

## **Piano Formativo**

### **Inibizione di MYCN a livello di trascrizione**

#### **Inibizione della trascrizione da parte di uno specifico acido nucleico peptidico anti-MYCN (PNA)**

##### **Premessa/stato dell'arte**

I PNA sono promettenti come oligonucleotidi antigenici per la loro resistenza alla degradazione e la capacità di legare il DNA bersaglio in modo potente e specifico. BGA002 è un oligonucleotide PNA antigene nuovo e altamente migliorato (agPNA), che lega una sequenza bersaglio unica presente solo nel gene MYCN umano. Un peptide di segnale di localizzazione nucleare (NLS) è collegato a BGA002 per favorirne il rilascio nel nucleo cellulare.

##### **Ipotesi e motivazione**

Un approccio alternativo per il targeting diretto del gene MYCN nel neuroblastoma (e altri tumori correlati a MYCN) riguarda l'inibizione specifica della trascrizione di MYCN, attraverso un oligonucleotide (oligo) antigene peptide nucleico (agPNA) specifico per MYCN. I PNA sono promettenti come oligo antigene per la loro resistenza alla degradazione e la capacità di legarsi in modo potente e specifico al DNA bersaglio BGA002, un nuovo e altamente migliorato agPNA, mirato specificamente a una sequenza unica presente solo nel gene umano MYCN.

##### **Obiettivi specifici**

1 - Valutare il singolo targeting diretto di MYCN mediante una specifica inibizione della trascrizione di MYCN nel neuroblastoma, attraverso un agPNA specifico per MYCN (BGA002), e confrontarlo con altri approcci singoli di targeting diretto di MYCN.

2 - Definire un insieme comune di risposte fenotipiche e molecolari tra i diversi approcci a targeting diretto singolo in NB, da confrontare con altri approcci a targeting diretto singolo MYCN.

Le risposte molecolari e fenotipiche comuni condivise dai diversi targeting diretti di MYCN verranno utilizzate come punto di partenza per identificare le basi della combinazione razionale del targeting di MYCN con altri approcci terapeutici per NB.

Inibizione trascrizionale da parte di uno specifico PNA anti-MYCN. Trattamento delle linee cellulari MNA-NB con l'inibitore trascrizionale specifico anti-MYCN PNA BGA002.

Convalida dell'efficacia. L'inibizione trascrizionale ottenuta utilizzando BGA002 a diverse dosi sarà valutata per le relative risposte fenotipiche mediante saggi funzionali e, a livello subcellulare profondo, mediante microscopia elettronica.

Targeting trascrizionale diretto di MYCN da parte dell'antigene specifico per MYCN PNA BGA002  
1 – Valutazione del singolo targeting diretto di MYCN mediante una specifica inibizione della trascrizione di MYCN in linee cellulari NB, attraverso l'agPNA specifico per MYCN (BGA002).

BGA002 sarà studiato in linee cellulari NB rappresentative di quattro diversi sottogruppi di NB (MNA+ // MNA + più altre alterazioni genetiche (p53, Alk) // MNA- // MNA- più altre alterazioni genetiche (p53, Alk) e correlati a fenotipi adrenergici e mesenchimali.

Diversi livelli di inibizione diretta dell'espressione di MYCN da parte di BGA002 a diverse dosi saranno valutati per le relative risposte fenotipiche a livello subcellulare profondo, mediante microscopia elettronica e altri test specifici. Le risposte del percorso molecolare a BGA002 saranno studiate mediante analisi dell'intero genoma mediante RNAseq.

2- Confronto dei risultati ottenuti al punto 1 con altri approcci singoli di targeting diretto di MYCN, per definire un insieme comune di risposte fenotipiche e molecolari tra i diversi approcci singoli di targeting diretto di MYCN nelle cellule NB.

Utilizzo delle risposte molecolari e fenotipiche comuni condivise dai diversi targeting diretti di MYCN, per identificare le basi molecolari della combinazione razionale del targeting di MYCN con altri approcci terapeutici per NB.

### **Risultati attesi e deliverables**

Caratterizzazione del targeting diretto di MYCN mediante una specifica inibizione della trascrizione di MYCN in NB, attraverso l'agPNA specifico per MYCN (BGA002), e confronto con altri approcci singoli di targeting diretto di MYCN. Definizione di un insieme comune di risposte molecolari tra i diversi approcci di targeting diretto singolo di MYCN in NB.

## **Targeting *MYCN* at the transcription level Inhibiting transcription by a specific anti-MYCN peptide nucleic acid (PNA)**

### **Background/state of art**

PNAs are promising as anti-gene oligonucleotides for their resistance to degradation and ability to bind the target DNA strongly and specifically. BGA002 is a new and highly improved antigene PNA oligonucleotide (**agPNA**), which binds a unique target sequence only present in human *MYCN* gene. A Nuclear Localization Signal (NLS) peptide is linked to BGA002 to aid its delivery into the cell nucleus.

### **Hypothesis and rationale**

An alternative approach for the direct targeting of MYCN gene in Neuroblastoma (and other MYCN-related tumors, concerns the specific MYCN transcription inhibition, through a MYCN-specific **antigene** peptide nucleic acid (**agPNA**) oligonucleotide (oligo). PNAs are promising as antigene oligos, for their resistance to degradation, and ability to potently and specifically bind the target DNA. BGA002, a new and highly improved agPNA, specifically target a unique sequence only present in human MYCN gene.

### **Specific aims**

1 - To evaluate the **single** direct targeting of MYCN by a specific MYCN transcription inhibition in Neuroblastoma, through a MYCN-specific agPNA (BGA002), and to compare it with other single direct targeting approaches of MYCN.

2 - To define a common set of phenotypic and molecular responses among the different single direct targeting approaches in NB, to be compared with other single direct targeting MYCN approaches.

The common molecular and phenotypic responses shared by the different direct targeting of MYCN will be used as the starting point to identify the basis of the rational combination of MYCN targeting with other therapeutic approaches for NB.

**Transcriptional inhibition by a specific anti-MYCN PNA.** Treatment of MNA-NB cell lines with the specific anti-MYCN PNA BGA002 transcriptional inhibitor.

**Validation of efficacy.** Transcriptional inhibition obtained by using BGA002 at different doses will be evaluated for the related phenotypic responses by functional assays and, at the deep subcellular level, by electron microscopy.

### **Direct transcriptional targeting of MYCN by the MYCN-specific antigene PNA BGA002**

1 – Evaluation of the single direct targeting of MYCN by a specific MYCN transcription inhibition in NB cell lines, through the MYCN-specific agPNA (BGA002).

BGA002 will be investigated in NB cell lines representative of four different NB subsets (MNA+ // MNA + plus other genetic alterations (p53, Alk) // MNA- // MNA- plus other genetic alterations (p53, Alk), and related to adrenergic and mesenchymal phenotypes.

Different levels of direct inhibition of MYCN expression by BGA002 at different doses will be evaluated for the related phenotypic responses at the deep subcellular level, by electron microscopy, and other specific assays. Molecular pathway responses to BGA002 will be investigated by genome wide analysis by RNAseq.

2- Comparison of the results obtained in point 1 with other single direct targeting approaches of MYCN, to define a common set of phenotypic and molecular responses among the different single direct MYCN targeting approaches in NB cells.

3- Use of the common molecular and phenotypic responses shared by the different direct targeting of MYCN, to identify the molecular basis of the rational combination of MYCN targeting with other therapeutic approaches for NB.

### **Expected outcomes and deliverables**

Characterization of the direct targeting of MYCN by a specific MYCN transcription inhibition in NB, through the MYCN-specific agPNA (BGA002), and comparison with other single direct targeting approaches of MYCN. Definition of a common set of molecular responses among the different single direct targeting of MYCN approaches in NB.

### **Referenze/ References**

1 - Montemurro L.; Raieli S.; Angelucci S.; Bartolucci D.; Amadesi C.; Lampis S.; Scardovi A.L.; Venturelli L.; Nieddu G.; Cerisoli L.; Fischer M.; Teti G.; Falconi M.; Pession A.; Hrelia P.; Tonelli R. [\*A novel MYCN-specific antigene oligonucleotide deregulates mitochondria and inhibits tumor growth in MYCN-amplified neuroblastoma\*](#), «CANCER RESEARCH», 2019, 79, pp. 6166 - 6177

2 - Raieli S.; Di Renzo D.; Lampis S.; Amadesi C.; Montemurro L.; Pession A.; Hrelia P.; Fischer M.; Tonelli R. [\*MYCN Drives a Tumor Immunosuppressive Environment Which Impacts Survival in Neuroblastoma\*](#), «FRONTIERS IN ONCOLOGY», 2021, 11, Article number: 625207, pp. 1 - 12

3 - Lampis S.; Raieli S.; Montemurro L.; Bartolucci D.; Amadesi C.; Bortolotti S.; Angelucci S.; Scardovi A.L.; Nieddu G.; Cerisoli L.; Paganelli F.; Valente S.; Fischer M.; Martelli A.M.; Pasquinelli G.; Pession A.; Hrelia P.; Tonelli R. [\*The MYCN inhibitor BGA002 restores the retinoic acid response leading to differentiation or apoptosis by the mTOR block in MYCN-amplified neuroblastoma\*](#), «JOURNAL OF EXPERIMENTAL & CLINICAL CANCER RESEARCH», 2022, 41, Article number: 160, pp. 160 - 179

4 - Bortolotti, Sonia; Angelucci, Silvia; Montemurro, Luca; Bartolucci, Damiano; Raieli, Salvatore; Lampis, Silvia; Amadesi, Camilla; Scardovi, Annalisa; Nieddu, Giammario; Cerisoli, Lucia; Paganelli, Francesca; Chiarini, Francesca; Teti, Gabriella; Falconi, Mirella; Pession, Andrea; Hrelia, Patrizia; Tonelli, Roberto. [\*Antigene MYCN Silencing by BGA002 Inhibits SCLC Progression Blocking mTOR Pathway and Overcomes Multidrug Resistance\*](#), «CANCERS», 2023, 15, pp. 990 - 1007

5 - Bartolucci D.; Montemurro L.; Raieli S.; Lampis S.; Pession A.; Hrelia P.; Tonelli R. [\*MYCN Impact on High-Risk Neuroblastoma: From Diagnosis and Prognosis to Targeted Treatment\*](#) «CANCERS», 2022, 14, Article number: 4421, pp. 1 - 29