

一类 1, 4-二氢-萘啉衍生物在治疗肿瘤中的应用

本申请要求于 2021 年 12 月 24 日提交中国专利局、申请号为 202111599362.3、发明名称为“一类 1, 4-二氢-萘啉衍生物在治疗肿瘤中的应用”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

5 技术领域

本发明属于制药领域，涉及 1, 4-二氢-萘啉衍生物的新用途，更具体的说涉及 1, 4-二氢-萘啉衍生物在制备抗肿瘤药物中的应用。所述肿瘤为实体瘤，包括神经系统肿瘤和非神经系统肿瘤。所述神经系统肿瘤包括胶质母细胞瘤和神经母细胞瘤等，所述非神经系统肿瘤包括肝癌、结肠癌、胃癌等。

10 背景技术

胶质母细胞瘤（Glioblastoma, GBM）是最常见的恶性原发性颅内肿瘤，约占所有胶质瘤的 57%，占有原发性中枢神经系统（central nervous system, CNS）恶性肿瘤的 48%（Neuro-oncology, 2018. 20: p. iv1-iv86）。胶质母细胞瘤致死率极高，在美国，2000-2014 年间胶质母细胞瘤患者的 1 年存活率为 41.4%，5 年的存活率仅为 5.8%（CA: a cancer journal for clinicians, 2020. 70(4): p. 299-312）。现在对于胶质母细胞瘤的病因还知之甚少，目前已知的唯一可能的致病因素为电离辐射。这也为胶质母细胞瘤的预防和治疗带来一定的挑战。

根据恶性程度，可分为 I-IV 级，其中 I、II 是恶性程度较低的胶质瘤，III、IV 为恶性程度较高的胶质瘤。胶质母细胞瘤的治疗方式主要包括手术切除、放疗、系统治疗（化疗、靶向治疗），其中手术后替莫唑胺同步放疗联合辅助化疗已成为新诊断胶质母细胞瘤的标准治疗方案。当前主要的化疗药物除替莫唑胺外，有亚硝脲类、丙卡巴肼、铂类、长春碱类以及喜树碱类等。但常规的化疗药物的抗肿瘤作用机制还满足不了现如今的临床需求。

在真核细胞中，巨胞饮是细胞内化胞外物质以及溶解分子的重要途径。巨胞饮过程对于肿瘤细胞有着双重作用。在营养缺乏的情况下，肿瘤细胞可通过巨胞饮途径内化胞外营养物质，从而促进肿瘤细胞生长；但通过药物处理或 RAS 基因的异常表达过度激活巨胞饮过程却能诱导一种新的死亡方式：巨泡式死亡（Methuosis）。巨泡式死亡是一种新的不依赖于蛋白酶体的细胞死亡形式，其特点主要是细胞质内充满巨胞饮小体派生的大量空泡。最早这种死亡方式在胶质母细胞瘤细胞中被发现（Oncogene, 1999. 18(13): p. 2281-90）。进一步研究发现，这种死亡方式是由不依赖于网格蛋白的巨胞饮体变化促发，最终形成大量空泡，引起细胞破裂死亡（Journal of medicinal chemistry, 2012. 55(5): p. 1940-56）。现如今

研究发现在巨胞饮体的形成过程中,有多种分子参与,其中包括 Ras、Rac1、Arf6、Rab7 等(The American journal of pathology, 2014. **184**(6): p. 1630-42)。Rac1 可通过调节肌动蛋白的装配进而影响巨胞饮体的形成,另外,Rac1 的激活可通过 GIT-1 的介导而使激活的 Arf6 减少,进而阻碍巨胞饮体的循环(Molecular cancer research : MCR, 2010. **8**(10): p. 1358-74)。近年来也发现陆续了一些小分子化合物通过激活 MKK4、JNK 和 Rac1 等机制,诱导细胞发生巨泡式死亡,包括 methamphetamine、indolyl chalcone、vaquinol-1、MOMIPP、CX-5011 等(Oncotarget 2016,7, 55863-55889; BMC cancer 2019, 19, 77; BBA - Molecular Cell Research 2020, 118807)。

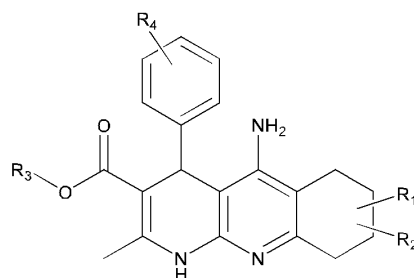
1, 4-二氢-萘啶衍生物是一种既能抑制乙酰胆碱酯酶活性,又能阻滞细胞外钙离子通过钙通道流入细胞的化合物。通过其抑制胆碱酯酶的活性,可延缓乙酰胆碱的水解速度,提高突触间隙乙酰胆碱水平,达到治疗阿尔茨海默症以及血管痴呆的作用(专利号 CN104203945B 和 CN106632317A)。另外,通过抑制钙离子内流,可提高神经细胞对缺血的耐受性,扩张脑血管和改善脑供血,保护神经元,有效改善血管性痴呆患者的认知功能。

发明内容

1, 4-二氢-萘啶衍生物是一种既能抑制乙酰胆碱酯酶活性,又能阻滞细胞外钙离子通过钙通道流入细胞的化合物,可用于治疗阿尔茨海默症及血管性痴呆。该类化合物可通过一种不依赖于抑制胆碱酯酶及阻滞钙通道的新作用机制诱导肿瘤细胞发生巨泡式死亡,从而发挥抗肿瘤的作用。

本发明的目的是提供一种通过新机制治疗肿瘤并能有效延长患者生存期的药物,所述药物为 1, 4-二氢-萘啶衍生物或其药学上可接受的盐。

具体的,本发明提供了一类如式 I 所示 1, 4-二氢-萘啶衍生物或其药学上可接受的盐在制备治疗肿瘤药物中的应用,



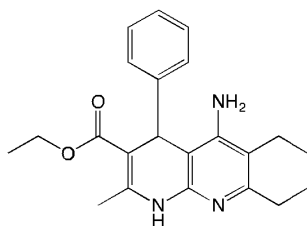
式 I

其中, R1 或 R2 为氢、卤素或 C1-C6 烷基;

R3 选自 C1-C6 烷基, 所述烷基中任意-CH₂-可被一个或两个以上的-O-置换;

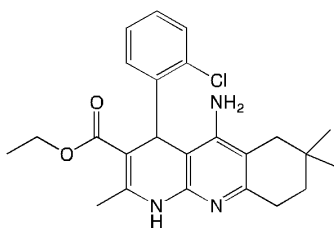
R4 为氢、卤素。

具体的, 所述化合物选自:



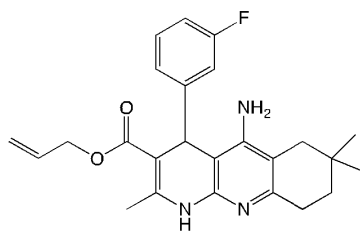
S1

化合物 1: 如 S1 所示;



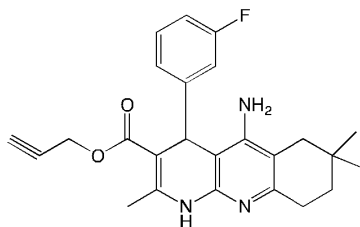
S2

化合物 2: 如 S2 所示;



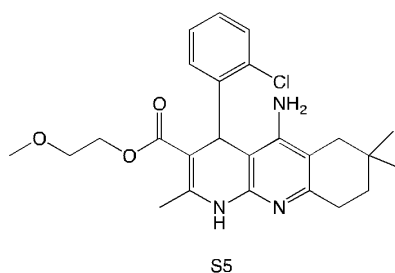
S3

化合物 3: 如 S3 所示;

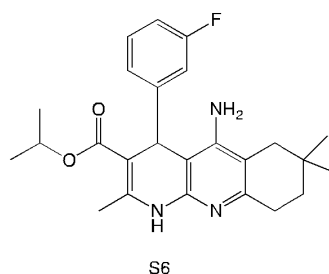


S4

化合物 4: 如 S4 所示;



化合物 5: 如 S5 所示;



5

化合物 6: 如 S6 所示。

上述药物, 以诱导肿瘤细胞发生巨泡式死亡, 出现空泡化细胞表型, 并抑制肿瘤细胞增殖, 发挥抑制肿瘤生长的作用, 最终达到治疗肿瘤的目的。

因此, 本发明提供 1, 4-二氢-萘啶衍生物或其药学上可接受的盐及其药物组合物在制备
10 抗肿瘤药物中的新用途。

所述肿瘤为实体瘤, 包括神经系统肿瘤和非神经系统肿瘤。所述神经系统肿瘤包括胶质母细胞瘤和神经母细胞瘤等, 所述非神经系统肿瘤包括肝癌、结肠癌、胃癌等。

具体的, 本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗实体瘤中的应用。

本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗神经系统肿瘤中应用。

15 本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗脑瘤中的应用。

本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗神经胶质瘤中的应用。

本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗胶质母细胞瘤的应用。

本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗肝癌、结肠癌和胃癌中的应用。

本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物与替莫唑胺联合治疗神经胶质瘤中的应用。

20 本发明提供了 1, 4-二氢-萘啶衍生物与放疗联合治疗神经胶质瘤中的应用。

本发明的优点和积极效果：

本发明提供的作为肿瘤治疗的新型药物，即 1,4-二氢-萘啶衍生物是一种通过特异性诱导肿瘤细胞发生巨泡式死亡的药物，对正常细胞影响较小，有利于开发既安全又有效的治疗肿瘤的药物。

5 附图说明

- 图 1 1, 4-二氢-萘啶衍生物诱导 T98 细胞发生空泡化表型；
- 图 2 S2 诱导多种肿瘤细胞发生空泡化；
- 图 3 钙通道抑制剂不诱导肿瘤细胞空泡化；
- 图 4 胆碱酯酶抑制剂不诱导肿瘤细胞空泡化；
- 10 图 5 钙通道抑制剂联合胆碱酯酶抑制剂不诱导肿瘤细胞空泡化；
- 图 6 S2 给药 2 周对裸鼠脑内 U87MG 胶质瘤生长曲线的影响；
- 图 7 S2 给药 2 周抑制裸鼠脑内 U87MG 胶质瘤生长；
- 图 8 S2 延长脑原位移植胶质瘤裸鼠的生存期；
- 图 9 S2+TMZ 联合用药 2 周对裸鼠脑内 U87MG 胶质瘤生长曲线的影响；
- 15 图 10 S2+TMZ 联合用药 2 周对脑内胶质瘤生长的影响；
- 图 11 S2+TMZ 联合用药延长 U87MG 脑原位瘤小鼠存活；
- 图 12 TMZ 不能抑制 T98 胶质瘤生长，不能减少实体瘤体积和重量；
- 图 13 S2 抑制 T98 胶质瘤生长，减少实体瘤体积和重量。

具体实施方式

- 20 下述实施例举例说明本发明，不应被认为是对本发明的限制。

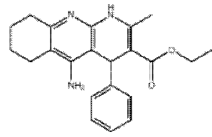
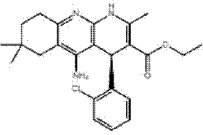
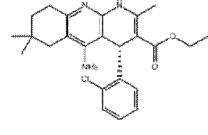
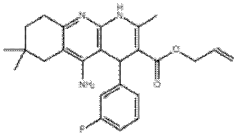
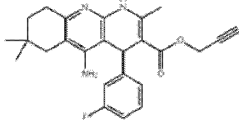
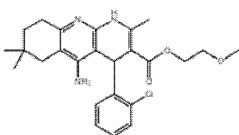
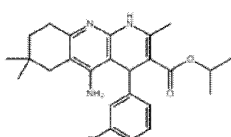
实施例 1 1, 4-二氢-萘啶衍生物对胶质母细胞瘤细胞空泡化诱导作用及增殖抑制作用研究

1 材料和方法

1.1 细胞

人神经胶质瘤细胞系 T98G 细胞来购自于南京科佰生物科技有限公司。

- 25 1.2 1, 4-二氢-萘啶衍生物编号及结构

化合物编号	结构
S1	
(+)-S2	
(-)-S2	
S3	
S4	
S5	
S6	

1.3 化合物溶液配制

称取一定量待测化合物，用 DMSO 溶解，制成终浓度为 100 mM 的均一溶液。

1.4 试剂与耗材

名称	货号/批号	生产商
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Minimum Essential Medium	2192505	gibco
MEM NEAA(100×)	2216384	gibco
Sodium Pyruvate(100 mM)	2192495	gibco
Fetal Bovine Serum	2261480CP	gibco
0.05% Trypsin-EDTA	2192791	gibco
DMSO	21020207	TEDIA
Pen Strep	2257223	gibco
12 孔板	191204-075	BioFIL
96 孔板	24820030	Corning

1.5 细胞培养及细胞表型观察

T98G 细胞稳定传代两次，待细胞密度达 85%以上，用 0.05% trypsin-EDTA 消化 3 分钟，培养基重悬细胞，以一定密度接种于 12 孔板中，每孔体系为 1 mL；培养 24 小时，按照分组情况分别每孔加入上述配制的化合物溶液，使培养体系中化合物浓度分别为：5 μM、10 μM、20 μM、40 μM、60 μM。加入等体积的 DMSO 作为对照孔。

加药处理 6 小时后，显微镜 20×物镜下观察，每孔随机选取五个视野拍照记录。若所观察视野中，细胞内出现边界清晰、明亮的空泡，并且至少符合下列条件中任意一条：1) 至少含有 1 个直径大于 3 μm 的空泡；2) 含有 3 个以上直径大小在 0.5~3 μm 范围内的空泡；则认定为巨泡式死亡阳性细胞。

空泡化率 R （%） = CELL_{阳性} / (CELL_{正常} + CELL_{阳性}) ×100%

其中，CELL_{阳性}：巨泡式死亡阳性细胞数量；CELL_{正常}：正常形态细胞数量

1.6 细胞增殖抑制检测

T98G 细胞稳定传代两次，待细胞密度达到 85%以上，用 0.05% trypsin-EDTA 消化 3 分钟，重悬细胞，以相应密度接种于 96 孔板中，培养 24 小时，按照培养体系终浓度 0.41 μM、1.23 μM、3.7 μM、11.1 μM、33.3 μM、100 μM 加药处理 72 小时后，采用 CellCounting-Lite™

2.0 试剂盒检测细胞活力。按照 CellCounting-Lite™ 2.0 试剂盒说明书加入 100 μL/孔试剂，震荡 10 分钟，在多功能读板仪上读取化学发光值（LUM），计算细胞相对活力。

肿瘤细胞相对活力 V（%）=（LUM-LUM_{本底}）/（LUM_{正常对照组}-LUM_{本底组}）×100%。LUM_{本底}为该检测试剂加入到完全培养基孔本底读数。采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件推算半抑制浓度（IC₅₀）。

2 实验结果

2.1 1, 4-二氢-萘啶衍生物诱导 T98G 细胞发生空泡化

S1、S2（包括(+)-S2 和(-)-S2）、S3、S4、S5 和 S6 能够诱导 T98 发生空泡化（图 1 和表 1），其中 S1 诱导空泡化的活性最弱，S2 诱导空泡化的活性最强。

表 1 1, 4-二氢-萘啶衍生物诱导 T98G 细胞发生空泡化定量分析

化合物	空泡化率（%）			
	5 μM	10 μM	20 μM	40 μM
S1	0.0	0.3±0.6	2.23±0.5	10.0±5.6
(+)-S2	1.3±1.6	10.0±4.2	69.3±6.9	-
(-)-S2	1.2±1.7	21.9±9.0	96.47±2.4	-
S3	1.1±1.5	5.34±1.2	9.04±3.8	57.4±13.9
S4	0.6±1.4	5.0±1.3	10.43±1.0	76.9±12.1
S5	1.4±1.4	10.7±0.90	35.1±1.3	-
S6	0.00	10.5±1.6	15.3±1.3	52.3±2.5

表中数据平均值± SD；“-”表示化合物有沉淀析出，数据未计算。

2.2 1, 4-二氢-萘啶衍生物抑制 T98G 细胞增殖

1, 4-二氢-萘啶衍生物能够抑制神经肿瘤细胞 T98G 增殖，肿瘤增殖抑制活性 IC₅₀ 见（表 2）。其中 S1 增殖抑制活性较弱，与诱导空泡化活性基本一致。

表 2 化合物对 T98G 细胞增殖抑制活性

化合物	IC ₅₀
S1	47.8 μM
(+)-S2	5.3 μM

(-)-S2	9.8 μM
S3	7.0 μM
S4	12.7 μM
S5	4.5 μM
S6	20.5 μM

实施例 2 S2 体外抑制肿瘤细胞增殖活性的研究

1 材料和方法

1.1 细胞

人脑胶质瘤细胞系 U87MG，人脑胶质瘤细胞系 T98G 和人脑胶质瘤细胞系 U251，购自于南京科佰生物科技有限公司；人脑胶质瘤细胞系 A172，人神经母细胞瘤细胞 SK-N-SH，人肝癌细胞系 HepG2，小鼠结肠癌细胞系 CT26.WT 和仓鼠卵巢细胞亚株 CHO-K1 购自于武汉普诺赛生命科技有限公司。

1.2 试剂和耗材

名称	货号/批号	生产商
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Minimum Essential Medium	2192505	gibco
MEM NEAA (100×)	2216384	gibco
Sodium Pyruvate (100 mM)	2192495	gibco
Fetal Bovine Serum	2261480CP	gibco
0.05% Trypsin-EDTA	2192791	gibco
Pen Strep	2257223	gibco
CellCounting-Lite™ 2.0	DD1101-02	Vazyme
96 孔板	24820030	Corning
六孔板	200421-074B	BioFIL
(-)-S2	D12-20161101-7	江苏欧威医药有限公司
DMSO	21020207	TEDIA

10

1.3 给药溶液的配制

精密称取 S2 粉末，用 DMSO 溶解，制备成浓度为 100 mM 的均一溶液，作为母液。

1.4 细胞培养及细胞表型观察

U87MG，T98G，U251，SK-N-SH，A-172 和 HepG2 等细胞贴壁培养于 MEM+10%FBS+1%P/S，按照 1:3 传代；CT26.WT 贴壁培养于 RPMI-1640+10% FBS+1% P/S 培养基中，按照 1:3 传代；CHO-K1 贴壁培养于 Ham's F-12K+10% FBS+1% P/S 培养基中，按照 1:3 传代。

上述所用细胞复苏后稳定传代两次，待细胞密度达 85%以上，用 0.05% trypsin-EDTA 消化 3 分钟，培养基重悬细胞，以一定密度接种于 6 孔板中，每孔体系为 2 mL；培养 24 小时，按照分组情况分别每孔加入上述配制的 S2 溶液 2 μL（DMSO 终浓度 0.1%），使细胞培养体系内的 S2 浓度达到 30 μM。

加药处理 6 小时后，显微镜 20×物镜下观察，每孔随机选取五个视野拍照记录。若所观察视野中，细胞内出现边界清晰、明亮的空泡，并且至少符合下列条件中任意一条：1）至少含有一个直径大于 3 μm 的空泡；2）含有三个以上直径大小在 0.5~3 μm 范围内的空泡；则认定为巨泡式死亡阳性细胞（Journal of Medicinal Chemistry 2018 61 (12), 5424-5434）。

空泡化率 R (%) = $\frac{\text{CELL}_{\text{阳性}}}{(\text{CELL}_{\text{正常}} + \text{CELL}_{\text{阳性}})} \times 100\%$

其中，CELL_{阳性}：巨泡式死亡阳性细胞数量；CELL_{正常}：正常形态细胞数量

1.5 细胞活力检测

按上述各类细胞复苏稳定传代两次，待细胞密度达 85%以上，用 0.05% trypsin-EDTA 消化三分钟，重悬细胞，以相应密度接种于 96 孔板中，培养 24 小时，按照培养体系终浓度 0.41 μM、1.23 μM、3.7 μM、11.1 μM、33.3 μM、100 μM 加药处理 48 小时后，采用 Cell Counting-Lite™ 2.0 试剂盒检测细胞活力。按照 Cell Counting-Lite™ 2.0 试剂盒说明书加入 100 μL/孔试剂，震荡 10 min，在多功能读板仪上读取化学发光值（LUM），计算细胞相对活力。

肿瘤细胞相对活力 V (%) = $\frac{\text{LUM} - \text{LUM}_{\text{本底}}}{(\text{LUM}_{\text{正常对照组}} - \text{LUM}_{\text{本底}})} \times 100\%$ 。LUM_{本底}为该检测试剂加入到完全培养基孔本底读数。采用 GraphPad Prism 8.0.1 统计软件推算半抑制浓度（IC₅₀）。

2 实验结果

2.1 S2 诱导肿瘤细胞空泡化

S2 能够诱导人胶质瘤细胞系 U87MG、T98G、U251 和 A172，人神经母瘤细胞系 SK-N-SH 等神经肿瘤细胞发生空泡化（图 2A-D），同时也能诱导非神经系统肿瘤细胞发生空泡化（图 2 A-D），包括人肝癌细胞 HepG2 和小鼠结肠癌细胞 CT26.WT；但是不会诱导非肿瘤细胞系仓鼠卵巢细胞 CHO-K1 发生空泡化。

2.2 S2 抑制肿瘤细胞增殖

S2 能够抑制神经肿瘤细胞和非神经肿瘤系统增殖，IC₅₀ 范围 4.7~14.3 μM，但对非肿瘤细胞系增殖抑制作用很弱（IC₅₀>100 μM）（表 3）。

表 3 S2 对肿瘤细胞的增殖抑制作用

肿瘤细胞	IC ₅₀ (μM)
U87MG	11.7 μM
T98G	9.4 μM
U251	14.3 μM
SK-N-SH	11.4 μM
A172	4.7 μM
HepG2	10.1 μM
CT26.WT	7.1 μM
CHO-K1	~100 μM

实施例 3 AChE 抑制剂和 VGCC 阻断剂对 T98 细胞空泡化表型的影响

1 材料和方法

1.1 细胞

人脑胶质瘤细胞系 T98G 购自于南京科佰生物科技有限公司

1.2 试剂和耗材

名称	货号/批号	生产商
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Minimum Essential Medium	2192505	gibco
MEM NEAA (100×)	2216384	gibco

Sodium Pyruvate (100 mM)	2192495	gibco
Fetal Bovine Serum	2261480CP	gibco
0.05% Trypsin-EDTA	2192791	gibco
Pen Strep	2257223	gibco
12 孔板	191204-075	BioFIL
(-)-S2	D12-20161101-7	江苏欧威医药有限公司
硝苯地平	N7634	Sigma
地尔硫卓	20210815	南京康满林化工实业有限公司
维拉帕米	C13156635	上海麦克林生化科技有限公司
多奈哌齐	DT6821	Sigma
氟桂利嗪	AGN20-39525	上海凯为化学技术有限公司
DMSO	21020207	TEDIA

1.3 给药溶液的配制

待测药品包括：硝苯地平、维拉帕米、地尔硫卓、氟桂利嗪和多奈哌齐。

精密称取上述待测药品，用 DMSO 溶解，分别制备成浓度为 20 mM 的均一溶液，作为母液。

1.4 细胞培养及细胞表型观察

T98G 细胞稳定传代两次，待细胞密度达 85%以上，用 0.05% trypsin-EDTA 消化 3 分钟，培养基重悬细胞，以一定密度接种于 12 孔板中，每孔体系为 1 mL；培养 24 小时，按照分组情况分别每孔加入上述配制的化合物溶液，使培养体系中化合物浓度分别为：0.1 μM、1 μM、5 μM、20 μM。加入等体积的 DMSO 作为对照孔。

加药处理 6 小时后，显微镜 20×物镜下观察，若所观察视野中，细胞内出现边界清晰、明亮的空泡，并且至少符合下列条件中任意一条：1) 至少含有 1 个直径大于 3 μm 的空泡；2) 含有 3 个以上直径大小在 0.5~3 μm 范围内的空泡；则认定为巨泡式死亡阳性细胞。

2 实验结果

2.1 钙通道抑制剂（VGCC）未能诱导肿瘤细胞空泡化

钙通道抑制剂硝苯地平、维拉帕米、地尔硫卓、氟桂利嗪（最高药物浓度 20 μM）均未能诱导人胶质瘤细胞系 T98G 出现空泡化细胞表型（图 3）。

5

2.2 胆碱酯酶（AChE）抑制剂未能诱导肿瘤细胞空泡化

胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐（最高药物浓度 20 μM）未能诱导人胶质瘤细胞系 T98G 出现空泡化细胞表型（图 4）。

10 2.3 钙通道抑制剂联合胆碱酯酶抑制剂未能诱导肿瘤细胞空泡化

钙通道抑制剂硝苯地平或维拉帕米（20 μM）与胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐（20 μM）联合应用均未能诱导人胶质瘤细胞系 T98G 出现空泡化细胞表型（图 5）。

实施例 4 S2 在 U87MG-Luc 胶质母细胞瘤细胞裸鼠原位移植瘤模型上的药效研究试验

15 1 材料和方法

1.1 实验动物

BALB/c Nude 裸鼠，雄性，SPF 级，体重 20-22 g，上海灵畅生物科技有限公司。

1.2 试剂和耗材

20 本实验中的主要试剂信息如下表：

名称	货号/批号	生产商
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Minimum Essential Medium	2192505	gibco
MEM NEAA(100×)	2216384	gibco
Sodium Pyruvate(100 mM)	2192495	gibco
Fetal Bovine Serum	2261480CP	gibco
0.05% Trypsin-EDTA	2192791	gibco
DMSO	21020207	TEDIA
双抗	2257223	gibco

0.9%氯化钠注射液	1903224C	安徽双鹤药业有限责任公司
(-)-S2	D12-20161101-7	江苏欧威医药有限公司
替莫唑胺（TMZ）	B1828132	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
Solutol HS-15（Kolliphor HS-15）	09362556P0	上海昌为医药辅料技术有限公司
乙醇	20180419	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖	20161219	国药集团化学试剂有限公司
异氟烷	21101001	瑞沃德生命科技有限公司

1.3 实验设备

本实验中的主要设备信息如下表：

设备名称	制造商	型号	仪器编号
分析天平	Mettler toledo	XA105	OW020004
电子称	常熟市双杰测试仪器厂	T1000 型	N/A
小动物活体成像仪	PE	IVIS Lumina XR	N/A
立体定位仪	Stoelting	/	N/A
一次性无菌注射器	上海米沙瓦医科工业有限公司	1 mL	N/A

5 1.4 给药制剂配制

S2

溶剂：5%乙醇+0.8% Solutol+5%葡萄糖

配制方法：取适量 S2，按比例加入无水乙醇超声溶解，按比例加入 Solutol HS-15 超声混匀（观察没有一丝一缕现象），超声过程中缓慢加入纯化水溶解后，按比例加入葡萄糖，

10 超声溶解即得溶液，溶液放置 4℃避光保存。

1.5 实验方法

1.5.1 U87MG-Luc 胶质母细胞瘤细胞裸鼠原位移植瘤模型制备

U87MG-Luc 细胞接种前 0.05%-trypsin-EDTA 消化细胞，并使用预冷的 PBS 重悬至 4×10^7 cell/mL，转移到置于冰上备用；裸鼠用异氟烷气体麻醉，而后将麻醉后动物俯卧位固定于立体定位仪上，用碘伏消毒裸鼠头皮，手术刀矢状切开裸鼠头皮，用碘伏清洁切口，暴露颅骨，延前凶前 1.0 mm，旁开右侧 2.0 mm，用颅骨钻打孔；用 10 μ L 平头微量注射器手动注射 5 μ L 细胞悬液 (2×10^5 个细胞)，进针深度 3.5 mm，退针 0.5 mm，注射时间约 10 分钟。停针 5 分钟后，缓慢拔针，消毒缝合切口，最后肌肉注射 5 万单位青霉素预防感染。

1.5.2 动物分组与给药

本次实验共分为 5 组，分别为模型组、TMZ 组、S2 给药组-LD (0.25 mg/kg)、S2 给药组-MD (0.5 mg/kg)、S2 给药组-HD (1 mg/kg)。将造模后的动物，机率均等单盲分入各组。接种后第 5 天始，每天静脉给药一次，持续 15 天。模型组每天静脉给溶剂一次，持续 15 天。

1.5.3 脑内肿瘤细胞活体成像

分别于接种第 4、12、18、25 天，腹腔注射 200 μ L 15 mg/mL D-荧光素钾盐溶液（溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌），10 分钟后利用小鼠活体成像系统（PE 公司 IVIS Lumina XR）进行 IVI 化学发光检测（明场+生物发光成像）。利用 Living Image 软件进行荧光强度分析，得到荧光强度[p/s]，以此数据体现肿瘤组织在实验动物脑内的大小。

1.5.4 动物生存期记录

检测实验动物的生存状态，及时记录动物的死亡日期。

1.6 数据统计分析

定量资料表示为均值 $\pm$ 标准误，各药效指标采用 GraphPad Prism (8.0.1) 软件作图和单因素方差分析 (one-way ANOVA) 或双因素重复测量 (two-way repeat ANOVA) 再采用 Fisher's LSD test 检验组间差异，和 Kaplan-Meier 生存分析。将 $P < 0.05$ 定义为具有显著性差异。

2 实验结果

2.1 S2 抑制裸鼠脑内原位移植 U87MG 胶质瘤生长

与溶剂组相比，S2 给药组-MD（0.5 mg/kg，IV）和 S2 给药组-HD（1 mg/kg,IV）均能显著抑制脑内 U87MG 原位肿瘤生长（图 6 A 和 B）。在给药两周后，与溶剂组相比，S2 给药组-MD（0.5 mg/kg，IV）和 S2 给药组-HD（1 mg/kg，IV）表现出显著地肿瘤生长抑制作用，其中 S2 给药组-HD（1mg/kg，IV）肿瘤抑制作用最强（图 7 A 和 B）。

2.2 S2 延长脑原位移植胶质瘤裸鼠的生存期

经生存曲线 Log-rank 分析，与溶剂组相比，S2 给药组-MD（0.5 mg/kg，IV）和 S2 给药组-HD（1 mg/kg，IV）显著延长 U87MG 脑原位癌小鼠的生存率（图 8），延长中位生存期和总体生存期（表 4）。

表 4 S2 延长 U87MG 脑原位癌小鼠生存期

生存期	Vehicle	S2 0.25 mg/kg	S2 0.5 mg/kg	S2 1 mg/kg
中位生存期（天）	31.5	32.5	33.5	35
总生存期（天）	31	32	33	36

实施例 5 S2 联合替莫唑胺（TMZ）在 U87MG-Luc 胶质母细胞瘤细胞裸鼠原位移植瘤模型上的药效研究试验

1 材料和方法

1.1 实验动物

同实施例 4。

1.2 试剂和耗材

同实施例 4。

1.3 实验设备

同实施例 4。

1.4 给药制剂配制

5 a) S2

溶剂：5%乙醇+0.8% Solutol+5%葡萄糖

配制方法：取适量 S2，按比例加入无水乙醇超声溶解，按比例加入 Solutol HS-15 超声混匀（观察没有一丝一缕现象），超声过程中缓慢加入纯化水溶解后，按比例加入葡萄糖，超声溶解即得溶液，溶液放置 4 °C 避光保存。

10 b) TMZ

溶剂：0.9 %氯化钠注射液

配制方法：称取适量 TMZ，按比例加入 0.9 %氯化钠注射液稀释，摇晃至混合均匀，溶液-20 °C 保存。

15 1.5 实验方法

1.5.1 U87MG-Luc 胶质母细胞瘤细胞裸鼠原位移植瘤模型制备

同实施例 4。

1.5.2 动物分组与给药

20 本次实验共分为 4 组，分别为模型组、TMZ（3 mg/kg）组、S2+TMZ 联合给药组-LD（TMZ 3 mg/kg 和 S2 0.25 mg/kg）、S2+TMZ 联合给药组-MD（TMZ 3 mg/kg 和 S2 0.5 mg/kg）和 S2+TMZ 联合给药组-HD（TMZ 3 mg/kg 和 S2 1 mg/kg）。将造模后的动物，机率均等单盲分入各组。接种后第 8 天始，TMZ：第 8 天和第 15 天腹腔给药 2 次；S2：每天静脉给药一次，持续 15 天。

25 1.5.3 脑内肿瘤细胞活体成像

分别于接种第 7、14、21 天，腹腔注射 200 μ L 15 mg/mL D-荧光素钾盐溶液（溶液经 0.22 μ m 滤膜过滤除菌），10 分钟后利用小鼠活体成像系统（PE 公司 IVIS Lumina XR）进行 IVI 化学发光检测（明场+生物发光成像）。利用 Living Image 软件进行荧光强度分析，得到荧光强度 [p/s]，以此数据体现肿瘤组织在实验动物脑内的大小。

1.5.4 动物生存期记录

检测实验动物的生存状态，及时记录动物的死亡日期。

5 1.6 数据统计分析

定量资料表示为均值±标准误，各药效指标采用 GraphPad Prism（8.0.1）软件作图和单因素方差分析（one-way ANOVA）或双因素重复测量（two-way repeat ANOVA）再采用 Fisher’s LSD test 检验组间差异，和 Kaplan-Meier 生存分析。将 $P < 0.05$ 定义为具有显著性差异。

10 2 实验结果

2.1 S2+TMZ 联合用药对裸鼠脑内 U87MG 胶质瘤生长的影响

与溶剂组相比，TMZ（3 mg/kg，IP）单独给药和 TMZ+S2（0.25、0.5 和 1 mg/kg IV）联合给药均能显著抑制脑内 U87MG 原位肿瘤生长（图 9 A 和 B）。在给药 2 周后（第 21 天），与 TMZ 相比，S2+TMZ 联合给药组的肿瘤生长抑制作用更强，其中 S2（0.5 mg/kg）+TMZ 联合给药组肿瘤抑制作用显著优于 TMZ 组（图 10 A 和 B）。

2.2 S2+TMZ 联合用药对脑原位胶质瘤裸鼠生存的影响

经生存曲线 Log-rank 分析，与溶剂组相比，TMZ（3 mg/kg，IP）单独给药和 TMZ+S2（0.25、0.5 和 1 mg/kg IV）联合给药组小鼠的生存时间有显著性差异。与 TMZ 单独用药相比，S2（0.5 mg/kg）+TMZ 联合用药和 S2（1 mg/kg）+TMZ 显著延长 U87MG 脑原位瘤小鼠的生存率（图 11），延长中位生存期和总体生存期（表 5）。

表 5 S2+TMZ 联合用药延长 U87MG 脑原位瘤小鼠生存期

生存期	Vehicle	TMZ 3 mg/kg	TMZ+ S2 0.25 mg/kg	TMZ+ S2 0.5 mg/kg	TMZ+ S2 1 mg/kg
中位生存期（天）	30	33.5	32	35	36
总生存期（天）	33	35	36	37	38

实施例6 S2对人脑胶质瘤T98G在NOD SCID小鼠皮下模型上的体内药效学研究

1 方法和材料

5 1.1 实验动物

NOD SCID, 雌性, 6-8 周龄, 体重 18-21 克。北京维通利华实验动物技术有限公司

1.2 受试药品

替莫唑胺 (TMZ), 上海阿拉丁生化科技股份有限公司, 批号: B1828132。

10 S2, 江苏欧威医药有限公司, 批号: D12-20161101-7。

1.3 给药制剂配制

TMZ (1.5 mg/mL) 配制方法: 称取 18 mg 的 Temozolomide, 溶解于 12 mL 的 1% HPMC 中。

15 S2 给药制剂配制方法同实施例 4。

1.4 实验方法

1.4.1 T98G 胶质母细胞瘤细胞裸鼠皮下移植瘤模型制备

人脑胶质瘤 T98G 细胞体外培养, 培养条件为 EMEM 培养基中加 10% 胎牛血清, 100
20 U/mL 青霉素和 100 μ g/mL 链霉素, 37°C 5% CO₂ 孵箱培养。待细胞数量达到要求后, 收取
细胞。将 0.2 mL (10×10^6 个) T98G 肿瘤细胞 (PBS: 基质胶=1:1) 皮下接种于每只小鼠的
右后背, 肿瘤平均体积达到约 147 mm³ 时开始分组给药。

1.4.2 动物分组与给药

25 第一组实验共分为两组, 分别为: 溶剂组、TMZ 组 (15 mg/kg, PO); 将造模后的动物
动物均等单盲分入各组, 每组 10 只。

第二组实验共分为两组, 分别为: 溶剂组、S2 组 (3 mg/kg, IV); 将造模后的动物均
动物均等单盲分入各组, 每组 9 只。

1.4.3 肿瘤大小的测量

每周两次用游标卡尺测量肿瘤直径，在实验结束后称量肿瘤重量并拍照。

1.5 数据统计肿瘤体积的计算公式为： $V = 0.5a \times b^2$ ，a 和 b 分别表示肿瘤的长径和短

5 径。

抑瘤疗效用 TGI (%) 或相对肿瘤增殖率 T/C (%) 评价。

抑瘤疗效用 TGI (%) 的计算： $TGI\% = [1 - (\text{某处理组给药结束时平均瘤体积} - \text{该处理组开始给药时平均瘤体积}) / (\text{溶剂对照组治疗结束时平均瘤体积} - \text{溶剂对照组开始治疗时平均瘤体积})] \times 100$ 。

10 相对肿瘤增殖率 T/C (%)： $T/C\% = TRTV / CRTV \times 100$ (TRTV: 治疗组 RTV; CRTV: 阴性对照组 RTV)。根据肿瘤测量的结果计算出相对肿瘤体积(relative tumor volume, RTV)，计算公式为 $RTV = V_t / V_0$ ，其中 V_0 是分组给药时 (即 d_0) 测量所得平均肿瘤体积， V_t 为某一次测量时的平均肿瘤体积， T_{RTV} 与 C_{RTV} 取同一天数据。

15 统计分析基于实验结束时每组肿瘤体积的平均值和标准误 (SEM)。两组间比较用 T-test 进行分析。用 GraphPad Prism (8.0.1) 进行所有数据分析， $P < 0.05$ 认为有显著性差异。

2 实验结果

2.1 TMZ 对 T98 肿瘤生长和实验终点肿瘤重量的影响

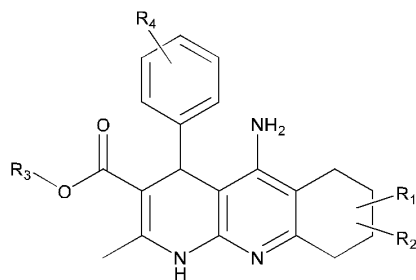
20 与溶剂组相比，TMZ 15 mg/kg 组对肿瘤体积增长没有抑制作用 (图 12 A-C)。实验终点采集肿瘤并称重，TMZ 15 mg/kg 组肿瘤重量与对照组无明显差异 (图 12 D)，与上述肿瘤体积抑制情况一致。

2.2 S2 对 T98 肿瘤生长和实验终点肿瘤重量的影响

25 与溶剂组相比，S2 3 mg/kg 组显著抑制肿瘤体积增长 (图 13 A-C)。实验终点采集肿瘤并称重，S2 3 mg/kg 组肿瘤重量显著低于对照组 (图 13 D)，与上述肿瘤体积抑制情况一致。

权 利 要 求

1、一类如式 I 所示 1, 4-二氢-萘啶衍生物或其药学上可接受的盐在制备治疗肿瘤药物中的应用，



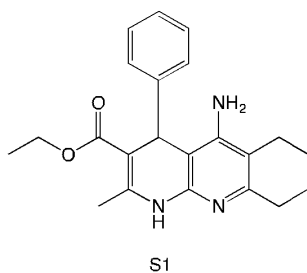
式 I

其中，R1 或 R2 为氢、卤素或 C1-C6 烷基；

R3 选自 C1-C6 烷基，所述烷基中任意-CH2-可被一个或两个以上的-O-置换；

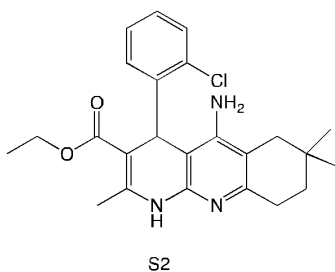
R4 为氢、卤素。

2、1, 4-二氢-萘啶衍生物或其药学上可接受的盐在制备治疗肿瘤药物中的应用，其特征在于，所述化合物选自：



S1

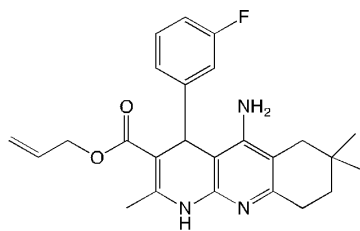
化合物 1：如 S1 所示；



S2

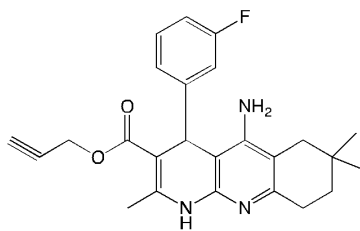
化合物 2：如 S2 所示；

22



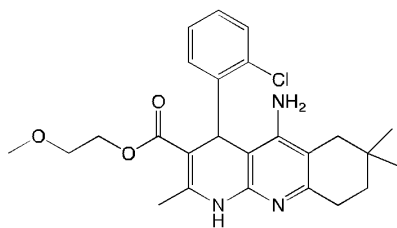
S3

化合物 3: 如 S3 所示;



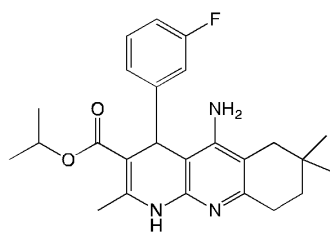
S4

化合物 4: 如 S4 所示;



S5

化合物 5: 如 S5 所示;



S6

化合物 6: 如 S6 所示。

- 10 3、根据权利要求 2 所述的应用, 其特征在于, 所述 1, 4-二氢-萘啉衍生物在治疗实体瘤中的应用。

- 4、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗神经系统肿瘤中的应用。
- 5、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗脑瘤中的应用。
- 5 6、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗神经胶质瘤中的应用。
- 7、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗胶质母细胞瘤中的应用。
- 8、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物在治疗肝癌、结肠癌和胃癌中的应用。
- 10 9、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物与替莫唑胺联合治疗神经胶质瘤中的应用。
- 10、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述 1, 4-二氢-萘啶衍生物与放疗联合治疗神经胶质瘤中的应用。