

**(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С
ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (РСТ)**

**(19) ВСЕМИРНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**
Международное бюро



**(43) Дата международной публикации:
28 марта 2002 (28.03.2002)**

PCT

**(10) Номер международной публикации:
WO 02/24610 A2**

(51) Международная патентная классификация⁷: C07B

(21) Номер международной заявки: PCT/RU01/00396

**(22) Дата международной подачи:
19 сентября 2001 (19.09.2001)**

(25) Язык подачи: русский

(26) Язык публикации: русский

**(30) Данные о приоритете:
2000123815 19 сентября 2000 (19.09.2000) RU**

(71) Заявители (для всех указанных государств, кроме (US): ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ «НОБЕЛЬ» [RU/RU]; 199178 Санкт-Петербург, Большой проспект Васильевского острова, д. 55 (RU) [NOBEL LIMITED LIABILITY COMPANY, St.Petersburg (RU)]. ТРОФИМОВА Надежда Васильевна (наследница умершего изобретателя) [RU/RU]; 194156 Санкт-Петербург, ул. Манчестерская, д. 6, кв. 1 (RU) [TROFIMOVA, Nadezhda Vasillievna (heiress of deceased inventor), St.Petersburg (RU)].

(72) Изобретатель: ТРОФИМОВ Валерий Афанасьевич (умерший) [TROFIMOV, Valery Afanasievich (deceased)].

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители (только для (US): ШИПОВ Валерий Павлович [RU/RU]; 198330 Санкт-Петербург, проспект Маршала Жукова, д. 43, корп. 1, кв. 78 (RU) [SHIPOV, Valery Pavlovich, St.Petersburg

(RU)]. ПОПОВ Александр Иванович [RU/RU]; 198332 Санкт-Петербург, проспект Кузмина, д. 21, кв. 97 (RU) [POPOV, Aleksandr Ivanovich, St.Petersburg (RU)]. ПИГАРЕВ Евгений Сергеевич [RU/RU]; 193067 Санкт-Петербург, ул. Караваевская, д. 10, корп. 1, кв. 49 (RU) [PIGAREV, Evgeny Sergeevich, St.Petersburg (RU)]. ИВАНОВ Виктор Николаевич [RU/RU]; 188000 Ленинградская обл., Выборг, ул. Приморская, д. 9, кв. 33 (RU) [IVANOV, Viktor Nikolaevich, Vyborg (RU)].

(74) Агент: АВСЕЕВИЧ Татьяна Михайловна; 193067 Санкт-Петербург, ул. Караваевская, д. 10, корп. 1, кв. 49 (RU) [AVSEEVICH, Tatyana Mikhailovna, St.Petersburg (RU)].

(81) Указанные государства (национально): AE, AT, AU, BG, BR, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, DZ, EE, ES, FI, GB, HU, IL, IN, JP, KR, LT, LV, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR, UA, US, UZ, ZA.

(84) Указанные государства (регионально): евразийский патент (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Опубликована

Без отчёта о международном поиске и с повторной публикацией по получении отчёта.

В отношении двухбуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. «Пояснения к кодам и сокращениям», публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня РСТ.

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING AN ANTINEOPLASTIC

(54) Название изобретения: СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СРЕДСТВА

(57) Abstract: The inventive method for producing an antineoplastic based on tetra-chloro-platinite of potassium consists in treating a water solution containing humic substances with a solution of tetra-chloro-platinite of potassium. Said treatment is carried out by exposing to the action of ultrasound having a radiation power of 40 W/cm^2 and a frequency of 22 Hz during 4-8 minutes. The humic substances can be exuded by treating a humified material with an alkaline solution at standard conditions. In the preferred embodiment, the humified materials are treated with the alkaline solutions at presence of carbamide and complexon. Composts, saprorels, moss peat and transition peat, the humus horizon of various soils can be used as the humified material. The treatment with the tetra-chloro-platinite of potassium can be carried out at a temperature of 405 °C. The humic substances can be also produced from oxidised wood lignin. It is rational to produce humic acids by oxidising the wood lignin in an alkaline medium with the aid of an oxygen-containing gas at a temperature of 17020 °C, a pressure ranging from 1.9 to 2.5 MPa during a time period ranging from 1 to 3 hours, aftercooling the stock, separating a solid phase from the solution and acidulating it till pH =2-3 is obtained. It is also rational to treat a water-alkaline suspension containing the wood lignin with the aid of ultrasound having a radiation power of 4-6 W/cm^2 , a frequency of 22 kHz during a time period ranging from 6 to 10 minutes. The treatment with the tetra-chloro-platinite of potassium is carried out at a temperature of 405 °C.



(57) Реферат: Способ получения противоопухолевого средства на основе тетрахлорплатинита калия включает обработку раствором тетрахлорплатинита калия водного раствора, содержащего гуминовые вещества. Обработку проводят под действием ультразвука с мощностью излучения $40 \text{ Вт}/\text{см}^2$ с частотой 22 Гц в течение 4-8 минут.

Гуминовые вещества могут быть получены обработкой гумифицированного материала щелочными растворами при нормальных условиях.

Гумифицированный материалы целесообразно обрабатывать щелочным раствором в присутствии мочевины и комплексона.

В качестве гумифицированного материала может быть использован торф из верховых или переходных болот или сапропель или компосты или гумусовые горизонты почв.

Обработку тетрахлорплатинитом можно проводить при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$.

Гуминовые вещества могут быть также получены из окисленного древесного лигнина.

Целесообразно получать гуминовые кислоты окислением древесного лигнина в щелочной среде кислородосодержащим газом при температуре $170 \pm 20^\circ\text{C}$, давлении 1,9-2,5 Мпа в течение 1-3 часов и последующим охлаждением реакционной массы, отделением твердой фазы от раствора и подкислением последнего до $\text{pH}=2-3$.

Целесообразно водно-щелочную суспензию, содержащую древесный лигнин, перед окислением обрабатывать ультразвуком с мощностью излучение $4-6 \text{ Вт}/\text{см}^2$, с частотой 22 кГц в течение 6-10 мин.

Обработку тетрахлорплатинитом калия целесообразно проводить при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$.

10

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО СРЕДСТВА

Область техники

Изобретение относится к области получения лекарственных препаратов, в частности, к получению противоопухолевых средств, представляющих собой комплексные соединения металлов, а более точно к способам получения противоопухолевых средств, содержащих комплексоны платины.

Предшествующий уровень техники

Противоопухолевые препараты, содержащие комплексоны платины, вызывая нарушение генетического аппарата опухолевых клеток, отличаются сильным противоопухолевым действием, вследствие чего привлекают к себе внимание специалистов.

Платиновые препараты обладают широким спектром противоопухолевого действия. Наиболее изученный препарат этого класса противоопухолевых средств - цис-дихлородиамминплатина (ДДП), активен против опухолей различного генезиса: спонтанных, перевивных, индуцированными вирусами и химическими капцерогенами. Основной недостаток ДДП - его высокая токсичность. Испытания на животных и в клинике показали, что он действует в основном на почки, костный мозг и желудочно-кишечный тракт (Биологические аспекты координационной химии, ред. К.Б. Яцмировского, Киев. «Наукова думка», 1979г., стр. 149-180).

Другое известное противоопухолевое средство, так называемый оксолпла-тин, содержит комплексное соединение четырёхвалентной платины, цис-диамминодихлордигидроксиплатину, и обладает активностью при

пероральном приеме. Препарат характеризуется отсутствием нефротоксичности, торможением роста метастазов, широтой терапевтического действия (A, RU, 2086261).

Известный противоопухолевый препарат платин, относящийся к группе комплексных соединений двухвалентной платины, эффективен при лечении злокачественных опухолей яичка и яичников, рака молочной железы, диссеминированной меланомы. Платин получают из платинохлористоводородной кислоты и гидроксиамина в три стадии путем образования промежуточного хлорплатинита щелочного металла, его взаимодействия с гидроксиамином в присутствии солей щелочного металла при комнатной температуре в слабокислой водной среде. Продукт очищают перекристаллизацией из разбавленной соляной кислоты. («Платин», рекламный листок, НПО «Медбиоэкономика», заказ 2178).

Известен также способ получения противоопухолевого средства, (A, SU, №1701323), в котором водный, содержащий ДНК и хлорид натрия, раствор смешивают с водным раствором тетрахлорплатината калия. Перед смешением в последний добавляют хлорид аммония, хлорид калия и ацетат калия, при этом каждый раствор нагревают до температуры плавления ДНК. В раствор, содержащий ДНК и хлорид натрия, добавляют цитрат натрия. Способ позволяет получить средство, сочетающее высокую противоопухолевую активность с выраженным иммуномодулирующим действием.

Исследования различных комплексов платины на животных и клинических испытаниях ДДП и некоторых его аналогов обнаружили разнообразие в биологических свойствах комплексов платины: противоопухолевой активности и побочного действия. Анализ имеющихся данных свидетельствует, что незначительные изменения в молекулярной структуре комплекса могут вызывать радикальные их изменения в биологической активности. Существование связи между структурой комплексного соединения и его противоопухолевой активностью стимулирует поиск новых содержащих платину препаратов - высокоактивных и

низкотоксичных.

Задачей настоящего изобретения является разработка способа, позволяющего получать из доступного природного сырья новые эффективные средства, содержащие платину и обладающие противоопухолевой 5 активностью.

Раскрытие изобретения

Поставленная задача решается тем, что предложен способ получения противоопухолевого средства на основе тетрахлорплатинита калия. В соответствии с изобретением раствором тетрахлорплатинита калия обрабатывают водный раствор, содержащий гуминовые вещества, при этом обработку проводят под действием ультразвука с мощностью излучения 40 10 Вт/см² с частотой 22 кГц в течение 4-8 минут. Гуминовые вещества могут быть получены обработкой гумифицированного материала при нормальных условиях растворами щелочей, в которые могут быть добавлены мочевина и 15 различные комплексоны, например, трилон Б. В результате получается смесь солей гумусовых кислот, которая в дальнейшем и называется гуминовыми веществами.

В качестве гумифицированного материала могут быть использованы сапропели, гумусовые горизонты из различных типов почв, компосты, торф из 20 верховых и переходных болот.

Гуминовые вещества также могут быть получены окислением древесного лигнина, при этом древесный лигнин в виде водно-щелочной супензии окисляют кислородсодержащим газом при температуре 170°C±20°C и давлении 1,9 - 2,5 Мпа в течение 1-3 часов. После охлаждения 25 реакционный массы отделяют твердую фазу из раствора, представляющую собой неокисленные частицы исходного гумифицированного материала. В растворе остаются соли гумусовых кислот, т.е. гуминовые вещества. Затем из подкисленного раствора гуминовых веществ выделяют гуминовые кислоты, которые после нейтрализации обрабатывают тетрахлорплатинитом калия.

Обработку тетрахлорплатинитом калия целесообразно проводить 30

при температуре $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$.

Обработку тетрахлорплатинитом калия ультразвуком проводят при мощности излучения $40,0 \pm 0,5$ Вт, частоте звуковых колебаний $22,0 \pm 0,5$ кГц в течение 1—25 минут. Выбор времени обработки ультразвуком зависит от 5 состава гуминовых кислот и выбирается экспериментально.

Целесообразно водно-щелочную суспензию, содержащую древесный лигнин, перед окислением обрабатывать ультразвуком с мощностью излучения $4—6$ Вт/см² и частотой 22 кГц в течение 6-10 мин. В этом случае увеличивается количество активных парамагнитных центров в веществе, что 10 ведет к еще большему увеличению биологической активности конечного продукта.

Лигнин, входящий в состав древесины, является ценным лекарственным сырьем, запасы которого практически не ограничены. Лечебные свойства лигнина всесторонне рассмотрены в монографии 15 (Леванова В.П., Лечебный лигнин. - Под ред. Н.А. Белякова.: Сп(б) - 1992 г.. стр. 136). Хотя лигнин и препараты на его основе в медицине до настоящего времени в основном рассматривались в качестве сорбентов, многие исследователи помимо сорбционных свойств отмечали антисептические, гипохолестеринемические и др. свойства.

20 В качестве древесного лигнина, продукта кислотного гидролиза древесины, могут быть использованы энтеросорбенты на основе лигнина, например, известный под торговой маркой «Полифепан».

«Полифепан» - неспецифический представляет собой порошок коричневого цвета без запаха и вкуса, влажностью 65%, состоит в основном 25 из лигнина и содержит не более 20% остаточных полисахаридов (гидроцеллюлозы). Все используемые в качестве исходного сырья вещества, упомянутые в примерах, приведенных ниже, разрешены для приёма внутрь организма.

Специальные исследования показали, что при окислении лигнина в условиях предлагаемого способа не происходит образования вредных для орга-

низма веществ, таких как полиароматические углеводороды, нитрозоамины и полихлорированные дицикло-*p*-диоксины.

Полученные продукты представляют собой концентрированные жидкости тёмно-коричневого цвета, содержащие от 0.05 до 1.00 % платины со 5 специфическим вкусом и запахом.

Общеизвестно, что процесс гумификации (процесс образования гуминовых веществ) является общепланетарным и получаемые в результате гуминовые вещества (иначе, гумусовые кислоты, представляющие собой смесь гуминовых кислот и фульвокислот) характеризуются сходными 10 спектрами в инфракрасной области, независимо от того, каким способом они получены.

Противоопухолевая активность предлагаемого средства обусловлена его природой. Органические соединения, входящие в его состав, характеризуются большим количеством ковалентно-активных связей. 15 Вследствие этого средство реагирует с нуклеофильными центрами белковых молекул. При этом нарушается трансляция и транскрипция нукleinовых кислот. Наличие ионов платины значительно усиливает антиопухолевое действие средства.

Механизм противоопухолевого действия предлагаемого вещества в на- 20 стоящее время изучается. Авторы предполагают, что возможным механизмом противоопухолевого действия является его воздействие на гипоталамус и щитовидную железу и как следствие этого активация эндорфинной системы.

Противоопухолевая активность полученного продукта оценивалась по 25 его влиянию на рост опухолей у крупного рогатого скота (коровы черно-пестрой породы). Последнее обусловлено тем, что обмен веществ (метаболизм) у крупного рогатого скота аналогичен по показателям обмену веществ человека и даёт репрезентативные результаты.

Лучшие варианты осуществления изобретения

Нижеследующие примеры поясняют предлагаемый способ получения

противоопухолевого средства и иллюстрируют его противоопухолевую активность.

ПРИМЕР №1

5 Исходную водно-щелочную суспензию лигнина (марки «Полифепан»,
- неспецифического энтерального сорбента - окисляли кислородом воздуха.

Состав суспензии

	Содержание полифепана	-1 кг
	Содержание щелочи (гидроксид натрия)	- 100 г.
10	Вода	- 8, 9 кг

Окисление проводили в реакторе с механическим перемешиванием при температуре 160 ± 5 °C при давлении 2,5 Мпа в течение 1 часа. Расход воздуха составлял 5 л/мин.

15 Реакционную массу охлаждают до комнатной температуры и от раствора фильтрованием отделяют осадок. Фильтрат, представляющий собой щелочной раствор, содержащий гуминовые вещества, подкисляют серной кислотой до pH 2-3. Фильтрованием выделяют осадок в виде геля гуминовых кислот, промывают дистиллированной водой, а затем водно-спиртовой смесью до установления pH 6,0-6,5 и высушивают при 105 °C до однородной 20 массы. Полученные гуминовые кислоты обрабатывают 5%-ым раствором аммиака из расчета 1 г гуминовых кислот на 80 мл указанного раствора, термостатируют в кипящий водяной бане до удаления избытка аммиака, фильтруют через бумажный фильтр и добавляют 30 об. % дистиллированной 25 воды. В полученный раствор, представляющий собой соли гуминовых кислот, относящихся к гуминовым веществам, вносят, из расчета на 1 г солей гуминовых кислот, по 0,27 масс. % тетрахлорплатинита калия и создают процесс развитой акустической кавитации под действием ультразвука с 30 мощностью излучения $40 \text{ вт}/\text{см}^2$ и частотой 22 кГц в течение 1 мин. Далее объем раствора доводят водой до 100 мл.

Полученный продукт представляет собой водный раствор солей гуминовых кислот, относящихся к гуминовым веществам, и комплексных соединений платины. Этот раствор использовали для испытаний на животных для определения его противоопухолевой активности. Результаты испытаний 5 приведены ниже в примере 7.

Для идентификации полученного вещества указанный выше раствор подвергали анализу.

Элементный состав сухого выделенного продукта в пересчёте на органическое вещество, масс.%: C-54%, H-12%, N-2%, (S+O)-32% (по 10 разности). Вещество разлагается без плавления, начиная с 168°C.

Результаты изучения инфракрасных Фурье-спектров показывают, что в полученном продукте присутствуют близкие по интенсивности полосы 1700 см⁻¹ и 1600 см⁻¹, характерные для карбоксильных групп, интенсивная полоса в 5 области 1200 см⁻¹ широкая по структуре полоса с локальными максимумами 3400, 3200, 3100 и 2600 см⁻¹, а также полосы 2926, 2815, 1460 см⁻¹ и полосы 2955 и 2870 см⁻¹, характерные для метиленовых групп

Полученный продукт обладает парамагнетизмом. В продукте наблюдаются симметричные сигналы электропарамагнитного резонанса (ЭПР) с 10 q-фактором $2,000 \pm 0,001$, близким к значению для свободного электрона ($q=2,00$) и шириной $H=6,1 \pm 0,1$ эрстед. Концентрация парамагнитных центров (ПМЦ) находится на уровне $(2,5 \pm 0,4) \times 10^{18}$ на один грамм.

Органическая часть продукта содержит 2,9-3^4 мг-экв СООН-групп в 1 г 15 продукта
6.0-6 4 мг-экв. фенольных гидроксилов в 1 г продукта.

ПРИМЕР № 2

Озерный сапропель с содержанием органического вещества 32% на сухое вещество подвергали щелочной обработке 0,1 М раствором едкого кали.

Для этого к 200 г озерного сапропеля с влажностью 95 % добавляли 5,6 г 20 едкого

кали и доводили общий объём смеси до 1 л, после чего смесь взбалтывали в течение 5

минут и оставляли на 6 часов. По истечении указанного срока фильтрованием отделяли осадок. Фильтрат, представляющий собой раствор щелочной раствор, 25 содержащий гуминовые вещества, подкисляли ортофосфорной кислотой до pH=1-2. Выпавший осадок (гель гуминовых кислот) отделяли фильтрованием, промывали дистиллированной водой, а затем водно-спиртовой смесью до установления pH=6,0-6,5 и высушивали при 105°C до постоянной массы. Полученные гуминовые кислоты обрабатывали 5%-ым водным 30 раствором аммиака из расчёта 1 г гуминовых кислот на 80 мл указанного раствора, термостатировали в кипящей водяной бане до удаления избытка аммиака, фильтровали через бумажный фильтр и добавляли 30 об. %

дистилированной воды. В полученный раствор, представляющий собой раствор солей гуминовых кислот, относящихся к гуминовым веществам, вносили, из расчета на 1 г гуминовых кислот, по 0,2 масс.% тетрахлорплатинита калия и создавали процесс развитой акустической кавитации под действием 5 ультразвука с мощностью излучения 40 вт/см² и частотой 22 кГц в течение 1 минуты. Далее объем раствора доводили водой до объема 100 мл.

Элементный состав сухого выделенного продукта в пересчёте на органическое вещество, масс.%: С- 60%, Н-6%, N -2%, (S+O) - 32% (по разности). Вещество разлагается без плавления, начиная с 168°C.

10 Результаты изучения инфракрасных Фурье-спектров показывают, что в полученном продукте присутствуют близкие по интенсивности полосы 1700 см⁻¹ и 1600 см⁻¹, характерные для карбоксильных групп, интенсивная полоса в области 1200 см⁻¹, широкая по структуре полоса с локальными максимумами 3400,3200,3100 и 2600 см⁻¹, а также полосы 2976, 2815, 1460 см⁻¹ и полосы 2955 15 и 2870 см⁻¹, характерные для метиленовых групп.

Полученный продукт обладает парамагнетизмом. В продукте наблюдаются симметричные сигналы ЭПР с q-фактором $2,000 \pm 0,001$, близким к значению для свободного электрона ($q=2,00$) и шириной $H=6,1 \pm 0,1$ эрстед. Концентрация ПМЦ находится на уровне $(2,5 \pm 0,4) \times 10^{18}$ на один грамм.

20 Органическая часть продукта содержит 3, 0-3,6 мг-экв СООН-групп в 1 г полученного продукта и 6,0-6,5 мг-экв. фенольных гидроксилов в 1 г.

ПРИМЕР № 3

Проводили аналогично примеру 2, при этом вермикомпост с содержанием органического вещества в количестве 23% на сухое вещество 25 подвергли щелочной обработке 0,1 М раствора едкого натра. 10 г вермикомпоста (в пересчёте на абсолютно сухую навеску) заливали 1л 0,1 М раствора едкого натра, смесь взбалтывали в течение 1 часа, после чего фильтрованием отделяли осадок. Фильтрат, представляющий собой раствор, содержащий гуминовые вещества, подкисляли серной кислотой до pH 1-2 и

выделяли гуминовые кислоты. Далее обработку производили аналогично тому, как показано в примерах 1 и 2, за исключением того, что в раствор солей гуминовых кислот вносили по 0,17 масс. % тетрахлорплатинита калия из расчета на 1 г гуминовых кислот и нагревали до 40°C.

5 Элементный состав сухого выделенного продукта в пересчёте на органическое вещество, масс.%: С - 57%, Н - 7%, N-2%, (O+S)- 34% (по разности).

Органическая часть продукта содержала 3,2-3,8 мг.-экв. COOH-групп в 1 г и 6,2 - 6-7 мг.-экв. фенольных гидроксилов в 1 г.

10 Исследования инфракрасных спектров и определение содержания COOH-групп и фенольных гидроксилов показали, что получены гуминовые вещества.

ПРИМЕР № 4

15 Проводили аналогично примеру 2, при этом торф из верхового болота с содержанием органического вещества 73% на сухое вещество подвергался щелочной обработке 0,2 М раствором едкого кали. 5 г сухого торфа заливали 0,2М раствором едкого кали, а затем оставляли на 6 часов, после чего фильтрованием отделяли осадок. Фильтрат, представляющий собой гуминовые вещества, подкисляли до pH=2-3 ортофосфорной кислотой. Далее обработку производили аналогично тому, как показано в примерах 1 и 2, за исключением того, что обработку солей гуминовых кислот тетрахлорплатинитокалия вели при 45 °C.

20 Элементный состав сухого выделенного продукта в расчёте на органическое вещество, масс.% С - 51%, Н - 12%, N - 2%, (O+8) - 35% (по разности).

Органическая часть продукта содержит 3,4-4,0 мг.-экв. COOH-групп в 1 г и 6,3-6,9 мг.-экв. фенольных гидроксилов в 1 г.

Исследования инфракрасных спектров и определение содержания

СООН-групп и фенольных гидроксилов показали, что получены гуминовые вещества.

ПРИМЕР № 5

Проводили аналогично примеру 2, при этом к 500 мл озёрного

5 сапропеля с

влажностью 90% и содержанием сухого остатка 31% добавляли 500 мл дистиллированной воды, 5,6 г едкого кали, 6 г мочевины и 37 г трилона Б.

После

10 перемешивания в течение 1 часа при нормальных условиях осадок отделяли фильтрованием. Фильтрат, представляющий собой раствор, содержащий гуминовые вещества, подкисляли серной кислотой до рН-1-2. Далее обработку производили аналогично тому, как показано в примерах 1 и 2, за исключением того, что в раствор гуминовых веществ вносили по 0,17 масс. % тетрахлорплатинита калия на 1 г гуминовых кислот и 15 нагревали до 40°C.

Элементный состав сухого выделенного продукта в пересчёте на органическое вещество, масс.%: C-52%, H-16%, N-2%, (O+S)=30% (по разности).

20 Органическая часть продукта содержит 3,0-3,4 мг.-экв. СООН-групп в 1 г и 6,0-6,4 мг.-экв. фенольных гидроксилов в 1 г.

Исследования инфракрасных спектров и определение содержания СООН-групп и фенольных гидроксилов показали, что получены гуминовые вещества.

ПРИМЕР № 6

25

Проводили аналогично примеру 2, при этом к 100 г гумусового горизонта почвы (горизонт А из обыкновенного чернозёма) с содержанием общего углерода 7% добавляли 500 мл дистиллированной воды, а затем 1,12

12

г едкого кали, 6 г мочевины и 7,4 г трилона Б. После перемешивания в течение 10 минут смесь выдерживали при нормальных условиях 6 часов и осадок отделяли фильтрованием. Фильтрат, представляющий собой раствор гуминовых веществ, подкисляли серной кислотой до pH=1-2. Далее обработку производили аналогично тому, как показано в примерах 1 и 23за исключением того, что в раствор солей гуминовых кислот вносили по 0,2 масс. % тетрахлорплатинита калия из расчета на 1 г гуминовых кислот и нагревали до 40°C.

Элементный состав сухого выделенного продукта в пересчёте на органическое вещество, масс.%: C-56%, H-8%, N=3%, (O+S)=33% (по разности).

Органическая часть продукта содержит 3,4 – 4,0 мг.-экв. COOH-групп в 1 г и 6,4 - 7,0 мг.-экв. фенольных гидроксилов в 1 г.

Исследования инфракрасных спектров и определение содержания COOH-групп и фенольных гидроксилов показали, что получены гуминовые вещества.

ПРИМЕР № 7

Препарат, полученный по примеру 1, испытывался для неспецифической иммунотерапии лейкоза крупного рогатого скота.

В опыте использовались коровы черно-пестрой породы в возрасте 5-7 лет одного из предприятий Ленинградской области. Все животные находились в стандартных условиях беспривязного содержания. Рацион и уход за животными был аналогичен общему стаду как в опыте, так и в контроле.

Препарат хранился в стеклянных флаконах ёмкостью 10, 20, 25, 30, 50, 100, 200 мл. При одновременной обработке большого количества крупного рогатого скота брались флаконы с препаратом до 500 мл. Флаконы герметично закрывались стерильными завинчивающимися пробками из нейтрального пластика или резиновыми пробками. Стерилизация препарата проводилась

автоклавированием. Храли препарат в защищенном от света месте. Срок хранения зависит от температуры окружающей среды, при температуре -5°C -- 10°C составляет до 2-3 лет. Перед использованием ампулу с препаратом или флакон выдерживали в теплой воде с температурой 37°C в течение 5-10 секунд.

5 Затем с соблюдением стерильности ампулы вскрывали и набирали в шприц для инъекций.

Для неспецифической иммунотерапии крупного рогатого скота от лейко-за были выделены три группы коров по 12 коров каждая.

Первая группа (Опыт): 12 коров черно-пестрой породы с клинической 10 формой лейкоза, положительно реагирующие по серологическому методу выявления инфицированных животных с помощью иммуно-диффузии в геле агара (РИД-тесту) и гематологическим исследованиям.

Вторая группа (Положительный контроль) 12 коров с клинической формой лейкоза. Все животные положительно реагировали по РИД-тесту и данным 15 гематологических исследований. Данная группа не подвергалась неспецифической иммунотерапии.

Третья группа (Отрицательный контроль). 12 коров черно-пестрой породы клинически здоровых, отрицательно реагирующих по РИД-тесту и гематологическим исследованиям.

20 Все три группы животных находились на одном скотном дворе на беспривязном содержании с одинаковыми условиями кормления и ухода. В течение эксперимента животные в опыте и контроле проверялись по трём тестам.

- установление наличия клинических признаков заболевания;
- серологическая диагностика с помощью РИД-теста;

25 - гематологическое обследование периферической крови у всех животных.

Клинический осмотр животных проводили в присутствии ветеринарных врачей хозяйства и сотрудников Санкт-Петербургского ветеринарного института.

30 У всех животных в опытной группе и в положительном контроле наблюдали увеличение объема поверхностных лимфатических узлов: паховых,

надвывиленных и предлопаточных. Особенно были увеличены паховые и надвывиленные лимфоузлы, которые при пальпации были равномерно увеличены. Признаков болезненности при глубокой пальпации не наблюдали. При перкуссии селезёнки отмечали расширение её границ.

5 Основой для наблюдения за развитием лейкозного процесса была взята клиническая схема лейкозного процесса. По этой схеме при развитии метастазов в лимфатических узлах наступают пролиферативные гиперпластические процессы. Лимфатические узлы при этом увеличиваются в объёме, что хорошо заметно при клиническом обследовании. Этот симптом является основным 10 клиническим признаком проявления заболевания. Поэтому процесс увеличения или уменьшения объема лимфатических узлов можно считать соответственно как ухудшение или улучшение характера заболевания лейкозом.

Неспецифическую иммунотерапию лейкоза проводили в несколько циклов по следующей схеме:

15 Как правило, испытуемый препарат вводили внутримышечно через каждые 6 суток по 20 мл в разведении 1:100 в течение 36 суток. Затем следовал перерыв 35-40 дней.

В процессе лечения определялась величина паховых и надвывиленных лимфатических узлов каждой коровы. Замер величины лимфатических узлов 20 показал, что после проведения 1-го цикла активной неспецифической иммунотерапии у всех животных наблюдали уменьшение объема лимфатических узлов до нормальных размеров. В параллельном положительном опыте у 12 коров с аналогичной клинической формой лейкоза увеличенные в объёме лимфатические узлы оставались без изменения. Через 35-40 дней после 25 окончания первого цикла активной неспецифической иммунотерапии у отдельных животных первой опытной группы вновь наблюдалось увеличение лимфатических узлов.

Всем животным опытной группы через 30-35 дней был проведен 2-ой повторный цикл активной неспецифической иммунотерапии: в течение 36 дней 30 каждое животное через каждые 6 дней получало 20 мл препарата в разведении 1:100. После второго курса у всех животных опытной группы наступила стойкая

ремиссия. У всех животных исчезли клинические симптомы, улучшилось общее состояние: коровы охотно поедали корм, увеличился надой. Отмечены характерные клинические признаки наступления ремиссии лейкоза. Животные стали активными, развился блеск кожных покровов, не стало исхудания.

5 При контролльном анализе крови на исследование по РИД-тесту у 60% животных наблюдался отрицательный результат.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения противоопухолевого средства на основе тетрахлорплатинита калия, отличающийся тем, что раствором тетрахлорплатинита калия обрабатывают водный раствор, содержащий гуминовые вещества, при этом обработку проводят под действием ультразвука с мощностью излучения $40 \text{ Вт}/\text{см}^2$ с частотой 22 Гц в течение 4-8 минут.
2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что гуминовые вещества получают обработкой гумифицированного материала щелочными растворами при нормальных условиях.
3. Способ по п. 2, отличающийся тем, что гумифицированный материал обрабатывают щелочным раствором в присутствии мочевины и комплексона.
4. Способ по п.п. 2 или 3, отличающийся тем, что в качестве гумифицированного материала используют торф из верховых или переходных болот или сапропель или компосты или гумусовые горизонты почв.
5. Способ по п.п. 3 или 4, отличающийся тем, что обработку тетрахлорплатинитом проводят при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$.
- 20 6. Способ по п. 2, отличающийся тем, что гуминовые вещества получают из окисленного древесного лигнина.
7. Способ по п. 6, отличающийся тем, что гуминовые вещества получают окислением древесного лигнина в щелочной среде кислородосодержащим газом при температуре $170 \pm 20^\circ\text{C}$, давлении 1,9-2,5 Мпа в течение 1-3 часов и 25 последующим охлаждением реакционной массы, отделением твердой фазы от раствора и подкислением последнего до $\text{pH}=2-3$.
- 30 8. Способ по п. 7, отличающийся тем, что водно-щелочную суспензию, содержащую древесный лигнин, перед окислением обрабатывают ультразвуком с мощностью излучение $4-6 \text{ Вт}/\text{см}^2$, с частотой 22 кГц в течение 6-10 мин.
9. Способ по п.п.7 или 8, отличающийся тем, что обработку тетрахлорплатинитом калия проводят при температуре $40 \pm 5^\circ\text{C}$.