



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110650746 B

(45) 授权公告日 2024.12.31

(21) 申请号 201880032057.6

(72) 发明人 阿夫塔卜·纳迪姆

(22) 申请日 2018.05.14

凯瑟琳娜·斯万堡 何俊勋

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

申请公布号 CN 110650746 A

专利代理人 薛琦

(43) 申请公布日 2020.01.03

(51) Int.CI.

A61K 38/17 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 38/38 (2006.01)

1707715.7 2017.05.14 GB

A61K 38/47 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61P 35/00 (2006.01)

2019.11.14

(56) 对比文件

US 2014051636 A1, 2014.02.20

(86) PCT国际申请的申请数据

US 2015216945 A1, 2015.08.06

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 丘裕

W02018/210759 EN 2018.11.22

(73) 专利权人 哈姆雷特药品AB

权利要求书1页 说明书7页

地址 瑞典隆德

序列表4页 附图4页

(54) 发明名称

生物活性复合物的制备

(57) 摘要

本发明提供了一种制备生物活性复合物的方法，所述方法包括将粉末状复合物形式的多肽成分如 $\alpha$ -乳清蛋白或其片段与油酸或同样呈固体形式的其药学上可接受的盐的混合物溶解在包含至少两种盐的混合物，优选三种盐的水溶液中；其中该方法在中温下进行。由于该制备过程不需要大量加热，故操作简单有效。

1. 一种制备生物活性复合物的方法,所述方法包括将粉末形式的多肽成分与油酸或同样呈固体形式的其药学上可接受的盐的混合物溶解在包含至少两种盐的水性溶剂中,其中第一种盐是氯化钠或氯化钾,第二种盐是磷酸氢二钠或磷酸二氢钾,其中所述方法在15-25°C下进行;其中所述多肽成分是牛 $\alpha$ -乳白蛋白或其片段。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述水性溶剂还包含第三种盐,其为磷酸二氢钠或磷酸二氢钾。
3. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括对形成的溶液进行过滤。
4. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括除去所述溶剂并获得固体形式的复合物。
5. 如权利要求4所述的方法,其中通过冻干除去所述溶剂。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述的牛 $\alpha$ -乳白蛋白片段是至多50个氨基酸的片段。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述的牛 $\alpha$ -乳白蛋白片段包含牛 $\alpha$ -乳白蛋白的 $\alpha$ -螺旋结构域。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述的第一种盐是氯化钠。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述的第二种盐是磷酸氢二钠。
10. 如权利要求2所述的方法,其中所述的第三种盐是磷酸二氢钾。
11. 如权利要求4或权利要求5所述的方法,其中所述的复合物在使用前用无菌水复原。

## 生物活性复合物的制备

[0001] 业界对涉及部分未折叠的蛋白质和脂质的复合物的生产具有极大的兴趣。这些蛋白质与处于完全折叠状态的相应蛋白质相比可能具有截然不同的特性,尤其是生物学特性。通过部分蛋白质解折叠以及脂肪酸结合后获得新的有益功能是一种显著现象,并且可能反映了通过改变蛋白质的构象状态和相关配体而实现功能多样化的重要的通用途径。因此,除了mRNA转录物的可变剪接、翻译后修饰和特定结构域的三级结构变化之外,原天然蛋白的部分解折叠渐渐被认为是产生功能多样性的机制。这可能是由于细胞对未折叠的蛋白质和脂质辅因子的反应,这决定了它们可变的特性。但是,这种反应在例如肿瘤细胞中可能不同,这意味着它们可能会产生治疗潜力。为了形成稳定的部分,未折叠的蛋白质经常以某种方式被修饰,并且特别地可以与辅因子例如脂肪酸辅因子结合。以这种方式形成的复合物可能是稳定的,并由此产生新的治疗选择。

[0002] HAMLET(对肿瘤细胞具有致死性的人 $\alpha$ -乳白蛋白)就是具有显著特性的新型肿瘤杀伤分子家族的一个例子。HAMLET由部分未折叠的 $\alpha$ -乳白蛋白形成,并与油酸共同构成完整的形式。在研究人乳防止细菌与细胞结合的能力时,偶然发现了HAMLET。早期的体外实验表明,HAMLET具有广泛的抗肿瘤活性,并具有高度的肿瘤选择性;随后的治疗研究证实了HAMLET的杀伤肿瘤活性和对体内肿瘤组织的相对选择性。在安慰剂的对照临床研究中,局部施用HAMLET可以消灭皮肤乳头状瘤或减小其大小;并且在患有膀胱癌的患者中,局部滴注HAMLET可以导致肿瘤细胞快速死亡,但不会导致肿瘤周围的健康组织死亡。最近,HAMLET在膀胱癌模型中的治疗功效在鼠膀胱癌模型中得到证明,HAMLET治疗可延迟肿瘤进展并导致大鼠胶质母细胞瘤异种移植模型中大鼠存活率提高,而没有健康脑组织中细胞死亡的迹象。因此,HAMLET似乎能识别肿瘤细胞中保守的死亡途径,从而将它们与健康的分化细胞区分开。

[0003] 目前还发现,使用马溶菌酶和油酸的其他复合物可引起细胞死亡(Vukojevic et al. Langmuir, 2010, 26 (18) 14782-14787),这表明当与合适的辅因子偶联时,不同的、未折叠的蛋白质可具有细胞毒性。

[0004] 其他工作集中在同样可被利用的这些蛋白质的肽片段的用途上(参见例如EP-B-2643010和共同申请而未决的英国专利申请号1621752.3)。

[0005] 经典地,这些类型的复合物是按照如Svensson等在Proc Natl Acad Sci U.S.A. 97, 4221-4226, 2000中记载的方法制备的。通过疏水作用色谱法从人乳中纯化天然 $\alpha$ -乳白蛋白。通过EDTA解折叠蛋白质,在用油酸预处理的基质上进行离子交换层析,并用高盐(具体而言为1M NaCl)洗脱,以获得生物活性复合物。这种类型的方法已经用于从牛 $\alpha$ -乳白蛋白生产其他生物活性复合物,包括BAMLET;以及由重组形式的 $\alpha$ -乳白蛋白形成的复合物,特别是如WO 2010/079362中所述的无半胱氨酸残基的复合物。

[0006] WO2010/131010记载了这种生物活性复合物的替代制备方案。在该参考文献中,BAMLET是在单相系统中制备的,其中在磷酸盐缓冲盐水(PBS)中复原 $\alpha$ -乳白蛋白,并添加油酸钠。然后将所得混合物加热到大于等于60°C的温度,得到活性复合物。该方法具有易于实施的优点,并且甚至可以在临床情况下借助试剂盒进行原位实施。

[0007] 在其他参考文献中,通过将先前冻干的复合物溶解在PBS中(参见例如WO2010/079362)来制备生物活性复合物以供使用。

[0008] 因此很明显的是,这种复合物在其生产中依赖盐的存在。如先前所使用的磷酸盐缓冲盐水(PBS)包括至少三种盐,有时是四种盐的混合物。其中有氯化钠、磷酸氢二钠和磷酸二氢钾,在某些情况下还包括氯化钾。

[0009] 申请人研究了用于制备化合物的盐混合物的影响,并且惊讶地发现,制备复合物使用的盐的精确特性会影响产品的活性。这表明所述产品是可区分的,因此各个具有特定盐分平衡的产品都是独特的产品。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了制备生物活性复合物的方法,所述方法包括将一种粉末形式的多肽成分与油酸或同样呈固体形式的其药学上可接受的盐的混合物溶解在包含至少两种盐的水溶液中,其中第一种盐是氯化钠或氯化钾,第二种盐为磷酸氢二钠或磷酸二氢钾,其中,特别地,所述方法在中温下进行。

[0012] 如本发明所用,“中温”的表述是指最高50°C的温度,例如0-50°C,例如10-40°C,更佳地为15-25°C,例如环境温度下。这样的温度通常低于多肽解折叠或变性的“解链温度”。然而,申请人发现它们仍然能够在这些盐条件下形成生物活性复合物。

[0013] 申请人发现,通过本发明的简单溶解方法,可以制备呈现明显的剂量依赖性反应的活性复合物。尽管所述混合物可以被加热,例如达50°C,如达40°C,以实现快速溶解,但如果水性溶剂中存在合适的盐平衡,则无需对溶液进行广泛的加热,如所述的煮沸。因此,在特定的实施方案中,所述方法在环境温度下进行。

[0014] 搅拌(例如涡旋)可促进溶解。如有需要,可以在此阶段用无菌过滤器过滤溶液。合适的过滤器包括聚醚砜膜(PES)或Minisar®NML醋酸纤维素膜。

[0015] 任何这样的搅拌过程都将进行一段时间,以确保成分在盐溶液中溶解。尽管具体的时间可能会取决于多种因素,例如所用多肽的特殊性质和保存混合物的温度,但时间通常会很短,例如不超过10分钟,例如1-5分钟,如大约2分钟。

[0016] 在一个具体的实施方案中,所述溶剂还包含第三种盐,其为磷酸二氢钠或磷酸氢二钾,特别是磷酸氢二钾。这样的混合物存在于常规的PBS溶液中。

[0017] 因此,该方法易于在各种制造和非制造环境中制备。

[0018] 本发明所用的术语“多肽”包含蛋白质和包括长肽的肽。

[0019] 用于本发明方法的合适的“多肽成分”包括天然存在的蛋白质,特别是 $\alpha$ -乳白蛋白、溶菌酶或其他具有膜干扰活性的蛋白质、重组蛋白质和尤其是所述天然存在的蛋白质的变体,所述的变体缺乏分子内化学键,如半胱氨酸残基突变的变体,或者特别是这些蛋白质中的任何一种的片段,特别是至多50个氨基酸的肽。

[0020] 术语“变体”是指具有相似生物学功能但氨基酸序列不同于其衍生自的基本序列的蛋白质或多肽,其所衍生自的序列中的一个或多个氨基酸被其他氨基酸取代。氨基酸取代可以被认为是“保守的”,其中氨基酸被具有广泛相似特性的不同氨基酸取代。非保守取代是将氨基酸替换为不同类型的氨基酸。

[0021] “保守取代”是指一个氨基酸被相同种类的另一个氨基酸取代,其中,种类定义如下:

<u>种类</u>	<u>氨基酸列举</u>
非极性的	A、V、L、I、P、M、F、W
[0022] 不带电荷极性的	G、S、T、C、Y、N、Q
酸性	D、E
碱性	K、R、H
[0023]	如本领域技术人员所公知的,通过保守取代来改变肽的一级结构可能不会显著改变该肽的活性,因为插入序列的氨基酸的侧链可以形成与被取代的氨基酸的原侧链相似的键和接触。即使当取代位于决定肽构象的关键区域时亦如是。
[0024]	只要不破坏DNA结合域多肽的功能,就可以进行非保守取代。
[0025]	广义地说,在不改变多肽生物活性的情况下,较少的非保守取代将是可能的。
[0026]	确定任何取代(以及实际上,任何氨基酸缺失或插入)的效果完全在本领域技术人员的常规能力范围内,本领域技术人员可以容易地确定变体多肽是否保留了碱性蛋白的基本特性和活性。例如,当确定多肽的变体是否属于本发明范围内时,技术人员将确定包含该变体的复合物是否保持非折叠形式天然蛋白构成的复合物的生物活性(例如肿瘤细胞死亡)。所述多肽具有天然蛋白生物活性的至少60%,优选至少70%,更优选至少80%,再更优选90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。
[0027]	所述多肽的变体可以包含或者基本上由与天然蛋白的氨基酸序列有至少70%同一性的氨基酸序列构成,如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、96%、97%、98%或99%,该天然蛋白序列为例如 $\alpha$ -乳白蛋白或溶菌酶序列。
[0028]	通过使用BLASTP计算机程序,以天然蛋白质序列作为基础序列,适当地确定序列同一性的水平。这意味着天然蛋白质序列形成确定同一性百分比的序列。BLAST软件可从 <a href="http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a> 公开获得(可于2017年5月10日前访问获取)。
[0029]	在一个特定的实施方案中,所述多肽成分是具有不超过50个氨基酸的肽,并且特别地可以具有10-45个氨基酸。这样的复合物更容易制备,并且原料成本更低。例如,可以使用用于生产肽的常规方法来制备肽。由于分子量较小,形成的复合物更易于处理和配制以用于给药。
[0030]	该复合物适宜衍生自天然存在的蛋白质或其变体。适宜的蛋白质是那些在此类复合物中具有活性的蛋白质,例如 $\alpha$ -乳白蛋白、 $\beta$ -乳球蛋白或溶菌酶,但也可以衍生自任何膜干扰蛋白质。
[0031]	膜干扰蛋白是具有与细胞膜界面相互作用的能力的蛋白,特别是引起破坏作用的,例如在细胞膜上形成管道。通常,蛋白质将嵌入细胞膜中。这样的蛋白质实例包括外壳复合物,例如COPI、COPII(例如SAR 1)、HOPS/CORVET、SEA(Seh1结合),以及网格蛋白复合物BAR结构域蛋白例如内啡肽,和ESCRT复合物,包括Snf7结构域亚基。
[0032]	特别地,该肽源自如上所述的天然存在的蛋白质的 $\alpha$ -螺旋结构域。所述蛋白质的 $\alpha$ -螺旋结构域在本领域中是众所周知的,或者可以使用常规方法确定。
[0033]	在一些实施方案中,当 $\alpha$ -螺旋结构域包含半胱氨酸残基时,可以将它们修饰成不同的氨基酸残基,例如丙氨酸残基,以避免分子间二硫键。
[0034]	在一个特定的实施方案中,该肽是 $\alpha$ -乳白蛋白的片段,特别是 $\alpha$ -乳白蛋白的 $\alpha$ 结构

域的片段。在一个具体的实施方案中,该肽包含人 $\alpha$ -乳白蛋白的 $\alpha$ 1(残基1-40)或 $\alpha$ 2(残基81-123)的氨基酸,或其他 $\alpha$ 乳白蛋白例如牛 $\alpha$ -乳白蛋白的类似区域。

[0035] 该肽适当地不包含引起折叠的成分,因此适当地缺少引起分子内键合的氨基酸,例如半胱氨酸残基。特别地,当肽衍生自天然存在的蛋白质时,任何半胱氨酸残基被其他氨基酸例如丙氨酸取代。

[0036] 因此,在特定的实施方案中,所述复合物包含人 $\alpha$ -乳白蛋白 $\alpha$ 1(残基1-40)或 $\alpha$ 2(残基81-123)的氨基酸,其中半胱氨酸被其他氨基酸例如丙氨酸取代,以防止任何分子内键合。

[0037] 因此,该肽的序列可以如SEQ ID NO 1或SEQ ID NO 2所示

[0038] KQFTKXELSQLLKD IDGYGGIALPELIXTM FHTSGYDTQA (SEQ ID NO 1)

[0039] LDDDI TDDIMXAKKILD IKGIDYWL AHKAL XTEKLE QWLX EKL (SEQ ID NO 2)

[0040] 其中X是除半胱氨酸外的其它氨基酸

[0041] 一个特定的该序列例子是下列SEQ ID NO 3或SEQ ID NO 4:

[0042] KQFTKAELSQLLKD IDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQA (SEQ ID NO 3)

[0043] LDDDI TDDIMA KKILD IKGIDYWL AHKALATEKLE QWLAEKL (SEQ ID NO 4)。

[0044] 在一些情况下,SEQ ID NO 1对应的肽链可被删减,例如省略末端丙氨酸残基,以产生如SEQ ID NO 6所示的肽链,其中SEQ ID NO 7是个特殊的例子。

[0045] KQFTKXELSQLLKD IDGYGGIALPELIXTMFHTSGYDTQ (SEQ ID NO 6)

[0046] KQFTKAELSQLLKD IDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQ (SEQ ID NO 7)

[0047] 这样的肽是新的,并与包含它们的生物活性复合物一起构成本发明的另一方面。

[0048] 其他肽也可以用于复合物中,并且可以通过确定与脂肪酸盐的复合物是否具有活性来测试适用性,例如使用下文所述的方法杀死细胞。

[0049] 在另一个实施例中,所述的肽衍自COPII蛋白质家族如SAR1,一个该肽的特殊例子是SEQ ID NO 5对应的肽链

[0050] MAGWDIFGWF RDVLASLGLW NKH (SEQ ID NO 5)。

[0051] 在另一个实施方案中,所述多肽成分是天然存在的蛋白质或其合成形式,特别是 $\alpha$ -乳白蛋白,例如人、牛、绵羊、骆驼或山羊 $\alpha$ -乳白蛋白。特别地,该蛋白质是牛乳白蛋白。

[0052] 如本发明所用,术语“生物活性”是指该复合物具有不同于或高于单独组分的生物学活性。特别是,该复合物能够诱导细胞死亡,特别是选择性地诱导肿瘤细胞的细胞死亡,和/或具有天然蛋白质(包括例如单体 $\alpha$ -乳白蛋白形式)所不具有的杀菌或抗病毒作用,尽管其亦可实现其他治疗作用。

[0053] 特别地,在本发明的方法中使用的油酸是式 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ 或 $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COO}^-$ 的C18:1油酸。

[0054] 在一个具体的实施方案中,该方法中使用了在药学上可接受的油酸盐。合适的药学上可接受的盐可按照本领域中常识理解。

[0055] 使用盐,尤其是油酸、脂肪酸或脂质的水溶性盐,因其可以形成水溶液用于例如离子交换柱等,意味着制备方法更为简单。合适的水溶性盐是碱金属或碱土金属盐,例如钠盐或钾盐。

[0056] 此外还发现,盐尤其是油酸盐,例如油酸钠可能具有一些固有肿瘤杀伤作用。因

此,将其包含在复合物中可能提升所述复合物的相关生物活性。

[0057] 在一个具体的实施方案中,用于本发明方法的所述第一种盐是氯化钠。

[0058] 在另一个具体实施方案中,用于本发明方法的所述第二种盐是磷酸氢二钠。

[0059] 在另一个具体实施方案中,用于本发明方法的所述第三种盐是磷酸二氢钾。

[0060] 在本发明的方法中使用的第一种盐与第二种盐适当比例为8:1至1:1,例如5:1至2:1,特别是4:1至3.5:1。如果存在第三种盐,则第一种盐与第三种盐的比例为20:1至5:1,例如15:1至10:1,例如12.5:1至11.5:1。

[0061] 在一个特定的实施方案中,第一种盐与第二种盐与第三种盐的比例为13-12:4-3:1。

[0062] 在本发明方法中混合物内油酸或油酸酯与肽的适当比例在20:1至1:1的范围内,但优选油酸酯过量,例如油酸酯:肽的比例约为5:1。混合的温度为0-50°C,通常在环境温度和压力下进行。

[0063] 如果需要,本发明方法的产物可以例如通过冻干来固化,以用于储存或配制。此后,可以使用特别是无菌水将其复原。该步骤尤其适合于多肽是肽而不是蛋白质的情形。申请人已经发现,当进行诸如冻干的程序时,蛋白质可以恢复到自然折叠状态。

[0064] 通过将多肽稳定在未折叠状态下,例如通过降低溶液的pH至例如4以下,或在制备中向溶剂中添加钙螯合剂如EDTA,可以缓解该自然折叠问题。在第二方面,本发明提供了可通过第一方面方法获得的复合物。

[0065] 因此,本发明第二方面的复合物可以通过以常规方式将它们与药学上可用的载体混合而配制成有用的药物组合物。这样的组合物构成本发明的第三方面。

[0066] 本发明的第三方面的组合物是适合于局部使用形式的适当药物组合物,例如乳膏剂、软膏剂、凝胶剂或水性或油性溶液或悬浮液。这些可以包括药学上公认可用的载体、填充剂和/或应急方法。

[0067] 局部溶液或乳膏剂适当地包含蛋白质复合物的乳化剂以及稀释剂或乳膏剂基质。

[0068] 复合物的日剂量根据临床实践特性而变化,并取决于患者、所治疗疾病的性质等。通常,每次给药使用2-200mg/剂的生物活性复合物。

[0069] 在本发明的另一方面,提供了一种治疗癌症的方法,该方法包括向需要其的患者施用如上所述的生物活性复合物。

[0070] 特别地,该复合物可用于治疗癌症,例如人皮肤乳头状瘤、人膀胱癌和成胶质细胞瘤。在后一种情况下,可按本领域已知的方法输液给药。

[0071] 本发明进一步提供了如上所定义的生物活性复合物,用于治疗,特别是用于癌症的治疗。

[0072] 该复合物还可以用于预防癌症,特别是胃肠道癌症,如例如W02014/023976中所述。在这种情况下,可以将复合物与食品例如乳制品如酸奶组合以用作保健品。这种类型的组合物形成本发明的另一方面。

[0073] 在本说明书的整个说明书和权利要求书中,词语“包括”和“包含”及其变体,例如名词“包括”和“包含”,意思是“包括但不限于”,并且不排除其他组份、整数或步骤。此外,除非上下文另做说明,否则单数名词包含其复数形式:特别地,在使用不定冠词的情况下,除非上下文另做说明,否则说明书应理解为考虑了复数以及单数。

[0074] 本发明的每个方面的优选特征可以如结合任何其他方面所描述的。在本申请的范围内，本申请需申明，在前述段落、权利要求和/或以下描述和附图中阐述的各个方面、实施例、示例和替代方案，尤其是其各个特征，可以是独立或组合使用。即，除非相互间特征不兼容，否则可以以任何方式和/或结合方式来组合所有实施例和/或任何实施例的特征。

## 附图说明

[0075] 现在将专门用结合下列附图的示例具体描述本发明，其中

[0076] 图1显示了使用一系列对肿瘤细胞具有生物活性的复合物获得的ATP Lite、PrestoBlue和Tryphan Blue的研究结果；

[0077] 图2显示了在过滤和未过滤溶液的情况下获得的类似结果的比较；

[0078] 图3显示了制备包含牛 $\alpha$ -乳白蛋白的复合物的(A)示意图和(B)照片；

[0079] 图4显示了对所得溶液施用至的肿瘤细胞的ATP Lite、PrestoBlue和Tryphan Blue的研究结果。

[0080] 详细说明

[0081] 实施例1

[0082] 生物可用复合物的制备

[0083] 用序列如SEQ ID NO 7所示的肽制备一系列生物可用复合物：

[0084] Ac-KQFTKAELSQLLKIDGYGGIALPELIATMFHTSGYDTQ-OH (SEQ ID NO 7)

[0085] 其为人 $\alpha$ -乳白蛋白一个变体片段。

[0086] 将冻干形式的肽(700 $\mu$ M)与油酸钠薄片(3.5mM)一起加入管中。然后将每根试管重新配制成所需体积的以下任一种：

[0087] 1) PBS (NaCl 6.8g/L;), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>×2H<sub>2</sub>O (4.8g/L); 和KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.3g/L) (pH7.2)

[0088] 2) NaCl溶液 (116mM) (pH 7.01)

[0089] 3) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>溶液 (31mM) (pH 8.6)

[0090] 4) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液 (9.56mM) (pH 4.6)

[0091] 5) (2) 和 (4) (pH 4.63) 的混合液

[0092] 6) (2) 和 (3) (pH 8.37) 的混合液

[0093] 7) (3) 和 (4) (pH 7.29) 的混合液

[0094] 将每种混合物涡旋直至溶液澄清。

[0095] 然后将获得的复合物冻干。冻干条件为低于1.2mbar的压力和低于-55°C的温度。

[0096] 将每个试管保存在-20°C或更低的温度下，并在使用前通过添加30ml无菌水进行重新配制。

[0097] 实施例2

[0098] 细胞死亡的测定

[0099] 人肺癌细胞(A549, ATCC)在含有非必需氨基酸(1:100)、1mM丙酮酸钠、50 $\mu$ g/ml庆大霉素和5-10%胎牛血清(FCS)的RPM1-1640中，于37°C、5%二氧化碳环境下培养。为了进行细胞死亡实验，细胞在96孔板(2×10<sup>4</sup>/孔, Tecan Group Ltd)上生长过夜。将细胞与实施例1中获得的生物活性复合物以相当于7、21或35 $\mu$ M肽的剂量在无血清RPM1-1640中于37°C孵育。1小时后添加FCS。在肽-油酸处理后3小时后，通过以下三个生化方法量化细胞死亡，包

括1) 使用基于发光的ATPlite<sup>TM</sup>试剂盒(Perkin Elmer)估算细胞内ATP水平,2) 用PrestoBlue荧光染色(Invitrogen公司,A13262),以及3) Tryphan Blue排除测定。使用酶标仪(Infinite F200,Tecan)测量荧光和发光。

[0100] 结果如图1所示。在PBS中制备的复合物具有很高的活性,并以剂量依赖的方式触发细胞死亡(图1A)。那些仅用PBS的单一盐制得的复合物溶液(图1B)显示出明显的活性丧失。相比之下,如图1C所示,上述混合物(6)以剂量依赖性方式维持合理水平肿瘤细胞毒性的活性。

[0101] 实施例3

[0102] 过滤对发明方法的影响

[0103] 使用PBS溶液(1)将实施例1的方法重复两次,但在这种情况下,每种溶液都通过化学上不同的过滤器,过滤器分别为聚醚砜膜(12846445,VWR)和Minisar<sup>®</sup>NML醋酸纤维素膜过滤器(60810103,Sartorius)。产物的生物学功效按照实施例2中所述的方法测试,与未过滤的产物并行比较。结果如图2所示。

[0104] 通过测量总细胞ATP水平、PrestoBlue染色和Tryphan Blue排斥试验之间,未观察到复合物生物活性的显着差异。

[0105] 实施例4

[0106] BAMLET的生产

[0107] 将冻干形式的牛 $\alpha$ -乳白蛋白( $700\mu\text{M}$ )与油酸钠薄片( $3.5\text{mM}$ )一起加入管中。然后将磷酸盐缓冲盐水( $1\text{ml}$ )加到试管中,在室温下涡旋1-2分钟。形成透明溶液(图3A和3B)。

[0108] 使用实施例2中所述的测定法测试所得溶液。结果示于图4中。显然,该溶液具有生物活性,并以剂量依赖性方式杀死了A549肺癌细胞。然而,因为复合物的冻干去除了活性,故这种作用是短暂的。

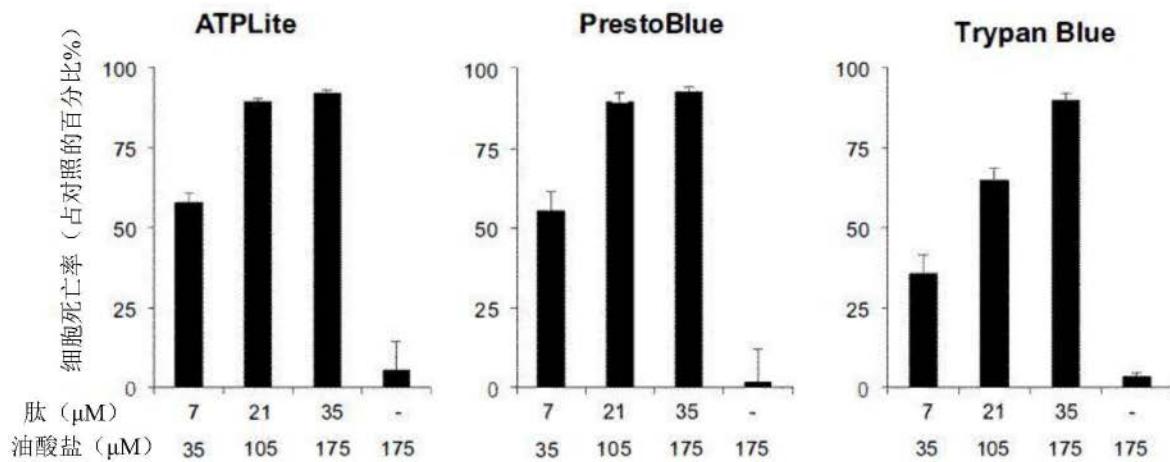
- [0001] SEQUENCE LISTING  
[0002] <110> 哈姆雷特药品AB  
[0003] <120> 生物活性复合物的制备  
[0004] <130> P19114250WP  
[0005] <150> GB 1707715.7  
[0006] <151> 2017-05-14  
[0007] <160> 7  
[0008] <170> PatentIn version 3.5  
[0009] <210> 1  
[0010] <211> 40  
[0011] <212> PRT  
[0012] <213> Artificial Sequence  
[0013] <220>  
[0014] <223> 突变蛋白片段  
[0015] <220>  
[0016] <221> MISC\_FEATURE  
[0017] <222> (6) .. (6)  
[0018] <223> 任何Cys以外的氨基酸  
[0019] <220>  
[0020] <221> MISC\_FEATURE  
[0021] <222> (28) .. (28)  
[0022] <223> 任何Cys以外的氨基酸  
[0023] <400> 1  
[0024] Lys Gln Phe Thr Lys Xaa Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp  
[0025] 1 5 10 15  
[0026] Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Xaa Thr Met Phe His  
[0027] 20 25 30  
[0028] Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala  
[0029] 35 40  
[0030] <210> 2  
[0031] <211> 43  
[0032] <212> PRT  
[0033] <213> Artificial Sequence  
[0034] <220>  
[0035] <223> 突变蛋白片段  
[0036] <220>  
[0037] <221> MISC\_FEATURE  
[0038] <222> (11) .. (11)

- [0039] <223> 任何Cys以外的氨基酸
- [0040] <220>
- [0041] <221> MISC\_FEATURE
- [0042] <222> (31) .. (31)
- [0043] <223> 任何Cys以外的氨基酸
- [0044] <220>
- [0045] <221> MISC\_FEATURE
- [0046] <222> (40) .. (40)
- [0047] <223> 任何Cys以外的氨基酸
- [0048] <400> 2
- [0049] Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Xaa Ala Lys Lys Ile Leu
- |        |   |   |    |    |
|--------|---|---|----|----|
| [0050] | 1 | 5 | 10 | 15 |
|--------|---|---|----|----|
- [0051] Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Xaa Thr
- |        |    |    |    |
|--------|----|----|----|
| [0052] | 20 | 25 | 30 |
|--------|----|----|----|
- [0053] Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Xaa Glu Lys Leu
- |        |    |    |
|--------|----|----|
| [0054] | 35 | 40 |
|--------|----|----|
- [0055] <210> 3
- [0056] <211> 40
- [0057] <212> PRT
- [0058] <213> Artificial Sequence
- [0059] <220>
- [0060] <223> 突变蛋白片段
- [0061] <400> 3
- [0062] Lys Gln Phe Thr Lys Ala Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp
- |        |   |   |    |    |
|--------|---|---|----|----|
| [0063] | 1 | 5 | 10 | 15 |
|--------|---|---|----|----|
- [0064] Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Ala Thr Met Phe His
- |        |    |    |    |
|--------|----|----|----|
| [0065] | 20 | 25 | 30 |
|--------|----|----|----|
- [0066] Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln Ala
- |        |    |    |
|--------|----|----|
| [0067] | 35 | 40 |
|--------|----|----|
- [0068] <210> 4
- [0069] <211> 43
- [0070] <212> PRT
- [0071] <213> Artificial Sequence
- [0072] <220>
- [0073] <223> 突变蛋白片段
- [0074] <400> 4
- [0075] Leu Asp Asp Asp Ile Thr Asp Asp Ile Met Ala Ala Lys Lys Ile Leu
- |        |   |   |    |    |
|--------|---|---|----|----|
| [0076] | 1 | 5 | 10 | 15 |
|--------|---|---|----|----|
- [0077] Asp Ile Lys Gly Ile Asp Tyr Trp Leu Ala His Lys Ala Leu Ala Thr

[0078]	20	25	30
[0079] Glu Lys Leu Glu Gln Trp Leu Ala Glu Lys Leu			
[0080]	35	40	
[0081] <210> 5			
[0082] <211> 23			
[0083] <212> PRT			
[0084] <213> Artificial Sequence			
[0085] <220>			
[0086] <223> 突变蛋白片段			
[0087] <400> 5			
[0088] Met Ala Gly Trp Asp Ile Phe Gly Trp Phe Arg Asp Val Leu Ala Ser			
[0089]	1	5	10
[0090] Leu Gly Leu Trp Asn Lys His			
[0091]	20		
[0092] <210> 6			
[0093] <211> 39			
[0094] <212> PRT			
[0095] <213> Artificial Sequence			
[0096] <220>			
[0097] <223> 突变蛋白片段			
[0098] <220>			
[0099] <221> MISC_FEATURE			
[0100] <222> (6) .. (6)			
[0101] <223> 任何Cys以外的氨基酸			
[0102] <220>			
[0103] <221> MISC_FEATURE			
[0104] <222> (28) .. (28)			
[0105] <223> 任何Cys以外的氨基酸			
[0106] <400> 6			
[0107] Lys Gln Phe Thr Lys Xaa Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp			
[0108]	1	5	10
[0109] Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Xaa Thr Met Phe His			
[0110]	20	25	30
[0111] Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln			
[0112]	35		
[0113] <210> 7			
[0114] <211> 39			
[0115] <212> PRT			
[0116] <213> Artificial Sequence			

- [0117] <220>
- [0118] <223> 突变蛋白片段
- [0119] <400> 7
- [0120] Lys Gln Phe Thr Lys Ala Glu Leu Ser Gln Leu Leu Lys Asp Ile Asp  
[0121] 1 5 10 15
- [0122] Gly Tyr Gly Gly Ile Ala Leu Pro Glu Leu Ile Ala Thr Met Phe His  
[0123] 20 25 30
- [0124] Thr Ser Gly Tyr Asp Thr Gln
- [0125] 35

图 1A



PBS = NaCl (116mM), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (31mM) 和 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (9.56mM)  
pH 7.2

图 1B

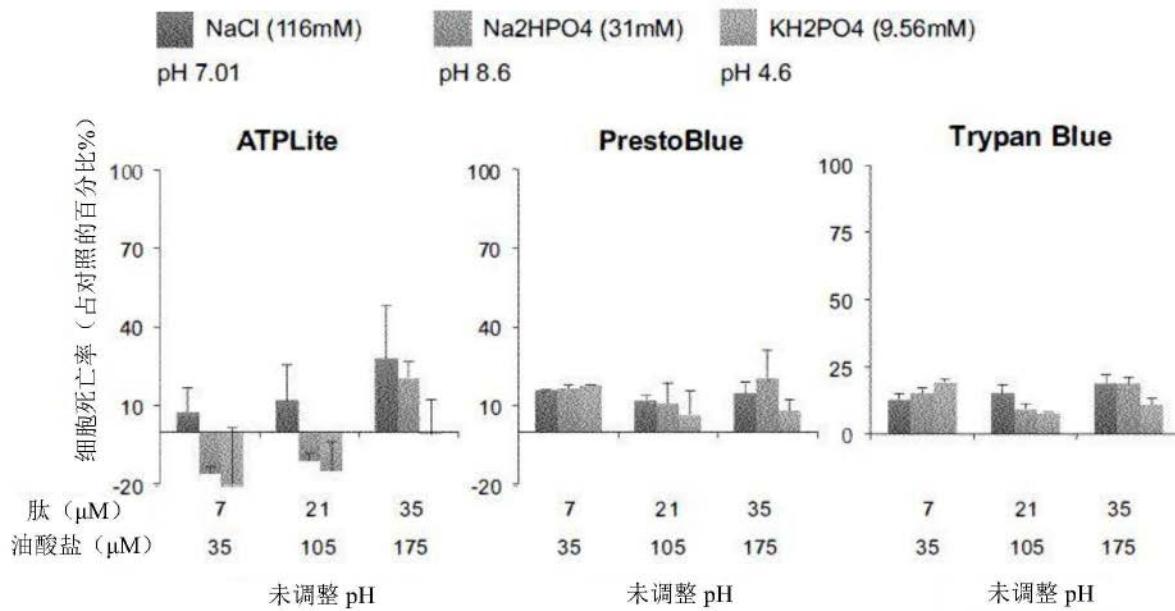


图 1C

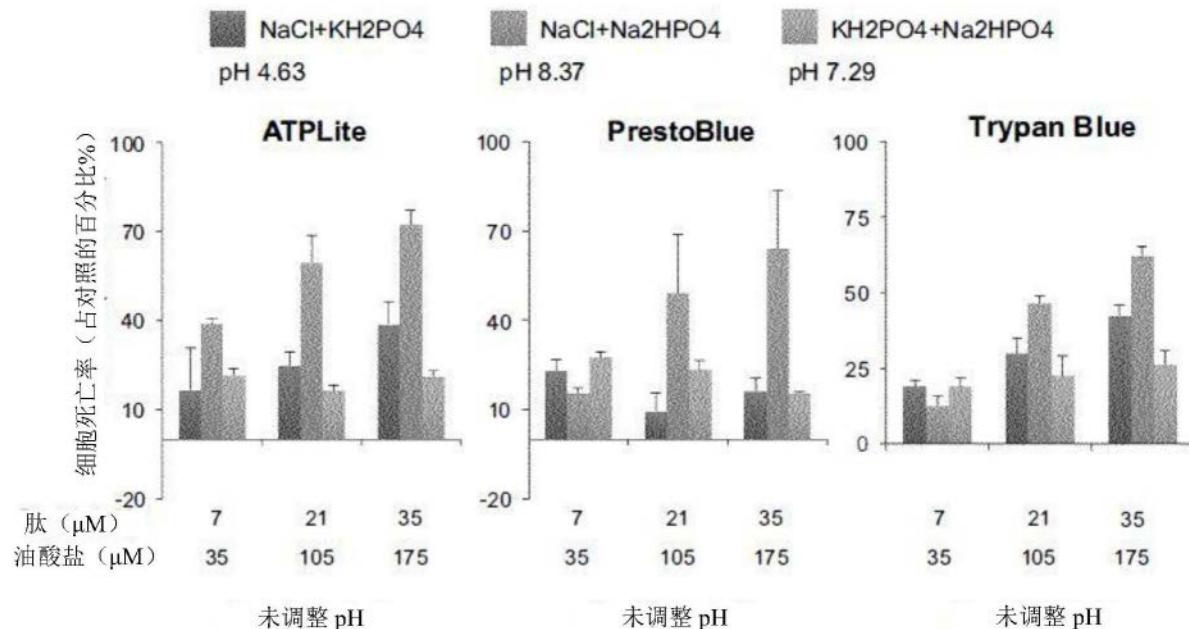


图1

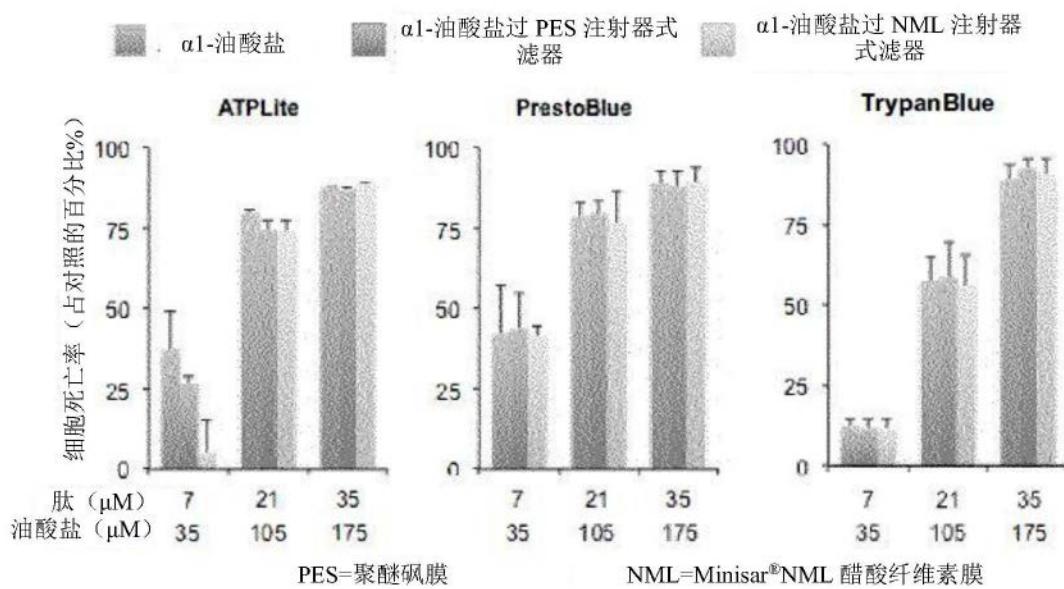


图2

图 3A

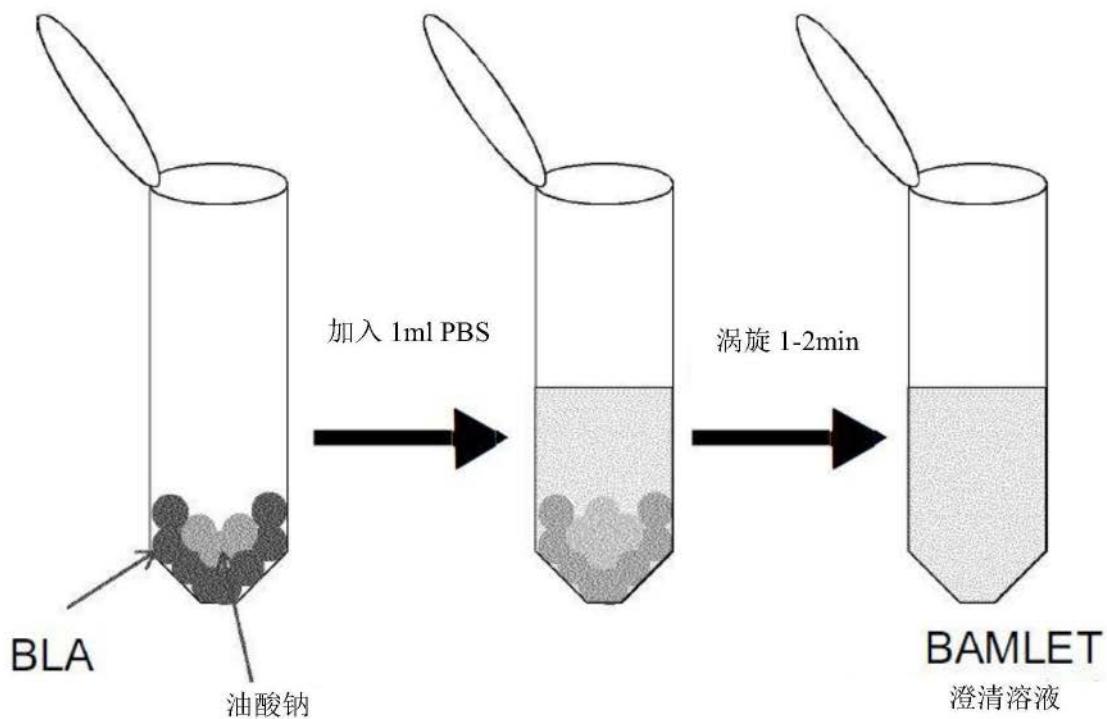


图 3B

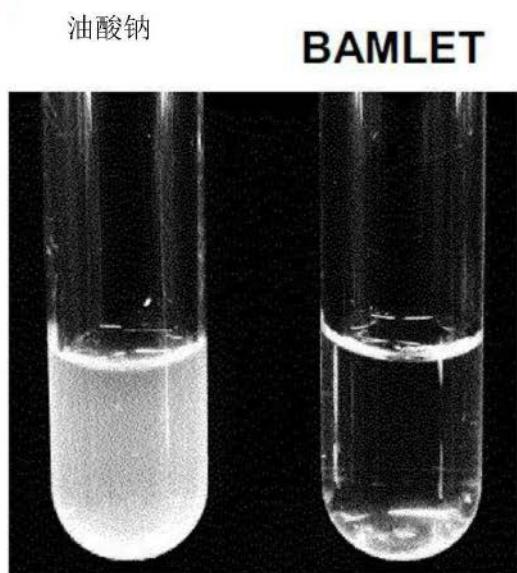


图3

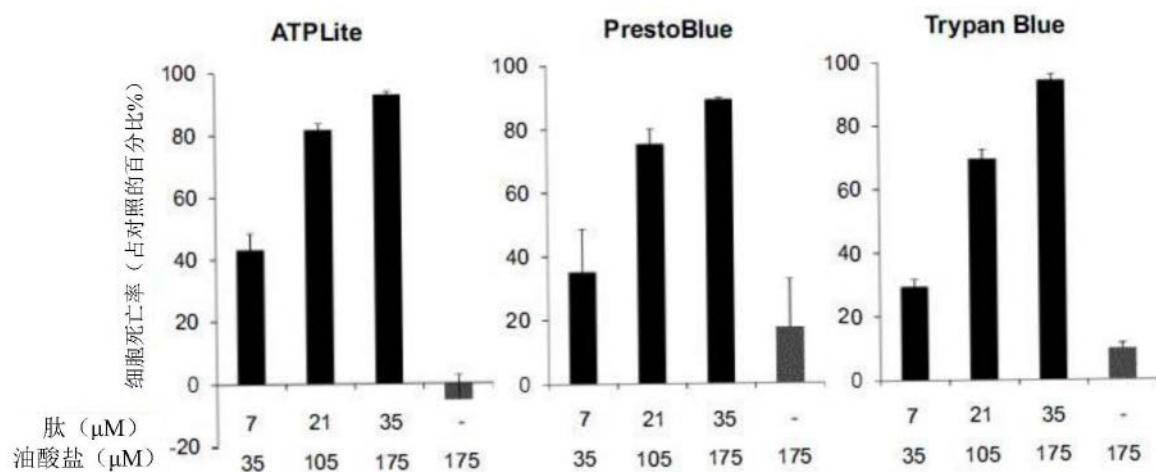


图4