



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) **327751**

(13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.

A61K 31/409 (2006.01)

A61K 49/04 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07D 487/22 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20034344	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	2001.10.04 PCT/RU01/00399
(22)	Inng.dag	2003.09.29	(85)	Videreføringsdag	2003.09.29
(24)	Løpedag	2001.10.04	(30)	Prioritet	2001.03.30, RU, 01108397
(41)	Alm.tilgj	2003.11.21			
(45)	Meddelt	2009.09.14			
(73)	Innehaver	Obschestvo s Ogranichennoi Otvetstvennostiju, Ul Vinnitskaya, d 10 str 1, 117192 Moskva, RU			
(72)	Oppfinner	Andrei Valentinovich Reshetnikov, Ul Vashnyakovskaya, d 6/3, kv 6, 111402 Moskva, RU Igor Dmitrievich Zalevsky, Ul Mira, d 23, kv 16, Fryazino, 141120 Moskovskaya obl, RU Jury Viktorovich Kemov, Ul Stroitelei, d 4, kv 91, Chernogolovka, 142431 Moskovskaya obl, RU Andrei Valentinovich Ivanov, Ul Millionschikova, d 18, kv 391, 115446 Moskva, RU Artashes Vacheevich Karmenyan, Prop Andropova, d 50/9, korp 3, kv 17, 115487 Moskva, RU Alexandr Tikhonovich Gradjushko, Ul Tverskaya, d 4, kv 29, 115487 Moskva, RU Vladimir Petrovich Laptev, Ul Dementieva, d 1, kv 39, Monino, 142432 Moskovskaya obl, RU Nataliya Petrovna Neugodova, Ul Profsojuznaya, d 31/3, kv 20, 117418 Moskva, RU Olga Yurievna Abakumova, Ul Jubileinaya, d 7, kv 93, Istra, 143500 Moskovskaya obl, RU Valery Alexeevich Privalov, Ul Soni Krivoi, d 26, kv 234, 454091 Chelyabinsk, RU Alexandr Vladimirovich Lappa, Ul Molodogvardeitsev, d 70 A, kv 266, 454136 Chelyabinsk, RU Vladimir Alexandrovich Romanov, Prosp Jubileiny, D 68, kv 104, Khimki, 141400 Moskovskaya obl, RU			
(74)	Fullmektig	Protector Intellectual Property Consultants AS, Postboks 5074 Majorstua, 0301 OSLO			

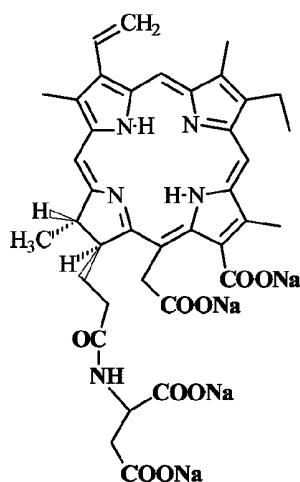
(54)	Benevnelse	Fotosensibilisator og fremgangsmåte for fremstilling av samme			
(56)	Anførte publikasjoner	CN 1256126 A , RU 2 054 476 C1			
(57)	Sammendrag				

Oppfinnelsen angår medisin og angår en fotosensibilisator for deteksjon og kurerer av tumorer. Foreliggende fotosensibilisator er realisert i form av en sammensetning inneholdende chlorin i form av salt og alkalimetaller. 80.90% av chlorin e₆, 5-20% purpurin 5 og resten er purpurin 18 blir benyttet som chlorin. Nevnte fotosensibilisator blir fremstil ved ekstraksjon av Spirulina biomasse ved hjelp av aceton. Etterpå blir nevnte biomasse eksponert for syrebehandling, nøytralisering, hydrolyse, ekstraksjon av feoforbid α, oppløsning i aceton, tilsetning av sterk base, nøytralisering og utfelling av chlorin e₆.

Foreliggende oppfinnelse angår det medisinske området, mer spesielt fotodynamisk terapi (PDT) med anvendelse av biologiske aktive forbindelsen.

Fotosensibilisatorer (PS) blir benyttet som terapeutiske midler som PDT og som fluoriserende markører ved fotodynamisk diagnostikk (PDD).

Mono-L-aspartilchlorin e_6 tetranatriumsalt "Npe6" er kjent som PS (US patent nr. 4.977.177):

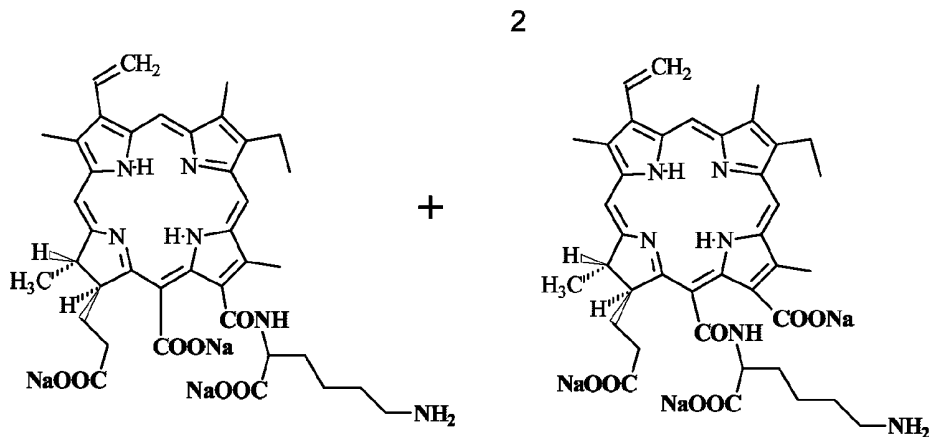


10

Dette PS er aktivt som PDT.

Dets ulemper er: dets besværlige fremstilling, for hurtig tumorakkumulering og dets ekskresjonsdynamikk som reduserer den effektive eksponeringstiden for tumorer, og komparativ lav grad av akkumulering i maligne formasjoner (tumor) på grunn av dets høye hydrofilisitet, som aktiverer kun en av flere mulige mekanismer for tumorødeleggelse i PDF-prosessen, nemlig kun blodkarpåvrikning.

20 Lysylchlorin p_6 trinatriumsalt "LCP" er kjent som PS (US patent nr. 5.330.741):

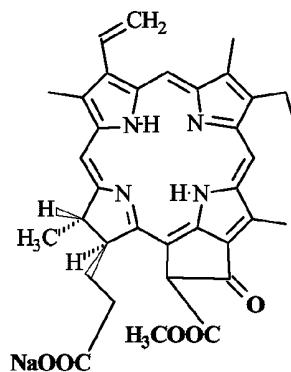


Denne PS er aktiv ved PDF.

- 5 Dets ulemper er : Dets kompliserte fremstilling og det faktum at det er en blanding av to monoamider ved posisjonene 13 og 15 i forholdet 10:1, noe som kan føre til uklar biodistribusjon og ekskresjon.

Feoforbid *a* natriumsalt er kjent som PS (US patent nr. 5.378,835):

10



Denne PS kan selektivt akkumuleres i maligne tumorer og er aktiv som PDT.

- 15 Dets ulempe er tendensen til oksidering (kjemisk instabilitet) ved lagring som en oppløsning, ikke full oppløselighet i vann etter lagring som et faststoff, hydrofobisitet og, som en konsekvens, sakte ekskresjon ut av organismen, som fører til forlenget fotosensitet av huden.

metanol, alkalisk alkoholoppløsning blir tilsatt til inntil pH er 8,5, PS-oppløsningen blir filtrert og avdampet i vakuum (US patent nr. 3.102.891).

Ulempene ved denne fremgangsmåten er: anvendelsen av høye temperaturer under fjerning av oppløsningsmidlene fra ekstraktene, anvendelsen av alkoholer, spesielt metylalkohol som fører til allomerisering av E exocyclus og dannelsen av forskjellige oksydasjonsprodukter av feofytiner og feoforbider (K. Hyvarinen, J. Helaja, P. Kurchen, I. Kipalainen, P. H. Hynninen. H-1 and C-13 NMR spectra of the methanolic allomerization products of 13(2)-(R)-chlorophyll a.// Magnetic Resonance in Chemistry.-1996-V-33-N8, s. 646-656), noe som fører til den komplekse blandingen av sammensetningen som er udefinert og vanskelig å reprodusere.

Der er en fremgangsmåte for fremstilling av PS, nemlig chlorin e_6 natriumsalt, som omfatter det følgende: 1N NaOH-oppløsning blir tilsatt til chlorin e_6 -trimetylleter-oppløsningen i tetrahydrofuran, blandingen blir omrørt i 2 dager ved romtemperatur under nitrogen, vann blir tilsatt til blandingen, så blir det organiske oppløsningsmiddelet ekstrahert med metylenklorid, sporene av det siste blir eliminert ved bobling av nitrogen gjennom chlorin- e_6 -oppløsningen (US patent nr. 5.002.962).

Ulempene med denne fremgangsmåten er: lav tilgjengelighet av tilstrekkelige mengder av starmaterialet chlorin- e_6 -trimetylleter, lang varighet av produksjonen av PS på grunn av den kjemiske inertheten til esterradikal ved den 13. posisjonen av tetrapyrrol-makrocyclusen og ustabilitet til medisinske former av PS ved lagring av formen i vannoppløsning på grunn av ufullstendig forsåpning av estergruppen ved den 13. posisjonen til makrocyclusen.

Det er kjent en fremgangsmåte for fremstilling av PS, nemlig "LCP" fotosensibilisator for fotodynamisk terapi (trinatriumsalt av lysyl-chlorin p_6), omfattende det følgende: biomasse blir behandlet med acetone 2-3 ganger for å ekstrahere klorofyll a , biomassen blir filtrert eller sentrifugert, ekstraktet blir avdampet, behandlet med syre for å fjerne magnesiumioner fra

klorofyllmolekylet og å hydrolysere fytilestergruppen, metylakohol blir tilsatt for samtidig esterifisering, reaksjonsmassen blir behandlet med vann, feoforbid a derivat blir ekstrahert med metylenklorid, ekstraktet blir nøytralisert, vasket med vann, avdampet, kromotografert på aliminiumoksid, metylfeoforbid a blir

5 krystallisert ut av blandingen av metylenklorid – metanol og det resulterende feofobid a-derivatet blir reagert med sterk uorganisk base i nærvær av oksygen i pyridin – dietyleter – n-propanol, reaksjonsmassen blir behandlet med vann. Vannfasen blir surgjort til pH 4, "ustabilt chlorin" blir ekstrahert med metylenklorid, ekstraktet avdampet, "ustabilt chlorin" blir igjen oppløst i

10 tetrahydrofuran, oppløsningen blir avdampet, denne prosedyren blir gjentatt til absorpsjonen ved 700 nm slutter å øke, det resulterende purpurin 18 blir oppløst i tetrahydrofuran, esterifisert med diazometan, purin 18 metylesteren blir blandet med lysin – vann-oppløsning i metylenklorid i nærvær av pyridin, blandingen blir omrørt i 12 timer ved romtemperatur, oppløsningsmidlene blir

15 fjernet under høyvakuum, så blir det resulterende råproduktet rensert ved revers fase høytydelse væskechromatografi (HPLC), oppløsningsmidlene blir fjernet ved lyofilisering, PS blir oppløst i fosfatbuffer for å oppnå injeksjonsoppløsning for PDT, 0,1 N NaOH-oppløsning blir tilsatt, pH blir justert til fysiologisk verdi på 7,35 med 0,1 N HCl og oppløsningen blir filtrert gjennom mikroporøst filter (US

20 patent nr. 5.330.741).

Ulempene med denne fremgangsmåten er: lav reproduserbarhet, arbeidskrevende (anvendelsen av høyvakuum, krystallisering, kolonnechromatografi og HPLC, lang varighet av reaksjonen med lysin),

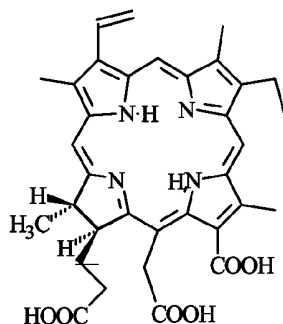
25 anvendelsen av sterkt toksiske og brennbare reagenter (diazometan, pyridin, metanol, tetrahydrofuran, dietyleter). Disse ulempene gjør fremgangsmåten uegnet for farmasøytisk industri. Dessuten er det resulterende målproduktet stabilt i kun 24 timer ved 4 °C i mørke, mens kravene ifølge farmacopoeia er at det skal være stabilt i ikke mindre enn 6 måneder (Leach, M.W., Higgins R. J.,

30 Boggan J.E., Lee S. –J., Autry S., Smith K. M. Effectiveness of a Lysylcholin p₆/Chlorin p₆ mixture in Photodynamic Therapy of the Subcutaneous 9L Glioma in Rat. Cancer Research 1992, V. 92, 1235 – 1239). Videre, hva angår den kjemiske sammensetningen, representerer denne PS blandingen av

monoamider ved 13. og 15. posisjon i det omtrentlige forholdet på 10:1 som kan føre til dets tvetydige biologiske distribusjon og ekskresjon ut av organismen.

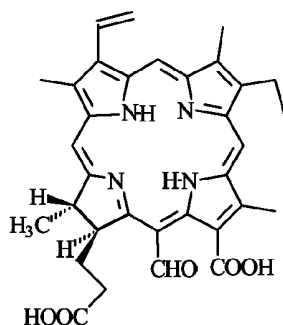
Målet ved foreliggende oppfinnelse er å fremskaffe PS som er kjennetegnet ved enkel preparativ isolering og rensing, balansert hydrofobisitet – hydrofilitet og, som en konsekvens, ved den optimale hurtigheten for akkumulering i tumorer og ekskresjon ut av tumoren og hele organismen, og også ved medisinske formers stabilitet i vandig oppløsning ved lagring.

10 Dette målet blir oppnådd ved å fremstille PS omfattende chlorin i form av salt med alkalimetall, hvor chlorin er sammensatt av chlorin e_6 (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-karboksymetyl-17, 18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2,7,12,18-tetrametylporfyrin)



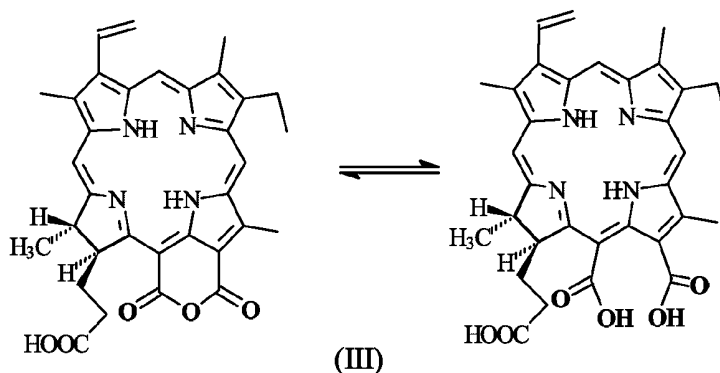
(I)

15 som utgjør 80-90 % , purpurin 5 (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-karboksymetyl-17, 18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2,7,12,18-tetrametylporfyrin)



(II)

som utgjør 2-15 %, og purpurin 18-chorin p₆ (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-karboksymetyl-17, 18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2,7,12,18-tetrametylporfyrin)



- 5 som utgjør resten, slik at nevnte komponenter danner sammensetningen. Natrium og kalium kan bli benyttet som alkalimetaller.

Målet ved foreliggende oppfinnelse er å oppnå høy reproduserbarhet på fremgangsmåten for fremstilling av PS, det er enkelhet, kjemisk stabilitet av de medisinske PS-formene som ikke er mindre enn ett år, så vel som å oppnå totalitet på fysiokjemisje og biologiske egenskaper på PS som gir effektiviteten av PS ved PDT, og også å unngå anvendelsen av toksiske reagenser.

15 Dette målet er oppnådd ved fremgangsmåten som angitt i krav 4.

Essensen av den foreslåtte fremgangsmåten for fremstilling av PS er følgende: *Spirulina* biomasse blir behandlet med aceton inntil klorofyll a er fullstendig ekstrahert, biomassen blir filtrert fra eller sentrifugert, ekstraktet blir behandlet med syre for å fjerne magnesiumioner fra klorofyllmolekylet, ekstraktet blir nøytralisert og utfelt feofytin a blir filtrert ut, så blir feofytin a hydrolysert i blandingen av saltsyre – aceton - heksan, 6 – 16 ml aceton, 0,6 – 6 ml heksan og 5 – 10 ml konsentrert saltsyre som blir benyttet for hvert gram rått feofytin a, blandingen blir oppvarmet til 40 – 60 °C og omrørt i 20 minutter – 1 time, så blir heksan (6-16 ml) tilsatt og organisk fase blir vasket med blandingen av aceton og saltsyre (2-10:1), vannfase blir vasket med heksan, så blir vandig fase inneholdende feoforbid a nøytralisert med overskudd av natriumsitrat (tri, di-,

eller monosubstituert) vannopløsning, utfelt feoforbid a blir filtrert fra, vasket med vann, rekrystallisert ut av aceton – vann-blanding, lufttørket inntil vekten blir konstant, så blir feoforbid a oppløst i aceton, sterk uorganisk base blir tilsatt i form av vannopløsning av 0,05 – 1,00 % konsentrasjon, omrørt ved 30 – 60 °C i 5 – 30 minutter, ekstra volum sterk uorganisk base blir tilsatt i form av vannopløsning med en konsentrasjon på 1 – 50 %, blandingen blir oppvarmet til 40 – 60 °C i 20 til 90 minutter, nøytralisert med fortennet saltsyre, chlorin e₆ blir oppvarmet i forseglet reservoar ved temperaturer på 40 – 100 °C i 1 time – 30 dager, så avkjølt og sterk baseopløsning blir tilsatt til pH 7,5 – 8,5, så blir oppløsningen justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en fotosensibilisator med en konsentrasjon på 6,5 – 7,5 vekt%.

Videre, i en fremgangsmåte for fremstilling av PS etter trinnet ved tilsetning av sterk base inntil pH 7,55 – 8,5 kan blandingen bli gelfiltrert for å gi chlorin e₆-prosjenter opp til 90-90%, purpurin 5 – opp til 2-15 % og purpurin 18 – resten, så blir fortennet saltsyreopløsning tilsatt til fotosensibilisatoren utfeller, oppløsningen blir justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi fotosensibilisatorkonsentrasjon på 6,5 – 7,5 vekt%, slik at det blir oppnådd det "flytende ekstraktet av chloriner".

Videre, i en fremgangsmåte for fremstilling av PS etter et trinn gelfiltrering kan fortennet saltsyreopløsning bli tilsatt til fotosensibilisatoropløsningen inntil fotosensibilisatoren utfeller, så blir utfellingen filtrert fra eller separert ved sentrifugering, tilsetningsstoffene godkjent av RF State Pharmacopeia blir tilsatt inntil pH 7,5 – 8,5, apyrogen vann for injeksjon blir tilsatt for å gi en fotosensibilisatorkonsentrasjon på 0,1 – 1 vekt% hvorefter bakterier blir filtrert fra.

Også i fremgangsmåten for fremstilling av PS etter trinnet ved gelfiltrering, kan fortennet saltsyreopløsning bli tilsatt til blandingen inntil fotosensibilisatoren utfeller, denne utfellingen blir filtrert fra eller separert ved sentrifugering, justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en fotosensibilisatorkonsentrasjon på 6,5 – 7,5 vekt%, "Væskeekstraktet av chloriner" blir dispergert i gelsubstrat

ifølge det følgende forhold: 0,5-12 vekt% av "Væskeekstraktet av chloriner", 5 – 20 vekt% av dimetylsulfoksyd, resten er vann, tilsetningsstoffene godkjent av RF State Pharmacopeia og gelsubstrat.

- 5 Videre, i fremgangsmåten for fremstilling av PS etter trinnet ved gelfiltrering, kan fortynnet saltsyreoppløsning bli tilsatt til blandingen til fotosensibilisatoren utfelles, denne utfelling blir filtrert fra eller separert ved sentrifugering, justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en fotosensibilisatorkonsentrasjon på 6,5 – 7,5 vekt%, og det resulterende "væskeekstraktet av chloriner" blir oppløst i
- 10 dimetylsulfoksyd ifølge det følgende forholdet: 0,5 – 12 vekt% av "væskeekstraktene av chloriner" og resten er dimetylsulfoksyd.

Denne fremgangsmåten er realisert ved anvendelse av standard kjemisk laboratorie pilotutstyr: biomasse blir behandlet i 10-50 l aluminiumskar utstyrt

15 med mekanisk rører, biomasse blir filtrert gjennom nutch-filtre med oljepumpevakuum og kjølefelle med flytende nitrogen, biomasse blir sentrifugert i avkjølt gulvsentrifuge med 4 x 1 liters kopper og rotasjonshastighet på 600 omdreininger per minutt, ekstrakt blir surgjort i 20 liters glassflasker, utfelt feofytin a blir filtrert gjennom 5-10 liters nutch-filtre med oljepumpevakuum og

20 kjølefelle med flytende nitrogen, feofytin blir hydrolysert i 0,1 til 0,5 liters oppvarmede trehalsede rundbunnede flasker utstyrt med rører, tilbakeløpskjøler og tilførselsåpning med kork, opplysninger blir vasket i 2 liters skilletrakter, nøytralisert i 2-5 liters begre, feofytid a blir filtrert gjennom 2-5 liters nutch-filtre med oljepumpevakuum og kjølefelle med flytende nitrogen, rekrystallisert i 0,25

25 – 1 liters kjemiske flatbunnede flasker, feofytid a blir oppløst i aceton og reagert med sterk uorganisk base i 0,5 til 2 liters oppvarmede trehalsede rundbunnede flasker utstyrt med rører, tilbakeløpskjøler og tilførselsåpning med kork, chlorin e₆-utfelling blir separert i den avkjølte gulvsentrifugen med 4 x 0,5 liters rør og rotasjonshastighet på 6000 omdreininger per minutt, chlorin e₆ blir

30 rekrystallisert, i 0,25 – 0,5 liter, 2 – 5 liters kjemisk flatbunnede flasker, chlorin e₆ blir filtrert gjennom 1-2 liters nutch-filtre med oljepumpevakuum og kjølefelle med flytende nitrogen, chlorin e₆ blir oppvarmet i 0,05 -0,1 liters rundbunnede flasker av varmeresistent glass, det ble reagert med sterk baseoppløsning og

justert i 0,1 til 1 liters kjemiske begere ved anvendelse av standard pH-meter og spektrofotometer, blandingen blir gelfiltrert på en kolonne med en diameter på 50 – 10 med mer og 100 – 150 med mer høyde, bakterier blir filtrert ut gjennom standard 0,22 µm mikroporøst filter av Millipor-typen, "væskeskstrakt av chloriner" ble dispergert i gelsubstrat ved anvendelse av kutte- eller kulehomogenisator, videre, 0,01 – 10 liters kjegleflasker med korker, 0,005 – 2 liters sylindre, 0,05 – 2 liters begre, 20 liters flasker, vekter med område 1-1000 g og magnetrørere blir benyttet for fremstilling av prøver og oppløsninger; 5 liters rundbunnede flasker med termometer og direktestrøm vannkondensator blir benyttet for regenerering av aceton og heksan; rotasjons varkuumevaporator blir benyttet for hurtig fjerning av oppløsningsmidler ved lav temperatur.

Ifølge fremgangsmåten for fremstilling av PS blir konsentrert saltsyreoppløsning ansett som mettet vandig hydrogenoppløsning ved en temperatur på 20 °C som vanligvis inneholder 36-37 vekt% hydrogenklorid.

Ved det trinnet hvor feofytin *a* omdannes til feforbid *a* blir området for volumområdene for heksan og aceton (6-16 ml aceton og 0,6 til 6 ml heksan) forklart ved det faktum at dersom laver volumer det blir benyttet er oppløsningen av feofytin *a* ikke fullstendig og dersom volumene blir større vil oppløsningen ikke være nok konsentrert for hurtig hydrolyse. Områder for saltsyrevolumene (5 -10 ml) blir forklart ved det faktum at dersom volumet er mindre vil feoforbid *a*-utbyttet reduseres og hvis volumet er større blir reaksjonens selektivitet redusert på grunn av dannelse av biproduktet pyrofeoforbid *a*. Temperaturområdet på 40-60 °C blir forklart ved det faktum at dersom temperaturen er laver reduseres utbyttet av feoforbid *a* og dersom temperaturen i reaksjonen blir høyere reduseres reaksjonens selektivitet på grunn av dannelsen av biproduktet pyrofeoforbid *a*. Tidsområdet på 20 minutter – 1 time blir forklart ved det faktum at dersom denne tiden er kortere vil utbyttet av feoforbid *a* reduseres og dersom denne perioden er lengre reduseres selektiviteten på grunn av dannelsen av biproduktet pyrofeoforbid *a*. Volumet av tilsatt heksan (6 – 16 ml) blir forklart ved det faktum at dersom dette volumet er

mindre er separasjonen av ett av reaksjonsproduktene, fytol, fra blandingen ikke effektiv, og anvendelsen av større heksanvolum er ikke rasjonell.

Ved trinnet for feoforbid a-rensing blir organisk fase vasket med blandingen av
5 aceton og konsentrert saltsyre i forhold på 2:1 til 10:1. Dersom dette forholdet er mindre enn 2:1 blir det dannet en flakaktig utfelling som er vanskelig å skille fra vannfasen inneholdende det ønskede feoforbid a. Dersom dette forholdet er større enn 10:1 blir vannfasen overmettet med aceton og sammenblandingen kommer inn i den fra hexanfasen og forurenses det ønskede feoforbid a.

10

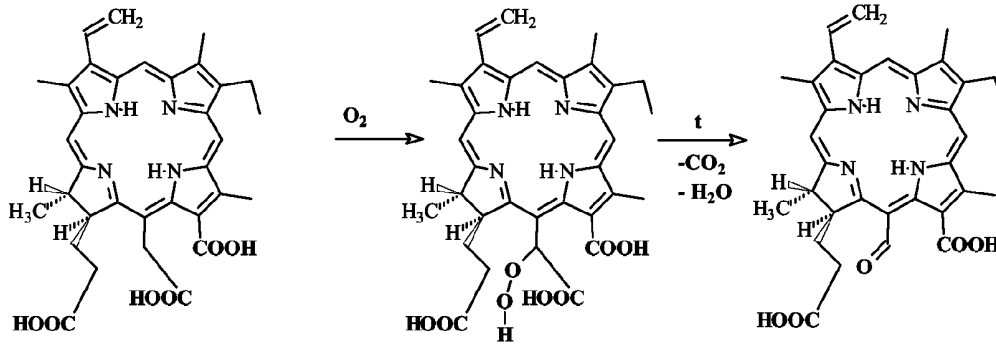
Ved trinnet hvor feoforbid a omdannes til chlorin e₆ ligger konsentrasjonen av sterk base i området 0,05 g/l 1,00 %, dets nedre grense er det minimum som er nødvendig for reaksjonen ved ånging av cyclopentanonringen (E-ring) i feoforbid a, og dersom konsentrasjonen av base er større enn 1 % vil det skje
15 E-ring allomerisering (oksidasjon), noe som fører til "ustabil chlorin" i stedet for det ønskede chlorin e₆, og fører så til purpurin 18 og videre til chlorin p₆.

Ifølge fremgangsmåten blir så et ekstra volum av sterk uorganisk base tilsatt i form av vannopløsning med 1-50 % konsentrasjon. Dersom konsentrasjonen
20 er lavere enn 1 %, skjer ufullstendig forsåpning av estergruppen ved 13. eller 15. posisjon. Dersom basekonsentrasjonen er høyere enn 50% åpnes tetrapyrrolmakrocyclusen i enkelte tilfeller.

Deretter blir reaksjonsmassen omrørt ved 30-60 °C i 5 til 30 minutter, den
25 lavere temperaturen letter prosessen ved allomerisering av E-ringen, og den høyere temperaturen letter dekomponeringen av chlorin e₆ til chlorin e₄. Ved tilsetning av en ekstra mengde sterk uorganisk base er temperaturområdet 40 – 60 °C og tidsområdet er 20 – 90 minutter. Dersom tid og temperatur er lavere enn angitt har metylesteren ved 15² posisjon ingen tid til å hydrolysere, dersom
30 tid og temperatur er større, øker utbyttet av biproduktet chlorin e₄.

Når chlorin e₆ omdannes til "væskeekstrakter av chloriner" skjer prosessen ved oksydering og de påfølgende termolytiske prosessene ved dehydrering og

dekarboksylering av PS med oksidert metylengruppe i 15¹-posisjonen til purpurin 5, skjer:



Når chlorin *e*₆ omdannes til "væskekstraktene av chloriner" krever

- 5 anvendelsen av temperaturen lavere enn 40 °C lengre reaksjonstid, dette er teknologisk irrasjonelt. Anvendelsen av temperaturer høyere enn 100 °C resulterer i akselerasjon av dekomponeringen av stoffer.

Varighet av prosessen kortere enn 1 time krever anvendelsen av temperaturer

- 10 over 100 °C, noe som resulterer i at stoffet har en lav biologisk aktivitet.

Varighet av prosessen i mer enn 30 dager er forbundet med irreversibel forandring (dekomponering) av stoff.

- 15 Den optimale temperaturen er 45 – 70 °C (fig. 1).

Den optimale varigheten av prosessen er 2 – 9 dager ved 70 °C (fig. 2) eller 1-48 timer ved 100 °C (fig. 3), noe som resulterer i 2-15 % av purpurin 5 i en blanding.

20

Stoffet inneholder 2-15 % purpurin 5 og 80-95 % chlorin *e*₆ 9 sammensetning av aktivt middel (PS) og passer for fremstilling av vannopløselige medisinske injeksjonsformer. Dersom stoffet inneholder mindre enn 5% purpurin 5 har det en lav biologisk aktivitet. Dersom stoffet inneholder mer enn 20% purpurin 5 er dets vannopløselig dårligere , noe som negativt påvirker stabiliteten til medisinske former ved lagring og forverrer evnen til å filtrere det gjennom

25

mikroporøse filtere. Den siste egenskapen er viktig for sterilisering av medisinske former da medisinske tetrapyrrol-former ikke kan bli sterilisert ved oppvarming eller UV-bestråling på grunn av den høye sannsynligheten for uønskede kjemiske forandringer.

5

80-95% chlorin e₆ innhold i stoffet er nødvendig for å holde purpurin 5 i vannopløselig tilstand.

pH-intervallene er et resultat av det faktum at dets laveste verdi, pH 7,5, er den nedre grensen for chloriners oppløselighet i vannoppløsninger som resulterer i konsentrasjoner som passer for farmasøytiske anvendelser, uten å tilsette oppløsnere. Den øvre grensen, pH 8,5, er grensen for biologisk toleranse av hydroksydioner [OH⁻].

15 Intervallet for chlorin e₆-konsentrasjoner på 6,5-7,5 % resulterer fra anvendelsen av teknologiske fremgangsmåter ved sentrifugering eller filtrering i trinnet for separering av chlorin e₆-utfelling, disse fremgangsmåtene gir produktet innen dette konsentrasjonsområdet.

20 Foreliggende oppfinnelse er illustrert med figurer, hvor fig. 1 angår fremgangsmåten og viser at dannelsen av purpurin 5 avhenger av temperaturen ved inkuberingen i 30 dager; fig. 2 viser avhengigheten til purpurin 5 innhold på inkubasjonstiden ved temperaturen 70 °C.; fig. 3 viser avhengigheten av purpurin 5 innhold på inkubasjonstiden ved temperaturen 100 °C; fig. 4
25 illustrerer farmakokinetikken til "væskekstrakter av chloriner" stoff, benyttet som den medisinske formen "Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") ved tumorøse mus ved intravenøs introduksjon av dosen på 20 mg/kg; Fig. 5a viser nærværet av chlorin e₆-metabolitt (formel I), nemlig purpurin 5 (formel II), i blodet, og kurvene merket som "2", er tatt som
30 PS i blodet; Fig. 5b bekrefter chlorin e₆ metabolismen (formel I) til purpurin 5 (formel II) i lever; Fig. 6 viser PMR-spekteret til "væskekstrakter av chloriner"-stoff, fremstilt i eksempel 2; Fig. 7 viser massespekteret til "væskekstrakter av chloriner"-stoff, fremstilt i eksempel 2; Fig. 8 viser absorpsjonen i det synlige

spekteret til "væskekstrakter av chloriner"-stoff, fremstilt i eksempel 2, hvor spekteret er tatt opp i etanol, konsentrasjonen av stoff er 5mkg/ml; Fig. 9 viser PMR-spekteret til chlorin e₆; Fig. 10 viser massespekteret til chlorin e₆; Fig. 11 viser absorpsjonen i det synlige spekteret av chlorin e₆, hvor spekteret er tatt opp i etanol, konsentrasjonen av chlorin e₆ er 15 mkg/ml (tilnærmet bånd – 5 mkg/ml); Fig. 12 viser det PMR-spekteret til purpurin 5; Fig. 13 viser massespekterer av purpurin 5; Fig. 14 viser absorpsjon av det synlige spekteret av purpurin 5, hvor spekteret er tatt i etanol, konsentrasjonen av purpurin 5 er 15 mkg/ml (tilnærmet bånd – 5 mkg/ml); Fig. 15 viser PMR-spekteret til purpurin 5 dimetyleter; Fig. 16 viser massespekteret til purpurin 5 dimetyleter; Fig. 17 viser absorpsjonen i det synlige spekteret til purpurin 5 dimetyleter, hvor spekteret er tatt i etanol, konsentrasjonen av purpuin DME er 15 mkg/ml (tilnærmet bånd – 5 mkg/ml).

PS er illustrert i eksempel 1, eksempler på realisering av fremgangsmåten er gitt i eksempel 2, 3, spesielle tilfeller av realisering av fremgangsmåten er illustrert i eksempler 4-9.

Med hensyn til kjemien omfatter PS tre sykliske tetrapyrroler av chlorinnaturen (med hydrogenert D-ring) – chlorin e₆ (formel I), purpurin 5 (formel II, eksempel 10) og purpurin 18, som gradvis omdannes til chlorin p₆ i alkalisk medium (ved lagring)(formel III).

Med hensyn på den fysikalske kjemien har PS evnen til å absorbere lys i det synlige spekteret, for å resultere i PS fotoaktivering og påfølgende relaxering av eksitert tilstand ved overføring av energi til molekylært oksygen og organiske stoffer oppløst i vevet. Denne overføringen leder til oksidering og dannelse av fri-radikal prosesser i biologisk vev og deres skade og til sist destruksjon (nekrose). Det mest foretrukne eksitasjonsbåndet for PDT er det langbølgede båndet (tab. 1) siden den penetrerende kraften til lys i biologisk vev øker sammen med økningen i bølgelengde. PS er således i stand til å skade biologiske objekter i dybder opp til 10 med mer etter eksitasjon av lys med bølgelengde 654 – 670 nm.

Med hensyn på farmasøytisk PS er "væskeekstrakt av chloriner"-stoffer (ekstrakter er ansett som væsker dersom konsentrasjonen av aktivt middel er mindre enn 20%). Det gitte stoffet er ansett som ekstrakt på grunn av

5 nødvendigheten for dets ekstraksjon fra biomasse ved anvendelse av organiske oppløsningsmidler.

Tabell 1

10 **Posisjoner for absorpsjonsmaksimum og molekylær slokking av absorpsjonsverdier for et langbølget bånd av "væskeekstrakt av chloriner" i forskjellige medier**

PS	λ_{\max} , nm ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$ (0,01 M boratbuffer, pH 9,18)	λ_{\max} , nm ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$ (0,01 M boratbuffer med 1% humant serumalbumin, pH 7,2)	λ_{\max} , nm ϵ , $M^{-1}cm^{-1}$ (etanol)
"Væskeekstrakt av chloriner"	654,5 (28270)	662 (34200)	662 (34230)

Forbindelser med formel II har evnen til å akkumulere selektivt i maligne neoplasmaer og maligne områder, men er svakt oppløselig i vann og

15 forbindelser med formel I, sammen med uttrykt fotodynamisk aktivitet, er et løselighetsmiddel for forbindelser med formel II.

Med hensyn på farmakologi (fig. 4, eksempel 11), er entydigheten til di

farmakokinetiske parametrene oppnådd ved det faktum at i en organisme

20 omdannes PS med formel (I) sakte til PS med formel (II), denne prosessen

opprettholder konsentrasjonen av den siste ved et konstant nivå fra tidspunktet

ved introduksjon inn i organismen inntil tidspunktet for ekskresjon ut av en

tumor, under et tidsintervall som er tilstrekkelig for effektiv realisering av PDT.

Etter at den foreslåtte PS-sammensetningen blir introdusert inn i organismen til

25 tumorøse mus kommer den inn i en blodstrøm, og på grunn av at

blodsirkulasjonen hovedsakelig av forbindelsen med formel I blir en høy og stabil PS-konsentrasjon – 0,27 – 0,32 μm , tilstrekkelig for effektiv PDT i intervallet på 0,5 til 4 timer, oppnådd i løpet av de første 3 timer etter introduksjon i området ved en tumor. Innen denne perioden blir høy kontrast oppnådd på grunn av nærværet av 2-15 % av forbindelsen med formel II i en sammensetning, denne forbindelsen har evnen til å akkumulere i en tumor med høy kontrast, maksimum av akkumuleringen faller på tidspunktet 3 timer etter PS-introduksjon inn i en dyreorganisme (kontrastindeksen er 14,5 for hud og 2,9 for muskler). Innen denne tiden omdannes forbindelsen med formel (I) til forbindelsen med formel (II) i organismen, for å gi høy stabil PS-konsentrasjon i området ved tumoren i intervallet 3-5 timer etter injeksjonen, denne konsentrasjonen avtar gradvis og forblir terapeutisk tilstrekkelig opp til 18 timer etter injeksjon. Så dissosierer forbindelsen med formel (II) i organismen til ikke-toksiske produkter som blir skilt ut gjennom en lever.

15

Transformering av chlorin e_6 med formel (I) til purpurin 5 med formel (II) blir vist ved fluorescens-spekteret til organer og vevsprøver fra eksperimentdyr (fig. 5). Ved tilsetning av "Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjoner" ("fotochlorin") medisinsk form til blodhomogenat [Fig. 5a, (1)] i konsentrasjonen på 10 μM med påfølgende spektrofotometrisk analyse blir forandringen av fluoresensspekteret i form av 1,2 ganger utvidelse og fluoresensintensitetens maksimum forskyves til en langbølget spektral region med 8 nm observert. Ved tilsetning av "fotochlorin" i en mindre konsentrasjon ($C=1 \mu\text{M}$) blir kun forskyvningen av spekteret uten utvidelse observert, noe som viser doseeffekten ved metabolittdannelse [Fig.5a, (2)].

25

Fig. 5a, (3) viser resultatet av analyse av blodhomogenat, mottatt 3 timer etter introduksjon av "fotochlorin" i mus. Den mest uttrykte parameteren her er 1,5 ganger utvidelse av et spektrum ved det maksimale skift av et bånd til en langbølget spektral region med 4 nm, dette indikerer at en blanding av "fotochlorin" og metabolitt er til stede i den analyserte blodanalysen.

30

Ved tilsetning av "fotochlorin" i konsentrasjon på 10 μ M til et testrør med leverhomogenat [Fig. 5b, (1)] er endringen i spektrale karakteristikker først og fremst i skift av maksimum for intensiteten til en langbølget spektral reigon med 9nm. Utvidelse av spekteret ble ikke observert.

Det tilsvarende bildet ble observert ved tilsetning av "fotochlorin" i mindre konsentrasjon $C= 1 \mu$ M [Fig. 5b, (2)].

Når homogenatet av levervev fremstilt 3 timer etter introduksjon av preparatet inn i dyr ble analysert er det spektrofotometriske bildet av en prøve tilsvarende to tidligere [Fig. 5b, (3)].

Således, viser de mottatte data "fotochlorin"-metabolittens nærvær i leverhomogenater.

Purpurin 5 akkumuleres i tumorer til eksperimentdyr, optimalt for fotodynamisk effekt ifølge selektivitet, ble observert innen tidsintervallet på 3-18 timer etter intravenøs eller intraperitoneal introduksjon. I tilfeller når det er nødvendig å aktivere også chlorin-stoffene som sirkulerer i blodstrømmen, er den optimale tiden for bestråling 0,5 – 4 timer etter introduksjon. Generelt, for realisering av PDT med "væskeekstrakter av chloriner", utgjør intervallet mellom introduksjonen av et preparat og bestråling, 0,5 til 18 timer.

25

Biologisk aktivitet til den medisinske formen "Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Fotochlorin"), inneholdende 0,5% cannfritt "væskeekstrakt av chloriner"-stoff, blir beregnet *in vitro* og *in vivo*.

PS-balansen ifølge amfilisitet blir vist ved standard eksperiment *in vitro* (Kessel D. Biochemistry. 1977, V 16, s. 3443 – 3449)(tabell 2, eksempel 12). PS-distribusjonskoeffisient i 1-octanol/fosfatbuffer, pH 7,4 (Cd) er 1,40. Det betyr at foreliggende PS er like godt oppløselig både i vandig og
5 i lipofil fase og det beviser PS lipofilisitet som tillater at denne forbindelsen blir redistribuert fra vann inn i komplekser med transportable proteiner og lipoproteiner, for å penetrere hurtig inn i celler og å akkumulere i cytoplasmiske intracellulære membraner og mikrosomer, eller å penetrere inn i celler ved diffusjon gjennom en plasmatiske
10 membran i disse cellene. Etter laserbestråling utvikler forbindelsen avsatt på en slik måte et enkelt oksygen på innsiden av en celle og dreper denne.

PS antitumoraktivitet mot forskjellige typer cancerceller er vist ved
15 resultatene oppnådd i *in vitro* eksperimenter hvor 3 linjer av dyrkede tumorceller: rotte pheochromocytomer PC12, rotte Gasser's gangllion neurinoma RGGN1 og rotte hepatoma 27 (Hep27), ble benyttet (Tabell 2, eksempel 13).

20 De følgende fremgangsmåte ble benyttet for studie av doseavhengig cytototoksisk (etter laserbestråling) og biologisk "mørke" aktivitet av PS:

MTT-test som tillater å definere nøyaktig antallet levende celler etter deres PS-behandling og laserbestråling for å beregne cytotoksisk og
25 cytototoksisk indekser til PS. Den samme testen tillater å beregne doseavhengig cytotoksisk og biologisk "mørke"-aktivitet til PS. (Andrei V. Reshetnickov, Gellii V. Ponomarev, Andrei V. Ivanov, Olga Yu. Abakumova, Tatyana A Tsvetkova, Artashes V. Karmenyan, Aleksei G. Rebeko, Rudof Ph. Baum. Novel drug form of chlorin e_6 // i Optical
30 methods for tumor treatment and detection: Mechanisms and Techniques

in photodynamic therapy IX. – T.J. Dougherty, ed., vol 3903, 124 – 129 (2000)).

Bestemmelse av antallet celler etter farging av celle-monolag med krystallfiolett ved slutten av eksperimentet. Denne fremgangsmåten er mindre arbeidskrevende og kostbar enn MTT-testen og den tillater også å beregne cytotoxiske og cytofototoksiske indekser av PS (A:E. Medvedev et al., Biomed Science, 1990, v.I. s. 261), men det er mindre presist da krystallfiolett også farger døde celler.

Komparativ genotoksisk og cytofototoksisk effekt av PS blir hovedsakelig beregnet ved graden av hemming av DNA-syntese i cellene. DNA-syntese blir evaluert ved nivået av inkorporering av ^{14}C tymidin inn i DNA ved anvendelse av standard radiometriske fremgangsmåter (O.Yu. Abakumova et al, J. Neural Transm. Suppl. 3, V. 52, s. 87).

Alle de tre studerte cellelinjene er meget sensitive for laserbestrålingseffekt etter PS-behandling (data fra MTT-test). Ifølge følsomhet overfor laserbestråling ble cellene rangert som følger: RGGN1 > PC12 > Hep27.

Forlenget PS-effekt i 5 μM konsentrasjon av celler i mørke var overlevelse 96,5 – 86,2 % for PC-12, 103, 7 – 93,0 for RGGN1 og 109,7 – 87,9 % for Hep27 (MTT-test – krystallfiolett, tilsvarende). Under de samme betingelser holdt DNA-syntesen i PC-12 celer seg hovedsakelig upåvirket og den var tilsvarende redusert 21,2 og 22,2 % i Hep27 og RGGN1-celler. Den observerbare økningen i antallet RGGN1 og Hep27-celler under påvirkning av 5 μM PS på celler i mørke er mer typisk for PS i fravær av bestråling enn introduksjon av proliferativ aktivitet.

Celledød blir observert etter laserbestråling av celler behandlet med PS.

Dose-avhengig cytofototoksisk aktivitet av preparatet blir detektert og den

tillater å beregne EC_{50} , dvs. å bestemme den konsentrasjonen av PS ved hvilke 50 % av cellene dør. Disse data er gitt i tabell 2. Det må bli observert at PS med EC_{50} lavere enn 20 μM er ansett å være effektiv overfor undertrykkelse av tumorvekst.

5

DNA-syntese i PC-12-celler er sterkt redusert (96,5% reduksjon sammenlignet med kun bestrålt kontroll) ved bestemmelse av genofototoksisitet etter behandling med celler med 5 μM PS og laserbestråling. DNA-syntese-stimulering etter laserbestråling ved lave PS-konsentrasjoner ble observert i Hep27 og RGGN1-celler, denne syntesen ble betydelig redusert i nærvær av 5 μM RC. Den observerbare DNA-syntesestimuleringen kan bli forklart ved det faktum at transformerte lever- og gliaceller som overlevde ved lav PS-konsentrasjoner har høy evne til å syntetisere DNA og å regenerere populasjonen.

PS er således et sterkt cytofototoksisk preparat for forskjellige typer tumorceller. I høye konsentrasjoner (> 5 μM) er det en moderat hemmer for tumorvekst selv uten bestråling. På grunn av høy genofototoksisitet kan PS bli ansett som et sterk hemmer for tumorvekst selv uten bestråling. På grunn av høy fenofototoksisitet kan PS bli ansett som en sterk hemmer for tumorvekst ved bestråling.

PS toksiske egenskaper ble studert i *in vitro* eksperimenter (eksempel 14). Den gjennomsnittlige LD_{50} er $210,53 \pm 22,2$ mg/kg når vektkoeffisienten er tatt i betraktning, og dosen som forårsaker død av 10% av eksperimentdyrene (LD_{10}) er 169,87 mg/kg. Disse eksperimentene tillater å anse PS som et "lavtoksisk stoff".

PS biodistribusjon ble studert i *in vivo* eksperimenter (eksempel 11). De følgende mekanismene for distribusjon av forbindelsene er observert når PS blir introdusert intraperitonealt i mus med T36 embryocarcinoma

inokulert i den bakre leggmuskelen. Etter injeksjon av PS kommer den inn i blodet, og den blir så redistribuert inn i organer og vev til et dyr (tab. 3).

Som det kan sees i tabell 3 blir maksimum for tumorakkumulering (0,70
5 μM) oppnådd i løpet av 5 timer etter intraperitoneal injeksjon i en dose på 40 mg/kg og det blir observert i en lang periode (18-24 timer).

Tumorkonsentrasjon 18 t etter injeksjon er 0,48 μM , det vil si 1,5 ganger mindre enn ved det absolutte akkumuleringsmaksimum ved høy
selektivitet for akkumulering. Tumor/muskelvev-forholdet er 32, og
10 tumor/hud-forholdet er 44.

Tumorakkumulerings maksimum (0,32 μM) blir oppnådd i løpet av 0,5 timer etter intravenøs injeksjon ved en dose på 20 mg/kg og det blir også oppretthold i en lang periode (opp til 5 timer). Maksimum kontrast for
15 akkumulering ved intravenøs injeksjon blir oppnådd i løpet av 3 timer og denne verdien er 3 for tumor/muskel-vev og 4 for tumor/hud. 98 % av PS blir utskilt av organismen i løpet av en dag.

Tabell 2

Lipofil koeffisient og in vitro aktivitet til "Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Fotochlorin").

Test, cellelinjer	Cytotoksisitet ("mørke"-toksisitet), % til kontroll ved 5 μM	Fotocytotoksisitet, EC_{50} , μM^1	(Cd)
MTT-test, PC-12	96,5	1,8	1,4
MTT-test, RGGN1	103,7	1,8	
MTT-test, Hep27	109,7	3,9	
Krystallfiolett-test, PC-12	86,2	1,5	
Krystallfiolett-test, RGGN1	93,0	1,8	
Krystallfiolett-test, Hep27	87,9	4,7	
Genotoksisitet, PC-12	104,7	3,5 % til kontroll ved 5 μM	
Genotoksisitet, RGGN1	77,8	132,2 % til kontroll ved 5 μM	
Genotoksisitet, Hep27	78,8	100,7% til kontroll ved 5 μM	

¹Bortsett fra for genofototoksisitet

5

Resultatene for beregningen av effektiviteten for preparatene ved PDT ved cancer i *in vivo* eksperimenter i mus (eksempel 15) tillater å fastslå at

"Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjoner" ("Fotochlorin") og "Radachlorin, 0,05 % gel" har den uttrykte fotodynamiske aktiviteten. "Væskeekstraktet av chloriner" medisinsk stoff som inkluderer natriumsalter av chloriner (eller salter av chloriner og andre sterke uorganiske baser) ble benyttet for fremstilling av medisinske former ved tilsetning av forskjellige tilsetningsstoffer godkjent av RF State Pharmacopoeia: kalsiumkarbonat, sakkarose, glukose, stivelse, magnesiumstearat, polyvinylpyrrolidoner, polyglukaner, metylglukamin, isotone oppløsninger, dimetylsulfoksid, gel og vann-emulsjonspreparater etc. (eksempler 4-9).

Salver, kremer, geler, oljebaserte preparater blir benyttet for utvordes bruk, disse formene inneholder substratene godkjent av RF State Pharmacopoeia, 5-20% dimetylsulfoksid og 0,5 – 12 % av "væskeekstrakt av chloriner" stoff eller 0,8 – 14% av "væskeekstrakt av chloriner" stoff og 86 – 99,2 dimetylsulfoksid (eksempel 8,9).

Konsentrasjonsområdet for dimetylsulfoksid i kombinasjon med substrater blir forklart ved det faktum at penetreringen av stoffet inn i vevet er lav ved konsentrasjoner lavere enn 5%, og det reduserer effektiviteten til PDT. Dersom konsentrasjonen av dimetylsulfoksid er høyere enn 20 % medisinske former på annen basis taper deres stabilitet ved lagring. Området for konsentrasjonen av stoff er forklart ved det faktum at dersom denne konsentrasjonen er lavere enn 0,5% konsentrasjon av stoff i vev er utilstrekkelig for effektiv PDT. Dersom konsentrasjonen av stoffet er høyere enn 12% vev taper transparensen for lysbestråling, hvor alt lys blir absorbert i det øvre laget av vevet som resulterer i en forbrenning ved lav effektivitet til PDT-proseduren.

Tabell 3

De viktigste farmakokinetiske parametere

PS	Maksimum for absolutt akkumulering, organ- μM – timer	Maksimum for akkumulering i tumor, μM - timer	Forhold tumor/hud ved maksimal akkumulering i tumor	Forhold tumor/muskel ved maksimal akkumulering i tumor	Akkumulering i tumor ved maksimal kontrast, μM – timer	Forhold tumor/hud ved maksimal kontrast	Forhold tumor/muskel ved maksimal kontrast	Ekskresjon, % -- timer
Fotochlorin intravenøs, 20 mg/kg	Tynntarm – 4,0 – 0,5	0,32 – 0,5	6,4	1,6	0,29 – 3	14,5	2,9	98—24
Fotochlorin intraperitonealt, 40 mg/kg	Blod – 5,2 – 0,5	0,70 - 5	3,9	3,0	0,48 -18	44,0	32,0	98—24

Eksposering av stoff på huden før bestråling er 0,5 – 24 timer ved utvortes bruk. Stoffet har ingen tid til å penetrere inn i et vev til nødvendig dybde på tider mindre enn 0,5 timer. Dersom tidsintervallet er mer enn 24 timer blir fallet av den absolutte akkumuleringen av preparatet observert på grunn av dets

5 redistribusjon og ekskresjon. Dessuten, er langtidseksposering av utvortes medisinske former på en hud uønsket fra et klinisk synspunkt.

Preparatet blir benyttet for intravenøs dråpevis eller innføring som en strøm i form av 0,1 til 1% oppløsning i et hvilket som helst medium godkjent av RF

10 State Pharmacopeia (apyrogen vann for injeksjon, dimetylsulfoksid, saltvannsolusjon etc.). Anvendelse av oppløsninger av stoffet med lavere konsentrasjon lavere enn 0,1% er irrasjonelt på grunn av de volumene væske som blir innført i en organisme. Anvendelsen av væsker med konsentrasjon høyere enn 1% er umulig på grunn av den lave filterbarheten til slike

15 oppløsninger i steriliseringstrinnet gjennom bakterielle filtre.

Halvleder laserdiodemodul for fotodynamisk terapi ML-662-SP designet av ZAO "MYLON" (St. Petersburg) og OOO "SIGM LUS" (Moskva) blir benyttet for aktivering av PS "væskekstrakt av chloriner" stoff. Denne modulen har de

20 følgende utgangsdata (sertifikat fra det Russiske Helseministeriet, reg. nr. 29/10-679-96):

Effekt på 2,5 – 3 W i en fiber på 200 mikron med en åpning på 0,22.

Høyintensive laserdioder fra "Polaroid" corp. (USA) og OOO "SIGM PLUS" samproduksjon med maksimum bestrålingsbølglengde på 662 ±3 nm.

25 Moduler med en lavere effekt (med et mindre antall dioder) med maksimum bestrålingsbølglengde på 662 ±3 nm kan bli benyttet for aktivering av PS-stoff, solid-state-laseren med pumping på en andre harmoniske av yttrium-aluminium garnet YAG:Nd³⁺ med en maksimum bølglengde for bestråling på 670 nm kan

30 også bli benyttet.

Mengden tilført energi varierer fra 30 opp til 300 J. Ved lysdoser lavere enn 30J blir PDT-proseduren alt for lang siden scanningen må bli utført på ekstremt små områder for å oppnå den maksimale effekten. Ved lysdoser som er større enn

2500 J/cm² blir betydelig skade av friskt vev som fører til forlenget regenereringsperiode, observert.

Området for bølgelegder for eksiterende bestråling er forbundet til en teknisk karakteristikk til den benyttede laseren (662 ±3 nm), skift av absorpsjonsmaksimum til preparatet avhengig av polariteten til mediet (654 – 662 nm) og innholdet av purpurin 5 i stoffet (2-15%, halv bredde av et langbølget absorpsjonsbånd ved 663 – 670 nm)(tab. 1).

10 Eksempel 1. Beskrivelse av de fysiokjemiske egenskapene til PS

PS representerer en tett mørk masse som gir en grønn skygge i et tynt lag, med en odør av alge.

For å bekrefte autenticiteten til PS "væskekstrakt av chloriner", ble 7,5% grundig omrørt, en del av ekstraktet (1 mg) ble oppløst i 10 ml medisinsk eller den mest rensede rektifiserte etylalkoholen, 95%, og optisk densitet ble målt ved 662 nm (D). Verdien var 0,23. Den molekylære eksinksjonen ϵ (M⁻¹cm⁻¹) ble beregnet ifølge formelen

20 $\epsilon = D * 597 / (0,004)$. Den resulterende verdien skal ligge i området 33300 – 35100. "Væskekstraktet av chloriner" inneholder således 7,5% PS.

PS-oppløsning i etylalkohol har en gul-grøn farge. Oppløsningen får rubinrød farge dersom lysstråler fra den medisinske blå lampen MDS 220-75 (tekniske spesifikasjoner 16.535.376-79) blir ledet gjennom opplysningslaget på et lysbeskyttet sted.

For den kvantitative bestemmelsen blir "væskekstrakt av chloriner" grundig omrørt, et del av ekstraktet (5 mg) blir oppløst i 10 ml medisinsk eller den mest rensede rektifiserte etylalkoholen, 95%, og optisk densitet ble målt ved 662 (D). Verdien var 2,15. PS-innholdet ble beregnet ifølge formelen: $c, \% = (2,15 * 597 * 10 * 100) / (34230 * 5) = 7,5\%$ (Tilsvarende spesifikasjonen).

For ytterligere analyse ble fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til 100 mg "væskekstrakt av chloriner" til PS felles ut, utfellingen blir filtrert fra, tørket i

vakuum over fosforpentoksyd i 12 timer og PMR-, massespektere og absorpsjonsspekter blir tatt i bølglengdeområdet 360-720 nm.

PS PMR spektrum (Fig. 6): (i (DMSO-D₆, kons. oppløsning): 9,64, 9,55, 9,52,
5 9,39, 9,80, 8,90, 8,79 (s, meso-H av chlorin e₆ og purpurin 5), 8,09, 8,04, 7,97,
7,92, (2d, CH=CH₂), 5,43 (2s, γ-meso-CHO av purpurin 5), 6,37, 6,32, 6,13,
6,10 (2d, CH=CH₂), 5,43 (2s, γ-meso-CH₂COOH), 4,60 (m, 7-H), 4,45 (m, 8-),
4,45 (m, 8H), 3,80, 3,56 (qx2, 4-CH₂CH₃), 3,75, 3,64, 3,51, 3,36, 3,29, 3,23 (n,
10 nukleær CH₃ av chlorin og purpurin 5), 2,38, 2,32 (2m, 7-CH₂CH₂COOH), 2,71,
2,20 (2m, 7-CH₂CH₂COOH), 1,76 (d, 8-CH₃), 1,72 (t, 4-CH₂CH₃), -1,63, -1,91
(2s, 2NH) ppm.

PS massespekter (Fig. 7): e.i. M⁺ (%), 596 (16,0), 566 (9,4), 508 (100,0), 494
(7,3), 447 (9,4), 435 (50,6), 421 (12,8), 405 (6,9), 254 (7,4). PS synlige
15 absorpsjonsspekter: λ (ε)(etanol), 386 (22310), 406 (113040), 506 (14870), 536
(8925), 608 (7437), 662 (34220).

Ifølge PMR spekteret inneholder stoffet 80 % chlorin e₆, 15% purpurin 5 og 5%
purpurin 18 (mindre signaler ved 9,25, 9,10, 8,71, 7,84, 3,32, 3,04 ppm), som
20 tilsvarer til en sammensetning som blir patentert. Ifølge massespekteret er der
topper av molekyllære ioner 596 av chlorin e₆ og 566 av purpurin 5. I
absorpsjonsspekteret er der et bånd ved 662 nm med absorpsjonsverdien som
passer godt med den molekyllære ekstinksjonen til PS etalon (34230).

25 Den studerte prøven er således "væskeekstrakt av chloriner", 7,5%.

Eksempel 2. Fremstilling av PS som "væskeekstrakt av chloriner", 6,5%
Spirulina biomasse (2 kg) ble behandlet med aceton (3 x 2 l) til klorofyll a var
fullstendig ekstrahert, biomassen ble filtrert fra, ekstraktet behandlet med
30 saltsyre (30 ml) for å fjerne magnesiumioner fra klorofyllmolekylet, ekstraktet ble
nøytralisert og utfyllt feofytin a (8 g) ble filtrert fra, så ble feofytin a hydrolysert i
blandingen av saltsyre – aceton – heksan, for dette formålet ble feofytin a
oppøst i blandingen av 50 ml aceton, 5 ml heksan og 40 ml saltsyre (37%),
blandingen ble oppvarmet til 40 °C og omrørt i en time, så ble heksan (50 ml)

tilsatt og organisk fase ble vasket med blandingen av aceton og saltsyre (2:1, 3 x 50 ml), vannfasen ble vasket med heksan (5 x 40 ml), så ble vannfasen inneholdende feoforbid a nøytralisert med overskudd av natriumcitrat (tri-, di- eller monosubstituert) vannoppløsning, utfelt feoforbid a ble filtrert ut, vasket
5 med vann (3 x 50 ml), rekrystallisert ut fra aceton – vann-blanding, lufttørket til dets masse ble konstant (feoforbid a utbytte er 4,2 g, 7,1 med mer, 77%), så ble feoforbid a (2,7 g, 4,56 mM) oppløst i aceton (100 ml), sterk uorganisk base ble tilsatt i form av vannoppløsning (0,05%, 25 ml), omrørt ved 60 °C i 5 minutter, ekstra volum av uorganisk base ble tilsatt i form av vannoppløsning (20 %, 25
10 ml), blandingen ble oppvarmet til 40 °C i 90 minutter, nøytralisert med fortynnet saltsyre (2%, omkring 250 ml), chlorin e₆ utfelling blir separert ved sentrifugering, vasket med destillert vann (5 x 10 ml) til sur reaksjon forsvinner, 1,85 g (2,96 med mer, 65%) chlorin e₆ ble fremstilt, så blir chlorin e₆ rekrystallisert fra aceton for å separere lineære tetrapyrroler, chlorin e₆ blir
15 filtrert ut og vasket tre ganger med destillert vann, chlorin e₆ blir oppvarmet i forseglet reservoar ved en temperatur på 40 °C i 30 dager, så avkjølt og 1 % natriumhydroksydoppløsning ble tilsatt til pH 7,5, det resulterende PS inneholder 15% purpurin 5, 80 % chlorin e₆ og 5% purpurin 18 (chlorin p₆), så ble oppløsningen justert med destillert vann for å gi en konsentrasjon av
20 fotosensibilisator på 6,5% for å gi 14,2 g (50%) PS i form av 6,5% "Væskeekstrakt av chloriner".

Det resulterende PMR spekteret av "væskeekstrakter av chloriner" (Fig. 6): (i (DMSO-D₆, kons. oppløsning): 9,64, 9,55, 9,52, 9,39, 9,80, 8,90, 8,79 (s, meso-
25 H av chlorin e₆ og purpurin 5), 8,09, 8,04, 7,97, 7,92, (2d, CH=CH₂ av chlorin e₆ og purpurin 5), 6,84 (2s, γ-meso-CHO av purpurin 5), 6,37, 6,32, 6,13, 6,10 (2d, CH=CH₂), 5,43 (2s, γ-meso-CH₂COOH), 4,60 (m, 7-H), 4,45 (m, 8-H), 4,45 (m, 8-H), 3,80, 3,56 (qx2, 4-CH₂CH₃), 3,75, 3,64, 3,51, 3,46, 3,29, 3,23 (n, nukleær CH₃ av chlorin e₆ og purpurin 5), 2,38, 2,32 (2m, 7-CH₂CH₂COOH),
30 2,71, 2,20 (2m, 7-CH₂CH₂COOH), 1,76 (d, 8-CH₃), 1,72 (t, 4-CH₂CH₃), -1,63, -1,91 (2s, 2NH) ppm.

Stoffet inneholder 80 % chlorin e₆, 15% purpurin 5 og 5% purpurin 18 (chlorin p₆)(signaler ved 9,25, 9,10, 8,71, 7,84, 3,55, 3,32, 3,04) ppm.

Det resulterende massespekter av stoffet (Fig. 7): e.i. M^+ (%), 596 (16,0), 566 (9,4), 508 (100,0), 494 (7,3), 447 (9,4), 435 (50,6), 421 (12,8), 405 (6,9), 254 (7,4).

- 5 Synlige absorpsjonsspekter (fig 8): λ (ϵ)(etanol), 386 (22310), 406 (113040), 506 (14870), 536 (8925), 608 (7437), 662 (34220).

Eksempel 3. Fremstilling av PS som "væskekstrakt av chloriner", 7,5%.

- Spirulina* biomasse (2 kg) ble behandlet med aceton (3 x 2 l) til klorofyll a var fullstendig ekstrahert, biomassen ble filtrert fra, ekstraktet behandlet med saltsyre (30 ml) for å fjerne magnesiumioner fra klorofyllmolekylet, ekstraktet ble nøytralisert og utfyllt feofytin a (8 g) ble filtrert fra, så ble feofytin a hydrolysert i blandingen av saltsyre – aceton – heksan, for dette formålet ble feofytin a oppøst i blandingen av 100 ml aceton, 50 ml heksan og 80 ml saltsyre (37%), blandingen ble oppvarmet til 60 °C og omrørt i 20 minutter, så ble heksan (100 ml) tilsatt og organisk fase ble vasket med blandingen av aceton og saltsyre (5:1, 3 x 50 ml), vannfasen ble vasket med heksan (5 x 40 ml), så ble vannfasen inneholdende feoforbid a nøytralisert med overskudd av natriumcitrat (tri-, di- eller monosubstituert) vannoppløsning, utfelt feoforbid a ble filtrert ut, vasket med vann (3 x 50 ml), rekrystallisert ut fra aceton – vann-blanding, lufttørket til dets masse ble konstant (utbytte er 3,8 g, 6,4 mM, 67%), så ble feoforbid a (2,7 g, 4,56 mM) oppløst i aceton (100 ml), sterk uorganisk base ble tilsatt i form av vannoppløsning (1%, 25 ml), omrørt ved 30 °C i 30 minutter, ekstra volum av uorganisk base ble tilsatt i form av vannoppløsning (20 %, 25 ml), blandingen ble oppvarmet til 60 °C i 20 minutter, nøytralisert med fortynnet saltsyre (2%, omkring 250 ml), chlorin e₆ utfelling blir separert ved sentrifugering, vasket med destillert vann (5 x 10 ml) til sur reaksjon forsvinner, 1,67 g (2,67 mM, 55%) chlorin e₆ ble fremstilt, så blir chlorin e₆ rekrystallisert fra aceton for å separere lineære tetrapyrroler, chlorin e₆ blir filtrert ut og vasket tre ganger med destillert vann, chlorin e₆ blir oppvarmet i forseglet reservoar ved en temperatur på 100 °C i 1 time, så avkjølt og 1 % natriumhydroksydoppløsning ble tilsatt til pH 8,5, det resulterende PS inneholder 2% purpurin 5, 82 % chlorin e₆ og 16% purpurin 18 (chlorin p₆), så

ble PS oppløsningen justert med destillert vann for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 7,5% for å gi 11,1 g (50%) PS i form av 7,5% pasta.

Spekteret for det resulterende stoffet er tilsvarende de som er gitt i eksempel 2 og representerer en superposisjon av spekteret til chlorin e₆ (fig. 9.11) og purpurin 5 (Fig. 12-14).

Eksempel 4. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – produksjon av "væskeekstrakt av chloriner", 7,5%.

PS inneholdende 2% purpurin 5, 82% chlorin e₆ og 16 % purpurin 18 (chlorin p₆) i form av 7,5% pastaen beskrevet i det tidligere eksempelet ble gelfiltrert på en Sephadex G10 kolonne med 50 mm diameter og 100 mm høyde ved anvendelse av 1% kaliumhydroksyd-oppløsning som elueringsmiddel, inntil chlorin e₆-innholdet blir 90%, purpurin 5 – 5% og purpurin 18 – 5%. Fortynnet saltsyreoppløsning blir tilsatt inntil PS utfelles, PS blir justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 7,5 vekt % for å gi 6,8 g "væskeekstakt av chloriner", 7,5%. Et elektronspekter av produktet – se fig. 8.

Eksempel 5. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – fremstilling av "Radachlorin, 0,1% oppløsning for injeksjon" medisinsk form.

Etter gelfiltrering blir fortynnet saltsyre tilsatt til oppløsningen av PS beskrevet i eksempel 4 inntil PS utfeller, denne utfellingen blir filtrert fra, konsentrert natriumhydroksyd-oppløsning i apyrogen vann blir tilsatt til pH 7,5, og apyrogen vann for injeksjon blir tilsatt for å gi konsentrasjon av PS på 0,1%, så blir bakterier filtrert fra oppløsningen gjennom antibakterielle "Millipore" mikroporøse filtre med 0,22 µm porer. Utbyttet er 500 ml oppløsning. Et elektronspekter av produktet – se fig. 8.

Eksempel 6. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – fremstilling av

"Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Fotochlorin") medisinsk form. Etter gelfiltrering blir fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til oppløsningen av PS beskrevet i eksempel 4 inntil PS utfeller, denne utfellingen ble filtrert, konsentrert kaliumhydroksyduppløsning ble tilsatt til pH 7, så ble oppløsningen

justert med N-metyl-D-glukamin opp til pH 8,5 under kontroll med pH-meter, apyrogen vann for injeksjon ble tilsatt for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 0,5 vekt%, så ble bakterier filtrert fra oppløsningen gjennom antibakterielt "Millipore" mikroporøst filter. Utbyttet er 100 ml
5 oppløsning. Et elektronspekter av produktet – se fig. 8.

Eksempel 7. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – fremstilling av "Radachlorin, 1% oppløsning for injeksjon" medisinsk form.

Etter gelfiltrering blir fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til oppløsningen av PS
10 beskrevet i eksempel 4 inntil PS utfeller, denne utfellingen ble filtrert, konsentrert natriumhydroksydoppløsning ble tilsatt til pH 8,5, så ble apyrogen vann for injeksjon ble tilsatt for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 1 vekt%, så ble bakterier filtrert fra oppløsningen gjennom antibakterielt "Millipore" mikroporøst filter. Utbyttet er 50 ml oppløsning. Et elektronspekter av produktet
15 – se fig. 8.

Eksempel 8. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – fremstilling av "Radachlorin, gel" medisinske former.

Etter gelfiltrering ble fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til oppløsningen av PS
20 beskrevet i eksempel 4 inntil utfelling av PS, denne utfellingen ble sentrifugert ut, justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 6,5 vekt%, så ble de følgende varianter realisert:

Variant (a). 0,3 g Pemulen TR1 eller Carbopol 2020 (BF Goodrich, UK) ble
25 tilsatt til 75 ml vann og 5 g dimetylsulfoksyd ved romtemperatur og omrørt i ¼ - 8 timer. Alkalisk vannoppløsning ble tilsatt til pH 5. Gel ble resuspendert ved tilsetning av "væskesktrakt av chloriner", 6,5 vekt% og vann for å gi en konsentrasjon på 0,05 vekt% av chlorin e₆ i den resulterende gel, gelen ble vakuumsert i 5 minutter ved 10 – 50 mm Hg. Utbyttet ble 100 g. gel.

30

Variant (b). 5 g dimetylsulfoksyd og "væskesktrakt av chloriner", 6,5 vekt% ble tilsatt til 70 ml vann for å gi 0,05 % konsentrasjon av chlorin e₆ i den resulterende gel, så ble 15 g Aculyne 33A (ISP, USA) tilsatt. Stoffet ble omrørt til

homogenitet og alkalisk vannoppløsning ble tilsatt til pH 5. Gelen ble vakuumisert i 5 minutter ved 10 – 50 mm Hg. Utbyttet var 100 g gel.

Etter gelfiltrering ble fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til oppløsningen av PS
5 beskrevet i eksempel 4 inntil utfelling av PS, denne utfellingen ble sentrifugert ut, justert med apyrogen vann for injeksjoner for å gi en konsentrasjon av fotosensibilisator på 7,5 vekt%, så ble de følgende varianter realisert:

Variant (c). 0,7 g Pemulen TR1 eller Carbopol 2020 (BF Goodrich, UK) ble
10 tilsatt til 60 ml vann og 20 g dimetylsulfoksyd ved romtemperatur og omrørt i ¼ - 8 timer. Vannoppløsning av trietanolamin ble tilsatt til pH 8,5. Gel ble resuspendert ved tilsetning av "væskeskstrakt av chloriner", 7,5 vekt% og vann for å gi en konsentrasjon på 1 % av chlorin e₆ i den resulterende gel, gelen ble vakuumisert i 5 minutter ved 10 – 50 mm Hg. Utbyttet ble 100 g. gel.

15 Variant (d). 20 g dimetylsulfoksyd og "væskeskstrakt av chloriner", 7,5 vekt% ble tilsatt til 55 ml vann for å gi 1 % konsentrasjon av chlorin e₆ i den resulterende gel, så ble 15 g Aculyne 33A (ISP, USA) tilsatt. Stoffet ble omrørt til homogenitet og vannoppløsning av trietanolamin ble tilsatt til pH 8,5. Gelen ble
20 vakuumisert i 5 minutter ved 10 – 50 mm Hg. Utbyttet var 100 g gel.

Eksempel 9. Et spesialtilfelle for fremstilling av PS – fremstilling av

"Radachlorin, dimetylsulfoksydoppløsning for utvortes bruk" medisinske former.

Variant (a). Etter gelfiltrering i eksempel 4 ble fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt
25 til blandingen inntil PS utfelte. Denne utfellingen ble filtrert ut, justert med apyrogen vann for injeksjon for å gi en konsentrasjon av PS på 7,5 vekt% og 14 g av det resulterende "væskeskstrakt av chloriner" ble tilsatt til 86 g dimetylsulfoksyd ved romtemperatur for å gi en konsentrasjon av chlorin e₆ på 1 % i den resulterende oppløsningen og omrørt til homogenitet. Utbyttet var 100 g
30 av oppløsningen.

Variant (b). Etter gelfiltrering i eksempel 4 ble fortynnet saltsyreoppløsning tilsatt til blandingen inntil PS ble utfelt, denne utfellingen ble filtrert ut, justert med apyrogen vann for injeksjon til en PS konsentrasjon på 7,5 vekt% og 0,8 g av

det resulterende "væskekstrakt av chloriner" ble tilsatt til 99,2 g av dimetylsulfoksyd ved romtemperatur for å gi 0,05 % konsentrasjon av chlorin e₆ i den resulterende oppløsningen, og omrørt til homogenitet. Utbyttet er 100 g av oppløsningen.

5

Eksempel 10.

For purpurin 5 identifikasjon ble reaksjonsblandingen fra eksempel 2 gelfiltrert op en Sephadex G10 kolonne ved anvendelse av 1% N-metyl-D-glucamin-oppløsning som elueringsmiddel for å gi 3 fraksjoner, de første og andre
10 fraksjonene inneholder purpuring 5. Disse fraksjonene ble nøytralisert, et utfelling ble filtrert fra, oppløst i kloroform – metanol, 1:2-blanding, og esterifisert med diazometan. Blandingen ble vasket med vann, en organisk fase ble separert, tørket med vannfri magnesiumsulfat, konsentrert ved avdamping under vakuum og kromatografert på silikagel, Merck, Kieselgel, 0,04-0,063, den
15 siste (minst mobile) fraksjonen ble oppsamlet. Hvis nødvendig ble den resulterende purpurin 5 dimetylester (10,1 % beregnet til tørr reaksjonsmasse tatt for esterifisering) kromatografert pånytt.

PMR-spekter (fig. 15): (DMSO-D₆, kons. oppløsning): 9,64, 9,46, 8,83 (s, meso-
20 H), 8,06 (2d, CH=CH₂), 6,82 (s, γ-meso-CHO), 6,34, 6,31, 6,19, 6,16 (2d, -CH=CH₂), 4,54 (m. 7-H), 4,46 (m, 8-H), 3,61 (q, 4-CH₂CH₃), 4,20, 3,81, 3,57, 3,53, 3,47 (5s, -COOCH₃) og nukleær -CH₂), 2,38, 2,35 (2m, 7 - CH₂CH₂COOH), 2,68, 1,85 (2m, 7 -CH₂CH₂COOH), 1,73 (d, 8-CH₃), 1,70 (t, 4-CH₂CH₃) ppm.

25

Massespekter (fig. 16): e.i., M⁺ (%), 594 (8,6), 566 (100,0), 505 (5,1), 491 (9,8), 475 (8,2), 463 (1,7), 447 (1,4), 433, (1,7), 403 (2,0), 262 (5,0).

Synlig absorpsjonspekter (fig. 17): λ (ε) (kloroform), 408 (117200), 501 (11380),
30 543 (9830), 617 (6720), 668 (35200).

Purpurin 5 dimetylester ble oppløst i aceton og konsentrert saltsyre (37%) ble tilsatt i forholdet 1:2. Blandingen ble omrørt i 2 timer ved 25 °C, nøytralisert, purpurin 5 ble filtrert ut, vasket med vann, oppløst i 10% N-metyl-D-glucamin-

oppløsning og gelfiltrert på en Sephadex G10 kolonne ved anvendelse av 1% N-metyl-D-glucamin-oppløsning som elueringsmiddel, den andre fraksjonen ble oppsamlet, nøytralisert, en utfelling ble filtrert fra, vasket med vann, tørket over fosforpentoksyd inntil vekten ble konstant for å gi purpurin 5 (5,2 % beregnet på tørr reaksjonsmasse tatt for esterifisering).

PMR-spekter (fig. 12): (DMSO-D₆, kons. oppløsning): 9,55, 9,39, 8,79 (s, meso-H), 8,09, 8,04, 7,97, 7,92 (2d, CH=CH₂), 6,84 (s, γ-meso-CHO), 6,37, 6,32, 6,13, 6,10 (2d, -CH=CH₂), 4,60 (m, 7-H), 4,45 (m, 8-H), 3,55 (q, 4-CH₂CH₃), 3,75, 3,46, 3,23, (s, nukleær -CH₂), 2,38, 2,32 (2m, 7 -CH₂CH₂COOH) 2,71, 2,20 (2m, 7 -CH₂CH₂COOH), 1,76 (d, 8-CH₃), 1,72 (t, 4-CH₂CH₃) ppm.

Massespekter (fig 13): e.i. M⁺ (%), 566 (8,2), 494 (100,0), 447 (9,1), 435 (49,6), 421 (12,7), 405 (6,6), 254 (7,1).

Synlig absorpsjonsspekter (fig. 14) λ (ε) (etanol), 408 (116900), 501 (11320), 540 (9790), 615 (6710), 665 (35090).

Eksempel 11. Studie av farmakokinetikk og metabolisme av "væskeekstrakt av chloriner" stoffene og "Radochlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinsk form.

769,2 mg/kg av 6,5% "væskeekstrakt av chloriner" stoff fra eksempel 2 (50 mg/kg beregnet for vannfritt chlorinstoff) ble introdusert intraperitonealt i mus av linjen Balb(c). Musene ble avlivet 3 timer etter injeksjon (hver gruppe bestod av 3 mus). Materialene fra lever, nyre, milt, lunger, tynntarm, tumor, omkringliggende muskelvev så vel som fra blod, urin, fæses fra tykktarmen med vekt på 100 mg fra hver, ble grundig homogenisert i glasshomogenisatorer tilsatt 4 ml saltvannsoppløsning. For undersøkelser av biologiske fluider (blod, urin) ble 0,1 ml av hvert fluid tatt med påfølgende fortykning i 4 ml saltvannsoppløsning. De resulterende homogenatene ble studert på "Perkin-Elmer" spektrofotometer (MPF-44A modell).

Studie av "Radachlorin, 0,5 % oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin" medisinsk form ble utført på en tilsvarende måte i homogenisater av organer og vev fra mus til hvilke preparatet var gitt intraperitonealt i doser på 50 mg/kg, hvor dyrene ble avlivet 3 timer etter injeksjon.

5

I begge tilfeller var der et skift av maksimum for fluorescens i vev av lever, tynntarm, milt og nyre til 670 nm (med 10 – 12 nm sammenlignet med 0,01 M boratbufferoppløsning, pH 9,2, og med 5-6 nm sammenlignet med 0,01 M boratbufferoppløsning, pH 9,2, med 1% human serumalbumin), noe som indikerer metabolismen av "Radachlorin, 5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin")(fig. 5).

10

I fluorescensspekteret ser dette fenomenet forskjellig ut enn rett og slett en enkel spekterutvidelse og skift mot det langbølgede området på grunn av den hydrofobe effekten til mediet (for eksempel etter en hydrofob interaksjon med proteiner, lipoproteiner). Skift av intensitetsmaksimum blir observert uten eller med en liten utvidelse av et bånd som er typisk for dannelsen av en ny forbindelse. Fluorescensspekteret til purpurin 5 i 0,01 M boratbufferoppløsning, pH 9,2, med 1 % humant serumalbumin er kjennetegnet ved tilstedeværelsen av 670 nm bånd.

15

20

I blod, pulmonar parenchyma, så vel som i hud og tumor blir utvidelse av spekteret med 1,4 – 1,5 ganger bølgelengden på 669 nm, observert, noe som indikerer tilstedeværelsen av "Radachlorin, 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") (dets kompleks med proteiner) og en metablolittblanding i homogenater.

25

Dersom "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") blir tilsatt direkte til rørene med homogenater av intakte animalske vev i konsentrasjoner på 0,5 – 1,0 μM , blir en metablolitt av "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") detektert i blod, tynntarm, lever, milt og lunge (et skift til langbølget område uten utvidelse av spekteret), og kun i hudhomogenat ble en svak 1,15 ganger utvidelse av spekter halvbredde, observert, noe som indikerer nærværet av "Photochlorin" – metablolitt blanding i en prøve.

30

Dersom "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") konsentrasjonen i homogenater av organer ble øket til 5-10 μM , ble nærværet av chlorin e_6 – purpurin 5 blanding registrert i praktisk talt alle prøvene (et skift
5 av spekteret til langbølget område med 1,15-1,05 ganger økning av halvbredde av spekteret).

Det er således mulig å anse at dannelsen av en metabolitt ved tilsetning av "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") til homogenater
10 avhenger av konsentrasjonen av preparatet og aktiviteten til enzymer i et homogenisert vev.

Disse eksperimentene demonstrer klart omdannelsen av chlorin e_6 til purpurin 5 under *in vivo* og *in vitro* betingelser. Denne omdannelsen er tilsvarende til
15 omdanningen av chlorin e_6 til purpurin 5 ved oppvarming.

Eksempel 12. N-oktanol/fosfatbuffer, pH 7,4, distribusjonskoeffisient.

300 ml n-oktanol og 300 ml fosfatbuffer, pH 7,4, ble virvlet i 20 sekunder og sentrifugert i 10 minutter ved 10000 omdreininger per minutt for separasjon. 0,1
20 ml PS prøve med en konsentrasjon av PS på 5 mg/ml ble oppløst i preparert bufferoppløsning (2 ml) og n-oktanol (8ml), absorpsjonsmaksimum ble bestemt ved 406 nm.

Verdiene av D^o_c og D^b_c ble fremskaffet, hvor o er n-oktanol, b er fosfatbuffer, c er kontroll. Likevektsdistribusjon av n-oktanol/fosfatbuffer ble oppnådd ved
25 virvling av 2 ml fosfatbuffer og 8 ml n-oktanol med 0,1 ml PS i 20 sekunder ved 20 °C med påfølgende sentrifugering i 10 minutter ved 10000 omdreininger per minutt. Optisk densitet til hver fase ble målt ved 406 nm for å gi verdiene for D^o og D^b , hvor o er n-oktanol, b er fosfatbuffer.

30

C_d ble beregnet ifølge formelen:

$C_d = (D^o V^o D^o_c V^o_c) / (D^b V^b D^b_c V^b_c)$, hvor V^o – volumet av oktanol som er tatt for bestemmelse av likevektsdistribusjon (8ml), V^o_c – volumet av oktanol, mettet med vann, tatt for kontroll av prøvens absorpsjon (8 ml), V^b – volumet av

bufferen tatt for bestemmelse av likevektsdistribusjon (2 ml), V_c^b – volumet av bufferen, mettet med oktanol, tatt for kontrollbestemmelse av prøvens absorpsjon (2ml). Eksperimenter ble utført tre ganger og gjennomsnittet av verdiene for C_d ble beregnet.

5

Den resulterende verdien er $1,4 \pm 0,3$.

Eksempel 13. Bestemmelse av *in vitro* fototoksisitet (biologisk aktivitet) og cytotoxiskitet (celletoksisitet) til "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinske former.

10

For dette arbeidet ble laminaren "Flow Lab"(UK), CO₂-inkubatoren "Flow Lab"(UK), multiscanneren "Bio-Tek Instruments" (USA), medier og serum "PanEco" (Russland), benyttet.

15

For et eksperiment ble celler fra en linje plassert i to 48 cellers plater: en for laserbestråling og en for "mørke"-eksperimentet. Neste dag ble preparatet tilsatt til cellene i konfluent tilstand og platene ble holdt ved konstant temperatur på et svart papir. Preparatkonsentrasjonene på 0,1, 0,5, 2,0 og 5,0 μM ble studert. 3 timer etter tilsetning av preparater ble cellene bestrålt med laser, hvor bestrålingsdosene var 50 J/cm^2 og 39 timer senere ble MTT-test utført så vel som inkubering med ¹⁴C-tymidin for bestemmelse av DNA-syntese ("mørke"-skålen ble også testet). I alle tilfellene ble den øvre delen av platen benyttet for MTT-testen, og den nedre delen ble benyttet for måling av DNA-syntese og antallet celler etter farging med krystallfiolett.

20

Dataene vist i tabell 2 er gjennomsnitt for 4 parallelle eksperimenter.

Eksempel 14. *In vivo* studie av toksiske egenskaper til "væskeekstraktene av chloriner" stoff og "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinske former.

30

Toksisitet ble studert ved intravenøs injeksjon av PS i hvite laboratoriemus med vekt 19-21 g (utklekkingsanstalt ved det Russiske Akademi for Medisinske Vitenskaper, Krukovo). Dyrene ble holdt under standart dyrehagebetingelser og ble matet ifølge det russiske helseministeriets ordre nr. 1179 av 10.10.83 "Om

godkjenningen av spesifikasjoner for foringsforbruk for laboratoriedyr i helseinstitusjoner". Toksisitet ble bestemt ifølge død av dyr, etter beregning av gjennomsnittlig dødelig dose – LD₅₀. Beregningen ble utført ifølge statistiske metoder anbefalt av State Pharmacopoeia, utgave XI (1,3). På basis av LD₅₀ ble det studerte preparatet referert til den spesifikke klassen for toksisitet ifølge Hodge og Sterner. Forgiftningsreaksjonene ble også registrert under eksperimentene.

- 12 mus (6 hannkjønn og 6 hunnkjønn) ble benyttet for hver testede PS-dose.
- 10 De følgende dosene ble benyttet for bestemmelse av PS LD₅₀: 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 mg/kg. Oppløsningen med 5 mg/ml PS konsentrasjon ble introdusert i musene intravenøst, dosen ble variert ved volumet av introdusert PS.
- 15 Den resulterende LD₅₀ verdien var 210,53 ±22,2 mg/kg, LD₁₀ verdien er 169,87 mg/kg.

Eksempel 15. *In vivo* biologisk aktivitet ved anvendelse av "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinsk form.

- 20 Fotodynamisk aktivitet til "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinsk form ble studert på mus fra linjen Balb/c med T36 embryocarcinoma inokulert inn i muskelen på den bakre leggen. Musenes vekt var 20-21 g. Bestrålingsprosedyren ble realisert med diodelaser ML-662-SP 2 uker etter inokulering med en tumor. Hår ble fjernet fra hud i bestrålingsområdet
- 25 før prosedyren.

- Preparatet ble introdusert intraperitonealt i en dose på 40 mg/kg, noe som tilsvarer til en tilstrekkelig terapeutisk dose. For utførelse av bestrålingsprosedyren ble musene bedøvet med eter. Vekten til tumorene i kontrollgruppen og de eksperimentelle gruppene ved starttidspunktet for eksperimentene varierte fra 0,9 til 1 g. Bestråling ble utført 5-6 timer etter injeksjon av PS. Hvert dyr, bortsett fra kontroll, ble bestrålt en gang, så ble det observert i løpet av en måned etter prosedyren, området for tumornekrose og generell fysiologisk tilstand ble registrert.

Den gjennomsnittlige densiteten på den eksponerende dosen bestråling var 150 eller 300 J/cm².

- 5 De beste resultatene i form av den fullstendige tumornekrosen, skorpedannelse 1 uke etter PDT og frafall av skorpen i løpet av 1,5 måneder etter PDT ble observert i gruppen som oppnådde lysdosen på 300 j/cm².

Eksempel 16. Behandling av en basalcelle hudcancer ved anvendelse av
10 "Radachlorin 0,5% oppløsning for injeksjon" ("Photochlorin") medisinsk form. Basalcelle hudcanceren ble diagnostisert ved cytologisk undersøkelse av en avskrapning. Preparatet ble introdusert dråpevis intravenøst for å gi en konsentrasjon på 0,7 mg/kg av pasientens vekt etter fortykning i 100 ml 0,9% steril NaCl saltvannsoppløsning. Bestrålingen av tumoren ble utført i 2 – 3
15 timer med diodelaseren ML-662-SP med bølgelengde på 662 nm med overflatedose på 50 J/cm², uten lokalanestesi. Ingen uønskede bieffekter ble registrert under injeksjon av preparatet og laserbestrålingen. I to timer etter bestråling ble det dannet et mørk brunt fokus med omkringliggende rødaktige soner på 1-2 cm på tumorstedet. På slutten av den første dagen ble det dannet
20 en nekrose i stedet for tumoren i form av en tørr mørk brun skorpe (brannskorpe). I løpet av 2-3 uker skjedde en avvisning av skorpen og 2 uker senere skjedde den fulle epiteliseringen av huddefekten i stedet for den tidligere basilioma med god kosmetisk effekt.

25 Eksempel 17. Behandling av basalcelle hudcancer med anvendelse av "Radachlorin 0,05% gel" medisinsk form. Basalcelle hudcanceren ble diagnostisert ved cytologisk undersøkelse av en avskrapning. Gelen ble påført over tumoren i tynt lag, hvis mulig ble ikke den friske huden rørt. Bestrålingen ble utført 20 – 40 minutter etter påføring av
30 gelen. Bestrålingsprosedyren ble realisert med diodelaseren ML-662-SP ("Mylon-Sigm Plus", Russland) ved en bølgelengde på 662 nm. Densiteten til eksponeringsdosen ved bestråling var 2500 J/cm². I løpet av 2 timer etter bestråling ble det dannet et mørk brunt fokus med omkringliggende rødaktige soner på 1-2 cm på tumorstedet. På slutten av den første dagen ble det dannet

en nekrose i stedet for tumoren i form av en tørr mørk brun skorpe (brannskorpe). I løpet av 2-3 uker skjedde en avvisning av skorpen og 2 uker senere skjedde den fulle epiteliseringen av huddefekten i stedet for den tidligere basilioma med god kosmetisk effekt.

5

Eksempel 18. Fjerning av en tatovering ved anvendelse av Radachlorin 0,5% oppløsning i dimetylsufoksy for utvortes bruk” medisinsk form.

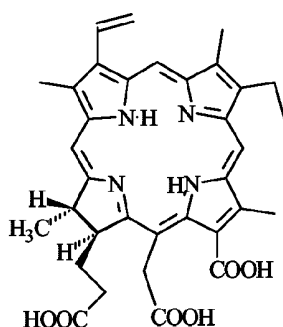
Oppløsningen ble hatt på en serviett og den siste ble lagt over tatoveringen, dekket med svart papir eller tynn aluminiumsfolie og fiksert i 30 minutter.

- 10 Overskudd av oppløsning ble fjernet fra overflaten med bomull fuktet med alkohol. Bestrålingsprosedyren ble realisert med diodelaseren ML-662-SP (“Mylon-Sigm Plus”, Russland) med en beølgelengde på 662 nm, bestråling ble utført langs mønsterlinjene for å forsøke å unngå å påvirke det omkringliggende vevet. Densiteten til eksponeringsdosen av bestråling var 120 J/cm^2 . I løpet av
- 15 1 time etter bestråling ble rødming og svelling av huden observert på stedet for tatoveringen. På slutten av den andre dagen ble et mørkebrunt ”bilde” med omkringliggende rødaktig sone på 1 mm dannet. I løpet av 2 uker ble det dannet en nekrose dannet på stedet for tatoveringen i form av en mørk bruk skorpe. To uker senere skjedde avskalling av skorpen sammen med
- 20 tatoveringen. Ved mindre lysdose foregår prosedyren uten nekrose ved avfarging av fargestoffet, men det er behov for gjentatte behandlinger i dette tilfellet. Et mykt lyserødt vev blir dannet i stedet for tatoveringen i løpet av 6 uker som et resultat av PDT, dette vevet er svakt forskjellig fra den omkringliggende huden, god kosmetisk effekt blir observert.

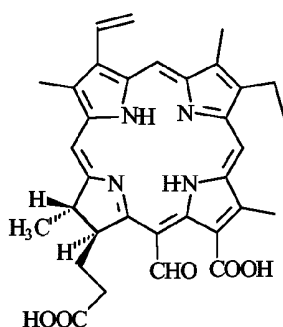
Patentkrav

1.

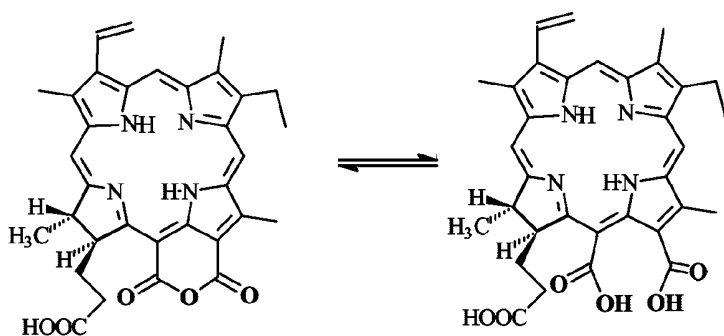
En fotosensibilisator omfattende chlorin som et salt med alkalimetall, karakterisert ved at chlorin er sammensatt av chlorin e₆ (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-karboksyetyl]-15-karboksymetyl-17,18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2, 7, 12, 18-tetrametylporfyrin)



som utgjør 80-90 %, purpurin 5 (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-formyl-17,18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2, 7, 12, 18-tetrametylporfyrin)



som utgjør 5-20 %, purpurin 19 – chlorin p₆ (13-karboksy-17-[2-karboksyetyl]-15-karboksy-17,18-*trans*-dihydro-3-vinyl-8-etyl-2, 7, 12, 18-tetrametylporfyrin)



15 som utgjør resten, slik at de nevnte komponentene danner sammensetningen.

2.

5 Fotosensibilisator ifølge krav 1, karakterisert ved at natrium er benyttet som alkalimetallet.

3.

10 Fotosensibilisator ifølge krav 1, karakterisert ved at kalium er benyttet som alkalimetallet.

4.

En fremgangsmåte for fremstilling av en fotosensibilisator ifølge krav 1, karakterisert ved at fremgangsmåten omfatter:

- 15 a) Behandling av *Spirulina* med aceton inntil klorofyll *a* er fullstendig ekstrahert,
- b) Separering av ekstraktet ved filtrering eller sentrifugering av biomassen,
- c) Behandling av ekstraktet med syre for å fjerne magnesiumioner ut av klorofyllmolekylet og for å hydrolysere fytylestergruppen for å gi en sur feofytin α -bladning,
- 20 d) Neutralisering av den sure feofytin α blandingen med en sterk uorganisk base for å felle feofytin α som så blir filtrert,
- e) Hydrolysering av feofytin α i en blanding av saltsyre – aceton – heksan, 6-16 ml aceton, 0,6 – 6 ml heksan og 5-10 ml konsentrert saltsyre som
- 25 blir benyttet for hvert gram av rått feofytin α ,
- f) Oppvarming av blandingen til 40-60 °C under omrøring i en tid fra 20 minutter til 1 time,
- g) Tilsetting av heksan (6-16 ml) tilsatt til blandingen for å danne en organisk fase og en vannfase,
- 30 h) Bringe i kontakt den organiske fasen med en blanding av aceton og saltsyre i et forhold på 2:1 til 10:1,
- i) Bringe i kontakt vannfasen med heksan inneholdende feoforbid α med heksan,

- j) Bringe i kontakt vannfasen inneholdende feoforbid α med overskudd av natriummsitrat (tri-, di- eller monosubstituert) vannopløsning for å felle ut feoforbid α ,
- k) Filtrering av utfelt feoforbid α , vasking av utfellingen med vann,
- 5 l) Rekrystallisering den utfelte feoforbid α ut av aceton – vann-blanding, og lufttørking inntil vekten blir konstant,
- m) Oppløsning av feoforbid α i aceton,
- n) Tilsetting av sterk uorganisk base blir tilsatt i form av vannopløsning med 0,05 – 1% konsentrasjon, under omrøring ved 30-60 °C i 5 – 30
- 10 minutter,
- o) Tilsetting av ekstra volum av sterk uorganisk base i form av vannopløsning med 1 – 50% konsentrasjon for å danne en blanding,
- p) Oppvarming av blandingen fra trinn o) 40-60 °C i 20 – 90 minutter,
- q) nøytralisering ved tilsetting av fortynnet saltsyre for å felle ut chlorin e_6
- 15 r) Separering ved sentrifugering av chlorin e_6 ,
- s) Vasking av chlorin e_6 med destillert vann inntil sur reaksjon forsvinner,
- t) Rekrystallisering av chlorin e_6 55-80% med aceton for å separere lineære tetrapyrroler,
- u) Filtrering av chlorin e_6 og vasking med destillert vann,
- 20 v) Oppvarming av chlorin e_6 i forseglet reservoar ved temperaturer på 40-100 °C i 1 time – 30 dager,
- w) Avkjøling av chlorin e_6 og tilsetting av sterk baseopløsning inntil pH er i området fra 7,5 – 8,5, og eventuelt gelfiltrering av blandingen,
- x) Tilsetting av fortynnet saltsyreløsning til oppløsningen inntil utfelling,
- 25 y) Separering av utfellingen ved filtrering eller sentrifugering, og
- z) Tilsetting av sterk hydroksidopløsning inntil pH er i området fra 7,0 til 8,5 for å oppnå fotosensibilisatoren omfattende 80 til 90 % chlorin e_6 , 2-15 % purpurin 5 og purpurin 18-chlorin p_6 .