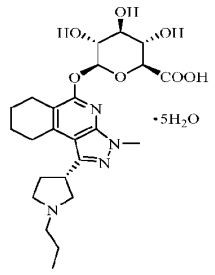
TSL-1502 复方药物组合

技术领域

本发明涉及一种治疗肿瘤的药物组合，特别是由化合物 TSL-1502 和替莫唑胺、顺铂或卡铂，伊立替康组成的复方药物组合。

背景技术

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-基)氧基)四氢-2H-吡喃-2-羧酸五水合物。TSL-1502 最早出现在中国专利 201180002886.8（公开号为 CN102510863A，授权公告号为 CN102510863B）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。

TSL-1502 是一种全新的口服聚二磷酸腺苷核糖聚合酶［poly(ADP-ribose)polymerase，PARP］抑制剂，在极低的剂量下可以抑制 PARP 蛋白家族中最重要的 2 个成员 PARP1 和 PARP2 的活性，拟用于晚期实体肿瘤的治疗；体外抗肿瘤作用机制研究表明，TSL-1502 抗肿瘤的作用机制包括诱导肿瘤细胞 DNA 损伤、细胞周期阻滞和细胞凋亡；并且与其它细胞毒抗肿瘤药物联合使用可以抑制化疗后的 DNA 损伤修复，从而增加化疗药物的疗效。体内外抗肿瘤谱研究验证了 TSL-1502 对于多种 DNA 修复缺陷的肿瘤更加敏感（如 BRCA1/2 基因缺陷或突变的肿瘤），是一种特异性的抗肿瘤及化疗增效药物。

TSL-1502 和其他药物联合应用未见报道，本发明对 TSL-1502 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、顺铂或卡铂，伊立替康联合使用具有协同增效作用。本发明为此进行了以下实验研究：

TSL-1502+替莫唑胺联用，用于治疗黑色素瘤;TSL-1502+顺铂联用，用于治疗乳腺癌；TSL-1502+卡铂联用，用于治疗乳腺癌；TSL-1502+盐酸伊立替康联用治疗大肠癌。

发明内容

本发明提供一种含有 TSL-1502 和另外一种抗肿瘤药物的复方药物组合，其中所述另外一种抗肿瘤药物选自替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康。

本发明包括含有 TSL-1502 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-1502 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。

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

或将含有 TSL-1502 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-1502 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-1502 和另外一种抗肿瘤药物复方药物组合，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。

本发明所述组合包含 TSL-1502 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。

进一步的，本发明所述组合包含 TSL-1502、替莫唑胺按照有效量（5-60）:（10-100）配比。优选（10-40）:（40-60）；最优选（10-30）：50。该组合物用于治疗黑色素瘤。

进一步的，本发明所述组合包含 TSL-1502、顺铂按照有效量（5-50）:（2-10）配比。优选（5-40）:（2-8）；最优选（6.25-25）：6。该组合物用于治疗乳腺癌，特别是人乳腺癌 MX-1 型。

进一步的，本发明所述组合包含 TSL-1502、卡铂按照有效量（10-90）:（5-100）配比。优选（20-70）:（50-70），最优选 25-50：60。该组合用于治疗乳腺癌，特别是人乳腺癌 MX-1 型。

进一步的，本发明所述组合包含 TSL-1502、盐酸伊立替康（开普拓）按照有效量（5-100）:（5-30）10 配比，优选（5-60）:（5-20），最优选（5-50）：10。该组合用于治疗大肠癌。

本发明所述的药物组合的制备方法，包括将含所需量的 TSL-1502 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-1502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-1502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-1502，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-1502 和另外一种抗肿瘤药物的使用剂量可以是一天 0.01mg-2000mg。所述肿瘤选自乳腺癌、黑色素瘤、大肠癌。

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。

附图说明

图 1. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效；

图 2. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对荷瘤裸小鼠体重的影响，均数±标准差；溶剂，n=12，治疗组，n=6；

图 3. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效（肿瘤照片）；

图 4. TSL-1502、AZD2281 对开普拓®治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用；

图 5. TSL-1502、AZD2281 单用或与开普拓®合用对荷瘤裸小鼠体重的影响，均数±标准差；溶剂组，n=12，治疗组，n=6；

图 6. TSL-1502、AZD2281 对开普拓®治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用(肿瘤照片)；

图 7. HD199、维拉帕利与顺铂合用对治疗人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用-平均肿瘤体积（mm^3）；

图 8. HD199、维拉帕利与顺铂合用对治疗人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用-相对肿瘤体积 RTV（%）；

图 9. HD199、维拉帕利与顺铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠体重(BW,g)的影响；

图 10. HD199、维拉帕利与替莫唑胺合用对治疗人黑色素瘤 B16F10 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用-平均肿瘤体积（mm^3）；

图 11. HD199、维拉帕利与替莫唑胺合用对治疗人黑色素瘤 B16F10 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用-相对肿瘤体积 RTV（%）；

图 12. HD199、维拉帕利与替莫唑胺合用对治疗人黑色素瘤 B16F10 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用-相对肿瘤增殖率 T/C（%）。

具体实施方式

以下通过实施例进一步说明本发明，但不作为对本发明的限制。

实施例 1

本发明提供 TSL-1502 和另外一种抗肿瘤药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康组成的复方药物冷冻干燥注射剂，

制备实例：

取 TSL-1502 20g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 10g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 20g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 50g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 100g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 2g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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。

实施例 4

取 TSL-1502 10g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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 5

取 TSL-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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 6

取 TSL-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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-1502 50g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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 8

取 TSL-15025g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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 9

取 TSL-1502 5g, 以及任选的以下任意一种药物替莫唑胺，顺铂，卡铂，伊立替康 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。

以下通过实验数据进一步说明本发明。

实验例 1

TSL-1502 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

3 受试药物

药物名称和批号：TSL-1502 为白色粉末，纯度 99.56%, 含水量 16.65%, 批号 120301; AZD2281 为白色粉末，纯度 99.15%, 批号 20131105；卡铂为白色粉末，纯度 100.0%，批号 C20141208。提供单位：TSL-1502及AZD2281（奥拉帕利）

均由天士力制药集团股份有限公司研究院药理毒理研究中心提供；其中 AZD2281 购自上海德默公司；卡铂由本实验室提供，来自昆明贵金属研究所。

配制方法：TSL-1502 用蒸馏水配制并稀释成相应浓度；AZD2281 用 3% DMA+20 % PEG 400+20% 丙二醇+57%生理盐水配制并稀释，并作为“溶剂”；卡铂用 5%葡萄糖溶液临时配制。

4 实验动物

BALB/c 裸鼠，6-7 周，♀，购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。生产许可证号：SCXK（沪）2012-0002；动物合格证号 2015000526837。饲养环境：SPF 级。

5 模型及剂量选择依据

参考 FDA 批准上市的 PARP 抑制剂 Olaparib（LYNPARZA）、Rucaparib（RUBRACA）和 Niraparib（ZEJULA）的体内药效研究剂量[2-4]，以及第五章的实验结果，选择了人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤模型及 TSL-1502 (25、50 mg/kg，PO，BID×14)的给药剂量。

6 实验步骤

裸小鼠皮下接种人乳腺癌 MX-1 肿瘤组织，待肿瘤生长至 100-200mm^3后，将动物随机分组(D0)。给药剂量和给药方案见表 1。

7 结果

如表 1 及图 1-3 所示，TSL-1502(25、50 mg/kg，PO，BID×14)剂量依赖性地抑制人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的生长，抑瘤率分别为 71%和 91%(D21)；AZD2281(25、50 mg/kg，PO，BID×14)对 MX-1 同样有效，抑瘤率分别为 42%和 72%(D21)，其中 50 mg/kg 组有 2/6 肿瘤部分消退；TSL-1502 对 MX-1 的疗效强于 AZD2281，其中 25 mg/kg 剂量组比较时有统计学显著性差异

(P<0.05)，但 50 mg/kg 剂量组比较时没有统计学显著性差异(P=0.057)。

卡铂(60 mg/kg，IP，Q4D×3)对 MX-1 的抑瘤率为 149%，有 2/6 肿瘤部分消退和 3/6 肿瘤完全消退(D21)，至实验结束时(D37)，仍有 2/6 肿瘤部分消退和 1/6 肿瘤完全消退；TSL-1502 25 mg/kg 与卡铂 60 mg/kg 合用，抑瘤率明显提高，从单用卡铂的 149%提高到 200%，所有肿瘤(6/6)均完全消退，AZD2281 25 mg/kg 与卡铂 60 mg/kg 合用，同样所有肿瘤完全消退(D21)；至实验结束时(D37)，合用组均未见肿瘤复发；无论是 TSL-1502 还是 AZD2281，合用组疗效均显著强于卡铂单用组(P<0.05)，说明二药对卡铂均有明显的增效作用。荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受，其中 TSL-1502 与卡铂合用组最大体重下降 3.8%(D6)，AZD2281 与卡铂合用组最大体重下降 9.3%(D9)，停药后体重均能逐渐恢复；其他药物没有引起小鼠体重明显下降。相比较，TSL-1502 对 MX-1 的疗效明显强于参比药物 AZD2281；二药均可显著增效卡铂治疗 MX-1 的疗效。

表 1. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效。

分组	给药	途径	平均肿瘤体积(mm3) D0	SEM	平均肿瘤体积(mm3) D21	SEM	% T/C D21	% 抑瘤率 D21		P值 D21	部分消退	完全消退	实验开始每组动物数	实验结束每组动物数
溶剂	D0-13, BID	PO	162.0	± 3.4	1080.2	± 73.6	-	-		-	0	0	12	12
TSL-1502 25 mg/kg	D0-13, BID	PO	156.5	± 10.0	420.1	± 64.9	29	71	*	0.000	0	0	6	6
TSL-1502 50 mg/kg	D0-13, BID	PO	159.3	± 6.6	237.9	± 46.4	9	91		0.000	2	0	6	6
AZD2281 25 mg/kg	D0-13, BID	PO	155.0	± 5.2	687.0	± 98.1	58	42		0.007	0	0	6	6
AZD2281 50 mg/kg	D0-13, BID	PO	153.0	± 5.7	418.4	± 92.1	29	71		0.000	0	0	6	6
卡铂 60 mg/kg	D0,4,8	IP	165.6	± 8.2	84.5	± 60.3	-49	149		0.000	2	3	6	6
TSL-1502 25 mg/kg+卡铂 60 mg/kg	D0-13, BID/D0,4,8	PO/IP	154.6	± 7.5	0.0	± 0.0	-100	200		0.000	0	6	6	6
AZD2281 25 mg/kg+卡铂 60 mg/kg	D0-13, BID/D0,4,8	PO/IP	162.5	± 4.5	0.0	± 0.0	-100	200		0.000	0	6	6	6

D0：第一次给药时间；P 值指与溶剂相比；*P<0.05，与 AZD2281 25 mg/kg 比较；采用 Student's t 检验。

表 1-2 金氏公式计算 TSL-1502 和卡铂 两种药物的联合作用 Q 值（Q≥1.15 为协同增效）

剂量(mg/kg)		Q	协同作用
TSL-1502	卡铂		
25	60	1.75	是

图 1. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效

图 2. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对荷瘤裸小鼠体重的影响。均数±标准差；溶剂，n=12，治疗组，n=6。

图 3. TSL-1502、AZD2281 单用或与卡铂合用对人乳腺癌 MX-1 裸小鼠皮下移植瘤的疗效（肿瘤照片）。

实验例 2

TSL-1502 对盐酸伊立替康治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用

3 受试药物

药物名称和批号： TSL-1502 为白色粉末，纯度 99.56%, 含水量 16.65%, 批号 120301; AZD2281 为白色粉末，纯度 99.15%, 批号 20131105；开普拓®（盐酸伊立替康注射液），为淡黄色澄明液体，2ml:40mg/瓶，批号 JM85B，生产日期：2015/02，有效期 2018/01。

提供单位：TSL-1502、AZD2281 均由天士力制药集团股份有限公司研究院药理毒理研究中心提供；其中 AZD2281 购自上海德默公司；开普拓®由本实验室提供，辉瑞公司生产。

配制方法：TSL-1502 用蒸馏水配制并稀释成相应浓度；AZD2281 用 3% DMA+20 % PEG 400+20% 丙二醇+57%生理盐水配制并稀释；开普拓®用生理盐水稀释。

4 实验动物

BALB/cA-nude 裸小鼠，5-6 周，♀，购自上海灵畅生物科技有限公司。生产许可证号：SCXK（沪）2013-0018；动物合格证号 2013001817948。饲养环境：SPF 级。

5 模型及剂量选择依据

参考 FDA 批准上市的 PARP 抑制剂 Olaparib（奥拉帕利）、Rucaparib（鲁卡帕利）和 Niraparib（尼拉帕利）的体内药效研究剂量[2-4]，以及第五章的实验结果，选择了人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤模型及 TSL-1502(50 mg/kg，PO，BID×17)与开普拓®(10 mg/kg，IP，D0,4)联合使用的给药方案。

6 实验步骤

裸小鼠皮下接种人大肠癌 SW620 细胞，待肿瘤生长至 100-200mm^3后，将动物随机分组(D_0)。给药剂量和给药方案见表 2。

7 结果

如表 2 及图 4-5 所示，TSL-1502(50 mg/kg，PO，BID×17)对人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的生长没有明显的抑瘤作用，抑瘤率为-5%; AZD2281(30 mg/kg，PO，QD×17)对 SW620 同样没有明显疗效，抑瘤率为 6%；开普拓®(10 mg/kg，IP，D0,4)对 SW620 的抑瘤率为 47%；TSL-1502(5、15、50 mg/kg，PO, BID×5)与开普拓®合用明显增强开普拓®对 SW620 的疗效，抑瘤率分别从单用开普拓®时的 47%提高到 79%、82%和 89%($P<0.05$ 或 $P<0.01$，与单用开普拓®比较)，而毒性没有明显增加；AZD2281(30 mg/kg，PO, QD×5)同样明显增效开普拓®对 SW620 的疗效，抑瘤率提高到 89%，有 1/6 肿瘤部分消退。荷瘤小鼠对以上药物均能较好耐受，没有明显体重减轻等症状发生。结果说明，按照目前的给药方案，TSL-1502 和 AZD2281 单用对 SW620 裸小鼠皮下移植瘤均没有明显疗效，但明显增效开普拓®治疗 SW620 的治疗作用，而毒性没有明显增加。

表 2. TSL-1502、AZD2281 对开普拓®治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用。

分组	给药	途径	平均肿瘤体积(mm3) D0	SEM	平均肿瘤体积(mm3) D17	SEM	% T/C D17	% 抑瘤率 D17		P值 D17	部分消退	实验结束每组动物数
溶剂	D0-4	IV	117.7	± 2.8	1231.9	± 72.3	-	-		-	0	12
AZD2281 30 mg/kg+开普拓 10 mg/kg	D0-4/D0,4	PO/IP	123.6	± 6.0	244.8	± 35.8	11	89	**	0.000	1	6
AZD2281 30 mg/kg	D0-16	PO	116.7	± 4.1	1164.3	± 153.6	94	6		0.653	0	6
开普拓 10 mg/kg	D0,4	IP	120.3	± 4.8	716.1	± 110.5	53	47		0.001	0	6
TSL-1502 5 mg/kg+开普拓 10 mg/kg	D0-4/D0,4	PO,BID/IP	115.2	± 5.5	351.5	± 42.1	21	79	*	0.000	0	6
TSL-1502 15 mg/kg+开普拓 10 mg/kg	D0-4/D0,4	PO,BID/IP	123.6	± 3.4	320.6	± 65.9	18	82	**	0.000	0	6
TSL-1502 50 mg/kg+开普拓 10 mg/kg	D0-4/D0,4	PO,BID/IP	116.2	± 2.6	233.7	± 22.4	11	89	**	0.000	0	6
TSL-1502 50 mg/kg	D0-16	PO,BID	122.2	± 4.6	1292.3	± 177.9	105	-5		0.731	0	6

D0：第一次给药时间；P 值指与溶剂相比，#P<0.05； **P<0.01，*P<0.05 与开普拓® 10 mg/kg 组比较；均采用 Student's t 检验。实验开始时小鼠数目：溶剂组 n=12，治疗组 n=6。

表 2-2 金氏公式计算 TSL-1502 和开普拓 两种药物的联合作用 Q 值（Q≥1.15 为协同增效）

剂量(mg/kg)		Q	协同作用
TSL-1502	开普拓		
50	10	2.01	是

图 4. TSL-1502、AZD2281 对开普拓®治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用

图 5. TSL-1502、AZD2281 单用或与开普拓®合用对荷瘤裸小鼠体重的影响。均数±标准差；溶剂组，n=12，治疗组，n=6。

图 6. TSL-1502、AZD2281 对开普拓®治疗人大肠癌 SW620 裸小鼠皮下移植瘤的增效作用(肿瘤照片)。

实验例 3

TSL-1502 体内联合顺铂在人乳腺癌 MX-1 移植瘤模型药效学研究报告

2.1 细胞株：

人乳腺癌细胞株 MX-1 购买于中国中科院细胞库；

2.2 试剂

胎牛血清(Gibco，Lot NO: 623311)，RPM1640 培养基(Gibco，Lot NO: 869317)，L15 培养基(Gibco，Lot NO: 810875)，胰蛋白酶(Sigma Lot NO:27250018)，青霉素 G 钠盐(山东鲁抗医药 Lot NO:B100122)，硫酸链霉素(山东鲁抗医药 Lot NO:080307)，0.25%EDTA(Trypsin（胰蛋白酶） Lot NO:25200056)，Hanks(NO 14170112)，$NaHCO_3$ (成都科龙 Lot NO. 20101013)，HCL(南京化学试剂有限公司)，Matrigel（基质）(BD Lot NO:20110068)，台盼蓝，DMSO，PEG400，Tw-80，0.9%氯化钠溶液，PBS 粉包(或 NaCl，KCl，NaH2PO4，KH2PO4)等。

2.3 仪器：

5%CO2 细胞恒温培养箱(美国 ThermoForma 公司)，超净工作台(苏州净化)，酒精棉球，酒精灯，滴管，培养瓶，离心管，冻存管，玻璃瓶(装培养基)，细胞计数板，盖玻片，细胞培养皿，细胞培养皿，压力消毒器，倒置显微镜，离心机，液氮，高压灭菌锅，电子天平，PH 计，游标卡

尺，磁力搅拌器，100mL 容量瓶，5mL 容量瓶，1000mL 容量瓶，1mL 注射器，灌胃针，离心管

2.4 动物：

Balb/c 雌性裸鼠 (SPF 级)，雌性，4-6 周龄，体重 18-22g，60 只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。动物生产许可证号为 Scxk(沪)2008-0016，合格证号为 2010001601905。

2.5 试验药物：

试验药物：TSL-1502，苏州汉德森医药科技有限公司实验室合成(批号：100301)，用生理盐水溶解；DDP（顺铂）：购买于山东铂源医药科技有限公司，用生理盐水溶解；

Veliparib（维利帕尼）CAS:912444-00-9，购买于上海皓原化学科技有限公司，批号：HM-0698-20101112，用生理盐水溶解

3 方法 Methodology

3.1 细胞培养：

MX-1 细胞株购买后放置-80℃冻存备用，冻存液为胎牛血清：DMSO=9：1。细胞复苏后常规培养于 RPMI-1640 完全培养液中(包含 10%的胎牛血清，1%(W/V)的青霉素和 1%(W/V)链霉素，其中胎牛血清要求进口的)，置于 5%的 CO_2 培养箱 37℃培养，相对饱和湿度，每日观察生长状况，贴壁 2-3 天传一代，传代扩增，收集指数增殖期细胞用 0.25%胰蛋白酶+0.53mMol/L 的 EDTA 消化，收集于无小牛血清的不完全培养液中轻轻摇动，制成细胞悬液，细胞计数及台盼蓝染色检测细胞活力（应大于 95%以上）。

3.2 荷瘤鼠模型构建：

Balb/c 雌性裸鼠 (SPF 级)，它是无毛、无胸腺的先天性 T 细胞免疫缺陷动物，缺乏免疫排斥反应，肿瘤移植后生长良好，并能保持肿瘤细胞的原有形态及细胞动力学和生物学特性，是肿瘤研究中较为理想、也较为常用的动物，4-6 周龄，体重 18-22g，60 只，用 75%的酒精消毒接种部位皮肤，异位移植瘤接种部位为左侧下肢腹股沟部，原位移植瘤接种部位为裸小鼠左侧第 2 乳头的脂肪垫（如下图所示），细胞接种细胞计数为 0.5×10^7/ ml，细胞接种剂量分别为 0.2ml(1×10^6细胞)，细胞株和 50% 基质混合接种（多加一点基质有助于肿瘤生长形状规则），每天观察肿瘤生长情况，记录肿瘤大小（长，宽）体积（长 x 宽 ^{2}/2），计算标准偏差，在接种 14-18 天左右后，肿瘤组织应该长为 100mm^3 左右。

3.3 溶液配制

空白溶液：在 100mL 容量瓶中加入 0.9g 的 NaCl，用蒸馏水定溶、摇晃，配制成 0.9%的 NaCl 溶液，室温保存备用。

顺铂溶液：准确称量 6mg 的顺铂(DDP)样品置于 100 毫升容量瓶中，用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 0.6 mg/ml 的 DDP 溶液。

Veliparib（维拉帕利）溶液：准确称量 25mg 的维拉帕利样品置于 100 毫升容量瓶中，用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 2.5 mg/ml 的维拉帕利溶液。

TSL-1502 溶液：准确分别称量 25、12.5、6.25mg 的化合物 TSL-1502 样品，置于 100 毫升容量瓶中，分别用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 2.5、1.25、0.625mg/ml 的 TSL-1502 溶液。

3.4 荷瘤鼠分组及给药方案：

荷瘤鼠分组及给药方案：裸小鼠肿瘤长到大概 100mm^3(时间大概为第 14 天上)，剔除偏大或者偏小肿瘤的裸小鼠，选取肿瘤大小一致性较好的裸小鼠，开始随机分组，分别为以下 6 组，每组至少确保 6 只以上。

空白对照组(0.1ml/10g，po（口服），Bid（每日两次）)，分组后，连续给药口服灌胃生理盐水 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射生理盐水，连续观察 40 天；

顺铂(Cisplatin)单给药组(6mg/kg，ip（静脉注射），qd（每日一次）)，分组后，连续给药口服灌胃生理盐水 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射顺铂溶液，连续观察 40 天；

维拉帕利给药组(25mg/kg，po（口服），Bid（每日两次）)+顺铂(6mg/kg，ip（静脉注射），qd（每日一次）)，分组后，连续给药口服灌胃维拉帕利溶液 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射顺铂溶液，连续观察 40 天；

TSL-1502 给药组(6.25mg/kg，po，Bid)+顺铂(6mg/kg，ip，qd)，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射顺铂溶液，连续观察 40 天；

TSL-1502 给药组(12.5mg/kg，po，Bid)+顺铂(6mg/kg，ip，qd)，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射顺铂溶液，连续观察 40 天；

TSL-1502 给药组(25mg/kg，po，Bid)+顺铂(6mg/kg，ip，qd)，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 3、6 天分别给药腹腔注射顺铂溶液，连续观察 40 天；

3.5 检测指标及方法：

3.5.1 肿瘤体积及肿瘤生长曲线：

裸小鼠肿瘤体积检测每隔天一次，肿瘤体积的测量方法：用游标卡尺量取肿瘤组织的长和宽(假定肿瘤组织为椭圆形)，体积使用长×宽 2/2 公式计算，计算肿瘤抑制率及相对肿瘤体积(RTV)，Vt：每天测量肿瘤得到的瘤体积，V0：初始瘤体积(给药前)；

3.5.2 相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)，计算公式为：

$RTV = V_t/V_{初始}$

其中 $V_{初始}$为分组给药时的测量所的的肿瘤体积，V_t为每次测量时的肿瘤体积。

3.5.3 相对肿瘤增殖率 T/C (%)，计算公式为 ：

$T/C\ (\%) = (T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$

3.5.4 肿瘤体积抑瘤率(GI)

$GI = [1-(TV_t-TV_{初始}) / (CV_t-CT_{初始})]\times 100\%$

其中 TV_t 表示治疗组每次测量时肿瘤体积；

$TV_{初始}$表示分组给药时治疗组测量的肿瘤体积；

CV_t表示对照组每次测量时肿瘤体积；

$CT_{初始}$表示分组给药时对照组测量的肿瘤体积；

3.5.5 荷瘤鼠体重变化曲线：

在测量荷瘤鼠体积的同时测量小鼠的体重，并绘制荷瘤鼠体重变化曲线，观察荷瘤鼠体重变化趋势，评价化合物对荷瘤鼠体重的改变；

3.6 统计分析：

肿瘤体积,肿瘤重量及荷瘤鼠肿瘤等计量资料数据采用$\bar{x}\pm S$表示；应用 Excel 软件或者 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析，统计学方法采用 t 检验。

3.7 实验结果分析

3.7.1 分析各给药组给药后的肿瘤体积大小，绘制时间-体积变化药效学曲线；

3.7.2 分析各给药组给药后肿瘤相对增殖率，绘制时间-肿瘤相对增殖率变化曲线；

3.7.3 分析各给药组给药后肿瘤大小抑制，计算肿瘤抑制率；

3.7.4 分析各给药组给药后的荷瘤鼠重量，绘制体重-时间变化曲线;

4 结果 Results

4.1 TSL-1502 联合 DDP 对人乳腺癌 MX-1 移植瘤荷瘤鼠抑瘤率的影响作用：

与空白对照组比较，在接种第 d26 天，单独用顺铂(6mg/kg)肿瘤抑制率达到 100.33%，在接种第 50 天， TSL-1502(6.25、12.5、25mg/kg)联合顺铂后相对顺铂的肿瘤抑制率分别为 32%、82%、86%，相同剂量的维拉帕利 (25mg/kg)联合顺铂后肿瘤抑制率为 61%，明显低于 TSL-1502($P<0.01$)，具体见表 3 和图 7。

表 3. TSL-1502 或维拉帕利与卡铂合用对抑瘤率（GI）的影响

组别	剂量 (mg/kg/d)	肿瘤体积 (day 26)	抑瘤率（%） (day 26，相对空白对照组)	肿瘤体积 (day 50)	抑瘤率（%） (day 50，相对 DPP 组)
空白对照组	0/0	6445±1428	—	—	—
DPP(对照组)	0/6	82±21	100.33**	4626	—
维拉帕利+DDP	25.0/6	55±13	100.84**	1894	60.53#
TSL-1502+DDP	6.25/6	59±15	100.75**	3191	31.79
	12.5/6	58±10	100.74**	916	82.06##
	25.0/6	54±8.7	100.81**	732	86.16##

与空白对照组比较，*p<0.05, **p<0.01；与 DDP 组对照比较：#P<0.05，##P<0.01。

4.2 TSL-1502 联合 DDP 对人乳腺癌 MX-1 移植瘤荷瘤鼠肿瘤相对增殖率（T/C，%）的影响作用：与空白对照组比较，在接种第 d26 天，单独用顺铂(6mg/kg)相对肿瘤增值率达到 T/C(%)1.34%,，在接种第 50 天，TSL-1502(6.25、12.5、25mg/kg)联合顺铂后相对顺铂的 T/C%值分别为 67.24%、19.60%和 15.50%，相同剂量的维拉帕利 (25mg/kg)联合顺铂后相对顺铂的 T/C%值为 39.10%，具体见表 4、5，图 8。针对人癌异体移植瘤模型，推荐采用相对肿瘤增殖率 T/C（%）作为试验评价指标。原则上，评价标准为：T/C（%）>40 %为无效；T/C（%）≤40%，并经统计学处理 P < 0.05 为有效。从结果来看，与单独使用顺铂相比，TSL-1502 联合顺铂对乳腺癌肿瘤抑制作用非常显著。

表 4. 给药期间荷瘤鼠相对肿瘤增殖率 (T/C%)变化

组别	d14	d16	d18	d20	d22	d24	d26	d28	d30	d32
对照组，DDP(6mg/kg)	99.99	109.12	29.74	9.45	3.65	1.93	1.34			
维拉帕利(25mg/kg)+DDP	100.01	116.26	33.45	11.05	3.97	1.80	0.86	46.15	24.35	12.35
TSL-1502(6.25mg/kg)+DDP	100.00	123.69	34.21	10.18	3.82	1.85	0.93	53.86	30.70	19.10
TSL-1502(12.5mg/kg)+DDP	100.00	117.74	33.35	10.81	4.10	1.87	0.93	47.69	23.00	12.73
TSL-1502(25mg/kg)+DDP	100.00	112.61	31.75	10.24	3.87	1.75	0.87	44.37	21.29	11.75
组别	d34	d36	d38	d40	d42	d44	d46	d48	d50	
对照组， DDP(6mg/kg)										
维拉帕利(25mg/kg)+DDP	7.61	7.37	8.08	9.22	11.57	16.20	22.23	30.55	39.10	
TSL-1502(6.25mg/kg)+DDP	13.68	16.20	21.23	25.34	32.16	39.18	46.50	57.67	67.24	
TSL-1502(12.5mg/kg)+DDP	7.08	4.96	4.18	3.93	5.12	6.98	10.02	14.25	19.60	
TSL-1502(25mg/kg)+DDP	6.54	4.60	3.87	3.66	4.82	6.63	9.08	11.93	15.50	

表 5. 给药期间荷瘤鼠的抑瘤率(GI,%)和相对肿瘤增殖率(T/C，%)汇总

组别	Dose (mg/kg/d)	RTV(%) (day 26)	抑瘤率(GI,%) (day 26，相对空白对照)	T/C%	RTV(%) (day 50)	抑瘤率(GI,%) (day 50，相对 DDP 组)	T/C%
空白对照	--	5970.33	—	—	—	—	—
对照组，DDP	6	79.83***	100.33	1.34	4451.17	—	—
维拉帕利+DDP	25.0/6	51.31	100.84	0.86	1740.62##	60.53	39.10
TSL-1502+DDP	6.25/6	55.53	100.75	0.93	2992.98#	31.79	67.24
	12.5/6	55.47	100.66	0.93	872.52###	82.06	19.60
	25.0/6	51.81	100.79	0.87	690.02###	86.16	15.50

与 Control 组比较，*p<0.05, **p<0.01；与 DDP 组对照比较：#P<0.05，##P<0.01；

4.4 TSL-1502 联合 DDP 对荷瘤鼠体重的影响：

与空白对照比较，在给药初期 TSL-1502 联合 DDP 对荷瘤鼠体重增加有一定影响，但持续给药超过 40 天后，各剂量联合给药组动物体重与 DDP 单独用药组比较无明显的体重差异(P>0.05)。见

表 6 和图 9。说明 TSL-1502 与 DDP 联合使用与单独使用 DDP 相比，毒性没有明显增加。

表 6. 给药期间荷瘤鼠平均体重(BW)的变化

组别	d14	d16	d18	d20	d22	d24	d26	d28	d30	d32
空白对照	19.28	20.06	20.13	21.10	22.28	22.69	23.05			
对照组，DDP(6mg/kg)	19.99	20.79	20.28	19.84	18.24	19.20	19.04	19.60	20.24	20.93
维拉帕利(25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	20.23	20.60	20.29	19.78	19.73	19.75	19.51	19.19	19.86	19.96
TSL-1502(6.25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	19.74	20.26	19.90	19.19	18.98	19.04	19.29	19.55	19.75	19.98
TSL-1502(12.5mg/kg)+DDP(6mg/kg)	19.53	19.03	17.79	16.44	16.00	16.03	16.10	16.28	16.61	16.55
TSL-1502(25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	20.81	20.44	18.75	17.11	16.58	16.38	16.20	16.08	16.33	16.70
组别	d34	d36	d38	d40	d42	d44	d46	d48	d50	
空白对照										
对照组，DDP(6mg/kg)	21.31	21.94	22.51	22.84	23.08	23.54	24.01	25.22	26.08	
维拉拍(25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	19.94	19.89	20.19	20.49	20.61	20.19	20.16	20.69	20.97	
TSL-1502(6.25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	20.29	20.70	21.19	21.64	22.78	23.41	24.33	24.79	25.74	
TSL-1502(12.5mg/kg)+DDP(6mg/kg)	16.46	16.46	16.99	17.26	18.16	19.51	21.29	22.83	24.28	
TSL-1502(25mg/kg)+DDP(6mg/kg)	16.48	16.50	17.03	17.19	18.09	18.89	20.89	22.53	23.80	

.参考文献：

[1].Cherrie K. Donawho, Yan Luo, et al. ABT-888, an Orally Active Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor that Potentiates DNA-Damaging Agents in Preclinical Tumor Models. Clin Cancer Res 2007;13(9) May 1, 2007。

实验例 4

TSL-1502 体内联合 TMZ（替莫唑胺）在 B16F10 黑色素瘤移植瘤模型药效学研究报告

2.1 细胞株：

黑色素瘤细胞株 B16F10 主要购买于中国中科院细胞库；

2.2 试剂

胎牛血清(Gibco，Lot NO: 623311)，RPM1640 培养基(Gibco，Lot NO: 869317)，L15 培养基(Gibco，Lot NO: 810875)，胰蛋白酶(Sigma Lot NO:27250018)，青霉素 G 钠盐(山东鲁抗医药 Lot NO:B100122)，硫酸链霉素(山东鲁抗医药 Lot NO:080307)，0.25%EDTA(胰蛋白酶 Lot NO:25200056)，Hanks(NO 14170112)，NaHCO3 (成都科龙 Lot NO. 20101013)，HCL(南京化学试剂有限公司)，Matrigel（基质）(BD Lot NO:20110068)，台盼蓝，DMSO，PEG400， 吐温-80，0.9%氯化钠溶液，PBS 粉包(或 NaCl，KCl，NaH_2PO_4，KH_2PO_4)等。

2.3 仪器：

5%CO2 细胞恒温培养箱(美国 ThermoForma 公司)，超净工作台(苏州净化)，酒精棉球，酒精灯，滴管，培养瓶，离心管，冻存管，玻璃瓶(装培养基)，细胞计数板，盖玻片，细胞培养皿，细胞培养皿，压力消毒器，倒置显微镜，离心机，液氮，高压灭菌锅，电子天平，PH 计，游标卡

尺，磁力搅拌器，100mL 容量瓶，5mL 容量瓶，1000mL 容量瓶，1mL 注射器，灌胃针，离心管

2.4 动物：

C57BL/6 小鼠 (SPF 级)，雌雄各半，6-8 周龄，体重 22-25g，70 只，购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司。实验动物生产许可证号为 Scxk(沪)2008 -0016，合格证号为 2008001608319。

2.5 试验药物：

TSL-1502，苏州汉德森医药科技有限公司实验室合成，批号：100301，用生理盐水溶解；

TMZ：购买于江苏恒瑞医药科技有限公司，批号：20100805，用生理盐水溶解；

维拉帕利，购买于上海皓原化学科技有限公司，批号：HM-0698-20101112，用生理盐水溶解。

3 方法 Methodology

3.1 细胞培养：

B16F10 细胞株购买后放置-80℃冻存备用，冻存液为胎牛血清：DMSO=9：1。细胞复苏后常规培养于 RPMI-1640 完全培养液中(包含 10%的小牛血清，1%(W/V)的青霉素和 1%(W/V)链霉素)，置于 5%的 CO2 培养箱 37℃培养，相对饱和湿度，每日观察生长状况，贴壁 2-3 天传一代，传代扩增，收集指数增殖期细胞用 0.25%胰蛋白酶+0.53mMol/L 的 EDTA 消化，收集于无小牛血清的不完全培养液中轻轻摇动，制成细胞悬液，细胞计数及台盼蓝染色检测细胞活力(应大于 95%以上)。

3.2 荷瘤鼠模型构建：

SPF（无特异病原，specific pathogen-free）级封闭群近交系 C57BL/6 母小鼠，6-8 周龄，每只 22 克左右 15 只随机分成 3 组，每组 5 只，用 75%酒精消毒腹部皮肤，分别取上述 B16F10 黑色素瘤细胞溶液接种于小鼠左首 Flank，每组接种细胞浓度为 $5x10^6$/mL，三组接种量分别为 0.2mL（接种 $1x10^6$细胞）、0.05mL（接种 $2.5x10^5$细胞）、0.012mL（接种 6x104 细胞），每组细胞株和 50%基质混合接种（多加一点基质有助于肿瘤生长形状规则），每天观察肿瘤生长情况，记录肿瘤大小（长，宽）体积（长 x 宽 ^{2}/2），计算标准偏差，在接种 8-10 天内肿瘤体积应在 100-200mm^3 左右。

3.3 溶液配制

空白溶液：在 100mL 容量瓶中加入 0.9g 的 NaCl，用蒸馏水定溶、摇晃，配制成 0.9%的 NaCl 溶液，室温保存备用。

TMZ 溶液：准确称量 50mg 的替莫唑胺(TMZ)样品置于 100 毫升容量瓶中，用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 5.0 mg/ml 的 TMZ 溶液。

维拉帕利溶液：准确称量 25mg 的维拉帕利样品置于 100 毫升容量瓶中，用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 2.5 mg/ml 的维拉帕利溶液。

TSL-1502 溶液：准确分别称量 30、15、10mg 的汉德森化合物 TSL-1502 样品，置于 100 毫升容

量瓶中，分别用 0.9%的 NaCl 溶液定溶成浓度为 3.0、1.5、1.0mg/ml 的 TSL-1502 溶液。

3.4 荷瘤鼠分组及给药方案：

荷瘤鼠分组及给药方案：SPF（无特异病原，specific pathogen-free）级 C57BL/6 母小鼠，6-8 周龄，70 只，每只 22 克左右，用 75%酒精消毒腹部皮肤，分别取上述 B16 F10 黑色素瘤细胞溶液接种于小鼠 Flank。接种方案选上述最佳条件，肿瘤形状为园或椭圆，B6 小鼠肿瘤长到大概 100mm3(时间为接种后第 10 天)，剔除偏大或者偏小肿瘤的裸小鼠，选取肿瘤大小一致性较好的裸小鼠，开始随机分组，分别为 6 组，每组 8 只。

空白对照组(0.1ml/10g，po，Bid)：分组后，连续给药口服灌胃生理盐水 9 天，其中第 2,3,4,5,6 天分别增加口服灌胃生理盐水一次，连续观察 23 天；

替莫唑胺(TMZ)单给药组(50mg/kg，po，qd)：分组后，连续给药口服灌胃生理盐水 9 天，其中第 2,3,4,5,6 天分别口服灌胃替莫唑胺溶液，连续观察 23 天；

维拉帕利给药组(25mg/kg，po，Bid)+替莫唑胺(50mg/kg，po，qd)：分组后，连续给药口服灌胃维拉帕利溶液 9 天，其中第 2,至第 6 天连续 5 天分别口服灌胃替莫唑胺溶液，连续观察 23 天；

TSL-1502 给药组(10mg/kg，po，Bid)+替莫唑胺(50mg/kg，po，qd)：分组后，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 2,3,4,5,6 天分别口服灌胃替莫唑胺溶液，连续观察 23 天；

TSL-1502 给药组(15mg/kg，po，Bid)+替莫唑胺(50mg/kg，po，qd)：分组后，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 2,3,4,5,6 天分别口服灌胃替莫唑胺溶液，连续观察 23 天；

TSL-1502 给药组(30mg/kg，po，Bid)+替莫唑胺(50mg/kg，po，qd)：分组后，连续给药口服灌胃 TSL-1502 溶液 9 天，其中第 2,3,4,5,6 天分别口服灌胃替莫唑胺溶液，连续观察 23 天；

3.5 检测指标及方法：

3.5.1 肿瘤体积及肿瘤生长曲线：

裸小鼠肿瘤体积检测每隔天一次，肿瘤体积的测量方法：用游标卡尺量取肿瘤组织的长和宽(假定肿瘤组织为椭圆形)，体积使用长×宽^2/2 公式计算，计算肿瘤抑制率及相对肿瘤体积(RTV)，Vt：每天测量肿瘤得到的瘤体积，$V_{初始1}$：初始瘤体积(给药前)；

3.5.2 相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)，计算公式为：

$RTV = V_t/V_{初始}$

其中 $V_{初始}$为分组给药时的测量所的的肿瘤体积，V_t为每次测量时的肿瘤体积。

3.5.3 相对肿瘤增殖率 T/C (%)，计算公式为 ：

$T/C\ (\%) = (T_{RTV} / C_{RTV}) \times 100\%$

3.5.4 肿瘤体积抑瘤率(GI)

$GI = [1-(TV_t-TV_{初始}) / (CV_t-CT_{初始})]\times 100\%$

其中 TV_t 表示治疗组每次测量时肿瘤体积；

$TV_{初始}$表示分组给药时治疗组测量的肿瘤体积；

CV_t表示对照组每次测量时肿瘤体积；

$CT_{初始}$表示分组给药时对照组测量的肿瘤体积；

3.5.4 荷瘤鼠体重变化曲线：

在测量荷瘤鼠体积的同时测量小鼠的体重，并绘制荷瘤鼠体重变化曲线，观察荷瘤鼠体重变化趋势，评价化合物对荷瘤鼠体重的改变；

3.6 统计分析：

肿瘤体积，肿瘤重量及荷瘤鼠肿瘤等计量资料数据采用$\bar{x}\pm S$ 表示；应用 Excel 软件或者 SPSS 12.0 软件包进行统计学分析，统计学方法采用 t 检验。

3.7 实验结果分析

3.7.1 分析各给药组给药后的肿瘤体积大小，绘制时间-体积变化药效学曲线；

3.7.2 分析各给药组给药后肿瘤相对增殖率，绘制时间-肿瘤相对增殖率变化曲线；

3.7.3 分析各给药组给药后肿瘤大小抑制，计算肿瘤抑制率；

3.7.3 分析各给药组给药后的荷瘤鼠重量，绘制体重-时间变化曲线；

4 结果 Results

4.1 TSL-1502 联合 TMZ 对 B16F10 模型肿瘤体积影响作用：

结果显示：TSL-1502 对于黑色素瘤 B16F10 荷瘤小鼠肿瘤生长有良好的抑制作用。在接种后第 33 天，单独使用 TMZ(50mg/kg)抑瘤率为 37.4%，显著性抑制效果($P<0.05$)，而 TSL-1502(10mg/kg)联合 TMZ 组抑瘤率为 76.1%，显著高于 TMZ 单独给药组($P<0.01$)。随 TSL-1502 剂量增加，联合 TMZ 的抑瘤效果更佳，(15mg/kg)+TMZ 组抑瘤率为 81.2%，TSL-1502 (30mg/kg)+TMZ 组抑制率为 87.0%。如表 7 和图 10。

表 7. 33 天时平均肿瘤体积 (mm^3)和抑瘤率(GI，%)

组别	平均肿瘤体积(mm3)	抑瘤率(GI，%)
空白对照组	12660.89	0.00
TMZ(50mg/kg)	8025.33 *	37.36
Veliparib(25mg/kg) +TMZ	5991.14 #	53.61
TSL-1502(10mg/kg) +TMZ	3188.62 ##	76.13
TSL-1502(15mg/kg) +TMZ	2570.66 ##	81.17
TSL-1502(30mg/kg) +TMZ	1833.32 ###	87.02

与 Control 比较，*p<0.05, **p<0.01；与 TMZ 对照比较：#P<0.05，##P<0.01；

4.2 TSL-1502 联合 TMZ 对 B16F10 黑色素瘤模型对肿瘤相对增殖率（T/C%）的影响作用：

表 8、9 和图 11，图 12 结果显示，在接种后 d33 天， TSL-1502(10、15、30mg/kg) 联合 TMZ 的肿瘤相对增殖率 T/C%分别由单用 TMZ 的 61.5% 提高到 26.5%、20.7%、15.4%（T/C%≤40%，P < 0.05 为有效)。与 TMZ 单独用药比较，TSL-1502 10mg/kg、15mg/kg 显著增加 TMZ 的抑瘤作用(P<0.01),TSL-1502 30mg/kg 的增效作用更佳（P<0.001)。

表 8. 给药期间荷瘤鼠相对肿瘤增殖率变化(T/C%)

Group	d11	d13	d15	d17	d19	d21	d23	d25	d27	d29	d31	d33
TMZ(50mg/kg)	100.00	78.62	65.03	66.79	69.17	66.43	66.23	66.42	70.26	68.64	67.52	61.55
Veliparib(25mg/kg) +TMZ	100.00	77.22	70.74	74.75	71.78	65.24	59.45	56.41	57.32	49.93	52.46	49.07
TSL-1502(10mg/kg) +TMZ	100.00	75.81	60.54	60.20	60.91	57.83	52.01	46.28	46.90	38.12	32.09	26.48
TSL-1502(15mg/kg) +TMZ	100.00	72.84	54.41	51.26	49.53	46.97	43.27	36.77	37.09	29.00	26.17	20.68
TSL-1502(30mg/kg) +TMZ	100.00	75.35	55.44	55.24	50.89	43.77	36.88	29.60	27.00	21.31	17.80	15.37

表 9. 33 天时相对肿瘤增殖率（T/C，%）和抑瘤率（GI，%）汇总

组别	RTV	T/C%	%GI
空白对照	5400.71	0.00	0.00
TMZ(50mg/kg)	3323.94 *	61.55	37.36
维拉帕利(25mg/kg)+TMZ	2649.89 #	49.07	53.61
TSL-1502(10mg/kg)+TMZ	1430.26 ##	26.48	76.13
TSL-1502(15mg/kg)+TMZ	1116.71 ##	20.68	81.17
TSL-1502(30mg/kg)+TMZ	830.31 ###	15.37	87.02

与 Control 比较，*p<0.05, **p<0.01；与 TMZ 对照组比较：#P<0.05，##P<0.01，###P<0.001。

参考文献：

[1].Cherrie K. Donawho, Yan Luo, et al. ABT-888, an Orally Active Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor that Potentiates DNA-Damaging Agents in Preclinical Tumor Models. Clin Cancer Res 2007;13(9) May 1, 2007。

[2]. JOANN P. PALMA, LUIS E. RODRIGUEZ, et al. The PARP Inhibitor, ABT-888 Potentiates Temozolomide: Correlation with Drug Levels nd Reduction in PARP Activity In Vivo. ANTICANCER RESEARCH 28: 2625-2636 (2008)。

。