



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | |
|---|---|---|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : C12N 9/00, 15/00, A61K 31/7105, A61P 35/00</p> | <p>A2</p> | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/43501 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 27. Juli 2000 (27.07.00)</p> |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE00/00227 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Januar 2000 (21.01.00) (30) Prioritätsdaten: 199 03 961.5 22. Januar 1999 (22.01.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN UNIVERSITÄTSKLINIKUM CHARITE [DE/DE]; Akademische Verwaltung - Forschung, Schumannstrasse 20/21, D-10117 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): VON ZGLINICKI, Thomas [DE/DE]; Dietzgenstrasse 59, D-13156 Berlin (DE). SARETZKI, Gabriele [DE/DE]; Ehrlichstrasse 22, D-10318 Berlin (DE). LUDWIG, Antje [DE/DE]; Crievitzer Strasse 20, D-13059 Berlin (DE). (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE).</p> | <p>(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></p> | |

(54) Title: RIBOZYMES DIRECTED AGAINST THE CATALYTIC SUBUNIT OF THE HUMAN TELOMERASE (hTERT)

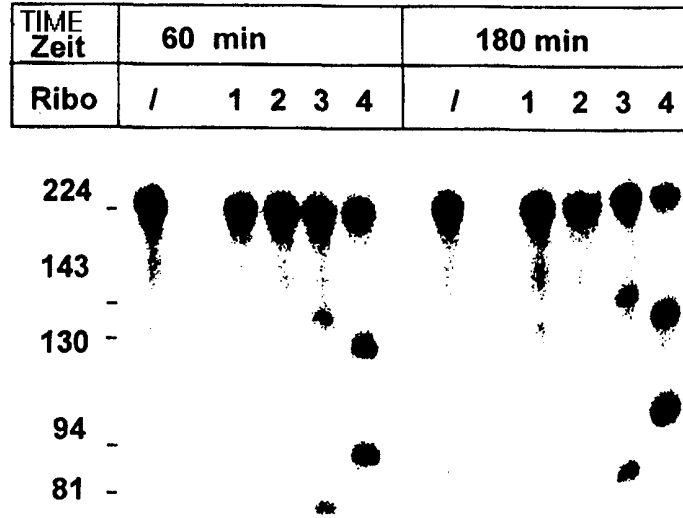
(54) Bezeichnung: GEGEN DIE KATALYTISCHE UNTEREINHEIT DER HUMANEN TELOMERASE (hTERT) GERICHTETE RIBOZYME

(57) Abstract

The invention relates to anti-telomerase ribozymes and to the use thereof. The ribozymes diminish the activity of the catalytic subunit of the human telomerase (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase, hTERT). They serve as telomerase inhibitors, limit the proliferative capacity and increase the sensitivity of tumor cells with regard to cytostatic agents.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft Anti-Telomerase-Ribozyme und ihre Verwendung. Die Ribozyme vermindern die Aktivität der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase, hTERT). Sie dienen als Telomerase-Inhibitoren, begrenzen die proliferative Kapazität und erhöhen die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|--------------------------------------|----|--|----|-----------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Gegen die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) gerichtete Ribozyme

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft Anti-Telomerase-Ribozyme und ihre Verwendung. Die Ribozyme vermindern die Aktivität der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase, hTERT). Sie dienen als Telomerase-Inhibitoren, begrenzen die proliferative Kapazität und erhöhen die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber

10

Zytostatika. Die Telomerase ist eine unikale reverse Transkriptase, die mit Hilfe einer internen RNA-Komponente Telomerasequenzen de novo an das 3'DNA-Ende der Telomeren anhängt. Damit wirkt sie einer progressiven mitotischen Telomerenverkürzung entgegen, deren Ergebnis in mortalen somatischen Zellen zur proliferativen Seneszenz führt. Obwohl es, insbesondere bei experimentell immortalisierten Zellen sowie bei anderen Spezies, alternative Möglichkeiten zum Telomerenlängenerhalt gibt, ist deren Bedeutung für die Tumorentstehung beim Menschen offenbar eher gering. Die weit überwiegende Mehrheit unterschiedlicher humaner Tumoren besitzt eine hohe Telomeraseaktivität, während Ausgangszellen und nichtinvasiv

15

Die Telomeraseaktivität kann in vitro allein aus der RNA-Komponente und der katalytischen Untereinheit rekonstituiert werden. In der katalytischen Untereinheit konnte außer 7 konservierten Sequenzmotiven für Reverse Transkriptasen ein telomerasespezifisches T-Motiv nachgewiesen werden. Mutationen in konservierten Aminosäuren des T-Motivs führen zu einem drastischen Funktionsverlust im zellfreien System (Weinrich S.L., Pruzan, R., Ma, L., Oulette, M., Tesmer, V. M., Holt, S.H., Bodnar, A., Lichtsteiner, S., Kim, N.W., Trager, J.B., Taylor, R.D., Carlos, R., Andrews, W. H., Wright, W., Shay, J.W., Harley, C.B., Morin, G.B., Nature Genetics, 17, 1997, 498-502).

20

25

Hemmung der Telomerase wurde schon sehr früh als eine potentiell hochspezifische Möglichkeit zur "Remortalisierung" und therapeutischen Kontrolle von Tumorzellen vorgeschlagen. Es war jedoch klar, daß Telomerase-Inhibition erst nach erheblicher Zeitverzögerung zur telomerenabhängigen Zellzyklusblockade führen würde (Kipling, D., Nature Genet 9, 1995: 104-105).

30

Die bisherigen Bemühungen, die Aktivität der Telomerase auszuschalten, richteten sich in erster Linie gegen die RNA-Komponente des Enzyms, da diese bereits seit 1995 bekannt ist. Eine erfolgreiche Telomeraseinhibition durch hTR-Antisensevektoren, die zu einer Telome-

35

renverkürzung und Seneszenz der entsprechenden Kultur führt, ist bisher nur einmal in HeLa Zellen demonstriert worden (Feng, J., Funk, W., Wang, S.S., Weinrich, S.L., Avilion, A.A., Chiu, C.P., Adams, R.R., Chang, E., Allsopp, R.C., Yu, J., Le, S., West, M.D., Harley, C.B., Andrews, W.H., Greider, C.W., Villeponteau, B, Science 1995, 269: 1236-1241). Erst in
5 letzter Zeit sind Arbeiten einer Gruppe erschienen, die Telomerase-Inhibition in Gliomzellen mit nachfolgender Induktion von Apoptose oder Differenzierung durch Einsatz modifizierter Antisense-RNA berichten (Kondo, Y., Kondo, S., Li, G., Silvermann, R.H., Cowell, J.K., Oncogene 1998, 16: 3323-3330; Kondo, Y., Kondo, S., Tanaka, Y., Haqqi, T., Barna, B.P., Cowell, J.K., Oncogene 1998, 16:2243-2248). Die Spezifität dieser Effekte ist jedoch unklar,
10 Telomereerosion wurde nicht nachgewiesen und ist hier wahrscheinlich nicht die Ursache der Apoptoseinduktion. Die RNA-Komponente ist möglicherweise nicht das beste Target für Telomerase-Inhibition, da sie auch in normalen Zellen exprimiert wird.

Nukleosidanaloga, wie z.B. der bekannte Hemmer reverser Transkriptasen Azidothymidin, funktionieren gut im zellfreien System, zeigen in Zellen aber starke unspezifische Nebenwirkungen (Strahl, C., Blackburn, E., Mol Cell Biol 16, 1996, 53-65; Janta-Lipinski, Matthes,
15 MDC Buch, pers. Mitteilung). Andere Strategien zur Hemmung der Telomerase wie z. B. Antisense-Technik mit peptidgekoppelten Nukleinsäuren oder Einsatz von Nicht-Nukleosiden sind bislang nur im zellfreien System erprobt.

Hammerhead-Ribozyme sind katalytische RNAs mit einer wohldefinierten Struktur, die RNA-
20 Targets mit der Sequenz XUN (N = A, C oder U) spezifisch spalten. Die Sequenz GUC gehört zu den besonders gut spaltbaren Targets. Hemmung der Telomerase und folgende Telomerenverkürzung durch Ribozyme gegen hTR wurde beschrieben (Yokoyama, Y., Takahashi, Y., Shinohara, A., Lian, Z., Wan, X., Niwa, K., Tamaya, T., Cancer Res., 58, 1998: 5406-5410). Eine verlässliche Inhibition des Zellwachstums wurde bisher mit Ribozymen gegen hTR nicht
25 erreicht. Ribozyme mit Aktivität gegen hTERT, die mRNA der katalytischen Untereinheit der Telomerase, wurden bisher nicht beschrieben.

In letzter Zeit gibt es erste Hinweise auf spezifische Wechselbeziehungen zwischen Telomeren und Telomerase einerseits und DNA-schädigenden Prozessen andererseits. Das bedeutet, daß Telomerase nicht nur durch Kompensation der "normalen" Telomereerosion zur unlimi-
30 tierten Proliferation von Tumorzellen beitragen könnte. Telomeren sind hypersensitiv gegenüber oxidativem Streß (Petersen, S., Saretzki, G., von Zglinicki, T. Exp. Cell Res. 1998, 239: 152-160). Inhibition der Telomerase in humanen Glioblastomzellen führt zur Induktion von Apoptose (Kondo, Y., Kondo, S., Li, G., Silvermann, R.H., Cowell, J.K., Oncogene 1998, 16: 3323-3330) oder zur Sensibilisierung gegen cis-Platin (Kondo, Y., Kondo, S., Tanaka, Y.,

Haqqi, T., Barna, B.P., Cowell, J.K., *Oncogene* 1998, 16:2243-2248) innerhalb weniger Tage, d.h. bevor eine signifikante Telomerenverkürzung auftreten kann.

In der Patentliteratur werden Telomerase-Inhibitoren mehrfach beschrieben. Sie richten sich vorwiegend gegen die RNA-Komponente des Enzyms (z.B. EP 666313 WO 97/37691 und WO 98/28442). Über Methoden zur Krebsbehandlung unter Verwendung von Telomerase-Inhibitoren wird in den US-Patenten US 5767278, US 5770613, US 5703116, US 5760062 und 5656638 berichtet. Die katalytische Untereinheit der menschlichen Telomerase (hTERT) hat die internationale Patentanmeldung WO 98/14593 und die daraus hervorgegangene europäische (EP 841396) bzw. deutsche Patentanmeldung (DE 19743497) zum Inhalt. Die darin beschriebenen Polynucleotide und Plasmide eignen sich zur Diagnose, Prognose und Behandlung von menschlichen Krankheiten und zur Veränderung der Proliferationskapazität von Zellen und Organismen. Die Patentschriften WO 98/14593 und WO 98/14592 beziehen sich auf Plasmide, darunter auch solche, die den Bereich des T-Motivs von hTERT überspannen, und zwar sowohl Expressionplasmid(e) als auch antisense-Plasmide. Antisense-Plasmide können zur Inhibition der Telomerase eingesetzt werden. Die deutsche Patentanmeldung DE 19720151 beschreibt ein chemisch modifiziertes Oligodesoxynucleotid, das einerseits einen Antisense-Effekt gegen hTR ausübt, andererseits an seinem 5'-Ende mit dem Protein der katalytischen Untereinheit hTERT reagiert.

Ribozyme, d.h. Polyribonucleotide, die antisense-Flanken mit einer zentralen RNA-schneidenden Struktur verbinden, sind jedoch in den o.g. Patenten nicht erwähnt. Zur spezifischen Hemmung der katalytischen Untereinheit der Telomerase existieren bislang keine publizierten Ergebnisse.

Der Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die Aktivität der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase, hTERT) zu vermindern und damit neue Telomerase-Inhibitoren zur Verfügung zu stellen.

Die Aufgabe wurde durch neue Ribozyme, die gegen das T-Motiv der humanen Telomerase gerichtet sind, gelöst. Die erfindungsgemäßen Ribozyme enthalten folgende Sequenzen:

1. 5'-GCUCGAC CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACGUACACA-3'
2. 5'-GCAGCUC CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACGACGUAC-3'
3. 5'-AAAGAAA CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACCUGAGCA-3'
4. 5'-UCUCCGU CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACAUAAAAG-3'
5. 5'-UGCUGCA CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACACUCUUC-3'
6. 5'-GACGACG CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACACACUCA-3'

7. 5'-CUUUUGA CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACGUGGUCU-3'
8. 5'-GCUUUGC CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACUUGCUC-3'
9. 5'-AAGACCU CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA AGCAGCUCG-3'
10. 5'-UGUUUUU CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA AGCCUGUUC-3'
- 5 11. 5'-CAUAAAA CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA AAAGACCUG-3'
12. 5'-UUCUUUU CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA AAACGUGGU-3'
13. 5'-UCCGGUA CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA AAAAAGAGC-3'

(kleine Buchstaben bezeichnen im Rahmen der Komplementarität der Nukleotide im Stemloop frei wählbare Nukleotide).

10 Es hat sich herausgestellt, daß die erfindungsgemäßen Ribozyme das T-Motiv der humanen Telomerase (hTERT) wie designt an einer der Sequenzen GUC, GUA, GUU, CUC oder UUC spalten.

Die erfindungsgemäßen Hammerhead-Ribozyme besitzen katalytische Aktivität in vitro. Sie spalten die mRNA für die humane Telomerase (hTERT) im T-Motiv an den vom Design geplanten Sequenzen. Die Hemmung der Telomerase in Zellen gelingt durch stabile Transfektion eines Expressionsvektors, in den das Ribozym kloniert wurde. Sie gelingt ebenfalls mit
15 anderen Transfektionsverfahren (z.B. transiente Transfektion oder Infektion mit einem rekombinanten Virus). Ein im katalytischen Zentrum mutiertes Ribozym hat keinen Effekt. Erfindungsgemäß tritt Telomerenverkürzung und Krise in Klonen mit gehemmter Telomerase
20 ein.

Die Klone mit gehemmter Telomerase steigern die Sensitivität gegenüber Doxorubicin (gemessen mit XTT-Assay - kolorimetrischer Assay - als Konzentration, die 50% der Zellen abtötet - LD50) um einen Faktor 2-3.

Die Hemmung der Telomerase durch die erfindungsgemäßen Ribozyme wird sowohl in alleiniger Anwendung als auch in Kombination mit Zytostatikagabe und/oder Bestrahlung erreicht. Dadurch wird sowohl die "klassische" Telomerenverkürzung nach Hemmung der Telomerase, die im Verlauf mehrerer Zellteilungen schließlich zur Krise und zum Absterben der Zellen führt, als auch die Telomerenverkürzungsrate durch DNA-Schädigung beschleunigt, oder es werden unabhängige Reparatureigenschaften der Telomerase ausgeschaltet, was eine erhöhte
25 Sensitivität bewirkt.
30

Das Wesen der Erfindung liegt in einer Kombination bekannter Elemente und neuer Lösungswege, die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr Inhibitoren der

katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase, hTERT) zur Verfügung stehen.

Die erfindungsgemäßen Ribozyme eignen sich zur Verwendung als Telomerase-Inhibitoren und zur Telomerenverkürzung, auch in Kombination mit Zytostatikagabe und/oder Bestrahlung oder mit Topoisomerase-Inhibition und dadurch zur Beschleunigung der Telomerenverkürzungsrate durch DNA-Schädigung sowie zur Ausschaltung der Reparatureigenschaften der Telomerase. Die erfindungsgemäßen Ribozyme eignen sich zur Behandlung von Tumoren und zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika.

Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung, ohne sie auf diese Beispiele zu beschränken.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1: Design der Ribozyme

Ribozyme bestehen aus den Helizes I und III, die mit den die Schnittstelle flankierenden Sequenzen des Targets hybridisieren, sowie dem katalytischen Kern und dem Stemloop (Helix II) mit der Struktur CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA. Die Herstellung der Ribozyme kann z.B. als Oligoribonukleotid erfolgen. Dazu wird die Sequenz wie angegeben aus den Ribonukleotiden G, C, A und U nach bekannten Verfahren synthetisiert. Stabilisierung des 3'- und des 5'-Endes mittels modifizierter Nukleotide oder cap-Strukturen ist prinzipiell möglich, der Einfluß dieser Modifikationen auf die katalytische Aktivität des Ribozyms muß im Einzelfall getestet werden. Diese Ribozyme können direkt eingesetzt werden. Eine andere Möglichkeit ist die Synthese der cDNA für das Ribozym aus den Desoxyribonukleotiden G, C, A und T. Diese Form der Ribozyme kann in Verbindung mit geeigneten Promotor(en) und Transfektionsvektoren (z.B. adeno- oder retrovirale Vektoren) eingesetzt werden.

cDNA-Sequenz des T-Motivs von hTERT (GenBank AF015950):

Nicht zum T-Motiv gehörende Nukleotide sind kursiv dargestellt. Aus der Sequenz ergeben sich die möglichen Schnittstellen und die Sequenzen der Antisense-Helizes für die möglichen Ribozyme 1-13. Die Schnittstelle des ersten Ribozyms (R1) ist fett dargestellt, und die flankierenden Sequenzen sind einmal bzw. zweimal unterstrichen. Darunter befindet sich das zugehörige Ribozym mit entsprechender Darstellung:

1681 *caagttcctg* *cactggctga* *tgagtgtgta* *cgtcgtcgag* *ctgctcaggt* *ctttcttta*
 1741 *tgtcacggag* *accacgttcc* *aaaagaacag* *gctcttttc* *taccggaaga* *gtgtctggag*
 1801 *caagtgcaa* *agcattggaa* *tcagacagca* *cttgaagagg* *gtgcagctgc* *gggagctgtc*

5' - GCUCGAC CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA ACGUACACA - 3'

Beispiel 2: Nachweis der katalytischen Aktivität der Ribozyme 1 – 4 in vitro

10 Eine 224 Nukleotide (nt) lange RNA, die die Sequenz des T-Motivs einschließt, wurde durch in-vitro-Transkription aus der mit einem T7-Promoter verlinkten cDNA von hTERT hergestellt (Target-RNA). Während der Transkription erfolgte die radioaktive Markierung mittels P^{32} -UTP. Ribozyme wurden nach Standardverfahren aus Ribonukleotiden mit durch Fmpmp (11-(2-Fluorophenyl)-4-methoxy-piperidin-1-yl) geschützten 2'-Hydroxylgruppen synthetisiert und HPLC-gereinigt. Sie wurden vor Gebrauch entschützt. Die Target-RNA wurde mit
 15 Ribozym 1, 2, 3 oder 4 bzw. ohne Ribozym (/) für 60 und 180 min inkubiert und die Reaktionsprodukte elektrophoretisch im Polyacrylamid-Gel getrennt. Das Gel wurde im Phosphorimager ausgewertet und zeigt Spaltung der Target-RNA an den designierten Stellen durch die Ribozyme 3 und 4 mit hoher Effizienz und geringe Wirksamkeit der Ribozyme 1 und 2 (Figur
 20 1).

Beispiel 3:

Nachweis der Hemmung der Telomerase durch stabile Transfektion und Expression des Ribozyms 4 in HBL100, einer immortalen Mammaepithelzelllinie mit hoher Telomeraseaktivität, und in MCF-7, einer Mammatumorzelllinie. Ein im katalytischen Zentrum mutiertes Ribozym hat keinen Effekt.

Beide Stränge der für das Ribozym R4 (4. Ribozym in der Liste) bzw. der für das im katalytischen Zentrum mutierte Ribozym mutR4 kodierenden cDNA wurden als Oligodesoxyribonukleotide nach Standardverfahren synthetisiert. Sie wurden in den Expressionvektor (Plasmid) pCDNA3.1 kloniert und stabil in MCF-7 - (Figur 2a) bzw. HBL-100-Zellen (Figur 2b) - exprimiert. Die Telomeraseaktivität in den nummerierten Klonen wurde mittels semiquantitativen TRAP-Assay (Telomerase Repeat Amplification Protocol) gemessen. Die Intensität des Leitermusters in der jeweiligen Spur im Verhältnis zur Intensität der Kontrollbande (Dreieck) ist ein Maß für die Aktivität der Telomerase. Die HBL-100- bzw. MCF-7-Klone, die mit einem
 35 im katalytischen Zentrum mutierten Ribozym transfiziert wurden (mut R4), zeigen etwa die gleiche Telomeraseaktivität wie die parentalen Zellen (p = Parentale Zellen, R8 = Positivkon-

trolle, NC = Negativkontrolle). Expression von R4 reduziert die Telomeraseaktivität auf Werte zwischen <1 und etwa 30%.

Beispiel 4: Nachweis von Telomerenverkürzung in Klonen mit gehemmter Telomerase

5 Die Telomerenlänge in den Zelllinien MCF-7 (Figur 3A) und HBL-100 (Figur 3B) wurde im Southernblot gemessen und quantifiziert wie beschrieben (Petersen, S., Saretzki, G., von Zglinicki, T. Exp. Cell Res. 1998, 239: 152-160). Die Anzahl der untersuchten Klone n und die jeweilige Telomeraseaktivität (in % der Aktivität in parental/mutR4-transfizierten Zellen, X-Achse) ist angegeben. Die Telomerenlänge in mit mutR4 transfizierten Klonen
10 (mutR4) oder in den R4-transfizierten Klonen, die nur geringfügige Verminderung der Telomeraseaktivität aufweisen, weicht nicht signifikant von der in parental Zellen ab. Die Telomerenlänge in den Klonen mit deutlich gehemmter Telomerase ist jedoch signifikant geringer.

Beispiel 5:

15 Nachweis der Inhibition des Zellwachstums in MCF-7-Klonen mit inhibierter Telomerase
Netto-Proliferationsraten wurden durch Zellzählung in jeder Passage ermittelt. Die Anzahl der untersuchten Klone n und die jeweilige Telomeraseaktivität (in % der Aktivität in parental/mutR4-transfizierten Zellen, X-Achse) ist angegeben. In Klonen mit einer Telomerase-Aktivität unter 25% der Ausgangszellen ist das Zellwachstum inhibiert (Figur 4A).

20 Nachweis einer geänderten Morphologie in telomerase-inhibierten MCF-7-Klonen. Die Morphologie lebender Zellen wurde im Phasenkontrast-Umkehrmikroskop kontrolliert. Mit mutR4 stabil transfizierter Klone (links) zeigen normales, schnelles Wachstum und die gleiche Morphologie wie parentale Zellen. Klone mit durch R4 inhibierter Telomerase (rechts) zeigen eingeschränktes Wachstum und zum überwiegenden Teil, insbesondere an der Peripherie der
25 entstehenden, vergleichsweise kleinen Kolonien, Zellen mit charakteristisch seneszenten Morphologie (gleiche Vergrößerung links und rechts) (Figur 4B).

Nachweis der Erzeugung eines seneszenten Phänotyps durch retrovirale Infektion mit dem Ribozym R4 in einer Massenkultur von MCF-7. R4 wurde in einen retroviralen Expressionsvektor (pBabe) kloniert und rekombinante Viren nach Standard-Prozedur generiert. Jeweils
30 10^5 MCF-7-Zellen wurden entweder mit dem unmodifizierten Vektor (links) oder mit R4-pBabe (rechts) infiziert. Dargestellt sind die Massenkulturen 2 Wochen nach Infektion. Infektion mit R4-pBabe vermindert die Telomeraseaktivität und blockiert das Wachstum in der Kultur. Zahlreiche Zellen sterben ab und lösen sich von der Kulturschale. Die wenigen über-

lebenden Zellen zeigen einen seneszenten Phänotyp (gleiche Vergrößerung links und rechts) (Figur 4C).

Beispiel 6:

5 Nachweis einer um einen Faktor 2-3 gesteigerten Sensitivität der Klone mit gehemmter Telomerase gegenüber Doxorubicin

HBL-100-Zellen wurden mit R4 bzw. mutR4 transfiziert. Die Telomeraseaktivität wurde mit TRAP-Assay gemessen. Die Klone wurden mit Doxorubicin in Konzentrationen zwischen 10 und 1000 ng/ml für drei Tage behandelt und dann das Zellüberleben mit XTT-Assay gemessen. Die Doxorubicin-Konzentration, die in einem um 50% reduzierten XTT-Signal (kolorimetrisches Signal) resultiert (LD50), wurde berechnet. Die Anzahl der untersuchten Klone n und die jeweilige Telomeraseaktivität (in % der Aktivität in parentalen/mutR4-transfizierten Zellen, X-Achse) ist angegeben. Klone mit einer Telomeraseaktivität <25% der Ausgangszellen weisen eine etwa um den Faktor 2 verminderte LD50 auf (Figur 5A).

15 Bestimmung der LD50 für Doxorubicin in MCF-7-Klonen (s. oben). Klone mit einer Telomeraseaktivität unter 25% sind drei- bis viermal sensitiver gegenüber Doxorubicin (Figur 5B).

Beispiel 7:

Nachweis der erhöhten Sensitivität von telomerase-negativen Zellen gegenüber topoisomerase-inhibierenden Zytostatika

Die Sensitivität gegenüber den angegebenen Zytostatika wurde als LD50 mittels XTT-Assay _{pBabe} gemessen. Angegeben ist das Verhältnis der LD50 der telomerase-positiven zu den telomerase-negativen Klonen. Untersucht wurden mutR4-transfizierte vs. R4-transfizierte HBL-100- und MCF-7-Klone und hTERT-exprimierende vs parentale BJ-Fibroblasten (Bodnar, A.G., Oulette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P. Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W. Science 1998, 279: 349-352). Zellen mit verringerter Telomeraseaktivität sind sensitiver als die isogenen Klone mit aktiver Telomerase gegenüber allen untersuchten Topoisomerase-Inhibitoren (Mitoxantron, Etoposid und Doxorubicin - Römpp Chemie Lexikon 1995), nicht aber gegenüber den anderswirkenden Zytostatika cis-Platin und Bleomycin oder dem alkylierenden Wirkstoff N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) oder oxidativer Belastung mittels Wasserstoffperoxid (H₂O₂) (Figur 6).

Patentansprüche

1. Ribozyme, die die Aktivität der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase hTERT (human Telomerase Enzyme Reverse Transcriptase) vermindern.
2. Ribozyme nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie gegen das T-Motiv der humanen Telomerase gerichtet sind.
3. Ribozyme nach Anspruch 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß sie das T-Motiv der humanen Telomerase (hTERT) an den Sequenzen GUC, GUA, GUU, CUC oder UUC schneiden.
4. Ribozyme nach Anspruch 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um Hammerhead-Ribozyme mit folgenden Sequenzen handelt:

| | | | |
|----|------------|------------------------|--------------|
| a) | 5'-GCUCGAC | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACGUACACA-3' |
| b) | 5'-GCAGCUC | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACGACGUAC-3' |
| c) | 5'-AAAGAAA | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACCUGAGCA-3' |
| d) | 5'-UCUCCGU | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACAUAAAAG-3' |
| e) | 5'-UGCUGCA | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACACUCUUC-3' |
| f) | 5'-GACGACG | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACACACUCA-3' |
| g) | 5'-CUUUUGA | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACGUGGUCU-3' |
| h) | 5'-GCUUUGC | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | ACUUGCUC-3' |
| i) | 5'-AAGACCU | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | AGCAGCUCG-3' |
| j) | 5'-UGUUUUU | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | AGCCUGUUC-3' |
| k) | 5'-CAUAAAA | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | AAAGACCUG-3' |
| l) | 5'-UUCUUUU | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | AAACGUGGU-3' |
| m) | 5'-UCCGGUA | CUGAuGAGuCcGUGAgGaCGAA | AAAAAGAGC-3' |
5. Verwendung von Ribozymen nach Anspruch 1 bis 4 als Telomerase-Inhibitoren.
6. Verwendung von Ribozymen nach Anspruch 1 bis 4 zur Telomerenverkürzung.
7. Verwendung von Ribozymen nach Anspruch 1 bis 4 in Kombination mit Zytostatikagabe und/oder Bestrahlung zur Telomerenverkürzung.

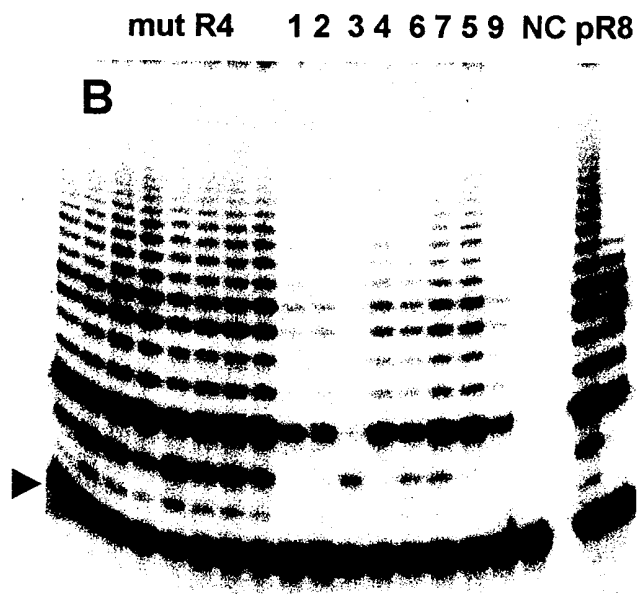
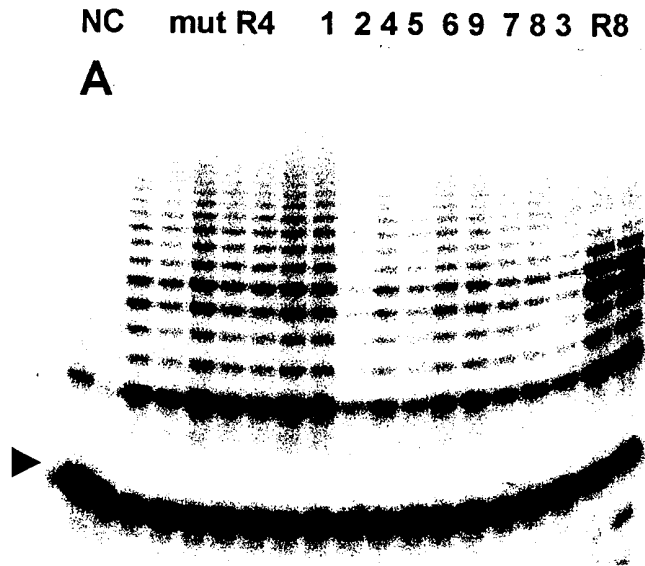
8. Verwendung von Ribozymen nach Anspruch 1 bis 4 in Kombination mit Topoisomerase-Inhibition zur Telomerenverkürzung.
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8 zur Beschleunigung der Telomerenverkürzungsrate durch DNA-Schädigung sowie zur Ausschaltung der Reparatureigenschaften der Telomerase.
10. Verwendung von Ribozymen nach Anspruch 1 bis 9 zur Behandlung von Tumoren.
11. Verwendung nach Anspruch 1 bis 4 zur Erhöhung der Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Zytostatika.

Figur 1

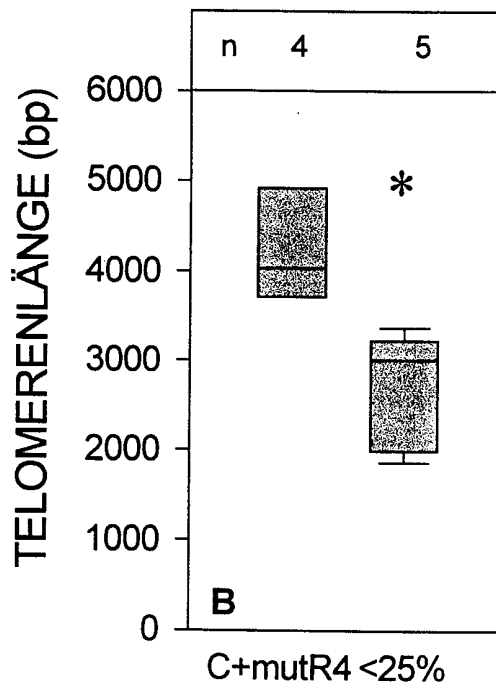
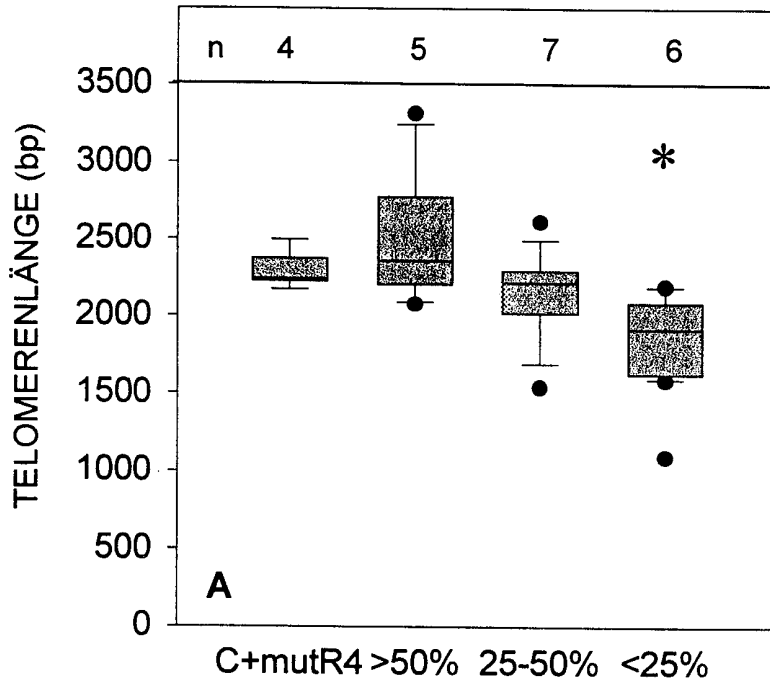
| Zeit | 60 min | | | | | 180 min | | | | |
|------|--------|---|---|---|---|---------|---|---|---|---|
| Ribo | / | 1 | 2 | 3 | 4 | / | 1 | 2 | 3 | 4 |



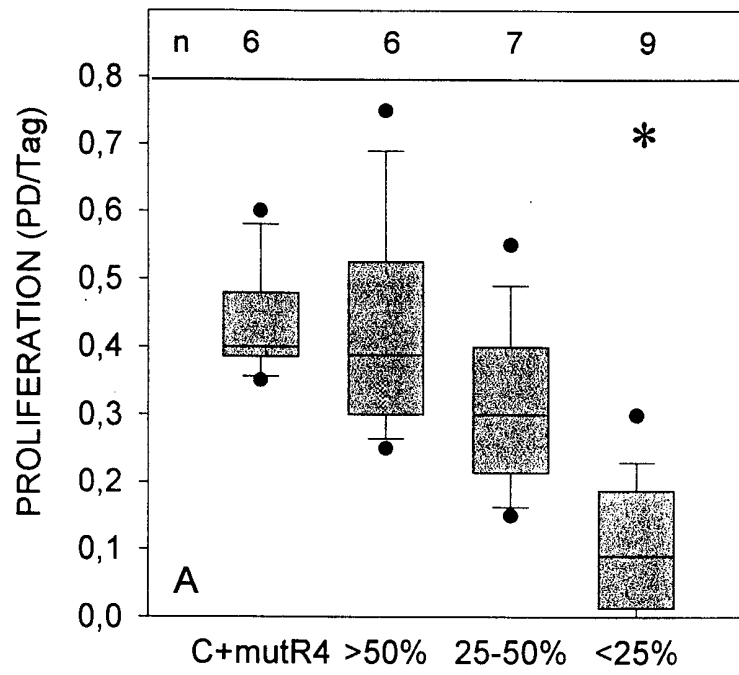
Figur 2



Figur 3

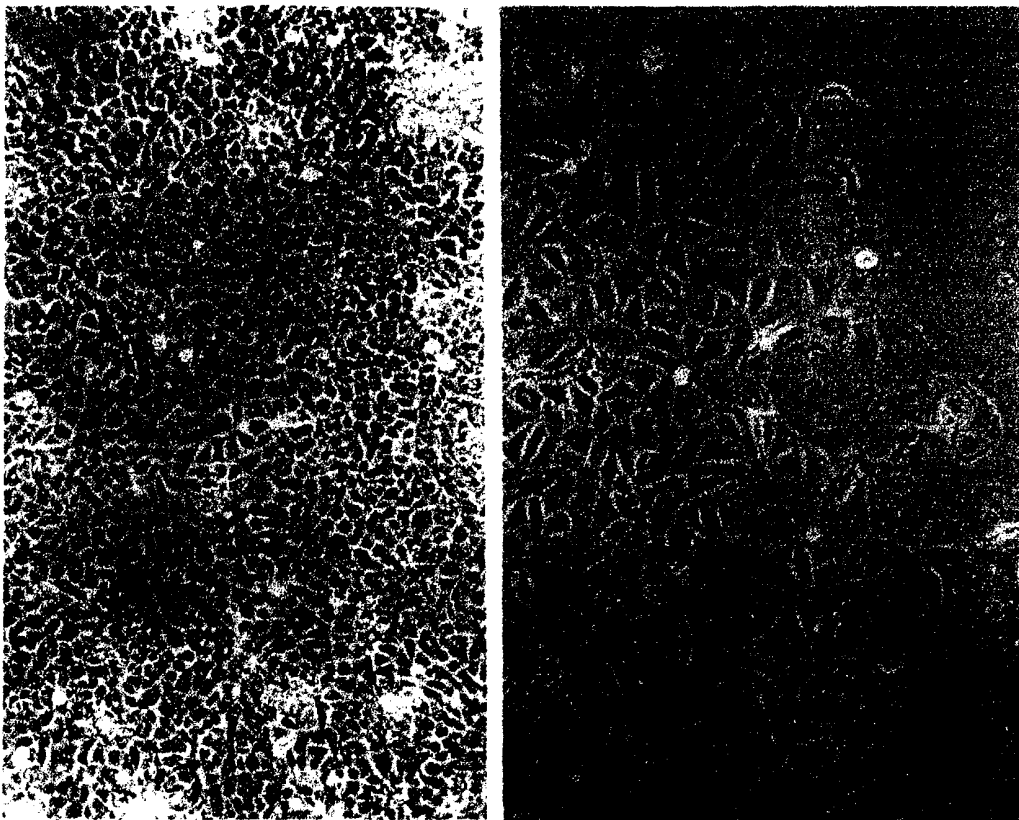


Figur 4A

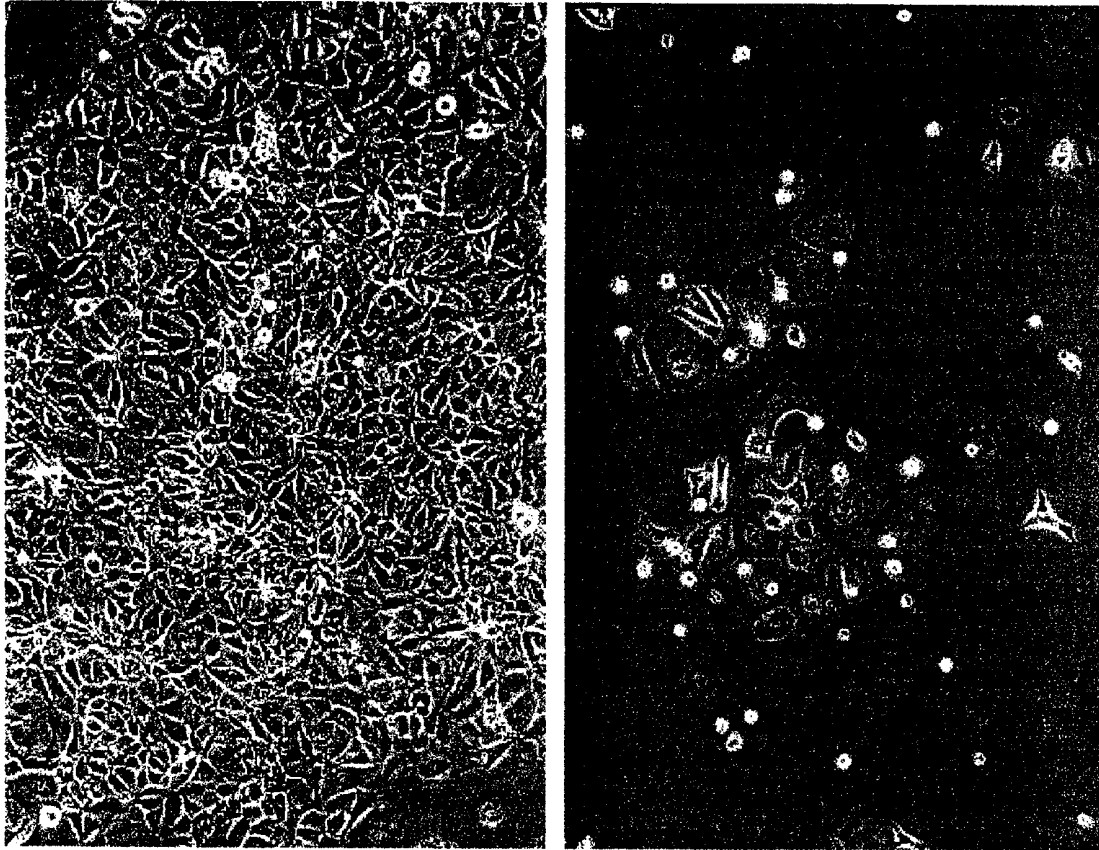


Figur 4B

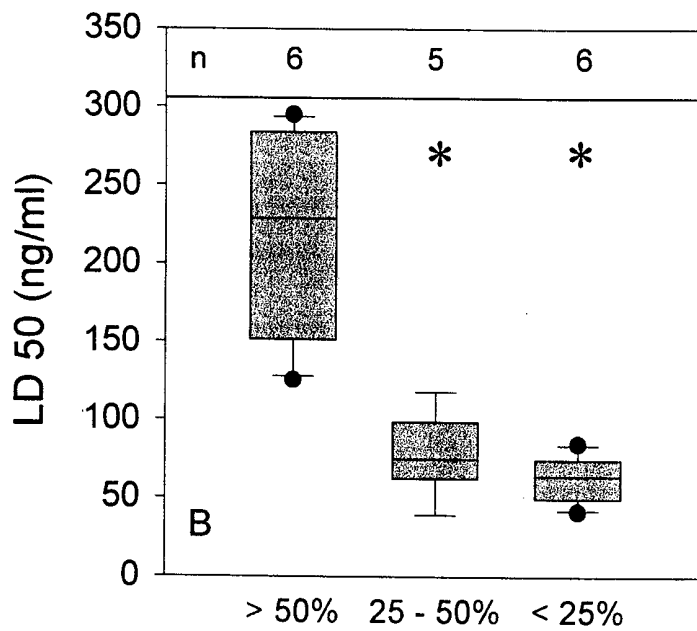
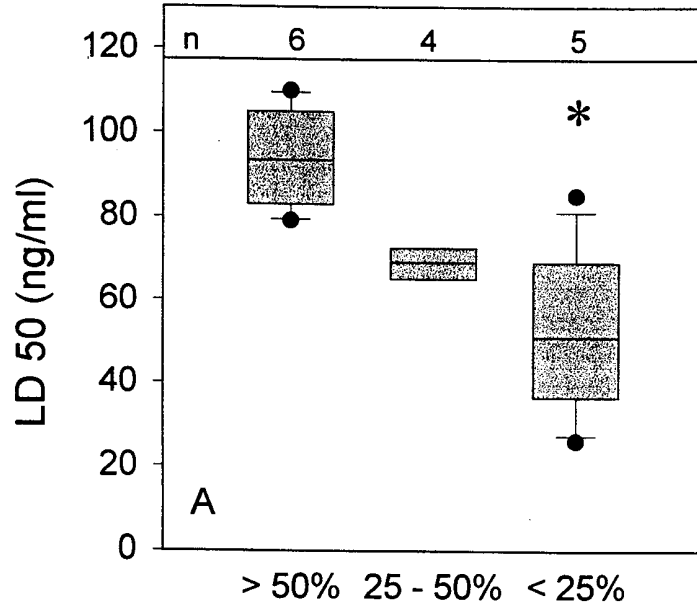
5/8



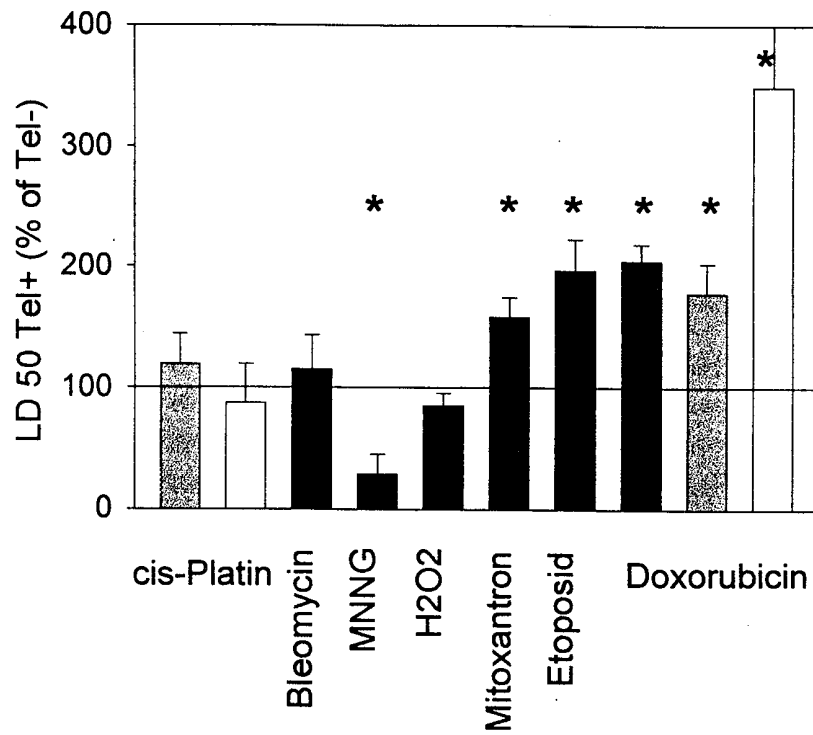
Figur 4C



Figur 5



Figur 6



SEQUENZPROTOKOLL

ALLGEMEINE ANGABEN:

ANMELDER:

NAME: Humboldt-Universität zu Berlin
Universitätsklinikum Charité
Akademische Verwaltung - Forschung

STASSE: Schumannstr. 20/21

ORT: Berlin

LAND Deutschland - DE

POSTLEITZAHL D-10117

5 BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG:

Gegen die katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT) gerichtete Ribozyme

ANZAHL DER SEQUENZEN: 13

10 COMPUTERLESBARE FASSUNG:

DATENTRÄGER: Diskette
COMPUTER: IBM-PC-kompatibel
BETRIEBSSYSTEM: MS-DOS 6.2 / WINDOWS 3.1
SOFTWARE: MS-WORD FÜR WINDOWS 6.0

15

DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:

AKTENZEICHEN:

ANMELDENUMMER

ANMELDETAG:

20

KLASSIFIKATION:

ANGABEN ZUM VERTRETER:

NAME: Patentanwalt Dr. Helmut Wehlan

STASSE: Paul-Gesche-Str. 1

25

ORT: Berlin

LAND: Deutschland

POSTLEITZAHL: 10315

TELEFON: 030-52279977

TELEFAX: 030/52279976

ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1 -13

SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

LÄNGE: 38 Basenpaare

5 ART: Ribozym

STRANGFORM: Einzelstrang

TOPOLOGIE: linear

ART DES MOLEKÜLS:

10 HYPOTHETISCH: ja

ANTISENSE: teilweise

ANGABEN ZU PUBLIKATIONEN: eingereicht

15 AUTOREN: A. Ludwig, G. Saretzki, P.S. Holm, M. Lorenz,
C.B. Harley, T. von ZglinickiTITEL: Ribozyme cleavage of telomerase mRNA
sensitized breast tumor cells to doxorubicin and
induced delayed crisis

20 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 1

GCUCGACCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CGUACACA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 2

GCAGCUCCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CGACGUAC

25

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 3

AAAGAAACUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CCUGAGCA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 4

30 UCUCGUCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CAUAAAAG

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 5

UGCUCACUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CACUCUUC

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 6

GACGACGCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CACACUCA

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 7

5 CUUUUGACUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CGUGGUCU

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 8

GCUUUGCCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA CUUGCUC

10 SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 9

AAGACCUCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA GCAGCUCG

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 10

UGUUUUUCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA GCCUGUUC

15

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 11

CAUAAAACUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA AAGACCUG

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 12

20 UUCUUUUCUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA AACGUGGU

SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO 13

UCCGGUACUG ANGAGNCNGU GANGNCGAAA AAAAGAGC

25