



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K PATENTU

235079
(11) (B2)

(22) Přihlášeno 28 06 79

(21) [PV 4488-79]

(32) (31) (33) Právo přednosti od 29 06 78
(78039/1978) Japonsko

(40) Zveřejněno 31 08 84

(45) Vydáno 15 02 87

(51) Int. Cl.³

A 61 K 39/40

A 61 K 35/74

A 61 K 37/02

(72)

Autor vynálezu

SUGAWARA YUTAKA, OMIYA, YAMAMOTO AKIHIRO, HIGASHIYAMATO,
HANDA MITSUAKI, KAMIFUKUOKA, USAMI HIROKO, SUGINAMI,
OGAWA HARUKI, CHOFU [Japonsko]

(73)

Majitel patentu

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, TOKIO [Japonsko]

(54) Způsob přípravy protinádorové látky

1

Způsob přípravy protinádorové látky rozkladem buněk bakterií patřících do skupiny hemolytických streptokoků spočívající ve fyzikálním rozrušení uvedených buněk, získání ve vodě nerozpustné látky na bázi stěn uvedených buněk, na kterou se ve formě vodné suspenze působí deoxyribonukleázou a ribonukleázou za podmínek dostatečných k úplnému rozkladu kyseliny nukleové a dále se působí pronázou, chymotrypsinem a pepsinem v intenzitě a za podmínek dostatečných k rozkladu proteinu.

Protinádorová látka je nejen tepelně stabilní, ale také má nepatrné zánětlivé vlastnosti způsobující bolest a nízkou pyrogenní účinnost.

2

Vynález se týká způsobu přípravy protinádorové látky rozkladem buněk bakterií patřících do skupiny hemolytických streptokoků.

Bylo zjištěno, že žijící buňky bakterií patřících do hemolytických streptokoků mají určitou účinnost proti rakovině.

Avšak, protože je účinnost velice nestálá, bylo učiněno mnoho pokusů zvýšit její stabilitu. Japonské patenty č. 6699/68, a č. 8871/70, 2034/71 a 2674/71 uvádějí různé schůdné metody, kde žijící buňky bakterií se suspendují ve fyziologickém roztoku obsahujícím antibiotikum, jako penicilin, cefalosporin, cykloserin nebo podobně, zahřívají se při teplotě v rozmezí 37 až 45 °C a po přidání vhodného stabilizátoru k suspenzi se lyofilizují a získá se suchý přípravek.

Ačkoliv tyto přípravky projevují protinádorovou účinnost, mají nedostatek pro farmaceutickou přípravu v tom, že způsobují bolest na místě, kde se podávají pacientovi, mají zánětlivé vlastnosti a vyvolávají u pacienta po podání přechodnou horečku.

Na druhé straně byly studovány různé metody extrakce protinádorových látek z buněk bakterií patřících do hemolytických streptokoků. Japonský patent číslo 1647/63 uvádí způsob, který zahrnuje rozrušení buněk, aby se získala látka plovoucí na povrchu, přidání organického rozpouštědla a shromáždění vysrážené antibiotické látky. Dále uveřejňuje japonský patent č. 43841/73 způsob, který zahrnuje rozrušení nebo rozklad buněk, aby se získala látka plovoucí na povrchu a shromáždění účinné látky jako frakce obsahující 50 až 80 % nasyceného roztoku síranu amonného. Tyto protinádorové látky získané z ve vodě rozpustných frakcí jsou hlavně tvořeny proteiny a jsou velice nestabilní vůči teplu a mají značně nižší protinádorovou účinnost než přípravky obsahující buňky. Kromě toho mají značné zánětlivé vlastnosti a relativně větší možnost vyvolat při podávání pacientovi horečku nebo bolest.

Také je známa z japonského patentu č. 6090/74 metoda, která zahrnuje účinek rozloženého enzymu na buňky bakterií patřících do hemolytických streptokoků a získání účinné látky ve vodě nerozpustné z rozkladného roztoku. Tento typ látky zahrnuje hlavně protoplasmickou membránu buněk a nemá v podstatě zánětlivé vlastnosti, pyrogenní účinnost a vlastnosti způsobující bolest. Avšak tato látka s protinádorovým účinkem je nestabilní vůči teplu.

Během výzkumu bylo zjištěno, že látky, které se získaly fyzikálním rozrušením buněk bakterií patřících do skupiny hemolytických streptokoků k získání ve vodě nerozpustné frakce obsahující hlavně složky stěn buněk, na kterou se působilo nukleázou nebo proteázou, mají nepatrné zánětlivé vlastnosti a vlastnosti způsobující bolest.

Předmětem vynálezu je proto způsob přípravy protinádorové látky rozkladem buněk

patřících do skupiny hemolytických streptokoků, který se vyznačuje tím, že se uvedené buňky bakterií fyzikálním způsobem rozruší, získá se ve vodě nerozpustná látka na bázi složek stěn uvedených buněk, na kterou se ve formě vodné suspenze působí deoxyribonukleázou a ribonukleázou za podmínek dostatečných k úplnému rozkladu kyseliny nukleové a dále se působí pronázou, chymotrypsinem a pepsinem v intenzitě a za podmínek dostatečných k rozkladu proteinu.

Na ve vodě nerozpustnou látku se působí deoxyribonukleázou v koncentraci 0,01 až 0,25 mg/ml a ribonukleázou v koncentraci 0,001 až 0,015 mg/ml při teplotě 25 až 39 °C po dobu 2 až 5 hodin a potom pronázou E v koncentraci 0,1 až 1,5 mg/ml, chymotrypsinem v koncentraci 0,05 až 0,65 mg/ml a pepsinem v koncentraci 0,0002 až 0,005 mg/mlilitru při teplotě 25 až 39 °C po dobu 2 až 24 hodiny.

Vynález bude detailněji objasněn v následujícím. Buňky bakterií patřících do hemolytických streptokoků jako *Streptococcus pyogenes* Su kmen, *Streptococcus pyogenes* C 203 S kmen, *Streptococcus pyogenes* S-43 kmen *Streptococcus pyogenes* Blackmore kmen nebo *Streptococcus equisimilis*, které se získají kultivací, se suspendují ve vhodném solném roztoku, jako fyziologickém roztoku nebo podobně, nebo v destilované vodě, a rozruší se fyzikálním způsobem, například použitím sonikátoru buňkového homogenizátoru nebo podobně, nebo rozmělněním za přítomnosti práškovitého kyslíčníku hlinitého ve hmoždíři. Suspenze rozrušených buněk se odstředí nejprve při nízké rychlosti otáčení, aby se odstranily nerozrušené buňky jako sraženina a potom látka plovoucí na povrchu se opět odstředí při vysoké rychlosti otáčení. Získaná sraženina se potom odstraní a promyje vhodným solným roztokem nebo destilovanou vodou a působí se proteázou, jako proteinázou, trypsinem, pepsinem, nagarsou nebo podobně a opět se promyje vhodným solným roztokem nebo destilovanou vodou. Takto získaný materiál obsahuje složky stěn buněk, které se mohou použít jako protinádorový přípravek suspendováním ve vhodném prostředí. Materiál se však musí čistit pomocí deoxyribonukleázy a ribonukleázy a popřípadě se dále čistí metodou gradientu hustoty sacharózy.

Působení nukleázou nebo proteázou podle vynálezu se výhodně provádí za optimálních podmínek pro použitý specifický enzym. Například se suspenduje substrát a enzym ve vhodném pufru, jako fosfátu nebo směsi glycin-kyselina chlorovodíková, aby se pH upravilo na optimální hodnotu pro enzym a zahřívá se asi při 37 °C po dobu v rozmezí několika hodin až několika desítek hodin. Protinádorová látka se získá jako směs peptidů.

Protinádorová látka získaná způsobem podle vynálezu, například podle způsobu popsaného v příkladu 1, je šedě bílý prášek a podle elementární analýzy má následující složení:

7,31 % N, 42,97 % C, 5,64 % H.

Vzorek podle vynálezu se suspenduje ve fyziologickém roztoku při koncentraci 30 miligramů na mililitr a stanoví se ultrafialové spektrum. Výsledky jsou uvedeny jako graf na obr. 1, kde na svislé ose je uvedena absorpce a na vodorovné ose vlnová délka (nm).

Na obr. 2 je uveden graf znázorňující infračervené absorpční spektrum za použití 2 mg vzorku podle vynálezu a KBr tablet. Na svislé ose je uvedena propustnost (v %) a na vodorovné ose vlnová délka (naše v μm a dole v cm^{-1}).

Látka je proteinem kombinovaným s polysacharidy obsahujícími rhamnózu, hexosamin a další. Výsledky analýzy chemického složení jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1

Složka	Obsah* (%)
rhamnóza	33,3
hexosamin	12,7
protein	16,7
celkové lipidy	0,2
RNA	0
DNA	0

*Obsah rhamnózy byl stanoven Cibbonovou metodou, hexosamin metodou Elson-

-Morgan, protein Lauryho metodou, celkové lipidy metodou zahrnující extrakci směsí chloroform-methanol (3:1) a zvážení suchého extraktu, RNA reakcí orcinu a DNA reakcí indolu.

Ačkoliv je protinádorová látka podle vynálezu stabilní vůči teplu a může se skladovat po dlouhou dobu ve formě suspenze, může se na rozdíl od přípravků obsahujících buňky hemolytických streptokoků suspendovat ve vhodném prostředí a potom lyofilizovat.

Vynález bude dále objasněn v následujících pokusech a příkladech, aniž by omezoval rozsah vynálezu.

Pokus 1

180 nádorových buněk Sarcoma se subkutánně naočkuje do tříselné oblasti samečka myši ICR (4 týdny starého) v množství 3×10^6 buněk na myš. Dvacet čtyři hodiny po naočkování se každé myši vpíchnou každý den po 4 dny subkutánně do břicha injekce protinádorového přípravku podle vynálezu, přípravek podle vynálezu, který se zahříval 30 minut při 90 °C nebo přípravek označený jako OK-432, byl pozitivní kontrola. Přípravek OK-432 byl připraven působením penicilinu na buňky *Streptococcus pyogenes* Su kmen a lyofilizací; 14 dní po naočkování nádorových buněk byl vyrostlý nádor každé myši vyříznut a zvážen. Jako kontrola se použil místo výše uvedeného přípravku fyziologický roztok.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Typ přípravku	Dávka $\mu\text{g}/\text{myš}$	Počet zkoušených (hlav) zvířat	Průměrná hmotnost nádoru (mg)	Potlačení (%)
Přípravek podle příkladu 1	3,6	10	567	47,3
Přípravek podle příkladu 2	3,2	10	613	43,1
Přípravek podle příkladu 3	3,0	10	658	38,9
Přípravek podle příkladu 4	2,7	10	635	41,0
Přípravek podle příkladu 1 zahřívaný 30 minut při 90 °C	3,6	10	600	44,2
OK-432	50,0	10	554	48,5
Fyziologický roztok	—	10	1076	—

*Dávka každého přípravku odpovídá množství připravenému z 50 μg suchých buněk.

Jak jasně vyplývá z tabulky 2, byla protinádorová účinnost přípravků podle vynálezu většinou ekvivalentní účinnosti přípravku OK-432 a přípravek podle vynálezu byl stabilní vůči teplotě.

Pokus 2

Nádorové buňky mastocytoma P-815 se subkutánně naočkují do tříselné oblasti samečka myši BDF₁ (5 týdnů starého, 10 myší na zkušební skupinu) v množství $2,5 \times 10^4$

buněk na myš. Dvacetčtyři hodiny po naočkování se každé myši každý den po 4 dny podá intravenózně protinádorový přípravek získaný podle příkladu 1 nebo přípravek OK-432 jako pozitivní kontrola. Byla měřena rozměrová změna nádoru nad kůží s průběhem času a zaznamenávána v termínech nejdelší průměr $\times$ nejkratší průměr. Jako kontrola se použil místo přípravku fyziologický roztok.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 3.

Tabulka 3

Typ přípravku	Dávka ($\mu\text{g}/\text{myš}$)	Rozměr nádoru			
		15 dní po		23 dní po	
		Průměr $\pm$ $\pm$ S. E. ^{xxx}	Potlačení (%)	Průměr $\pm$ $\pm$ S. E.	Potlačení (%)
Přípravek podle příkladu 1	14,4 ^x	4,0 $\pm$ 3,7	41	6,9 $\pm$ 5,1	44
	7,2 ^{xx}	4,4 $\pm$ 2,5	35	4,7 $\pm$ 4,1	61
OK-432	100 ^x	2,6 $\pm$ 2,5	62	5,0 $\pm$ 3,3	59
Fyziologický roztok	—	6,8 $\pm$ 0,3	—	12,3 $\pm$ 2,7	—

^xDávka odpovídá množství připravenému z 200 μg suchých buněk

^{xx}Dávka odpovídá množství připravenému z 100 μg suchých buněk

^{xxx}S. E.: standardní chyby

Z údajů v tabulce 3 je jasné, že přípravek získaný v příkladu 1 také projevuje pozoruhodnou protinádorovou účinnost proti nádoru P-815.

Pokus 3

V tomto pokuse byl potvrzen silný účinek protinádorového přípravku podle vynálezu pro zesílené vyvolání imunity proti leukémii způsobené buňkami L 1210 u myši. Suspenze buněk L 1210 (6×10^7 buněk/mililitr) se smíchá s ekvivalentním objemem 8 mM roztoku jodoacetátu sodného a nechá se stát 20 minut při 37 °C, aby se získaly upravené buňky (označeno IA-L 1210). Samičky myši BDF₁ (8 týdnů staré) se roz-

dělí do skupin po 5 členech a subkutánně se vpíchne injekce buněk IA-L 1210 v množství 5×10^6 na myš (první sensibilace) a 10 dní po první sensibilaci se injekce opakuje (další sensibilace). Pokusným myším se podá subkutánně dvakrát ve stejnou dobu jako první a další sensibilace přípravek podle vynálezu nebo OK-432 jako pozitivní kontrola. Pět dní po další sensibilaci se pokusným myším subkutánně naočkují přírodní buňky 1210 v množství 10^4 buněk/myš a pozoruje se procento přežitých.

Jako kontrola se podá jedné skupině myši pouze IA-L 1210 a druhá skupina myši se nesensibiluje.

Výsledky jsou uvedeny v tabulce 4.

Tabulka 4

Sensibilace (dvakrát)	Typ přípravku (Celková dávka mg/hlava $\times$ 2)	Průměr přežitých dní	ILS ^x (%)	Počet přežitých zvířat 40 dní po naočkování L 1210
IA-L 1210	Přípravek podle příkladu 1 (7,2)	38,8	62	4
	Přípravek podle příkladu 1 (7,2)	37,4	56	4
	OK-432 (100)	37,6	57	4
	—	25,4	6	1
—	—	24,0	—	0

$$x \text{ ILT} = \frac{T-C}{C} \times 100$$

T = Průměr přežitých dní pro skupinu léčených myší

C = Průměr přežitých dní pro skupinu neléčených myší

Pokus 4

Protinádorový přípravek získaný podle vynálezu pozoruhodně snižuje vlastnosti vyvolávající bolest a zánět ve srovnání s OK-432.

Myším samečkům ICR (5 týdnů starým, deset myší na skupinu) se intraperitoneálně podá přípravek podle vynálezu v dávce 25 μg na myš. Během 60 minut po podání se nepozoruje žádný abnormální pohyb. Naopak projevují myši, kterým byl podán pří-

pravek OK-432 v dávce 100 $\text{mg}/\text{myš}$ na základě hmotnosti suchých buněk, různou hranicí tak zvaného kroučícího se syndromu, zejména kroucení těla nebo napínání zadních nohou, způsobený vyvoláním bolesti.

Na druhé straně se píchne intrakutánně, myším samečkům ICR (5 týdnů starým; 5 myší na skupinu) do hřbetu injekce protinádorového přípravku podle vynálezu v dávce 25 $\mu\text{g}/\text{myš}$ nebo přípravku OK-432 v dávce 100 $\mu\text{g}/\text{myš}$ na základě hmotnosti suchých buněk a 3 hodiny po injekci se intravenózně vpíchne do ocasu 0,5% Evansova modrého roztoku. Třicet minut po injekci barviva se myši usmrtí, kůže injikované části na hřbetě se sloupne a pozoruje se vytékání barviva z této části. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 5.

Tabulka 5

Typ přípravku	Dávka ($\mu\text{g}/\text{hlava}$)	Zvířata s vytékáním barviva (hlava)
		Celkový počet pokusných zvířat (hlava)
Přípravek podle příkladu 1	25	0/5
Přípravek podle příkladu 2	25	0/5
Přípravek podle příkladu 3	25	0/5
Přípravek podle příkladu 4	25	0/5
OK-432	100	5/5

Jak vyplývá z tabulky 5 je vytékání barviva u myší, kterým byl podán přípravek OK-432 pozitivní, zatímco se u myší, kterým byl podán protinádorový přípravek podle vynálezu, nepozoruje vytékání barviva. Tyto výsledky potvrzují slabý zánětlivý účinek přípravku podle vynálezu.

Příklad 1

Streptococcus pyogenes Su-kmen/ATCC 21060] se naočkuje do bujónového prostředí (1500 ml) a kultivuje se 20 hodin. Celá živná půda se potom očkuje v 3% kvasničním extraktu (30 l) a staticky se kultivuje 20 hodin při 37 °C; 3% kvasničný extrakt se připravil rozpuštěním kvasničního extraktu ve vodě, upraveném pH vodným roztokem hydroxidu sodného na 7,4, zahříváním roztoku po dobu jedné hodiny při 100 °C a po ochlazení odstraněním sraženiny filtrací a sterilizací filtrátu párou při 120 °C a tlaku 0,098 MPa po dobu 10 minut. Živné prostředí se ochladí ledem a buňky v živném prostředí se za chlazení odstředí, promyjí dvakrát studeným fyziologickým roztokem a suspendují se v BBM, jehož složení je 675 mililitrů maltózy, 6 ml 20% vodného roztoku KH_2PO_4 majícího pH 6,9 až 7,0 upravené hydroxidem sodným, 12 ml 2% vodného roztoku $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ a 66 ml destilované vody. Suspenze se smíchá s 180 g jemných skleněných částic o průměru 0,1

mililitru a po rozdělení na 6 alikvotních částí se každá alikvotní část směsi homogenizuje v buňkovém homogenizátoru asi při 4000 otáčkách za minutu po dobu 5 minut, aby se rozrušily buňky. Výsledná suspenze se dekantuje, aby se odstranila většina skleněných částic a odstřeďuje se 10 minut při 1500 otáčkách za minutu, aby se odstranily skleněné částice a nerozrušené buňky. Látka plovoucí na povrchu se opět 30 minut odstřeďuje při 13 000 otáčkách za minutu a sraženina se odstraní, promyje dvakrát studeným fyziologickým roztokem a suspenduje se v 300 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0). Suspenze se zahřívá 15 minut při 95 °C a po ochlazení se odstřeďuje 10 minut při 1000 otáčkách za minutu. Látka plovoucí na povrchu se opět 30 minut odstřeďuje při 13 000 otáčkách za minutu a výsledná sraženina se suspenduje v 300 ml 50 mM fosfátového pufru. K suspenzi se přidá 15 mg deoxyribonukleázy (820 Knits-jednotek/mg) a 3 mg ribonukleázy (67 Knits-jednotek/mg) a směs se inkubuje 2 hodiny při 37 °C. Potom se směs odstřeďuje 30 minut při 13 000 otáčkách za minutu a výsledná sraženina se shromáždí, suspenduje ve 300 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) a po přidání 90 mg pronázy -E se inkubuje 24 hodiny při 37 °C.

Reakční směs se 30 minut odstřeďuje při 13 000 otáčkách za minutu a sraženina se

suspenduje v 300 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) a po přidání 39 mg krystalického chymotrypsinu se inkubuje 2 hodiny při 37 °C. Směs se odstřeďuje 30 minut při 13 000 otáčkách za minutu. Sraženina se odstraní, suspenduje v 300 ml 0,2 M glycin-HCl pufru (pH 2,0) a po přidání 30 mg pepsinu se inkubuje 2 hodiny při 37 °C. Směs se odstřeďuje 30 minut při 13 000 otáčkách za minutu. Výsledná sraženina se suspenduje ve 28 ml 5 mM fosfátového pufru. Vrstvy sacharózy vodných roztoků (každá 4 ml), které mají rozdílnou hustotu 1,30, 1,25, 1,15 nebo 1,10, se umístí do odstředivkové zkumavky o objemu 40 ml ode dna k vrcholku a potom se umístí 4 ml vrstvy výše připravené suspenze na vrcholek vrstev sacharózových roztoků. Po 70minutovém odstředění při 3000 otáčkách za minutu se střední vrstvy odstraní pipetou a odstřeďují 30 minut při 13 000 otáčkách za minutu. Sraženina (0,63 g jako suchý základ) se shromáždí a promyje dvakrát odstředěním s 50 mM fosfátovým pufrům (pH 7,0), potom se suspenduje ve 100 ml 50 mM fosfátového pufru (pH 7,0) a získá se protinádorový přípravek.

Příklad 2

Opakuje se příklad 1 s rozdílem, že se použije *Streptococcus pyogenes* C 203 S kmen (ATCC 821546) místo Su kmene a získá se

protinádorový přípravek (0,56 g jako suchý základ).

Příklad 3

Opakuje se příklad 1 s rozdílem, že se použije *Streptococcus pyogenes* S-43 kmen (ATCC 21547) místo Su kmene a získá se protinádorový přípravek (0,53 g jako suchý základ).

Příklad 4

Opakuje se příklad 1 s rozdílem, že se použije *Streptococcus pyogenes* Blackmore kmen (ATCC 21548) místo Su kmene a získá se protinádorový přípravek (0,47 g jako suchý základ).

Příklad 5

Opakuje se příklad 1 s rozdílem, že se použije *Streptococcus equisimilis* (uložený s ATCC pod skupinou C *Streptococcus* sp. ATCC 21597) místo Su kmene a získá se protinádorový přípravek (0,54 g jako suchý základ).

Pro úplnou specifikaci protinádorové látky jsou v následujícím uvedeny pro příklady 1 až 5 výsledky aminokyselinové analýzy a analýzy dalších složek.

I — Aminokyselinová analýza, výsledky jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1
moly/mg stěn buněk (%)

asparagin	8,6	0,03
threonin	7,3	0,03
serin	14,3	0,05
kyselina muramová	117,8	0,43
kyselina glutamová	273,4	1,00
glycin	24,2	0,09
alanin	1095,2	4,01
valin	12,9	0,05
methionin	—	—
isoleucin	7,5	0,03
leucin	12,1	0,04
tyrosin	—	—
glukosamin	579,6	2,12
galaktosamin	—	—
ornithin	7,5	0,03
lysin	299,2	1,09
NH ₂	1031,7	3,77
histidin	8,2	0,03
arginin	8,3	0,03

II. Analýza dalších složek

Metody kvantitativní analýzy následujících složek jsou uvedeny níže.

1. Obsah proteinu:

Obsah proteinu byl stanoven metodou podle Loweryho a dalších.

2. Obsah celkového hexosaminu:

Vzorek se hydrolyzoval ve 3 N HCl po dobu 4 hodin ve vroucí vodní lázni a celkové množství hexosaminu se stanovilo metodou podle „Protein, Nucleic Acid, Enzyme“, sv. 14, č. 11 (1969) uveřejněno v Japonsku str. 1015 až 1016.

3. Obsah fosforu:

Vzorek se přeměnil v popel působením kyseliny sírové a kyseliny chloristé, podrobil se barevnému vyvolání za použití molybdenanu amonného a kyseliny askorbové a potom se provedlo stanovení (Lowry a další, J. B. C. sv. 207, str. 1 až 17 /1954/).

4. Obsah glycerinu a rhamnózy:

Analýza se provedla metodou založenou na Alditolové metodě plynové chromatografie cukru (Koso Seikagaku Jikken-ho/

/základní biochemické pokusy/) č. 5, vydal Maruzen Co., Ltd., Japonsko, hl. 4.3 — polysacharidy.

Vzorek se hydrolyzoval ve 2 N HCl při 100 °C po dobu jedné hodiny, sušil se za sníženého tlaku a redukoval se přes noc pomocí NaBH₄. Potom se přebytek NaBH₄ rozložil kyselinou octovou a odpařil se za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustil v methanolu a destiloval se pro odstranění kyseliny borité. Tato destilace se opakovala několikrát. Potom se přidal ke zbytku pyridin a acetanhydrid (1 : 1) a směs se zahřívala za účelem acetylace 1,5 hodiny při 100 °C a odpařila se za sníženého tlaku do sucha. Zbytek se rozpustil v předem stanoveném objemu chloroformu a analyzoval se chromatografií plyn — kapalina.

Výsledky každé analýzy jsou uvedeny v tabulce 2.

Tabulka 2

Protein (μg/ ml buněk)	Celkový he- xosamin (moly/mg stěn buněk)	glycerin (moly/mg stěn buněk)	fosfor (moly/mg stěn buněk)	(μg/mg stěn buněk)	rhamnóza (moly/mg stěn buněk)	(μg/mg stěn buněk)
391,1	888,7	24,8	250,5	7,76	628,7	103,1
298,7	536,5	10,3	111,7	3,46	448,2	73,5
73,7	1316,5	6,8	234,6	7,07	723,8	118,7

PŘEDMĚT VYNÁLEZU

1. Způsob přípravy protinádorové látky rozkladem buněk bakterií patřících do skupiny hemolytických streptokoků, vyznačený tím, že se uvedené buňky bakterií fyzikálním způsobem rozruší, získá se ve vodě nerozpustná látka na bázi složek stěn uvedených buněk, na kterou se ve formě vodné suspenze působí deoxyribonukleázou a ribonukleázou za podmínek dostatečných k úplnému rozkladu kyseliny nukleové a dále se působí pronázou, chymotrypsinem a pepsinem v intenzitě a za podmínek dostatečných k rozkladu proteinu.

2. Způsob podle bodu 1, vyznačený tím, že se na ve vodě nerozpustnou látku působí deoxyribonukleázou v koncentraci 0,01 až 0,25 mg/ml a ribonukleázou v koncentraci 0,001 až 0,015 mg/ml při teplotě 25 až 39 °C po dobu 2 až 5 hodin a potom pronázou E v koncentraci 0,1 až 1,5 mg/ml, chymotrypsinem v koncentraci 0,05 až 0,65 mg/mililitru a pepsinem v koncentraci 0,0002 až 0,005 mg/ml při teplotě 25 až 39 °C po dobu 2 až 24 hodiny.



