

Изобретение относится к химико-фармацевтической промышленности и касается способа получения фармацевтического препарата, используемого в медицине для фотодинамической терапии онкологических заболеваний.

Известны способы получения фотосенсибилизирующих препаратов из растительного сырья путем экстракции свежего или специально высушенного сырья полярными растворителями (спирт, ацетон) и получения экстракта суммы хлорофиллов а и b. Из хлорофильного экстракта осаждают сумму феофитинов а и b, из которых путем хроматографической очистки выделяют чистый феофитин а. Из феофитина а получают "неустойчивый хлорин" путем окисления в спиртах (метиловом, этиловом, пропиловом), содержащих щелочь, и обработкой его при нагревании и кипячении в органических растворителях или декарбоксилирующими агентами [1].

Однако эти способы сложны, многостадийны и имеют низкий выход целевого продукта.

Известен способ получения фармацевтического препарата для фотодинамической терапии, модифицированный на стадии очистки целевого продукта [2].

Способ заключается в том, что из растительного сырья выделяют путем его поэтапной обработки органическим растворителем производные хлорофилла. Сначала выделяют путем экстракции сырья полярным растворителем (этанолом) смесь хлорофиллов а и b, из которой при помощи реактива Жирара осаждают феофитины а и b. Далее из этой смеси получают чистый феофитин а путем хроматографической очистки на силикагеле, феофитин а затем подвергают окислительному расщеплению в диэтиловом эфире с добавлением к нему 20-30% едкого калия при барботировании воздухом при комнатной температуре в течение 2 ч до образования "неустойчивого хлорина", который затем обрабатывают, как описано выше.

Однако этот способ также многостадийный, трудоемкий и не пригоден для промышленного производства. Выход целевого продукта не высок из-за потерь производных хлорофилла на стадии обработки смеси реактивом Жирара и хроматографической очистки на силикагеле, а также при экстрагировании диэтиловым эфиром из слабокислой среды, при которой часть хлорина не переходит в кислое соединение, а остается в водной фазе. Известный способ получения хлорина в промышленных условиях нетехнологичен, так как требует использования большого количества взрывоопасного и вредного растворителя - диэтилового эфира, содержит значительное количество трудоемких процессов экстрагирования и требует больших объемов сырья. Кроме того, в процессе экстракции этанолом хлорофилл подвергается алломеризации, т.е. в этих условиях может наблюдаться частич-

ное окисление изоциклического кольца пигмента. При омылении феофитина с окисленным изоциклом основным продуктом реакции получается не хлорин, а ряд хлориноподобных продуктов, таких как пурпурины.

Задача, на решение которой направлено предлагаемое изобретение, состоит в упрощении способа получения фармацевтического препарата, предотвращении окисления изоцикла хлорофилла, повышении выхода целевого продукта.

Задача решается тем, что в способе получения фармацевтического препарата путем экстракции из растительного сырья хлорофилла и его производных органическим растворителем и окислительного расщепления с выделением феофитина и последующего превращения его в хлорин в качестве сырья используют высушенные листья крапивы, люпина, люцерны и спинулины, а экстракцию проводят в два этапа. Сначала выделяют путем  $\text{CO}_2$ -экстракции из сырья под давлением 10-300 бар смесь каротиноидов и жирных кислот, а затем этанолом извлекают производные хлорофилла, сразу же обрабатывают их концентрированной соляной кислотой с образованием осадка феофитина и растворяют его в спиртовом растворе в вакууме.

Проводят окислительное расщепление фитола и размыкание изоцикла в спиртовом растворе щелочи. Затем растворяют в кислоте и выделяют гидроксидом натрия осадок, состоящий преимущественно из хлорина, который подвергают стабилизации, сушке и очистке от примесей растворением в минимальном количестве ацетона.

Новым, согласно изобретению, является то, что растительное сырье подвергают  $\text{CO}_2$ -экстракции под давлением с извлечением каротиноидов и жирных кислот. И после извлечения каротиноидов и жирных кислот из растительной массы выделяют путем экстракции полярным растворителем этанолом производные хлорофилла. Спиртовой экстракт пигментов сразу же обрабатывается концентрированной соляной кислотой с выделением хлорина. Такая обработка растительного сырья позволяет извлечь производные хлорофилла без потерь и, тем самым, увеличить выход феофитинов.

А обработка феофитинов концентрированной соляной кислотой позволяет полнее выделить в раствор хлорин из осадка хлорофильных пигментов.

Способ осуществляется следующим образом.

Растительное сырье подвергают сушке в токе воздуха при 40-80°C.

Обезвоженное сырье помещают в экстрактор для  $\text{CO}_2$ -экстракции и под давлением 10-300 бар и температуре 25°C проводят экстракцию каротиноидов и жирных кислот. Травяную массу выгружают из  $\text{CO}_2$ -экстрактора, загружают в сосуд, заливают этанолом и прово-

дят экстракцию хлорофилла. После экстракции этанольный раствор хлорофиллов а+b отфильтровывают через стеклянный фильтр. К экстракту сразу же добавляют концентрированную соляную кислоту из расчета 2 мл на 1 л экстракта и через 12 ч осаждают сумму феофитинов а+b в виде черного осадка, который отфильтровывают и многократно промывают спиртом. Феофитин а+b растворяют в минимальном количестве ацетона, а затем спирта в вакууме. Далее в реакционный сосуд под вакуумом добавляют спиртовой раствор КОН до концентрации 15%. В результате происходит омыление фитола и размыкание изоцикла. Затем реакционную смесь при атмосферном давлении выливают в четырехкратное количество воды для прекращения реакции омыления.

Щелочной раствор подкисляют соляной кислотой до содержания в общем растворе 4,7%. При этом происходит растворение хлорина в кислоте. Затем проводят нейтрализацию раствора 30% раствором гидроксида натрия, получают осадок, состоящий из ряда пигментов, исключая хлорин. Осадок отделяют, а раствор фильтруют, и из раствора при нейтрализации выпадает осадок с содержанием хлорина 50-60%, который промывают, собирают и сушат при температуре +37°C.

Для очистки хлорина от примесей его растворяют в минимальном количестве ацетона. Не растворившуюся часть препарата отделяют центрифугированием, раствор разводят дистиллированной водой 1:1 и доводят рН до 3,4, при этом образовавшийся осадок отделяют центрифугированием при тех же условиях. Осадок собирают и сушат в термостате при температуре +37°C.

Спектрофотометрически установлено, что после процедуры очистки содержание активного вещества в препарате возрастает на 10-15%.

Очищенный хлорин растворяют в воде, стерильно фильтруют. Для стабилизации препарата вводят раствор хитозана, который снижает общую токсичность и повышает специфические свойства препарата. Затем раствор разливают во флаконы и лиофильно высушивают из замороженного состояния. Высушенный препарат укупоривают в стерильных условиях и закатывают.

Описанный метод получения фармацевтического препарата для фотодинамической терапии удобен тем, что кроме использования легко доступных реактивов не содержит технологически сложных операций. Кроме того, основной растворитель - этиловый спирт - после отделения феофитинов может перегоняться и использоваться многократно в этой технологии.

Введение стабилизатора хитозана позволяет получать препарат не только в сухой, но и в жидкой форме.

В соответствии с изобретением полученный препарат содержит лиофильно высушенный хлорин в виде тринатриевой соли.

Физико-химические показатели препарата следующие.

Молекулярная масса 662 Да. В препарате содержится не менее 0,3 мг хлорина на 1 мг сухого вещества. Остальное составляет хлорид натрия, необходимый для лиофильной сушки препарата, и стабилизатор.

По внешнему виду препарат представляет собой лиофилизированный аморфный порошок черного цвета с зеленовато-фиолетовым металлическим блеском. Без запаха. рН водного раствора определяют потенциометрически. Содержимое 1 флакона, растворенное в 20 мл воды, должно иметь рН  $8,5 \pm 0,5$ .

Водный раствор 0,002 г препарата в 400 мл воды должен быть прозрачным.

Препарат умеренно растворим в пиридине (1 г в 100 мл), в воде (1 г в 100 мл), в 0,9% изотоническом растворе хлорида натрия (1 г в 100 мл).

Подлинность определяют спектрофотометрически по спектру поглощения при длинах волн от 400 до 700 нм.

Хлорин имеет характерный спектр в виде четырех основных пиков при 401,5, 500, 530, 560, 605, 665 нм (фиг. 1).

В качестве второго теста на подлинность применяют тонкослойную хроматографию на пластинках с силуфолом - UV-256.

В качестве растворителя используют гексан, ацетон, хлороформ в соотношении 1:1:1. На хроматографическую пластину наносят 2 мкл раствора хлорина в воде. По окончании процесса хроматографии и подсушивания пластины на хроматограмме выявляют одно ярко-зеленое пятно на старте и до семи слабоокрашенных пятен с  $R_{f1}=0,08 \pm 0,03$ ;  $R_{f2}=0,2 \pm 0,05$ ;  $R_{f3}=0,31 \pm 0,07$ ;  $R_{f4}=0,44 \pm 0,09$ ;  $R_{f5}=0,60 \pm 0,10$ ;  $R_{f6}=0,85 \pm 0,07$ ;  $R_{f7}=0,95 \pm 0,04$ .

Испытание на чистоту и допустимые пределы примесей проводят по ГФ XI, вып. 1, стр.165.

Содержание тяжелых металлов определяют методом влажной минерализации по статье "Компедиум Медикаменторум".

Содержание меди в препарате не превышает  $1,2 \times 10^{-3}\%$ , цинка  $8,3 \times 10^{-3}\%$ , железа  $1 \times 10^{-1}\%$ , магния  $1,25 \times 10^{-2}\%$ , алюминия  $1,3 \times 10^{-2}\%$ , молибдена 0,17%.

Препарат не содержит кобальта, ртути, свинца, стронция, мышьяка.

Органические примеси в препарате отсутствуют.

Остаточная влажность препарата не должна превышать 12%.

Количественное определение хлорина основано на спектрофотометрическом измерении оптической плотности раствора при 665 нм.

Расчет содержания хлорина в препарате ведут по формуле

$$C = D \times 50 / E \times 1 \times 662,$$

где D - оптическая плотность раствора при 665 нм;

Е - коэффициент молярной экстинкции хлорина в данном растворителе при данной длине волны, равный  $5,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ см}$ ;

l - толщина слоя кюветы (в см);

662 - молекулярная масса тринатриевой соли хлорина;

50 - коэффициент разведения препарата.

Содержание хлорина в сухом препарате должно быть  $50 \pm 5 \text{ мг}$ .

Пример 1 (субстрат - крапива).

I. Получение феофитинов.

Измельченные до порошка листья крапивы (3,5-4 кг) замачивают в 20 л смеси воды со спиртом в соотношении 1:1 в течение 1,5-2 ч при температуре 15-25°C. Затем воду отсасывают под вакуумом. Обезвоженную растительную массу помещают в CO<sub>2</sub>-экстрактор и под давлением 10-300 бар проводят экстракцию каротиноидов и жирных кислот. Травяную массу извлекают из CO<sub>2</sub>-экстрактора, помещают в стеклянную трубку (L=120 см, D=40 мм) и заливают 15 л этанола на 1,5-2 ч. Экстракция повторяется 3 раза. Экстракты объединяют, фильтруют через стеклянный, бумажный или ватно-марлевый фильтр.

К экстракту сразу же добавляют концентрированную HCl (2 мл на 1 л экстракта), через 12 ч осадок отфильтровывают и сушат на воздухе.

Выход - 30 г порошка.

II. Синтез хлорина.

30 г порошка феофитина растворяют в 250 мл ацетона. Полученный раствор смешивают с 5 л спирта. Смесь азорируют азотом в течение 30-40 мин при температуре +40°C.

Параллельно готовится спиртовой раствор гидроксида калия из расчета 1,2 кг на 5 л 96% спирта в атмосфере азота. Затем раствор щелочи прокачивается в емкость с растворенным в этаноле феофитином.

Реакция проводится в течение 40-50 мин при температуре +40°C в азотной атмосфере.

По окончании реакции раствор нейтрализуется 28 л заранее приготовленного раствора 9% соляной кислоты до pH=0,4-0,8 при интенсивном перемешивании. При этом выпадает осадок, состоящий из примесных пигментов, который отделяют фильтрацией через мезгу на нутч-фильтре.

Доводят pH фильтрата до  $4,0 \pm 0,2$  30% раствором гидроксида натрия. Выпавший осадок, состоящий преимущественно из хлорина, собирают на центрифуге и отмывают дистиллированной водой до pH=3,6.

Полученный осадок сушат при температуре +37°C до постоянной массы.

Выход продукта - около 5 г.

III. Очистка от примесей.

Берут навеску препарата и растворяют в минимальном количестве ацетона. Не растворившуюся часть препарата отделяют центрифугированием при 3000 об/мин в течение 15 мин.

Затем раствор разводят дистиллированной водой 1:1 и доводят pH до 3,4, при этом выпадает осадок, который отделяют центрифугированием при тех же условиях. Осадок собирают и сушат в термостате при температуре +37°C.

IV. Стабилизация препарата.

Полученное сухое вещество растворяют в дистиллированной воде при pH=11,0. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. pH фильтрата доводят до значения 8,0-8,5 и вводят 125 мл стабилизатора, (растворенный 2% раствор хитозана). Далее полученный раствор стерильно фильтруют, разливают во флаконы и леофильно высушивают.

Влажность полученного препарата не более 10%.

Пример 2 (субстрат - люпин).

I. Получение феофитинов.

Схема получения феофитинов из люпина аналогична схеме получения из крапивы как в примере 1.

Выход продукта составляет около 50 г.

II. Синтез хлорина.

40 г феофитина растворяют в 0,5 л ацетона. Далее см. схему получения хлорина и очистки от примесей как в примере 1.

Пример 3 (субстрат - смесь крапивы, люпина, люцерны в весовом соотношении 1:1:1) - получение жидкой формы.

I. Получение феофитина.

Растительную смесь 80 кг, высушенную при температуре 40-80°C в токе воздуха, замачивают в 300 л смеси воды с этанолом (1:1) в течение 1,5 ч при температуре 15-25°C. Затем раствор отсасывают под вакуумом. Обезвоженную траву помещают в экстрактор для CO<sub>2</sub>-экстракции под давлением 10-300 бар и температуре 25°C. Затем травяную массу выгружают из CO<sub>2</sub>-экстрактора, загружают в сосуд для обработки этанолом и проводят 3 экстракции хлорофилла этанолом (по 200-250 л). Экстракты объединяют и далее проводят получение феофитина по схеме получения из экстракта крапивы по примеру 1.

Выход продукта - 800 г.

II. Получение хлорина.

Полученный феофитин растворяют в 2 л ацетона. Полученный раствор заливают в 15 л этанола на 45-60 мин, добавляют раствор KOH в этаноле (3,5 кг на 15 л спирта). Реакция длится 60 мин при температуре +40°C в атмосфере азота.

Раствор нейтрализуют 9% HCl (15 л на 60 л H<sub>2</sub>O), pH=0,6-75 л.

Образовавшийся осадок удаляют на нутч-фильтре. Доводят pH фильтрата до 4,0. Образовавшийся осадок собирают на центрифуге и отмывают подкисленной водой.

Выход продукта - около 100 г.

Вещество растворяют в дистиллированной воде при pH=11,0.

Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр. РН фильтрата доводят до значения 8,0-8,5 и вводят стабилизатор - 2% раствор хитозана.

Полученный раствор стерильно фильтруют и разливают во флаконы.

Фармацевтический препарат, полученный предлагаемым способом, выпускается в сухом виде по  $50 \pm 100$  мг во флаконах на 50 мл или в жидкой форме. Содержание активного вещества хлорина составляет не менее 0,3 мг/мг сухого вещества.

По своему действию препарат относится к фотосенсибилизаторам, избирательно накапливаемым в опухолевой ткани. Последующее воздействие светом с длиной волны 665 нм приводит (фотодинамическая терапия) к возбуждению молекулы хлорина и последующему разрушению опухолевой ткани. Эффект фотосенсибилизации проявляется в нарушении клеточного дыхания, синтеза белка, подавлении гликолиза, в изменении проницаемости клеточной мембраны. На этих свойствах хлорина основано его применение при лечении опухолей. Введение стабилизатора снижает общую токсичность и повышает его специфические свойства.

Препарат вводят внутривенно. Раствор препарата готовят ex tempore. Содержимое флакона разводят в 50 мл физиологического раствора хлорида натрия. Лечебную дозу препарата вводят в вену в течение 20 мин в 200 мл физиологического раствора.

Полученное фотосенсибилизирующее средство прошло клинические испытания и показало положительные результаты.

Клинические испытания фармакологических свойств фотосенсибилизатора хлорина были проведены при фотодинамической терапии опухолей на мышах и крысах путем внутривенного введения фотосенсибилизатора и последующего облучения опухолевых очагов.

Фотосенсибилизатор хлорин имеет максимум поглощения при длине волны 660 нм. Поэтому для фотооблучения опухолей использовался лазер с указанной длиной волны света.

Испытания показали, что препарат является малотоксичным веществом. Так, для мышей  $LD_{10}$  составляет 40 мг/кг, для крыс - 30 мг/кг.

Для перевитых опухолей крыс и мышей характерно более медленное накопление и выведение препарата по сравнению с нормальными тканями.

Через 24-72 ч после введения концентрация хлорина в опухолях превышала его содержание в печени, почках, селезенке и мышцах у животных с саркомой 45 соответственно в 2,6, 1,2, 4,3 и 6,5 раз; с саркомой М-1 - в 4,6, 2,1, 7,7 и 11,5 раз; с саркомой 180 - в 6, 12, 10 и 55 раз; с солидной опухолью Эрлиха - в 6,5, 13, 11 и 65 раз.

Диапазон терапевтических доз хлорина составлял 1-10 мг/кг. Глубина повреждения ново-

образований при использовании препарата в этих дозах варьировала от 4 до 16 мм, а противоопухолевый эффект фотодинамического воздействия находился в прямой зависимости от концентрации фотосенсибилизатора в крови, ткани опухоли и от энергетической экспозиции светового облучения.

Различные типы опухолей отличались по чувствительности к фотодинамическому воздействию: излеченность животных с альвеолярным раком печени РС-1, саркомой 45, саркомой М-1 и лимфосаркомой Плисса составила соответственно 100, 100, 50 и 20%.

Фотодинамическое воздействие с хлорином вызывает структурно-функциональные изменения и некроз опухолевой ткани. В зависимости от дозы препарата гибель опухолевых клеток может наступать в результате прямого фотоцитотоксического эффекта или опосредованно вследствие необратимого нарушения кровообращения с последующим аутолизом.

Основное побочное действие хлорина выражалось в незначительных структурно-функциональных нарушениях в печени при длительном (в течение 30 суток) введении препарата. При 2-3-кратном введении патологических изменений не наблюдалось.

В токсических дозах, вызывающих гибель всех или части подопытных животных, наблюдались выраженные морфологические изменения в печени.

Максимальное повреждение опухолевой и нормальной тканей наблюдалось при проведении фотооблучения в момент наибольшей концентрации хлорина в крови, а преимущественное повреждение опухолевой ткани - при интервале времени между введением препарата и световым воздействием 24-72 ч. Терапевтическая доза фотооблучения составляет 45-135 Дж/см<sup>2</sup>.

Результаты испытаний показали, что полученный данным способом фармацевтический препарат является эффективным фотосенсибилизатором для лечения онкологических заболеваний при использовании метода лазеродинамической терапии. Данное соединение превосходит по своим характеристикам применяемые в настоящее время препараты на основе гематопорфирина.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения фармацевтического препарата для фотодинамической терапии онкологических заболеваний, включающий экстракцию из растительного сырья хлорофилла и его производных органическим растворителем, их окисление с выделением феофитина и последующим превращением его, отличающийся тем, что, из растительного сырья путем  $CO_2$  экстракции под давлением 10-300 бар до извлечения хлорофилла этанолом отделяют каротиноиды и жирные кислоты, а превращение хлорофилла

осуществляют незамедлительно обработкой концентрированной соляной кислотой и после его окислительного расщепления и выделения из солянокислого раствора и осаждения щело-

чью при  $pH=4,0\pm 0,2$  проводят последующую очистку препарата и вводят стабилизатор.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что в качестве стабилизатора применяют раствор хитозана.

