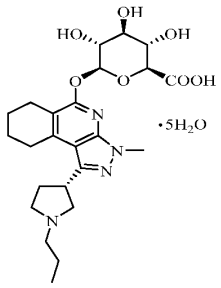
# 一种含有 TSL-1502M 的药物组合物及其应用

## 技术领域

本发明属于药物制备技术领域，具体涉及一种含有 PARP 抑制剂 TSL-1502 的中间体 TSL-1502M 的药物组合物及其应用。

## 背景技术

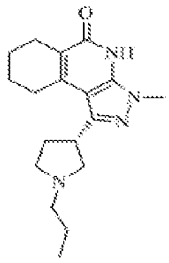
PARP 抑制剂 TSL-1502，化学名为(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-三羟基-6-(3-甲基-1-((S)-1-丙基吡咯烷-3-基)-6,7,8,9-四氢-3H-吡唑并[3,4-c]异喹啉-5-氧基)四氢-2H-吡喃-2-甲酸的化合物（设定其编号为 TSL-1502），该化合物最早出现在 201180002886.8（公开号为 CN102510863A，授权公告号为 CN102510863B，以下简称为 2011 年专利）的 0177 段化合物，其结构式见式Ⅰ。




式 I

上述专利在权利要求 16 公开了具体肿瘤类型，如头部癌、甲状腺癌、颈癌、眼癌、皮肤癌、口腔癌、咽喉癌、食道癌、胸癌、骨癌、血癌、骨髓癌、肺癌、结肠癌、乙状结肠癌、直肠癌、胃癌、前列腺癌、乳腺癌、卵巢癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、脑癌、肠癌、心脏癌、肾上腺癌、皮下组织癌、淋巴结癌、色素癌、恶性神经胶质瘤等。然而实际上，也仅在实施例 19 证实了黑色素瘤、人乳腺癌细胞株的治疗效果，对其他肿瘤没有涉及。

TSL-1502M，是制备 TSL-1502 的中间体，其申请号为 201910465780.X，发明名称为一种 PARP 抑制剂的中间体 TSL-1502M 及其制备方法，（申请日为 2019 年 05 月 31 日，公开号为 CN112010850A），结构式见式Ⅱ，




式Ⅱ。

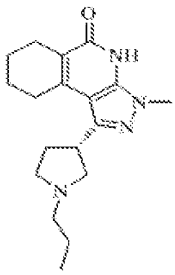
式Ⅱ化合物设定其编号为：TSL-1502M，其作为中间体即可以用于制备 TSL-1502，又可以用于 TSL-1502 的检测，作为对照品是有用的。但是该文献中并没有公开 TSL-1502M 的药物用途信息及与其他抗癌药物组合的相关信息。

发明人在研究 TSL-1502M 时，意外发现其对 PARP 酶的抑制活性高于 TSL-1502，提示了其作为 PARP 抑制剂的药物用途。

TSL-1502M 和其他药物联合应用未见报道，本发明对 TSL-1502M 和其他药物的联合应用进行了研究，意外的发现，其和替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康联合使用具有协同增效作用。

## 发明内容

本发明提供一种含有 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物的复方药物组合物，其中，所述 TSL-1502M 结构如下



式Ⅱ。

其中所述另外一种抗肿瘤药物选自替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康。

本发明包括含有 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物两种活性成分的药物制剂组合物，或分立的含有 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物的药物制剂，两种制剂包装在一起的组合。

本发明所述的药物组合物的制备包括将含有 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物混合的步骤。

或将含有 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物分别制备成药物制剂，将两种制剂组合包装在一起，使用时可以方便的联合应用两种药物。如所述组合包装可以将 TSL-1502M 制备成注射剂，另外一种抗肿瘤药物制备成注射剂，两种单位剂量的注射剂一起包装在同一个包装盒中，使用时可以分别注射，也可以一起注射。

本发明所述的 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物的药物组合物，其中每一种药物的剂量采用药物有效量，所述“有效量”是指每一种药物单独或联合应用时能够实现临床上预防或治疗疾病而起效的量。如制备成注射剂，是单位剂量形式，如分装成不同颜色，不同规格大

小的无菌小瓶，每瓶含有药物活性成分 0.1-2000mg，小瓶封装后，再置入包装盒子中；还可进一步置入可装有 2-100 瓶的包装盒子中，方便储存和运输。

本发明所述组药物合物包含 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物，两者重量比可以根据各自的有效量进行配比，如为 1∶1000 至 1000∶1。

对于乳腺癌，TSL-1502M 和替莫唑胺的重量比为 3-10nm：10-30μm，优选为 3nm：10-30μm。

对于大肠癌或结肠癌，TSL-1502M 和 7-乙基-10-羟基喜树碱或伊立替康的重量为 3-10μM：0.1-1nM，优选为 3-10μM：0.1nM。

本发明所述的药物组合物的制备方法，包括将含所需量的 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物一起或分别作为药物活性成分，根据制剂学常规技术制备成可供服用的药物制剂组合物，其剂型包括，注射剂，优选干粉注射剂，特别优选冷冻干燥注射剂。

本发明的注射剂可以不加入辅料或加入一种或多种药用辅料，如：葡萄糖，乳糖，甘露醇，氯化钠，羟丙基-B-环糊精等，然后使用适当的方法制成注射剂。

本发明的使用方法包括，将含所需量的 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物一起作为两种药物活性成分制备成注射剂一起注射使用。也可将含所需量的 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物分别作成注射剂，分别注射使用。

本发明所述药物制剂组合物，可以是任何可服用的药物形式：如：片剂、糖衣片剂、薄膜衣片剂、肠溶衣片剂、胶囊剂、硬胶囊剂、软胶囊剂、口服液、口含剂、颗粒剂、冲剂、丸剂、散剂、膏剂、丹剂、混悬剂、粉剂、溶液剂、注射剂、栓剂、软膏剂、硬膏剂、霜剂、喷雾剂、滴剂、贴剂。

本发明的药物制剂组合物，优选的是单位剂量的药物制剂形式，如在制成药剂时，单位剂量的药剂可含有本发明的 TSL-1502M，以及另外一种抗肿瘤药物 0.1-1000mg，其余为药学上可接受的辅料。药学上可接受的辅料以重量计可以是制剂总重量的 0.01-99.99%。

本发明的药物制剂组合物在使用时根据病人的情况确定用法用量，如一日 1-3 次，一次 1-20 片等。

优选的，本发明的药物制剂组合物为口服制剂或注射剂。其中，所述口服制剂选自胶囊剂、片剂、滴丸、颗粒剂、浓缩丸、口服液中的一种。其中，所述注射剂选自液体、半固体，固体，粉剂形式，优选注射液，粉针中的一种。

本发明的药物制剂组合物，其口服给药的制剂可含有辅料，诸如粘合剂、填充剂、稀释剂、压片剂、润滑剂、崩解剂、着色剂、调味剂和湿润剂，必要时可对片剂进行包衣。

适用的填充剂包括纤维素、甘露糖醇、乳糖和其它类似的填充剂。适宜的崩解剂包括淀

粉、聚乙烯吡咯烷酮和淀粉衍生物，例如羟基乙酸淀粉钠。适宜的润滑剂包括，例如硬脂酸镁。适宜的药物可接受的湿润剂包括十二烷基硫酸钠。

本发明的药物制剂可通过混合，填充，压片等常用的方法制备固体口服组合物。进行反复混合可使活性物质分布在整个使用大量填充剂的那些组合物中。

口服液体制剂的形式例如可以是水性或油性悬浮液、溶液、乳剂、糖浆剂或酏剂，或者可以是一种在使用前可用水或其它适宜的载体复配的干燥产品。这种液体制剂可含有常规的添加剂，诸如悬浮剂，例如山梨醇、糖浆、甲基纤维素、明胶、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素、硬脂酸铝凝胶或氢化食用脂肪，乳化剂，例如卵磷脂、脱水山梨醇一油酸酯或阿拉伯胶；非水性载体（它们可以包括食用油），例如杏仁油、分馏椰子油、诸如甘油的酯的油性酯、丙二醇或乙醇；防腐剂，例如对羟基苯甲酯或对羟基苯甲酸丙酯或山梨酸，并且如果需要，可含有常规的香味剂或着色剂。

对于注射剂，制备的液体单位剂型含有本发明的活性物质和无菌载体。根据载体和浓度，可以将此化合物悬浮或者溶解。溶液的制备通常是通过将活性物质溶解在一种载体中，在将其装入一种适宜的小瓶或安瓿前过滤消毒，然后密封。辅料例如一种局部麻醉剂、防腐剂和缓冲剂也可以溶解在这种载体中。为了提高其稳定性，可在装入小瓶以后将这种组合物冰冻，并在真空下将水除去。

本发明进一步提供本发明的组合物在制备抗肿瘤药物中的应用，所述应用时，TSL-1502M和另外一种抗肿瘤药物的使用剂量可以是一天 0.01mg-2000mg。

本发明的应用取得了意想不到的技术效果，有关应用的实例见本发明实验例。

本发明提供的抗肿瘤的药物组合，具有以下特点：

1、发明人试验发现，TSL-1502M 明显增效替莫唑胺对 MDA-MB-436 细胞（乳腺癌细胞株）的增殖抑制作用；与替莫唑胺合用后诱导 MDA-MB-436 细胞的 γ-H2AX 磷酸化水平显著增加，促进肿瘤细胞的细胞凋亡过程。

2、TSL-1502M 与替莫唑胺合用后，对肿瘤细胞的抑制作用优于单独使用 TSL-1502M 或替莫唑胺，如表 3-1 所示，单独给予 TSL-1502M 在浓度为 30nM 时对 MDA-MB-436 细胞（乳腺癌）的抑制率为 67.5±1.5%，单独使用 TMZ 在 30μM 时的抑制率为 8.5±3.5%，二者联合可进一步将 MDA-MB-436 细胞增殖抑制率提高到 80.2±3.5%，这种协同增效作用在较低的药物浓度时更为明显。

3、TSL-1502M 明显增效伊立替康活性代谢产物 SN38 对 SW620 细胞（结肠癌细胞株）的增殖抑制作用。

4、TSL-1502M 与伊立替康活性代谢产物 SN38 合用，对肿瘤细胞的抑制作用优于单独使

用 TSL-1502M 或替莫唑胺。如表 3-2 所示，单独给予 TSL-1502M 在浓度为 10μM 时对 SW620 细胞（大肠癌，具体为结肠癌）的抑制率为 37.2±17.9%，单独使用 SN38（伊立替康的活性代谢物）在 1nM 时的抑制率为 62.3±18.1%，二者联合可进一步将 MDA-MB-436 细胞增殖抑制率提高到 98.3±1.3%，这种协同增效作用在较低的药物浓度时更为明显。

**附图说明**

图 1：TSL-1502 及 TSL-1502M 对体外培养细胞增殖的影响；

图 2：TSL-1502、TSL-1502M 与细胞毒药物合用对 MDA-MB-436、SW620 细胞增殖的抑制作用；

图 3：TSL-1502M 对 MDA-MB-436 细胞 γ-H2AX 磷酸化的影响。

**具体实施方式**

**实施例 1**

本发明提供 TSL-1502M 和另外一种抗肿瘤药物替莫唑胺， 7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康组成的复方药物冷冻干燥注射剂，

制备实例：

取 TSL-1502M 20g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 10g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 2**

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 10g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 20g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 50g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到

2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 100g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 10g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 20g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 50g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

或

取 TSL-1502M 100g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，共同溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，混合均匀，罐装到 2g 的小瓶中，共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，包装，即得。

**实施例 3**

取 TSL-1502M 2g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 1g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**或**

取 TSL-1502M 10g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊

立替康、拓扑替康 5g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 4**

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 2.5g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 5**

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 6**

取 TSL-1502M 50g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 5g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 7**

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 50g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 8**

取 TSL-1502M 5g，以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，7-乙基-10-羟基喜树碱、伊立替康、拓扑替康 10g，分别溶于含有 100g 甘露醇的 1000ml 水溶液中，分别罐装到 2g 的小瓶中，各共计 500 瓶，封盖前，置入冷冻干燥箱中，真空干燥 24 小时，封盖，各取 1 瓶组合包装，即得。

**实施例 9：TSL-1502M 的制备**

参考申请号为 201910465780.X，发明名称为一种 PARP 抑制剂的中间体 TSL-1502M 及其制备方法的实施例 1：

反应：反应釜中，加入主原料(*S*)-3-甲基-1-(吡咯烷-3-基)-3,4,6,7,8,9-六氢-5*H*-吡唑并[3,4-*c*]异喹啉-5-酮 (2*S*,3*S*)-2,3-二(苯甲酰氧基)丁二酸盐（630.0g，1mol）和乙醇（3800mL），搅拌，降温至 10℃，加入氰基硼氢化钠（125.7g，2mol），再滴加丙醛（116.2g，2mol），滴加过程中温度不超过 20℃，滴加完毕后，继续在 10℃~25℃搅拌反应 1h~2h。

淬灭：反应结束后，向反应混合物中缓慢滴加质量百分浓度为 36~38%的盐酸（73g，2mol），调节 pH 至 4-5 之间，控制滴加速度，以 20%氢氧化钠吸收大量冒出的气体，为防止冲料，同时控制温度为 20℃~30℃。

后处理：S1、淬灭后的反应液减压浓缩蒸除乙醇，温度不超过 70℃；

S2、向 S1 的残留物中加入水与二氯甲烷（水与二氯甲烷的重量比为 1：4），使用量为式Ⅰ化合物重量的 7 倍，在 5℃~15℃温度下用 40%的氢氧化钠水溶液调节混合液的 pH 至 9~10，搅拌，静置，分层，有机相保留；

S3、S2 所得水相用二氯甲烷继续萃取 1 次，所得有机相与 S2 所得有机相合并，水相保留；

S4、S3 所得合并后的有机相用 40%的氢氧化钠水溶液萃取，所得水相与 S3 所得水相合并，有机相保留；

S5、S4 所得合并后的水相用 36~38%的盐酸调节 pH 至 4~5，再加入二氯甲烷，二氯甲烷使用量为式Ⅰ化合物重量的 5 倍，搅拌后静置分层，有机相保留；

S6、S5 所得水相用二氯甲烷继续萃取 2 次，所得有机相与 S4、S5 所得有机相合并；

S7、S6 所得合并后的有机相用 3%碳酸氢钠水溶液洗涤 2 次后再用无水硫酸钠干燥，过滤除去硫酸钠固体，滤液减压浓缩后真空干燥，得到 PARP 抑制剂的中间体 TSL-1502M 226g。

**实验例 1**

**一、实验材料**

1、受试药物

TSL-1502：白色粉末，批号 120301，纯度 99.56%，含水量 16.65%，密封，2-8℃保存，申请人自备；

TSL-1502M: 白色粉末，批号 20150801，纯度 98.6%，密封，2-8℃保存，申请人自备；

ABT-888（维利帕尼，Veliparib）：白色粉末，批号 HM-069-8-20101112，纯度 98.12%，密封，2-8℃保存，购自上海皓元公司，ABT-888 是一种新型的强效 PARP-1 和 PARP-2 抑制剂，主要用于乳腺癌；

AZD2281（奥拉帕利，Olaparib）：白色粉末，批号 20131105，纯度 99.15%，密封，2-8℃保存，购自上海德默公司，AZD2281 是一种 PARP 抑制剂，已批准适应症包括卵巢癌、乳腺

癌、胰腺癌、前列腺癌；

替莫唑胺(简称：TMZ)：白色粉末，批号 20150418， 密封，2-8℃保存，替莫唑胺是咪唑四嗪衍生物，主要用于多形性胶质母细胞瘤；

SN-38（伊立替康的活性代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱。cas 号为 86639-52-3）：淡黄色粉末，纯度 99.1%，批号 E060206，密封，2-8℃保存，购自上海骏杰生物技术公司，伊立替康是喜树碱的半合成衍生物，主要用于结肠（直肠）癌。

**2、药品配制方法：**

TSL-1502、TSL-1502M、AZD2281 和 ABT-888 用 DMSO 配成 10 mM 的原液，分装保存于-70℃；TMZ 用 DMSO 配成 200mM 的原液，分装保存于-70℃。

**3、细胞株选择依据及细胞株来源**

参考 FDA 批准上市的 PARP 抑制剂 Olaparib（LYNPARZA）、Rucaparib（RUBRACA）和 Niraparib（ZEJULA）的药效学研究情况，选择 BRCA1/2 突变型及野生型细胞来评价 TSL-1502 及其代谢产物的体外抗肿瘤活性。细胞来源及培养条件见表 1

表 1：细胞来源及类型

| 细胞株 | 来源 | 组织来源和类型 | BRCA 基因 | 培养条件 |
|---|---|---|---|---|
| V-C8 | 国外赠送 | 中华仓鼠卵巢细胞衍生株 | BRCA2 defective | 含 10%FBS 的 F-10 |
| V-C8 #13-5 | 国外赠送 | 中华仓鼠卵巢细胞衍生株 | 正常 | 含 10%FBS 的 F-10 |
| MDA-MB-436 | 细胞库 | 人乳腺癌细胞 | BRCA1 mutated | 含 10%FBS，10 μg/ml insulin 的 L-15 |
| Capan-1 | ATCC | 人胰腺癌细胞 | BRCA2 mutated | 含 20%FBS 的 IMDM |
| HCC1937 | ATCC | 人乳腺癌细胞 | BRCA1 mutated | 含 10%FBS 的 RPMI1640 |
| MDA-MB-468 | 细胞库 | 人乳腺癌细胞 | 正常 | 含 10%FBS 的 L-15 |
| UWB1.289 | ATCC | 人卵巢癌细胞 | BRCA1-null | 含 3%FBS 的 RPMI1640/IMDM |
| UWB1.289 BRCA1 | ATCC | 人卵巢癌细胞 | BRCA1 表达 | 含 3%FBS 的 RPMI1640/IMDM |
| SW620 | ATCC | 人结肠癌细胞 | 正常 | 含 10%FBS 的 L-15 |

4、试剂及仪器

RPMI1640，L-15，F-10，DMEM 及 IMDM 购自 Gibco BRL 公司；FBS 购自 Gibco BRL 公司；SRB 购自 Sigma 公司；抗 Rad51 一抗购自 Santa Cruz 公司；抗 P-γ-H2AX 和 PARP 一抗购自 Cell Signaling Technology 公司；抗 β-Tubulin 一抗购自 Sigma 公司；辣根过氧化酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗购自 Calbiochem 公司；Alexa Fluor ® 488 goat anti-rabbit 荧光二抗购自 Molecular Probes 公司；Immobilon Western HRP Substrate luminal reagent 购自 Millipore 公司；其它普通的化学试剂系国产分析纯（AR）试剂；

多功能酶标仪 Synergy H4 购自 BioTek 公司；二氧化碳培养箱（Model 3111）购自 Thermo 公司；倒置显微镜 XDS-1B 购自重庆光电仪器有限公司；流式细胞仪(FACS Calibur flow

cytometer)购自 Beckman Dickson 公司；激光共聚焦显微镜购自奥林巴斯公司；Western blot 成像仪购自 GlinxScience instruments。

二、实验方法

**1、磺酰罗丹明 B 蛋白染色法(SRB 法)**

接种一定数量的对数生长期细胞于 96 孔培养板。贴壁生长 24 小时后，加入不同浓度(1、3、10、30、100、300、1000、3000、10000 nM)的药物。药物作用 10 天后，用三氯乙酸固定细胞。然后 SRB 溶液染色；最后加入 Tris 溶液溶解 SRB，酶标仪 510nm 波长下测定 OD 值，以下列公式计算细胞生长抑制率：

抑制率 = （OD 值$_{对照孔}$－OD 值$_{给药孔}$）/ OD 值$_{对照孔}$×100%

根据各浓度抑制率，计算半数抑制浓度 $IC_{50}$。

**2、Western blot 法**

**γ-H2AX 的磷酸化的检测：**

MDA-MB-436 接种于六孔板（$2\times10^5$/ml），加入不同浓度的 TSL-1502M 或 AZD2281（100、1000、10000 nM）作用 1.5 小时后，再加入 1mM TMZ 作用 0.5 小时，加入 1×SDS 凝胶上样缓冲液（50 mM Tris-HCl (pH 6.8)，100 mM DTT，2% SDS，10%甘油，0.1%溴酚蓝）裂解细胞。细胞裂解物在沸水浴中加热变性，进行 SDS-PAGE 电泳，电泳结束后，用湿转系统将蛋白转移至 PVDF 膜，将 PVDF 膜置于封闭液（5%脱脂奶粉稀释于 TBS/T）中室温封闭，然后 I，II 抗反应；洗膜后，用 Immobilon Western HRP Substrate luminal reagent 试剂发色，Western blot 成像仪拍照。

三、实验结果

**1、TSL-1502、TSL-1502M 抑制多种体外培养肿瘤细胞的增殖**

TSL-1502、AZD2281、ABT-888 作用于细胞 240 小时（120 小时更换新配药物一次）后，检测其对细胞的增殖抑制作用。结果如表 2 和图 1 所示：

对 BRCA 基因缺陷或突变细胞（V-C8、MDA-MB-436、Capan-1 和 UWB1.289），TSL-1502M 的增殖抑制作用十分显著，$IC_{50}$ 分别为 0.2±0.0nM、0.9±0.2nM、100.6±73.8 nM、1.9±0.4nM），该抑制作用显著强于其前药 TSL-1502（$IC_{50}$ 分别为 132.1±4.7nM、79.6±12.5nM、≈10000 nM、935.7±526.6nM），以及参比药物 AZD2281（$IC_{50}$ 分别为 18.6±1.3 nM、4.0±0.7nM、586.1±89.4 nM、≈1nM（抑制率稍弱于 TSL-1502M））和 ABT-888（$IC_{50}$ 分别为 314.2±24.4 nM、114.7±60.8nM、NA、2102.5±1470.1nM）；

但对 BRCA1 突变的 HCC1937 细胞，TSL-1502M、TSL-1502、AZD2281 和 ABT-888 的增殖抑制均较弱。

对 BRCA 基因正常细胞（V-C8#13-5 和 UWB1.289 BRCA1），TSL-1502M、TSL-1502、AZD2281 和 ABT-888 的增殖抑制作用均较弱；但对 BRCA 功能正常的 MDA-MB-468 细胞，TSL-1502M 和 AZD2281 有一定增殖抑制作用（$IC_{50}$ 分别为 73.6±19.5 nM 和 541.1±93.8 nM）。

总体而言，TSL-1502M 对 BRCA1/2 功能缺陷的细胞更为敏感，对细胞的增殖抑制作用具有选择性，其选择性的作用特点与 AZD2281 和 ABT-888 相似，其抑制作用比 TSL-1502、AZD2281 和 ABT-888 强。

**表 2：对体外培养细胞增殖的影响（n=2）**

| 细胞株 | IC50 (nM，Mean ± SD) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | TSL-1502 | TSL-1502M | AZD2281 | ABT-888 |
| V-C8 | 132.1±4.7 | 0.2±0.0 | 18.6±1.3 | 314.2±24.4 |
| V-C8#13-5 | >10000 | >10000 | ≈10000 | >10000 |
| Capan-1 | ≈10000 | 100.6±73.8 | 586.1±89.4 | NA |
| HCC1937 | >10000 | >10000 | ≈10000 | >10000 |
| MDA-MB-468 | >10000 | 73.6±19.5 | 541.1±93.8 | NA |
| UWB1.289 | 935.7±526.6 | 1.9±0.4 | ≈1 | 2102.5±1470.1 |
| UWB1.289 BRCA1 | >10000 | 2110.0±865.5 | 2917.5±79.9 | >10000 |
| MAD-MB-436 | 79.6±12.5 | 0.9±0.2 | 4.0±0.7 | 114.7±60.8 |

**2、TSL-1502、TSL-1502M 增效细胞毒药物抗肿瘤活性**

检测了 TSL-1502 和 TSL-1502M 与细胞毒药物的联合抗肿瘤作用。结果如表 3-1、3-2、3-3、3-4 和图 2 所示。

**2.1 TSL-1502 和 TSL-1502M 对 MDA-MB-436 细胞的增殖抑制作用：见表 3-1**

表 3-1：对 MDA-MB-436 细胞增殖的抑制作用。抑制率（%，Mean±SD）

| | | AZD2281 | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 nM | 10 nM | 30 nM | 100 nM |
| TMZ | 0 μM | 0 | 25.0±3.6 | 36.4±4.1 | 47.0±5.2 |
| | 10μM | 2.7±2.5 | 42.0±0.4 | 56.8±1.6 | 61.5±2.2 |
| | 30μM | 9.1±4.8 | 59.8±2.9 | 69.6±3.5 | 71.7±1.4 |
| | | ABT888 | | | |
| | | 0 nM | 30 nM | 100 nM | 300 nM |
| TMZ | 0 μM | 0 | 4.9±0.8 | 18.9±6.6 | 23±3.2 |
| | 10μM | 0.9±2.2 | 18.1±1.4 | 30.1±0.7 | 40±0.5 |
| | 30μM | 6.2±3.5 | 38.2±1.5 | 50.5±0.3 | 60±2.6 |
| | | TSL-1502 | | | |
| | | 0 nM | 30 nM | 100 nM | 300 nM |
| TMZ | 0 μM | 0 | 1.3±2.1 | 15.6±3.3 | 30.2±1 |
| | 10μM | 3.8±0.8 | 7±4.2 | 24.6±2.7 | 48.1±2.8 |
| | 30μM | 11.2±2.4 | 22.7±2.1 | 42.3±3 | 63.4±3 |
| | | TSL-1502M | | | |

| | | 0 nM | 3 nM | 10 nM | 30 nM |
|---|---|---|---|---|---|
| TMZ | 0 μM | 0 | 28.6±0.1 | 61.9±1.3 | 67.5±1.5 |
| | 10μM | -0.9±0.8 | 45.2±1.3 | 69.3±0.6 | 74.1±1.7 |
| | 30μM | 8.5±3.5 | 63.8±3.3 | 75.6±1.1 | 80.2±3.5 |

表 3-2 金氏公式计算 TSL-1502M 和 TMZ 两种药物的联合作用 Q 值

| $C_{1502M}$(nM) | $C_{TMZ}$(μM) | Q | 协同作用 |
|---|---|---|---|
| 3 | 10 | 1.62 | 是 |
| 10 | 10 | 1.13 | 否 |
| 30 | 10 | 1.10 | 否 |
| 3 | 30 | 1.84 | 是 |
| 10 | 30 | 1.16 | 是 |
| 30 | 30 | 1.14 | 否 |

在 BRCA1 突变的 MDA-MB-436 细胞中，TSL-1502、TSL-1502M 和参比化合物 AZD2281、ABT-888 均能够明显增效 TMZ 对 MDA-MB-436 细胞的增殖抑制作用。单独使用 TMZ（≤30 μM）对 MDA-MB-436 细胞的增殖几乎没有抑制作用，而 10μM 的 TMZ 与 3 nM 的 TSL-1502M 联合使用时，Q 值为 1.62 具有协同作用；30μM 的 TMZ 与 3nM 或 10nM 的 TSL-1502M 联合使用时，Q 值分别为 1.84 和 1.16 具有协同作用。 即肿瘤细胞或肿瘤组织中 TSL-1502M 与 TMZ 的药物浓度分别在 3-10nM 和 10-30μM 范围内，对肿瘤的抑制具有协同作用，效果较佳的是 TSL-1502M 3nM 和 TMZ 10-30μM，效果更佳的是 TSL-1502M 3nM 和 TMZ 30μM 的组合。

**2.2：TSL-1502 和 TSL-1502M 对 SW620 细胞的增殖抑制作用。见表 3-3**

表 3-3：对 SW620 细胞的增殖抑制作用。抑制率（%，Mean±SD）

| | | AZD2281 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 0μM | 3μM | 10μM |
| SN38 | 0 nM | 0 | 15.4±23.0 | 70.2±18.2 |
| | 0.1nM | 1.0±11.2 | 32.2±27.9 | 94.5±5.0 |
| | 1nM | 73.5±8.0 | 92.0±9.3 | 97.1±1.4 |
| | | TSL-1502M | | |
| | | 0μM | 3μM | 10μM |
| SN38 | 0 nM | 0 | 18.8±13.4 | 37.2±17.9 |
| | 0.1nM | 0.0±4 | 37.7±16.6 | 56.3±12.7 |
| | 1nM | 62.3±18.1 | 98.0±0.7 | 98.3±1.3 |

表 3-4 金氏公式计算 TSL-1502M 和 SN38 两种药物的联合作用 Q 值

| $C_{1502M}$(μM) | $C_{SN38}$(nM) | Q | 协同作用 |
|---|---|---|---|
| 3 | 1 | 1.41 | 是 |
| 10 | 1 | 1.29 | 是 |
| 3 | 0.1 | 2.01 | 是 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| 10 | 0.1 | 1.51 | 是 |

在BRCA基因正常的SW620细胞中，TSL-1502M和参比化合物AZD2281均能够明显增效TMZ对SW620细胞的增殖抑制作用。单独给予SN38（≤1nM）或TSL-1502M （≤10μM），对SW620细胞的抑制率最高分别为62.3±18.1、37.2±17.9；当两者联合使用时，抑制率可提高到98.3±1.3%；TSL-1502M（3μM~10μM）和SN38（0.1nM~1nM）联合应用，Q值均大于1.15具有协同作用。

上述结果表明，在BRCA基因突变或正常的肿瘤细胞中，TSL-1502M对细胞毒药物均有增效作用。

**3、TSL-1502M与TMZ合用明显增强MDA-MB-436细胞γ-H2AX的磷酸化**

磷酸化的组蛋白H2AX(γ-H2AX)是DNA损伤的标志物，我们在BRCA1突变的MDA-MB-436细胞中检测了TSL-1502M与TMZ合用后对DNA损伤修复的影响。TSL-1502M以及参比对照化合物AZD2281合用TMZ后，对γ-H2AX的影响结果见图3，合用部分见图中圆圈的部分，结果显示：

TSL-1502M或参比化合物AZD2281与TMZ合用后γ-H2AX的磷酸化明显增强。

上述结果表明，TSL-1502M及AZD2281能抑制DNA损伤修复，TSL-1502M活性强于AZD2281。

试验结论：

TSL-1502M明显增效替莫唑胺对MDA-MB-436细胞（BRCA1突变）和伊立替康活性代谢产物SN38对SW620细胞（BRCA1/2正常）的增殖抑制作用；与替莫唑胺合用后诱导MDA-MB-436细胞的γ-H2AX磷酸化水平显著增加，提示协同增效作用通过促进肿瘤细胞的细胞凋亡而实现；TSL-1502M的作用特点与参比化合物AZD2281相似，TSL-1502M的活性比AZD2281强。