zellkultur-Assays und in Blutplättchen-Response-Assays. Von Fachleuten mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich wird erkannt, dass die Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung nützlich für jeden beliebigen Zweck oder jede beliebige Indikation sind, in der ein Ansprechen oder Binden aktivierter Blutplättchen wünschenswert ist. Beispielhafte diagnostische Protokolle und Experimente, in denen radiomarkierte Annexine verwendet werden, werden nachfolgend angegeben, um weiter diesen Aspekt der vorliegenden Erfindung aufzuklären.

[0065] Ein Beispiel eines bevorzugten Annexins, das nützlich in der praktischen Durchführung der vorliegenden Offenbarung ist, ist Annexin V, das von Bohn im Jahre 1979 aus Human-Plazenta, einer reichen Quelle von Annexinen, isoliert wurde und mit Plazenta-Protein 4 (PP4) bezeichnet wurde. Annexin V wurde in *E. coli* exprimiert (Iwasaki et al., *J. Biochem.*, Band 102, Nummer 5, 1261 – 1273 (1987)). Auch wurde ein cDNS-Klon voller Länge von Annexin V erhalten und in Expressions-Vektoren subkloniert, wodurch die Produktion von Fusions-Proteinen erleichtert wurde, die Annexin V enthalten (siehe allgemein dazu Tait et al., *J. Biol. Chem.* 270 (37), 21594 – 21599 (1995)). Annexin V besteht aus vier Domänen (vier nebeneinander vorliegende, nicht perfekte Wiederholungen von etwa 75 Aminosäure-Resten; „Funakoshi et al., *Biochem.* 26, 8087 – 8092 (1987)“, worin jede Domain aus 5 alpha-Helices besteht. Von der Seite erscheint das Annexin V-Molekül kronenartig mit wenigstens vier Calcium-Bindungsstellen auf seiner konvexen Oberfläche, durch die Annexin-Phospholipid-Wechselwirkungen vermittelt werden. Andere Annexin-Moleküle sind ebenfalls nützlich in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung, und die auf Annexin V bezogenen Diskussionen der obigen Beschreibung gelten allgemein für Annexin-Moleküle.

[0066] Von den Annexinen hat Annexin V die stärkste Bindungsaffinität ($K_d < 10^{-10}M$) gegenüber Phospholipid-Vesikeln, die 80 % Phosphatidylcholin und 20 % Phosphatidylserin enthalten, unter Bedingungen, die denen von Plasma-Flüssigkeit und extracellulärer Flüssigkeit vergleichbar sind (1,2 mM ionisiertes Calcium; 0,15 M Ionenstärke). Diese Bindung ist reversibel und Calcium-abhängig. Der Grad einer Annexin-Bindung an Phospholipide kann quantitativ erfaßt werden durch Fluoreszenz-Quenchen, wie dies beschrieben wurde von „Taft et al., *J. Biol. Chem.* 264, 7944 – 7949 (1989)“.

[0067] Da Annexin V eine Mehrzahl von Calcium-Bindungsstellen aufweist und da ein Binden von Annexin V an negativ geladene Phospholipide durch Calcium vermittelt wird, kann ein im Engineering behandeltes Molekül, das aus einer oder mehreren einzelnen Annexin V-Domänen besteht, in Bildgebungs-Protokollen gemäß der vorliegenden Offenbarung verwendet werden. Auch kann das Annexin-Molekül an einer Position oder Positionen, die von den Domain-Grenzen verschieden sind, verteilt werden und so ein dem Engineering unterworfen Molekül liefern, das einer Calciumvermittelten Bindung von anionischen Phospholipiden fähig ist.

Auch kann Annexin V an einem oder mehreren Aminosäure-Resten) verändert werden, solange die Affinität von Annexin V für anionische Phospholipide nicht signifikant verschlechtert wird. Beispielsweise kann der Cystein-Aminosäure-Rest (Position 316) von Annexin V entweder gestrichen werden oder durch Alanin oder andere, keine Schwefel enthaltende Aminosäuren ersetzt werden, wie dies Fachleuten mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich bekannt ist. Dabei wird beim Markieren ein monomer radiomarkiertes Annexin V hergestellt.

[0068] In einem anderen Beispiel kann ein natives Annexin an dem N-terminalen Ende dadurch modifiziert werden, dass man Aminosäure-Reste addiert und so für eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe oder zugängliche Sulfhydryl-Gruppen sorgt. Dies kann bewirkt werden mit der Addition von wenigstens einem einzelnen Cystein-Rest nahe dem N-terminalen Ende. Die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen können nach einer anfänglichen Konjugation verfügbar sein oder der weiteren Konjugation dienen, abhängig von der verwendeten Ausführungsform der Erfindung.

[0069] Ein bevorzugtes modifiziertes Annexin-Molekül, wie es in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen definiert ist, ist eine monomere Form von Annexin V mit einer N-terminalen Verlängerung einer Aminosäure-Sequenz. Die Sequenz wird so gewählt, dass sie Aminosäuren enthält, die einer Aminosäure benachbart sind, die eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe enthält, wie beispielsweise Cystein. Die gewählte Sequenz verbessert die Verhältnisse Ziel-Organ zu normalem Organ und das überlegene Gerinsel-Bildgebungs-Potential. Die Verwendung von hydrophilen Aminosäuren in der Sequenz wie beispielsweise Serin, Glycin, Threonin, Aspartat, Glutamat und andere erleichtert die Ausscheidung der Chelat-Produkte des Catabolismus über die Nieren im Anschluß an eine Aufnahme des radiomarkierten Annexins in normalen Organen wie beispielsweise der Leber. Eine bevorzugte Aminosäure-Sequenz, die dem N-terminalen Ende von Annexin V zuaddiert wird, ist Ala-Cys-Asp-His-Ser-Met. Ein Vorteil dieser speziellen Konfiguration ist, dass mit dem Cystein-Rest nahe dem N-terminalen Ende die Sulfhydryl-Gruppe und die benachbarten Amid-Gruppen eine stabile Chelatisierung eines Radionuklids erlauben. Beispielsweise kann ein Radionuklid wie beispielsweise Technetium in dem nun gebildeten stabilen N_3S -Chelat verwendet werden, und zwar zur Verwendung beim endogenen Radiomarkieren des Annexin-Moleküls.

[0070] So wird es durch die vorliegende Erfindung in Betracht gezogen, dass Tc-99m direkt über eine spezielle, dem Bio-Engineering unterworfenen Stelle an Annexin V gebunden werden kann, und zwar ohne die Notwendigkeit einer inzwischen ablaufenden Produktion einer Amin-gerichteten aktiven Ester-Chelatisierungs-Verbindung für die Radiomarkierung. Wie oben festgestellt, kann zum Erleichtern eines direkten Markierens die modifizierte Annexin V-N-Terminus-Sequenz aus Ala-Cys-Asp-His-Ser-... usw. bestehen, um ein Beispiel zu nennen. Ein definiertes Chelat-System durch eine endogene Protein-Sequenz kann in den Fällen erreicht werden, in denen die benachbarten Amid-Donor-Atome von Aminosäure-Resten sich um die Basis der Metall-Oxo-Bindung in einer quadratisch pyramidalen Anordnung herumwickeln. So sorgt diese Anordnung für ein stabiles Chelatisieren, ähnlich dem stabilen Chelatisieren, das erhalten wird, wenn man ein N_3S -Chelat in einem vorgebildeten Markierungs-Verfahren verwendet. In einer bevorzugten Ausführungsform liegt der Cystein-Rest nahe dem N-terminalen Ende, und der Sulfhydryl-Rest des Cysteins und die benachbarten Amid-Gruppen von den anderen Aminosäuren innerhalb des modifizierten Annexins bilden eine stabile endogene MAG_3 -ähnliche Chelatisierungs-Struktur. Für die endogene Chelatisierung ist Technetium-99m das bevorzugte Radionuklid.

[0071] Andere Modell-Peptide, mit denen die Sequenz des N-terminalen Endes eines modifizierten Annexin V variiert werden kann (beispielsweise die Sequenz von George et al., in: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 8358 – 8362 (1995)), können hergetellt und verwendet werden. Diese Peptide werden denselben Bedingungen einer in vitro-Markierung mit Tc-99m unterworfen, wie sie oben beschrieben wurden. Peptide mit geeigneten charakteristischen Markierungs-Eigenschaften können gewählt werden, und die Sequenz kann in das rekombinante Annexin V-Molekül eingearbeitet werden. Ein Erfolg wird angezeigt durch eine Herstellung eines Derivats mit spezieller Aktivität, die genauso hoch ist wie oder höher ist als diejenige des vorliegenden Derivats, wie berichtet wurde von „Stratton et al.“, in: Circulation 92, 3113 – 3121 (1995), das stabil in vitro und in vivo ist, das seine Membran-Bindungsaktivität und Thrombus-Bindungsaktivität beibehält und das nicht nachteilig verändert wird in Bezug auf die Clearance im Blut oder die Bio-Verteilung. Wenn die oben angegebenen Kriterien erfüllt werden, wird das modifizierte Annexin V-Molekül oder das Multimer aus dem modifizierten Annexin V-Molekül in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet.

[0072] Eine andere Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein Annexin-Multimer. Ein Annexin-Multimer ist aus zwei oder mehr modifizierten Annexin-Molekülen aufgebaut, die über Disulfid-Brücken zwischen einer oder mehreren der zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen der jeweiligen Annexine miteinander verbunden

werden. Das Prototyp-artige und bevorzugte Annexin-Multimer ist ein Annexin-Dimer. Es ist beabsichtigt, dass das Dimer eine höhere Aktivität gegenüber der Blutplättchen-Membran aufweist, was von einer niedrigeren Dissoziationsrate herrührt. Das Dimer kann dann an der Target-Stelle in einer höheren Konzentration ausgeschüttet werden oder länger in dem Thrombus in vivo gehalten werden, wodurch das Target zu Hintergrund-Verhältnis zu jedem gegebenen Zeitpunkt verbessert wird.

[0073] Das Annexin-Multimer sowie das Annexin-Dimer können als Fusionprotein hergestellt werden. Beispielsweise kann dies bewirkt werden durch Verwendung bekannter Expressions-Systeme mit den modifizierten Annexinen, worin die modifizierten Annexine mit einem Peptid-Linker über die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen miteinander verbunden werden.

[0074] Ein multimeres Molekül kann auch weitere funktionelle Stellen enthalten, wie beispielsweise eine endogene radiomarkierte Chelatisierungs-Stelle, wie sie oben genannt wurde, oder eine freie Sulfhydryl-Stelle, um das Binden einer Hexose-Einheit möglich zu machen. Beispielsweise kann ein Annexin-Dimer produziert werden, das eine Hexose-Einheit und eine N_xS_y -Chelatisierungs-Verbindung einschließt. Diese Verbindung kann dann zum Erzeugen stabilisierter Monomere für weitere Radiomarkierungs-Verfahren über Reduktion der Disulfid-Bindungen des Dimers verwendet werden.

[0075] Um die Hintergrund-Radiomarkierungs-Aktivität zu senken, können Annexine (einschließlich modifizierte Annexine und deren Multimere) mit Hexose-Einheiten oder Einheiten auf Hexose-Basis derivatisiert werden. Noch spezieller können Annexine derivatisiert werden, so dass sie eine oder mehrere Hexosen eingearbeitet enthalten (z.B. sechs Kohlenstoffatome aufweisende Zucker-Einheiten), die von Ashwell-Rezeptoren oder anderen Leber-Rezeptoren erkannt werden, wie beispielsweise dem Mannose-/N-Acetylglucosamin-Rezeptor, der mit Endothel-Zellen und/oder Kupffer-Zellen der Leber assoziiert ist, oder dem Mannose-6-phosphat-Rezeptor. Beispielhaft für solche Hexosen sind Galactose, Mannose, Mannose-6-phosphat, N-Acetylglucosamin, Pentamannosylphosphat und dergleichen. Andere Einheiten, die von Ashwell-Rezeptoren erkannt werden, einschließlich Glucose, N-Galactosamin, N-Acetylgalactosamin, Thioglycoside von Galactose und allgemein D-Galactoside und Glucoside und dergleichen können ebenfalls in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Damit schließen Hexose-Einheiten, die in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung nützlich sind, eine Vielzahl von Galactose-, Mannose- und Glucose-Zuckern ein, die von Leber-Rezeptoren erkannt werden. Es versteht sich, dass Galactose und Galactose-Cluster von dem Begriff „Hexose-Einheit“ umfaßt werden. Weiter sollte auch erkannt werden, dass die Verwendung des Begriffs „Galactose“ in der Diskussion so verstanden wird, dass er nicht nur Galactose umfaßt, sondern auch N-Galactosamin, N-Acetylgalactosamin, Thioglycoside von Galactose und allgemein auch D-Galactoside. Der Begriff „Mannose“ wird in der Weise verstanden, dass er Mannose, Mannose-6-phosphat, Pentamannosylphosphat und dergleichen einschließt. Der Begriff „Glucose“ wird so verstanden, dass er Glucose, Glucoside und dergleichen umfaßt. Bevorzugte Hexose-Einheiten sind Hexose, Zucker, wie beispielsweise Galactose und Galactose-Cluster. Für die Zwecke der Erfindung ist die am meisten bevorzugte Galactose N-Acetylgalactosamin.

[0076] Wie oben festgestellt wurde, ist Galactose die Prototyp-artige Hexose, die für die Zwecke dieser Beschreibung verwendet wird. Eine Galactosethioglycosid-Konjugation an ein Protein wird vorzugsweise bewirkt in Übereinstimmung mit den Lehren von Lee et al. „2-Imino-2-methoxyethyl-1-thioglycosides. New Reagents for Attaching Sugars to Proteins“, *Biochemistry* 15 (18), 3956, (1976)“. Ein weiteres nützliches Galactosethioglycosid-Konjugations-Verfahren wird beschrieben in Drantz et al., „Attachment of Thioglycosides to Proteins: Enhancement of Liver Membrane Binding“, *Biochemistry* 15 (18), 3963 (1976)“. Eine Annexin-Galactose-Konjugation wird auch in den nachfolgenden Beispielen diskutiert.

[0077] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung liegt die Zahl der Galactose-Reste, die an das Annexin-Konjugat gebunden sind, im Bereich von 1 bis zur Maximalzahl von Galactose-Einheiten, die nicht signifikant die Bindungsaffinität von Annexin gegenüber seinem Ziel-Molekül verringern; siehe Beispiel IV. Beispielsweise ist eine Galactose-Derivatisierung, die wenigstens 20 % der nativen Annexin-Bindungs-Aktivität bewahrt, bevorzugt, wobei die Bewahrung von wenigstens 50 % der nativen Annexin-Bindungs-Aktivität noch mehr bevorzugt ist. Die theoretisch mögliche Maximalzahl von Galactose-Resten, die an dem Annexin-Molekül angeordnet sind, ist 22 (d.h. die Zahl von Lysin-Resten innerhalb der Annexin-Struktur). Eine beispielhafte Zahl von Galactose-Resten an radiomarkierten Annexin-Galactose-Konjugaten gemäß der vorliegenden Erfindung liegt im Bereich von 1 und etwa 5.

[0078] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise Hexose-Cluster bei der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet. Galactose-Cluster sind die Proto-

typ-artigen Hexose-Cluster, die für die Zwecke der vorliegenden Beschreibung verwendet werden. Ein die Galactose, N-Acetylgalactosamin enthaltender Cluster ist ein besonders bevorzugter Galactose-Cluster gemäß der vorliegenden Erfindung.

[0079] Der Aufbau von Hexose-Clustern gemäß der vorliegenden Erfindung wird durchgeführt unter Berücksichtigung der folgenden Kriterien, wie dies im Kontext des Aufbaus eines Galactose-Clusters beschrieben wird:

- 1) Zahl von Galactose-Resten in einem Cluster;
- 2) Entfernung zwischen Galactose-Einheiten in dem Cluster; und
- 3) Entfernung zwischen Galactose-Cluster und der Annexin-Konjugat-Komponente.

[0080] Hinblick auf das Kriterium Nr. 1 gibt die Literatur an, dass Galactose-Rezeptoren auf der Oberfläche eines Human-Hepatozyten als Heterotrimere und vielleicht als Bis-Heterotrimere gruppiert sind. Siehe beispielsweise „Hardy et al., Biochemistry 24, 22 – 28 (1985)“. Für eine optimale Affinität gegenüber solchen Rezeptoren wird im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen, dass jeder Galactose-Cluster vorzugsweise wenigstens drei Galactose-Reste enthalten sollte. Allgemein gilt, dass die Neigung für den Cluster, dass er durch Leber-Rezeptoren erkannt wird, um so größer ist, je größer die Zahl von Galactose-Resten in dem Cluster ist.

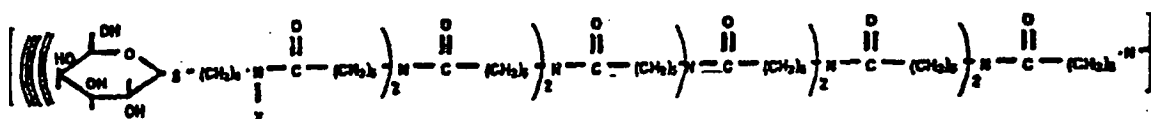
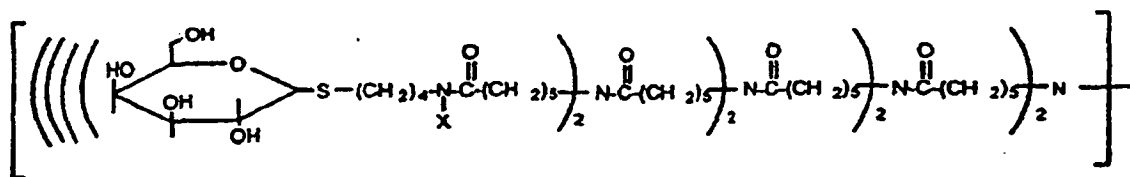
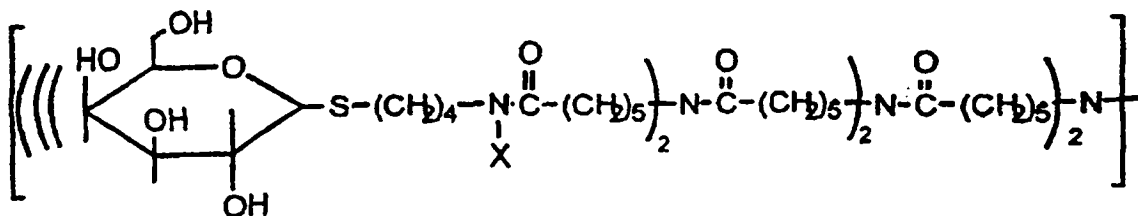
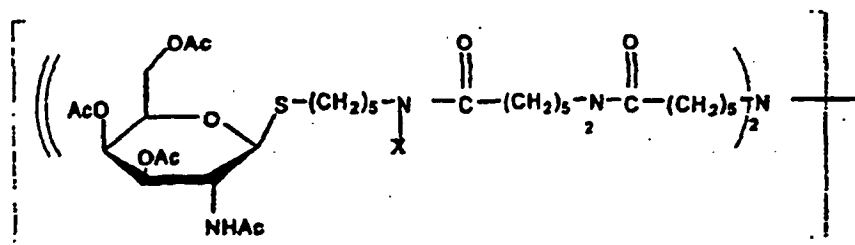
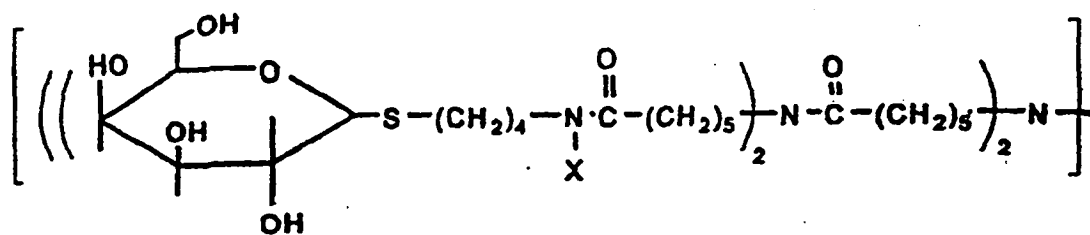
[0081] Eine erhöhte Galactose-Cluster-Größe kann das Binden des Annexins an ein Target-Molekül stören. Wenn eine signifikante Störung der Annexin-Bindung an ein Ziel-Molekül beobachtet wird (eine Verringerung auf < 20 % des nativen Annexin-Bindungs-Vermögens), kann ein engeres Linker-Molekül zwischen den beiden Einheiten verwendet werden, oder es sollten derart große Cluster nicht in radiomarkierten Annexin-Galactose-Cluster-Konjugaten gemäß der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0082] Im Hinblick auf das obige Kriterium Nr. 2 sind die Galactose-Rezeptoren innerhalb jedes Trimers voneinander um Entfernungen von 15, 22 und 25 Angström entfernt. Folglich kommt es im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht, dass die Galactose-Reste innerhalb eines Clusters vorzugsweise durch flexible Linker-Molekül voneinander getrennt sind, was die Trennung um wenigstens 25 Angström erlaubt. Der Abstand zwischen Galactose-Resten ist wahrscheinlicherweise wichtiger, wenn die Zahl von Galactose-Resten klein ist. Bei größeren Konstrukten tritt eher ein passendes Abstandhalten in Bezug auf Galactose-Reste ein, die nicht unmittelbare Nachbarn sind (d.h. Zucker-Reste, die weiter voneinander entfernt sind als diejenigen, die unmittelbare Nachbarn sind). Wenn eine mittlere Bindungslänge von 1,5 Angström angenommen wird, sind bevorzugte Galactose-Cluster gemäß der vorliegenden Erfindung gekennzeichnet durch eine Trennung von benachbarten Galactose-Resten von etwa 10 Bindungslängen oder mehr. Andere bevorzugte Konstrukte schließen Galactose-Cluster ein, die gekennzeichnet sind durch eine Trennung benachbarter Zucker-Reste um etwa 25 Bindungslängen oder mehr.

[0083] Betreffend Kriterium Nr. 3 sollte die Entfernung zwischen dem Annexin und dem Galactose-Cluster ausreichend sein, um irgendwelche nachteiligen sterischen Effekte auf eine Bindung von Annexin an ein Ziel-Molekül zu vermeiden, die durch die Größe oder Orientierung des Galactose-Clusters hervorgerufen werden. Diese Entfernung ist vorzugsweise größer als etwa 7 Bindungslängen oder etwa 10 Angström. Sofern nötig, wird ein Verlängerungs-Molekül zwischen dem Galactose-Cluster und dem Linker eingearbeitet (der den Galactose-Cluster und die Annexin-Komponente verbindet), oder zwischen dem Annexin und dem Linker, um die erforderliche Entfernung einzustellen.

[0084] Zwar scheinen die vorstehend erwähnten Parameter optimal für Galactose zu sein; es sollte jedoch angemerkt werden, dass diese Faktoren bei anderen Hexosen oder Mischungen daraus schwanken können, die sich an dieselben Rezeptoren binden können oder nicht oder die sich in unterschiedlicher Weise binden können. Unterstellt man die Lehren dieser Anmeldung als gegeben, kann ein Fachmann mit üblichen Sachverstand in diesem technischen Bereich unter Verwendung verfügbarer Synthese-Verfahren ein Annexin und ein aktives Mittel an andere Hexose-Cluster binden und kann solche Konstrukte identifizieren, die optimale Leistungseigenschaften liefern.

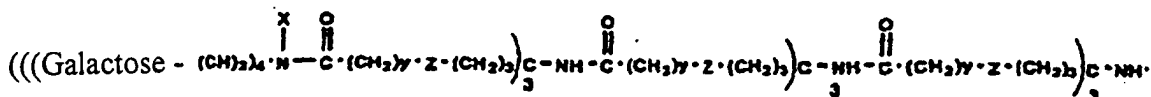
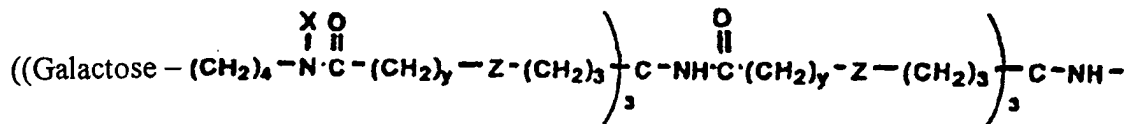
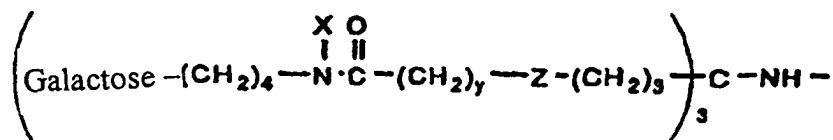
[0085] Beliebige verzweigte Zucker-Strukturen, die die Kriterien erfüllen, die oben beschrieben wurden, können in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Bevorzugte Galactose-Cluster gemäß der vorliegenden Erfindung weisen die folgenden Strukturen auf:



worin X vorzugsweise H oder Methyl ist, was zu Galactose-Clustern führt, die 4, 8, 16 und 32 Galactose-Reste enthalten. Eine weitere Wiederholung des Verzweigungs-Schemas ermöglicht eine Verlängerung des Galactose-Clusters dahingehend, dass dieser 32, 64 usw. Galactose-Reste einschließt. Darüber hinaus kann die Linker-Einheit zwischen den Hexose-Resten selbst und der Verzweigungs-Struktur (gezeigt als $-S-(CH_2)_4-NX-$) hinsichtlich ihrer Länge variabel sein.

[0086] Alternative Verzweigungs-Strukturen können auch im Aufbau der Galactose-Cluster in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Beispielsweise können andere Konstrukte, bei denen das Verzweigen zu einer Verdoppelung der Zahl von Galactose-Resten führt, verwendet werden. Außerdem kommen im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Konstrukte in Betracht, bei denen ein Verzweigen zu einer Verdreifachung oder anderen passenden Vervielfachungen der Zahl von Galactose-Resten führt.

[0087] Eine weitere potentielle Verzweigungs-Konstruktion basiert auf dem Molekül Bishomotris: $(HO-CH_2)_3-C-NH_2$. Das eine Sulphydryl-Gruppe enthaltende Derivat dieses Moleküls kann ebenfalls verwendet werden. In dieser Ausführungsform der Erfindung wird jeder Arm des Bishomotris-Moleküls verlängert und mit einer Carbonsäure terminiert: $(HO_2C-(CH_2)_y-Z-(CH_2)_3-C-NH_2)$, worin Z für S oder O steht und y im Bereich von 1 bis etwa 10 liegt. Für diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist ein bevorzugter Galactose-Cluster gekennzeichnet durch die folgenden Strukturen:



worin X vorzugsweise H oder Methyl ist, y im Bereich von 1 bis etwa 10 liegt und Z für O oder S steht. Die oben gezeigten Strukturen tragen 3, 9 bzw. 27 Galactose-Reste. Eine weitere Wiederholung des Verzweigens erlaubt eine Erweiterung bei Einschluß von 81 usw. Galactose-Resten.

[0088] Auch kann X eine Niederalkyl-Einheit (aufgebaut aus 2 bis 12 Kohlenstoffatomen) sein, die von Methyl verschieden ist, wie beispielsweise Ethyl, t-Butyl und dergleichen. X kann auch eine Niederalkyl-Gruppe sein, die ein Heteroatom trägt wie beispielsweise eine Niederalkyl-Säure, ein Niederalkyl-Ester, ein Niederalkyl-Aldehyd, ein Niederalkyl-Keton oder ein Niederalkyl-Ether.

[0089] Es ist intendiert, dass an eine Hexose-Einheit konjugiertes Annexin V durch die Leber schneller aus dem Blut beseitigt wird, was es ermöglicht, bald nach der Verabreichung eines radiomarkierten Mittels ein optimales Verhältnis Ziel zu Hintergrund zu erreichen. Beispielsweise kann ein Galactose-Cluster wie beispielsweise ein N-Acetylgalactosamin verwendet werden, um das oben beschriebene Ergebnis zu erreichen. Die Bindung des Clusters erfolgt nahe dem N-terminalen Ende des modifizierten Annexins, um nicht die Bindung der Annexin-Einheit an Thromben zu beeinträchtigen.

[0090] Wie früher angegeben, können Annexin-Moleküle durch Addition von etwa 2 bis etwa 6 terminalen Aminosäure-Resten modifiziert werden, um die Konjugations-Reaktion zwischen dem Annexin-Molekül und der Hexose-Einheit oder zwischen dem Annexin-Molekül und entweder einem Linker-Molekül oder einer Hexose-Einheit zu erleichtern oder um die Bildung eines Annexin-Multimers zu erleichtern. Beispielsweise können terminale Aminosäure-Reste addiert werden, um eine Sulfhydryl-Gruppe bereitzustellen oder um eine Gruppe bereitzustellen, die für eine Derivatisierung an eine Maleimid-Gruppe befähigt ist, wobei derartige Sulfhydryl- und Maleimid-Gruppen für die Konjugations-Reaktion verfügbar sind. Diese Modifikation kann über Verfahrensweisen der Protein-Chemie oder über eine Produktion eines passenden Fusions-Proteins oder andere, hierfür nützliche Verfahrensweisen erfolgen.

[0091] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein rekombinantes Annexin-Molekül an dem N-terminalen Ende durch Addition von Aminosäure-Resten modifiziert, mit der Maßgabe, dass wenigstens eine der Aminosäuren eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe liefert. Beispielsweise kann dies bewirkt werden mit der Addition wenigstens eines einzelnen Cystein-Rests nahe dem N-terminalen Ende. Ein bevorzugtes modifiziertes Annexin, wie es in der vorliegenden Beschreibung und in den Patentansprüchen definiert ist, ist eine Monomer-Form von Annexin V mit einer N-terminalen Verlängerung der bevorzugten Aminosäure-Sequenz aus Ala-Cys-Asp-His-Ser-Met. Ein Vorteil dieser Konfiguration ist, dass mit dem Cystein-Rest nahe dem N-terminalen Ende die Sulfhydryl-Gruppe und die benachbarten Amid-Gruppen für die Chelatisierung des Technetiums sorgen, was zu einer N₃S-artigen stabilen chelatisierenden Verbindung führt, und zwar für ein direktes Markieren. Es ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung beabsichtigt, dass die benachbarten Aminosäure-Donor-Atome von Aminosäure-Einheiten sich um die Basis der Metall-Oxo-Bindung in einer quadratisch pyramidalen Anordnung winden, wodurch Stabilität erreicht wird, und zwar ähnlich einer stabilen Chelatisierung, wie sie durch Verwendung einer N₃S-Chelat-Verbindung erreicht wird.

[0092] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird ein modifiziertes Annexin-Molekül produziert, das einen einzelnen Cystein-Rest als zweiten Rest in einer N-terminalen Verlängerung aus sechs Aminosäuren enthält. In dieser Ausführungsform wurde der einzelne natürliche innere Cystein-Rest zu einer keinen

Schwefel enthaltenden Aminosäure mutiert, wie beispielsweise Alanin oder Serin. Ein Verfahren zum Mutieren des Cystein-Rests wird in Beispiel VIII geliefert. Diese Aminosäure-Verlängerung liefert ein hochgradig flexibles Mittel zum Binden funktioneller Einheiten an den N-terminalen Bereich eines Annexins wie beispielsweise von Annexin V. Die Verfahrensweisen, die in der vorliegenden Beschreibung beschrieben werden, produzieren erfolgreich monomere und dimere modifizierte Annexin V-Moleküle. Es ist offensichtlich, dass die Proteine im wesentlichen rein sind und das erwartete Molekulargewicht aufweisen. Darüber hinaus kann irgendeine Produktion eines modifizierten Annexin V-Dimers quantitativ in das Monomer überführt werden, und zwar durch Behandlung mit 2-Mercaptoethanol, was das Vorhandensein der erwarteten Disulfid-Bindung bestätigt.

[0093] Es wurden Messungen der Membran-Bindungseigenschaften von modifiziertem Annexin und dem modifizierten Annexin-Dimer in einem Konkurrenz-Assay gegen natives monomeres Annexin V durchgeführt. Das Dimer ist 6-fach potenter als monomeres Annexin V in der Verdrängung von markiertem Ligand von der Membran. Pharmacokinetische Untersuchungen, die in der vorliegenden Beschreibung offenbart sind, haben gezeigt, dass das erhöhte Molekulargewicht des modifizierten Annexin-Dimers die Geschwindigkeit seines Verschwindens aus dem Blut nicht verlangsamt. Tatsächlich wird das modifizierte Annexin V-Dimer aus dem Blut mit ungefähr derselben Geschwindigkeit wie monomeres Annexin V des Wild-Typs entfernt. Siehe dazu die nachfolgende Tabelle 1.

Tabelle 1

Pharmacokinetische Daten von mit ^{125}I jodiertem modifiziertem Annexin V-Dimer und Annexin V in Mäusen

Zeit seit der Injektion (min)	Radioaktivität im Blut (% ID/g)	
	Annexin V	Modifiziertes Annexin V-Dimer
15	1,27 ± 0,12	1,70 ± 0,02
60	1,60 ± 0,04	0,36 ± 0,04
240	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,02

[0094] Die Offenbarung der vorliegenden Erfindung zeigt, dass das dimere Molekül von Annexin V wahrscheinlich eine höhere Affinität zu der Blutplättchen-Membran aufweist, und zwar höchstwahrscheinlich aufgrund einer langsameren Dissoziationsgeschwindigkeit. Damit kann dieses Molekül in höherer Konzentration aufgenommen oder länger in dem Thrombus in vivo gehalten werden, wodurch das Verhältnis Target-zu-Hintergrund zu jedem gegebenen Zeitpunkt verbessert wird.

[0095] Radionuklide, die nützlich im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind, schließen penetrierende Photonen-Emitter einschließlich gamma-Emitter und Röntgenstrahl-Emitter ein. Diese Strahlen begleiten eine nukleare Transformation wie beispielsweise das Einfangen von Elektronen, eine beta-Emission und einen isomeren Übergang. Radionuklide, die nützlich sind schließen solche mit Photonen zwischen 80 und 400 keV und Prositronen-Produzenten, 511 keV-Zerstrahlungs-Photonen und annehmbare Strahlungs-dosis aufgrund von absorbierten Photonenteilchen und deren Halbwertszeit ein. Radionuklide, die geeignet zur Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind, sind in diesem technischen Bereich bekannt und schließen ein: ^{18}F , ^{69}Cu , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{100}Pd , ^{212}Bi , ^{212}Pb , ^{109}Pd , ^{67}Cu , ^{67}Ca , ^{68}Ga , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , ^{95}Ru , ^{105}Ru , ^{99}Rh , ^{105}Rh , ^{111}In , ^{123}I , ^{125}I , ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{170}Lu , ^{189}Pt , ^{193}Pt , ^{199}Au , ^{197}Hg und dergleichen.

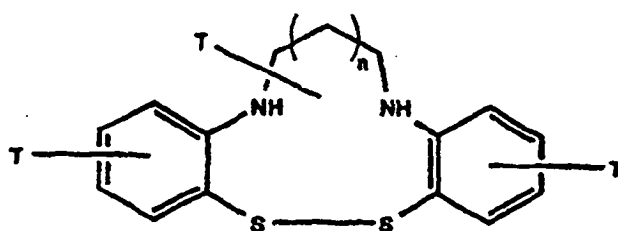
[0096] Tc-99m ist ein bevorzugtes Radionuklid für die praktische Durchführung der vorliegenden Erfindung. Tc-99m wurde stabil an Annexin V in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung sowohl bei niedriger als auch bei hoher spezifischer Aktivität gebunden (0,53 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ – 1,012 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$). Adäquate radiochemische Ausbeuten und gute radiochemische Reinheiten wurden erhalten. Aktivierte Blutplättchen-Bindungs-Untersuchungen wurden ebenfalls durchgeführt und die radiomarkierten Annexin V-Konjugate banden sich gut an aktivierte Blutplättchen.

[0097] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann eine N_xS_y -Chelat-Verbindung an ein Annexin-Hexose-Konjugat, ein Annexin-Multimer oder ein modifiziertes Annexin gebunden werden, um ein Radiomarkieren zu erleichtern. N_xS_y -Chelat-Verbindungen schließen chelatisierende Verbindungen ein, die in der Lage sind, sich koordinativ an ein Metall oder Radio-Metall zu binden und sich kovalent an ein Annexin-Molekül zu binden. Bevorzugte N_xS_y -Chelat-Verbindungen haben die N_2S_2 -Kerne (allgemein beschrieben in dem

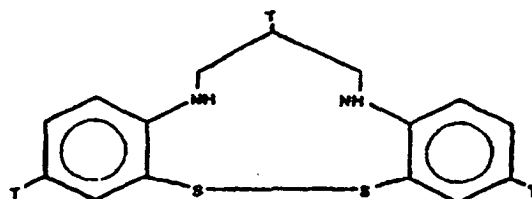
US-Patent Nr. 4,897,225 oder dem US-Patent Nr. 5,164,176 oder dem US-Patent Nr. 5,120,526), den N_3S -Kern (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,965,392), den N_2S_3 -Kern (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,988,496), den N_2S_4 -Kern (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,988,496), den N_3S_3 -Kern (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 5,075,099) und den N_4 -Kern (allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,963,688 und dem US-Patent Nr. 5,227,474). Besonders bevorzugte N_xS_y -Chelat-Verbindungen haben den N_2S_2 -Kern und den N_3S -Kern. N_2S_2 - und N_3S -Chelat-Verbindungen sind in diesem technischen Bereich bekannt. Beispielsweise sind bevorzugte N_2S_2 -Verbindungen beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,897,225, und bevorzugte N_3S -Chelat-Verbindungen sind allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,965,392 und in dem US-Patent Nr. 5,112, 953.

[0098] Die N_2S_2 -Chelat-Verbindungen sind bifunktionelle Diamid-Chelatoren und bifunktionelle Dimercaptid-Chelatoren der N_xS_y -Familie, die in der Lage sind, stabil ein Radionuklid über zwei Stickstoff-Atome und zwei Schwefel-Atome zu komplexieren, die in passender Weise angeordnet sind. N_2S_2 -Chelat-Verbindungen sind allgemein beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,897,225.

[0099] Bevorzugte Chelat-Verbindungen mit einem N_2S_2 -Kern schließen auch Diamindimercaptoamid-Chelat-Verbindungen ein, die das folgende Biphenyl-Grundgerüst aufweisen und die allgemein beschrieben sind in der US-Patentanmeldung mit dem amtlichen Aktenzeichen Nr. 08/463,232:



oder



worin $n = 0$ bis 1 ist und ein oder mehrere T-Substituenten eine funktionelle Gruppe einschließen, die verfügbar und geeignet für eine Konjugation mit einer anderen Konjugat-Komponente ist. Solche beispielhaften funktionellen Gruppen schließen hydrophile Gruppen ein, die nützlich für eine Ausscheidung über die Niere sind, im Gegensatz zu einer hepatobiliären Ausscheidung.

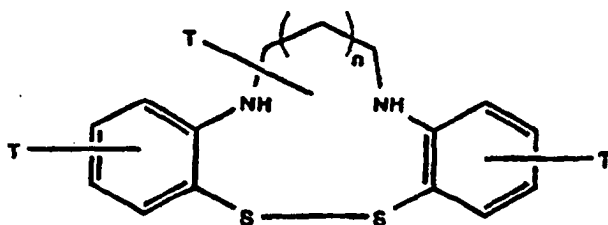
[0100] Die N_3S -Chelat-Verbindungen sind bifunktionelle Triamid-mercaptid-Chelatoren der N_xS_y -Familie, die in der Lage sind, ein Radionuklid stabil durch drei Stickstoff-Atome und ein Schwefel-Atom zu komplexieren, die in passender Weise positioniert sind. Bevorzugte N_3S -Chelat-Verbindungen sind beschrieben in dem US-Patent Nr. 4,965,392 und dem US-Patent Nr. 5,091,514.

[0101] Die vorliegende Erfindung betrifft diese stabile Chelat-Technologie zur Ausnutzung des Thrombus-Auf-finde-Vermögens von Annexin-Molekülen. Dadurch wird ein Bildgebungs-Mittel bereitgestellt, das in der Lage ist, vaskuläre Thromben in vivo schnell zu visualisieren. Die radiomarkierten Annexine, einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate und radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung können dazu verwendet werden, Thrombus-Bilder zu erhalten, die den hohen Wert der Hintergrund-Aktivität reduzieren oder eliminieren, der von metabolisch abgebautem radiomarkiertem Konjugat resultiert. Die radiomarkierten Annexine einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate und Radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate vermeiden auch eine klinisch nicht annehmbare Toxizität gegenüber Nicht-Zielzellen-Stellen. Mit Tc-99m radiomarkiertes Annexin V zeigte bessere Ergebnisse als I-123 in Untersuchungen an Schweinen, wie im nachfolgenden Beispiel III beschrieben wird.

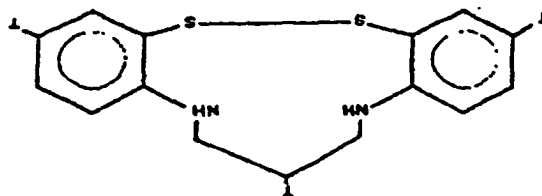
[0102] Die Radiomarkierung von Annexin V mit einem Radionuklid unter Verwendung einer N_2S_2 -Chelat-Ver-

bindung oder N_3S_3 -Chelat-Verbindung kann durchgeführt werden unter Verwendung entweder eines vorher gebildeten oder eines nachher gebildeten Ansatzes. Mit anderen Worten: Das Radionuklid wird entweder innerhalb der Chelat-Verbindung vor (vorgebildet) oder im Anschluß an (nachgebildet) die Konjugation der Chelat-Verbindung an Annexin V komplexiert. Der vorgeformte Ansatz ist bevorzugt, und geeignete Verfahrensweisen dafür sind in den Beispielen I, II, IV und XV beschrieben. Weitere Untersuchungen zeigten an, dass der Vorform-Radiomarkierungs-Ansatz zu zwei radiometrischen Peaks bei der HPLC-Analyse führte. Das Auftreten von zwei Peaks resultiert aus Cystein-konjugiertem Annexin V sowie aus Lysin-konjugiertem Annexin V. So kann die Cystein-Aminosäure von Annexin V entweder gestrichen oder durch eine andere, keinen Schwefel enthaltende Aminosäure ersetzt werden und führt so zu einem monomer markierten Annexin V; siehe dazu Beispiel IX. Die Verwendung des Vorform-Ansatzes zum Radiomarkieren des modifizierten Annexin V führt auch zu einem monomer markierten Annexin V. Die Konjugation kann auftreten über die zugängliche Sulfhydryl-Gruppe eines modifizierten Annexins dazu über den Lysin-Rest des modifizierten Annexins. Auch kann eine Hexose-Einheit-Konjugation an das Annexin über chemische Verfahrensweisen entweder vor der Konjugation (nachgeformter Ansatz) oder im Anschluß an eine Konjugation (vorgeformter Ansatz) einer Chelat-Verbindung an das Annexin erfolgen. Eine chemische Konjugation einer Hexose-Einheit wird vorzugsweise vor der Konjugation der Chelat-Verbindung durchgeführt.

[0103] Für Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, in denen es erwünscht ist, dass die chelatisierenden Verbindungen eine schnelle Komplexierung von Radionuklid bei Raumtemperatur zeigen, können die folgenden Chelat-Verbindungen verwendet werden:



oder



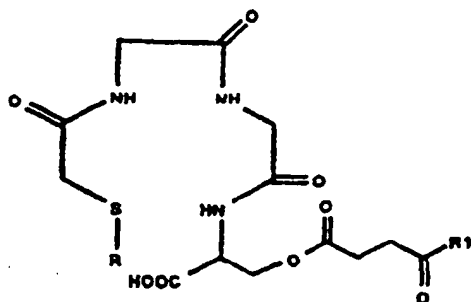
worin $n = 0$ bis 1 ist und einer oder mehrere T-Substituenten eine funktionelle Gruppe einschließen, die für eine Konjugation mit einer anderen Konjugat-Komponente verfügbar und geeignet ist. In dem oben angegebenen Beispiel ist eine funktionelle Gruppe wie beispielsweise ein Amin in der Lage, mit der Lysin-Carboxyl-Einheit oder einem aktivierten Ester-Derivat davon zu reagieren. Alternativ kann eine einen aktiven Ester tragende Chelat-Verbindung an eine funktionelle Amino-Gruppe konjugiert werden, um ein Beispiel zu nennen.

[0104] In einer weiteren Ausführungsform der vorliegenden Erfindung kann auch eine Esterase-empfindliche Chelat-Verbindung verwendet werden. Solche Ausführungsformen schließen Annexin-Chelat-Verbindungs-Konjugate ein, die modifizierte Annexin-Chelat-Verbindungs-Konjugate einschließen, sowie Multi-mer-Chelat-Verbindungs-Konjugate. Eine Hexose-Einheit kann auch mit den oben angegebenen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

[0105] Ein Vorteil bei der Verwendung einer Esterase-empfindlichen Chelat-Verbindung ist, dass die Verbindung während des Metabolismus des radiomarkierten Proteins in der Leber gespalten wird. Die Freisetzung der Verbindung erzeugt mit Radioaktivität assoziierte Cataboliten mit vorteilhafter Distribution, was zur Verringerung der Hintergrund-Radioaktivität in der Nähe des Herzens und der Lungen führt. So ist eine Verwendung dieses Typs von Chelat-Verbindung die Bildgebung des Herzens und der Lungen. Weiter ist ein anderes wünschenswertes Merkmal dieser Art von Chelat, dass ein größerer Bruchteil des Technetium-99m schnell durch die Leber freigesetzt wird und dann über die Nieren ausgeschieden wird.

[0106] Mit anderen Worten: Die Ester-Komponente dieser Chelat-Verbindung wird während des Metabolismus des markierten Proteins in der Leber gespalten, was zu einer größeren Freisetzung von Radioaktivität aus der Leber in das Blut und eine Ausscheidung über die Nieren führt. Eine bevorzugte Esterase-empfindliche Chelat-Verbindung ist eine solche, die ein N₃S-Seryl-Succinat enthält, wie sie beschrieben ist in dem US-Patent Nr. 5,112,953.

[0107] Beispielsweise kann eine Esterase-empfindliche Chelat-Verbindung der folgenden Struktur mit Annexin verwendet werden, um die oben angegebenen Ergebnisse zu erhalten:



worin R irgendeine Säure-labile oder Basen-labile Schwefel-Schutzgruppe ist, wie sie im Stand der Technik bekannt ist, beispielsweise eine Ethoxyethyl-Gruppe, und R¹ ein aktivierter Ester ist, der N-Hydroxysuccinimid-tetrafluorphenyl und Tetrafluorphenyl- und Tetrafluorthiophenyl-Ester einschließt.

[0108] Ein Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich ist mit der Natur und Spezifität funktioneller Einheiten vertraut, und die Natur und Spezifität werden auch in der vorliegenden Beschreibung diskutiert.

[0109] In Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung, in denen die Chelat-Verbindung gekennzeichnet ist durch eine einzelne funktionelle Gruppe, die für die Konjugation verfügbar und geeignet ist, werden das Annexin, die Chelat-Verbindung und Galactose-Cluster-Komponenten vorzugsweise über ein trifunktionelles Linker-Molekül verbunden. Funktionelle Gruppen, die für eine Konjugation verfügbar sind, sind solche, die nicht durch sterische Hinderungen vor einer Konjugation bewahrt werden. Funktionelle Gruppen, die für eine Konjugation geeignet sind, sind solche Gruppen, die im chemischen Sinn in der Lage sind, mit verfügbaren funktionellen Gruppen zu reagieren, die mit anderen Konjugat-Komponenten assoziiert sind. Darüber hinaus stört eine Konjugation geeigneter funktioneller Gruppen nicht wesentlich eine notwendige Funktion der Komponente, mit der die funktionelle Gruppe assoziiert ist. Beispielsweise ist eine funktionelle Gruppe, die in der Komplementarität bestimmenden Region einer Antikörper-Ziel-Einheit angeordnet ist, beispielsweise allgemein nicht „geeignet“ für eine Konjugation, da das Ziel-Bindungs-Vermögen des Antikörpers durch eine solche Verbindung mit hoher Wahrscheinlichkeit wesentlich beeinträchtigt wird. In gleicher Weise ist eine funktionelle Gruppe, die innerhalb des Bindungsbereichs des Annexins angeordnet ist, allgemein nicht „geeignet“ für eine Konjugation.

[0110] Nützliche tifunktionelle Linker sind zugänglich für ein Binden mit funktionellen Gruppen, die auf den drei Konjugat-Komponenten verfügbar sind oder auf irgendwelchen Verlängerungs-Einheiten, die beim Konjugat-Aufbau verwendet werden. Ein nützlicher trifunktionaler Linker ist Lysin, in dem die funktionelle alpha-Aminogruppe, die funktionelle epsilon-Aminogruppe und die funktionelle Carboxyl-Gruppe verwendet werden. Ein Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem Bereich könnte andere tifunktionelle Linker identifizieren und diese in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung verwenden, wie dies weiter unten beschrieben ist.

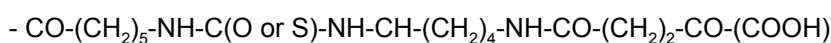
[0111] Abspaltbare Linker können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Solche Linker sind bifunktionelle Einheiten, die in der Lage sind, sich mit dem trifunktionellen Linker in der Weise zu verbinden, dass sie die chelatisierende Verbindung mit dem trifunktionellen Linker verbinden, der seinerseits mit der Annexin-Komponente und der Cluster-Komponente verbunden wird. Beispiele geeigneter abspaltbarer Linker schließen ein: Monosaccharide, Polysaccharide, Polyaminosäuren, Hydroxyalkylacrylamide (z.B. HPMA), hydrophile Polymere auf Polyethylenglycol-Basis, biologisch abbaubare Polymere, die eine Ether- oder Ester-Bindung enthalten, sowie Dextran und Hemisuccinylester und dergleichen.

[0112] Ebenfalls sind Verlängerungs-Moleküle, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung nützlich sind, bifunktionelle Einheiten, die in der Lage sind, sich entweder mit der Annexin-Komponente oder dem Linker oder der

Galactose-Cluster-Komponente und dem Linker zu verbinden. Geeignete Verlängerungs-Moleküle schließen Aminocaproat-Einheiten, $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n\text{OOH}$ oder eine aktivierte Ester-Form davon, worin n im Bereich von 2 etwa 5 liegt, und dergleichen ein. Ein Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich ist in der Lage, andere geeignete Verlängerungs-Moleküle zu identifizieren und zu verwenden, wie sie in der vorliegenden Erfindung und in den Ansprüchen beschrieben sind. Alternativ dazu kann ein passend aufgebauter Linker der Funktion des Verlängerungs-Moleküls dienen.

[0113] Auch können im Rahmen der vorliegenden Erfindung eine Bindung erleichternde Einheiten verwendet werden. Solche Einheiten sind bifunktionell und erleichtern ein Binden der Konjugat-Komponenten, z.B. Galactose-Cluster, Annexin, Chelat-Verbindung, Linker und Verlängerungs-Molekül. Beispiele solcher eine Bindung erleichternde Einheiten schließen Moleküle mit funktionellen Harnstoff-Gruppen, Moleküle mit funktionellen Thioharnstoff-Gruppen, Succinat-Brücken, Maleimide und dergleichen ein. Derartige eine Bindung erleichternde Einheiten sind einer Identifikation und Verwendung durch Fachleute mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich zugänglich.

[0114] Ein Beispiel eines Linker-Verlängerungs-Moleküls zum Erleichtern des Bindungs-Systems ist nachfolgend gezeigt:



worin die alpha-Amingruppe des Lysin-Linkers über eine funktionelle Harnstoff- oder Thioharnstoff-Gruppe an einen Amino-Caproat-Spacer gebunden ist (der seinerseits an einen Galactose-Cluster gebunden ist, der nicht gezeigt ist); die Lysin-Carboxylat-Gruppe für eine Bindung zu einer Chelat-Verbindung (nicht gezeigt) verfügbar ist; und die epsilon-Aminogruppe des Lysin-Linkers für eine Bindung zu einem Lysin-Rest der Annexin-Komponente (nicht gezeigt) über eine Succinat-Brücke verfügbar ist. Andere Aminosäure-Reste der Annexin-Komponente wie beispielsweise Cystein können auch für Bindungszwecke verwendet werden. Alternativ dazu kann eine Maleimid-S $(\text{CH}_2)_n$ CO-Bindungserleichterungs-Einheit-Verlängerungsmolekül-Kombination verwendet werden, um den Zucker-Rest mit dem Lysin zu verbinden. Ein Beispiel eines durch einen trifunktionellen Linker verbundenen Konjugats wird in Beispiel VII diskutiert.

[0115] Wenn die Chelat-Verbindungs-Komponente des Konjugats durch mehr als eine funktionelle Gruppe gekennzeichnet ist, die für eine Konjugation verfügbar und geeignet ist, kann der Galactose-Cluster mit der Chelat-Verbindungs-Komponente verbunden werden, welche ihrerseits mit der Annexin-Komponente des Konjugats über zwei oder mehr bifunktionelle Linker verbunden wird. Alternativ dazu wird der Hexose-Cluster wie beispielsweise N-Acetylgalactosamin mit der zugänglichen Sulfhydryl-Gruppe des modifizierten Annexins verbunden, und die Chelat-Verbindungs-Komponente wird mit der Annexin-Komponente über den Lysin-Rest an dem Annexin verbunden. In einer anderen möglichen Konfiguration wird die Chelat-Verbindung mit einem Hexose-Cluster über einen trifunktionellen Linker verbunden, worin der Hexose-Cluster, der an die Chelat-Verbindung konjugiert ist, dann mit der zugänglichen Sulfhydryl-Gruppe des modifizierten Annexins durch eine die Bindung erleichternde Einheit gebunden wird. Die oben angegebene mögliche Konfiguration kann auch einen abspaltbaren Linker zwischen der Chelat-Verbindung und dem Linker einschließen, der den Cluster an das Annexin bindet. Vorzugsweise wird die Annexin-Komponente des Konjugats zuletzt in die Bildung eines Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin-Konjugats eingebunden. Geeignete bifunktionelle Linker und Einbinde-Verfahrensweisen können von Fachleuten mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich identifiziert und eingesetzt werden. Ein Beispiel einer derartigen chelatisierenden Verbindung und einer derartigen Konjugations-Verfahrensweise wird in Beispiel V beschrieben.

[0116] Die folgenden Variationen sind Beispiele der Reihenfolge, in der die Komponenten (speziell das modifizierte Annexin, die Hexose-Einheit und die chelatisierende Verbindung) aneinander konjugiert werden, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht kommen. Es ist für einen Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich offenbar, dass in den Fällen, in denen ein Konjugat der vorliegenden Erfindung drei Komponenten aufweist (z.B. ein Annexin, eine Hexose-Einheit und eine chelatisierende Verbindung), eine Komponente an eine andere Komponente in einer Vielzahl von Orientierungen gebunden werden kann. Beispielsweise können die Hexose-Einheit und eine chelatisierende Verbindung auf unterschiedlichen Seiten an einem Annexin gebunden werden oder können aneinander gebunden werden, und nur eines der Moleküle wird direkt an das Annexin gebunden:

[0117] Die Hexose-Einheit ist an das modifizierte Annexin über eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe oder mehrere derartige Gruppen gebunden, und die Chelat-Verbindung ist an das modifizierte Annexin über einen Lysin-Rest an dem modifizierten Annexin konjugiert; eine Chelat-Verbindung ist an das modifizierte Annexin

über eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe oder mehrere derartige Gruppen konjugiert und die Hexose-Einheit ist an das modifizierte Annexin über einen Lysin-Rest an dem modifizierten Annexin konjugiert; eine Chelat-Verbindung ist an die Hexose-Einheit konjugiert, die ihrerseits an das modifizierte Annexin über eine zugängliche Sulfhydryl-Gruppe oder mehrere derartige Gruppen konjugiert ist; die Hexose-Einheit ist an die Chelat-Verbindung konjugiert, die ihrerseits an das modifizierte Annexin über zugängliche Sulfhydryl-Gruppen konjugiert ist; die Chelat-Verbindung ist an die Hexose-Einheit konjugiert, die ihrerseits an das modifizierte Annexin über die Lysin-Reste des modifizierten Annexins konjugiert ist, so dass sie die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen für eine weitere Konjugation verfügbar läßt; die Hexose-Einheit ist an die Chelat-Verbindung konjugiert, die ihrerseits an das modifizierte Annexin über Lysin-Reste konjugiert ist, wobei sie die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen wieder verfügbar für eine weitere Konjugation läßt, und andere ähnliche Variationen.

[0118] An die Hexose-Einheit und die Chelat-Verbindung über chemische Verfahren konjugiertes Annexin kann entweder vor einer Komplexierung (dies ist der nachträglich gebildete Ansatz) oder im Anschluß an eine Komplexierung (dies ist der vorgeformte Ansatz) eines Radio-Metalls mit der Chelat-Verbindung auftreten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird eine Hexose-Einheit an die Annexin-Komponente vor der Zugabe der Radiomarkierung gebunden. Die chemische Konjugation wird vorzugsweise durchgeführt im Anschluß an die Radio-Metall-Komplexierung, wenn nicht die Chelat-Verbindung, die in dem Konjugat eingesetzt wird, in der Lage ist, das Radionuklid mit schneller Kinetik bei Raumtemperatur zu binden. Annexin V wird mit einem bildgebenden Radionuklid für eine Verwendung im Rahmen der vorliegenden Erfindung radiomarkiert.

[0119] Radiomarkierte Annexine, einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate und radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate, gemäß der vorliegenden Erfindung bieten einen zusätzlichen Vorteil gegenüber früher hergestellten, mit I-123 markierten Annexinen, und zwar dahingehend, dass sie dafür zugänglich sind, in Form eines kalten Kits abgepackt zu werden. Das bedeutet, dass das Annexin oder Annexin-Galactose oder Annexin-Galactose-Cluster oder Galactose-Cluster und Chelat-Verbindungs-Komponenten einzeln in Röhrchen abgefüllt und getrennt von der Tc-99m-Komponente zur Verfügung gestellt werden können (und möglicherweise auch getrennt voneinander in Röhrchen abgefüllt werden können).

[0120] Eine Lyophilisierung und Abfüllung der Konjugat-Komponenten in steriler, pyrogenfreier Umgebung kann nach Verfahrensweisen bewirkt werden, die Fachleuten im Bereich der Technik einer guten Herstellungspraxis bekannt sind, insbesondere da solche Praktiken biologische Materialien betreffen.

[0121] Wenn ein Patient, der ein Thrombus-Bild benötigt, identifiziert ist, kann ein kaltes Kit geordert oder aus dem Lager geholt werden. Tc-99m kann aus einer Radio-Apotheke oder einer anderen Quelle dafür erhalten werden. Der vorgebildete oder nachgebildete Prozeß der Chelatisierung/Komplexierung wird durchgeführt. Das radiomarkierte Annexin, das radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugat oder das radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugat wird dem Patienten verabreicht, und der Patient wird anschließend einem Bildgebungs-Verfahren unterzogen. Für radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugate wird ein Annexin-Galactose-Konjugat vorzugsweise hergestellt und in dem Kit in ein Röhrchen abgefüllt. Für radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate wird ein Konjugat aus Chelat-Verbindung, Annexin und Galactose-Cluster vorzugsweise hergestellt und in dem Kit in Röhrchen abgefüllt, obwohl auch Annexin-Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung- Zwei Komponenten- oder andere Mehr-Komponenten-Kits verwendet werden können.

[0122] Radiomarkierte Annexine einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate oder radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate, gemäß der vorliegenden Erfindung werden in solchen Mengen verabreicht, dass man eine diagnostisch wirksame Menge an Radionuklid an die Ziel-Stelle liefert. Passende verabreichte Dosierungen hängen von einer Vielzahl von Faktoren ab, die in weitem Umfang Patienten-spezifisch sind, und Praktiker in diesem technischen Bereich werden solchen Faktoren in der praktischen Anwendung der vorliegenden Erfindung in Betracht ziehen. Die Komponenten des radiomarkierten Annexins beeinflussen auch Dosis-Mengen auf Wegen, die Praktikern in diesem technischen Bereich als feststellbar bekannt sind oder routinemäßig feststellbar sind. Im Allgemeinen wird radiomarkiertes Annexin einschließlich Radiomarkierten Annexin-Galactose-Konjugats oder radiomarkierten Annexin-Galactose-Cluster-Konjugats in großen Säugern in einer Dosis verabreicht, die zwischen etwa 0,3 und etwa 300 Microgramm/Kilogramm Körpergewicht des Empfängers liegen, wobei etwa 3 bis etwa 10 Microgramm/Kilogramm Körpergewicht bevorzugt sind, und zwar abhängig von den physiologischen charakteristischen Eigenschaften des Patienten und der involvierten oder vermuteten Krankheit.

[0123] Ein Praktiker in diesem technischen Bereich ist in der Lage, eine passende Dosis und einen passenden Verabreichungsweg für einen gegebenen Empfänger bei einer gegebenen Krankheit zu identifizieren.

[0124] Radiomarkierte Annexine einschließlich radiomarkierter Annexin-Galactose-Konjugate oder radiomarkierter Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate gemäß der vorliegenden Erfindung können auf jede dafür passende Weise verabreicht werden. Beispielsweise kann eine intravenöse Infusion zur Verabreichung radiomarkierter Annexine angewendet werden. Andere Verabreichungswege finden ebenfalls Gebrauch in der praktischen Durchführung der vorliegenden Erfindung. Beispielsweise sind zusätzliche Verabreichungswege Injektion über die Arterien (z.B. die Koronar-Arterie), ein intrakoronarer Weg, ein intralymphatischer Weg, ein intrathecaler Weg, oder ein anderer in einen Körper-Hohlraum erfolgender Weg und dergleichen.

[0125] Nach Verabreichung des Radionuklids und in Abhängigkeit von der Natur des Radionuklids und dem Zweck der Verabreichung kann der Empfänger verschiedenen Verfahrensschritten zum Nachweis radioaktiver Emissionen von der Stelle oder den Stellen unterzogen werden, an denen sich das Radionuklid lokalisiert. Beispielsweise werden Tc-99m enthaltende Konjugate mit einer Gamma-Kamera bildmäßig erfaßt.

[0126] Die Konjugate der vorliegenden Erfindung können in diagnostischen oder therapeutischen Verfahren oder als Medikament oder zur Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von z.B. einem vaskulären oder Herz-Zustand verwendet werden.

[0127] Die Erfindung wird weiter durch die Präsentation der folgenden Beispiele beschrieben. Diese Beispiele werden zur Illustration der Erfindung angeboten und nicht zu deren Beschränkung.

BEISPIEL I

Verfahren zum Radiomarkieren eines Annexin-N₂S₂-Chelat-Konjugats

[0128] Annexin V kann von einer Vielzahl von Gewebe-Extrakten isoliert werden, beispielsweise von der Leber, der Lunge und der Plazenta, und zwar in Übereinstimmung mit Verfahrensweisen, wie sie beschrieben sind in der Druckschrift „Funakoshi et al., Biochem. 26, 8087 – 8092 (1987)“, der Druckschrift „Taft et al., Biochem., 27, 6268 – 6276 (1988)“ und dem US-Patent Nr. 4,937,324, um einige Beispiele zu nennen. Darüber hinaus kann Annexin V in E. coli exprimiert werden, wie dies beschrieben wurde in der Druckschrift „Taft et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, 288, 141 – 144 (1991)“.

[0129] Annexin wurde mit Tc-99m unter Verwendung einer Diamid-dimercaptid-N₂S₂-Chelat-Verbindung radiomarkiert, in Übereinstimmung mit der Markierungs-Verfahrensweise mit dem Onko-Trac® (auch bezeichnet als Verluma™) Small Cell Lung Cancer Imaging Kit, wie dies beschrieben ist in: "J. Nucleinsäure. Medizin., 32, 1445 – 1451 (1991)".

[0130] Ein bevorzugtes Verfahren zum Radiomarkieren von Annexin V mit Tc-99m stellt eine modifizierte Verfahrensweise mit dem Onko-Trac®-Kit unter Verwendung von C-18-Baker-gereinigtem Tc-99m-N₂S₂-TFP dar. In dieser Verfahrensweise wurde eine angesäuerte Lösung des aktiven Esters hergestellt durch Zusatz von 0,16 ml, 0,2 M Chlorwasserstoffsäure-Eisessig (Verhältnis: 14 : 2) zu 0,6 ml 2,3,5,6-Tetrafluorphenyl-4,5-bis-(S-1-ethoxyethylmercaptoacetamido-)pentanoat (0,3 mg; 0,0005 Mol frisch gelöst in 0,9 ml Isopropylalkohol). Dann wurden 0,5 ml dieser Lösung zugesetzt zu 1,1 ml Tc-99m-Gluconat (hergestellt aus 0,12 mg SnCl₂ · 2 H₂O, 5,0 mg Natriumgluconat bei pH 6,1 bis 6,3 und 100 mCi/ml [Tc-99m] Perchnetat, d.h. der erste Schritt in der Onko-Trac®-Kit-Markierungs-Verfahrensweise. Die Reaktionsmischung wurde 15 Minuten lang auf 75°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Das resultierende Tc-99m-transchelatisierte Tetrafluorphenyl-Aktivester-Derivat von Tc-99m-4,5-Bis-(thioacetamido-)pentanoat wurde gegebenenfalls und vorzugsweise mit 2 ml Wasser verdünnt und dadurch gereinigt, dass man die Reaktionsmischung auf eine konditionierte C-18-Kartusche aufgab (J.T. Baker, Philipsberg, N.J.), mit 2,0 ml Wasser acht Mal wusch, gefolgt von einem Schritt des Trocknens der Säule für 5 Minuten und Eluieren mit 100 % Acetonitril. Das Lösungsmittel wurde unter einem stetigen Strom von N₂-Gas verdampft. Danach wurden 0,15 ml Phosphat-gepufferte Kochsalz-Lösung (PBS), 0,15 ml Annexin V in einer Konzentration von 2,35 mg/ml und 0,2 ml 0,2 M Bicarbonat (pH 10,0) zur Konjugation an das Tc-99m-N₂S₂-Chelat zugesetzt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Tc-99m-N₂S₂-Annexin V-Konjugat gereinigt durch Durchlaufenlassen durch eine G-25-SEPHA-DEX®-(PD-10)-Säule (erhältlich von der Firma Pharmacia, Piscataway, N.J.), die mit PBS equilibriert worden war. Fraktionen (1,0 ml) wurden aufgefangen, und diejenigen Fraktionen, die Annexin V enthielten, wurden gepoolt. Die Protein-Konzentration wurde bestimmt durch UV-Absorption bei 280 nm. Die Tc-99m-Annexin V-Konjugat-Lösung (300 – 350 µg) wurde verdünnt und wurde zur Injektion in PBS gelagert, die Rinderserumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 15 bis 20 mg BSA/ml PBS enthielt.

BEISPIEL II

Verfahrensweise zum Radiomarkieren eines Annexin-N₃S-Chelat-Konjugats

[0131] S-Benzoylmercaptoacetylglucylglycylglycin (S-Benzoyl-MAG₃) wurde in Übereinstimmung mit den Verfahrensweisen hergestellt, die in dem US-Patent Nr. 4,965,392 beschrieben sind. Danach wurden 25 µg S-Benzoylmercaptoacetylglucylglycylglycin in 0,10 ml 1,0 M Carbonat-Puffer (pH 12) gelöst. Dann wurden 75 mCi Tc-99m-Perthetnetat in etwa 1,0 ml zugesetzt, gefolgt von 1,0 mg frisch gelöstem Natriumdithionits (10 mg/ml). Diese Mischung wurde auf 100°C ± 4 °C 3 Minuten lang erhitzt und wurde dann in einem Eisbad 5 min abgekühlt und ergab so Tc-99m-MAG₃, wie dies bestimmt wurde durch ITLC (CH₃CN-Lösungsmittel), Anionenaustausch-HPLC (Beckman AX, 10 Micron 0,01 M Na₂SO₄/0,01 M Na₃PO₄, pH 7,0) und Umkehrphasen-HPLC (Beckman ODS, 5 Micron 2 % CH₃CN/0,01 M Na₃PO₄, pH 7,0).

[0132] Der Tc-99m-MAG₃-Komplex in Carboxylat-Form wurde dann verestert; 0,20 ml 1 N HCl, 0,30 ml 0,2 M Phosphat-Puffer (pH 6,0), 10,0 mg 2,3,5,6-Tetrafluorphenol (TFP) in 0,01 ml 90 % CH₃CN und 12,5 mg EDC (1-(3-Dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimid-hydrochlorid) in 0,1 ml 90 % CH₃CN wurden zusammengegeben, und die Reaktanden wurden bei Raumtemperatur (25°C ± 2°C) 1 h lang gemischt. An dieser Stelle erhielt man Tc-99m-MAG₃-TFP-Ester, wie bestimmt wurde durch ITLC (CH₃CN als Lösungsmittel), Anionenaustausch-HPLC (Beckman AX, 10 Micron 0,01 M Na₂SO₄/0,01 M Na₃PO₄, pH 7,0) und Umkehrphasen-HPLC (Beckman ODS, 5 Micron 34 % CH₃CN/0,01 M Na₃PO₄, pH 7,0). Die Präparation wurde unter Verwendung einer C-18-Baker-Säule gereinigt. Die Reaktionsmischung wurde gegebenenfalls und vorzugsweise mit 2 ml Wasser verdünnt und auf die Säule aufgegeben, zweimal mit Wasser gewaschen und danach achtmal mit 10 % C₂H₅OH/0,01 M Na₃PO₄, pH 7,0, gewaschen. Das Produkt wurde mit CH₃CN eluiert und das Lösungsmittel wurde vor der Konjugation mit Annexin V entfernt.

[0133] Die Konjugation des aktiven Esters an Annexin V wurde durchgeführt durch Zusatz von Annexin V in einem Phosphat-Puffer, pH 9,5, zu dem Tc-99m-MAG₃-TFP-Ester. Die Reaktion wurde für wenigstens 30 Minuten durchgeführt, und das gewünschte radiomarkierte Annexin-Produkt wurde erhalten durch Durchlaufenlassen durch eine PD-10-Gel-Filtrationssäule.

BEISPIEL III

Thrombus-Bildgebung mit einem radiomarkierten Annexin

A. Vorbereitung der Tiere - LA-Vaskular-Thromben

[0134] Auf Fastendiät gesetzte, 25 – 30 kg schwere Yorkshire-Schweine wurden sediert durch intramuskuläre Verabreichung von Telazol (5 – 10 mg/kg) (im Handel erhältlich von der Firma AVECO Co.) und mit im Handel erhältlichem Atropin (1 mg, Firma Elkins-Sinn, Inc., Cherry Hills, N.J.). Surital (200 mg) (im Handel erhältlich von der Firma Abbott Laboratories) wurde intravenös zur Anästhesie verabreicht. Die Tiere wurden intubiert und erhielten eine Inhalations-Anästhesie von 1,5 – 2 % Halothan (im Handel erhältlich von der Firma Abbott Laboratories, Abbott Park, IL) und O₂ in ausreichender Menge, um einen Tiefenzustand der Anästhesie und physiologische Werte der arteriellen Blutgase zu erhalten. Eine kontinuierliche elektrokardiographische Überwachung wurde unter Verwendung von Alligator-Clip-Elektroden eingerichtet. Es wurde ein Einschnitt im Nacken-Bereich durchgeführt, und ein Acht-French-Katheter (Firma USCI Co., Billerica, MA) wurde in der rechten gemeinen Carotis-Arterie zur Überwachung von Blutdruck und Arterien-Blutgasen sowie zur Blutabnahme angebracht.

[0135] Die Schweine wurden in eine rechtsseitige seitliche Decubitus-Position gebracht, und es wurde eine laterale Thoracotomie durchgeführt, um das Herz freizulegen. Der Einschnitt wurde mittels eines Thoracotomie-Retraktors offengehalten. Das Pericardium wurde geöffnet, und der linke Vorhof-Anhang wurde von dem linken Atrium mittels einer Vaskular-Quer-Klammer isoliert. Mit Gummispitzen versehene Zangen wurden dazu verwendet, um den Anhang vorsichtig zusammenzudrücken. Fünf Minuten später wurden Ricinoleat (1 mg, Firma ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA) und Thrombin (50 mg, Firma Johnson und Johnson Co., Arlington, TX) in den linken Vorhof-Anhang (LAA; left atrial appendage) unter Verwendung einer 27 Ga-Nadel injiziert. Die Quer-Klammer wurde 10 Minuten später entfernt.

[0136] Eine Stunde nach der durch Zusammendrücken bewirkten Verletzung wurde TC-99m-Annexin V, das in Übereinstimmung mit dem obigen Beispiel I hergestellt worden war, in Form einer intravenösen Bolus-Dosis in einer Ohr-Vene verabreicht. Die intravenöse Leitung wurde dann mit Kochsalz-Lösung gespült. Bei 7 Tieren

wurde mit I-125 markiertes Ovalbumin als nicht spezifisches Kontrollmittel verabreicht, das herstellbar ist beispielsweise durch die Verfahrensweise, die beschrieben wurde von „Fraker et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 849 – 857 (1978)“. Kurz gesagt, wurde mit I-125 radiomarkiertes Ovalbumin hergestellt durch das Iodogen-Verfahren unter Verwendung von 600 µg Ovalbumin (Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) und NaI-125 (2 mCi, 0,92 nMol).

[0137] Eine Bildaufnahme wurde wie unten beschrieben durchgeführt. Am Ende des experimentellen Vorgehens (allgemein nach etwa 150 Minute) wurden die Tiere durch eine intravenöse Bolus-Dosis von 80 mEq KCl getötet, wobei die Tiere nach wie vor unter allgemeiner Anästhesie lagen. Eine letzte Blutprobe wurde für die Zählrohr-Zählung abgenommen. Das Herz wurde schnell herausoperiert, blutfrei gewaschen und in Proben für eine Zählrohr-Zählung verschnitten. Weitere Proben der Carotis-Arterie, der Lunge, der Leber, der Milz, der Muskeln und der Nieren wurden von einigen Tieren erhalten.

B. Kontroll-Experimente

[0138] Es wurden 5 unterschiedliche Arten von Kontroll-Experimenten durchgeführt: Simulation des offenen Brustkorbs, Simulation des geschlossenen Brustkorbs, Ovalbumin, Indium-Blutplättchen und nicht-spezifischer, mit Tc-99m markierter Antikörper.

1. Simulation des offenen Brustkorbs: In drei Tieren wurde das Herz wie oben beschrieben freigelegt, jedoch wurde der linke Vorhof nicht isoliert, zusammengedrückt oder mit einer Injektion mit Ricinoleat/Thrombin versehen. Marker-Bilder mit einem Cobalt-Marker wurden durchgeführt, wie dies unten beschrieben ist, und das Tc-99m-Annexin V wurde 30 bis 60 Minuten nach der Freilegung des linken Vorhof-Anhangs (LAA) injiziert. Die Bildaufnahme und Probengewinnung waren identisch mit derjenigen, wie sie oben im Teil A beschrieben wurden.
2. Simulation des geschlossenen Brustkorbs: In sieben Tieren wurde eine intravenöse Leitung ins Ohr eingerichtet. Es wurde keine Thoracotomie durchgeführt. Die Sedierung und Anästhesie waren identisch mit derjenigen, die oben im Teil A beschrieben wurde. Das Tc-99m-Annexin V (mit bzw. ohne andere Kontroll-Radionuklide, wie beispielsweise I-125-Ovalbumin oder In-111-Blutplättchen) wurde verabreicht und die Bildgewinnung wurde durchgeführt.
3. Ovalbumin: I-125-Ovalbumin wurde in sieben Tieren als negatives Kontroll-Protein verabreicht. Ovalbumin hat eine Molekulargröße, die ähnlich derjenigen von Annexin ist, und zeigt eine geringfügig niedrigere Freisetzung aus dem Blut.
4. Indium-Blutplättchen: In-111-Blutplättchen-Markierung wurde in sieben Tieren als positive Zählrohr-Zählungs-Markierung durchgeführt. Mit In-111 radiomarkierte Blutplättchen wurden in Übereinstimmung mit der Verfahrensweise hergestellt, die beschrieben wurde von „Stratton et al. in: Am. J. Cardiol. 47: 874 (1981)“ und von „Stratton et al. in: Circulation, 69, 561 (1984)“. Eine Bildgewinnung wurde nicht versucht wegen der langen Serum-Halbwertszeit der In-111-Blutplättchen.
5. Nicht-spezifischer Tc-markierter Antikörper. In einem einzelnen Experiment wurde ein Thrombus im linken Atrium (LA) durch das oben beschriebene Verfahren erzeugt, jedoch wurde Tc-99m-Annexin V nicht verabreicht. Stattdessen wurde ein Tc-99m-Fab-Fragment eines Antikörpers verabreicht, der mit NR-LU-10 bezeichnet war. NR-LU-10 ist ein monoklonaler IgG2b-Antikörper mit einem Molekulargewicht von 150 kD, der ein etwa 40 kD großes Glycoprotein-Antigen erkennt, das auf den meisten Carcinomen exprimiert wird. NR-LU-10 ist ein gut charakterisierter Pancarcinom-Antikörper, der sicher an über 565 Patienten in Human-Klinik-Versuchen verabreicht wurde. NR-LU-10-Fab wurde hergestellt in Übereinstimmung mit bekannten Verfahrensweisen und wurde in Übereinstimmung mit den Verfahrensweisen radiomarkiert, die beschrieben sind in: „J. Nucl. Med., 32, 1445 – 1451 (1991)“ und durch das modifizierte C-18-Baker-Verfahren mit gereinigtem Tc-99m-N₂S₂-TFP, wie es beschrieben wurde in Beispiel I zur Herstellung von radiomarkiertem Annexin V. Dieses Tc-99m-Fab-Konjugat wurde als negativer Kontrollwert sowohl für die Zählrohr-Zählung als auch für die Bildgebung bezeichnet.

C. Bildaufnahme

[0139] Ein Cobalt-Marker wurde auf die freigelegte Oberfläche des linken Vorhof-Anhangs (LAA) aufgelegt und mit einem Operationsband an Ort und Stelle gehalten, das an dem Thoracotomie-Refraktor befestigt war. Das Band wurde so eingestellt, dass sich der Marker allgemein mit dem LAA mit jedem Herzschlag-Zyklus bewegte. Marker-Bilder wurden 10 Sekunden in jeder planaren Schicht und 10 Sekunden in jeder tomographischen Schicht aufgenommen. Der Cobalt-Marker wurde dann entfernt.

[0140] Eine Starport-Kamera der Firma General Electric mit einem Colimator für allgemeine Zwecke wurde

verwendet, um die Tc-99m-Bilder aufzunehmen. Fünf minütige Planar-Aufnahmen wurden der Reihe nach in der linken seitlichen Ansicht, bei 45 Grad zum LAO und von hinten aufgenommen. Diesen folgte eine zehnminütige tomographische Aufnahme. Der gesamte Satz von drei planaren und einer tomographischen Aufnahme wurde für insgesamt 5 Sätze wiederholt. Es wurde dafür gesorgt, das Schwein oder das Aufnahme-Gerüste während der gesamten Aufnahme-Sequenz nicht zu bewegen.

[0141] Bilder wurden auf einem Microdelta-Computer aufgezeichnet, der an ein VAX-Mainframe-System angeschlossen war. Die Bilder wurden auf einem Band oder auf der VAX-Festplatte gespeichert. Eine Planar-Bildanalyse bestand daraus, zuerst das Bild mit dem Marker anzuschauen und die Marker-Position auf dem Betrachtungs-Bildschirm aufzuzeichnen. Das erste Bild, das nach der Injektion von Tc-99m-Annexin V aufgenommen worden war, wurde dazu verwendet, um den Herz-Blut-Pool zu definieren. Jedes nachfolgende Bild wurde angeschaut und unter Verwendung des Markers und des anfänglich aufgezeichneten Blut-Pools als Referenz analysiert. Jedes Bild wurde als positiv, ungewiß oder negativ eingestuft.

[0142] Bei dreizehn Tieren waren die Thromben im linken Vorhof gebildet worden, und diese wurden abgebildet, wie dies oben beschrieben wurde. Zwölf Tieren war Tc-99m Annexin V für das Bildgebungs-Verfahren injiziert worden, und einem Tier war ein nicht-spezifischer Tc-99m-Fab als Kontrolle injiziert worden. Ein Bildgebungs-Verfahren bei geschlossenem Brustkorb wurde an sieben Tieren ohne Verletzung des Vorhofs durchgeführt, und Simulationsexperimente am offenen Brustkorb wurden an drei Tieren durchgeführt. Bei Tieren mit Vorhof-Thromben waren alle planaren Aufnahmen, die zu einem Zeitpunkt von weniger als 35 Minuten nach der Verabreichung von Tc-99m-Annexin V aufgenommen worden waren, negativ. Neun der planaren Bilder von Vorhof-Thromben, die zu einem Zeitpunkt von mehr als 70 Minuten aufgenommen wurden, waren positiv, eine Aufnahme war mehrdeutig und zwei waren negativ. Alle tomographischen Bilder der Vorhof-Thromben waren entweder positiv ($n = 10$) oder mehrdeutig ($n = 2$) bei Aufnahme-Zeiten von mehr als 2 h nach der Injektion. Die mittlere Zeit im Anschluß an die Verabreichung von Tc-99m-Annexin V, bei der die planaren Bilder positiv wurden, betrug 82 Minuten (35 – 135 Minuten).

[0143] Keines der Kontroll-Tiere mit geschlossenem Brustkorb hatte positive Aufnahmen. Eines der drei Tiere der Simulations-Versuche mit offenem Brustkorb hatte ein positives Bild bei 85 Minuten. Man geht davon aus, dass dieses falsche positive Ergebnis von der Produktion eines Thrombus resultierte, der durch den chirurgischen Eingriff induziert worden war.

[0144] Diese Ergebnisse zeigen an, dass die intravenöse Verabreichung von Tc-99m-Annexin V den Erhalt diagnostischer Bilder erlaubte, mit denen vaskuläre Vorhof-Thromben innerhalb einer kurzen Zeit nach der Verabreichung des Konjugats identifiziert werden.

D. Proben-Entnahme

[0145] Proben (sowohl Blut als auch Gewebe), die wie oben beschrieben entnommen worden waren, wurden gewogen und in Röhrchen für eine unmittelbare Zählung von Tc-99m gegeben. Nachdem das Tc-99m zerfallen war (typischerweise zu einem Zeitpunkt von 5 – 7 Tagen nach der Entnahme) wurden die Proben erneut getestet und so die I-125-Zählwerte erhalten. Jedes Röhrchen wurde für 1 Minute gezählt. Die Zählungen wurden im Hinblick auf den Zerfall korrigiert, anschließend im Hinblick auf das Gewicht korrigiert und mit der Einheit Zählwerte pro Minute pro Gramm aufgezeichnet. Die Zählwerte pro Minute pro Gramm für jede Probe wurden dann normalisiert durch Teilen durch die Zählwerte pro Minute pro Gramm der am Ende abgenommenen Blutprobe. Folglich wurden die Ergebnisse für jede der Probe berechnet in einem Verhältnis zu der zuletzt abgenommenen Blutprobe, was einen sinnvollen Vergleich zwischen einzelnen Tieren erlaubte. Diese Verfahrensweise wurde für alle Radionuklide in einem gegebenen Experiment durchgeführt.

[0146] Die Zählrohr-Zähl-Verhältniswerte wurden für eine Vielzahl von Gewebe-Proben erhalten. Für die verletzten Gewebe und Thromben wurden üblicherweise mehrere Proben von demselben Tier abgenommen. In diesen Fällen wird das Maximal-Verhältnis für irgendeine Probe angegeben, wie auch der Mittelwert für alle abgenommenen Proben. Der Maximal-Wert für jedes Tier wurde über alle Tiere gemittelt und wird angegeben als Maximal-Anx-V-Verhältnis.

[0147] Diese Ergebnisse zeigen an, dass sich das Tc-99m-Annexin V vorzugsweise in Atrium-(Vorhof-)Thromben und im verletzten linken Atrium sammelt, wobei der höchste Nicht-Target-Anordnungswert in der Niere auftritt. Der Konzentrationswert der Niere ist wenigstens teilweise ein Indikator für die Ausscheidung von Tc-99m-Annexin V über den Nieren-Weg.

Radiomarkierte Annexin-Galactose-Konjugate

A. Herstellung von Annexin V von Human-Plazenta und durch Expression in *E. coli*

[0148] Annexin V wurde aus Human-Plazenta bis zu einer Endreinheit von 99 % gereinigt, wie dies beschrieben wurde von „Funakoshi et al., in: *Biochemistry*, 26, 5572 – 5578 (1987)“ und von „Tait et al. in: *Biochemistry*, 27, 6268 – 6276 (1988)“.

[0149] Alternativ wurde Annexin V erhalten durch Expression in *E. coli*; dieses wurde jedoch nicht in den folgenden Experimenten verwendet. Diese Expression wurde wie folgt durchgeführt:

[0150] 1. Herstellung einer Massen-Fermentations-Überstandsflüssigkeit.

[0151] Es wurden Standard-molekularbiologische Verfahrensweisen zum Expressieren von Annexin V in *E. coli* angewendet. Noch spezieller wurde die Protein-kodierende Region der Annexin V-cDNS (siehe Funakoshi et al., a.a.O.) in die NdeI/BamHI-Site des Plasmids pET-12a inseriert (Firma Novagen, Madison, WI). Das ausgewählte Plasmid wurde verwendet, um den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) (Firma Novagen) zu transformieren.

[0152] Einzelne Kolonien (Klone) wurden auf Luria Broth-Platten isoliert, die 50 g/ml Ampicillin oder Carbenicillin enthielten, wie dies diskutiert ist in: „Sambrook et al., *Molecular Cloning Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Springs Harbor Laboratory Press, (1989)“. Zur Produktion wurden Kulturen der ausgewählten Klone, die das gewünschte Plasmid enthielten, über Nacht bei 37°C unter Schütteln in "Terrific Broth" gezüchtet (siehe: "Tartof et al., *Bethesda Res. Lab. Focus*, 9, 12 (1987)"), die 50 µg/ml Carbenicillin enthielt (im Handel erhältlich von der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri). Die Kultur wurde 1 : 20 in demselben Medium verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln für 18 bis 24 h inkubiert. Die Bakterien wurden durch Zentrifugieren gewonnen, einmal mit einem gleichen Volumen 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M Natriumchlorid, pH 8, gewaschen und als Pellets bei –20 °C gelagert. Die Pellets wurden aufgetaut und erneut mit 10 – 15 % (w/v) kaltem 0,05 M Tris-HCl, 0,02 M Na₄EDTA, pH 7,2 suspendiert. Die Suspension wurde im Ultraschall 4 Minuten auf Eis behandelt, zentrifugiert, und die überstehende Flüssigkeit wurde bei –70 °C gelagert.

[0153] 2. Reinigung von Annexin V aus der Masse-Fermentations-Überstandsflüssigkeit: Nach dem Auftauen wurde die überstehende Flüssigkeit unter Verwendung eines 0,1 µm Hohlfaser-Filtermoduls filtriert (erhältlich im Handel von der Firma A/G Technology, Needham, MA) und die Leitfähigkeit wurde mit konzentriertem Natriumchlorid auf einen Wert eingestellt, der gleich war zu 0,02 M Tris-HCl, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8. Polyethylenimin-WP (Firma J.T. Baker, Philipsberg, N.J.) wurde suspendiert in 0,02 M Tris-HCl, 0,5 M Natriumchlorid, pH 8, und 1 g Harz pro 10 ml Masse-Fermentations-Überstandsflüssigkeit wurde der filtrierten Überstandsflüssigkeit zugesetzt. Nach Rühren für 30 Minuten wurde die überstehende Flüssigkeit entfernt, in 0,02 M Tris-HCl, pH 8, ausgetauscht und auf eine Q-SEPHAROSE®HP-Säule aufgegeben (Firma Pharmacia, Piscataway, N.J.), die mit demselben Puffer equilibriert worden war. Die Säule wurde entwickelt mit einem Schritt-Gradienten von 0 bis 0,5 M Natriumchlorid. Fraktionen wurden auf Annexin V getestet durch Größen-Ausschluß-HPLC, und Fraktionen, die ein bei A₂₈₀ absorbierendes Material passender Größe enthielten, wurden gepoolt. Das halbgerinigte Annexin V wurde in PBS ausgetauscht und durch Ultrafiltration konzentriert. Gel-Filtration über SEPHACRYL®-100 HP (Firma Pharmacia), das in PBS equilibriert worden war, ergab das gereinigte Protein. Die Protein-Konzentration wurde eingestellt auf 1 mg/ml, steril bei 0,2 µm filtriert und bei 2 bis 8°C gelagert.

B. Derivatisierung von Annexin V mit Galactose

[0154] Man folgte der allgemeinen Verfahrensweise von „Lee et al., *Biochemistry*, 15, 6268 – 6276 (1976)“.

a. Herstellung von 2-Imino-2-methoxyethyl-1-thio-D-galactopyranosid

[0155] Eine 1,0 M-Lösung von Cyanomethyl-2,3,4,6-tetra-O-acetyl-1-thio-D-galactopyranosid (im Handel erhältlich von der Firma Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) wurde hergestellt durch Lösen von 1,83 g (4,5 mMol) in 4,5 ml wasserfreiem Methanol unter Erhitzen auf 50 °C. Die Lösung wurde bei 50 °C gehalten, und 0,1 ml (0,45 mMol) 25 % Natriummethoxid in Methanol (im Handel erhältlich von der Firma Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) wurde unter kontinuierlichem Rühren zugesetzt. Nach 6 h bei 50 °C wurde das Methanol unter verringertem Druck entfernt, und dies ergab das Galactose-Methylimidat als farbloses, viskoses

Öl.

b. Galactosylierung von Annexin V

[0156] Das Galactose-Methylimidat wurde mit Annexin V in Mol-Verhältnissen 300 : 1, 150 : 1 und 75 : 1 zusammengegeben. Für die Zusammengabe von 300 : 1 wurden 3,35 mg Galactosemethylimidat in Methanol in ein Öl unter einem Strom von Stickstoff überführt. Dem Öl wurden 2,53 mg Annexin V in 0,05 M HEPES-Puffer (im Handel erhältlich von der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri), pH 7,4, und 0,04 ml 0,5 M Natriumborat-Puffer, pH 8,5 zugesetzt. Die Lösung wurde 1 h bei Raumtemperatur durch Taumeln in dem Reaktionsgefäß gemischt, und man ließ sie dann bei Raumtemperatur über Nacht (etwa 18 h) stehen. Die Reaktionsmischung wurde mit 0,4 ml PBS verdünnt, in ein Dialyse-Röhrchen überführt (Cut-Off 6.000 bis 8.000 MW) und wurde 24 h gegen PBS dialysiert. Nach Entfernen des Materials aus dem Dialyse-Beutel wurde die Lösung durch ein 0,2 µm-Spritzen-Filter filtriert. Die anderen Zusammengabe-Verhältnisse wurden in analoger Weise behandelt.

C. Charakterisierung des Galactose-derivatisierten Annexins V

[0157] Die Protein-Konzentration wurde unter Verwendung von A_{280} von 0,6 für eine 1 mg/ml-Lösung von Annexin V bestimmt. Die Zahl der Galactose-Reste pro Molekül Annexin V wurde bestimmt durch Messen der Gesamtzahl reaktiver Amine an Annexin V vor und nach der Reaktion mit Galactosemethylimidat unter Verwendung von Trinitrobenzolsulfonsäure, wie dies beschrieben wurde von „Habeeb, Analytical Biochemistry, 14, 328 – 336 (1966)“.

Mischungsverhältnis	Substitutionsverhältnis
300 : 1	4,7 : 1
150 : 1	2,3 : 1
75 : 1	1,1 : 1

[0158] Das Vermögen von Galactose-modifiziertem Annexin V, sich an aktivierte Blutplättchen zu binden, wurde dadurch getestet, dass man sein Vermögen zum Inhibieren des Bindens von unmodifiziertem, mit ^{125}I -radiomarkiertem Annexin V an frisch isolierte Human-Blutplättchen abschätzte, wobei man der Verfahrensweise von „Thiagarajan und Tail, J. Biol. Chem., 265, 17240 – 17243 (1990)“ folgte. Die folgende Tabelle zeigt die Ergebnisse des Konkurrenz-Assays und zwar sowohl als absoluten Wert (linke Spalte) als auch als Wert normalisiert auf 100 % für unmodifiziertes Annexin V (rechte Spalte).

Substitutionsverhältnis	Konkurrenzwert (% des Kontrollwerts)	Konkurrenzwert (% des Kontrollwerts)
4,7	0	0
2,3	5,7	7,6
1,1	21,4	28,7
unmodifiziert	74,5	100

D. Herstellung von Tc-99m-Annexin V-Galactose

[0159] Annexin V-Galactose wurde radiomarkiert mit Technetium-99m unter Verwendung einer Diamiddimer-captid-(N_2S_2 -)Chelat-Verbindung, wie dies beschrieben wurde durch „Kasina et al., J. Nucl. Med., 32, 1445 – 1451 (1991)“. Die vorgeformte aktive Ester-Chelat-Verbindung wurde mit 2,0 ml Wasser verdünnt und vor der Konjugation an Annexin V-Galactose unter Verwendung einer modifizierten konditionieren C-18-Säule gereinigt (im Handel erhältlich von der Firma J.T. Baker) wie beschrieben in „Fritzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 4025 – 4029 (1988)“, achtmaliges Waschen mit 2,0 ml Wasser, gefolgt von einem Schritt des Trocknens der Säule für 5 Minuten und Eluieren mit 100 % Acetonitril. Das Lösungsmittel wurde unter einem stetigen Strom von N_2 entfernt. Anschließend wurden 0,15 ml PBS, 0,35 ml Annexin V-Galactose (4,7 : 1 = Galactose : Annexin V) in einer Konzentration von 1,0 mg/ml und 0,2 ml 0,2 M Bicarbonat-Puffer (pH 10,0) zur Konjugation

an den Tc-99m-N₂S₂-TFP-Ester zugesetzt. Nach 20 Minuten bei Raumtemperatur wurde das Tc-99m-Annexin V-Galactose-Konjugat gereinigt durch Durchlaufenlassen durch eine G-25-SEPHADEX[®]-PD-10 Säule (im Handel erhältlich von der Firma Pharmacia), die mit PBS equilibriert worden war.

[0160] Fraktionen von 1,0 ml wurden aufgefangen, und Fraktionen, die Annexin V enthielten, wurden gepoolt. Die Protein-Konzentration wurde bestimmt durch UV-Absorption bei 280 nm. Die radiochemische Ausbeute des Konjugats betrug 35,3 %. Die radiochemische Reinheit betrug 99,8 %, abgeschätzt durch sofortige Dünnschicht-Chromatographie auf Silica-Gel-imprägnierten Glasfaser-Platten, die entwickelt wurden in 12 % (w/v) wässriger Trichloressigsäure. Die ITLC-Platten wurden in zwei Hälften geschnitten und jede Hälfte wurde in einem Gamma-Counter oder einem Dosis-Calibrator gecounted. Das radiomarkierte Annexin V-Galactose-Konjugat fiel am Anfangspunkt aus und alle Nicht-Protein-gebundene Radioaktivität wanderte mit der Lösungsmittelfront in diesem Lösungsmittelsystem. Die Tc-99m-Annexin V-Galactose-Konjugat-Lösung (300 bis 350 g) wurde verdünnt und in PBS aufgehoben, das Rinderserumalbumin enthielt (im Handel erhältlich von der Firma Sigma Chemical Co.) und zwar in einer Endkonzentration von 15 bis 20 mg/ml PBS vor der intravenösen Injektion.

E. Freisetzung von Tc-99m-Annexin V und von Tc-99m-Annexin V-Galactose aus dem Blut

[0161] Ein Tiermodell, wie es vorstehend in Beispiel III beschrieben worden war, wurde verwendet zur Bewertung der Freisetzung der Moleküle aus dem Blut. Für N = 20 Schweine ist die Freisetzung aus dem Blut (**Fig. 2**) zweiphasig (biexponential):

%ID/g a = 0,0389	t _{1/2} a = 9,6 min
%ID/g b 0,0300	t _{1/2} b = 46 min

a + b = 0,0689; daher werden 57 % (0,0389/0,0689) der injizierten Dosis/Gramm Blut in der schnelleren a-Phase freigesetzt, und 43 % des ID/g wird in der langsameren b-Phase freigesetzt.

[0162] Die Blut-Freisetzung von Tc-99m Annexin V-Galactose im Schwein (**Fig. 2**) ist ebenfalls zweiphasig (biexponentiell):

%ID/g a = 0,0313	t _{1/2} a = 3,5 min
%ID/g b = 0,0045	t _{1/2} b = 160 min

a + b = 0,0358, daher werden 87 % (0,0313/0,0358) der injizierten Dosis/Gramm Blut sehr schnell in der frühen a-Phase freigesetzt. Diese schnellere Freisetzung reduziert die Hintergrund-Radioaktivität in dem Blut-Bereich, d.h. das Geräusch, und verbessert daher das Verhältnis Signal : Geräusch. Folglich kann eine Thrombus-Abbildung zu kürzeren Zeitpunkten erreicht werden.

BEISPIEL V

Herstellung der Chelat-Verbindung

[0163] 4,4-Diethoxycarbonylpropyl-1,3-dianilin: Eine gerührte Lösung aus 2,065 g (1,25 Mo) Ethyl-4-aminobenzoat, 14,35 ml (0,125 Mol) 1,3-Di-iodpropan und 10,5 g (0,125 Mol) Natriumbicarbonat in 500 ml trockenem DMSO wird bei 100 °C 3 Stunden lang unter Stickstoff erhitzt. Nach dem Abkühlen wird die Mischung unter Rühren in 21 Eiswasser gegossen, und der resultierende Niederschlag wird durch Filtration gesammelt. Der Niederschlag wird danach mit Eisessig (14 × 75 ml) gewaschen, bis das gesamte anfängliche Ethyl-4-aminobenzoat entfernt worden war. Nach dem Trocknen im Vakuum wird das so erhaltene Produkt ohne weitere Reinigung im nächsten Schritt verwendet.

[0164] 1,3-Di-(2-imino-6-ethoxycarbonylbenzthiazolyl-3-)propan: Ammoniumthiocyanat (16,5 g; 0,217 Mol) wird einer mit einem Magneten gerührten Suspension von 4,4-Diethoxycarbonylpropyl-1,3-dianilin (10,0 g; 0,27 Mol) in 1.500 ml Eisessig zugesetzt. Eine Lösung aus Brom (34,6 g; 0,216 Mol) in 100 ml Eisessig wird danach tropfenweise der Suspension unter Rühren bei Raumtemperatur zugesetzt. Nachdem man die Reaktionsmischung über Nacht bei Raumtemperatur rührte, wird das Dihydrobromid-Salz des Rohprodukts durch Filtration gesammelt und getrocknet. Das Produkt wird isoliert durch Lösen des Rohproduktes in heißem Wasser, Einstellen auf einen basischen pH-Wert durch die Zugabe von gesättigter Natriumbicarbonat-Lösung, Sammeln des Niederschlages durch Filtration und Trocknen im Vakuum.

[0165] N,N-Bis-(2-disulfidyl-4-hydroxycarbonylphenyl)-1,3-propyldiamin: Festes Natriumhydroxid (20,0 g;

0,357 Mol) wird einer Suspension von 1,3-Di-(2-imino-6-ethoxycarbonylbenzthiazolyl-3-)propan (1,0 g; 0,002 Mol) in 40 ml destilliertem Wasser zugesetzt, und die resultierende Mischung wird 12 Stunden lang auf 120 ° C erhitzt. Das vollständige Lösen trat nach 1 Stunde ein. Die Reaktionsmischung wurde danach in einem Eisbad abgekühlt, und der pH-Wert wurde mit 5,0 N Essigsäure auf 5,0 eingestellt. Die wässrige Lösung wird danach mit drei 100 ml-Portionen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Extrakte werden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, und das Trockenmittel wird abfiltriert. Nach der Entfernung des Lösungsmittels erhält man das Produkt.

[0166] Bis zu diesem Punkt ist die Synthese schematisch in **Fig. 3** gezeigt.

[0167] N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-hydroxycarbonylphenyl)-1,3-propyldiamin-mono-(methylaminocaproat-)Addukt: Zu einer Mischung aus N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-hydroxycarbonylphenyl)-1,3-propyldiamin und 2 bis 3 Äquivalenten von Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (hergestellt, wie dies nachfolgend in Beispiel VI beschrieben ist) in Dimethylformamid werden 10 Äquivalente Triethylamin und anschließend 0,9 bis 1,0 Äquivalente BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylamino) phosphoniumhexafluorophosphat) zugesetzt. Die Mischung wird 24 Stunden lang bei 15 bis 30 ° C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wird mit entionisiertem Wasser verdünnt, und der pH-Wert wird auf etwa 2 mit einer 1 N wässrigen Chlorwasserstoffsäure eingestellt. Die Mischung wird erneut konzentriert. Der Rückstand wird an Silica-Gel chromatographiert. Die Fraktionen der Chromatographie, die das Produkt enthalten, werden vereinigt und konzentriert, und man erhält das Produkt.

[0168] Diese Chelat-Verbindung ist zugänglich für die Verwendung mit einem geeigneten trifunktionellen Linker oder einem Paar bifunktioneller Linker, um die radiomarkierten Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate der vorliegenden Erfindung herzustellen. Deren Verwendung mit einem Paar bifunktioneller Linker wird in dem nachfolgenden Beispiel angesprochen.

BEISPIEL VI

Radiomarkierte Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate mit bifunktionellem Linker

A. Herstellung eines Acht-Galactose-Clusters

[0169] Diese Vorgehensweise wird schematisch in **Fig. 5** gezeigt.

[0170] Methyl-6-bromhexanoat: In einen 1 Liter Rundkolben, der mit 20 g (102,5 mMol) 6-Bromhexansäure und 500 ml Methanol befüllt war, wurde 2 bis 3 Minuten lang Chlorwasserstoff-Gas eingeblasen. Die Mischung wurde 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und konzentriert, und ergab 21,0 g des Produktes in Form eines gelben Öls (99 %): ¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO); 3,57 (s, 3H), 3,51 (t, 2H), 2,30 (t, 2H), 1,78 (Pentett), 2H) und 1,62 bis 1,27 (m, 4H) ppm.

[0171] Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid: Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 40,0 g Aminocaprinsäure befüllt war, wurden 500 ml Methanol zugesetzt. Chlorwasserstoffgas wurde 5 Minuten lang durch die Mischung durchgeblasen, und die Mischung wurde 5 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde danach mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,1 mm Hg) konzentriert. Dies ergab 55 g des Produktes als weißen Feststoff (99 %): ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD); 3,67 (s, 3H), 3,02 (t, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,48 (t, 2H) und 2,03 bis 1,87 (Pentett, 2H) ppm.

[0172] Methyl-6-(trifluoracetamido-)hexanoat: In einen 1 Liter-Rundkolben, der mit 25,0 g (138 mMol) Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid und 500 ml Methylenchlorid befüllt war, wurden 24 ml (170 mmol) Trifluoressigsäureanhydrid gegeben. Die Mischung wurde in einem Eisbad abgekühlt und 42 ml (301 mMol) Triethylamin wurden über einen Zeitraum von 25 bis 30 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde 2 Stunden lang bei 0 ° C bis Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 150 ml Diethylether und 150 ml Petrolether verdünnt, und die resultierende Lösung wurde zuerst mit 1 N wässriger HCl-Lösung (3 × 150 ml) und danach mit gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung (3 × 150 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert, und ergab 32,9 g des Produktes in Form eines schwach gelben Öls (99 %): ¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO); 9,39 (m, 1H), 3,57 (s, 3H), 3,14 (q, 2H), 2,29 (t, 2H), 1,60 bis 1,38 (m, 4H) und 1,32 bis 1,19 (m, 2H) ppm.

[0173] N,N'-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl-)amin-hydrochlorid: In einen 500 ml trockenen Rundkolben, der mit 12,0 g (50,0 mMol) des sekundären Amids Methyl-6-(trifluoracetamido-)hexanoat und 250 ml trockenem Tetra-

hydrofuran befüllt war, wurden 2,2 g (55 mMol; 1,1 Äquivalente) 60 % Natriumhydrid gegeben. Die Mischung wurde 30 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Danach wurden 10,25 g (49,0 mMol; 0,98 Äquivalente) des Alkylbromids, Methyl-6-bromhexanoat zugesetzt. Die Mischung wurde 3 Stunden lang unter Rückfluß gerührt; zusätzlich wurden 5,80 g (27,7 mMol; 0,55 Äquivalente) Methyl-6-bromhexanoat zugesetzt, und die Mischung wurde 70 Stunden lang unter Rückfluß gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt, mit 150 ml einer 1 N wässrigen HCl verdünnt und danach mit Ethylacetat (3 × 100 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte wurde vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml Methanol verdünnt und danach mit 30 ml einer 10 N wässrigen Natriumhydroxid-Lösung behandelt. Die Mischung wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 37 %iger konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 1 bis 2 angesäuert. Die Lösung wurde mit Diethylether (3 × 100 ml) gewaschen. Die wässrige Phase wurde konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Der nachfolgende Rückstand wurde mit 250 ml Methanol verdünnt, und HCl-Gas wurde 2 bis 3 Minuten lang durchgeblasen, mit anschließendem Rühren bei Raumtemperatur für 3 Stunden. Die Mischung wurde konzentriert. Der Rückstand wurde mit 300 ml Methanol verdünnt und filtriert, um anorganische Salze zu entfernen. Das Filtrat wurde mit 3 g Aktivkohle durch ein Celite-Filter (hergestellt von der Firma 7. T. Baker) filtriert und konzentriert. Der Rückstand, ein cremefarbiger Feststoff, wurde aus 100 ml 2-Propanol erneut auskristallisiert, und ergab 7,0 g des Produktes in Form eines weißen Feststoffes. Die Konzentration des Filtrats und erneute Auskristallisation des Rückstandes ergab eine zusätzliche Ausbeute an 1,65 g des Produktes von insgesamt 8,65 g (56 %): ¹H-NMR (200 MHz, d₆-DMSO); 3,57 (s, 3H), 2,90 bis 2,73 (m, 4H), 2,30 (t, 4H); 1,67 bis 1,44 (m, 8H) und 1,37 bis 1,20 (m, 4H) ppm.

[0174] Methyl-4-methylaminobutyrat-hydrochlorid: In einen 1 Liter-Rundkolben, der mit 30,0 g (195 mMol) 4-Methylaminobuttersäure und 500 ml Methanol befüllt war, wurde 1 bis 2 Minuten lang HCl-Gas durchgeblasen. Die Mischung wurde 3 bis 4 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Dies ergab 32,5 g des Produktes in Form eines schaumigen, cremefarbenen Feststoffes (99 %): ¹H-NMR (200 MHz, CD₃OD); 3,67 (s, 3H), 3,03 (t, 2H), 2,68 (s, 3H), 2,48 (t, 2H) und 2,03 bis 1,87 (Pentett), 2H) ppm.

[0175] Methylaminobutanol: In einen 1 Liter-Rundkolben, der mit 32,5 g (194 mMol) des Esters Methyl-4-methylaminobutyrate-hydrochlorid befüllt war, wurden über eine Zeitdauer von 1 Stunde bei 0 °C 500 ml 1 M Boran in Tetrahydrofuran zugesetzt. Nachdem die Zugabe beendet war, wurde die Mischung 20 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt, auf 0 °C abgekühlt und das überschüssige Boran wurde durch sorgfältige Zugabe von 100 ml Methanol zerstört. Nachdem das gesamte Methanol zugegeben war, wurde die Mischung 1 Stunde lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend konzentriert. Der Rückstand wurde mit 400 ml Methanol verdünnt und danach wurde HCl-Gas 5 Minuten lang in die Lösung eingeblasen. Die Mischung wurde 16 Stunden lang unter Rückfluß erhitzt. Die Mischung wurde abgekühlt, konzentriert und danach mit 250 ml entionisiertem Wasser verdünnt. Das Produkt wurde zunächst in Form der freien Base freigesetzt durch Zugabe einer 10 N wässrigen Natriumhydroxid-Lösung auf einen pH-Wert von 9 bis 9,5, und danach durch Zugabe von 70 g eines AG-1 X-8-Anionenaustausch-Harzes (Hydroxid-Form), im Handel erhältlich von der Firma BioRad, Richmond, CA, und durch Rühren der Lösung für eine Zeitdauer von 2 Stunden. Das Harz wurde abfiltriert und mit 150 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die wässrigen Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 200 ml 2-Propanol verdünnt und filtriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 100 ml 2-Propanol gespült. Die organischen Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde unter verringertem Druck destilliert und ergab 12,85 g des Produktes in Form eines farblosen Öls (Siedepunkt: 68 °C bei 0,1 bis 0,2 mm Hg; 64 %): ¹H-NMR (200 MHz, D₂O); 3,52 (t, 2H), 2,56 (t, 2H), 2,31 (s, 3H) und 1,65 bis 1,43 (m, 4H) ppm.

[0176] 4-(N-Methyltrifluoracetamido-)1-butanol: In einen 250 ml-Rundhalskolben, der mit 10,0 g (96,9 mMol) des Amins 4-Methylaminobutanol in 100 ml trockenem Methanol befüllt war, wurden 17,5 ml (147 mMol) Ethyltrifluoracetat gegeben. Die Mischung wurde 24 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert, ergab 18,55 g des Produktes in Form eines nahezu farblosen Öls (96 %): ¹H-NMR (200 MHz, D₂O); 3,63 und 3,50 (2 Triplets, 4H), 3,20 und 3,05 (d und s, 3H), und 1,82 bis 1,47 (m, 4H) ppm.

[0177] 1-(p-Toluolsulfonyloxy-)4-(N-methyltrifluoracetamido-)butan: In einen trockenen 1 Liter-Rundhalskolben, der mit 17,0 g (85,4 mMol) des Alkohols 4-(N-methyltrifluoracetamido-)1-butanol in 400 ml Methylenchlorid befüllt war, wurden 17,1 g (89,7 mMol; 1,05 Äquivalente) Toluolsulfonylchlorid und anschließend 30 ml (213 mMol; 2,5 Äquivalente) Triethylamin bei 0 °C über eine Zeitdauer von 10 Minuten gegeben. Die Mischung wurde 15 Stunden lang bei 0 °C bis Raumtemperatur gerührt und danach mit 5 % (v/v) wässriger HCl (3 × 200 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert, mit Hexan/Methylenchlorid (50 : 50) und danach mit Methy-

lenchlorid eluiert. Dies ergab 25,1 g des Produktes in Form eines blassgelben Öls (83 %): $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, CDCl_3); 7,80 (d, 2H), 7,37 (d, 2H), 4,07 (m, 2H), 3,41 (m, 3H), 3,09 und 2,98 (q und s, 3H), 2,45 (s, 3H) und 1,68 (m, 4H) ppm; TLC (Methylenchlorid), $R_f = 0,31$.

[0178] 1-S-(2,3,4,6-Tetra-O-acetyl-beta-D-galactopyranosyl)-2-thiopseudoharnstoffhydrobromid: In einen 250 ml-Rundkolben, der mit 5,08 g (60,8 mMol; 1,09 Äquivalente) Thioharnstoff und 36 ml Aceton befüllt war, wurden 25,0 g (66,7 mMol) Tetra-acetyl-alpha-D-galactopyranosylbromid gegeben. Die Mischung wurde 15 bis 20 Minuten unter Rückfluß gerührt und danach auf Eis abgekühlt. Die Mischung wurde durch einen Buchner-Trichter filtriert und mit 25 ml eiskaltem Aceton gespült. Die Feststoffe wurden mit 50 ml Aceton behandelt, 15 Minuten lang unter Rückfluß erhitzt, auf Eis gekühlt und filtriert. Die Feststoffe wurden mit 25 ml kaltem Aceton gespült, an der Luft getrocknet und danach im Vakuum getrocknet. Dies ergab 22,6 g des Produktes in Form eines weißen Feststoffes (76 %): $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, d_6 -DMSO); 9,4 bis 9,0 (breites d, 4H), 5,63 (d, 1H), 5,38 (d, 1H), 5,23 (dd, 1H), 5,09 (t, 1H), 4,40 (t, 1H), 4,04 (dd, 1H), 2,13 (s, 3H), 2,08 (s, 3H), 2,00 (s, 3H), 1,93 (s, 3H) ppm.

[0179] 4-(N-Methylaminobutyl)-1-thio-beta-D-alactopyranosid: In einen 500 ml-Rundkolben, der mit 20,7 g (42,5 mMol; 1,07 Äquivalente) des Thiopseudoharnstoffhydrobromids, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, in 70 ml entionisiertem Wasser befüllt war, wurden 6,4 g (46,3 mMol; 1,16 Äquivalente) Kaliumcarbonat und 4,7 g (45,2 mMol; 1,13 Äquivalente) Natriumbisulfit gegeben, und danach wurden sofort 14,1 g (39,9 mMol; 1,0 Äquivalente) des Tosylats, 1-(p-Toluolsulfonyloxy)-4-(N-methyltrifluoracetamido-)butan in 70 ml Aceton zugegeben. Die Mischung wurde 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mit 50 ml Kochsalzlösung verdünnt und mit Ethylacetat (3 x 200 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert, zuerst mit 75% Methylenchlorid/Hexan, danach mit Methylenchlorid, danach mit 2 % Methanol/Methylenchlorid und letztendlich mit 10 % Methanol/Methylenchlorid eluiert. Alkylierungsprodukt mit unterschiedlichen Graden der Acetylierung enthaltende Fraktionen wurden zusammengegeben und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 250 ml Methanol und 150 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 110 g AG-1 X-8-Harz (Hydroxid-Form; 2,6 m Äquivalente/g Trockengewicht), im Handel erhältlich von der Firma BioRad, behandelt. Die Mischung wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde filtriert und das Harz wurde mit Methanol (2 x 150 ml) gespült. Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 6,1 g des Produktes (54 %): $^1\text{H-NMR}$ (200 MHz, D_2O); 4,38 (d, 1H), 3,88 (d, 1H), 3,69 bis 3,41 (m, 5H), 2,82 bis 2,64 (m, 4H), 2,43 (s, 3H) und 1,68 bis 1,57 (4H) ppm.

[0180] N-BOC-Bis-methylester: Zu 1,00 g (3,23 mMol) des Aminhydrochlorids N,N-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)-amin-hydrochlorid, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, wurden 1,5 ml (10,6 mMol) Triethylamin und danach 875 mg (3,55 mMol; 1,1 Äquivalente) BOC-ON 2-(tert-Butoxycarbonyloxyimino)-2-phenylacetonitril zugesetzt. Die Mischung wurde 18 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N wässriger Chlorwasserstoffsäure (3 x 50 ml) und anschließend mit gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung (2 x 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert und mit 15 % (Volumenprozent) Ethylacetat/Hexan eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 990 mg des Produktes als nahezu farbloses Öl (83 %).

[0181] N-BOC-Bis-Säure: Zu 980 mg (2,62 mMol) des Diesters, der in dem vorhergehenden Schritt hergestellt worden war, in 10 ml Methanol wurden 5,8 ml einer 1 N wässrigen Natriumhydroxid-Lösung (5,8 mMol) zugesetzt. Die Mischung wurde 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 30 ml entionisiertem Wasser verdünnt und auf einen pH-Wert von 1,5 bis 2 angesäuert. Die Mischung wurde mit Ethylacetat (6 x 50 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, das im Handel erhältlich ist von der Firma J. T. Baker, und mit 65 % Methanol/Wasser eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 851 mg des Produktes als nahezu farbloses Öl (94 %).

[0182] N-BOC-Tetramethylester: Zu 825 mg (2,39 mMol) der Bis-Säure, die wie oben beschrieben hergestellt worden war, in 35 ml trockenem Dimethylformamid wurden 1,75 g (5,65 mMol; 2,36 Äquivalente) des Aminhydrochlorid N,N-Bis-(6-methoxycarbonylhexyl)-amin-hydrochlorid und 3,0 ml Triethylamin und anschließend 2,4 g (5,4 mMol; 2,3 Äquivalente) BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 17 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 100 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N Chlorwasserstoffsäure (3 x 50 ml) und anschließend mit wässriger Natriumbicarbonat-Lösung (2 x 50 ml) gewaschen.

Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert und mit Ethylacetat eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 1,63 g des Produktes als nahezu farbloses Öl (80 %).

[0183] N-BOC-Tetra-Säure: Einer Lösung aus 1,41 g (1,65 mMol) Tetramethylester, der wie oben beschrieben hergestellt worden war, in 25 ml Methanol wurden 7,4 ml (7,4 mMol) 1 N wässrige Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt. Die Mischung wurde 22 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 30 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 1 N wässriger Chlorwasserstoffsäure auf einen pH-Wert von 2 angesäuert. Die Mischung wurde mit Ethylacetat/Isopropanol in einem Verhältnis von 3 : 1 (Volumenverhältnis) (3 × 100 ml) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser (50 : 50) (Volumenverhältnis) und letztendlich mit Methanol/Wasser (75 : 25) eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 1,19 g des Produktes als farbloses Öl (90 %).

[0184] N-BOC-Octamethylester: Einer Mischung aus 501 mg (0,626 mMol) der Tetra-Säure, die wie oben beschrieben hergestellt worden war, und 30 ml trockenem Dimethylformamid wurden 968 mg (3,12 mMol; 5,0 Äquivalente) des Aminhydrochlorids, N,N'-Bis-(6-methoxycarboxyhexyl-)amin-hydrochlorid und 2,0 ml (14,2 mMol) Triethylamin und anschließend 1,22 g (2,76 mMol; 4,6 Äquivalente) BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 19 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 75 ml Ethylacetat verdünnt und mit 1 N wässriger Chlorwasserstoffsäure (2 × 50 ml) gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser (60 : 40) und letztendlich mit Methanol/Wasser (90 : 10) eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 715 mg des Produktes als farbloses Öl (63 %).

[0185] N-BOC-Octa-Säure: Einer Lösung aus 715 mg (0,393 mMol) Octamethylester, der wie oben beschrieben hergestellt worden war, in 20 ml Methanol wurden 6 ml 1 N wässrige Natriumhydroxid-Lösung (6 mMol) und 5 ml entionisiertes Wasser zugesetzt. Die Mischung wurde 16 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 20 ml entionisiertem Wasser verdünnt, und die Lösung wurde auf einen pH-Wert von 1,5 bis 2,0 angesäuert. Die Mischung wurde konzentriert, und der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser (50 : 50) und letztendlich mit Methanol/Wasser (80 : 20) eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 647 mg des Produktes als nahezu farbloses Öl (96 %).

[0186] Die oben angegebene Vorgehensweise ist bestimmt für die Herstellung eines Galactose-Clusters mit 8 Galactose-Resten. Die Version mit vier Galactose-Resten kann in Übereinstimmung mit dieser Vorgehensweise hergestellt werden, indem man von der Tetra-Säure zu dem Galactose-Derivatisierungs-Schritt, der nachfolgend für die 8-Galactose-Cluster beschrieben ist, verfährt. In ähnlicher Weise können 16-, 32- etc. Galactose-Cluster-Konstrukte in Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung durch die Einführung mehrerer Wiederholungen der Methylester- und Säure-Bildungs-Schritte hergestellt werden. Noch spezieller werden die 16-Methylester-Konstrukte, die 16-Säure, die 32-Methylester und so weiter im wesentlichen hergestellt, wie dies oben für die Tetra- und Octa-Formen beschrieben wurde. Wenn die erwünschte Anzahl an Säure-Resten gebildet ist, wird der Galactose-Derivatisierungs-Schritt durchgeführt, wobei die Anteile der Bestandteile so eingestellt wird, dass sie mit der Anzahl der Säure-Reste in Einklang gebracht werden.

[0187] N-BOC-Octa-Galactosyl-Konstrukt: Einer Mischung aus 161 mg (94 mMol) der Octa-Säure, die wie oben beschrieben hergestellt worden war, und 225 mg (906 Micromol; 9,64 Äquivalente) des Galactosamins, 4-N-(Methylaminobutyl)-1-thio-beta-D-galactopyranosid, in 8 ml trockenem Dimethylformamid wurden 0,5 ml (3,54 mMol) Triethylamin und anschließend 371 mg (839 Micromol; 8,4 Äquivalente) BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 17 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser (40 : 60) und letztendlich mit Methanol/Wasser (70 : 30) eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 170 mg des Produktes als nahezu farbloses Öl (47 %).

[0188] Octa-Galactosylamin: 170 mg des N-BOC-Octa-Galactosyl-Konstrukts, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, wurden 5 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 10 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Der Rückstand wurde ohne weitere Reinigung verwendet.

B. Herstellung der verlängerten Galctose-Cluster

[0189] Diese Verfahrensweise ist in **Fig. 6** schematisch gezeigt.

[0190] Methyl-6-(N-BOC-)aminocaproat: Einer Mischung aus dem Aminhydrochlorid Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, wurden 1,1 Äquivalente BOC-ON und anschließend 2 bis 3 Äquivalente Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 16 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt und konzentriert. Der Rückstand wurde in Ethylacetat gelöst und mit 1 N wässriger Chlorwasserstoffsäure und danach mit gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und über Reaktionsverdampfung bei verringertem Druck konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert und mit 25% Ethylacetat/Hexan eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und man erhielt das Produkt.

[0191] 6-(N-BOC-)aminocaprönsäure: Zu einer Lösung des Methylesters Methyl-6-(N-BOC-)aminocaproat in Methanol wurden 1,5 Äquivalente einer 1 N wässrigen Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt. Die Mischung wurde 16 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit entionisiertem Wasser verdünnt und mit Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit 25 % Ethylacetat/Hexan und letztendlich mit 100 % Ethylacetat eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und man erhielt das Produkt.

[0192] N-BOC-verlängertes Octa-Galactosyl-Konstrukt: Zu einer Lösung des Octa-Galactosylamins, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, in Dimethylformamid und 1,5 bis 3 Äquivalenten 6-(N-BOC-)aminocaprönsäure wurden 4 bis 6 Äquivalente Triethylamin und anschließend 1,1 bis 1,5 Äquivalente BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 4 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit entionisiertem Wasser verdünnt, und der pH-Wert wurde durch Zugabe einer 1 N wässrigen Chlorwasserstoffsäure auf 1,5 bis 2,0 eingestellt. Die Mischung wurde mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde konzentriert und der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert, zunächst mit Methanol/Wasser (50 : 50) und letztendlich mit Methanol/Wasser (65 : 35) eluiert. Die chromatographierten Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und man erhielt das Produkt.

[0193] Amin-verlängertes Octa-Galactosyl-Konstrukt: Dem N-BOC-geschützten Amin, das in dem vorhergehenden Schritt hergestellt worden war, wurde Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 10 Minuten lang bei 15 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Man erhielt das Produkt, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

C. Konjugation von Galactose-Cluster mit Chelat-Verbindung und Annexin-Bestandteilen

[0194] Octa-Galactosyl-Chelat-Verbindung-Konstrukt: Einer Mischung aus Aminverlängertem Octa-Galactosylamin, 1,2 Äquivalenten N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-hydroxycarbonylphenyl-)1,3-propyldiamin-mono-(methylaminocaproat-)Addukt und 5 Äquivalenten Triethylamin in Dimethylformamid wurden 1,1 Äquivalente BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 2 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit entionisiertem Wasser gewaschen, und der pH-Wert wurde durch Zugabe einer 1 N wässrigen Chlorwasserstoffsäure auf 2,5 eingestellt. Die Mischung wurde mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und man erhielt das Produkt.

[0195] Octa-Galactosyl-Chelat-Verbindung-Carbonsäure-Konstrukt: Einer methanolischen Lösung des Estertragenden Octa-Galactosyl-Chelat-Verbindung-Konstrukts, das vorangehend hergestellt worden war, wurden 4 bis 5 Äquivalente einer 1 N wässrigen Natriumhydroxid-Lösung zugesetzt. Die Mischung wurde 16 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt. Die Mischung wurde konzentriert und der Rückstand wurde mit entionisiertem Wasser gewaschen. Der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde auf etwa 2,5 eingestellt, und die Lösung wurde erneut konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Umkehr-Phasen-C-18-Silica-Gel chromatographiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert und man erhielt das Produkt.

[0196] Annexin V-Chelat-Verbindung-Octa-Galactosyl-Konstrukt: Das Octa-Galactosyl-Chelat-Verbin-

ung-Carbonsäure-Konstrukt wird mit Annexin V in molaren Verhältnissen von 30:1, 15:1, 5:1 und 2:1 zusammengegeben. Die Konjugation von Annexin V wird durchgeführt durch die Aktivierung der funktionellen Carbonsäure-Gruppe des Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Konstrukts mit Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethylamino-)phosphoniumhexafluorophosphat (BOP). Dem Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Konstrukt in DMF wird eine equimolare Konzentration an BOP in DMF zugesetzt. Annexin V in 0,05 M HEPES-Puffer (im Handel erhältlich von der Firma Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), pH 7,4, wird der Reaktionsmischung zugesetzt und anschließend wird ein 0,5 M Borat-Puffer, pH 8,5, zugesetzt. Die DMF-Konzentration in der Reaktionsmischung wird zwischen 5 bis 20 % gehalten. Die Mischung wird 1 Stunde lang bei Raumtemperatur durch Rotieren des Reaktionsgefäßes gemischt, und wird danach bei Raumtemperatur über Nacht (etwa 18 bis 24 Stunden) stehen gelassen. Die Reaktionsmischung wird danach mit PBS verdünnt, in einen Dialyseschlauch (Cut-Off: Molekulargewicht: 6.000 bis 8.000 MW) überführt, und 24 Stunden lang gegen PBS dialysiert. Nach dem Entfernen des Materials aus dem Dialysebeutel wurde die Lösung durch ein 0,2 Micrometer Spitzen-Filter filtriert. Alle anderen Zusammengabe-Verhältnisse wurden in analoger Weise behandelt.

D. Charakterisierung des Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin V-Konjugats

[0197] Die Protein-Konzentration wird bestimmt unter Verwendung von A_{280} von 0,6 für eine 1 mg/ml-Lösung Annexin V. Die Anzahl der Galactose-Reste pro Molekül Annexin V wird bestimmt durch Messung der Gesamtzahl an reaktiven Aminen an Annexin V vor und nach der Reaktion mit dem Galactosyl-Cluster-Chelat-Verbindung-Konjugat unter Verwendung von Trinitrobenzolsulfonsäure, wie dies beschrieben ist in „Habeeb, Analytical Biochemistry, 14, 328 – 336 (1966)“. Die Fähigkeit von Galactose-Chelat-Verbindung-Annexin, sich an aktivierte Blutplättchen zu binden, wird dadurch bewertet, indem man seine Fähigkeit bestimmt, die Bindung von unmodifiziertem, I-125-radiomarkiertem Annexin V an frisch isolierte menschliche Blutplättchen zu inhibieren, in Anlehnung an das Verfahren von „Thiagarajan und Tait, J. Biol. Chem., 265, 17240 – 17243 (1990)“.

E. Radiomarkierungs-Verfahren zur Verwendung im nach-gebildeten Chelat-Konjugations-Verfahren

[0198] Verfahren A: Zinngluconat-Kits wurden hergestellt, die 5 mg Natriumgluconat, 100 Microgramm Zinnchlorid, 1,0 mg (1 mg/ml) Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin V und 0,1 bis 1,0 mg Lactose enthielten. Der pH-Wert wurde unter Verwendung von HCl, Essigsäure oder NaOH zwischen 5 und 7 gehalten. Dem Zinngluconat-Kit wurden 1,0 ml Natriumpertechtetat (Tc-99m) mit einer spezifischen Aktivität von 50 mCi zugesetzt. Die Phiole wurde 5 bis 30 Minuten lang bei 25 bis 37 °C inkubiert. Der prozentuale Anteil an markiertem Konjugat, verbleibendem TcO_4 , und hydrolysiertem reduziertem Technetium wurde bestimmt durch ITLC in 12 % TCA als Entwicklungslösungsmittel.

[0199] Verfahren B: Zinntartrat-Kits wurden in einer Vakuum-Phiole unter Stickstoff hergestellt, die 0,5 ml Dinatriumtartrat (10 mg/ml) und 0,1 ml Zinnchlorid (1,0 mg/ml in Ethanol) enthielten. Der pH-Wert der Lösung wurde zwischen 5 und 7, vorzugsweise bei 6,0 gehalten. Dieser Zinntartrat-Lösung wurden 1,0 ml Natriumpertechtetat (50 mCi) zugesetzt, und man ließ die Lösung bei Raumtemperatur stehen. Einer evakuierten Phiole wurden nacheinander 200 Microliter Natriumphosphat (0,5 M; pH 8 oder 10) und 1,0 ml Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin V-Konjugat (1,0 mg/ml) zugesetzt. Danach wurde Tc-99m-Tartrat (50 mCi) zugesetzt, und die Phiole wurde 5 bis 30 Minuten lang bei 25 bis 37 °C inkubiert. Der prozentuale Anteil an markiertem Konjugat, verbleibendem TcO_4 und hydrolysiertem reduziertem Technetium wurde bestimmt durch ITLC in 12 % (w/v) Trichloressigsäure als Entwicklungslösungsmittel.

[0200] Konstrukte, die gemäß diesem Beispiel hergestellt worden waren, wurden in Übereinstimmung mit den Verfahrensabläufen, die oben angegeben wurden (Beispiel III und Beispiel IV (E)) getestet, um die Nützlichkeit in Anwendungen, beispielsweise bei der Darstellung von Blutgerinnseln, zu überprüfen.

BEISPIEL VII

Annexin-Galactose-Cluster-Konjugate mit trifunktionellem Linker

A. Herstellung der Chelat-Verbindung

[0201] Die Herstellung der Chelat-Verbindung N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-methylphenyl-) gamma, gamma'-diamino-isovalerat-N-hydroxysuccinimid ist schematisch in **Fig. 4** gezeigt.

[0202] 3-Iodmethyl-4-Iodbuttersäure: Einer Lösung aus 1,61 g (10mMol) 3-Hydroxymethyl-4-butanolid (hergestellt durch das Verfahren von Kinoshita und Hirano, J. Heterocyclic Chem., 29, 1025 (1992)) in 100 ml Koh-

lenstofftetrachlorid wurden 8 g (40 mMol) Iodtrimethylsilan zugesetzt. Die Reaktionsmischung wurde 12 Stunden lang unter Stickstoff auf 50 °C erhitzt. Die Mischung wurde mit Chloroform verdünnt und mit Wasser (3 × 100 ml), 5 % wässriger Natriumthiosulfat-Lösung (100 ml), 10 % wässriger Natriumbicarbonat-Lösung und Kochsalzlösung gewaschen. Die organische Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und verdampft. Dies ergab das erwünschte Rohprodukt. Das Rohprodukt wurde mittels Silica-Gel-Chromatographie (Ethylacetat/Hexan = 3 : 7 als Elutionsmittel) gereinigt, und man erhielt 3-Iodmethyl-4-Iodbuttersäure.

[0203] Ethyl-3-Iodmethyl-4-Iodbutyrat: Eine Lösung aus 2,831 g (8 mMol) 3-Iodmethyl-4-Iodbuttersäure in 80 ml Ethanol wurde mit HCl-Gas bei 0 °C gesättigt. Nach dem Rühren der Lösung bei Raumtemperatur für 2 Tage wurde das Lösungsmittel unter Vakuum entfernt, und der Rückstand wurde in Dichlormethan gelöst. Die Dichlormethan-Schicht wurde mit 10 % wässriger Natriumbicarbonat-Lösung (3 × 100 ml), Wasser (1 × 100 ml) und Kochsalzlösung gewaschen. Die abgetrennte Dichlormethan-Schicht wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und verdampft und ergab Ethyl-3-Iodmethyl-4-Iodbutyrat.

[0204] Ethyl-gamma gamma'-di-(4-methylanilino-)isovalerat: Eine gerührte Lösung aus 7,5 g (70 mMol) 4-Toluidin, 2,764 g (7 mMol) Ethyl-3-Iodmethyl-4-Iodbutyrat und 0,588 g (7 mMol) Natriumbicarbonat in 30 ml trockenem Dimethylsulfoxid wurde 3 Stunden lang unter Stickstoff auf 100°C erhitzt. Die abgekühlte Mischung wurde unter Rühren auf 400 ml Eiswasser gegossen. Der resultierende Niederschlag wurde durch Filtration gesammelt. Das verbleibende 4-Toluidin in dem Niederschlag wurde durch mehrmaliges Waschen mit wässriger Essigsäure entfernt. Das Produkt wurde erhalten durch Umkristallisation des gewaschenen Niederschlags in Heptan.

[0205] Ethyl gamma gamma'-[1,3-di-(2-imino-6-methylbenzthiazolyl-3-)]isovalerat: Einer mit einem Magneten gerührten Suspension aus 2,0 g (6,5 mMol) Ethyl-gamma, gamma'-di-(4-methylanilino-)isovalerat in 250 ml Eisessig wurde Ammoniumthiocyanat (3,5 g; 0,046 Mol) zugesetzt, und anschließend wurde tropfenweise eine Lösung aus Brom (7,27 g; 0,046 Mol) in 50 ml Eisessig zugesetzt. Nachdem die Zugabe beendet war, wurde das Rühren über Nacht fortgesetzt. Der gelbe Niederschlag aus Dihydrobromidsalz wurde filtriert und getrocknet. Der trockene Feststoff wurde danach in heißem Wasser gelöst, und die Benzothiazol-freie Base wurde freigesetzt mit einer gesättigten Natriumbicarbonat-Lösung. Der weiße Feststoff wurde filtriert und getrocknet, und man erhielt das Rohprodukt, das ohne weitere Reinigung verwendet wurde.

[0206] N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-methylphenyl)-gamma, gamma'-diaminoisovaleriansäure: Einer Suspension aus Ethyl-gamma, gamma'-[1,3-di-(2-imino-6-methylbenzthiazolyl-3-)]isovalerat in 40 ml destilliertem Wasser wurden feste Kaliumhydroxid-Pellets (20,0 g; 0,037 Mol) zugesetzt, und die resultierende Lösung wurde 15 bis 24 Stunden auf 120 °C erhitzt. Nach mehreren Stunden des Erhitzens wurde aus der Suspension eine klare Lösung. Die Reaktionsmischung wurde in einem Eisbad abgekühlt und mit 5,0 N Essigsäure auf einen pH-Wert von 5,0 angesäuert und die wässrige Lösung wurde mit drei 100 ml-Portionen Ethylacetat extrahiert. Die vereinigten Ethylacetat-Extrakte wurden über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet und filtriert. Das Lösungsmittel aus dem Filtrat wurde unter verringertem Druck entfernt, und man erhielt das Rohprodukt. Dieses Rohprodukt wurde an einer Silica-Gel-Säule unter Verwendung einer Mischung aus Ethylacetat : Hexan (20 : 80) mit 1 % Essigsäure als eluierendes Lösungsmittel chromatographiert und man erhielt das Produkt in Form eines kristallinen gelben Feststoffs.

[0207] N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-methylphenyl)-gamma, gamma'-diaminoisovalerat-N-hydroxysuccinimid: N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-methylphenyl)-gamma, gamma'-diaminoisovaleriansäure wurde mit N-Hydroxysuccinimid (NHS) und Dicyclohexylcarbodiimid (DCC) entweder in Tetrahydrofuran (THF) oder Dimethylformamid (DMF) bei Raumtemperatur umgesetzt. Nach dem Rühren über Nacht bei Raumtemperatur wurde das Lösungsmittel entfernt, und das Rohprodukt wurde mittels Säulenchromatographie an Silica-Gel gereinigt.

B. Konjugat-Bildung

[0208] Diese Chelat-Verbindung ist zugänglich für die Verwendung mit einem geeigneten trifunktionellen Linker, um ein radiomarkiertes Annexin-Galactose-Cluster-Konjugat der vorliegenden Erfindung, wie dies nachfolgend beschrieben wird, zu bilden.

[0209] Im Handel erhältliches N-epsilon-t-BOC-Lysin (Firma Sigma Chemical Company) wurde unter Verwendung von Trifluoressigsäureanhydrid in sein N-alpha-Trifluoracetamid-Addukt umgewandelt. Die Aktivierung der Carbonsäure-Funktion, beispielsweise mit BOP (Benzotriazol-1-yloxy-tris-(dimethylhino-) phosphoniumhexafluorophosphat), im Handel erhältlich von der Firma Aldrich Chemical Co., und die Reaktion der aktivierten Einheit mit dem einzig vorhandenen Amin an einem Galactose-Cluster, z.B. wie er oben beschrieben wurde,

erfordert eine Galactose-Cluster-trifunktionelle Linker-Spezies. Das alpha-Amin des trifunktionellen Lysin-Linker-Bestandteils der Galactose-Cluster-trifunktionelle Linker-Spezies wird deblockiert unter Verwendung von methanolischem Natriumhydroxid. Die Umsetzung mit dem N-Hydroxysuccinimidester des Chelat-Verbindungsmoleküls, das wie in Teil A dieses Beispiels beschrieben hergestellt worden war, bringt eine Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung trifunktionelle Linker-Spezies hervor. Die Entfernung der Schutzgruppe von dem epsilon-Amin des trifunktionellen Lysin-Linker-Bestandteils unter Verwendung von Trifluoressigsäure und anschließender Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid stellt eine verfügbare Carbonsäure-Funktionalität bereit, durch welche das Annexin im Anschluss an die folgende Aktivierung der Carbonsäure (z.B. mit BOP) konjugiert werden kann.

BEISPIEL VIII

Verfahren zur Herstellung eines Zellexpressions-Klons für Annexin V

[0210] Ein Stamm-Klon, HPAP 1.6, wird beschrieben in „Funakoshi et al., Primary Structure of Human Placental Anticoagulant Protein, *Biochemistry*, 26, 8087 – 8092 (1987)“. Eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um das Annexin-Gen aus dem λ HPAP 1.6-Stammklon zu amplifizieren. Der Sense-Primer (CAT ATG GCA CAG CTT CTCA) enthielt eine NdeI-Restriktionsstelle (unterstrichen) und die ersten 16 Nucleotide der Annexin-Leader-Sequenz, beginnende mit dem ATG-Start-Codon. Der Antisense-Primer (GGA TCC TTA GTC ATC TTC TCC ACA) kodierte das Ende der Kodierungs-Sequenz, ein Stop-Codon (fett gedruckt) und die BamHI-Restriktionsstelle (unterstrichen). Das PCR-Produkt und das Plasmid pET-12a (**Fig. 2**), die von der Firma Novagen (Palo Alto, Kalifornien) erhalten wurden, wurden jeweils mit NdeI und BamHI verdaut und miteinander mit T4-DNS-Ligase verbunden. Ein Teil der Bindungs-Lösung wurde in einen *E. coli*-Wirts-Stamm transformiert und auf Agar-Nährplatten, die Ampicillin enthielten, selektiert. Das Plasmid von dem resultierenden Klon wurde bezeichnet als pET-12a-PAP1-E287G, 7/16/93, Klon 1. Eine Dideoxy-DNS-Sequenzanalyse zeigte, dass dieses Plasmid DNS enthielt, welche mit der Wild-Typ-Annexin-Sequenz übereinstimmte, ausgenommen zwei Mutationen [855 G \rightarrow A (stumm); 860 A \rightarrow G (wandelt Glu-287 in Gly-287 um)].

[0211] Die Sequenzänderungen, die in pET-12a-PAP-E287G, 7/16/93, Klon 1 vorhanden waren, wurden in der folgenden Weise korrigiert: Das Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen SfuI und BamHI verdaut, die ein Fragment von etwa 240 Basenpaaren, das beide Mutationen enthielt, herausschnitten. Das Fragment wurde ersetzt durch ein 240 Basenpaar-Fragment von einem unabhängigen Klon, von dem bekannt war, dass er die Wild-Typ-Sequenz enthielt. Die DNSs wurden gebunden und in einen *E. coli*-Wirt transformiert. Die *E. coli*-Kolonien, die das DNS-Plasmid enthielten, wurden auf Ampicillin enthaltenden Agar-Nährplatten selektiert. Der resultierende Klon beherbergte das Plasmid pET-12a-PAP1, 3/7/94, Klon 1 (**Fig. 3**). Die DNS-Sequenz bestätigte, dass die Annexin-kodierende Sequenzierung auf dem Plasmid exakt mit der Wild-Typ-Sequenz übereinstimmte.

[0212] Der Wirts-Stamm BL21 (DE3), der von der Firma Novagen erhalten wurde, wurde mit dem Plasmid pET-12a-PAP1, 3/7/94, Klon 1 transformiert. Ein Glycerin-Vorrat wurde hergestellt aus dem resultierenden Transformanten BL21 (DE3)(pET-12A-PAP1, 3/7/94, Klon 1) und bei ≤ -65 °C gelagert.

[0213] Das Wachstum von *E. coli*-BL21 (DE3) (pET-12A-PAP1, 3/7/94, Klon 1) in einer flüssigen Kultur bei 37°C führte zu einer Anreicherung des Annexin V-Proteins in dem *E. coli*-Cytoplasma-Raum.

BEISPIEL IX

Verfahren zur Modifizierung (Ersetzen einer Aminosäure) von Annexin V

[0214] Das Plasmid pET-12a ist oben in Beispiel VIII beschrieben Annexin-Aminosäure-Varianten-Gene wurden zwischen den NdeI- und BamHI-Restriktionsstellen auf dem pET-12a-Plasmid angeordnet.

[0215] Eine unabhängige Modifikation von Annexin V wurde durch zielgerichtete Aminosäure-Änderung durchgeführt, unter Verwendung der PCR-Amplifikation. Um diese Änderung zu erreichen, wurden Oligonucleotide erzeugt, welche in der Antisense-Richtung des 3'-Endes des Annexins eingebaut waren. Die besondere Änderung von Annexin V, die in der vorliegenden Erfindung beschrieben wird, ist ein Ersatz eines Cystein-Restes (Position 316) durch Alanin oder durch eine andere Nicht-Schwefel enthaltende Aminosäure, wie beispielsweise Serin. Um diese Änderung zu erreichen, wurde die Nucleotid-Sequenz geändert von TGT in GCA. Das Oligonucleotid schließt eine BamHI-Enzym-Restriktionsstelle und ein Stop-Codon ein.

[0216] Das Sense-Oligonucleotid ist eingebunden in die T7-Promoter-Region des pET-12a, genau stromaufwärts von der NdeI-Restriktionsstelle oder des 5'-Endes von Annexin V. Die nachfolgend angegebenen Sequenzen sind die Antisense- bzw. Sense-Oligonucleotid-Sequenz:

(N_x168 Cys TO Ala-Antisense)

5' GTACCTGGATCCTTAGTCATCTTCTCCGCGAGCAGCAGAAGAGCTTTCTT

3';

und

(T7 -Sense):

5' CGAAATTAATACGACTCACTATAGGG 3'.

[0217] Die Oligonucleotide N_x168 und T7 wurden synthetisiert unter Verwendung eines DNS-Synthesizers, Modell 381A (Applied Biosystem Inc., Modell 381 A, Foster City, CA). Nachdem die Synthese abgeschlossen war, wurde bei beiden Oligonucleotiden die Schutzgruppe entfernt gemäß Anhang 5 des Protokolls des oben genannten Herstellers. Die Reinigung wurde durchgeführt unter Verwendung einer SephadexTM-G-25-Säule (Firma Pharmacia, Uppsala, Schweden).

[0218] Die PCR-Reaktionen wurden durchgeführt unter Verwendung der UITmaTM-Polymerase (Firma Perkin Elmer, Norwalk, CT). Die Reaktionen wurden durchgeführt unter Verwendung eines etwa gleich langen pET-12a-Annexin V-Templates, 30 p Mol der Oligonucleotide T7 und N_x168-Oligonucleotide und 0,4 mM jedes Nucleotids. Eine Übersichtung mit Mineralöl war eingeschlossen. Die Reaktionsansätze wurden in einem Coy-Temperaturwechsler, Modell 110 P angeordnet und 5 Minuten lang bei 94 °C inkubiert. Etwa 2 Minuten nach Beginn der Inkubation wurden 0,5 Einheiten Polymerase zugesetzt. Die Reaktionen wurden anschließend 30 Mal einem Zyklus bei 94 °C 30 Sekunden lang, bei 55 °C 1 Minute lang und bei 74 °C 1 Minute lang unterworfen. Die Reaktionen wurden danach 5 Minuten lang bei 74 °C inkubiert und danach bei 15 °C aufgesaugt.

[0219] Das resultierende Ala-substituierte Annexin-Gen wurde danach gereinigt unter Verwendung eines DNS-Reinigungs-Kits (promega MagicTM, PCR Preps-DNS-Purification System, Madison, WI) gemäß dem Protokoll des Herstellers.

[0220] Annexin-A11a- und pET-12a wurden danach mit NdeI- und BamHI-(Gibco/BRL, Gaithersburg, MD) Restriktionsenzymen verdaut. Die Abbauprodukte wurden danach mittels Agarose-Gel-Elektrophorese gereinigt. Geeignete Banden wurden herausgeschnitten und unter Verwendung eines GeneClean II[®]-Kits (Bio 101, Inc., La Jolla, CA) gemäß dem Protokoll des Herstellers gereinigt. Annexin-Ala und pET-12a wurden danach durch T4-DNS-Ligase (Promega) 12 bis 18 Stunden lang bei 4 °C miteinander verbunden.

[0221] Annexin-Ala-pET-12a wurden in einen E. coli-Stamm, DH5[∞] maximal wirksame kompetente Zellen (Gibco/BRL), transformiert. Jeder andere geeignete Wirts-Stamm für das pET-12a-Plasmid kann ebenso verwendet werden. Die transformierten E. coli-Zellen wurden auf einem LB-Agar (GibcoBRL) angeordnet, der mit 100 µg/ml Ampicillin (Firma International Biotechnologies Inc., New Haven, CT) angereichert war, und 12 bis 18 Stunden bei 37 °C inkubiert. Eine geeignete Kolonie wurde danach selektiert und in eine Terrific Broth (GibcoBRL) eingebracht, die mit 100 µg/ml Ampicillin (International Biotechnologies Inc.) angereichert worden war.

[0222] Mehrere Kolonien von den LB-Agarplatten wurden selektiert und expandiert. Das DNS-Plasmid wurde gereinigt unter Verwendung des Promega-Wizard-Miniprep-Reinigungs-Kits. Sobald das DNS-Plasmid gereinigt war, wurden die Kolonien mittels Sequenz-Analyse gescreent, um zu bestätigen, dass ein besonderer selektierter K1on die Aminosäure-Modifikation oder -Änderung enthielt.

BEISPIEL X

Herstellung und Radiomarkierung eines modifizierten Annexins

[0223] Das modifizierte Annexin, bei dem die zugänglichen Sulfhydryl-Gruppen an dem N-Ende des Annexin-Moleküls angehängt sind, können hergestellt werden in Übereinstimmung mit den Verfahren, die dargelegt sind in „Tanaka et al., Biochem., 35, 922 – 929 (1996)“, und zwar wie folgt:

[0224] Herstellung-eines N-terminal verlängerten Annexins V (Annexin V-N-6; auch als modifiziertes Annexin bezeichnet): Zuerst wurde eine mutanten-Annexin V-cDNS (pANXVC-S) konstruiert, bei dem das Cys₃₁₆-Codon ersetzt wurde durch ein Ser-Codon, eine NdeI-Stelle vor dem Initiator Met-Codon eingeführt war, und eine BamHI-Stelle nach dem Stop-Codon eingeführt war. Diese wurde konstruiert durch PCR unter Verwendung einer Annexin V-cDNS (pPAP-I-1.6; Funakoshi et al., *Biochemistry*, 26, 5572 – 5578 (1987); Cookson et al., *Genomics*, 20, 463 – 467 (1994)) als Template und zweier Oligonucleotide, nämlich 5'-g-gaa-ttc-cat-atg-gca-cag-gtt-ctc-aga-ggc-act-gtg-3' und 5'-cgc-gga-tcc-tta-gtc-atc-ttc-tcc-gga-gag-cag-3'. Diese DNS wurde in die NdeI- und BamHI-Klonierungs-Stellen in dem pET-12a-Plasmid (Novagen, Madison, WI) gebunden. Ein Oligonucleotid (5'-t-atg-gca-tgt-gac-cat-tc-3') und sein inverses Komplement (5'-t-aga-atg-gtc-aca-tgc-ca-3') wurden hergestellt, um sechs Aminosäure-Reste (Met-Ala-Cys-Asp-His-Ser) zu kodieren, mit NdeI-kompatiblen Überhängen an beiden Enden. Die zwei komplementären Oligonucleotide wurden eingebunden und das Produkt wurde in pANXVC-S gebunden, welches mit NdeI verdaut worden war, um das pANXVC-S-N6-Plasmid herzustellen. Die DNS-Sequenzierung dieser Plasmids bestätigte, dass die beabsichtigten Mutationen richtig eingeführt waren.

[0225] Dieses Plasmid (pANXVC-S-N6) wurde danach in einen *Escherichia coli*-Stamm K-38 transformiert, der das pGP-1-Plasmid enthielt, und zwar zur Produktion von rekombinantem Protein durch Expression von dem T7-Promotor des Vectors. Die Zellen wurden gezüchtet bei 30 °C in 3 l einer 2 %igen L-Brühe in 50 mM Kaliumphosphat, pH 7,4, 35 µM Kanamycin. Nach 4 h ($OD_{600} = 0,4$) wurden die Zellen einem Hitzeschock ausgesetzt, indem man die Kultur-Glaskolben 20 Minuten lang in ein 42 °C warmes Wasserbad stellte und die Kultivierung wurde 2 h lang bei 37 °C fortgesetzt. Die Zellen wurden danach geerntet und über Nacht bei -20 °C gefroren gelagert.

[0226] Die aufgetauten Zellen wurden in 100 ml einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 10 mM CaCl₂, 0,1 mM DFP, das 1 mg Leupeptin und 1 mg Pepstatin enthielt, suspendiert und 5 Minuten lang mit Ultraschall behandelt. Das Zell-Lysat wurde mit 5 µl DNase (10 Einheiten/ml) für 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Danach wurden Pellets durch Zentrifugieren gesammelt, und Annexin V-N6 wurde aus den Pellets unter Rühren für 1 h bei 4 °C in 70 ml einer Lösung aus 50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 8 M Harnstoff, 0,1 M NH₄Cl, 10 mM EDTA, 0,1 mM DFP, das 1 mg Leupeptin und 1 mg Pepstatin enthielt, extrahiert. Der durch Zentrifugieren erhaltene Überstand wurde zweifach mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,0 und 0,1 mM DTT verdünnt und 48 h lang bei 4 °C stehengelassen. Die Probe wurde danach nacheinander gegen 150 ml, 500 ml und 210,1 M Natriumphosphat, pH 6,0, dialysiert. Die dialysierte Probe wurde auf eine DEAE-Sepharose-Säule (1,4 × 18 cm) aufgebracht, die mit 0,1 M Phosphat, pH 6,0, equilibriert war. Nachdem die Säule gewaschen worden war, wurden die Proteine eluiert mittels eines linearen Gradienten, der gebildet wurde durch jeweils 100 ml 0 M und 0,5 M NaCl in Phosphat-Puffer. Der Haupt-Protein-Peak, der eine antikoagulierende Aktivität enthielt, wurde gepoolt, und Ammoniumsulfat wurde bis zu einer 80 %igen Sättigung zugesetzt. Die Niederschläge, die durch Zentrifugieren gesammelt wurden, wurden in 5 ml 50 mM Natriumacetat, pH 5,6, 150 mM NaCl und 10 mM DTT gelöst und auf eine Sephadex G-75-Säule (2,5 × 90 cm) aufgebracht, die mit demselben Puffer mit Ausnahme von DTT equilibriert war. Das Annexin V-N6 eluierte als einzelner Peak und es war homogen an SDS-PAGE mit einer Molekularmasse von 36 kDa. Die Ausbeute betrug 35 mg Protein aus 3 l Kulturmedium. Das modifizierte Annexin, das wie oben beschrieben hergestellt worden war, wurde danach in Übereinstimmung mit der Erfindung verwendet.

BEISPIEL XI

Herstellung eines modifizierten Annexins V und seines Dimers

[0227] Durch Zusatz zugänglicher Sulfhydrylgruppen modifiziertes Annexin V und sein Dimer wurden wie folgt hergestellt: Das existierende Plasmid pJ110 (auch bekannt als pANXVC-S-N6) wurde in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3) transfektiert. Eine cytoplasmatische Expression erfolgte durch Wachstum über Nacht bis zur Sättigung in 4 × 1 l einer T-Brühe. Die Zellen wurden durch Zentrifugieren gewonnen. Eine Ultraschall-Behandlung in einem Puffer wurde durchgeführt, der aus 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 10 mM CaCl₂ bestand. Es wurde 20 Minuten lang bei 23.000 × g zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Modifiziertes Annexin wurde aus dem Pellet freigesetzt durch Suspendieren in 50 mM Tris-HCl, pH 7,2, 20 mM EDTA. Es wurde bei 23.000 × g 20 Minuten lang zentrifugiert, und das Pellet wurde verworfen. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit RNase A (3 µg/ml) für 2 h bei Raumtemperatur behandelt. Es erfolgte eine Dialyse in Schläuchen mit einem Molekulargewicht-Cutoff von 25.000 gegen 3 × 2120mM Tris-HCl, pH 8,0 (gut durchlüftet). Eine Teilmenge des vorhandenen modifizierten Annexins wurde in das A5-Dimer durch spontane Disulfid-Bindungs-Bildung aufgrund der Luftoxidation umgewandelt. Eine Reinigung erfolgte durch Ionenaustausch-FPLC auf einer MonoQ HR10/10-Säule (Firma Pharmacia) mit einem linearen Gradienten von 0 bis 0,5 M NaCl in 20

mM Tris-HCl (pH 8,0). Es wurde 1/30 Volumenteil 1 M 2-[N-Morpholino-]ethansulfonsäure (Firma Sigma Chemical) zu den Fraktionen zugesetzt, um den pH-Wert bei 5,8 zu halten und eine spontane Disulfid-Bindungs-Bildung zu inhibieren. Das Monomer wurde bei 0,22 M NaCl eluiert und das Dimer wurde bei 0,28 M NaCl eluiert. Diese Verfahrensweise ergibt etwa 5 mg sowohl des reinen Monomers als auch des reinen Dimers pro Liter an Ausgangs-Kulturmaterial.

[0228] Sobald das über Disulfid-Bindungen gebundene Dimer von modifiziertem Annexin V produziert ist, kann es im Hinblick auf seine Membran- und Thrombus-Bindungs-Aktivität sowie im Hinblick auf pharmakokinetische Daten und Organaufnahme in Mäusen bewertet werden. Seine Affinität für Zellmembranen wurde bestimmt durch direkte Titration (siehe nachfolgend (1)), seine Kurve des Verschwindens aus dem Blut und seine Bioverteilung wurde in Mäusen bestimmt (siehe nachfolgend (2)), und das in vivo bestimmte Verhältnis der Präsenz in Thrombus : in Blut im Schweizeherz-Vorhof-Thrombus-Modell 30 Minuten und 120 Minuten nach der Injektion und im Vergleich mit dem entsprechenden Verhältnis für monomeres Annexin V wurde bestimmt (siehe nachfolgend (3)).

1. Binden von modifiziertem Annexin V und Annexin V-Dimer an Phosphatidylserin enthaltende Membranen: Sofern Derivate mit bereits Tc-99m markiert waren, wurde jedes Derivat nicht mit I-125 durch das Iodo-Gen-Verfahren markiert und durch Gelfiltration gereinigt, wie dies früher für Annexin V beschrieben wurde (siehe Tait et al., J. Lab. Clin. Med., 123, 741 – 748 (1994)). Die Affinität jedes Derivats gegenüber Zellmembranen wurde gemessen durch direkte Titration von aufbewahrten Erythrocyten mit freigesetztem Phosphatidylserin, wie dies früher beschrieben wurde in „Taft et al., J. Lab. Clin. Med., 123, 741 – 748 (1994)“. Gebundener und freier Ligand wurden durch Zentrifugation von Zellen durch eine Siliconöl-Barriere getrennt. Die Dissoziationskonstante wurde bestimmt durch Einpassen der Daten in ein einfaches Modell des Bindens an homogene Stellen, wie dies von Tait beschrieben wurde. Die Verwendung von künstlich behandelten Erythrocyten mit hohen Konzentrationen an freigesetztem PS ist eine experimentelle Erleichterung, die Ergebnisse liefert, die equivalent denjenigen sind, die erhalten wurden mit aktivierten Blutplättchen mit freigesetztem PS. Normale Erythrocyten haben in vivo kein extracellulär freigesetztes PS (Taft et al., J. Lab. Clin. Med., 123, 741 – 748 (1994)).

2. Freisetzung aus dem Blut, Bioverteilung und Exkretion in Mäusen: Ein intravenöser Bolus von 10 µg/kg (0,3 µg pro 30 Gramm Maus) an jeweils mit I-125 markiertem oder mit Tc-99m-markiertem Derivat (Dimer; Galactose-modifiziertes Annexin; Tc-99m-modifiziertes Annexin; Tc-99m-Serylsuccinat-markiertes Annexin V) wurde injiziert. Blutproben wurden zum Zeitpunkt von 1, 2, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 45, 60, 90 und 120 Minuten hergestellt. Die folgenden Organe wurden von den Mäusen jeweils zum Zeitpunkt von 30, 60 und 120 Minuten nach der Injektion gewonnen: Gehirn, Herz, Aorta, Vena cava, Lunge, Milz, Leber, Magen, Gedärme, Niere, Blase, Skelettmuskel, Knochen und Blut. Die Ergebnisse sind ausgedrückt als % ID/g Gewebe und % ID/Organ.

3. Verhältnis Thrombus/Blut in vivo in Schweinen: Es wurden etablierte Verfahrensweisen angewendet, wie sie für akute Vorhof-Thromben beschrieben sind (Stratton et al., Circulation, 92, 3113 – 3121 (1995)), und zwar für das I-125 markierte Dimer, für Galactose-modifiziertes Annexin und für Annexin V als Kontrollprobe. Auf der Basis früherer Erfahrungen mit nativem Annexin V in diesem Modell kann ein zweifacher Unterschied in den Thrombus/Blut-Verhältnissen zwischen modifiziertem und nativem Annexin V bei einem P-Wert von $\leq 0,05$ im zweigängigen t-Test mit einem Wert n von 5 Tieren dargelegt werden.

[0229] Sobald ein Molekül mit wünschenswerten Eigenschaften identifiziert wurde, kann das Annexin V-Dimer direkt als Fusionsprotein unter Verwendung eines existierenden Expressions-Systems produziert werden, wie dies beschrieben wurde in Tait et al., J. Biol. Chem., 270, 21594 – 21599, wobei die beiden Annexin V-Einheiten über einen Peptid-Linker verbunden sind. Dieses dimere Molekül kann auch zusätzliche funktionelle Stellen enthalten, wie beispielsweise eine endogene Tc-99m-Chelatisierungsstelle oder eine freie Sulfhydrylgruppe, an der die Bindung von Galactose möglich werden kann.

BEISPIEL XII

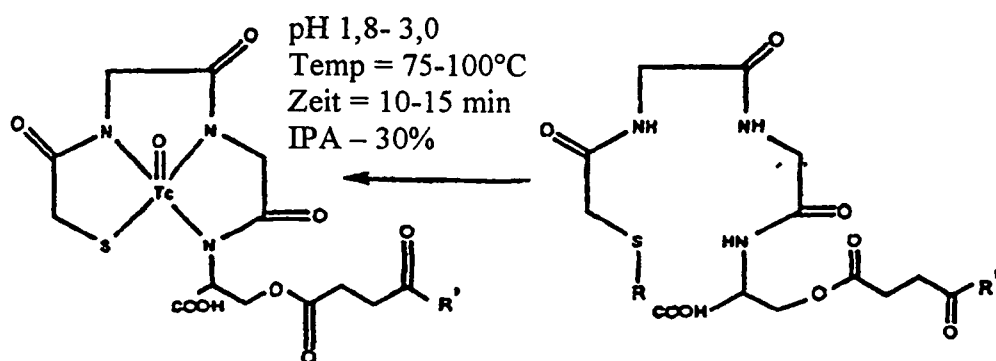
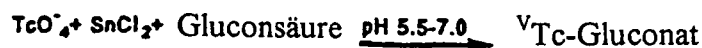
Endogene Radiomarkierung von modifiziertem Annexin

[0230] Es wurde eine Untersuchung des Radiomarkierens von modifiziertem Annexin (Annexin V-N-6 von Beispiel X) mit Tc-99m durchgeführt, wobei man der Verfahrensweise von George et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 8358 – 8362 (1995) folgte. Das modifizierte Annexin (160 µg) wurde mit 2,5 mCi Tc-99m-Pertechnetat zusammengegeben, und zwar zusammen mit Methylendiphosphonat als Austausch-Ligand und Zinnionen als Reduktionsmittel. Die Endkonzentration des Proteins, wie sie verfügbar war, betrug 200 µg/ml. Jedoch führte eine Inkubation bei einem pH-Wert von 10 für 30 Minuten bei 37 °C zu einer Radiochemie-Ausbeute von 52

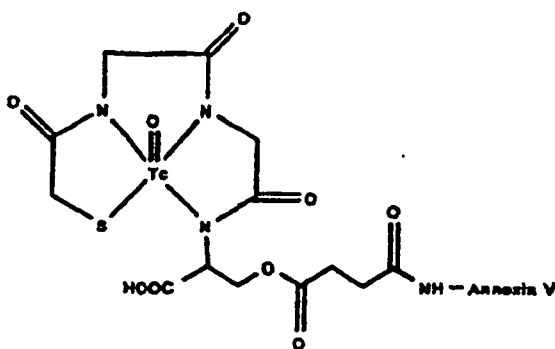
%. Diese offensichtliche Ausbeute war konsistent mit den Ergebnissen, die nach Reinigung durch Gelfiltration erhalten wurden, die eine Ausbeute von 56 % der eingesetzten Radioaktivität in 89 %iger radiochemischer Reinheit zeigten. Die Lagerung des gereinigten Materials zeigte keine Änderung der radiochemischen Reinheit bei Messung mittels TLC- und Zorbax-HPLC-Chromatographie nach 18 h in PBS bei Raumtemperatur. Im Gegensatz dazu zeigte natives Annexin V nur eine Markierung von 2 % unter denselben Bedingungen. So zeigten die Ergebnisse, daß das modifizierte Annexin V-Molekül direkt mit Tc-99m markiert werden kann. Ein Fachmann mit üblichem Sachverstand in diesem technischen Bereich kann das modifizierte Annexin V-Molekül für eine Optimierung der Tc-99m-Radiomarkierungs-Ausbeute (Proteinkonzentration, Austausch-Chelate, pH-Wert-Abhängigkeit, Temperatur und Zeit) bewerten. Die Radiomarkierungs-Stabilität (Behandlung mit Serum und unterschiedlichen Konzentrationen Cystein), die Zell- und Thrombus-Bindung, die Freisetzung aus dem Blut und die Bioverteilungs-Eigenschaften, sowie Katabolit-Formen von ausgeschiedener Radioaktivität (HPLC von biologischen Proben und Vergleich mit synthetischen Peptid-Tc-99m-Chelat-Standards zur Identifizierung). Geeignete Methoden schließen diejenigen ein, die zur Charakterisierung verschiedener N,S-Amid-Thiolat-Chelatisierungsmittel für Tc-99m-bifunktionelle Protein-Radiomarkierungs-Mittel verwendet wurden (Kasina et al., J. Nucl. Med., 32, 1445 – 1451 (1991); Fritzberg et al., Proc. Natl. Acad. Sic. USA, 95, 4025 – 4029 (1988)).

BEISPIEL XIII

[0231] Herstellung eines radiomarkierten Anneacin-Konjugats mit einem Esteraseempfindlichen Chelat



Annexin V
pH = 9-10
Zeit = 15-30 min
25°C-37°C



[0232] Experimentelle Vorgehensweise: Annexin V wurde mit Tc-99m-N₃S-Serylsuccinat über den Weg mit vorgeformtem Chelat radiomarkiert, wie dies für Antikörper Fab-Fragmente beschrieben ist (Srinivasan et al., J. Nucl. Med., 32, 1017 (Zusammenfassung) (1991)). Die Anwendung dieses Ansatzes auf dem C₅N₂S₂-Aktivester war ähnlich für beide Antikörper-Proteine (Kasina et al., J. Nucl. Med., 32, 1445 – 1441 (1991)) und Annexin V (Stratton et al., Circulation, 92, 3113 – 3121 (1995)). In der vorliegenden Verfahrensweise wurde der Serylsuccinat-Ester in dem Radiomarkierungs-Verfahren ersetzt. Dieses Derivat wurde in vitro im Hinblick auf Markierungsstabilität, Membranbindung und Gerinselbindung bewertet. Es kann in Mäuse injiziert werden, und seine Aufnahme in Organen, einschließlich Leber und Niere über den Zeitraum von 10 Minuten bis 2 Stunden kann gemessen werden. Dies zeigt die Geschwindigkeit der Organ-Aufnahme sowie die Rückhaltung an, und ermöglicht einen Vergleich des Zeitablaufs mit früheren Daten für das Amid-verknüpfte Tc-99m-Chelat.

[0233] Ein Erfolg wird angezeigt durch eine signifikante Reduktion der Rückhaltung von Radioaktivität in der Leber. Eine erhöhte Rate des Verschwindens aus den Organen im Anschluß an das Aufnehmen von Tc-99m-Annexin V zeigt das Potential von verbesserten Thrombus : Organ-Verhältnissen innerhalb der Zeit im Anschluß an die Bildgebung auf. Bildgebungs-Experimente können mit dem Schweine-Modell durchgeführt werden, um vergleichbare Verbesserungen unter klinischen Bedingungen vorherzusagen.

[0234] Markieren von Annexin V mit Tc-99m-Serylsuccinat-Ester: Annexin V, das mit dem Serylsuccinat-Ester konjugiert war, wurde mit Tc-99m nach der Onco Trac-Kit-Verfahrensweise markiert (Kasina et al., J. Nucl. Med., 32, 1445 – 1451 (1991)) und wurde dann an Annexin V unter Verwendung des vorher beschriebenen Verfahrens zur Konjugation Tc-99m-N₂S₂-TFP an Annexin V konjugiert (Stratton et al., Circulation, 92, 3113 – 3121 (1995)).

BEISPIEL XIV

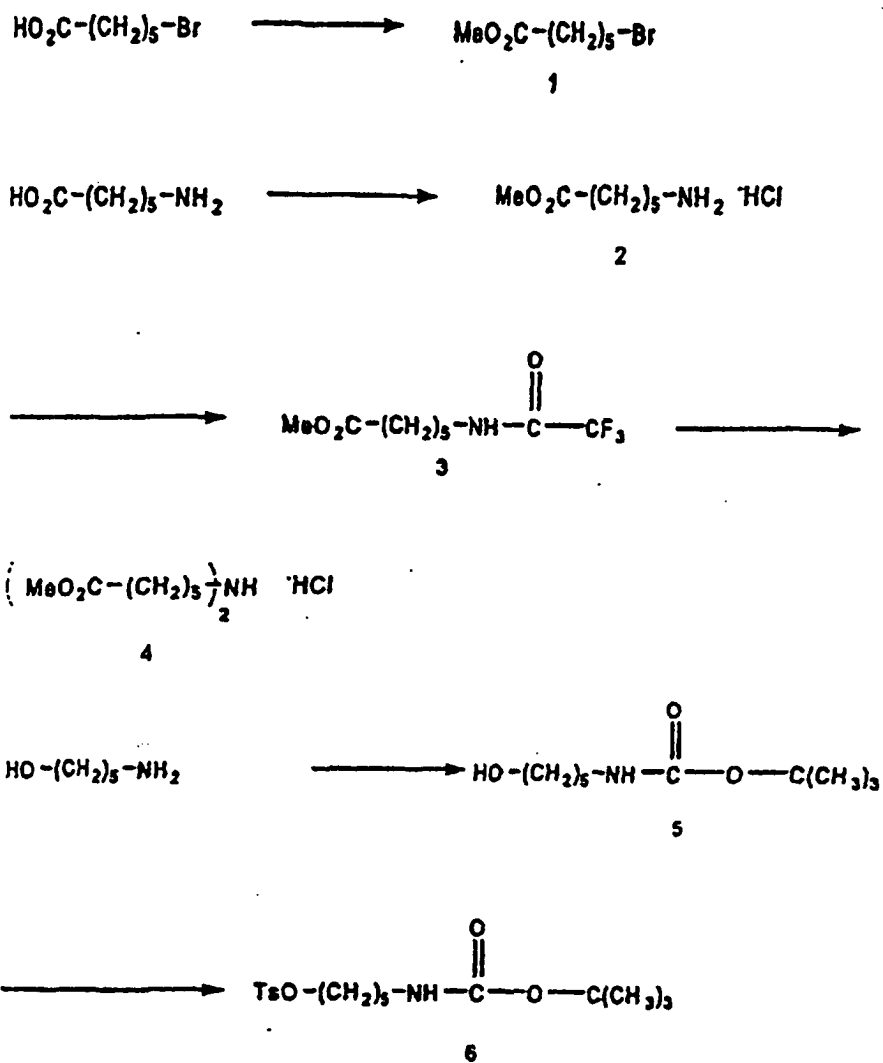
Herstellung eines radiomarkierten modifizierten Annexin V-Galactose-Cluster-Chelat-Konjugats

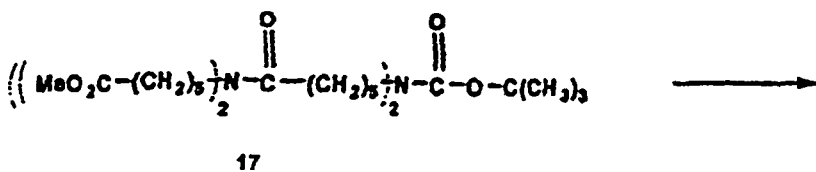
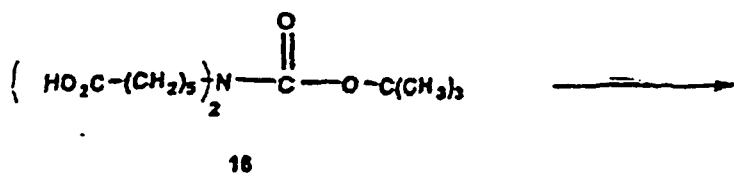
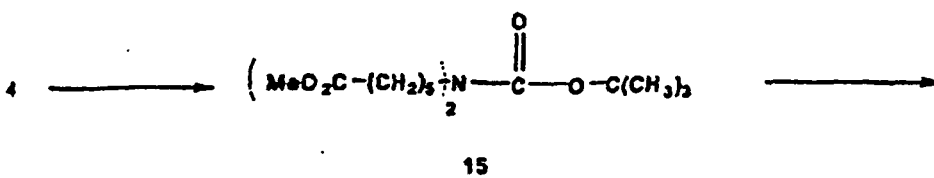
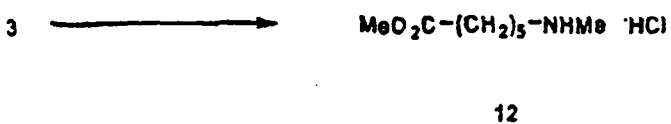
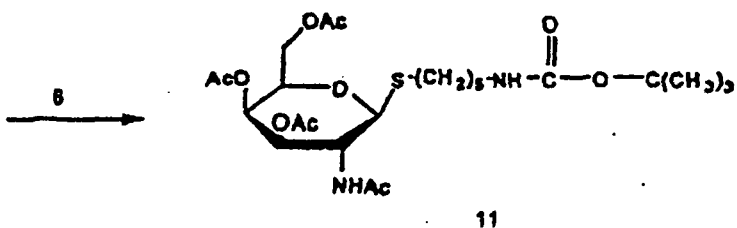
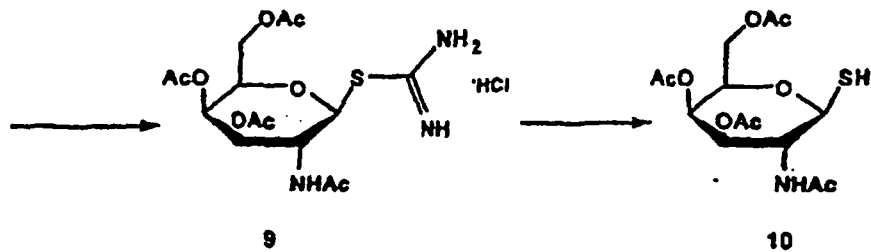
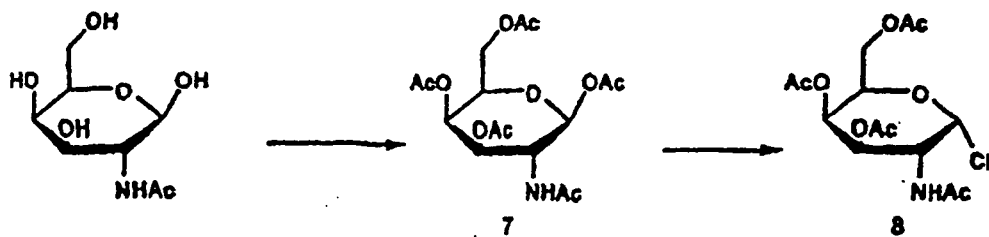
[0235] Ein Maleimid-verknüpfter Galactose-Cluster gemäß der vorliegenden Erfindung kann spezifisch an die Sulfhydrylgruppe des modifizierten Annexins V konjugiert werden. Nach Verifizierung der Stöchiometrie der Galactose-Markierung wurde das Galactose-modifizierte Annexin radioiodiert, und das Produkt wurde hinsichtlich seiner Bindung in vitro an die Membran und einen Thrombus bewertet, und es wurden pharmako-kinetische Daten und Organ-Aufnahme-Daten in Mäusen ermittelt. Einer Aufrechterhaltung der Bindung und einem schnelleren Verschwinden aus dem Blut folgte die in vivo-Bestimmung des Thrombus : Blut-Verhältnisses im Schweine-Modell zum Zeitpunkt von 30 und 120 Minuten nach der Injektion und im Vergleich zu entsprechenden Verhältnissen für nicht-modifiziertes Annexin V.

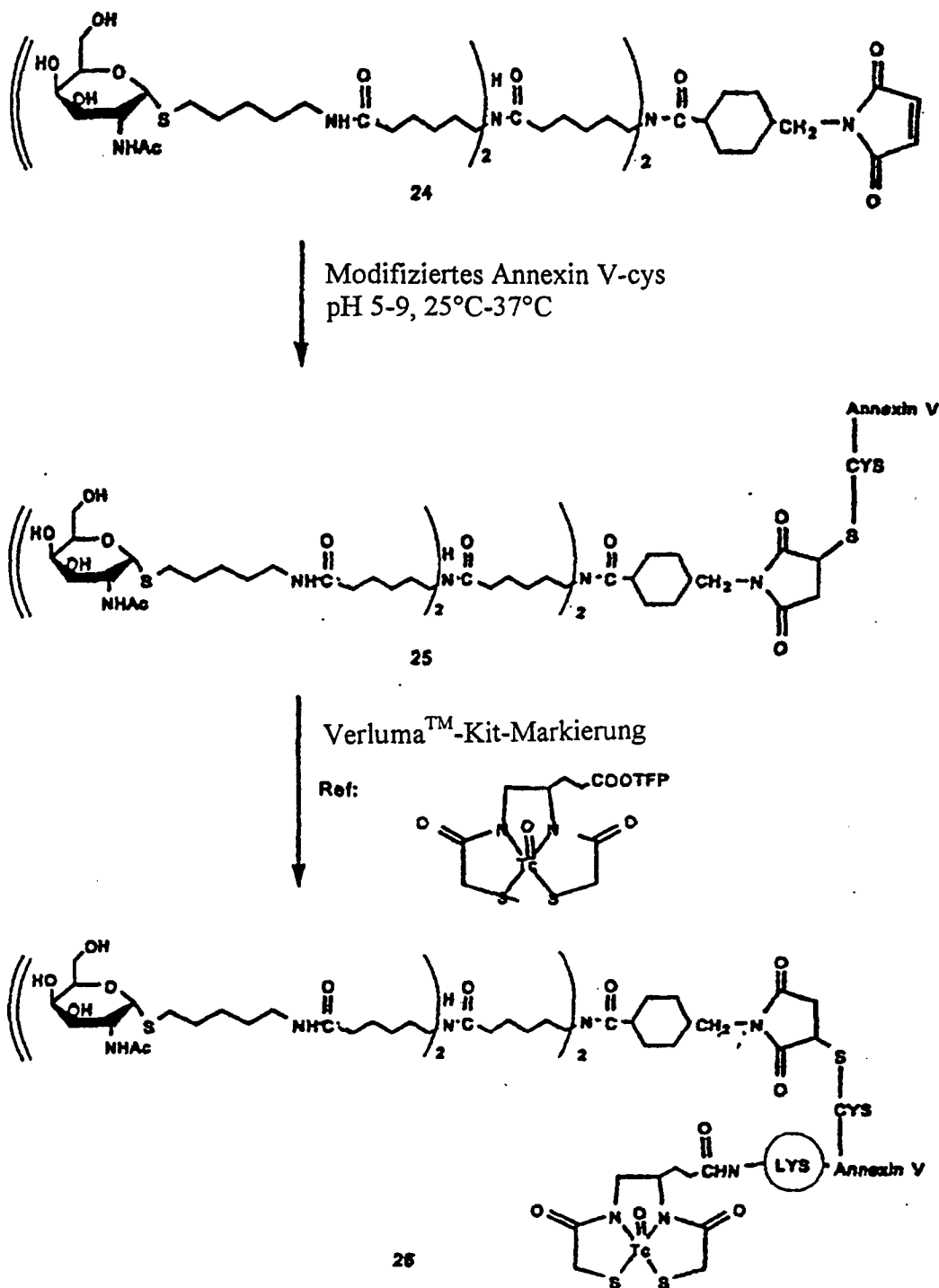
[0236] Die Geschwindigkeit des Verschwindens des modifizierten Annexins V aus dem Blut ohne Kompromisse beim Vermögen des modifizierten Annexins V, sich an Zellmembranen oder Thromben in vitro zu binden, wird verglichen mit den Werten von unmodifiziertem Annexin V. Das in vivo-Verhältnis Thrombus : Blut zum Zeitpunkt von 30 Minuten nach der Injektion sollte höher sein verglichen mit nativem Annexin V, und sollte genauso hoch oder höher sein zum Zeitpunkt von 120 Minuten nach der Injektion. Wenn jedoch die Anwendung dieses Mechanismus auch das Hintergrundsignal von der Leber zu speziellen Zeiten erhöht, die für eine Bildgebung ausgewählt werden, kann der Einsatz des Mechanismus über einen Esteraseempfindlichen Linker zur Beschleunigung der Ausscheidung von Radiomarkierung aus der Leber verwendet werden, um das Hintergrundsignal zu senken. Die weiteren Beispiele beziehen sich auf weitere Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

BEISPIEL XV

Verfahren zur Herstellung von N-Acetylgalactosamin-S-Annexin-N-Chelat-Verbindung







Herstellung von Methyl-6-bromhexanoat (1)

[0237] In einen 2 Liter-Rundkolben, der mit 99,7 g (0,511 Mol) 6-Bromhexanoat (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) und 1 Liter Methanol befüllt war, wurde 1 bis 2 Minuten lang Chlorwasserstoffgas eingeblasen. Die Mischung wurde 18 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und mit 150 ml entionisiertem Wasser, 200 ml gesättigtem Natriumbicarbonat und danach nochmals mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde unter Vakuum verdampft und dies ergab 99,6 g des Produktes (1) in Form eines farblosen Öls (93 %): Siedepunkt = 93 bis 96 °C bei 3 mm Hg: $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 3,57 (3H, s), 3,51 (2H, t), 2,30 (2H, t), 1,78 (2H, t), 1,62 bis 1,28 (4H, m) ppm.

Herstellung von Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (2)

[0238] In einen 2 Liter-Rundkolben, der mit 101,3 g (0,722 Mol) 6-Aminohexanoat (Aldrich Chemical Co.) in

1 Liter Methanol befüllt war, wurde 3 bis 4 Minuten lang Chlorwasserstoffgas eingeblasen. Die Mischung wurde 16 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde zweimal mit 500 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert (< 0,5 mm Hg). Dies ergab 140,1 g des Produktes (2) in Form eines weißen Feststoffes (100 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 9,40 (1H, breites Triplett), 3,57 (3H, s), 3,15 (2H, Quartett), 2,29 (2H, t), 1,60 bis 1,38 (4H, m) und 1,32 bis 1,19 (2H, m) ppm.

Herstellung von Methyl-6-(trifluoracetamido-)hexanoat (3)

[0239] Einem 2 Liter-Rundkolben, der mit 100,2 g (0,552 Mol) Aminhydrochlorid (2) und 1 Liter Methanol befüllt war, wurden 100 g (0,703 Mol) Ethyltrifluoracetat und anschließend 120 ml (0,861 Mol) Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 19 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und danach filtriert. Das Filtrat wurde mit 3 × 300 ml Aliquota 1 N wässriger HCl, 200 ml entionisiertem Wasser, 2 × 200 ml Aliquot gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung und letztendlich mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde unter Vakuum destilliert und ergab 115,8 g des Produktes (3) in Form eines farblosen Öls: Siedepunkt = 113 bis 116 °C bei 120 mm Hg; ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,57 (3H, s), 2,75 (2H, m), 2,29 (2H, t), 1,60 bis 1,40 (4H, m) und 1,37 bis 1,19 (2H, m) ppm.

Herstellung von N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)amin-hydrochlorid (4)

[0240] Einem 5 Liter-Dreihalskolben, der mit einem Rückflußkühler ausgestattet war, der mit einem Gasblsenzähler verbunden war, und der mit 20,9 g 60 % Natriumhydroxid (0,523 Mol) in 1 Liter wasserfreiem Dioxan befüllt war, wurden 100 g (0,416 Mol) sekundäres Amid 3 in 200 ml trockenem Dioxan über eine Zeitdauer von 20 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde 1 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt, und danach wurden 130 g (0,622 Mol) Bromid 1 in 100 ml Dioxan zugesetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluß erhitzt und 7 h lang gerührt. Zusätzlich wurden 10 g der Verbindung 1 zugesetzt, und die resultierende Mischung wurde für weitere 15 h gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 600 ml 1 N wässriger HCl verdünnt und mit 1 Liter Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde danach mit 250 ml entionisiertem Wasser, 250 ml 5 %iger wässriger Natriumbisulfit-Lösung und letztendlich mit 250 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert.

[0241] Der Rückstand wurde mit 300 ml entionisiertem Wasser und 500 ml Methanol verdünnt und mit 200 ml 10 N wässrigem Natriumhydroxid behandelt. Die Mischung wurde 16 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Syrup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 800 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 200 ml konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 1 bis 2 angesäuert. Die Mischung wurde danach mit 3 × 300 ml Aliquots Diethylether gewaschen und die wässrige Phase wurde danach mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Sirup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter trockenem Methanol verdünnt und mittels Rotationsverdampfung erneut konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter trockenem Methanol verdünnt und danach wurde Chlorwasserstoffgas 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen. Die Mischung wurde 18 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt, und danach durch ein Celite-Filter (hergestellt durch die Firma J.T. Baker) vakuumfiltriert. Die Feststoffe wurden mit 200 ml Methanol gespült. Die vereinigten Filtrate wurden konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter Methanol verdünnt und Chlorwasserstoffgas wurde erneut 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen. Die Mischung wurde 3 h lang gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter Methanol verdünnt und 10 g Aktivkohle wurden zugesetzt. Die Mischung wurde 30 Minuten lang gerührt und danach durch ein Celite-Filter vakuumfiltriert. Die Feststoffe wurden mit 100 ml Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate wurden konzentriert. Der Rückstand wurde in heißem 2-Propanol gelöst und man ließ ihn danach erneut, zuerst bei Raumtemperatur und dann mittels Verwendung eines Eisbades, kristallisieren. Die Feststoffe wurden filtriert und mit 3 × 75 ml Aliquots kaltem 2-Propanol gespült. Die Feststoffe wurden an der Luft getrocknet und dies ergab 70,5 g des Produktes (4) in Form eines weißen Feststoffes. Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde erneut in 200 ml 2-Propanol kristallisiert und ergab zusätzlich 15,3 g des Produktes von insgesamt 85,8 g (67 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 8,69 (2H, breit), 3,57 (6H, s), 2,82 (4H, m), 2,30 (4H, t), 1,67 bis 1,43 (8H, m) und 1,28 bis 1,19 (4H, m) ppm; ¹H-NMR (CD₃OD); δ 3,66 (6H, s), 3,42 (4H, t), 2,34 (4H, t), 1,75 bis 1,55 (8H, m) und 1,45 bis 1,25 (4H, m) ppm.

Herstellung von N-BOC-S-Aminopentanol (5)

[0242] Einem 2 Liter-Dreihals-Rundkolben, der an dem mittleren Hals mit einem 500 ml Zugabe-Trichter und

an einem Seitenhals mit einem Übergangsstück zum Entlüften eines Gasblasenzählers ausgestattet war, wurden 40 g (0,388 Mol) 5-Aminopentanol in 500 ml trockenem Acetonitril zugesetzt. Danach wurden 84,5 g (0,387 Mol) Di-t-butyldicarbonat in 400 ml trockenem Acetonitril über einer Zeitdauer von 50 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde 15 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 600 ml Ethylacetat verdünnt und mit 2 x 200 ml Aliquots 0,5 N wässriger HCl und 2 x 200 ml Aliquot entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und zunächst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 74,5 g des Produktes (5) in Form eines nahezu farblosen Öls (88 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 6,72 (1H, breites Triplett), 4,31 (1H, t), 3,43 bis 3,27 (2H, m), 2,87 (2H, Quartett) und 1,45 bis 1,10 (15H, s und Multiplett) ppm; ¹H-NMR (CDCl₃); δ 4,58 (1H, breites s), 3,65 (2H, t), 3,13 (2H, Quartett) und 1,70 bis 1,30 (15H, Singlett und Multiplett) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,28 (Methylenchlorid/Methanol (95:5)).

Herstellung von N-BOC-5-Aminopentyltoluolsulfonat (6)

[0243] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 74,5 g (0,366 Mol) N-BOC-Aminopentanol (6) in 400 ml Methylenchlorid befüllt war, wurden 45 ml wasserfreies Pyridin und anschließend 74,1 g (0,389 Mol) p-Toluolsulfonylchlorid zugesetzt. Die Mischung wurde 17 h lang bei Raumtemperatur gerührt, mit 200 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 400 ml 0,5 N HCl, 2 x 200 ml Aliquots 0,5 N HCl und 2 x 100 ml Aliquots entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (11 x 23 cm) chromatographiert, zunächst mit Methylenchlorid und danach mit Ethylacetat/Methylenchlorid (3 : 97) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zunächst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 82,13 g des Produktes (6) in Form eines weißen Feststoffes: ¹H-NMR (CDCl₃); δ 7,77 (2H, d), 7,31 (2H, d), 4,45 (1H, breites s), 3,98 (2H, t), 3,03 (2H, t), 2,41 (3H, s) und 1,80 bis 1,20 (15H, Singlett und Multiplett) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,50 (Ethylacetat/Methylenchlorid (3 : 97)).

Herstellung von 1-b, 3,4,6-Tetra-O-acetyl-N-acetyl-galactosamin (7)

[0244] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 25,0 g (116 mMol) Galactosaminhydrochlorid (Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) befüllt war, wurden 180 ml wasserfreies Pyridin und anschließend 115 ml Essigsäureanhydrid (1,22 Mol) zugesetzt. Die Mischung wurde 44 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach in einen 2 Liter-Becher gegossen, der 600 g Eis und 200 ml entionisiertes Wasser enthielt. Die Mischung wurde 10 bis 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach vakuumfiltriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 4 x 100 ml Aliquots entionisiertem Wasser gewaschen, 2 h lang an der Luft getrocknet und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) 14 h lang getrocknet; dies ergab 39,8 g des Produktes in Form eines weißen Feststoffes (88 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 7,89 (1H, d), 5,63 (1H, d), 5,16 (1H, d), 5,07 (1H, dd), 4,28 bis 3,92 (4H, m), 2,11 (3H, s), 2,02 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,90 (3H, s) und 1,88 (3H, s) ppm.

Herstellung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-galactosamin-1-b-pseudothioharnstoff-hydrochlorid

[0245] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 39,8 g (102 mMol) der Verbindung 7 befüllt war, wurden 400 ml Acetylchlorid zugesetzt. Die Mischung wurde 64 h lang bei 47 bis 48 °C gerührt. Die Mischung wurde konzentriert und danach zweimal mit 200 ml Methylenchlorid verdünnt und erneut zunächst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) erneut konzentriert; dies ergab 40,2 g des Rohproduktes (8) in Form eines dunkel-bernsteinfarbenen schaumigen Feststoffes: ¹H-NMR (CDCl₃); δ 6,24 (1H, d), 5,61 (1H, d), 5,43 (1H, dd), 5,27 (1H, dd), 4,83 bis 4,71 (1H, m), 4,48 (1H, t), 4,22 bis 4,01 (2H, 2 dd), 2,15 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,00 (3H, s) und 1,98 (3H, s) ppm. Dem rohen Chlorid (8) in einem 1 Liter-Rundkolben wurden 9,3 g (122 mMol) Thioharnstoff und 150 ml Aceton zugesetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluß 40 Minuten lang gerührt und danach in einem Eisbad 30 Minuten lang abgekühlt und danach vakuumfiltriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 2 x 75 ml Aliquots Aceton gespült. Die Feststoffe wurden danach 45 Minuten lang an der Luft getrocknet und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) 2 h lang getrocknet; dies ergab 33,0 g des Produktes (9) in Form eines hellbeigen Feststoffes (74 % Gesamtausbeute aus 7): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 9,38 und 9,12 (2 breite Singletts, 3H), 8,36 (1H, d), 5,56 (1H, d), 5,34 (1H, d), 5,01 (1H, dd), 4,38 (1H, t), 4,22 bis 4,00 (3H, m), 2,11 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,92 (3H, s) und 1,81 (3H, s) PPM.

Herstellung von 1-b-Mercapto-3,4,6-tri-O-acetyl-N-acetyl-galactosamin (10)

[0246] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 30,0 g (67,9 mMol) des Pseudothioharnstoffes (9) in 175 ml Methy-

lenchlorid und 175 ml entionisiertem Wasser befüllt war, wurden 7,08 g (37,24 mMol) Natriummetabisulfit zugesetzt und anschließend vorsichtig 10,2 g (74,5 mMol) Kaliumcarbonat zugesetzt. Die Mischung wurde 40 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und die Mischung wurde danach in einen 500 ml-Scheidetrichter überführt. Die Schichten wurden getrennt und die wäßrige Phase wurde danach mit 2 × 125 ml Aliquotss Methylchlorid gewaschen. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Dies ergab 24,2 g des Produktes (10) in Form eines sehr blassgelben (cremefarbenen) Feststoffes (98 %): ¹H-NMR (CDCl₃); δ 6,24 (1H, d), 5,61 (1H, d), 5,43 (1H, dd), 5,27 (1H, dd), 4,83 bis 4,71 (1H, m), 4,48 (1H, t), 4,22 bis 4,01 (2H, 2 dd), 2,15 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,00 (3H, s) und 1,98 (3H, s) ppm.

Herstellung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-N-acetylgalactosamin-1-a-S-[5'-thiopentyl-N-BOC-amin] (11)

[0247] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 24,2 g (66,6 mMol) des Thiols (10) unter Stickstoffatmosphäre befüllt war, wurden 350 ml trockenes Acetonitril zugesetzt. Die Mischung wurde über eine Zeitdauer von 20 Minuten auf 40 bis 42 °C erhitzt, bis sich letztendlich die Feststoffe gelöst hatten. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU; im Handel erhältlich von der Firma Aldrich Chemical Company; 10,5 ml, 70,2 mMol) wurden danach zugesetzt und die Mischung wurde 20 Minuten lang gerührt. Danach wurden 24,0 g (67,1 mMol) des Tosylats 6 in 75 ml Acetonitril über eine Zeitdauer von 3 bis 4 Minuten zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde 1,5 h lang bei 40 bis 25°C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 400 ml Methylchlorid verdünnt und zuerst mit 250 ml 0,5 N wäßriger HCl und danach mit 250 ml einer 5 %igen wäßrigen Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesium getrocknet, vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (21 × 7 cm) (hergestellt von der Firma E.M. Merck) chromatographiert und mit Ethylacetat/Hexan/Ethanol (55 : 42,5 : 2,5) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt, konzentriert und erneut an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (21 × 7 cm) (hergestellt von der Firma J.T. Baker) chromatographiert und mit jeweils 500 ml Methanol/Wasser im Verhältnis 50 : 50; 55 : 45; 60 : 40; 65 : 35 und 70 : 30 und anschließend mit Methanol/Wasser (75 : 25) eluiert, bis das gesamte Produkt von der Säule eluiert war. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Methylchlorid verdünnt und mit wasserfreiem Magnesiumsulfat behandelt. Die Mischung wurde vakuumfiltriert und das Filtrat wurde zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 17,9 g des Produktes (11) in Form eines schaumigen weißen Feststoffes: ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 9,38 und 9,12 (2 breite Singletts, 3H), 8,36 (1H, d), 5,56 (1H, d), 5,34 (1H, d), 5,01 (1H, dd), 4,38 (1H, t), 4,22 bis 4,00 (3H, m), 2,11 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,92 (3H, s) und 1,81 (3H, s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit p-Anisaldehyd-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,50 (Ethylacetat/Hexan/Ethanol (57 : 40,5 : 2,5)); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,21 (Methanol/Wasser (65 : 35)).

Herstellung von Methyl-6-methylaminohexanoat-hydrochlorid (12)

[0248] Ein 2 Liter-Dreihals-Rundkolben, der mit 8,77 g 60 % NaH in Mineralöl (219 mMol; 1,1 Äquivalente) in 500 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran befüllt war, wurde mit einem 500 ml Zugabetrichter am mittleren Hals ausgestattet. Danach wurden 34,5 g (144 mMol) des sekundären Amids 3 in 300 ml wasserfreiem Tetrahydrofuran über eine Zeitdauer von 30 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde weitere 50 Minuten lang gerührt und anschließend wurden 22,6 ml (363 mMol) Iodmethan zugesetzt. Die Mischung wurde 23 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach in einen 2 Liter-Rundkolben überführt und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 400 ml 1 N wäßriger HCl behandelt und anschließend mit 300 ml Ethylacetat und danach mit 2 × 200 ml Aliquotss Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt und zuerst mit 3 × 125 ml Aliquotss 5 %iger wäßriger Natriumthiosulfat-Lösung und anschließend mit 100 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und konzentriert. Der Rückstand wurde in 250 ml Methanol gelöst und erneut konzentriert. Der Rückstand wurde mit 250 ml Methanol verdünnt und mit 50 ml 10 N wäßrigem Natriumhydroxid und anschließend mit 100 ml entionisiertem Wasser behandelt. Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 17 h lang gerührt, mit weiteren 50 ml entionisiertem Wasser verdünnt und danach mit 3 × 200 ml Aliquotss Hexan gewaschen. Die wäßrige Phase wurde mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Methanol verdünnt und Chlorwasserstoffgas wurde 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen (10 g). Die Mischung wurde 3 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Dem Rückstand wurden 500 ml Methanol zugesetzt und anschließend wurde nochmals Chlorwasserstoffgas 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen (9,2 g). Die Mischung wurde 18 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde in einem Eisbad abgekühlt und danach vakuumfiltriert. Das Filtrat wurde mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde zweimal mit 250 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert. Der Rückstand wurde mit 300 ml 2-Propanol verdünnt und mit 4 g Aktivkohle

30 Minuten lang behandelt. Die Mischung wurde durch ein Celite-Filter vakuumfiltriert und die Feststoffe wurden mit 2 × 75 ml Aliquotss 2-Propanol gespült. Die Filtrate wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 250 ml Methanol verdünnt und erneut mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 250 ml Methanol verdünnt und Chlorwasserstoffgas wurde 1 bis 2 Minuten lang in die Mischung eingeblasen (5,0 g). Die Mischung wurde bei Raumtemperatur 2 h lang gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde zweimal mit 250 ml Methanol verdünnt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und letztendlich unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab das Produkt (12) in Form eines sehr hellgelben, schaumigen Feststoffes (85 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 8,72 (2H, breites s), 3,58 (3H, s), 2,82 (2H, m), 2,49 (3H, s), 2,32 (2H, t), 1,68 bis 1,45 (4H, m) und 1,39 bis 1,21 (2H, m) ppm; ¹H-NMR (CD₃OD); δ 3,63 (3H, s), 2,97 (2H, t), 2,34 (2H, t), 1,75 bis 1,56 (4H, m) und 1,49 bis 1,31 (2H, m) ppm.

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl)-amin (15)

[0249] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 6,34 g (29,1 mMol) Di-t-butylidicarbonat und 9,00 g (29,1 mMol) N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl)-amin-hydrochlorid 4 befüllt war, wurden 125 ml wasserfreies Acetonitril und anschließend 7,5 ml Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 22 h lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und mit 2 × 100 ml Aliquotss 0,1 N wässrige HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und 100 ml einer 5 %igen wässrigen Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 10,5 g des Produktes (15) als nahezu farbloses Öl (97 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,57 (6H,s), 3,07 (4H, t), 2,28 (4H, t), 1,60 bis 1,10 und 1,37 (21H, m und s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,33 (Ethylacetat/Hexan (20 : 80)); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,17 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(5-hydroxycarbonylpentyl)-amin (16)

[0250] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 10,5 g Bis-methylester 15 befüllt war, wurden 75 ml Methanol und anschließend 75 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid zugesetzt. Die Mischung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 75 ml entionisiertem Wasser verdünnt und der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde durch langsame Zugabe von etwa 75 ml 1 N wässriger HCl auf 2,0 bis 2,5 eingestellt. Danach wurden 200 ml Ethylacetat zugesetzt und die Mischung wurde 3 Minuten lang heftig gerührt. Die Mischung wurde in einen Scheidetrichter überführt und die Schichten wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 2 × 150 ml Aliquotss Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und vakuumfiltriert. Die Filtrate wurden zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 9,52 g des Produktes in Form eines viskosen, nahezu farblosen Öls (98 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,07 (4H, t), 2,28 (4H, t), 1,58 bis 1,10 und 1,37 (21H, m und s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,44 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(N',N'-bis-(5-methoxycarbonylpentyl)-5-carbamylpentyl)-amin (17)

[0251] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 9,52 g (27,6 mMol) Bis-Säure (16) in 250 ml wasserfreiem Dimethylformamid befüllt war, wurden 19,0 g 861,3 mMol N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl)-amin-hydrochlorid (4) und anschließend 30 ml Triethylamin zugesetzt. Während die Mischung gerührt wurde, wurden 25,7 g (58,1 mMol) BOP zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde 14 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 750 ml Ethylacetat verdünnt und mit 250 ml 0,2 N wässriger HCl, 100 ml 0,1 N wässriger HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und 2 × 100 ml Aliquots 5 %iger wässriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (9 × 21 cm) chromatographiert und zuerst mit 70 % Ethylacetat/Hexan und danach mit 100 % Ethylacetat eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt (17) enthielten, wurden vereinigt und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (7 × 23 cm) chromatographiert und zuerst mit Methanol/Wasser (75 : 25), danach mit Methanol/Wasser (80 : 20) und letztendlich mit Methanol/Wasser (85 : 15) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und die resultierende Lösung wurde mit wasserfreiem Magnesi-

umsulfat getrocknet. Die Mischung wurde vakuumfiltriert und das Filtrat wurde zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert; dies ergab 17,80 g des Produktes (17) in Form eines nahezu farblosen, viskosen Öls (75 %): $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 3,57 (12H, s), 3,18 und 3,07 (12H, 2 t), 2,32 bis 2,16 (12H, m), 1,61 bis 1,09 und 1,37 (45H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, Rf = 0,50 (Ethylacetat); RP-18-Silica-Gel, Rf = 0,30 (Methanol/Wasser (85 : 15)).

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(N',N'-bis-(5-hydroxycarbonylpentyl)-5-carbamyl-pentyl-)amin (18)

[0252] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 7,88 g (9,20 mMol) Tetramethylester (18) in 75 ml Methanol befüllt war, wurden 70 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid zugesetzt. Die Mischung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Sirup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml entionisiertem Wasser verdünnt und unter heftigem Rühren wurde der pH-Wert der Lösung durch langsame Zugabe von etwa 70 ml 1 N wässriger HCl auf 2 bis 2,5 eingestellt, wobei das Produkt (18) in dem Verfahren als Öl austrat (eine flüssige Phase trennte sich von einer anderen flüssigen Phase). Die Mischung wurde mit 200 ml 2-Propanol/Methylenchlorid (3 : 1) und anschließend mit 3 \times 100 ml Aliquots 2-Propanol/Methylenchlorid (3 : 1) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dies ergab 7,70 g eines nahezu farblosen, dicken Sirups, der aus 6,93 g des erwünschten Produktes (18; 94 %) und 0,77 g 2-Propanol bestand (durch NMR-Integration): $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 3,18 und 3,07 (12H, 2 t), 2,37 bis 2,12 (12H, m), 1,60 bis 1,10 und 1,37 (45H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); RP-18-Silica-Gel, Rf = 0,50 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung eines N-BOC-Tet-Gal-Nac-1-a-S-C5-Zweiges (20)

[0253] Einem 250 ml-Rundkolben, der mit 4,05 g (7,38 mMol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-N-acetyl-galactosamin-1-a-S-[5'-thiopentyl-N-BOC-amin] (11) befüllt war, wurden 20 ml Methylenchlorid und anschließend 20 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mittels Rotationsverdampfung konzentriert und der Rückstand wurde dreimal mit 75 ml Methylenchlorid verdünnt und erneut konzentriert; dies ergab 6,27 g Rückstand, nämlich eine Mischung aus dem erwünschten Produkt (19) und restlicher Trifluoressigsäure: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD); δ 5,61 (1H, d), 5,41 (1H, dd), 5,01 (1H, dd), 4,62 bis 4,47 (2H, m), 4,11 (2H, d), 2,91 (2H, t), 2,74 bis 2,48 (2H, m), 2,11 (3H, 2 s), 2,00 (3H, s), 1,93 und 1,91 (6H, 2s) und 1,37 bis 1,10 (6H, m) ppm. Einem separaten 250 ml-Rundkolben, der mit 1,33 g des Syrups, der 90 Gew.-% der Verbindung 18 enthielt (netto 1,20 g; 1,50 mMol) befüllt war, wurden 50 ml wasserfreies Dimethylformamid zugesetzt. Um das restliche 2-Propanol zu entfernen, wurde die Mischung zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dem Rückstand wurden 20 ml wasserfreies Dimethylformamid und 10 ml trockenes Triethylamin zugesetzt. Der resultierenden gerührten Lösung wurde eine Dimethylformamid-Lösung des Rohproduktes 19 (insgesamt 30 ml wasserfreies Dimethylformamid) zugesetzt und die resultierende Mischung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde danach mit 250 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 2 \times 100 ml Aliquots 1 N wässriger HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und danach mit 100 ml gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (5,5 \times 19 cm) chromatographiert und mit jeweils 250 ml Methanol/Wasser (65 : 35), Methanol/Wasser (70 : 30), Methanol/Wasser (75 : 25) und anschließend mit 800 ml Methanol/Wasser (80 : 20) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Dies ergab 3,55 g eines schaumigen weißen Feststoffes (94 %). Dieses Material wurde danach an einer Silica-Gel-Säule (5,5 \times 20 cm) chromatographiert und mit Ethylacetat/Methanol (80 : 20) eluiert. Die Fraktionen, die nur das erwünschte Produkt (20) enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dies ergab 2,83 g des erwünschten Produktes in Form eines rein weißen schaumigen Feststoffes (75 %): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD); δ 5,58 (4H, d), 5,42 (4H, dd), 5,01 (4H, dd), 4,63 bis 4,51 (8H, m), 4,20 bis 4,00 (8H, m), 3,35 bis 3,10 (20H, m), 2,73 bis 2,47 (8H, m), 2,32 (4H, t), 2,25 bis 2,08 (20H, m und s), 2,00 (12H, s), 1,93 und 1,91 (24H, 2 s), 1,71 bis 1,20 (69H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, Rf = 0,47 (Ethylacetat/Methanol (75 : 25)); RP-18-Silica-Gel, Rg = 0,33 (Methanol/Wasser (80 : 20)).

Herstellung von N,N-Bis-(N',N'-his-(5-methoxycarbonylpentyl)-5-carbamylpentyl-)amin TFA (21)

[0254] Einem 250 ml-Rundkolben, der mit 1,50 g (1,75 mMol) N-BOC-N,N-Bis-(N',N'-bis-(5-methoxycarbonylpentyl)-5-carbamylpentyl-)amin (17) in 15 ml Methylenchlorid befüllt war, wurden 15 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde danach mit 50 ml Methanol verdünnt und erneut mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde nochmals mit 50 ml Methylenchlorid verdünnt und erneut mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert.

Herstellung von TFA-Salz eines Tet-Gal-Nac-1-a-S-Pentylamin-Zweiges (22)

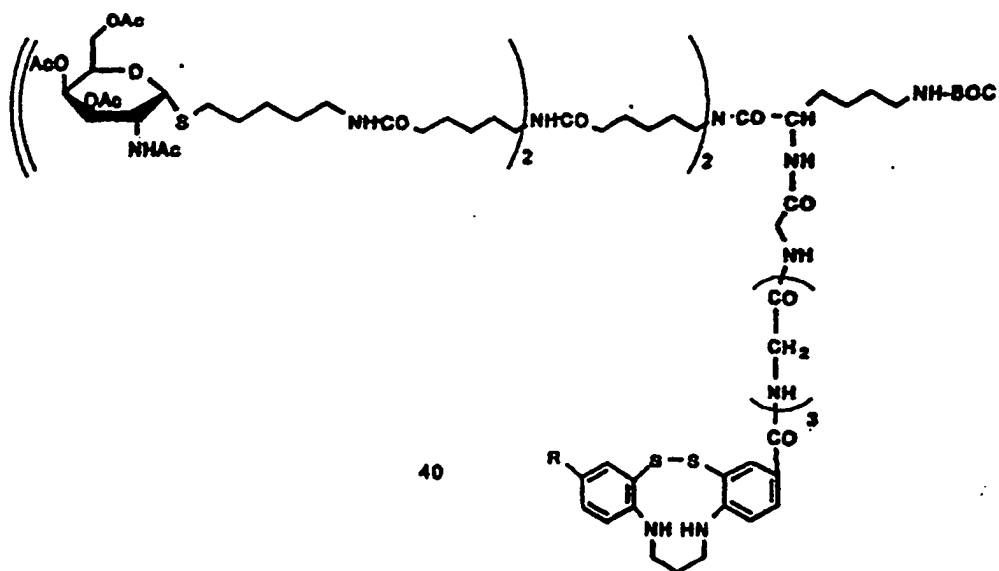
[0255] Einem 100 ml-Rundkolben, der mit 790 mg (0,313 mMol) eines N-BOC-Tet-Gal-Nac-1-a-S-C5-Zweiges (20) befüllt war, wurden 10 ml Methylenchlorid und anschließend 10 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 150 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 2×100 ml Aliquots einer gesättigten wässrigen Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und danach zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert; dies ergab 690 mg des Produktes (22) in Form eines schaumigen cremefarbenen Feststoffes (91 %).

Herstellung eines Tet-Gal-Nac-1-a-S-Pentylamin-Konjugats von modifiziertem Annexin V mittels SMCC-Derivatisierung (25)

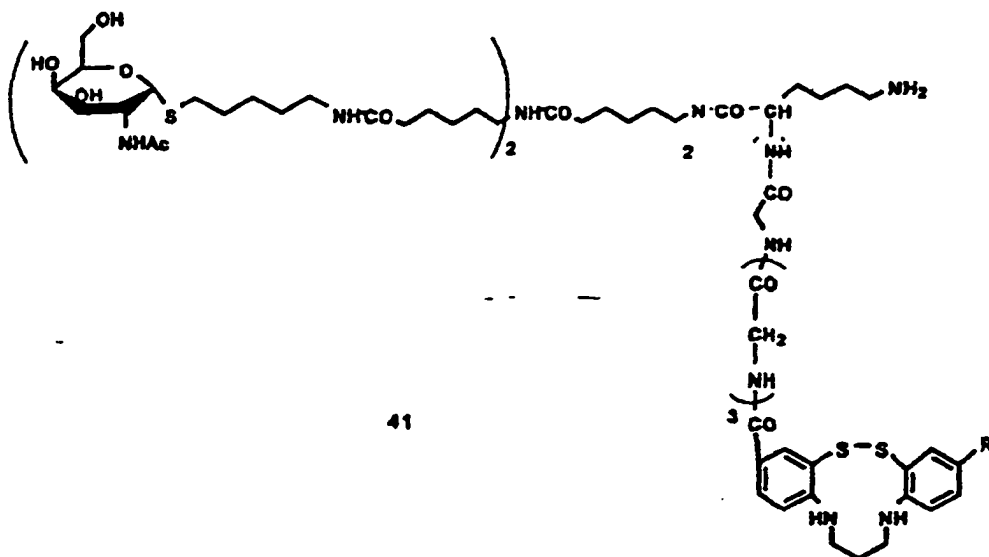
[0256] Das Tetragalactosyl-N-AC-1-a-S-pentylamin (22) wurde mit SMCC-Reagens in Triethylamin und DMF bei Raumtemperatur umgesetzt. Das Maleimidyl-Derivat (23) wird mit einem Anionenaustausch-Harz des Typs AG-1 X8 (BioRad; Hydroxid-Form; 2 bis 6 m Äquivalente/g) in wässrigem Methanol trituriert. Die Mischung wurde 15 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach vakuumfiltriert. Das Harz wurde mit 50 ml entionisiertem Wasser und danach mit 50 ml Methanol gespült. Die Filtrate wurden vereinigt und mittels Rotationsverdampfung und anschließend mit einer Vakuumpumpe bei vollem Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert; dies ergab das Produkt 24 in Form eines trockenen Feststoffes. Die Konjugation von modifiziertem Annexin V-SH mit einer mit einem Maleimidyl-Rest derivatisierten gesäuerten Galactose wird durchgeführt in 5 bis 15 % DM-SO-Lösungsmittel mit einem pH-Wert im Bereich von 5 bis 8 in Borat-Puffer. Der Maleimidyl-Galactose-Cluster wird dem Annexin V in molaren Verhältnissen von 1 : 1; 5 : 1 und 10 : 1 angeboten. Das monomere Galactose-Cluster-Annexin V-Konstrukt wird danach mittels Gelfiltrations-Methoden gereinigt. Das Produkt wird danach auf seinen Sulfhydrylgehalt untersucht, um den Derivatisierungsgrad zu bestimmen, um das Konjugat 25 in guter Ausbeute zu erhalten.

Herstellung von ^{99m}Tc -Galactose-Cluster-Annexin V-Konjugat (26)

[0257] Der $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ -TFP-Ester wird hergestellt mittels des VerlumaTM-Kit-Markierungsverfahrens (Kasina, S., Rao, T.N., Srinivasan, A., et al., Development and Biologic Evaluation of a Kit for Performed Chelate Technetium-99m Radiolabeling of an Antibody Fab Fragment Using a Diamide Dimercaptide Chelating Agent, J. Nucl. Med., 32, 1445-1451 (1991)). Das ^{99m}Tc wurde in den N_2S_2 -Liganden mittels Transchelatisierung von ^{99m}Tc -Gluconat durch Erhitzen eingearbeitet. Der $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ -TFP-Ester wird danach konjugiert mit dem Galactose-Cluster-Annexin V-Konstrukt in einem 0,2 m Bicarbonat-Puffer, pH 10,0, für eine Zeitdauer von 20 bis 30 Minuten bei Raumtemperatur. Das $^{99m}\text{Tc-N}_2\text{S}_2$ -Galactose-Cluster-Annexin V-Konjugat wird durch Gelchromatographie gereinigt; dies ergab 30 bis 40 % einer radiochemischen Ausbeute mit einer radiochemischen Reinheit von ≥ 85 % des Produktes 26.



1) TFA/CH₂Cl₂
RT
2) AG-1 X 8 Anionenaustausch-Harz
MeOH/H₂O



SMCC/TEA
DMF, RT

wünschte Verbindung 14 in niedriger Ausbeute.

Herstellung des Annexin V-Monomer-S-Konjugat des Galactose-Cluster-Liganden des trifunktionellen Lysins (43)

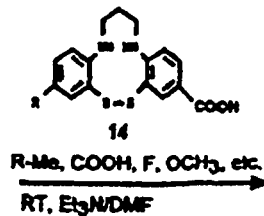
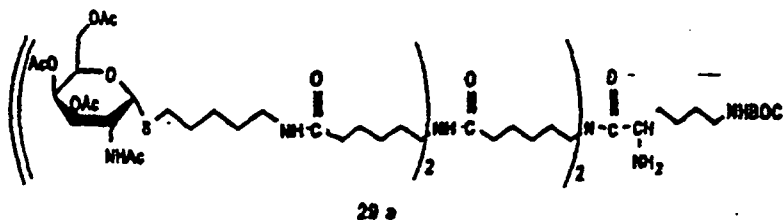
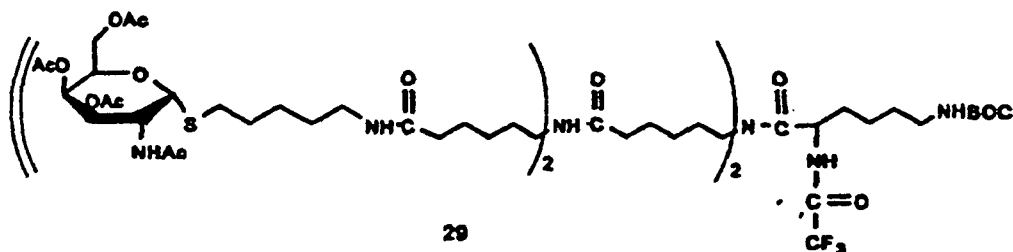
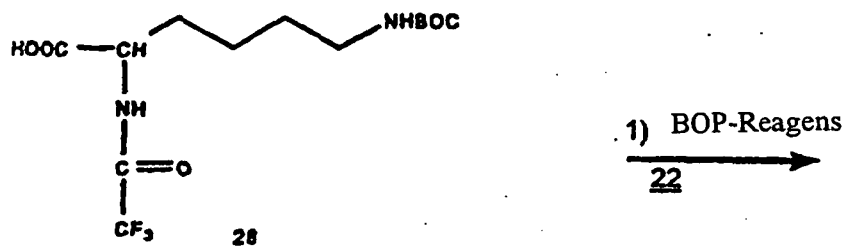
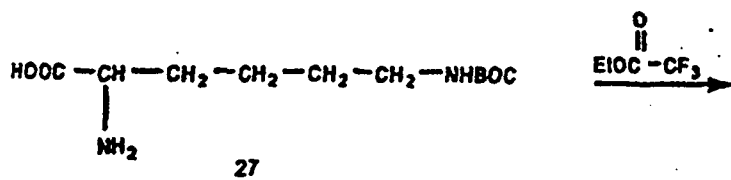
[0261] Der N,N'-Bis-(2-disulfidyl-6-hydroxycarbonylphenyl)-1,3-propyldiamin-mono-NHS-Ester (14) wurde mit 1,2 Äquivalenten t-Butyltetraglycincarboxylat in Form seines Hydrochlorid-Salzes, im Handel erhältlich von der Firma Aldrich Chemical Company, in DMF-Lösungsmittel unter Verwendung von 10 Äquivalenten von Triethylamin als Base umgesetzt. Das Lösungsmittel aus der Reaktionsmischung wurde unter Vakuum entfernt und das Rohprodukt wurde mittels Silica-Gel-Säulenchromatographie gereinigt. Dies ergab das Peptid-Addukt 38 in guter Ausbeute. Der tertiäre Butylester der Verbindung 38 wurde in einer TFA-CH₂Cl₂-Mischung entfernt. Die Mischung wurde 1 Stunde lang gerührt und das Lösungsmittel entfernt und getrocknet und ergab die Carbonsäure des Ligand-Tetrapeptid-Addukts 39 in guter Ausbeute.

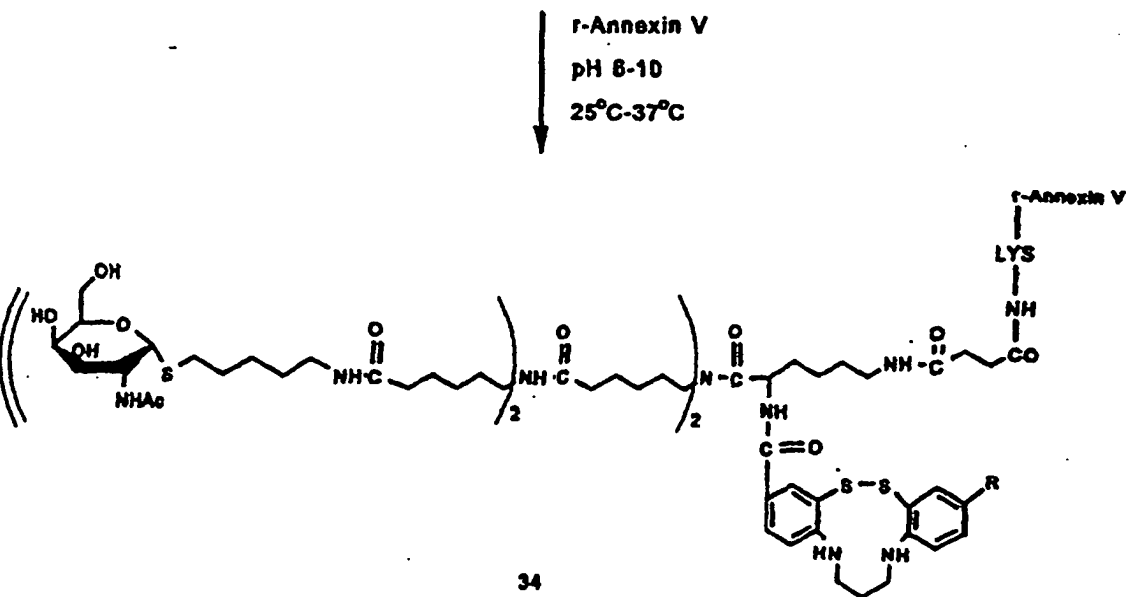
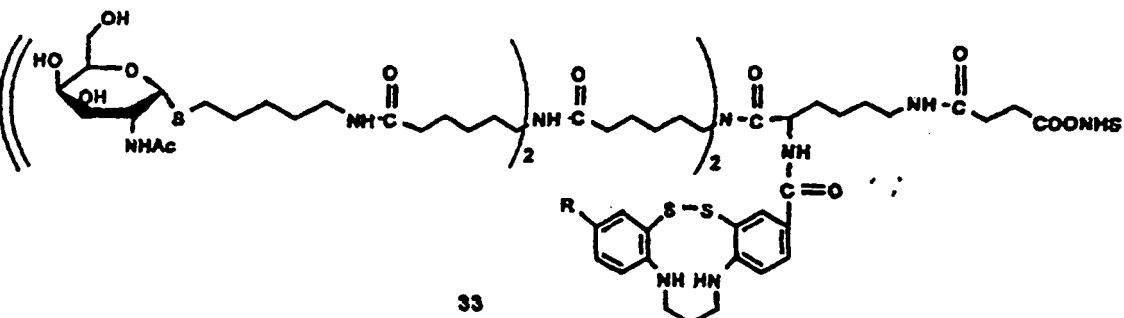
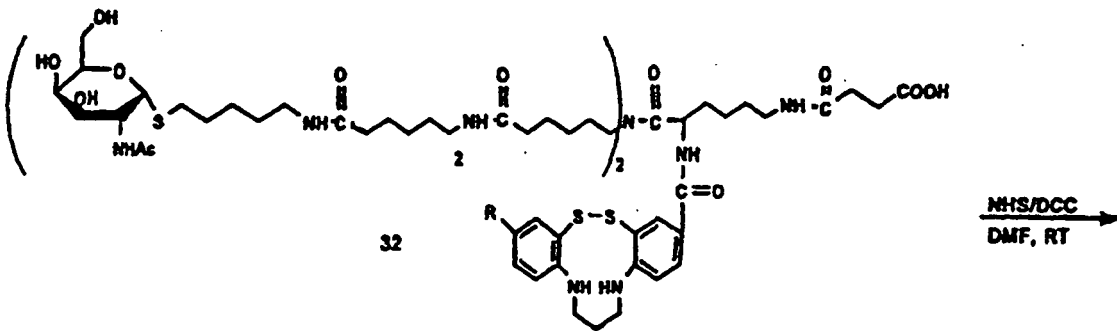
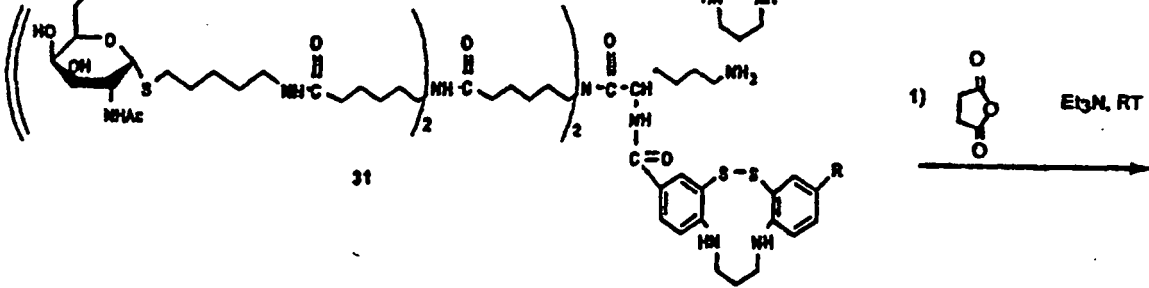
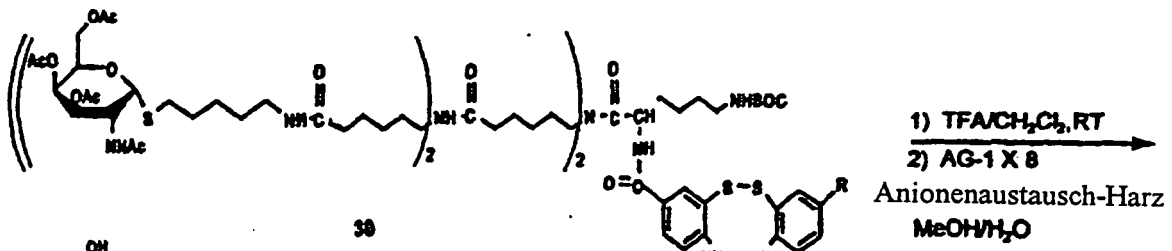
[0262] Die Carboxyl-Funktionalität des Tetraglycin-Ligand-Addukts 39 wurde mit 1,2 Äquivalenten 3,5,6-Tri-O-acetyl-NH-acetyl-tetra-galactosyl-ε-HNBOC-α-Aminolysin 29a in DMF-Lösungsmittel und 5 Äquivalenten Triethylamin in Gegenwart von 1,2 Äquivalenten BOP-Reagens konjugiert. Das Lösungsmittel aus der Reaktionsmischung wurde unter Vakuum entfernt und getrocknet. Das Rohprodukt wurde mittels Silica-Gel-Säulenchromatographie gereinigt. Dies ergab Verbindung 40 des trifunktionellen Lysin-epsilon-Amins, geschützt mit BOC.

[0263] Die BOC-Gruppe von Verbindung 40 wird in einer TFA-CH₂Cl₂-Mischung entfernt. Die Reaktionsmischung wird 1 bis 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel aus der Reaktionsmischung wurde entfernt und getrocknet. Das Rohprodukt wurde danach mit AG-1 X8-Anionenaustausch-Harz in wässrigem Methanol bei Raumtemperatur trituriert. Die Mischung wurde filtriert, und das Harz wurde mit Methanol gespült. Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert und dies ergab o-Deacetyl-N-acetyltetra-galactosyl-Ligand-Chelat-Verbindung des trifunktionellen Lysins in Form eines epsilon-Amins 41 in guter Ausbeute. Die Aminoverbindung 41 wurde mit 1,2 Äquivalenten SMCC-Reagens in 10 Äquivalenten Triethylamin und DMF-Lösungsmittel derivatisiert. Die Reaktionsmischung wurde 1 bis 2 Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter verringertem Druck entfernt und das Rohprodukt wurde an einer Silica-Gel-Säule chromatographiert und ergab Maleimidyl-tetra-galactose-tetra-glycyl-peptidyl-Ligand-Chelat-Verbindung des trifunktionellen Lysins 42 in guter Ausbeute. Das Maleimidyl-Derivat 42 wurde danach konjugiert mit modifiziertem Annexin V-SH bei einem pH-Wert von 5 bis 9 in Boratpuffer und/oder Phosphatpuffer. Die Reaktionsmischung wurde 2 Stunden lang bei 25 bis 37 °C inkubiert. Das Schwefel-Addukt des modifizierten Annexin-Konjugats wurde danach mittels Gelfiltration gereinigt und ergab das Konjugat 43 in guter Ausbeute.

BEISPIEL XVIII

[0264] Verfahren zur Herstellung von Dimer-N-Galactose-Chelat-Verbindung oder S-Annexin-N-Galactose (endogene Chelatisierung, kein Dimer) oder S-Annexin-N-Galactose-Chelat-Verbindung





Herstellung von N- ϵ -(tert-Butoxycarbonyl-1N'- α -trifluoracetyl-L-Lysin (28)

[0265] Einem 250 ml-Rundkolben, der mit 10,0 g (0,041 Mol) N- ϵ -(tert-Butoxycarbonyl)-L-Lysin 27, im Handel erhältlich von der Firma BACHEM Bioscience Inc. (Tochtergesellschaft der BACHEM Switzerland, 3700 Horizon Drive, Renaissance at Gulph Mills, King of Prussia, PA, 19406, USA) und 100 ml Methanol befüllt war, wurden 10,0 g (0,07 Mol) Ethyltrifluoracetat und anschließend 20,0 ml (0,144 Mol) Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 20 Stunden lang bei 20 bis 30°C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml Diethylether verdünnt und danach filtriert. Das Filtrat wurde danach mit 3 \times 30 ml Aliquots einer 1 N wässrigen HCl, 20 ml entionisiertem Wasser und letztendlich mit 20 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde unter Vakuum destilliert und dies ergab Produkt 28 in guter Ausbeute. N- ϵ -(tert-Butoxycarbonyl)-N'- α -trifluoracetyl-L-Lysin wurde mit Tri-*o*-acetyl-tet-Gal-Nac-1- α -S-Pentylamin in Gegenwart von BOP-Reagens umgesetzt. Die aktivierte Carbonsäure reagierte mit dem Galactosamin-Cluster in DMF und Triethylamin und ergab das Galactose-Cluster-Lysin-Addukt 29 in guter Ausbeute. Der N- α -Trifluoracetyl-Schutz des Lysins wurde entfernt und ergab den primären α -Amino-Lysin-Galactose-Cluster 29a in mäßiger Ausbeute.

Konjugation von Galactose-Cluster mit einer Chelat-Verbindung und Annexin-Komponenten (34)

Tetragalactosyl-Chelat-Verbindung-Konstrukt (29a–34)

[0266] Einer Mischung aus mit Amin verlängertem Tetra-Galactosylamin 29a und 1,2 Äquivalenten N,N'-Bis-(2-disulfidyl-4-hydroxycarbonylphenyl)-1,3-propyldiamin-mono-NHS-Ester in Dimethylformamid wurden 5 Äquivalente Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 2 bis 24 Stunden lang bei 15 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit entionisiertem Wasser verdünnt und der pH-Wert wurde durch Zugabe von 1 N wässriger Chlorwasserstoffsäure auf 2,5 eingestellt. Die Mischung wurde mit Ethylacetat gewaschen. Die wässrige Phase wurde konzentriert. Der Rückstand wurde an einem Phasenumkehr-C-18-Silica-Gel chromatographiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert, und dies ergab so das Produkt 30 in guter Ausbeute. Die mit BOC geschützte epsilon-Amin-Funktionalität von Verbindung 30 wurde entfernt durch Rühren bei Raumtemperatur in einer Trifluoressigsäure-Methylenchlorid-Mischung. Die resultierende primäre epsilon-Amin-Verbindung 31 wurde mit AG-1 X8-Anionenaustausch-Harz (Hydroxid-Form) in einer Methanol/Wasser-Mischung 15 Stunden lang bei Raumtemperatur trituriert. Die Mischung wurde filtriert, und das Harz wurde mit Methanol gespült. Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert und dies ergab den *o*-deacetylierten N-Acetyl-Galactose-Cluster, der nach Umsetzung mit Bernsteinsäureanhydrid in Triethylamin und DMF bei Raumtemperatur das Hemibernsteinsäure-Addukt 32 in guter Ausbeute ergab. Die Hemibernsteinsäure-Funktionalität der Verbindung 32 wurde aktiviert durch Umsetzung mit 1,1 Äquivalenten N-Hydroxysuccinimid in Gegenwart von 1,2 Äquivalenten eines DCC-Kupplungsmittels. Das Reaktionsprodukt wurde unter Vakuum konzentriert, und ergab ein Rohprodukt, das nach Reinigung mittels Silica-Gel-Säulenchromatographie den NHS-Ester 33 in mäßiger Ausbeute ergab. Der NHS-Ester des Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Addukts des trifunktionellen Lysins wurde mit Annexin V bei einem pH-Wert von 6 bis 10 in Gegenwart von DMSO (0 bis 15 %) umgesetzt. Die Reaktion wurde durchgeführt bei 25 bis 37 °C für eine Zeitdauer von 1 bis 2 Stunden. Das rohe Konjugat wurde gereinigt durch Gelchromatographie und dies ergab das Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin V-Lysin-Konjugat 34 in guter Ausbeute.

BEISPIEL XIX

Radiomarkierungs-Verfahren für die Beispiele XVI, XVII und XVIII

Charakterisierung der Galactose-Cluster-Chelat-Annexin V-Konjugate

[0267] Die Proteinkonzentration wurde bestimmt unter Verwendung von A_{280} von 0,6 für 1 mg/ml Lösung von Annexin V. Die Anzahl der Galactose-Reste pro Molekül Annexin V wurde bestimmt durch Messen der Gesamtzahl reaktiver Amine am Annexin V vor und nach der Umsetzung mit dem Galactosyl-Cluster-Chelat-Konjugats unter Verwendung von Trinitrobenzolsulfonsäure, wie dies beschrieben wurde von Habeeb, *Analytical Biochemistry*, 14, 328-336 (1966).

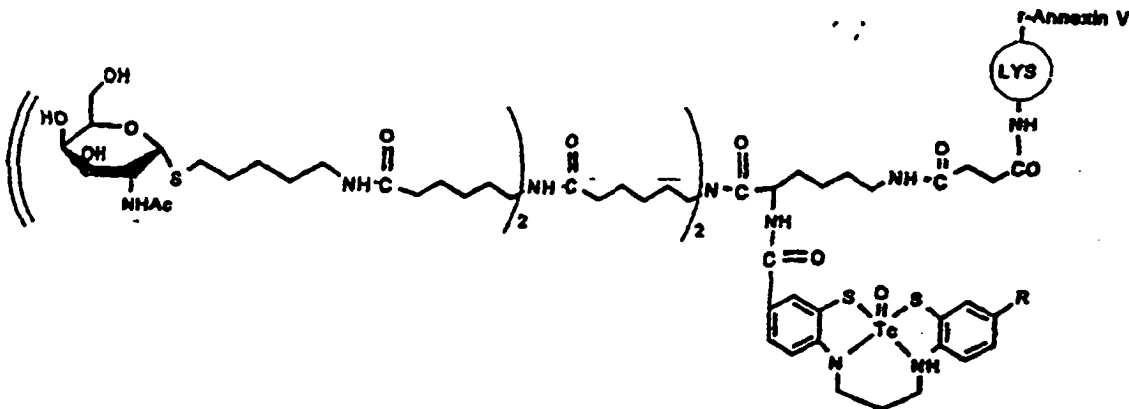
[0268] Auch die Anzahl der Galactose-Reste pro Molekül modifizierten Annexins V, die mittels Sulfhydryl konjugiert waren, wurde bestimmt durch Messen des reaktiven Sulfhydryls an Annexin V vor und nach der Umsetzung mit dem Galactosyl-Cluster-Chelat-Konjugat unter Verwendung von 3-Carboxy-4-nitrophenyldisulfid, DTNB, Ellman's Reagens, wie dies beschrieben wurde von Deakin, et al., *Biochem. J.*, 89, 296 (1963). Die Fähig-

keit des Galactose-Chelat-Annexins V an aktivierte Blutplättchen zu binden wurde bewertet, indem man seine Fähigkeit bestimmte, die Bindung von unmodifiziertem, I-125 radiomarkiertem Annexin V an frisch isolierte menschliche Blutplättchen zu binden in Anlehnung an das Verfahren von Thiagarajan und Tait, J. Biol. Chem., 265, 17, 240-243 (1990).

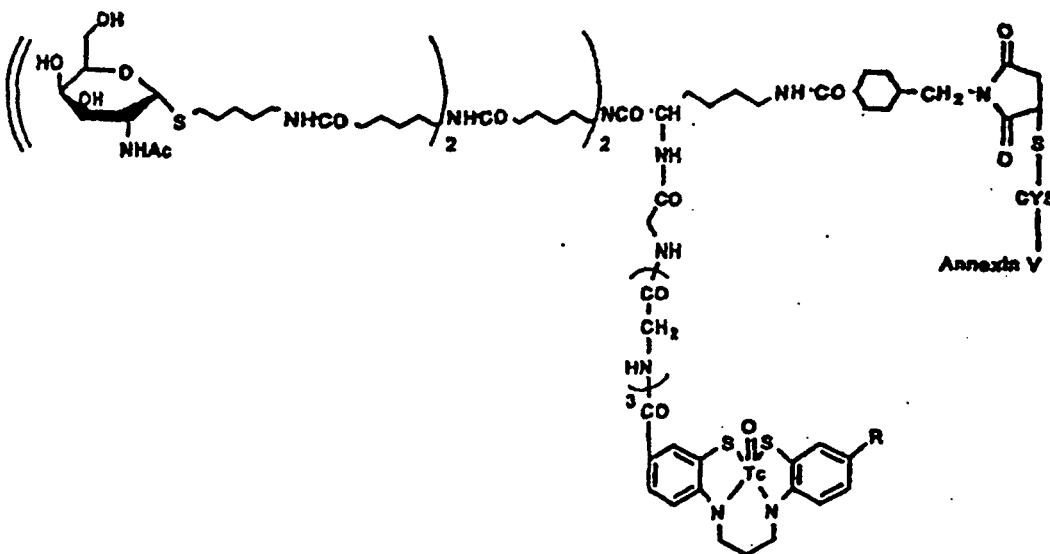
Radiomarkierungs-Verfahren zur Verwendung in nachgelagerten Chelat-Konjugations-Verfahren

[0269] Verfahren A: Zinn-Gluconat-Kits wurden hergestellt, die 5 mg Natriumgluconat, 100 Mikrogramm Zinnchlorid, 1,0 mg (1 mg/ml) Galactose-Cluster-Chelat-Annexin V und 0,1 bis 1,0 mg Lactose enthielten. Der pH-Wert wurde unter Verwendung von HCl, Essigsäure und NaOH zwischen 5 und 7 gehalten. Dem Zinn-Gluconat-Kit wurden 1,0 ml Natriumpertechnetat (Tc-99m) mit einer spezifischen Aktivität von etwa 50 mCi zugesetzt. Die Phirole wurde 5 bis 30 Minuten lang bei 25 bis 30 °C inkubiert. Die prozentuale Bildung von markiertem Konjugat, verbleibendem Pertechnetat und hydrolysiertem/reduziertem Technetium wurde mittels ITLC in 12 % TCA als Entwicklungs-Lösungsmittel bestimmt.

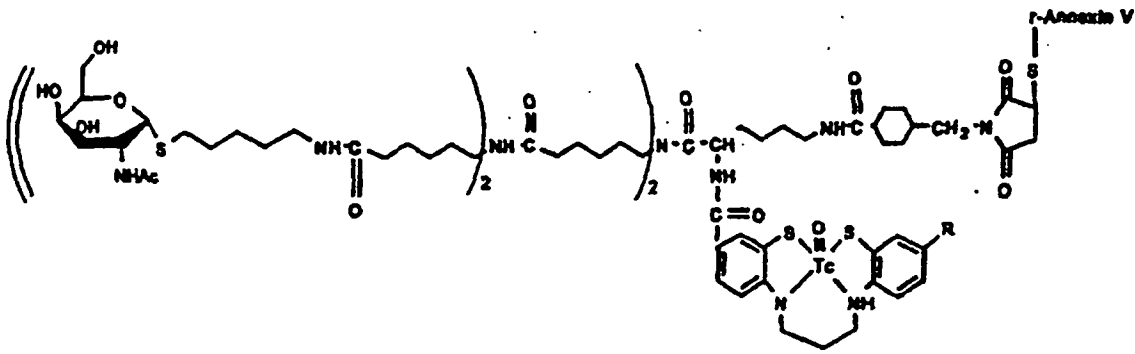
[0270] Verfahren B: Zinn-Tartrat-Kits, die 0,5 ml Dinatriumtartrat (10 mg/ml) und 0,1 ml Zinnchlorid (1,0 mg/ml Ethanol) enthielten, wurden in einer Vakuum-Phirole unter Stickstoff hergestellt. Der pH-Wert der Lösung wurde zwischen 5 und 7, vorzugsweise bei 6,0, gehalten. Dieser Zinn-Tartrat-Lösung wurden 1,0 ml Natriumpertechnetat (50 mCi) zugesetzt, und man ließ die Lösung bei Raumtemperatur stehen. Einer evakuierten Phirole wurden nacheinander 200 µl Natriumphosphat (0,5 M, pH 8 oder 10) und 1,0 ml Galactose-Cluster-Chelat-Verbindung-Annexin V-Konjugat (1,0 mg/ml) zugesetzt. Anschließend wurde das Tc-99m-tartrat (50 mCi) zugesetzt, und die Phirole wurde 5 bis 30 Minuten lang bei 25 bis 37 °C inkubiert. Die prozentuale Bildung von markiertem Konjugat, verbleibendem Pertechnetat und hydrolysiertem/reduziertem Technetium wurde mittels ITLC in 12 % TCA als Entwicklungs-Lösungsmittel bestimmt.



Radiomarkierte Verbindung von Beispiel XVI



Radiomarkierte Verbindung von Beispiel XVII



Radiomarkierte Verbindung von Beispiel XVIII

BEISPIEL XX

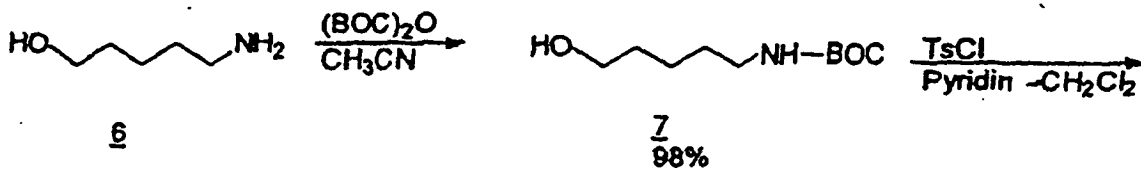
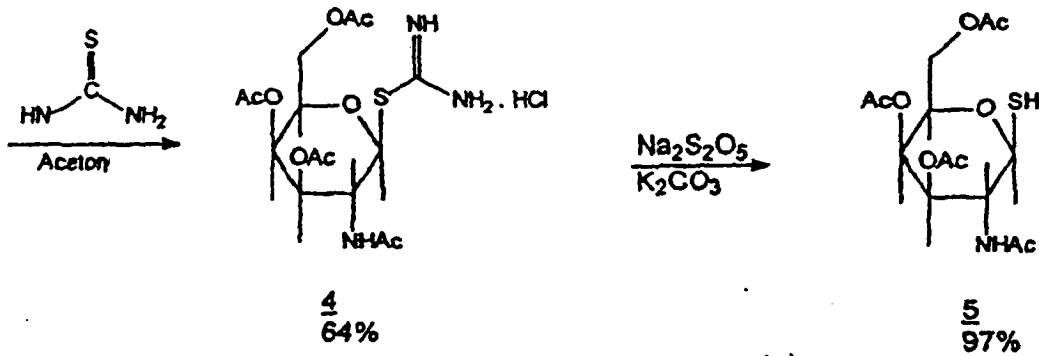
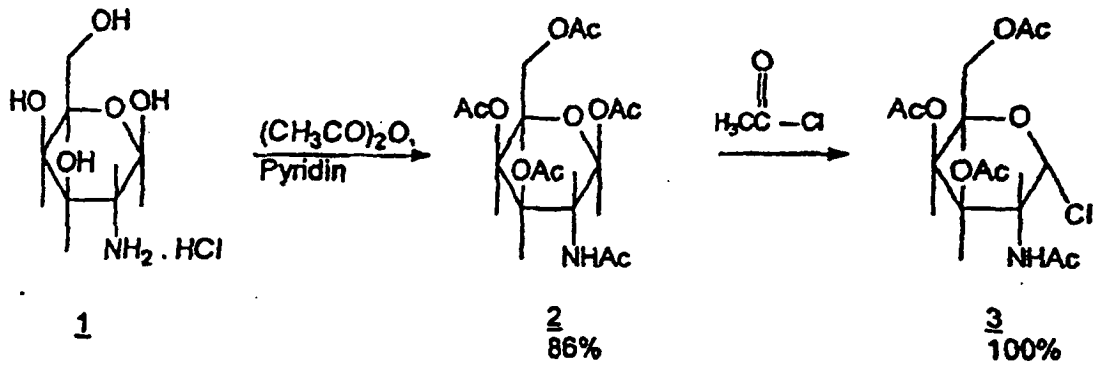
Herstellung von modifiziertem Annexin V-Dimer durch rekombinante Verfahren

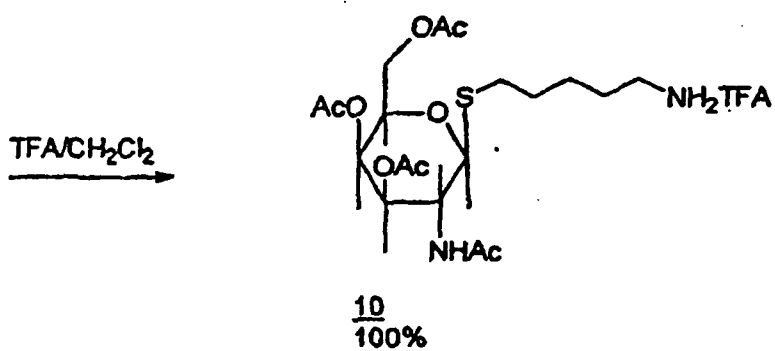
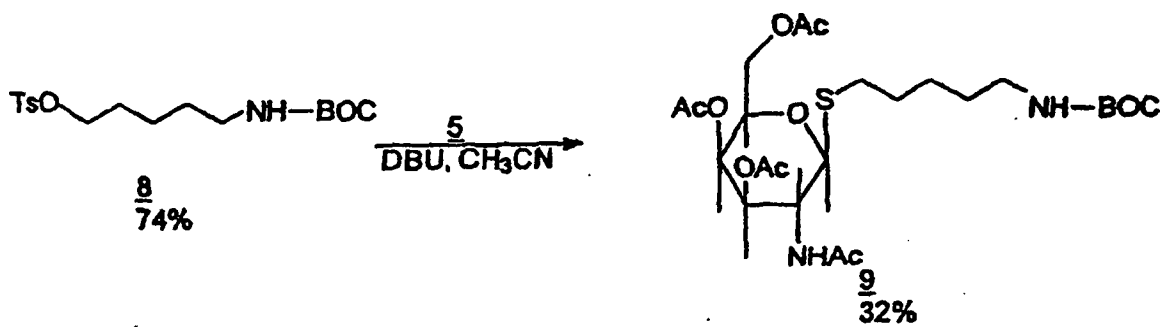
[0271] Ein Dimer aus zwei modifizierten Annexin V-Molekülen kann hergestellt werden durch rekombinante DMS-Verfahren in Anlehnung an die Verfahren, die beschrieben wurden von Tait et al., J. Biol. Chem., 270, 21594 – 21599 (1995), zur Konstruktion und Expression von chimären Molekülen, die Annexin V enthalten. Zuerst wurde an dem Annexin V-cDNS-Template-pPPPAP-I-1 eine PCR durchgeführt mit Oligonukleotid-Primern, die an der NdeI-Stelle an dem 5'-Ende und an der BamHI-Stelle an dem 3'-Ende der Annexin V-Kodierungssequenz (Aminosäuren 1-320 und Stop-Codon) eingeführt wurden. Dieses PCR-Produkt wurde durch Standardverfahren an den NdeI- und BamHI-Stellen des Plasmids pEP-12a (Novagen Corp., Madison, WI) kloniert, um das Plasmid pET-12a-Ax1 zu erzeugen. PCR wurde danach nochmals an dem Annexin V-cDNS-Template-pPAP-1-1,6 mit Oligonukleotid-Primern, die an der NdeI-Stelle an dem 5'-Ende eingeführt wurden und einer Sequenz, die die Aminosäuren Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly codiert, und anschließend an der NdeI-Stelle an dem 3'-Ende der Annexin V-Kodierungssequenz (Aminosäuren 1-3210) durchgeführt. Dieses pCR-Produkt wurde danach durch Standardverfahren an der NdeI-Stelle des Plasmids pET-12a-Ax1 kloniert, um das Plasmid pET-12a-Ax2 zu erzeugen. Die Herstellung des dimeren Annexin V-Moleküls durch Cytoplasma-Expression in E. coli aus Plasmid pET-12a-Ax2 wurde danach durch Standardverfahren durchgeführt, wie dies beispielsweise gezeigt wurde durch Tait et al., J. Biol. Chem., 270, 21594 – 21599 (1995).

BEISPIEL XXI

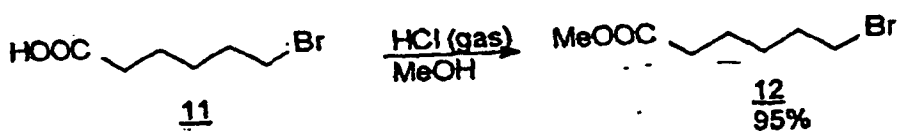
Durchführung der Galactosylierung (4-Mer-Zucker-Cluster) von modifiziertem Annexin

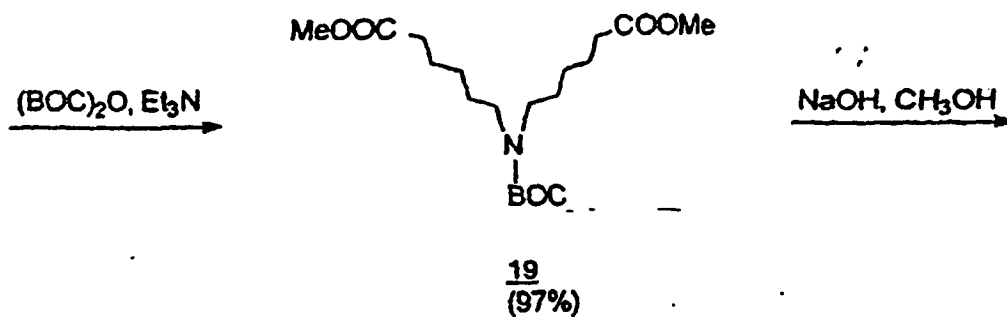
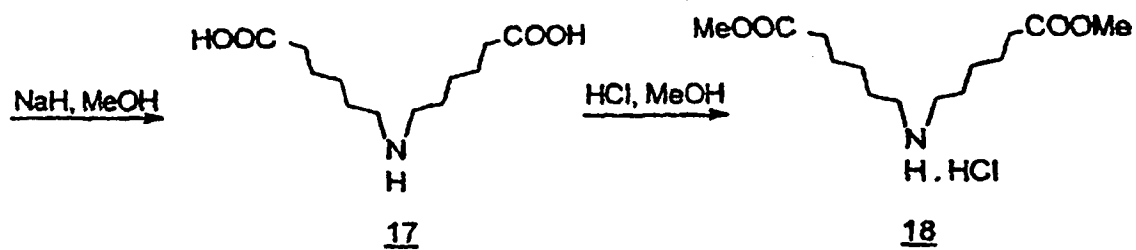
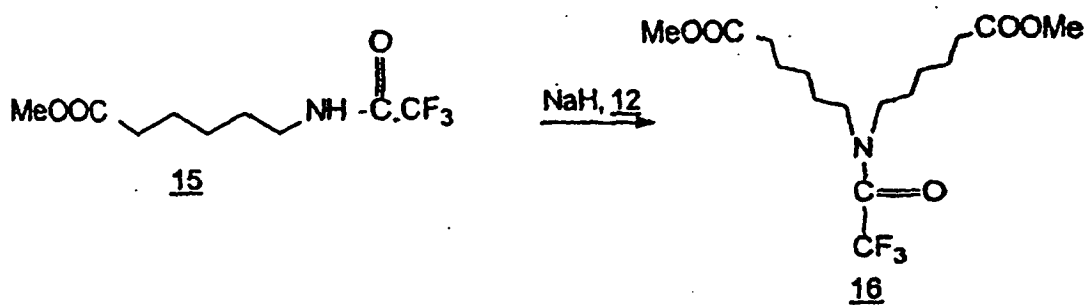
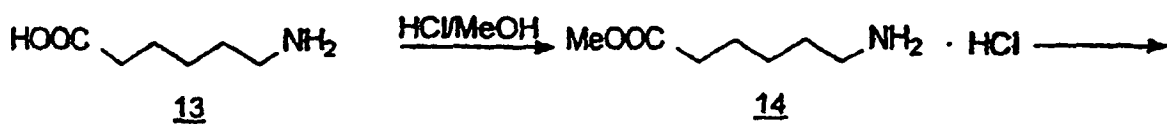
A. Synthese von Zucker mit Linker

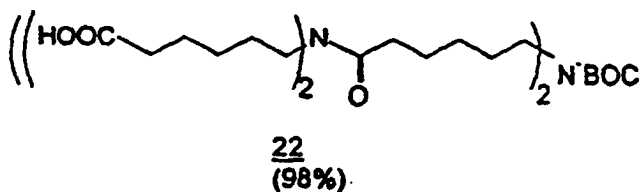
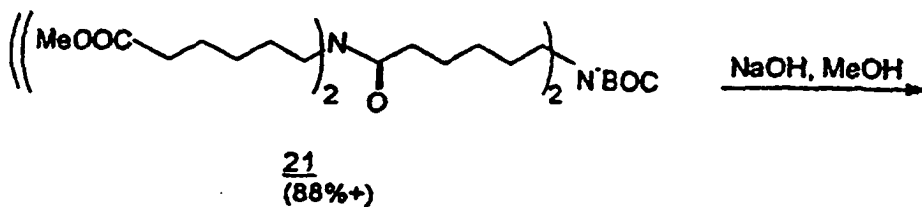
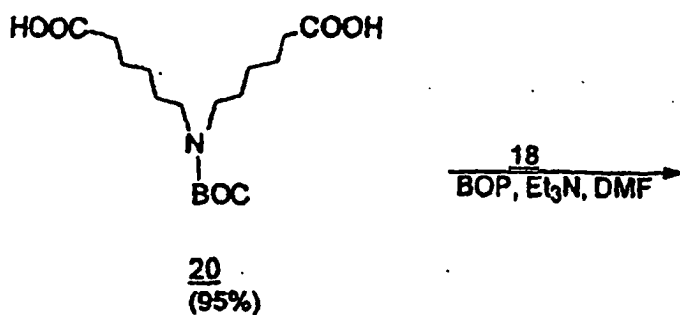




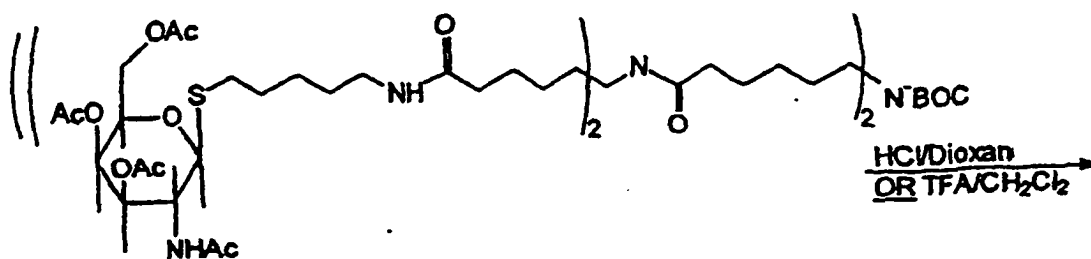
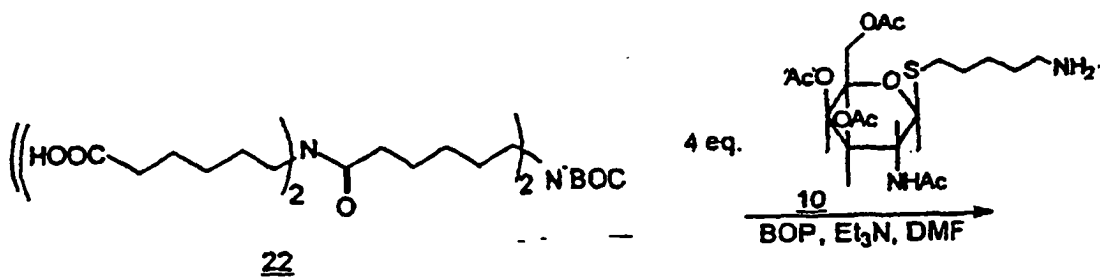
B. Synthese von 4-MER-Clustern

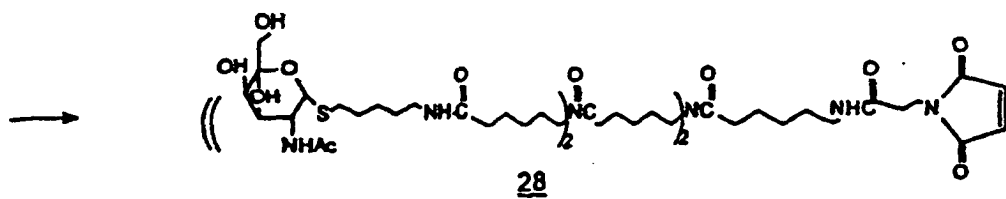
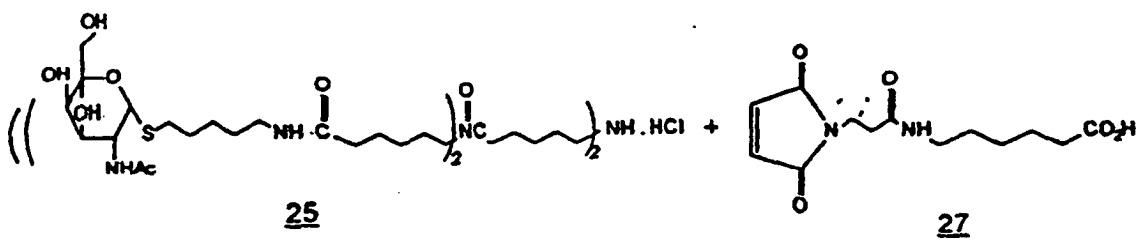
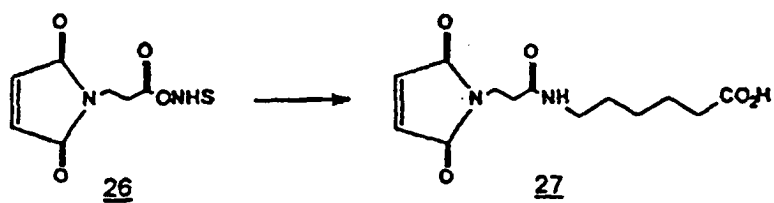
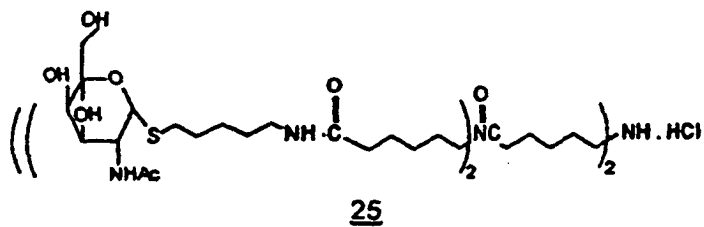
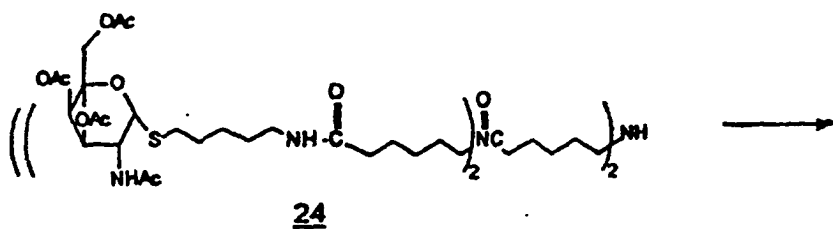




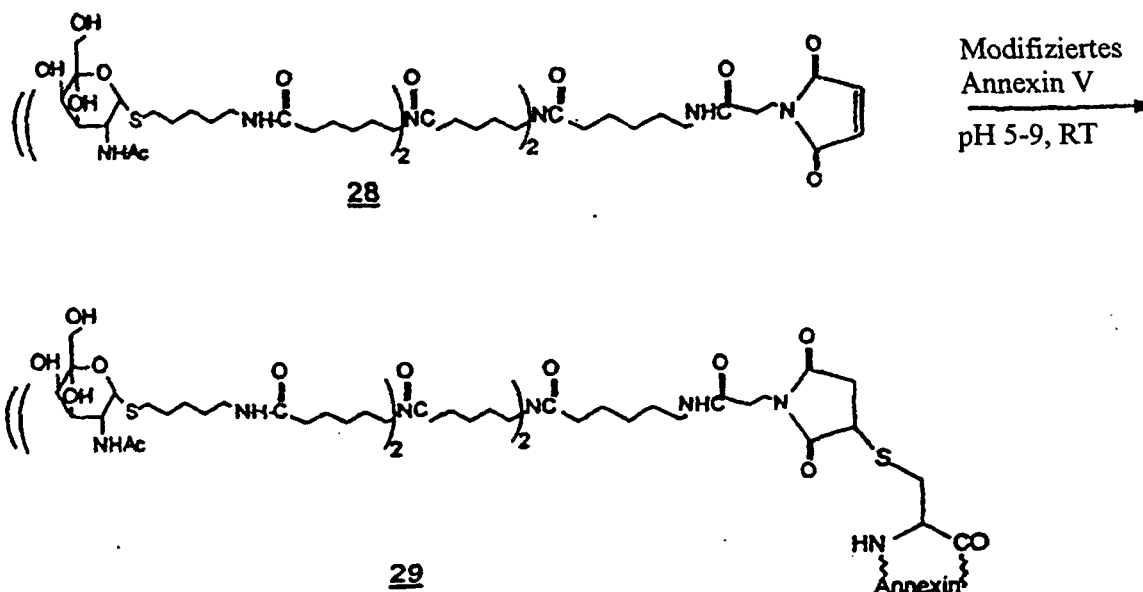


C. Kupplung von Zucker an Cluster





E. Konjugation von modifiziertem Annexin V (Monomer) mit Verbindung 28



Herstellung von 1-b 3 4 6-Tetra-O-Acetyl-N-acetyl-galactosamin (2)

[0272] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 25,0 g (116 mMol) Galactosaminhydrochlorid (1, Sigma Chemical Co., St. Louis, Missouri) befüllt war, wurden 180 ml wasserfreies Pyridin und danach 115 ml Essigsäureanhydrid (1,22 Mol) zugesetzt. Die Mischung wurde 44 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach in einen 2 Liter-Becher, der 600 g Eis und 600 ml entionisiertes Wasser enthielt, gegossen. Die Mischung wurde 10 bis 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach vakuumfiltriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 4 × 100 ml Aliquots entionisiertem Wasser gespült, 2 h lang an der Luft getrocknet und danach 14 h lang unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) getrocknet. Dies ergab 39,8 g des Produktes in Form eines weißen Feststoffes (88 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); d 7,89 (1H, d), 5,63 (1H, d), 5,16 (1H, d), 5,07 (1H, dd), 4,28 bis 3,92 (4H, m), 2,11 (3H, s), 2,02 (3H, s), 1,99 (3H, s), 1,90 (3H, s) und 1,88 (3H, s) ppm.

Herstellung von 3,4,6,-Tri-O-Acetyl-N-acetyl-Galactosamin-1-b-nseudothioharnstoffhydrochlorid (4)

[0273] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 39,8 g (102 mMol) 2 befüllt war, wurden 400 ml Acetylchlorid zugesetzt. Die Mischung wurde 64 h lang bei 47 bis 48 °C gerührt. Die Mischung wurde konzentriert und danach zweimal mit 200 ml Methylenchlorid verdünnt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) erneut konzentriert. Dies ergab 40,2 g des Rohproduktes (3) in Form eines dunkel-bernsteinfarbenen schaumigen Feststoffes: ¹H-NMR(CDCl₃); d 6,24 (1H, d), 5,61 (1H, d), 5,43 (1H, dd), 5,27 (1H, dd), 4,83 bis 4,71 (1H, m), 4,48 (1H, t), 4,22 bis 4,01 (2H, 2 dd), 2,15 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,00 (3H, s) und 1,98 (3H, s) ppm. Dem rohen Chlorid (3) in einem 1 Liter-Rundkolben wurden 9,3 g (122 mMol) Thioharnstoff und 150 ml Aceton zugesetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluß 40 Minuten lang gerührt und danach in einem Eisbad 30 Minuten lang abgekühlt und danach vakuumfiltriert. Die gesammelten Feststoffe wurden mit 2 × 75 ml Aliquots Aceton gespült. Die Feststoffe wurden danach 45 Minuten lang an der Luft getrocknet und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) 2 h lang getrocknet; dies ergab 33,0 g des Produktes (4) in Form eines hellbeigen Feststoffes (74% Gesamtausbeute aus 7): ¹H-NMR (d₆-DMSO); d 9,38 und 9,12 (2 breite Singletts, 3H), 8,36 (1H, d), 5,56 (1H, d), 5,34 (1H, d), 5,01 (1H, dd), 4,38 (1H, t), 4,22 bis 4,00 (3H, m), 2,11 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,92 (3H, s) und 1,81 (3H, s) ppm.

Herstellung von 1-b-Mercapto-3,4 6-tri-O-acetyl-N-acetyl-N-acetyl-galactosamin (5)

[0274] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 30,0 g (67,9 mMol) des Pseudothioharnstoffes (4) in 175 ml Methylenchlorid und 175 ml entionisiertem Wasser befüllt war, wurden 7,08 g (37,24 mMol) Natriummetabisulfit zugesetzt und anschließend vorsichtig 10,2 g (74,5 mMol) Kaliumcarbonat zugesetzt. Die Mischung wurde 40 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und die Mischung wurde danach in einen 500 ml-Scheidetrichter überführt. Die Schichten wurden getrennt und die wäßrige Phase wurde danach mit 2 × 125 ml Aliquots Methylenchlorid gewaschen. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Natriumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Dies ergab 24,2 g (5) in Form eines sehr blassgelben (cremefarbenen) Feststoffes (98 %): ¹H-NMR (CDCl₃); d 6,24 (1H, d), 5,61 (1H, d), 5,43 (1H, dd), 5,27 (1H, dd), 4,83 bis 4,71 (1H,

m), 4,48 (1H, t), 4,22 bis 4,01 (2H, 2 dd), 2,15 (3H, s), 2,02 (3H, s), 2,00 (3H, s) und 1,98 (3H, s) ppm.

Herstellung von N-BOC-S-Aminopentanol (7)

[0275] Einem 2 Liter-Dreihals-Rundkolben, der an dem mittleren Hals mit einem 500 ml Zugabe-Trichter und an einem Seitenhals mit einem Übergangsstück zum Entlüften eines Gasblasenzählers ausgestattet war, wurden 40 g (0,388 Mol) 5-Aminopentanol (6) in 500 ml trockenem Acetonitril zugesetzt. Danach wurden 84,5 g (0,387 Mol) Di-*t*-butyldicarbonat in 400 ml trockenem Acetonitril über einer Zeitdauer von 50 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde 15 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 600 ml Ethylacetat verdünnt und mit 2 × 200 ml Aliquots 0,5 N wässriger HCl und 2 × 200 ml Aliquots entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und zunächst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 74,5 g des Produktes (7) in Form eines nahezu farblosen Öls (88 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 6,72 (1H, breites Triplett), 4,31 (1H, t), 3,43 bis 3,27 (2H, m), 2,87 (2H, Quartett), und 1,45 bis 1,10 (15H, s und Multiplett) ppm; ¹H-NMR (CDCl₃); δ 4,58 (1H, breites Singlett), 3,65 (2H, t), 3,13 (2H, Quartett) und 1,70 bis 1,30 (15H, Singlett und Multiplett) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,28 (Methylenchlorid/Methanol (95:5)).

Herstellung von N-BOC-5-Aminopentyltoluolsulfonat (8)

[0276] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 74,5 g (0,366 mol) N-BOC-Aminopentanol (7) in 400 ml Methylenchlorid befüllt war, wurden 45 ml wasserfreies Pyridin und anschließend 74,1 g (0,389 Mol) *p*-Toluolsulfonylchlorid zugesetzt. Die Mischung wurde 17 h lang bei Raumtemperatur gerührt, mit 200 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 400 ml 0,5 N HCl, 2 × 200 ml Aliquots 0,5 N HCl und 2 × 100 ml Aliquots entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (11 × 23 cm) chromatographiert, zunächst mit Methylenchlorid und danach mit Ethylacetat/Methylenchlorid (3 : 97) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zunächst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 82,13 g des Produktes (8) in Form eines weißen Feststoffes: ¹H-NMR (CDCl₃); δ 7,77 (2H, d), 7,31 (2H, d), 4,45 (1H, breites Singlett), 3,98 (2H, t), 3,03 (2H, t), 2,41 (3H, s) und 1,80 bis 1,20 (15H, Singlett und Multiplett) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,50 (Ethylacetat/Methylenchlorid (3 : 97)).

Herstellung von 3,4,6-Tri-O-acetyl-N-acetylgalactosamin-1- α -S-[5'-thiopentyl-N-BOC-amin] (9)

[0277] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 24,2 g (66,6 mMol) des Thiols (5) unter Stickstoffatmosphäre befüllt war, wurden 350 ml trockenes Acetonitril zugesetzt. Die Mischung wurde über eine Zeitdauer von 20 Minuten auf 40 bis 42 °C erhitzt, bis sich letztendlich die Feststoffe gelöst hatten. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU; im Handel erhältlich von der Firma Aldrich Chemical Company; 10,5 ml, 70,2 mMol) wurden danach zugesetzt und die Mischung wurde 20 Minuten lang gerührt. Danach wurden 24,0 g (67,1 mMol) des Tosylats 6 in 75 ml Acetonitril über eine Zeitdauer von 3 bis 4 Minuten zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde 1,5 h lang bei 40 bis 25°C gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 400 ml Methylenchlorid verdünnt und zuerst mit 250 ml 0,5 N wässriger HCl und danach mit 250 ml einer 5% igen wässrigen Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesium getrocknet, vakuumfiltriert und mittels eines Rotationsverdampfers konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (21 × 7 cm) (hergestellt von der Firma E.M. Merck) chromatographiert und mit Ethylacetat/Hexan/Ethanol (55 : 42,5 : 2,5) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt, konzentriert und erneut chromatographiert an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (21 × 7 cm) (hergestellt von der Firma J.T. Baker) und mit jeweils 500 ml Methanol/Wasser im Verhältnis 50 : 50; 55 : 45; 60 : 40; 65 : 35 und 70 : 30 und anschließend mit Methanol/Wasser (75 : 25) eluiert, bis das gesamte Produkt von der Säule eluiert war. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Methylenchlorid verdünnt und mit wasserfreiem Magnesiumsulfat behandelt. Die Mischung wurde vakuumfiltriert und das Filtrat wurde zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 17,9 g des Produktes (9) in Form eines schaumigen weißen Feststoffes: ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 9,38 und 9,12 (2 breite Singletts, 3H), 8,36 (1H, d), 5,56 (1 H, d), 5,34 (1H, d), 5,01 (1H, dd), 4,38 (1H, t), 4,22 bis 4,00 (3H, m), 2,11 (3H, s), 2,01 (3H, s), 1,92 (3H, s) und 1,81 (3H, s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit *p*-Anisaldehyd-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,50 (Ethylacetat/Hexan/Ethanol (57 : 40,5 : 2,5)); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,21 (Methanol/Wasser (65 : 35)).

Herstellung von Methyl-6-bromhexanoat (12)

[0278] In einen 2 Liter-Rundkolben, der mit 99,7 g (0,511 Mol) 6-Bromhexanoat (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, Wisconsin) und 1 Liter Methanol befüllt war, wurde 1 bis 2 Minuten lang Chlorwasserstoffgas eingeblasen. Die Mischung wurde 18 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und mit 150 ml entionisiertem Wasser, 200 ml gesättigtem Natriumbicarbonat und danach nochmals mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde unter Vakuum destilliert und dies ergab 99,6 g des Produktes (12) in Form eines farblosen Öls (93 %): Siedepunkt = 93 bis 96 °C bei 3 mm Hg: ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,57 (3H, s), 3,51 (2H, t), 2,30 (2H, t), 1,78 (2H, Pentett) und 1,62 bis 1,28 (4H, m) ppm.

Herstellung von Methyl-6-aminohexanoat-hydrochlorid (14)

[0279] In einen 2 Liter-Rundkolben, der mit 101,3 g (0,722 Mol) 6-Aminohexanoat (13) (Aldrich Chemical Co.) in 1 Liter Methanol befüllt war, wurde 3 bis 4 Minuten lang Chlorwasserstoffgas eingeblasen. Die Mischung wurde 16 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde zweimal mit 500 ml Methanol verdünnt und erneut konzentriert (< 0,5 mm Hg). Man erhielt 140,1 g des Produktes (14) in Form eines weißen Feststoffes (100 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 9,40 (1H, breites Triplet), 3,57 (3H, s), 3,15 (2H, Quartett), 2,29 (2H, t), 1,60 bis 1,38 (4H, m) und 1,32 bis 1,19 (2H, m) ppm.

Herstellung von Methyl-6-trifluoracetamido-)hexanoat (15)

[0280] Einen 2 Liter-Rundkolben, der mit 100,2 g (0,552 Mol) Aminhydrochlorid (14) und 1 Liter Methanol befüllt war, wurden 100 g (0,703 Mol) Ethyltrifluoracetat und anschließend 120 ml (0,861 Mol) Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 19 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und danach filtriert. Das Filtrat wurde mit 3 × 300 ml Aliquots 1 N wässriger HCl, 200 ml entionisiertem Wasser, 2 × 200 ml Aliquots gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung und letztendlich mit 200 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde unter Vakuum destilliert und ergab 115,8 g des Produktes (15) in Form eines farblosen Öls: Siedepunkt = 113 bis 116 °C bei 120 mm Hg: ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,57 (3H, s), 2,75 (2H, m), 2,29 (2H, t), 1,60 bis 1,40 (4H, m) und 1,37 bis 1,19 (2H, m) ppm.

Herstellung von N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)amin-hydrochlorid (18)

[0281] Einem 5 Liter-Dreihalskolben, der mit einem Rückfluskkühler ausgestattet war, der mit einem Gasblaszähler verbunden war, und der mit 20,9 g 60 % Natriumhydroxid (0,523 Mol) in 1 Liter wasserfreiem Dioxan befüllt war, wurden 100 g (0,416 Mol) sekundäres Amid 15 in 200 ml trockenem Dioxan über eine Zeitdauer von 20 Minuten zugesetzt. Die Mischung wurde 1 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt, und danach wurden 130 g (0,622 mol) Bromid 12 in 100 ml Dioxan zugesetzt. Die Mischung wurde unter Rückfluß erhitzt und 7 h lang gerührt. Zusätzlich wurden 10 g der Verbindung 12 zugesetzt, und die resultierende Mischung wurde für weitere 15 h gerührt. Die Mischung wurde abgekühlt und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 600 ml 1 N wässriger HCl verdünnt und mit 1 Liter Ethylacetat extrahiert. Die organische Phase wurde danach mit 250 ml entionisiertem Wasser, 250 ml 5 % wässriger Natriumbisulfid-Lösung und letztendlich mit 250 ml entionisiertem Wasser gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert.

[0282] Der Rückstand wurde mit 300 ml entionisiertem Wasser und 500 ml Methanol verdünnt und mit 200 ml 10 N wässrigem Natriumhydroxid behandelt. Die Mischung wurde 16 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt und mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Sirup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 800 ml entionisiertem Wasser verdünnt und mit 200 ml konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 1 bis 2 angesäuert. Die Mischung wurde danach mit 3 × 300 ml Aliquots Diethylether gewaschen und die wässrige Phase wurde danach mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Sirup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter trockenem Methanol verdünnt und mittels Rotationsverdampfung erneut konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter trockenem Methanol verdünnt und danach wurde Chlorwasserstoffgas 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen. Die Mischung wurde 18 h lang bei 20 bis 30 °C gerührt, und danach durch eine Celite-Filter (hergestellt durch die Firma J.T. Baker) vakuumfiltriert. Die Feststoffe wurden mit 200 ml Methanol gespült. Die vereinigten Filtrate wurden konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter Methanol verdünnt und Chlorwasserstoffgas wurde erneut 2 bis 3 Minuten lang in die Mischung eingeblasen. Die Mischung wurde 3 h lang gerührt und danach

konzentriert. Der Rückstand wurde mit 1 Liter Methanol verdünnt und 10 g Aktivkohle wurden zugesetzt. Die Mischung wurde 30 Minuten lang gerührt und danach durch eine Celite-Filter vakuumfiltriert. Die Feststoffe wurden mit 100 ml Methanol gewaschen und die vereinigten Filtrate wurden konzentriert. Der Rückstand wurde in heißem 2-Propanol gelöst und man ließ ihn danach erneut, zuerst bei Raumtemperatur und dann mittels Verwendung eines Eisbades, kristallisieren. Die Feststoffe wurden filtriert und mit 3 × 75 ml Aliquots kaltem 2-Propanol gespült. Die Feststoffe wurden an der Luft getrocknet; dies ergab 70,5 g des Produktes (18) in Form eines weißen Feststoffes. Die Filtrate wurden vereinigt und konzentriert. Der Rückstand wurde erneut in 200 ml 2-Propanol kristallisiert und ergab zusätzlich 15,3 g des Produktes von insgesamt 85,8 g (67 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 8,69 (2H, breit), 3,57 (6H, s), 2,82 (4H, m), 2,30 (4H, t), 1,67 bis 1,43 (8H, m) und 1,28 bis 1,19 (4H, m) ppm; ¹H-NMR (CD₃OD); δ 3,66 (6H, s), 3,42 (4H, t), 2,34 (4H, t), 1,75 bis 1,55 (8H, m) und 1,45 bis 1,25 (4H, m) ppm.

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)amin (19)

[0283] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 6,34 g (29,1 mMol) Di-t-butylidicarbonat und 9,00g (29,1 mMol) N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)amin-hydrochlorid (18) befüllt war, wurden 125 ml wasserfreies Acetonitril und anschließend 7,5 ml Triethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 22 h lang bei Raumtemperatur gerührt und anschließend mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 300 ml Ethylacetat verdünnt und mit 2 × 100 ml Aliquots 0,1 N wässrige HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und 100 ml einer 5 %igen wässrigen Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 10,5 g des Produktes (19) als nahezu farbloses Öl (97 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,57 (6H, s), 3,07 (4H, t), 2,28 (4H, t), 1,60 bis 1,10 und 1,37 (21H, m und s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, R_f = 0,33 (Ethylacetat/Hexan (20 : 80)); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,17 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(5-hydroxycarbonylpentyl-)amin (20)

[0284] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 10,5 g Bis-methylester 19 befüllt war, wurden 75 ml Methanol und anschließend 75 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid zugesetzt. Die Mischung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 75 ml entionisiertem Wasser verdünnt und der pH-Wert der resultierenden Lösung wurde durch langsame Zugabe von etwa 75 ml 1 N wässriger HCl auf 2 bis 2,5 eingestellt. Danach wurden 200 ml Ethylacetat zugesetzt und die Mischung wurde 3 Minuten lang heftig gerührt. Die Mischung wurde in einen Scheidetrichter überführt und die Schichten wurden getrennt. Die wässrige Phase wurde mit 2 × 150 ml Aliquots Ethylacetat extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet und vakuumfiltriert. Die Filtrate wurden zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck (< 0,5 mm Hg) konzentriert; dies ergab 9,52 g des Produktes in Form eines viskosen, nahezu farblosen Öls (98 %): ¹H-NMR (d₆-DMSO); δ 3,07 (4H, t), 2,28 (4H, t), 1,58 bis 1,10 und 1,37 (21H, m und s) ppm: Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); RP-18-Silica-Gel, R_f = 0,44 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung von N-BOC-N N-Bis-(N',N'-bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)5-carbamylpentyl-)amin (21)

[0285] Einem 1 Liter-Rundkolben, der mit 9,52 g (27,6 mMol) Bis-Säure (16) in 250 ml wasserfreiem Dimethylformamid befüllt war, wurden 19,0 g (61,3 mMol) N,N-Bis-(5-methoxycarbonylpentyl-)amin-hydrochlorid (18) und anschließend 30 ml Triethylamin zugesetzt. Während die Mischung gerührt wurde, wurden 25,7 g (58,1 mMol) BOP zugesetzt. Die resultierende Mischung wurde 14 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde mit 750 ml Ethylacetat verdünnt und mit 250 ml 0,2 N wässriger HCl, 100 ml 0,1 N wässriger HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und 2 × 100 ml Aliquots 5 %iger wässriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer Silica-Gel-Säule (9 × 21 cm) chromatographiert und zuerst mit 70 % Ethylacetat/Hexan und danach mit 100 % Ethylacetat eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt (21) enthielten, wurden vereinigt und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (7 × 23 cm) chromatographiert und zuerst mit Methanol/Wasser (75 : 25), danach mit Methanol/Wasser (80 : 20) und letztendlich mit Methanol/Wasser (85 : 15) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Der Rückstand wurde mit 500 ml Diethylether verdünnt und die resultierende Lösung wurde mit wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet. Die Mischung wurde vakuumfiltriert und das Filtrat wurde zuerst mittels Rotati-

onsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert; dies ergab 17,80 g des Produktes (21) in Form eines nahezu farblosen, viskosen Öls (75 %): $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 3,57 (12H, s), 3,18 und 3,07 (12H, 2t), 2,32 bis 2,16 (12H, m), 1,61 bis 1,09 und 1,37 (45H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, Rf = 0,50 (Ethylacetat); RP-18-Silica-Gel, Rf = 0,30 (Methanol/Wasser (85 : 15)).

Herstellung von N-BOC-N,N-Bis-(N',N'-bis-(5-hydroxycarbonylpentyl)-5-carbamyl-pentyl)amin (22)

[0286] Einem 500 ml-Rundkolben, der mit 7,88 g (9,20 mMol) Tetramethylester (21) in 75 ml Methanol befüllt war, wurden 70 ml 1 N wässriges Natriumhydroxid zugesetzt. Die Mischung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach mittels Rotationsverdampfung zu einem dicken Sirup konzentriert. Der Rückstand wurde mit 50 ml entionisiertem Wasser verdünnt und unter heftigem Rühren wurde der pH-Wert der Lösung durch langsame Zugabe von etwa 70 ml 1 N wässriger HCl auf 2 bis 2,5 eingestellt, wobei das Produkt (22) in dem Verfahren als Öl austrat (eine flüssige Phase trennte sich von einer anderen flüssigen Phase). Die Mischung wurde mit 200 ml 2-Propanol/Methylenchlorid (3 : 1) und anschließend mit 3 \times 100 ml Aliquots 2-Propanol/Methylenchlorid (3 : 1) extrahiert. Die organischen Extrakte wurden vereinigt, über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, filtriert und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dies ergab 7,70 g eines nahezu farblosen dicken Sirups, der aus 6,93 g des erwünschten Produktes (22; 94 %) und 0,77 g 2-Propanol bestand (durch NMR-Integration): $^1\text{H-NMR}$ (d_6 -DMSO); δ 3,18 und 3,07 (12H, 2 t), 2,37 bis 2,12 (12H, m), 1,60 bis 1,10 und 1,37 (45H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); RP-18-Silica-Gel, Rf = 0,50 (Methanol/Wasser (70 : 30)).

Herstellung eines N-BOC-Tet-Gal-Nac-1-a-S-C5-Zweiges (23)

[0287] Einem 250 ml-Rundkolben, der mit 4,05 g (7,38 mMol) 3,4,6-Tri-O-acetyl-N-acetyl-galactosamin-1-a-S-[5'-thiopentyl-N-BOC-amin] (9) befüllt war, wurden 20 ml Methylenchlorid und anschließend 20 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde mittels Rotationsverdampfung konzentriert und der Rückstand wurde dreimal mit 75 ml Methylenchlorid verdünnt und erneut konzentriert; dies ergab 6,27 g Rückstand, nämlich eine Mischung aus dem erwünschten Produkt (10) und restlicher Trifluoressigsäure: $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD); δ 5,61 (1H, d), 5,41 (1H, dd), 5,01 (1H, dd), 4,62 bis 4,47 (2H, m), 4,11 (2H, d), 2,91 (2H, t), 2,74 bis 2,48 (2H, m), 2,11 (3H, 2 s), 2,00 (3H, s), 1,93 und 1,91 (6H, 2 s) und 1,37 bis 1,10 (6H, m) ppm. Einem separaten 250 ml-Rundkolben, der mit 1,33 g des Sirups, der 90 Gew.-% der Verbindung 20 enthielt (netto 1,20 g; 1,50 mMol) befüllt war, wurden 50 ml wasserfreies Dimethylformamid zugesetzt. Um das restliche 2-Propanol zu entfernen, wurde die Mischung zuerst mittels Rotationsverdampfung und anschließend unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dem Rückstand wurden 20 ml wasserfreies Dimethylformamid und 10 ml trockenes Triethylamin zugesetzt. Der resultierenden gerührten Lösung wurde eine Dimethylformamid-Lösung des Rohproduktes 10 (insgesamt 30 ml wasserfreies Dimethylformamid) zugesetzt und die resultierende Mischung wurde 2 h lang bei Raumtemperatur gerührt. Die Mischung wurde danach mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde danach mit 250 ml Methylenchlorid verdünnt und mit 2 \times 100 ml Aliquots 1 N wässriger HCl, 100 ml entionisiertem Wasser und danach mit 100 ml gesättigter wässriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die organische Phase wurde über wasserfreiem Magnesiumsulfat getrocknet, vakuumfiltriert und mittels Rotationsverdampfung konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (5,5 \times 19 cm) chromatographiert und mit jeweils 250 ml Methanol/Wasser (65 : 35), Methanol/Wasser (70 : 30), Methanol/Wasser (75 : 25) und anschließend mit 800 ml Methanol/Wasser (80 : 20) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck konzentriert. Dies ergab 3,55 g eines schaumigen weißen Feststoffes (94 %). Dieses Material wurde danach an einer Silica-Gel-Säule (5,5 \times 20 cm) chromatographiert und mit Ethylacetat/Methanol (80 : 20) eluiert. Die Fraktionen, die nur das erwünschte Produkt (23) enthielten, wurden vereinigt und zuerst mittels Rotationsverdampfung und danach unter vollem Vakuumpumpen-Druck ($< 0,5$ mm Hg) konzentriert. Dies ergab 2,83 g des erwünschten Produktes in Form eines rein weißen schaumigen Feststoffes (75 %): $^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD); δ 5,58 (4H, d), 5,42 (4H, dd), 5,01 (4H, dd), 4,63 bis 4,51 (8H, m), 4,20 bis 4,00 (8H, m), 3,35 bis 3,10 (20H, m), 2,73 bis 2,47 (8H, m), 2,32 (4H, t), 2,25 bis 2,08 (20H, m und s), 2,00 (12H, s), 1,93 und 1,91 (24H, 2s), 1,71 bis 1,20 (69H, m und s) ppm; Dünnschichtchromatographie (Sichtbarmachung mit Ninhydrin-Spray und Hitze); Silica-Gel, Rf = 0,47 (Ethylacetat/Methanol (75 : 25)).

[0288] Einer Lösung aus 155 mg 23 in 1,0 ml CH_2Cl_2 wurden 1,0 ml Trifluoressigsäure zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde mit 5 ml CH_2Cl_2 verdünnt und erneut konzentriert. Der Rückstand wurde in 5 ml CH_2Cl_2 gelöst und mit 10 ml

gesättigter wäßriger Natriumbicarbonat-Lösung gewaschen. Die wäßrige Phase wurde zurückextrahiert mit 3 × 5 ml CH₂Cl₂/2-Propanol (3 : 1). Die organischen Phasen wurden vereinigt, über Natriumsulfat getrocknet, filtriert und konzentriert. Der Rückstand wurde dreimal in 5 ml CH₂Cl₂ gelöst und erneut konzentriert; dies ergab 153 mg des Rohproduktes.

[0289] Einer Lösung aus 145 mg des Rohproduktes 24 in 2 ml Methanol wurden 1,0 g AG1-X8-Anionenaustausch-Harz (Biorad; Hydroxid-Form; 2,3 mequiv/g) und anschließend 3 ml entionisiertes Wasser zugesetzt. Die Mischung wurde 16 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach filtriert. Das Harz wurde mit 10 ml Methanol/Wasser (1 : 1) gespült und die vereinigten Filtrate wurden danach konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (3 × 11 cm) chromatographiert und mit Methanol/Wasser/1 N wäßrige HCl (50 : 50 : 0,2) eluiert. Dies ergab 112 mg Produkt (96 %): NMR (D₂O); 6,548 (4H, d), 4,37 bis 4,20 (8H, m), 3,98 (4H, d), 3,87 bis 3,70 (12H, m), 3,40 bis 3,21 (8H, m), 3,15 (8H, t), 3,03 (4H, t), 2,61 (8H, m), 2,40 (4H, t), 2,21 (8H, t), 2,02 (12H, s) und 1,78 bis 1,15 (60H, m) ppm. TLC, R_f = 0,59 (Methanol/Wasser/1 N wäßrige HCl (70 : 30 : 0,2)).

[0290] 1,01 g Maleimidopropionsäure-NHS-Ester 26 in 10 ml trockenem DMF wurden 750 mg 6-Aminocapronsäure und anschließend 1,5 ml trockenes Diisopropylethylamin zugesetzt. Die Mischung wurde 3,5 h lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (3,5 × 18 cm) chromatographiert und mit Methanol/Wasser/1 N wäßrige HCl (40 : 60 : 0,1) und danach mit Methanol/Wasser (50 : 50) eluiert. Die Fraktionen, die das Produkt enthielten, wurden vereinigt und konzentriert. Dies ergab 956 mg des Produktes 27 in Form eines weißen Feststoffes (89 %): NMR (DMSO – 200 MHz); 6,7,90 (1H, t), 7,01 (2H, s), 3,60 (2H, t), 2,98 (2H, Quartett), 2,31 (2H, t), 2,19 (2H, t) und 1,58 bis 1,13 (5H, m) ppm. TLC, R_f = 0,55 (Methanol/Wasser (50 : 50)).

[0291] 10 ml Maleimid-Carbonsäure 27 in 1,0 ml trockenem DMF wurden 100 µl trockenes Diisopropylethylamin und 15 mg BOP zugesetzt. Die Mischung wurde 15 Minuten lang bei Raumtemperatur gerührt und danach wurden 17 mg 25 zugesetzt. Die Mischung wurde zwei Stunden lang bei Raumtemperatur gerührt und danach konzentriert. Der Rückstand wurde an einer RP-18-Silica-Gel-Säule (2,5 × 16 cm) chromatographiert und mit Methanol/Wasser (60 : 40 : 0,2) eluiert. Dies ergab 6,5 mg des Produktes 28 (34 %): NMR (CD₃OD – 200 MHz); 6,6,83 (2H, s), 5,53 (4H, d), 4,41 (4H, dd), 4,18 (4H, t), 3,90 (4H, d), 3,81 bis 3,67 (12H, m), 3,33 (12H, m), 3,15 (10H, t), 2,60 (8H, m), 2,38 (6H, m), 2,19 (8H, m), 1,97 (12H, s) und 1,75 bis 1,20 (66H, m) ppm.

C. Konjugation von Annexin V-SH mit Verbindung 28

[0292] Die Konjugation von Annexin an den Maleimidyl-4-mer-Zucker-Cluster bedingt die Inkubation von Annexin V-SH mit Dithiothreitol (DTT), um sicherzustellen, daß die Sulfhydryl-Einheit des Annexins vollständig reduziert wird, die Reinigung durch Größen-Ausschlußchromatographie, um überschüssiges DTT zu entfernen, und anschließend die sofortige Umsetzung mit dem Maleimidyl-Agens.

[0293] Insbesondere wurden 2,25 ml Annexin V-SH (4,1 mg pro ml 10 mMol MES-Puffer, pH 6,0, der 150 mMol Natriumchlorid enthielt) (d.h. 0,26 µMol) wurden 45 µMol DTT in 0,05 ml Wasser zugesetzt, um eine Endlösung von 20 mMol DTT zu erhalten. Nach Inkubation bei Raumtemperatur für eine Zeitdauer von 30 Minuten wurden 1,1 ml Aliquots der Reaktionslösung auf PD-10-Sephadex^R-Größen-Ausschlußchromatographie-Säulen aufgetragen, die zuvor mit einem mit Stickstoff gesättigten 30 mMol Natriumphosphat-Puffer, pH-Wert: 6,75, der 150 mMol Natriumchlorid enthielt, equilibriert worden waren. Die 2,4 bis 4,8 ml-Fraktionen aus jeder Säule wurden danach gepoolt und sofort danach wurden 2,6 µMol (5,7 mg) der festen Verbindung 26 zugesetzt. Nach dem Rühren, um alles aufzulösen, wurde die Reaktionsmischung 2 h lang bei Raumtemperatur inkubiert und danach erschöpfend gegen eine mit Phosphat gepufferte Kochsalzlösung dialysiert.

[0294] Um die Derivatisierung zu bestätigen, wurde eine Matrix-unterstützte Laser-Desorptions-Ionisation (MALDI) an mit destilliertem Wasser dialysiertem Konjugat durchgeführt, die eine Spezies mit einem MW von 38.548 (m/e) anzeigte, was auf ein 1 : 1-Konjugat hinwies.

Patentansprüche

1. Modifiziertes Annexin, das ein Annexin umfaßt, das modifiziert ist, um eine zugängliche Sulfhydrylgruppe bereitzustellen.

2. Konjugat, das umfaßt:
ein modifiziertes Annexin nach Anspruch 1, wobei die Modifikation eine zugängliche Sulfhydrylgruppe bereit-

stellt; und

eine Hexose-Einheit, die von einem Säugerleberrezeptor erkannt wird, wobei die Hexose-Einheit an das Annexin konjugiert ist.

3. Konjugat nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die zugängliche Sulfhydrylgruppe durch Cystein bereitgestellt ist.

4. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat weiter umfaßt: einen N_xS_y Chelatbildner, wobei die Hexose-Einheit direkt oder über den Chelatbildner an das modifizierte Annexin konjugiert ist und der Chelatbildner direkt oder über die Hexose-Einheit an das modifizierte Annexin konjugiert ist.

5. Konjugat nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat die folgende Konfiguration hat: Hexose-Einheit – modifiziertes Annexin V – Chelatbildner oder Chelatbildner – Hexose-Einheit – modifiziertes Annexin V oder Chelatbildner – spaltbarer Linker – Hexose-Einheit – modifiziertes Annexin V.

6. Konjugat nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat weiter ein Radionuklid umfaßt, das direkt an das modifizierte Annexin komplettiert ist.

7. Konjugat, das umfaßt:
ein Annexin-Multimer nach Anspruch 1; und
einen an das Annexin konjugierten N_xS_y Chelatbildner.

8. Konjugat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Multimer zwei oder mehr modifizierte Annexin-Moleküle umfaßt, die durch Disulfidbindungen zwischen einer oder mehreren der zugänglichen Sulfhydrylgruppen auf den entsprechenden Annexinen verknüpft sind.

9. Konjugat nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß das Multimer ein Dimer ist.

10. Konjugat nach Anspruch 7 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat die folgende Konfiguration hat:
Hexose-Einheit – Multimer – Chelatbildner
oder Chelatbildner – Hexose-Einheit – Multimer.

11. Konjugat nach Anspruch 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der N_xS_y Chelatbildner ein Esterase-sensitiver N_xS_y -Chelatbildner ist.

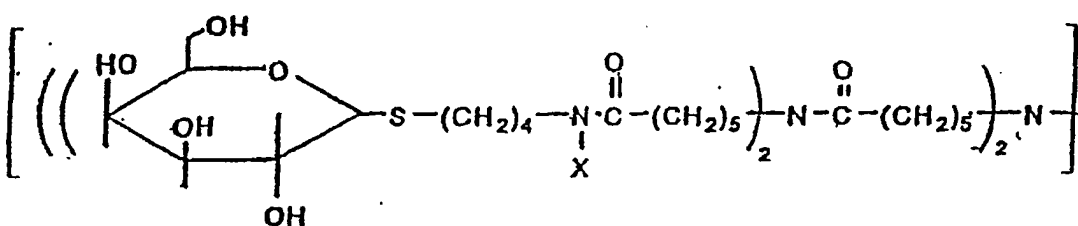
12. Konjugat nach Anspruch 7, das weiter umfaßt: eine Hexose-Einheit, die von einem Säureleberrezeptor erkannt wird, wobei die Hexose-Einheit direkt oder über den Chelatbildner an das Multimer oder Annexin konjugiert ist und der Chelatbildner direkt oder über die Hexose-Einheit an das Multimer oder Annexin konjugiert ist.

13. Konjugat nach Anspruch 2 oder 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Hexose-Einheit einen Cluster umfaßt, der wenigstens drei Hexose-Reste enthält, verbunden in einer verzweigten Konfiguration, und daß der Cluster an einem einzigen Verknüpfungspunkt an das Annexin konjugiert ist.

14. Konjugat nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Hexose-Reste unabhängig ausgewählt sind aus Galactose, Mannose, Mannose-6-phosphat, N-Acetylglucosamin, Pentamannosylphosphat, Glucose, N-Galactosamin, N-Acetylgalactosamin, Thioglykosiden von Galactose, D-Galaktosiden und Glucosiden.

15. Konjugat nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Hexose-Rest N-Acetylgalactosamin ist.

16. Konjugat nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß der Cluster:



umfaßt, worin X H oder CH_3 ist.

17. Konjugat nach Anspruch 5 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat weiter einen spaltbaren Linker zwischen dem Chelatbildner und der Hexose-Einheit umfaßt.

18. Konjugat nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der spaltbare Linker ausgewählt ist aus Monosacchariden, Polysacchariden, Polyaminosäuren, Hydroxyalkylacrylamiden, Polyethylenglykol-basierten hydrophilen Polymeren, biologisch abbaubaren Polymeren, die eine Ether- oder Esterverknüpfung enthalten, Dextran oder Hemisuccinylestern.

19. Konjugat nach Anspruch 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat die folgende Konfiguration hat:
Chelatbildner – spaltbarer Linker – Multimer.

20. Konjugat nach einem der Ansprüche 2 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Annexin Annexin V ist.

21. Konjugat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäure an Position 316 des Annexins zu Serin mutiert ist.

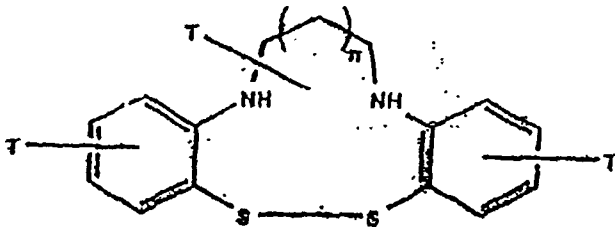
22. Konjugat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation des Annexins eine Aminosäureverlängerung am N-Terminus umfaßt, wobei die Aminosäureverlängerung die zugängliche Sulfhydrylgruppe umfaßt.

23. Konjugat nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Verlängerung wenigstens etwa zehn Aminosäuren, vorzugsweise wenigstens sechs Aminosäuren umfaßt.

24. Konjugat nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß die zugängliche Sulfhydrylgruppe durch Cystein bereitgestellt ist.

25. Konjugat nach einem der Ansprüche 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der N_xS_y -Chelatbildner ein N_2S_2 -Chelatbildner ist.

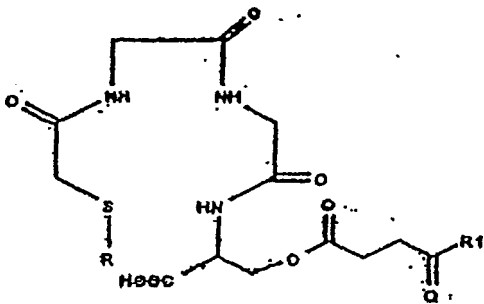
26. Konjugat nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß der N_2S_2 -Chelatbildner die folgende Formel aufweist:



worin T H, CH_3 ist oder eine funktionelle Gruppe trägt und n 0 oder 1 ist.

27. Konjugat nach einem der Ansprüche 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der N_xS_y -Chelatbildner ein N_3S -Chelatbildner ist.

28. Konjugat nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der N_3S -Chelatbildner die folgende Formel aufweist:



worin R Ethoxyethyl ist und R' Tetrafluorphenyl ist.

29. Konjugat nach einem der Ansprüche 4 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Konjugat weiter ein Radionuklid umfaßt, das durch den Chelatbildner komplettiert ist.
30. Konjugat nach einem der Ansprüche 6 oder 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid ausgewählt ist aus F-18, Cu-64, Ga-67, Ga-68, Re-186, Re-188, I-123, I-125, Cu-67, Tc-99m, Tc-94, Ru-95 und In-111.
31. Konjugat nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid Technetium-99m ist.
32. Konjugat nach einem der Ansprüche 2, 4, 7, 29 oder 30 zur Verwendung in einem diagnostischen oder therapeutischen Verfahren.
33. Konjugat nach einem der Ansprüche 2, 4, 7, 29 oder 30 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines vaskulären oder kardialen Zustandes.
34. Für direkte radioaktive Markierung geeignetes modifiziertes Annexin, das ein Annexin umfaßt, das modifiziert ist, um eine zugängliche Sulfhydrylgruppe bereitzustellen, die an der Komplexierung eines Radionuklids teilnehmen kann.
35. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Modifikation des Annexins eine Aminosäureverlängerung am N-Terminus umfaßt, wobei besagte Aminosäureverlängerung die zugängliche Sulfhydrylgruppe umfaßt.
36. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Sulfhydrylgruppe innerhalb von zehn Aminosäuren vom N-Terminus liegt.
37. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäureverlängerung weiter Glycin umfaßt.
38. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß die zugängliche Sulfhydrylgruppe durch Cystein bereitgestellt ist.
39. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 38, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäureverlängerung weiter Glycin umfaßt.
40. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 35, dadurch gekennzeichnet, daß das Annexin Annexin V ist.
41. Modifiziertes Annexin nach einem der Ansprüche 35 bis 40, dadurch gekennzeichnet, daß das modifizierte Annexin weiter ein Radionuklid umfaßt, das direkt an das modifizierte Annexin komplexiert ist.
42. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid ein diagnostisches Radionuklid ist.
43. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid F-18, Cu-64, Cu-67, Re-186, Re-188, Pd-100, Pd-109, Bi-212, Pb-212, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, Tc-94, Ru-95, Ru-105, Rh-99, Rh-105, In-111, I-123, I-125, Sm-153, Lu-177, Lu-170, Pt-189, Pt-193, Au-199 oder Hg-197 ist.
44. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid Cu-64, Cu-67, Re-186, Re-188, Pd-100, Pd-109, Bi-212, Pb-212, Ga-67, Ga-68, Tc-99m, Tc-94, Ru-95, Ru-105, Rh-99, Rh-105 oder In-111 ist.
45. Modifiziertes Annexin nach Anspruch 44, dadurch gekennzeichnet, daß das Radionuklid Tc-99m ist.
46. Modifiziertes Annexin nach einem der Ansprüche 34, 35, 41 oder 43 zur Verwendung in einem diagnostischen oder therapeutischen Verfahren.
47. Modifiziertes Annexin nach einem der Ansprüche 34, 35, 41 oder 43 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines vaskulären oder kardialen Zustandes.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

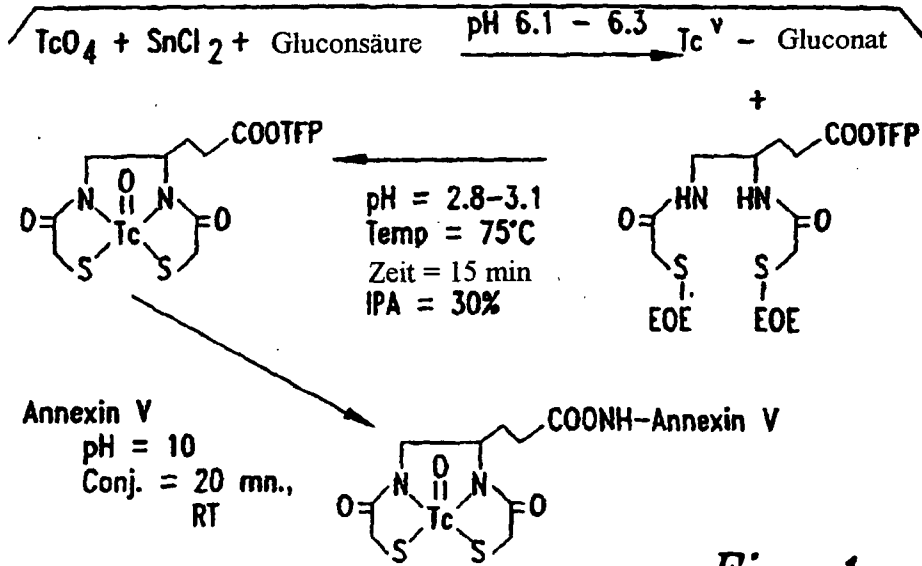


Fig. 1

N, N'- Bis (2-disulfidyl-4-ethoxycarbonylphenyl) - 1,3 - propyldiamin

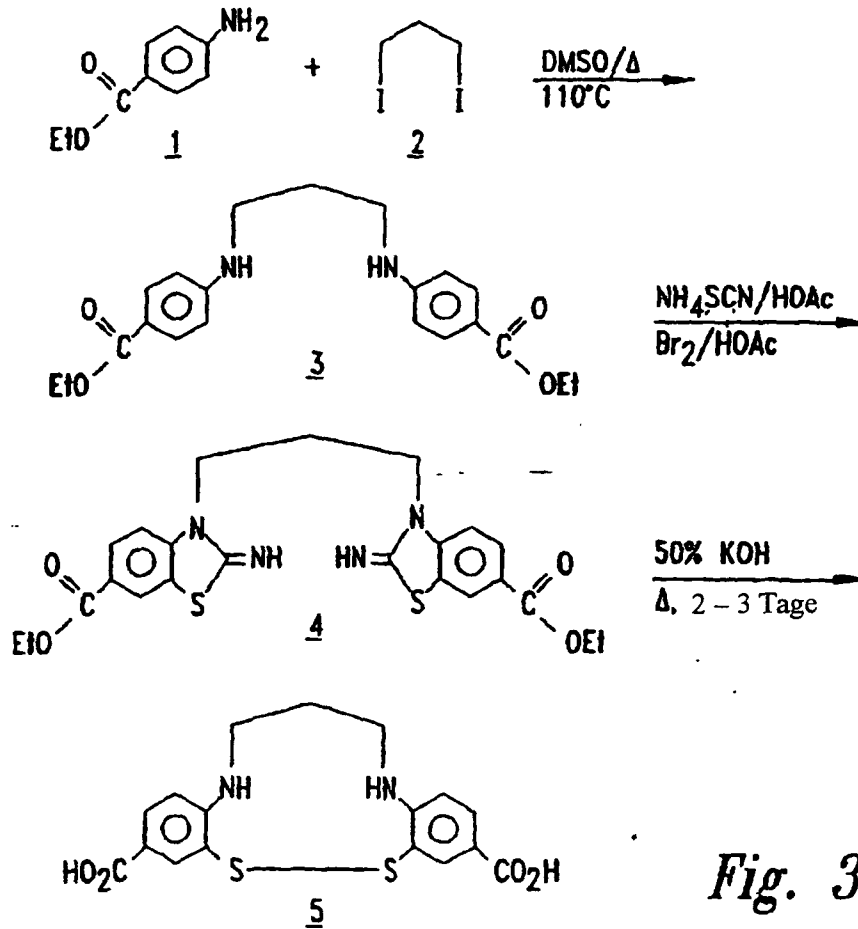


Fig. 3

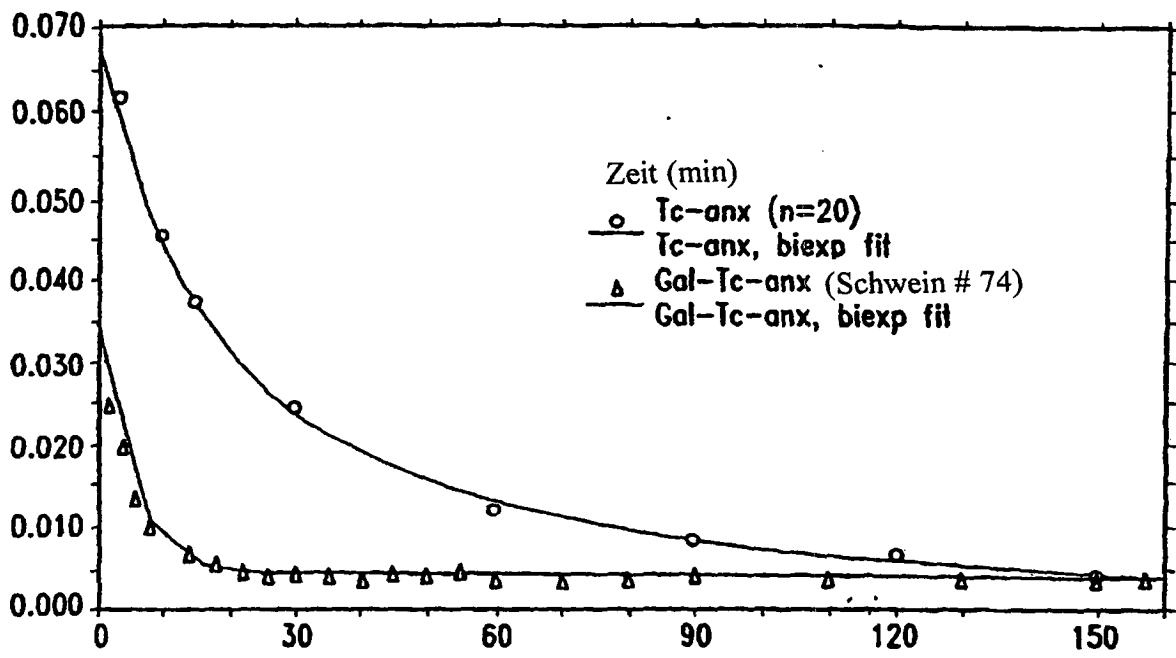


Fig. 2

N, N'- Bis (2-disulfidyl-4-methylphenyl) - γ , γ' - diamino
isovalerat N-hydroxysuccinimid

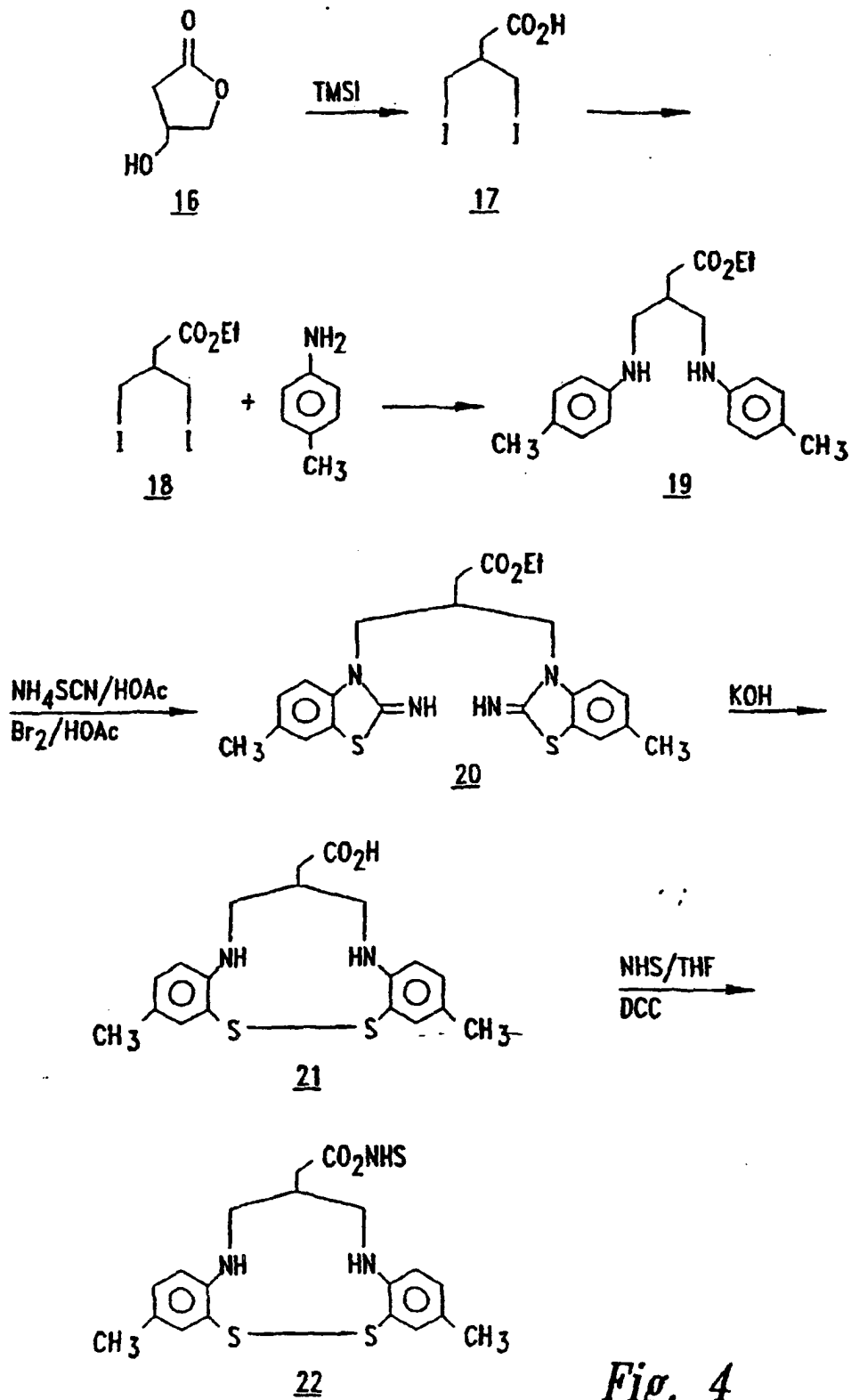


Fig. 4

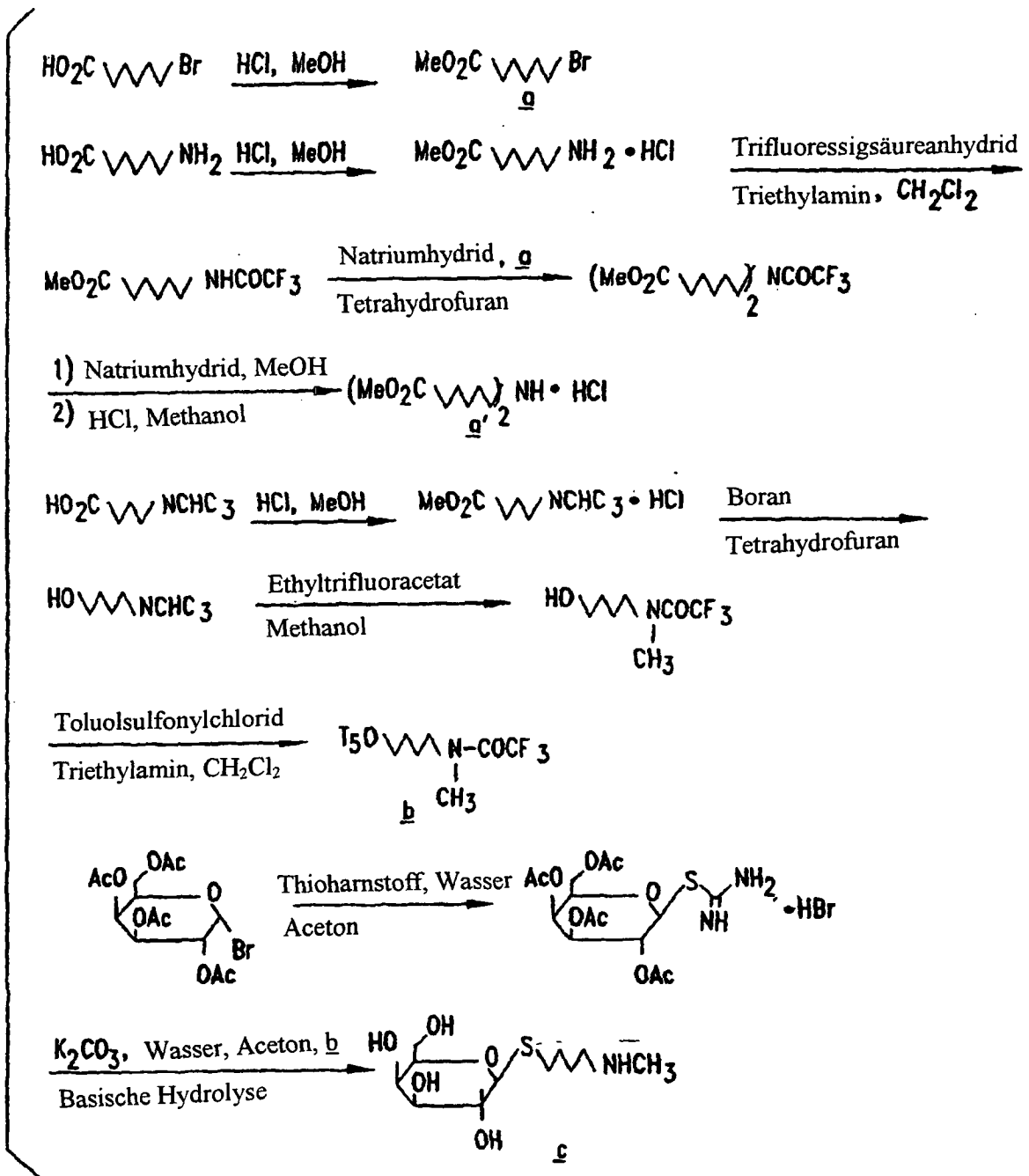


Fig. 5A

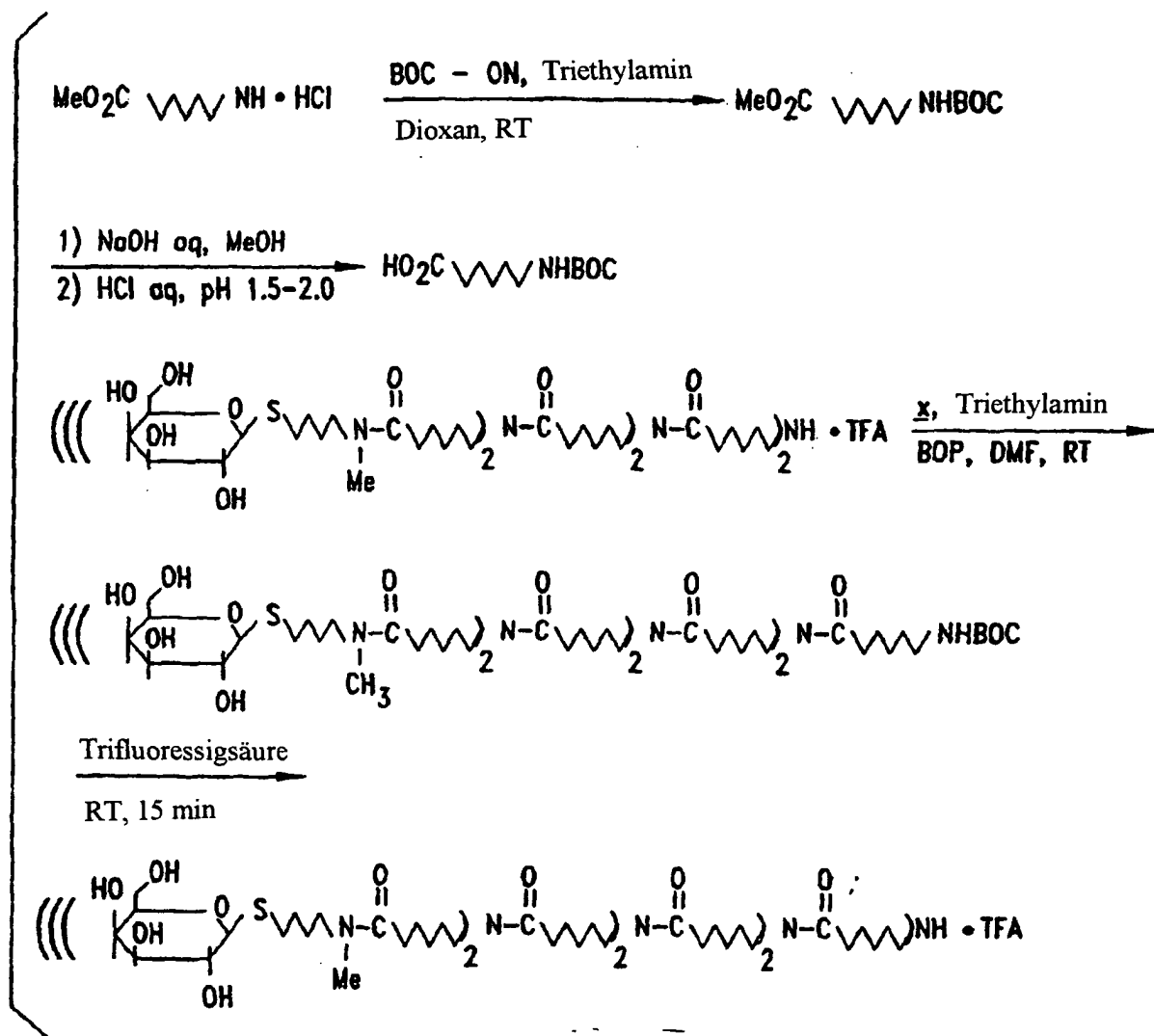


Fig. 6

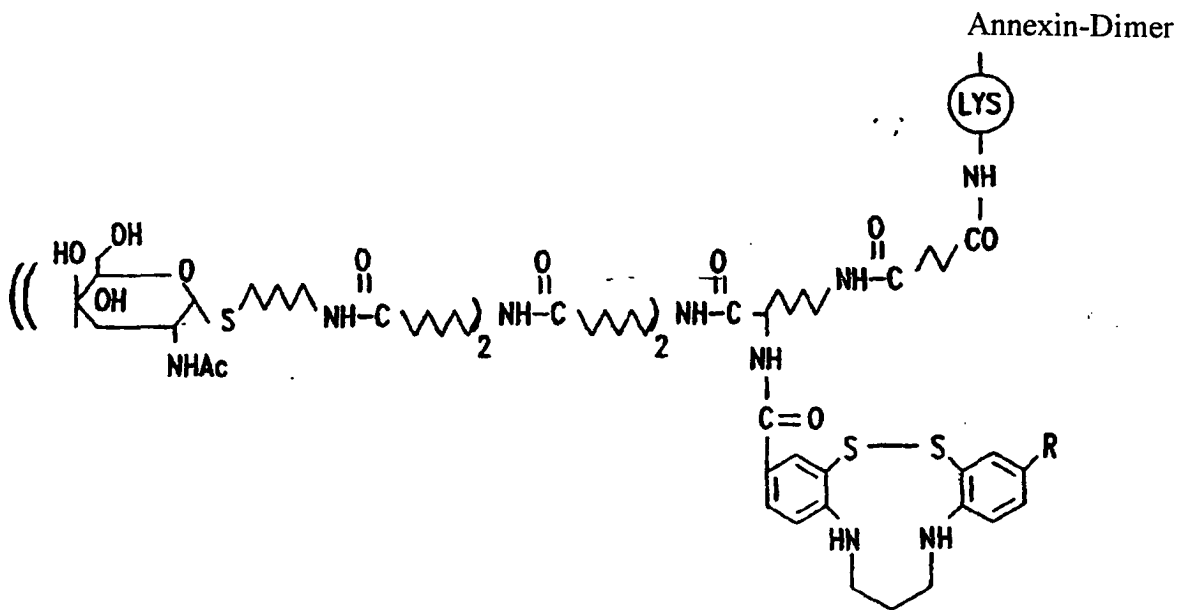
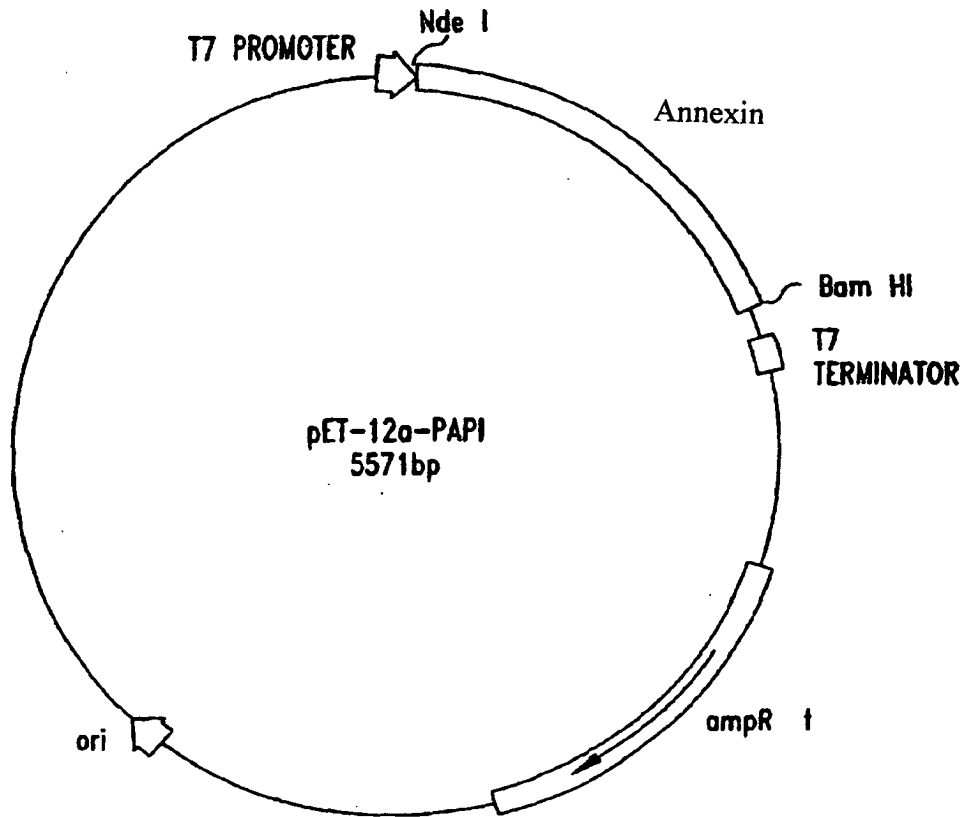


Fig. 9

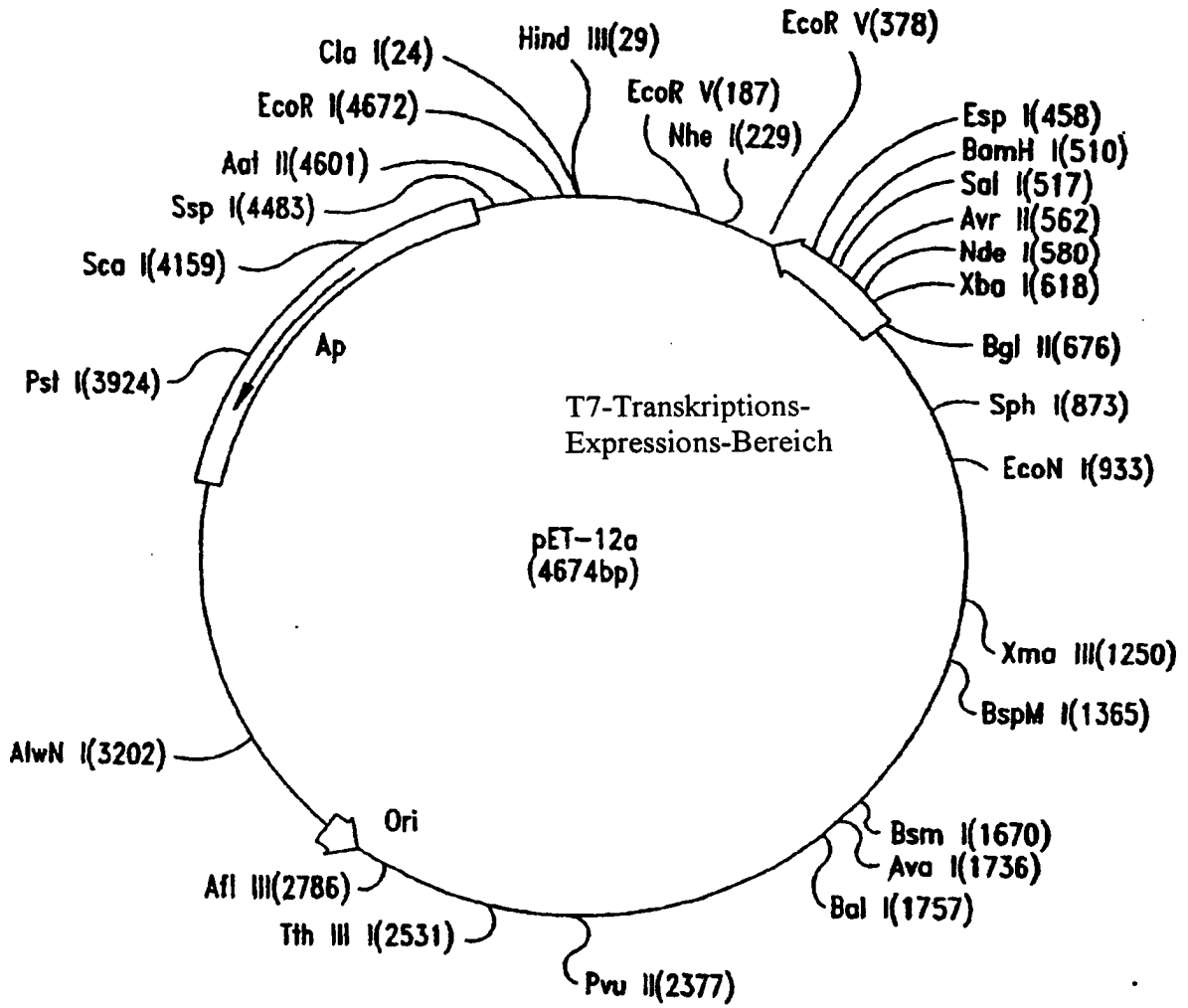


Fig. 8