

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 875220 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS**
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application 875220

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
A61K 37/02
C12N 15/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date 26.11.1987

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date 26.11.1987

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public 27.05.1988

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date 12.06.2019

(32) (33) (31) Etuoikeus - Prioritet - Priority

26.11.1986 US 935509

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 •Cornell Research Foundation, Inc., East Hill Plaza, Ithaca New York, TOWN UNKNOWN, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Rockefeller University, 1230 York Avenue, New York New York, United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 •Gabay, Joelle E., United States, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 •Nathan, Carl F., USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Mikrobeja tuhoavia proteiineja, niitä sisältäviä koostumuksia ja niiden käyttö.

Mikrober förhärjande proteiner, sammansättningar som innehåller dem och deras användning.

Mikrobeja tuhoavia proteiineja, niitä sisältäviä seoksia ja niiden käyttötapoja

Tämä keksintö tehtiin hallituksen tuella seuraavien apurahojen turvin: CA 22090 ja CA 43610 (National Cancer Institute) ja AI 07012 ja AI 20516 (U.S. Public Health Service). USA:n hallituksella on tiettyjä oikeuksia tähän keksintöön.

Tässä patenttihakemuksessa viitataan useisiin julkaisuihin käyttämällä sulkeissa olevia arabialaisia numeroita. Nämä viitteet löytyvät täydellisinä tämän selostuksen lopusta, väliittömästi ennen patenttivaatimuksia. Julkaisut sisällytetään tähän patenttihakemukseen täydellisinä viitteiksi, jotta tekniikan taso, johon esillä oleva keksintö liittyy, selviää tarkemmin.

Granulosyytit ovat avainkomponentteja vähintään kahdessa mikrobi-infektioita vastaan kohdistuvassa isännän puolustusjärjestelmässä. Toisessa näistä järjestelmistä polymorfonukleaariset leukosyytit (PMN:t) tuottavat reaktiivisia happiväli tuotteita, jotka tuhoavat tunkeutuvat mikro-organismit suoraan tai epäsuorasti. Toinen systeemi riippuu mekanismeista, jotka ovat respiratorisesta purkauksesta riippumattomia (1 - 3). Neutrofiiliperäisten proteiinien on pitkään katsottu olevan tämän respiratorisesta purkauksesta riippumattoman mikrobisidisen reitin komponentteja (4 - 6). Eräs molekyyli sisältää pienten (alle 4 kD) ihmisen antibioottisten neutrofiili-peptidien, nimeltään defensiinit, joukko on sekventoitu ja paikannettu immunohistokemiallisesti atsurofiilisiin jyväsiin (7). Nämä peptidit osoittavat in vitro-olosuhteissa bakteereita, sieniä ja viruksia tuhoavia ominaisuuksia, jotka riippuvat suurella määrällä monista tekijöistä, joista mainittakoon mm. pH, ionivahvuus ja kalsium- tai magnesiumkonsentraatio. Lisäksi on niin, että näiden peptidien vaikutustapa ja niiden

varsinainen osuus mikrobeja tuhoavassa toiminnassa in vivo ovat kiistelyjen kohteena.

Esillä oleva keksintö tarjoaa ainekoostumuksen, jota voidaan käyttää mikrobeja tuhoavana aineena. Tämä ainekoostumus sisältää vähintään kahta polypeptidiä, jotka valitaan ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidien joukosta, joiden näennäiset molekyylimassat ovat noin 3 500 daltonia, noin 13 000 daltonia, noin 18 000 daltonia, noin 29 000 daltonia ja noin 54 000 daltonia. Ainekoostumuksella on respiratorisesta purkauksesta riippumaton mikrobeja tuhoava vaikutus bakteereihin ja sieniin pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0, kalsiumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 10 mmoolia/l, jolloin bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridipitoisuuden ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l ja fungisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridipitoisuuden ollessa korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös menetelmän mikrobeja tuhoavana aineena käyttökelpoisen ainekoostumuksen valmistamiseksi. Oleellisesti ottaen tässä menetelmässä erotetaan verestä polymorfonukleaariset leukosyytit niin, että saadaan polymorfonukleaaristen leukosyyttien suhteen rikastettu valmiste. Tämä polymorfonukleaaristen leukosyyttien suhteen rikastettu valmiste suspendoidaan sopivaan puskuriin, saatu suspensio käsitellään sopivalla proteaasien inhibiittorilla ja suspendoituneet solut käsitellään lysointiolosuhteissa niin, että saadaan lysoituneiden leukosyyttien suspensio. Lysoituneiden leukosyyttien suspensio käsitellään sopivalla ke-latointiaineella ja sen jälkeen näin käsitelty suspensio sentrifugoidaan, jotta saadaan tumien ja rikkoutumattomien solujen muodostama faasi ja tumienulkoisen emäliuos. Tumienulkoisen emäliuos otetaan talteen ja fraktioidaan tiheysgradientissa ja atsuromiilijyvässet sisältävä jae otetaan talteen ja suspendoidaan puskuriin, jonka pH on noin 7,0. Näin saatu atsuromiilijyvässuspensio käsitellään reagenssilla, jonka pH

on alle noin 8,0, ja joka kykenee liuottamaan atsuofiilikalvon proteiinit. Käsitelty suspensio erotetaan kiinteään faasiin ja emäliuokseen ja sen jälkeen emäliuos otetaan talteen. Viimeksimainittu on mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi sopiva ainekoostumus.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös puhdistetun polypeptidin, joka kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka ennustettu molekyylimassa on 24 823 daltonia, ja jonka aminohappojärjestys on esitetty kuvassa 20, tai kyseessä on tämän fragmentti.

Lisäksi esillä oleva keksintö tarjoaa toisen puhdistetun polypeptidin, jota voidaan käyttää mikrobeja tuhoavana aineena. Tämä polypeptidi kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 18 000 daltonia.

Edelleen keksintö tarjoaa mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan puhdistetun polypeptidin, joka kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 54 000 daltonia. Polypeptidillä on respiratorisesta purkauksesta riippumatonta bakteereita tuhoavaa aktiivisuutta pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0, kun kalsiumionikonsentraatio on korkeintaan 10 mmoolia/l ja natriumkloridikonsentraatio korkeintaan noin 0,3 moolia/l.

Edelleen keksintö tarjoaa mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan puhdistetun polypeptidin, joka kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 29 000 daltonia, ja jolla on respiratorisesta purkauksesta riippumatonta bakteereita ja sieniä tuhoavaa aktiivisuutta pH-alueella noin 5,0 - 8,0, kun kalsiumionikonsentraatio on korkeintaan noin 10 mmoolia/l, niin, että bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraatioissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,3 moolia/l.

lia/l, ja fungisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraatioissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Edelleen keksintö tarjoaa mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan puhdistetun polypeptidin. Tämä polypeptidi kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 25 000 daltonia. Tällä polypeptidillä on respiratorisesta purkauksesta riippumattonta bakteereita ja sieniä tuhoavaa aktiivisuutta pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0, kun kalsiumionikonsentraatio on korkeintaan noin 10 mmoolia/l, jolloin bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l ja fungisidinen vaikutus on voimassa natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Kuvioiden lyhyt selostus

Kuvio 1. Bakterisidisen aktiivisuuden sijoittuminen ihmisen neutrofiilisolujen eri alayksiköihin

(A) Atsurofiilisten jyvästen (myeloperoksidaasi), spesifisten jyvästen (vitamiinia B12 sitova proteiini) ja solukalvon (emäsfosfataasi) sijoittuminen.

(B) Bakterisidisen aktiivisuuden profiili. Kukin jae käsiteltiin uuttamalla 0,05 M glysiini-HCl-puskurilla, pH 2,0, sentrifugoimalla kiihtyvyydellä 10 000 x g 20 minuuttia ja inkuboimalla emäliuosta E. coli K12:n kanssa proteiinipitoisuuden ollessa 5 mikrogrammaa/ml. Tässä on esitetty se prosentuaalinen osuus bakteereista, jotka kuolivat inkuboitessa 37 C:ssa 30 minuuttia. Ikkunassa (C) on esitetty se määrä atsurofiilistä jyväsistä (●) tai spesifisistä jyväsistä (Δ) puhdistettua proteiinia, joka oli tarpeen saamaan aikaan 50 % vähennemisen bakteerin pesäkkeidenmuodostusyksiköissä (LD₅₀).

Kuvio 2. HL60-solujen tumienulkoisesta emäliuoksesta Percoll-gradientilla saadut bakterisidien ja fungisidisen aktiivisuuden profiilit

(---) = sameus (OD_{450});

Mustat pylvää = bakterisidisen aktiivisuuden profiili;

vinoviivoitetut pylvää = fungisidisen aktiivisuuden profiili.

Kuvio 3. Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) yhteys kalvoon

Relaksointipuskurissa (pH 7,3, ks. käytännön toteutus esimerkejä) olevat eristetyt atsurofiiliset jyväsrikotettiin jäädytys-sulatusmenetelmällä, johon oli yhdistetty sonikointi, ja sentrifugoimalla. Emäliuos (■), pelletoitunut materiaali (●) ja kokonaiset jyväsrikot (▲) uutettiin pH-arvossa 2,0 ja uuteteista tutkittiin bakterisidinen aktiivisuus.

Kuvio 4. pH:n vaikutus bakterisidisen tekijän uuttumiseen atsurofiilisten jyväsrikotien kalvoista

Atsurofiilikalvoerät lisättiin eri puskurisysteemeihin: (0,05 M): glysiini, pH 2,0 - 3,0; sitraatti, pH 4,0 - 6,0; fosfaatti, pH 7,0. Kun oli inkuboitu 25 °C:ssa 40 minuuttia, suspensiot sentrifugoitiin kiihtyvyydellä 10 000 x g (20 minuuttia) ja emäliuosten proteiinipitoisuus ja bakterisidinen aktiivisuus määritettiin. Yksi tappava yksikkö (KU) vastaa sen mikrogrammaa/ml-arvon käänteisarvoa, joka tarvitaan tappamaan 10⁵ bakteeria 30 minuutissa 37 °C:ssa. Jokaisessa tapauksessa bakterisidisuusmäärittäminen suoritettiin 0,05 M sitraattipuskurissa, pH 5,5.

Kuvio 5. Atsurofiilisisistä jyväsrikotista saadun uutteen bakterisidinen aktiivisuus kasvavissa bakteerikonsentraatioissa

Jyväsuoite valmistettiin toteutus-esimerkeissä kuvatulla tavalla. 30 mikrogrammaa/ml (●), 3 mikrogrammaa/ml (Δ), 0,3 mikrogrammaa/ml (□) tai 0,03 mikrogrammaa/ml (▲) atsuofiiliuutetta lisättiin kuhunkin testattavaan bakteerikonsentraatioon.

Kuvio 6. Atsuofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän bakterisidisen aktiivisuuden kinetiikka

$E. coli$ K12-soluja (2×10^5 CFU/ml) inkuboitiin 1,4 mikrogramman/ml (●) tai 0,7 mikrogramman/ml (Δ) kanssa atsuofiilisten jyväsien uutetta 0,05 M sitraattipuskurissa pH 5,5 tai pelkässä sitraattipuskurissa (■).

Kuvio 7. pH:n vaikutus atsuofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän bakterisidiseen aktiivisuuteen

$E. coli$ K12-soluja ($2,5 \times 10^5$ CFU/ml) inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa 2,8 mikrogramman/ml (●) tai 0,7 mikrogramman/ml (Δ) kanssa atsuofiilistä jyväsistä saatua uutetta sitraattipuskurissa pH 5 ja 5,5 ja natriumfosfaatti- tai natriumfosfaatti-sitraattipuskurissa pH 6,0 tai 8,0.

Kuvio 8. pH:n vaikutus HL60-soluista johdetun bakterisidisen tekijän (BF) bakterisidiseen aktiivisuuteen

$E. coli$ K12-soluja (2×10^5 CFU/ml) inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa 1,25 mikrogramman/ml (●) tai 0,625 mikrogramman/ml (■) kanssa HL60-solujen epäpuhdasta jyväsuoitetta 50 mM sitraattipuskurissa pH 5, 5,5 ja 6 ja 50 mM tris-HCl-puskurissa, pH 7 ja 8.

Kuvio 9. Ca^{2+} -ionien vaikutus atsuofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän bakterisidiseen aktiivisuuteen

E. coli K12-soluja ($2,5 \times 10^5$ CFU/ml) inkuboitiin 30 minuuttia 37°C :ssa 1,8 mikrogramman/ml kanssa atsurofiilisisistä jyväsistä saatua jyväsuetta 0,05 M sitraattipuskurissa pH 5,5, johon oli lisätty täydennykseksi kuviosta ilmenevät määrät CaCl_2 .

Kuvio 10. Ca^{2+} -ionien vaikutus HL60-soluista johdetun bakterisidisen tekijän (BF) bakterisidiseen aktiivisuuteen

E. coli K12-soluja (2×10^5 CFU/ml) inkuboitiin 30 minuuttia 37°C :ssa 1,25 mikrogramman/ml kanssa HL60-soluista saatua epäpuhdasta jyväsuetta 0,5 M sitraattipuskurissa pH 5,5, johon oli lisätty täydennykseksi kuviosta ilmenevät määrät CaCl_2 .

Kuvio 11. Natriumkloridipitoisuuden vaikutus atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän bakterisidiseen aktiivisuuteen

E. coli K12-soluja ($2,5 \times 10^5$ CFU/ml) inkuboitiin 30 minuuttia 37°C :ssa 2,8 mikrogramman/ml (●) tai 1,4 mikrogramman/ml (■) kanssa atsurofiilisisistä jyväsistä saatua uutetta 0,05 M sitraattipuskurissa, pH 5,5, johon oli lisätty täydennykseksi natriumkloridia kuviosta ilmenevät määrät. Nuoli osoittaa plasman natriumkloridipitoisuutta.

Kuvio 12. ADBF:n fungisidinen aktiivisuus eri ajankohtina ja eri pitoisuuksina

(■) = 1,6 mikrogrammaa ADBF/ml

(△) = 3,2 mikrogrammaa ADBF/ml

(□) = 8 mikrogrammaa ADBF/ml

(○) = 16 mikrogrammaa ADBF/ml

(●) = kontrolli

Kuvio 13. ADBF:lle suoritettu käänteisfaasi-HPLC-analyysi

Käänteisfaasi-HPLC-analyysi suoritettiin toteutus-esimerkki-osassa kuvatulla tavalla. Pylvästä seurattiin aallonpituudella 214 nm (0,5 AUFS;) (engl. absorpitiyon units full scale, täyden skaalan absorptioyksikköä). Määrittämistä varten 100 mikrolitraa kutakin jaetta kuivattiin Savant Speed-Vac[®]-laitteessa, uudelleensuspendoitiin 100 mikrolitraan 0,1 % etikkahappoa, kuivattiin uudestaan ja suspendoitiin lopuksi 160 mikrolitraan 0,05 M sitraattipuskuria, pH 5,5. Lisättiin 40 mikrolitraa E. coli K12-suspensiota, jotta lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 2×10^5 CFU/ml, ja inkuboitiin 30 minuuttia 37 °C:ssa. Viistotut alueet osoittavat jakeita, joiden alueella tuhoava vaikutus oli 100-prosenttinen. Ikkuna A edustaa epäpuhdasta ADBF:ää; ikkuna B TSK-pylväessä puhdistettua ADBF:ää (50 - 60 kD:n piikki); ja ikkuna C TSK-pylväessä puhdistettua (ADBF:ää (10 - 20 kD:n piikki)).

Kuvio 14. Käänteisfaasi-HPLC:llä puhdistettujen atsurofiileistä johdettujen proteiinien N-terminaalisen sekvenssin analyysi (yhden kirjaimen tunnuksat)

Kuviossa on esitetty kumulatiiviset sekvenssitiedot (useista analyysistä), jotka vastaavat kutakin kuviossa 13 esitettyä käänteisfaasin pääpiikkiä.

Piikki 1 = defensiini; piikki 4 = katepsiini G, piikki 5a = lysotsyymi ja piikki 8 = elastaasi.

Kuvio 15. ADBF:n molekyyli-massajakautumaan perustuva ekskluusiokromatogrammi 1 mg ADBF:ää ajettiin TSK-ekskluusiopylväessä tässä selostetulla tavalla.

(●) = bakterisidisen aktiivisuuden profiili

(▲) = fungisidisen aktiivisuuden profiili

(—) = UV-profiili

Kuvio 16. ADBF:n ja TSK-eksklusiopylväessä saatujen jakeiden SDS-PAGE-erottuminen

ADBF sekä kuvion 15 mukaisen kromatogrammin eri ADBF-jakeet ajettiin pelkistävässä olosuhteissa 15-prosenttisessa SDS-polyakryyliamidigeelissä. Kaistat 1 ja 10 edustavat merkkejä, joiden molekyylimassa on pieni; kaista 2 = jae 58; kaista 3 = jae 41; kaista 4 = jae 34; kaista 5 = jae 33; kaista 6 = jae 32, kaista 7 = jae 31; kaista 8 = jae 30; ja kaista 9 = ADBF ennen eksklusiokromatografiaa.

Kuvio 17. TSK-käänteisfaasi-HPLC:llä saadun piikin 9 SDS-PAGE-erottuminen

Käänteisfaasi-HPLC-pylväestä saatu piikki 9 (kuvio 13) ladattiin pelkistäväseen 10-prosenttiseen SDS-polyakryyliamidigeeliin.

Kaistat 1 ja 3 = molekyylimassamerkit; kaista 2 = piikki 9.

Kuvio 18. TSK-käänteisfaasi-HPLC:llä saadun piikin 5b SDS-PAGE-erottuminen

Käänteisfaasi-HPLC:llä saadut peräkkäiset jakeet, joiden eluoitusajat olivat 45 - 65 minuuttia, ajettiin 12-prosenttisessä SDS-polyakryyliamidigeelissä.

Kaista 8 sisältää piikin 5b (kuvio 13C) ja kaista 11 sisältää lähtömateriaalin, joka koostui TSK:n piikkijakeesta 42.

Kuvio 19. TSK-pylväessä puhdistetun HL60-soluista johdetun bakterisidisen tekijän (BF) käänteisfaasi-HPLC-tulos

Kuvio 20. 25 000 daltonin/13 000 daltonin ADBF-polypeptidien CDNA-proteiinisekvenssit

Kuvio 21. ADBF:n molekyylimassajakautumaan perustuva eksklusiokromatografia korkeassa suolapitoisuudessa

ADBF:lle suoritettiin molekyylikokoon perustuva TSK-eksklusiokromatografia 50 mM glysiinipuskurissa, pH 2, joka sisälsi 500 mmoolia/l NaCl

(●) = bakterisidisen aktiivisuuden profiili

(▲) = fungisidisen aktiivisuuden profiili

(-) = UV₂₈₀-profiili

Kuvio 22. Korkeassa suolapitoisuudessa suoritetulla TSK-eksklusiokromatografialla saatujen jakeiden SDS-PAGE-erottuminen

Kuviossa 21 esitetyn kromatogrammin eri ADBF-jakeet.

Kaistat 1 ja 3 = ADBF-uute; kaistat 2 ja 12 = molekyylimassamerkit; kaistat 4 ja 5 = jakeet 34 ja 35, vastaavasti (p54); kaista 6 = jae 36; kaistat 7, 8 ja 9 = jakeet 37, 38 ja 39, vastaavasti (p29); kaista 10 = jae 43 (p14 pääasiassa); kaista 11 = jae 45 (p18 + p14).

Esillä oleva keksintö tarjoaa ainekoostumuksen, jota voidaan käyttää mikrobeja tuhoavana aineena. Tämä ainekoostumus sisältää vähintään kahta polypeptidiä, jotka valitaan ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidien joukosta, joiden näennäiset molekyylimassat ovat noin 3 500 daltonia, noin 13 000 daltonia, noin 18 000 daltonia, noin 29 000 daltonia ja noin 54 000 daltonia. Tässä patenttihakemuksessa tarkoitetaan "polymorfonukleaarisella leukosyytillä" polymorfonukleaarista leukosyyttisolua, neutrofiilisolua, neutrofiilin prekursorisolua ja promyelosyyttistä leukemiasolua. Aine-

koostumuksella on respiratorisesta purkauksesta riippumatonta, mikrobeja tuhoavaa vaikutusta bakteerien ja sienten suhteen pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0, kun kalsiumionikonsentraatio on korkeintaan noin 10 mmoolia/l, jolloin bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridiaktiivisuuden ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l ja fungisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridiaktiivisuuden ollessa korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa ovat ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidit HL-60-soluista johdettuja. Toisessa keksinnön toteutustavassa ovat ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidit KG-1-soluista johdettuja. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa ovat polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidit atsurofiilisisistä jyväsistä johdettuja.

Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa on polypeptidi, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 3 500 daltonia, defensiini.

Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa polypeptidi, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 13 000, kattaa 12 867 daltonin polypeptidin, joka on esitetty kuviossa 20 aminohappo numero 105 aminohappoon numero 220. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa voi mikä tahansa polypeptideistä, joiden molekyylimassat ovat noin 18 000, noin 29 000 ja noin 54 000 daltonia, olla läsnä atsurofiilisisistä jyväsistä saadussa uutteessa.

Vielä eräässä toteutustavassa on polypeptidi, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 29 000, elastaasi, katepsiini G tai polypeptidi, joka sisältyy kuvion 13A piikkejä 6 tai 7 vastaavaan atsurofiilisisistä jyväsistä saatuun uutteeseen. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa polypeptidi, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 54 000 daltonia, si-

sältää seuraavan N-terminaalisen aminohapposekvenssin: Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu.

Esillä olevan keksinnön mukaista ainekoostumusta voidaan käyttää säilöntäaineena, desinfiointiaineena tai terapeuttisena aineena. Tässä tarkoitettulla ainekoostumuksella on bakterisidinen vaikutus mm. gram-positiivisiin ja gram-negatiivisiin bakteereihin. Esimerkkejä tällaisista gram-positiivisistä bakteereista ovat Staphylococcus aureus, beeta-hemolyytiset streptokokit, kuten Streptococcus pneumoniae, ja Listeriat. Esimerkkejä gram-negatiivisistä bakteereista ovat Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli ja Salmonella typhimurium. Edelleen sieniin, joita vastaan kyseinen ainekoostumus toimii mikrobeja tuhoavana aineena, kuuluu mm. hiiva. Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa hiiva on Candida albicans.

Tämän keksinnön tarjoama ainekoostumus säilyttää yli 80 % hapestasta riippumattomasta, mikrobeja tuhoavasta aktiivisuudestaan varastoitaessa 7 vuorokautta pH-arvossa noin 2,0 noin 4 C:ssa.

Keksintö tarjoaa myös menetelmän bakteerien tai sienten tuhoamiseksi. Kyseisessä menetelmässä saatetaan bakteerit tai sienet kosketukseen tehokkaasti bakteereita tai sieniä tappavan määrän kanssa keksinnön tarjoamaa ainekoostumusta, joka tavallisesti on sopivaan puskuriin liuotetussa muodossa. Alalla tunnetaan esimerkkejä sopivista puskureista, joista mainittakoon mm. fosfaattipuskuri ja fosfaatilla puskuroitu fysiologinen suolaliuos, joilla on fysiologinen pH-arvo.

Esillä oleva keksintö tarjoaa farmaseuttisen koostumuksen, joka soveltuu bakteeri- tai sieni-infektioiden hoitoon. Tämä farmaseuttinen koostumus sisältää tehokkaasti bakteereja tai sieniä tappavan määrän keksinnön mukaista ainekoostumusta sekä

farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Farmaseuttisesti hyväksyttävät kantaja-aineet ovat alalla tunnettuja ja niistä on selostettu julkaisuissa The Pharmacopeia of the United States ja The National Formulary.

Tarkoitettusta käyttötavasta riippuen voidaan keksinnön tarjoama farmaseuttinen seos formuloida liuokseksi, suspensioksi, parenteraaliseksi valmisteeksi, vedettömäksi voiteeksi, emulsiovoiteeksi, pesunesteiksi, suihkeiksi, jauheiksi, tableteiksi tai kapsелеiksi. Parenteraaliset valmisteet voivat sisältää apuainetta, kuten erityisesti tislattua pyrogeenitöntä vettä, fosfaattipuskuria tai normaalia fysiologista suola-liuosta. Vedettömät voiteet, emulsiovoiteet, pesunesteet ja suihkeet voivat sisältää kantaja-ainetta, kuten kasvi- tai mineraaliöljyä, valkoista vaseliinia tai molekyylimassaltaan korkeata alkoholia, so. ketjussa on yli 12 hiiliatomia. Tabletit tai kapselit voivat sisältää laimennusaineita, esimerkiksi laktoosia, sideaineita, liukuaineita, esim. steariinihappoa, ja hajotusainetta, esimerkiksi maissitärkkelystä.

Edelleen keksintö tarjoaa menetelmän bakteeri- tai sieninfektiota sairastavan hoitamiseksi antamalla tehokkaasti bakteereita tai sieniä tappava määrä keksinnön mukaista farmaseuttista koostumusta.

Keksintö tarjoaa menetelmän mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan ainekoostumuksen valmistamiseksi. Oleellisesti ottaen tässä menetelmässä erotetaan verestä polymorfonukleaariset leukosyytit niin, että saadaan polymorfonukleaaristen leukosyyttien suhteen rikastettu valmiste. Tämä valmiste suspendoidaan sopivaan puskuriin, esimerkiksi fosfaattipuskuriin, saatu suspensio käsitellään sopivalla proteaasien inhibiittorilla, esimerkiksi di-isopropyylifluorifosfaatilla, ja suspendoituneet solut käsitellään lysoivissa olosuhteissa, jotta saadaan lysoituneiden leukosyyttien suspensio. Lysoituneiden leukosyyttien suspensio käsitellään so-

pivalla kelatointiaineella, esimerkiksi EDTA:lla tai kalsiumkelaattorilla EGTA, ja sen jälkeen näin käsitelty suspensio sentrifugoidaan, jotta saadaan tumat ja rikkoutumattomat solut sisältävä faasi ja tumienulkoisen emäliuos. Tumienulkoisen emäliuos otetaan talteen ja fraktioidaan tiheysgradienttissa ja atsurofiiliset jyvät sisältävä jae otetaan talteen ja suspendoidaan puskuriin, jonka pH on noin 7,0 esimerkiksi tässä selostettuun relaxointipuskuriin. Näin saatu atsurofiilisten jyväsien suspensio käsitellään reagenssilla, jonka pH on alle noin 8,0 ja kykenee liuottamaan atsurofiilikalvon proteiinit. Käsitelty suspensio erotetaan kiinteään faasiin ja emäliuokseen ja emäliuos otetaan talteen. Viimeksimainittu muodostaa mikrobeja tuhoavana aineena käyttökelpoisen ainekoostumuksen.

Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa käytetään proteaasien inhibiittorina di-isopropyylifluorifosfaattia. Eräässä toisessa tämän keksinnön toteutustavassa verinäyte otetaan ihmiseltä. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa rikastettu polymorfonukleaaristen leukosyyttien valmiste sisältää yi noin 95 % polymorfonukleaarisia leukosyyttejä ja alle noin 3 % eosinofiilejä. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa käsitellään polymorfonukleaaristen leukosyyttien suspensio typpikavitaatiolla, jotta saadaan aikaan lysoitujen leukosyyttien suspensio.

Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa käytetään tumienulkoisen emäliuoksen fraktiointiin epäjatkovaa Percoll-tiheysgradienttia. Vielä eräässä toteutustavassa fraktiointimateriaali erotetaan atsurofiilisistä jyväsistä ennenkuin kerätyt atsurofiiliset jyvät suspendoidaan neutraaliin puskuriin.

Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa voidaan atsurofiilisten jyväsien suspensio käsitellä niin, että atsurofiiliset jyvät lysoituvat, ja näin saadut kalvofragmentit ote-

taan talteen. Nämä talteenotetut kalvofragmentit käsitellään sen jälkeen uuttoreagenssilla niin, että saadaan uuttoreagenssin ja atsuofiilikalvojen välinen suspensio. Tämän keksinnön eräässä toteutustavassa on uuttoreagenssin pH alle noin 4,0. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa on uuttoreagenssin pH noin 2,0. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa on uuttoreagenssi ei-ioninen pinta-aktiivinen aine, jonka pH on noin 7,0.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan puhdistetun polypeptidin. Tämä polypeptidi kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka ennustettu molekyyli­massa on 24 823 daltonia, ja jonka aminohappojärjestys on esitetty kuviossa 20, tai kyseessä on tämän fragmentti. Keksintö tarjoaa myös tätä polypeptidiä koodittavan DNA-molekyylin, jonka nukleotidisekvenssi on esitetty kuviossa 20.

Tämän keksinnön yhteydessä ymmärretään, että yksilöiden välillä esiintyy vaihtelua proteiineissa ja nukleiinihappoissa, esimerkiksi nukleotidien korvaamisia toisilla, nukleotidien poistumia ja lisänukleotidien sijoittumisia väliin sekä erilaista glykosyloitumista eri paikoissa, mutta näin syntyneet funktionaaliset johdannaiset kuuluvat esillä olevan keksinnön kattamaan alaan.

Tämän keksinnön eräässä toteutustavassa on puhdistetun polypeptidin näennäinen molekyyli­massa noin 13 000 daltonia. Keksinnön edullisessa toteutustavassa on polypeptidin ennustettu molekyyli­massa 12 867 daltonia. Tämä polypeptidi saattaa sisältää kuviossa 20 esitetyn aminohappojärjestyksen aminohaposta 105 aminohappoon 220. Keksintö tarjoaa myös tätä polypeptidiä koodittavan DNA-molekyylin. Eräässä toteutustavassa DNA-molekyyli kattaa kuviossa 20 esitetyn DNA-sekvenssin nukleotidista 369 nukleotidiin 716. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa on polypeptidin näennäinen molekyyli­massa

noin 18 000 daltonia. Keksintö tarjoaa myös tätä polypeptidiä koodittavan DNA-molekyylin.

Edelleen keksintö tarjoaa menetelmän mikro-organismin, esimerkiksi bakteerin, sienen tai viruksen, tappamiseksi. Tässä menetelmässä saatetaan mikro-organismi kosketukseen tehokkaasti mikro-organismin tappavan määrän kanssa keksinnön tarjoamaa polypeptidiä, jonka ennustettu molekyylimassa on 24 823 daltonia, tai tämän fragmentin kanssa.

Edelleen keksintö tarjoaa vektorin, joka sisältää DNA-molekyylin, joka koodittaa keksinnön mukaista polypeptidiä, jonka ennustettu molekyylimassa on 24 823 daltonia, tai sen fragmenttia. Tämän keksinnön eräässä toteutustavassa vektori on plasmidi. Edelleen keksintö tarjoaa isäntä-vektorisysteemin kyseisen 24 823 daltonin polypeptidin tai sen fragmentin tuottamiseksi, joka isäntä-vektorisysteemi käsittää esillä olevan keksinnön mukaisen plasmidin sopivassa isännässä. Tätä isäntä-vektorisysteemiä voidaan kasvattaa sopivissa olosuhteissa, jotka sallivat esillä olevan keksinnön mukaisen 24 823 daltonin suuruisen polypeptidin tai sen fragmentin tuottamisen, jonka jälkeen näin saatu polypeptidi voidaan ottaa talteen.

Keksintö tarjoaa myös menetelmän puhdistetun, 24 823 daltonin polypeptidin tai sen fragmentin valmistamiseksi siten, että kasvatetaan neutrofiilien prekursorisoluja, otetaan solut talteen ja suspendoidaan ne sopivaan puskuriin. Saatua neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitellään niin, että saadaan neutrofiilien lysoitujen prekursorisolujen suspensio, ja suspensio erotetaan niin, että saadaan tumat ja rikkoutumattomat solut sisältävä faasi ja tumienulkoisen emäliuos. Tumienulkoisen emäliuos otetaan talteen ja käsitellään uutto-reagenssilla, jonka pH on alle noin 8,0, ja joka kykenee liuottamaan kalvoproteiinit, jotta saadaan uutto-reagenssifaasi ja liukenematon kalvofaasi. Uutto-reagenssifaasi erotetaan

liukenemattomat kalvot sisältävästä faasista niin, että saadaan liuenneet proteiinit sisältävä faasi ja liukenematon kalvofaasi. Liuenneet proteiinit sisältävä faasi otetaan talteen ja puhdistetaan niin, että saadaan keksinnön mukaista 24 823 daltonin polypeptidiä tai sen fragmenttia.

Eräässä keksinnön toteutustavassa neutrofiilien preukursorisolut ovat HL60-soluja. Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitellään sopivalla proteaasien inhibiittorilla, ennenkuin saadaan aikaan lysoitujen neutrofiilien suspensio. Toisessa tämän keksinnön toteutustavassa käsitellään lysoitujen neutrofiilien suspensio ennen erottamista sopivalla kelatointiaineella.

Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa liukoiset proteiinit sisältävä faasi puhdistetaan ioninvaihtokromatografialla. Liukoiset proteiinit sisältävä faasi voidaan myös puhdistaa molekyylimassajakautumaan perustuvalla eksklusiokromatografialla, affiniteettikromatografialla tai immunoaffiniteettikromatografialla.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää 24 823 daltonin polypeptidiä tai sen fragmenttia, jotka ovat keksinnönmukaisia, sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Tätä farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää bakteeri- tai sieni-infektiota sairastavan hoitoon siten, että annetaan bakteereita tai sieniä tehokkaasti tappava määrä tätä farmaseuttista koostumusta.

Esillä oleva keksintö tarjoaa vielä erään mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan polypeptidin. Tämä polypeptidi kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 18 000 daltonia. Eräässä keksinnön toteutustavassa on tällä polypeptidillä respiratorisesta purkauksesta riippumaton mikrobeja tuhoava vaikutus bakteerien tai sienten ollessa kyseessä pH-

alueella noin 5,0 - noin 8,0 kalsiumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 10 mmoolia/l, jolloin bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l ja fungisidinen aktiivisuus ilmenee natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,15 moolia/l. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa sisältää polypeptidi seuraavan N-terminaalisen aminohappojärjestyksen: X-Pro-Pro-Gln-Phe-Thr-X-Ala-Gln-X-Phe-Ala-Ile-Gln-X-Ile-X-Leu-Asn-Pro.

Keksintö tarjoaa myös menetelmän mikro-organismin tappamiseksi. Tuossa menetelmässä saatetaan mikro-organismi kosketukseen mikro-organismin tehokkaasti tappavan määrän kanssa keksinnön mukaista 18 000 daltonin polypeptidiä.

Edelleen keksintö tarjoaa DNA-molekyylin, joka koodittaa tämän keksinnön mukaista 18 000 daltonin polypeptidiä. Keksintö tarjoaa myös vektorin, joka sisältää keksinnön mukaisen DNA-molekyylin. Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa tämä vektori on plasmidi. Lisäksi keksintö tarjoaa isäntä-vektorisysteemin keksinnön mukaisen 18 000 daltonin plasmidin tuottamiseksi, joka isäntä-vektorisysteemi käsittää keksinnön mukaisen plasmidin sopivassa isännässä. Tätä isäntä-vektorisysteemiä voidaan kasvattaa sopivissa olosuhteissa, jotka sallivat keksinnön mukaisen 18 000 daltonin polypeptidin tuotannon, ja näin syntynyt polypeptidi voidaan ottaa talteen.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös menetelmän keksinnön mukaisen puhdistetun polypeptidin valmistamiseksi siten, että viljellään neutrofiilien prekursorisoluja, solut otetaan talteen ja suspendoidaan sopivaan puskuriin. Saatu neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitellään niin, että saadaan neutrofiilien lysoitujen prekursorisolujen suspensio, ja suspensio erotetaan niin, että saadaan tumat ja rikkoutumattomat solut sisältävä faasi ja tumienulkoisen faasi. Tumienulkoisen faasi otetaan talteen ja käsitellään uuttoreagenssilla, jonka

pH on alle noin 8,0, ja joka kykenee liuottamaan kalvon proteiinit niin, että saadaan uuttoreagenssifaasi ja liukenematon kalvofaasi. Uuttoreagenssifaasi erotetaan liukenemattomasta kalvofaasista niin, että saadaan liukoiset proteiinit sisältävä faasi ja liukenematon kalvofaasi. Liukoiset proteiinit sisältävä faasi otetaan talteen ja puhdistetaan niin, että saadaan 18 000 daltonin polypeptidi.

Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa neutrofiilien prekursorisolut ovat HL60-soluja. Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitellään sopivalla proteaasien inhibiittorilla, ennenkuin saadaan aikaan lysoitujen neutrofiilien suspensio. Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa käsitellään lysoitujen neutrofiilien suspensio sopivalla kelatointiaineella ennen erottamista.

Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa liukoiset proteiinit sisältävä faasi puhdistetaan ioninvaihtokromatografialla. Liukoiset proteiinit sisältävä faasi voidaan myös puhdistaa molekyylimassajakautumaan perustuvalla eksklusiokromatografialla, affiniteettikromatografialla tai immunoaffiniteettikromatografialla.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös farmaseuttisen koostumuksen, joka sisältää keksinnönmukaista 18 000 daltonin polypeptidiä sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Tätä farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää sieni-infektion hoitoon siten, että annetaan mikro-organismien tehokkaasti tappava määrä farmaseuttista koostumusta.

Esillä oleva keksintö tarjoaa vielä erään mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan polypeptidin, joka kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 54 000 daltonia. Tällä polypeptidillä on respiratorisesta purkauksesta riippumatonta bakteereja tuhoavaa aktiivisuutta pH-alueella noin 5,0 - noin

8,0 kalsiumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 10 mmoolia/l ja natriumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l. Eräässä tämän keksinnön mukaisessa toteutustavassa on polypeptidillä myös sieniä tuhoavaa aktiivisuutta pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0 kalsiumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 10 mmoolia/l ja natriumkloridikonsentraation korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Vielä eräässä tämän keksinnön toteutustavassa polypeptidi sisältää seuraavan N-terminaalisen aminohappojärjestyksen: Val-Asn-Pro-Gly-Val-Val-Val-Arg-Ile-Ser-Gln-Lys-Gly-Leu-Asp-Tyr-Ala-Ser-Gln-Gln-Gly-Thr-Ala-Ala-Leu-Gln-X-X-Leu-Lys-His-Ile-Lys-Ile-Pro-Asp-Tyr-Leu.

Keksintö tarjoaa myös menetelmän mikro-organismien tappamiseksi. Tuossa menetelmässä saatetaan bakteeri tai sieni kosketukseen niitä tehokkaasti tappavan määrän kanssa keksinnön mukaista 54 000 daltonin polypeptidiä.

Edelleen keksintö tarjoaa keksinnön mukaista 54 000 daltonin polypeptidiä koodittavan DNA-molekyylin ja vektorin, joka sisältää tämän DNA-molekyylin. Esillä oleva keksintö tarjoaa myös vektorin, joka on keksinnön mukaisen plasmidin muodossa. Edelleen keksintö tarjoaa isäntä-vektorisysteemin keksinnön mukaisen 54 000 daltonin polypeptidin tuottamiseksi, joka isäntä-vektorisysteemi käsittää keksinnön mukaisen plasmidin sopivassa isännässä. Isäntä-vektorisysteemiä voidaan kasvat-
taa sopivissa olosuhteissa, jotka sallivat keksinnön mukaisen 54 000 daltonin polypeptidin tuotannon, ja näin syntynyt polypeptidi voidaan ottaa talteen.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös menetelmän keksinnön mukaisen puhdistetun 54 000 daltonin polypeptidin valmistamiseksi siten, että viljellään neutrofiilien prekursorisoluja, solut otetaan talteen ja suspendoidaan ne sopivaan puskuriin. Saatu neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitellään niin,

että saadaan neutrofiilien lysoitujen prekursorisolujen suspensio, ja suspensio erotetaan niin, että saadaan tumat ja rikkoutumattomat solut sisältävä faasi ja tumienulkoisen faasi. Tumienulkoisen faasi otetaan talteen ja käsitellään uut-toreagenssilla, jonka pH on alle noin 8,0, ja joka kykenee liuottamaan kalvon proteiinit niin, että saadaan uut-toreagenssifaasi ja liukenematon kalvofaasi. Uuttoreagenssifaasi erotetaan liukenemattomasta kalvofaasista niin, että saadaan liukoiset proteiinit sisältävä faasi ja liukenematon kalvo-faasi. Tämän jälkeen liukoiset proteiinit sisältävä faasi otetaan talteen ja puhdistetaan niin, että saadaan 54 000 daltonin polypeptidi.

Eräässä tämän keksinnön toteutustavassa ovat neutrofiilien prekursorisolut HL60-soluja. Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa neutrofiilien prekursorisolujen suspensio käsitel-lään sopivalla proteaasien inhibiittorilla, ennenkuin saadaan aikaan lysoitujen neutrofiilien suspensio. Vielä eräässä tä-män keksinnön toteutustavassa käsitellään lysoitujen neutro-fiilien suspensio sopivalla kelatointiaineella ennen erotta-mista.

Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa liukoiset proteiinit sisältävä faasi puhdistetaan ioninvaihtokromatografialla. Liukoiset proteiinit sisältävä faasi voidaan myös puhdistaa molekyylimassajakautumaan perustuvalla eksklusiokromatogra-fialla, affiniteettikromatografialla tai immunoaffiniteetti-kromatografialla.

Esillä oleva keksintö tarjoaa myös farmaseuttisen koostumuk-sen, joka sisältää keksinnön mukaista 54 000 daltonin polypep-tidiä sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Tätä farmaseuttista koostumusta voidaan käyttää baktee-ri-infektioden hoitoon siten, että annetaan tehokkaasti baktee-reja tappava määrä tätä farmaseuttista koostumusta. Vielä eräässä keksinnön toteutustavassa voidaan tätä farmaseuttista

koostumusta käyttää bakteri- tai sieni-infektion hoitoon siten, että annetaan tehokkaasti bakteereita tai sieniä tappava määrä tätä farmaseuttista seosta.

Keksintö tarjoaa menetelmän sienten tappamiseksi siten, että sienet saatetaan kosketukseen tehokkaasti sieniä tappavan määrän kanssa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidiä, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 29 000 daltonia. Erään toteutustavan mukaisesti on polypeptidi läsnä atsuropiilisten jyvasten uutuksessa. Vielä erään toteutustavan mukaisesti on polypeptidi elastaasi. Vielä erään toteutustavan mukaisesti on polypeptidi katepsiini G.

Edelleen keksintö tarjoaa farmaseuttisen seoksen, joka sisältää ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidiä, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 29 000 daltonia, sekä farmaseuttisesti hyväksyttävää kantaja-ainetta. Edelleen keksintö tarjoaa menetelmän bakteri-infektion hoitamiseksi siten, että annetaan tehokkaasti bakteereita tappava määrä tätä farmaseuttista seosta. Edelleen keksintö tarjoaa menetelmän sieni-infektion hoitamiseksi siten, että annetaan tehokkaasti sieniä tappava määrä tätä farmaseuttista seosta.

Edelleen keksintö tarjoaa mikrobeja tuhoavana aineena käytettäväksi soveltuvan puhdistetun polypeptidin, joka kattaa ihmisen polymorfonukleaarisen leukosyytin polypeptidin, jonka näennäinen molekyylimassa on noin 25 000 daltonia, ja tällä polypeptidillä on respiratorisesta purkauksesta riippumatonta mikrobeja tuhoavaa aktiivisuutta bakteereihin ja sieniin pH-alueella noin 5,0 - noin 8,0 kalsiumionikonsentraation ollessa korkeintaan noin 10 mmoolia/l, jolloin bakterisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,3 moolia/l ja fungisidinen aktiivisuus on voimassa natriumkloridikonsentraation ollessa korkeintaan noin 0,15 moolia/l.

Keksinnön mukaisia ainekoostumuksia, polypeptidejä ja menetelmiä valaistaan seuraavien kokeiden ja esimerkkien avulla, jotka on tarkoitettu vain selventäviksi eikä millään tavoin keksintöä rajoittaviksi, sillä keksintö määritellään liitteenä olevissa patenttivaatimuksissa.

Neutrofiilien eristäminen

Terveiltä luovuttajilta saadun veren koaguloituminen estettiin 25 mM natriumsitraattipitoisuudella ja sen jälkeen mukaan sekoitettiin yhtä suuri tilavuus 6-prosenttista dekstraaniliuosta, joka oli tehty 0,9-prosenttiseen natriumkloridiliuokseen, jotta erytrosyytit painuivat pohjaan. Kun seosta oli pidetty 60 minuuttia huoneenlämpötilassa, otettiin leukosyyttien suhteen rikastunut emäliuos talteen ja sentrifugoitettiin 10 minuuttia kiihtyvyydellä 200 x g. Solupelletit uudelleensuspendoitiin 0,9-prosenttiseen natriumkloridiliuokseen ja polymorfonukleaariset leukosyytit (PMS:t) erotettiin mononukleaarisisista soluista sentrifugoimalla Ficoll-Hypaquen läpi. Kontaminoivat erytrosyytit poistettiin kahdella peräkkäisellä hypotonisella lysykiekierrolla, kuten julkaisuissa (8, 9) on selostettu. Yli 98 % soluista oli polymorfonukleaarisia leukosyyttejä, joista yli 95 % oli neutrofiilejä ja alle 3 % eosinofiilejä. Yksi yksikkö verta antoi 109 neutrofiiliä.

Neutrofiilien fraktiointi solujen alajakeisiin

Fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen suspendoituja eristettyjä neutrofiilejä (2×10^7 solua/ml) käsiteltiin 15 minuuttia 4 C:ssa 5 mM di-isopropyylifluorifosfaattipitoisuudessa (DFP). DFP:llä käsiteltyjä soluja sentrifugoitettiin 10 minuuttia 4 C:ssa kiihtyvyydellä 130 x g ja saatu pelletti uudelleensuspendoitiin jääkylmään puskuriin, jossa oli 100 mmoolia/l KCl, 3 mmoolia/l NaCl, 1 mmooli/l ATP(Na)₂, 3,5 mmoolia/l MgCl₂ ja 10 mM Pipesiä, pH 7,3 (relaksointipuskuri). Solususpensiota rikottiin typpikavitaatiolla 20 mi-

nuuttia 2412 kPa:n (350 psi) paineessa pommissa (Parr Instrument Company, Moline, IL) 4 C:ssa ja kavitaatti kerättiin Ca²⁺-ionikelaattorina toimivaan EGTA:han, pH 7,4, jonka lopulliseksi pitoisuudeksi tuli 1,5 mmoolia/l. Tummat ja rikkoutumattomat solut pelletoitettiin (P₁) sentrifugoimalla 10 minuuttia 4 C:ssa kiihtyvyydellä 500 x g. Tumienulkoista emäliuosta (S₁) sentrifugoitiin 15 minuuttia nopeudella 20 000 min⁻¹ (SS 34-roottori) käyttämällä epäjatkovaa Percoll-tiheysgradienttia, kuten julkaisussa (8) on selostettu. Noin 1 ml:n jakeet kerättiin 4 C:ssa ja niistä analysoitiin spesifiset merkit, jotka edustavat atsurofiilisiä jyväsiä (beeta-glukuronidaasi ja myeloperoksidaasi), spesifisiä jyväsiä (vitamiinia B12 sitova proteiini) ja solukalvoa (emäsfosfataasi), kuten jäljempänä selostetaan. Percoll poistettiin yhdistetyistä jakeista sentrifugoimalla nopeudella 35 000 min⁻¹ (180 000 x g) 2 tuntia SW41-roottorissa. Kerros, joka sedimentoitui pakautuneen Percollin yläpuolelle, uudelleensuspendoitiin relaxointipuskuriin ja varastoitiin erissä -70 C:ssa.

Spesifisten merkkien määrittäminen solujen alajakeista

Jotta voitaisiin olla varmoja täydellisestä liukenemisestä, erät relaksaatiopuskurissa olevia atsurofiilisiä jyväsiä laimennettiin 1:5-laimennoksiksi Triton X-100:aan (lopullinen pitoisuus 0,05 % paino/tilavuus) ennen entsyymi- tai proteiinimäärityksiä. Emäsfosfataasi määritettiin käyttämällä substraattina p-nitrofenyylifosfaattia (1 mg/ml) puskurissa, jossa oli 0,3 mmoolia/l MgCl₂ ja 50 mM natriumbarbitaalipuskuria, pH 10,5. Määrityksissä käytettiin 50 mikrolitran näytteitä, jotka oli laimennettu Triton X-100:aan. Näytteitä inkuboitiin 80 minuuttia 37 C:ssa määritysseoksessa (tilavuus 1 ml) ja reaktio lopetettiin lisäämällä 100 mikrolittraa 1 N natriumhydroksidiliuosta. Absorbanssi aallonpituudella 410 nm luettiin välittömästi. Entsyymiaktiivisuus laskettiin julkaisussa (10) kuvatulla tavalla.

Beeta-glukuronidaasi määritettiin fenolftaleiinin vapautumise-
 senä 3 tunnissa 37 °C:ssa 1 mM fenolftaleiini-beeta-monogluku-
 ronihaposta 100 mM natriumasetatipuskurissa, pH 4,4. Määri-
 tyksissä käytettiin 25 mikrolitran näytteitä, jotka oli lai-
 mennettu Triton X-100:aan, 500 mikrolitrassa määritysseosta.
 Reaktio pysäytettiin lisäämällä 200 mikrolitraa liuosta, jos-
 sa oli 1 mooli/l glysiiniä, 1 mooli/l NaCl ja 1 mooli/l NaOH,
 ja absorbanssit luettiin 550 nm:ssä. Entsyymiaktiivisuus las-
 kettiin julkaisussa (8) kuvatulla tavalla.

Vitamiinia B12 sitova proteiini mitattiin 25, 50 ja 100
 mikrolitran näytteistä, jotka oli laimennettu Triton X-
 100:aan, käyttämällä oleellisesti ottaen menetelmää, jota on
 selostettu julkaisussa (11). ⁵⁷Co-vitamiini B12 valmistettiin
 sekoittamalla keskenään 5 ⁵⁷ng/ml ⁵⁷Co-vitamiini B12:ta (Sigma)
 ja 0,025 mikrocurietä/⁵ml ⁵⁷Co-syanokobalamiinia (Amersham,
 ominaisaktiivisuus 10 ⁵⁷cpm/ng). 750 mikrolitraa fysiologista
 suolaliuosta sekoitettiin 350 mikrolitraan ⁵⁷Co-vitamiinia
 B12 ja mukaan lisättiin näyte, jonka lopullinen tilavuus oli
 100 mikrolitraa. Sitten lisättiin 0,5 ml albumiinilla pääl-
 lystettyä hiiltä ja koeputkia sentrifugoitiin 2 minuuttia
 huoneenlämpötilassa kiihtyvyydellä 10 000 x g. Otettiin 1 ml
 emäliuosta ja siitä suoritettiin tuikelaskenta Packard-auto-
 gamma-tuikelaskurilla (Packard Instrument Co., Downers Grove,
 IL), jotta saatiin selville näytteessä oleva sitoutunut ⁵⁷Co-
 B12.

Proteiini määritettiin julkaisussa (12) kuvatulla tavalla
 käyttämällä standardina seerumin albumiinia. Jotta vältettäi-
 siin Triton X-100:n häirintä määrityksessä, alkaliseen kupa-
 riliuokseen lisättiin 0,1 % natriumdodekyylisulfaattia (13).
 Percoll ei vaikuttanut määritykseen sinä väkevyytenä, jona se
 oli läsnä jakeissa.

Myeloperoksidaasin määrittämiseksi 200 mikrolitraa kutakin
 jaetta laimennettiin 5-kertaisesti relaksaatiopuskuriin, jos-

sa oli 0,2 % Triton X-100, ja sijoitettiin Perkin-Elmer 557-kaksoissädespektrometrin (Coleman Instruments Division, Oak Brook, IL) näyteosastoon. Sitten mitattiin absorptiospektrit aallonpituusalueella 400 - 600 nm hapettuneista jakeista ditioniitilla pelkistettyihin jakeisiin verrattuina ($E_{472 \text{ nm}}^{-1} = 75 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (14).

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän valmistus

Ne Percoll-gradienttijakeet, jotka vastasivat atsurofiilisiä jyväsia, yhdistettiin ja Percoll poistettiin sentrifugoimalla, kuten julkaisussa (8) on selostettu. Atsurofiilisten jyvästen suspensio uudelleensuspendoitiin relaksaatiopuskuriin ja suspensiota varastoitiin joko jäällä 4 °C:ssa tai -70 °C:ssa. Jäällä 4 °C:ssa varastoidut atsurofiiliset jyväsät näyttivät olevan ehjiä, koska mitään beeta-glukuronidaasin tai myeloperoksideasin vapautumista ei voitu havaita 2 viikon aikana. Atsurofiilisten jyvästen jäädyttäminen -70 °C:een sai aikaan hieman beeta-glukuronidaasin vuotamista (<20 %), mutta ei myeloperoksideasin vuotamista. Eristettyjä atsurofiilisiä jyväsia uutettiin 40 minuuttia 25 °C:ssa 0,05 M glysiini-HCL-puskurilla, pH 2,0. Happouutetta sentrifugoitiin 20 minuuttia kiihtyvyydellä 10 000 x g ja emäliuosta käytettiin atsurofiileistä johdetun bakterisidien tekijän (ADBF) lähteenä. Emäliuos joko laimennettiin inkubointiväliaineeseen tai dialysoitiin sitä vasten ennen bakterisidisia määrityksiä. Atsurofiilistä bakterisidistä tekijää sisältävien utteiden dialyysissä käytettiin putkimaista kalvoa, jonka leikkausraja oli 1 000 MR (Spectra/Por, Spectrum Medical, Los Angeles, CA). Percoll-tiheysgradienttien jakeet uutettiin tällä samalla menetelmällä; Percollilla ei ollut mitään vaikutusta uuttoon eikä bakterisidisen tekijän aktiivisuuteen.

Bakterisidiset määritykset

Bakterisidinen aktiivisuus testattiin E. coli K12:ta (MC 4100) vastaan rutiinimäärityksillä ja bakterisidista aktiivisuutta

havaittiin olevan myös seuraavia bakteereita kohtaan: *Salmonella typhimurium* LT2, *Pseudomonas aeruginosa* PAC ja PAO, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* ja *Streptococcus pneumoniae* tyypit III ja II sekä *S. pneumoniae* tyyppiin II kannan kapseloitumaton muoto. Useimpien bakteerien viljelyssä käytettiin tryptikaasisoijalientä ja tryptikaasi-soija-agarmaljoja. *S. pneumoniae* tapauksessa käytettiin Cy-alustaa ja agarmaljoja, joissa oli 5 % defibrinoitua lampaanverta (15).

Agarmaljassa kasvavalla yhdellä pesäkkeellä ympätettiin nestemäinen alusta ja sen jälkeen kasvatettiin yön yli 37 C:ssa. Erällä yön yli kasvanutta viljelmää ympätettiin tuore ravinneliemi ja kasvatettiin eksponentiaalisen vaiheen keskikohtaan. Sitten bakteeriviljelmä laimennettiin koeväliaineeseen haluttuun konsentraatioon. Useimmat kokeet suoritettiin 0,05 M sitraattipuskurissa, pH 5,5. Kontrollikokeet osoittivat, että tämä puskuri ei vaikuttanut testatuista bakteereista minkään muun kuin *P. aeruginosa* ja *S. pneumoniae* tyyppiin II elossapysymiseen, joille sitten käytettiin 0,05 M fosfaattipuskuria, pH 6,0. Joissakin bakterisidisisä määrityksissä käytettiin muita puskureita, kuten asetaatti-, fosfaatti- tai sitraattifosfaattipuskuria, joiden pitoisuus oli 0,01 M tai 0,05 M, kuten jäljempänä tarkemmin selostetaan.

Bakteeria (4×10^4 pesäkkeenmuodostusyksikköä 200 mikrolitran lopullisessa tilavuudessa) inkuboitiin 30 minuuttia 37 C:ssa eri määrien kanssa atsuofiilisten jyvasten uutetta (ADBF) tai HL60-soluista johdettua uutetta (BF), jotka oli laimennettu inkubointiväliaineeseen. Sitten näytteet laimennettiin 1:100-laimennoksiksi M63-minimiravinnealustaan (16) ja levitettiin agarmaljoihin. Pesäkkeenmuodostusyksiköt (CFU) laskettiin sen jälkeen, kun oli inkuboitu 16 tuntia 37 C:ssa. Bakterisidinen aktiivisuus ilmaistiin kuolleiden bakteerien osuutena kontrolliin verrattuna, kun bakteerit olivat olleet alttiina ADBF:n tai BF:n vaikutukselle. Vaihtoehtoisesti käy-

tettiin tappavan aktiivisuuden yksikköä (KU) niin, että yksi yksikkö vastaa ADBF- tai BF-valmisteen sen laimennoksen käänteisarvoa, joka tappaa 10^5 bakteeria/ml 30 minuutissa 37 C:ssa (LD₅₀).

Fungisidiset määritykset

Fungisidinen aktiivisuus testattiin *Candida albicans*-hiivaa (Columbia Presbyterian Hospital-sairaalaasta saatu kliininen eriste) vastaan rutiinimenetelmillä. Sienten viljelyssä käytettiin Sabauraud-lientä ja Sabauraud-agarmaljoja (Difco).

Nestemäinen kasvualusta ympättiin agar-maljalla kasvavasta yhdestä pesäkkeestä ja viljeltiin yön yli 37 C:ssa. Erällä yön yli kasvanutta viljelmää ympättiin tuore ravinnealusta ja kasvatettiin eksponentiaalisen kasvuvaiheen keskikohtaan. Sitten sieniviljelmät laimennettiin koeväliaineeseen haluttuihin konsentraatioihin. Kokeet suoritettiin 10 mM fosfaattipuskurissa, pH 5,5.

C. albicans-hiivaa (10^5 pesäkkeenmuodostusyksikköä/ml) inkuboitiin 60 minuuttia 37 C:ssa eri määrien kanssa atsurofii-listen jyvasten uutetta (ADBF) tai HL60-soluista saatua uutetta (BF), jotka oli laimennettu inkubointiväliaineeseen. Sitten näytteet laimennettiin 1:100-laimennoksiksi M63-miniravinnealustaan (16) ja levitettiin agarmaljoihin. Pesäkkeenmuodostusyksiköt (CFU) laskettiin, kun oli inkuboitu 30 tuntia 37 C:ssa. Fungisidinen aktiivisuus ilmaistiin kuolleiden sienten osuutena kontrolliin verrattuna, kun bakteerit olivat olleet alttiina ADBF:n tai BF:n vaikutukselle. Vaihtoehtoisesti käytettiin tappavan aktiivisuuden yksikköä (KU) niin, että yksi yksikkö vastaa ADBF- tai BF-valmisteen sen laimennoksen käänteisarvoa, joka tappaa 10^5 sientä 60 minuutissa 37 C:ssa (LD₅₀).

Atsurofiilisten jyvästen kalvojen eristäminen

Neutrofiilisoluiista eristetyt, relaksointipuskurissa (pH 7,3) olevat atsurofiiliset jyväset rikottiin suorittamalla seitsemän kertaa jäädytys asetoni-kuivajäähauteessa ja sulatus 37 °C:ssa niin, että jokaista kertaa seurasi upotus 10 sekunniksi vesihauteeseen sonikointia varten (Bransen B3, Heat Systems-Ultrasonic Inc., Plainview, NY). Pelletoitu materiaali saatiin sentrifugoimalla lysoituja jyväsiä 60 minuuttia kiihtyvyydellä 10 000 x g tai 6 minuuttia kiihtyvyydellä 135 000 x g 4 °C:ssa. Tästä pelletoidusta materiaalista käytettiin nimitystä atsurofiilisten jyvästen kalvot. Eristetyistä jyvästen kalvoista ja jyvästen sisäosista liuenneesta materiaalista määritettiin ADBF-aktiivisuus sen jälkeen, kun oli inkuboitu 0,05 M glysiinin, pH 2,0, kanssa, kuten edellä on selostettu.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) karakterisointi molekyylilikoon perustuvalla eksklusiokromatografialla

Noin 1 mg ADBF-kalvouutetta sijoitettiin Bio-Sil TSK-125-eksklusiopylvääseen, joka oli tasapainotettu joko liuoksella, jossa oli 50 mM glysiiniä ja 0,1 moolia/l NaCl, pH 2,0, tai liuoksella, jossa oli 5 mM glysiiniä ja 0,5 moolia/l NaCl, pH 2. Eluoituneista jakeista kehitettiin ADBF-bakterisidinen ja ADBF-fungisidinen profiili ja OD 280-profiili. ADBF-kalvouuttele ja eksklusiopylväästä saaduille valituille jakeille suoritettiin natriumdodekyylisulfaattipolyakryyliamidigeelielektroforeesi (SDS-PAGE 15 %).

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) karakterisointi käänteisfaasi-HPLC-menetelmällä

Trifluorietikkahappoa (TFA) lisättiin ADBF-valmisteeseen tai TSK-pylväässä puhdistettuun ADBF-valmisteeseen pitoisuuteen 0,1 % ja näytteet sijoitettiin Vydac wide pore C₄-käänteisfaasipylvääseen (250 x 4 mm) ja ajettiin 92 minuutin gradien-

tilla, sen jälkeen 3 minuuttia 100-prosenttisella liuoksella ja sen jälkeen pestiin 2 minuuttia. Liuotin A oli TFA:n 0,1-prosenttinen vesiliuos ja liuotin B oli HPLC-laatuiseen asetonitriiliin tehty liuos, jossa oli 0,1 % TFA:ta. Gradientti oli seuraava:

Aika	Liuotinta B
0-2 minuuttia	0 %
2-62 minuuttia	0-48 %
62-92 minuuttia	48-100 %
92-95 minuuttia	100 %
95-97 minuuttia	0 %

Käytetty laite oli Beckman-käänteisfaasi-HPLC-systeemi, jossa oli Vydac wide pore C₄-käänteisfaasipylväs (250 x 4 mm), kaksi 110B-pumppua, 421A-ohjauslaite, 210A-injektori, 2 ml:n näytekierukka, 163-detektori, jossa aallonpituutta voitiin muuttaa, 2112 Redirac-jakeenkeräyslaite sekä Kipp and Zonen BD 41-piirtorekisteröintilaite. Detektori oli asetettu aallonpituudelle 214 nm, 0 - 0,5 täyden skaalan absorbanssiyksikköä (AUFS) ja huippujakeet kerättiin manuaalisesti.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) polypeptidien sekvenssianalyysi

Käänteisfaasi-HPLC-menetelmällä puhdistettu ADBF ja TSK-pylvästä saatu käänteisfaasi-HPLC-menetelmällä puhdistettu ADBF konsentroidiin 50 mikrolitraksi Speed Vac[®]-laitteella ja laddattiin Applied Biosystems 477A-pulssinestefaasisekventaattoriin. Fenyylitiohydantoiinianalyysi (PTH) suoritettiin samanaikaisesti käyttämällä Applied Biosystems Model 120A PTH Analyzer-laitetta.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) polypeptidien aminohappoanalyysi

Peptidien PTC-aminohappoanalyysi suoritettiin hydrolysoimalla 1 tunti 150 C:ssa 6,0 N suolahapossa käyttämällä Waters Pico-taq[®]-systeemiä, joka oli varustettu Beckman-HPLC-systeemillä.

HL60-solujen viljely

HL60-soluja (39, 40) kasvatettiin suspensioviljelminä, jotka sisälsivät perusravinnealustaa (seerumiton) täydennettynä insuliinilla ja transferrinillä. Solut kasvatettiin tiheyteen 2×10^6 solua/ml ja otettiin talteen sentrifugoimalla. Solupelletti uudelleensuspendoitiin tiheyteen 1×10^8 solua/ml myöhempää fraktiointia varten.

HL60-solujen alajakeiden fraktiointi

Fosfaatilla puskuroituun fysiologiseen suolaliuokseen suspendoituja HL60-soluja (2×10^7 solua/ml) käsiteltiin 15 minuuttia 4 C:ssa 5 mM DFP-pitoisuudessa. DFP:llä käsiteltyjä soluja sentrifugoitiin 10 minuuttia 4 C:ssa kiihtyvyydellä $130 \times g$ ja saatu pelletti uudelleensuspendoitiin jääkylmään relaxointipuskuriin, joka sisälsi 100 mmoolia/l KCl, 3 mmoolia/l NaCl, 1 mmooli/l $\text{ATP}(\text{Na})_2$, 3,5 mmoolia/l MgCl_2 ja 10 mM Pipesiä, pH 7,3. Solususpensiota rikottiin typpikavitaatiolla 20 minuuttia 4 C:ssa 2412 kPa:n (350 psi) paineessa pommissa ja kavitaatti kerättiin Ca^{2+} -ionikelaattorina toimivaan EGTA:han, pH 7,4, jonka lopullinen pitoisuus oli 1,5 mmoolia/l. Tumat ja rikkoutumattomat solut pellettoitiin (P_1) sentrifugoimalla kiihtyvyydellä $500 \times g$ 10 minuuttia 4 C:ssa.

Tumienulkoista emäliuosta (S_1) sentrifugoitiin 30 minuuttia kiihtyvyydellä $10\,000 \times g$, jotta jyvät saatiin pelletoiduiksi. Tämä epäpuhdas jyväsuspensio uudelleensuspendoitiin relaxointipuskuriin ja varastoitiin erissä -70 C:ssa. Vaihtoehtoisesti sentrifugoitiin tumienulkoista emäliuosta (S_1) 15 minuuttia nopeudella 20 000 min⁻¹ (SS 34-roottori) käyttä-

mällä epäjatkovaa Percoll-tiheysgradienttia, kuten julkaisussa (8) on selostettu. Noin 1 ml:n jakeet kerättiin 4 C:ssa ja ne analysoitiin edellä kuvatulla tavalla sen suhteen, olisiko läsnä spesifisiä merkkejä, jotka edustivat atsuurofiilisiä jyväsiä (beeta-glukuronidaasi ja myeloperoksidaasi), spesifisiä jyväsiä (vitamiinia B12 sitova proteiini) ja solukalvoa (emäsfosfataasi). Percoll poistettiin yhdistetyistä jakeista sentrifugoimalla nopeudella $35\ 000\ \text{min}^{-1}$ ($180\ 000 \times g$) 2 tuntia SW41-roottorissa. Kerros, joka sedimentoitui pakkautuneen Percollin päälle, suspendoitiin relaksointipuskuriin ja varastoitiin erinä -70 C:ssa.

Jakeet, jotka oli saatu joko myeloperoksidaasiaktiivisuutta vastaavista Percoll-gradienteista tai HL60-solujen epäpuhtaasta jyväsvalmisteesta, uudelleensuspendoitiin puskuriin ja varastoitiin joko jäällä tai -70 C:ssa. Epäpuhtas jyväsvalmiste tai eristetyt jyväset uutettiin 0,05 M glysiini-HCl-puskurilla, pH 2,0, uuttoaajan ollessa 40 minuuttia 25 C:ssa. Happouutetta sentrifugoitiin 20 minuuttia kiihtyvyydellä $10\ 000 \times g$ ja emäliuos joko laimennettiin inkubointiväliaineella tai dialysoitiin sitä vasten ennen bakterisidisiä määrityksiä. BF-uutteiden dialysoinnissa käytettiin putkikalvoa, jonka leikkausraja oli $1000\ M_r$ (Spectra/For, Spectrum Medical, Los Angeles, CA).

HL60-cDNA-kirjastojen valmistus ja seulonta

Ihmisen HL60-soluja (ATCC CCL 240) kasvatettiin spesifioidulla tavalla tiheyteen 1×10^6 solua/ml DMEM-alustassa, joka sisälsi 5 % vasikan sikiön seerumia. Indusoidun kirjaston aikaansaamiseksi soluja käsiteltiin 40 tuntia 1 %:lla DMSO:lla ennen talteenottoa. Solut otettiin talteen 4 C:ssa ja pestiin kahdesti käyttämällä pesuliuksena fosfaatilla puskuroitua fysiologista suolaliuosta (PBS). Solupelletit otettiin talteen, homogenoitiin puskurissa, joka sisälsi 20 mmoolia/l vanadylikompleksia (Bethesda Research Laboratories) ja 0,2 %

Nonidet P-40, ja sentrifugoitiin 10 minuuttia nopeudella 14 000 min⁻¹ Beckman JS-13-roottorissa. RNA valmistettiin emäliuoksesta käyttämällä fenoli-kloroformiuuttoa ja saadulle kokonais-RNA:lle suoritettiin oligo-dT-affiniteettikromatografia, jotta saatiin mRNA.

Indusoitujen ja indusoimattomien solujen kokonais-mRNA-valmisteita käytettiin templaatteina cDNA-kirjastojen valmistukseen λ gt10:ssä, kuten julkaisussa (41) on selostettu, mutta toisen säikeen synteesi suoritettiin julkaisussa (42) kuvatulla menetelmällä. Saatuun cDNA:han liitettiin synteettinen oligonukleotidi (CCGGAATTCGG, Bethesda Research Laboratories) ja sen jälkeen katkaistiin EcoRI:llä. cDNA fraktioitiin koon mukaan ja puhdistettiin käyttämällä polyakryyliamidigeelejä ja sijoitettiin λ gt10:n EcoRI-kohtaan. Sekä indusoimattomasta että indusoidusta RNA:sta saatiin useita miljoonia faageja. Valmistettiin kolme jäljennöskalvoa ja faagit seulottiin kohtalaisen ankarissa olosuhteissa (6 x SSC, 35 C) käyttämällä 5'-päästä leimattua seosta, jossa oli 16 kappaletta 14-meerisiä oligonukleotideja, jotka oli valmistettu käyttämällä piikin 5b aminohappoja 31 - 35 koodittavan sekvenssin käänteistä komplementtia (ks. kuvio 14).

Ile-His-Asn-Phe-Asn-Ile-Asn-Tyr

CAT	AAT	TTT	AAT	AT
C	C	C	C	

Koetin	3'GTA	TTA	AAA	TTA	TA
	G	G	G	G	

Tulokset

Bakterisidisen tekijän sijainti solujen eri alajakeissa

Jotta saataisiin selville, missä solujen alajakeessa ADBF sijaitsee neutrofiileissä, neutrofiilit fraktioitiin käyttämäl-

lä julkaisussa (8) selostettua menetelmää. Neutrofiilit käsiteltiin 5 mM di-isopropyylifluorifosfaattipitoisuudella (DFP) ennen fraktiointia, koska DFP:n, joka on voimakas seriiniproteaasien inhibiittori, on osoitettu estävän proteolyysiä hyvin tehokkaasti polymorfonukleaaristen leukosyyttien (PMN) uutteissa (17, 18). 10⁹ DFP:llä käsiteltyä solua rikottiin typpikavitaatiolla ja tumienulkoisen emäliuos sentrifugoitiin käyttämällä epäjatkuvaa Percoll-tiheysgradienttia. Gradientin jokaisesta jakeesta määritettiin spesifiset merkit, jotka edustavat atsuropiilisiä jyväsiä (myeloperoksidaasi), spesifisiä jyväsiä (vitamiinia B12 sitova proteiini) ja solukalvoa (emäsfosfataasi). Kuten kuviosta 1 voidaan havaita, menetelmä johti näiden kolmen osaston tehokkaaseen erottumiseen toisistaan. Atsuropiiliset jyväset eivät osoittaneet mitään spesifistä jyväsistä tai solukalvosta aiheutuvaa kontaminoitumista. Spesifiset jyväset eivät olleet solukalvojen kontaminoimia, mutta niissä oli kyllä hieman atsuropiilisten jyvästen aiheuttamaa kontaminaatiota, mitä osoittaa se, että tässä piikissä on läsnä 10 % myeloperoksidaasista.

Bakterisidinen aktiivisuus, joka saatiin uuttamalla soluja keet pH-arvossa 2,0, jakautui taulukossa I esitetyllä tavalla.

Taulukko I

Bakterisidisen tekijän (BF) sijainti ihmisen neutrofiileissä

Puhdistusvaihe	Tilavuus (ml)	Proteiinia (mg/ml)	K.U. ^a	S.A. ^b	Saanto (%)
Kavitaatti	9,8	0,6	1500	2500	100
Pelletti	2,0	0,6	450	750	6
S1 ^c	8,8	0,46	1280	2780	97
S2 ^d	8,0	0,26	6,5	25	0,8
γ (solukalvo)	3,0	0,13	4,0	30	0,4
β (spesifiset jyvät)	3,0	0,21	2,5	12,5	4,5
α (atsurofiiliset jyvät)	3,0	0,20	1430	7140	86

a

Tappavan aktiivisuuden yksikköä

b

Ominaisaktiivisuus (KU/mg proteiinia)

c

Tumienulkoisen emäliuos

d

Sytosoli

Suurin osa kavitaatin aktiivisuudesta oli läsnä tumienulkoisessa emäliuoksessa (S₁). 6 % aktiivisuudesta liittyi tumajakeeseen johtuen luultavasti muutamien jyväsarten tarttumista tumiin. Bakterisidisen tekijän sijaintia jyväsakeessa osoitti lisäksi ominaisaktiivisuus, joka oli kaksinkertainen verrattuna fraktioimattoman kavitaatin ominaisaktiivisuuteen.

Kuten kuvioista 1 ilmenee, oli yli 90 % bakterisidistä tekijästä läsnä atsuropiilisten jyvästen jakeessa. Spesifisten jyvästen jakeessa oleva pieni aktiivisuustaso saattoi johtua atsuropiilisten jyvästen 10-prosenttisesta kontaminaatiosta, joka havaittiin myeloperoksidiasimäärityksellä (ks. kuvio 1). Todellakin noin 10 kertaa enemmän spesifisten jyvästen jakeen proteiinia kuin atsuropiilisten jyvästen jakeen proteiinia tarvittiin tuhoamaan 50 % bakteereista (ikkuna kuviossa 1). Jotta saataisiin selville bakterisidisen tekijän (BF) sijainti HL60-solujen alajakeissa, DFP:llä käsitellyt HL60-solut fraktioitiin samoin, kuin DFP:llä käsiteltyjen neutrofiilien kohdalla on selostettu. Jokaisesta Percoll-gradientin jakeesta analysoitiin bakterisidinen ja fungisidinen aktiivisuus. Kuten kuvioista 2 voidaan havaita, HL60-solujen jyväsprofiili eroaa neutrofiilien jyväsprofiilista, mikä mahdollisesti heijastaa sitä, että HL60-solut ovat erilaistumattomia neutrofiilien prekursorisoluja. Bakterisidinen ja fungisidinen aktiivisuus olivat korkeimmat jakeissa 20 - 22. Nämä jakeet vastasivat myös korkeimpia myeloperoksidiasimäärityksiä.

Bakterisidisten tekijöiden yhteys kalvoon

Jotta saataisiin paikannetuksi atsuropiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) sijainti neutrofiilien atsuropiilissä jyväsissä, ehjät puhdistetut jyvässet lysoitiin neutraalissa pH:ssa käyttämällä toistettua jäädytys-sulatusta ja sonikointia.

Rikotut jyvässet sentrifugoitiin ja jyvästen liukoinen sisus erotettiin pelettoituneista jyvästen kalvoista. Näissä olosuhteissa yli 90 % beeta-glukuronidaasista ja myeloperoksidiasista löytyi emäliuosjakeesta (tuloksia ei ole piirretty esiin). Sen sijaan 98 % ADBF:stä oli yhteydessä atsuropiilikalvoihin, kuten kuvioista 3 ilmenee. HL60-solujen epäpuhtaiden jyväsuohteiden tarkastelu osoitti myös sitä, että bakterisidinen tekijä (BF) on yhteydessä kalvoon (tuloksia ei ole piirretty esiin).

Useiden eri aineiden kykyä vapauttaa ADBF atsuofiilikalvoista tutkittiin myös. ADBF-aktiivisuus mitattiin emäliuoksesta ja atsuofiilikalvojen sentrifugoinnilla saatu pelletti käsiteltiin puskureilla, joiden pH vaihteli. Kuviosta 4 ilmenee, että alle 10 % ADBF-aktiivisuudesta vapautui kalvosta pH-alueella 5,0 - 7,0, 50 % pH:ssa 4,0 ja 100 % pH-alueella 2,0 - 3,0. Bakterisidisen tekijän uutto ehjistä atsuofiilistä jyväsistä noudatti samaa pH-käyrää (tuloksia ei ole piirretty esiin). Sitten testattiin muita aineita, joita tavallisesti käytetään kalvojen sisältämien ulkoisten ja rakenteellisten proteiinien liuottamiseen (ks. taulukko II jäljempänä). 50 mikrolitraa atsuofiilikalvoja (0,5 mikrogrammaa proteiinia/mikrolitra) inkuboitiin 25 °C:ssa 40 minuuttia 200 mikrolit-rassa kutakin edellä mainituista aineista. Sen jälkeen sentrifugoitiin 20 minuuttia kiihtyvyydellä 10 000 x g (4 °C), emäliuokset otettiin talteen, dialysoitiin 0,05 M sitraattia, pH 5,5, vasten ja proteiini ja bakterisidinen aktiivisuus mitattiin. Pelletit pestiin 3 kertaa jääkylmällä 0,05 M fosfaatilla, pH 7,0, inkuboitiin 40 minuuttia 25 °C:ssa 0,05 M glysiinin, pH 2,0, kanssa, sentrifugoitiin ja emäliuoksista mitattiin proteiini ja tappava aktiivisuus. Atsuofiilisten kalvojen Triton X-114-käsittelyssä noudatettiin julkaisussa (19) selostettua menetelmää.

Taulukko II

pH:n ionivahvuuden ja eri pinta-aktiivisten aineiden vaikutus ADBF:n vapautumiseen atsuropiilikalvosta

Atsuropiilikalvojen käsittelyssä käytetyt aineet:		Emäliuokseen vapautuneen materiaalin bakterisidinen aktiivisuus	Pellettiin jääneen materiaalin bakterisidinen aktiivisuus
Puskuri	Lisäaineet	(tappavaa yksikköä)	(tappavaa yksikköä)
0,05 M glysiini pH 2,0	-	1430	<10
0,05 M sitraatti pH 5,5	-	20	1190
0,1 M natriumbikarbonaatti, pH 11,0	-	<10	1100
0,05 M fosfaatti pH 7,0	2 M NaCl	<10	820
Ei mitään	6 M urea	<10	1310
0,05 M fosfaatti pH 7,0	1 % Triton X-100	1310	<10
0,01 M Tris pH 7,4	0,15 M NaCl 0,05 % Triton X-114	170 ^a 1200 ^b	N/A ^c

- a
vesifaasi
- b
pinta-aktiivisen aineen faasi
- c
ei sovellu

Taulukosta II voidaan havaita, että atsurofiilisten kalvojen käsittely 1-prosenttisella Triton X-100:lla vapautti ADBF-aktiivisuutta yhtä tehokkaasti kuin happo. Sitä vastoin ei 6 M urea eikä 0,1 M natriumbikarbonaatti, pH 11, vapauttanut bakterisidista tekijää jyväsien kalvosta.

Triton X-144:ää on käytetty eristettyihin kalvoihin tai kokonaisiin soluihin kalvojen rakenteellisten proteiinien erottamiseen hydrofiilisistä proteiineista; hydrofiiliset proteiinit saadaan talteen vesifaasissa, kun taas amfiifiiliset kalvoon integroituneet proteiinit löytyvät pinta-aktiivisen aineen faasista sen jälkeen, kun tämä pinta-aktiivinen aine on erotettu 20 °C:ssa tai korkeammassa lämpötilassa faasinerotuksella (19,20). Kun atsurofiilikalvot uutettiin Triton X-144:llä, 87 % ADBF:stä erottui pinta-aktiivisen aineen faasiin.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) in vitro-aktiivisuus riippuu atsurofiilikalvosta vapautumisesta

Atsurofiilikalvot käsiteltiin pH-arvossa 2,0, joka liuottaa ADBF:n, tai pH-arvossa 5,5, joka edustaa lysosomiensisäistä pH:ta (21 - 23), mutta ei vapauta ADBF:ää kalvosta (ks. kuvio 4). Sitten bakterisidinen aktiivisuus mitattiin pH-arvossa 5,5 kokonaisista kalvoista sekä emälius- ja pellettijakeista, jotka oli saatu sentrifugoimalla kalvoista, jotka oli käsitelty kummassakin pH-arvossa. pH-arvossa 5,5 käsitellyistä kalvoista saadun ADBF:n (kalvoon sitoutunut ADBF, aktiivisuus 1 tappava yksikkö) aktiivisuus oli 1/10 pH-arvossa 2,0 käsitellyistä kalvoista saadun ADBF:n aktiivisuudesta (liukoinen

ADBF; aktiivisuus 11,6 tappavaa yksikköä). Bakterisidinen aktiivisuus voitiin saada lähes täydellisesti talteen pH-arvossa 5,5 käsitellyistä kalvoista, kun ne uutettiin uudelleen pH-arvossa 2,0 (ks. taulukko II edellä).

Annoksen, ajan, bakteerin kasvuvaiheen ja puskurin vaikutus

ADBF-aktiivisuus oli lineaarinen suhteessa proteiinikonsentraatioon alueella 0,3 - 30 mikrogrammaa/ml (kuvio 1 sekä muut tulokset, joita ei ole esitetty kuvissa). Bakteripitoisuuden vaikutus on esitetty kuviossa 5: aina lukumäärään 10⁷ bakteria/ml voitiin bakteerit tappaa määrällä 30 mikrogrammaa/ml ADBF:ää sisältävää uutetta 30 minuutissa 37 °C:ssa. Tuhoutuminen oli nopeata: 50 % soluista kuoli 5 minuutissa 37 °C:ssa käytettäessä sellaista atsuropiilisten jyvasten uutetta, joka sisälsi 1,4 mikrogrammaa proteiinia/ml (kuvio 6). Kokeessa inkuboitujen bakteerien fysiologinen tila ei vaikuttanut niiden alttiuteen ADBF:n suhteen. Näin ollen eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa ja stationäärisessä kasvuvaiheessa olevat bakteerit olivat yhtä herkkiä. Glukoosin (20 mmoolia/l) lisääminen inkubointiväliaineeseen ei vaikuttanut ADBF-aktiivisuuteen. ADBF:n tappava aktiivisuus oli suunnilleen sama, kun puskurina käytettiin sitraattia, asetaattia tai fosfaattia (tuloksia ei ole esitetty).

pH:n ja kahdenarvoisten kationien vaikutus

Koska on osoitettu, että fagosomit saavuttavat nopeasti pH-arvon 5,5 ja pitävät sitä yllä tappaessaan bakteereita solunsisäisesti in vivo (21 - 23), pH:n vaikutusta ADBF:n ja BF:n bakterisidiseen aktiivisuuteen tutkittiin in vitro. ADBF ja BF olivat tehokkaita laajalla pH-alueella (5,0 - 8,0) (kuviot 7 ja 8 vastaavasti). Alustoja, jotka olivat happamampia kuin pH 5,0, ja jotka siis ovat bakterisidisiä per se, ei voitu käyttää ADBF:n tappavan vaikutuksen testaamiseen.

Koska ionit, kuten Mg^{2+} ja Ca^{2+} ovat oleellisen tärkeitä fagossyöttisissä prosesseissa (24) ja vaikuttavat myös gram-negatiivisten bakteerien pintaominaisuuksiin (25), myös näiden ionien vaikutusta ADBF:n ja BF:n bakterisidiseen aktiivisuuteen tutkittiin. Mg^{2+} -ionit antagonisoivat, mutta eivät täydellisesti salvanneet ADBF-aktiivisuutta. Mg^{2+} -ionien vaikutus oli maksimaalinen pitoisuudessa 1 mmoolia/l niin, että bakterisidinen aktiivisuus aleni 25 %:lla (tuloksia ei ole esitetty kuvioissa). Sitä vastoin Ca^{2+} -ionit inhiboivat kaiken ADBF- ja BF-aktiivisuuden konsentraatioissa 25 mmoolia/l ja 20 mmoolia/l (kuviot 9 ja 10 vastaavasti). Bakterisidisen aktiivisuuden väheneminen oli karkeasti ottaen lineaarinen kalsiumkonsentraatioalueella 1 - 25 mmoolia/l. Koska näissä kokeissa käytetty väliaine sisältää sitraattia, joka kelatoi kahdenarvoisia kationeja, vapaiden kationien konsentraatio liuoksessa on alempi kuin nimellinen konsentraatio. Sitraatti ei kuitenkaan sido merkittäviä määriä magnesiumia eikä kalsiumia matalassa pH:ssa (26). EDTA:n (1 - 25 mmoolia/l) lisääminen inkubointiväliaineeseen (kelatoimaan kationeja) ei vaikuttanut ADBF- eikä BF-aktiivisuuteen (tuloksia ei ole esitetty kuvioissa). Natriumkloridi inhiboi konsentraatiossa, joka oli 0,3 moolia/l tai enemmän (kuvio 11). Natriumkloridi tai kaliumkloridi ei inhiboinut ADBF-aktiivisuutta fysiologisina konsentraatioina, kun ADBF-konsentraatio oli 2,8 mikrogrammaa/ml tai suurempi.

Atsuofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) bakteereja tappavan vaikutuksen spektri

ADBF tappaa sekä gram-positiivisia että gram-negatiivisia bakteereita (ks. taulukko III).

Taulukko III

ADBF:n bakteerientuhoamisspektri

Organismi	Kanta tai tyyppi	ADBF-aktiivisuus ^a
Staphylococcus aureus	S27	+
Staphylococcus aureus	450	+
Staphylococcus aureus	TSS-1 ^b	+
Staphylococcus aureus	TSS-2 ^b	+
Streptococcus pneumoniae	Tyyppi III	-
Streptococcus pneumoniae	Tyyppi II	+
Streptococcus pneumoniae	R6	+
Listeria monocytogenes	450	(+)
Pseudomonas aeruginosa	PAC	+
Pseudomonas aeruginosa	PAO 103-0	+
Salmonella typhimurium	LT2	+
Escherichia coli K12	MC 4100	+

a

ADBF-aktiivisuus luokitellaan mikrogrammoina/ml⁵ atsuofiili-
 uutteen proteiinia, joka tarvitaan tappamaan 10⁵ bakteeria
 30 minuutissa 37 °C:ssa: +, 0,1 - 0,3 µg/ml; (+), 1 -
 2,5 µg/ml; -, 20 µg/ml.

b

Kliiniset eristeet, jotka oli saatu kahdelta potilaalta,
 joilla oli toksisen shokin oireyhtymä.

Gram-positiivisia bakteereita, jotka kuolivat ADBF:n vaikutuksesta, olivat erilaiset Staphylococcus aureus-kannat (kaksi eristettä potilaista, joilla oli toksisen shokin oireyhtymä), beeta-hemolyyttiset streptokokit (lukuunottamatta tyyppiä III olevaa kapseloitunutta Streptococcus-bakteeria) ja jossakin määrin Listeria monocytogenes. Kaikki testatut gram-negatiiviset bakteerit kuolivat yhtä tehokkaasti kuin E. coli.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) fungisidinen aktiivisuus

Kuviosta 12 ilmenee, että ADBF:llä on fungisidista vaikutusta alueella noin 3,0 mikrogrammaa/l - noin 16,0 mikrogrammaa/ml.

Atsurofiileistä johdetun bakterisidisen tekijän (ADBF) puhdistus

ADBF-uutteelle suoritettu käänteisfaasi-HPLC (RPHPLC) tuotti toistettavissa olevan profiilin, joka sisälsi vähintään 9 tunnusomaista piikkiä, joista jotkin esiintyvät dubletteina (ks. kuvio 13A). Kun jokaisesta jakeesta poistettiin käänteisfaasiliuottimet kuivaamalla ja jäännös uudelleensuspendoitiin ja analysoitiin, voitiin tunnistaa kaksi aktiivisuuspiikkiä, jotka on merkitty vinoviivoituksella kuvioon 13A. Ensimmäinen aktiivisuuspiikki peittää kaksi suurta UV-piikkiä, jotka on nimetty piikkeiksi 5 ja 6, ja toinen aktiivisuuspiikki liittyy yhteen UV-piikkiin, joka on nimetty piikiksi 9. Piikin 5 aminohapposekvenssi paljasti kaksi proteiinia, joista toisen sekvenssi edusti lysotsyymiä (5a) ja toisen (5b) N-terminaalinen sekvenssi on esitetty kuviossa 14. Piikki 6 sisälsi yhden ainoan uuden sekvenssin, jolla oli homologiaa trypsiinin superperheen kanssa (ks. kuvio 14). Piikki 9 sisälsi vähintään kaksi proteiinia, jotka olivat 9a ja 9b, ja joiden sekvenssit on esitetty kuviossa 14.

Koska sekvenssit 5b ja 9b ovat identtiset, ja koska molemmat sekvenssit ovat yhteydessä bakterisidiseen aktiivisuuteen, hakijat arvelevet, että tämä sekvenssi yhdessä sekvenssin 9a kanssa on vastuussa tällaisesta bakterisidisestä aktiivisuudesta.

ADBF-aktiivisuus puhdistettiin osittain molekyylimassajakautumaan perustuvalla eksklusiokromatografialla käyttämällä Bio-Sil TSK-125-pylvästä (ks. kuvio 15). Fungisidinen ja bakterisidinen aktiivisuus eluoituivat pylvästä yhdessä kahtena aktiivisuuspiikkinä, joista pääpiikki eluoitui alueella 50 - 60 kD (jakeet 31 ja 32) ja pienempi piikki alueella 10 - 20 kD (jakeet 42). TSK-eksklusiokromatografiassa käytetty lähtömateriali (ADBF) ja TSK-eksklusiokromatografialla saadut jakeet analysoitiin polyakryyliamidigeelielektroforeesilla (15 %), jonka tulos on esitetty kuviossa 16.

50 - 60 kD:n eksklusiopiikille (jakeet 31 - 32) suoritettu käänteisfaasi-HPLC tuotti 2 aktiivisuuspiikkiä, jotka olivat piikit 4, 5 ja 6 kattavaan alueeseen liittyvä vähäisemmän aktiivisuuden piikki ja piikkiin 9 liittyvä pääaktiivisuuden piikki (kuvio 13B). Piikin 4 aminohappojärjestyksen määrittäminen osoittaa identtisyyttä ihmisen katepsiini G:n kanssa (ks. kuvio 14). Piikki 9 vastasi yhtä ainutta N-terminaalista sekvenssiä, joka on merkitty 9A:ksi kuviossa 14. Puhdistetun piikin 9a aminohappokoostumus on esitetty seuraavassa taulukossa IV.

Taulukko IV

Puhdistetun piikin 9a aminohappoanalyysi

<u>Aminohappo</u>	<u>Mooli-%</u>
Asp	7,3
Glu	7,4
Ser	8,8

Gly	7,3
His	1,8
Arg	4,7
Thr	4,2
Ala	11,2
Pro	6,2
Tyr	2,6
Val	8,1
Met	2,5
Ile	5,1
Leu	10,4
Phe	5,5
Lys	7,3

Piikin 9 SDS-PAGE-analyysi (10 %) osoittaa, että pääproteiini-vyöhykkeen molekyylimassa on noin 54 000 daltonia (kuvio 17) .

10 - 20 kD:n eksklusiopiikille (jake 42) suoritettu käänteis-faasi-HPLC tuotti yhden ainoan aktiivisuuspiikin, joka liit-tyi piikkiin 5 (kuvio 13C), ja jolla oli yksi ainut N-termi-naalinen sekvenssi, joka oli identtinen 5b:n (kuvio 14) kans-sa. Piikin 5 SDS-PAGE-analyysi paljasti yhden ainoan vyöhyk-keen, jonka näennäinen molekyylimassa oli 13 000 daltonia (ks. kuvio 18).

TSK-eksklusiokromatografialla saatiin aikaan parempi erotus-kyky, kun käytettiin puskuria, jossa oli 50 mM glysiiniä, pH 2, ja 500 mmoolia/l NaCl (ks. kuvio 21). Näissä olosuhteissa saavutettiin 54 kD:n vyöhykkeen lähes täydellinen erottuminen 29 kD:n vyöhykkeistä. Aktiivisuusprofiilit osoittivat, että 54 kD:n proteiinilla (jakeet 34 - 36) oli vain bakterisidista aktiivisuutta eikä lainkaan fungisidista aktiivisuutta. Alue, joka sisälsi pääasiallisesti kaksi proteiinia, joiden mole-kyylimassat olivat vastaavasti 13 kD ja 18 kD (jakeet 42 - 45), sisälsivät suurimman osan fungisidisesta vaikutuksesta ja lisäksi bakterisidista aktiivisuutta. Kuvio 22 esittää näiden kahden eri jakeen SDS-PAGE-tuloksia.

HL60-soluista johdettu bakterisidinen tekijä (BF) puhdistettiin jyväsistä (kerätty talteen Percoll-gradienttisentrifugoinnin jälkeen) TSK-ekskluusiokromatografialla ja käänteisfaasi-HPLC:llä, joita on selostettu ADBF:n yhteydessä. Käänteisfaasi-HPLC (kuvio 19) paljasti aktiivisuuspiikin, joka sekvenssianalyysin mukaan vastasi sekvenssiä 9a (kuvio 14) sisältäen kontaminaationa hieman elastaasia (piikki 8).

Ihmisen HL60-cDNA-kirjastot seulottiin koettimella, joka oli johdettu sekvenssistä, joka vastasi piikin 5b aminohappoja 31 - 35, kuten edellä on selostettu. 16 kloonina puhdistettiin indusoidusta kirjastosta plakkien avulla. Kukin kloonin katkaistiin Sau3a-entsyymillä ja fragmentit sijoitettiin yksisäikeiseen faasiin M13. Faagit seulottiin hybridisoimalla 14-meerikoosteen kanssa ja positiiviset M13-faagit sekventoitiin käyttämällä julkaisussa (43) kuvattua dideoksiketjunktakaisumenetelmää. Yksi näistä klooneista, P-7, sisälsi sekvenssin, joka sopi tarkalleen yhteen proteiinin sekvenssin perusteella ennustetun sekvenssin kanssa aminohappojen 13 ja 14 välissä olevaan kohtaan asti, johon väliin oli sijoitettuna synteettinen oligonukleotidi. Klooonin P-7 EcoRI-fragmentilla seulottiin indusoidun kirjasto uudestaan, ja näin saatiin eristetyiksi 8 cDNA-kloonina. Yksi näistä klooneista, P-FL2, sijoitettiin M13-vektoreihin ja sekventoitiin. Myös toinen cDNA-kloonin (P-FL1) sekventoitiin. Se oli identtinen PFL2:n kanssa paitsi, että sen 5'-pää alkoi kohdasta, joka oli 43 emäsparin päässä klooonin P-FL2 5'-päästä.

Molemmat kloonit (P-FL1 ja P-FL2) sisältävät avoimen lukuvaiheistuksen, joka koodittaa 220 aminohappoa ennustetun molekyylimassan ollessa 24 823 (kuvio 20). Läsä on tyypen sitoutuvan glykosyloitumisen kohta (Asn-85), joka saattaa jottaa suurempaan molekyyliin. Tähteet Thr₁₀₀-Ile₁₄₄ vastaavat tarkalleen piikille 5b saatua aminoterminaalista sekvenssiä. Molekyylin C-terminaalisen osan (Thr₁₀₅- Tyr₂₂₀) odotettu molekyylimassa on 12 867, joka vastaa piikin 5b odotettua näennäistä molekyylimassaa SDS-PAGE-analyysin mukaan.

Tarkastelua

Hirschin suorittamista varhaisista tutkimuksista (27 - 29) lähtien on selostettu useita neutrofiileihin liittyviä bakterisidisia proteiineja, jotka joissakin tapauksissa on eristetty (7, 18, 30 - 34). Näiden tai muiden ihmisen neutrofiileistä johdettujen bakterisidisten proteiinien sijaintia solujen eri alajakeissa ei ole tähän mennessä selvitetty. Kuten esillä olevassa selostuksessa on mainittu, ihmisen neutrofiilit käsiteltiin DFP:llä proteolyysin estämiseksi. Nämä käsitellyt neutrofiilit fraktioitiin käyttämällä periaatetta, joka johtaa sytosolin, solukalvon, spesifisten jyvästen ja atsuofiilisten jyvästen selvään erottumiseen toisistaan niin, että proteolyysi oli mahdollisimman vähäistä tai jyvästen eheys ja tiheys säilyivät mahdollisimman tarkkaan. ADBF:n uuton ja määrityksen optimaaliset olosuhteet määritettiin: ADBF uuttui maksimaalisesti pH-alueella 2,0 - 3,0 ja sen paras määrittäjä-pH oli 5,5 (fagolysosomaalinen pH). Kaikki solun osastot seulottiin näissä olosuhteissa ja havaittiin, että suurin osa bakterisidisestä aktiivisuudesta (97 %) liittyi tumienulkoiseen emäliuokseen (S_1) ja noin 90 % aktiivisuudesta seurasi atsuofiilijyväs populaation kanssa, kun S_1 sentrifugoitiin Percoll-tiheysgradien-teissa. Sytosolijakeessa tai solukalvojakeessa ei ollut merkittävää aktiivisuutta. Spesifisten jyvästen osoittama pieni aktiivisuustaso (5 - 10 %) voitiin katsoa johtuvaksi tämän jakeen kontaminoitumisesta 5 - 10 %:lla myeloperoksidaasipositiivisia atsuofiilisiä jyväsiä. Tuloksista ilmeni vain yksi sijaintipaikka ihmisen neutrofiilien bakterisidiselle tekijälle (BF) ja se oli atsuofiilinen jyvänen.

Näitä tuloksia tukee se, että ihmisen neutrofiileistä löytyi yksi ainut sijaintipaikka ADBF:lle niin, että bakterisidinen aktiivisuus sijaitsi vain suuressa, myeloperoksidaasipositiivisessa jyväs populaatiossa (35). Lisäksi kirjallisuudesta löytyy maininta siitä, että yksi neutrofiileistä johdetuista

bakterisidististä tekijöistä (BPI) voidaan saada talteen (90 %) atsufofiilisiä jyväsia sisältävistä solujakeista (36). Sitä vastoin Rest et al. (37) ovat löytäneet bakterisidisen tekijän ihmisen neutrofiilien sekä atsufofiilististä että spesifi-
sistä jyväsistä. Koska he käyttivät erilaista fraktiointitekniikkaa (homogenointi sakkaroosissa ja isopykninen sentrifugointi sakkaroositiheysgradien-teissa) sekä erilaisia uutto- ja mittausmenetelmiä, heidän tuloksensa eivät ole suoraan verrattavissa tässä selostettuihin tuloksiin.

ADBF on yhteydessä atsufofiilikalvoon. Kun atsufofiiliset jyvässet lysoitiin neutraalissa pH:ssa, joka liuotti 90 % myeloperoksidaasista, 90 % ADBF:stä jäi kalvopellettiin. Kaikki kalvoon liittyvä ADBF voitiin uuttaa pH-arvossa 2,0 ja saada liuosmuotoon, kun hapolla käsitelty kalvo sentrifugoitiin pois. Mahdollisia selityksiä hapon liuottavalle vaikutukselle ovat: (1) happo indusoi proteolyyttisen tapahtuman; (2) happo indusoi konformaatiomuutoksia, jotka rikkovat ADBF:n ja jyväs-sen kalvon välisen yhteyden; tai (3) happo muuttaa ADBF:n ja kalvon välillä vallitsevaa varausvuorovaikutusta. ADBF:n liuottamiseen ei aivan välttämättä tarvittu matalaa pH:ta. Triton X-100 kykeni myös neutraalissa pH:ssa vapauttamaan ADBF:n. Aineet, joita yleisesti käytetään perifeeristen kalvoproteiinien liuottamiseen, kuten 2 M NaCl, 6 M urea tai 0,1 M natriumbikarbonaatti, jonka pH on 11, eivät kyenneet dissosioimaan ADBF:ää atsufofiilikalvosta. Tämä viittaa siihen että ADBF on tiukasti liittynyt atsufofiilikalvoon tai muodostaa sen rakenteeseen kuuluvan osan. Itse asiassa, kun atsufofiilikalvoja käsiteltiin Triton X-144:llä, ADBF käyttäytyi kuten kalvon rakenneosa sikäli, että se hakeutui pintaaktiivisen aineen faasiin.

Kantaa otetaan myös siihen kysymykseen, onko bakterisidisen tekijän vapautuminen kalvosta tarpeen bakterisidisen aktiivisuuden ilmenemiseksi. Kalvoon sitoutuneen ADBF:n aktiivisuus oli 1/10 liuenneen ADBF:n aktiivisuudesta, mikä viittaa in

vitro-olosuhteissa ADBF:n liuosmuodossa olemisen ja aktiivisuuden väliseen yhteyteen. ADBF:n in vivo-aktivoitumisen mekanismeista ei vielä tunneta.

Tässä selostettujen paikannustulosten perusteella siis käytettiin ADBF:n lähteenä ehjiä, puhdistettuja atsuropiilisiä jyväsia ja niiden ominaisuuksia tutkittiin. Tämä on muuta kuin aiemmissa toteutuksissa, joissa bakterisidiset proteiinit saatiin heterogeenisestä, jyvästen suhteen rikastetusta jakeesta uuttamalla hapolla pitkään (7, 18, 31) niin, ettei läsnä ollut proteaasien inhibiittoria (7, 31). ADBF muistuttaa joitakin aiemmin selostetuista bakterisidisistä proteiineista siinä, että se on hapolla uuttuvaa ja yhteydessä jyväsiiin. Erityisesti on ADBF:llä monia kanin neutrofiileistä johdetun fagosytiinin ominaisuuksia (28, 29, 38): (1) Testauksessa käytetyn väliaineen muutoksilla, kuten puskurin vaihtamisella, glukoosin lisäämisellä tai metalleja sitovan aineen lisäämisellä on vain vähäinen vaikutus ADBF:n bakterisidiseen aktiivisuuteen; ja (2) sen tuhoava vaikutus ei edellyttänyt kahdenarvoisia kationeja (Mg^{2+} , Ca^{2+}) (suurina pitoisuuksina nämä ionit antagonisoivat tai Ca^{2+} :n tapauksessa inhiboivat bakterisidisen aktiivisuuden täysin, Ca^{2+} :n $-ID_{50}$ oli 10 mmoolia/l). Kuten fagosytiini, oli myös ADBF aktiivisempi matalassa pH:ssa (5,0 - 5,5), joka on arvioitu fagolysosomaalinen pH, kun bakteerit tuhoutuvat solunsisäisesti.

ADBF eroaa muista kirjallisuudessa mainituista, neutrofiileistä johdetuista mikrobeja tuhoavista proteiineista monin tavoin. ADBF on aktiivinen laajalla pH-alueella niin, että sen optimaalinen aktiivisuus ilmenee pH-arvossa 5,5, ja se on suhteellisen epäherkkä korkealle ionivahvuudelle. Tämä on toisin kuin bakteerien läpäisevyyttä lisäävällä tekijällä (BPI), jonka aktiivisuusoptimi on pH-arvossa 7,0, ja defensiineillä, jotka vaativat tarkalleen pH-alueita 7,0 - 8,0 sekä alhaista ionivahvuutta ollakseen bakterisidisesti aktiivisia (7, 31, 34, 35). Mikrobeja tuhoavan spektrinsä puolesta ADBF eroaa puhdistetuista tekijöistä, kuten BPI:stä tai mikrobeja

tuhoavista kationisista proteiineista, jotka ovat aktiivisia vain gram-negatiivisten bakteerien suhteen (18, 31, 34).

ADBF on erittäin aktiivista: 0,1 - 0,3 mikrogrammaa/ml kykeni tappamaan 10^5 bakteeria per ml, kun testeissä käytettiin monenlaisia organismeja (gram-negatiivisia ja gram-positiivisia bakteereita). Gram-negatiivisten bakteerien suhteen spesifisillä puhdistetuilla tekijöillä, kuten BPI:llä (31, 44) ja 57 kD:n suuruisella mikrobeja tuhoavalla kationisella proteiinilla (18) on ADBF:ään verrattava aktiivisuus, kun taas muut, kuten defensiinit, näyttävät olevan aktiivisia vain suuremmissa konsentraatioissa (50 mikrogrammaa/ml) sekä gram-positiivisten että gram-negatiivisten bakteerien suhteen (7, 34). Lisäksi ADBF tappaa bakteereita nopeasti: yli 50 % tuhoutuminen saavutetaan 5 minuutissa. ADBF:n tuhoava vaikutus ei myöskään näytä olevan yhteydessä vetyperoksidista riippuvaisiin systeemeihin, koska katalaasi (500 yksikköä/ml) ei vähennä sen aktiivisuutta merkittävästi (tuloksia ei ole esitetty), ja koska yli 90 % myeloperoksidaasista vapautuu liukoiseen jakeeseen, kun kalvo-ADBF eristetään.

ADBF:lle suoritettu käänteisfaasi-HPLC-määritys paljastaa 9 pääproteiinipiikkiä, jotka sisältävät vähintään 10 eri polypeptidiä. Useat sisältävät aminoterminaalaisia sekvenssejä, jotka ovat identtisiä ennestään tunnetuissa polypeptideissä tavattujen kanssa:

Piikki 1	Defensiini
Piikki 4	Katepsiini G
Piikki 5a	Lysotsyymi
Piikki 8	Elastaasi
Piikki 9a	Bakterisidinen läpäisevyyttä lisäävä proteiini (BPI)

Aktiivisuusprofiileissa, jotka saatiin atsuromiiliijyväsui-
teen käänteis-HPLC-jakeille sekä osittain puhdistetulle
ADBF:lle, liittyi *E. colia* tappava vaikutus piikkeihin 5b ja
9a. Näin ollen voidaan tunnistaa kaksi puhdistettua polypep-
tidiä, joilla on selvästi erotettavat aminoterminaaliset sek-
venssit. BPI, kuten kirjallisuudessa on selostettu (31, 44),
on aktiivinen vain gram-negatiivisten bakteerien suhteen.

Piikistä 5b johdetusta aminohappojärjestyksestä kloonattiin
uusi täyspitkä cDNA, joka koodittaa 220 aminohapon polypepti-
diä, jonka ennustettu molekyyliassa on 24 823. Tämä proteiini
edustaa piikin 5b edustaman 13 kD:n polypeptidin prekur-
soria, joka saattaa prosessoitua neutrofiilissä tai puhdis-
tuksen aikana. Se, että piikin 5b sekvenssi ilmenee myös pii-
kissä 9 (nimeltään sekvenssi 9b kuviossa 14) voidaan selittää
eri tavoin: 1) hajoaminen C-päässä; 2) erot konformaatioissa;
tai 3) N-terminaalaisesti salpautuneen prekursorin prosessoii-
tuminen pylvään jälkeen.

Koska kypsiä polymorfonukleaarisia leukosyyttejä ei voida
kasvattaa pitkään soluviljelmänä, tutkittiin neutrofiilien
prekursorisolujen käyttöä bakterisidisten tekijöiden tuotan-
toon. HL60-soluista johdetun bakterisidisen tekijän (BF) tut-
kimus paljasti erilaisen jyväsprofiilin, kuin neutrofiileistä
saatiin, kun erotus suoritettiin Percoll-gradienteissa. Läsä
oli kuitenkin sellainen bakterisidisen tai fungisidisen ak-
tiivisuuden piikki, joka asettui päällekkäin myeloperoksidaa-
siaktiivisuuspiikin kanssa (kypsien neutrofiilien sisältämien
atsurofiilisten jyväsien merkki). HL60-soluista johdetun BF:n
ja ADBF:n aktiivisuudet ovat oleellisesti ottaen identtiset,
mitä tulee voimakkuuteen (nanogrammoja per ml vaaditaan tu-
hoamaan tietty bakteerimäärä), pH-aktiivisuusprofiiliin,
herkkyyteen CaCl_2 :lle, vaeltamiseen Superose 12 FPLC-ekskluu-
siokromatografiassa sekä olemiseen yhteydessä kalvoon. Näin
ollen bakterisidisen tekijän (BF) tuottaminen HL60-soluista
tarjoaa vaihtoehtoisen keinon tuottaa suuria määriä bakteri-
sidista tekijää (BF) kaupallisiin käyttötarkoituksiin.

VIITEKIRJALLISUUTTA

1. Klebanoff, S.J. and R.A. Clark. 1978. The Neutrophil: function and clinical disorders. North-Holland Publishing Company. pp. 1-810.
2. Kaplan, E.L., T. Laxdal, and P.G. Quie. 1968. Studies of polymorphonuclear leukocytes from patients with chronic granulomatous disease of childhood: Bactericidal capacity for streptococci. *Pediatrics* 41:591-599.
3. Mandell, G.L. 1974. Bactericidal activity of aerobic and anaerobic polymorphonuclear neutrophils. *Infect. Immun.* 9:337-341.
4. Elsbach, P., and J. Weiss. 1983. A reevaluation of the roles of the O₂-dependent and O₂-independent microbicidal systems of phagocytes. *Rev. Infect. Dis.* 5:843-853.
5. Spitznagel, J.K., and W.M. Shafer. 1985. Neutrophil killing of bacteria by oxygen-independent mechanisms: A historical summary. *Rev. Infect. Dis.* 7:398-403.
6. Ganz, T., M.E. Selsted, D. Szklarek, S.S.L. Harwig, K. Daher, D.F. Bainton and R.I. Lehrer. 1985. Defensins, natural peptide antibiotics of human neutrophils. *J. Clin. Invest.* 76:1427-1435.
7. Selsted, M.E., S.S.L. Harwig, T. Ganz, J.W. Schilling and R.I. Lehrer. 1985. Primary Structures of Three Human Neutrophil Defensins. *J. Clin. Invest.* 76: 1436-1439.

8. Borregaard, N., J.M. Heiple, E.R. Simons, and R.A. Clark. 1983. Subcellular localization of the b-cytochrome component of the human neutrophil microbicidal oxidase: translocation during activation. *J. Cell Biol* 97:52-61.
9. Boyum, A. 1968. Separation of leukocytes from blood and bone marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 (Suppl.):77-89.
10. Lindhardt, K. and K. Walter. 1963. Phosphatases (phosphomonoesterases). In *Methods of Enzymic Analysis*. H.-U. Bergmeyer, editor. Academic Press, Inc., New York. 779-787.
11. Gottlieb, C., K.-S. Lau, L.R. Wasserman, and V. Herbert. 1965. Rapid charcoal assay for intrinsic factor (IF), gastric juice unsaturated B12 binding capacity, antibody to IF, and serum unsaturated B12 binding capacity. *Blood* 25:875-893.
12. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
13. Wang, C.S. and R.L. Smith. 1975. Lowry determination of protein in the presence of Triton X-100. *Anal. Biochem.* 63:414-417.
14. Bos, A., R. Wever, and D. Roos. 1978. Characterization and quantification of the peroxidase in human neutrophils. *Biochem. Biophys. Acta.* 525:37-44.

15. Tomasz, A. 1968. Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability, and loss of autolysis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 59:86-93.
16. Miller, J.H. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 137-140.
17. Amrein, P.C. and T.P. Stossel. 1980. Prevention of degradation of human polymorphonuclear leukocyte proteins by diisopropylfluorophosphate. Blood 56:442-447.
18. Shafter, W.M., L.E. Martin, and J.K. Sptiznagel. 1984. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropylflourophosphate. Infect. Immun. 49:29-35.
19. Bordier, C. 1981. Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. J. Biol. Chem. 256:1604-1607.
20. Lewis, V., S.A. Green, M. Marsh, P. Vihko, A. Helenius, and I. Mellman. 1985. Glycoproteins of the lysosomal membrane. J. Cell Biol. 100:1839-1847.
21. Geisow, M.J., P. D'Arcy Hart, and M.R. Young. 1981. Temporal changes of lysosome and phagosome pH during phagolysosome formation in macrophages: Studies by fluorescence spectroscopy. J. Cell. Biol. 89:645-652.

22. McNeil, P.L., L. Tanasugarn, J.B. Meigs, and D.K. Taylor. 1983. Acidification of phagosomes is initiated before lysosomal enzyme activity is detected. *J. Cell Biol.* 97:692-702.
23. Horwitz, M.A. and F.R. Maxfield. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes. *J. Cell Biol.* 99:1936-1943.
24. Silverstein, S.C., R.M. Steinman and Z.A. Cohn. 1977. Endocytosis. *Ann. Rev. Biochem.* 46:669-722.
25. Nikaido, H. and M. Vaara. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* 49:1-32.
26. Chaberek, S. and A.E. Martell. 1959. Organic sequestering agents. Wiley & Sons, editors. Chapman & Hall, New York. pp. 312-313.
27. Hirsch, J.G. 1956. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 103:589-611.
28. Hirsch, J.G. 1956. Studies of the bactericidal action of phagocytin. *J. Exp. Med.* 103:613-621.
29. Hirsch, J.G. 1960. Further studies on preparation and properties of phagocytin. *J. Exp. Med.* 111:323-337.

30. Zeya, H.I. and J.K. Spitznagel. 1963. Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: separation and identification. *Science* 142:1085-1087.
31. Weiss, J., P. Elsbach, I. Olsson, and H. Odeberg. 1978. Purification and characterization of a potent bactericidal and membrane active protein from the granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 253:2664-2672.
32. Elsbach, P., J. Weiss, R.C. Franson, S. Beckerdite-Quagliata, A. Schneider and L. Harris. 1979. Separation and purification of a potent bactericidal/permeability increasing protein and a closely associated phospholipase A_2 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *J. Biol. Chem.* 254:11000-11009.
33. Lehrer, R.I., K.M. Ladra, and R.B. Hake. 1975. Nonoxidative fungicidal mechanisms of mammalian granulocytes: demonstration of components with candidacidal activity in human, rabbit, and guinea pig leukocytes. *Infect. Immun.* 11:1226-1234.
34. Selsted, M.E., D. Szklarek, and R.I. Lehrer. 1984. Purification and antibacterial activity of antimicrobial peptides of rabbit granulocytes. *Infect. Immun.* 45:150-154.
35. Gennaro, R., B. Dewald, U. Horisberger, H.-U. Gubler, and M. Baggiolini. 1983. A novel type of cytoplasmic granule in bovine neutrophils. *J. Cell. Biol.* 96:1651-1661.

36. Weiss, J., T. Goldberg-Klein, and I. Olsson. 1986. Cellular and subcellular localization of the neutrophil bactericidal/permeability-increasing protein. Clin. Res. 34:537A (Abstr.).
37. Rest, R.F., M.H. Cooney, and J.K. Spitznagel. 1978. Bactericidal activity of specific and azurophil granules from human neutrophils: studies with outer-membrane mutants of Salmonella typhimurium LT-2. Infect. Immun. 19:131-137.
38. Cohn, Z.A. and J.G. Hirsch. 1960. The isolation of the specific granules of rabbit polymorphonuclear leucocytes. J. Exp. Med. 112:983-1003.
39. Collins, S.J., Gallo R.C., and Gallagher, R.E., 1977. Continuous growth and differentiation of human myeloid leukaemic cells in suspension culture. Nature 270: 347-349.
40. Collins, S.J., Ruscetti, F.W., Gallagher, R.E., and Gallo, R.C., 1978. Terminal differentiation of human promyelocytic leukemia cells induced by dimethyl sulfoxide and other polar compounds. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75: 2458-2462.
41. Huynh, T.V., et al., 1984. DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, Glover, D. ed., IRL, Oxford.
42. Gubler, V., et al., 1983. Gene 25: 263-269.
43. Smith, A.J.H., 1980. Meth. Enzym. 65: 560-580.

44. Ooi, C.E., et al., 1987. A 25-kDa NH₂-terminal Fragment Carriers All The Antibacterial Activities of the Human Neutrophil 60-kDa Bactericidal/Permeability-Increasing Protein, J. Biol. Chem. 252: 14891-14894.



Patenttivaatimukset

1. Mikrobin vastaisena aineena käyttökelpoinen aineseos, **tunnettu** siitä, että se sisältää vähintään kahta polypeptidiä, jotka on valittu ryhmästä, johon kuuluvat sellaiset ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidit, joiden näennäinen molekyylipaino on noin 3500 daltonia, noin 13 000 daltonia, noin 18 000 daltonia, noin 29 000 daltonia ja noin 54 000 daltonia, jolloin aineseoksella on respiratoorisesta purkauksesta riippumaton mikrobin vastainen vaikutus bakteereja ja sieniä vastaan pH-alueella noin 5,0 - 8,0 ja kalsiumionipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 10 mM, bakterisidinen vaikutus natriumkloridipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,3 M ja sieniä tappava vaikutus natriumkloridipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,15 M.

2. Menetelmä bakteerien ja sienien tappamiseksi, **tunnettu** siitä, että sienet ja bakteerit saatetaan kosketukseen patenttivaatimuksen 1 mukaisen aineseoksen bakteereja tai sieniä tappavan määrän kanssa.

3. Menetelmä mikrobin vastaisena aineena käyttökelpoisen aineseoksen valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että

- a) olennaisesti erotetaan polymorfonukleaarisia leukosyyttejä verestä paljon polymorfonukleaarisia leukosyyttejä sisältävän valmisteen aikaansaamiseksi,
- b) suspendoidaan paljon polymorfonukleaarisia leukosyyttejä sisältävä valmiste sopivaan puskuriin,
- c) käsitellään saatua polymorfonukleaarisia leukosyyttejä sisältävä suspensio sopivalla proteaasi-inhibiittorilla,
- d) käsitellään polymorfonukleaarisia leukosyyttejä sisältävä suspensio suspentoituneiden leukosyyttien liuottamiseksi,
- e) käsitellään saatua liuotettujen leukosyyttien suspensiota sopivalla kelatointiaineella,
- f) sentrifiguidaan käsiteltyä liuotettujen leukosyyttien suspensiota tuma/ehjäsolufaasin ja päällä olevan jälkitumanesteen aikaansaamiseksi,

- g) otetaan talteen päällä oleva jälkitumaneste,
- h) fraktioidaan päällä oleva jälkitumaneste tiheysgradientilla,
- i) otetaan talteen tiheysgradientin jae, joka sisältää atsu-rofiilijyväsia,
- j) suspendoidaan talteenotetut atsu-rofiilijyvaset puskuriin, jonka pH on noin 7,
- k) käsitellään saatua atsu-rofiilijyväsuspensiota uuttoreagenssilla, jonka pH on alle noin 8,0 ja joka kykenee liuottamaan atsu-rofiilikalvoproteiineja uuttavan reagenssin/atsurofiilimembraanisuspension aikaansaamiseksi,
- l) erotetaan uuttavan reagenssin/atsurofiilimembraanisuspensio kiinteän faasin ja päällä olevan nesteen muodostamiseksi, ja
- m) otetaan talteen päällä oleva neste.

4. Mikrobin vastaisena aineena käyttökelpoinen puhdistettu polypeptidi, **tunnettu** siitä, että se on ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidi, jolla on joko

- a) 24 823 daltonin ennakoitu molekyyllipaino ja kuviossa 20 esitetty aminohapposekvenssi,
- b) noin 18 000 daltonin näennäinen molekyyllipaino, tai
- c) noin 54 000 daltonin näennäinen molekyyllipaino, respiratorisesta purkauksesta riippumaton bakteerien vastainen vaikutus pH-alueella noin 5,0-8,0, kalsiumionipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 10 mM ja natriumkloridipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,3 M.

5. DNA-molekyyli, **tunnettu** siitä, että se koodaa patenttivaatimuksen 4b) polypeptidiä.

6. Menetelmä mikro-organismien tappamiseksi, **tunnettu** siitä, että mikro-organismi saatetaan kosketukseen patenttivaatimuksen 4 mukaisen polypeptidin mikro-organismeja tappavan määrän kanssa.

7. Vektori, **tunnettu** siitä, että se on patenttivaatimuksen 5 mukainen DNA-molekyyli, edullisesti plasmidi.

8. Isäntävektorisysteemi ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidin tuottamiseksi, jonka ennakoitu molekyylipaino on 24 823 daltonia tai osa siitä, **tunnettu** siitä, että se on patenttivaatimuksen 7 mukainen plasmidi sopivassa isännässä.

9. Menetelmä ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidin valmistamiseksi, jonka molekyylipaino on 24 823 daltonia tai osa siitä, **tunnettu** siitä, että kasvatetaan patenttivaatimuksen 8 mukaista isäntävektorijärjestelmää sopivissa olosuhteissa, jotka sallivat ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidin tuottamisen ja saadun ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidin talteenottamisen.

10. Menetelmä patenttivaatimuksen 4 mukaisen puhdistetun polypeptidin valmistamiseksi, **tunnettu** siitä, että

- a) viljellään neutrofiilisiä edeltäjäsoluja,
- b) otetaan viljellyt neutrofiiliset edeltäjäsolut talteen,
- c) suspendoidaan talteenotetut, viljellyt neutrofiiliset edeltäjäsolut sopivassa puskurissa,
- d) käsitellään saatua neutrofiilisten edeltäjäsolujen suspensiota, niin että saadaan liuenneiden neutrofiilisten edeltäjäsolujen suspensio,
- e) erotetaan liuotettujen neutrofiilisten edeltäjäsolujen käsitelty suspensio, niin että saadaan tumien ja ehjien solujen faasi sekä päällä oleva jälkitumaneste,
- f) otetaan talteen päällä oleva jälkitumaneste,
- g) käsitellään päällä olevaa jälkitumanestettä uuttoreagenssillä, jonka pH on alle noin 8,0 ja joka kykenee liuottamaan membraaniproteiineja, niin että saadaan uuttoreagenssifaasi ja liukenematon membraanifaasi,
- h) erotetaan uuttoreagenssifaasi liukenemattomasta membraani-

faasista, niin että saadaan liukoinen proteiinifaasi ja liukenematon membraanifaasi,

g) otetaan talteen liukoinen proteiinifaasi, ja

j) puhdistetaan talteenotettu liukoinen proteiinifaasi, niin että saadaan puhdistettu 24 823 daltonin polypeptidi tai sen osa.

11. Menetelmä sienien tappamiseksi, **tunnettu** siitä, että sienet saatetaan kosketukseen ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidin sieniä tehokkaasti tappavan määrän kanssa, jonka näennäinen molekyylipaino on noin 29 000 daltonia.

12. Mikrobin vastaisena aineena käyttökelpoinen puhdistettu polypeptidi, **tunnettu** siitä, että se on ihmisen polymorfonukleaaristen leukosyyttien polypeptidi, jonka näennäinen molekyylipaino on noin 25 000 daltonia, respiratorinen purkauksesta riippumaton mikrobin vastainen vaikutus bakteereja ja sieniä vastaan pH-alueella noin 5,0-8,0 ja kalsiumionipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 10 mM, bakteereja tappava vaikutus natriumkloridipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,3 M ja sieniä tappava vaikutus natriumkloridipitoisuuksissa, jotka ovat korkeintaan noin 0,15 M.

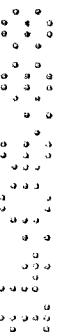


FIGURE 1

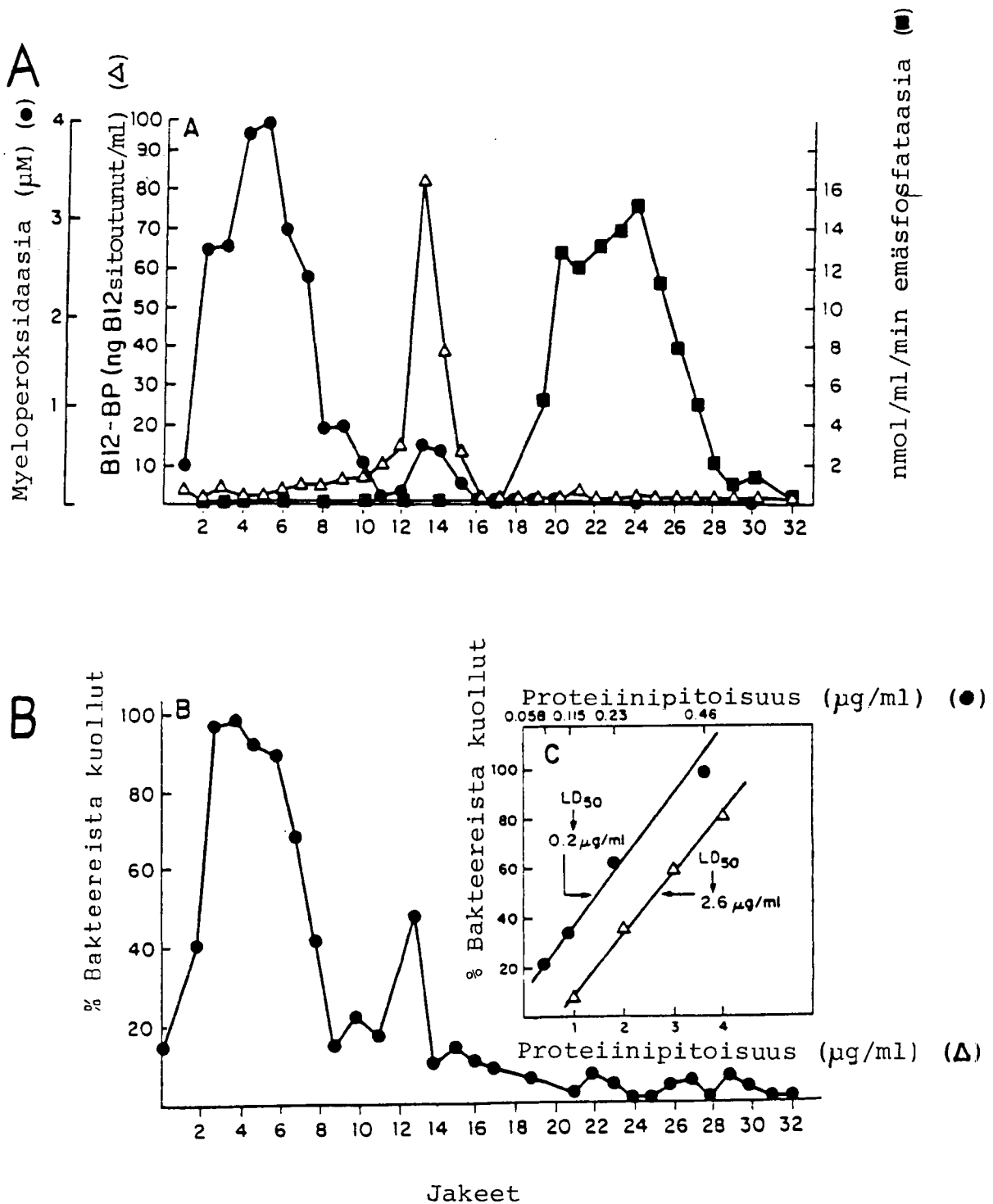


FIGURE 2

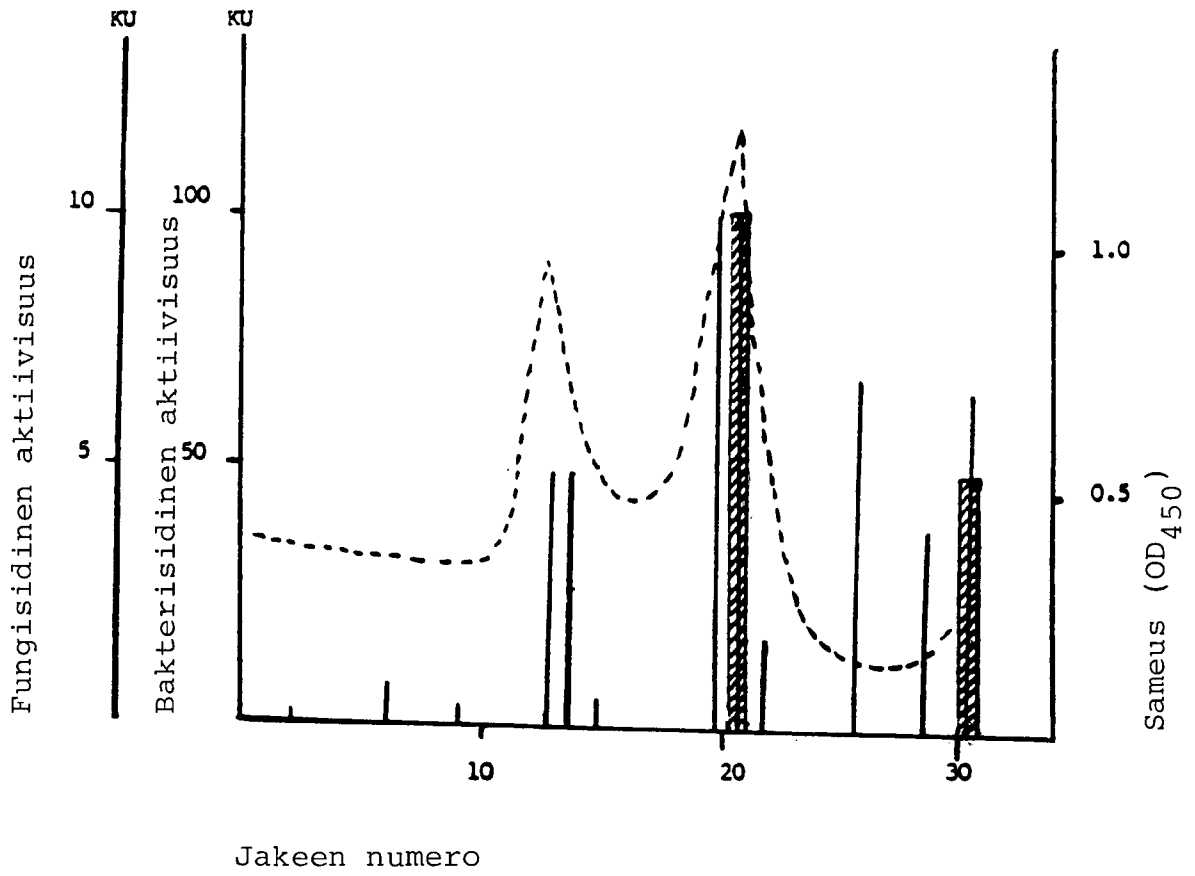


FIGURE 3

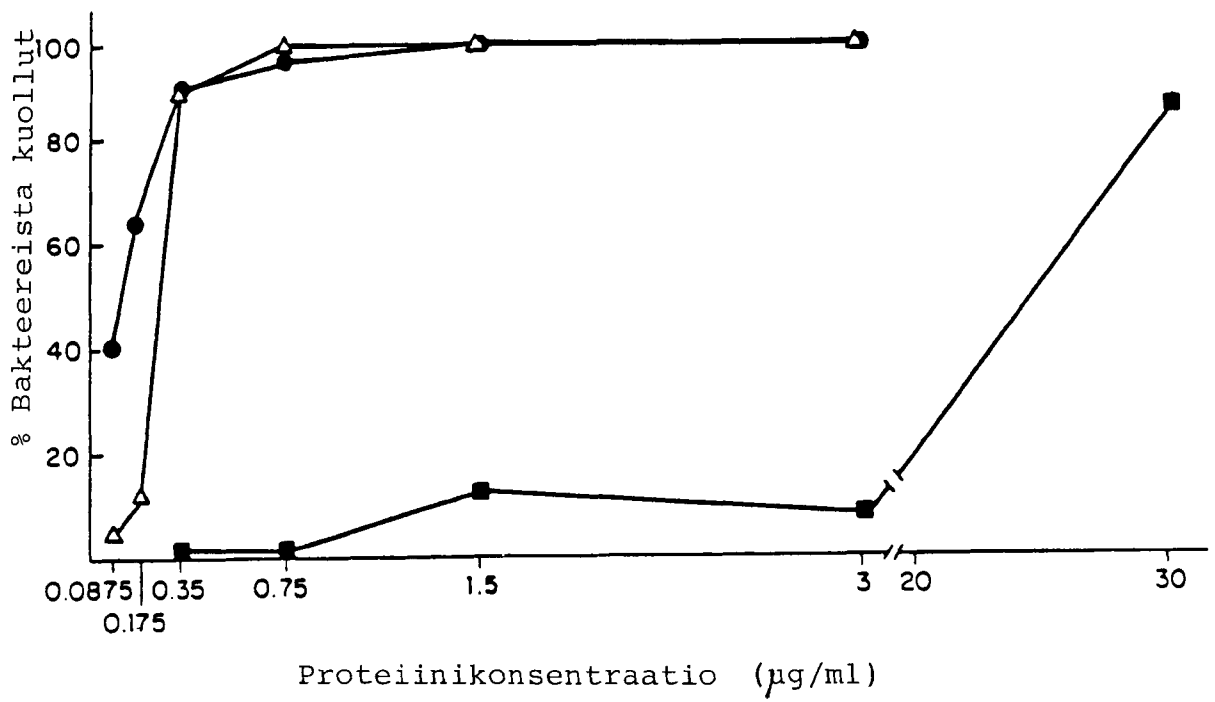


FIGURE 4

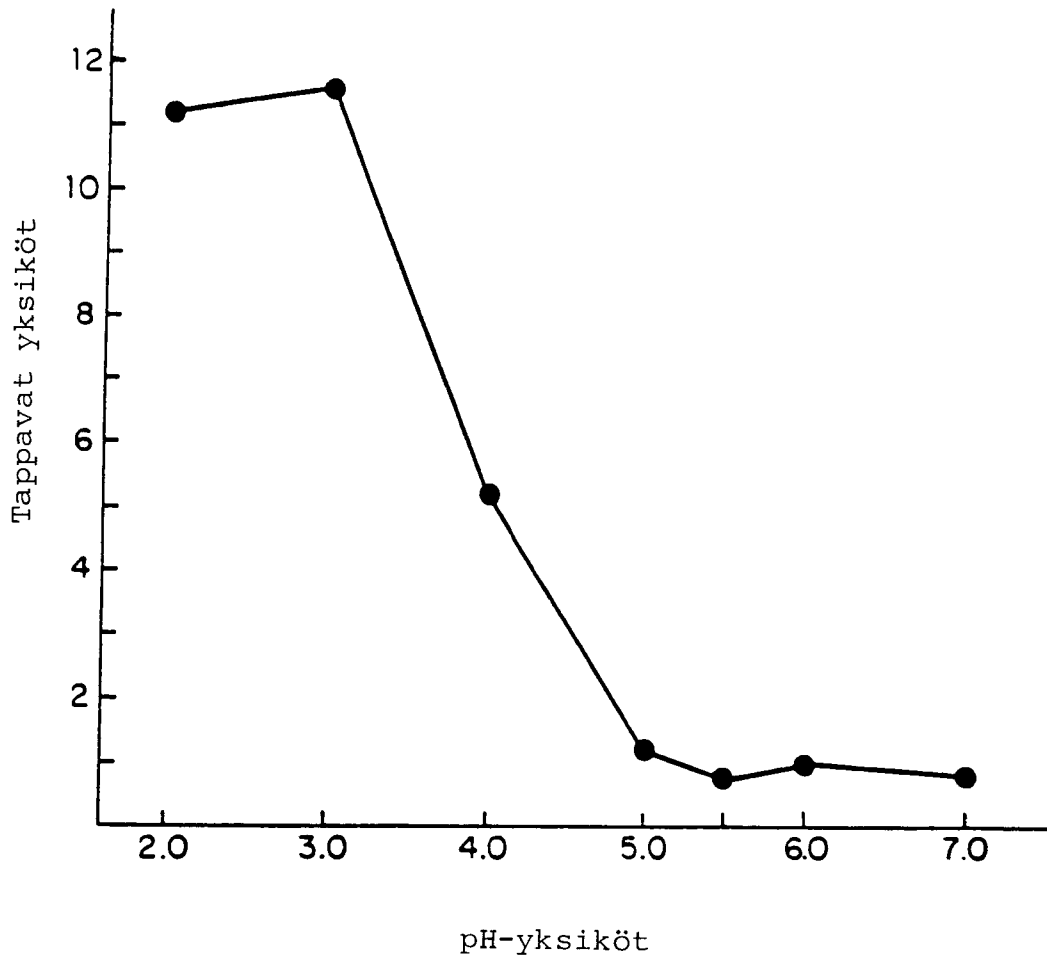


FIGURE 5

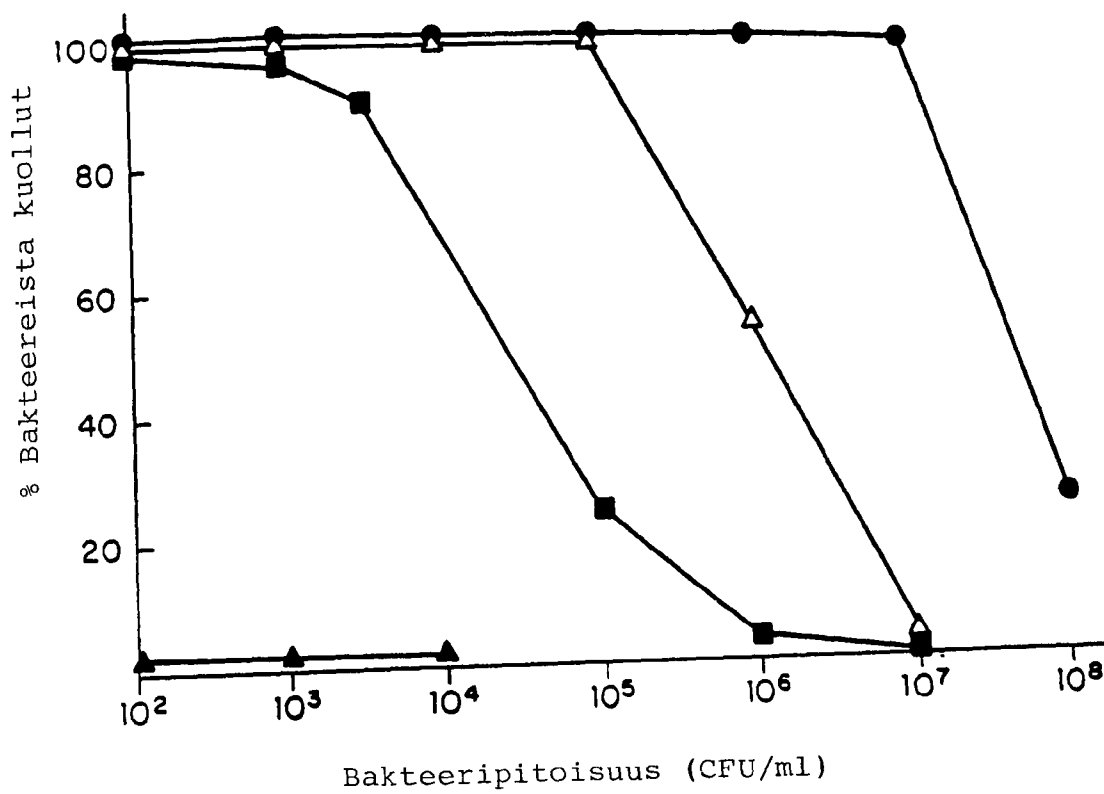


FIGURE 6

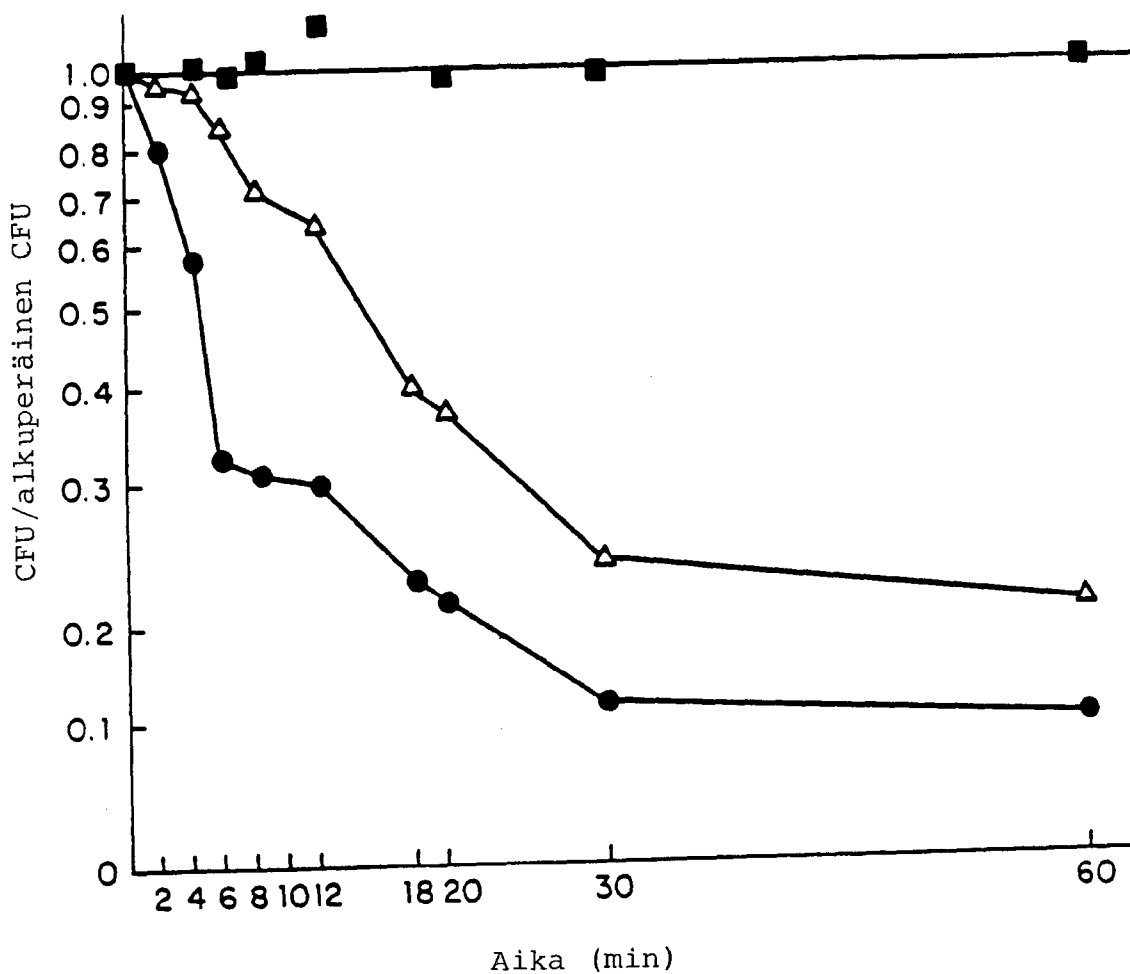


FIGURE 7

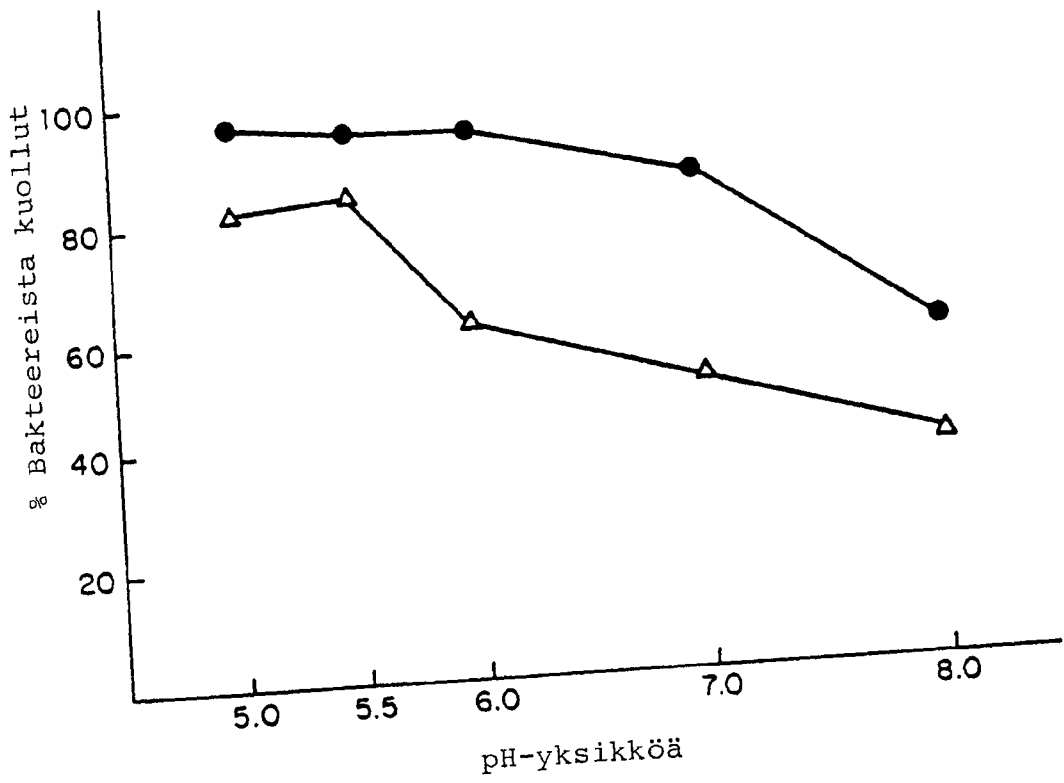


FIGURE 8

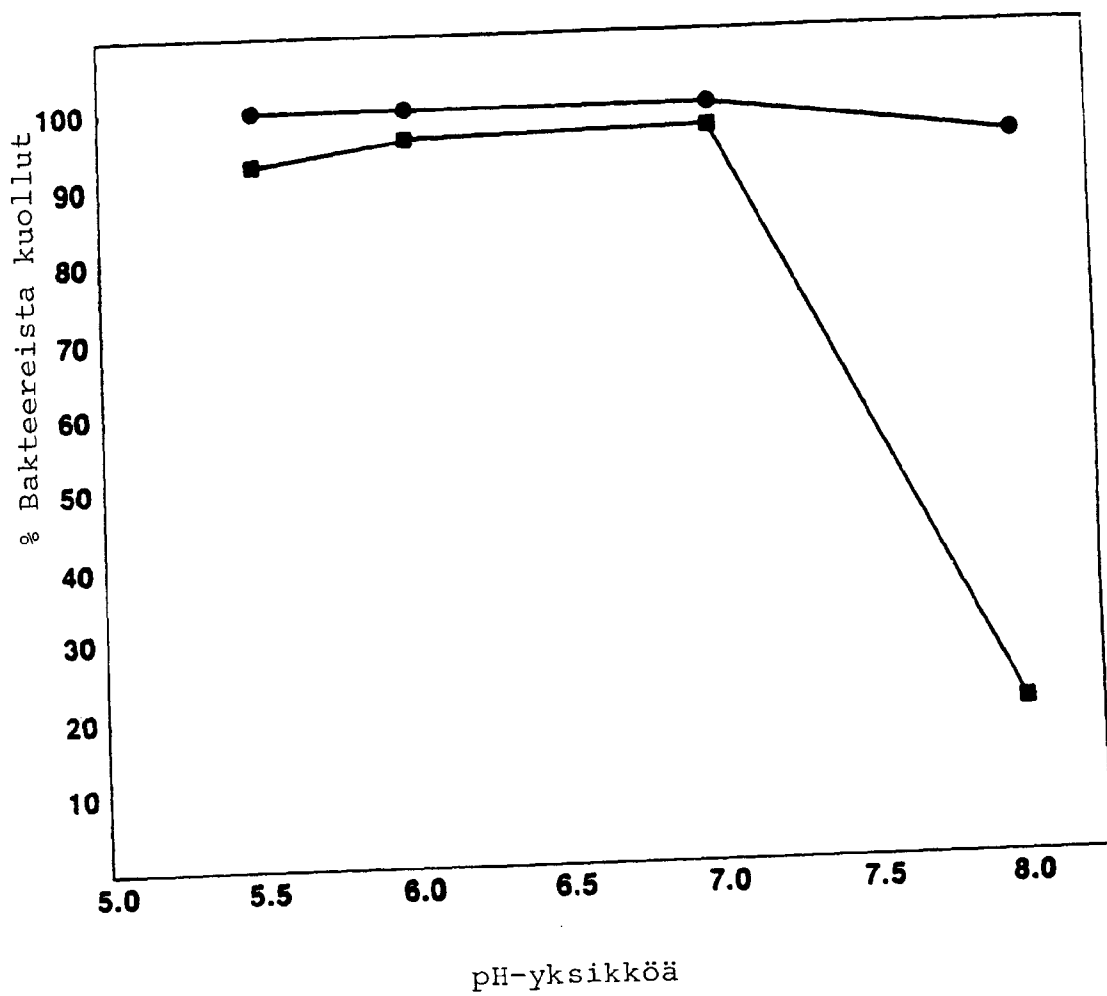


FIGURE 9

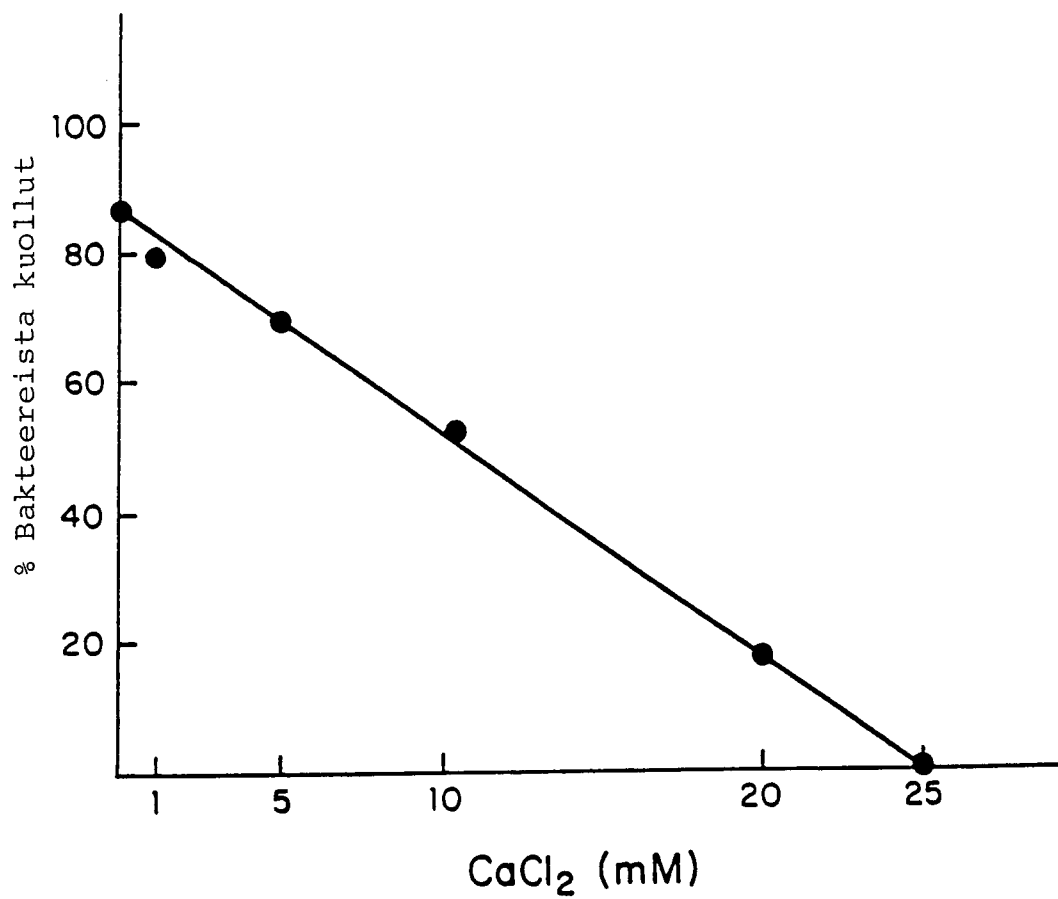


FIGURE 10

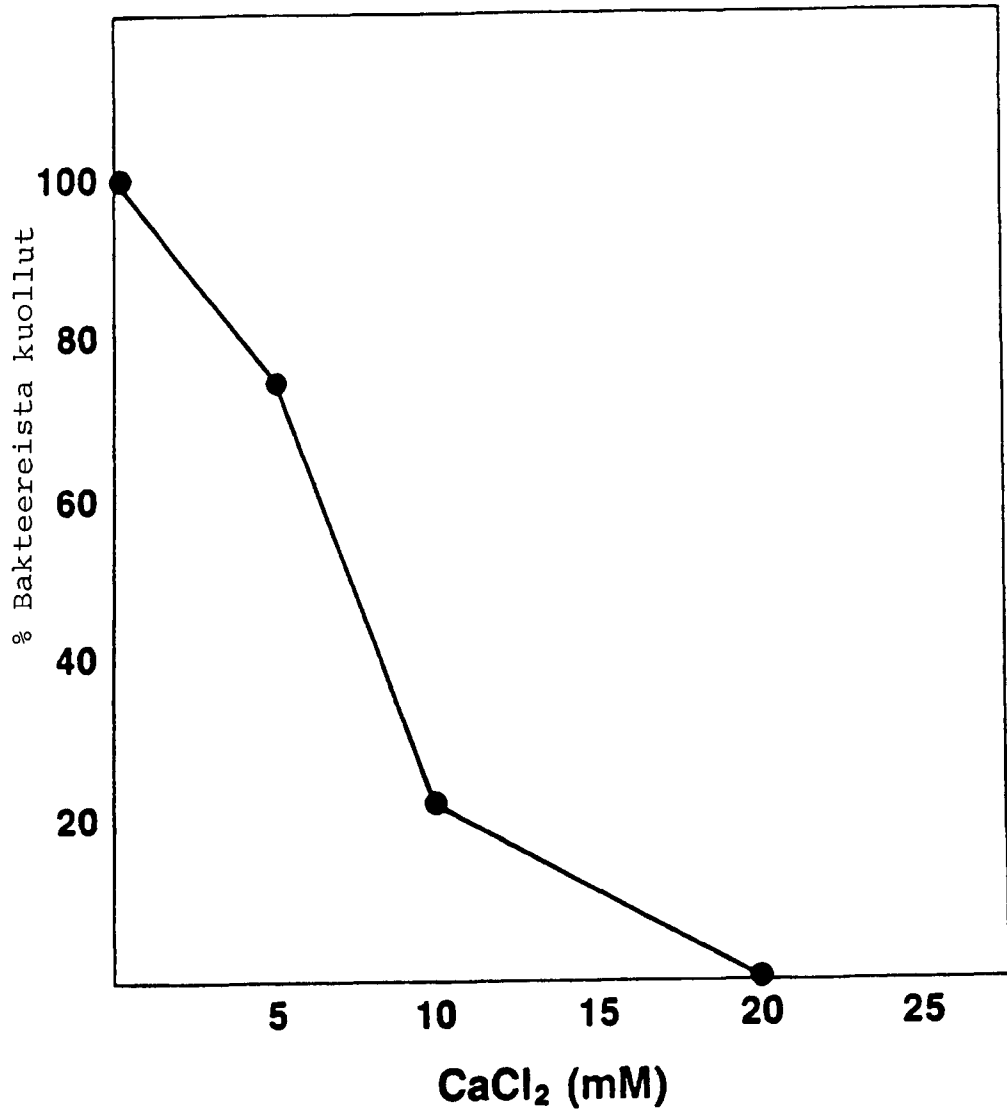


FIGURE 11

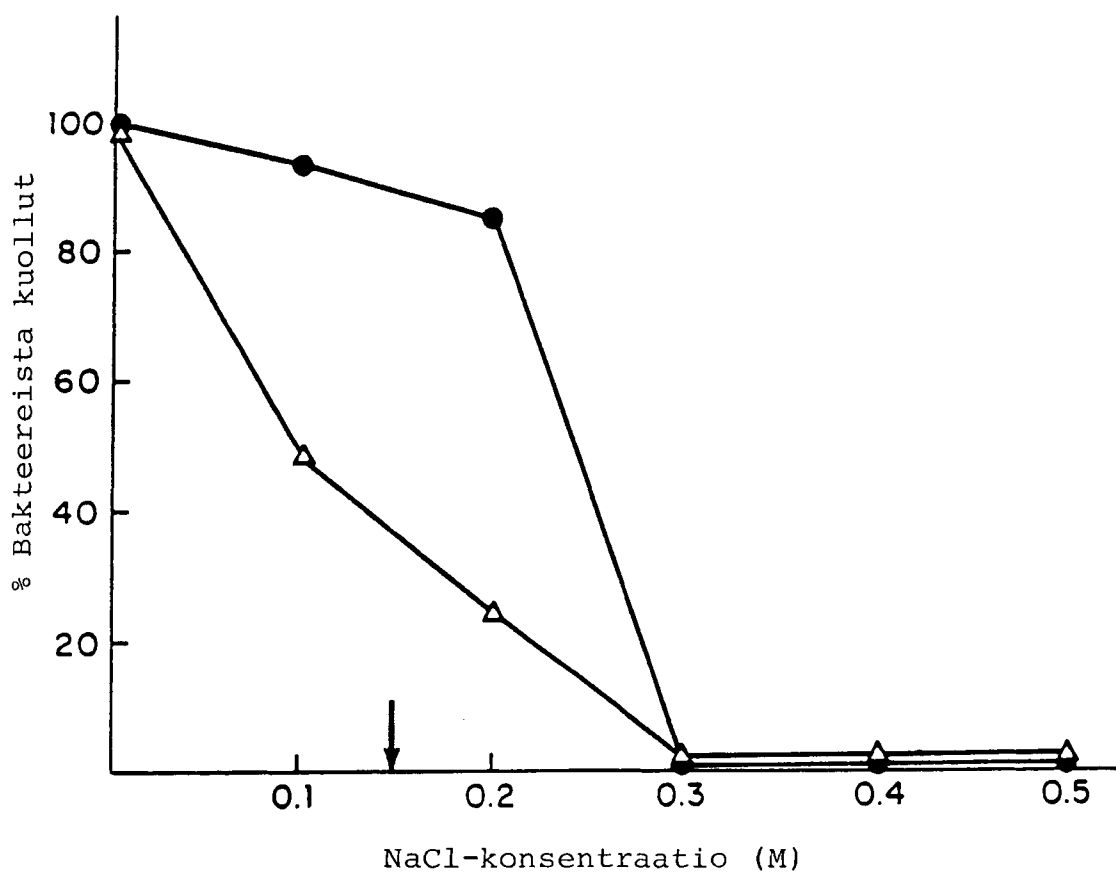


FIGURE 12

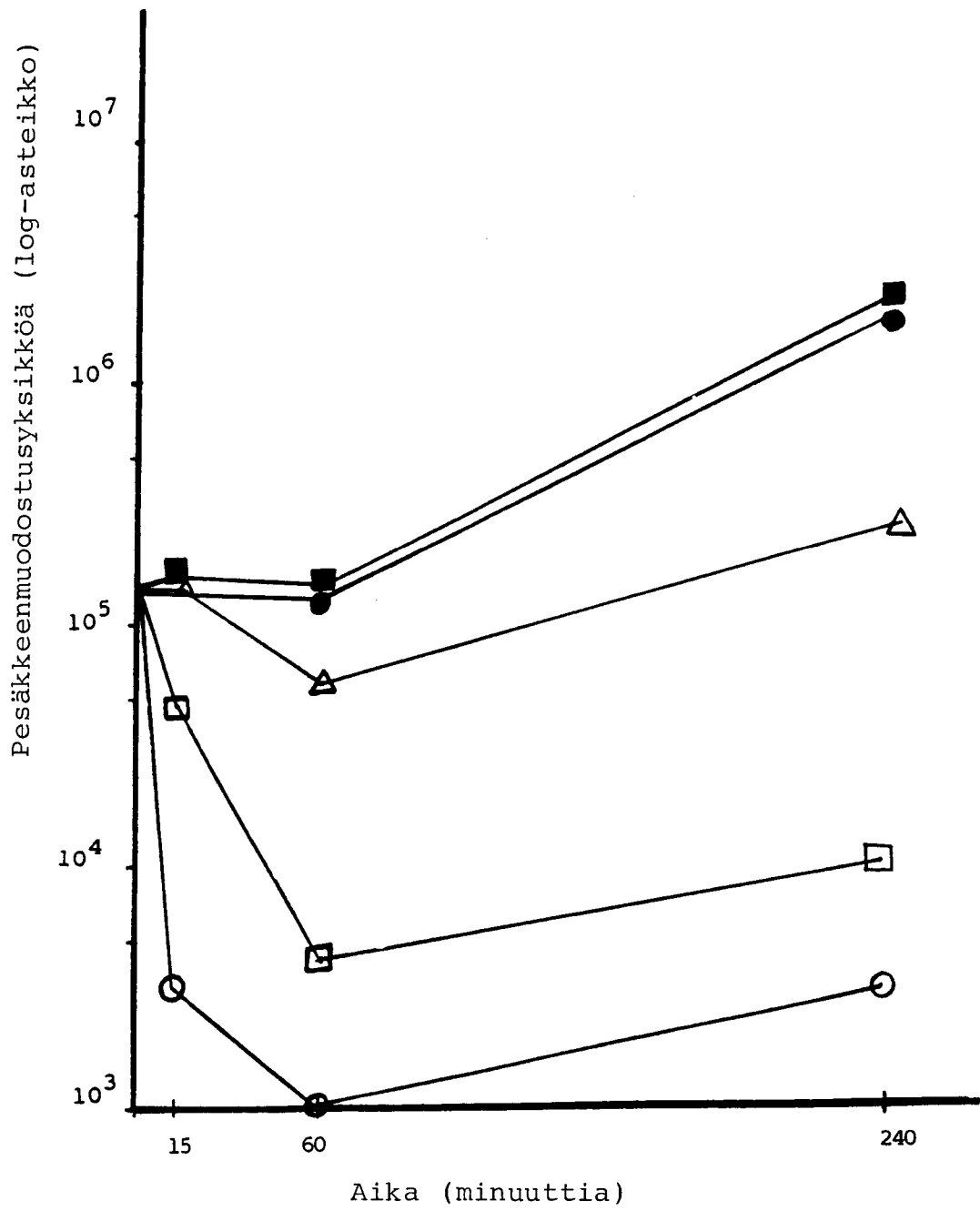


FIGURE 13

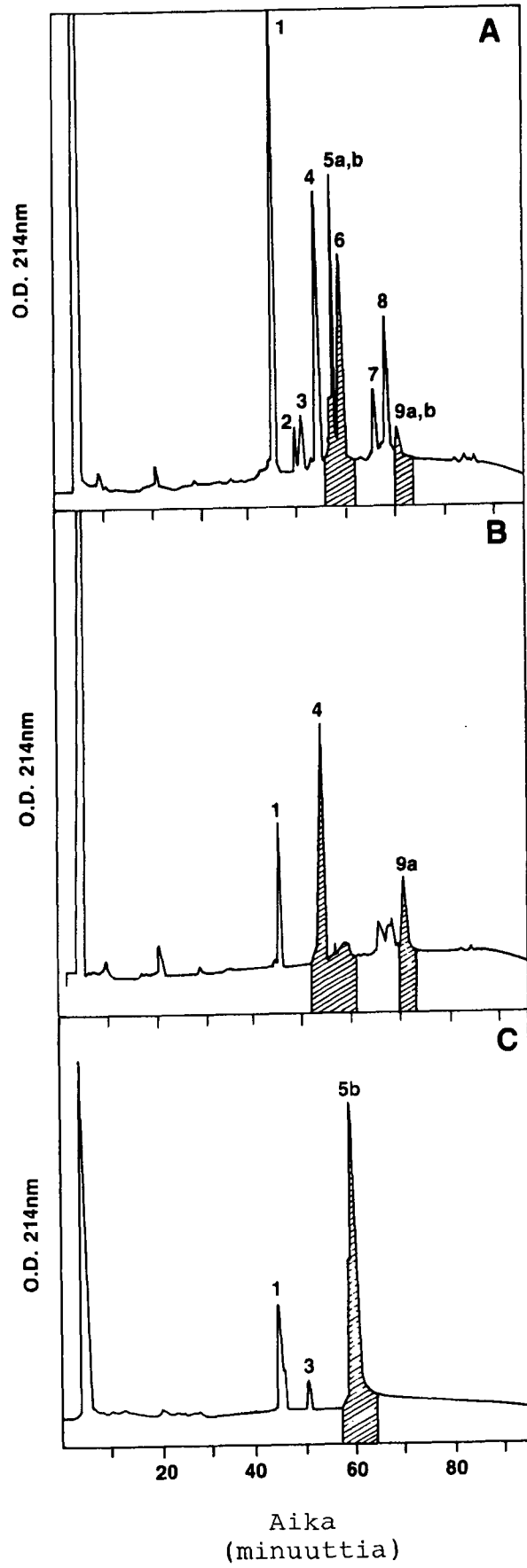


FIGURE 14

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	12	14	16	18	20						
1	X	Y	X	R	I	P	A	X	I	A	G	E	R	R	Y	G	T	X	I	X	Q
4	I	I	G	G	R	E	S	R	P	H	S	R	P	Y	M	A	Y	L	Q	I	Q
5a	K	V	F	E	R	X	E	L	A	R	T	L	K	R	L						
5b	T	C	R	Y	L	L	V	R	S	L	Q	T	F	S	Q	A	X	F	T	X	R
8	I	V	G	G	R	R	A	R	P	H	A	X	P	F	M	V	S	L	Q	L	
9a	V	N	P	G	V	V	V	R	I	S	Q	K	G	L	D	Y	A	S	Q	Q	G
9b	T	C	R	Y	L	L	V	R	S	L	Q	T	F	S	Q	A	X	F	T	X	R

	22	24	26	28	30	32	34	36	38	40										
1	X																			
4	X	P	A																	
5a																				
5b	R	X	Y	R	G	N	L	V	S	I	H	N	F	N	I	N	Y	R	I	
8																				
9a	T	A	A	L	Q	X	X	L	K	H	I	K	I	P	D	Y	L			
9b	R	X	Y	R	G	N	L	V	S	I	H	N	F	N	I	N	Y	R	I	



FIGURE 15

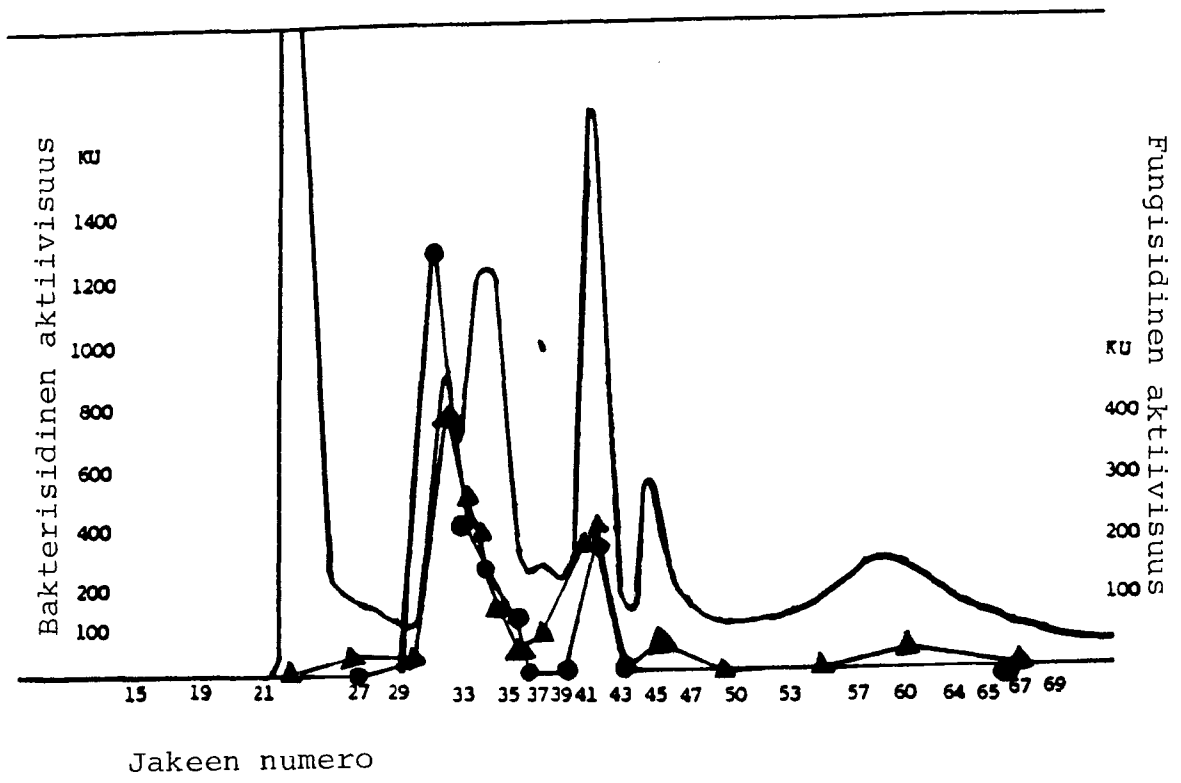


FIGURE 16

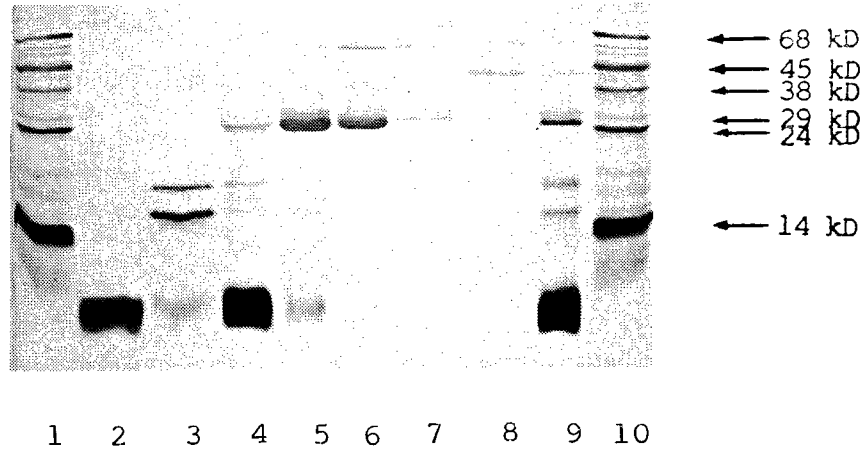


FIGURE 17

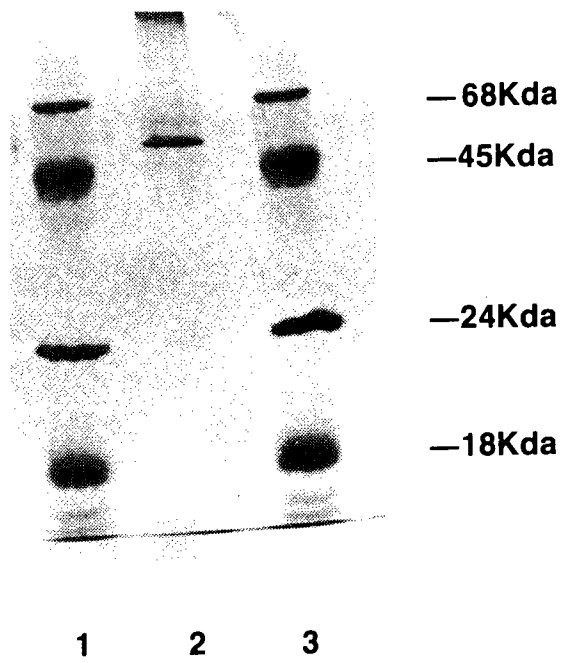
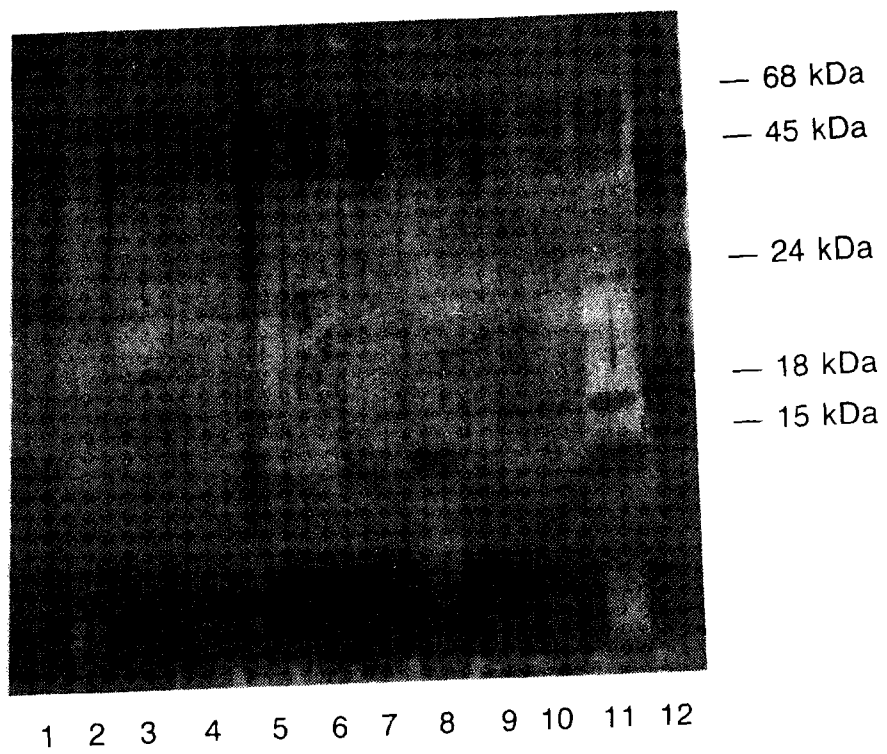


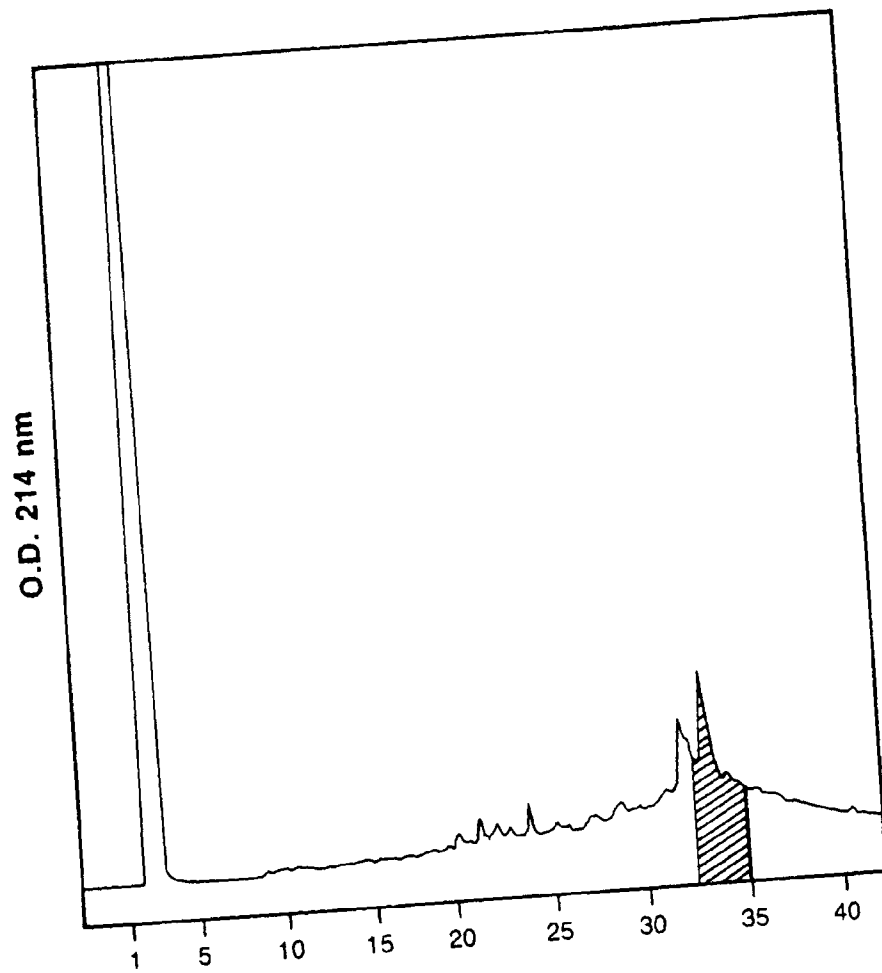
FIGURE 18



Q
S
E
E

Q
S
E
E

FIGURE 19



070800

140800

FIGURE 20B

420 430 440 450 460 470
TGGTTTACTTGCCGGAGGTGCTACAGGGGCAACCTGGTTTCCATCCACAACCTCAATATT
130 140
TrpPheThrCysArgArgCysTyrArgGlyAsnLeuValSerIleHisAsnPheAsnIle
480 490 500 510 520 530
AATTATCGAATCCAGTGTCTGTCAGCGCGCTCAACCAGGGTCAAGTCTGGATTGGAGGC
150 160
AsnTyrArgIleGlnCysSerValSerAlaLeuAsnGlnGlyGlnValTrpIleGlyGly
540 550 560 570 580 590
AGGATCACAGGCTCGGGTCGCTGCAGACGCTTTCAGTGGGTTGACGGCAGCCGCTGGAAC
170 180
ArgIleThrGlySerGlyArgCysArgArgPheGlnTrpValAspGlySerArgTrpAsn
600 610 620 630 640 650
TTTGCGTACTGGGCTGCTCACCAGCCTGGTCCC GCGGTGGTCACTGCGTGGCCCTGTGTA
190 200
PheAlaTyrTrpAlaAlaHisGlnProGlyProAlaValValThrAlaTrpProCysVal
660 670 680 690 700 710
CCCGAGGAGGCTACTGGCGTCGAGCCACTGCCTCAGAAGATTCCTTTCATCTGTTCTTAC
210 220
ProGluGluAlaThrGlyValGluProLeuProGlnLysIleProPheIleCysSerTyr

TGA

FIGURE 21

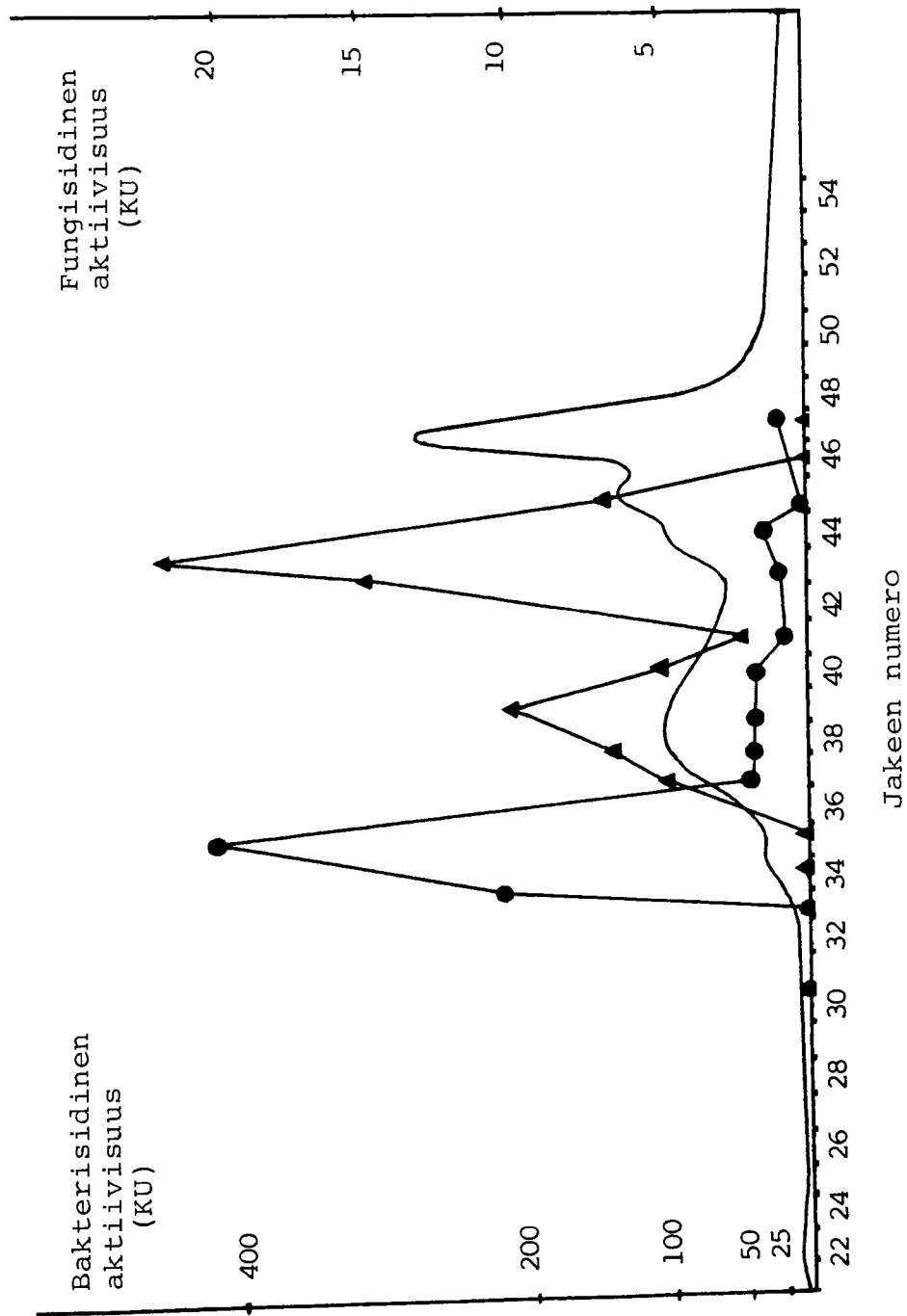


FIGURE 22

