

2022D-0017

Darovací smlouva

dle § 2055 a násl. zákona č.89/2012 Sb.
občanského zákoníku

Název instituce: Liga proti rakovině Praha z.s.
Zastoupená: xxx
Adresa: Na Truhlářce 100/60, 180 81 Praha 8
IČO: 00571555
DIČ: CZ00571555
Bankovní spojení: xxx
Číslo účtu: xxx
Registrace: Městský soud v Praze, oddíl L, SP. zn. 2370

Obdarovaný:

Název instituce: Univerzita Karlova veřejná vysoká škola
podle z.č. 111/1998 Sb., o vysokých školách,
v platném znění, do obchodního rejstříku se
nezapíše
Sídlo: Ovocný trh 560/5, 116 36 Praha 1
ID datové schránky: piyj9b4
IČO: 00216208
DIČ: CZ00216208
Ve věci součástí: 1. lékařská fakulta
Kontaktní adresa: Kateřinská 32, 121 08 Praha 2
Zastoupená: xxx
Bankovní
spojení:
Dárce:

Uzavírají tuto smlouvu:

1.

Dárce poskytne peněžní dar z výtěžku sbírky Český den proti rakovině ve výši 450.000,- Kč (slovy čtyřistapadesátitisíkorunčeských) obdarovanému. Dar bude využit na podporu vědecké činnosti, a sice na podporu projektu: Experimentální a preklinická cílená kombinovaná léčba maligního melanomu, prováděného v Ústavu lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha a na Ill. Chirurgické klinice 1. LF UK a FN v Motole.

xxx

Řešitelé: xxx

Obdarovaný je právnickou osobou se sídlem na území České Republiky.

Obdarovaný tento dar přijímá a použije jej k účelu, uvedeném v čl. 1. této smlouvy. V případě, že dar nebude použit obdarovaným na účel uvedený v bodu 1., vyhrazuje si dárce právo na navrácení daru v plné výši. IV. Peněžní dar bude vyplacen převodem na výše uvedený účet do 14 dnů po uzavření smlouvy. Obdarovaný podpisem této smlouvy potvrzuje její platnost.

Obě strany se zavazují, že budou o daru účtovat ve svém účetnictví v souladu s touto smlouvou.

Vl.

Obdarovaný potvrzuje, že poskytovaná částka souhlasí s příloženým rozpisem rozpočtu výdajů. Obdarovaný je povinen sledovat použití finančních prostředků v členění podle tohoto rozpočtu a o čerpání podat zprávu do 1 roku od podpisu smlouvy. Součástí zprávy musí být členěná účetní sestava podle jednotlivých položek tohoto rozpočtu včetně příložených kopií dokladů o uskutečněných nákladech. VII.

Obdarovaný se zavazuje uvádět u publikací, že práce byla finančně podporována Ligou proti rakovině Praha a u investic označit štítkem, že nákup byl realizován s podporou Ligy proti rakovině Praha. Vlil.

Tato smlouva je vyhotovena ve dvou originálech, přičemž každá smluvní strana obdrží jedno vyhotovení. Smlouva nabývá platnosti dnem podpisu obou smluvních stran a podléhá povinnému uveřejnění podle z. č. 340/2015 Sb., o registru smluv.

V Praze, dne .

.....

obdarovaný

Návrh na výši finanční podpory: 450 000,- Kč

Rozpočet:

Pouze neinvestiční náklady, zdůvodnění (ceny s DPH):

Běžný spotřební materiál na jedno použití-zkumavky a pipetovací špičky, NUNC zkumavky, plastické nádoby (lahve, misky, platička) pro buněčné kultivace (50 tis. Kč.),

Speciální chemikálie, média pro buněčné kultivace, fetální telecí séra a suplementy pro kultivaci buněk v kultuře (80 tis. Kč.),

Bujony a chemikálie pro růst bakterií, plastický materiál pro bakteriální kultivace (30 tis. Kč.)

Enzymy pro klonování (přípravu rekombinantní) DNA, enzymy pro PCR (30 tis. Kč.),

Oligonukleotidy pro všechny aplikace (klonování, mutagenese, PCR, realtime PCR (včetně modifikovaných a značených oligonuleotidů 60 tis. Kč.)

Speciální chemikálie —inhibitory signálních drah a epigenetické inhibitory, též agonisté sign. drah atd., pro použití v buněčných kulturách, popř. v experimentech na myších (většinou od firem Selleckchem, LC labs, RD systems) (50 tis. Kč).

Služby (například sekvenování DNA) (50 tis. Kč).

Nude myši (100 tis Kč) pouze část nutného počtu (asi 20 myší). POZN: pouze pokud zbude celá plánovaná částka. Výše uvedené položky mohou být event. nepředpokládaně vyšší. Finanční zdroj na nude myši (kmen NSG, 1 myš 5000,-Kč) bude též k dispozici z jiného zdroje.

9. Bankovní spojení a přesné číslo bankovního účtu:

xxx Komerční banka, Na Příkopě 33, P.o. Box 839, 11407 Praha I

Fakturace i dodání spotřebního materiálu budou na adresu:

Ustav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I. lékařské fakulty Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakultní nemocnice Praha, I. lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108 Praha 2

10. Prohlášení žadatele, že publikace a souhrny přednášek budou označeny větou

„Prácebylafinančně podpořena grantem Ligy proti rakovině

Praha” a případně zakoupené investiční předměty budou označeny nápisem

„Zakoupeno za finančního přispění Ligy proti rakovině Praha ”.

PROHLÁŠENÍ

Zádost o finanční podporu na výzkum maligního melanomu - Liga proti rakovině Praha

Žádosti o grant musí obsahovat tyto údaje:

1. Název projektu
2. Jméno hlavního řešitele
3. Jména spoluřešitelů
4. Název pracoviště, adresa a spojení (telefony, fax, e-mail)
5. Stručná charakteristika projektu a realizační výstup
6. Stupeň rozpracování projektu, případně kopie publikací
7. Je projekt podporován i z jiných zdrojů?
8. Návrh na výši finanční podpory a jejího využití + rozpočet
9. Bankovní spojení a přesné číslo bankovního účtu
10. Prohlášení žadatele, že publikace a souhrny přednášek budou označeny větou „ Práce byla finančně podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha" a případně zakoupené investiční předměty budou označeny nápisem „Zakoupeno z finančního příspěví Ligy proti rakovině Praha".
11. Prohlášení žadatele, že do roka od přidělení finanční podpory bude předložen přehled o čerpání finančních prostředků a podána stručná zpráva o získaných výsledcích výzkumu (v případě výzkumného grantu).
12. Datum odeslání žádosti

1. Název projektu

Experimentální a preklinická cílená kombinovaná léčba maligního melanomu.

2. Jméno hlavního řešitele:

xxx

3. Jména spoluřešitelů:

xxx

4. Název pracoviště, adresa a spojení (telefony, fax, e-mail):

1. lékařská fakulta, Univerzita Karlova Praha.

Pracoviště: 1. Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakultní nemocnice Praha, 1. lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108 Praha

2. III. Chirurgická klinika 1. lékařské fakulty a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5

Hlavní řešitel:

xxx

nemocnice Praha (odd. transkripce a buněčné signalizace), 1. lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108 Praha 2.

telxxx, fax xxx, m. xxx e-mail: xxx@lfl.cuni.cz

Rešitelé:

xxx Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky I . lékařské fakulty
Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakulní nemocnice Praha (odd.
transkripce a buněčné signalizace), 1 . lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108
Praha 2.
tel. xxx, e-mail: xxx@gmail.com

xxx III. Chirurgická klinika 1. lékařské fakulty a FN v Motole, V Úvalu 84, 150 06 Praha
5 tel. xxx, e-mail: xxx@seznam.cz

xxx Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1 . lékařské fakulty
Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakulní nemocnice Praha (odd.
transkripce a buněčné signalizace), 1 . lékařská fakulta UK, Kateřinská 32,
12108 Praha 2.
Telxxx, xxx@centrum.cz

xxx: Ustav lékařské biochemie a laboratorní . diagnostiky 1 . lékařské fakulty
Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakulní nemocnice Praha (odd.
transkripce a buněčné signalizace), 1. lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108
Praha 2.
Tel. xxx,xxx@seznam.cz

5. Stručná charakteristika projektu a realizační výstup

Souhrn. Maligní melanom patří k nejvíce metastazujícím nádorům vůbec a k předním příčinám úmrtí na nádorová onemocnění. Je hlavní příčinou úmrtí na kožní nádory. K metastázám dochází velmi brzy a to zvyšuje zákeřnost onemocnění. Jeho nebezpečnost zvyšuje i možnost skryté slizniční lokalizace a jeho zvl. forma - melanom oka. Asi 60% všech případů nese mutaci BRAF onkogenu a asi 15% mutaci NRAS onkogenu. Proto je současná léčba zaměřena na inhibici aktivit něčto onkogenů a na inhibici signální cesty MAPK, kterou oba onkogeny aktivují. Typická léčiva účinkující na BRAF je vemurafenib nebo dabrafenib. Používají se i inhibitory kináz MAPK dráhy. Bohužel téměř ve 100% případů vzniká po několika měsících monoterapie rezistence a navíc závislost nádorových buněk na léku (viz níže) a léčba je v další fázi mnohem složitější. Proto je nutné použít již od začátku léčby kombinaci více léčiv. Protože molekulárních mechanismů vzniku rezistence je mnoho, je téměř nemožné určit u jednotlivých případů čím byla rezistence způsobena.

Současný stav poznání a základní literatura:

Podobně jako u ostatních typů nádorů je i u melanomu hlavním problémem léčby nádorová mikroheterogenita, tedy přítomnost různých fenotypově odlišných buněčných subpopulací, které se, kromě mnoha molekulárních a biologických vlastností, liší i různou citlivostí na podaná protinádorová léčiva. Určité subpopulace se lékem eradikují, jiné zůstávají rezistentní a progredují dále i přes aplikovanou léčbu. Mikroheterogenitaje způsobena

genetickými i epigenetickými mechanismy (Meacham a Morrison 2013). Jednotlivé subpopulace a jejich vlastnosti se mohou navíc měnit, tedy velká plasticita nádorových buněk, zvl. u melanomu, stojí za vývojem mikroheterogenity, dale tzv. epiteliálně-mezenchymového přechodu, lékové rezistence i tvorby a udržování nádorových kmenových buněk (Arozarena a Wellbrock 2019). U melanomu je cílená léčba zaměřena na dva hlavní mutované onkogeny, a to zejména BRAF (zcela nejčastěji mutace V600E), a dále NRAS, které jsou (buď jeden nebo druhý) mutovány u více než 75% případů. Tyto tzv. "driver" onkogeny spouštějí aberantně aktivovanou MAPK signální dráhu. Jsou proto někdy užívány i inhibitory kináz této signální cesty. Problémem je však inherentní ale zejména během léčby získaná rezistence vůči těmto lékům (Welsh et al. 2016, Kong et al. 2017, Kakadia et al. 2018, Khaliq a Fallahi-Sichani 2019, Patel et al. 2020, Proietti et al. 2020). Navíc může být při anti-BRAF terapii produkován pro-onkogenní "sekretom" obsahující faktory, které podporují růst rezistentních klonů a metastazování (Obenauf et al. 2015). Další komplikací anti-BRAF monoléčby je, že nádorové buňky se adaptují na podaný inhibitor a získávají na něm závislost a dokonce jej potřebují pro další růst (tzv. "drug addiction") (Ramsdale et al. 2015, Kong et al 2017, Hong et al. 2018). V takovém případě je nutné lék okamžitě vysadit (tzv. "drug holiday"), což zpomalí růst nádoru a dokonce může způsobit senescenci nádorových buněk (Hong et al. 2018, Das et al. 2019). Za získání lékové závislosti u BRAF-positivních melanomů jsou pravděpodobně zodpovědné proteiny ERK2 kináza, JUNB a FRAI (Kong et al 2017, Das et al. 2019). Léková rezistence může být způsobena mnoha molekulárními mechanismy (Daud a Bastian 2012, Chan et al. 2017, Czarnecka et al. 2020, Vachtenheim a Ondrušová 2021).

Kromě vemurafenibu a dabrafenibu existují další podobná léčiva pro BRAFmut nádory (encorafenib, sorafenib, GDC-0879, PLX8394), dále též inhibitory MAPK kináz (MEKI/2 inhibitory selumetinib, trametinib, binimetinib, cobimetinib, ERK1/2 inhibitory ulixertinib, SCH772984, AZD0364, SCH772984). Možnosti zásahu pro NRASmut nádory jsou mnohem menší (STK 19(D89N) nebo pan-RAF inhibitor belvarafenib). Léková rezistence a popsané doprovodné jevy jsou tedy hlavní překážkou úspěšnější cílené léčby maligního melanomu. Z výše uvedených důvodů vývoje nepříznivých fenotypů melanomových buněk po anti-BRAF terapii je nutné léčbu vemurafenibem a podobnými inhibitory kombinovat s dalšími léčivy, které by zabránily vzniku rezistence a drug addiction. Tato léčiva by buď doplňovala antiBRAF léčbu nebo by inhibitory BRAFmut nebyly vůbec použity a byly by cíleny jiné, pro melanom rovněž důležité signální cesty (nřie). Nalezení a testování takových velmi účinných kombinací je předmětem predkládaného projektu.

Literatura:

- 1 Arozarena I, Wellbrock C. Phenotype plasticity as enabler of melanoma progression and therapy resistance. *Nat.Rev. Cancer* 2019; 19: 377-391.
- 2 Chan XY, Singh A, Osman N, Piva TJ. Role Played by Signalling Pathways in Overcoming BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma. *Int.J.Mol.Sci.* 2017; 18.
- 3 Czarnecka AM, Bartnik E, Fiedorowicz M, Rutkowski P. Targeted Therapy in Melanoma and Mechanisms of Resistance. *Int.J.Mol.Sci.* 2020; 21.
- 4 Das I, Wilhelm M, Hoiom V, Franco MR, Costa SF, Hansson J, Tuominen R, Egyhazi BS. Combining ERBB family and MET inhibitors is an effective therapeutic strategy in cutaneous malignant melanoma independent of BRAF/NRAS mutation status. *Cell Death.Dis.* 2019; 10: 663.
- 5 Daud A, Bastian BC. Beyond BRAF in melanoma. *Curr. Top.Microbiol.Immunol.* 2012; 355: 99-117.
- 6 Faiao-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, Sandri S, Vicente AL,

- Scapulatempo-Neto C, Vazquez VL, Reis RM, Chauhan J, Goding CR, Smalley KS, Maria-Engler SS. Targeting the hedgehog transcription factors GLII and GL12 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene* 2017; 36: 18491861.
- 7 Fallahi-Sichani M, Moerke NJ, Niepel M, Zhang T, Gray NS, Sorger PK. Systematic analysis of BRAF(V600E) melanomas reveals a role for JNK/c-Jun pathway in adaptive resistance to drug-induced apoptosis. *Mol.Syst.Biol.* 2015; 11: 797.
 - 8 Hong A, Moriceau G, Sun L, Lomeli S, Piva M, Damoiseaux R, Holmen SL, Sharpless NE, Hugo W, Lo RS. Exploiting Drug Addiction Mechanisms to Select against MAPKi-Resistant Melanoma. *Cancer Discov.* 2018; 8: 74-93.
 - 9 Kakadia S, Yarlagadda N, Awad R, Kundranda M, Niu J, Naraev B, Mina L, Dragovich T, Gimbel M, Mahmoud F. Mechanisms of resistance to BRAF and MEK inhibitors and clinical update of US Food and Drug Administration-approved targeted therapy in advanced melanoma. *Onco. Targets. Ther.* 2018; 11: 7095-7107.
 - 10 Khaliq M, Fallahi-Sichani M. Epigenetic Mechanisms of Escape from BRAF Oncogene Dependency. *Cancers. (Basel)* 2019; 11.
 - 11 Kong X, Kuilman T, Shahrabi A, Boshuizen J, Kemper K, Song JY, Niessen HWM, Rozeman EA, Geukes Foppen MH, Blank CU, Peeper DS. Cancer drug addiction is relayed by an ERK2-dependent phenotype switch. *Nature* 2017; 550: 270-274.
 - 12 Meacham CE, Morrison SJ. Tumour heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 2013; 501: 328-337.
 - 13 Obenauf AC, Zou Y, Ji AL, Vanharanta S, Shu W, Shi H, Kong X, Bosenberg MC, Wiesner T, Rosen N, Lo RS, Massague J. Therapy-induced tumour secretomes promote resistance and tumour progression. *Nature* 2015; 520: 368-372.
 - 14 Patel H, Yacoub N, Mishra R, White A, Long Y, Alanazi S, Garrett JT. Current Advances in the Treatment of BRAF-Mutant Melanoma. *Cancers. (Basel)* 2020; 12.
 - 15 Proietti I, Skroza N, Bernardini N, Tolino E, Balduzzi V, Marchesiello A, Michelini S, Volpe S, Mambrin A, Mangino G, Romeo G, Maddalena P, Rees C, Potenza C. Mechanisms of Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: A Systematic Review. *Cancers. (Basel)* 2020; 12.
 - 16 Ramsdale R, Jorissen RN, Li FZ, Al Obaidi S, Ward T, Sheppard RE, Bukczynska PE, Young RJ, Boyle SE, Shackleton M, Bollag G, Long GV, Tulchinsky E, Rizos H, Pearson RB, McArthur GA, Dhillon AS, Ferrao PT. The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Sci.Signal.* 2015; 8: ra82.
 - 17 Vachtenheim J, Ondrušová, L. Many Distinct Ways Lead to Drug Resistance in. *Life (Basel)* 2021; 11.
 - 18 Vlčková, K, Ondrušová, L., Vachtenheim J, Réda J, Dundr P, Zadinová, M, Žáková P, Poučková, P. Survivin, a novel target of the Hedgehog/GLI signaling pathway in human tumor cells. *Cell Death.Dis.* 2016; 7: e2048.
 - 19 Welsh SJ, Rizos H, Scolyer RA, Long GV. Resistance to combination BRAF and MEK inhibition in metastatic melanoma: Where to next? *Eur.J. Cancer* 2016; 62: 7685.

Cíl řešení projektu a postupy řešení:

Hlavním cílem řešení je najít co nejvíce optimální kombinaci léčiv určených k cílené terapii (eradikaci) melanomových buněk, popř. více alternativních kombinací, které by byly použity namísto klasické monoterapie vemurafenibem nebo dabrafenibem hned od počátku léčení. Při event. relapsu onemocnění by bylo možné hned použít alternativní kombinaci. Cílem je i testování kombinace bez použití vemurafenibu a podobných léčiv. Tato cílená léčiva (nízkomolekulární inhibitory) mají mnohem menší vedlejší účinky než klasická chemoterapie. Kombinace léčiv by byly testovány nejdříve na buňkách v buněčné kultuře,

při jejich úspěšnosti dále in vivo na nude myších. K dispozici máme cca 30 typů buněčných linií lidského melanomu, mnoho z nich obsahuje mutovaný BRAF, event NRAS.

Dílejší konkrétní cíle projektu jsou následující:

1. Protože s testování kombinací léčiv u buněk melanomu máme již zkušenosti a některé dřívější výsledky (níže). Velmi důležitou signální cestou pro melanom je Hedgehog/GLI cesta (HH). Jejimi výkonnými transkripčními faktory jsou GLII -2. Blokování této cesty např. zabránilo rezistenci po léčbě BRAFmut inhibitory (Faiao-Flores et al. 2017). Podobné zkušenosti s inhibicí a eradikací melomových buněk máme po použití pan-GLI inhibitoru GANT61 (viz příloha-publikace v Int J Oncol). Ten však není a pravděpodobně asi nebude použit v klinických zkouškách vzhledem k vysoké toxicitě a nutným vysokým dávkám. Za něj jsme však již zkoušeli hodnotnou náhradu, inhibitor survivinu, který je cílem signální cesty HH (Vlčková et al 2016). Cílem tedy bude testovat trojkombinace BRAF inhibitoru s inhibitorem survivinu a ještě další vybranou látkou, např. inhibitorem kinázy Axl, důležité pro invazivitu melanomových buněk. I další látky budou testovány jako třetí látka (např. obatoclox, inhibitor Bcl2 rodiny antiapoptotických genů).

Postup řešení. Jednotlivé látky budou smíchány ve směsi ("kokteilu") v několika koncentracích a testovány, jak eradikují melanomové buňky v kultuře. Potenciální použité látky YM 155 (inhibitor survivinu), obatoclox, AZD5363 (inhibitor kinázy AKT), SGI-7079 (inhibitor AXL kinázy), HAI 5 (specifický inhibitor melanomu) a další (viz též příloha — náš PATENT). Použitá metodika bude převážně inhibice formace kolonií, tj. vlastně inhibice proliferace. Podle našich předchozích i dalších výsledků, většina použitých látek funguje jako induktor apoptozy a jejich účinky se musí potencovat. Bude tedy testována i každá látka zvlášť. Výsledky experimentů jsou zřetelné ze 2 příloh (patent, Int. J. Oncol.).

2. Bude zkoumáno, jak "kokteily" látek, které neobsahují vemurafenib, jsou schopny eradikovat již vzniklé vemurafenib-rezistentní nádorové buňky. Tyto již rezistentní buňky vznikají při monoterapii (výše) a lze je vyselektovat i v buněčné kultuře, popř. získat darem od zahraničních kolegů. Spektrum použitých látek bude podobné, navíc budou testovány inhibitory epigenetických mechanismů, o kterých je známo, že účinkují na nádorové buňky, event. i na melanomy (JQI, GSK126, GSH343,..). Velmi účinný se ukázal obatoclox, bude proto pravděpodobně součástí většiny testovaných směsí, bude použit i YM 155 (výše).

Postup řešení. Metodický postup testování bude podobný jako v b. 1. Vemurafenibrezistentní buňky budou růst v přítomnosti tohoto inhibitoru, nebo bez přítomnosti (drug holiday), další látky budou přítomny v obou případech a bude provedeno porovnání.

3. Dasatinib je mnohonásobně účinnější inhibitor podobný známému dlouho používanému léku proti chromické myeloidní leukémii Imatinibu (lék Gleevec), Je to inhibitor tyrozinkináz Abl-Bcr, Src, i onkogenu c- Kit. Částí projektu je zkoumat jeho možné použití i v kombinaci s jinými léčivy pro léčbu melanomu. Dasatinib se již začíná rovněž používat při léčbě melanomu. Domníváme se, jak vyplývá i z našich výsledků (níže, a viz přílohadasatinib), tyto léčebné zásahy "cílené" léčby však stále mají malý racionální molekulární podklad, neboť není znám přesný molekulární mechanismus jejich působení a získané resistance. Na základě naší zjištěných výsledků, a to že buněčná linie Hbl je extrémně citlivá vůči samostatně aplikovaným již velmi malým dávkám dasatinibu, zatímco ostatní buněčné linie (50 Imel, SK-MEL-28, MeWo, SK-MEL-2 i další) jsou více či méně rezistentní, jsme provedli molekulární analýzu aktivace signálních drah MAPK a AKT (viz příloha-dasatinib). Bylo zjištěno, že pouze u buněčné linie Hbl dasatinib je schopen inhibovat současně obě dráhy, zatímco ostatní linie jsou vůči inhibici samotným dasatinibem rezistentní a jsou schopny dráhy inhibovat jen nepatrně, popř. vůbec. Účinnost dasatinibu tedy závisí na schopnosti inhibice dvou signálních cest současně. Z tohoto důvodu chceme

zkoumat kombinaci dasatinibu s dalšími látkami, které inhibují tyto dvě dráhy (MAPK a AKT). I Src kináza, kterou dasatinib inhibuje, je důležitá pro proliferaci melanomu a aktivaci zejména AKT dráhy a má tedy ve vícekombinacích inhibitorů význam. Dosažení účinku podobného u buněk Hbl jen dasatinibem i u ostatních typů melanomových linií kombinací dasatinibu s dalšími léčivy by byl velmi výrazný pokrok k citlivosti melanomu vůči "koktailům" léčiv obsahujících dasatinib.

Postup řešení. Opět půjde o testování kombinací látek spolu s dasatinibem na buněčných kulturách melanomu různě citlivých typů. Výběr možných testovaných látek je velký a je nutné znát podrobně molekulární mechanismy vedoucí k progresi melanomu. Způsob testování bude podobný, tedy indukce apoptosy, formace kolonií a inhibice proliferace, tedy obecně délka nutná k eradikaci všech buněk v kultuře.

Realizační výstup:

Realizačním výstupem má být publikace (nebo více publikací), které budou popisovat dosud nezjištěné velmi účinné trojkombinace (popř. i čtyřkombinace) cílených léčiv na melanomové buňky v buněčné kultuře (s podáním patentu zatím není počítáno). Kombinace léčiv musí být účinné proti všem genetickým formám nádoru (BRAFMut, NRASmut, wt) a musí eradikovat nejen citlivé ale i rezistentnější druhy buněčných nádorových linií. Všechny v projektu použité cílené látky jsou již klinických fázích zkoušení nebo jsou již povoleny k léčbě. Dle fin. možností bude provedena alespoň část studií účinných kombinací in vivo na nude myších (preklinické zkoušení). Uvedený postup je (vedle jiných způsobů terapie, zejména imunoterapie) velmi slibnou a perspektivní léčbou pomocí chemických látek, používaných v relativně nízkých koncentracích s menšími vedlejšími účinky. Nalezení více vhodných kombinací by bylo výhodné při budoucí změně terapie jež by se nezdála zcela účinná (tj. změna léčby z jedné kombinace na druhou). Podobně jako se typy buněčných linií melanomu liší (nezávisle na přítomnosti mutací) citlivostí na aplikované látky, je zcela pravděpodobné, že i klinické případy (jednotlivé nádory) jsou různě citlivé, a proto je nutno testovat více účinných kombinací.

6. Stupeň rozpracování projektu, případně kopie publikací

Projekt je do značné míry rozpracován, poučivě bylo vidět pro klinické účely nevhodného inhibitoru GANT61 (vše). Všechny použité inhibitory v projektu budou jen ty, které se již samostatně klinicky zkoušejí (fáze II-IV), event. jsou již k léčbě schváleny. Čtyři pilafy: Patent, publ. Int J Oncol, publ. Life, a předběné výsledky-dasatinib ukazují, že s aplikací a testováním cílených látek máme zkušenosti. Tématu je blízko i další publikace připravená k odeslání do tisku, ve které jsme v naší laboratorii odhalili že protein Slug, který je pro-onkogenní, podílí se na epitel.-mezenchymálním přechodu i udriování nádorových kmenových buněk, je rovněž jasným cílem HH dráhy (vedle její námi dříve popsaného survivinu-vše) a tedy i cílem protinádorové terapie. Název práce, autoři a abstrakt jsou následovné:

The Hedgehog/GLI signaling pathway is pivotal for transcription of Slug (Snai12) in melanoma cells

xxx

Abstract. In melanoma and other cancers, invasion, epithelial-mesenchymal transition, metastasis and cancer stem cells maintenance are regulated by transcription factors including Snail family that support migration and apoptosis resistance. Role of Slug protein in melanoma is not completely understood. Here we investigated the transcriptional regulation of Slug in melanoma and demonstrate that SLUG gene is under the control of the Hedgehog/GLI signaling pathway and is activated predominantly by GLI2 transcription factor. Its promoter contains high number of binding sites for GLI. Slug expression is activated in reporter assays by GLI factors and inhibited by GLI inhibitor GANT61 and

SMO inhibitor cyclopamine. Slug RNA levels are lowered by GANT61 as assessed by real-time PCR. Chromatin immunoprecipitation has mapped binding of factors GLI 1-3 in the four subregions of the proximal SLUG promoter. Surprisingly, MITF is an imperfect activator of SLUG in reporter assays and downregulation of MITF has no effect on endogenous Slug levels. Immunohistochemical analysis confirmed the above findings and showed MITF-negative regions in metastatic melanoma which were positive for GLI2 and Slug. Our results thus demonstrate previously unrecognized transcription activation mechanism for Slug in melanoma which may represent its main regulation of expression in these cells.

Dasatinib jako mojný inhibitor proliferace melanomovych bunék jsme jih predbúné zkoumali ze dvou dávodá: Inhibice signálnf dráhy AKT/mTOR, která je rovnéi kromé MAPK dráhy deregulována u melanomu, jsme dFive dosáhli pomocf inhibice onkogennf Src kinázy dasatinibem, a to i za pFitomnosti konstituéné aktivnf AKT kinázy, nebot' se mélo za to, he aktivovany Src je nezbytny pro aktivaci AKT. Dále, bylo jih známo, he podávánf dasatinibu vyrazné ruöilo získanou resistenci melanomovych bunék váéi vemurafenibu (viz prilohadasatinib).

7. Je projekt podporován i z jiných zdrojů?

Projekt je öásteéné financován z institucionálnfho projektu Cooperatio, Univerzita Karlova Praha.

8. Návrh na v\$i finanöni podpory a jejího vyuhiti + rozpoöt

Návrh na výši finanöní podpory: 450 000,- Kč

Rozpočet:

Pouze neinvestiöní náklady, zdůvodnění (ceny s DPH):

Běžný spotřební materiál na jedno použití-zkumavky a pipetovací špiöky, NUNC zkumavky, plastické nádoby (lahve, misky, platiöka) pro bunéöné kultivace (50 tis. Kč.),

Speciální chemikálie, média pro bunéöné kultivace, fetální telecí séra a suplementy pro kultivaci bunék v kultuře (80 tis. Kč.),

Bujony a chemikálie pro růst bakterií, plastický materiál pro bakteriální kultivace (30 tis. Kč.)

Enzymy pro klonování (přípravu rekombinantní) DNA, enzymy pro PCR (30 tis. Kč.),

Oligonukleotidy pro všechny aplikace (klonování, mutageneze, PCR, realtime PCR (vöetně modifikovaných a znaöených oligonuleotidů 60 tis. Kč.)

Speciální chemikálie —inhibitory signálních drah a epigenetické inhibitory, též agonisté sign. drah atd., pro použití v bunéöných kulturách, popř. v experimentech na myších (vöetšinou od firem Selleckchem, LC labs, RD systems) (50 tis. Kč).

Služby (například sekvenování DNA) (50 tis. Kč).

Nude myši (100 tis Kč) pouze öást nutného öötu (asi 20 myší). POZN: pouze pokud zbude celá plánovaná öástka. Výše uvedené položky mohou být event. nepředpokládaně vyšší.

Finanční zdroj na nude myši (kmen NSG, 1 myš 5000,-Kč) bude též k dispozici z jiného zdroje.

9. Bankovní spojení a přesné číslo bankovního účtu:

xxx Komerční banka, Na Příkopě 33, P.o. Box 839, 1 1407 Praha I

Fakturace i dodání spotřebního materiálu budou na adresu:

Ustav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky 1 . lékařské fakulty Univerzity Karlovy Praha a Všeobecné fakultní nemocnice Praha xxx 1 . lékařská fakulta UK, Kateřinská 32, 12108 Praha 2

10. Prohlášení žadatele, že publikace a souhrny přednášek budou označeny větou „Práce byla finančně podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha” a případně zakoupené investiční předměty budou označeny nápisem „Zakoupeno za finančního příspěví Ligy proti rakovině Praha“.

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji tímto, že budou-li poskytnuty finanční prostředky Ligou proti rakovině Praha na podporu řešení projektu „Experimentální a preklinická cílená kombinovaná léčba maligního melanomu”, budou publikace a souhrny přednášek označeny větou „Práce byla finančně podpořena grantem Ligy proti rakovině Praha” a případně zakoupené investiční předměty budou označeny nápisem „Zakoupeno za finančního příspěví Ligy proti rakovině Praha ”. Znamená to te tedy, že publikace obsahující výsledky podpořené „Ligou proti rakovině Praha” budou vždy obsahovat v poděkování dedikaci finančních prostředků. Rovněž přístroje (i malé, neinvestiční) budou označeny „Zakoupeno za finančního příspěví Ligy proti rakovině Praha“.

31. 8. 2022

xxx

hlavní řešitel

11. Prohlášení žadatele, že do roka od přidělení finanční podpory bude předložen přehled o čerpání finančních prostředků a podána stručná zpráva o získaných výsledcích výzkumu (v případě výzkumného grantu).

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji tímto, že do roka od přidělení finanční podpory bude předložen přehled o čerpání finančních prostředků a podána stručná zpráva o získaných výsledcích výzkumu (v případě výzkumného grantu).

31. 8. 2022

xxx

hlavní řešitel

12. Datum odeslání žádosti

31. 8. 2022

Přílohy: PŘÍLOHY k žádosti-xxx-4x: publikace (pdf), patent, předběžné výsledky

LIGA PROTI RAKOVINĚ PRAHA

LEAGUE
AGAINST
CANCER
PRAGUE
MEMBER OF
UICC AND
ECL

Ústav lékařské biochemie a laboratorní diagnostiky

1. LF UK a VFN

xxx

Kateřinská 32

121 08 Praha 2

V Praze, dne 2. listopadu 2022

Věc: Oznámení o poskytnutí finančního příspěvku

Vážený pane docente,

k Vaší žádosti o udělení finančního příspěvku na výzkumný projekt Experimentální a preklinická cílená kombinovaná léčba maligního melanomu prováděný v Ústavu lékařské **biochemie a laboratorní diagnostiky 1. LF UK a VFN Praha** a na **III. Chirurgické klinice 1. LF UK a FN v Motole**, Vám sdělujeme, že výbor Ligy proti rakovině Praha po posouzení Vaší žádosti rozhodl poskytnout Vám částku ve výši

450.000,- Kč.

Povinností obdarovaného je podat stručnou zprávu a zaslat vyúčtování přidělených prostředků do 1 roku po podpisu smlouvy dle bodu VI. Darovací smlouvy.

Dva originály podepsané Darovací smlouvy jsou přiloženy. Prosíme o jejich podepsání a zaslání jednoho paré zpět.

Případné dotazy, týkající se finančních záležitostí Vám zodpoví ekonomka Ligy proti rakovině Praha xxx

S pozdravem

LIGA PROTI RAKOVINĚ PRAHA
z. s.

180 82 Praha 8 Křehká

<http://www.lpjdzp19a2tel>

Ligy proti rakovině Praha

Př.: Darovací smlouva

Liga proti rakovině Praha z.s. tel.. xxx IČo: 00571555
Na Truhlářce 100/60 NTL: xxx
180 81 Praha 8 e-mail: Číslo účtu / Bank Account No..
Czech Republic [http:// www.lpr.cz](http://www.lpr.cz) xxx
Registrováno dne 15.7.1991 na Ministerstvu vnitra ČR, číslo reg. VSC/1-
7179/91-R