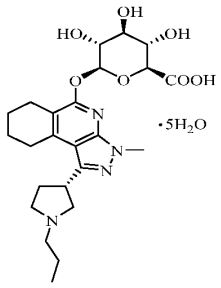
一种 PARP 抑制剂 TSL-1502 中间体 TSL-1502M 的用途

技术领域

本发明属于药物制备技术领域，具体涉及一种 PARP 抑制剂 TSL-1502 的中间体 TSL-1502M 的用途。

背景技术

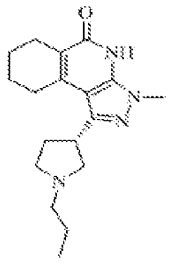
PARP 抑制剂 TSL-1502，化学名为(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-三羟基-6-(3-甲基-1-((S)-1-丙基吡咯烷-3-基)-6,7,8,9-四氢-3H-吡唑并[3,4-c]异喹啉-5-氧基)四氢-2H-吡喃-2-甲酸的化合物（设定其编号为 TSL-1502），该化合物最早出现在 201180002886.8（公开号为 CN102510863A，授权公告号为 CN102510863B，以下简称为 2011 年专利）的 0177 段化合物，其结构式见式Ⅰ。



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。

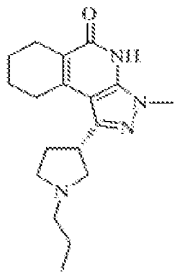
式Ⅱ化合物设定其编号为：TSL-1502M，其作为中间体即可以用于制备 TSL-1502，又可以用于 TSL-1502 的检测，作为对照品是有用的。但是该文献中并没有公开 TSL-1502M 的药物用途信息。

发明内容

本发明是在研究 TSL-1502M 时，意外发现其药物用途，特别是抗肿瘤的用途。

具体的，本发明提供了 TSL-1502M 在制备预防和治疗抗肿瘤的药物中的应用。

所述 TSL-1502M 的结构见式Ⅱ：



式Ⅱ。

本发明经过研究，意外发现该化合物具有抗肿瘤的作用，主要通过抑制肿瘤细胞增殖并诱导细胞凋亡发挥抗肿瘤作用，所述肿瘤细胞包括：BRCA 功能缺陷的肿瘤细胞、BRCA 基因突变的肿瘤细胞，或 BRCA 功能正常的肿瘤细胞。

为此，本发明所述的抗肿瘤作用，其中的肿瘤包括以下肿瘤：

所述肿瘤具体为乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌。

所述肿瘤优选为乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌。

本发明还提供了一种含有 TSL-1502M 药物制剂组合物，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，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 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，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。

所述应用时，TSL-1502M 的使用剂量可以是一天 0.01mg-2000mg。

本发明提供的抗肿瘤作用，具有以下特点：

1、发明人试验发现，对 BRCA1/2 功能缺陷的细胞（尤其是乳腺癌细胞、胰腺癌细胞、卵巢癌细胞）更为敏感，对细胞的增殖抑制作用具有选择性，TSL-1502M 的效果要优于 TSL-1502。

2、在 BRCA 基因突变或正常的肿瘤细胞（尤其是乳腺癌细胞）中，TSL-1502M 对细胞毒药物均有增效作用。

3、TSL-1502M 及奥拉帕利能抑制 DNA 损伤修复（优选乳腺癌），TSL-1502M 活性强于奥拉帕利。

4、TSL-1502 和 TSL-1502M 诱导乳腺癌细胞周期阻滞在 G_2/M 期（优选乳腺癌），TSL-1502M 活性明显强于 TSL-1502。

5、TSL-1502，TSL-1502M 和阳性对照药物奥拉帕利一样，都能诱导乳腺癌细胞凋亡，其中 TSL-1502M 的活性比奥拉帕利强。

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 细胞的增殖抑制作用；

图 3： TSL-1502 及 ABT-888 对 MDA-MB-436 细胞克隆形成的抑制作用；

图 4：TSL-1502M 及 AZD2281 对 Rad51 聚集点形成的影响；

图 5：TSL-1502M 对 MDA-MB-436 细胞 γ-H2AX 磷酸化的影响；

图 6：TSL-1502，TSL-1502M 及 AZD2281,ABT888 对 MDA-MB-436 细胞周期的影响；

图 7：TSL-1502，TSL-1502M 及 AZD2281 诱导 MDA-MB-436 细胞凋亡的作用。

具体实施方式

实施例 1：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、克隆形成实验

细胞按每孔 200 个的密度接种于 6 孔板中。贴壁生长 24 小时后，加入不同浓度(0.3、1、3、10、30、100 nM)的药物，每 5 天更换培养液和药物，20 天后，以甲醇：冰醋酸（3：1）固定，用结晶紫染色，计数，拍照。

3、免疫荧光法

贴在小盖玻片上的细胞经药物处理后，用 4%多聚甲醛固定，在含 0.3% Triton X-100 的

磷酸盐缓冲液(pH7.4)中穿透破膜，封闭后加入抗 Rad51 的一抗 4℃孵育，再用 Alexa Fluor® 488 goat anti-rabbit 荧光二抗孵育，最后用 DAPI 染色。封片后用激光共聚焦显微镜观察拍照。

4、Western blot 法

4.1 γ-H2AX 的磷酸化的检测：

MDA-MB-436 接种于六孔板（2×10^5/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。

4.2 细胞凋亡的检测：

MDA-MB-436 接种于六孔板（1×10^5/ml），加入不同浓度的 TSL-1502、TSL-1502M(0.01、0.1、1 μM)或 AZD2281(0.1、1、10 μM 作用 120 小时后，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。

5、流式细胞术

MDA-MB-436 细胞接种于 6 孔板中（2×10^5/ml），经药物处理后 48h，收集细胞。用乙醇固定过夜，然后加入 RNase 及碘丙啶，混匀，37℃避光染色 30 分钟, 最后用流式细胞仪(FACSCalibur flow cytometer)检测细胞中 DNA 含量，每组样品为 1×10^4 个细胞。实验结果用 ModFit Lt Mac V3.0 软件分析。

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 和图 2 所示。

在 BRCA1 突变的 MDA-MB-436 细胞中，30、100、300 nM 的 TSL-1502，3、10、30 nM 的 TSL-1502M，10、30、100 nM 的 AZD2281 或 30、100、300 nM ABT-888 与 10、30 μM 的 TMZ 合用 120 小时。

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。

在 BRCA 基因正常的 SW620 细胞中，3、10μM 的 TSL-1502M 或 3、10μM 的 AZD2281 与 0.1、1nM 的伊立替康活性代谢产物 SN38 联合作用 144 小时，TSL-1502M 和参比化合物 AZD2281 均能够明显增效 SN38 对 SW620 细胞的增殖抑制作用。

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。

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 细胞的增殖抑制作用。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

2.2：TSL-1502 和 TSL-1502M 对 SW620 细胞的增殖抑制作用。见表 3-2

表 3-2：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

3、TSL-1502 抑制 BRCA 功能缺陷肿瘤细胞的克隆形成

TSL-1502 前药需要较长时间产生抗肿瘤作用，因此，我们检测 TSL-1502 对 MDA-MB-436 细胞（BRCA1 基因突变）克隆形成抑制作用时，将作用时间延长到 20 天。结果如图 3 所示，

TSL-1502 和参比化合物均能够剂量依赖地抑制 MDA-MB-436 细胞的克隆形成。TSL-1502 抑制克隆形成的 IC_{50} 为 9.5±1.4nM，AZD2281 和 ABT-888 抑制克隆形成的 IC_{50} 分别为 1.7±0.1 和 9.5±1.4nM。总体而言，TSL-1502 和参比药物 AZD2281 和 ABT-888 均能抑制 BRCA 功能缺陷肿瘤细胞的克隆形成，TSL-1502 的抑制作用比 ABT-888 强，比 AZD2281 弱。

4、 TSL-1502M 选择性地诱导 Rad51 聚焦点的形成

PARP 抑制能够诱导 DNA 损伤，进而增加同源重组功能正常细胞中自发的 Rad51 聚集点的形成。而在 BRCA1/2 缺陷的细胞中，同源重组修复功能障碍，Rad51 聚集点不会被诱导形成。我们用免疫荧光法检测了 TSL-1502M 及 AZD2281 对 Rad51 聚集点形成的影响。如图 4 所示：

10 μM 的的 TSL-1502M 或 30 μM 的 AZD2281 作用 24 小时后，在 BRCA1/2 功能正常的细胞（V-C8 #13-5）中，Rad51 聚集点被明显诱导，而在 BRCA1/2 功能缺陷的细胞（V-C8）中，Rad51 聚集点不能被诱导。

可见，TSL-1502M 能够选择性地诱导 BRCA1/2 功能正常的细胞中 Rad51 聚焦点的形成，其作用特点与 AZD2281 相似。

5、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 5，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。

6、TSL-1502 诱导细胞阻滞在 G2/M 期

以 TSL-1502、TSL-1502M 和参比化合物 AZD2281 作用于 MDA-MB-436 细胞，48 小时后，以流式细胞术检测对细胞周期的影响。结果如图 6 所示：

TSL-1502，TSL-1502M 和参比化合物 AZD2281 都能够剂量依赖地诱导 G_2/M 期细胞增加，即诱导细胞周期 G_2/M 期阻滞。

TSL-1502M 诱导 G_2/M 期周期阻滞作用和 AZD2281 近似：10μM 剂量下都能明显诱导 G_2/M 期阻滞；TSL-1502 诱导 G_2/M 期周期阻滞作用弱于 TSL-1502M 和参比化合物 AZD2281：10μM 剂量下诱导 G_2/M 期阻滞作用较弱。

上述结果表明，TSL-1502 和 TSL-1502M 诱导 MDA-MB-436 细胞周期阻滞在 G_2/M 期，TSL-1502M 活性明显强于 TSL-1502，和参比化合物 AZD2281 近似。

7、 TSL-1502、TSL-1502M 诱导细胞凋亡

以 TSL-1502，TSL-1502M 和参比药物 AZD2281 作用于 MDA-MB-436 细胞，120 小时后，以 Western Blot 法检测凋亡标志物蛋白 PARP 的切割变化。结果如图 7 所示：

TSL-1502 在 1μM 剂量下，有较弱的诱导 PARP 切割作用，10μM 更明显；

TSL-1502M 在 0.01μM 剂量下，即能明显诱导 PARP 切割；

参比药物 AZD2281 在 0.1μM 剂量下，有较弱的诱导 PARP 切割作用，1μM 和 10μM 更明显。

结果表明，TSL-1502，TSL-1502M 和参比药物 AZD2281 一样，都能诱导 MDA-MB-436 细胞凋亡，其中 TSL-1502 的活性比 AZD2281 弱，TSL-1502M 的活性比 AZD2281 强。

试验结论：

本发明研究了 TSL-1502 及其代谢产物 TSL-1502M 的体外抗肿瘤活性及作用机制。主要包括：

1）TSL-1502M 对 BRCA 基因缺陷或突变细胞，如 V-C8、MDA-MB-436 和 UWB1.289 细胞有显著的增殖抑制作用，IC_{50} 分别为 0.2±0.0nM、0.9±0.2nM 和 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 和 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 和≈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 和 2102.5±1470.1nM）。

对 BRCA 基因正常细胞，如 V-C8#13-5 和 UWB1.289 BRCA1 细胞，TSL-1502M、TSL-1502、AZD2281 和 ABT-888 的增殖抑制均较弱。

2）TSL-1502 能够抑制 MDA-MB-436 细胞的克隆形成。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；选择性地诱导 BRCA1/2 功能正常细胞中 Rad51 聚焦点的形成；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；能够诱导 MDA-MB-436 细胞 G_2/M 期阻滞，能够诱导细胞凋亡；TSL-1502M 的作用特点与参比化合物 AZD2281 相似，TSL-1502M 的活性比 AZD2281 强。