



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

Int. Cl.³: A 61 K
C 07 G

49/02
7/04

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein

Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978



PATENTSCHRIFT A5

625 126

① Gesuchsnummer: 10183/76

② Anmeldungsdatum: 10.08.1976

③ Priorität(en): 13.08.1975 DE 2536008

④ Patent erteilt: 15.09.1981

⑤ Patentschrift
veröffentlicht: 15.09.1981

⑥ Inhaber:
Hoechst Aktiengesellschaft, Frankfurt a.M. 80
(DE)

⑦ Erfinder:
Dr. Alexander Schwarz, Flörsheim a.M. (DE)
Vaclav Endrst, Friedberg/Taunus (DE)
Dr. Gerhard Kloss, Kelkheim/Taunus (DE)

⑧ Vertreter:
Brühwiler & Co., Zürich

⑨ Verfahren zur Herstellung von zur Bindung von Technetium geeigneten zinnhaltigen Humanserumalbumin-Partikeln.

⑩ Humanserumalbuminpartikel, welche zur Bindung von Technetium geeignet sind, werden hergestellt. Durch Dialyse gereinigtes Humanserumalbumin wird auf einen pH-Wert von 9,8 bis 10,2 eingestellt und während 10 bis 20 Minuten bei 71 bis 73°C gehalten. Dann wird auf 45 bis 50°C gekühlt, mit Säure ein pH-Wert von 6,8 bis 7,0 eingestellt und 0,17 bis 0,22 Gew.-% Zinn-II-Ionen, bezogen auf das Albumin, zugegeben. Durch weiteren Säurezusatz wird der pH-Wert auf 5,2 bis 4,8 eingestellt und weitere 1,53 bis 1,73 Gew.-% Zinn-II-Ionen, bezogen auf das Albumin, zugesetzt. Die Temperatur wird auf 71 bis 73°C erhöht und die Suspension der Gegenstromsedimentation mittels physiologischer Kochsalzlösung unterworfen. Nach Dekantieren der Kochsalzlösung wird die Konzentration der Teilchen mit sterilem destilliertem Wasser auf 2,5 bis 3,0 mg Albumin pro Milliliter Suspension gebracht. Die Suspension wird dann in auf -80°C vorgekühlten Gefässen gefriergetrocknet.

Die gefriergetrockneten Humanserumpartikel können unmittelbar vor Gebrauch durch Zugabe isotonischer, steriler Pertechnetatlösung und kurzes Schütteln mit Technetium-99m markiert werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zur Herstellung von zur Bindung von Technetium geeigneten, zinnhaltigen Partikeln, dadurch gekennzeichnet, dass man Humanserumalbumin in wässriger Lösung nach Reinigung durch Dialyse auf einen pH-Wert zwischen 9,8 und 10,2 einstellt, die Lösung auf eine Temperatur zwischen 71 und 73 °C bringt, diese Temperatur 10 bis 20 Minuten lang erhält, die Lösung dann auf eine Temperatur zwischen 45 und 50 °C bringt, durch Zusatz von Säure einen pH-Wert zwischen 6,8 und 7,0 einstellt, 0,17 bis 0,22 Gewichtsprozent Zinn-II-Ionen, bezogen auf Humanserumalbumin, zusetzt, unter weiterem Rühren und durch Zusatz weiterer Säure einen pH-Wert zwischen 5,2 und 4,8 einstellt, danach weitere 1,53 bis 1,73 Gewichtsprozent Zinn-II-Ionen, bezogen auf Humanserumalbumin, zusetzt, anschliessend noch einmal auf eine Temperatur zwischen 71 und 73 °C erwärmt,

die so erhaltene Suspension der Gegenstromsedimentation mittels physiologischer Kochsalzlösung unterwirft,

die sedimentierten Teilchen nach Dekantieren der physiologischen Kochsalzlösung mit sterilem destilliertem Wasser auf einen Gehalt von 2,5 bis 3,0 mg Albumin pro Milliliter Suspension bringt

und diese Suspension in Gefässen gefriertrocknet, die auf eine Temperatur unter minus 80 °C vorgekühlt sind.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man Humanserumalbumin nach Reinigung durch Dialyse auf einen pH-Wert zwischen 9,8 und 10,2 durch Zusatz von Natronlauge unter Rühren einstellt.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man bei einer Temperatur zwischen 45 und 50 °C einen pH-Wert zwischen 6,8 und 7,0 durch Zusatz von Salzsäure unter Rühren einstellt.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Gegenstromsedimentation bei einer Strömungsgeschwindigkeit zwischen 10 und 20 ml pro cm² Gefässquerschnitt und pro Stunde durchgeführt wird.

5. Verfahren nach Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Rührgeschwindigkeit nach der ersten Zugabe der Zinn-II-Ionen zwischen 600 und 700 Umdrehungen pro Minute liegt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass man die Suspension in Gefässen gefriertrocknet, die Mengen von 0,5 bis 5 ml der Suspension aufnehmen.

Es ist bekannt, zur szintigrafischen Darstellung der Lunge zum Zwecke der Diagnose Humanserumalbumin (HSA)-Partikel zu verwenden, die einen Durchmesser von mehr als 10 Mikrometer haben. Solche Partikel werden in den peripheren Blutkreislauf gebracht und bleiben auf ihrem Weg durch die Lungen in den Kapillargefässen stecken. Sind die Partikel durch einen Gamma-Strahler radioaktiv markiert, so erlauben sie die Darstellung der Lunge in einem Perfusionsszintigramm. In ähnlicher Weise ist die Darstellung anderer Teilgebiete des Kreislaufs nach Injektion in das zuführende Blutgefäss möglich.

HSA-Partikel sind gut verträglich. Sie werden in der Lunge enzymatisch abgebaut. Zur radioaktiven Markierung verwendete man zunächst Jod-131, später Technetium-99m [vgl. P. V. Harper et al., Radiology 85, 101 (1965)]. Die Markierung mit Technetium kann unmittelbar vor der Verwendung zur Injektion mit Hilfe des Eluats eines Technetium-99m-Generators erfolgen. Vorher sind die lyophilisierten HSA-Partikel monatelang haltbar. Weitere Vorteile der Verwendung von Technetium zum Markieren der HSA-Partikel sind dessen wesentlich

geringere Halbwertszeit (Tc-99m: 6 Stunden, J-131: 8 Tage), was die Strahlenbelastung des Patienten verringert, sowie die bessere Messbarkeit infolge seiner Gamma-Strahlung in einem eng umschriebenen messtechnisch günstigen Energiebereich.

5 Zum Markieren der HSA-Partikel mit Technetium ist ein Reduktionsmittel erforderlich, das die Pertechnetat-Anionen aus dem Generatoreluat in Technetium niedriger Oxidationsstufe überführt, welches sich an die HSA-Partikel bei saurer Fällung am isoelektrischen Punkt anlagert. Als Reduktionsmittel werden vorwiegend Metallsalze, insbesondere Zinn-II-chlorid, verwendet (vgl. DOS 2 235 681).

Dieses bekannte Verfahren zur Herstellung von zur Bindung von Technetium geeigneten zinnhaltigen HSA-Partikeln hat verschiedene Nachteile. Die Säuredenaturierung der zinnhaltigen HSA-Partikel bei 80 °C führt zu harten Albuminteilchen, die nur schwer abgebaut werden können und deren Grösse zwischen 5 und 100 Mikrometer liegt. Der Zinngehalt liegt sehr hoch und führt zu einer unnötigen Zinnbelastung des Organismus.

20 Das Arbeiten mit Agglomerationshemmern wie Propylenglykol, Konservierungsmitteln wie Benzylalkohol und mit Antischaummitteln, welche Zusatzstoffe ebenfalls radioaktiv markiert werden, führt zu Präparaten, die auch in anderen Organen, wie Leber, Milz und Knochenmark, in nicht erwünschter Weise angereichert werden.

Es wurde nun ein Verfahren zur Herstellung von zur Bindung von Technetium geeigneten, zinnhaltigen Humanserumalbumin-Partikeln gefunden, das die obigen Nachteile vermeidet und das dadurch gekennzeichnet ist, dass man Humanserumalbumin in wässriger Lösung nach Reinigung durch Dialyse, zweckmässig durch Zusatz von Natronlauge und zweckmässig unter Rühren, auf einen pH-Wert zwischen 9,8 und 10,2 einstellt, die Lösung auf eine Temperatur zwischen 71 und 73 °C bringt, diese Temperatur 10 bis 20 Minuten lang erhält, die Lösung dann auf eine Temperatur zwischen 45 und 50 °C bringt und in der Regel unter weiterem Rühren durch Zusatz von Säure, vorzugsweise von Salzsäure, einen pH-Wert zwischen 6,8 und 7,0 einstellt, 0,17 bis 0,22 Gewichtsprozent Zinn-II-Ionen, bezogen auf Humanserumalbumin, zusetzt, unter weiterem Rühren und durch Zusatz weiterer Säure einen pH-Wert zwischen 5,2 und 4,8 einstellt, danach weitere 1,53 bis 1,73 Gewichtsprozent Zinn-II-Ionen, bezogen auf Humanserumalbumin, zusetzt, anschliessend noch einmal auf eine Temperatur zwischen 71 und 73 °C erwärmt,

45 die so erhaltene Suspension der Gegenstromsedimentation mittels physiologischer Kochsalzlösung, vorzugsweise bei einer Strömungsgeschwindigkeit zwischen 10 und 20 ml pro cm² Gefässquerschnitt und pro Stunde, unterwirft,

die sedimentierten Teilchen nach Dekantieren der physiologischen Kochsalzlösung mit sterilem destillierten Wasser auf einen Gehalt von 2,5 mg bis 3,0 mg Albumin pro Milliliter Suspension bringt

und diese Suspension zweckmässig in Mengen von 0,5 bis 5 ml und vorzugsweise in Mengen von 0,5 bis 2 ml in Gefässen gefriertrocknet, die auf eine Temperatur unter minus 80 °C vorgekühlt sind.

Dabei ist es vorteilhaft, die Rührgeschwindigkeit nach der ersten Zugabe der Zinn-II-Ionen zwischen 600 und 700 Umdrehungen pro Minute zu halten. Mit besonderem Vorteil wird ein Magnetrührer verwendet, wobei die Länge des Rührstabes zwischen einem Drittel und der Hälfte des grössten Gefässdurchmessers liegt.

Die Gefriertrocknung erfolgt vorteilhaft in flüssigem Stickstoff.

65 Vorteilhaft werden die gefriergetrockneten HSA-Partikel unmittelbar vor Gebrauch durch Zugabe isotonischer, steriler Pertechnetatlösung und kurzes Schütteln mit Technetium-99m markiert.

Die so hergestellten HSA-Partikel haben gegenüber dem Stand der Technik folgende Vorteile:

1. Die niedrige Denaturierungstemperatur von 72° liefert Partikel, die einerseits lange genug in der Lunge gespeichert werden, um mehrfache Aufnahmen (z.B. mit der Szintillationskamera) machen zu können. Andererseits werden die Partikel nach kurzer Zeit abgebaut. Bei Tierversuchen (Ratte) wurden 24 Stunden nach Applikation nur noch 5% der injizierten Partikel in der Lunge gefunden.

2. Die Fällungstemperatur zwischen 45 und 50 °C und die bevorzugte Rührgeschwindigkeit während des Fällungsvorganges führen zur reproduzierbaren Bildung makroaggregierter Partikel gleichmässiger Grössenverteilung von 20 bis 50 Mikrometer (>90%).

3. Der Zinngehalt der Partikel ist mit 1,70 bis 1,95% Sn²⁺ (bezogen auf das Albumin) besonders niedrig; ausserdem wird das Zinn durch die in zwei Schritten erfolgende Zugabe besonders wirksam gebunden. Deshalb liegt die Markierungsausbeute, auch bei länger gelagerten Präparaten, über 99%, d.h. der Gehalt an freiem ^{99m}TcO₄ ist kleiner als 1%.

4. Die Reinigung der ausgefällten Partikel durch Gegenstromsedimentation trennt unerwünschte kleine Teilchen leicht und vollständig ab, so dass Leber und Nieren nur sehr geringe Aktivitätsmengen aufweisen. In der Ratte wurden 15 Minuten nach der Injektion von der applizierten Dosis weniger als 0,3% in der Leber und weniger als 0,6% in den Nieren gefunden.

5. Die in physiologischer Kochsalz-Lösung erfolgende Sedimentation der Partikel verhindert ein Verkleben bzw. Zusammenbacken und damit eine Vergrösserung der Partikel. Nach der endgültigen Verdünnung und dem Gefriertrocknen enthält das Produkt pro 2,5 mg Humanserumalbumin zwischen 1,5 und 2,0 mg Kochsalz. Diese physiologisch unbedenkliche Menge an Kochsalz macht den Zusatz von Agglomerationshemmern bzw. Stabilisatoren überflüssig und bewirkt, dass sich die Partikel bei Zugabe des Technetium-99m-Generatoreluats leicht und gleichmässig suspendieren lassen.

6. Die gefriergetrockneten, nur Zinn-II-Ionen und Kochsalz enthaltenden Partikel werden durch Zugabe von isotoni-scher Pertechne-tat-Lösung und kurzes Schütteln mit Technetium-99m markiert, wobei umständliche Manipulationen, wie Erwärmen o.ä., nicht notwendig sind. Die Generatoreluat-Volumina sind wegen der guten Suspendierbarkeit der Partikel und wegen der vollständigen Reduktion des Pertechne-tats

nicht eng begrenzt; es können 1 bis 10 ml zugesetzt werden, ohne dass die Markierungsausbeute unter 99% sinkt.

Beispiel

5 10 g gegen isotonische Kochsalz-Lösung dialysiertes Humanserumalbumin (HSA) werden mit steriler, isotonischer NaCl-Lösung auf 400 ml aufgefüllt und durch Zugabe von 1n NaOH auf pH 10 eingestellt. Unter Rühren wird die Albumin-Lösung schnell auf 72 °C erhitzt und 15 Minuten bei dieser Temperatur gehalten. Die Temperatur der Lösung wird auf 45 °C gesenkt, die Rührgeschwindigkeit auf 650 U./min erhöht und langsam 0,1n HCl in isotonischer Kochsalz-Lösung bis pH 6,9 zugetropft. Dann gibt man so langsam 3,7 ml einer frisch angesetzten, 34 mg SnCl₂ · 2H₂O enthaltenden, salzsau-
15 ren Lösung hinzu, dass keine Partikelausfällung eintritt.

Durch weitere Zugabe von 0,1n HCl in isotonischer Kochsalz-Lösung bis pH 5,1 erreicht man die vollständige Ausfällung des denaturierten Albumins in Form von Makroaggregaten mit einer Teilchengrösse bis zu 50 µm. Das restliche Zinn-
20 salz, 306 mg SnCl₂ · 2H₂O, gelöst in 0,02%iger Salzsäure, wird anschliessend langsam zugesetzt. Durch nachfolgende, 30minütige Nachdenaturierung der Suspension bei 72 °C werden die Partikel verfestigt.

Die Partikelsuspension wird über Nacht in einem Gefäss, das im unteren Teil eine Fritte (Porengrösse G2) mit ca. 85 cm² Fläche besitzt, in von unten mit einer Geschwindigkeit von ca. 1 l/h entgegenströmender physiologischer Kochsalz-Lösung sedimentiert. Während alle kleineren Teilchen abgeschwemmt werden, setzen sich die gewünschten 20 bis 50 µm grossen
30 Teilchen ab. Nach dem Abdekantieren der überstehenden Flüssigkeit wird die Aufschlammung der Partikel in der isotonischen Kochsalz-Lösung mit sterilem destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 2,5 mg HSA/ml eingestellt; die Lösung enthält 1,8 mg NaCl/ml. Je 1 ml der Suspension wird in
35 mit flüssigem Stickstoff vorgekühlte Fläschchen abgefüllt, worin die Partikelsuspension fast augenblicklich gefriert. Nach sorgfältiger Gefriertrocknung bilden die Partikel eine trockene, leicht bewegliche Masse, die einwandfrei suspendierbar ist und eine unveränderte Teilchengrösse von 20 bis 50 µm be-
40 sitzt. Ein Flascheninhalt von 2,5 mg HSA entspricht 1 bis 2 · 10⁶ Teilchen.

Sämtliche Arbeiten werden unter aseptischen Bedingungen vorgenommen, da eine nachträgliche Sterilisation der Partikel nicht möglich ist.