

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

Zveřejněná podle §31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

2018-181

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.:

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11.04.2018**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **30.10.2019**
(Věstník č. 44/2019)

A61K 31/404 (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
A61K 31/5517 (2006.01)
A61K 31/519 (2006.01)
A61K 31/4427 (2006.01)
A61K 31/426 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(71) Přihlašovatel:
Univerzita Karlova, Praha 1, Staré Město, CZ

(72) Původce:
doc. MUDr. Jiří Vachtenheim, CSc., Praha 5, CZ

(74) Zástupce:
Rott, Růžička & Guttman
Patentové, známkové a advokátní kanceláře, JUDr.
Ing. Michal Guttman, patentový zástupce,
Vyskočilova 1566, 140 00 Praha 4, Michle

(54) Název přihlášky vynálezu:
**Farmaceutický přípravek pro léčení
maligního melanomu**

(57) Anotace:
Farmaceutický přípravek pro léčení maligního melanomu obsahuje trojkombinaci účinných látek, kterými jsou GANT61, obatoclax, s výhodou jeho mezlátová sůl, a látka vybraná ze skupiny sestávající z (+)-JQ1, SGI-7079, GSK343, GSK126, HA15, přičemž koncentrace účinných látek v dané trojkombinaci potřebných pro eradikaci nádorových buněk je následující: a) GANT61 10 až 20 $\mu\text{mol/l}$; b) obatoclax 150 až 300 nmol/l ; c) (+)-JQ1 125 až 500 nmol/l ; c2) SGI-7079 125 až 500 nmol/l ; c3) GSK343 0,25 až 1,0 $\mu\text{mol/l}$; c4) GSK126 25 až 100 nmol/l ; a c5) HA 15 2,5 až 10 $\mu\text{mol/l}$. Všechny trojkombinace jsou velmi účinné v pokusech na buněčných kulturách lidských melanomových buněk, kdy došlo k eradikaci všech nádorových buněk do 7 dnů po aplikaci.

Farmaceutický přípravek pro léčení maligního melanomu

Oblast techniky

5

Vynález se týká farmaceutického přípravku pro léčení maligního melanomu kombinací tří známých účinných látek. V přihlášce obecně je řešena problematika cílené léčby nádorových buněk. Konkrétně je řešena otázka zahubení buněk u jednoho typu nádoru (melanomu) synergickou kombinací účinných látek, které jsou dále v přihlášce popsány.

10

Dosavadní stav techniky

15

Cílená léčba nádorových onemocnění znamená léčbu účinnou chemickou látkou (popř. látkami), schválenými pro použití v humánní medicíně státním orgánem, např. americkým úřadem FDA (Food and Drug Administration), nebo nadnárodní agenturou, např. EMEA. V České republice je samozřejmě pro léčebné použití účinných látek nutný též souhlas Státního ústavu pro kontrolu léčiv (SÚKL). Dosud byla při cílené léčbě i v klinických studiích fáze I-IV (které léčbě těsně předcházejí) používána v naprosté většině pouze jedna sloučenina, např. inhibitor některé buněčné signální dráhy, inhibitor funkce mutovaného onkogenu, inhibitor epigenetické regulace, inhibitor antiapoptotických proteinů apod. V současné době existuje již přes 100 000 různých chemických inhibitorů, které mají alespoň menší (avšak statisticky signifikantní) negativní účinek na růst nádorových buněk (či přímo buňky usmrcují převážně pomocí apoptózy) v experimentálním testování. Využito a zkoušeno (ať již experimentálně na buněčných kulturách, v preklinických studiích na imunodeficitních tzv. nude myších i v klinických studiích přímo při léčbě pacientů s jakýmkoli nádorem) bylo však jen mnohem menší množství látek (cca 200-300).

20

25

30

Problémem klinického použití jedné látky je však rezistence, která vzniká zpravidla po několika měsících “úspěšné” léčby v podstatě vždy (výjimečně je nádor již od počátku inherentně rezistentní vůči léčivu, což se bez experimentálního ověření nepozná). Typická je např. rezistence proti vemurafenibu nebo dabrafenibu, které se používají pro inhibici aktivity mutovaného BRAF onkogenu. Mutace toho onkogenu (“driver mutations”) jsou u maligního melanomu přítomny asi v 60 % případů (1). Dalším typicky mutovaným onkogenem u melanomu je NRAS, a to asi u 15 % případů (2). Po proběhlé léčbě příslušným inhibitorem se nádor stává (vlivem mnoha mutací vzniklých během jeho progresu) rezistentní vůči původní léčbě a je dokonce “závislý” na podávaném léku (tento stav se označuje jako “drug addiction”) (3-5) a produkuje se proonkogenní “sekretom” podporující nádorový růst (6). Řešit tuto situaci se stává složitější než před podáním prvního léku. Obvykle se první lék pochopitelně vysadí a nasadí se druhý lék a pokračuje se v léčbě. Velmi často vznikne postupně rezistence i na tento druhý lék. Melanom je silně fenotypově heterogenní již od prvních stadií (7, 8) a heterogenita se postupně zvyšuje. Přítomnost mnoha různých subpopulací buněk tak způsobuje jeho rezistenci, neboť vůči podanému léčivu je senzitivní jen malá část subpopulací. Tato mikroheterogenita a plasticita fenotypu je obecně léčebným problémem i u jiných typů nádorů (9,10).

35

40

45

V poslední době je proto uplatňována tendence nasadit dva, popř. i více léků najednou již jako počáteční léčbu (11-13). Tyto léky by měly být pečlivě vybírány podle výsledků předchozího experimentálního výzkumu na buněčných kulturách stejného typu nádoru a na nude myších, což se většinou neděje a jsou často přímo prováděny klinické studie na pacientech. Kombinace dvou léčiv od začátku léčby prudce snižuje riziko vzniku rané rezistence. Ověřovat přímo pacientův nádor experimentálně na různé účinné kombinace léčiv v podstatě není čas, neboť toto ověření je časově náročné a nádor v pacientovi mezitím roste a zhoršuje se tak prognóza. Podle literatury byly při této tzv. cílené léčbě výjimečně zkoušeny při léčbě nádorů nebo experimentálně pouze dvojkombinace léčiv jako první léčba (11-15) (s lepším účinkem než monoléčba), nebyla však vyzkoušena trojkombinace. Při klasické chemoterapii se samozřejmě vždy použije kombinace nedlených, obecně používaných protinádorových látek.

50

55

Citace pramenů:

1. Davies H, Bignell GR, Cox C et al.: Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002, 417(6892):949-54.
2. Yan J, Wu X, Yu J et al.: Analysis of NRAS gain in 657 patients with melanoma and evaluation of its sensitivity to a MEK inhibitor. *Eur J Cancer*. 2018, 89:90-101.
3. Kong X, Kuilman T, Shahrabi A et al.: Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature*. 2017, 550(7675):270-274.
4. Hong A, Moriceau G, Sun L et al: Exploiting Drug Addiction Mechanisms to Select against MAPKi-Resistant Melanoma. *Cancer Discov*. 2018, 8(1):74-93.
5. Sidaway P: Targeted therapies: Drug addiction revealed in BRAF and MEK inhibitor-resistant melanoma cells. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015, 12(4): 189.
6. Obenaus AC, Zou Y, Ji AL: Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature*. 2015, 520(7547):368-72.
7. Vandamme N, Berx G: Melanoma cells revive an embryonic transcriptional network to dictate phenotypic heterogeneity. *Front Oncol*. 2014, 4:352.
8. Tulchinsky E, Pringle JH, Caramel J et al.: Plasticity of melanoma and EMT-TF reprogramming. *Oncotarget*. 2014, 5(1): 1-2.
9. Meacham CE, Morrison SJ: Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature*. 2013, 501(7467):328-37.
10. Blakely CM, Watkins TBK, Wu W et al.: Evolution and clinical impact of co-occurring genetic alterations in advanced-stage EGFR-mutant lung cancers. *Nat Genet*. 2017, 49(12): 1693-1704.
11. Watanabe M, Umezawa K, Higashihara M et al. Combined inhibition of NF- κ B and Bcl-2 triggers synergistic reduction of viability and induces apoptosis in melanoma cells. *Oncol Res*. 2013, 21 (4): 173-80.
12. Vlčková K, Réda J, Ondrušová L et al.: GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax. *Int J Oncol*. 2016, 49(3):953-60.
13. Korkut A, Wang W, Demir E et al.: Perturbation biology nominates upstream-downstream drug combinations in RAF inhibitor resistant melanoma cells. *Elife*. 2015, 18;4.
14. Boshuizen J, Koopman LA, Krijgsman O et al.: Cooperative targeting of melanoma heterogeneity with an AXL antibody-drug conjugate and BRAF/MEK inhibitors. *Nat Med*. 2018, 24(2):203-212.
15. Dinavahi SS, Noory MA, Gowda R: Moving Synergistically Acting Drug Combinations to the Clinic by Comparing Sequential versus Simultaneous Drug Administrations. *Mol Pharmacol*. 2018, 93(3): 190-196.
16. Santini R, Vinci MC, Pandolfi S et al.: Hedgehog-GLI signaling drives self-renewal and tumorigenicity of human melanoma-initiating cells. *Stem Cells*. 2012, 30(9): 1808-18.
17. Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC et al.: Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*. 2017, 36(13): 1849-1861
18. Stecca B, Mas C, Clement V et al.: Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI 1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(14):5895-900.
19. Vlčková K, Ondrušová L, Vachtenheim J et al: Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells. *Cell Death Dis*. 2016, 7:e2048.
20. Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB et al.: BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013,110(11):4321-6.
21. Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A et al. Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007, 104(49): 19512-7.
22. Segura MF, Fontanals-Cirera B, Gaziel-Sovran A et al.: BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res*. 2013, 73(20):6264-

76.

23. Müller J, Krijgsman O, Tsoi J et al.: Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. Nat Commun. 2014, 5:5712

24. Tiffen JC, Gunatilake D, Gallagher SJ et al.: Targeting activating mutations of EZH2 leads to potent cell growth inhibition in human melanoma by derepression of tumor suppressor genes. Oncotarget. 2015, 6(29):27023-36.

25. Cerezo M, Lehraiki A, Millet A et al.: Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance. Cancer Cell. 2016, 29(6):805- 819.

Podstata vynálezu:

Podstatou vynálezu je zjištění pěti různých kombinací tří látek-účinných protinádorových léčiv v jednom přípravku na buňkách v buněčné kultuře, namířené specificky proti lidskému malignímu melanomu (v pokročilejších stádiích II - IV). V těchto stádiích je další léčba téměř neúčinná (kromě imunoterapie, která však působí v malém procentu případů). Z dosavadního stavu techniky vyplývá, že pro účinnou léčbu je nutno eliminovat nádorové buňky v co nejkratším čase. Zjistili jsme, že všech pět účinných kombinací léčiv je schopno zcela eradikovat nádorové buňky max. do 5 dnů (viz dále Obr. 2), tedy účinek testovaných kombinací látek byl mimořádně silný.

V této přihlášce vynálezu uvádíme trojkombinace chemických látek (5 různých trojkombinací), kdy základem jsou vždy dvě látky a jen třetí se ve všech kombinacích liší. Jejich účinek na buňky maligního melanomu je efektivní, i když se liší podle použité buněčné linie, a je velmi rychlý, neboť buňky jsou eradikovány i při nižších koncentracích látek nejpozději do 7 dnů. Testovali jsme kombinace jen cílených léčiv (nizkomolekulárních inhibitorů), nikoli např. kombinaci podání jedné chemické látky s imunologickou léčbou, fototerapií, radioterapií apod. Naším cílem tedy bylo zaútočit na nádorové buňky účinnými látkami, které jsou každá z jiné oblasti buněčné biologie a nejsou zaměřeny proti "driver" mutacím onkogenů, kdy je známo, že se vždy vytvoří rezistence. Pro účinnost léčby je důležité, aby byly eradikovány i subpopulace buněk, které jsou velmi invazivní a rekrutují se z nich tzv. nádorové kmenové buňky (cancer stem cells, CSC) a metastatické buňky.

Základem naší látkové trojkobinace byl GANT61 a obatoclax. GANT61 je látka silně a specificky inhibující aktivitu faktorů G1I, které jsou efektoři signální cesty Hedgehog (17-19), důležité pro progresi melanomu. Obatoclax je velmi silný inhibitor antiapoptotické rodiny genů BCL2 a inhibuje i antiapoptotický protein Mcl-1 (20,21). K tomuto základu dvou látek, bylo použito vždy jedné z pěti následujících látek. JQ1, což je velmi silný inhibitor aktivity epigenetického faktoru BRD4, důležitého pro progresi melanomu (22). Dalšími látkami byly SGI-7079, inhibitor AXL kinázy, která je přítomna v subpopulacích invazivních buněk melanomu (23). Inhibitory GSK323 a GSK126 působí podobně a jsou silnými inhibitory methyltransferázy EZH2 (součást "polycomb repression 2" komplexu). EZH2 byl popsán jako důležitý epigenetický faktor při vývoji melanomu (24). HA 15 je látka popsána jako velmi silně a specificky působící mechanismem stresu endoplasmatického retikula a mitochondrií na melanomové buňky (25).

Bylo zjištěno, že koncentrace účinných látek v dané trojkombinaci potřebných pro eradikaci nádorových buněk je následující: a) GANT61 10 až 20 $\mu\text{mol/l}$; b) obatoclax 150 až 300 nmol/l ; c1) (+)-JQ1 125 až 500 nmol/l ; c2) SGI-7079 125 až 500 nmol/l ; c3) GSK343 0,25 až 1,0 $\mu\text{mol/l}$; c4) GSK126 25 až 100 nmol/l ; a c5) HA 15 2,5 až 10 $\mu\text{mol/l}$.

K testování bylo použito 6 definovaných buněčných linií nádoru pro nejvyšší koncentrace účinných látek a 4 buněčné linie pro použití dvou nižších koncentrací účinných látek. Celkem bylo provedeno testování v rozsahu 3 koncentrací látek na všech pěti kombinacích. Bylo tedy dosaženo 15 výsledků. Navíc byly provedeny testy na kontrolních, nemelanomových liniích (buňky nádoru slinivky břišní), a to v jedné nejvyšší koncentraci ve všech pěti kombinacích.

Cílem řešení bylo nalézt vhodné kombinace léků, které jsou co nejúčinnější pro dosažení rychlé eradikace nádorových buněk, která je předpokladem pro úspěšnou cílenou léčbu. Koncentrace látek použité v přihlášce vynálezu jsou pravděpodobně použitelné i při humánním použití v nádorové tkáni (ověření vyžaduje další farmakologické studie již při klinickém zkoušení). Provedli jsme ještě dva experimenty, kdy koncentrace látek byly nižší než nejvyšší, a zjistili jsme, že snižováním koncentrace se dosáhne eradikace buněk jen u dvou buněčných linií, na další dvě linie jsou nejnižší koncentrace již neúčinné (Obr. 5. a tabulka č. 2), účinná byla jen poslední trojkombinace (č.V).

Dalším cílem vynálezu byl požadavek, aby kombinace tří látek eradikovala všechny molekulární typy maligního melanomu, např. s mutacemi i bez mutací onkogenů BRAF, NRAS, RAC1 a dalších. Podobný přístup je u melanomu originální, stejně tak je originálních všech pět použitých kombinací cílených léčiv.

Zdůvodnění patentovatelnosti přihlašovaného řešení: Jednak je to z důvodu originality popsaných experimentálních výsledků jde o unikátní možnost použít uvedené látky (které byly vybrány na základě dlouholetého molekulárně-biologického výzkumu melanomu a možných cílů jeho léčby) při terapii melanomu. Uvedené trojkombinace biologicky aktivních chemických inhibitorů nebyly tedy nikdy k uvedenému účelu (ani k léčbě jiných nádorů) testovány (dle dostupné odborné literatury). Uvedení všech pěti trojkombinací v jednom vynálezu zdůvodňujeme chemickou podobností jednotlivých látek, jejich podobností z hlediska biologického negativního vlivu na buněčný růst a jejich mimořádné účinnosti ve všech kombinacích, zvl. v nejvyšších popsaných koncentracích.

Účinky vynálezu

Z obrazové části přihlášky vynálezu je zřejmé ubývání buněk obsahující ať již publikovanou dvojkombinaci GANT61 + obatoclax (méně účinná kombinace) (Obr. 1) nebo všech 5 trojkombinací. Pro srovnání jsou na Obr. 3 ukázány i 4 druhy buněk nádorů slinivky břišní (při použití nejvyšší koncentrace látek, tj. experimenty č. 16-20, viz tabulka 2), na které působí látky jen nepatrně hůře než na buňky melanomu, pouze jedna pankreatická nádorová linie (PANC-1) je vůči substancím odolná. Použití nižších koncentrací látek na melanomové buňky (tabulka 3 exp. 6-10, a Obr. 4) zvýšilo jejich odolnost a při nejnižší koncentraci látek (tabulka 2. exp. 11-15, a Obr. 5) byly již 2 linie melanomu resistantní i 7. den (kromě 5. trojkombinace, která byla účinná u všech typů buněk), ale na 2 další linie trojkombinace působily a buňky byly eradikovány již 5. den (Obr. 5).

Důvod pro výběr 2 základních popsaných látek: První dvě látky (sloučenina 1 a 2), tedy GANT61 a obatoclax, mají synergický účinek a vykazují tzv. syntetickou letalitu při jejich kombinovaném použití na melanomových buňkách (Vlčková K, Réda J, Ondrušová L et al.: GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax. Int J Oncol. 2016, 49(3):953-60). Proto byly zvoleny jako základ každé z pěti trojkombinací. K těmto dvěma sloučeninám byla přidána další 1 látka. Bylo použito 5 dalších účinných látek a tím se dosáhlo i vytvoření pěti různých směsí ("koktejlů"), které byly testovány v různých koncentracích jak rychle eradikují melanomové buňky.

Zdůvodnění výběru dalších 5 použitých látek: Výběr látek vychází z našich mnohaletých zkušeností, experimentů a jejich výsledků u buněk maligního melanomu a z dostupných literárních údajů:

Sloučenina 3 ((+)-JQ1): Jde o inhibitor tzv. BET bromodomén, který silně a specificky inhibuje BET doménu která je obsažena v epigenetickém faktoru BRD4. JQ1 obecně působí jako inhibitor na mnoho nádorů včetně melanomu. Jeho extrémně silný účinek ukazuje na důležitost BRD4 faktoru při onkogenezi. Byl proto vybrán pro jeho velmi silný a specifický účinek na mnoho typů

nádorových buněk vč. melanomu. BRD4 je onkogenní protein s rekurentní translokací u mnoha nádorů a kompetitivní vazba s JQ1 vytlačuje BRD4 onkoprotein z chromatinu.

5 Sloučenina 4 (SGI-7079): Jde o silný inhibitor protein kinázy AXL, která se v poslední době ukazuje jako marker invazivity a onkogenních vlastností melanomových buněk (Sensi M, Catani M, Castellano G, et al.: Human cutaneous melanomas lacking MITF and melanocyte differentiation antigens express a functional Axl receptor kinase. *J Invest Dermatol.* 2011, 131 (12):2448-57). Její hladina je zvýšena v subpopulacích s vysokou invazivitou a její zvýšení doprovází pokles klíčového transkripčního faktoru melanomu MITF (Müller J, Krijgsman O, Tsoi J. et al.: Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. *Nat Commun.* 2014, 5:5712).

15 Sloučenina 5 (GSK343): GSK343 je silný a selektivní inhibitor aktivity faktoru EZH2 (enhancer of zeste homologue 2). Je silně specifický pro EZH2 s 60x větší selektivitou inhibice oproti příbuznému proteinu EZH1, a má >1000x větší selektivitu oproti jiným histon-methyltransferázám. EZH2 je histon metyltransferáza, trimetyluje histon 3 na lysinu 27 (H3K27me3), a je tedy typický epigenetický modulátor. EZH2 je podjednotka tzv. “polycomb repressive complex 2 (PRC2)”. V nádorech včetně melanomu je nalézána vysoká hladina EZH2 a přítomnost H3K27me3 a inhibice EZH2 má výrazný vliv na snížení nádorové progresse melanomu (Gelato KA, Schöckel L, Klingbeil O et al.: Super-enhancers define a proliferative PGC- α -expressing melanoma subgroup sensitive to BET inhibition. *Oncogene* 2018, 37(4):512-521).

25 Sloučenina 6 (GSK126): Tato sloučenina je podobně jako sloučenina 5 silným inhibitorem EZH2. GSK126 is je silný a selektivní inhibitor EZH2 methyltransferázy, rovněž více než 1000x selektivnější pro EZH2 než pro 20 jiných lidských methyltransferáz. Použili jsme tedy tuto látku jako druhou alternativu s podobnými chemickými a biologickými vlastnostmi jako má látka 5. (EZH2 působí jako transkripční aktivátor nebo represor, v závislosti na buněčném kontextu.)

30 Sloučenina 7 (HA15): Tato látka se ukázala v jedné publikované práci jako mimořádně účinná proti melanomovým buňkám (Cerezo M, Lehraiki A, Millet A. et al.: Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance. *Cancer Cell* 2016, 29(6):805-819). Látka překonává známou rezistenci způsobenou aplikací inhibitoru BRAF (mutovaný a aktivovaný onkogen u cca 60% případů melanomu). Specifickým cílem této látky je chaperonový komplex BiP/GRP78/HSPA5 a působení HA15 v buňce má za následek stres endoplasmatického retikula s následnou buněčnou smrtí autofagií a apoptózou (Cerezo M, Rocchi S.: New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. *Autophagy.* 2017, 13(1):216-217).

40 Popis použitých chemických sloučenin (účinných látek). (Citace jsou pouze vhodným výběrem 5 citací pro každou látku z velkého množství existujících citací o příslušné sloučenině.)

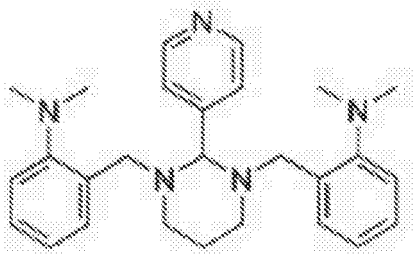
Sloučenina 1:

Triviální název: GANT61, synonymum: NSC136476

45 Chemický název: 2-[[3-[[2-(dimethylamino)fenyl]methyl]-2-pyridin-4-yl]-1,3-diazinan-1-yl]methyl]-N,N-dimethylanilin

Sumární vzorec: C₂₇H₃₅N₅, molekulová hmotnost: 429,6

50 Strukturní vzorec:



Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): GANT61 je inhibitor GLI1- i GLI2- indukované transkripce tím, že znemožňuje vazbu těchto transkripčních faktorů na DNA.

5

Příklady biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): GANT61 je inhibitor funkce GLI1- a GLI2-indukované transkripce, inhibuje signální dráhu Hedgehog s IC50 5 µM v GLI1-exprimujících HEK293T buňkách.

10 Citace (GANT61):

- Vlčková K, Réda J, Ondrušová L et al.: GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclox. *Int J Oncol.* 2016, 49(3):953-60 (12);
- Mazumdar T, DeVecchio J, Shi T et al.: Hedgehog signaling drives cellular survival in human colon carcinoma cells. *Cancer Res.* 2011, 71 (3): 1092-102;
- Wickström M, Dyberg C, Shimokawa T, et al.: Targeting the hedgehog signal transduction pathway at the level of GLI inhibits neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* 2013, 132(7): 1516-24;
- Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, et al.: Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene.* 2017, 36(13): 1849-1861 (17);
- Geng L, Lu K, Li P, et al.: GLI1 inhibitor GANT61 exhibits antitumor efficacy in T-cell lymphoma cells through down-regulation of p-STAT3 and SOCS3. *Oncotarget.* 2017, 8(30):48701 -48710.

25

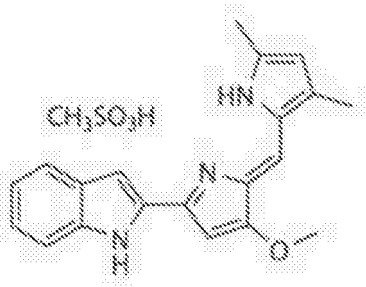
Sloučenina 2:

Triviální název: Obatoclox mezylát, synonymum: GX15-070

30 Chemický název: 2-((3,5-Dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylen)-3-methoxy-2H-pyrrol-5-yl)-1H-indol methansulfonát

Sumární vzorec: C₂₀H₁₉N₃O.CH₄O₃S, molekulová hmotnost: 413,49

35 Strukturní vzorec:

40 Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): antagonist BCL-2 s K_i, 0,22 µM. Obatoclox je BH3 mimetikum vážající se a inhibující široké spektrum členů BCL-2 rodiny, a to BCL-2, Bcl-

xL, a rovněž na Mcl-1.

Příklady biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): Obatoclax kompletně inhibuje oživení funkce Mcl-1 vlivem Bak v konc. 5 μ M v SK-MEL-5 buňkách a překonává rezistenci k ABT-373-indukované apoptóze způsobené vlivem inhibice Mcl-1 v KB/Bcl-2 buňkách.

Je antagonistou antiapoptotického faktoru BCL-2 (K_i je 0,22 μ M v nebuněčném pokusu). Obatoclax se zde používá ve formě mezylátové soli, v literatuře lze najít i odkazy na tartrátovou sůl (sůl kyseliny vinné) nebo hydrochloridovou sůl.

Citace (Obatoclax):

- Huang S, Okumura K, Sinicrope FA.: BH3 mimetic obatoclax enhances TRAIL-mediated apoptosis in human pancreatic cancer cells. Clin Cancer Res. 2009, 15(1): 150-9;
- Vlčková K, Réda J, Ondrušová L et al.: GLI inhibitor GANT61 kills melanoma cells and acts in synergy with obatoclax. Int J Oncol. 2016, 49(3):953-60 (12);
- Nguyen M, Marcellus RC, Roulston A, et al.: Small molecule obatoclax (GX15-070) antagonizes MCL-1 and overcomes MCL-1-mediated resistance to apoptosis. Proc Natl Acad Sci USA. 2007, 104(49): 19512-7 (21);
- Yazbeck VY, Li C, Grandis JR, et al.: Single-agent obatoclax (GX15-070) potently induces apoptosis and pro-survival autophagy in head and neck squamous cell carcinoma cells. Oral Oncol. 2014, 50(2): 120-7;
- Koehler BC, Scherr AL, Lorenz S, et al.: Pan-Bcl-2 inhibitor obatoclax delays cell cycle progression and blocks migration of colorectal cancer cells. PLoS One. 2014, 9(9):e 106571.

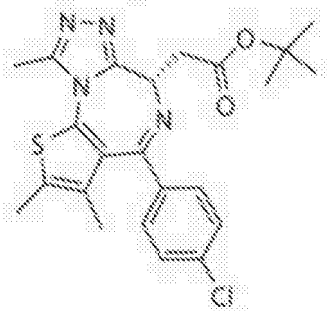
Sloučenina 3:

Triviální název: (+)-JQ1, synonymum: --

Chemický název: (S)-tert-butyl 2-(4-(4-chlorfenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-yl)acetát

Sumární vzorec: $C_{23}H_{25}ClN_4O_2S$, molekulová hmotnost: 456,99

Strukturní vzorec:



Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): (+)-JQ1 je inhibitor tzv. BET bromodomén, $IC_{50}=77$ nM / 33 nM pro BRD4(1/2) protein in vitro, vazba je specifická pouze na rodinu BET proteinů.

Příklady biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): (+)-JQ1 (500 nM) oslabuje rychlou proliferaci NMC 797 a Per403 buněk v kultuře. (+)-JQ1 (50 mg/kg) inhibuje růst nádorů z NMC 797 buněk na nude myších.

Látka je inhibítozem BET bromodomén, s IC₅₀ 77 nM a 33 nM for BRD4(1), resp. BRD4(2) v nebuněčném pokusu in vitro.

5 Citace (JQ1):

- Shao Q, Kannan A, Lin Z, et al.: BET protein inhibitor JQ1 attenuates Myc-amplified MCC tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2014, 74(23):7090-102;
- Korkut A, Wang W, Demir E. et al.: Perturbation biology nominates upstream-downstream drug combinations in RAF inhibitor resistant melanoma cells. *Elite.* 2015, 18;4;
- 10 - De Raedt T, Beert E, Pasmant E, et al.: PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies. *Nature.* 2014, 514(7521):247-51;
- Segura MF, Fontanals-Cirera B, Gaziel-Sovran A et al.: BRD4 sustains melanoma proliferation and represents a new target for epigenetic therapy. *Cancer Res.* 2013, 73(20):6264-76 (22);
- 15 - Filippakopoulos P, Qi J, Picaud S et al.: Selective inhibition of BET bromodomains. *Nature.* 2010, 468(7327): 1067-73.

Sloučenina 4:

20

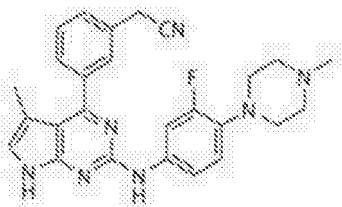
Triviální název: SGI-7079, synonymum: CFIEMBL3809908;

Chemický název: 2-(3-(2-((3-Fluoro-4-(4-methylpiperazin-1-yl)fenyl)amino)-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)fenyl)acetonitril

25

Sumární vzorec: C₂₆H₂₆FN₇, molekulová hmotnost: 455,53

Strukturní vzorec:



30

Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): nový selektivní inhibitor tyrosin kinázy AXL (K_i = 5,7 nM).

- 35 Příklad biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): je účinný (K_i=5,7 nM) v inhibici aktivity kinázy AXL in vitro a inhibuje Gas6 liganden-indukovanou tyrosinovou fosforylaci lidské AXL exprimované v HEK293T buňkách (EC₅₀=100 nM), inhibuje růst nádorů v závislosti na koncentraci.

40 Citace (SGI-7079):

- Byers LA, Diao L, Wang J, et al.: An epithelial-mesenchymal transition gene signature predicts resistance to EGFR and PI3K inhibitors and identifies Axl as a therapeutic target for overcoming EGFR inhibitor resistance. *Clin Cancer Res.* 2013, 19(1):279-90;
- 45 - Myers SH, Brunton VG, Unciti-Broceta A: AXL Inhibitors in Cancer: A Medicinal Chemistry Perspective. *J Med Chem.* 2016 Apr 28;59(8):3593-608;
- Sensi M, Catani M, Castellano G, et al.: Human cutaneous melanomas lacking MITF and melanocyte differentiation antigens express a functional Axl receptor kinase. *J Invest Dermatol.*

2011, 131 (12):2448-57;

- Müller J, Krijgsman O, Tsoi J. et al.: Low MITF/AXL ratio predicts early resistance to multiple targeted drugs in melanoma. Nat Commun. 2014, 5:5712 (23);

- 5 - Miller MA, Oudin MJ, Sullivan RJ. Et al.: Reduced Proteolytic Shedding of Receptor Tyrosine Kinases Is a Post-Translational Mechanism of Kinase Inhibitor Resistance. Cancer Discov. 2016, 6(4):382-99.

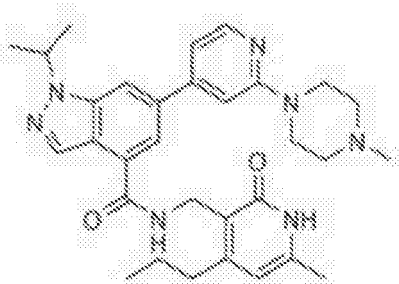
Sloučenina 5:

- 10 Triviální název: GSK343, synonymum: 1346704-33-3

Chemický název: N-[(6-methyl-2-oxo-4-propyl-1H-pyridin-3-yl)methyl]-6-[2-(4-methyl-piperazin-1-yl)pyridin-4-yl]-1-propan-2-ylindazol-4-karboxamid

- 15 Sumární vzorec: $C_{31}H_{39}N_7O_2$, molekulová hmotnost: 541,69

Strukturní vzorec:



20

Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): silný a selektivní inhibitor EZH2 proteinu s $IC_{50}=4$ nM v in vitro reakci, ukazující 60x větší selektivitu oproti EZH1, a je 1000x více selektivní pro EZH2 i ve srovnání s 20 jinými lidskými methyltransferázami. Příklad biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): Inhibuje trimethylaci lysinu H3K27 (H3K27me3) s $IC_{50}=174$ nM v nádorových buňkách prsní žlázy HCC1806, silně inhibuje buněčnou proliferaci v nádorových buňkách prsní žlázy a prostaty (nádorová linie prostaty LNCaP je nejvíce sensitivní k GSK343, s $IC_{50}=2,9$ μ M).

25

Citace (GSK343):

30

- Yu H, Ma M, Yan J. et al.: Identification of coexistence of BRAF V600E mutation and EZH2 gain specifically in melanoma as a promising target for combination therapy. J Transl Med. 2017, 15(1):243;

35

- Poirier JT, Gardner EE, Connis N. et al.: DNA methylation in small cell lung cancer defines distinct disease subtypes and correlates with high expression of EZH2. Oncogene. 2015, 34(48):5869-78;

- Fane ME, Chhabra Y, Hollingsworth DEJ et al.: NFIB Mediates BRN2 Driven Melanoma Cell Migration and Invasion Through Regulation of EZH2 and MITF. EBioMedicine. 2017, 16:63-75;

40

- Souroullas GP, Jeck WR, Parker JS et al.: An oncogenic Ezh2 mutation induces tumors through global redistribution of histone 3 lysine 27 trimethylation. Nat Med. 2016, 22(6):632-40;

- Mahmoud F, Shields B, Makhoul I et al.: Role of EZH2 histone methyltransferase in melanoma progression and metastasis. Cancer Biol Ther. 2016, 17(6):579-91.

45

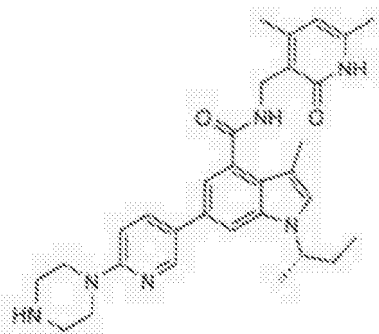
Sloučenina 6:

Triviální název: GSK126, synonymum: 1346574-57-9

Chemický název: 1-[(2S)-butan-2-yl]-N-[(4,6-dimethyl-2-oxo-1H-pyridin-3-yl)methyl]-3-methyl-6-(6-piperazin-1-yl)pyridin-3-ylindol-4-karboxamid

5 Sumární vzorec: $C_{31}H_{38}N_6O_2$, molekulová hmotnost: 526,87

Strukturní vzorec:



10

Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): účinný, velmi selektivní inhibitor EZH2 methyltransferázy s $IC_{50}=9,9$ nM, >1000x více selektivní pro EZH2 ve srovnání s 20 jinými lidskými methyltransferázami.

15

Příklad biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): silně inhibuje methylaci na H3K27me3 (trimethylace lysinu 27 v histonu H3) a H3K27me3 v EZH2 divokých i mutantních DLBCL buňkách. Efektivně inhibuje proliferaci EZH2 mutantních DLBCL buněčných linií a indukuje transkripční aktivaci cílových genů pro EZH2 v senzitivních buněčných liniích. V H2087 buňkách inhibuje expresi VEGF-A a fosforylované kinázy Ser(473)-AKT, čímž způsobuje inhibici buněčné proliferace, migrace a metastázování.

20

Citace (GSK126):

- McCabe MT, Ott HM, Ganji G et al.: EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. Nature 2012, 492(7427): 108-12;
- Tiffen J, Wilson S, Gallagher SJ et al.: Somatic Copy Number Amplification and Hyperactivating Somatic Mutations of EZH2 Correlate With DNA Methylation and Drive Epigenetic Silencing of Genes Involved in Tumor Suppression and Immune Responses in Melanoma. Neoplasia. 2016, 18(2): 121-32;
- Fisher ML, Adhikary G, Grun D et al.: The Ezh2 polycomb group protein drives an aggressive phenotype in melanoma cancer stem cells and is a target of diet derived sulforaphane. Mol Carcinog. 2016, 55(12):2024-2036;
- Tiffen JC, Gunatilake D, Gallagher SJ et al.: Targeting activating mutations of EZH2 leads to potent cell growth inhibition in human melanoma by derepression of tumor suppressor genes. Oncotarget. 2015, 6(29):27023-36 (24);
- Ott HM, Graves AP, Pappalardi MB et al.: A687V EZH2 is a driver of histone H3 lysine 27 (H3K27) hypertrimethylation. Mol Cancer Ther. 2014, 13(12):3062-73.

Sloučenina 7:

40

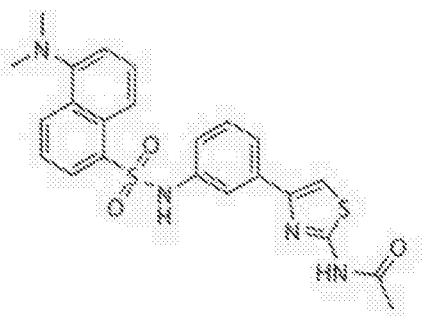
Triviální název: HA15, synonymum: 1609402-14-3

Chemický název: N-[4-[3-[[5-(dimethylamino)naftalen-1-yl]sulfonylamino]fenyl]-1,3-thiazol-2-yl]acetamid

45

Sumární vzorec: $C_{23}H_{22}N_4O_3S_2$, molekulová hmotnost: 466,58

Strukturní vzorec:



5

Farmakologický účinek (dle selleckchem.com): HA15 je molekula specificky inhibující proteinový complex BiP/GRP78/HSPA5.

10

Příklad biologického účinku in vitro nebo in vivo (dle selleckchem.com): HA15 indukuje stress endoplasmatického retikula vedoucí k buněčné smrti in vitro a překonává rezistenci vůči BRAF inhibitoru v melanomových buňkách. IC50 nebylo zatím stanoveno.

Citace (HA15):

15

- Cerezo M, Lehraiki A, Millet A. et al.: Compounds Triggering ER Stress Exert Anti-Melanoma Effects and Overcome BRAF Inhibitor Resistance. Cancer Cell 2016, 29(6):805-819;

- Cerezo M, Rocchi S.: New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. Autophagy. 2017, 13(1):216-217;

20

- Cerezo M, Rocchi S: New anti-cancer molecules targeting HSPA5/BIP to induce endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis. Autophagy. 2017, 13(1):216-217;

- Ruggiero C, Doghman-Bouguerra M, Ronco C et al.: The GRP78/BIP inhibitor HA15 synergizes with mitotane action against adrenocortical carcinoma cells through convergent activation of ER stress pathways. Mol Cell Endocrinol. 201, pii: S0303-7207(18):30070-4;

25

- Moriya C, Taniguchi H, Nagatoishi S et al.: PRDM14 directly interacts with heat shock proteins HSP90a and glucose-regulated protein 78. Cancer Sci. 201, 109(2):373-383.

Objasnění výkresů

30

Obr. 1: Publikovaná (citace (12)) experimentální terapie v buněčné kultuře dvojkombinací sloučenin GANT61 a obatoclax (který byl v tomto experimentu v koncentraci pouze 100 nM, na rozdíl od trojkombinací, a neměl zde jako samotná aplikovaná látka téměř žádný účinek na melanomové buňky). Obrázek převzatý z publikace (12).

35

Obr. 2: Experimenty provedené při nejvyšších koncentracích (nepublikovaný experiment). Lze z něj jasně usoudit, že všemi pěti trojkombinacemi protinádorových sloučenin při nejvyšších použitých koncentracích (tabulka 2, experimenty č. 1-5) bylo všech 6 typů melanomových buněk v kultuře zcela eradikováno ve velmi krátké době (max. po pěti dnech). Označení K. 1, K. 2, atd. v Obr. 2 vždy značí číslo použité trojkombinace (K jako kombinace nebo koktejl). Toto je tedy hlavní (a velmi vydařený) výsledek experimentální části přihlášky.

40

Obr. 3: Srovnání účinnosti použitých trojkombinací na nádorových buňkách slinivky břišní (nepublikovaný experiment). Tyto buňky byly o něco více rezistentní při nejvyšší koncentraci látek (další koncentrace nebyly testovány), zcela rezistentní byla buněčná linie PANC-1, která byla eradikována pouze první trojkombinací až 7. den po její aplikaci na buňky. Označení K. 1, K. 2, atd. v Obr. 3 vždy značí číslo použité trojkombinace.

45

Obr. 4: Experimenty provedené při středních koncentracích (nepublikovaný experiment). Lze z něj usoudit, že při středních použitých koncentracích látek (tabulka 2, exp. 6-10) se zhoršuje eradikace buněk a prodlužuje se doba jejich přežívání (kromě linie SK-MEL-3, která je velmi
 5 sensitivní). Nicméně s výjimkou buněčné linie SK-MEL-28 jsou i při těchto koncentracích všechny buňky eradikovány nejpozději 7. den experimentu, a to u všech pěti typů kombinací. Označení K. 1, K. 2, atd. v Obr. 4 vždy značí číslo použité trojkombinace.

Obr. 5: Experimenty provedené při nejnižších koncentracích (nepublikovaný experiment). Lze z
 10 něj jasně usoudit, že v nejnižších použitých koncentracích látek (tabulka 2, exp. 11-15) trojkombinací protinádorových sloučenin byly u dvou buněčných linií melanomových buněk (501 mel a SK-MEL-3) buňky zcela eradikovány ve velmi krátké době (max. po pěti dnech), a to všechny buňky u všech pěti “koktejlů”. Naopak dvě buněčné linie (MeWo a SK-MEL-28) již byly k aplikaci léčiv až do 7. dne rezistentní, kromě kombinace č. 5, kdy byly buňky eradikovány
 15 již 3., resp. 5. den experimentu. Označení K. 1, K. 2 atd. v Obr. 5 vždy značí číslo použité trojkombinace). Opět se ukázalo, že buněčná linie SK-MEL-3 je velmi sensitivní i k nízkým koncentracím látek.

Způsob provádění testů

20 Testování přežívání buněk po jednotlivých dnech bylo provedeno metodou tzv. “colony forming assay”. Buňky byly rozesety do jamek a po jejich přilnutí k plastikovému povrchu (všechny typy buněk byly adherentní buňky) byl další den považován za den 0, kdy byly přidány látkové kombinace. Další den byl pak označen den 1 atd. Analýza množství zbývajících buněk byla
 25 provedena ve dnech 1, 3, 5 a 7. Tmavá pole reprezentují přítomnost buněk, světlá pole ukazují na nepřítomnost buněk. Každá buněčná linie obsahuje kontroly, kam bylo přidáváno pouze rozpouštědlo (v levém sloupci na Obr. 2-5, na Obr. 1 jsou kontroly v horní řadě). Některé látky byly rozpouštěny v dimethylsulfoxidu (DMSO), některé v etanolu. Ke kontrolám byla tedy přidávána jen směs DMSO/etanol 3:2. K buňkám byla vždy přidána 1/1000 objemu “stocku”
 30 (koncentrovaného zásobního roztoku) každé z trojkombinací látek. Výsledky byly kvantifikovány pomocí software ImageJ (hodnoty jsou ukázány v tabulkách č. 3-6 a ukazují stejně jako obrázky dostatečně zřejmě účinek látek). Kvantifikace Obr. č. 1 je ukázána přímo v obrázku (jen hlavní čísla) a protože jde o obrázek převzatý z vydané publikace, je ponechán nezměněn. Z tabulek je zřejmé, že v “prázdných” polích již je rel. hodnota 0 nebo jen zcela nepatrně nad nulou (tzn.
 35 buňky byly látkami zničeny). V kontrolách, zvl. 7. den jsou relativní hodnoty velmi vysoké. Na první pohled je jasná např. úplná eradikace všech typů buněk melanomu max. již ve dni 5 (Obr. 2). Jako kontrolu jsme použili pro srovnání na léčbu obecně velmi rezistentní buňky nádoru pankreatu (Obr. 3). Tyto 4 typy nádoru slinivky břišní byly o něco více rezistentní než melanomy, ale ke dni 7 byly též eradikovány. Výjimkou byla linie PANC-1, která byla
 40 eradikována po 7 dnech pouze první trojkombinací látek, k ostatním kombinacím byly tyto buňky i po 7 dnech rezistentní.

Příklady uskutečnění vynálezu

45 V této přihlášce jde o jedinečné provedení vynálezu, které spadá do širokého obsahu řešení “vhodné kombinace protinádorových léčiv použitelné od počátku nádorové léčby”. Byla prokázána 100% účinnost u všech pěti trojkombinací léčiv na buněčných kulturách melanomových buněk v jedné (nejvyšší) koncentraci. Byly použity různé, přesně definované
 50 koncentrace látek a autentické výsledky jsou demonstrovány na obrázcích. Při použití nižších koncentrací se začala projevovat různá citlivost melanomových linií na jednotlivé trojkombinace a pochopitelně se prodloužila i doba eradikace buněk. Souhrnně však ve všech experimentech byly melanomové buňky eradikovány (až na 2 výjimečně rezistentní buněčné linie při nejnižších koncentracích sloučenin - Obr. 5) nejpozději do 7 dnů od aplikace léčiva.

Způsob přípravy pěti trojkombinací léčiv a jejich aplikace na buňky v buněčné kultuře:

Tabulka 1

5 Tabulka látek použitých v pěti testovaných kombinacích ("koktejlech")

Obsah látek v jednotlivých trojkombinacích:	
Trojkombinace č. I: Sloučenina 1 + Sloučenina 2 + Sloučenina 3	
Trojkombinace č. II: Sloučenina 1 + Sloučenina 2 + Sloučenina 4	
Trojkombinace č. III: Sloučenina 1 + Sloučenina 2 + Sloučenina 5	
Trojkombinace č. IV: Sloučenina 1 + Sloučenina 2 + Sloučenina 6	
Trojkombinace č. V: Sloučenina 1 + Sloučenina 2 + Sloučenina 7	

10 Příprava látek před přidáním na buňky: Kontrolní roztok (bez přidání inhibitorů), použitý i pro doplnění objemu na 1000x pracovní koncentraci po příslušném naředění všech látek v etanolu nebo DMSO dle pokynů výrobce (selleckchem.com) ve všech kombinacích: 2 díly etanolu (100%) + 3 díly dimethylsulfoxidu (DMSO, 100%). Všechny kombinace v 1000x pracovní koncentraci pak byly 1000x naředěny na konečnou koncentraci 1x v příslušném kultivačním médiu a aplikovány na buňky. 1000x ředěný kontrolní roztok nemá již jako 1x kontrolní roztok žádný vliv na buněčný růst. Konečné ("pracovní") koncentrace všech látek (aplikované na buňky) jsou uvedeny pro každý experiment v Tabulce 2.

15

Tabulka 2

Tabulka konečných ("pracovních") koncentrací všech v kombinacích použitých látek. Uvedené koncentrace jsou tedy přítomny v médiu na buňkách během celého pokusu (den 1-7).

20

Exp. č.	GANT61	Obatoclax	(+)-JQ1	SGI-7079	GSK343	GSK126	HA15	Obr. č.	Tu.
1	20 µM	300 nM	500 nM	0	0	0	0	2	m.
2	20 µM	300 nM	0	500 nM	0	0	0	2	m.
3	20 µM	300 nM	0	0	1,0 µM	0	0	2	m.
4	20 µM	300 nM	0	0	0	100 nM	0	2	m.
5	20 µM	300 nM	0	0	0	0	10 µM	2	m.
6	10 µM	150 nM	250 nM	0	0	0	0	4	m.
7	10 µM	150 nM	0	250 nM	0	0	0	4	m.
8	10 µM	150 nM	0	0	0,5 µM	0	0	4	m.
9	10 µM	150 nM	0	0	0	50 nM	0	4	m.
10	10 µM	150 nM	0	0	0	0	5 µM	4	m.
11	10 µM	150 nM	125 nM	0	0	0	0	5	m.

12	10 µM	150 nM	0	125 nM	0	0	0	5	m.
13	10 µM	150 nM	0	0	0,25 µM	0	0	5	m.
14	10 µM	150 nM	0	0	0	25 nM	0	5	m.
15	10 µM	150 nM	0	0	0	0	2,5 µM	5	m.
16	20 µM	300 nM	500 nM	0	0	0	0	3	pa.t.
17	20 pM	300 nM	0	500 nM	0	0	0	3	pa.t.
18	20 pM	300 nM	0	0	1,0 µM	0	0	3	pa.t.
19	20 pM	300 nM	0	0	0	100 nM	0	3	pa.t.
20	20 pM	300 nM	0	0	0	0	10 µM	3	pa.t.

Vysvětlivky k Tabulce 2: M = mol/l, Exp. = experiment, Tu. = typ nádoru, m. = melanom, pa.t. = tumor pankreatu (pokus s těmito nádorovými buňkami byl proveden pro srovnání pouze s nejvyšší koncentrací účinných látek, exp. 16-20).

5

Tabulka 3

Kvantifikace denzity buněk k Obr. 2 (jednotlivé buňky tabulky se shodují s políčky obrázku).

10

501mel

14314	5929	7387	7735	8324	8096
18112	0	1168	0	0	0
18253	0	0	0	0	0
18763	0	0	0	0	0

Hbl

8568	2275	5220	4368	4316	4651
13059	0	0	0	0	0
14944	0	0	0	0	0
17160	0	0	0	0	0

MeWo

3001	1612	1575	2902	3652	3560
8656	609	812	482	779	190
10297	0	0	0	0	0
11607	0	0	0	0	0

15

SK-MEL-3

4516	3007	3118	3330	2889	2942
8932	0	0	237	0	0
9916	0	0	0	0	0
10130	0	0	0	0	0

SK-MEL-5

3741	1130	1901	2341	2284	2934
8840	0	0	0	0	0
9918	0	0	0	0	0
11074	0	0	0	0	0

SK-MEL-28

6391	4320	3774	4911	5111	6529
11717	945	3381	2652	3307	2326
11890	0	0	0	0	0
12872	0	0	0	0	0

5 Tabulka 4

Kvantifikace denzity buněk k Obr. 3 (jednotlivé buňky tabulky se shodují s políčky obrázku).

BxPC-3:

2269	1804	1081	2331	1881	2058
4683	408	793	2683	2184	2053
7734	0	0	0	0	0
10128	0	0	0	0	0

MiaPaca

5743	1974	1446	3504	3511	2536
11878	310	540	2410	1004	432
12444	0	0	32	0	0
12813	0	0	0	0	0

PANC-1

1595	1814	2087	2491	2958	2787
9366	2787	4602	4896	4651	3710
13680	1260	3832	5510	5729	4340
13968	120	1536	2532	4562	2793

10

PA-TU-8902

4729	2740	2585	3731	3234	3430
12567	1799	3077	5123	4327	5203
14227	479	1861	1196	1257	1959
14571	0	0	0	0	0

Tabulka 5

15 Kvantifikace denzity buněk k Obr. 4 (jednotlivé buňky tabulky se shodují s políčky obrázku).
501mel

17111	6711	7383	9123	10637	12052
36330	0	0	0	0	0
39847	0	0	0	0	0
43575	0	0	0	0	0

MeWo

12505	10976	9554	12236	13416	13244
25141	6609	10539	8944	9166	6913
39702	8941	5051	3063	3853	2353
41377	2856	1589	1118	0	0

SK-MEL-3

15008	5518	5368	7881	7776	8154
27964	0	0	0	0	0
38400	0	0	0	0	0
40889	0	0	0	0	0

SK-MEL-28

14026	4653	8459	9254	7678	8065
27937	4821	8975	4684	8115	8458
40758	698	801	861	1515	8205
45725	165	768	2358	172	2568

5

Tabulka 6

Kvantifikace denzity buněk k Obr. 5 (jednotlivé buňky tabulky se shodují s políčky obrázku).

10

501mel

27840	13994	13013	11286	11881	13946
39380	2957	101	82	945	329
39450	153	0	0	0	0
43242	0	0	0	0	0

MeWo

15157	11579	14592	14620	14504	11384
28603	16208	19532	15041	19111	0
39648	20253	22409	22504	29771	0
42893	32419	32566	11411	20209	0

SK-MEL-3

16040	6589	10585	5374	7665	6639
36702	689	325	258	228	371
37212	0	0	0	0	0
39725	0	0	0	0	0

15

SK-MEL-28

28343	15376	19922	14626	16404	13676
38456	33239	32573	42435	46258	25451
42017	25679	36106	36241	37751	0
44002	27098	40063	41511	41319	0

5

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Farmaceutický přípravek pro léčení maligního melanomu obsahující kombinaci účinných látek, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci tří účinných látek

10

a) GANT61, tj. 2-[[3-[[2-(dimethylamino)fenyl]methyl]-2-pyridin-4-yl-1,3-diazinan-1-yl]methyl]-N,N-dimethylanilin;

15

b) Obatoclax, tj. 2-(2-((3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylen)-3-methoxy-2H-pyrrol-5-yl)-1H-indol a

c) látku vybranou ze skupiny sestávající z

20

c1) (+)-JQ1, tj. (S)-tert-butyl 2-(4-(4-chlorfenyl)-2,3,9-trimethyl-6H-thieno[3,2-f][1,2,4]triazolo[4,3-a][1,4]diazepin-6-yl)acetát;

c2) SGI-7079, tj. 2-(3-(2-((3-Fluoro-4-(4-methylpiperazin-1-yl)fenyl)amino)-5-methyl-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidin-4-yl)fenyl)acetonitril;

25

c3) GSK343, tj. N-[(6-methyl-2-oxo-4-propyl-1H-pyridin-3-yl)methyl]-6-[2-(4-methylpiperazin-1-yl)pyridin-4-yl]-1-propan-2-ylindazol-4-karboxamid;

30

c4) GSK126, tj. 1-[(2S)-butan-2-yl]-N-[(4,6-dimethyl-2-oxo-1H-pyridin-3-yl)methyl]-3-methyl-6-(6-piperazin-1-ylpyridin-3-yl)indol-4-karboxamid;

c5) HA15, tj. N-[4-[3-[[5-(dimethylamino)naftalen-1-yl]sulfonylamino]fenyl]-1,3-thiazol-2-yl]acetamid;

35

přičemž koncentrace účinných látek potřebných pro eradikaci nádorových buněk je následující:

a) GANT61 10 až 20 $\mu\text{mol/l}$; b) obatoclax 150 až 300 nmol/l ; c1) (+)-JQ1 125 až 500 nmol/l ; c2) SGI-7079 125 až 500 nmol/l ; c3) GSK343 0,25 až 1,0 $\mu\text{mol/l}$; c4) GSK126 25 až 100 nmol/l ; ac5) HA15 2,5 až 10 $\mu\text{mol/l}$.

40

2. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci tří účinných látek:

a) GANT61 v koncentraci 10 až 20 $\mu\text{mol/l}$;

45

b) obatoclax v koncentraci 150 až 300 nmol/l a

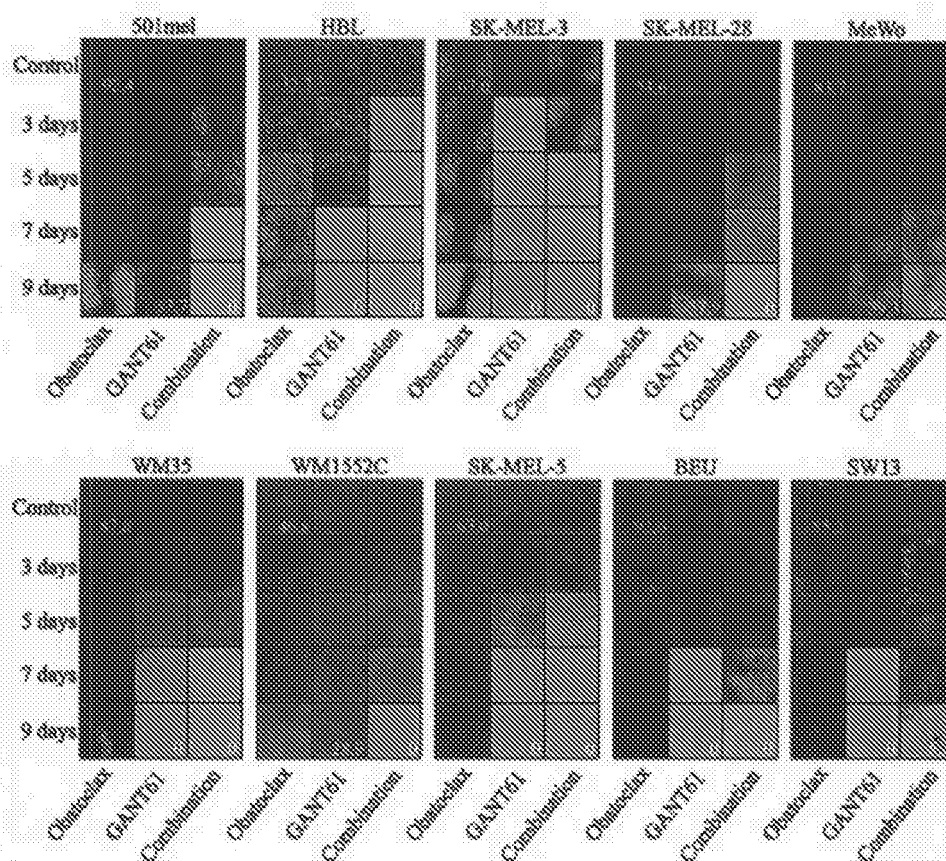
c) látku vybranou ze skupiny sestávající z

c1) (+)-JQ1 v koncentraci 250 až 500 nmol/l ;

50

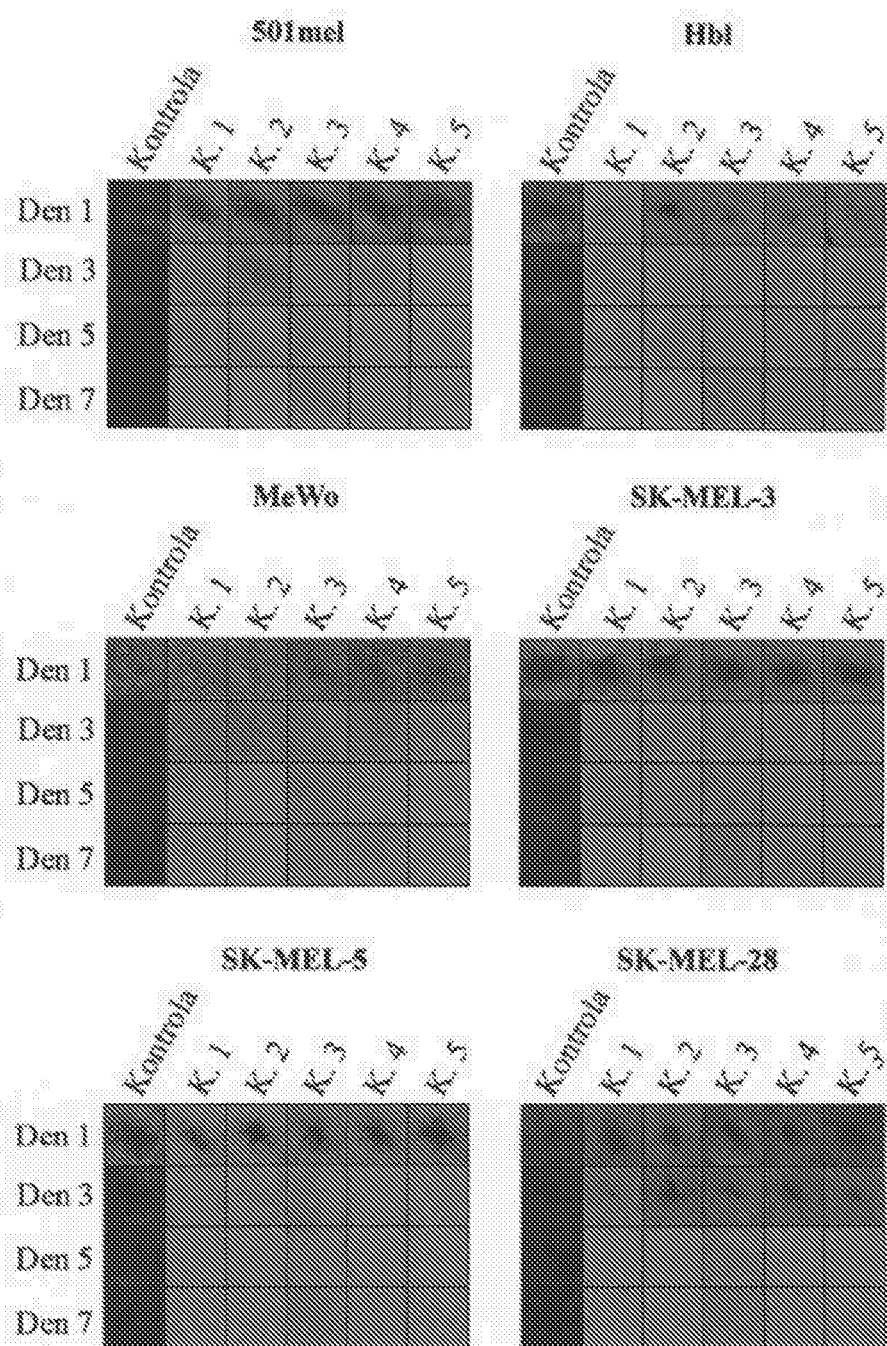
- c2) SGI-7079 v koncentraci 250 až 500 nmol/l;
- c3) GSK343 v koncentraci 0,5 až 1,0 $\mu\text{mol/l}$;
- 5 c4) GSK126 v koncentraci 50 až 100 nmol/l;
- c5) HA15 v koncentraci 5 až 10 $\mu\text{mol/l}$.
- 10 3. Farmaceutický přípravek podle nároku 1 nebo 2, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci tří účinných látek:
- a) GANT61 v koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$;
- 15 b) obatoclox v koncentraci 300 nmol/l a
- c) látku vybranou ze skupiny sestávající z
- cl) (+)-JQ1 v koncentraci 500 nmol/l;
- 20 c2) SGI-7079 v koncentraci 500 nmol/l;
- c3) GSK343 v koncentraci 1,0 $\mu\text{mol/l}$;
- 25 c4) GSK126 v koncentraci 100 nmol/l;
- c5) HA15 v koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$.
- 30 4. Farmaceutický přípravek podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje kombinaci tří účinných látek:
- a) GANT61 v koncentraci 10 až 20 $\mu\text{mol/l}$;
- b) obatoclox v koncentraci 150 až 300 nmol/l a
- 35 c5) HA15 v koncentraci 2,5 až 10 $\mu\text{mol/l}$.
- 40 5. Farmaceutický přípravek podle kteréhokoliv z nároků 1 až 4, vyznačující se tím, že účinná látka obatoclox je ve formě mezylátové soli, tj. 2-(2-((3,5-dimethyl-1H-pyrrol-2-yl)methylen)-3-methoxy-2H-pyrrol-5-yl)-1H-indol methansulfonát.

5 výkresů

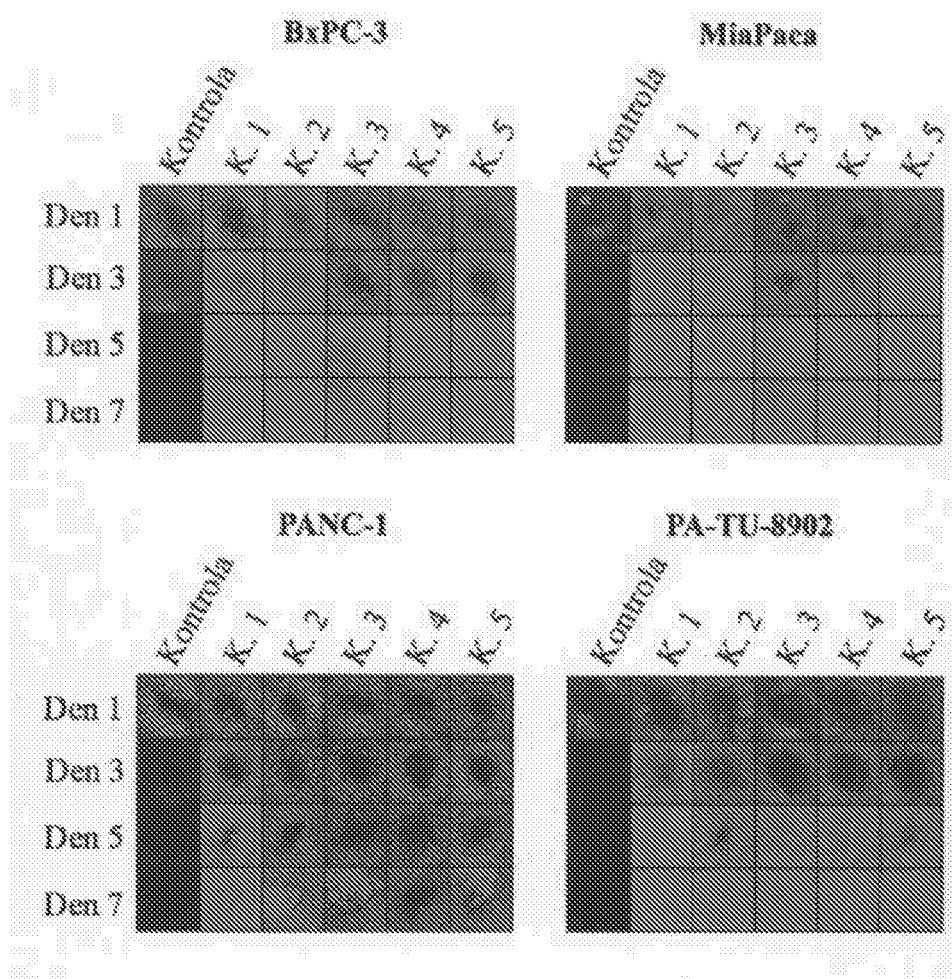


(publik. v Int. J. Oncol. 46, 2016, 953-960, Vlčková et al.)

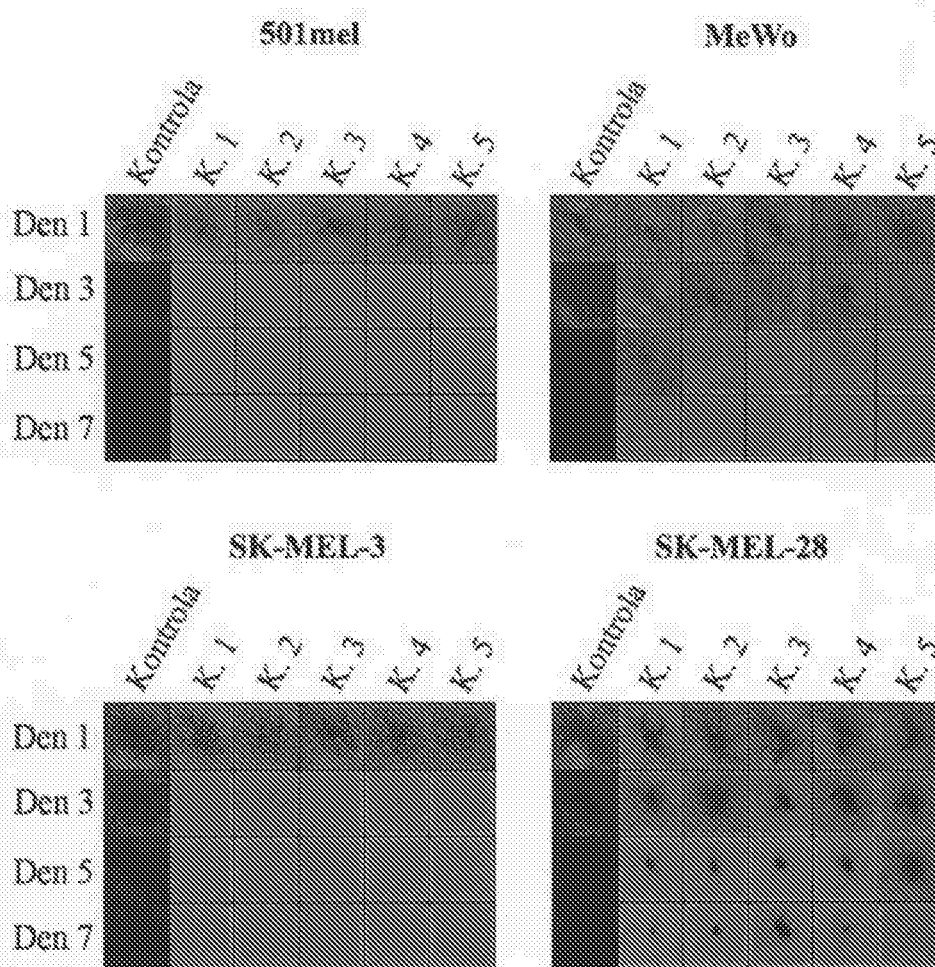
Obr. 1



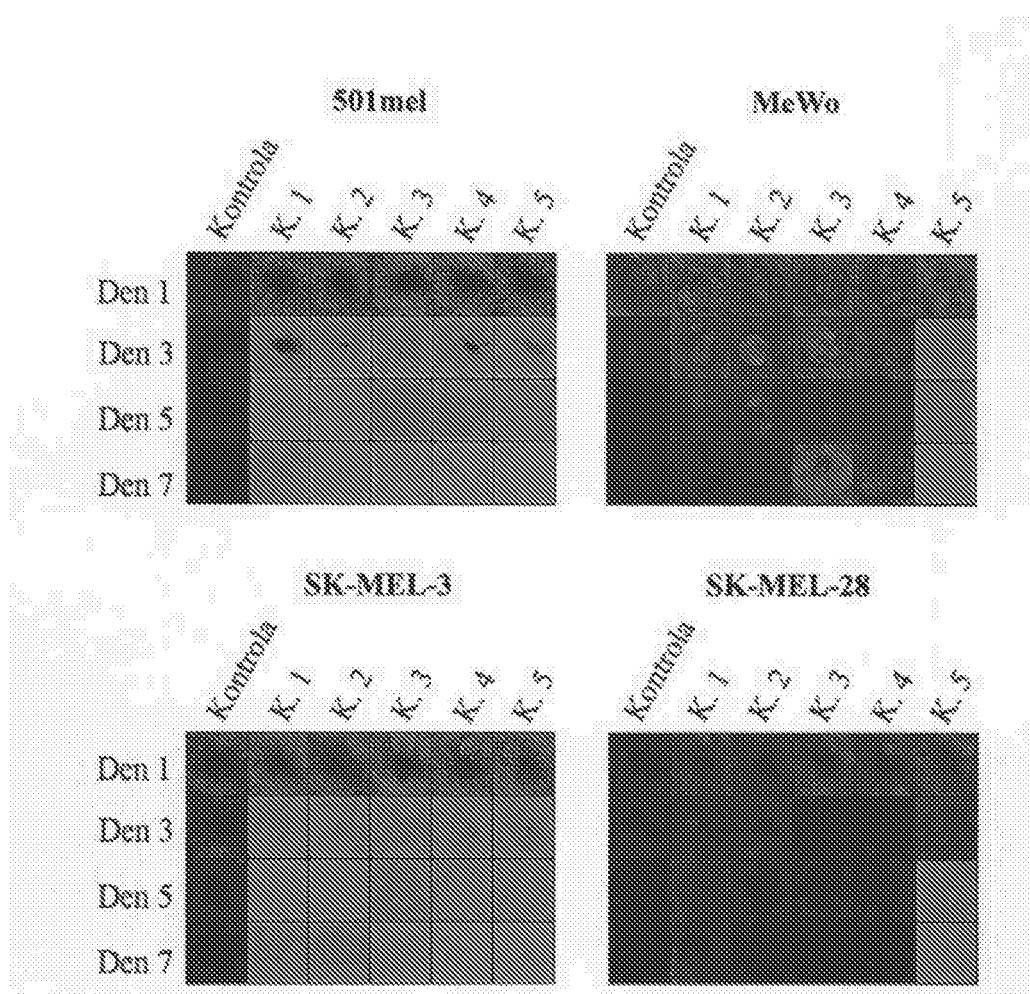
Obr. 2



Obr. 3



Obr. 4



Obr. 5