**项目方案**

**基于B-hCD3E mice建立B-hCDH17 B16F10 黑色素瘤模型并测试药物药效**

**项目编号：25P094001**

**委托单位**

|  |  |
| --- | --- |
| **名称** | **南京维立志博生物科技股份有限公司** |
| **地址** | **暂无** |
| **联系人** | **暂无** |
| **电话** | **暂无** |
| **电邮** | **暂无** |

**研究机构**

|  |  |
| --- | --- |
| **名称** | **百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司** |
| **地址** | **北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地宝参南街12号院** |
| **联系人** |  |
| **电话** |  |
| **电邮** |  |

**项目负责人和实验参加人员姓名**

|  |  |
| --- | --- |
| **项目负责人** | **郭佩佩** |
| **实验负责人** |  |
| **质量保证人员** | **杨翠丽** |

**实验预计开始日期：2024年xx月xx日**

**实验预计结束日期：2024年xx月xx日**

**目录**

[1. 项目名称 4](#_Toc140838198)

[2. 项目目的 4](#_Toc140838199)

[3. 关键实验试剂与仪器设备 4](#_Toc140838200)

[3.1. 关键实验试剂 4](#_Toc140838201)

[3.2. 关键仪器设备 4](#_Toc140838202)

[4. 受试品信息与配制方法 4](#_Toc140838203)

[4.1. 受试品信息 4](#_Toc140838204)

[4.2. 受试品及对照品配制方法 5](#_Toc140838205)

[5. 实验动物和饲养管理 5](#_Toc140838206)

[5.1. 实验动物 5](#_Toc140838207)

[5.2. 饲养管理 6](#_Toc140838208)

[6. 实验方法 6](#_Toc140838209)

[6.1. 细胞培养 6](#_Toc140838210)

[6.2. 肿瘤细胞的接种与分组 6](#_Toc140838211)

[6.3. 剂量调整或暂停 7](#_Toc140838212)

[6.4. 实验动物人道终点 7](#_Toc140838213)

[6.5. 实验动物非正常死亡 7](#_Toc140838214)

[6.6. 检测指标 8](#_Toc140838215)

[6.7. 实验终点 8](#_Toc140838216)

[6.8. 安乐死 8](#_Toc140838217)

[6.9. 药物评价指标 9](#_Toc140838218)

[6.10. 数据采集和统计学分析 9](#_Toc140838219)

[6.11. 方案变更 9](#_Toc140838220)

[7. 项目报告 9](#_Toc140838221)

[8. 原始资料保存 9](#_Toc140838222)

[9. 实验方案认可签字 9](#_Toc140838223)

**名词缩略表**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **英文缩写** | **英文全称** | **中文全称** |
| FBS | Fetal Bovine Serum | 胎牛血清 |
| PBS | Phosphate Buffered Saline | 磷酸缓冲液 |
| TGI | Tumor Growth Inhibition | 肿瘤生长抑制率 |
| TV | Tumor Volume | 肿瘤体积 |
| TW | Tumor Weight | 肿瘤重量 |
| SEM | Standard Error of the Mean | 标准误 |
| RH | Relative Humidity | 相对湿度 |
| i.p. | Intraperitoneal | 腹腔注射 |
| i.v. | Intravenous | 静脉注射 |
| s.c. | Subcutaneous | 皮下注射 |
| p.o. | Per Os | 口服 |
| i.m. | Intramuscular | 肌肉注射 |
| i.t. | Intratumoral | 瘤内注射 |
| i.g. | Intragastric | 灌胃给药 |
| hr | Hour | 小时 |
| min | Minute | 分钟 |

1. **项目名称**

基于B-hCD3E mice建立B-hCDH17 B16F10 黑色素瘤模型并测试药物药效

1. **项目目的**

基于B-hCD3E mice建立B-hCDH17 B16F10 黑色素瘤模型并测试药物药效

1. **关键实验试剂与仪器设备**
   1. **关键实验试剂**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **试剂名称** | **供货单位** | **货号** | **保存条件** |
| DMEM | Corning | 10-013-CVRC | 2~8 ℃ |
| 胎牛血清 | ExCell Bio | FSP500 | -20 ℃ |
| PBS | Gibco | 20012-027 | 2~8 ℃ |

* 1. **关键仪器设备**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **试剂/仪器名称** | **供货单位** | **型号/货号** | **保存条件** |
| 二氧化碳培养箱 | PHCbi | MCO-18AC | 室温 |
| 细胞计数仪 | Countstar | Rigel S2 | 室温 |
| 电子天平 | 奥豪斯 | PX822ZH/E | 室温 |
| 游标卡尺 | MITUTOYO | CD-15AX | 室温 |

1. **受试品信息与配制方法**
   1. **受试品信息**
      1. **受试品 1**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | TA1 |
| 代号 | TA1 |
| 生产日期 | 2025-07-17 |
| 有效期至 | 2026-07-16 |
| 供货单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 生产单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 批号 | 20250717002 |
| 物理性状 | 溶液(有浓度) |
| 储存液浓度 | 7.5mg/mL |
| 规格及数量 | 0.8mL/支 |
| 溶媒 | 0.9%氯化钠溶液 |
| 贮存条件 | -80℃, 避光 |

* + 1. **受试品 2**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | TA2 |
| 代号 | TA2 |
| 生产日期 | 2025-07-29 |
| 有效期至 | 2026-07-28 |
| 供货单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 生产单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 批号 | 20250729001 |
| 物理性状 | 溶液(有浓度) |
| 储存液浓度 | 14.21mg/mL |
| 规格及数量 | 0.5mL/支 |
| 溶媒 | 0.9%氯化钠溶液 |
| 贮存条件 | -80℃, 避光 |

* + 1. **受试品 3**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | TA3 |
| 代号 | TA3 |
| 生产日期 | 2025-07-15 |
| 有效期至 | 2026-07-14 |
| 供货单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 生产单位 | 南京维立志博生物科技股份有限公司 |
| 批号 | Y250715 |
| 物理性状 | 溶液(有浓度) |
| 储存液浓度 | 4.56mg/mL |
| 规格及数量 | 1.54mL/支 |
| 溶媒 | 0.9%氯化钠溶液 |
| 贮存条件 | -80℃, 避光 |

* + 1. **对比留样**

|  |  |
| --- | --- |
| 名称 | 重组化单克隆抗体注射液 |
| 代号 | 重组化单克隆抗体注射液 |
| 生产日期 | 2019 |
| 有效期至 | 2028 |
| 供货单位 | 祐和医药科限公司 |
| 生产单位 | 烟台迈百瑞国际生物医药有限公司 |
| 批号 | 17227807001 |
| 物理性状 | 溶液 |
| 储存液浓度 | 发生大 |
| 规格及数量 | 打算大哥 |
| 溶媒 | 化钠注射液 |
| 贮存条件 | 健康和 |

* 1. **受试品及对照品配制方法**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **样品** | **样品名称** | **工作液浓度** | **配制方法** | **药品的最终处理** |
| 溶剂对照 | PBS | Null | Null | 实验结束后，按医疗废物处理。 |
| 受试品1 | hIgG | 几行 | 分装 | 1．分装后剩余原液储存于-80℃，**项目数据报告验收后，应委托方要求返还，若验收后3个月内无返还要求，按医疗废弃物处理。**  2．剩余工作液储存于2~8℃，实验结束后，按医疗废物处理。 |
| 受试品2 | 重组源化单克隆抗体注射液 | 大时代 | 分非官方的 | 1．分装后剩余原液储存于-80℃，实验结束后返还委托方。  2．剩余工作液储存于2~8℃，实验结束后，按医疗废物处理。 |

1. **实验动物和饲养管理**
   1. **实验动物**

|  |  |
| --- | --- |
| 种属 | *Mus musculus* |
| 品系 | C57BL/6 |
| 名称 | B-hCD3E mice |
| 性别 | 雌鼠 |
| 体重 | 15g以上，5g差内（保证动物质量） |
| 周龄 | 5-7周龄 |
| 数量 | 36只（入组18只） |
| 实验动物提供商 | 百奥赛图江苏基因生物技术有限公司 |
| 实验动物生产许可证号 | SCXK（苏）2021-0003/ SCXK（苏）2021-0005 |

* 1. **饲养管理**

实验动物饲养在百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司动物中心的SPF级屏障设施环境。实验前动物经过7天的适应性饲养。

屏障系统温度和湿度控制在如下范围：

**温度**：20~26 ℃

**湿度**：40~70% RH

**照明**：每12小时交替

**鼠笼**：玉米芯高压消毒清洁垫料，每两周更换一次。每只笼具具有笼具标签，标明动物数量、性别、品系、接收时间、组别以及实验开始时间。

**饲料和饮水**：SPF级鼠生长繁殖饲料购自北京科澳协力饲料有限公司。饮用水为灭菌酸化水（pH 2.5~3.0）。动物可以自由摄取无菌食物和饮水。

**动物编号**：耳签

1. **实验方法**
   1. **细胞培养**

小鼠结肠癌MC38细胞购自舜冉上海生物科技有限公司，百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司对MC38细胞进行了基因改造，使其表达人源XXX，该细胞被命名为B-hCDH17 B16-F10细胞。细胞培养在37 ℃、5% CO2的培养箱中，培养基成分为含有10 %灭活胎牛血清的Dulbecco's Modified Eagle's Medium培养基。

* 1. **肿瘤细胞的接种与分组**

将PBS重悬的B-hCDH17 B16-F10细胞以5×105个/0.1 mL/只接种于36只B-hCD3E mice人源化小鼠的右侧背部皮下。当平均肿瘤体积达到80-100mm3时，根据肿瘤体积和体重选择18只小鼠入组，随机分配到3个实验组中，每组6只，分组当天（Day 0）开始给药，具体给药方案见下表：

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **组别** | **受试品** | **动物数**  **(只)** | **剂量**  **(mg/kg) a** | **给药途径** | **给药频率b** | **给药次数c** |

注：a：给药体积依实验动物体重按10 μL/g计算；

b：BIW指每周给药2次；

c：给药次数或因肿瘤生长情况而不同。

* 1. **剂量调整或暂停**

两次给药间隔时间应注意观察动物健康状态，若出现以下任何一项或多项情况时，应暂停给药，直至动物恢复正常状态：

* 1. 动物体重降低至开始药物处理时体重的85%以下停止给药，恢复至开始药物处理时体重的90%继续给药
  2. 给药后，动物行动迟缓或异常。
  3. **实验动物人道终点**

在实验过程中，若出现以下任何一项或多项情况时，应对动物实施安乐死：

1. 当单只动物荷瘤体积超过2500 mm3；
2. 肿瘤发生严重破溃，3天之内未结痂；
3. 动物出现行动异常，或瘫痪；
4. 动物体重降低超过开始药物处理时体重的20%。
   1. **实验动物非正常死亡**

实验过程中，若出现实验动物非正常死亡，对动物进行大体剖检并记录所有肉眼观察到的病变情况。收集动物尸体保存于10%中性福尔马林中，后续处理方式以与客户最终确认为准。

* 1. **检测指标**
     1. **肿瘤体积：**

分组后每周使用游标卡尺对肿瘤体积进行2次测量，安乐死前测量肿瘤体积，测量肿瘤的长径和短径，其体积计算公式为：肿瘤体积=0.5×长径×短径2。

* + 1. **体重检测：**

接种、分组（即首次给药前）、给药期间每周2次、安乐死前称取动物体重。

* + 1. **一般临床观察：**

适应性饲养期和实验期间每天观察1次，观察内容包括但不限于肿瘤结节破溃情况、动物状态、饮食情况等。

* + 1. **肿瘤重量及拍照：**

小鼠中途死亡或提前安乐死，以及实验终点，剥取小鼠肿瘤称重，并对安乐死动物及肿瘤拍照记录，照片记录附于课题报告之后。

* + 1. **样品收集及检测**

1. 小鼠中途死亡或提前安乐死，以及实验终点，每只小鼠收集肿瘤样本，2-8℃保存于10%中性福尔马林固定液中，实验结束后统一邮寄。
2. 实验结束时，采集每只小鼠肿瘤，称重，进行流式检测。

检测Panel如下：mCD16/32、hFcX、Live/Dead、mCD45、mCD3ε、mNK1.1、mKi-67、h/m Granzyme B、hTROP-2。

1. 各组首次给药后2 hr和24 hr及实验终点采集每只小鼠非抗凝血40 μL，收集血清于-80℃保存。

通过MSD方法检测血清中如下细胞因子含量：Mouse IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, KC/GRO, IL-10, IL-12p70, TNF-α。

* 1. **实验终点**

具体结束实验时间以与客户最终确认日期为准。

* 1. **安乐死**

实施人道终点或实验结束时，使用过量CO2将动物执行安乐死。

* 1. **药物评价指标**
     1. **肿瘤体积抑制率（TGITV）：**

TGITV (%) = [1-(Ti-T0)/(Ci-C0)] × 100%

（Ti：治疗组在给药第i天的肿瘤体积均值，T0：治疗组在给药第0天的肿瘤体积均值；Ci：对照组在给药第i天的肿瘤体积均值，C0：对照组在给药第0天的肿瘤体积均值）

* + 1. **（可选）瘤重抑制率（TGITW）：**

实验结束，对存活动物实施安乐死后剥离肿瘤组织，称量肿瘤重量，计算各组的肿瘤重量差异以进一步计算瘤重抑制率TGITW，计算公式如下：

瘤重抑制率TGITW%=（TW对照组- TW治疗组）/ TW对照组×100% ，TW指肿瘤重量。

* 1. **数据采集和统计学分析**

测定和观察的原始数据必须进行记录。基于原始数据进行分析处理，结果分析用平均数和标准误表示（Mean ± SEM）。同时对肿瘤体积进行统计学分析，p < 0.05认为有显著性差异。结果分析时同时考虑统计学意义和生物学意义。

* 1. **方案变更**

甲乙双方对已生效方案进行任何修改，均需以书面明确。经双方认可后，变更生效。

1. **项目报告**

项目报告中需包含实验基础信息、检测指标及实验结果均在项目报告中分析、讨论。

1. **原始资料保存**

项目方案：保存

实验过程记录：保存

统计学数据：保存

项目报告：保存

资料保存地点：百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司，保管期限为实验结束（实验操作完成日期为准）后五年。

1. **实验方案认可签字**

本方案已经过项目负责人和委托单位批准确认。

项目负责人：

郭佩佩

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

百奥赛图（北京）医药科技股份有限公司

委托单位负责人：

XXX

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_日期：\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

XX公司