

МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ И ИНФОРМАЦИОННЫЕ ТЕХНОЛОГИИ В ХИМИИ И ХИМИЧЕСКОЙ ТЕХНОЛОГИИ

УДК 004.94

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ПРОИЗВОДСТВА НОВОГО ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА ТРЕТЬЕГО ПОКОЛЕНИЯ ДЛЯ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ РАКА

Н.А. Миронова, старший преподаватель, Е.В. Бурляева, профессор

кафедра Информационных технологий МИТХТ им. М.В. Ломоносова,

Москва, 119571 Россия

e-mail: nadyamiron@yandex.ru

На основе методологии функционального моделирования построен комплекс моделей в нотации IDEF0, описывающий технологию производства и процедуры контроля качества *O*-этилоксим-*N*-этоксциклоимида бактериохлорина *p*.

Ключевые слова: системный анализ, функциональное моделирование, декомпозиция, фотосенсибилизаторы 3-го поколения, фотодинамическая терапия.

1. Введение

Фотодинамическая терапия (ФДТ) рака является новым перспективным методом диагностики и лечения в онкологии [1]. В основе метода лежит способность определенных окрашенных веществ – фотосенсибилизаторов (ФС) избирательно накапливаться в опухоли и в зависимости от используемого источника света либо интенсивно флуоресцировать, что позволяет обнаруживать заболевание на ранних этапах его развития, либо генерировать реакционноспособный синглетный кислород, который селективно разрушает раковые клетки [2]. Последнее связано с тем, что время жизни этой формы кислорода в клетке составляет от 100 до 250 нс и за это время его диффузия не превышает 45 нм. Поскольку размеры клетки лежат в пределах от 10 до 100 мкм, синглетный кислород не успевае покинуть раковую клетку и разрушить соседние здоровые клетки [3].

Важную роль в эффективности ФДТ играет длина волны используемого света. В красной области спектра при 620 и 660 нм свет проникает в ткань на глубину до 2-3 и 4-6 мм, соответственно. Используемые в настоящее время ФС первого поколения имеют максимум поглощения при 618-623 нм, а второго поколения около 660-665 нм, что ограничивает удаление крупных опухолей и фотодинамическое воздействие на глубоко расположенные участки ткани, часто содержащие очаги метастазирования, что чревато рецидивами [4].

Для дальнейшего развития ФДТ рака необходимо создание ФС следующего третьего поколения, которые будут обладать интенсивным поглощением в ближней ИК-области спектра. В этом случае эффективное удаление опухолей можно осуществлять на глубине до 18-20 мм. Кроме того, важным преимуществом подобных ФС является возможность использования для освещения надежных и недорогих полупроводниковых лазеров с рабочей длиной волны около 800 нм.

В настоящее время ФС третьего поколения разрабатываются лишь в Израиле [5, 6], США [7] и у нас в стране в МИТХТ им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательском онкологическом институте им. П.А. Герцена и Всероссийском онкологическом центре им. Н.Н. Блохина. Для получения подобных ФС в качестве исходного соединения был использован природный бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*) [8]. Отличительной чертой этого пигмента является наличие в электронном спектре интенсивной полосы поглощения в районе 760 нм. Направленная модификация бактериохлорофилла и введение дополнительного циклоимидного кольца в положение 13-14-15 основного макроцикла позволили улучшить спектральные характеристики, сместив максимум поглощения с 760 до 800 нм [9]. Была синтезирована большая группа подобных циклоимидов [10], из которых после проведения биологических испытаний был отобран наиболее перспективный ФС – метиловый эфир *O*-этилоксим-*N*-этоксциклоимид бактериохлорина *p* (1) (рис. 1) [11].

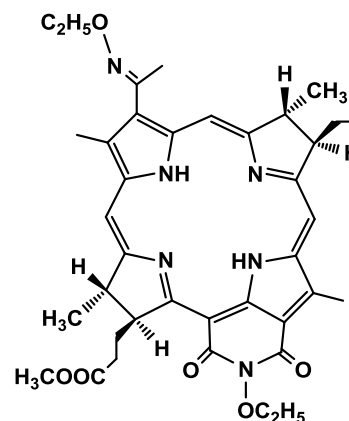


Рис. 1. Структура метилового эфира *O*-этилоксим-*N*-этоксциклоимида бактериохлорина *p*.

2. Краткое описание производства

Производство бактериохлорина, торговое название «Бактериосенс», представляет собой сложный технологический процесс, включа-

ющий четыре основных этапа. На первом осуществляется выращивание биомассы *Rhodobacter capsulata*, ее отделение от культуральной жидкости и складирование при температуре -18°C . Второй этап включает выделение бактериохлорофилла *a* из биомассы, окисление бактериохлорофиллина в бактериопурпурин (БП), обработку последнего *N*-этоксиамином и хроматографическую очистку образовавшегося *N*-этоксидибактериоциклоимида. На третьем этапе на основе полученной субстанции и эмульгатора Кремофор готовят стерильный физиологический раствор Бактериосенса. Процесс изготовления препарата завершается розливом стерильного раствора во флаконы, лиофильной сушкой и укупоркой флаконов, маркировкой последних и складированием в специальную тару для последующего хранения в холодильнике.

На первом этапе осуществляется выращивание культуры *Rhodobacter capsulata* в биореакторе емкостью 100 л. В качестве питательной среды используется агар-агар, лактат, дрожжевой экстракт, сульфат магния, сульфат железа, сульфат аммония, сульфат цинка, сульфат марганца и борная кислота. В ходе роста биомассы поддерживается температура $30 \pm 2^{\circ}\text{C}$, рН 6.9 ± 0.1 при постоянном перемешивании и барботировании воздуха. Контроль за протеканием процесса осуществляется путем отбора проб с трехчасовыми интервалами и измерением плотности растущей биомассы спектрофотометрически. По достижении заданной плотности раствора биомассу отделяют от культуральной жидкости центрифугированием и хранят при температуре от -8 до -10°C .

Экстракция Бхл *a* проводится изопропиловым спиртом при температуре 25°C , перемешивании и обработке ультразвуком. Экстракт отфильтровывают на нутч-филт্রে и биомассу снова подвергают процессу экстракции до получения неокрашенных растворов (обычно достаточно 2-3 раза). Объединенные экстракты упаривают в вакууме и остаток перекристаллизовывают из гексана с хлористым метиленом. Полученный Бхл *a* (содержание не менее 70%) растворяют в изопропиловом спирте, подщелачивают водным раствором едкого натра и барботируют воздух, контролируя образование БП по уменьшению поглощения при 760 нм (Бхл *a*) и росту полосы при 817 нм (БП).

Реакционную смесь подкисляют соляной кислотой до рН 2, экстрагируют хлороформом и выделяют бактериопурпурин с чистотой не менее 90% основного вещества. БП растворяют в эфире, обрабатывают диазометаном и метиловый эфир БП после упаривания растворителя обрабатывают этоксиамином в пиридине в течение 24 часов при 20°C . Диетоксибактериоциклоимид (ДЭБЦ) выделяют после подкисления соляной кислотой. После хроматогра-

фической очистки содержание ДЭБЦ составляет не менее 97%.

3. Цели функционального моделирования

Как следует из краткого описания процесса получения ДЭБЦ, промежуточные продукты синтеза и конечный бактериохлорин могут содержать в качестве нежелательных примесей используемые реагенты, остатки растворителей и не вступившие в реакцию промежуточные соединения, что крайне нежелательно при синтезе лекарственных веществ. В связи с этим весьма актуальной задачей при проектировании технологической цепочки синтеза ДЭБЦ является организация надежного и оперативного контроля качества получаемых веществ на каждой стадии производства. Важными критериями также являются продолжительность анализа, точность и чувствительность методов. Это тем более важно в данном случае, поскольку основное вещество и возможные примеси часто имеют близкие физико-химические свойства.

Одним из методов обеспечения надлежащего качества ФС является разработка и внедрение системы менеджмента качества, разработанной в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 9000-2008 [12]. Ключевым понятием в международной системы стандартов ИСО семейства 9000 является концепция «процессного подхода». Эта концепция близка к концепциям классического системного анализа, однако обладает рядом особенностей [13]. Одним из ключевых аспектов этого подхода является обеспечение наглядности («прозрачности») объекта управления (организации или системы) посредством его точного, достаточного, лаконичного, удобного для восприятия и анализа описания. Очевидно, что для построения такого описания необходимо использовать такие принципы системного анализа, как декомпозиция процессов и систем, построение иерархии, абстрагирование. Применение этих принципов позволяет, начав с наиболее общего описания процессов, характеризующих миссию организации, конкретизировать его вплоть до уровня, достаточного для корректного анализа и выработки эффективных управленческих решений.

Таким образом, одним из первых этапов создания системы менеджмента качества является разработка формализованной функционально-технологической модели, включающей в себя, помимо процессов обеспечения жизненного цикла продукции, процессы управления качеством продукции [14]. Проведение функционального моделирования технологического процесса с последовательной декомпозицией отдельных этапов позволяет четко регламентировать действия, выполняемые на каждом этапе, используемые материалы и требования к ним, технологическое оборудование, а также процедуры контроля качества.

4. Методы и результаты функционального моделирования

Для формального описания процедуры декомпозиции, установления связей между этапами и указания регламентирующих требований использована нотация IDEF0 [15]. В рамках этой нотации описание технологического процесса строится в виде иерархической структуры, которая отражает различные уровни абстракции с ограниченным числом компонентов на каждом из уровней. Основным элементом описания является диаграмма, состоящая из функциональных блоков и соединяющих их дуг. Различают 4 роли дуг: интерфейс ввода/вывода, управляющее воздействие и механизм реализации функции. Роль дуги задается ее расположением относительно функционального блока: стрелка, входящая в блок слева, обозначает входной параметр; стрелка, входящая сверху, – управление; стрелка, входящая снизу, – механизм реализации; стрелка, выходящая справа, – выходные параметры. Нотация IDEF0 позволяет удобно описать иерархическую декомпозицию «этап-подэтап» сверху вниз, поскольку обеспечивает пошаговую детализацию диаграмм. Каждый

функциональный блок может быть декомпозирован на другой диаграмме.

На начальном этапе построения функционально-технологической модели производство ФС рассматривается как единый процесс (соответствующая диаграмма имеет уровень А-0). На входе этого процесса задается сырье – биомасса бактерий *Rh. capsulatus*, результатом его является готовый препарат. Регламентируют этот единый процесс требования к качеству продукции и управленческие решения. Далее, на 1-м шаге декомпозиции выделены 4 основных технологических процесса: производство биомассы, выделение бактериохлорина и получение бактериопурпурина, синтез ДЭБЦ, упаковка и хранение. Все эти процессы являются последовательными – продукт, произведенный в результате каждого технологического процесса, используется в качестве сырья для реализации следующего процесса. Диаграмма, соответствующая 1-му шагу декомпозиции, имеет уровень А0 и приведена на рис. 2. Каждый из основных технологических процессов, в свою очередь, может быть декомпозирован на несколько процессов.

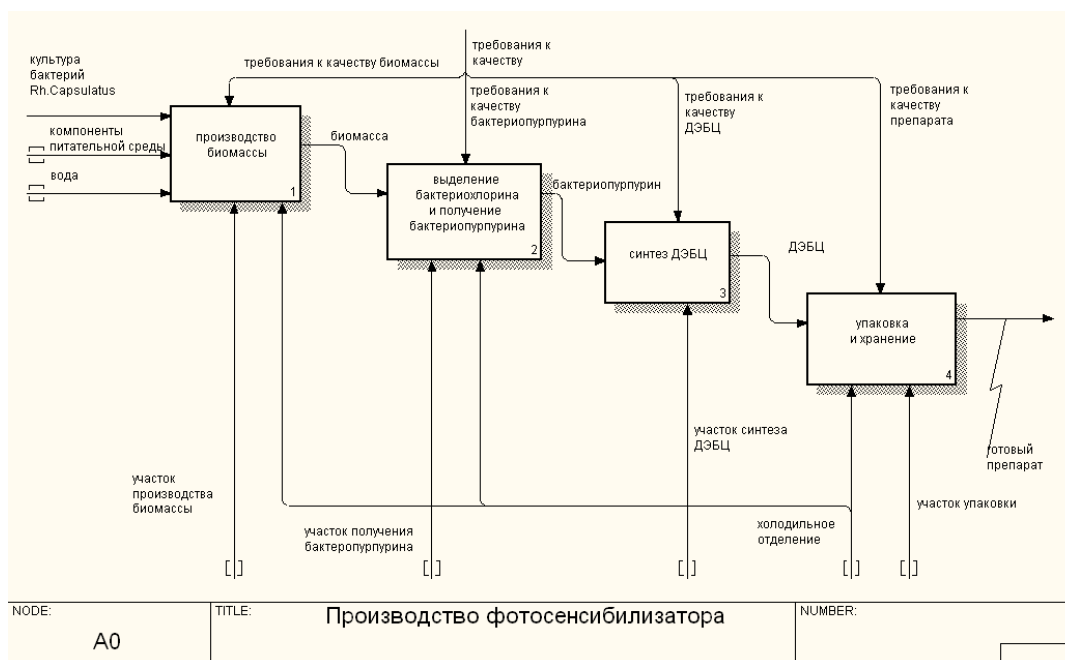


Рис. 2. Диаграмма уровня А0 «Производство фотосенсибилизатора».

Рассмотрим более подробно декомпозицию одного из выделенных на диаграмме технологических процессов – процесса выделения бактериохлорина и получения бактериопурпурина. Диаграмма, описывающая этот процесс, имеет уровень А2 и представлена на рис. 3. Из этой диаграммы видно, что процесс производства биомассы разделен на 6 процессов, каждому из которых соответствует функциональный блок. 5 из них являются последовательными. Процесс «выделение изопропилового спирта» (функциональный блок 3 на рис. 3) зависит только от процесса «выделение бактериохлорофилла»

(функциональный блок 1 на рис. 3) и не связан с остальными процессами. Этот процесс, а также связанные с ним дуги задают рецикл – повторное использование реагента (изопропилового спирта), необходимого для осуществления процесса выделения бактериохлорофилла. Сырье и материалы, необходимые для осуществления процесса, описаны с помощью входных дуг, продукты, получаемые в результате процесса – с помощью дуг с ролью «выход». Так, дуга с меткой «изопропиловый спирт с водой» выходит из блока 1 «выделение бактериохлорофилла» (то есть описывает один из результатов одно-

именного процесса) и указывает на блок «выделение изопропилового спирта» (то есть задает необходимое для одноименного процесса сырье). Исполнители процессов конкретизи-

рованы с помощью дуг с ролью «механизм», например, выделение бактериохлорофилла осуществляется с помощью ультразвуковой экстракции.

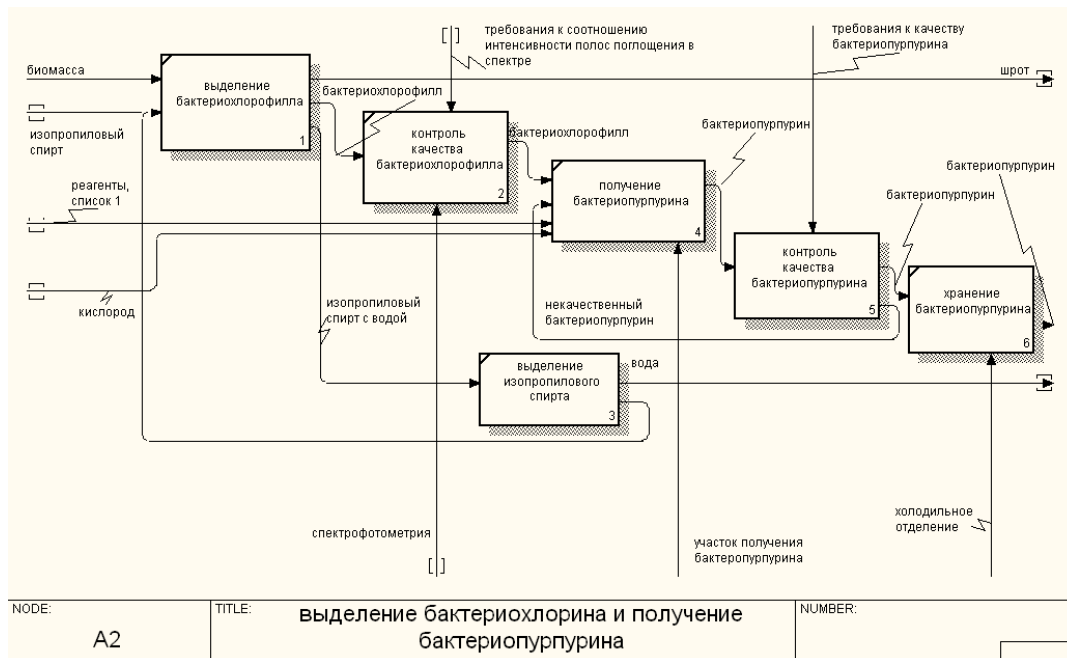


Рис. 3. Диаграмма уровня A2 «Выделение бактериохлорофилла и получение бактериопурпурина».

Следует особо остановиться на процедурах контроля качества (функциональные блоки 2 и 5 на рис. 3). На диаграмме определены как процессы, которые выполняются, если продукт соответствует требованиям качества, так и процессы, которые выполняются в том случае, если продукт не удовлетворяет этим требованиям. В частности, если бактериохлорофилл не удовлетворяет требованиям качества, то процесс выделения бактериохлорофилла повторяется. Дуга с меткой «некачественный бактериохлорофилл» задает обратную связь, позволя-

ющую выполнить возврат к предыдущему производственному процессу. Для каждого процесса контроля качества с помощью дуг с меткой «управление» заданы требования к качеству. Для процесса контроля качества бактериохлорофилла с помощью дуги «механизм» задан и способ контроля качества. Процесс контроля качества бактериопурпурина включает в себя несколько этапов, поэтому он декомпозирован на отдельной диаграмме. Эта диаграмма имеет уровень A25 и приведена на рис. 4.

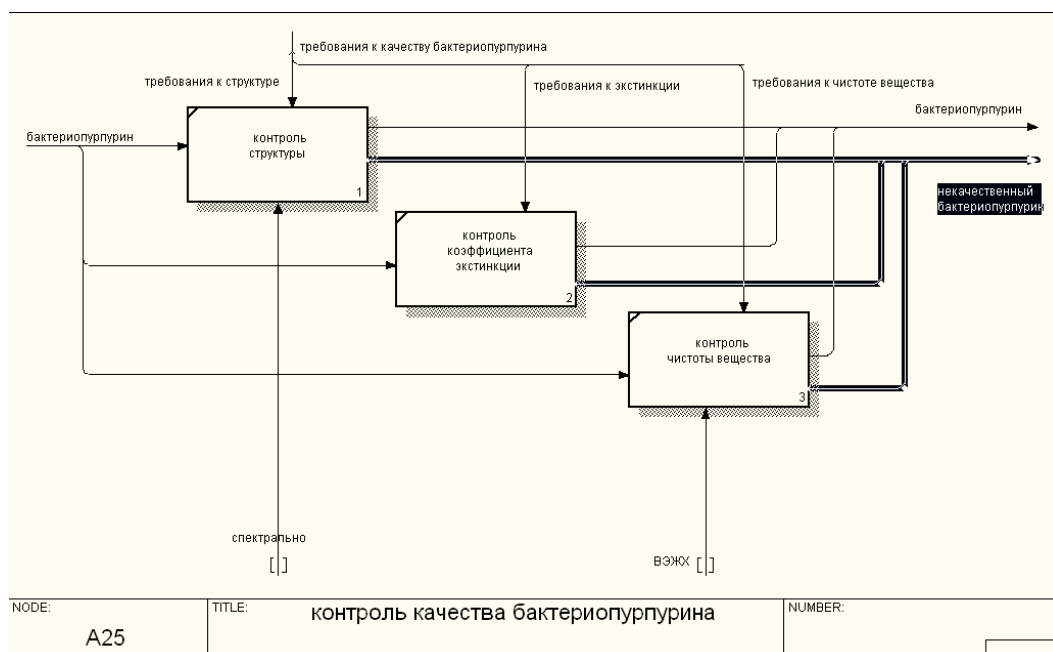


Рис. 4. Диаграмма уровня A25 «Контроль качества бактериопурпурина».

Как видно из диаграммы на рис.4, контроль качества бактериопурпурина состоит из 3 независимых процессов, на вход каждого из которых поступает произведенный бактериопурпурин. Для каждого из процессов контроля качества с помощью дуг с меткой «управление» определены требования к качеству, с помощью

дуг с меткой «механизм» – метод контроля качества.

Итоговая иерархическая структура, описывающая все этапы декомпозиции технологии производства ФС, представляет собой дерево. На рис. 5 приведены первые 3 уровня иерархии декомпозиции.



Рис. 5. Иерархическая диаграмма, описывающая первые 3 уровня декомпозиции.

5. Выводы

Анализ полученных диаграмм позволяет выделить ряд характерных особенностей описываемого технологического процесса:

- весь процесс производства сопровождается процедурами контроля качества продукции;
- для каждой технологической операции описаны необходимые материалы, результат ее

выполнения, исполнитель операции и документы, регламентирующие выполнение операции;

- для каждой процедуры контроля качества описаны документы, регламентирующие требования к качеству продукции;
- для каждой процедуры контроля качества с помощью дуг обратной связи описаны процессы, которые выполняются в случае несоответствия продукции предъявляемым требованиям.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Bonnett R. Chemical aspects of photodynamic therapy. Amsterdam: Gordon and Breach Science Publishers, 2000. 305 p.
2. Mac Donald I.J., Dougherty T.J.J. Basic principles of photodynamic therapy // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2001. V. 5. № 2. P. 105–129.
3. Красновский А.А. Первичные механизмы фотоактивации молекулярного кислорода. История развития и современное состояние исследований // Биохимия. 2007. Т. 72. № 10. С. 1311–1331.
4. Moan J. On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues // J. Photochem. Photobiol. B. 1990. V. 6. P. 343–344.
5. Kondinova N.V., Pinthus J.H., Brandis A., Brenner O., Bendel. P., Ramon J., Eshhar Z., Scherz A., Salomon J. Photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide (TOOKAD): Successful *in vivo* treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts // Int. J. Cancer. 2003. V. 104. P. 782–789.
6. Mazor O., Brandis A., Plaks V., Neumark E., Rosenbach-Belkin V., Salomon Y., Scherz A. WST 11, a novel water-soluble bacteriochlorophyll derivative: cellular uptake, pharmacokinetics, biodistribution and vascular-targeted photodynamic activity using melanoma tumors as a model // Photochem. Photobiol. 2005. V. 81. P. 342–351.
7. Chen Y., Potter W.R., Missert J.R., Morgan J., Pandey R.K. Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on long-wave-length photosensitizers derived from bacteriopurpurineimide and bacteriochlorin p6: Fused imide ring enhances the *in vivo* PDT efficacy // Bioconjugate Chem. 2007. V. 18. P. 1460–1473.
8. Grin M.A., Mironov A.F., Shtil A.A. Bacteriochlorophyll *a* and its derivatives: Chemistry and perspectives for cancer therapy // Anti-Cancer Agents Med. Chem. 2008. V. 8. № 6. P. 683–697.

9. Миронов А.Ф., Грин М.А., Ципровский А.Г., Дзарданов Д.В., Головин К.В., Феофанов А.В., Якубовская Р.И. Гидразиды в ряду бактериохлорофилла а, обладающие фотодинамической активностью, и способ их получения: пат. 2223274 РФ № 2002123618/04; заявл 04.09.2002; опубл. 10.02.2004, Бюл. № 4.
10. Mironov A.F., Grin M.A., Tsiprovskij A.G., Kachala V.V., Karmakova T.A., Yakubovskaya R.I. New bacteriochlorin derivatives with a fused N-aminimide ring // J. Porphyrins Phthalocyanines. 2003. V. 7. P. 725–730.
11. Миронов А.Ф., Грин М.А. Ципровский А.Г., Меерович Г.А., Меерович И.Г., Лощенов В.Б., Оборотова Н.А., Барышников А.Ю., Цыганков В.А. Фотосенсибилизатор на основе производного бактериохлорина р, способ получения производного бактериохлорина р и способ фотодинамической терапии с использованием этого фотосенсибилизатора: пат. 2411943 РФ № 2009113808/15; заявл. 14.04.2009; опубл. 25.08.2010.
12. ГОСТ Р ИСО 9000-2008. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь. М.: Стандартинформ, 2008. 32 с.
13. Репин В.В., Елиферов В.Г. Процессный подход к управлению. Моделирование бизнес-процессов. М.: РИА «Стандарты и качество», 2004. 408 с.
14. Григорьев Л.Ю., Корышев И.И. Стратегия компании и цели в области качества // Методы менеджмента качества. 2009. № 7. С. 10–17.
15. Рекомендации по стандартизации. Информационные технологии поддержки жизненного цикла продукции. Методология функционального моделирования. М.: Госстандарт России, 2001. 19 с.

FUNCTIONAL SIMULATION OF PRODUCTION OF A NEW 3-rd GENERATION PHOTOSENSITIZER FOR PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER

N.A. Mironova[@], E.V. Burlyayeva

M.V. Lomonosov Moscow State University of Fine Chemical Technology, Moscow, 119571 Russia

[@]*Corresponding author e-mail: nadyamiron@yandex.ru*

The paper is concerned with an important stage of the technology development of the third generation photosensitizer for photodynamic therapy of cancer with 800 nm absorption band. An important requirement of a process chain of obtaining of bacteriochlorin p N-ethoxycycloimide O-ethyloxime methyl ester is organization of reliable and efficient quality control of the original Rhodobacter capsulate biomass, its moisture content, concentration of the isolated bacteriochlorophyll a and conversion of the latter into bacteriopurpurin and its chemical modification into the target product along with the control of the intermediate products at every stage of the manufacturing process. When organizing the production, duration of the tests at each step of the process, accuracy and reliability of the quality monitoring should be the determining criteria. On the basis of functional modeling methodology there was created a complex of models in IDEF0 notation, describing production technology and quality control procedure of bacteriochlorin p N-ethoxycycloimide O-ethyloxime.

Key words: *system analysis, functional modeling, decomposition, third generation photosensitizers, photodynamic therapy.*