

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 35 odst. 1 zákona č. 84/1972 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1989-3401

(19)
ČESKOSLOVENSKÁ
SOCIALISTICKÁ
REPUBLIKA

- (22) Přihlášeno: **05.06.1989**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **06.06.1988**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **1988/4437541**
(33) Země priority: **SU**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.10.1990**
(Věstník č. 10/1990)

ÚŘAD PRO
VYNÁLEZY
A OBJEVY

(51) Int. Cl.:

C 01 G 55/00

(71) Přihlašovatel:

INSTITUT FIZIČESKOJ CHIMII IMENI L. V. PISARŽEVSKOGO AKA, Kijev, SU
KIJEVSKIJ GOSUDARSTVENNYJ INSTITUT USOVERŠEN, Kijev, SU

(72) Původce:

Volčenskova Ilima Iljodorovna, Kijev, SU
Majdanevič Naděžda Nikolajevna, Višněvy, SU
Budarin Lev Ivanovič, Kijev, SU
Trochimenko Jelena Petrovna, Višněvy, SU
Kejsevič Ljudvig Vladislavovič dr., Kijev, SU
Šalimov Sergej Alexandrovič dr., Kijev, SU
Kopytin Sergej Nikolajevič ing., Kijev, SU

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsob výroby derivátů dvojmočné platiny s polyaniontem desoxyribonukleové kyseliny

~~Předložený~~ Vynález se týká oblasti bioanorganické chemie a zejména se týká způsobu výroby nových látek, derivátů dvojmocné platiny s polyaniontem desoxyribonukleové kyseliny, které vykazují antineoplastickou aktivitu a v lékařství se používají při chemoterapii rakoviny vaječníku, rakoviny plic a jater a rakoviny žlučníku.

V přítomnosti se zvyšuje úmrtnost obyvatelstva na zhoubné nádory rozdílné lokalizace; zejména všude mezi lidmi v mladém a středním věku. V závislosti na tomto se věnuje velká pozornost hledání a zkoušení léčiv s antineoplastickou účinností.

Jsou známy různé sloučeniny, které mají antineoplastickou aktivitu, a způsob jejich výroby, například sloučeniny cis-dichlordiaminplatnaté, 1,2-diaminocyklohexan/4-karboxyftalato/platnaté, 1,1-diaminomethylocyklohexan/sulfato/platnaté, 1,2-diaminocyklohexan/isocitrat/platnaté a jiné. /Handbuch .Synthese komplexer Verbindungen der Metalle der Platingruppe, 1964, "Nauka", /Moskva// .Z uvedených sloučenin je zejména aktivní cis-dichlordiaminoplat-

natá sloučenina./ Handbook of Cancer Combination Chemotherapy, s. 85, Eleomycin, Peplomycin, Cisplatin, Nippon Kayak 1986, s. 26 - 63/.

Způsob výroby uvedené látky spočívá v tom, že se kaliumtetrachloroplatinid nechá zreagovat s octanem amonným při zahřívání na teplotu varu s následující izolací konečného produktu.

Všechny uvedené sloučeniny vykazují antineoplastickou aktivitu, vyznačují se ale vysokou toxicitou a vedlejšími účinky na organismus. Všechny uvedené preparáty potlačují kromě toho v tom či onom stupni imunologickou reaktivitu organismu.

V přihlášce vynálezu popisovaný způsob je nový a až dosud nebyl v literatuře popsán.

Vynález si klade za základní úlohu vyvinout způsob výroby nových sloučenin, které vykazují vysokou antineoplastickou aktivitu ve spojení s imunomodulující aktivitou a malou toxicitou.

Úloha je vyřešena tím, že způsob výroby nových sloučenin, derivátů dvojmocné platiny s polyaniontem desoxyribonukleové kyseliny podle vynálezu spočívá v tom, že desoxyribonukleová kyselina s molekulovou hmotností, která není nižší než $8 \cdot 10^6$ D se nechá zreagovat s cis-dichlor-

aminoplatnatou sloučeninou nebo s částečně hydrolyzovanou cis-dichlordiaminoplatnatou sloučeninou ve vodném prostředí nebo v pufrčním roztoku s hodnou pH 7,0 až 7,5 a iontovou silou 0,01 až 0,02 při teplotě, která se nepohybuje pod teplotou tání desoxyribonukleové kyseliny s následující izolací konečného produktu.

Získají se sloučeniny, které představují jemně krystalický prášek žluté barvy, bez zápachu, na vzduchu stálý, které se mohou skladovat beze změny vlastností po dobu je jednoho roku. Teplota tání není pro ně charakteristická.

Nárokovaná sloučenina poly { hexakis [chloroamino-
diakvaplatnato]_m }_n-desoxyribonukleát následujícího vzor-
ce:



$$\text{kde DNS}^{-\text{m}} = \left[\text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{O}_{32}\text{N}_{15}\text{P}_4 \right]_n^{-\text{m}}, \quad n = 1900 \pm 90,$$

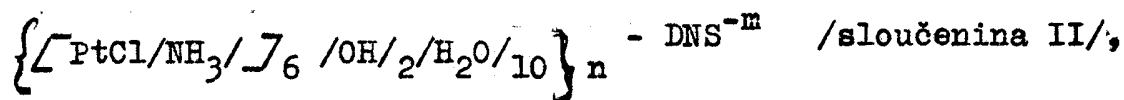
$$m = 6n,$$

ztrácí při zahřívání během 10 hodin při teplotě 180 až 200 °C všechny molekuly vody. Látka se dá špatně rozpouštět ve vodě, methanolu, ethanolu a není hygroskopická. Její rozpustnost ve vodě činí při 20 °C 0,002 %. Roztok 0,015 g látky v 1000 ml roztoku citrátové soli / 0,015 molů chlo-

ridu sodného + 0,0015 molů citrátu sodného/ při teplotě 20 °C vykazuje hodnotu pH 5,42 / pH stanoveno potenciometricky.

UV spektrum 0,00184% roztoku sloučeniny /I/ ve vodě vykazuje v oblasti 230 až 300 nm absorpční maximum u 268,8 ± 0,2 nm / 1 g ϵ = 4,000, počítáno na 1 mol nukleotidu/. IR spektrum vykazuje absorpční pásy při 340 cm⁻¹ /Pt-Cl- skupina/, 1000-1300 cm⁻¹ /PO₄ skupina/, 1320 cm⁻¹ /PtNH₃ skupina/, 1500 - 1700 cm⁻¹ / C=C, C=N, C=O skupiny/, 3100 - 3700 cm⁻¹ / C-H, N-H, O-H skupiny/ a reflexní spektrum pevné sloučeniny I vykazuje na extrémních bodech koeficientů spektrální reflexe R_{248,3} /%/ = 4,60 ; R_{333,3} /%/ = 12,3 ; R_{400,6} /%/ = 22,4 ; R_{514,4} /%/ = 60,1 .Průměrná viskozita molekulové hmoty nárokované sloučeniny I se rovná 6,2.10⁶ D.

Sloučenina poly { bis [hydroxochloroaminoakvaplatnato]-tetrakis [chloroaminoakvaplatnato] }_m - desoxyribonukleát podle vynálezu následujícího vzorce :



kde DNS^{-m} = $\frac{1}{n} \text{C}_{39} \text{H}_{51} \text{O}_{32} \text{N}_{15} \text{P}_4$ při n = 2000 ± 100 ,

$$m = 4n,$$

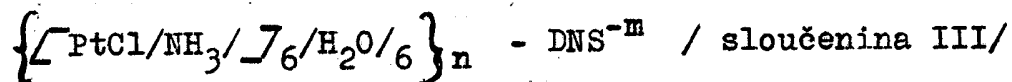
ztrácí při zahřívání během 8 hodin při teplotě 180 až 200 °C

všechny molekuly vody. Rozpustnost sloučeniny II ve vodě při 20 °C činí 0,0075 %. Roztok obsahující 0,018 g látky v 1000 ml roztoku citrátové soli vykazuje při 20 °C hodnotu pH 5,38.

UV spektrum 0,002% roztoku sloučeniny II ve vodě vykazuje v oblasti 230 až 300 nm absorpční maximum při 265,7 ± 0,2 nm / lg ϵ = 4,000, počítáno na 1 mol nukleotidu/. IR spektrum vykazuje absorpční pásy u 340 cm⁻¹ /Pt-Cl-skupina /, 1000 - 1300 cm⁻¹ /PO₄ skupina/, 1340 cm⁻¹ /ptNH₃ skupina /, 1500 - 1700 cm⁻¹ /C=C, C=N, C=O skupiny/, 3100 - 3700 cm⁻¹ /C-H, N-H, O-H skupiny/, 3295 cm⁻¹ /PtOH skupiny/.

Průměrná viskozita molekulové hmoty sloučeniny II podle vynálezu se rovná 6,0 · 10⁶D.

Sloučenina poly { hexakis [chloroaminoakvaplantato] - }_n-desoxyribonukleát podle vynálezu následujícího vzorce :



$$\text{kde } \text{DNS}^{-m} = \text{C}_{39}\text{H}_{49}\text{O}_{32}\text{N}_{15}\text{P}_4 \begin{matrix} m \\ n \end{matrix} \quad n = 2100 + 100 , \\ m = 6n$$

se při zahřívání po dobu 12 hodin při teplotě 180 až 200 °C ve své hmotě nemění. Látky se dá špatně rozpouštět

ve vodě, methanolu a ethanolu. Její rozpustnost ve vodě činí při 20 °C 0,0005 % a v roztoku, který obsahuje 18 mmolů/l natriumchloridu a 1,8 mmolů natriumcitrátu, 0,005 %. Roztok sestávající z 0,015 g látky v 1000 ml roztoku citrátové soli vykazuje při 20 °C hodnotu pH 5,44.

UV spektrum 0,002% roztoku sloučeniny IIIv roztoku citrátové soli vykazuje v oblasti 230 až 300 nm absorpční maximum u $266,2 \pm 0,2$ nm / 1 g $\xi = 4,000$, počítáno na 1 mol nukleotidu/.

IR spektrum vykazuje absorpční pásy při 340 cm^{-1} /PtCl skupina/, $1000 - 1300\text{ cm}^{-1}$ / PO₄ skupina/, 1340 cm^{-1} /PtNH₃ skupina/, $1500 - 1700\text{ cm}^{-1}$ / C=C, C=N, C=O skupiny/, $3000 - 3700\text{ cm}^{-1}$ /C-H, N-H, O-H skupiny /.

Reflexní spektrum pevné sloučeniny III se vyznačuje $R_{267,1} / \%/ = 8,97$, $R_{333,0} / \%/ = 26,28$.

Sloučeniny podle vynálezu vykazují antineoplastickou účinnost ve spojení s imunomodulující aktivitou. Nárokové sloučeniny byly zkoušeny na zvířatech a klinicky na lidech. Byla zkoušena jejich antineoplastická aktivita vůči přeočkovévané Shvetz-erytromylose. Antineoplastická aktivita všech látek podle vynálezu se vyhodnocovala podle výsledků pokusů, které se provádě-

ly na bílých krysách, které nepatřily k žádné rase, a jejichž hmotnost byla 150 až 200 g / ve skupinách vždy po 10 zvířatech /. Zvířatům se vpravilo do boku $2 \cdot 10^8$ - $2 \cdot 10^{10}$ buněk přeočkovaného kmene Shvetz-erytromyelosy a to subkutánně. 4. až 6 den po inokulaci nádorových buněk, to znamená v období logaritmické fáze růstu nádoru se začaly zvířatům zavádět sloučeniny podle vynálezu. Sloučeniny podle vynálezu se zaváděly intraperitoneálně, třikrát, v časovém odstupu 24 hodin ve formě vodných roztoků popřípadě vodných suspenzí.

Nárokované látky byly zaváděny v následujících dávkách :

sloučenina I	- 17,1 mg/kg
sloučenina II	- 17,1 až 27,3 mg/kg
sloučenina III	- 27,3 mg/kg

Antineoplastická účinnost sloučenin podle vynálezu byla zkoušena ve srovnání s kontrolou / bez použití preparátu / a ve srovnání s CDDP a DNS preparáty. Zavedené dávky CDDP činily 8,1 mg/kg a u DNS 18,0 mg/kg.

Antineoplastická účinnost se vyhodnocovala podle následujících biologických charakteristických dat : stupně inhibice růstu nádoru, schopnost přežití zvířat 10tý den po inokulaci buněk nádoru jakož i délka života zví-

řat.

Výsledky zkoušek jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

látky	stupeň inhibice růstu nádoru, %	schopnost přežití zvířat, %	délka života ve dnech
1	2	3	4
CDDP	78	80	11,5 ± 0,5
DNS	0	100	18,5 ± 0,5
sloučenina I podle vynálezu	84	100	21,5 ± 0,5
sloučenina II podle vynálezu	94	100	11,5 ± 0,5
sloučenina III podle vynálezu	95	100	21,0 ± 1,0
kontrola	0	100	14,5 ± 0,5

Jak je z tabulky 1 zřejmé nejsou látky podle vynálezu méně účinné než preparát CDDP, ale podle charakterických dat jej v antineoplastické aktivitě převyšují. Jako zejména účinná se projevuje sloučenina III, která potlačuje růst nádoru účinněji než CDDP, a zvyšuje schopnost přežití zvířat o 20 %

a délku života o 10 dní, to znamená o dvojnásobek.

Rovněž byla zkoušena akutní toxicita nárokovaných sloučenin.

Akutní toxicita nárokovaných sloučenin se zkoušela ve srovnání s CDDP na bílých krysách, nepatřících k žádné rase, s hmotností 150 až 200 g a na bílých nelineárních myších s hmotností 30 ± 3 g, které byly vystaveny po dobu 20 dnů karanténě. Nárokované sloučeniny I a II se zaváděly třikrát intraperitoneálně ve formě vodných suspenzí a ve formě vodných roztoků, a sloučenina III a CDDP ve formě suspenzí s citrátovou solí popřípadě ve formě roztoků s citrátovou solí / pH 7,0 až 7,5 a iontovou silou 0,01 až 0,02/ v časovém odstupu 2 hodin v objemech vždy po 0,5 ml pro myši a po 0,2 ml pro krysy. Celkové dávky sloučenin I, II, a III podle vynálezu činily 34,0 ; 68,0 ; 84,0 ; 102,0 a 136,0 mg/kg, u CDDP - 8,0 ^{10,0;} 14,0 ; 16,0 a 18,0 mg/kg - Počet uhynutých zvířat v každé skupině byl registrován každých 24 a 48 hodin. V každé skupině bylo 12 zvířat / 6 samců a 6 samic/, pokusy se dvakrát opakovaly. Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulce 2.

Výsledky zkoušek ukazují, že látky podle vynálezu jsou méně toxické než CDDP. Z uvedených látek nejméně toxická je sloučenina III podle vynálezu. Toxicita sloučeniny

III podle vynálezu klesá zejména tehdy, když se tato používá v roztoku aniž by se reakční směs vystavila lyofilnímu sušení a následujícímu odstranění sodných solí.

Uhynulá zvířata byla pitvána a histologicky se zkoumaly ledviny a střeva. Zvířata, která dostala látky podle vynálezu v množstvích nacházejících se pod toxickou dávkou, byla po 14 dnech usmrcena. Jejich vnitřní orgány byly podrobeny autopsii.

T a b u l k a 2

charakteristická data toxicity	CDDP v roztoku	sloučenina		sloučenina		sloučenina	
		I podle vy- nálezu	v roztoku	II podle vy- nálezu	v suspen- si	III podle vy- nálezu	v roz- toku
1	2	3	4	5	6	7	8
LD ₅₀ mg/kg	11,3	51,8	51,8	66,0	66,0	102,8	82,5
LD ₁₀₀ mg/kg	18,3	84,0	84,0	100,0	100,0	136,0	120,0

Podle histologických vyšetření byly příčiny uhynutí zvířat, která dostala toxické dávky preparátu CDDP a látek podle vy-

nálezu, různé. Při zavádění CDDP v toxických dávkách se pozoruje výrazná dystrofie vnitřních orgánů, akutní pseudonefróza, masivní nekrózy malých kloubů a otoky stromy. Ve střevě se pozoruje nikterak výrazná dysplazie epitelu.

Při zavedení látek podle vynálezu v toxických dávkách se zjistí v ledvinách nepodstatné vratné změny: nikterak výrazné otoky stromy, jednotlivé povrchové výrony v malých kloubech, dystrofické změny kanálků. Při tom lze ale zaznamenat dysplazii a deskvamaci střevního epitelu, poškození jeho regenerační funkce a redukci počtu mitóz.

Při zavádění látek podle vynálezu v množstvích pod toxickými dávkami jsou shora uvedené změny v ledvinách a střevě vratné a během 14 dnů dochází k naprosté regeneraci.

Byla zkoušena imunologická aktivita látek podle vynálezu. Imunologická aktivita se zjišťovala pomocí charakteristických dat, která charakterizují vliv nárokovatelných látek na funkci imunitních systémů: celulární a humorální imunita.

Vliv na celulární imunitu se vyhodnocoval podle doby odloučení allotransplantátu kůže nositele nádoru.

Vliv na humorální imunitu / antitelo nese / se vyhodnocoval podle množství buněk tvořících ve slezině anti-

tělíska a podle titru aglutininu a hemolysinu v krevním séru.

Vliv nárokovaných látek na celulární imunitu byl zkoušen na samčích krysách linie Wistar s hmotností 150 až 200 g. Zvířatům byl transplantován kožní kryt rozměru (2 x 3) cm² odebraný krysám linie August, do hřbetní krajiny. Potom byly těmže zvířatům inokulovány do kyčlí subkutánně 2.10⁸ buněk Shvetz-erytromyelosy. 4. a 6 den po přeočkování nádoru se zavedla zvířatům intraperitoneálně třikrát v časovém odstupu 24 hodin sloučenina I podle vynálezu v dávce 17,1 mg/kg, sloučenina II v dávce 17,1 mg/kg a sloučenina III v dávce 27,3 mg/kg. Sloučeniny I a II se zaváděly ve formě vodného roztoku a sloučenina III ve formě roztoku 0,015 molů chloridu sodného + 0,0015 molu citrátu sodného. Jako srovnání se používaly preparáty DNS a CDDP, které se zaváděly v solném roztoku podle stejného schématu v dávkách 12,0 a 8,1 mg/kg. Jako kontrola sloužila intaktní zvířata. Čas odloučení kožního krytu se fixoval podle změny jeho teploty, barvy a elasticity.

Výsledky pokusů jsou uvedeny v tabulce 3.

Ve srovnání k intaktním zvířatům se zvětšila doba odloučení kožního krytu neošetřených nositelů nádoru o 5,5 dní. To svědčí o ~~sní~~ snížení celulární imunity organismu za podmínek vývinu nádoru.

T a b u l k a 3

Doba odloučení / ve dnech / kožního krytu~~ž~~ u intaktních zvířat a u nositelů nádoru bez léčení a u léčených látkami podle vynálezu

intaktní zvířata	nositelé nádoru bez léčení	léčení nositelé nádoru				
		CDDP	DNS	látkami podle vynálezu		
				I	II	III
1	2	3	4	5	6	7
9,5 ± 1,0	15,0 ± 1,0	13,05 ± 0,5	12,5 ± 0,5	6,0 ± 1,0	6,5 ± 0,5	6,5 ± 0,5

Zavedení preparátu CDDP a DNS neovlivňuje prakticky celulární imunitu nositele nádoru /CDDP/ nebo ji ovlivňuje jen nepodstatně /DNS/. Zavedení nárokovaných látek zkracuje dobu odmítnutí kožního krytu o 3 dny ve srovnání s intaktními zvířaty a o 8,5 dnů ve srovnání s neléčenými nositeli nádoru.

Tím stimuluje zavádění nárokovaných sloučenin značnou měrou celulární imunitu nositele nádoru a to tak, že se její hladina zvýší nad hladinu zdravého zvířete, což se při zavádění CDDP a DNS nepodařilo.

Vliv látek podle vynálezu na humorální imunitu byl rovněž zkoumán ve srovnání s CDDP a DNS. Pro tento účel byly použity krysy, nositelé Shvetz-erytromyelosy, linie Wistar. 4 den po přeočkování nádoru se počalo s jejich léčením podle stejného schématu jako při zkoumání celulární imunity. 8 den po přeočkování nádoru se provedla imunizace zvířat, tím že se jim zavedly Hammelovy erythrocyty v dávce $2 \cdot 10^6$ buněk. Za 4 dny po imunizaci se zvířata usmrtila dekapitací za použití narkózy etherem a zjišťoval se obsah buněk tvořících antitělíska ve slezině pomocí Ernho metody a agglutinační a hemolysinový titr v periferní krvi se zjišťoval o sobě známými způsoby.

Obsah buněk tvořících antitělíska se zjišťoval v přepočtu na 10^6 splenocytů a na celkovou hmotnost sleziny. Výsledky pokusů jsou shrnuty v tabulce 4.

Látky podle vynálezu snižují humorální imunitu nositele nádoru. Tyto látky zmenšují rovněž počet buněk tvořících antitělíska a snižují agglutinační a hemolysinový titr. Snižování humorální imunity vlivem látek podle vynálezu nastává ale jen v menší míře než je tomu při působení CDDP. DNS preparát prakticky neovlivňuje humorální imunitu.

T a b u l k a 4

1	skupiny zvířat			
	2	3	4	5
charakteristické hodnoty humorální imunity	intaktní zvířata	nositelé nádoru ne-léčení	léčení nositelé nádoru	
			CDDP	
1.	obsah buněk tvořících antitělíska po 10^6 spelnocytů	2530 ± 550	$283,7 \pm 22,5$	$20,37 \pm 2.03$
2.	obsah buněk tvořících antitělíska počítáno na hmotu sleziny	$/1828 \pm 250/x 10^3$	$/250,3 \pm 16,8/x 10^3$	$/36,42 \pm 2,03/x 10^3$
3.	agglutinační titr	1 : 512	1 : 160	1 : 64
4.	hemolyzní titr	1 : 4064	1 : 2235	1 : 128

pokračování tabulky 4

DNS	skupiny zvířat		
	léčení nositelé nádoru		
	látkami podle vynálezu		
	I	II	III

pokračování tabulky 4

I	6	7	8	9
1.	292,5 ± 30,7	68,4 ± 9,38	73,21 ± 14,2	69,2 ± 12,7
2.	/302,7 ± ±45,3/x 10 ³	/78,96 ± ±3,72/x10 ³	/84,21 ± ± 3,31/10 ³	/56,25 ± 10,0/ x 10 ³
3.	1 : 128	1 : 128	1 : 128	1 : 100
4.	1 : 2560	1 : 256	1 : 650	1 : 512

Vliv látek podle vynálezu na antitelogenesi byl zkoušen i na dvou na Hammelovy erythrocyty opačně reagujících liniích myši: CBA a C₅₇BL/6. Použila se zvířata s hmotností 20 ± 2 g, která byla vystavena po dobu nejméně 20 dnů karanténě. Intaktním zvířatům se zavedla jednou intraperitoneálně látky podle vynálezu v dávkách 13,6 mg/kg, DNS v dávce 6,0 mg/kg a CDDP v dávce 8,1 mg/kg. Za hodinu byla zvířata imunizována tím, že se jim intraperitoneálně zavedlo 10⁸ buněk Hammelových erythrocytů. 7., 14. a 30. den se zvířata usmrtila a zjistil se obsah aglutinínů v krevním séru a to pomocí známých metod. Výsledky byly vyjádřeny ve formě lg₂ titrů antitělisek. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Uvedené výsledky ukazují, že DNS zvyšuje obsah antitělisek vůči Hammelovým erythrocytům v krevním séru a CDDP a látky podle vynálezu tento obsah snižují, přičemž antidepresivní úči-

nek sloučenin podle vynálezu je méně výrazný než u CDDP.

T a b u l k a 5

zaváděné látky, dávka	délka doby pozorování /dny	lg ₂ titru antitělisek	
		linie myší CBA	linie myší C ₅₇ BL ₆
1	2	3	4
kontrola /bez zavádění látek	7	8,95 ± 0,15	7,25 ± 0,20
	14	9,42 ± 0,23	7,72 ± 0,20
	30	9,20 ± 0,20	6,24 ± 0,60
CDDP / 8,1 mg/kg	7	5,30 ± 0,15	3,80 ± 0,24
	14	5,80 ± 0,19	4,04 ± 0,12
	30	5,10 ± 0,30	4,21 ± 0,37
sloučenina I po- dle vynálezu /13,6 mg/kg/	7	7,30 ± 0,12	6,40 ± 0,15
	14	7,80 ± 0,31	6,82 ± 0,38
	30	8,10 ± 0,40	6,25 ± 0,31
sloučenina II podle vynálezu /13,6 mg/kg/	7	7,20 ± 0,30	6,60 ± 0,32
	14	7,60 ± 0,32	6,81 ± 0,30
	30	6,40 ± 0,42	6,48 ± 0,15

pokračování tabulky 5

1	2	3	4
sloučenina III podle vynálezu			
/ 13,6 mg/kg/	7	8,10 ± 0,23	6,41 ± 0,21
	14	8,40 ± 0,42	6,68 ± 0,29
	30	8,50 ± 0,30	6,32 ± 0,24
DNS /6,0 mg/kg/			
	7	9,42 ± 0,37	7,92 ± 0,31
	14	10,8 ± 0,24	7,80 ± 0,50
	30	10,0 ± 0,12	6,49 ± 0,50

Prováděl se také zkoumání vlivu kátek podle vynálezu, ve srovnání s CDDP a DNS preparáty, na tvorbu buněk tvořících antitělíska ve slezině dvou linií myší reagujících opačně na Hammelovy erytrocyty.

Myším linií CBA a C₅₇Bl⁶ s hmotností 20 ± 2 g se zavedla jednou CDDP v dávce 8,1 mg/kg, DNS v dávce 6,0 mg/kg a látky podle vynálezu v dávce 13,6 mg/kg.

Za 1 hodinu byla zvířata imunizována, tím že se jim intraperitoneálně zavedlo 10⁸ buněk Hammelových erytrocytů. 4. den se zjišťoval počet buněk tvořících antitělíska ve slezině zvířat pokusných a kontrolních skupin / bez zavedení preparátu/. Obsah buněk tvořících antitělíska se počítal

na 10^6 splenocytů a na celou slezinu. Výsledky vyšetřování jsou uvedeny v tabulce 6.

T a b u l k a 6

Zaváděné látky	obsah buněk tvořících antitěliska			
	linie myší CBA		linie myší C ₅₇ B ₆ ^l	
	na 10^6 buněk	na celou slezinu x 1000	na 10^6 buněk	na celou slezinu x 1000
1	2	3	4	5
kontrola	160,0 ± 7,0	240,0 ± 10,0	72,0 ± 4,0	9,4 ± 1,3
CDDP /8,1 mg/kg/	42,0 ± 3,8	63,0 ± 2,2	13,3 ± 1,24	2,2 ± 0,96
DNS /6,0 mg/kg/ I sloučenina / podle vynálezu	240,8 ± 3,2	500,0 ± 17,4	81,2 ± 4,1	10,3 ± 1,12
/13,6 mg/kg/ sloučenina II po- dle vynálezu	51,0 ± 2,8	76,5 ± 7,3	25,3 ± 2,8	3,89 ± 0,7
/13,6 mg/kg/ sloučenina III po- dle vynálezu	52,7 ± 4,18	79,05 ± 6,42	30,27 ± 3,7	3,94 ± 0,8
/13,6 mg/kg/	54,8 ± 5,82	82,20 ± 7,24	32,72 ± 4,02	4,26 ± 0,8

Z údajů uvedených v tabulce 6 je zřejmé, že DNS zvyšuje obsah buněk tvořících antitělíska ve slezině u myší, které reagují buď méně nebo více na Hammelovy erythrocyty linií myší, CDDP a látky podle vynálezu snižují obsah buněk tvořících antitělíska ve slezině u myší jak CBA linie tak i C₅₇BL^l/₆ linie, imunodepresivní účinek látek podle vynálezu je ale méně výrazný než imunodepresivní účinek CDDP.

Tím dokazují jak látky podle vynálezu tak i CDDP výrazný imunodepresivní účinek na systém humorální imunity jak u intaktních zvířat tak i u nositelů nádorů. Snižují tvorbu buněk, producentů antitělísek, čímž se snižuje počet antitělísek v krevním séru. Imunodepresivní účinek látek podle vynálezu je méně výrazný než imunodepresivní účinek CDDP.

Zkoumalý se charakteristická data funkčních aktivit jater nebo ledvin krys. Intaktním zvířatům se zavedly třikrát, ve stejných dávkách s časovým odstupem 1 hodiny vodné roztoky nárokovaných látek I a II a roztoky citrátových solí CDDP jakož i nárokované sloučeniny III při toxických mezidávkách rovných $1/2 LD_{50}$, což pro CDDP činilo celkem 9,0 mg/kg, u nárokovaných sloučenin I, II a III - 25,54 mg/kg 33,0 mg/kg a 50,1 mg/kg. Za 24 hodin a za 7 dní se usmrtila zvířata a zjistily se některé biochemické charakteristické veličiny krve, které charakterizují funkční stav jater a ledvin. Výsledky pokusů ukázaly, že první den po zavedení CDDP

a látek podle vynálezu v dávkách rovnajících se $1/2$ LD_{50} dochází ke staticky přípustnému zvýšení transamináz / alaninaminotransferáz a aspartataminotransferáz/, hladiny bilirubinu jakož i ke zvýšení množství močoviny v krevním séru . 7 den po zavedení látek podle vynálezu se tato charakteristická data normalizovala. U přežívajících zvířat, která dostala CDDP, byla tato charakteristická data vyšší než normální. Zjištěné výsledky ukazují, že látky podle vynálezu v toxických mezidávkách, rovných $1/2$ LD_{50} vykazují vratný nefrotoxický a hepatotoxický účinek. Normalizace charakteristických dat funkčních aktivit jater a ledvin u zvířat, kterým byla podána CDDP, 7 den nenastala.

Výsledky provedených biochemických zkoušek byly potvrzeny histologickým vyšetřením tkáně jater a ledvin.

Komplex vlastností dokázaný jako výsledek provedených zkoušek : vysoká charakteristická data stupně inhibice růstu nádoru, schopnost zvířat přežít a délka života zvířat při současném snížení toxicity vytváří perspektivy u látek podle vynálezu pro vývoj efektivních preparátů při léčení zhoubných nádorů.

Další přednost nárokovaných látek spočívá v existenci výrazných imunomodulujících vlastností těchto látek

v důsledku stimulace celulární imunity a značného snížení humorální imunity, což rovněž umožňuje zvýšit účinnost při chemoterapii zhoubných nádorů.

Byly provedeny klinické zkoušky léčiva s antineoplastickým účinkem, které obsahuje jako účinnou látku nárokovanou sloučeninu III. Klinické zkoušky se prováděly u 102 pacientek s rakovinou vaječníků a u 32 pacientů s rakovinou jater ve 4. klinickém stádiu onemocnění ve stáří od 14 až do 68 let.

U rakoviny vaječníků ve 4. klinickém stádiu byl uvedený preparát zaváděn ve formě roztoku / pH = 7,0 až 7,5 %, s iontovou silou 0,02/ do břišní dutiny 3tí až 5tý den po neúplné operaci. Preparát se zaváděl třikrát po 380 mg v objemu 250 ml v průběhu 1 až 1,5 hodiny / u pacientů s hmotností 75 kg/ s přerušením na 2 až 4 dny v závislosti na stavu právě ošetřovaného pacienta. Celková dávka uvedeného preparátu činila 1150 až 1500 mg účinné látky za celou dobu léčení, což je ekvivalentní 675 až 850 mg čistého preparátu CDDP a převyšuje 4 až 6krát maximálně přípustnou dávku při léčení CDDP, která se rovná 120 až 150 mg.

Ve třech případech se zaváděl preparát na bazi látky podle vynálezu ve stejných dávkách a za stejných podmínek 4 až 6 týdnů před operací neoperovatelných ra-

kovin vaječníku .Toto vyvolalo lysi hlavní hmoty nádoru a částečné vymizení vzdálených metastáz, což umožnilo později provést chirurgický zásah. Potom se pokračovalo v chemoterapii s uvedeným preparátem. Pacientky s rakovinou vaječníku, popsané skupiny, byly 1 až 4krát léčeny chamoterapeuticky v časovém odstupu 2 až 4 měsíců bez neodvratné hydratace a zvýšené diurézy.

U primárního a metastatického nádoru jater ve 4. klinickém stádiu byl uvedený preparát zaváděn po kapkách ve formě roztoku v průběhu 6 až 8 hodin do jaterní arterie nebo do pupeční žíly. V 10 případech byl uveeňý preparát zaváděn ve formě vodné suspence selektivně za kontroly echolokace dvakrát nebo třikrát v dávkách 380 až 760 mg u pacienta s hmotností 75 až 80 kg a v objemu 10 až 50 ml. Podle údajů echografie zůstávají látky po dobu 4 až 8 týdnů po jejich zavedení v ložisku nádoru.

Za 4 až 6 týdnů po provedeném léčení infuzí nebo místním léčení uvedeným preparátem se zmenšila velikost jater, tato se stala měkkými, nebolestivými, syndrom bolesti se prakticky zcela zkrátil. To dovolilo provést chirurgický zásah , a sice kryodestrukci.

Během léčení pacientů s rakovinou vaječnicku a rakovinou jater ve 4. klinickém stádiu, uvedeným preparátem se pozorovalo zlepšení celkového stavu, nálady a chuti k jídlu.

Provedené klinické zkoušky ukázaly, že účinnost použití uvedeného preparátu u pacientů s rakovinou vaječnicku ve 4. klinickém stádiu dosahuje 90 %, přičemž byla prokázána úplná remise / vymizení příznaků nemoci / ve 35 % případů, částečná remise a stabilizace procesu v 55 % případů, u 10 % pacientů se prokázalo, že použití uvedeného preparátu nebylo efektivní. Při úplné klinické remisi dosahuje délka života pacientů 2,5 roku při neustálém kontrole.

Při léčení rakoviny jater ve 4. klinickém stádiu za použití uvedeného preparátu činila délka života 7,5 až 11 měsíců od počátku léčení. U třech pacientů přestoupila délka života 18 měsíců při trvalé kontrole.

Způsob výroby nových sloučenin, derivátů dvojmocné platiny s polyaniontem desoxyribonukleovou kyselinou se provádí následovně.

Desoxyribonukleová kyselina s molekulovou hmotností, která není vyšší než $8 \cdot 10^6$ se nechá zreagovat s cis-dichloraminoplatnatou sloučeninou nebo

s částečně hydrolysovanou cis-dichlorodiaminoplatnatou sloučeninou ve vodném prostředí popřípadě v pufrčním roztoku s hodnotou pH 7,0 až 7,5 a s iontovou silou 0,01 až 0,02 při teplotě, která není nižší než teplota tání kyseliny desoxyribonukleové s následující izolací konečného produktu.

Nárokovaná sloučenina I, poly { hexakis [chloroaminodiakvaplatnato] }_m-desoxyribonukleát, a nárokovaná sloučenina /III/, poly { hexakis [chloroaminoakvaplatnato] }_m-desoxyribonukleát, se získá reakcí nativní desoxyribonukleové kyseliny s cis-dichlorodiaminoplatnatou sloučeninou a nárokovaná sloučenina II, poly { bis [hydroxychloroaminoplatnato] tetraakis [chloroaminodiakvaplatnato] }_m-desoxyribonukleát, se získá reakcí desoxyribonukleové kyseliny s částečně hydrolysovanou cis-dichlorodiaminoplatnatou sloučeninou.

Proces se provádí ve vodném prostředí s hodnotou pH 7,0 až 7,5 a s iontovou silou 0,01 až 0,02 při teplotě, která není nižší než teplota tání DNS až do celkového proběhnutí reakce. Ukončení reakce se kontroluje spektrofotometricky podle dosažených parametrů UV spekter.

Z reakční směsi se vyloučí konečný produkt, tím že

se chlorid amonný a přebytek vody odstraní lyofilním sušením. Konečný produkt se může vyloučit i ve formě roztoku. Chemické složení nárokovaných látek v roztoku a v usušeném stavu je identické.

Pro lepší vysvětlení předloženého vynálezu jsou uvedeny následující příklady realizace způsobu výroby sloučenin podle vynálezu.

Příklad 1

K roztoku 500 mg nativní DNS s molekulovou hmotností $8,5 \cdot 10^6$ D ve 375 ml vody, který se zahřeje na teplotu tání DNS /78,0 °C/, se přidá roztok 675 mg cis-dichlorodiaminoplatnaté sloučeniny ve 375 ml vody, která se zahřeje na stejnou teplotu. Reakční směs se nechá stát 15 minut za míchání a při teplotě 78 °C, potom se ochladí na teplotu místnosti a přeruší se lyofilní sušení.

Získá se 1105 mg / 90 % / poly { hexakis [chloroaminodiakvaplatnato γ]}_m desoxyribonukleát ve formě jemně krystalického žlutého prášku, který je ve vodě těžko rozpustný, s následujícími parametry UV spektra 0,002% roztoku ve vodě $\lambda_{\max} = 268,8 \text{ nm}$, $E_{268,8} = 10080 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ a molekulovou hmotností $6,2 \cdot 10^6$ D.

Nalezeno, %: Pt 38,46; Cl 7,38 ; C 15,61 ; N 9,36 ;
H 3,09 ; P 4,67. $C_{39}H_{91}O_{44}N_{21}Cl_6P_4Pt_6$

Vypočteno, % : Pt 38,11 ; Cl 6,94 ; C 15,25 ; N 9,58 ;
H 2,97 ; P 4,17 .

Příklad 2

Vedení procesu je analogické jako v příkladu 1 s tím rozdílem, že se konečný produkt nevyloučí z reakční směsi. UV spektrum získané látky v roztoku je charakterizováno $\lambda_{\max} = 268,8 \text{ nm}$ a $E_{268,8} = 10000 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Její molekulová hmotnost v roztoku činí $6,0 \cdot 10^6 \text{ D}$. Získaná látka má identické chemické složení jako látka získaná v příkladu 1.

Příklad 3

Vedení procesu je analogické jako v příkladu 1, s tou výjimkou, že se jako nativní desoxyribonukleová kyselina použije nativní DNS s molekulovou hmotností $10,6 \cdot 10^6 \text{ D}$. Získá se produkt, jehož UV spektrum v roztoku je charakterizováno následujícími parametry $\lambda_{\max} = 268,7 \text{ nm}$, $E_{268,7} = 10080$ a molekulová hmotnost je rovná $6,2 \cdot 10^6 \text{ D}$. Získaná látka je svým chemickým složením identická s látkou získanou v příkladu 1.

Příklad 4

Roztok 405 mg cis-dichlorodiaminoplatnatá sloučenina ve 250 ml vody, který se připraví při teplotě místnosti, se zahřívá až na teplotu tání nativní DNS /78,5 °C/ během jedné hodiny, tento roztok se přidá k roztoku 333 mg nativní DNS s molekulovou hmotností $11,2 \cdot 10^6$ D ve 250 ml vody, která se rovněž zahřeje na 78,5 °C, a směs se nechá za míchání stát při téže teplotě 15 minut. Směs se ochladí na teplotu místnosti a přeruší se lyofilní sušení.

Získá se 730 mg /93 %/ poly { bis [hydroxochloro - aminoakvaplatnato] tetrakis [chloroaminodiakvaplatnato] }_n -
~~u~~ desoxyribonukleát ve formě jemně krystalického žlutého prášku, který je ve vodě těžko rozpustný, s parametry UV spektra 0,0075% roztoku ve vodě $\lambda_{\max} = 265,7 \text{ nm}$, $E_{265,7} = 9980 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, s molekulovou hmotností $6,0 \cdot 10^6$ D a intenzivním absorpčním pásem v IR spektru při 3295 cm^{-1} , které odpovídá kolísání valence OH skupiny ve skupině PtoH .

Nalezeno, %: Pt 39,97 ; Cl 7,38 ; C 15,53 ; N 9,38 ;
H 2,98 ; P 4,07 . $\text{C}_{39}\text{H}_{91}\text{O}_{44}\text{N}_{21}\text{Cl}_6\text{P}_4\text{Pt}_6$.

Vypočteno, %: Pt 38,11 ; Cl 6,94 ; C 15,25 ; N 9,58 ;
H 2,97 ; P 4,17 .

Příklad 5

Vedení procesu se provádí analogicky jako v příkladu 4 s tou výjimkou, že se konečný produkt nevytloučí z roztoku. UV spektrum získané látky v roztoku je charakterizován následujícími parametry $\lambda_{\max} = 265,8 \text{ nm}$, $E_{265,8} = 10050 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Molekulová hmotnost získané látky v roztoku činí $6,2 \cdot 10^6 \text{ D}$. Získaná látka má identické ~~stax~~ chemické složení jako látka z příkladu 4.

Příklad 6

Vedení procesu je analogické jako v příkladu 4 s tou výjimkou, že se jako nativní DNS použije nativní DNS s molekulovou hmotností $9,6 \cdot 10^6 \text{ D}$. Získá se produkt s molekulovou hmotností $5,9 \cdot 10^6 \text{ D}$, jehož UV spektrum je charakterizováno následujícími parametry $\lambda_{\max} = 265,7$, $E_{265,7} = 9990 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Získaná látka má identické chemické složení jako látka získaná v příkladu 4.

Příklad 7

K roztoku citrátové soli / 15 mmolů/l chloridu sodného + 1,5 mmolů/l citrátu sodného ve vodě /, který obsahuje 500 mg nativní DNS s molekulovou hmotností $10,6 \cdot 10^6 \text{ D}$ ve 375 ml roztoku, který byl zahřát na teplotu tání nativní DNS / $78,0 \text{ }^\circ\text{C}$ /, přidá se 675 mg cis-dichlorodiamino -

platnaté sloučeniny ve 375 ml analogického roztoku citrátové soli, která se zahřeje na stejnou teplotu. Reakční směs se nechá stát 15 minut při stejné teplotě a za míchání, potom se ochladí na teplotu místnosti a přerušuje se lyofilní sušením. Získá se 1,8 g lyofilizátu, který představuje směs nárokované sloučeniny III, chloridu sodného a citrátu sodného. K 250 mg lyofilizátu se přidá 50 ml destilované vody a pečlivě se promíchá. Vyloučená suspenze se odstředí při teplotě místnosti rychlostí otáček 7000 o/min během 15 minut. Roztok se ze sráženiny zdekantuje, sráženina se promyje vodou, ethylalkoholem, ethyletherem a usuší na vzduchu. Získá se 90 mg /60 % teorie / čistého poly {hexakis[chloroaminoakvaplatnato]}_n-~~2~~-desoxyribonukleátu ve formě jemně krystalického tmavě žlutého prášku, který je ve vodě omezeně rozpustný, s parametry UV spektra 0,05% roztoku ve vodě, která obsahuje 18 mmolů/l chloridu sodného a 1,8 mmolů/l citrátu sodného $\lambda_{\max} = 266,2 \text{ nm}$, $E_{266,2} = 10000 \text{ l. mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, molekulová hmotnost činí $6,2 \cdot 10^6 \text{ D}$.

Nalezeno, %: Pt 39,81, Cl ; 7,40 ; C 15,62; N 10,11;
H 2,88 ; P 4,33 . $\text{C}_{39}\text{H}_{79}\text{O}_{38}\text{N}_{21}\text{Cl}_6\text{P}_4\text{Pt}_6$
Vypočteno, %: Pt 39,58 ; Cl 7,21 ; C 15,88 ; N 9,95 ;
H 2,67 ; P 4,19.

Příklad 8

Vedení procesu probíhá analogicky jako v příkladu 7 s tou výjimkou, že se konečný produkt z reakční směsi nevyloučí. UV spektrum získané látky v roztoku je charakterizováno následujícími parametry: $\lambda_{\max} = 266,2 \text{ nm}$, $E_{266,2} = 10100 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Jeho molekulová hmotnost je ~~stejná~~ rovná $5,9 \cdot 10^6 \text{ D}$. Chemické složení získané látky je identické se složením látky získané v příkladu 7.

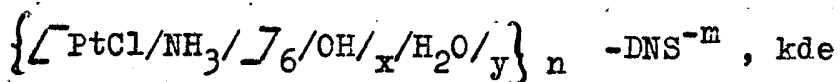
Příklad 9

Vedení procesu probíhá analogicky jako v příkladu 7 s tou výjimkou, že se jako nativní DNS použije nativní DNS s molekulovou hmotností $9,6 \cdot 10^6 \text{ D}$.

Získá se produkt s molekulovou hmotností $6,0 \cdot 10^6 \text{ D}$ a UV spektrem, které je charakterizováno $\lambda_{\max} = 266,2 \text{ nm}$, $E_{266,2} = 10020 \text{ l} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Chemické složení získané látky je identické s chemickým složením látky získané v příkladu 7.

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

Způsob výroby derivátů dvojmocné platiny s polyaniontem desoxyribonukleové kyseliny obecného vzorce



$$\text{DNS}^{-m} = \text{C}_{39} \text{H}_{55-r} \text{O}_{32} \text{N}_{15} \text{P}_4 \text{ }^{-m}, \quad n = 2000 \pm 200,$$

$$\text{při } x = 0, y = 12, m = 6n, r = 6,$$

$$\text{při } x = 2, y = 10, m = 4n, r = 4,$$

$$\text{při } x = 0, y = 6, m = 6n, r = 6,$$

vyznačující se tím, že se reakce desoxyribonukleové kyseliny s molekulovou hmotností, která není nižší než 8 milionů daltonů, s cis-dichloroplatnatou sloučeninou nebo s částečně hydrolyzovanou cis-dichlorodiaminoplatnatou sloučeninou provádí ve vodném prostředí, popřípadě v pufrálním roztoku s hodnotou pH 7,0 až 7,5 a iontovou silou 0,01 až 0,02 při teplotě, která není nižší než teplota tání kyseliny desoxyribonukleové, s následující izolací ko-