

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202491634 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.12

(51) Int. Cl. A61K 31/4375 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2022.11.21

(54) ПРИМЕНЕНИЕ КЛАССА 1,4-ДИГИДРО-НАФТИРИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ

(31) 202111599362.3

(72) Изобретатель:

(32) 2021.12.24

Чжан Чжэнпин, Ли Фулун, Ван Лэй,  
Чэнь Жун, Ян Вэйдун, Фан Фан, Ань  
Вэньци, Хуа Яо, Фэн Линь (CN)

(33) CN

(86) PCT/CN2022/133165

(87) WO 2023/116304 2023.06.29

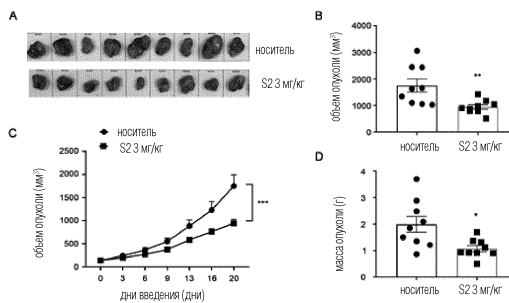
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

Медведев В.Н. (RU)

НЬЮРОДОН ФАРМАСЬЮТИКАЛ  
КО., ЛТД. (CN)

(57) Настоящее изобретение относится к применению класса 1,4-дигидро-нафтиридиновых производных в лечении опухолей.



202491634

A1

A1

202491634

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-581537EA/085

### ПРИМЕНЕНИЕ КЛАССА 1,4-ДИГИДРО-НАФТИРИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет китайской патентной заявки № 202111599362.3, поданной в Национальное управление интеллектуальной собственности Китая 24 декабря 2021 г. и озаглавленной «ПРИМЕНЕНИЕ КЛАССА 1,4-ДИГИДРОНАФТИРИДИНОВЫХ ПРОИЗВОДНЫХ В ЛЕЧЕНИИ ОПУХОЛЕЙ», которая включена в настоящую заявку посредством ссылки во всей полноте.

#### **Область техники, к которой относится изобретение**

[0002] Настоящее изобретение относится к области фармацевтики и касается нового применения производного 1,4-дигидронафтиридина, более конкретно, применения производного 1,4-дигидронафтиридина для получения лекарственного средства для лечения опухоли. Опухоль представляет собой солидную опухоль, включая опухоли нервной системы и опухоли, не относящиеся к нервной системе. Опухоли нервной системы включают глиобластому, нейробластому и т.д., а опухоли, не относящиеся к нервной системе, включают рак печени, рак толстой кишки, рак желудка и т.д.

#### **Предпосылки создания изобретения**

[0003] Глиобластома (GBM) является наиболее распространенной злокачественной первичной внутричерепной опухолью, на ее долю приходится примерно 57% всех глиом и 48% всех первичных злокачественных опухолей центральной нервной системы (ЦНС) (Neuro-oncology, 2018. 20: p. iv1-iv86). Смертность от глиобластомы чрезвычайно высока. В США годовая выживаемость пациентов с глиобластомой с 2000 по 2014 год составляла 41,4%, а 5-летняя выживаемость составляла всего 5,8% (CA: a cancer journal for clinicians, 2020. 70(4): p. 299-312). Причина глиобластомы до сих пор плохо изучена; единственным известным возможным причинным фактором является ионизирующее излучение. Это также создает определенные проблемы для профилактики и лечения глиобластомы.

[0004] По степени злокачественности глиобластома можно разделить на I-IV степени. Из них к I и II относятся глиомы низкой злокачественности, а к III и IV относятся глиомы высокой злокачественности. Методы лечения глиобластомы в основном включают хирургическую резекцию, лучевую терапию и системную терапию (химиотерапию, таргетную терапию). Среди них послеоперационная терапия темозоломидом совместно с лучевой терапией в комбинации с адъювантной химиотерапией стала стандартной схемой лечения впервые диагностированной глиобластомы. Помимо темозоломида, основные химиотерапевтические препараты, применяемые в настоящее время, включают препараты на основе нитрозомочевины, прокарбазин, препараты на основе платины, винбластиновые препараты и камптотециновые препараты. Однако механизм противоопухолевого действия традиционных химиотерапевтических препаратов не может удовлетворить сегодняшние клинические потребности.

[0005] В эукариотических клетках макропиноцитоз является важным путем

интернализации внеклеточных веществ и растворения молекул клетками. Процесс макропиноцитоза имеет двоякий эффект на опухолевые клетки. В случае дефицита питательных веществ опухолевые клетки могут интернализировать внеклеточные питательные вещества через путь макропиноцитоза, в результате происходит промотирование роста опухолевых клеток. Однако чрезмерная активация процесса макропиноцитоза посредством медикаментозного лечения или аномальной экспрессии гена RAS может индуцировать новый тип гибели: метуоз. Метуоз является новой протеасома-независимой формой гибели клеток, характеризующейся заполнением цитоплазмы большим количеством вакуолей, происходящих из макропиноцитосом. Эта форма гибели была впервые обнаружена в клетках глиобластомы (Oncogene, 1999. 18(13): p. 2281-90). Дальнейшие исследования показали, что эта форма гибели запускается изменениями в макропиноцитосомах, которые независимы от клатрина, что в конечном итоге приводит к образованию большого количества вакуолей, вызывая разрушение и гибель клеток (Journal of medicinal chemistry, 2012. 55(5): p. 1940-56). Текущие исследования показали, что в образовании макропиносом участвуют различные молекулы, в том числе Ras, Rac1, Arf6, Rab7 и т.д. (The American journal of pathology, 2014. 184(6): p. 1630-42). Rac1 может влиять на образование макропиноцитосом, регулируя сборку актина. Кроме того, активация Rac1 может снижать активированный Arf6 посредством GIT-1, тем самым препятствуя циркуляции макропиноцитосом (Molecular cancer research: MCR, 2010. 8(10): p. 1358-74). В последние годы было обнаружено, что некоторые низкомолекулярные соединения индуцируют метуоз клеток путем активации таких механизмов, как MKK4, JNK и Rac1, включая метамфетамин, индолилхалкон, вакинол-1, MOMPP, CX-5011 и т.д. (Oncotarget 2016, 7, 55863-55889; BMC cancer 2019, 19, 77; BBA-Molecular Cell Research 2020, 118807).

[0006] 1,4-дигидронафтиридиновые производные представляют собой соединения, которые могут ингибировать активность ацетилхолинэстеразы и блокировать приток внеклеточных кальциевых ионов в клетки через кальциевые каналы. Путем ингибирования активности холинэстеразы 1,4-дигидронафтиридиновые производные могут замедлять скорость гидролиза ацетилхолина, повышать уровень ацетилхолина в синаптической щели и достигать эффекта лечения болезни Альцгеймера и сосудистой деменции (патенты Китая №№ CN104203945B и CN106632317A). Кроме того, путем ингибирования притока кальциевых ионов 1,4-дигидронафтиридиновые производные могут повышать устойчивость нервных клеток к ишемии, расширять церебральные кровеносные сосуды и улучшать кровоснабжение головного мозга, защищать нейроны и эффективно улучшать когнитивную функцию у пациентов с сосудистой деменцией.

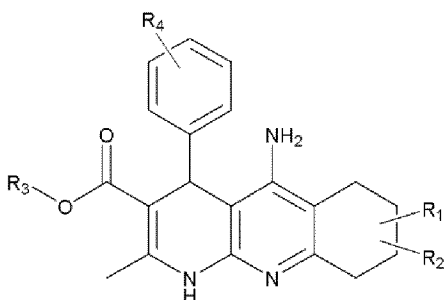
### **Сущность изобретения**

[0007] 1,4-дигидронафтиридиновые производные представляют собой соединения, которые могут ингибировать активность ацетилхолинэстеразы и блокировать приток внеклеточных кальциевых ионов в клетки через кальциевые каналы, которые можно использовать для лечения болезни Альцгеймера и сосудистой деменции. Такие соединения могут индуцировать метуоз опухолевых клеток через новый механизм действия, который

не опирается на ингибирование холинэстеразы и блокирование кальциевых каналов, проявляя таким образом противоопухолевые эффекты.

[0008] Целью настоящего изобретения является обеспечение лекарственного средства, которое может лечить опухоли через новый механизм и эффективно продлевать период выживания пациентов. Лекарственное средство представляет собой 1,4-дигидронафтиридиновое производное или его фармацевтически приемлемую соль.

[0009] В частности, настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного, представленного формулой I, или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения опухоли,



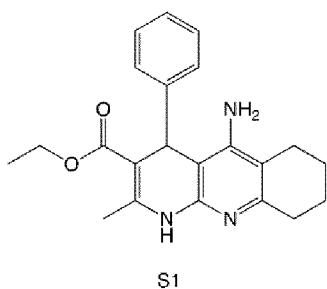
#### Формула I

где  $R_1$  или  $R_2$  представляет собой водород, галоген или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

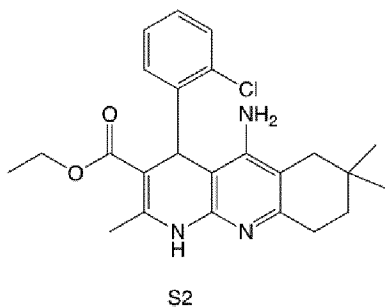
$R_3$  выбран из  $C_1$ - $C_6$  алкила, где любая группа  $-CH_2-$  в алкиле может быть замещена одним или несколькими  $-O-$ ;

$R_4$  представляет собой водород или галоген.

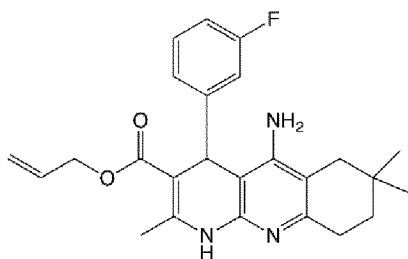
[0010] В частности, производное выбрано из группы, состоящей из:



Соединения 1, представленного как S1;

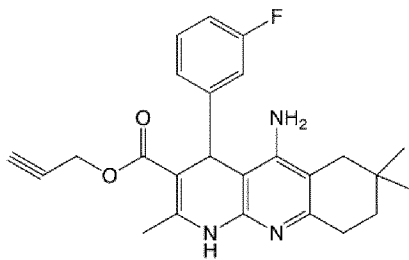


Соединения 2, представленного как S2;



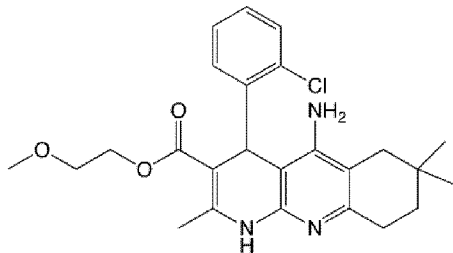
S3

Соединения 3, представленного как S3;



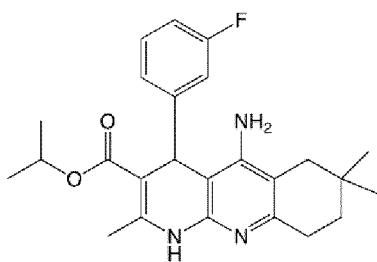
S4

Соединения 4, представленного как S4;



S5

Соединения 5, представленного как S5; и



S6

Соединения 6, представленного как S6.

[0011] Представленные выше соединения индуцируют метуоз опухолевых клеток, вызывают вакуолизированный клеточный фенотип, ингибируют пролиферацию опухолевых клеток и проявляют функцию ингибирования роста опухоли, достигая в результате цели лечения опухолей.

[0012] Поэтому настоящее изобретение обеспечивает новое применение 1,4-дигидронафтиридинового производного, или его фармацевтически приемлемой соли, или

фармацевтической композиции, включающей такое соединение, для получения лекарственного средства для лечения опухоли.

[0013] Опухоль представляет собой солидную опухоль, включая опухоли нервной системы и опухоли, не относящиеся к нервной системе. Опухоли нервной системы включают глиобластому, нейробластому и т.д., а опухоли, не относящиеся к нервной системе, включают рак печени, рак толстой кишки, рак желудка и т.д.

[0014] В частности, настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении солидной опухоли.

[0015] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении опухоли нервной системы.

[0016] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении опухоли головного мозга.

[0017] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении глиомы.

[0018] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении глиобластомы.

[0019] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в лечении рака печени, рака толстой кишки и рака желудка.

[0020] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в комбинации с темозоломидом в лечении глиомы.

[0021] Настоящее изобретение обеспечивает применение 1,4-дигидронафтиридинового производного в комбинации с лучевой терапией в лечении глиомы.

[0022] Преимущества и положительные эффекты настоящего изобретения:

[0023] В качестве нового лекарственного средства для лечения опухолей производное 1,4-дигидро-нафтиридина, обеспечиваемое настоящим изобретением, является лекарственным средством, которое специфически индуцирует метуоз опухолевых клеток, которое оказывает незначительное влияние на нормальные клетки и является подходящим для разработки безопасных и эффективных лекарственных средств для лечения опухолей.

#### **Краткое описание чертежей**

[0024] Фиг. 1 показывает, что производные 1,4-дигидронафтиридина индуцировали фенотип вакуолизации в клетках T98;

[0025] Фиг. 2 показывает, что S2 индуцировал вакуолизацию в различных опухолевых клетках;

[0026] Фиг. 3 показывает, что ингибиторы кальциевых каналов не индуцировали вакуолизацию опухолевых клеток;

[0027] Фиг. 4 показывает, что ингибиторы холинэстеразы не индуцировали вакуолизацию опухолевых клеток;

[0028] Фиг. 5 показывает, что ингибиторы кальциевых каналов в комбинации с ингибиторами холинэстеразы не индуцировали вакуолизацию опухолевых клеток;

[0029] Фиг. 6 показывает эффект введения S2 в течение 2 недель на кривую роста глиомы U87MG в головном мозге бестимусных мышей;

[0030] Фиг. 7 показывает, что введение S2 в течение 2 недель ингибировало рост глиомы U87MG в головном мозге бестимусных мышей;

[0031] Фиг. 8 показывает, что S2 продлевал период выживания бестимусных мышей с ортотопически трансплантированной глиомой головного мозга;

[0032] Фиг. 9 показывает эффект комбинированного лечения S2+TMZ в течение 2 недель на кривую роста глиомы U87MG в головном мозге бестимусных мышей;

[0033] Фиг. 10 показывает эффект комбинированного лечения S2+TMZ в течение 2 недель на рост интрацеребральной глиомы;

[0034] Фиг. 11 показывает, что комбинированное лечение S2+TMZ продлеvalo период выживания мышей с карциномой головного мозга U87MG in situ;

[0035] Фиг. 12 показывает, что TMZ не мог ингибировать рост глиомы T98 и не мог уменьшать объем и массу солидных опухолей;

[0036] Фиг. 13 показывает, что S2 ингибировал рост глиомы T98 и уменьшал объем и массу солидных опухолей.

### Подробное описание изобретения

[0037] Следующие примеры иллюстрируют настоящее изобретение и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

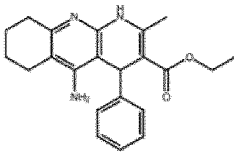
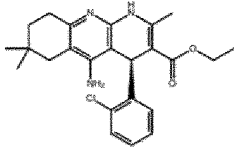
**[0038] Пример 1 Исследование эффектов индукции вакуолизации и ингибирования пролиферации, оказываемых 1,4-дигидронафтиридиновыми производными на клетки глиобластомы**

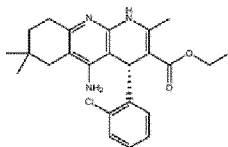
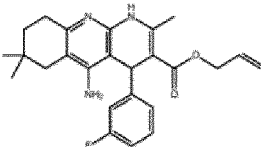
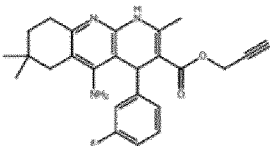
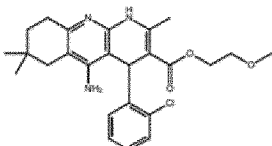
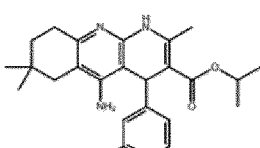
[0039] 1 Материалы и методы

[0040] 1.1 Клетки

[0041] Клетки T98G линии клеток глиомы нервных клеток человека приобретали у Nanjing Cobioer Biotechnology Co., Ltd.

[0042] 1.2 Номер и структура производных 1,4-дигидронафтиридина

Номер соединения	Структура
S1	
(+)-S2	

(-)-S2	
S3	
S4	
S5	
S6	

[0043] 1.3 Получение раствора соединения

[0044] Отвешивали определенное количество соединения для испытания и растворяли в DMSO с получением однородного раствора с конечной концентрацией 100 мМ.

[0045] 1.4 Реагенты и расходные материалы

Название	Кат. №/№ партии	Изготовитель
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Минимальная питательная среда	2192505	gibco
MEM NEAA(100×)	2216384	gibco
Пируват натрия(100 мМ)	2192495	gibco
Фетальная бычья сыворотка	2261480CP	gibco
0,05% Трипсина-EDTA	2192791	gibco
DMSO	21020207	TEDIA
Пен./Стреп.	2257223	gibco
12-луночный планшет	191204-075	BioFIL
96-луночный планшет	24820030	Corning

[0046] 1.5 Клеточная культура и наблюдаемый клеточный фенотип

[0047] Клетки T98G стабильно пассировали два раза. Когда плотность клеток достигала более 85%, клетки расщепляли 0,05% трипсином-EDTA в течение 3 минут, ресуспендировали в культуральной среде и высевали в 12-луночный планшет с определенной плотностью, причем каждая луночная система составляла 1 мл. Клетки культивировали в течение 24 часов и добавляли раствор соединения, полученный, как



указано выше, в каждую лунку в соответствии с группированием, чтобы концентрации соединений в культуральной системе составляли соответственно 5 мкМ, 10 мкМ, 20 мкМ, 40 мкМ и 60 мкМ. В контрольную лунку добавляли равный объем DMSO.

[0048] После 6 часов обработки лекарственным средством планшеты осматривали под микроскопом с линзой объектива 20× и для каждой лунки случайным образом выбирали пять полей обзора для фотографирования и регистрации. Если в поле наблюдения в клетке появились яркие вакуоли с четкой границей и при соблюдении по меньшей мере одного из следующих условий: 1) клетка содержала по меньшей мере 1 вакуоль диаметром более 3 мкм; 2) клетка содержала 3 и более вакуолей диаметром в пределах 0,5-3 мкм, клетка считалась метуоз-положительной клеткой.

[0049] Степень вакуолизации  $R$  (%) =  $\frac{\text{КЛЕТКИ}_{\text{положительные}}}{(\text{КЛЕТКИ}_{\text{нормальные}} + \text{КЛЕТКИ}_{\text{положительные}})} \times 100\%$

[0050] Из них КЛЕТКИ положительные: количество метуоз-положительных клеток; КЛЕТКИ нормальные: количество клеток с нормальной морфологией

[0051] Анализ ингибирования пролиферации клеток 1.6

[0052] Т98G клетки стабильно пассировали два раза. Когда плотность клеток достигала более 85%, клетки расщепляли 0,05% трипсином-EDTA в течение 3 минут, ресуспендировали, высевали в 96-луночный планшет при соответствующей плотности и культивировали в течение 24 часов. Клетки обрабатывали лекарственными средствами при конечных концентрациях системы культивирования 0,41 мкМ, 1,23 мкМ, 3,7 мкМ, 11,1 мкМ, 33,3 мкМ и 100 мкМ, соответственно. После 72 часов обработки лекарственным средством жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellCounting-Lite™ 2.0. В планшет добавляли реагенты при 100 мкл/лунка в соответствии с инструкциями к набору CellCounting-Lite™ 2.0 и встряхивали в течение 10 минут. Значение люминесценции (LUM) считывали на многофункциональном планшет-ридере и рассчитывали относительную жизнеспособность клеток.

[0053] Относительная жизнеспособность опухолевых клеток  $V$  (%) =  $\frac{\text{LUM} - \text{LUM}_{\text{фон}}}{(\text{LUM}_{\text{нормальный контроль}} - \text{LUM}_{\text{фон}})} \times 100\%$ . LUM фон означает фоновое значение лунки с полной культуральной средой, в которую был добавлен реагент для детекции. Полуингибирующую концентрацию (IC<sub>50</sub>) рассчитывали с использованием статистической программы GraphPad Prism 8.0.1.

[0054] 2 Результаты эксперимента

[0055] 2.1 Производные 1,4-дигидронафтиридина индуцируют вакуолизацию в клетках Т98G

[0056] S1, S2 (включая (+)-S2 и (-)-S2), S3, S4, S5 и S6 могут индуцировать вакуолизацию в Т98 (Фиг. 1 и Таблицу 1), где S1 обладает самой слабой индуцирующей вакуолизацию активностью, а S2 обладает самой сильной индуцирующей вакуолизацию активностью.

Таблица 1

Количественный анализ вакуолизации в клетках Т98G, индуцированной 1,4-

дигидронафтиридиновыми производными

Соединение	Степень вакуолизации (%)			
	5 мкМ	10 мкМ	20 мкМ	40 мкМ
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

[0057] Данные в таблице выражены в виде среднего значения±SD; “-” означает, что соединение осаждалось, и данные не были рассчитаны.

[0058] 2.2 Производные 1,4-дигидронафтиридина ингибируют пролиферацию клеток T98G

[0059] Производные 1,4-дигидронафтиридина могут ингибировать пролиферацию нервных опухолевых клеток T98G. Значение IC<sub>50</sub> активности, направленной на ингибирование пролиферации опухоли, показано в Таблице 2. Ингибирующая пролиферацию активность S1 является слабой, что в принципе согласуется с активностью индукции вакуолизации.

Таблица 2

Ингибиторная активность соединений в отношении пролиферации клеток T98G

Соединение	IC <sub>50</sub>
S1	47,8 мкМ
(+)-S2	5,3 мкМ
(-)-S2	9,8 мкМ
S3	7,0 мкМ
S4	12,7 мкМ
S5	4,5 мкМ
S6	20,5 мкМ

[0060] **Пример 2 Исследование ингибиторной активности S2 в отношении пролиферации опухолевых клеток *in vitro***

[0061] 1 Материалы и методы

[0062] 1.1 Клетки

[0063] Клеточную линию глиомы головного мозга человека U87MG, клеточную линию глиомы головного мозга человека T98G и клеточную линию глиомы головного мозга человека U251 приобретали у Nanjing Cobioer Biotechnology Co., Ltd.; клеточную

линию глиомы головного мозга человека A172, клетки нейробластомы человека SK-N-SH, клеточную линию рака печени человека HepG2, клеточную линию рака толстой кишки мыши CT26.WT и сублинию клеток яичника китайского хомячка CHO-K1 приобретали у Wuhan Procell Biotechnology Co., Ltd.

[0064] 1.2 Реагенты и расходные материалы

Название	Кат. №/№ партии	Изготовитель
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Минимальная питательная среда	2192505	gibco
MEM NEAA (100×)	2216384	gibco
Пируват натрия (100 мМ)	2192495	gibco
Фетальная бычья сыворотка	2261480CP	gibco
0,05% Трипсин-EDTA	2192791	gibco
Пен./Стреп.	2257223	gibco
CellCounting-Lite™ 2.0	DD1101-02	Vazyme
96-луночный планшет	24820030	Corning
6-луночный планшет	200421-074B	BioFIL
(-)-S2	D12-20161101-7	Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd.
DMSO	21020207	TEDIA

[0065] 1.3 Получение раствора лекарственного средства

[0066] Порошок S2 точно отвешивали и растворяли в DMSO с получением однородного раствора с концентрацией 100 мМ в качестве маточного раствора.

[0067] 1.4 Клеточная культура и наблюдаемый клеточный фенотип

[0068] Клетки U87MG, T98G, U251, SK-N-SH, A-172 и HepG2 адгезивно культивировали в среде MEM+10%FBS+1%P/S и пассировали в соотношении 1:3; Клетки CT26.WT адгезивно культивировали в среде RPMI-1640 + 10% FBS + 1% P/S и пассировали в соотношении 1:3; CHO-K1 культивировали в среде Хэма F-12K+10% FBS+1% P/S и пассировали в соотношении 1:3.

[0069] Клетки, использованные выше, восстанавливали и дважды стабильно пассировали. Когда плотность клеток достигала более 85%, клетки расщепляли 0,05% трипсином-EDTA в течение 3 минут, ресуспендировали в культуральной среде и высевали в 6-луночный планшет с определенной плотностью, причем каждая луночная система составляла 2 мл. Клетки культивировали в течение 24 часов, добавляя по 2 мкл приготовленного выше раствора S2 (конечная концентрация DMSO 0,1%) в каждую лунку в соответствии с группированием так, чтобы концентрация S2 в системе культуры клеток достигала 30 мкМ.

[0070] После 6 часов обработки лекарственным средством планшет рассматривали под микроскопом с линзой объектива 20× и для каждой лунки случайным образом выбирали пять полей зрения для фотографирования и записи. Если в клетке в наблюдаемом поле зрения появлялись яркие вакуоли с четкой границей и при соответствии по меньшей

мере одному из следующих условий: 1) клетка содержала по меньшей мере одну вакуоль диаметром более 3 мкм; 2) клетка содержала 3 и более вакуоли диаметром в пределах 0,5-3 мкм, клетка считалась метуоз-положительной клеткой (Journal of Medicinal Chemistry 2018 61 (12), 5424-5434).

[0071] Степень вакуолизации R (%) =  $\frac{\text{КЛЕТКИ}_{\text{положительные}}}{(\text{КЛЕТКИ}_{\text{нормальные}} + \text{КЛЕТКИ}_{\text{положительные}})} \times 100\%$

[0072] КЛЕТКИ<sub>положительные</sub>: количество метуоз-положительных клеток; КЛЕТКИ<sub>нормальные</sub>: количество клеток с нормальной морфологией

[0073] 1.5 Анализ жизнеспособности клеток

[0074] Указанные выше различные клетки восстанавливали и стабильно пассировали два раза. Когда плотность клеток достигала более 85%, клетки расщепляли 0,05% трипсином-EDTA в течение трех минут, ресуспендировали, высевали в 96-луночный планшет при соответствующей плотности и культивировали в течение 24 часов. Клетки обрабатывали лекарственными средствами при конечных концентрациях системы культивирования 0,41 мкМ, 1,23 мкМ, 3,7 мкМ, 11,1 мкМ, 33,3 мкМ и 100 мкМ. После 48 часов обработки лекарственными средствами жизнеспособность клеток определяли с использованием набора CellCounting-Lite™ 2.0. В планшет добавляли реагенты при 100 мкл/лунка в соответствии с инструкциями к набору CellCounting-Lite™ 2.0 и встряхивали в течение 10 минут. Значение люминесценции (LUM) считывали на многофункциональном планшет-ридере и рассчитывали относительную жизнеспособность клеток.

[0075] Относительная жизнеспособность опухолевых клеток V (%) =  $\frac{\text{LUM} - \text{LUM}_{\text{фон}}}{(\text{LUM}_{\text{нормальный контроль}} - \text{LUM}_{\text{фон}})} \times 100\%$ . LUM<sub>фон</sub> представляет собой фоновое значение в лунке с полной культуральной средой, в которую был добавлен реагент для детекции. Полуингибирующую концентрацию (IC<sub>50</sub>) рассчитывали с использованием статистической программы GraphPad Prism 8.0.1.

[0076] 2 Результаты эксперимента

[0077] 2.1 S2 индуцирует вакуолизацию опухолевых клеток

[0078] S2 может индуцировать вакуолизацию в нервных опухолевых клетках, таких как клеточные линии глиомы человека U87MG, T98G, U251 и A172, клеточная линия нейробластомы человека SK-N-SH (Фиг. 2A-D), а также может индуцировать вакуолизацию в опухолевых клетках, не относящихся к нервной системе (Фиг. 2 A-D), включая клетки рака печени человека HepG2 и клетки рака толстой кишки мыши CT26.WT. Однако S2 не мог индуцировать вакуолизацию в неопухолевой клеточной линии яичников хомячка CHO-K1.

[0079] 2.2 S2 ингибирует пролиферацию опухолевых клеток

[0080] S2 мог ингибировать пролиферацию опухолевых клеток нервной системы и опухолевых клеток, не относящихся к нервной системе, с IC<sub>50</sub> в диапазоне 4,7-14,3 мкМ, но имел очень слабый ингибирующий эффект на пролиферацию неопухолевых клеточных линий (IC<sub>50</sub> > 100 мкМ) (Таблица 3).

## Ингибирующий эффект S2 на пролиферацию опухолевых клеток

Опухолевые клетки	IC <sub>50</sub> (мкМ)
U87MG	11,7 мкМ
T98G	9,4 мкМ
U251	14,3 мкМ
SK-N-SH	11,4 мкМ
A172	4,7 мкМ
НерG2	10,1 мкМ
CT26.WT	7,1 мкМ
CHO-K1	□100 мкМ

[0081] **Пример 3 Эффекты ингибиторов АСhЕ и блокаторов VGCC на фенотип вакуолизации клеток T98**

[0082] 1 Материалы и методы

[0083] 1.1 Клетки

[0084] Клеточную линию T98G глиомы головного мозга человека приобретали у Nanjing Cobioer Biotechnology Co., Ltd.

[0085] 1.2 Реагенты и расходные материалы

Название	Кат. №/№ партии	Изготовитель
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Минимальная питательная среда	2192505	gibco
MEM NEAA (100×)	2216384	gibco
Пируват натрия (100 мМ)	2192495	gibco
Фетальная бычья сыворотка	2261480CP	gibco
0,05% Трипсина-EDTA	2192791	gibco
Пен./Стреп.	2257223	gibco
12-луночный планшет	191204-075	BioFIL
(-)-S2	D12-20161101-7	Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd.
Нифедипин	N7634	Sigma
Дилтиазем	20210815	Nanjing Chemlin Chemical Industry Co.,Ltd.
Верапамил	C13156635	Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd.
Донепезил	DT6821	Sigma
Флунаризин	AGN20-39525	Shanghai Kaiwei Chemical Technology Co., Ltd.
DMSO	21020207	TEDIA

[0086] 1.3 Получение раствора лекарственного средства

[0087] Лекарственные средства для использования в испытаниях включают:

нифедипин, верапамил, дилтиазем, флунаризин и донепезил.

[0088] Указанные выше используемые в испытаниях лекарственные средства точно отщипывали и растворяли в DMSO с получением однородного раствора с концентрацией 20 мМ в качестве маточного раствора, соответственно.

[0089] 1.4 Клеточная культура и наблюдаемый клеточный фенотип

[0090] Т98G клетки стабильно пассировали два раза. Когда плотность клеток достигала более чем 85%, клетки расщепляли 0,05% трипсином-EDTA в течение 3 минут, ресуспендировали в культуральной среде и высевали в 12-луночный планшет при определенной плотности, при этом каждая луночная система составляла 1 мл. Клетки культивировали в течение 24 часов и добавляли раствор соединения, полученный как указано выше, в каждую лунку в соответствии с группированием таким образом, чтобы концентрации соединений в системе культивирования составляли 0,1 мкМ, 1 мкМ, 5 мкМ и 20 мкМ, соответственно. В контрольную лунку добавляли равный объем DMSO.

[0091] После 6 часов обработки лекарственными средствами планшеты осматривали под микроскопом с линзой объектива 20×. Если в поле наблюдения в клетке появились яркие вакуоли с четкой границей и при соблюдении по меньшей мере одного из следующих условий: 1) клетка содержала по меньшей мере 1 вакуоль диаметром более 3 мкм; 2) клетка содержала 3 и более вакуолей диаметром в пределах 0,5-3 мкм; клетка считалась метуоз-положительной клеткой.

[0092] 2 Результаты эксперимента

[0093] 2.1 Ингибиторы кальциевых каналов(VGCC) не могли индуцировать вакуолизацию опухолевых клеток

[0094] Ни один из ингибиторов кальциевых каналов, таких как нифедипин, верапамил, дилтиазем и флунаризин, при максимальной концентрации лекарственного средства 20 мкМ не могли и индуцировать вакуолизированный клеточный фенотип клеточной линии Т98G глиомы человека (Фиг. 3).

[0095] 2.2 Ингибиторы холинэстеразы (AChE) не могли индуцировать вакуолизацию опухолевых клеток

[0096] Ингибитор холинэстеразы донепезил при максимальной концентрации лекарственного средства 20 мкМ не мог индуцировать вакуолизированный клеточный фенотип клеточной линии Т98G глиомы человека (Фиг. 4).

[0097] 2.3 Ингибиторы кальциевых каналов в комбинации с ингибиторами холинэстеразы не могли индуцировать вакуолизацию опухолевых клеток

[0098] Комбинированное применение ингибитора кальциевых каналов нифедипина или верапамила (20 мкМ) с ингибитором холинэстеразы донепезилом (20 мкМ) не могло индуцировать вакуолизированный клеточный фенотип в клеточной линии Т98G глиомы человека (Фиг. 5).

[0099] **Пример 4 Исследование эффективности S2 на модели опухоли у бестимусных мышей с трансплантацией клеток глиобластомы U87MG-Luc in situ**

[0100] 1 Материалы и методы

[0101] 1.1 Экспериментальные животные

[0102] Бестимусных мышей BALB/c, самцов, SPF-категории, с массой тела 20-22 г, приобретали у Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd.

[0103] 1.2 Реагенты и расходные материалы

[0104] Ниже представлена информация, касающаяся основных реагентов, используемых в этом эксперименте

Название	Кат. №/№ партии	Изготовитель
D-PBS	H106FA0001	Sangon Biotech
Минимальная питательная среда	2192505	gibco
MEM NEAA(100×)	2216384	gibco
Пируват натрия(100 мМ)	2192495	gibco
Фетальная бычья сыворотка	2261480CP	gibco
0,05% Трипсина-EDTA	2192791	gibco
DMSO	21020207	TEDIA
Двойные антитела	2257223	gibco
0,9% раствор хлорида натрия для инъекций	1903224C	Anhui Double-Crane Pharmaceutical Co., Ltd.
(-)-S2	D12-20161101-7	Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd.
Темозоломид (TMZ)	B1828132	Shanghai Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd.
Solutol HS-15 (Kolliphor HS-15)	09362556P0	Shanghai Chineway Pharmaceutical Excipients Technology Co., Ltd.
Этанол	20180419	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.
Глюкоза	20161219	Sinopharm Chemical Reagent Co., Ltd.
Изофлуран	21101001	Ruiwode Life Technologies Co., Ltd.

[0105] 1.3 Используемое в эксперименте оборудование

[0106] Ниже представлена информация, касающаяся основного оборудования, используемого в этом эксперименте

Название оборудования	Изготовитель	Модель	Номер устройства
Аналитические весы	Mettler toledo	XA105	OW020004
Электронные весы	Changshu G&G Measurement Plant	T1000 type	N/A
Устройство для визуализации живых мелких животных	PE	IVIS Lumina XR	N/A
Прибор для стереотаксиса	Stoelting	/	N/A
Одноразовый стерильный шприц	Shanghai Medical Co.,Ltd.	Misawa Industry	1 мл
			N/A

[0107] 1.4 Получение растворов лекарственных средств

[0108] S2

[0109] Растворитель: 5% этанол+0,8% Solutol+5% глюкозы

[0110] Способ получения: Отбирали соответствующее количество S2, растворяли в абсолютном этаноле в определенной пропорции под ультразвуком, равномерно смешивали с Solutol HS-15 в определенной пропорции под ультразвуком (явления филаментации не наблюдали), медленно добавляли очищенную воду для растворения в процессе обработки ультразвуком, в определенной пропорции добавляли глюкозу и растворяли под действием ультразвука с получением раствора. Раствор хранили при температуре 4°C в темноте.

[0111] 1.5 Экспериментальные методы

[0112] 1.5.1 Установление модели опухоли у бестимусных мышей с трансплантацией клеток глиобластомы U87MG-Luc in situ

[0113] Перед трансплантацией клетки U87MG-Luc расщепляли 0,05% трипсином-EDTA, ресуспендировали в предварительно охлажденном PBS до концентрации  $4 \times 10^7$  клеток/мл и переносили на лед для последующего использования. Бестимусных мышей анестезировали газообразным изофлураном, а затем фиксировали на стереотаксическом аппарате в положении лежа. Череп бестимусной мыши дезинфицировали йодоформом и надрезали сагиттально скальпелем. Разрез обрабатывали йодоформом. Череп обнажали и сверлили черепным сверлом, выступая на 1,0 мм перед брегмой и отклоняясь вправо на 2,0 мм. 5 мкл клеточной суспензии ( $2 \times 10^5$  клеток) вводили вручную с использованием 10-мкл микрошприца с плоской головкой, вводя иглу на глубину 3,5 мм, вытягивая иглу на 0,5 мм и инъецируя в течение примерно 10 минут. После прекращения инъекции на 5 минут иглу медленно извлекали, разрез стерилизовали и зашивали. В завершение внутримышечно вводили 50000 единиц пенициллина для предотвращения инфекции.

[00114] 1.5.2. Группирование животных и введение.

[0115] Этот эксперимент был разделен на 5 групп, а именно эталонную группу, группу TMZ, группу введения низкой дозы (LD) S2 (0,25 мг/кг), группу введения средней дозы (MD) S2 (0,5 мг/кг), группу введения высокой дозы (HD) S2 (1 мг/кг). Модельных животных распределяли по группам односторонне слепым методом с равной вероятностью. С 5-го дня после трансплантации препараты вводили внутривенно один раз в день в течение 15 дней. Эталонной группе вводили растворитель, внутривенно один раз в день в течение 15 дней.

[00116] 1.5.3. Визуализация опухолевых клеток головного мозга in vivo.

[0117] В дни 4, 12, 18 и 25 после трансплантации интраперитонеально вводили 200 мкл раствора калиевой соли D-люциферина с концентрацией 15 мг/мл, который фильтровали и стерилизовали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Через 10 минут осуществляли хемилюминесцентную детекцию IVI (яркое поле+биоломинесцентная визуализация) с использованием системы визуализации мышей in vivo (PE company IVIS Lumina XR). Интенсивность флуоресценции анализировали с использованием программного обеспечения Living Image с получением интенсивности флуоресценции [p/s],



которая отражала размер опухолевой ткани в головном мозге экспериментальных животных.

[0118] 1.5.4 Данные, касающиеся периода выживания животных

[0119] Условия выживания экспериментальных животных контролировали и своевременно фиксировали даты гибели животных.

[00120] 1.6 Статистический анализ данных

[00121] Количественные данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Каждый фармакодинамический индекс был представлен графически с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (8.0.1), различия между группами анализировали с использованием однофакторного ANOVA или двустороннего повторного ANOVA с последующим тестом LSD Фишера, а анализ выживаемости осуществляли по методу Каплана-Мейера.  $P < 0,05$  определяли как значимую разницу.

[00122] 2 Результаты эксперимента

[00123] 2.1. S2 ингибировал рост глиомы U87MG, трансплантированной *in situ*, в головном мозге бестимусных мышей.

[00124] По сравнению с группой введения носителя, как группа введения S2-MD (0,5 мг/кг, внутривенно), так и группа введения S2-HD (1 мг/кг, внутривенно) могли демонстрировать существенное ингибирование роста опухолей головного мозга U87MG *in situ*. (Фиг. 6 А и В). После двух недель введения группа введения S2-MD (0,5 мг/кг, внутривенно) и группа введения S2-HD (1 мг/кг, внутривенно) продемонстрировали значительный ингибирующий эффект на рост опухоли по сравнению с группой, получавшей носитель, при этом в группе введение S2-HD (1 мг/кг, внутривенно) наблюдали наиболее сильный ингибирующий эффект на опухоль (Фиг. 7 А и В).

[00125] 2.2. S2 продлевал период выживания бестимусных мышей с трансплантированной *in situ* глиомой головного мозга.

[00126] Согласно лог-ранговому анализу кривой выживаемости, по сравнению с группой носителя, в группе введения S2-MD (0,5 мг/кг, внутривенно) и группе введения S2-HD (1 мг/кг, внутривенно) значительно повышалась выживаемость мышей с карциномой головного мозга U87MG *in situ* (Фиг. 8), продлевался медианный период выживания и общий период выживания (Таблица 4).

Таблица 4

S2 продлевал период выживания мышей с карциномой головного мозга U87MG *in situ*

Период выживания	Носитель	S2 0,25 мг/кг	S2 0,5 мг/кг	S2 1 мг/кг
Медианный период выживания (дни)	31,5	32,5	33,5	35
Общий период выживания (дни)	31	32	33	36

[00127] **Пример 5 Исследование эффективности S2 в комбинации с темозоломидом (TMZ) на модели опухоли у бестимусных мышей с трансплантацией клеток глиобластомы U87MG-Luc *in situ***

[00128] 1 Материалы и методы

[00129] 1.1 Экспериментальные животные

[00130] Такие же, как в Примере 4.

[00131] 1.2 Реагенты и расходные материалы

[00132] Такие же, как в Примере 4.

[00133] 1.3 Используемое в эксперименте оборудование

[00134] Такое же, как в Примере 4.

[00135] 1.4 Получение растворов лекарственных средств

[00136] а) S2

[00137] Растворитель: 5% этанол+0,8% Solutol+5% глюкозы

[00138] Способ получения: Отбирали соответствующее количество S2, растворяли в абсолютном этаноле в определенной пропорции под ультразвуком, равномерно смешивали с Solutol HS-15 в определенной пропорции под ультразвуком (явления филаментации не наблюдали), медленно добавляли очищенную воду для растворения в процессе обработки ультразвуком, в определенной пропорции добавляли глюкозу и растворяли под действием ультразвука с получением раствора. Раствор хранили при температуре 4°C в темноте.

[00139] б) TMZ

[00140] Растворитель: 0,9% раствор хлорида натрия для инъекций

[00141] Способ получения: Отвешивали соответствующее количество TMZ, разбавляли 0,9% раствором хлорида натрия для инъекций в определенной пропорции и встряхивали до равномерного смешивания с получением раствора. Раствор хранили при -20°C.

[00142] 1.5 Экспериментальные методы

[00143] 1.5.1 Установление модели опухоли у бестимусных мышей с трансплантацией клеток глиобластомы U87MG-Luc in situ

[00144] Так же, как в Примере 4.

[00145] 1.5.2. Группирование животных и введение.

[0115] В этом эксперименте мышей разделяли на 4 группы, а именно, эталонную группу, группу TMZ (3 мг/кг), группу-LD комбинированного введения S2+TMZ (TMZ 3 мг/кг и S2 0,25 мг/кг), группу-MD комбинированного введения S2+TMZ (TMZ 3 мг/кг и S2 0,5 мг/кг) и группу-HD комбинированного введения S2+TMZ (TMZ 3 мг/кг и S2 1 мг/кг). Модельных животных распределяли по группам односторонне слепым методом с равной вероятностью. С дня 8 после трансплантации TMZ вводили интраперитонеально два раза в дни 8 и 15; S2 вводили внутривенно раз в день в течение 15 дней.

[00147] 1.5.3 Визуализация опухолевых клеток в головном мозге in vivo

[00148] В дни 7, 14 и 21 после трансплантации интраперитонеально вводили 200 мкл раствора калиевой соли D-люциферина с концентрацией 15 мг/мл, который фильтровали и стерилизовали через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Через 10 минут осуществляли хемилюминесцентную детекцию IVI (яркое поле+биолюминесцентная визуализация) с использованием системы визуализации мышей in vivo (PE company IVIS Lumina XR). Интенсивность флуоресценции анализировали с использованием программного

обеспечения Living Image с получением интенсивности флуоресценции [p/s], которая отражала размер опухолевой ткани в головном мозге экспериментальных животных.

[0149] 1.5.4 Данные, касающиеся периода выживания животных

[0150] Условия выживания экспериментальных животных контролировали и своевременно фиксировали даты гибели животных.

[00151] 1.6 Статистический анализ данных

[00121] Количественные данные выражены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка. Каждый фармакодинамический индекс был представлен графически с использованием программного обеспечения GraphPad Prism (8.0.1), различия между группами анализировали с использованием однофакторного ANOVA или двустороннего повторного ANOVA с последующим тестом LSD Фишера, а анализ выживаемости осуществляли по методу Каплана-Мейера.  $P < 0,05$  определяли как значимую разницу.

[00153] 2 Результаты эксперимента

[00154] 2.1 Эффект комбинации S2+TMZ на рост U87MG глиомы в головном мозге бестимусных мышей

[00155] По сравнению с группой введения носителя как группа введения TMZ (3 мг/кг, и/п) отдельно, так и группа комбинированного введения TMZ+S2 (0,25, 0,5, и 1 мг/кг в/в) показали существенное ингибирование роста опухоли головного мозга U87MG *in situ* (Фиг. 9 А и В). После 2 недель введения (день 21), по сравнению с TMZ, группа комбинированного введения S2+TMZ показала более сильный ингибирующий эффект на рост опухоли, и ингибирующий опухоль эффект в группе комбинированного введения S2 (0,5 мг/кг) + TMZ был значительно лучше, чем в группе введения TMZ (Фиг. 10 А и В).

[00156] 2.2 Эффект комбинации S2+TMZ на выживаемость бестимусных мышей с глиомой головного мозга *in situ*

[00157] Согласно лог-ранговому анализу кривой выживаемости, по сравнению с группой носителя, была существенная разница в периоде выживания мышей между группой введения только TMZ (3 мг/кг, и/п) и группой комбинированного введения TMZ+S2 (0,25, 0,5 и 1 мг/кг в/в). По сравнению с введением только TMZ комбинация S2 (0,5 мг/кг) + TMZ и S2 (1 мг/кг) + TMZ значительно повышала выживаемость мышей с карциномой головного мозга U87MG *in situ* (Фиг. 11) и продлевала медианный период выживания и общий период выживания (Таблица 5).

Таблица 5

Комбинированное применение S2+TMZ продлевало период выживания мышей с карциномой головного мозга U87MG *in situ*

Период выживания	Носитель	TMZ 3 мг/кг	TMZ+S2 0,25 мг/кг	TMZ+S2 0,5 мг/кг	TMZ+S2 1 мг/кг
Медианный период выживания (дни)	30	33,5	32	35	36
Общий период выживания (дни)	33	35	36	37	38

[00158] **Пример 6 Фармакодинамическое исследование *in vivo* действия S2 на глиому головного мозга T98G человека в мышинной подкожной модели NOD SCID**

[00159] 1 Методы и материалы

[00160] 1.1 Экспериментальные животные

[00161] NOD SCID, самки, возраст 6-8 недель, масса тела 18-21 г, приобретали у Beijing VitalRiver Experimental Animal Technology Co., Ltd.

[00162] 1.2 Испытываемые лекарственные средства

[00163] Темозоломид (TMZ), Shanghai Aladdin Biochemical Technology Co., Ltd., номер партии: B1828132.

[00164] S2, Jiangsu Simovay Pharmaceutical Co., Ltd., номер партии: D12-20161101-7.

[00165] 1.3 Получение растворов лекарственных средств

[00166] Способ получения TMZ (1,5 мг/мл): отвешивали 18 мг Темозоломида и растворяли в 12 мл 1% НРМС.

[00167] Способ получения раствора S2 для введения был таким же, как в Примере 4.

[001608] 1.4 Экспериментальные методы

[00169] 1.4.1 Установление опухолевой модели подкожного трансплантата клеток глиобластомы T98G у бестимусных мышей

[00170] Клетки глиомы головного мозга человека T98G культивировали *in vitro*. Клетки культивировали в среде EMEM с добавлением 10% фетальной телячьей сыворотки, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина в инкубаторе с температурой 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. После того как количество клеток достигло необходимого количества, клетки собирали. 0,2 мл (10 × 10<sup>6</sup>) опухолевых клеток T98G (PBS: Matrigel=1:1) инокулировали подкожно в правую часть спины каждой мыши. Мышей разделяли на группы и осуществляли введение, когда средний объем опухоли достигал примерно 147 мм<sup>3</sup>.

[00171] 1.4.2. Распределение животных по группам и введение.

[00172] Первую серию экспериментов разделяли на две группы, а именно: группу введения носителя и группу TMZ (15 мг/кг, п/о); модельных животных рандомизированно распределяли по группам слепым способом, по 10 животных в каждой группе.

[00173] Вторую серию экспериментов разделяли на две группы, а именно: группу введения носителя и группу S2 (3 мг/кг, в/в); модельных животных рандомизированно распределяли по группам слепым способом, по 9 животных в каждой группе.

[00174] 1.4.3. Измерение размера опухоли.

[00175] Диаметры опухолей измеряли штангенциркулем два раза в неделю, а после эксперимента опухоли взвешивали и фотографировали.

[00176] 1.5 Статистический анализ данных. Объем опухоли рассчитывали следующим образом:  $V=0,5a \times b^2$ , где *a* и *b* представляют собой длинный и короткий диаметры опухоли, соответственно.

[00177] Эффект ингибирования опухоли оценивали по TGI (%) или относительной скорости пролиферации опухоли Т/С (%).

[00178] Эффект ингибирования опухоли рассчитывали как TGI (%):  $TGI \% = [1 - (\text{средний объем опухоли в конце введения в определенной группе лечения} - \text{средний объем опухоли в начале введения в группе лечения}) / (\text{средний объем опухоли в конце введения в}$

контрольной группе введения носителя - средний объем опухоли в контрольной группе введения носителя в начале лечения)]  $\times 100$ .

[00179] Относительная скорость пролиферации опухоли T/C (%):  $T/C \% = TRTV/CRTV \times 100$  (TRTV: RTV группы лечения; CRTV: RTV группы отрицательного контроля). Относительный объем опухоли (RTV) рассчитывали на основании результатов измерения опухоли по формуле расчета  $RTV = V_t/V_0$ , где  $V_0$  представляет собой средний объем опухоли, измеренный на момент распределения по группам и введения (т.е.  $d_0$ ), и  $V_t$  представляет собой средний объем опухоли при измерении в определенное время,  $T_{RTV}$  и  $C_{RTV}$  определены в один и тот же день.

[00180] Статистический анализ основывался на среднем значении и стандартной ошибке (SEM) объемов опухолей в каждой группе в конце эксперимента. Сравнение между двумя группами анализировали с использованием Т-критерия. Весь анализ данных осуществляли с использованием GraphPad Prism (8.0.1), и  $P < 0,05$  считали значимой разницей.

[00181] 2 Результаты эксперимента

[00182] 2.1 Эффект TMZ на рост опухоли T98 и массу опухоли в конечной точке эксперимента

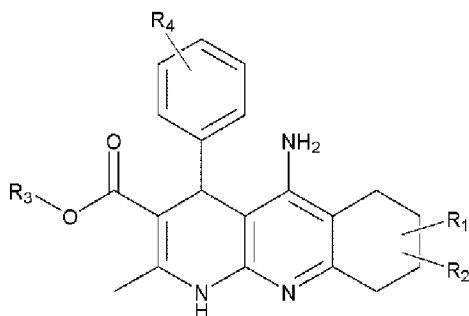
[00183] По сравнению с группой введения носителя группа введения TMZ в дозе 15 мг/кг не показала никакого ингибирующего эффекта на рост объема опухоли (Фиг. 12А-С). Опухоли собирали и взвешивали в конце эксперимента. Не было значительной разницы в массе опухоли между группой, получавшей TMZ 15 мг/кг, и контрольной группой (Фиг. 12D), что согласуется с вышеуказанным ингибированием объема опухоли.

[00184] 2.2. Эффект S2 на рост опухоли T98 и массу опухоли в конечной точке эксперимента.

[00185] По сравнению с группой введения носителя группа введения S2 в дозе 3 мг/кг показала значительное ингибирование роста объема опухоли (Фиг. 13 А-С). Опухоли собирали и взвешивали в конце эксперимента. Масса опухоли в группе, получавшей S2 3 мг/кг, была значительно ниже, чем в контрольной группе (Фиг. 13D), что согласуется с вышеуказанным ингибированием объема опухоли.

### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение 1,4-дигидронафтиридинового производного, представленного формулой I, или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения опухоли,



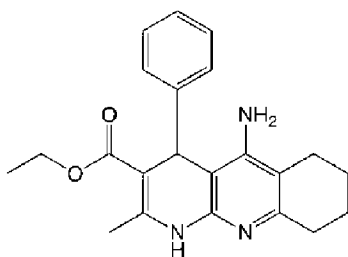
Формула I

где  $R_1$  или  $R_2$  представляет собой водород, галоген или  $C_1$ - $C_6$  алкил;

$R_3$  выбран из  $C_1$ - $C_6$  алкила, где любая группа  $-CH_2-$  в алкиле может быть замещена одним или несколькими  $-O-$ ;

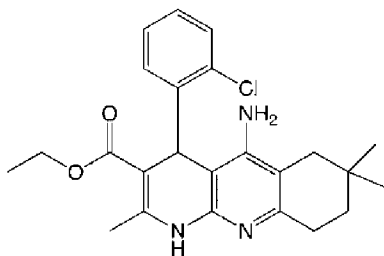
$R_4$  представляет собой водород или галоген.

2. Применение 1,4-дигидронафтиридинового производного или его фармацевтически приемлемой соли для получения лекарственного средства для лечения опухоли, где соединение выбрано из группы, состоящей из:



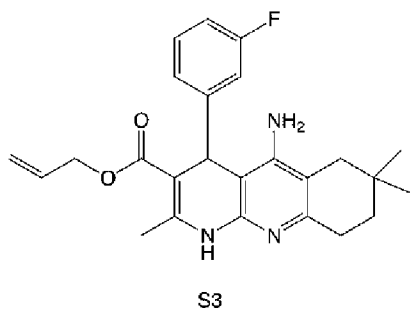
S1

Соединения 1, представленного как S1;

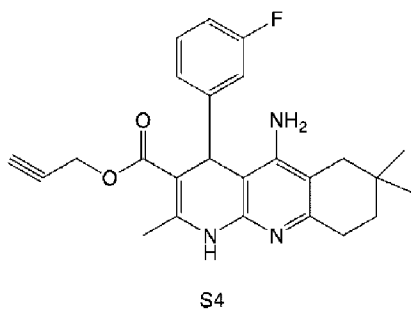


S2

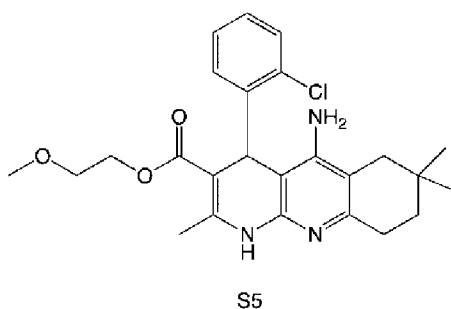
Соединения 2, представленного как S2;



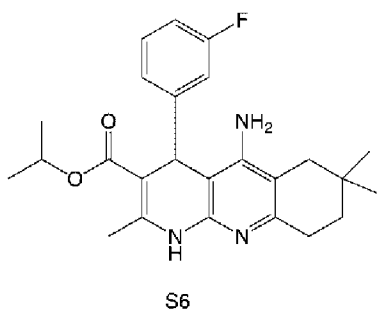
Соединения 3, представленного как S3;



Соединения 4, представленного как S4;



Соединения 5, представленного как S5; и



Соединения 6, представленного как S6.

3. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения солидной опухоли.

4. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения опухоли нервной системы.

5. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения опухоли головного мозга.

6. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения глиомы.

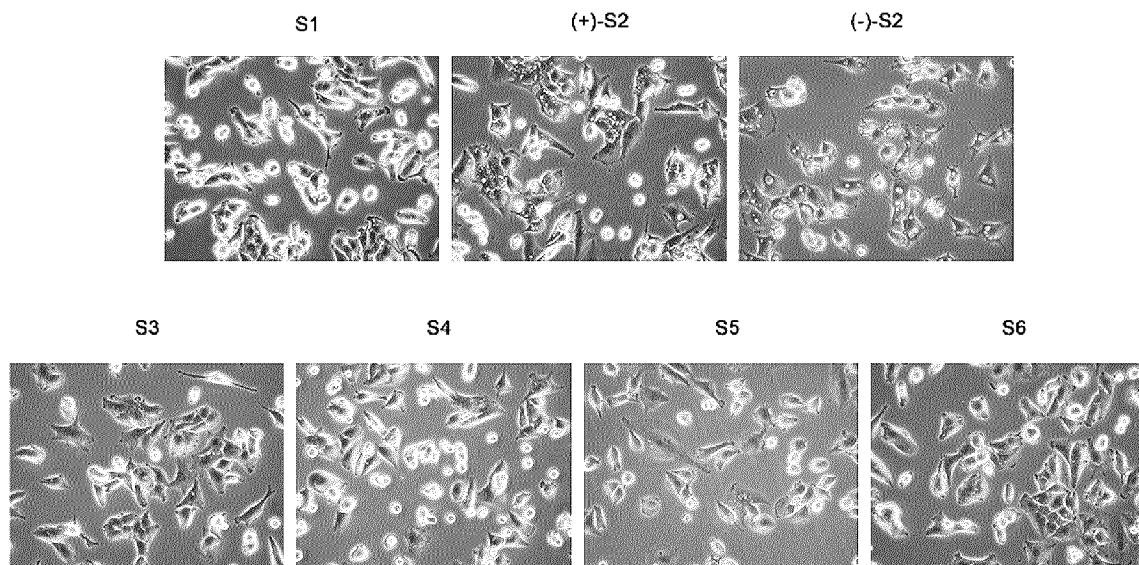
7. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения глиобластомы.

8. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют для лечения рака печени, рака толстой кишки и рака желудка.

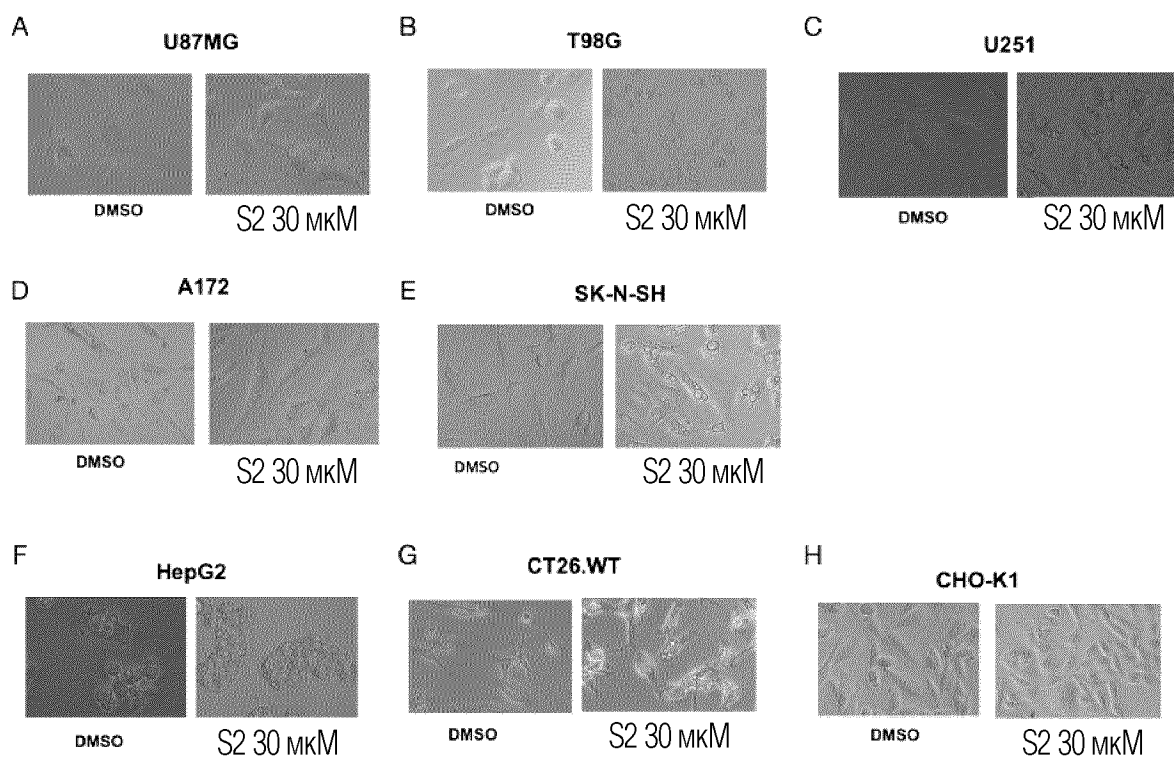
9. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют в комбинации с темозоломидом для лечения глиомы.

10. Применение в по п. 2, где 1,4-дигидро-нафтиридиновое производное используют в комбинации с лучевой терапией для лечения глиомы.

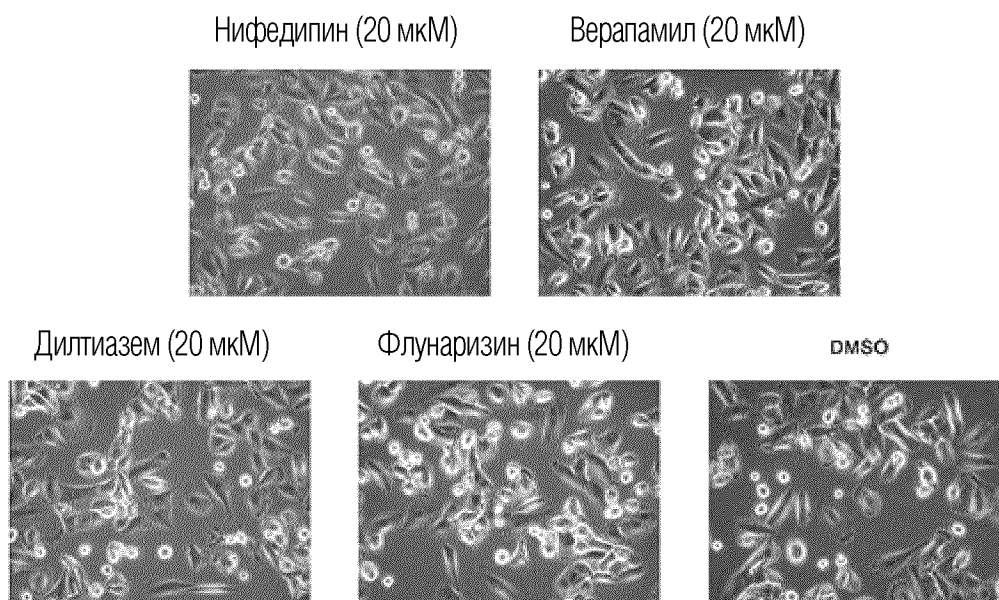




ΦΙΓ. 1

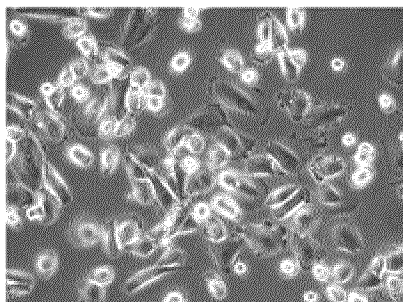


ФИГ. 2

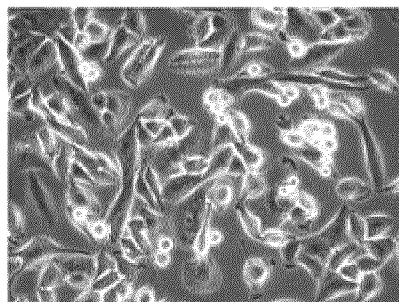


ФИГ. 3

Donepezil (20 мкМ)

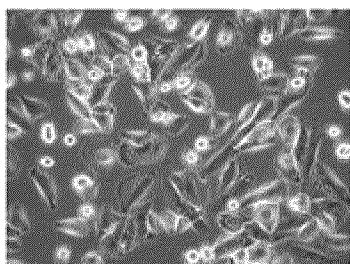


DMSO

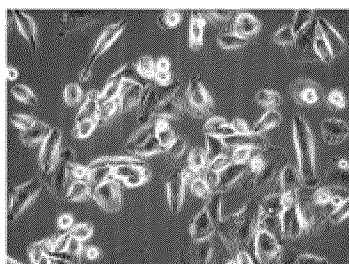


ФИГ. 4

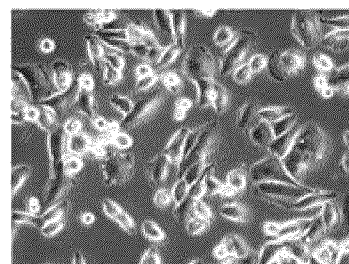
Нифедипин + Donepezil  
(20 мкМ + 20 мкМ)



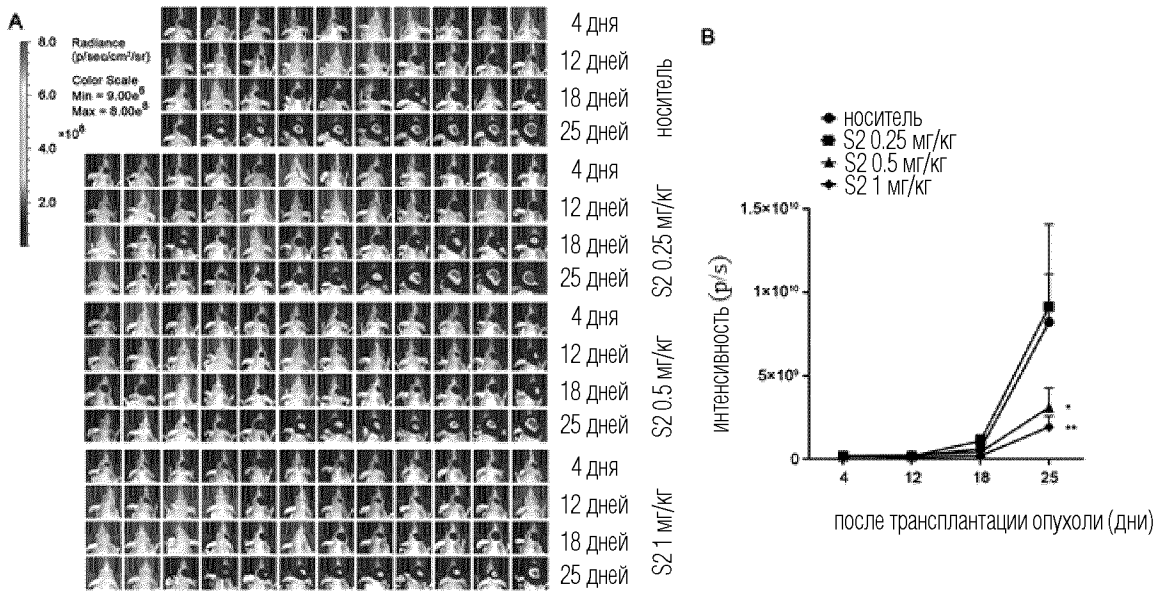
Верапамил + Donepezil  
(20 мкМ + 20 мкМ)



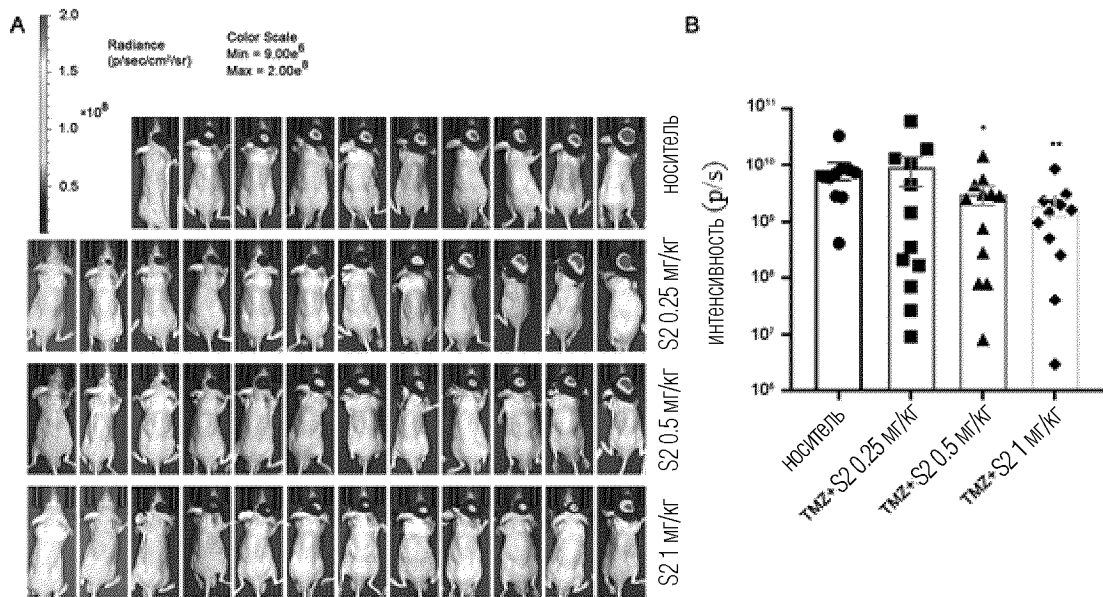
DMSO



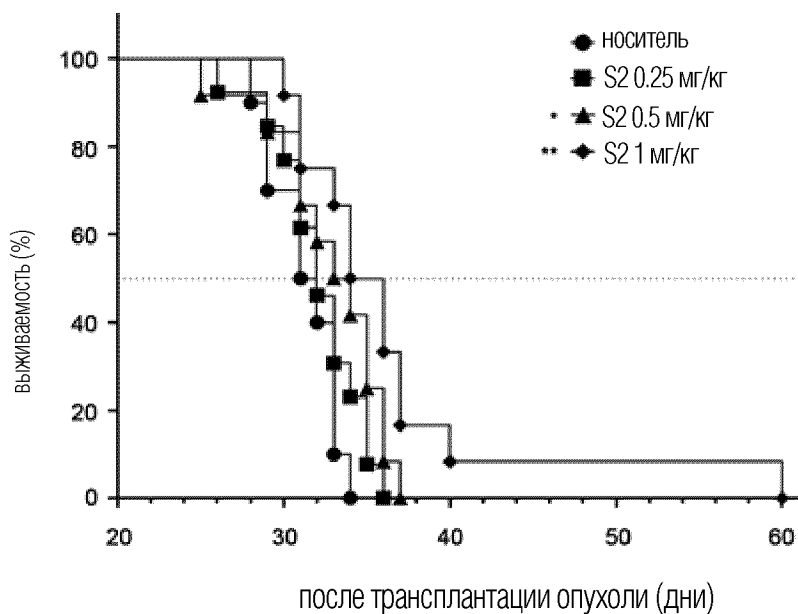
ФИГ. 5



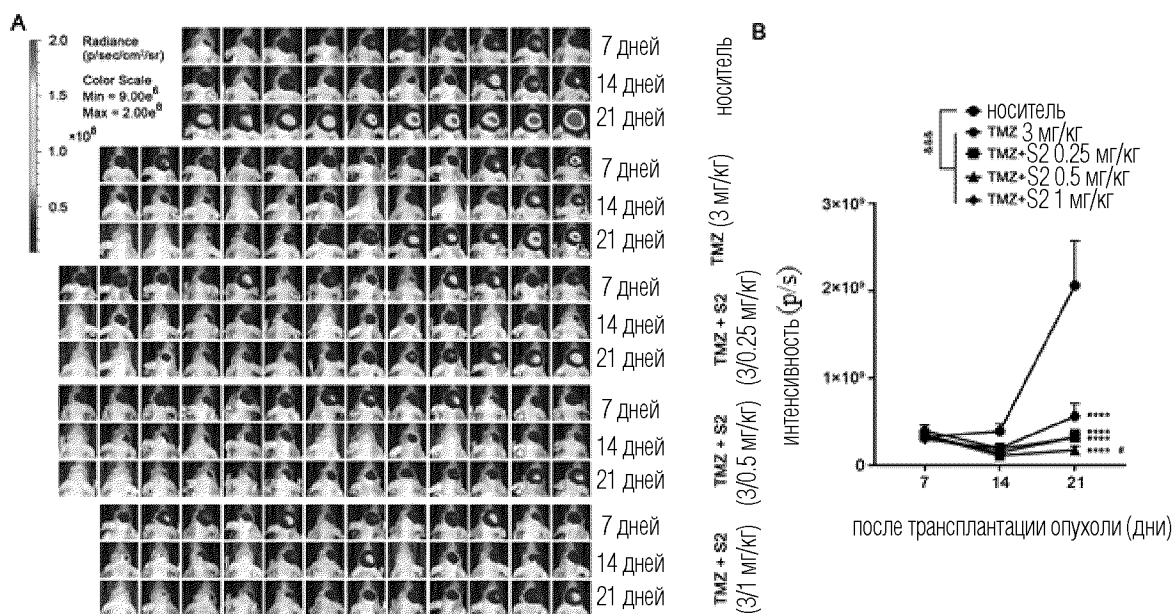
ФИГ. 6



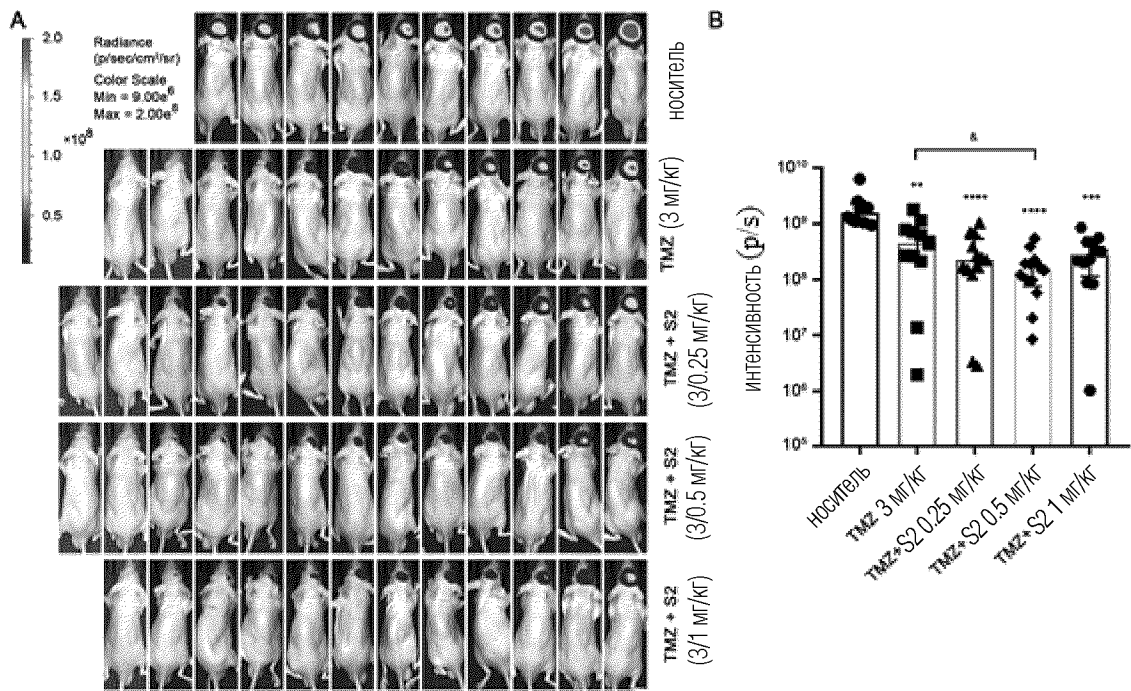
ФИГ. 7



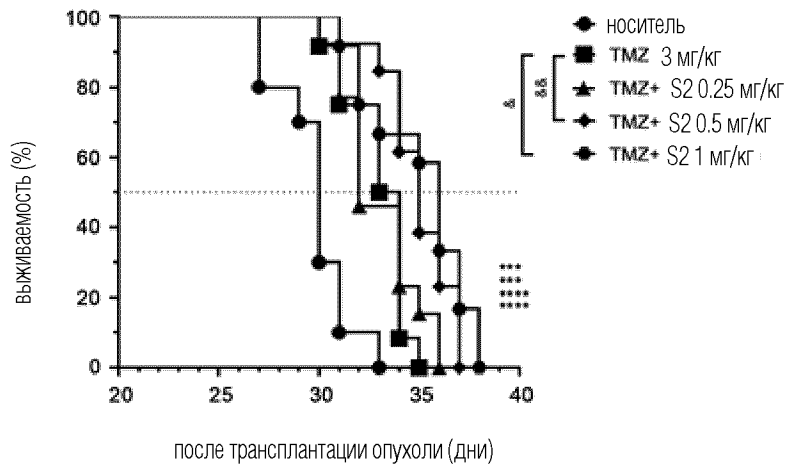
ФИГ. 8



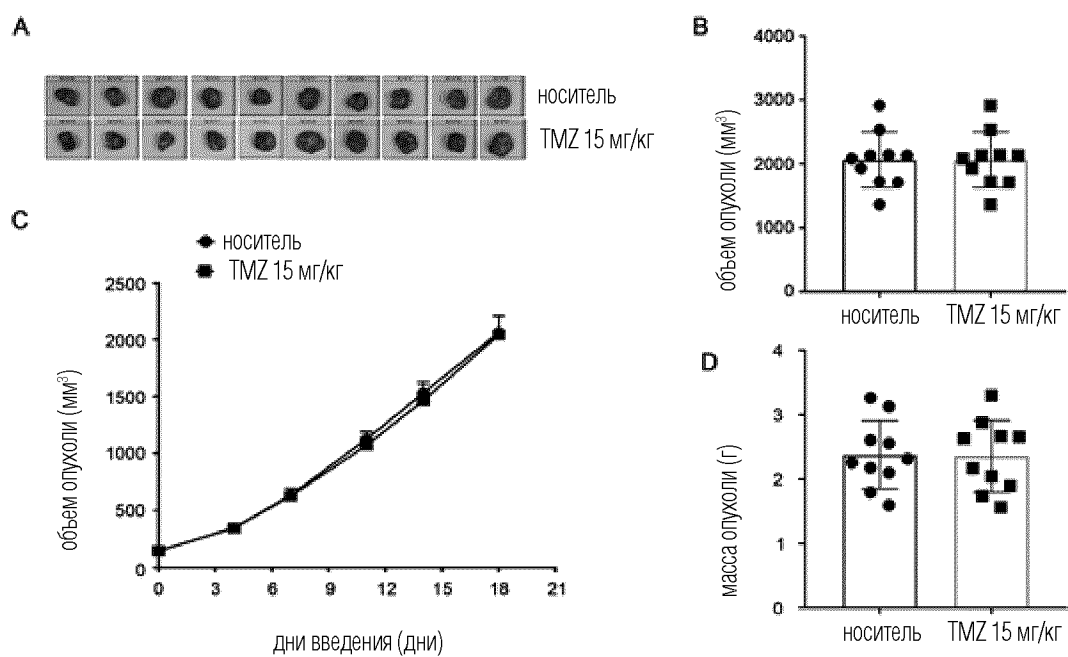
ФИГ. 9



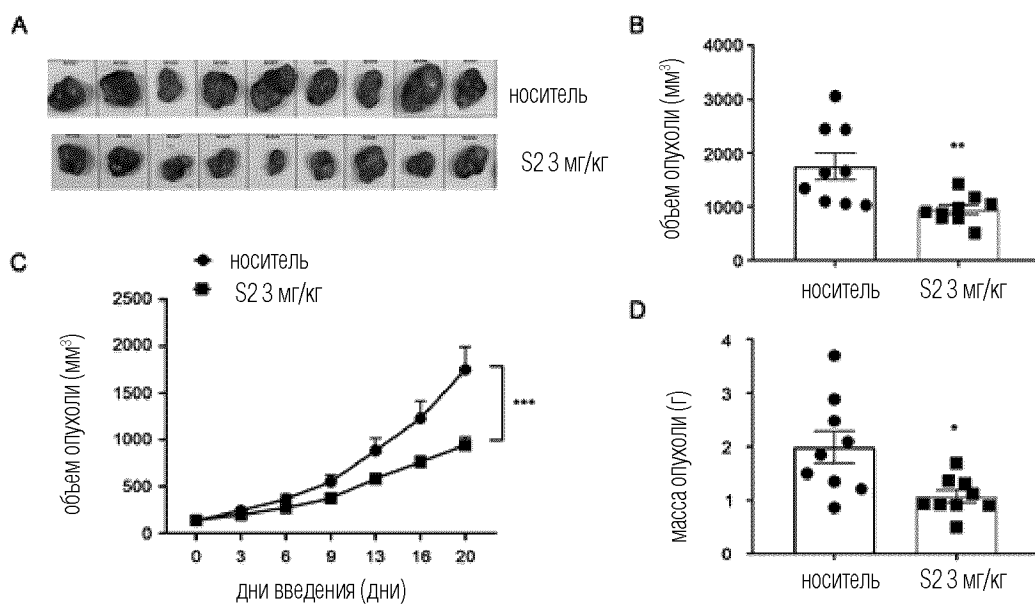
ФИГ. 10



ФИГ. 11



ФИГ. 12



ФИГ. 13