



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

208162
(11) (B2)

(51) Int. Cl.³
C 07 G 7/00

(22) Přihlášeno 20 07 72
(21) {PV 5171-72}

(32) (31) (33) Právo přednosti od 20 07 71
(164456) Spojené státy americké

(40) Zveřejněno 31 12 80

(45) Vydáno 15 04 84

(72)(73)
Autor vynálezu
a současně
majitel patentu

HANEY THOMAS ALBERT, EAST BRUNSWICK, BRUNO GERALD
ANTHONY, SHREWSBURY a BARTLETT JANETH MARIE, EAST
BRUNSWICK (Sp. st. a.)

(54) Způsob výroby makroagregátů technecia-99m, albuminu a iontů cínu

1

Vynález se týká způsobu výroby makroagregátů technecia-99m, albuminu a iontů cínu, vázáním radioaktivního technecia-99m na lidský krevní albumin.

Přípravků z lidského krevního albuminu, na který je vázán radioaktivní jod, bylo již použito k vyšetřování rozmanitých oblastí lidského těla. Také technecium-99m nabylo v posledních letech širokého uplatnění jako indikační složka albuminu. Byly použity nebo navrženy rozmanité postupy, pomocí nichž může být na albumin vázáno technecium-99m namísto radioaktivního jodu.

Použitelnost technecia-99m při scintigrafických detekčních metodách je dána jednak jeho fyzikálními, jednak jeho chemickými vlastnostmi. Krátký poločas rozpadu technecia-99m a skutečnost, že nevyzařuje beta-záření, mají za následek, že exponovaná tkáň je vystavena jen nízkým dávkám záření. Poločas rozpadu technecia-99m je asi 6 hodin. Proto mohou být aplikovány vysoké aktivity, čímž se zkrátí čas potřebný pro vyšetření.

Jak již bylo výše uvedeno, technecium může být připraveno v rozmanitých chemických formách a může být převedeno do komplexů s bílkovinami. Použití technecia-99m ve formě komplexů s makroagregáty

2

lidského krevního albuminu pro vyšetřování plic bylo již popsáno.

M. M. Gwyther a E. O. Field v pojednání o použití agregátů albuminu značených techneciem-99m při scintigrafickém vyšetření plic v časopise Int. J. Appl. Rad. and Isotopes 17, 485 — 486 (1966) popsali způsob značení albuminu použitím zvýšených koncentrací chloridu železnatého a kyseliny askorbové.

Odlišný přístup k problému popsali T. De-paoli, A. Hager a J. O. Nicolini v článku „Albumin Macroaggregates Labelled with ^{99m}Tc“, publikovaném v časopise Inter. J. Appl. Rad. and Isotopes, 17, 551 — 554 (1966).

V této práci jsou uveřejněna následující kritéria pro použitelné makroagregáty albuminů:

1. musí být sterilní a nesmí obsahovat pyrogeny;
2. jejich nevázaná radioaktivita nesmí přesahovat 5 % z celkové přítomné radioaktivity;
3. méně než 10 % částic je menších než 5 mikrometrů v největším průměru a žádná z částic není větší než 100 mikrometrů; průměrná velikost částic musí ležet mezi 10 a 50 mikrometry;

4. mají takovou specifickou aktivitu, že potřebná dávka radioaktivity může být vázána na méně než 1,5 mg albuminu.

Všechny tyto způsoby mají jako hlavní nevýhodu to, že vyžadují vycvičený personál a speciální zařízení k získání komplexu radioaktivního prvku s albuminem. Byly prováděny pokusy o zjednodušení těchto způsobů přípravy, avšak každý z dosud vyvinutých postupů vyžaduje řadu míchacích a zahřívacích stupňů.

Makroagregáty vytvořené podle vynálezu obsahují agregáty lidského krevního albuminu.

Výše uvedené nedostatky nemá způsob výroby makroagregátů technecia-99m, albuminu a iontů cínu podle vynálezu, jehož podstata spočívá v tom, že se k vodnému roztoku denaturovaného albuminu přidá halogenid cínatý, nastaví se pH vzniklé reakční směsi na hodnotu 4,5 až 6 k získání makroagregátů albuminu, načež se k nim přidá vodný roztok technecia-99m.

Při způsobu podle vynálezu se hodnota pH reakční směsi s výhodou nastaví pomocí anorganické zásady.

Roztok makroagregátů albuminu se s výhodou před přidáním vodného roztoku technecia-99m dehydratuje.

Výhodou způsobu podle vynálezu je, že jsou při něm eliminovány výše popsané nedostatky. Způsob podle vynálezu zahrnuje přidavek halogenidu cínatého (například chloridu cínatého, jodidu cínatého nebo bromidu cínatého) k okyselenému roztoku lidského krevního albuminu, nastavení pH vzniklé směsi na isoelektrický bod albuminu k vytvoření makroagregátů, oddělení přitom vytvořeného supernatantu od vzniklých makroagregátů, resuspendování vytvořených makroagregátů v roztoku vhodném pro injikování, který popřípadě může být dehydratován, přidání technecia-99m ke vzniklé suspenzi a vyloučení makroagregátů, na kterých je vázána radioaktivní indikační složka.

Výraz „makroagregáty albuminu“ zahrnuje částice albuminu mající velikost 10 až 100 mikrometrů, s výhodou 30 až 50 mikrometrů.

Makroagregáty podle vynálezu se vytvoří použitím lidského krevního albuminu, který je denaturován. Denaturovaný albumin může být připraven jakýmkoliv ze známých způsobů.

Jeden ze způsobů pro přípravu denaturovaného albuminu zahrnuje zahřívání a alkylizaci normálního krevního albuminu a jeho následovné zalkalizování. Normální lidský krevní albumin se používá v případech, kdy se indikační testy provádějí u lidí. V případě, že se uvedené testy provádějí například s krávy, psy nebo krysy, použije se příslušného zvířecího séra. Normální krevní albumin se zahřívá na teplotu 55 až 95 °C, s výhodou na teplotu 75 až

85 °C, po dobu 15 až 60 minut podle množství použitého albuminu. Větší množství albuminu vyžaduje delší zahřívání. Použitím některé anorganické kyseliny, jako například kyseliny sírové, chlorovodíkové, dusičné, některé organické zásady, jako například octanu sodného, roztoku octanového pufru, některé anorganické zásady, jako například hydroxidu alkalického kovu, zejména hydroxidu sodného, nebo hydrogenkarbonátu alkalického kovu, například hydrogenkarbonátu sodného, se nastaví pH albuminu na hodnotu 4,5 až 6, s výhodou na hodnotu 5,3. To způsobí vysrážení denaturovaného albuminu.

Je třeba poznamenat, že albumin může být denaturován nastavením pH na hodnotu okolo 8, přičemž se pak použije kyseliny k nastavení pH na hodnotu 4,5 až 6, nebo nastavením pH na hodnotu okolo 2, přičemž se pak použije báze k dosažení hodnoty pH 4,5 až 6. Změna hodnoty pH je obecně doprovázena zahříváním k zajištění přiměřeného stupně denaturace.

Jiná cesta pro přípravu albuminu spočívá v zahřívání emulze albuminu v některém oleji, jakým je například bavlníkový olej, oddělení, uspořádání podle velikosti a vysušení vytvořených makroagregátů, které jsou obecně odborníkům v daném oboru známé jako mikrosferity. Přesnější pokyny pro přípravu mikrosferitů je možné nalézt v publikacích „Radiologic Clinics of North America“ 8, 233 (1969) a „International Journal of Applied Radiation and Isotopes“ 21, 155 (1970); oba způsoby přípravy jsou zde doloženy literárními odkazy.

Při přípravě albuminu způsobem podle vynálezu je dávana přednost použití komerčního lidského krevního albuminu, který obsahuje konzervační látky a prostředky proti pění. pH tohoto materiálu je nastaveno na hodnotu 1 až 3, s výhodou na hodnotu 1,5 až 2, přidáním silné anorganické kyseliny, například kyseliny sírové nebo kyseliny chlorovodíkové.

Potom se ke směsi přidá halogenid cínatý, rozpuštěný v kyselině chlorovodíkové. Poměr množství cínatých iontů k albuminu má být v rozmezí 1:2 až 1:20. Obzvláště mimořádných výsledků bylo dosaženo, když byl poměr cínatých iontů k albuminu asi 1:5.

Když byl připraven denaturovaný lidský krevní albumin, přidá se potřebné množství halogenidu cínatého v kyselém prostředí, jakým je například kyselina chlorovodíková; pH tohoto roztoku má být 1 až 2, s výhodou 1,1 až 1,3.

pH roztoku se potom nastaví na hodnotu isoelektrického bodu denaturovaného albuminu, což je okolo 5,3; tato hodnota však může popřípadě ležet v rozmezí 4,8 až 5,8. Tímto dojde k vytvoření makroagregátů. K zajištění stálosti těchto makroagregátů se tyto roztoky zahřívají po dobu 10 až 45 mi-

nut, s výhodou 10 až 20 minut. Použitá teplota je 75 až 85 °C, s výhodou 78 až 81 °C.

Takto vytvořené makroagregáty se promyjí destilovanou vodou, roztokem soli nebo redukčního činidla, jakým je roztok sulfonové kyseliny. Částice se potom resuspendují ve vodě pro injekce, v roztoku soli nebo v roztoku obsahujícím vhodné redukční činidlo, jakým je například dextrosa nebo sůl sulfonové kyseliny.

Makroagregáty mohou být také popřípadě dehydratovány, což zvyšuje stabilitu cínatých iontů. Výhodným způsobem dehydratace je lyofylizace, i když může být použito i jiných standardních metod.

I když se při popisu přípravy makroagregátů podle vynálezu používá albuminu, může být použito také globulinů, s výhodou alfa-, beta nebo gama-globulinu s fibrinogenem.

Postup přípravy makroagregátů se až do tohoto stadia vede tak, že se získají sterilní a nepyrogenní makroagregáty, které jsou takto ve formě vhodné pro injekce. Dávkovací jednotky se připravují tak, že jednotlivé intravenózní injekce, podaná savi s tělesnou hmotností okolo 70 kg, dodá asi $3,7 \cdot 10^7$ až $1,85 \cdot 10^8$ s⁻¹ technecia-99m, s výhodou asi $1,1 \cdot 10^8$ s⁻¹ technecia-99m.

Při provádění způsobu podle vynálezu se dodávají technikovi ampule s předem připravenými makroagregáty. Potom je třeba k nim přidat potřebné množství technecia-99m z jeho generátoru, například z generátoru popsaného v patentu USA č. 3 369 121.

K roztoku se přidá požadované množství technecia-99m ve vodném roztoku, s výhodou v solném roztoku, jak je předem stanoveno lékařem, čímž se rozumí požadovaná radioaktivita, což je rozhodujícím faktorem pro množství přidávaného technecia-99m. Měření množství technecia-99m není praktické, protože je přítomno v proměnlivých množstvích, což závisí na aktivitě generátoru a době, kdy byl tento generátor naposled eluován. Reakce probíhá stejně dobře, když se makroagregáty přidávají do roztoku technecia-99m.

Způsob podle vynálezu je v následující části popisu blíže objasněn několika příklady provedení. Všechny teploty jsou uváděny ve stupních Celsia.

Příklad 1

Příprava neznačeného albuminového makroagregátu

Smísí se 0,4 ml 25% lidského krevního albuminu (s obsahem 100 mg albuminu), 0,9 ml benzylalkoholu, 2 ml propylenglykolu, 2 kapky prostředku proti pěnění a 75 ml vody pro injekce a vzniklá směs se promíchá. Po přidání 0,1 N HCl se nastaví pH na hodnotu 1,75; dále se přidá 100 mg dihydrátu chloridu cínatého a směs se promíchá. Za míchání se potom přidá 20 ml 0,5 M octanového pufru (pH = 5,1) k vytvoření makroagregátů albuminu a směs se zahřívá na vodní lázni na teplotu 80 °C (± 15 °C) za neustálého míchání po dobu 40 minut.

Směs se potom odstředí a supernatant se odlije. Za účelem dalšího vyčištění makroagregátů albuminu se k nim přimísí voda pro injekce, směs se znovu odstředí a supernatant se znovu odlije. Denaturované makroagregáty lidského krevního albuminu se dále suspendují ve 100 ml vody pro injekce a ochladí asi na 5 °C.

Příklady 2 a 3

V těchto příkladech provedení se připraví dva druhy albuminových makroagregátů

Každý makroagregát se testuje za účelem zjištění stupně vázání technecia-99m na albumin a množství injikované dávky, která se lokalizuje v plicích a játrech krys. Přesně 25 ml každého přípravku, jejich složení je uvedeno v tabulce 1, se injikuje do hrdelní zevní žíly (vena jugularis) krys. 15 minut po injekci se krysy usmrtí a stanoví se procenta injikované dávky v plicích a játrech.

Pro stanovení stupně vázání technecia-99m na albumin se stanoví celková radioaktivita přípravku a celková radioaktivita supernatantu odečítáním počtu impulsů za jednotku času při měření celkového přípravku a supernatantu po odstředění makroagregátů.

Stupeň vázání (v %) technecia-99m na albumin se stanoví podle následujícího vzorce:

$$\text{Stupeň vázání (\%)} = \frac{\left(\frac{\text{počet impulsů získaný měřením přípravku}}{\text{počet impulsů získaný měřením supernatantu}} - \frac{\text{počet impulsů získaný měřením}}{\text{počet impulsů získaný měřením supernatantu}} \right) \times 100}{\text{počet impulsů získaný měřením přípravku}}$$

TABULKA 1

	Příklad 2	Příklad 3
Suspenze makroagregovaného lidského krevního albuminu (z příkladu 1)	2 ml	1 ml
Bifalátový draselný pufr	1 ml	—
Technecium-99m (z generátoru)	2 ml	1 ml
% injikované dávky v plicích krys	95,4*	99,6*
% injikované dávky v játrech krys	2,1*	0,63*

*) průměr ze tří výsledků získaných u tří krys

Z těchto příkladů je patrné, že makroagregáty podle vynálezu mohou být snadno připraveny a použity jako prostředek k scintigrafickému zobrazení stavu plic (pro skeniny plic).

Příklad 4

0,4 ml 25% krevního albuminu (s obsahem 100 mg albuminu), 50 ml vody pro injekce a 0,1 N HCl v množství nezbytném k dosažení hodnoty pH 2 se míchají (325 kmitů/min) 20 minut při teplotě 79 °C. Potom se přidá 1 ml 2,5% roztoku chloridu cínatého a nastaví se pH na hodnotu 5,1 až 5,2 pomocí 1 M octanového pufru (asi 30 ml). Směs se znovu za míchání (325 kmitů/min) zahřívá 20 minut na teplotu 79 °C. Směs se potom odstředí a supernatant se odlije.

Aby se makroagregáty promyly, promíchají se s vodou pro injekce, směs se znovu odstředí a supernatant se znovu odlije. Promytí se opakuje a pak se makroagregáty suspendují ve 100 ml vody pro injekce a dají se do lednice.

Příklad 5

Postupuje se podle příkladu 2 a 3, přičemž procentní lokalizace aktivity jsou uvedeny v tabulce 2.

TABULKA 2

Makroagregovaný lidský krevní albumin	1 ml
Technecium-99m (z generátoru)	1 ml
Voda pro injekce	8 ml
% injikované dávky v plicích krys	98*
% injikované dávky v játrech krys	0,57*

*) průměr ze tří výsledků získaných a tří krys

Příklad 6

Normální lidský krevní albumin (0,75 g) se přidá ke směsi kyseliny chlorovodíkové (0,5 N) (20 ml) a vody pro injekce (400 ml) a zahřívá se na teplotu 80 °C za míchání po dobu 30 minut. K ochlazené směsi se přidá přes sterilizační filtr roztok chloridu cínatého (1%, 7 ml) a ihned následuje přidavek octanového pufru (1M, 100 ml; octan sodný bezvodý — 8,5 g; ledová kyselina octová — 4 ml, voda pro injekce do 100 ml).

Směs se znovu zahřívá za míchání na teplotu 80 °C po dobu 15 minut, načež za míchání se agregáty nechají usadit. Teplotu 80 °C po dobu 15 minut, načež se míchání a agregáty se nechají usadit.

Potom se agregáty resuspendují ve vodě pro injekce, když byl předem na základě chemické analýzy stanoven potřebný objem tak, aby se dosáhlo žádané koncentrace denaturovaného albuminu 0,75 mg/ml. Podle vypočteného objemu se stanoví množství normálního lidského krevního albuminu potřebné k tomu, aby vznikl 0,5% roztok nosiče.

Ampule (s výhodou silikonové) se naplní a obsah se lyofilizuje do sucha. Před uzavřením ampulí se tyto ampule naplní dusíkem.

V době aplikace může mít roztok technecia-99m aktivitu $1,85 \cdot 10^7 \text{ s}^{-1}$ na 1 ml až $7,4 \cdot 10^9 \text{ s}^{-1}$ na - ml; zpravidla se k roztoku přidá 1 až 3 ml roztoku technecia-99m, majícího aktivitu $3,7 \cdot 10^7$ až $3,7 \cdot 10^8 \text{ s}^{-1}$ na 1 ml.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob výroby makroagregátů technecia-99m, albuminu a iontů cínu, vyznačený tím, že se k vodnému roztoku denaturovaného albuminu přidá halogenid cínatý, nastaví se pH reakční směsi na hodnotu 4,5 až 6 k získání makroagregátů albuminu, načež se k nim přidá vodný roztok technecia-99m.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se hodnota pH reakční směsi nastaví pomocí anorganické zásady.

3. Způsob podle bodů 1 a 2, vyznačený tím, že se roztok makroagregátů před přidáním vodného roztoku technecia-99m dehydratuje.