



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114053276 B

(45) 授权公告日 2024. 05. 07

(21) 申请号 202010748321.5

CN 102665711 A, 2012.09.12

(22) 申请日 2020.07.30

EP 2918292 A1, 2015.09.16

(65) 同一申请的已公布的文献号

US 2007015814 A1, 2007.01.18

申请公布号 CN 114053276 A

US 2009098084 A1, 2009.04.16

WO 2007095628 A1, 2007.08.23

(43) 申请公布日 2022.02.18

徐康, 范钰, 林庚金, 等. 羟基喜树碱对结肠癌LoVo细胞凋亡及 bcl-2、p53基因表达的影响. 《上海医学》. 2004, 第25卷(第10期), 第642-644页.

(73) 专利权人 江苏天士力帝益药业有限公司
地址 223003 江苏省淮安市清浦工业园朝阳西路168号

Mouly, Laetitia et al.. PARP-1-dependent RND1 transcription induced by topoisomerase I cleavage complexes confers cellular resistance to camptothecin. 《Cell death & disease》. 2018, 第9卷(第9期), 第1-16页. (续)

(72) 发明人 杨海龙 李德馨 马晓慧 唐海
蔡金勇 周水平 郭建飞 范立君
沈伟生 王萍

审查员 王诗琳

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130
专利代理师 王为

(51) Int. Cl.

A61K 31/4745 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101903025 A, 2010.12.01

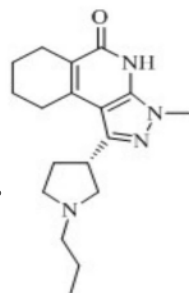
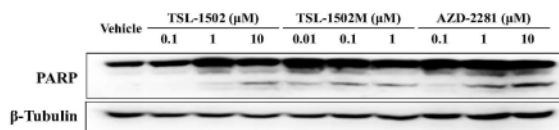
权利要求书1页 说明书10页 附图5页

(54) 发明名称

一种PARP抑制剂TSL-1502中间体TSL-1502M的用途

(57) 摘要

本发明涉及一种PARP抑制剂TSL-1502的中间体TSL-1502M的用途。TSL-1502M是制备TSL-1502的中间体, 结构式见式II, 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



式II

CN 114053276 B

瘤的用途。

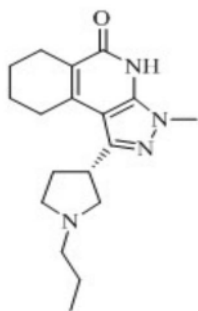
[接上页]

(56) 对比文件

Hopkins, Todd A et al..PARP1 Trapping
by PARP Inhibitors Drives Cytotoxicity in

Both Cancer Cells and Healthy Bone
Marrow.《Molecular cancer research : MCR》
.2018,第409-419页.

1. 式 II 化合物和 7-乙基-10-羟基喜树碱的药物组合在制备预防和治疗结肠癌药物中的应用:



式II。

2. 根据权利要求1所述的应用,所述药物是任何可服用的药物形式。
3. 根据权利要求2所述的应用,所述药物选自片剂、胶囊剂、口服液、口含剂、颗粒剂、丸剂、散剂、丹剂、粉剂、注射剂、栓剂、膏剂、喷雾剂、滴剂、贴剂。
4. 根据权利要求3所述的应用,其中,所述注射剂选自液体、半固体,固体,粉剂形式。
5. 根据权利要求4所述的应用,其中,所述注射剂为注射液,粉针中的一种。

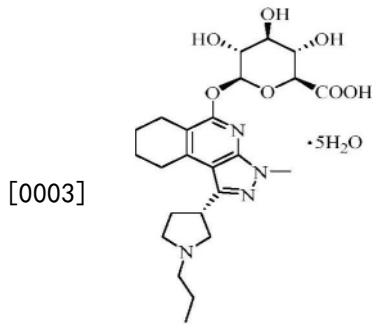
一种PARP抑制剂TSL-1502中间体TSL-1502M的用途

技术领域

[0001] 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

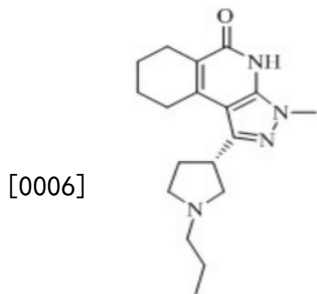
[0002] PARP抑制剂TSL-1502,化学名为(2S,3S,4S,5R,6S)-3,4,5-三羟基-6-(3-甲基-1-((S)-1-丙基吡咯烷-3-基)-6,7,8,9-四氢-3H-吡唑并[3,4-c]异喹啉-5-氧基)四氢-2H-吡喃-2-甲酸的化合物(设定其编号为TSL-1502),该化合物最早出现在201180002886.8(公开号为CN102510863A,授权公告号为CN102510863B,以下简称为2011年专利)的0177段化合物,其结构式见式I。



式 I

[0004] 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。

[0005] 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,尚未公开),结构式见式II,



式II

[0007] 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

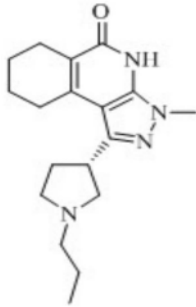
药物用途信息。

发明内容

[0008] 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。

[0009] 具体的,本发明提供了TSL-1502M在制备预防和治疗抗肿瘤的藥物中的应用。

[0010] 所述TSL-1502M的结构见式II:



[0011]

式II。

[0012] 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。

[0013] 为此,本发明所述的抗肿瘤作用,其中的肿瘤包括以下肿瘤:

[0014] 所述肿瘤具体为乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌。

[0015] 所述肿瘤优选为乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌。

[0016] 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。

[0017] 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%。

[0018] 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。

[0019] 优选的,本发明的药物制剂为口服制剂或注射剂。

[0020] 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。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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個使用大量填充剂的那些组合物中。

[0025] 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、糖浆剂或酞剂，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。

[0026] 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。

[0027] 所述应用时，TSL-1502M的使用剂量可以是一天0.01mg-2000mg。

[0028] 本发明提供的抗肿瘤作用，具有以下特点：

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 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。

[0032] 4、TSL-1502和TSL-1502M诱导乳腺癌细胞周期阻滞在G₂/M期（优选乳腺癌），TSL-1502M活性明显强于TSL-1502。

[0033] 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

[0034] 图1：TSL-1502及TSL-1502M对体外培养细胞增殖的影响

[0035] 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

[0036] 图3：TSL-1502及ABT-888对MDA-MB-436细胞克隆形成的抑制作用

[0037] 图4：TSL-1502M及AZD2281对Rad51聚集点形成的影响

[0038] 图5：TSL-1502M对MDA-MB-436细胞 γ -H2AX磷酸化的影响

[0039] 图6：TSL-1502，TSL-1502M及AZD2281，ABT888对MDA-MB-436细胞周期的影响

[0040] 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

[0041] 实施例1：TSL-1502M的制备

[0042] 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:

[0043] 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-5H-吡唑并[3,4-c]异喹啉-5-酮(2S,3S)-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。

[0044] 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℃。

[0045] 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℃;

[0046] 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;

[0047] 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;

[0048] 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;

[0049] 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;

[0050] 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;

[0051] 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。

[0052] 实验例1

[0053] 一、实验材料

[0054] 1、受试药物

[0055] 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;

[0056] TSL-1502M:白色粉末,批号20150801,纯度98.6%,密封,2-8℃保存,申请人自备;

[0057] 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;

[0058] 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;

[0059] 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;

[0060] 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。

[0061] 2、药品配制方法：

[0062] TSL-1502、TSL-1502M、AZD2281和ABT-888用DMSO配成10mM的原液，分装保存于-70℃；TMZ用DMSO配成200mM的原液，分装保存于-70℃。

[0063] 3、细胞株选择依据及细胞株来源

[0064] 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

[0065] 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	人乳腺癌细胞	BRCA1 mutated	含 10%FBS, 10 µg/ml

	库			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

[0068] 4、试剂及仪器

[0069] 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;辣根过氧化物酶标记的羊抗兔和羊抗鼠二抗购自Calbiochem公司;Alexa Fluor[®] 488goat 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;

[0070] 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。

[0071] 二、实验方法

[0072] 1、磺酰罗丹明B蛋白染色法(SRB法)

[0073] 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、10000nM)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：

[0074] 抑制率 = $(OD_{\text{对照孔}} - OD_{\text{给药孔}}) / OD_{\text{对照孔}} \times 100\%$

[0075] 根据各浓度抑制率,计算半数抑制浓度 IC_{50} 。

[0076] 2、克隆形成实验

[0077] 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、100nM)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。

[0078] 3、免疫荧光法

[0079] 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[®] 488goat 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。

[0080] 4、Western blot法

[0081] 4.1 γ -H2AX的磷酸化的检测:

[0082] 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、10000nM)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(50mM Tris-HCl(pH 6.8),100mM 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。

[0083] 4.2细胞凋亡的检测:

[0084] 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 μ M)或AZD2281(0.1、1、10 μ M)作用120小时后,加入1×SDS凝胶上样缓冲液(50mM Tris-HCl(pH 6.8),100mM 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。

[0085] 5、流式细胞术

[0086] 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。

[0087] 三、实验结果

[0088] 1、TSL-1502、TSL-1502M抑制多种体外培养肿瘤细胞的增殖

[0089] 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:

[0090] 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 ± 0.0 nM、 0.9 ± 0.2 nM、 100.6 ± 73.8 nM、 1.9 ± 0.4 nM,该抑制作用显著强于其前药TSL-1502(IC_{50} 分别为 132.1 ± 4.7 nM、 79.6 ± 12.5 nM、 \approx

10000nM、 935.7 ± 526.6 nM), 以及参比药物AZD2281 (IC_{50} 分别为 18.6 ± 1.3 nM、 4.0 ± 0.7 nM、 586.1 ± 89.4 nM、 ≈ 1 nM(抑制率稍弱于TSL-1502M)) 和ABT-888 (IC_{50} 分别为 314.2 ± 24.4 nM、 114.7 ± 60.8 nM、NA、 2102.5 ± 1470.1 nM);

[0091] 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。

[0092] 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)。

[0093] 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。

[0094] 表2: 对体外培养细胞增殖的影响 (n=2)

细胞株	IC50 (nM, Mean \pm 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
[0095] 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

[0096] 2、TSL-1502、TSL-1502M增效细胞毒药物抗肿瘤活性

[0097] 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。

[0098] 在BRCA1突变的MDA-MB-436细胞中, 30、100、300nM的TSL-1502, 3、10、30nM的TSL-1502M, 10、30、100nM的AZD2281或30、100、300nM ABT-888与10、30 μ M的TMZ合用120小时。

[0099] 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。

[0100] 在BRCA基因正常的SW620细胞中, 3、10 μ M的TSL-1502M或3、10 μ M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。

[0101] 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。

[0102] 2.1 TSL-1502和TSL-1502M对MDA-MB-436细胞的增殖抑制作用: 见表3-1

[0103] 表3-1: 对MDA-MB-436细胞的增殖抑制作用。抑制率(% , Mean \pm SD)

		AZD2281			
		0 nM	10 nM	30 nM	100 nM
TMZ	0 μ M	0	25.0 \pm 3.6	36.4 \pm 4.1	47.0 \pm 5.2
	10 μ M	2.7 \pm 2.5	42.0 \pm 0.4	56.8 \pm 1.6	61.5 \pm 2.2
	30 μ M	9.1 \pm 4.8	59.8 \pm 2.9	69.6 \pm 3.5	71.7 \pm 1.4
		ABT888			
		0 nM	30 nM	100 nM	300 nM
TMZ	0 μ M	0	4.9 \pm 0.8	18.9 \pm 6.6	23 \pm 3.2
	10 μ M	0.9 \pm 2.2	18.1 \pm 1.4	30.1 \pm 0.7	40 \pm 0.5
	30 μ M	6.2 \pm 3.5	38.2 \pm 1.5	50.5 \pm 0.3	60 \pm 2.6
		TSL-1502			
		0 nM	30 nM	100 nM	300 nM
TMZ	0 μ M	0	1.3 \pm 2.1	15.6 \pm 3.3	30.2 \pm 1
	10 μ M	3.8 \pm 0.8	7 \pm 4.2	24.6 \pm 2.7	48.1 \pm 2.8
	30 μ M	11.2 \pm 2.4	22.7 \pm 2.1	42.3 \pm 3	63.4 \pm 3
		TSL-1502M			
		0 nM	3 nM	10 nM	30 nM
TMZ	0 μ M	0	28.6 \pm 0.1	61.9 \pm 1.3	67.5 \pm 1.5
	10 μ M	-0.9 \pm 0.8	45.2 \pm 1.3	69.3 \pm 0.6	74.1 \pm 1.7
	30 μ M	8.5 \pm 3.5	63.8 \pm 3.3	75.6 \pm 1.1	80.2 \pm 3.5

[0105] 2.2: TSL-1502和TSL-1502M对SW620细胞的增殖抑制作用。见表3-2

[0106] 表3-2: 对SW620细胞的增殖抑制作用。抑制率(% , Mean \pm SD)

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

[0108] 3、TSL-1502抑制BRCA功能缺陷肿瘤细胞的克隆形成

[0109] 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IC₅₀为9.5 \pm 1.4nM, AZD2281和ABT-888抑制克隆形成的IC₅₀分别为1.7 \pm 0.1和9.5 \pm 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。

[0110] 4、TSL-1502M选择性地诱导Rad51聚焦点的形成

[0111] 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聚焦点不会被诱导形成。我们用免疫荧光法检测了TSL-1502M及AZD2281对Rad51聚焦点形成的影响。如图4所示:

[0112] 10 μ M的TSL-1502M或30 μ M的AZD2281作用24小时后,在BRCA1/2功能正常的细胞(V-C8#13-5)中, Rad51聚焦点被明显诱导,而在BRCA1/2功能缺陷的细胞(V-C8)中, Rad51聚焦点不能被诱导。

[0113] 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。

[0114] 5、TSL-1502M与TMZ合用明显增强MDA-MB-436细胞 γ -H2AX的磷酸化

[0115] 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:

[0116] TSL-1502M或参比化合物AZD2281与TMZ合用后 γ -H2AX的磷酸化明显增强。

[0117] 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。

[0118] 6、TSL-1502诱导细胞阻滞在G₂/M期

[0119] 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:

[0120] TSL-1502, TSL-1502M和参比化合物AZD2281都能够剂量依赖地诱导G₂/M期细胞增加,即诱导细胞周期G₂/M期阻滞。

[0121] TSL-1502M诱导G₂/M期周期阻滞作用和AZD2281近似:10 μ M剂量下都能明显诱导G₂/M期阻滞;TSL-1502诱导G₂/M期周期阻滞作用弱于TSL-1502M和参比化合物AZD2281:10 μ M剂量下诱导G₂/M期阻滞作用较弱。

[0122] 上述结果表明, TSL-1502和TSL-1502M诱导MDA-MB-436细胞周期阻滞在G₂/M期, TSL-1502M活性明显强于TSL-1502,和参比化合物AZD2281近似。

[0123] 7、TSL-1502、TSL-1502M诱导细胞凋亡

[0124] 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:

[0125] TSL-1502在1 μ M剂量下,有较弱的诱导PARP切割作用,10 μ M更明显;

[0126] TSL-1502M在0.01 μ M剂量下,即能明显诱导PARP切割;

[0127] 参比药物AZD2281在0.1 μ M剂量下,有较弱的诱导PARP切割作用,1 μ M和10 μ M更明显。

[0128] 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。

[0129] 试验结论:

[0130] 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:

[0131] 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, IC₅₀分别为0.2 \pm 0.0nM、0.9 \pm 0.2nM和1.9 \pm 0.4nM,该抑制作用显著强于其前药TSL-1502(IC₅₀分别为132.1 \pm 4.7nM、79.6 \pm 12.5nM和935.7 \pm 526.6nM),以及参

比药物AZD2281 (IC_{50} 分别为 $18.6 \pm 1.3nM$ 、 $4.0 \pm 0.7nM$ 和 $\approx 1nM$ (抑制率稍弱于TSL-1502M))和ABT-888 (IC_{50} 分别为 $314.2 \pm 24.4nM$ 、 $114.7 \pm 60.8nM$ 和 $2102.5 \pm 1470.1nM$)。

[0132] 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。

[0133] 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。

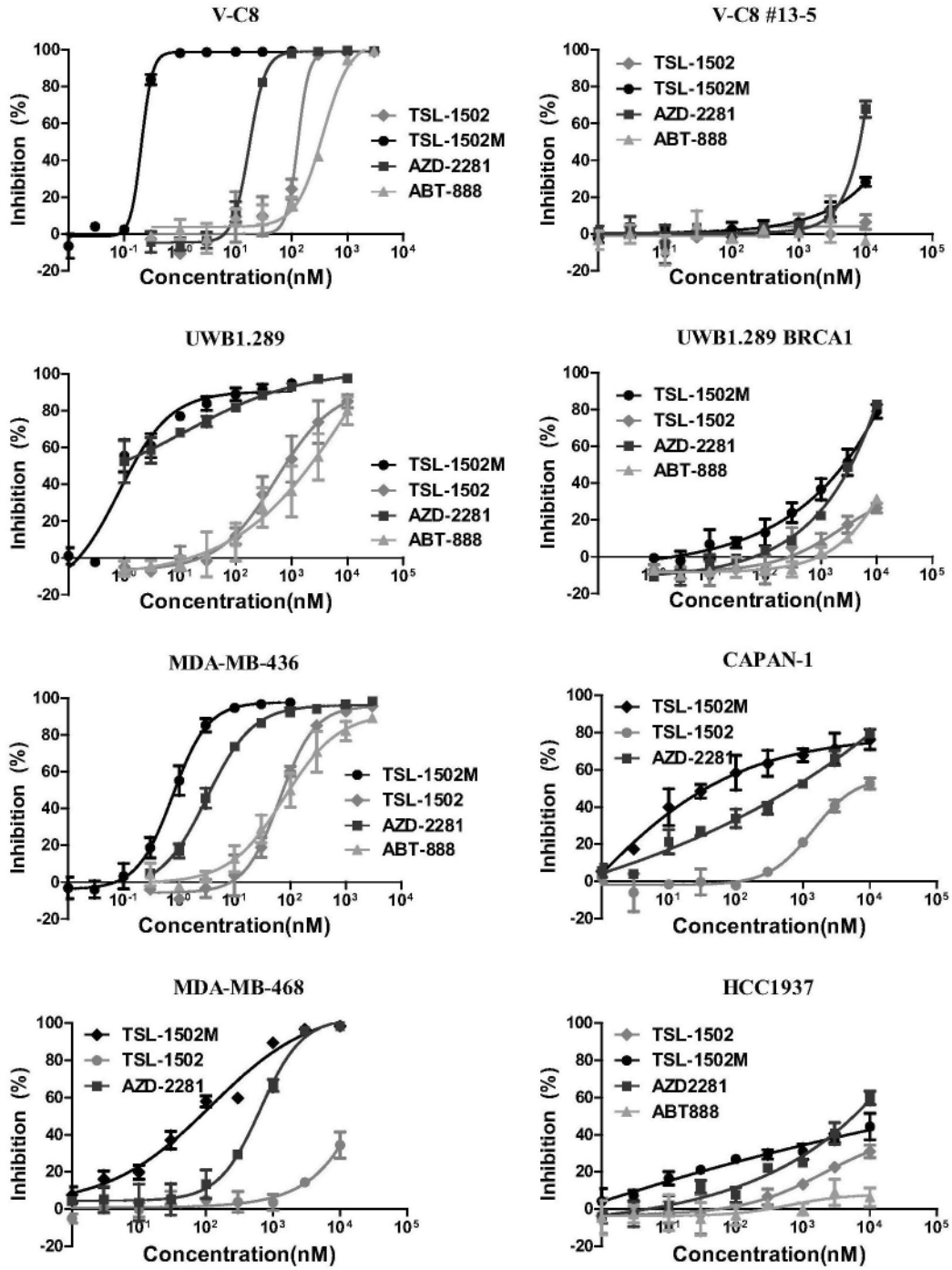
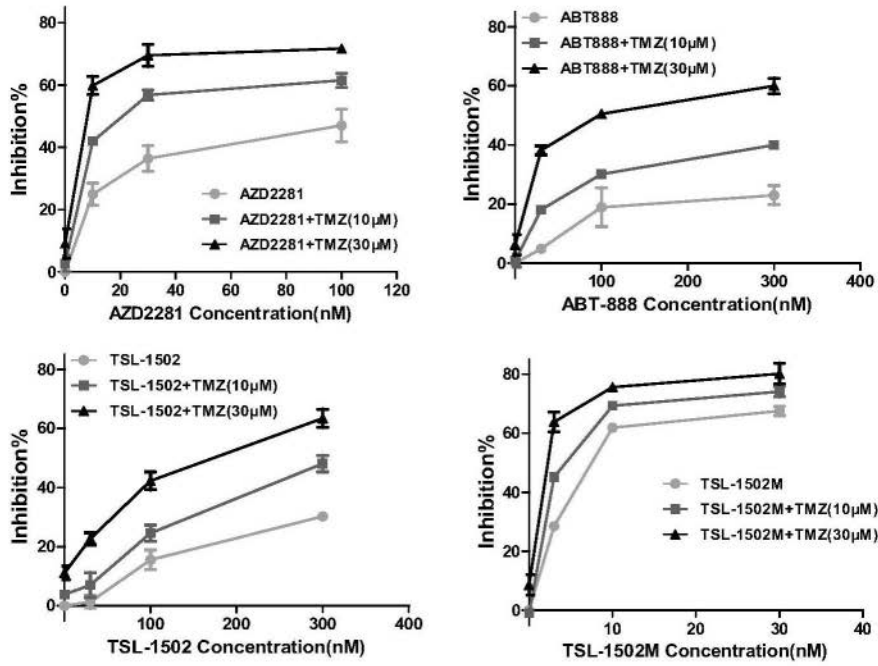


图1

MDA-MB-436:



SW620:

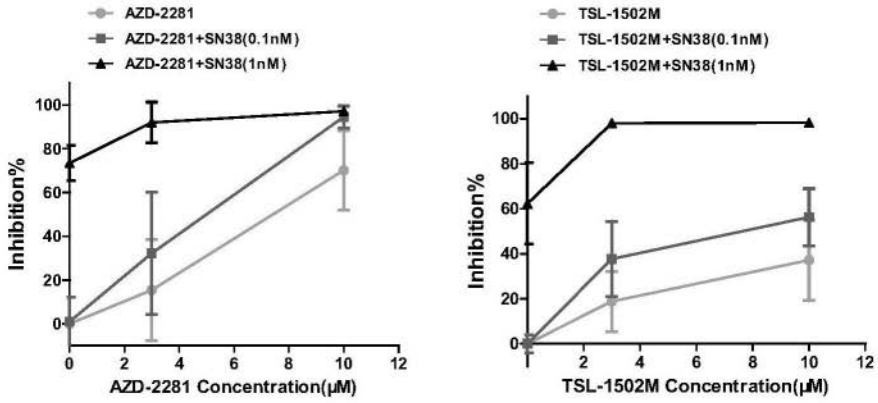


图2

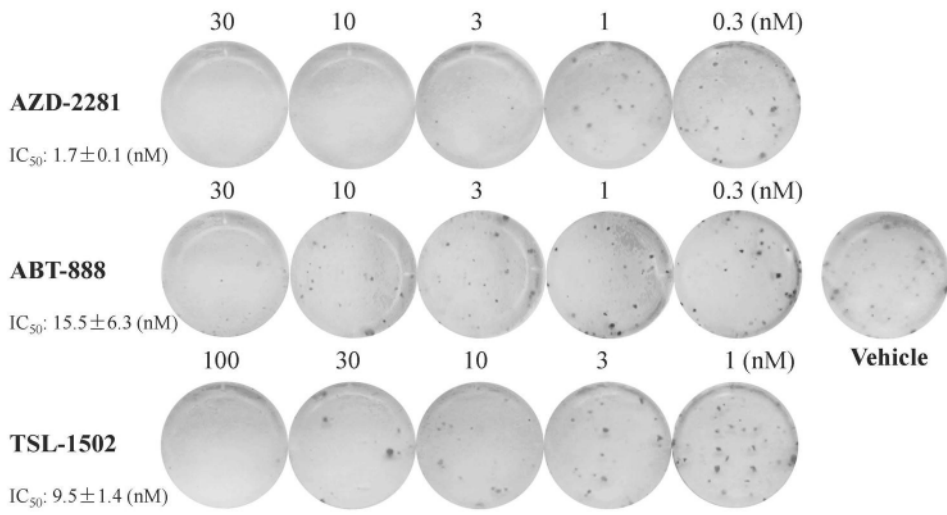


图3

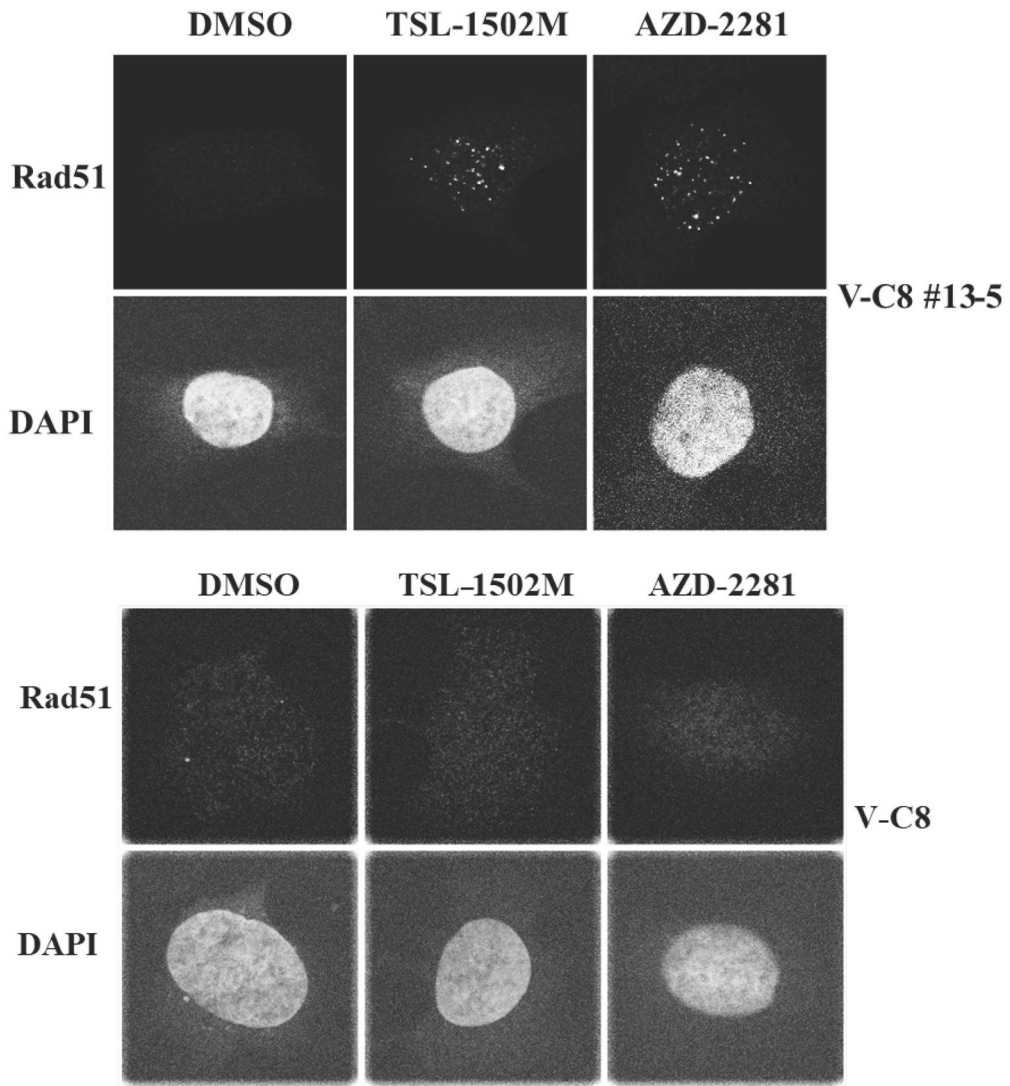


图4

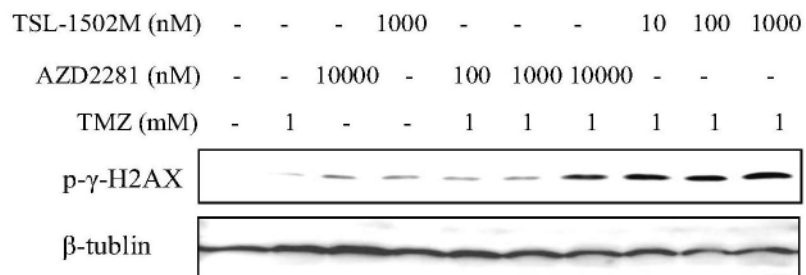


图5

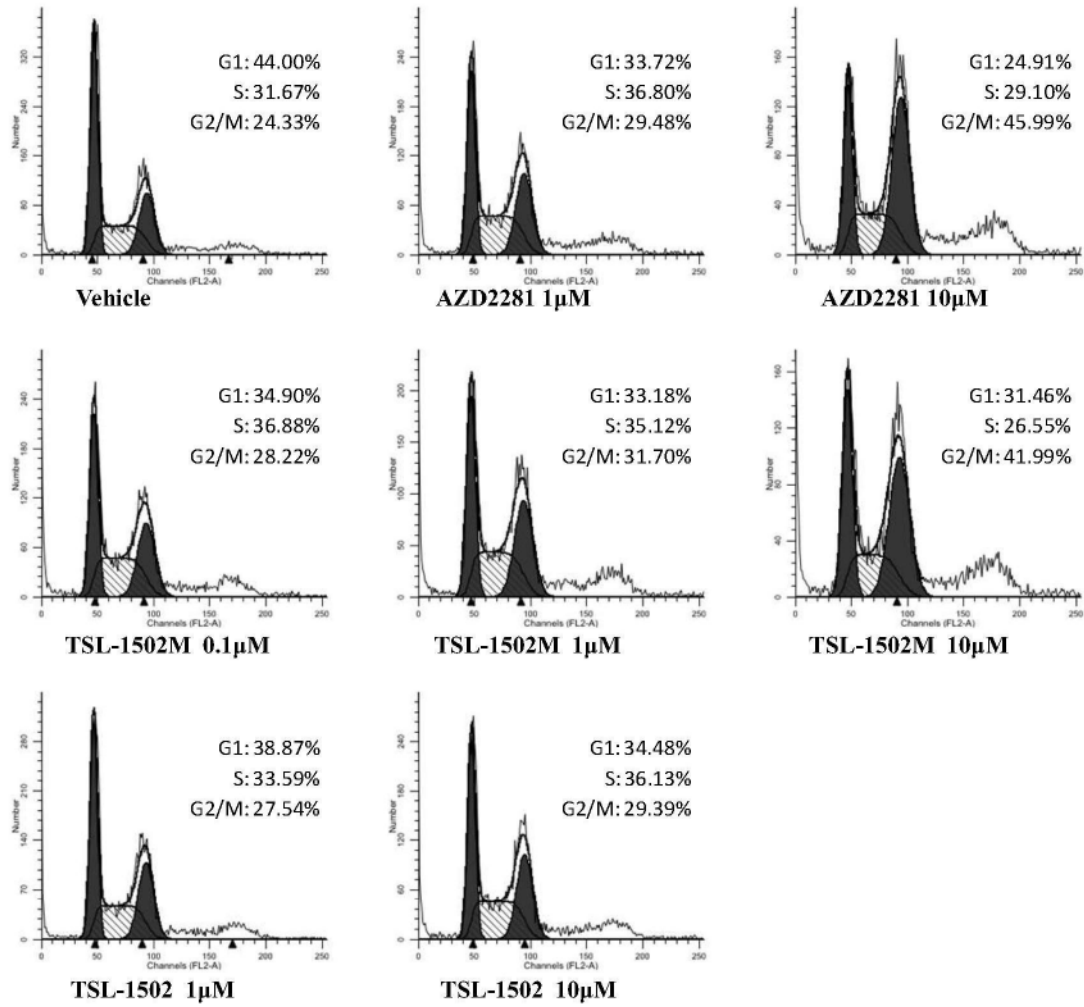


图6

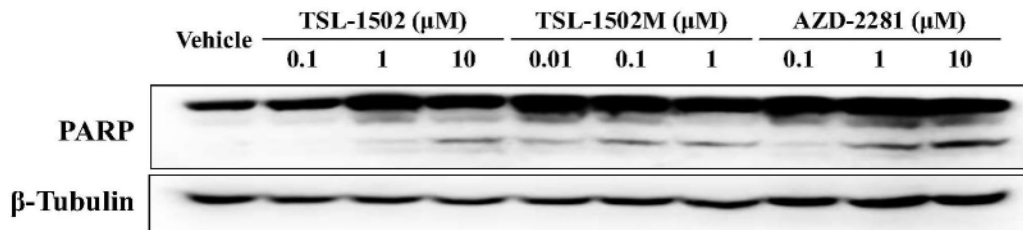


图7