



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 60 2004 012 404 T2** 2009.03.26

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 618 195 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **60 2004 012 404.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/IB2004/001297**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **04 730 318.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2004/096826**

(86) PCT-Anmeldetag: **29.04.2004**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **11.11.2004**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **25.01.2006**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **12.03.2008**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.03.2009**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/11** (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

MI20030860 29.04.2003 IT

(73) Patentinhaber:

**Alma Mater Studiorum - Università di Bologna,
Bologna, IT; Università Degli Studi di Parma,
Parma, IT**

(74) Vertreter:

**Manitz, Finsterwald & Partner GbR, 80336
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI,
SK, TR**

(72) Erfinder:

**TONELLI, Roberto, I-40057 Granarolo dell'Emilia
(Bologna), IT; FRONZA, Raffaele, I-39012 Merano
(Bolzano), IT; PESSION, Andrea, I-40137 Bologna,
IT; SFORZA, Stefano, I-43100 Parma, IT;
CORRADINI, Roberto, I-42100 Reggio Emilia, IT;
MARCHELLI, Rosangela, I-43100 Parma, IT**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR SELEKTIVEN HEMMUNG DES MENSCHLICHEN N-MYC-GENS IN N-MYC EX-
PRIMIERENDEN TUMOREN DURCH ANTISENSE- UND SENSE-PEPTIDONUKLEINSÄUREN (PNA)**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

BEREICH DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Sense- und Antisense-Peptidnukleinsäuren (PNAs). Die vorliegende Erfindung betrifft weiter die Verwendung der benannten PNAs zur Herstellung von Arzneistoffen zur Behandlung von Tumoren.

STAND DER TECHNIK

[0002] Bekannterweise kann die Antisense-Strategie erfolgreich zur Behandlung von genetischen oder viren-hervorgerufenen verwendet werden.

[0003] Gemäß der Antisense-Strategie kann ein RNA-Anteil, der komplementär zu einer umgeschriebenen RNA-Region eines Gens ist, die Expression von umgeschriebener RNA durch Bildung einer Bindung zwischen komplementär DNA und umgeschriebener DNA blockieren, um die Translation der umgeschriebenen RNA zu vermeiden.

[0004] Um es anders zu sagen, werden kurze DNA-Sequenzen umfassend 15–25 Längebasen in komplementärer Form synthetisiert und mit Anteilen von spezifischen mRNAs von Viren oder schädlichen Ursprungs, die sich in Tumorzellen befinden, kombiniert.

[0005] Die so gebildeten komplementären Anteile können die Translation unmittelbar blockieren.

[0006] Weiter bekannt ist die Verwendung der Antisense-Strategie zur Herstellung von Antisense-Arzneistoffen, die in menschlicher Gentherapie verwendet werden.

[0007] Die Verwendung von Antisense-Strukturen wie z. B. Oligonukleotiden ist bekannt.

[0008] In einer Forschung von A Rolosen et al. (Cancer Research 50, 6316–6322, Okt. 1, 1990) haben synthetische Antisense-Oligomere die Expression des N-MYC Gens in der Neuroepitheliom-Zelllinie CHP100 spezifisch gehemmt.

[0009] In den letzten Jahren entwickelt sich aber die Verblendung neuer Antisense- und Antigen-Strukturen wie Peptidnukleinsäuren (PNAs).

[0010] Ein anderer Typ von Antisense-Struktur, die erfolgreich verwendet wurde, ist ein ganz/teilweise Phosphorothioat-Antisense-Oligonukleotid gegen die Expression der mRNA von menschlichem N-MYC in Neuroblastomzellen [siehe U Galderisi et al., Journal of Cellular Biochemistry 74: 31–37 (1999)].

[0011] Peptidnukleinsäuren (PNAs) umfassen Analogen von Nukleinsäuren mit neutraler Ladung enthaltend eine Pseudopeptid-Kette (Backbone) anstelle einer geläufigen Desoxyribose-Phosphat-Struktur.

[0012] Peptidnukleinsäuren (PNAs) sind enzymatisch stabiler als Antisense-Oligonukleotidstrukturen.

[0013] Peptidnukleinsäuren können sich komplementär mit DNA/RNA-Strängen binden, wodurch eine hybride PNA/DNA- oder PNA/RNA-Doppelhelixstruktur gebildet wird, die thermodynamisch stabiler als Homoduplexe sind.

[0014] Peptidnukleinsäuren können weiter durch herkömmliche Synthesetechniken für die Peptid-Synthese synthetisiert werden.

[0015] In Anbetracht der oben erläuterten Vorteile stellen Peptidnukleinsäuren (PNAs) ein alternativer Ansatz zur Antisense-Gentherapie dar und sind das vorteilhafteste System zur Antigen-Strategie.

[0016] Es wurde weiter gezeigt, daß Peptidnukleinsäuren hochspezifisch für Zielsequenzen sind und die Hemmung der Proteinexpression ermöglichen.

[0017] Doyle et al. (siehe Biochemistry 2001, 40 53–64) haben die Auswirkungen der Antisense-PNA-Hemmung auf die Luciferase-Expression in COS-7-Zellen durch die 5'-UTR-Region und die ganze Kodierregion der

Luciferase getestet und überprüft. Sie haben ebenfalls die Auswirkung von ungekoppelten Basen und die Auswirkung der PNA-Länge auf deren Hemmungseigenschaften überprüft.

[0018] Daher stellen Peptidnukleinsäuren (PNAs) ein hoffnungsvoller therapeutischer Ansatz zur Behandlung von genetischen oder viren hervorgerufenen Erkrankungen dar.

[0019] Leider besitzen Peptidnukleinsäuren (PNAs) einen Nachteil, gerade wie Antisense-Oligonukleotidstrukturen, indem sie eine geringe Fähigkeit haben, durch die Zellmembran zu gelangen.

[0020] Um diesen Nachteil zu vermeiden, haben einige Forscher versucht, Peptidnukleinsäuren mit spezifischen Molekülen zu konjugieren, um die Wirksamkeit der Penetration der Peptidnukleinsäuren durch die Zellmembran zu erhöhen.

[0021] Einige Forschungen haben die Verwendung von verschiedenen Peptid-Konjugaten als Träger beschrieben: pAntennapedia (43–58) konjugiert mit einer 21-meren PNA komplementär zur bekannten Typ-I-mRNA des Galanin-Rezeptors wurde von Bowes-Zellen erfolgreich aufgenommen (siehe M Pooga et al., Nature Biotechnology, Band 16, Sept. 1998). Bei einer anderen Forschung wurden Sequenzen von künstlichen Konjugaten auf der Basis der Struktur der dritten Helix des Antennapedia-Homeodomäns gebildet, die ebenfalls von der Zellen aufgenommen wurden, gelingen aber nur durch das Zytoplasma und nicht durch den Kern (siehe C. G. Simmons et al., Bioorganic & medicinal Chemistry Letters, Band 7, Nr. 23, Seiten 3001–3006, 1997).

[0022] Experimente mit einer 17-meren PNA, die als Antisense zum C-MYC Onkogen synthetisiert wurde und mit Varianten eines basischen heptameren NLS-Peptids konjugiert, das – wie es vorher gezeigt wurde – den Transfer des großen T-Antigens von SV40 durch die Zellmembran vermittelt, haben die Zellaufnahme von Burkittlymphom-Zellen gezeigt (die eine translozierte Hyperexpression des C-MYC Onkogens besitzen). Das ermöglichte eine schnelle Unterregulation der Expression von C-MYC (siehe G. Cutrona et al., Nature Biotechnology, Band 18, März 2000).

[0023] Es ist weiter bekannt, daß ungefähr 25–30% von unbehandelten Neuroblastomen eine Amplifikation/Überexpression des N-myc Protoonkogens zeigen, assoziiert mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium, schnellem Fortschreiten und ungünstiger Prognose. Ein Neuroblastom ist ein von dem Peripherennervensystem hervorgerufenen Sarkom und besteht aus Neutoblasten (Embryozellen, die Nervenzellen werden).

[0024] Neuroblastome befallen Kinder bis 10 Jahre und verursachen Schädel- und Lebermetastasen.

[0025] Die Expression von N-myc bei transgenen Mäusen führt zur Entwicklung von Neuroblastomen.

[0026] Eine In-vitro-Antisense-Hemmung der Expression von N-myc verringert die Proliferation von Neuroblastom und fördert die Differenzierung der Neuroblastom-Tumorzellen.

[0027] Die Inhibition wurde bisher sowohl von Antisense-Oligonukleotidstrukturen gegen M-myc-mRNA als auch von der Expression von Trägern zur Erzeugung von Antisense-RNA von N-myc begleitet.

[0028] Die Oligonukleotid-Antisense haben aber einen Nachteil, d. h. sie werden von Nukleasen schnell abgebaut. Daher könnte die Identifikation von selektiven N-myc(Protein)-Hemmern sehr wichtig für die Entwicklung von spezifischen therapeutischen Mitteln geringer Toxizität und hoher Wirksamkeit zur Behandlung von N-myc exprimierenden Neuroblastomen sein.

[0029] Damit ist es notwendig, PNA-Sequenzen zu haben, die die Synthese des N-MYC Proteins, das in dieses Protein exprimierenden Tumoren erzeugt wird, hemmen oder vermeiden können.

[0030] Insbesondere ist es notwendig, gegebenenfalls konjugierbare PNA-Sequenzen zu haben, zur Verwendung bei der Antisense- und Antigen-Strategie, um die Synthese des N-MYC Proteins zu hemmen oder zu vermeiden. Lichun et al. [Peptides 23 (2002) 1557–1565] haben eine Reihe von PNA-Konstrukten entwickelt, die antisense zum N-MYC Onkogen sind. Diese zeigten eine höher Zytotoxizität zu IMR32-Zellen von menschlichem Neuroblastom, waren aber von deren Freigabeverfahren beschränkt: PNA waren zu Somatostatin-Analogen konjugiert und waren wirksam nur an Zellen, die das N-MYC Onkogen und Somatostatin-Rezeptoren simultan exprimieren.

[0031] Insbesondere ist es notwendig, Antisense- und Antigen-PNA-Sequenzen zu haben, zur Verwendung von hochspezifischen und wirksamen Arzneistoffen (Antisense- und Antigen-Arzneistoffen) hoher Spezifität und Wirksamkeit zur Behandlung von Tumoren zu herstellen. Insbesondere ist es notwendig, ausgewählte Peptidnukleinsäuren zu haben, die Boten-mRNA binden können.

ZIELE DER ERFINDUNG

[0032] Ein Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, PNA-Sequenzen zu projektieren und auszuwählen, die durch die Zellmembran gelangen können.

[0033] Ein weiteres Ziel der vorliegenden besteht darin, PNA-Sequenzen zu projektieren und auszuwählen, zur Verwendung in der Antisense-Strategie.

[0034] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, PNA-Sequenzen zu projektieren und auszuwählen, zur Verwendung in der Antigen-Strategie.

[0035] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, PNA-Sequenzen zu projektieren und auszuwählen, zur selektiven Hemmung des N-MYC Proteins, z. B. in menschlichen Neuroblastomzellen.

[0036] Ein anderes Ziel der vorliegenden Erfindung besteht darin, hoch spezifische und wirksame PNA-Sequenzen zu projektieren und auszuwählen, zur Herstellung von Antisense- und Antigen-Arzneistoffen zur Verwendung in der Behandlung von genetischen Erkrankungen.

[0037] Diese und andere Ziele, die sich aus der folgenden detaillierten Beschreibung ergeben, wurden von der Anmelderin erreicht, die eine Antisense-Strategie und eine Antigen-Strategie auf Basis von der Verwendung von spezifischen Peptidnukleinsäuren (PNA) zur Hemmung der Synthese des N-MYC Proteins in das benannte Protein exprimierenden Tumoren vorschlägt, insbesondere in menschlichen Neuroblastomzellen.

BESCHREIBUNG DER ERFINDUNG

[0038] Ein erster Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfasst daher PNA-Sequenzen mit den Merkmalen des beigefügten Hauptanspruchs.

[0039] Ein anderer Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfasst ein Verfahren zur Herstellung von PNA-Sequenzen mit den Merkmalen der beigefügten Hauptansprüche. Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung umfasst die Verwendung der benannten PNA-Sequenzen zur Herstellung von Arzneistoffen zur Behandlung von Tumoren, deren Merkmalen in der beigefügten Hauptanspruch beschrieben sind.

[0040] Andere bevorzugten Ausführungen sind in der beigefügten Nebenansprüchen beschrieben.

[0041] In einer bevorzugten Ausführung verwendet die Anmelderin PNA-Sequenzen zur selektiven Hemmung des N-MYC Proteins in menschlichen Neuroblastomzellen.

[0042] Um die Wirksamkeit der von der Anmelderin ausgewählten Peptidnukleinsäuren zu zeigen, hat die Anmelderin experimentelle Tests durchgeführt, indem sie vier Neuroblastom-Zelllinien ausgewählt hat: GI-LI-N, IMR-32, worin das N-myc Gen amplifiziert und überexprimiert ist; und GI-CA-N, GI-ME-N, worin das N-myc Gen nicht amplifiziert und nicht exprimiert ist. Überraschenderweise hat die Anmelderin gefunden, daß die von der Anmelderin ausgewählten Antisense-Peptidnukleinsäuren durch die Zellmembran ohne Verwendung eines Trägers gelangen können.

[0043] Weiter hat die Anmelderin überraschenderweise gefunden, daß die Hemmungswirkung dank der Sense- und Antigen-PNAs auf die Synthese des N-MYC Proteins hochselektiv und spezifisch ist und eine Antiproliferationswirkung hat.

[0044] Außerdem folgt der Stillung des Wachstums von GI-LI-N-Zellen von menschlichem Neuroblastom, bei den das N-myc Gen amplifiziert ist, nach der Verwendung der Antisense-PNA unmittelbar eine Zelldifferenzierung oder Apoptose (programmierter Zelltod).

[0045] Vorteilhafterweise umfasst die Peptidnukleinsäure (PNA) 12 bis 24 Nukleotidbasen. Die benannte Peptidnukleinsäure ist komplementär zum Antisense-Strang des menschlichen N-myc Gens.

[0046] Bevorzugte PNA, wie sie im folgenden beispielhaft beschrieben und erläutert sind, sollten aber nicht als beschränkend für die vorliegende Erfindung betrachtet werden. Auch andere PNA-Typen können nämlich beschaffen werden, indem deren Struktur geeignete Modifikationen unterworfen wird, um deren Wirksamkeit zu erhöhen und sie spezifischer und geeigneter für verschiedene therapeutische Erfordernisse zu machen. Auch diese möglichen Varianten sind daher im Bereich und zwischen den Ziele der vorliegenden Erfindung enthalten.

[0047] In einer ersten Ausführung ist die Peptidnukleinsäure komplementär zum Antisense-Strang des menschlichen N-myc Gens und wird als Sense-PNA bezeichnet.

[0048] In einer zweiten Ausführung hat die Anmeldering eine Antisense-Peptidnukleinsäure PNA (bp 135–150: 5'-TCCACCCAGCGCGTCC-3', Genbank Zutritt Nummer M13241) projiziert, die komplementär zu einer Einzelsequenz in der 5'-UTR Region des N-myc Gens, ist, um einen Angriff mit dem Ribosom zu hemmen.

[0049] Um die Spezifität der Aktivität der Antisense-PNA zu beurteilen, wurde eine mutierte PNA enthaltend die Substitution von drei Basen (5'-CCCACTCAGCGCGCCC-3') projiziert.

[0050] Die Sense-PNA kann mit einem Träger konjugiert sein, der durch die Kernmembran der Zielzellen d. h. der das N-myc Gen exprimierenden Tumorzellen, gelangen kann. Der benannte Träger ist bevorzugt in 3'-Stellung zur PNA-Sequenz konjugiert.

[0051] Bei einem bevorzugten Aspekt der Erfindung besteht der benannte Träger aus geeigneten Peptidsequenzen, die sich von geeigneten Proteinen ableiten.

[0052] Die benannten Proteine sind unterschiedlichen Ursprungs; z. B. können sie sich von verschiedenen Virus-Typen ableiten.

[0053] Als nicht beschränkendes Beispiel werden die benannten Proteine bevorzugt aus:

- Kernlokalisierungssignal (NLS), aus SV40-Virus; der Träger besteht aus einer Peptidsequenz PKKKRKV;
- Penetratin, aus Antennapedia; der Träger besteht aus einer Peptidsequenz RQIKIWFQNRRMKWKK;
- Transportan: der Träger besteht aus einer Peptidsequenz GWTLNSAGYLLGKINLAALAKKIL;
- Retroinvers-Penetratin: der Träger besteht aus einer Peptidsequenz (D)-KKWKMRNRNQFWVKVQR;
- TAT-Protein, aus HIV-Virus: der Träger besteht aus einer Peptidsequenz GRKKRRQRRRPPO;
- TAT-Protein, aus HIV-Virus: der Träger besteht aus einer Peptidsequenz YGRKKRRQRRR, ausgewählt werden.

[0054] Andere Peptidsequenz, die bevorzugt als Träger verwendet werden können, können z. B. aus der folgenden ausgewählt werden:

- MSVLTPLLLRLTGSARRLPVPRAKIHSL;
- KFFKFFKFFK;
- KKKK.

[0055] Die die benannten Peptidsequenzen bildenden Aminosäuren können sowohl in L- als auch in DL-Konfiguration stehen.

[0056] Bei einem anderen bevorzugten Aspekt der Erfindung ist die PNA mit Trägern konjugiert, die aus Peptiden umfassend Aminosäuren mit D- oder L-Konfiguration ausgewählt sind, wobei die benannten Peptide unmittelbar zu PNA durch eine stabile Kovalentbindung oder durch eine labile Disulphurbindung gebunden ist, die dann durch Reduktion geöffnet werden können.

[0057] Peptide umfassend D-Arginin sind besonders bevorzugt. Bei einem dritten bevorzugten Aspekt der Erfindung ist die PNA mit Trägern verschiedener Strukturen konjugiert, wobei die benannten Träger unmittelbar zu PNA durch eine stabile Kovalentbindung oder durch eine labile Disulphurbindung gebunden ist, die dann durch Reduktion geöffnet werden können.

[0058] Zwischen diesen Trägern ist die Retinoesäure besonders bevorzugt.

[0059] Die mit einem Träger konjugierte Sense-PNA weist eine Antigen-PNA-Aktivität auf. Zwischen Antigen-PNAs werden die, die sich zum Antisense-Strang des N-myc Gens binden, als Sense-Antigen-PNA be-

zeichnet.

[0060] Die Sense-Antigen-PNAs haben sich als besonders wirksam gegen Zielzellen erwiesen.

[0061] Die Anmelderin hat auch Sense-Antigen- und Antisense-Antigen-PNA-Sequenzen (Sense-Antigen: bp: 1650–1665 5'-ATGCCGGGCATGATCT-3'; Antisense-Antigen: 5'-AGATCATGCCCGGCAT-3' Genbank Accession Number M13241) projiziert, die komplementär zu einer Sequenz des Exons 2 des N-myc Gens sind. Die benannten Sequenzen wurden in 3'-Stellung mit einem Kernlokalisierungssignal (NLS), das sich aus SV40-Virus ableitet, konjugiert, um die Durchdringung durch die Kernmembran einfacher zu machen. Der Träger umfasst eine Peptidsequenz PKKKRKV.

[0062] In einer bevorzugten Ausführung werden die erfindungsgemäßen Sense-Antigen- oder Antisense-Antigen-PNAs zur Herstellung von pharmazeutischen Zusammensetzungen verwendet.

[0063] Nun wird ein Verfahren zur Synthese von erfindungsgemäßen Peptidnukleinsäuren (PNA) im Mikromolarmassstab 10, Reinigung und Charakterisierung davon nur beispielhaft beschrieben:

50 mg Polystyrolharz, funktionalisiert mit Methylbenzhydrylamino-Gruppen (MBHA-PS), werden mit Dichlormethan (DCM) für 1 Stunde behandelt, um das Harz schwellen zu lassen. Das Harz wird dann mit 5% Diisopropylethylamin (DIPEA) in Dimethylformamid (DMF), DCM, dann mit 5% DIPEA in DMF und N-methylpyrrolidon (NMP) gewaschen. Gesondert wird eine Lösung enthaltend 0,01 mMol des ersten N-Boc-geschützten C-terminalen PNA-Monomer (herkömmliches Produkt) in 125 Mikrolitern NMP, 0,0095 mMol Benzotriazolyluronium-Hexafluorophosphat (HBTU) in 125 Mikrolitern NMP hergestellt und die beiden Lösungen werden zusammengemischt. Dann werden 0,02 mMol DIPEA zugesetzt und es wird für 2 Minuten aktivieren lassen, dann wird die das aktivierte Monomer enthaltende Lösung in Berührung mit dem Harz gebracht. Die Reaktion wird für 1 Stunde fortgesetzt, dann wird das Harz wiederholt mit NMP gewaschen. Die nicht reagierten Stellen werden mit einer Lösung von Essigsäureanhydrid/Pyridin/DMF im Verhältnis 1:2:2, blockiert, die mit dem Harz für 1 Stunde in Berührung gebracht wird. Die Abwesenheit von reaktiven Stellen wird mit einem Kaiser-Test geprüft. Sollte das Kaiser-Test nicht negativ sein, wird die Blockierprozedur wiederholt. Das Harz wird dann wiederholt mit NMP, dann mit 5% DIPEA in DMF, dann mit DCM gewaschen. Nun ist das Harz mit dem ersten C-terminalen Monomer im Verhältnis 0,2 mMol/Gram gebunden.

[0064] Die Kettenverlängerungsprozedur besteht für jedes einzuführenden Monomer in einem Zyklus umfassend: Deprotektion der Boc-Gruppe, Voraktivierung und Kupplung, Blockieren der gegebenenfalls nicht reagierten Stellen (Capping). Diese Zyklen werden in der Regel mit einem automatischen Synthesizer (Applied Biosystem ABI 433A) durchgeführt. Die für die verschiedenen Schritte verwendeten Lösungen sind die folgenden. Deprotektion: Trifluoressigsäure (TFA)/m-Kresol 95:5; Voraktivierung und Kupplung: 0,05 mMol des N-Boc-geschützten PNA-Monomers und 0,048 mMol HBTU gelöst in 500 Mikrolitern NMP und addiert mit 0,1 mMol DI-PEA; Capping: Essigsäureanhydrid/Pyridin:NMP 1:25:25.

[0065] Die rhodaminierten PNAs wurden unter Verwendung von einer Spacer-Molekül (Boc-Aminoethoxyethoxyessigsäure) im vorletzten Zyklus anstelle des PNA-Monomers und von Rhodamin im letzten Zyklus anstelle des PNA-Monomers synthetisiert.

[0066] Die so synthetisierten PNAs wurden von dem Harz durch eine Lösung von Trifluormethansulfonsäure (TFMSA):TFA:m-Kresol:Thioanisol 2:6:1:1 getrennt und unter Zugabe von Ethylether zur Trennlösung gefällt. Die so erhaltenen rohen PNAs wurden durch LC-MS (analytische Säule C18 250 × 4,6 mm, Gradientenelution mit Wasser addiert mit 0,2% Ameisensäure und einer Lösung von Wasser:Acetonitril 60:40 addiert mit 0,2% Ameisensäure, Durchflussrate 1 ml/min. UV-Detektor bei 260 nm und Massendetektor in Positivionsmodi, Bereich 150–1500 m/z) analysiert. Die Reinigung wurde mit einem System durchgeführt, das ähnlich wie das analytische System ist aber unter Verwendung von einer semipreparativen Säule (250 × 10 mm). Die Identität der reinen Verbindung wurde durch Massenspektrometrie immer bestätigt. Typische Ausbeute nach Reinigung: 30%. Typische Reinheit nach Reinigung: 90–95%.

[0067] Um die Fähigkeit der Sense- und Antigen-PNA, in die menschlichen Neuroblastomzellen zu gelangen, zu beurteilen und die darauffolgende Intrazellulärlokalisation zu analysieren, hat die Anmelderin vier Zelllinien, GI-LI-N und IMR-32, GI-CA-N und GI-ME-N verwendet und hat sie für 30 Minuten bis 24 Stunden mit 20 µM Antisense- oder Sense-PNA konjugiert mit Rhodamin in 5' behandelt. Außerdem waren die Antigen-PNAs mit NLS in 3' konjugiert.

[0068] Das Bild am Fluoreszenz-Mikroskope zeigt, daß die intrazytoplasmatische Fluoreszenz für die Anti-

sense-PNA 5'-UTR (in den Zelllinien GI-LI-N und GI-CA-N) und die intranukleare Fluoreszenz für die Antigen-PNAs (in den Zelllinien GI-LI-N und GI-ME-N) schon 30 Minuten nach der Zellbehandlung mit PNA messbar sind. Die maximale Intensität wird in 6 Stunden erreicht, dann bleibt das Niveau konstant für 24 Stunden.

[0069] Es wurden hohe intrazytoplasmatische Niveaus der Antisense-PNA beobachtet, während für die Antigen-PNAs hohe intranukleare Niveaus beobachtet wurden.

[0070] Die unbehandelten Zellen zeigen eine intrazelluläre Background-Fluoreszenz nach sechs Stunden.

[0071] Um die Wirksamkeit und Spezifität der von der Anmelderin ausgewählten Peptidnukleinsäuren hat die Anmelderin die oben beschriebenen vier Zelllinien eingesetzt.

[0072] In dreifachen Tests mit 24-mulden Platten wurden $1,0 \times 10^5$ Zellen in die ersten Mulden mit 0,5 ml RPMI1640 enthaltend 10% FBS und 2 mM L-Butanin eingeführt. Die Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert, so daß sie an der Basis der Mulden gut haften konnten. Um die optimale Konzentration zur Hemmung des Zell-Wachstums wurde dann die Peptidnukleinsäure zu den GI-LI-N Zellen mit Konzentrationen von 10, 20, 40 und 60 μM für die Antisense-PNA 5'-UTR zugegeben, während die Sense- und Antisense-Antigen-PNAs mit Konzentrationen von 1, 2, 5, 10 und 20 μM zu den GI-LI-N und IMR-32 Zellen zugegeben wurden.

[0073] Um die Spezifität und Selektivität der Auswirkung der Peptidnukleinsäuren auf das N-MYC Protein zu beurteilen, wurden die GI-LI-N Zellen mit einer Variante der Antisense-Peptidnukleinsäure 5'-UTR mit drei darin eingeführten Mutationsstellen mit einer Konzentration von 20 μM (optimale Konzentration für diese PNA) behandelt, und die GI-CA-N Zellen (die keine Amplifikation des N-myc Gens aufweisen) wurden mit Antisense-PNA 5'-UTR mit einer Konzentration von 20 μM behandelt.

[0074] Um die Spezifität der Sense- und Antisense-Antigen-PNAs zu bestimmen, wurden die GI-ME-N und GI-CA-N Zellen (worin das N-myc Gen nicht amplifiziert und nicht exprimiert ist) mit Sense- und Antisense-Antigen-PNA mit einer Konzentration von 10 μM (optimale Konzentration für die Sense-Antigen-PNA) behandelt.

[0075] Um die Auswirkungen der Behandlungen zu beurteilen, wurden dann die Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach der Behandlung gesammelt und gezählt.

[0076] Die Zellenzählung und -vitalität wurden mit einem kolorimetrischen Ausschlussverfahren (Farbstoff Trypanblau, trypan blue dye) bestimmt.

[0077] Die Behandlung mit 20 μM Antisense-PNA in GI-LI-N Zellen mit amplifizierter Expression des N-myc Gens zeigt eine hohe Hemmung des Zellwachstums. Die maximale Hemmungswirkung beträgt 70% und wird 48 Stunden nach der Behandlung erreicht ([Fig. 1](#)).

[0078] Die Neuroblastomzellen GI-CA-N mit der nicht-amplifizierten Expression des N-myc Gens, die N-myc nicht exprimieren, zeigen keine Hemmungswirkung in den Tests unter denselben Bedingungen ([Fig. 1](#)). Die Proliferationstests mit den GI-LI-N Zellen unter Verwendung einer Antisense-PNA enthaltend eine Sequenz, die durch die Einführung von drei Mutationsstellen geändert wurde, haben keine Hemmungswirkung gezeigt ([Fig. 1](#)). Das stellt die selektive und spezifische Wirkung der Antisense-PNA für die Sequenz 5'-UTR des N-myc Transkripts dar.

[0079] Die Herstellung von N-MYC (Protein) wurde durch Western Blotting in der Zelllinie GI-LI-N nach Behandlung mit 20 μM Antisense-PNA bei 24, 48 und 72 Stunden beurteilt. Eine hohe Abnahme des Proteins wurde nach 24 Stunden beobachtet. Die benannte Abnahme wird schwächer nach 72 Stunden.

[0080] Eine flusszytometrische Analyse auf die GI-LI-N Zellen 36 Stunden nach der Behandlung mit 20 μM Antisense-PNA zeigt, daß die benannte PNA eine Zellenakkumulation in G_0/G_1 von 34% zu 57% verursacht und nimmt in G_2 und in der S-Phase jeweils von 13 zu 6% und von 53% zu 37% ab.

[0081] Außerdem nimmt die Zahl der Zellen in der sub- G_1 -Phase mit einem Gehalt an hypodiploider DNA (wenigere Chromosome als diploide DNA, d. h. $2n$) von 3 zu 22% zu. Um die Differenzierung der GI-LI-N Zellen zu neuronalen Zellen zu beurteilen, wurde die benannte Zelllinie mit 20 μM Antisense-PNA behandelt, wobei morphologische Änderungen durch mikroskopische Analyse detektiert wurden.

[0082] Die Bestimmung mit dem Mikroskope wurde 36 und 48 Stunden nach der Kultur der GI-LI-N Zellen mit

oder 20 μ M Antisense-PNA durchgeführt.

[0083] Nach 36 Stunden weisen die behandelten Zellen eine weniger uniforme Verteilung auf und nach 48 Stunden neigen dazu, kleine Aggregate zu bilden.

[0084] Keine Hemmungswirkung wurde für das Wachstum der GI-CA-N Zellen gefunden, dagegen wurden diese Auswirkungen in den Tests auf die GI-LI-N Zellen beobachtet. Vorteilhafterweise zeigen die erfindungsgemäßen PNA eine hohe Selektivität für das Ziel auf Sequenz 5'-UTR N-myc.

[0085] Als weitere Bestätigung wurde keine Hemmungswirkung für die Zellvitalität, das Zellzyklus und die Menge von N-MYC Protein beobachtet, auch nicht nach der Behandlung mit 10 μ M mutierter Antisense-PNA. Das zeigt weiter die Spezifität der Auswirkung der Antisense-PNA.

[0086] Antigen-PNA: Die Behandlung mit 10 μ M Sense-Antigen-PNA in GI-LI-N und IMR-32 Zellen mit amplifizierter Expression des N-myc Gens führt zu einer hohen Hemmung des Zellwachstums.

[0087] Die maximale Hemmungswirkung beträgt nämlich 90% in GI-LI-N Zellen und 80% in IMR-32 Zellen und wird 48 Stunden nach der Behandlung erreicht ([Fig. 2](#); C(a) und D(b)).

[0088] Die Neuroblastomzellen GI-ME-N und GI-CA-N mit nicht-amplifiziertem und nicht exprimiertem N-myc Gen zeigen dagegen keine Hemmungswirkung in den Tests unter denselben ([Fig. 2](#); E(c)).

[0089] Die Proliferationstests mit GI-LI-N IMR-32 Zellen unter Verwendung von 10 μ M Antisense-Antigen-PNA zeigten keine Hemmungswirkung ([Fig. 2](#); C(x) und D(y)). Das bedeutet, daß die Auswirkung der Sense-Antigen-PNA spezifisch und selektiv für den Antisense-Strang des N-myc Gens ist, und daß wahrscheinlich die Hemmungswirkung sich für die Transkription durch die Stillung der RNA-Polymerase, die als Matrize ihren Antisense-Strang verwendet, entfaltet.

[0090] Die Herstellung des N-myc Transkripts wurde vor und nach 48-stündiger Behandlung mit 10 μ M Sense-Antigen-PNA durch Amplifikation in PCR von cDNA, die aus 250 ng mRNA von GI-LI-N Zellen erhalten wurde, bestimmt. Die folgenden Primers wurden verwendet: Sense CGACCACAAGGCCCTCAGT (Exon 2, bp 2366); Antisense TGACCACGTCGATTTCTTCCT (Exon 3, bp 5095)(Genbank M13241). Die PCR wurde mit 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten, daß in den mit Sense-Antigen-PNA behandelten GI-LI-N Zellen das PCR-Produkt für den N-myc Transkript nicht detektierbar ist, während es in den unbehandelten Zellen gut detektierbar.

[0091] Vorteilhafterweise sind die erfindungsgemäßen Antigen-PNAs hochspezifisch für die Amplifikation/Überexpression von N-myc.

[0092] Eine Amplifikation/Überexpression des N-myc Gens stellt das Hauptmerkmal dar, das die GI-LI-N, IMR-32 Zelllinien von den GI-ME-N und GI-CA-N Zelllinien unterscheidet.

[0093] Keine Wachstumshemmungswirkung wurde für die GI-ME-N und GI-CA-N Zellen beobachtet, dagegen wurden diese Auswirkungen in den Tests mit den IMR-32 Zellen gefunden.

[0094] Vorteilhafterweise zeigen die erfindungsgemäßen Antigen-PNAs eine hohe Selektivität für das Ziel an der Sequenz des Exons 2 von N-myc.

[0095] Die Antigen-PNA weist nämlich eine hohe Hemmungswirkung auf, indem sie direkt mit der PNA-Polymerase bei der Transkription im Antisense-Strang unmittelbar interferiert, während die komplementäre Antisense-Antigen-PNA eine viel geringere Wirkung aufweist, wahrscheinlich nur aufgrund der sterischen Interferenz mit dem Komplex der Transkriptionsproteine.

[0096] In anderen Tests mit Sense-Antigen-PNA wurde die Produktion des N-MYC Proteins unter Verwendung von Western Blotting in der Zelllinie IMR-32 nach 3 Stunden Behandlung mit 10 μ M Sense-Antigen-PNA bestimmt. Nach 3 Stunden Behandlung mit Sense-Antigen-PNA wurde eine Abnahme von 50% des Proteinniveaus detektiert.

[0097] Eine zytofluorimetrische Analyse auf die IMR-32 Zellen 24 und 48 Stunden nach der Behandlung mit Sense-Antigen-PNA bei einer Konzentration von 10 μ M verursachte eine Zellakkumulation in G₀/G₁ (von 39%

zu 53% nach 24 Stunden; von 31% zu 53% nach 48 Stunden) und eine Abnahme in G₂/M (von 17% zu 6% nach 24 Stunden; von 25% zu 9% nach 48 Stunden) und in der S-Phase (von 45 zu 41% nach 24 Stunden; von 44% zu 39% nach 487 Stunden).

[0098] Um die Spezifität der Aktivität der Sense-Antigen-PNA zu beurteilen, wurde eine mutierte PNA umfassend die Substitution von drei Basen (5'-GTGCCGAGCATGGTCT3') projiziert.

[0099] Es wurde keine Hemmungswirkung für die Zellvitalität, das Zellzyklus und die Menge von N-MYC Protein beobachtet, auch nicht nach der Behandlung mit einer Konzentration von 10 µM mutierter Antisense-PNA und unter denselben Testbedingungen wie für die Sense-Antigen-PNA. Das zeigt die Spezifität der Auswirkung der Sense-Antigen-PNA.

[0100] Die Behandlung mit 10 µM Sense-Antigen-PNA wurde auch mit HT29 Zellen (aus Kolonkarzinom) und HeLa-Zellen (aus Zervixkarzinom), die das N-myc Gen exprimieren, durchgeführt.

[0101] Die Behandlung führt zu einer hohen Hemmung des Zell-Wachstum. Die maximale Hemmungswirkung beträgt nämlich 70% in HT29 Zellen 48 Stunden nach der Behandlung, und 70% in HeLa-Zellen 24 Stunden nach der Behandlung.

[0102] Die Proliferationstests mit HT29 und HeLa-Zellen unter Verwendung von 10 µM mutierter Sense-Antigen-PNA zeigten keine Hemmungswirkung. Das bedeutet, daß auch bei den N-myc exprimierenden Kolon- und Zervixkarzinomen eine Hemmungswirkung unter Verwendung von Sense-Antigen-PNA entsteht, und daß diese Auswirkung für den Antisense-Strang des N-myc Gens selektiv und spezifisch ist.

[0103] Die PNA gemäß der vorliegenden Erfindung sind wichtig für die Entwicklung von PNA-basierten Arzneimitteln für spezifische Behandlungen und das N-MYC Protein exprimierenden Neuroblastomen.

[0104] Diese PNA können auch für andere Tumortypen, die das N-MYC Protein exprimieren. z. B. Retinoblastom, Medulloblastom, Neuroblastom, Glioblastom, Astrozytom oder kleinzelligen Lungentumor, Rhabdomyosarkom, akute Lymphoblastenleukämien Typ B.

<110> UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA et al.

<120> VERFAHREN ZUR SELEKTIVEN HEMMUNG DES MENSCHLICHEN N-myc GENS IN N-MYC EXPRIMIERENDEN TUMOREN DURCH ANTISENSE- UND ANTIGEN-PEPTIDONUKLEINSÄUREN (PNA)

<130> U216412WO9

<140> PCT/IB2004/001297

<141> 29-04-2004

<150> IT MI2003A000860

<151> 29-04-2003

<160> 16

<170> PatentIn Version 3.1

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-PNA komplementär zu einer Einzelsequenz in der 5'-UTR-Region des N-myc Gens (Originaltext Seite 6, Zeile 17-20)

<400> 1
tccacccagc gcgtcc

16

<210> 2

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> mutierte PNA enthaltend die Substitution von

drei Basen (Originaltext Seite 6, Zeile 23-25)

<400> 2
ccaactcagc gcgccc 16

<210> 3

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Sense-Antigen-PNA-Sequenz komplementär zu einer
Sequenz des Exons 2 des N-myc Gens (Originaltext Sei-
te 8, Zeile 14-19)

<400> 3
atgccgggca tgatct 16

<210> 4

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Antigen-PNA-Sequenz komplementär zu
einer Sequenz des Exons 2 des N-myc Gens (Original-
text Seite 8, Zeile 14-19)

<400> 4
agatcatgcc cggcat 16

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Sense-Primer (Exon 2, bp 2366) (Originaltext

Seite 14, Zeile 21-22)

<400> 5
cgaccacaag gccctcagt 19

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Antisense-Primer (Exon 2, bp 5095) (Original-

text Seite 14, Seite 22-23)

<400> 6
tgaccacgtc gatttcttcc t 21

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> mutierte PNA-Sequenz enthaltend die Substituti-
on von drei Basen (Originaltext Seite 15, Zeile 29-
31)

<400> 7
gtgccgagca tggctt 16

<210> 8

<211> 7

<212> PRT

<213> SV40-Virus

<220>

<221> misc_feature

<223> Trägerprotein NLS (Originaltext Seite 7, Zeile
5-6)

<400> 8

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val
1 5

<210> 9

<211> 16

<212> PRT

<213> antennapedia

<220>

<221> misc_feature

<223> Trägerprotein Penetratin (Originaltext Seite 7,
Zeile 7-8)

<400> 9

Arg Gln Ile Lys Ile Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys
1 5 10 15

<210> 10

<211> 24

<212> PRT

<213> Unbekannt

<220>

<223> Trägerprotein Transportan (Originaltext Seite
7, Zeile 9-10)

<400> 10

Gly Trp Thr Leu Asn Ser Ala Gly Tyr Leu Leu Gly Lys Ile Asn Leu
1 5 10 15Ala Ala Leu Ala Lys Lys Ile Leu
20

<210> 11

<211> 16

<212> PRT

<213> Unbekannt

<220>

<223> Trägerprotein-(D)-Sequenz Retroinvers-

Penetratin (Originaltext Seite 7, Zeile 11-12)

<400> 11

Lys Lys Trp Lys Met Arg Arg Asn Gln Phe Trp Val Lys Val Gln Arg
1 5 10 15

<210> 12

<211> 13

<212> PRT

<213> HIV-Virus

<220>

<221> misc_feature

<223> Trägerprotein TAT (Originaltext Seite 7, Zeile
13-14)

<400> 12

Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Pro Pro Gln
1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> HIV-Virus

<220>

<221> misc_feature

<223> Trägerprotein TAT (Originaltext Seite 7, Seite
15-16)

<400> 13

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg
 1 5 10

<210> 14

<211> 29

<212> PRT

<213> Unbekannt

<220>

<223> Träger-Peptidsequenz (Originaltext Seite 7,

Zeile 17-20)

<400> 14

Met Ser Val Leu Thr Pro Leu Leu Leu Arg Gly Leu Thr Gly Ser Ala
 1 5 10 15

Arg Arg Leu Pro Val Pro Arg Ala Lys Ile His Ser Leu
 20 25

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Unbekannt

<220>

<223> Träger-Peptidsequenz (Originaltext Seite 7,

Seite 17-19, 21)

<400> 15

Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys Phe Phe Lys
 1 5 10

<210> 16

<211> 4

<212> PRT

<213> Unbekannt

<220>

<223> Träger-Peptidsequenz (Originaltext Seite 7,

Zeile 17-19, 22)

<400> 16

Lys Lys Lys Lys
 1

Patentansprüche

1. Peptid-Nukleinsäure (PNA) enthaltend 12 bis 24 Nukleotidbasen, wobei die Peptid-Nukleinsäure zum

Antisense-Strang des menschlichen N-myc Gens komplementär ist.

2. Peptid-Nukleinsäure nach Anspruch 1, die mit einem Träger konjugiert ist, welcher durch die Kernmembran von N-myc-Gen exprimierenden Zielzellen durchdringen kann.

3. Konjugierte Peptid-Nukleinsäure nach Anspruch 2, wobei der Träger in 3'-Stellung zur Peptid-Nukleinsäuresequenz konjugiert ist.

4. Peptid-Nukleinsäure nach irgendeinem der Ansprüche 2 und 3, wobei der Träger ausgewählt ist aus der Gruppe von Peptidsequenzen umfassend:

- i) **SEQ ID NO.8 (PKKKRKV);**
- ii) **SEQ ID NO.9 (RQIKIWFQNRRMKWKK);**
- iii) **SEQ ID NO.10 (GWTLSAGYZLGKINZAALAKKIL);**
- iv) **SEQ ID NO.11 ((D)-KKWKMRRNQFWVKVQR);**
- v) **SEQ ID NO.12 (GRKKRRQRRRPPQ) ;**
- vi) **SEQ ID NO.13 (YGRKKRRQRRR) ;**
- vii) **SEQ ID NO.14 (MSVLTPLLRGLTGSARRLPVPRAKIHSL) ;**
- viii) **SEQ ID NO.15 (KFFKFFKFFK) und**
- ix) **SEQ ID NO.16 (KKKK)**

5. Peptid-Nukleinsäure nach Anspruch 4, wobei der Träger SEQ ID NO. 8 ist.

6. Peptid-Nukleinsäure nach irgendeinem der Ansprüche 1–5, wobei sense antigene PNA SEQ ID NO. 3 (5'-ATGCCGGGCATGATCT-3') ist.

7. Peptid-Nukleinsäure (PNA) bestehend aus 12–14 Nukleotidbasen, die SEQ ID NO. 1 (5'-TCCACCCAGCGCGTCC-3') umfasst.

8. Verfahren zum Synthetisieren von Peptid-Nukleinsäuren (PNAs) nach den Ansprüchen 1–7, umfassend die folgenden Schritte:

- Zugabe von einem ersten N-Boc-geschützten C-terminalen PNA-Monomer an einem Harz,
- Kettenverlängerung durch Entschützen der Boc-Gruppe, Voraktivierung und Kupplung
- Trennung der so synthetisierten PNAs vom Harz durch Trifluormethansulfonsäure und Fällung der Lösung unter Zugabe von Ethylether.

9. Pharmazeutische Zusammensetzung umfassend eine Peptid-Nukleinsäure PNA nach mindestens einem der Ansprüche 1 bis 7.

10. Verwendung einer Peptid-Nukleinsäure PNA nach den Ansprüchen 1–7 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei der Tumor der Expression vom N-MYC/n-myc-Protein zugeordnet ist.

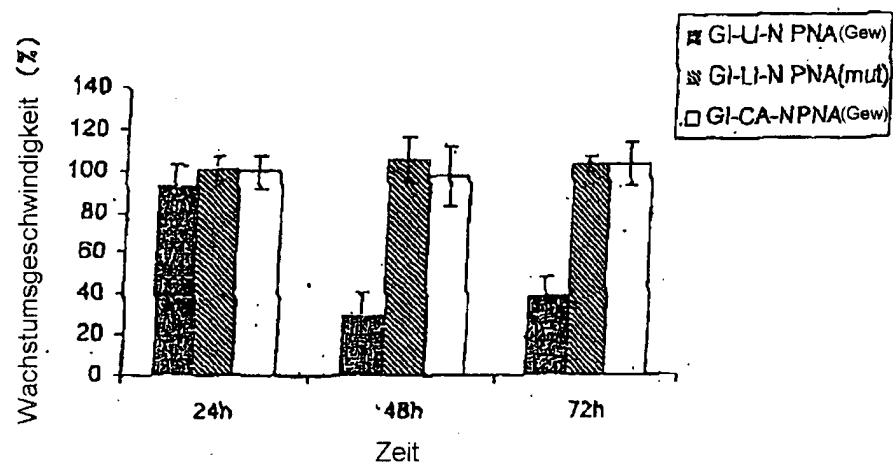
12. Verwendung einer Peptid-Nukleinsäure PNA nach Anspruch 10 oder 11 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren wie Neuroblastom, Retinoblastom, Medulloblastom, Glioblastom, Astrozytom oder kleinzelligem Lungentumor, Rhabdomyosarkom, akuten Lymphoblastenleukämien Typ B.

13. Verwendung einer Peptid-Nukleinsäure PNA nach Anspruch 7 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Tumoren wie Neuroblastom, Retinoblastom, Medulloblastom, Glioblastom, Astrozytom oder kleinzelligem Lungentumor, akuten Lymphoblastenleukämien Typ B.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIGUR 1



FIGUR 2

