

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS
PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN
FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) **FI 970026 A7**

(12) **JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **970026**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification

C12N 9/12

C12N 9/14

C12N 5/10

C12N 15/12

C12N 15/52

C12Q 1/68

C07H 21/00

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **06.07.1995**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **03.01.1997**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **03.03.1997**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **13.06.2019**

(86) Kansainvälinen hakemus - **06.07.1995 PCT/US1995/008530**
Internationell ansökan - International
application

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

07.07.1994 US 272102 27.10.1994 US 330123

07.06.1995 US 472802 07.06.1995 US 482115

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Geron Corporation, 200 Constitution Drive Menlo Park, CA 94025, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Villeponteau, Bryant, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

2 • Feng, Junli, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

3 • Funk, Walter, USA, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

4 • Andrews, William H, Richmond, CA 94805, AMERIKAN YHDYSVALLAT, (US)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Berggren Oy Ab, Antinkatu 3 C, 00100 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Nisäkästelomeraasi

Däggdjurstelomeras

(83) Mikro-organismitalletus - Deposition av mikroorganism - Deposit of microorganism

75925 ATCC

75926 ATCC

NISÄKKÄÄN TELOMERAASI

Keksinnön käyttöala

5 Tämä keksintö koskee ihmisen telomeraasia, ribonukleoproteiinientsyymiä, joka on mukana ihmisen telomeerin DNA-synteesissä. Keksintö antaa käyttöön menetelmät ja koostumukset, jotka kuuluvat molekyylibiologian, kemian, farmakologian ja lääketieteen ja diagnostisen tekniikan alueisiin.

10

Tekniikan tason kuvaus

Eukaryoottien kromosomien päissä eli telomeereissä oleva DNA koostuu tavallisesti peräkkäin toistuvista yksinkertaisista sekvensseistä. Telomeraasi on ribonukleoproteiinientsyymi, joka syntetisoi telomeerin DNA:n yhden säikeen käyttäen templaattina sekvenssiä, joka sisältyy entsyymiin RNA-komponenttiin. Katso Blackburn, 1992, Annu. Rev. Biochem. 61:113-129, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi.

20

Ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia ei ole raportoitu tähän mennessä tieteellisessä kirjallisuudessa, vaikka ihmisen telomeraasin tiedetään syntetisoivan telomeerin toistuvia yksiköitä, joissa on sekvenssi 5'-TTAGGG-3'.

25 Katso Morin, 1989, Cell 59:521-529, ja Morin, 1991, Nature 353:454-456, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Tämä tieto ei ole ollut riittävä tekemään ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleotidisekvenssin jäännöksen eristämistä ja identifioimista mahdolliseksi. *Saccharomyces cerevisiae*en, tietyn *Tetrahymena*-lajin, sekä muiden siliatien, kuten *Euplotes* ja *Glaucoma*, telomeraasientsyymien RNA-komponentti on sekvensoitu ja raportoitu tieteellisessä kirjallisuudessa. Katso Singer and Gottschling, 21.10.1994, Science 266:404-409; Ligner et al., 1994, Genes & Development 8:1984-1988; Greider and Blackburn, 1989, Nature 337:331-337; Romero and Blackburn, 1991, Cell 67:343-353; ja Schippen-Lenz and Blackburn, 1990, Science 247:546-552, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi. Näiden sili-

35

aattien telomeraasientsyymit syntetisoivat telomeerin toistuvia yksiköitä, jotka eroavat ihmisen vastaavista.

On olemassa suuri tarve saada lisää informaatiota ihmisen telomeraasista. Huolimatta telomeeri-DNA:n toistuvien yksiköiden näennäisen yksinkertaisesta luonteesta ovat tiedemiehet kauan tienneet, että telomeereillä on tärkeä biologinen rooli kromosomien rakenteen ja toiminnan säilyttämisessä. Aivan viime aikoina ovat tiedemiehet spekuloineet, että telomeerin DNA:n menetys voi toimia laukaisijana solujen senesenssille ja vanhenemiselle, ja että telomeraasin säätelyllä voi olla tärkeitä biologisia seurauksia. Katso Harley, 1991, Mutation Research 256:271-282, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi.

On myös kuvattu menetelmiä telomeraasitoiminnan havaitsemiseksi, sekä sellaisten yhdisteiden identifioimiseksi, jotka säätelevät tai vaikuttavat telomeraasitoimintaan, yhdessä menetelmien kanssa solujen senesenssi- ja immortaaliterapiaan ja diagnosoimiseen kontrolloimalla telomeerin pituutta ja telomeraasitoimintaa. Katso PCT-patenttijulkaisut nro 95/13381, julkaistu 18.5.1995; 95/13382, julkaistu 18.5.1995; ja 93/23572, julkaistu 25.11.1993; ja US-patenttihakemus, jonka sarjanumeroa ei ole luovutettu (keksijät C. Harley, N. Kim, S. Weinrich), jätetty 7.6.1995; 08/315,214, jätetty 28.9.1994; 08/315,216, jätetty 28.9.1994; 08/288,501, jätetty 10.8.1994; 08/014,838, jätetty 8.2.1993; 08/153,051 ja 08/151,477, jätetty kumpikin 12.11.1993; 08/060,952, jätetty 13.5.1993; 08/038,766, jätetty 24.3.1993; ja 07/882,438, jätetty 13.5.1992, joista jokainen on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi.

Merkittäviä parannuksia ja uusia mahdollisuuksia telomeraasivälitteisiin terapioihin ja telomeraasikokeisiin ja seulontamenetelmiin voitaisiin ottaa käyttöön, jos nukleiinihappo, joka sisältää RNA-komponentin ja/tai koodaa telomeraasin proteiinikomponentteja, olisi saatavissa puhtaana tai eristettävänä muotona ja näiden nukleiinihappojen nuk-

leotidisekvenssit olisivat tunnettuja. Tämä keksintö täyttää nämä ja muut tarpeet ja antaa käyttöön nämä parannukset ja mahdollisuudet.

5 Keksinnön yhteenveto

Ensimmäiseksi tämä keksintö tarjoaa käyttöön RNA-komponentin sekä geenin RNA-komponentille ihmisen telomeraasista olennaisen puhtaassa muodossa, sekä nukleiinihapot, jotka sisältävät kaikki tai ainakin käyttökelpoisen osan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleotidisekvenssistä. Tämä keksintö tarjoaa myös käyttöön RNA-komponentin nukleiinihapot muista lajeista, jotka nukleiinihapot jakavat olennaisen homologian ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kanssa, mukaan lukien mutta ei näihin rajoittuen, nisäkkäiden, kuten kädellisten, RNA-komponentit. Muita keksinnön käyttökelpoisia nukleiinihappoja ovat nukleiinihapot, joiden sekvenssit ovat komplementaarisia RNA-komponentille; nukleiinihapot, joiden sekvenssit ovat sukua mutta eroavat RNA-komponentin nukleotidisekvensseistä ja jotka vuorovaikuttavat ihmisen telomeraasin RNA-komponentin tai RNA-komponentin geenin tai proteiinikomponenttien kanssa käyttökelpoisella tavalla; ja nukleiinihapot, jota eivät jaa merkittävää sekvenssihomologiaa tai komplementaarisuutta RNA-komponentille tai RNA-komponentin geenille, mutta toimivat RNA-komponentissa halutulla ja käyttökelpoisella tavalla. Kuten jäljessä tarkemmin kuvataan, keksinnön nukleiinihappoissa on sekä DNA- että RNA-molekyylit ja modifioidut analogit jommastakummasta, ja ne toimivat monissa eri käyttötarkoituksissa.

Eräs keksinnön käyttökelpoisen nukleiinihapon tyyppi on antisense-oligonukleotidi, kolmoiskierteen muodostava oligonukleotidi, tai muu oligonukleotidi tai matkiva oligonukleotidi (esim. antisense-PNA - peptidinukleiinihappo/polyamidinukleiinihappo), jota voidaan käyttää in vivo tai in vitro estämään ihmisen telomeraasin toimintaa. Nämä oligonukleotidit voivat estää telomeraasin aktiivisuuden monin

eri tavoin, kuten estämällä telomeraasin geenin transkriptio (esimerkiksi kolmoiskierteen muodostuksella) tai sitoutumalla telomeraasin RNA-komponenttiin tavalla, joka estää funktionaalista ribonukleoproteiinitelomeraasia yhdistymästä, tai ehkäisee RNA-komponenttia, joka on jo yhdistynyt telomeraasin entsyymikompleksiksi, toimimasta templaattina telomeerin DNA-synteesiä varten. Tyypillisesti ja riippuen toimintamallista, nämä keksinnön oligonukleotidit käsittävät spesifisen sekvenssin, jossa on noin 10 - noin 25-200 tai enemmän nukleotideja ja joka on joko identtinen tai komplementaarinen nukleotidien spesifiselle sekvenssille telomeraasin RNA-komponentissa tai telomeraasin RNA-komponentin geenissä.

Eräässä keksinnön toteutusmuodossa keksintö tarjoaa käyttöönsä antisense-polynukleotidit, jotka ovat komplementaarisia telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvensseille, tyypillisesti komplementaarisia polynukleotidisekvensseille, jotka ovat olennaisesti identtisiä luonnossa esiintyvän nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin geenisekvenssille. Näitä antisense-nukleotideja käytetään estämään telomeraasin RNA-komponentin lajien transkriptiota ja/tai stabiilisuutta ja/tai funktionaalisuutta ja näin vaikuttamaan vastaavan telomeraasitoiminnan määrän vähenemiseen solussa (esim. potilaan neoplastisessa solussa). Nämä antisense-polynukleotidit voivat toimia telomeraasia moduloivina aineina inhiboimalla funktionaalisen (katalyyttisesti aktiivisen ja erittäin puhtaan) telomeraasiholoentisyymien muodostumista, joka vaaditaan oikeaan telomeerireplikaatioon ja korjaukseen solussa. Antisense-polynukleotidit voidaan yhdistää muiden antineoplastisten terapeuttisten modaaliteettien kanssa, kuten ionisoiva säteily tai kemoterapia (esim. DNA:ta vahingoittavan aineen, kuten bleomysiinin, cisplatiinin, typpisinappikaasun, doksirubisiinin, nukleotidianalogien ja vastaavien kanssa). Antisense-polynukleotidit voivat edistää solujen kuolemaa herkissä soluissa (esim. replikoimalla soluja, jotka vaativat telomeraasitoimintaa DNA-korjausta tai replikaatiota

varten). Antisense-polynukleotidit ovat olennaisesti identtisiä ainakin 25 vierekkäisen nukleotidin kanssa nisäkkään telomeraasin RNA-sekvenssille komplementaarisesta sekvenssistä, joka tässä on esitetty. Antisense-polynukleotidit ovat tyypillisesti ssDNA, ssRNA, metyyli fosfonaattirunkoiset polynukleotidit, fosforotiolaattirunkoiset polynukleotidit, sekarunkoiset polynukleotidit, polyamidinukleiinihapot, ja vastaavat antisense-rakenteet, jotka alalla tunnetaan. Eräässä keksinnön osassa antisense-polynukleotidi annetaan estämään telomeraasin RNA-komponentin transkriptio ja/tai toiminta ja telomeraasin toiminta solussa, kuten replikoitavassa ihmisen solussa.

Eräässä toteutusmuodossa keksintö tarjoaa käyttöön templaatin kanssa epätasapainossa olevan polynukleotidin, jolla polynukleotidilla on sekvenssi olennaisesti identtinen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin kanssa ja käsittää telomeerin toistuvan templaattisekvenssin, jossa on ainakin yhden parin epätasapaino suhteessa ihmisen telomeraasin toistuvaan sekvenssiin 5'-TTAGGG-3', mutta muuten sen kanssa komplementaarinen. Templaattiepätasapainoinen polynukleotidi käsittää tyypillisesti yhden nukleotidiepätasapainon luonnossa esiintyvässä templaattisekvenssissä, ja voi käsittää kaksi nukleotidiepätasapainoa templaattisekvenssissä, joko vierekkäisinä epätasapainoisina nukleotideina tai siten, että epätasapainoiset nukleotidit ovat yhden tai useamman tasapainossa olevan (komplementaarisen) nukleotidin erottamia. Keksinnön templaattiepätasapainoiset polynukleotidit pystyvät yleensä näyttämään telomeraasitoiminnan yhdessä ihmisen telomeraasin polypeptidikomponentin kanssa, ja näin tuottamaan liittymättömyyden valituissa (epätasapainoisissa) nukleotidikohdissa ihmisen telomeraasin toistuvassa sekvenssissä telomeerin toistuvan replikoitumisen, korjauksen, ja/tai addition seurauksena, jolloin syntyy telomeerejä, jotka luottavat mutatoituneen sense-telomeraasin RNA-komponentin jatkuvaan läsnäoloon olennaisesti replikoitumista ja telomeerin pituuden säilyttämistä varten.

Toinen käyttökelpoinen keksinnön nukleiinihappotyyppi on ribotsyymi, joka pystyy lohkaisemaan spesifisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponentin tehden entsyymistä inaktiivisen. Vielä toinen keksinnön käyttökelpoisen nukleotidin tyyppi on koetin tai aluke, joka sitoutuu spesifisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponenttiin ja jota näin ollen voidaan käyttää esim. havaitsemaan telomeraasin läsnäolo näytteessä. Lopuksi keksinnön käyttökelpoisia nukleiinihappoja ovat yhdistelmäilmentymisplasmidit keksinnön nukleiinihappojen tuottamiseen. Eräs tällaisen plasmidin erityyisen käyttökelpoinen tyyppi on ihmisen geeniterapiaan käytetty plasmidi. Keksinnön ihmisen geeniterapiaan käyttökelpoiset plasmidit ovat erityyppisiä, ei pelkästään niitä, jotka koodaavat antisense-oligonukleotideja tai ribotsyymejä, vaan myös niitä, jotka saavat ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ilmentymään, tai deletoitu tai muuten muuttunut (mutatoitunut) ihmisen (tai muun lajin, jonka RNA-komponentin sekvenssit ovat olennaisen homologisia ihmisen RNA-komponentin kanssa) telomeraasin RNA-komponentin tai sen geenin versio.

Eräässä toteutusmuodossa johdetaan polynukleotidi, jossa on nisäkkään telomeraasin RNA-komponentille komplementaarinen osa, joka on riittävä spesifisesti hybridisoitumaan fysiologisissa olosuhteissa, sitomalla kovalenttisesti kemiallinen lisäsubstituentti, joko polynukleotidisynteesin aikana tai sen jälkeen, jolloin muodostuu johdannaispolynukleotidi, joka pystyy spesifisesti hybridisoitumaan mainittuun telomeraasin RNA-komponenttiin. Johdannaispolynukleotidi voi lokalisoitua endogeeniseen telomeraasientsyymiin, jossa on mainittu RNA-komponentti, jolloin johdannaispolynukleotidi tuottaa telomeraasin RNA-komponentin ja/tai proteiinikomponentin muunnoksen tai kemiallisen modifikaation, ja näin ollen modifioi, tyypillisesti vähentämällä, telomeraasin entsyymaattista aktiivisuutta.

Eräässä toteutusmuodossa keksintö tarjoaa käyttöön polynukleotidit, jotka ovat sopivia sairauksien diagnosoimiseen,

jotka liittyvät telomeraasin poikkeavan RNA-komponentin runsauteen ja/tai rakenteeseen. Polynukleotidikoettimet, jotka sisältävät sekvenssejä, jotka ovat olennaisesti identtisiä tai olennaisesti komplementaarisia nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin nukleotidisekvenssin kanssa, voidaan käyttää diagnoisoimaan sairaustiloja (esim. neoplasia tai preneoplasia) havaitsemalla telomeraasin RNA-komponentin runsaus ja/tai telomeraasin RNA-komponentin rakenteelliset muutokset (esim. typistuminen, sekvenssinvaihtelut, deletiot tai insertiot, ja vastaavat), ja/tai telomeraasin RNA-komponentin geenin uudelleenjärjestymiset tai kopiomäärän kasvaminen potilaasta viljellyissä soluissa, tai havaitsemalla patognomoninen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin alleeli (esim. RFLP:llä tai alleeli-spesifisellä PCR-analyysillä). Havaitseminen tapahtuu usein in situ-hybridisaatiolla käyttäen leimattua (esim. ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , fluoresoitua, biotinyloitua, digoksieeninylöitua) antisense-polynukleotidia, joka on komplementaarinen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentille, vaikka voidaan myös käyttää Northern blottausta, dot-blottausta tai liuoshybridisointia kiinteälle RNA:lle tai poly A⁺ RNA:lle, joka on eristetty solunäytteestä, samoin voidaan käyttää PCR:n tai LCR: avulla tapahtuvaa kopiomäärän lisäämistä käyttäen telomeraasin RNA-komponentille spesifisiä alukkeita. Solut, jotka sisältävät muuttuneen määrän (tyypillisesti merkittävästi enemmän) telomeraasin RNA-komponenttia verrattuna saman solutyyppin (-tyyppien) ei-neoplastisiin soluihin, identifioidaan mahdollisesti sairastuneiksi soluiksi, kuten preneoplastiset tai avoimesti neoplastiset solut, ja voidaan identifioida soluiksi, joilla on metastaatin potentiaali. Samoin telomeraasin RNA-komponentin geenilokuksen tai läheisesti sitouneiden paikkojen patognomonisten uudelleenjärjestäytymisien tai kopiomäärän lisääntymisen havaitseminen solunäytteessä identifioi patologisen tilan läsnäolon tai altistumisen patologisen tilan kehittymiselle (esim. syöpä, geneettinen sairaus). Telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidikoettimia käytetään myös yksilöiden oikeuskemiallisiin tunnistamisiin, kuten isyystutkimukseen

tai rikoksesta epäiltyjen tai tuntemattomien vainajien tunnistamiseen.

Toiseksi keksintö tarjoaa käyttöön menetelmiä hoitaa tilaa, joka liittyy telomeraasitoimintaan solussa tai soluryhmässä saattamalla solu(t) kosketuksiin terapeuttisesti vaikuttavan määrän kanssa ainetta, joka muuttaa telomeraasitoimintaa tuossa solussa. Näitä aineita ovat telomeraasin RNA-komponenttia koodaavat nukleiinihapot, kolmoiskierteen muodostavat oligonukleotidit, antisense-oligonukleotidit, ribotsyymit ja plasmidit ja muut geeniterapian vektorit (esim. adenovirusvektorit, adenoviruksiin liittyvät vektorit, jne.), joita käytetään ihmisen geeniterapiaan ilmentämällä telomeraasin RNA-komponenttia, tai epätasapainossa oleva telomeraasin RNA-komponentti, kuten edellä kuvattiin. Tähän liittyvänä asiana keksintö tarjoaa käyttöön farmaseuttisia koostumuksia, jotka sisältävät näitä terapeuttisia aineita yhdessä farmaseuttisesti sopivan kantajan tai suolan kanssa, joka voi olla formulaatio lipofektiokompleksissa, liposomissa tai immunoliposomissa terapeuttisen aineen kohdistettua tarjontaa varten. Keksintö tarjoaa käyttöön myös näiden telomeraasiohjattujen terapeuttisen aineiden yhdistelmät muiden lääkkeiden kanssa, kuten antineoplastiset aineet ja muut sytotoksiset tai sytostaattiset aineet; sienilääkkeet (esim. AIDS-potilaiden hoitoon); nukleotidit, nukleosidit ja niiden analogit; ja muut farmaseuttiset aineet, jotka sopivat sairaustilojen, kuten neoplasian, hyperplasian, HIV-infektion/AIDSin ja niihin liittyvien patologioiden hoitoon, ja muiden sairauksien hoitoon, joille on tunnusomaista epänormaali telomeerin metabolia. Menetelmät voivat käsittää johdannaispolynukleotidin käytön, joka pystyy spesifisesti hybridisoitumaan telomeraasin RNA-komponenttiin nisäkkään telomeraasissa, jolloin johdannaispolynukleotidi viedään nisäkkään soluihin, joissa on telomeraasitoimintaa ja se inhiboi telomeraasitoimintaa lokalisoitumalla telomeraasin RNA-komponenttiin ja inaktivoimalla tai inhiboimalla telomeraasitoimintaa.

Keksintö tarjoaa käyttöön myös terapeuttiset aineet, jotka inhiboivat neoplasiaa tai apoptosiaa moduloimalla telomeraasin toimintaa inhiboimalla tai lisäämällä telomeraasin RNA-komponentin muodostumista; näitä aineita voidaan käyttää lääkkeinä. Näitä lääkkeitä käytetään hoitamaan erilaisia ihmisen ja eläinten sairauksia, kuten: neoplasia, hyperplasia, neurodegeneratiiviset sairaudet, ikääntyminen, AIDS, sieni-infektiot ja vastaavat. Eräässä toteutusmuodossa aine sisältää geeniterapiavektorin, joka pystyy transkriboimaan telomeraasin RNA-komponentin sekvenssin tai sen komplementin, tai vaihtoehtoisesti entsymaattisesti inaktiivisen telomeraasin RNA-komponentin, joka voi kilpailevasti inhiboida funktionaalisen telomeraasin holoentsyymin muodostumisen.

Kolmanneksi keksintö tarjoaa käyttöön diagnostiset menetelmät määrittää ihmisen telomeraasin RNA-komponentin taso, määrä tai läsnäolo, tai telomeraasitoiminta solussa, solupopulaatiossa tai kudoksenäytteessä, tai minkä tahansa edellisen uutteessa. Tähän liittyen tämä keksintö tarjoaa käyttöön käyttökelpoiset reagenssit näihin menetelmiin (kuten alukkeet ja koettimet, jotka edellä mainittiin), valinnaisesti pakattuina reagenssisarjaksi yhdessä ohjeiden kanssa reagenssisarjan käyttämiseksi diagnostisen menetelmän toteuttamiseksi.

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän sairauden (esim. neoplasian) dianosoimiseksi ihmispotilaassa, jolloin diagnosikoetta (esim. kiinnitettyjen solujen polynukleotidi-hybridisaatio in situ leimatulla telomeraasin RNA-komponentin koettimella, joka sitoutuu spesifisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponenttiin tai geenisekvenssiin) käytetään määrittämään, jos ennaltamäärätty patognomoninen konsentraatio telomeraasin RNA-komponenttia on läsnä ihmispotilaalta saadussa biologisessa näytteessä; jos koe osoittaa telomeraasin RNA-komponentin olemisen normaalialueen ulkopuolella (esim. ennaltamäärätyn patognomonisen konsentraa-

tion yläpuolella), potilaalla diagnosoidaan olevan sairaustila tai altistuminen sairaudelle.

Eräässä toteutusmuodossa keksinnön polynukleotideja käytetään diagnosoimaan patologisia tiloja tai geneettisiä sairauksia, kuten neoplasia, hyperplasia, ennenaikainen tai epänormaali solujen senesenssi, tai muita lääketietellisiä tiloja, jotka liittyvät telomeraasin toimintaan, ja tarkemmin tiloja, jotka liittyvät muutoksiin telomeraasin RNA-komponentin tai geenisekvenssin rakenteessa tai runsaudessa, tai jotka liittyvät patognomoniseen telomeraasin RNA-komponentin alleeliin, joka voidaan havaita RFLP:llä ja/tai alleeli-spesifisellä PCR:llä, tai muulla sopivalla havaintomenetelmällä. Tyypillisesti menetelmällä diagnosoidaan sairautta (esim. neoplasia) ihmispotilaassa, jolloin diagnostista koetta (esim. telomeraasin RNA-komponentin määrän ja/tai rakenteen määrittäminen) käytetään määrittämään, jos ennaltamäärätty telomeraasin RNA-komponentin patognomoninen konsentraatio tai rakenne on läsnä ihmispotilaalta saadun biologisen näytteen soluissa; jos koe osoittaa telomeraasin RNA-komponentin olemisen normaalialueen ulkopuolella (esim. ennaltamäärätyn patognomonisen konsentraation yläpuolella), potilaalla diagnosoidaan olevan sairaustila tai altistuminen sairaudelle.

Neljänneksi tämä keksintö tarjoaa käyttöön yhdistelmätelomeraasivalmisteet ja menetelmät näiden valmisteiden tuottamiseksi. Näin ollen tämä keksintö tarjoaa käyttöön yhdistelmäihmistelomeraasin, joka sisältää proteiinikomponentteja ihmisen telomeraasista sekä proteiinikomponentteja nisäkäslajista, jolla RNA-komponentti on olennaisesti homologinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentille, yhdessä keksinnön yhdistelmä-RNA-komponentin kanssa. Nämä keksinnön yhdistelmä-RNA-komponenttimolekyylit ovat niitä, jotka eroavat luonnossa esiintyvistä RNA-komponenttimolekyyleistä yhdessä tai useammassa emäsubstituutiossa, deleetiossa, terminaaliadditiossa ja/tai insertiossa, sekä RNA-komponenttimolekyylejä, jotka ovat identtisiä luonnossa esiin-

tyvän RNA-komponenttimolekyylin kanssa, joka on tuotettu yhdistelmäisäntäsoluissa. Menetelmä tällaisten yhdistelmätelomeraasimolekyylien tuottamiseksi käsittää sen, että transformoidaan eukaryoottinen isäntäsolu, joka ilmentää telomeraasin proteiinikomponentteja yhdistelmäilmentymisvektorin kanssa, joka koodaa keksinnön RNA-komponenttimolekyyliä, ja viljellään näitä isäntäsoluja, jotka on transformoitu mainitun vektorin kanssa olosuhteissa, joissa telomeraasin proteiinikomponentti ja telomeraasin RNA-komponentti ilmentyvät ja yhdistyvät muodostaen aktiivisen telomeraasimolekyylin, joka pystyy lisäämään sekvenssejä (ei välttämättä samaa sekvenssiä, jonka luonnon telomeraasi on lisännyt) kromosomi-DNA:n telomeereihin.

Viidenneksi keksintö tarjoaa käyttöön menetelmiä ihmisen telomeraasin proteiinikomponenttien puhdistamiseksi sekä telomeraasin proteiinikomponenttien puhdistamiseksi, jotka ovat peräisin nisäkäslajista, jonka RNA-komponentti on oleellisesti homologinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kanssa. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös menetelmän eristää ja identifioida näitä proteiinikomponentteja koodaavia nukleiinihappoja. Tähän liittyen tämä keksintö tarjoaa käyttöön puhdistettua ihmisen telomeraasia ja puhdistettua telomeraasia nisäkäslajista, jonka RNA-komponentti on olennaisesti homologinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kanssa, sekä puhdistettuja nukleiinihappoja, jotka koodaavat yhtä tai useampaa komponenttia näistä telomeraasivalmisteista. Tämä keksintö tarjoaa käyttöön myös farmaseuttisia koostumuksia, jotka käsittävät aktiivisena ainesosana telomeraasin proteiinikomponentteja tai nukleiinihappoa, joka koodaa telomeraasin proteiinikomponenttia.

Kuudenneksi tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmiä aineiden identifioimiseksi, jotka moduloivat (t.s. inhiboivat, lisäävät tai muuttavat spesifisyyttä) nisäkkään telomeraasitoimintaa. Tällaiset telomeraasia moduloivat aineet ovat usein pienimolekyyllisiä (esim. alle noin 3000 daltonia) ja niitä voidaan käyttää modifioimaan telomeraasitoi-

mintaa in vitro ja in vivo, usein terapeuttista vaikutusta varten, ja niitä käytetään laboratorioreagensseina ja/tai lääkkeinä.

- 5 Eräässä toteutusmuodossa keksintö tarjoaa käyttöön menetelmät identifioida ainepankista tai -kirjastosta mahdolliset aineet, jotka moduloivat telomeraasitoimintaa moduloimalla
- 10 nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin ei-kovalenttista sidosta telomeraasin proteiinikomponentin kanssa. Telomeraasin RNA-komponentti voidaan tuottaa yhdistelmätemplaatista isäntäsolussa tai syntetisoida kemiallisesti, jos halutaan. Tyypillisesti nisäkkään telomeraasin proteiinikomponentti, kuten sellainen, joka voidaan puhdistaa telomeraasia ilmentävistä soluista, ja josta voi olla luonnossa
- 15 esiintyvän telomeraasin RNA-komponentti poistettu (esim. RNase-käsittelyllä), saatetaan kosketuksiin nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin kanssa sopivissa vesipitoisissa sitoutumisolosuhteissa, jolloin ei-kovalenttinen sitoutuminen voi tapahtua RNA:n ja proteiinikomponenttien välille
- 20 ilman lisättyä ainetta (s.o. kontrollisitoutumisreaktiossa). Ei-kovalenttisen vuorovaikutuksen suuruutta telomeraasin RNA-komponentin ja proteiinikomponentin välillä yhden tai useamman ainekirjastosta tai -pankista valitun aineen läsnäollessa verrataan ei-kovalenttisen vuorovaikutuksen suuruuteen kontrollisitoutumisreaktiossa, joka sisältää
- 25 telomeraasin RNA- ja proteiinikomponentin ja joista aine(et) puuttuvat; aineet, jotka tuottavat tilastollisesti merkittävän kasvun ei-kovalenttisen sitoutumisen suuruuteen telomeraasin RNA- ja proteiinikomponenttien välillä määrittämään tällöin mahdollisiksi telomeraasia moduloiviksi aineiksi. Ei-kovalenttisen sitoutumisen suhteellinen suuruus voidaan määrittää millä tahansa sopivalla menetelmällä, kuten spesifisen sidosaффiniteetin määrittäminen, kuten kilpailevalla sitoutumiskokeella, telomeraasin katalyyttisen aktiivisuuden määrittäminen sopivassa telomeerin toistotempla
- 30 laatissa, tai muu sopiva koe funktionaalisesta ei-kovalenttisestä vuorovaikutuksesta nisäkkään telomeraasin RNA- ja

proteiinikomponenttien välillä, kuten geelisiirto tai EMSA (elektroforeettinen mobiilisuudensiirtokoe).

Toteutusmuodossa, jossa tutkitaan ei-kovalenttista sitoutumiskoetta mahdollisten telomeraasia moduloivien aineiden havaitsemiseksi, toinen tai molemmat telomeraasin RNA-komponentista tai proteiinikomponentista leimataan sopivalla havaittavalla leimalla, ja ei-kovalenttinen sitoutuminen määritetään erikseen aineen läsnäollessa tai poissaollessa, joka on valittu ainekirjastosta tai -pankista. Ei-kovalenttisen sitoutumisen määrittäminen käsittää sen, että mitataan laajuus, missä leimattu telomeraasikomponentti (RNA-komponentti tai proteiinikomponentti) sitoutuu samankaltaiseen telomeraasikomponenttiin (proteiinikomponentti tai RNA-komponentti, vastaavasti), onko mainittu samankaltainen telomeraasikomponentti erikseen leimattu vai onko se leimaamaton, kuten sieppaamalla (esim. immobilisoimalla) sitoutuneet kompleksit, jotka sisältävät leimatun telomeraasikomponentin ja mainitun samankaltaisen telomeraasikomponentin, ja erottamalla (esim. pesemällä) sitoutumaton leimattu telomeraasikomponentti sitoutuneista komplekseista, jolloin syntyy erillinen sidosfraktio, ja havaitaan sidotut kompleksit erotetussa sidosfraktiossa määrittämällä havaittavissa olevan leiman läsnäolo. Aineet, jotka tuottavat tilastollisesti merkittävän vähentymisen tai lisääntymisen telomeraasin RNA- ja proteiinikomponenttien ei-kovalenttisessa sitoutumisessa, identifioidaan näin mahdollisiksi telomeraasia moduloiviksi aineiksi. Aineet, jotka vähentävät ei-kovalenttista sitoutumista, ovat mahdollisia telomeraasi-inhibiittoreita (eli antagonisteja), kun taas aineet, jotka lisäävät telomeraasikomponenttien ei-kovalenttista sitoutumista, ovat mahdollisia telomeraasi-agonisteja.

Eräässä toteutusmuodossa mahdolliset telomeraasia moduloivat aineet identifioidaan niiden kyvyn perusteella tuottaa tilastollisesti merkittävä nousu tai lasku entsyymaattisessa aktiivisuudessa nisäkkään telomeraasissa, joka sisältää

puhdistettua telomeraasin proteiinikomponenttia ja telomeraasin RNA-komponenttia.

Eräässä toteutusmuodossa mahdolliset telomeraasia moduloivat aineet identifioidaan niiden kyvyn perusteella tuottaa tilastollisesti merkittävä lasku tai nousu reportteripolynukleotidisekvenssin transkriptiossa (esim. β -galaktosidaasigeeni, lusiferaasigeeni, HPRT-geeni), joka on toimivasti sitoutunut nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin geenin, edullisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenin transkription säätelysekvenssiin, metabolisesti aktiivisessa nisäkäsolussa. Muunnelmassa endogeeninen telomeraasin RNA-komponentin geeni nisäkäsolussa kohdistetaan homologisen kohdistusrakenteen avulla reportteripolynukleotidisekvenssin sijoittamiseksi käyttökelpoiseen sitoutumiskohtaan ylöspäin transkription säätelysekvenssistä (esim. promoottorista) endogeenisessä telomeraasin RNA-komponentin geenissä endogeenisen geenin kromosomaalisessa kohdassa. Vaihtoehtoisessa muunnoksessa eksogeeninen polynukleotidi, joka käsittää reportteripolynukleotidin, sitoutuu toimivasti nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin geenin transkription säätelyalueelle (esim. promoottori ja ylöspäin transkriptiofaktorin sitoutumiskohdista); eksogeeninen polynukleotidi siirretään nisäkkään soluun, jossa se voi integroitua ei-homologisesti kromosomaaliseen kohtaan ja/tai säilytetään tai replikoidaan episomaalisena polynukleotidina. Aineet, jotka tuottavat tilastollisesti merkittävän reportterinukleotidin transkription moduloitumisen aineella käsitellyissä soluissa, identifioidaan näin mahdollisiksi nisäkkään telomeraasia moduloiviksi aineiksi.

Koostumukset mahdollisten telomeraasia moduloivien aineiden identifioimiseksi sisältävät tyypillisesti: (1) nisäkkään telomeraasin proteiinikomponentin, kuten sellaisen, joka on voitu puhdistaa telomeraasia ilmentävistä nisäkkään soluista, edullisesti kädellisten (esim. ihmisen) soluista, ja josta tyypillisesti on irrotettu RNA-komponentti, jos sellainen on mukana, käsittelemällä RNase:lla tai muulla kä-

sittelyllä, joka on verrattavissa RNA-komponentin poistoon ja proteiinin kapasiteetin retentioon muodostaa uudelleen telomeraasiaktiivisuus samankaltaisen telomeraasin RNA-komponentin läsnäollessa sopivissa sitoutumisolosuhteissa, (2) lisäksi telomeraasin RNA-komponentin, edullisesti ihmisen RNA-komponentin, joka on tuotettu transkriboimalla yhdistelmäpolynukleotidi solussa, ja (3) vesipitoiset sitoutumisolosuhteet (esim. fysiologiset olosuhteet, telomeraasikokeen olosuhteet), ja valinnaisesti (4) reportteripolynukleotidin, joka sisältää ainakin yhden replikoitavissa olevan tai laajennettavissa olevan lisäksi telomeraasin toistuvan sekvenssin, tyypillisesti sellaisen, joka on mainitun RNA-komponentin komplementaarinen templaattiosa, ja valinnaisesti (5) nukleotideja, jotka sopivat reportteripolynukleotidin mainitun telomeerin toistuvan (toistuvien) sekvenssi(e)n replikoimiseen ja/tai laajentamiseen telomeerin koeolosuhteissa; aine lisätään tyypillisesti tällaiseen koostumukseen ei-kovalenttisen sitoutumisen ja/tai telomeraasitoiminnan arvioimiseksi suhteessa kontrolloikoostumukseen, josta mainittu aine puuttuu.

Seitsemänneksi keksintö tarjoaa myös käyttöön nolla-alleelit lisäksi telomeraasin RNA-komponentin geeneistä, kuten sellaiset, jotka on tuotettu homologisen geenin avulla suuntaamalla heterologinen polynukleotidi lisäksi telomeraasin RNA-komponenttigeeniin telomeraasin RNA-komponentin geenin inaktivoimiseksi funktionaalisesti. Keksintö tarjoaa käyttöön myös ei-ihmisenkaltaiset knockout-eläimet, joissa on telomeraasin RNA-komponentin nolla-alleeli, ja eräässä variaatiossa tarjoaa käyttöön ei-ihmisenkaltaiset knockout-eläimet, jotka ovat homotsygoottisia telomeraasin RNA-komponentin nolla-alleeleille ja joilta olennaisesti puuttuu endogeeninen telomeraasiaktiivisuus, koska endogeenisen telomeraasin RNA-komponentti puuttuu. Näitä knockout-eläimiä käytetään kaupallisina reagensseina toksisuusseulontaan, myyntiin farmaseuttisiin tutkimuslaboratorioihin telomeraasia moduloivien aineiden identifioimiseen tai

tutkimiseen, lemmikkieläiminä, sekä maataloudessa kotieläiminä muiden käyttötapojen lisäksi.

Kahdeksanneksi keksintö tarjoaa käyttöön menetelmän immortalisoida nisäkässoluja, kuten bioreaktorissa toivottuja fermentointisoluja tai haluttua solukantaa, jolla on edullisia ominaisuuksia kaupallisena tutkimusreagenssina. Menetelmässä viedään nisäkässoluun polynukleotidi, joka ilmentää funktionaalista telomeraasin RNA-komponenttia, joka pystyy muodostamaan telomeraasientsyymin telomeraasin proteiinikomponentin läsnäollessa.

Keksinnön muut piirteet ja edut tulevat ilmeisiksi seuraavasta piirrosten selityksestä, keksinnön edullisista toteutusmuodoista, esimerkeistä ja patenttivaatimuksista.

Määritelmät

Termi "telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidi" tässä käytettynä viittaa polynukleotidiin, jossa on ainakin 20 nukleotidia, ja jossa polynukleotidi käsittää segmentin, joka muodostuu ainakin 20 nukleotidista, jotka: ovat ainakin 85-prosenttisesti identtisiä luonnossa esiintyvän nisäkkään telomeraasin RNA:n komponenttisekvenssin kanssa, tyypillisesti kädellisten telomeraasin RNA-komponentin kanssa, kuten ihmisen tai apinan telomeraasin RNA-komponentin kanssa. Jotkut telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit, joilla on sekvenssimuunnoksia verrattuna luonnossa esiintyvän telomeraasin RNA-komponentin sekvenssiin tai sen komplementtiin, voivat olla sopivia hybridisaatiokoetteiksi, PCR-alukkeiksi, LCR-amplimeereiksi, epätasapainoisiksi RNA-komponenteiksi ja vastaaviksi.

Termiä "vastaa jotakin" käytetään tässä tarkoittamaan sitä, että polynukleotidisekvenssi on homologinen (t.s. se on identtinen, ei täsmälleen evoluutionaarisesti sukua) koko viitepolynukleotidisekvenssin tai sen osan kanssa, tai että polypeptidisekvenssi on identtinen viitepolypeptidisekvens-

sin kanssa. Vastakohtana tälle termiä "komplementaarinen jonkun kanssa" käytetään tässä tarkoittamaan sitä, että komplementaarinen sekvenssi on homologinen koko viitepolynukleotidisekvenssin tai sen osan kanssa. Esimerkiksi

5 nukleotidisekvenssi "TATAC" vastaa viitesekvenssiä "TATAC" ja on komplementaarinen viitesekvenssin "GTATA" kanssa.

Seuraavia termejä käytetään kuvaamaan sekvenssien suhteita kahden tai useamman polynukleotidin välillä: "viitesekvenssi", "vertailuikkuna", "sekvenssien identtisyys", "sekvenssien identtisyysprosentti" ja "olennainen identtisyys".

"Viitesekvenssi" on määrätty sekvenssi, jota käytetään perustana sekvenssivertailulle; viitesekvenssi voi olla osa suuremmasta sekvenssistä, esimerkiksi segmentti täysimittaisesta telomeraasin RNA-komponentin geenin sekvenssistä.

15 Yleensä viitesekvenssi on pituudeltaan ainakin 20 nukleotidia, usein ainakin 25 nukleotidin pituinen, ja usein ainakin 50 nukleotidin pituinen. Koska kaksi polynukleotidia voi kumpikin (1) käsittää sekvenssin (t.s. osan koko polynukleotidisekvenssistä), joka on sama kahden polynukleotidin välillä, ja (2) voi edelleen käsittää sekvenssin, joka on eri kahden polynukleotidin välillä, sekvenssivertailut kahden (tai useamman) polynukleotidin välillä suoritetaan tavallisesti vertaamalla kahden polynukleotidin sekvenssejä "vertailuikkunan kautta" sekvenssin samanlaisuuden paikallisten alueiden identifioimiseksi ja vertaamiseksi.

"Vertailuikkuna" tässä käytettynä viittaa käsitteelliseen segmenttiin, jossa on ainakin 25 vierekkäistä nukleotidipaikkaa, jossa polynukleotidisekvenssiä voidaan verrata viitesekvenssiin, jossa on ainakin 25 vierekkäistä nukleotidia ja jossa osa polynukleotidisekvenssistä vertailuikkunassa voi sisältää additioita tai deleetioita (s.o. välit) 20 prosenttia tai vähemmän, kun verrataan viitesekvenssiin (joka ei sisällä additioita tai deleetioita) kahden sekvenssin suuntaamiseksi optimaalisesti. Sekvenssien optimaalinen suuntaaminen vertailuikkunan suuntaamiseksi voidaan suorittaa Smith and Watermanin paikallisella homo-

logia-algoritmillä (1981) Adv. Appl. Math. 2: 482, Needleman and Wunsch homologiaa suuntaavalla algoritmillä (1970) J. Mol. Biol. 48: 443, etsimällä samanlaisuus Pearson and Lipmanin menetelmällä (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444, näiden algoritmien tietokonetoteutuksilla (GAP, BESTFIT, FASTA ja TFASTA, Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison WI), tai tutkimalla, ja valitaan eri menetelmien avulla saatu paras suuntaus (s.o. joka vertailuikkunassa johtaa korkeimpaan homologian prosenttiin).

Termi "sekvenssin identtisyys" tarkoittaa, että kaksi polynukleotidisekvenssiä on identtisiä (s.o. nukleotidi kerrollaan tarkasteltuna) vertailuikkunasta. Termi sekvenssien identtisyysprosentti" lasketaan vertaamalla kahta optimaalisesti suunnattua sekvenssiä vertailuikkunasta, määrittämällä kohtien lukumäärä, jossa identtinen nukleinihappomäs (esim. A, T, C, G, U tai I) esiintyy molemmissa sekvensseissä, jolloin saadaan yhteensopivien kohtien lukumäärä, jakamalla yhteensopivien kohtien lukumäärä kohtien kokonaismäärällä vertailuikkunassa (s.o. ikkunakoko), ja kertomalla tulos 100:lla, jolloin saadaan sekvenssien identtisyyden prosentti. Termi "olennainen identtisyys" tässä käytettynä merkitsee polynukleotidisekvenssin ominaisuutta, jossa polynukleotidi sisältää sekvenssin, jossa on ainakin 80-prosenttinen sekvenssien identtisyys, edullisesti ainakin 85-prosenttinen identtisyys ja usein 89-95-prosenttinen identtisyys, tavallisemmin ainakin 99-prosenttinen sekvenssien identtisyys verrattuna viitesekvenssiin vertailuikkunasta, jossa on ainakin 20 nukleotidikohtaa, usein ikkunasta, jossa on ainakin 30-50 nukleotidia, jolloin sekvenssien identtisyysprosentti lasketaan vertaamalla viitesekvenssiä polynukleotidisekvenssiin, joka voi sisältää deletioita tai additioita, jotka muodostavat kaikkiaan 20 prosenttia tai vähemmän viitesekvenssistä vertailuikkunan kautta. Viitesekvenssi voi olla osa suuremmasta sekvenssistä, esimerkiksi osana täysimittaisesta telomeraasin RNA-komponentin geenisekvenssistä, joka tässä on esitetty.

Spesifinen hybridisaatio määritellään tässä hybridinmuodostukseksi koetinpolynukleotidin (esim. keksinnön polynukleotidi, joka voi sisältää substituutioita, deletioita ja/tai additioita) ja spesifisen kohdepolynukleotidin välillä (esim. telomeraasin RNA-komponentti tai genomin geenisekvenssi, jossa koetin edullisesti hybridisoituu spesifiseen kohteeseen niin, että esimerkiksi yksittäinen vyöhyke, joka vastaa yhtä tai useampaa telomeraasin RNA-komponentin geenin RNA-lajia (tai spesifisesti lohkaistua tai tuotettua telomeraasin RNA-komponentin lajia), voidaan identifioida sopivasta solulähteestä (esim. somaattinen solu, joka ilmentää telomeraasin RNA-komponenttia) valmistetun RNA:n Northern blottauksella. Keksinnön polynukleotidit, jotka spesifisesti hybridisoituvat nisäkkään telomeraasin RNA-komponenttiin tai ihmisen telomeerin sekvensseihin, voidaan valmistaa tässä annettujen sekvenssitietojen perusteella menetelmien ja termodynaamisten periaatteiden mukaan, jotka tunnetaan alalla ja joita on kuvattu julkaisuissa Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. ja Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc. San Diego, CA, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi.

Tässä käytettynä termi "sopivat sitoutumisolosuhteet" viittaa vesipitoisiin olosuhteisiin, joissa nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti liittyy yhteen itsensä kanssa samankaltaisen proteiinikomponentin kanssa ja muodostaa entsyymaattisesti aktiivisen telomeraasin holoentsyymin, joka kykenee telomeeritoistojen katalyyttiseen replikoitumiseen, korjautumiseen ja/tai additioon sopivasta templaattista, joka sisältää telomeerin toistuvia yksiköitä; tällainen telomeerin toistotemplaatti voi olla läsnä tai poissa. Usein sopivat sitoutumisolosuhteet voivat olla fysiologiset olosuhteet. "Fysiologiset olosuhteet" tässä käytettynä viittaa lämpötilaan, pH-arvoon, ionivahvuuteen, viskositeettiin, ja vastaaviin biokemiallisiin parametreihin, jotka ovat ver-

tailukelpoisia elinvoimaisen organismin kanssa, ja/tai jotka tyypillisesti ovat solun sisällä elinvoimaisessa viljelyssä nisäkkään solussa, erityisesti olosuhteissa, jotka

5 ottoplasman olosuhteet nisäkkään solussa, joka on kasvatettu tyypillisissä laboratorioviljelyolosuhteissa, ovat fysiologiset olosuhteet. Sopivia in vitro-reaktio-olosuhteita in vitro-transkriptioseoksille ovat yleensä fysiologiset olosuhteet, ja esimerkkinä voidaan mainita erilaiset alalla

10 tunnetut tumauutteet. Yleensä in vitro-fysiologiset olosuhteet voivat käsittää 50-200 mM NaCl tai KCl, pH 6,5-8,5, 20-45°C ja 0,001-10 mM kahdenarvoista kationia (esim. Mg⁺⁺, Ca⁺⁺); edullisesti noin 150 mM NaCl tai KCl, pH 7,2-7,6, 5 mM kahdenarvoista kationia ja usein mukana on 0,01-1,0

15 prosenttia epäspesifistä proteiinia (esim. BSA). Ei-ioninen detergentti (Tween, NP-40, Triton X-100) voi usein olla mukana, tavallisesti noin 0,001-2%, tyypillisesti 0,05-2% (t/t). Tutkija voi valita erityiset vesipitoiset olosuhteet tavanomaisten menetelmien mukaan. Yleisohjeena voidaan sa-

20 noa, että seuraavat puskuria sisältävät vesipitoiset olosuhteet ovat käyttökelpoiset: 10-250 mM NaCl, 5-50 mM Tris HCl, pH 5-8, ja valinnaisesti lisätään kahdenarvoista kationia (tai kationeja) ja/tai metallikelaattoreita ja/tai ei-ionisia detergenttejä ja/tai membraanifraktioita ja/tai

25 vaahdonestoaineaineita ja/tai tuikeaineita.

Tässä käytettynä termit "leima" tai "leimattu" viittaavat havaittavan markkerin liittämiseen, esim. liittämällä radio-leimattua aminohappoa tai liittämällä polypeptidiin

30 biotinyyliosa, jotka voidaan havaita merkityllä avidiinilla (esim. streptavidiinilla, joka sisältää fluoresenssi-markkerin tai entsyymaattisen toiminnan, joka voidaan havaita optisilla tai kalorimetrisillä menetelmillä). Alalla tunnetaan erilaisia polypeptidien ja glykoproteiinien leimausmenetelmiä ja niitä voidaan käyttää. Esimerkkejä polypeptidien leimoista ovat, mutta ei niihin rajoittuen, seuraavat: radioisotoopit (esim. ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), fluoresenssileimat (esim. FITC, rodamiini, lantanidifosforit),

entsyymaattiset leimat (esim. piparjuuriperoksidaasi, β -galaktosidaasi, luciferaasi, alkaalinen fosfataasi), biotinyyliryhmät, ennaltamäärätyt polypeptidiepitoopit, jotka sekundäärinen reportteri tunnistaa (esim. leusiinin veto-

5 ketjuparisekvenssit, sitoutumiskohdat sekundäärisille vasta-aineille, transkription aktivaattoripolypeptidi, metalliset sidosdomeenit, epitooppimerkit). Joissakin toteutusmuodoissa leimat liitetään eripituisilla välivarsilla vähentämään jäännöspotentiaalin steeristä häirintää.

10

Tässä käytettynä termi "tilastollisesti merkittävä" tarkoittaa tulosta (s.o. koelukema), joka yleensä on ainakin kaksi standardipoikkeamaa ylä- tai alapuolella keskiarvon ainakin kolmesta eri kontrollikokeen lukeman määrittämisestä

15 ja/tai joka on tilastollisesti merkittävä määritettynä Studentin t-testillä tai muulla alalla hyväksytyllä tilastollisen merkittävyyden mittausmenetelmällä.

20

Tässä käytettynä termit "patognomoninen konsentraatio", "patognomoninen määrä" ja "patognomoninen hybridisaatiomalli" viittaavat telomeraasin RNA-komponentin konsentraatioon, määrään tai lokalisaatiomalliin, vastaavasti, näytteessä, joka osoittaa patologisen (esim. neoplastisen, senesentin, immuunipuutos-, neurodegeneratiivisen, tulehduksellisen jne.) tilan olemassaoloa tai altistumista sille, että on kehittymässä neoplastinen sairaus, kuten karsinooma, sarkooma tai leukemia. Patognomoninen määrä on telomeraasin RNA-komponentin määrä solussa tai solunäytteessä, joka on normaalien kliinisten arvojen ulkopuolella,

25 jotka arvioidaan tulevilla ja/tai takautuvilla tilastollisilla kliinisillä tutkimuksilla. Yleensä yksilöllä, jolla on neoplastinen sairaus (esim. karsinooma, sarkooma tai leukemia), on telomeraasin RNA-komponentin määrä solussa tai kudoksenäytteessä sellainen, että se on normaalien, ei-sairaalle ihmiselle tunnusomaisten arvojen ulkopuolella;

30 tyypillisesti patognomoninen konsentraatio on ainakin noin yhden standardipoikkeaman keskimääräisen normaaliarvon ulkopuolella, tavallisemmin se on ainakin noin kaksi stan-

35

dardipoikkeamaa tai enemmän keskimääräisen normaaliarvon
yläpuolella. Olennaisesti kuitenkin kaikki kliiniset diag-
noositestit tuottavat jonkun prosentin vääriä positiivisia
ja vääriä negatiivisia tuloksia. Diagnostisen kokeen herk-
5 kyyden ja selektiivisyyden täytyy olla riittävä täyttämään
diagnoosin tarkoitus ja mitkä tahansa asiaankuuluvat säätö-
vaatimukset. Yleensä keksinnön diagnoosimenetelmiä käyte-
tään identifioimaan yksilöitä mahdollisesti sairaksi, ja
ne antavat lisäparametrin sairauden eri diagnooseissa, jot-
10 ka ovat pätevän terveysalan ammattilaisten tekemiä.

Tässä käytettynä termi "sairausalleeli" viittaa geenin
alleeliin, joka pystyy tuottamaan tunnistettavan sairauden.
Sairausalleeli voi olla vallitseva tai väistynä ja se voi
15 tuottaa sairauden suoraan tai kun se on mukana spesifisen
geneettisen taustan tai aikaisemmin olemassa olleen patolo-
gisen tilan yhteydessä. Sairausalleeli voi olla läsnä gee-
niyhdistelmässä tai se voi syntyä de novo yksilössä somaati-
sien mutaation vaikutuksesta.

20 Termiä "antineoplastinen aine" käytetään tässä viittaamaan
aineisiin, joilla on funktionaalinen ominaisuus inhiboida
neoplasman kehittymistä tai edistymistä ihmisessä, usein
inhiboidaan myös metastaasia tai metastaattista potentiaa-
25 lia.

Tässä käytettynä termi "toimivasti sitoutunut" viittaa po-
lynukleotidielementtien sidokseen funktionaalisessa suh-
teessa. Nukleiinihappo on "toimivasti sitoutunut", kun se
30 on sijoittunut funktionaaliseen suhteeseen toisen nukle-
iinihapposekvenssin kanssa. Esimerkiksi promoottori tai
aktivaattori on toimivasti sitoutunut koodaavaan sekvens-
siin, jos se vaikuttaa koodaavan sekvenssin transkriptioon.
Toimivasti sitoutunut tarkoittaa sitä, että sitoutuvat DNA-
35 sekvenssit ovat tyypillisesti vierekkäisiä ja siellä, missä
on tarpeen yhdistää kaksi proteiinien koodaavaa aluetta,
vierekkäisiä ja lukukehyksessä. Koska aktivaattorit kuiten-
kin yleensä toimivat ollessaan useiden kiloemästen erotta-

mia promoottorista, ja intronisekvenssit voivat olla eri pituisia, jotkut polynukleotidielementit voivat olla toimivasti sitoutuneita, mutta eivät vierekkäisiä. Rakennegeeni (s.o. HSV tk-geeni), joka on käyttökelpoisesti sitoutunut

5 polynukleotidisekvenssiin, joka vastaa endogeenisen geenin transkription säätelysekvenssiä, ilmentyy yleensä olennaisesti samassa temporaalisessa ja solutyypille spesifisessä mallissa kuin luonnossa esiintyvä geeni.

10 Tässä käytettynä termi "transkriptionaalinen yksikkö" tai "transkriptionaalinen kompleksi" viittaa polynukleotidisekvenssiin, joka sisältää rakennegeenin (eksonit), cis-toimivan sitoutuneen promoottorin ja muita cis-toimivia sekvenssejä, jotka ovat tarpeen rakennesekvenssien tehokkaalle

15 transkriptiolle, etäisyyttä sääteleviä elementtejä, jotka ovat tarpeen rakennesekvenssien sopivalle kudosspesifiselle ja kehitykselliselle transkriptiolle, ja lisä-cis-sekvenssejä, jotka ovat tärkeitä tehokkaalle transkriptiolle ja translaatiolle (esim. polyadenyloitumiskohta, mRNA:n stabiilisuutta kontrolloivat sekvenssit).

20

Termiä "transkription modulointi" käytetään tässä viittamaan cis-asemaan sitoutuneen rakennesekvenssin joko lisäystranskription tai inhibointitranskription kapasiteettiin; tämä lisäys tai inhiboituminen voi olla mahdollinen spesifisen tapahtuman ilmaantuessa, kuten induktorilla tapahtuva stimulaatio ja/tai voi ilmetä vain tietyissä solutyypeissä.

25 Tässä käytettynä termi "transkription säätelyalue" viittaa DNA-sekvenssiin, joka sisältää funktionaalisen promoottorin ja mitä tahansa mukaan liittyneitä transkriptioelementtejä (esim. aktivaattori, CCAAT-laatikko, TATA-laatikko, SP1-kohta jne.), jotka ovat välttämättömiä polynukleotidisekvenssin transkriptiolle, joka on käyttökelpoisesti sitoutunut transkription säätelyalueeseen.

30

35

Termi "nolla-alleeli" tässä käytettynä tarkoittaa, että geenilokus käsittää ainakin yhden mutaation tai rakenteel-

lisen muutoksen, niin että nolla-alleeli on olennaisesti kykenemätön ohjaamaan funktionaalisen geenituotteen tehokasta ilmentymistä. "Knockout-solu" on solu, jossa on ainakin yksi endogeenisen geenin nolla-alleeli, tyypillisesti se on homotsygoottinen nolla-alleelille. Näin ollen esimerkiksi knockout-solu voi olla homotsygoottinen nolla-alleelille telomeraasin RNA-komponentin lokuksessa, niin että knockout-solu on olennaisesti kykenemätön ilmentämään funktionaalista telomeraasin RNA-komponenttia.

Lyhyt kuvaus piirroksista

Kuva 1. Tutkittiin telomeraasiaktiivisuutta soluista, jotka ilmentävät templaatti-mutatoituneita TRC3 DEAE-sefaroosi-fraktioituja uutteita mutanttia TRC3 ilmentävistä stabiileista transformanteista käyttäen tavanomaisia kokeita erilaisissa reaktio-olosuhteissa. Uutteita soluista, jotka ilmentävät MuC+17 TRC3:a (vyöhykkeet 1, 4, 7, 10, 13, 16, leimattu C*:llä), MuC TRC-3:a (vyöhykkeet 2, 5, 8, 11, 14, 17, leimattu C:llä) tai MuA TRC3:a (vyöhykkeet 3, 6, 9, 12, 15, 18, leimattu A:lla), tutkittiin normaaleissa reaktio-olosuhteissa (vyöhykkeet 1-6), normaali-olosuhteet plus 0,5 mM ddCTP (vyöhykkeet 7-9), normaali-olosuhteet miinus dTTP plus 0,5 mM ddTTP (vyöhykkeet 10-12), tai normaali-olosuhteet miinus dATP plus 0,5 mM ddATP (vyöhykkeet 13-18). Koe-reaktiot vyöhykkeissä 1-9 sisälsivät 8 μ M kokonais dGTP:tä, josta 1 μ M oli 32 P-dGTP:tä (800 Ci/mmol). Mutanttitelomeraasin havaitsemisen helpottamiseksi koereaktiot vyöhykkeissä 10-18 sisälsivät 8 μ M kokonais dGTP:tä, josta 2 μ M oli 32 P-dGTP:tä (800 Ci/mmol). Uutteet käsiteltiin DNasettomalla RNasella (25 μ g/ml 10 min. 30°C:ssa) ennen telomeraasikokeita (vyöhykkeet 1-3, 16-18). Reunavyöhykkeet sisältävät DNA-markkereita, joiden nukleotidikoot (nt) on esitetty.

Kuva 2. Telomeraasin RNA-komponentin (hTR) ja GAPDH RNA:n vakiotaso määritettiin käyttäen kvantitatiivista RT-PCR:ää. Kontrollikokeet osoittavat, että kaikki PCR-määrät olivat

lineaarisella alueella jopa 25 sykliä. RT-PCR analysoitiin viidelle normaalille telomeerinegatiiviselle solulinjalle (1-5) ja viidelle tuumorin telomeraasipositiivisille solulinjoille (6-10): 1) primäärinen sikiön keuhko; 2) primäärinen sikiön käden iho; 3) aikuisen primääri prostata; 4) primääriset sinoviaaliset fibroblastit; 5) esinahan fibroblastit; 6) melanooma LOX; 7) leukemia U251; 8) NCIH23 keuhkokarsinoma; 9) paksusuolen tuumori SW620; 10) rintatuumori MCF7. PCR-tuotteet leimattiin ^{32}P :llä, liuotettiin 6% PAGE:en, ja kvantifioitiin käyttäen PhosphorImageria. Suhteellinen transkriptio ilmaistaan mielivaltaisissa yksiköissä.

Kuva 3. TRF:n keskimääräinen pituus telomeraasin RNA-komponentin antisense- ja vektorin kontrollisoluissa. HeTe7-solut, jotka stabiilisti ilmentävät 10-3-hTR antisense- tai vektorikontrollia, valikoitiin hygromysiini- ja puromysiinikasvualustaan ja korjattiin 23 PDL:ssä transfektion jälkeen. Tuman DNA puhdistettiin, leikattiin HinfI:llä ja RsaI:llä, ja ajettiin 0,5% agarosigeelissä. DNA tutkittiin geelissä (TTAGGG)₃-oligonukleotidilla telomeerin terminaalisten restriktiofragmenttien (TRF) leimaamiseksi. Geeli skannattiin Molecular Dynamic's PhosphorImager-laitteella ja keskimääräinen TRF määritettiin kuvatulla tavalla (Allsopp et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 10114). Katkoviivat osoittavat keskimääräisen keski-TRF:n antisense- ja kontrolliryhmille.

Kuva 4. Kaaviollinen esitys PCR-menetelmästä in situ.

Edullisten toteutusmuotojen kuvaus

Tämä keksintö tarjoaa käyttöön menetelmät, reagenssit, geneettisesti modifioidut eläimet ja solut, sekä farmaseuttiset koostumukset, joilla on yhteys ihmisen telomeraasin ribonukleoproteiiniin.

Tässä jäljessä käytetyt nimet ja laboratoriotoimenpiteet soluvilyssä, molekyyli-genetiikka ja nukleiinihappokemia ja hybridisaatio, joita kuvataan jäljessä, voivat olla hyvin tunnettuja ja alalla tavallisesti käytettyjä menetelmiä.

- 5 Standardimenetelmiä käytetään yhdistelmänukleiinihappo-
menetelmiin, polynukleotidisynteesiin ja mikrobiviljelyyn
ja transformaatioon (esim. elektroporaatio, lipofektio).
Tekniikat ja menetelmät toteutetaan yleensä alalla ta-
vanomaisten menetelmien ja erilaisten yleisten viitejul-
10 kaisujen mukaan (katso yleisesti Sambrook et al. *Molecular
Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (1989) Cold Spring
Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., joka on
liitetty tähän yhteyteen viitteeksi), joita annetaan kautta
koko tämän asiakirjan.

15

Oligonukleotidit voidaan syntetisoida Applied Bio Systems-
oligonukleotidisyntesoiijalla valmistajan antamien ohjeiden
mukaan.

20

Menetelmiä PCR:n vahvistamiseksi on kuvattu alalla (PCR
Technology: Principles and Applications for DNA Amplifica-
tion toim. HA Erlich, Freeman Press, New York, NY (1992);
PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, toim.
Innis, Gelfland, Snisky and White, Academic Press, San
25 Diego, CA (1990); Mattila et al. (1991) Nucleic Acids Res.
19: 4967; Eckert, K.A. and Kunkel, T.A. (1991) PCR Methods
and Applications 1: 17; PCR toim. McPherson, Quirkles and
Taylor, IRL Press, Oxford; ja US-patentti 4,683,202, jotka
kaikki on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi).

30

Tiivistelmä keksinnöstä

Keksintö ilmenee osaksi ihmisen telomeraasin RNA-komponen-
tin ja tämän RNA-komponentin geenin kloonauksesta ja ero-
35 tuksesta, sekä niihin liittyvistä transkription säätelyele-
menteistä. Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleoti-
disekvenssi on esitetty alla. Käytännöllisyyden vuoksi
sekvenssi on esitetty käyttäen standardilyhenteitä ribonuk-

leotideille (A on riboadeniini, G on riboguaniini, C on ribosytidiini ja U on uridiini). Alan ammattimiehet tunnistavat, että alla esitetty sekvenssi esittää myös cDNA:n sekvenssin, jossa ribonukleotidit on korvattu deoksiribonukleotideilla (ja uridiini on korvattu tymidiinillä).

GGGUUGC GGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
 UAACCCUAA CUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
 UGUUUUUCUCGCGUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
 UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACA AAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
 GCCCCUCCCGGGACCUGCGGGCGGGUCGCUGCCCAGCCCCGAACCCCGCC
 UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
 GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
 UCACCGUUUCAGGCCGCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
 GCGAUUCCCUAGAGCUAUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGGCUCACACAUGC
 AGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
 CCCUCGCCGGCAGUGGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGC
 CAGUGUGCU

Ylläoleva sekvenssi on esitetty 5'-3'-suunnassa ja on numeroitu viittauksia varten. RNA-komponentin templaattisekvenssin uskotaan olevan sijoittunut alueelle, jonka määrittävät nukleotidit 50-60 (5'-CUAACCCUAAC-3'), joka on komplementaarinen telomeerin sekvenssille, joka koostuu noin yhdestä ja kahdesta kolmasosasta telomeerin toistuva yksiköitä.

Tämä sekvenssi johdettiin cDNA-klooneista ja RNA-komponentin genomien kloonista. Kun RNA-komponentti on ensin transkriboitu vastaavasta geenistä, ainakin jotkut syntyneistä RNA-transkriptiteistä ovat paljon pitempiä kuin yllä esitetty ~560 nukleotidin sekvenssi ja voi itse asiassa sisältää

enemmän kuin 1000 nukleotidia. Täysin funktionaalinen telomeraasimolekyyli voi kuitenkin olla muodostunut transkripteista, jotka koostuvat yllä esitetystä ~560 nukleotidisekvenssistä. RNA-komponentin 3'-pään luonnon telomeraasissa

5 uskotaan olevan alueessa, jonka määrittävät nukleotidit 514-559 ylläolevassa sekvenssissä; eräs analyysi osoittaa, että 3'-pää voi olla U-jäännös nukleotidissa 538. Yhdistelmä-RNA-komponenttimolekyyliä, jotka sisältävät vähemmän kuin yllä esitetyn sekvenssin nukleotidit 1-559, voidaan

10 myös käyttää aktiivisen telomeraasin valmistamiseksi.

Genomin klooni identifioitiin ja eristettiin ihmisen DNA:n genomikirjastosta insertoituna lambdavektoriin FIXII. Genomiklooni, joka sisältää RNA-komponentin geenisekvenssit,

15 sisälsi ~15 ke:n insertin ja nimettiin klooniksi 28-1. Geeni on lokalisoitunut kromosomin 3 q-haaran ulompaan päähän. Sekvenssin informaatio, joka on saatu SauIIIAl-restriktioentsyymien tunnistuskohdasta ~15 ke:n insertin toisesta päästä sisäisen HindIII-restriktioentsyymien tun-

20 nistuskohtaan, joka käsittää koko kypsän RNA-komponentisekvenssin sekä RNA-komponentin geenin transkription säätelyelementit lambda-kloonista 28-1, on esitetty jäljessä käyttäen deoksiribonukleotidien standardilyhennyksiä ja kuvattu 5'-3'-suunnassa.

25

30

35

50

100

150

200

250

300

350

400

450

500

550

GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGTACT

CAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAAGTACA

AGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGATAAT

GTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTTGACATATAACTCAAAGCATT

TAGCATCTACTCTATGTAAGGTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAAAAA

CAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAAACTTTACAACCTGGCAGATGCTAT

GAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAGAGG

GAGATATTTTACTTTTCTTTTCAGATCGAGGACCGACAGCGACAAGTCCAC

GGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAAACTTTTAAGATCATCCTGTCAT

TTATATGTAAAGTGCAGTATACTGGCCATTATAAAAATTTCGCGGCCGGG

TGCGGTGGCTCATACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCGGGT

GGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAAA 600
 CCCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAACTAGCTGGGCGTGGTGGCAGGCG 650
 CCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGAACC 700
 CGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCATCCA 750
 GCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTACAAT 800
 TTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTACCTCATCAAGACACAGCACTACT 850
 TTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTCTTTCCTAATAAAAGGGAG 900
 ATTCAGTCCTTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGCCAT 950
 CCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGGCAG 1000
 GGTAGGAACCTCGGACGCATCCCACTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTGTAG 1050
 TCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTCACAAAGTTCTCCAAAAAATGTGAT 1100
 GATCAAACTAGGAATTAGTGTTCTGTGTCTTAGGCCCTAAAATCTTCCT 1150
 GTGAATTCCATTTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGCAGA 1200
 GGATAGAAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAAAGA 1250
 AGGTCGGAAGTAAAGACGCAAAGCCTTTCCCGGACGTGCGGAAGGGCAAC 1300
 GTCCTTCCTCATGGCCGGAATGGAACCTTTAATTTCCCGTTCCCCCAAC 1350
 CAGCCCGCCCGAGAGAGTGACTCTCAGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGG 1400
 CCAATCCGTGCGGTGCGGCGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGGC 1450
 AGCGCACCGGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCAT 1500
 TTTTGTCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGCTCC 1550
 CCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCGGCC 1600
 TGCCGCCTTCCACCGTTCATTCTAGAGCAAACAAAAAATGTCAGCTGCTG 1650
 GCCCGTTCGCCCCCTCCCGGGACCTGCGGCGGGTCTGCTGCCAGCCCCCGA 1700
 ACCCCGCTTGAGGGCCGCGGTGCGGCCGGGGCTTCTCCGGAGGCACCCACT 1750
 GCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTCAGCCGCGGGTCTCTCGGGGGCGAG 1800
 GCGGAGGTTACCGTTTCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTCCCG 1850
 CGCGCGGCGCGATTCCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTC 1900
 ACACATGCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGCGCA 1950
 2000

TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTGACT
 GACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTCCAA
 AGTCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCGGGGTTGCCTGGAGCCGTTCC
 TGCGTGGGTTCTCCCGTCTTCCGCTTTTTTGTTCCTTTTATGGTTGTATT
 ACAACTTAGTTCCTGCTCTGCAGATTTTGTGAGGTTTTTGTCTCTCCCA
 AGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCATTT
 TTTTTTGAGAGATCATTTAAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGATCTA
 AATGAACATTGGAAATTGTGTTCCCTTAATGGTCATCGGTTTATGCCAGA
 GGTTAGAAGTTTCTTTTTTTGAAAAATTAGACCTTGGCGATGACCTTGAGC
 AGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT

15

20

25

30

35

RNA-komponenttisekvenssi alkaa emäksestä 1459. Joukko tran-
 skription säätelyelementtejä on identifioitu sekvenssissä.
 A/T Box yleinen sekvenssi löytyy nukleotideista 1431-1436;
 PSE yleiset sekvenssit löytyvät nukleotideista 1406-1414
 sekä nukleotideista 1508-1526; CAAT Box yleinen sekvenssi
 löytyy nukleotideista 1399-1406; SP1 yleinen sekvenssi
 löytyy nukleotideista 1354-1359; ja β/γ -interferonin vaste-
 elementin yleinen sekvenssi löytyy nukleotideista 1234-
 1245. Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin vakiotila-
 transkriptio ihmisen soluissa, kuten HT1080:ssä (telomeraa-
 sin ilmentyminen) on olennaisesti muuttumaton, kun sekvens-
 sit nukleotidista 1159 ylöspäin deletoidaan vektoreissa,
 jotka transfektoidaan stabiilisti soluihin.

DNA oravasaimirista, jonka uskotaan olevan geneettisesti
 erilaistunein ei-ihmisenkaltainen kädellinen verrattuna
 ihmiseen, sisältää telomeraasin RNA-komponenttiseen,
 jonka kopiomäärää voidaan lisätä PCR-alukkeilla, jotka
 sisältävät sekvenssit, jotka vastaavat esitettyä ihmisen
 telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssiä tai
 ovat komplementaarisia sen kanssa. Muilla ei-ihmisenkalta-
 illa kädellisillä uskotaan olevan telomeraasin RNA-kom-
 ponenttisekvenssejä, joiden kopiomäärä on myös lisättävissä

PCR-alukkeilla, jotka on saatu ihmisen telomeraasin RNA-komponenttiseen sekvenssistä.

Telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit

5

10

15

20

Sekvenssien esittäminen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentille ja sen geenille, kuten edellä ihmisen telomeraasille ja kuvassa 5 oravasaimirin telomeraasille tekee mahdolliseksi konstruoida eristetyt polynukleotidit, jotka sisältävät ainakin 15 vierekkäisen nukleotidin, tyypillisesti ainakin 20-25 vierekkäisen polynukleotidin sekvenssin, jotka ovat olennaisesti identtisiä nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin sekvenssin tai nisäkkään RNA-komponentin geenisekvenssin kanssa. Edelleen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin (ja geenin) sekvenssit tekevät mahdolliseksi konstruoida nukleiinihappohybridisaatiokoettimet ja PCR-alukkeet, joita voidaan käyttää havaitsemaan vierekkäisen telomeraasin RNA-komponentin ja/tai geenin RNA- ja DNA-sekvenssit solussa, solunäytteessä, kudoksetä, reaktioastiassa, hybridisaatiomembraanissa tai vastaavassa.

25
30

35

Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin sekvenssejä sisältävät polynukleotidit voivat sisältää sekvenssejä, jotka auttavat transkriptiota (ilmentymissekvenssejä), RNA:n stabilointisekvenssejä ja vastaavia. Yleiset periaatteet tällaisten polynukleotidien konstruoinnista ottaen huomioon tällä hetkellä julkaistu keksinnön sekvenssi-informaatio ja opastus ja ohjeet ovat alalla hyvin tunnettuja ja kuvattu edelleen julkaisussa Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. Nämä polynukleotidit voivat esimerkiksi, mutta ei niihin rajoittuen, sisältää promoottorin ja valinnaisesti aktivaattorin käytettäväksi eukaryoottisissa ilmentymisissä, ja valinnaisesti sekvenssejä, jotka ovat tarpeellisia vektorin replikoitumisessa. Tyypillinen eukaryoottinen ilmentymiskasetti sisältää polynukleotidisekvenssin, joka transkriptiossa tuottaa nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin transkriptin; tällainen polynukleotidisekvenssi on

sitoutunut alaspäin (s.o. transkription suunnassa 5' - 3') sopivasta promoottorista, kuten HSV tk-promoottorista tai pgk- (fosfoglyseraattikinaasi) promoottorista, valinnaisesti sitoutuneena aktivaattoriin.

5

Lisäksi kun funktionaalisen telomeraasin RNA-komponentin ilmentymistä ei haluta, tämän keksinnön polynukleotidien ei tarvitse transkriboida funktionaalisen telomeraasin RNA-komponentin transkriptia. Tämän keksinnön polynukleotidit
10 voivat toimia hybridisaatiokoettimina ja/tai PCR-alukkeina (amplimeereina) ja/tai LCR-oligomeereina telomeraasin RNA-komponentin RNA- tai DNA-sekvenssien havaitsemiseksi.

15

20

Vaihtoehtoisesti voivat tämän keksinnön polynukleotidit toimia hybridisaatiokoettimina tai alukkeina sukulaisgeenien RNA- tai DNA-sekvenssien havaitsemiseen, tai telomeraasin RNA-komponentin geenin RNA- tai DNA-sekvenssien havaitsemiseen sukulaislajissa, tyypillisesti nisäkäslajissa. Tällaista hybridisaatiota ja PCR-sovellutuksia varten keksinnön polynukleotidien ei tarvitse transkriboida funktionaalista telomeraasin RNA-komponenttia. Näin ollen keksinnön polynukleotidit voivat sisältää olennaisia deleetioita, additioita, nukleotidisubstituutioita ja/tai transpositioita, kunhan spesifinen hybridisaatio tai spesifinen kopioiden lisääminen nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin sekvenssiin pysyy tallella.

25

30

35

Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin ja vastaavien geenisekvenssien genomien tai cDNA:n kloonit voidaan eristää kloonikirjastoista (saatavissa esim. Clontechiltä, Palo Alto, CA) käyttäen hybridisaatiokoettimia, jotka on suunniteltu tässä esitettyjen nukleotidisekvenssien pohjalta ja käyttäen tavanomaisia hybridisaatioseulontamenetelmiä (esim. Benton WD and Davis RW (1977) Science 196: 180; Goodspeed et al. (1989) Gene 76: 1). Kun halutaan cDNA-klooni, edullisia ovat sellaiset kloonikirjastot, jotka sisältävät cDNA:ta, joka on peräisin somaattisen solun RNA:sta tai muusta telomeraasin RNA-komponenttia ilmentävän

solun RNA:sta. Vaihtoehtoisesti synteettiset polynukleotidisekvenssit, jotka vastaavat koko tässä esitettyjä sekvenssejä tai osaa niistä, voidaan konstruoida oligonukleotidien kemiallisella synteetillä. Lisäksi voidaan käyttää

5 polymeerasiketjureaktiota (PCR) käyttäen alukkeita ja perustuen tässä esitettyihin sekvenssitietoihin DNA-fragmenttien kopiomäärän lisäämiseksi, jotka ovat peräisin genomien DNA:sta, RNA-yhdistelmistä, tai cDNA-kloonikirjastoista. US-patentit 4,683,195 ja 4,683,202 kuvaavat PCR-menetelmiä.

10

Näillä polynukleotideilla on erilaisia käyttöjä, kuten telomeraasin RNA-komponentin koettimina, templaatteina funktionaalisen tai ei-funktionaalisen telomeraasin RNA-komponentin tuottamiseksi soluissa, kaupallisina diagnoosi-

15 reagensseina telomeraasin RNA-komponentin havaitsemiskokeen standardoimiseksi, geeniterapiapolynukleotideina eläimille antamista varten; näitä polynukleotideja voidaan myös käyttää ruoka-aineina, palavina energianlähteinä, UV-säteilyä absorboivina auringonsuoja-aineina, ja viskositeettia lisäävinä liuotusaineina, muiden käyttöjen ohella.

20

Tässä kuvatut plasmidit, jotka konstruoitiin ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ja RNA-komponentin geenin kloonauksen aikana, ovat tämän keksinnön tärkeitä seikkoja.

25

Näitä plasmideita voidaan käyttää tuottamaan ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia sekä geeniä sille olennaisesti puhtaassa muodossa, joka on vielä toinen tärkeä seikka tässä keksinnössä. Lisäksi alan ammattimiehet tietävät, että useat muut plasmidit, sekä plasmidittomat nukleiinihapot olennaisesti puhtaassa muodossa, jolloin ne sisältävät koko ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleotidisekvenssin tai ainakin käyttökelpoisen osan siitä, ovat käyttökelpoista tämän keksinnön tarjoamaa materiaalia.

30

35

Mitä tulee keksinnön nukleiinihappoihin ja niitä sisältäviin valmisteisiin, alan ammattimiehet tietävät, että keksinnön nukleiinihapot sisältävät sekä DNA- että RNA-molekyylejä sekä niiden synteettisiä, ei-luonnossa esiintyviä

35

analogeja, ja deoksiribonukleotidien, ribonukleotidien ja/tai jomman kumman analogien heteropolymeerejä. Keksinnön nukleiinihapon tai nukleiinihappoanalogin erityinen koostumus riippuu tarkoituksesta, johon sitä käytetään ja ympäristö(i)stä, johon materiaali sijoitetaan. Modifioidut tai synteettiset, ei-luonnossa esiintyvät nukleotidit on suunniteltu toimimaan erilaisissa tarkoituksissa ja pysymään stabiileina erilaisissa ympäristöissä, kuten niissä, joissa on läsnä nukleaaseja, kuten alalla hyvin tiedetään. Modifioidut tai synteettiset, ei-luonnossa esiintyvät nukleotidit verrattuna luonnossa esiintyviin ribo- tai deoksiribonukleotideihin voivat erota nukleotidin hiilihydraatin (soke-
rin), fosfaattisidoksen tai emäsosien suhteen, tai voivat jopa sisältää ei-nukleotidiemäksen (tai ei lainkaan emästä) joissakin tapauksissa. Katso esim. Arnold et al., PCT-patenttijulkaisu nro WO 89/02439, nimeltään "Non-nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes", joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. Koska keksinnön nukleiinihapot voivat sisältää paljon erilaisia nukleotideja, voivat nämä nukleiinihapot myös toimia monissa erilaisissa käyttökel-
poisissa toiminnoissa.

Samankaltaisten geenien erotus

Kuten edellisessä kuvauksessa on osoitettu, ihmisen telomeraasin RNA-komponentin sekvenssiä sisältävien puhdistettujen nukleiinihappojen käyttäminen antaa arvokkaita diagnostisia ja terapeuttisia menetelmiä ja reagensseja sekä muita tärkeitä etuja. Eräs tärkeä tämän keksinnön etu on se, että keksinnön menetelmiä ja reagensseja voi käyttää telomeraasin RNA-komponentin ja RNA-komponentille tarkoitettujen geenien erottamiseen mistä tahansa nisäkäslajista, jonka RNA-komponentti on olennaisesti homologinen tämän keksinnön ihmisen RNA-komponentin kanssa. Fraasi "olennaisesti homologinen" viittaa homologian asteeseen, joka tarvitaan ihmisen RNA-komponentin oligonukleotidin tai nukleiinihapposekvenssin spesifiseen hybridisaatioon toisen nisäkäslajin RNA-komponentin sekvenssin nukleiinihapposek-

venssiin. Kun tällainen olennainen homologia on annettu, alan ammattimiehet voivat käyttää keksinnön nukleiinihappoja ja oligonukleotidialukkeita ja koettimia identifioimaan ja eristämään olennaisesti homologisia sekvenssejä.

5

10

15

20

25

30

35

Voidaan tutkia esimerkiksi genomien tai cDNA:n kirjastoa homologisten sekvenssien havaitsemiseksi. Voidaan myös käyttää alukkeita, jotka vastaavat RNA-komponentin sekvenssin ja PCR:llä tapahtuvan kopiomäärän lisääntymisen alueita vähän tai kohtuullisen tiukissa olosuhteissa spesifisen homologisen nukleiinihapposekvenssin kopiomäärän lisäämiseksi RNA- tai DNA-valmisteista nisäkäslajista. Käyttämällä näitä ja muita samanlaisia menetelmiä alan ammattimiehet voivat helposti eristää ei vain erilaisia RNA-komponentin nukleiinihappoja ihmisen soluista, vaan myös homologisia RNA-komponentin nukleiinihappoja muista nisäkässoluista, kuten kädellisten soluista, eläinlääketieteellisesti mielenkiintoisten nisäkkäiden, s.o. karjan, lampaiden, hevosen, koirien ja kissojen soluista, ja jyrsijöiden, s.o. rottien, hiirien ja hamstereiden soluista. Näitä nukleiinihappoja voidaan vuorostaan käyttää transgeenisten eläinten valmistamiseen, jotka ovat erittäin arvokkaita telomeraasitoimintaa säätelevien lääkkeiden seulontaan ja tutkimiseen. Käyttämällä esimerkiksi keksinnön plasmidia voidaan "nukuttaa" RNA-komponenttiteeni tai korvata luonnollinen RNA-komponenttiteeni indusoitavalla yhdistelmägeenillä mus spretus alkiokantasolussa ja synnyttää sitten transgeeninen hiiri, joka on käyttökelpoinen mallina tai koejärjestelmänä tutkittaessa ikään tai senesenssiin liittyviä sairauksia. Esimerkki 9 jäljessä kuvaa, kuinka tällaista metodologiaa on käytetty identifioimaan ja eristämään kädellisten RNA-komponenttisekvenssejä.

Muita ihmisen ja apinan telomeraasin RNA-komponenttien nisäkäshomologeja ja/tai niiden kaltaisia geenejä voidaan identifioida ja eristää seulomalla sopivaa ei-ihmisenkaltaisen nisäkkään genomien tai cDNA-kloonien kirjastoa, kuten sellaista, joka on saatu hiirestä, rotasta, kanista, mar-

susta, hamsterista, koirasta, naudasta, lampaista, susista porsaista tai muusta genomi- tai cDNA-kirjastosta sopivassa vektorissa, kuten hiivan keinotekoiset kromosomit, kosmidit, tai bakteriofaagi λ (esim. λ Charon 35), polynukleotidikoettimen kanssa, joka sisältää sekvenssin, jossa on ainakin 20 vierekkäistä nukleotidia (tai niiden komplementtia) ihmisen tai apinan telomeraasin RNA-komponentin tai geenin polynukleotidisekvenssistä. Tyypillisesti hybridisointi- ja pesuolosuhteet toteutetaan erittäin tiukasti tavanomaisten hybridisaatiomenetelmien mukaan. Positiiviset kloonit erotetaan ja sekvensoidaan. Asian valaisemiseksi mutta ei rajoittamiseksi voidaan täysipituinen polynukleotidi, joka vastaa ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleotidisekvenssiä 559, leimata ja käyttää hybridisaatiokoettimenä genomien kloonien eristämiseksi ei-ihmisenkaltaisesta genomikloonikirjastosta λ EMBL4 tai λ GEM11 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin); tyypilliset hybridisointiolosuhteet plakkinousujen seulomiseksi (Benton and Davis (1978) Science 196: 180; Dunn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 13057) voivat olla: 50% formamidia, 5 x SSC tai SSPE, 1-5 x Denhardtin liuos, 0,1-1% SDS, 100-200 μ g leikattua heterologista DNA:ta tai tRNA:ta, 0-10% dekstraanisulfaattia, 1×10^5 - 1×10^7 cpm/ml denaturoitua koetinta, jonka spesifinen aktiivisuus on noin 1×10^8 cpm/ μ g, ja inkubointi 42°C-37°C:ssa noin 6-36 tuntia. Esihybridisointiolosuhteet ovat olennaisesti identtiset, paitsi että koetin ei ole mukana ja inkubointiaika on tyypillisesti pienempi. Pesuolosuhteet ovat tyypillisesti 1-3 x SSC, 0,1-1% SDS, 45-70°C ja pesuliuos vaihdetaan noin 5-30 minuutin kuluttua. Ei-ihmisenkaltaisen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidien eristämiseksi ihmisen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidikoettimen kanssa on usein edullista hybridisoida vähemmän tiukoissa olosuhteissa, kuten noin 39°C:ssa ja pestä peräkkäin seuraavissa vaihelämpötiloissa: huoneenlämpö, 37°C, 39°C, 42°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C, 65°C ja 70°C, pysähtyen jokaisen vaiheen jälkeen ja seuraten taustakoettimen signaalia (ja valinnaisesti havaitsemalla signaali autoradiogrammilla ja/tai fosforikuvannalla,

jos käytetään radioleimattua koetinta) ja päättää pesuvaiheet, kun sopiva signaali/kohina-suhde saavutetaan, joka on määritetty empiirisesti.

- 5 Polynukleotidit, jotka sisältävät sekvenssejä, joissa on suunnilleen ainakin 30-50 nukleotidia, edullisesti ainakin 100 nukleotidia, jotka vastaavat niitä nukleotidisekvenssejä tai ovat niiden kanssa komplementaarisia, jotka tässä on esitetty ihmisen ja apinan telomeraasin RNA-komponentin
- 10 sekvensseille, voivat toimia PCR-alukkeina ja/tai hybridisaatiokoettimina identifioitaessa ja eristettäessä itiölinjan geenejä, jotka vastaavat esitetyjä geenin ja RNA-komponentin sekvenssejä. Nämä itiölinjan geenit voidaan eristää erilaisilla alalla tavanomaisilla menetelmillä,
- 15 kuten, mutta ei näihin rajoittuen, genomikirjastojen hybridisaatioseulonta bakteriofaagissa λ tai kosmidikirjastoissa, tai genomisekvenssien kopiomäärän lisäys PCR:llä käyttäen alukkeita, jotka on saatu tässä esitetyistä sekvensseistä. Ihmisen genomikirjastot ovat kaupallisesti saatavia
- 20 tai ne voidaan konstruoida de novo ihmisen DNA:sta.

Alan ammattimiehelle on ilmeistä, että nukleotidisubstitutiot, deleetiot ja additiot voivat liittyä keksinnön polynukleotideihin. Nukleotidisekvenssin vaihtelu voi johtua erilaisten alleelien ja vastaavien sekvenssipolymorfismista. Näiden nukleotidien substitutioiden, deleetioiden ja additioiden ei kuitenkaan tulisi olennaisesti rikkoa polynukleotidin kykyä hybridisoitua johonkin tässä esitettyyn täysimittaiseen ihmisen tai apinan telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssiin hybridisaatio-olosuhteissa, jotka ovat riittävän tiukat johtaakseen spesifiseen hybridisaatioon.

Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit voivat olla lyhyitä oligonukleotideja (esim. 20-100 emästä), kuten käytettäessä hybridisaatiokoettimina ja PCR- (tai LCR-) alukkeina. Polynukleotidisekvensseissä voi myös olla osa suuremmasta polynukleotidista (esim. kloonausvektoris-

ta, joka sisältää telomeraasin RNA-komponentin kloonin) ja se voi olla yhdistynyt polynukleotidisidoksella toiseen polynukleotidisekvenssiin. Tyypillisesti telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit sisältävät ainakin 25 peräkkäistä nukleotidia, jotka ovat olennaisesti identtisiä luonnossa esiintyvän telomeraasin RNA-komponentin tai geenisekvenssin kanssa, tavallisemmin telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidi sisältää ainakin 50-100 peräkkäistä nukleotidia, jotka ovat olennaisesti identtisiä luonnossa esiintyvän nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin sekvenssin kanssa. Alan ammattimiehet kyllä tietävät, että telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin minimipituus, joka vaaditaan spesifiseen hybridisoitumiseen telomeraasin RNA-komponentin kohdesekvenssiin, riippuu useista tekijöistä: G/C-pitoisuudesta, epäsopivien emästen sijainnista (jos niitä on), sekvenssin yhtenäisyyden asteesta verrattuna kohdepolynukleotidien populaatioon, ja polynukleotidin kemiallisesta luonteesta (esim. metyylifosfonaattirunko, polyamidinukleiinihappo, fosforotiolaatti, jne.), muiden muassa.

Haluttaessa PCR-amplimeerit olennaisesti täysimittaisen cDNA-kopioiden määrän lisäämiseksi voidaan valita tutkijan harkinnan mukaan. Samoin amplimeerit telomeraasin RNA-komponentin geenin (apina tai ihminen) kopiomäärän lisäämiseksi voidaan valita.

Kutakin näistä sekvensseistä voidaan käyttää hybridisaatiokoettimina tai PCR-amplimeereina havaitsemaan neoplastisen sairauden läsnäolo, jolle sairaudelle on tunnusomaista lisääntynyt tai vähentynyt telomeraasin RNA-komponentin taso soluissa, tai kudostyyppityksen suorittamiseksi (s.o. kudosten identifioimiseksi, joille on tunnusomaista telomeraasin RNA-komponentin ilmentyminen) ja vastaavaan. Sekvenssejä voidaan myös käyttää havaitsemaan genomiset telomeraasin RNA-komponentin geenisekvenssit DNA-näytteessä, kuten oikeuslääketieteellisessä DNA-analyysissä (esim. RFLP-analyysi, PCR-tuotteen pituuden (pituuksien) jakautu-

ma, jne.) tai diagnosoimaan sairauksia, jolle on tunnusomaista telomeraasin RNA-komponentin geenin kopiomäärän lisääntyminen ja/tai uudelleenjärjestäytymiset.

- 5 Esimerkiksi, mutta ei rajoittaen voidaan seuraavaa oligonukleotidialukkeiden paria käyttää lisäämään telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssien kopiomäärää (esim. cDNA) tai hybridisaatiokoettimina (esim. biotinyloituina tai loppuleimattuina oligonukleotidikoettimina):

10

5'-AGCACACTGGCCAGTCAGTCAGGTTTG-3' ja
5'-GGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCTGGGA-3'.

15

Muut sopivat PCR-alukkeet, LCR-alukkeet, hybridisaatio-
koettimet ja alukkeet ja vastaavat ovat ilmeisiä alan ammattimiehille mitä tulee tässä esitettyihin telomeraasin RNA-komponentin sekvensseihin ja niihin, jotka voidaan saada niiden avulla. Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit ja niiden komplementit voivat toimia hybridisaatiokoettimina tai alukkeina havaittaessa nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin RNA- tai DNA-sekvenssejä. Tällaiseen hybridisoitumiseen ja PCR-sovellutuksiin voi sisältyä olennaisia deleetioita, additioita, nukleotidisubstituutioita ja/tai transpositioita, kunhan ihmisen telomeraasin RNA-komponenttisekvenssin spesifinen hybridisaatio tai spesifinen kopioiden lisääntyminen säilytetään. Näiden nukleotidien substituutioiden, deleetioiden ja additioiden ei kuitenkaan tulisi olennaisesti hajottaa polynukleotidin kykyä hybridisoitua telomeraasin RNA-komponentin tai geenin sekvenssiin hybridisoitumisolosuhteissa, jotka ovat riittävän tiukat johtamaan spesifiseen hybridisoitumiseen.

30

Esimerkiksi, ei rajoittaen, ihmisen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidi voi sisältää sekvenssin nukleotidista 48 nukleotidiin 209, jonka uskotaan olevan riittävän ihmisen telomeraasin holoentsyymin uudelleen rakentamiseksi telomeraasin proteiinikomponentin läsnäollessa:

35

5'-UCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUCCAC
CGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCCGUUCGCCCCUCCC-3'

5

tai DNA:na:

5'-TCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGCTCCCCGCGCGC
TGTTTTTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCGGCCTGCCGCTTCCAC
CGTTCATTCTAGAGCAAACAAAAAATGTCAGCTGCTGGCCCGTTCGCCCCCTCCC-3'.

10

Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidi voi myös sisältää tai koostua nukleotideista 1-559, ja voi käsitellä muiden nukleotidien tai nukleotidisekvenssien pääteadditioita. Templaattimuokattu muunnos, joka koostuu nukleotideista 48-209, mutta jossa telomeerin toistotemplaatin sekvenssi on muunnettu, pystyy kilpailemaan typistetyn RNA-komponentin kanssa, joka koostuu villikannan sekvenssistä 48-209, telomeraasin proteiinikomponentin sitomiseksi ja telomeraasin holoentsyymin uudelleen rakentamiseksi.

20

Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin rakenneanalyysi osoittaa alueet, joilla on taipumus muodostaa sekundäärisiä rakenteita, kuten hiussolkisilmukoita. Esimerkiksi alueella, joka ulottuu suunnilleen nukleotidista 200 nukleotidiin 350 ihmisen telomeraasin RNA-komponentissa, on olennainen hiussolkisilmukan luonne. Telomeraasin RNA-komponentin muilla osilla on myös merkittävä sekundääriseen rakenteeseen luonne. Mitä tulee tähän huomattuun sekundääriseen rakenteeseen, alan ammattimiehet voivat korvata muita nukleotidisekvenssejä, joiden on tietokoneanalyysien avulla ennustettu omakuvan samanlaisia sekundääriseen rakenteen formaatioita. Vaikka erilaiset tietokoneohjelmat ovat sopivia määrittämään nukleotidisekvenssejä, jotka omaksuvat olennaisesti ekvivalentteja sekundäärisiä rakenteita, voidaan käyttää UWGCG Sequence Analysis Software Packagen ohjelmia FOLD, SQUIGGLES, CIRCLES, DOMES, MOUNTAINS, ja STELOOP, ja vastaavia. Samoin voidaan suunnitella ei-nukleotidirakennetta

30

35

matkivia rakenteita, kuten peptidinukleiinihappoja ja vastaavia, molekyylimallitusohjelmilla matkittavaksi halutun ihmisen telomeraasin RNA-komponentin alueen (alueiden) luonteenomaisen sekundäärisen rakenteen matkijoiksi. Näitä rakenteellisia matkijoita voidaan käyttää terapeuttisesti tai erilaisiin käyttötarkoituksiin (esim. kilpailevat antagonistit jne.).

Antisense

Eräs erityisen käyttökelpoinen keksinnön nukleiinihappotyyppi on antisense-oligonukleotidi, jota voidaan käyttää in vivo tai in vitro inhiboimaan ihmisen telomeraasitoimintaa. Antisense-nukleotidit käsittävät spesifisen sekvenssin noin nukleotidista 10 noin nukleotidiin 25-200 tai enemmän (s.o. kyllin pieni, jotta pystyy muodostamaan stabiilin dupleksin, mutta kyllin pieni, antotavasta riippuen, annettavaksi in vivo, jos halutaan), joka on komplementaarinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentissa oleville nukleotideille. Näiden oligonukleotidien toimintamekanismi voi käsittää RNA-komponentin sitoutumisen joko estämään funktionaalisen ribonukleoproteiinin telomeraasin yhdistelmää, ehkäisemään RNA-komponenttia toimimasta templaattina telomeerin DNA-synteesille, destabiloimaan telomeraasin RNA-komponenttia ja lyhentämään sen puoliintumisaikaa, ja/tai inhiboimaan telomeraasin RNA-komponentin geenin transkriptiota.

Keksintöä kuvaavia antisense-oligonukleotideja, jotka toimivat telomeraasin aktiivisuutta inhiboiden in vivo ja/tai in vitro, ovat edellä testien yhteydessä mainitut oligonukleotidit sen määrittämiseksi, sisältääkö kloonin pGRN7 cDNA:n ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia varten. Kolmea tällaista oligonukleotidia, kuten edellä huomautettiin, käytettiin osoittamaan telomeraasitoiminnan inhiboimista in vitro. Kunkin tällaisen oligonukleotidin sekvenssi on esitetty alla:

T3 5'-CTCAGTTAGGGTTAGACAAA-3'
 P3 5'-CGCCCTTCTCAGTTAGGGTTAG-3'
 TA3 5'-GGCGCCTACGCCCTTCTCAGTT-3'

5

Näitä oligonukleotideja voidaan käyttää myös inhiboimaan telomeraasin aktiivisuutta ihmisen soluissa.

10 Alan ammattimiehet tietävät, että tämä keksintö antaa monia erilaisia antisense-oligonukleotideja, jotka pystyvät inhiboimaan telomeraasitoimintaa. Toinen käyttökelpoinen keksinnön antisense-oligonukleotidi on oligonukleotidi Tel-AU, jolla on sekvenssi 5'-CAGGCCACCCCTCCGCAACC-3', ja joka ku-
 15 ten mikä tahansa keksinnön antisense-oligonukleotidi, voidaan syntetisoida käyttäen fosforotioaattinukleotideja, kiraalisia metyyli fosfonaatteja, luonnossa esiintyviä nukleotideja tai niiden seoksia antamaan stabiilisuus ja haluttu T_m. Alan ammattimiehet tietävät, että monia erilaisia
 20 modifioituja nukleotidianalogeja, kuten O-metyyli ribonukleotideja, fosforotioaattinukleotideja ja metyyli fosfonaattinukleotideja, voidaan käyttää tuottamaan keksinnön nukleiinihappoja, joilla on enemmän haluttuja ominaisuuksia (s.o. nukleasiresistenssi, tiukempi sitoutuminen jne.)
 25 kuin niillä, jotka on tuotettu käyttäen luonnossa esiintyviä nukleotideja. Muita menetelmiä oligonukleotidien nukleasiresistenssin muuttamiseksi ovat ne, joita on kuvattu PCT-patenttijulkaisussa nro 94/12633.

30 Muita toteutusmuotoja, jotka on suunnattu telomeraasitoiminnan muuntamiseen, ovat menetelmät, joissa käytetään spesifisiä antisense-polynukleotideja, jotka ovat komplementaarisia koko ihmisen telomeraasin RNA-komponentin (hTR) sekvensseille tai niiden osille, kuten antisense-polynukleotidit ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenille tai
 35 sen transkriboidulle RNA:lle, mukaanlukien tyypistetyt muodot, jotka voidaan liittää yhteen telomeraasiholoentsyymin kanssa. Näissä komplementaarisissa antisensepolynukleoti-

deissa voi olla tehty nukleotidisubstituutioita, additioita, deletioita tai transpositioita, kunhan spesifinen sitoutuminen relevanttiin kohdesekvenssiin, joka vastaa telomeraasin RNA-komponenttia tai sen geenää, säilyy polynukleotidin funktionaalisen ominaisuutena. Komplementaarisia antisense-polynukleotideja ovat liukoiset antisense-RNA tai -DNA-oligonukleotidit, jotka voivat hybridisoitua spesifisesti telomeraasin RNA-komponentin lajeihin ja ehkäisevät telomeraasin RNA-komponentin geenin transkriboitumista (Ching et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 10006; Broder et al. (1990) Ann. Int. Med. 113: 604; Loreau et al. (1990) FEBS Letters 274: 53; Holcenbert et al., WO91/11535; U.S.S.N. 07/530,165; WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641; ja EP 386563, joista jokainen on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi). Siksi antisense-polynukleotidit inhiboivat funktionaalisen telomeraasin RNA-komponentin tuotantoa. Koska telomeraasin RNA-komponentin ilmentyminen (transkription aste ja/tai RNA:n stabiilisuus) liittyy yhteen telomeraasin holoentsyymin aktivoitumisen ja entsyymiaktiivisuuden kanssa, antisense-polynukleotidit, jotka ehkäisevät telomeraasin RNA-komponenttia vastaavan RNA:n transkriptiota ja/tai telomeraasin RNA-komponentin vuorovaikutusta ihmisen telomeraasin proteiinikomponentin kanssa ja/tai telomeraasin RNA-komponentin vuorovaikutus telomeerisekvensseihin voi inhiboida telomeraasitoimintaa ja/tai kääntää fenotyyppiä, kuten immortalisaatiota tai neoplastista transformaatiota soluissa, jotka ilmentävät telomeraasitoimintaa antisense-polynukleotidien poissaollessa. Koostumuksia, jotka sisältävät terapeuttisesti vaikuttavan annostuksen telomeraasin RNA-komponentin antisense-polynukleotideja, voidaan antaa sairauksien hoitamiseen, jotka vaativat telomeraasitoimintaa solupatogeneesiin (esim. neoplasia) tai inhiboimaan sukusolujen tuotantoa tai säilymistä (s.o. ehkäisevänä aineena), jos halutaan. Eripituisia antisense-polynukleotideja voidaan tuottaa, vaikka nämä antisense-polynukleotidit tyypillisesti sisältävät sekvenssin, jossa on ainakin noin 25 peräkkäistä nukleotidia, jotka ovat olennaisesti komplementaarisia luonnossa esiin-

tyvälle telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssille, ja jotka ovat tyypillisesti täysin komplementaarisia ihmisen telomeraasin RNA-komponentin sekvenssille, ja ovat usein komplementaarisia telomeraasin RNA-komponentin sekvenssille, joka on komplementaarinen telomeraasin tois-

5 tuvalle sekvenssille tai komplementaarinen telomeraasin RNA-komponentin osalle, joka on kosketuksissa telomeraasipolypeptidin alayksikölle.

10 Antisense-polynukleotideja voidaan tuottaa heterologisesta ilmentymiskasetista transfektoidussa solussa tai transgeenisessä solussa. Heterologinen ilmentymiskasetti voi olla osa geeniterapiavektoria, kuten adenovirus- tai adenovirukseen liittyvä virusvektori, tai muu geeniterapiavektori.

15 Heterologinen kasetti voi olla polynukleotidissa, joka ei pysty itsenäisesti replikoitumaan ja joka siirretään soluihin millä tahansa erilaisista sopivista menetelmistä, jotka alan ammattimiehet tuntevat (esim. lipofektio, biolistit, liposomit, immunoliposomit, elektroporaatio jne.). Vaihtoehtoisesti antisense-polynukleotidit voivat sisältää liu-

20 koisia oligonukleotideja, joita annetaan ulkoisessa ympäristössä, joko viljelykasvualustassa in vitro tai välitiloissa ja kehon nesteissä (esim. veri, CSF) niiden käyttämiseksi in vivo. Liuukoisten antisense-polynukleotidien,

25 jotka ovat läsnä ulkoisessa ympäristössä, on esitetty pysyvän liittymään sytoplasmaan ja inhiboimaan spesifisiä RNA-lajeja. Joissakin toteutusmuodoissa antisense-polynukleotideissa on metyylifosfonaattiosia, C-5-propenyyliosia, 2'-fluoririboosisokereita, tai ne ovat polyamidinukleiini-

30 happoja (PNA:t) (Egholm et al. (1992) J. Am. Chem. Soc. 114: 1895; Wittung et al. (1994) Nature 368: 561; Egholm et al. (1993) Nature 365: 566; Hanvey et al. (1992) Science 258: 1481, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi).

35 Antisense-polynukleotideja koskevien yleisten menetelmien tutkimiseksi katso Antisense RNA and DNA, (1988), D.A. Melton, toim., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Keksinnön antisense-oligonukleotidien lisäksi voidaan konstruoida oligonukleotideja, jotka sitoutuvat kaksois-nuleiinihapoksi joko taipuneessa RNA-komponentissa tai RNA-komponentin geenissä, muodostaen kolmoiskierteen sisältävän tai kolmoisnukleiinihapon telomeraasitoiminnan inhiboimiseksi. Nämä keksinnön oligonukleotidit konstruoidaan käyttäen kolmoiskierremuodostuksen ja RNA-komponentin nukleotidisekvenssin emäspariutumissääntöjä (Cheng et al. (1988) J. Biol. Chem. 263: 15110; Ferrin and Camerini-Otero (1991) Science 354: 1494; Ramdas et al. (1989) J. Biol. Chem. 264: 17395; Strobel et al. (1991) Science 254: 1639; Hsieh et al. (1990) edellä; Rigas et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83: 9591, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi). Nämä oligonukleotidit voivat estää telomeraasitoiminnan monin eri tavoin, kuten estämällä telomeraasigeenin transkriptio tai sitoutumalla telomeraasin RNA-komponentin kaksoisalueeseen tavalla, joka estää RNA-komponenttia joko muodostamasta funktionaalista ribonukleoproteiinitelomeraasia tai toimimasta templaattina telomeerin DNA-synteesille. Tyypillisesti ja toimintamallista riippuen keksinnön kolmoisrakenteen muodostavissa oligonukleotideissa on spesifinen sekvenssi, jossa on noin 10 - noin 25-200 tai useampi nukleotidi (s.o. riittävän suuri muodostamaan stabiili kolmoiskierre mutta riittävän pieni, jotta antotavasta riippuen voidaan antaa in vivo, jos halutaan), jotka ovat "komplementaarisia" (tässä yhteydessä komplementaarinen tarkoittaa, että pystyy muodostamaan stabiilin kolmoiskierteen) spesifiselle sekvenssille telomeraasin RNA-komponentissa tai geenille telomeraasin RNA-komponenttia varten.

Keksinnön antisense- ja kolmoiskierteen muodostavien oligonukleotidien lisäksi voidaan telomeraasin aktiivisuuden inhiboimiseen käyttää myös sense-oligonukleotideja, jotka ovat sekvenssiltään identtisiä ainakin osalle ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia. Tämän tyyppisille keksinnön oligonukleotideille on luonteenomaista se, että ne sisältävät joko (1) vähemmän kuin RNA-komponentin täydellisen sekvens-

sin muodostamaan funktionaalinen telomeraasientsyymi tai
 (2) RNA-komponentin täydellisen sekvenssin, joka tarvitaan
 muodostamaan funktionaalinen telomeraasientsyymi sekä yhden
 tai useamman nukleotidin substituutio tai insertio, joka
 5 tekee saadun RNA:n ei-funktionaaliseksi. Molemmissa tapauk-
 sissa telomeraasin aktiivisuuden inhiboituminen havaitaan
 "mutantti"-RNA-komponentin vuoksi, joka sitoo ihmisen telo-
 meraasin proteiinikomponentit muodostamaan inaktiivinen te-
 lomeraasimolekyyli. Näiden oligonukleotidien toimintameka-
 10 nismi käsittää näin ollen ei-funktionaalisen ribonukleo-
 proteiinitelomeraasin yhdistymisen tai funktionaalisen
 ribonukleoproteiinin yhdistymisen estämisen. Esimerkki voi
 olla templaattimuokattu muunnos, joka sisältää nukleotidit
 48-209, mutta jossa telomeerin toistotemplaatin sekvenssi
 15 on muuttunut. Tällaiset templaattimuokatut muunnokset pys-
 tyvät kilpailemaan sitoutumisesta telomeraasin proteiini-
 komponenttiin. Tämäntyyppiset keksinnön sense-oligonukle-
 otidit sisältävät spesifisen sekvenssin, jossa on noin 20,
 50, 100, 200, 400, 500 tai enemmän nukleotideja, jotka ovat
 20 identtisiä nukleotidien spesifisen sekvenssin kanssa ihmi-
 sen telomeraasin RNA-komponentissa.

Lisäksi antisense-polynukleotidit voivat sisältää johdan-
 naissubstituentin, joka on olennaisesti häiritsemätön mitä
 25 tulee nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin hybridisoitu-
 miseen. Antisense-polynukleotidit, jotka on modifioitu li-
 sätyillä kemiallisilla substituentteilla, voidaan liittää
 metabolisesti aktiiviseen eukaryoottisolun hybridisoitu-
 maan telomeraasin RNA-komponentin kanssa solussa. Tyypilli-
 30 sesti tällaiset antisense-polynukleotidit ovat johdettuja,
 ja niihin on liitetty lisäksi kemiallisia substituentteja,
 joko ennen polynukleotidisynteesiä tai sen jälkeen, vastaa-
 vasti, ja ovat näin ollen lokalisoituneet komplementaari-
 seen sekvenssiin telomeraasin RNA-komponentissa, jossa ne
 35 tuottavat muutoksen tai kemiallisen muunnoksen lokaaliseen
 DNA-sekvenssiin ja/tai telomeraasin proteiinikomponenttiin.
 Edullisia liitettyjä kemiallisia substituentteja ovat:
 europium(III)teksafyriini, ristisilloittavat aineet, psora-

leeni, metallikelaatit (esim. rauta/EDTA-kelaatti rautakatalysoituun lohkaisuun), topoisomeraasit, endonukleaasit, eksonukleaasit, ligaasit, fosfodiesteriaasit, fotodynaamiset porfyriinit, kemoterapeuttiset lääkkeet (esim. adriamysiini, doksirubisiini), interkalaatioaineet, emäsmuunnosaineet, immunoglobuliiniketjut ja oligonukleotidit. Rauta/EDTA-kelaatit ovat erityisen edullisia kemiallisia substituentteja, kun halutaan polynukleotidisekvenssin paikallista lohkaisua (Hertzberg et al. (1982) J. Am. Chem. Soc. 104: 313; Herzberg and Dervan (1984) Biochemistry 23: 3934; Taylor et al. (1984) Tetrahedron 40: 457; Dervan, PB (1986) Science 232: 464). Edullisia liitoskemiallisia menetelmiä ovat: suora sitoutuminen, esim. reaktiivisen lisäaminoryhmän kautta (Corey and Schulz (1988) Science 238: 1401, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi, ja muut suorasidoskemialliset menetelmät, vaikka streptavidiini/biotiini- ja digoksigeniini/anti-digoksigeniini-vasta-ainesitoutumismenetelmiä voidaan myös käyttää. Menetelmiä kemiallisten substituenttien liittämiseksi on annettu US-patenteissa 5,135,720, 5,093,245 ja 5,055,556, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi. Muitakin sidoskemiallisia menetelmiä voidaan käyttää tekijän harkinnan mukaan. Polynukleotidit, jotka vastaavat koko nisäkkään telomeraasin RNA-komponenttia tai olennaista osaa siitä (s.o. "sense"-polynukleotidit), voidaan myös johtaa ja käyttää reagoimaan telomeraasin toistosekvenssien kanssa genomissa ja tuottaa kemiallisen ympäristön addukteja tai muu modifikaatio kromosomien telomeerialueissa.

Epätasälliset templaatit

Toinen käyttökelpoinen keksinnön oligonukleotidi sisältää ihmisen telomeraasin RNA-komponentin muuttuneen tai mutatoituneen sekvenssin. Yu et al., 1990, Nature 344: 126 esittää, että Tetrahymena-telomeraasin RNA-komponentin mutatoitunut muoto voidaan liittää Tetrahymena-solujen telomeraasiin ja että liittämällä on haitallisia vaikutuksia näihin soluihin. Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin muta-

toituneiden muotojen liittämällä voi olla samanlaisia vaikutuksia ihmissoluihin, joilla muuten on telomeraasitoimintaa, ilman että vaikutetaan normaaleihin ihmissoluihin, joilla ei ole telomeraasitoimintaa. Nämä mutatoituneet muodot

5 ovat niitä, joissa sekvenssi 5'-CTAACCCTA-3' on mutatoitunut sekvenssiin 5'-CAAACCCAA-3', 5'-CCAACCCCAA-3' TAI 5'-CTCACCCTCA-3'. Kukin näistä muunnetuista RNA-komponentin sekvensseistä muuttaa telomeerin toistuvia yksiköitä, jotka ovat liittyneet kromosomaaliseen DNA:han, vaikuttaen näin

10 kromosomin rakenteeseen ja toimintaan. Nämä oligonukleotidit voidaan suunnitella sellaisiksi, että ne sisältävät restriktioentsyymien tunnistuskohtia, jotka ovat käyttökelpoisia diagnostisissa menetelmissä tutkittaessa muunnetun RNA-komponentin läsnäoloa telomeerin DNA:n tai laajentuneen

15 telomeraasisubstraatin restriktioentsyymileikkauksella.

Keksinnön tämän puolen valaisemiseksi suoritettiin paikkaspesifinen mutageneesi käyttäen plasmidia (nimeltään pGRN33), jota saa American Type Culture Collectionilta

20 talletusnumerolla ATCC 75926), joka käsittää 2,5 ke:n HindIII-SacI-fragmentin lambda-kloonista 28-1 (katso esimerkki 7 jäljessä) sekä replikoitumisalun SV40 (mutta ei promoottoritoimintaa). Saadut plasmidit, nimeltään pGRN34 (sisältää 5'-CAAACCCAA-3':n), pGRN36 (sisältää 5'-CCAACCC-

25 CAA-3':n) ja pGRN37 (sisältää 5'-CTCACCCTCA-3':n), transformoitiin eukaryoottisiin isäntäsoluihin (293-johdettu solulinja, joka ilmentää SV40:n suuren T-antigeenin), ja telomeraasikokeet suoritettiin käyttäen solu-uutteita transformanteista.

30 Kokeet osoittivat, että telomeraasitoiminta soluissa johti muuttuneita sekvenssejä sisältävien nukleiinihappojen muodostumiseen, osoittaen sitä, että genomiklooni sisälsi funktionaalisen RNA-komponentin geenin ja että plasmidit

35 sisälsivät muuttuneen mutta funktionaalisen RNA-komponentin geenin. Nämä tulokset osoittavat, kuinka tämä keksintö antaa yhdistelmätelomeraasivalmisteet ja menetelmät näiden valmisteiden tuottamiseksi. Tämä keksintö antaa yhdistelmä-

ihmistelomeraasin, joka käsittää ihmisen telomeraasin proteiinikomponentit funktionaalisesti liittyneinä keksinnön yhdistelmä-RNA-komponenttiin. Tällaiset keksinnön yhdistelmä-RNA-komponenttimolekyylit sisältävät ne, jotka eroavat

5 luonnossa esiintyvistä RNA-komponenttimolekyyleistä yhdessä tai useammassa emässubstituutiassa, deleetiossa tai inser-tiossa, sekä RNA-komponenttimolekyylit, jotka ovat identti-siä luonnossa esiintyvän RNA-komponenttimolekyylin kanssa, joka on tuotettu yhdistelmäisäntäsoluissa. Menetelmä näiden

10 yhdistelmätelomeraasimolekyylien tuottamiseksi käsittää sen, että transformoidaan eukaryoottinen isäntäsolu, joka ilmentää telomeraasin proteiinikomponentteja, yhdistelmä- ilmentymisvektorin kanssa, joka koodaa keksinnön RNA-kom- ponenttimolekyyliä, ja viljellään näitä isäntäsoluja, jotka

15 on transformoitu kyseisellä vektorilla olosuhteissa, joissa proteiinikomponentit ja RNA-komponentti ilmentyvät ja yh- distyvät muodostaen aktiivisen telomeraasimolekyylin, joka pystyy lisäämään sekvenssejä (ei välttämättä samaa sekven- siä, jonka luonnon telomeraasi lisää) kromosomaalisen DNA:n

20 telomeereihin. Muita käyttökelpoisia toteutusmuotoja näistä yhdistelmä-DNA-ilmentymisvektoreista (tai plasmideista) ovat plasmidit, jotka sisältävät geenin ihmisen telomeraa- sin RNA-komponentille, jossa geenissä on deleetio, insertio tai muu muunnos, joka tekee geenin ei-funktionaaliseksi.

25 Nämä plasmidit ovat erityisen käyttökelpoisia ihmisen gee- niterapiaan "tainnuttamaan" endogeeninen RNA-komponentti- geenin, vaikka tarvitaankin erittäin tehokas transformaatio- ja yhdistelyjärjestelmä tekemään käsiteltyt solut palautu- mattomasti mortaaliksi.

Ribotsyymitoteutusmuodot

Keksinnön muita oligonukleotideja, joita kutsutaan ribot- syymeiksi, voidaan myös käyttää inhiboimaan telomeraasi- aktiivisuutta. Toisin kuin antisense- ja muut edellä kuva- tut oligonukleotidit, jotka sitoutuvat RNA:han, DNA:han tai telomeraasin proteiinikomponenttiin, ribotsyymi ei vain si- toudu vaan myös spesifisesti lohkaisee ja näin potentiaa-

lisesti inaktivoi kohde-RNA:n, kuten ihmisen telomeraasin RNA-komponentin. Tämä ribotsyymi voi sisältää 5'- ja 3'-päätesekvenssit, jotka ovat komplementaarisia telomeraasin RNA:lle. Riippuen lohkeamiskohdasta ribotsyymi voi tehdä

5 telomeraasientsyymien inaktiiviseksi. Katso PCT-patenttijulkaisu nro 93/23572 edellä. Alan ammattimiehet huomaavat tutkiessaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin RNA-sekvenssiä, että useita käyttökelpoisia ribotsyymien kohdepaikkoja on läsnä ja ne ovat herkkiä lohkeamaan esimerkiksi vasaranpään malliselle ribotsyymille. Tämän tyyppiset keksintöä kuvaavat ribotsyymit sisältävät alla olevat ribotsyymit, jotka ovat RNA-molekyylejä, joilla on esitetyt sekvenssit:

15

- 1: 5'-UAGGGUUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACAAAAAU-3';
- 2: 5'-UUAGGGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGACAAAA-3';
- 3: 5'-UCUCAGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGGGUUA-3'; ja
- 4: 5'-CCCGAGACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACCCGCG-3'.

20

Muut optimaaliset kohdepaikat ribotsyymivälitteiselle telomeraasiaktiivisuuden inhibiitiolle voidaan määrittää kuten Sullivan et al. ovat kuvanneet PCT-patenttijulkaisussa nro 94/02595 ja Draper et al. PCT-patenttijulkaisussa nro 93/23569, jotka molemmat on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. Kuten Hu et al. ovat kuvanneet PCT-patenttijulkaisussa nro 94/03596, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi, antisense- ja ribotsyymifunktiot voidaan yhdistää yhteen oligonukleotidiin. Lisäksi ribotsyymit voivat sisältää yhden tai useamman modifioidun nukleotidin tai modifioidun sidoksen nukleotidien välillä, kuten edellä on kuvattu keksintöä valaisevien antisense-oligonukleotidien kuvauksen yhteydessä. Eräässä osassa RNase P:n katalyyttinen alayksikkö (ihmisen tai *E.colin*) modifioidaan (katso Altman S (1995) *Biotechnology* 13: 327) ohjaussekvenssin saamiseksi, joka vastaa sitä osaa nisäkkään telomeraasin RNA-komponentista, joka emäspariutuu telomeerin toistosekvenssiin;

tällaiset RNase P-muunnokset voivat lohkaista telomeerisekvenssejä. Eräässä osassa RNase P:n katalyyttinen alayksikkö (ihmisen tai *E.colin*) modifioidaan ohjaussekvenssin saamiseksi, joka on komplementaarinen telomeraasin RNA-komponentin osan kanssa siten, että RNase P voi lohkaista telomeraasin RNA-komponentin. Nämä suunnitellut ribotsyymit voivat ilmentyä soluissa tai ne voidaan siirtää useilla eri keinoilla (esim. liposomit, immunoliposomit, biolistit, suora siirto soluun, jne.). Muita ribotsyymien muotoja (ryhmän I introniribotsyymit (Cech T (1995) *Biotechnology* 13: 323); vasaranpääribotsyymit (Edgington SM (1992) *Biotechnology* 10: 256) voidaan suunnitella esitetyn telomeraasin RNA-komponenttisekvenssin informaation pohjalta katalysoimaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ja/tai ihmisen telomeerin toistosekvenssien lohkaisemista.

Näin ollen keksintö antaa paljon erilaisia oligonukleotideja inhiboimaan telomeraasin aktiivisuutta. Näitä oligonukleotideja voidaan käyttää keksinnön terapeuttisissa menetelmissä sairauden hoitamiseksi, jotka menetelmät käsittävät sen, että potilaalle annetaan terapeuttisesti vaikuttava annos keksinnön telomeraasi-inhibiittoria tai aktivaattoria. Telomeraasin inhiboituminen tai aktivoituminen voidaan mitata sen ainemäärän määrittämiseksi, joka pitäisi toimittaa terapeuttisesti vaikuttavassa annoksessa käyttäen koejärjestelyä, joka on kuvattu samaan aikaan vireillä olevissa US-patenttihakemuksissa ja PCT-patenttijulkaisussa nro 93/23572, jotka edellä on huomioitu. Kuten näissä hakemuksissa ja edellä on puhuttu, telomeraasitoiminnan inhibointi tekee immortaalisen solun mortaaliseksi, kun taas telomeraasitoiminnan aktivointi voi lisätä solun replikaatiivista elinkaarta. Telomeraasin inhibointiterapia on tehokas hoito syöpiä vastaan, joissa tapahtuu kontrolloimatonta immortaalisten solujen kasvua, ja telomeraasin aktivointi on tehokas hoito ehkäisemään solun senesenssiä. Sel- laisten aineiden antaminen, jotka inhiboivat tai estävät telomeraasin aktiivisuutta, kuten antisense-oligonukleotidit, kolmoiskierteen muotoinen oligonukleotidi, ribotsyymi,

tai plasmidi, joka ajaa telomeraasin mutantti-RNA-komponentin ilmentymään, voi estää telomeraasin toiminnan ja johtaa kaiken kaikkiaan solujen senesenssiin ja käsiteltyjen solujen solukuolemaan.

5

Terapeuttisia ja profylaktisia seikkoja

Lisäksi tämä keksintö antaa käyttöön terapeuttiset menetelmät, jotka varmistavat, että normaalisolut pysyvät mortaalina; esimerkiksi RNA-komponentti voidaan modifioida käyttäen geeniteknologian standardimenetelmiä koko komponenttia koodaavan luonnollisen geenin tai sen osan deleetomiseksi (esim. in vitro-mutageneesillä) geneettisellä yhdistelmätekniikalla. Nämä solut ovat sitten palautumattomasti mortaalisia. Tämä menetelmä on käyttökelpoinen geeniterapiassa, jossa normaalisolut, jotka on modifioitu sisältämään ilmentymisplasmideita, lisätään potilaaseen, ja halutaan varmistaa, että syöpäsoluja ei lisätä, tai jos näitä soluja lisätään, silloin nuo solut on tehty palautumattomasti mortaaliseksi.

20

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

Koska telomeraasi on aktiivinen vain tuumorissa, itiölinjassa ja tietyissä kantasoluissa verenmuodostusjärjestelmässä, telomeraasin inhibiittiterapia ei vaikuta muihin normaaleihin soluihin. Voidaan myös käyttää vaiheita välttämään telomeraasi-inhibiittorin kosketus itiölinjan tai kantasolujen kanssa, vaikka tämä ei ole olennaista. Koska esimerkiksi itiölinjan solut ilmentävät telomeraasin aktiivisuutta, telomeraasin inhibiointi voi vaikuttaa negatiivisesti siittiöiden syntymiseen ja sperman elinkykyyn kertoen siitä, että telomeraasi-inhibiittorit voivat olla tehokkaita raskauden ehkäisijöitä tai sterilointiaineita. Tämä raskautta ehkäisevä vaikutus ei kuitenkaan ole toivottua sellaisella potilaalla, joka saa keksinnön telomeraasi-inhibiittoria syövän hoitoon. Tällaisissa tapauksissa keksinnön telomeraasi-inhibiittoria voidaan antaa sellaisella tavalla, joka varmistaa, että inhibiittoria tuotetaan vain tera-

piajakson aikana siten, että negatiivinen vaikutus itiölinjan soluihin on vain ohimenevä.

Muissa keksinnön terapeuttisissa menetelmissä käytetään

5 keksinnön telomeraasin RNA-nukleiinihappoa stimuloimaan telomeraasitoimintaa ja lisäämään replikatiivisten solujen elinkaarta. Nämä menetelmät voidaan suorittaa toimittamalla soluun keksinnön funktionaalinen yhdistelmä-telomeraasiribonukleoproteiini. Ribonukleoproteiini voidaan esimerkiksi
10 toimittaa soluun liposomissa, tai voidaan käyttää ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geeniä (tai yhdistelmägeeniä erilaisten säätelyelementtien kanssa) eukaryoottisessa ilmentymisplasmidissa (telomeraasin proteiinikomponenttien ilmentymistä koodaavien sekvenssien kanssa tai ilman nii-
15 tä), jolloin aktivoidaan telomeraasitoimintaa erilaisissa normaaleissa ihmissoluissa, joista muuten puuttuisi havaittava telomeraasitoiminta johtuen telomeraasin RNA-komponentin tai proteiinikomponentin alhaisesta ilmentymistasosta. Jos telomeraasin RNA-komponentti ei riitä stimuloimaan te-
20 lomeraasitoimintaa, RNA-komponentti voidaan transfektoida telomeraasin proteiinikomponentteja ilmentävien geenien kanssa telomeraasiaktiivisuuden stimuloimiseksi. Näin ollen keksintö antaa käyttöön menetelmiä hoitaa tilaa, joka liittyy telomeraasitoimintaan solussa tai soluryhmässä saattamalla solu(t) kosketuksiin terapeuttisesti vaikuttavan määrän kanssa ainetta, joka muuttaa telomeraasitoimintaa tässä solussa.

Soluissa, jotka yhdistävät telomeraasin RNA-geenin ylimääräisiä kopioita, voi tapahtua kasvua telomeraasitoiminnassa ja niissä voi olla tähän liittyvä suurempi replikatiivinen elinkaari. Tämä terapia voidaan suorittaa ex vivo soluissa myöhempää liittämistä varten isäntään, tai voidaan suorittaa in vivo. Telomeerin pituuden stabiloimisen tai kasvatamisen edut lisättäessä eksogeenisiä telomeraasin geenejä ex vivo normaaleihin diploidisoluihin ovat: telomeerin stabilointi voi estää solujen senesenssin ja mahdollistaa potentiaalisesti rajoittamaton solujen kopiomäärän lisäänty-

misen; ja normaalit diploidisolut, joilla on pitempi elinkaari, voidaan viljellä in vitro lääketesteihin, virusten valmistukseen, tai muihin hyödyllisiin tarkoituksiin. Lisäksi ex vivo kopiomäärältään lisättyjä erityyppisiä kantasoluja voidaan käyttää soluterapiassa erilaisiin sairauksiin, kuten edellä todettiin.

Telomeerin stabilointi voi myös alentaa syövän vaikutusta replikoituissa soluissa estämällä telomeereja tulemasta kriittisen lyhyiksi, kuten solut kriisin lähellä. Kriisin aikana syntyy massiivinen genomien epästabiilisuus, koska telomeerin pään suojaava vaikutus menetetään. "Geneettinen katto" sekoittuu toistamiseen, ja melkein kaikki solut kuolevat. Ne harvat solut, jotka selviävät tästä prosessista, ovat tyypillisesti aneuploidisia, joissa on monia geenien uudelleenjärjestymisiä ja jotka päättävät uudelleen muodostuvan stabiilisuuden telomeereissään ilmentämällä telomeeraasia. Jos kriisi voidaan ehkäistä pitämällä telomeerit pitkinä, kriisiin liittyvä genomien epästabiilisuus voidaan myös estää, jolloin rajoitetaan mahdollisuuksia, että yksittäinen solu kärsii metastoittamisen syövän syntymiseen vaadittavien geneettisten mutaatioiden tarvittavasta lukumäärästä.

Soluja, jotka voidaan kohdistaa telomeraasigeeniterapiaan (terapia, joka käsittää sen, että lisätään kohdesolun telomeraasitoimintaa), ovat näihin kuitenkin rajoittumatta verta muodostavat kantasolut (AIDS ja jälkikemoterapia), verisuonten endoteelisolut (sydän- ja aivoverisuonisairaudet), ihon fibroblastit ja basaali-ihokerroksen keratinoosyytit (haavojen paraneminen ja palovammat), kondrosyytit (niveltulehdus), aivojen astrosyytit ja mikroglia-solut (Alzheimerin tauti), osteoblastit (osteoporoosi), retinaaliset solut (silmäsairaudet) ja haiman saarekesolut (tyypin I diabetes).

Tyypillisesti keksinnön terapeuttisissa menetelmissä annetaan oligonukleotidia, joka toimii inhiboiden tai stimuloi-

den telomeraasitoimintaa in vivo fysiologisissa olosuhteissa ja on stabiili niissä olosuhteissa. Kuten edellä huomattiin, modifioidut nukleiinihapot voivat olla käyttökelpoisia antamaan tällainen stabiilisuus, sekä varmistamaan oligonukleotidin toimitus haluttuun kudokseen, elimeen tai soluun. Menetelmiä, jotka ovat käyttökelpoisia oligonukleotidien toimittamiseksi terapeutisiin tarkoituksiin, on kuvattu Inouye et al.:n US-patentissa 5,272,065, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi.

Samalla kun oligonukleotidit voidaan toimittaa suoraan lääkkeenä sopivassa farmaseuttisessa formulaatiossa, voidaan myös toimittaa oligonukleotidit käyttäen keksinnön geeniterapiaa ja yhdistelmä-DNA-ilmentymisplasmideita. Eräs tällainen kuvaava plasmidi on kuvattu esimerkissä 8 jäljessä. Yleensä näissä plasmideissa on promoottori ja valinnaisesti aktivaattori (erillään sellaisesta, joka sisältyy promoottorisekvensseihin), jotka toimivat oligoribonukleotidin transkription aikaansaamiseksi, sekä muina säätelyelementteinä, jotka tuovat episomaalien pysymisen tai kromosomaalisen integroitumisen ja korkeatasoisen transkription, jos halutaan. Adenoviruspohjaisia vektoreita käytetään usein geeniterapiaan ja ne ovat sopivia käytettäväksi tämän keksinnön reagenssien ja menetelmien kanssa. Katso PCT-patenttijulkaisut nro 94/12650; 94/12649 ja 94/12629. Käyttökelpoisia promoottoreita näihin tarkoituksiin ovat metalotioneiinipromoottori, konstitutiivinen adenoviruksen pääasiallinen myöhäispromoottori, deksametasoni-indusoitava MMTV-promoottori, SV40-promoottori, MRP polIII-promoottori, konstitutiivinen MPSV-promoottori, tetrasykliini-indusoitava CMV-promoottori (kuten ihmisen välitön-varhais-CMV-promoottori), ja konstitutiivinen CMV-promoottori. Geeniterapiaan käyttökelpoinen plasmidi voi sisältää muita funktionaalisia elementtejä, kuten valikoitavat markkerit, tunnistusalueet, ja muita geenejä. Yhdistelmä-DNA-ilmentymisplasmideita voidaan myös käyttää keksinnön oligonukleotidien valmistamiseen toimitettavaksi muilla kuin geeniterapian keinoilla, vaikka saattaa olla taloudellisempaa tehdä ly-

hyitä oligonukleotideja in vitro kemiallisilla synteeseillä.

Mukaanliittyvissä kohdissa keksintö esittää farmaseuttisia koostumuksia, joka sisältävät terapeuttisesti vaikuttavan määrän keksinnön telomeraasi-inhibiittoria tai telomeraasi-aktivaattoria. Keksinnön telomeraasi-inhibiittorien farmaseuttiset koostumukset sisältävät ihmisen telomeraasin mutantti-RNA-komponentin, antisense-oligonukleotidin tai kolmoiskierteen muotoisen oligonukleotidin, joka sitoo ihmisen telomeraasin RNA-komponentin tai sen geenin, tai ribotsyymiin, joka pystyy lohkaisemaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin, tai yhdistelmän näistä tai muita lääkkeitä farmaseuttisesti sopivassa kantajassa tai suolana. Muut keksinnön farmaseuttiset koostumukset sisältävät telomeraasin aktivaattorivalmisteen, kuten puhdistetun ihmisen telomeraasin tai mRNA:n telomeraasin proteiinikomponenteille ja telomeraasin RNA-komponentin, ja niitä käytetään hoitamaan senesenssiin liittyviä sairauksia. Tässä mielessä mutatoitu sense-nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti annetaan solupopulaatioon; mutatoitunut sense-telomeraasin RNA-komponentti sisältää ainakin yhden epäsoptivan emäksen suhteessa ihmisen telomeraasin toistosekvenssiin, mutta pystyy esittämään telomeraasin aktiivisuuden yhdessä ihmisen telomeraasin polypeptidikomponentin kanssa, jolloin tapahtuu väärä liittyminen valituissa nukleotidikohdissa ihmisen telomeraasin toistosekvenssissä, jolloin syntyy telomeerijä, jotka pohjautuvat mutatoituneen sense-telomeraasin RNA-komponentin läsnäoloon olennaista replikoitumista varten. Käyttöön annetaan terapeuttinen menetelmä, jossa mutatoitunut sense-telomeraasin RNA-komponenttia annetaan solupopulaatiolle riittävän kauan telomeerisekvenssien liittämiseksi, jotka ovat olennaisen ei-funktionaalisia templaateina luonnossa esiintyvälle nisäkkään telomeraasin RNA-komponentille, jonka jälkeen mutatoitunut sense-telomeraasin RNA-komponentti poistetaan, mikä johtaa nopeaan häviöön telomeerin keskimääräisessä pituudessa solupopulaatiossa ja lisääntyneeseen senesenssiin tai solujen kuolleisuuteen.

Terapeuttinen aine voidaan antaa formulaatiossa, joka sopii annettavaksi parenteraalisesti, nenän kautta, oraalisesti tai muulla tavalla. Katso edelläolevaa PCT-patenttijulkaisua nro 93/23572.

5

Diagnoosimenetelmät

Tämä keksintö antaa käyttöön diagnoosimenetelmiä ja reagensseja edellä kuvattujen farmaseuttisten formulaatioiden ja terapeuttisten menetelmien lisäksi. Keksintö antaa käyttöön diagnoosimenetelmiä ihmisen telomeraasin RNA-komponentin tason, määrän tai läsnäolon määrittämiseksi, telomeraasin tai telomeraasitoiminnan määrittämiseksi solussa, solupopulaatiossa tai kudoksenäytteessä. Tähän liittyen tämä keksintö antaa käyttökelpoisia reagensseja näihin menetelmiin, ja ne on valinnaisesti pakattu reagenssisarjan muotoon yhdessä reagenssisarjan käyttöohjeiden kanssa diagnoosimenetelmän toteuttamiseksi. Kuten edellä huomattiin niiden testien yhteydessä, jotka suoritettiin sen määrittämiseksi, sisältääkö kloonin pGRN7 cDNA:n ihmisen telomeraadin RNA-komponentille, RNA-komponentin tasot nousevat tuumorisolussa. Näin ollen RNA-komponentin havaitseminen on käyttökelpoinen diagnoosimenetelmä tuumorisoluille.

Lisäksi voidaan koettimia tai alukkeita, jotka sitoutuvat spesifisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponenttiin (tai sen geenin jompaankumpaan säikeeseen), käyttää diagnoosimenetelmissä havaitsemaan telomeraasin nukleiinihapon läsnäolo näytteessä. Alukkeet ja koettimet ovat oligonukleotideja, jotka ovat komplementaarisia, ja näin ollen sitoutuvat kohdenukleiinihappoon. Vaikka alukkeet ja koettimet voivat erota sekvenssin ja pituuden suhteen, primäärinen erilaistumistekijä on eräs funktio: alukkeet toimivat DNA-synteesin aloittajina, kuten PCR-kopiolisäyksessä, kun taas koettimia käytetään tyypillisesti vain sitoutumaan kohdenukleiinihappoon. Tyypillisiä pituuksia alukkeelle tai koettimelle voivat olla 8-20-30 tai useampi nukleotidi. Aluke tai koetin voi myös olla leimattu havaitsemista (s.o.

tähän tarkoitukseen käytetään tavallisesti radioaktiivisia tai fluoresenssimolekyyliä) tai puhdistumista/erotusta helpottamaan (s.o. tähän tarkoitukseen käytetään usein biotiinia tai avidiinia).

5

Erityisen edullinen keksinnön diagnoosimenetelmä käsittää telomeraasin RNA-komponentin sekvenssien havaitsemisen solu- tai kudoksenäytteissä, jotka on otettu potilaista, joilla epäillään olevan riski saada syöpä. Nämä menetelmät käsittävät tyypillisesti sen, että leimattu koetin tai aluke sitotaan RNA-komponentin sekvenssiin olosuhteissa, joissa vain täysin yhteensopivat (komplementaariset) sekvenssit sitoutuvat (hybridisoituvat) toisiinsa. Näytteessä olevaan RNA:han sitoutuneen leimatun materiaalin havaitseminen korreloi telomeraasitoiminnan läsnäoloa ja syöpäsolujen läsnäoloa. Jotkut solut voivat ilmentää telomeraasin RNA-komponenttia, mutta jäävät telomeraasi-negatiivisiksi, koska ne eivät ilmennä telomeraasin proteiini-komponentteja. Jos haluttaisiin havaita telomeraasi-aktiivisuuden läsnäolo tällaisissa soluissa, voitaisiin ensin eristää proteiini ja sitten määrittää, sisältääkö proteiinifraktio telomeraasin RNA-komponentin, joka ilmaisisi telomeraasitoiminnan läsnäolon. Keksinnön diagnoosimenetelmät voivat olla erityisen käyttökelpoisia havaittaessa telomeraasitoiminnan läsnäoloa kudosisbiopsioissa ja histologisissa leikkeissä, joissa menetelmä suoritetaan in situ, tyypillisesti telomeraasin RNA-komponentin kopiomäärän lisääntymisen jälkeen käyttämällä keksinnön spesifisiä PCR-alukkeita.

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

Keksintö antaa myös telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidikoettimia sairaustilojen (esim. neoplasian tai preneoplasian) diagnosoimiseen havaitsemalla telomeraasin RNA-komponentti, tai telomeraasin RNA-komponentin geenin uudelleenjärjestelyillä tai kopiomäärän lisäämisellä soluissa, jotka on otettu potilaasta, tai havaitsemalla patognomonin telomeraasin RNA-komponentin alleeli (esim. RFLP:llä tai alleelispesifisellä PCR-analyysillä). Tyypillisesti havaitseminen tapahtuu in situ hybridisaatiolla käyttäen

leimattua (esim. ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , fluoresoitua, biotinyloitua, digoksygeninyloitua) telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidia, vaikka voidaan myös käyttää Northern blotting-, dot blotting-menetelmää tai liuoksen hybridisaatiota kiinteässä RNA:ssa tai poly A⁺ RNA:ssa, jotka on erotettu solunäytteestä, tai voidaan käyttää myös PCR-kopiolisäystä käyttäen telomeraasin RNA-komponentille spesifisiä alukkeita. Solut, jotka sisältävät muuttuneen määrän telomeraasin RNA-komponenttia verrattuna saman solutyypin (-tyyppien) ei-neoplastisiin soluihin, identifioidaan mahdollisiksi sairastuneiksi soluiksi. Samoin identifioidaan telomeraasin RNA-komponenttiseen lokukseen tai lähelle sitoutuneiden lokusten patognomonisten uudelleenjärjestäytymisten tai kopiomäärän lisääntymisen tapahtuminen solunäytteessä patologisen tilan tai patologisen tilan (esim. syöpä, geneettinen sairaus) kehittymistä ennustavan tilan olemassaoloa. Polynukleotidikoettimia käytetään myös yksilöiden oikeustieteelliseen tunnistamiseen, kuten isyyystesteihin tai rikoksesta epäiltyjen tai tuntemattomien vainajien tunnistamiseen.

Ihmispopulaatiossa voi olla pieniä muutoksia telomeraasin RNA-komponentin perusprimäärisekvenssissä, ottaen huomioon alleeliset muunnokset, restriktiokohdan polymorfismit, ja geneettisiin sairauksiin liittyvät syntyperäiset telomeraasin RNA-komponentin sairausalleelit.

Haluttaessa voidaan PCR-amplimeerit olennaisesti täysimitaisen telomeraasin RNA-komponentin kopioiden lisäämiseksi valita tutkijan mielen mukaan. Samoin voidaan valita amplimeerit telomeraasin RNA-komponenttiseen osien kopiomäärän lisäämiseksi.

Telomeraasin RNA-komponentin ilmentyminen

Riippuen alukkeen, koettimen tai muun nukleiinihapon pituudesta, joka sisältää ihmisen telomeraasin RNA-komponentin sekvenssejä, voivat keksinnön plasmidit olla käyttökelpoi-

sia. Esimerkiksi keksinnön täysimittaisen RNA-komponentin yhdistelmätuotanto voidaan suorittaa käyttäen keksinnön yhdistelmä-DNA:n ilmentymisplasmidia, joka sisältää nukle-iinihapon, joka sisältää RNA-komponentin nukleotidisekvenssin suunnattuna transkriptioon sopivan promoottorin ohjaa-
 5 mana. Isäntäsolut näille plasmideille voivat olla joko prokaryoottisia tai eukaryoottisia, ja promoottori, sekä muut säätelyelementit ja valikoitavat markkerit, jotka on valit-
 10 tu liittymään ilmentymisplasmidiin, riippuvat tuotantoon käytetystä isäntäsolusta.

Koskematonta RNA-komponenttigeeniä, s.o. promoottoria, joka sisältää minkä tahansa säätelysekvenssin geenin 5'-aluees-
 sa, ja RNA-komponenttia koodaavaa aluetta voidaan käyttää
 15 ilmentämään RNA-komponenttia ihmissoluissa, kuten ihmisen soluissa, jotka on immortalisoitu virustransformaation tai syövän avulla. RNA-komponenttigeenin promoottori voi kui-
 tenkin olla säädelty, ja tästä ja muista syistä johtuen voidaan haluta ilmentää RNA-komponentti eri promoottorin
 20 ohjauksessa. Toisaalta RNA-komponenttigeenin promoottoria voidaan käyttää itsenäisesti RNA-komponenttia koodaavasta sekvenssistä ilmaisemaan muita kiinnostuksen kohteena ole-
 via koodaavia sekvenssejä. Voitaisiin esimerkiksi tutkia RNA-komponenttigeenin transkription säätelyä yhdistämällä
 25 RNA-komponenttigeenin promoottori koodaavaan sekvenssiin reportteria koodaavaksi sekvenssiksi, kuten koodaava sek-
 venssi beeta-galaktosidaasille tai muulle entsyymille tai proteiinille, jonka ilmentymistä voidaan helposti seurata. Näin olle geenin promoottoria ja muita säätelyelementtejä
 30 ihmisen telomeraasin RNA-komponentille voidaan käyttää ei vain ilmentämään RNA-komponenttia, vaan myös ihmisen telo-
 meraasin proteiinikomponentteja, antisense- tai muita oli-
 gonukleotideja, sekä muita kiinnostavia geenituotteita ih-
 35 misen soluissa. Ilmentymisplasmidit, jotka sisältävät kos-
 kemattoman geenin ihmisen telomeraasin RNA-komponentille, voivat olla erityisen käyttökelpoisia erilaisiin tarkoituk-
 siin, kuten geeniterapiaan. Alan ammattimiehet hyväksyvät, että monia erilaisia ilmentymisplasmideita voidaan käyttää

tuottamaan keksinnön käyttökelpoisia nukleiinihappoja, ja että termi "plasmidi" tässä käytettynä viittaa minkä tahansa tyyppiseen nukleiinihappoon (faagista, viruksesta, kromosomista, jne.), jota voidaan käyttää viemään spesifistä geneettistä informaatiota isäntäsoluun ja säilyttämään tuo informaatio jonkin aikaa.

Telomeraasin proteiinikomponentin eristys

10 Tämän keksinnön reagensseilla voidaan myös suorittaa ihmisen sekä muiden nisäkkäiden telomeraasientsyymien proteiinikomponentteja koodaavien nukleiinihappojen kloonaus ja eristys, joita aikaisemmin ei ole ollut saatavissa. Lisääminen tällaisiin nukleiinihappoihin antaa täydentäviä etuja

15 niille aineille, jotka hankitaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin nukleiinihapposekvenssejä sisältävien nukleiinihappojen avulla. Kuten edellä huomattiin, voidaan esimerkiksi tämän keksinnön terapeuttisia etuja lisätä joissakin tapauksissa käyttämällä ihmisen telomeraasin proteiinikomponenttien puhdistettuja valmisteita ja lisäämällä

20 näitä koodaaviin nukleiinihappoihin. Keksinnön nukleiinihappoja, jotka koodaavat ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia, voidaan käyttää eristämään nukleiinihapot, jotka koodaavat ihmisen telomeraasin proteiinikomponentteja, jolloin päästään näihin etuihin käsiksi. Näin ollen keksintö antaa menetelmät ihmisen telomeraasin proteiinikomponenttien eristämiseksi ja puhdistamiseksi, sekä ihmisen telomeraasin proteiinikomponentteja koodaavien nukleiinihappojen identifioimiseksi ja eristämiseksi. Tähän liittyen tämä

25 keksintö antaa käyttöön puhdistetun ihmisen telomeraasin, puhdistetut nukleiinihapot, jotka koodaavat ihmisen telomeraasin proteiinikomponentteja, yhdistelmäilmentymisplasmidit ihmisen telomeraasin proteiinikomponentteja varten. Keksintö antaa käyttöön myös farmaseuttiset koostumukset,

30 jotka sisältävät vaikuttavana aineosana joko ihmisen telomeraasin proteiinikomponentteja tai nukleiinihapon, joka joko koodaa näitä proteiinikomponentteja tai vuorovaikuttaa nukleiinihappojen kanssa, jotka koodaavat näitä proteiini-

komponentteja, kuten antisense-oligonukleotidit, kolmoiskierteen muodostavat oligonukleotidit, ribotsyymit tai yhdistelmä-DNA-ilmentymisplasmidit mille tahansa edellisistä.

- 5 Kloonattua ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia voidaan käyttää identifioimaan ja kloonamaan nukleiinihappoja, jotka koodaavat telomeraasientsyymin ribonukleoproteiinin proteiinikomponentteja. Useita erilaisia menetelmiä voidaan käyttää, jotta saadaan aikaan proteiinikomponenttien iden-
- 10 tifiointi ja kloonaus. Voidaan esimerkiksi käyttää entsyymin tai osittain denaturoidun entsyymin affiniteettisieppausta käyttäen affiniteettiligandina joko (1) nukleotidisekvenssejä, jotka ovat komplementaarisia RNA-komponentille, sitomaan koskematon entsyymi RNA-komponenttiin; tai (2)
- 15 RNA-komponenttia sitomaan osittain tai täysin denaturoidun entsyymin proteiinikomponentit. Ligandi voidaan kiinnittää kiinteään alustaan tai kemiallisesti modifioida (esim. biotinyloida) myöhempää immobilisointia varten alustalle. Ih-
- 20 misen telomeraasia sisältävien solu-uutteiden käsittely, ja sen jälkeen pesu ja alustaan sitoutuneen telomeraasientsyymin eluointi antaa erittäin puhtaan valmisteon telomeraasientsyymistä. Proteiinikomponentit voidaan sitten valinnaisesti puhdistaa edelleen tai analysoida suoraan proteiinisekvensoinnilla. Määritettyä proteiinisekvenssiä voi-
- 25 daan käyttää alukkeiden ja koettimien valmistukseen cDNA:n kloonamiseksi tai kloonin identifioimiseksi genomipankissa, joka sisältää nukleiinihappoja, jotka koodaavat telomeraasin proteiinikomponenttia.
- 30 Telomeraasin affiniteettisieppaus käyttäen suunniteltua RNA-komponenttia voidaan myös suorittaa käyttäen in vitro transkriboitua telomeraasin RNA:ta ja järjestelmää telomeraasin entsyymiaktiivisuuden uudelleenrakentamiseksi. Katso Autexier and Greider, 1994, Genes & Development 8: 563-575, joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi. RNA on suunniteltu sisältämään merkin, joka on samanlainen epitopin kanssa, joka merkitsee proteiineja. Merkki voi olla RNA-sekvenssi, johon voidaan käyttää tiukasti sidottua ligan-
- 35

dia, esim. RNA-sekvenssille spesifistä vasta-ainetta, sekvenssille spesifistä nukleiinihappoa sitovaa proteiinia, tai orgaanista väriä, joka sitoutun tiukasti spesifiseen RNA-sekvenssiin. Telomeraasin sietokyky merkkisekvenssille ja sijainnille voidaan tutkia käyttäen standardimenetelmiä. Muuttuneen RNA komponentin synteesi ja tämän menetelmän uudelleenrakennusvaihe voidaan myös suorittaa in vivo. Affiniteettisieppausta käyttäen immobilisoitua ligandia RNA-merkille voidaan sitten käyttää entsyymin eristämiseen.

Ilmentymisen seulontaa voidaan myös käyttää eristämään telomeraasientsyymin proteiinikomponentteja. Tässä menetelmässä cDNA-ilmentymiskirjastot voidaan seuloa leimatulla telomeraasin RNA:lla, ja cDNA:ita koodaavat proteiinit, jotka sitoutuvat spesifisesti telomeraasin RNA:han, voidaan identifioida. Voidaan myös käyttää molekyylin geneettistä lähestymistä käyttäen translaation inhiboimista telomeraasientsyymin proteiinikomponentteja koodaavien nukleiinihappojen eristämiseksi. Tässä menetelmässä telomeraasin RNA-sekvenssit yhdistetään valikoitavissa olevan markkerin yläpuolelle. Sopivassa järjestelmässä ilmentyessään valikoitavissa oleva markkeri on funktionaalinen. Kun telomeraasin RNA:n sidospoteiinia koodaava cDNA ilmentyy, proteiini sitoutuu tunnistussekvenssiinsä estäen näin valikoitavissa olevan markkerin translaation, jolloin on mahdollista identifioida proteiinia koodaava kloonin. Muissa tämän menetelmän toteutusmuodoissa valikoitavissa olevan markkerin estetty translaatio mahdollistaa transformoitujen solujen kasvamisen. Muita järjestelmiä, joita voidaan käyttää, ovat "vuorovaikutusansajärjestelmä", joka on kuvattu PCT-patenttijulkaisussa nro WO 94/10300; "yhden hybridin" järjestelmä, joka on kuvattu julkaisuissa Li and Herskowitz, 17.12.1993, Science 262: 1870-1874, ja Zervos et al., 29.1.1993, Cell 72: 223-232; ja "kahden hybridin" järjestelmä, jota saa ostaa Clontechiltä.

Telomeraasin RNA:n sitoutumis- tai telomeraasin aktiivisuuskokeita spesifisesti sitoutuneiden proteiinien ja

aktiivisuuden havaitsemiseksi voidaan käyttää helpottamaan telomeraasientsyymin puhdistamista ja entsyymin proteiini-

komponentteja koodaavien nukleiinihappojen identifioimista. Esimerkiksi sellaisia nukleiinihappoja, jotka sisältävät

RNA-komponenttisekvenssejä, voidaan käyttää affiniteetti-reagensseina eristämään, identifioimaan ja puhdistamaan peptideitä, proteiineja tai muita yhdisteitä, jotka sitoutuvat spesifisesti sekvenssiin, joka sisältyy RNA-komponenttiin, kuten ihmisen telomeraasin proteiinikomponentit.

On saatavissa useita erilaisia muotoja, kuten geelisiirto, suodatinsidonta, jalanjälkien jättäminen, Northwestern (proteiiniblotin RNA-koetin) ja valoristisilloitus, tällaisen sitoutumisen havaitsemiseksi ja komponenttien eristämiseksi, jotka sitoutuvat spesifisesti RNA-komponenttiin. Näitä kokeita voidaan käyttää sidospoteiinien identifioimiseen, sidospoteiinien jälkien puhdistamiseen, RNA-sitoutumiskohtien tunnistamiseen, sidospoteiinien molekyylikoon määrittämiseen, proteiinien leimaamiseen preparatiivista eristämistä varten, ja elänten jälki-immunisointiin vasta-ainesukupolvea varten vasta-aineidensaamiseksi käytettäväksi proteiinin eristämiseen tai proteiinia kytketyssä transkriptio/translaatiojärjestelmässä koodaavan proteiinin identifioimiseen.

Nisäkkään telomeraasin proteiinikomponentin puhdistus

Nisäkkään telomeraasin proteiinikomponentti voidaan puhdistaa tavanomaisilla biokemiallisilla menetelmillä telomeraasia ilmentävistä soluista, kuten HT1080-solut, 293-solut ja muut sopivat immortalisoidut solulinjat. Esimerkiksi mutta ei rajoittaen todetaan, että ihmisen telomeraasi voidaan puhdistaa solu-uutteista olennaisesti menetelmän mukaan, joka esitettiin US-patenttihakemuksessa 08/288,501, jätetty 10.8.1994, ja joka on liitetty tähän yhteyteen viitteeksi.

Nisäkkään telomeraasiuutteet voidaan erottaa telomeraasin RNA-komponentista käsittelemällä RNase-toiminnalla tai muulla sopivalla keinolla telomeraasin RNA-komponentin erottamiseksi ja/tai hajottamiseksi samalla kun telomeraa-

sin proteiinikomponentti jää olennaisesti koskemattomaksi ja psytyy uudelleen rakentumaan lisättäessä eksogeenista telomeraasin RNA-komponenttia, kuten yhdistelmätekniikalla tai vastaavalla tuotettua. Näin puhdistettua, ja valinnaisesti endogeenisestä telomeraasin RNA-komponentista erotettua telomeraasin proteiinikomponenttia voidaan käyttää aineena tässä kuvatuissa seulontakokeissa, ja muissakin käytötavoissa.

10 Geeniterapia

Eksogeenisen geneettisen materiaalin siirtäminen soluihin (s.o. DNA-välitteinen transfektio) on välttämätön menetelmä solubiologian ja molekyylligenetiikan perustutkimuksessa, sekä perusteena kehitettäessä tehokkaita menetelmiä ihmisen geeniterapiaan. Tähän mennessä useimmat hyväksytyistä geeninsiirtokokeista Yhdysvalloissa perustuvat replikoitumisvikaisiin retrovirusvektoreihin, joissa on terapeuttinen polynukleotidisekvenssi osana retroviruksen genomia (Miller et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 4239; Kolberg R (1992) J. NIH Res. 4: 43; Cornetta et al., (1991) Hum. Gene Ther. 2: 215). Adenovirusvektoreita on myös kuvattu potentiaalisti käytettäväksi ihmisen geeniterapiassa (Rosenfeld et al. (1992) Cell 68: 143).

Toinen ihmisillä käytettäväksi hyväksytty geeninsiirtomenetelmä on plasmidi-DNA:n fysikaalinen siirto liposomeissa suoraan tuumorisoluihin in situ. Toisin kuin virusvektorit, jotka täytyy lisätä viljellyissä soluissa, plasmidi-DNA voidaan puhdistaa homogeeniseksi ja näin vähentää patogeenisen kontaminaation mahdollisuutta. Joissakin tilanteissa (esim. tuumorisoluihin) ei ehkä ole välttämätöntä, että eksogeeninen DNA integroituu stabiilisti siirrettyyn soluun, koska väistytvä ilmentyminen voi riittää tappamaan tuumorisolut. Liposomivälitteistä DNA:n siirtoa ovat useat tutkijat kuvanneet (Wang and Huang (1987) Biochem. Biophys. Res. Commun. 147: 980; Wang and Huang (1989) Biochemistry 28: 9508; Litzinger and Huang (1992) Biochem. Biophys. Acta

1113: 201; Gao and Huang (1991) Biochem. Biophys. Res. Commun. 179: 280; Felgner WO91/17424; WO91/16024).

Immunoliposomeja on myös kuvattu kantajina eksogeenisille polynukleotideille (Wang and Huang (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84: 7851; Trubetskoy et al. (1992) Biochem. Biophys. Acta 1131: 311). Immunoliposomien voisi hypoteettisesti odottaa parantaneen solutyypin spesifisyyttä verrattuna liposomeihin spesifisten vasta-aineiden sisältymisen vuoksi, jotka oletettavasti sitoutuvat pinta-antigeneihin spesifisiin solutyyppeihin. Behr et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86: 6982 raportoivat lipopolyamiinin käyttämisen reagenssina välittämään itse transfektiota, ilman että täytyy lisätä mitään muuta fosfolipidiä liposomien muodostamiseksi.

Sen mukaisesti telomeraasin RNA-komponenttisekvenssin tai sen komplementin polynukleotidi, joka on olennaisesti identtinen ainakin 25 nukleotidin, edullisesti 50-100 nukleotidin tai useamman kanssa, sidotaan toimivalla tavalla heterologiseen promoottoriin muodostamaan transkriptioyksikkö, joka pystyy ilmentämään telomeraasin RNA-komponentin tai antisense-telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidia ihmisen solussa. Tällainen transkriptioyksikkö voi sisältyä transgeeniin, adenovirusvektoriin, tai muuhun geeniterapian modaliteettiin toimitettavaksi ihmissoluihin, kuten telomeraasiin liittyvän sairauden (esim. neoplasian) hoitamiseen. Sopivia toimitusmenetelmiä telomeraasin RNA-komponentin sense- tai antisense-ilmentymisrakenteelle valitsevat tutkijat hyväksyttävän käytännön ja säännösvaatimusten mukaan.

Transgeenisten eläinten toteutustavat

Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin, erityisesti telomeraasin RNA-komponenttigeenien genomiklooneja, jotka ovat olennaisesti identtisiä hiiren telomeraasin RNA-komponentille, voidaan käyttää konstruoimaan homologisia kohderakenteita solujen ja transgeenisten, ei-ihmisenkaltaisten

eläinten luomiseksi, joissa on ainakin yksi funktionaalisesti hajotettu telomeraasin RNA-komponentin alleeli. Alalla löytyy ohjausta homologisten kohderakenteiden konstruointiin: Rahemtulla et al. (1991) Nature 353: 180; Jasin et al. (1990) Genes Devel. 4: 157; Koh et al. (1992) Science 256: 1210; Molina et al. (1992) Nature 357: 161; Grusby et al. (1991) Science 253: 1417; Bradley et al. (1992) Bio/Technology 10: 534, jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi). Homologista suuntaamista voidaan käyttää synnyttämään niin sanottuja "knockout"-hiiriä, jotka ovat heterotsygoottisia tai homotsygoottisia inaktivoidulle telomeraasin RNA-komponentin alleelille. Tällaisia hiiriä voidaan myynnissä tutkimuseläimiksi immuunijärjestelmän kehittämisen, neoplasian, siittiöiden muodostuksen tutkimiseen, niitä voidaan käyttää lemmikkieläiminä, voidaan käyttää eläinproteiiniksi (ruokaan), ja monet muut käyttötavat.

Kimeerisesti suunnattuja hiiriä saadaan Hogan et al.:n mukaan Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) ja Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, toim., IRL Press, Washington D.C., (1987), jotka on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi. Alkiokantasolut manipuloidaan julkaistujen menetelmien mukaan (Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, E.J. Robertson, toim., IRL Press, Washington D.C., (1987); Zijlstra et al. (1989) Nature 342: 435; ja Schwartzberg et al. (1989) Science 246: 799, joista jokainen on liitetty tähän yhteyteen viitteiksi).

Lisäksi telomeraasin RNA-komponentin cDNA:ta tai genomigeenikopiota voidaan käyttää konstruoimaan transgeenejä telomeraasin RNA-komponentin ilmentämiseksi korkeilla tasoilla ja/tai transkription säätelysekvenssien transkriptionaalisen säätelyn alaisena, jotka sekvenssit eivät luonnossa esiinny telomeraasin RNA-komponentin geenin vieressä. Esimerkkinä mutta ei rajoituksena voidaan mainita, että rakenteellinen promoottori (esim. HSV-tk- tai pgk-promoot-

tori) tai solulinjalle spesifinen transkription säätelysekvenssi (esim. CD4- tai CD8-geenin promoottori/aktivaattori) voidaan toimivasti kiinnittää telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssiin muodostamaan transgeeni (tyypillisesti yhdessä valikoitavan markkerin, kuten neo-geenin ilmentymiskasetin kanssa). Näitä transgeenejä voidaan liittää soluihin (esim. ES-soluihin, vertamuodostaviin kantasoluihin) ja transgeeniset solut ja transgeeniset ei-ihmisenkaltaiset eläimet voidaan saada tavanomaisten menetelmien mukaan. Transgeenisia soluja ja/tai transgeenisia ei-ihmisen kaltaisia eläimiä voidaan käyttää seulomaan antineoplastisia aineita ja/tai seulomaan potentiaalisia karsinogeneeneja, koska telomeraasin RNA-komponentin yli-ilmentyminen tai telomeraasin RNA-komponentin epäsopiva ilmentyminen voivat johtaa preneoplastiseen tai neoplastiseen tilaan.

Aineen seulontakokeet

Telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidit, telomeraasin proteiinikomponenttivalmisteet, telomeerin toistotemplaattit ja sidosreaktiot ja vastaavat toteutetaan viitaten kokeellisiin esimerkkeihin. Yleensä telomeraasin proteiinikomponentit saadaan tavanomaisesti puhdistamalla telomeraasia ilmentävistä nisäkässoluista ja erotetaan niihin liittyneestä RNA-komponentista ennen niiden käyttämistä tässä kuvatuissa kokeissa. Tutkija voi valita erityisesti vesipitoiset olosuhteet tavanomaisten menetelmien mukaan. Yleisohjeen mukaisesti voidaan käyttää seuraavia puskuroituja vesipitoisia olosuhteita: 10-25 mM NaCl, 5-50 mM Tris HCl, pH-5-8, valinnaisesti lisätään kahdenarvoinen kationi/kationeja ja/tai metallikelaattoreja ja/tai ionittomia detergentejä ja/tai membraanifraktioita. Alan ammattimiehet hyväksyvät, että näihin perusolosuhteisiin voidaan lisätä additioita, deletioita, muunnoksia (kuten pH) ja substitutioita (kuten KCl korvaamaan NaCl:a tai puskurisubstitutio). Muunnoksia voidaan tehdä sitoutumisreaktion perusolosuhteisiin, kunhan spesifinen telomeraasin holoentsyymin

muodostuminen ja/tai telomeraasin aktiivisuus ilmenee kontrollireaktio(i)ssa. Olosuhteet, jotka eivät salli spesifistä sitoutumista ja lohkaisemista kontrollireaktioissa (ainetta ei mukana), eivät ole sopivia käytettäväksi sitoutumiskokeissa.

Telomeraasin RNA-komponentin sitoutumisen määrittämiseksi immobilisoituun telomeraasin proteiinikomponenttiin, telomeraasin RNA-komponentin laji edullisesti leimataan havaittavalla markkerilla, tyypillisesti biotinyyliryhmällä, fluoresoivalla osalla tai radioleimatulla lisätyllä nukleotidilla. Sopiva leimaus telomeraasin proteiinikomponentille on, ei kuitenkaan rajoittaen, radioleimaus liittämällä radioleimattu aminohappo (esim. ^{14}C -leimattu leusiini, ^3H -leimattu glysiini, ^{35}S -leimattu metioniini), radioleimaus käyttämällä translaationjälkeistä radiojodausta ^{125}I :llä tai ^{131}I :llä (esim. Bolton-Hunter-reaktio ja kloramiini T), leimaus käyttämällä translaationjälkeistä fosforylointia ^{32}P :llä (esim. fosforylaasi ja epäorgaaninen radioleimattu fosfaatti), fluoresenssileimaus lisäämällä fluoresoiva leima (esim. fluoreskeiini tai rodamiini), tai leimaamalla muilla tavanomaisilla menetelmillä, jotka alalla tunnetaan. Toteutusmuodoissa, joissa joku polypeptidilaji immobilisoidaan sitomalla substraattiin, muu komponentti yleensä leimataan havaittavalla markkerilla.

Leimattu telomeraasin RNA- tai proteiinikomponentti saateetaan kosketuksiin immobilisoidun telomeraasin proteiinin tai RNA-komponentin kanssa, vastaavasti, ja aineen kyky muuttaa leimatun komponentin määrää, joka immobilisoituu (s.o. joka sitoutuu samankaltaiseen telomeraasin komponenttiin ja siepataan). Sitoutumisreaktion inkubointiaika ja lämpötila saattavat vaihdella, kunhan valitut olosuhteet mahdollistavat spesifisen sitoutumisen tapahtumisen kontrollireaktiossa, jossa ainetta ei ole mukana. Edullisissa toteutusmuodoissa käytetty lämpötila on noin ainakin 15°C , edullisemmin $35\text{--}42^\circ\text{C}$, ja inkubointiaika on noin ainakin 15 sekuntia, vaikka pitemmät inkubointiajat ovat edullisia,

niin että joissakin toteutusmuodoissa saavutetaan sitoutumistasapaino. Sidoskompleksien sitoutumiskinetiikka ja termodynaaminen stabiilisuus määräävät liikkumavaran, joka saavutetaan muuttamalla aikaa, lämpötilaa, suolaa, pH:ta ja muita reaktio-olosuhteita. Missä tahansa erityisessä toteutusmuodossa voi tutkija kuitenkin kalibroida halutut sitoutumisreaktion olosuhteet helposti käyttäen alalla tavanomaisia menetelmiä, joita voivat olla sidosanalyysi käyttäen Scatchard-analyysiä, Hill-analyysiä ja muita menetelmiä (Proteins, Structures and Molecular Principles, (1984) Creighton (toim.), W.H. Freeman and Company, New York).

Leimatun telomeraasin proteiinikomponentin spesifinen sitoutuminen immobilisoituun telomeraasin RNA-komponenttiin, vastaavasti, määritetään lisäämällä leimaamaton kilpaileva proteiini (esim. albumiini) ja/tai leimaamaton RNA. Kun sitoutumisreaktio on tapahtunut, leimatun lajin määrä, joka on spesifisesti sitoutunut immobilisoituun lajiin, havaitaan. Esimerkkinä mutta ei rajoittaen mainitaan, että sitoutumiselle sopivan inkuboitumisajan kuluttua immobilisoidun leimatun telomeraasin proteiinikomponentin sisältävä vesifaasi poistetaan ja substraatti, joka sisältää immobilisoidun sitoutuneen telomeraasin holoentsyymilajin ja minkä tahansa leimatun telomeraasin proteiinikomponentin sitoutuneena siihen, pestään sopivalla puskurilla, joka valinnaisesti sisältää leimaamatonta salpausainetta (-aineita), ja pesupuskuri(t) poistetaan. Pesun jälkeen havaittavan leiman määrä, joka on jäljellä spesifisesti sitoutuneena immobilisoituun leimattuun komponenttiin, havaitaan (esim. optisilla, entsymaattisilla, autoradiografisilla tai muilla radiokemiallisilla menetelmillä).

Joissakin toteutusmuodoissa lisätään leimaamatonta salpaaja-ainetta, joka inhiboi epäspesifisen sitoutumisen. Esimerkkejä näistä salpaajista ovat, ei kuitenkaan rajoittaen: vasikan kateenkorvan DNA, lohenmädin DNA, hiivan RNA, sekasekvenssi (satunnainen tai valesatunnainen sekvenssi) eripituisia oligonukleotideja, naudan seerumin albumiini,

ionittomat detergentit (NP-40, Tween, Triton X-100, jne.),
 rasvattomat kuivamaitoproteiinit, Denhardtin reagenssi,
 polyvinyyli pyrrolidoni, Ficoll, ja muut salpaaajat. Tutkijat
 voivat harkintansa mukaan valita salpaaajat sopivissa kon-
 sentraatioissa lisättäväksi sidoskokeisiin.

Toteutusmuodoissa, joissa telomeraasin RNA-komponentti tai
 telomeraasin proteiinikomponentti on immobilisoitu, voidaan
 käyttää kovalenttista tai ei-kovalenttista sidosta subst-
 raattiin. Kovalenttisia sidoskemiallisia menetelmiä ovat,
 mutta ei rajoittaen, alalla hyvin tunnetut menetelmät (Ka-
 donaga and Tijan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 83:
 5889). Eräs esimerkki, joka ei rajoita, on kovalenttinen
 sidos substraattiin, joka on saatu syanogeenibromidin kans-
 sa (kuten CNBr-johdettu Sepharose 4B). Voi olla toivottavaa
 käyttää erottavaa osaa vähentämään potentiaalista steeristä
 häirintää substraattista. Proteiinien ei-kovalenttisia si-
 toutumisia substraatteihin ovat, mutta ei rajoittaen, pro-
 teiinin sitoutuminen varattuun pintaan ja sitoutuminen
 spesifisten vasta-aineiden kanssa.

Eräässä toteutusmuodossa mahdolliset terapeuttiset aineet
 identifioidaan niiden kyvyn perusteella estää telomeraasin
 proteiinikomponentin sitoutuminen telomeraasin RNA-kompo-
 nenttiin.

Tyypillisesti telomeraasin RNA-komponentti, jota näissä me-
 netelmissä käytetään, sisältää luonnossa esiintyvän nisäk-
 kään telomeraasin RNA-komponenttisekvenssin (esim. ihmisen
 RNA-komponentti), vaikka joskus käytetään mutanttitelome-
 raasin RNA-komponenttisekvenssejä, jos mutanttitelomeraasin
 RNA-komponentti sitoutuu telomeraasin proteiinikomponent-
 tiin kontrollikokeen olosuhteissa (esim. fysiologiset olo-
 suhteet).

Eräässä toteutusmuodossa mahdolliset telomeraasia moduloi-
 vat aineet identifioidaan niiden kyvyn perusteella tuottaa
 tilastollisesti merkittävä väheneminen tai lisääntyminen

reportteripolynukleotidisekvenssin transkriptiossa (esim. β -galaktosidaasigeeni, lusiferaasigeeni, HPRT-geeni), joka on toimivasti sitoutunut nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin geenin, edullisesti ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenin transkription säätelysekvenssiin metaboli-

5 sesti aktiivisessa nisäkässolussa. Reportterigeeni (esim. HPRT) voidaan insertoida nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin ds cDNA:n restriktiokohtaan tai tylppäpäiseen kohtaan synnyttämään homologinen kohderakenne tai transgeeni,

10 jolloin elinkykyisessä nisäkässolussa reportterigeeni sijoittuu endogeenisen telomeraasin RNA-komponentin geenin promoottorin ja siihen liittyvien transkription kontrolloelementtien transkription kontrollin alaisena. Aineet, jotka tuottavat reportterigeenin annosriippuvaisen transkriptionaalisen muunnoksen, identifioidaan tällä tavalla

15 mahdollisiksi telomeraasia moduloiviksi aineiksi.

Eräässä variaatiossa endogeeninen telomeraasin RNA-komponenttigeeni nisäkässolussa suunnataan homologisen kohderakenteen kanssa sijoittamaan reportteripolynukleotidisekvenssi toimivaan sidokseen endogeenisen geenin kromosomaalisessa lokuksessa olevan endogeenisen telomeraasin RNA-komponenttigeenin transkription säätelysekvenssin (esim. promoottorin) yläpuolelle. Vaihtoehtoisessa variaatiossa

20 reportteripolynukleotidin eksogeeninen polynukleotidi, joka sisältää reportteripolynukleotidin, sidotaan toimivasti nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin geenin transkription säätelyalueeseen (esim. promoottorin ja yläpuolisen transkriptiotekijän sitoutumiskohdat); eksogeeninen polynukleotidi siirretään nisäkässoluun, jossa se voi integroitua ei-

25 homologisesti kromosomaaliseen paikkaan ja/tai pidetään tai replikoidaan episomaalisena polynukleotidina. Aineet, jotka tuottavat tilastollisesti merkittävän reportteripolynukleotidin transkription muuntumisen aineella käsitellyissä soluissa, identifioidaan mahdollisiksi nisäkkään telomeraasia moduloiviksi aineiksi.

30

35

Telomeraasia moduloivat aineet, jotka vähentävät solun kykyä korjata telomeerin vaurio tai inhiboida telomeerin replikoitumista (esim. kilpailevasti inhiboimaan endogeenista luonnossa esiintyvää telomeraasia), ovat mahdollisia antineoplastisia tai herkistäviä aineita, jotka herkistävät soluja (esim. neoplastisia soluja) telomeeriä vahingoittaville aineille (esim. alkyloiville aineille ja ionisoivalle säteilylle).

- 10 Mahdollisista antineoplastisista aineista tutkitaan sitten edelleen niiden antineoplastinen aktiivisuus kokeissa, joita rutiininomaisesti käytetään ennustamaan sopivuutta käytettäväksi ihmisen antineoplastisina lääkkeinä. Esimerkkejä näistä kokeista, ei kuitenkaan rajoittavassa mielessä,
- 15 ovat: (1) mahdollisen aineen kyky inhiboida ankkuri-riippumattomien transformoitujen solujen kykyä kasvaa pehmeässä agar-agarissa, (2) kyky alentaa nu/nu-hiiriin istutettujen transformoitujen solujen tuumorigeenisyyttä, (3) kyky kääntää transformoitujen solujen morfologinen transformaatio,
- 20 (4) kyky alentaa istutettujen tuumorien kasvaminen nu/nu-hiirissä, (5) kyky inhiboida tuumorien tai preneoplastisten solujen muodostumista spontaanisti tai kemiallisesti aiheutettua karsinogeneesiä eläinmalleissa, ja (6) kyky indusoida erilaistuneempi fenotyyppi transformoidussa solussa,
- 25 johon ainetta käytetään.

Kokeita aineiden kyvyn havaitsemiseksi inhiboida tai lisätä telomeraasin proteiinikomponenttia: telomeraasin RNA-komponentin sitominen ja/tai telomeraasin entsymaattinen aktiivisuus hoitavat ainepankkien (esim. yhdistekirjastojen, peptidikirjastojen ja vastaavien) helppoa korkean suorituskyvyn seulontaa telomeraasin antagonistien tai agonistien identifioimiseksi. Tällaiset antagonistit ja agonistit voivat moduloida telomeraasin aktiivisuutta ja näin ollen moduloida telomeerin korjautumiskompetenssia ja replikoitumispotentiaalia.

Sitä että potilaalle annetaan tehokas annos ainetta, joka kykenee spesifisesti inhiboimaan telomeraasitoimintaa, voidaan käyttää terapeuttisena tai profylaktisena menetelmänä hoitaa patologisia tiloja (esim. syöpä, tulehdus, lymfaattista uudiskasvua aiheuttavat sairaudet, autoimmuunisairaudet, neurodegeneratiiviset sairaudet, ja vastaavat), joita hoidetaan tehokkaasti moduloimalla telomeraasin aktiivisuutta ja DNA:n korjautumista ja replikoitumista.

Kuten alan ammattimiehille tulee selväksi tätä esitystä lukiessaan, tämä keksintö antaa käyttöön arvokkaita reagensseja, jotka liittyvät ihmisen telomeraasiin, sekä erilaisia käyttökelpoisia terapeuttisia ja diagnostisia menetelmiä. Ylläoleva tarpeesta annettu kuvaus antaa rajoitetun näytteen näistä menetelmistä, joita ei tulisi pitää keksinnön aluetta rajoittavina. Keksinnön muut ominaisuudet ja edut ilmenevät seuraavista esimerkeistä ja patenttivaatimuksista.

Seuraavat esimerkit kuvaavat keksinnön spesifisiä näkökohtia keksinnön valaisemiseksi ja kuvauksen antamiseksi alan ammattimiehille menetelmistä, joita käytetään ihmisen telomeraasin RNA-komponentin eristämiseksi ja identifioimiseksi. Esimerkkejä ei tulisi pitää keksintöä rajoittavina, koska esimerkit pelkästään antavat spesifisen menettelytavan, joka on käyttökelpoinen keksinnön ymmärtämisessä ja toteuttamisessa.

KOKEELLISET ESIMERKIT

Katsaus

Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kloonauksen vaati uuden menetelmän, joka sisältää negatiivisen valinnan ja positiivisen valinnan syklit, jotka kuvataan jäljessä. Aluksi kuitenkin tehtiin yritys kloonata RNA-komponentti käyttäen käänteistranskriptiota ja menetelmää kloonata cdna:n päät, jota kutsutaan 5'-RACE PCR-kopioiden lisäämiseksi. Käänteistranskriptioreaktio aloitettiin alukkeella, joka oli

identtinen toistoyksikölle yksisäikeisessä osassa ihmisen telomeerin DNA:ta ja näin ollen komplementaarinen sekvenssille, jonka uskotaan olevan läsnä ihmisen telomeraasin RNA-komponentissa. Auke sisälsi myös 5'-päässään sekvenssin, joka vastaa restriktioentsyymien tunnistuskohtaa. Kuitenkin kun cDNA:ta, joka syntyi käänteistranskriptioreakti-
 5 on ja PCR-kopiolisäyksen avulla, tutkittiin geelielektroforeesilla ja geelissä läsnä olevan nukleiinihapon säikeiden nukleotidisekvenssi-analyysillä, havaittiin vain ribosomin
 10 RNA-sekvenssit. Samanlaisia ongelmia todettiin, kun tämän 5'-RACE-lähestymistavan variaatioita yritettiin käyttäen sarja-alukkeita.

Onnistunut kloonaustryitys alkoi cDNA:n valmistuksella puhdistetuista ihmisen telomeraasivalmisteista sekä solulinjoista, joilla on ihmisen telomeraasitoiminta ja solulinjoista, joilla ei ole havaittavaa ihmisen telomeraasitoimintaa. Menetelmä, jota käytettiin cDNA:n valmistukseen, on kuvattu yksityiskohtaisesti esimerkissä 1 jäljessä. Kahta
 15 negatiivista valintavaihetta ja onnistuneita positiivisen valinnan syklejä käytettiin yhdessä cDNA-valmisteen kanssa, jotka olivat peräisin kahdesta ihmisen solulinjasta, alentamaan ei-toivottujen sekvenssien konsentraatiota ja nostamaan toivottujen RNA-komponenttisekvenssien konsentraatio-
 20 ta.

Negatiiviset valintavaiheet käsittivät biotinyloidun PCR-tuotteen valmistuksen cDNA:sta, joka oli valmistettu ihmisen solulinjasta, jolla ei ole havaittavaa telomeraasitoimintaa. Biotinyloitu PCR-tuote denaturoitiin ja sitten uudelleenhybridisoitiin liuoksessa, jossa oli paljon pienempi pitoisuus ei-biotinyloitua PCR-tuotetta (100 biotinyloitua tuotetta: 1 ei-biotinyloitu tuote) cDNA:sta, joka
 25 oli valmistettu ihmisen solulinjasta, jossa ei ole telomeraasitoimintaa. Kun annettiin se mahdollisuus, että telomeraasinegatiivinen solulinja saattaisi sisältää jonkun pienen määrän RNA-komponenttia, suoritettiin hybridisaatiovaihe sen ainoan RNA:n erottamiseksi tai valitsemiseksi, joka
 30

ilmentyi runsaasti kummassakin solulinjassa. Kun oli suoritettu hybridisaatio vaiheeseen C_0t , joka oli valittu mahdollistamaan runsaimmin ilmentyneen RNA:n hybridisoituminen, ei-toivottu aine poistettiin sitomalla streptavidinyloituhiin magneettisiin partikkeleihin; supernatantti, joka jäi jäljelle partikkelien keräämisen jälkeen, sisälsi halutun cDNA:n ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia varten. Prosessi cDNA:n PCR-kopiolisäykselle on kuvattu esimerkissä 2 jäljessä.

Tämä aine rikastettiin edelleen halutun cDNA:n suhteen positiivisen valinnan onnistuneilla sykleillä. Positiivisessa valintavaiheessa biotinyloitu koetin, joka oli komplementaarinen ennustetulle templaattisekvenssille ihmisen telomeraasin RNA-komponentissa, hybridisoitiin PCR-tuotteeseen rikastetusta (negatiivisella valinnalla) näytteestä PCR-vahvistettua cDNA:ta ihmisen solulinjasta, jossa on telomeraasitoimintaa. Hybridisaation jälkeen koetin/kohdekompleksit sidottiin avidinyloituhiin magneettihelmiin, jotka sitten kerättiin ja käytettiin RNA-komponenttisekvenssien suhteen rikastetun nukleiinihapon lähteenä positiivisen valinnan jatkosykleissä. Positiivinen valintaprosessi on kuvattu yksityiskohtaisemmin esimerkeissä 3 ja 4 jäljessä.

Positiivisen valinnan kolmannen syklin jälkeen kopiomäärältään lisätyt tuotteet erotettiin geelielektroforeesilla, ja poistettiin geelin osat, jotka vastasivat kooltaan ~200 emäsparin nukleiinihappoja. Sen jälkeen nukleiinihapot eluoiitiin geeliosista ja kopiomäärää lisättiin PCR:llä. PCR-kopiolisäystuotteet leikattiin restriktioentsyymillä NotI ja insertoitiin sitten sitomalla plasmidin pBluescriptIISK+ NotI-kohtaan, jota plasmidia voi ostaa Stratageneltä. Saadut plasmidit transformoitiin E.coli-isäntäsoluihin, ja yksittäiset pesäkkeet erotettiin ja käytettiin nukleiinihapolähteenä lisäanalyysiin ja DNA-sekvensointiin. Joukko tällä testillä positiivisiksi osoittautuneita klooneja analysoitiin sitten DNA-sekvensoinnilla ja monilla eri testeillä.

Näitä muita testejä olivat seuraavat: (1) sen määrittäminen, inhiboisivatko otaksutulle RNA-komponentille komplementaariset antisense-oligonukleotidit telomeraasitoimintaa ihmissolu-uutteissa, joiden tiedettiin sisältävän telomeraasia; (2) sen määrittäminen, voitaisiinko otaksutulle RNA-komponentin kloonisekvenssille spesifisiä PCR-alukkeita käyttää vahvistamaan telomeraasinäytteessä olevaa nukleinihappoa, ja jäljittäisikö havaittu tuote, jos sellaista on, telomeraasin aktiivisuuden telomeraasin puhdistuksen aikana; ja (3) sen määrittäminen, voitaisiinko otaksutulle RNA-komponentin kloonin sekvenssille spesifisiä PCR-alukkeita käyttää vahvistamaan nukleinihappoa, jota on läsnä solu-uutteissa, jotka ovat peräisin soluista, joissa telomeraasitoiminnan tiedetään olevan suuri (s.o. tuumorisolut), suurempi määrä kuin solu-uutteissa, jotka ovat peräisin soluista, joiden tiedetään tuottavan ei lainkaan tai vain pieniä määriä telomeraasitoimintaa. Eräs kloon, joka oli nimeltään plasmidi pGRN7, tuotti tuloksia näissä koeksissa, joissa määritettiin, että plasmidi sisälsi cDNA:ta, joka vastasi ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia.

Näin ollen antisense-oligonukleotidit, jotka vastaavat pGRN7:n otaksutun RNA-komponentin sekvenssin sekvenssejä, inhiboivat telomeraasin aktiivisuutta in vitro. Samoin, kun telomeraasi puhdistettiin solu-uutteista prosessilla, joka käsitti (1) DEAE-kromatografian; (2) Sephadex S300-kromatografian ja (3) joko glyseroligradiaentin, SP-sefaroosi- tai fenyylisefaroosierottamisen, ja fraktiot kerättiin, pGRN7:n otaksutulle RNA-komponenttisekvenssille spesifiset PCR-alukkeet lisäsivät sopivan kokoisen nukleinihapon kopiomäärää, ja kopiolisätyn tuotteen määrä korreloi hyvin kerätyissä fraktioissa havaitun telomeraasitoiminnan määrän kanssa. Lopuksi solu-uutteet normaaleista (ei havaittavaa telomeraasitoimintaa), syöpä- (telomeraasitoiminta läsnä) sekä kives- (telomeraasitoiminta läsnä) soluista osoittivat vastaavia määriä PCR-tuotetta käänteistranskriptiossa ja PCR-kopiolisäyksessä (RT-PCR) alukkeilla, jotka olivat spesifisiä pGRN7:ään sisältyvälle otaksutulle RNA-komponen-

tille. Ohje RT-PCR:lle on kuvattu esimerkeissä 5 ja 6 jäljessä.

Ylläolevat tulokset antoivat vakuuttavan todistuksen siitä, että ihmisen telomeraasin RNA-komponentti oli kloonattu, joten plasmidia pGRN7 käytettiin sitten eristämään genomikloonin RNA-komponentille ihmisen solulinjasta, kuten esimerkiksi 7 jäljessä on kuvattu. Genomikloonin identifioitiin ja eristettiin ihmisen DNA:n genomikirjastosta insertoituna lambda-vektoriin FIXIII, joka oli hankittu Stratageneltä. Haluttu kloonin, joka sisälsi RNA-komponentin geenisekvenssit, jotka sisälsivät ~15 ke:n insertin, nimettiin klooniksi 28-1. Tämä kloonin on talletettu American Type Culture Collectioniin ja on saatavissa talletusnumerolla 75925. Erilaisia restriktiofragmentteja subkloonattiin tästä faagista ja sekvensoitiin. Geenin on myös lokalisoitunut kromosomin 3 q-haaran distaaliseen päähän. Sekvenssi-informaatio, joka saatiin SauIIIA1-restriktioentsyymin tunnistuskohdasta ~15 ke:n insertin toisessa päässä sisäisen HindIII-restriktioentsyymin tunnistuskohtaan, joka käsittää koko kypsän RNA-komponentin sekvenssin sekä RNA-komponentin geenin transkription säätelyelementit lambda-kloonista 28-1, on esitetty edellä.

Esimerkki 1

PCR-kopioimisäätyn cDNA:n valmistus

RNA saatiin soluista 293 ja IMR-90 guanidiini-tiosyanaatti-uutolla tai puhdistetuista telomeraasifraktioista fenoli/kloroformi-uutoilla. Koko RNA soluista 293 fraktioitiin koon mukaan 2% agarosigeelillä, ja eristettiin RNA, joka oli kooltaan alle 500 emäsparia.

Ensimmäisen säikeen cDNA-synteesi suoritettiin käyttäen Superscript™ II käänteiskopioijaentsyymiä, joka oli saatu Bethesda Research Laboratories:lta (BRL). Noin 0,5-1,0 µg RNA:ta sekoitettiin noin 40 ng:n kanssa satunnaisaluketta (6 mer; pdN₆) vedessä kokonaistilavuuteen 11 µl. Liuosta

kuumennettiin 10 min. 95°C:ssa ja jäähdytettiin sitten jäissä 5-10 min. Denaturoitu nukleinihappo kerättiin sentrifugoimalla. Denaturoidun RNA:n ja alukkeen muodostama seos suspendoitiin sitten uudelleen lisäämällä tässä jär-

5 jestyksessä: 4 µl 5x ensimmäisen säikeen synteessin pusku-
ria; 2 µl 0,1 M ditiotreitolia (DTT); 1 µl RNAsin:ia (Phar-
macia); ja 1 µl dNTP (2,5 mM kukin varastoliuos). Reaktio-
seosta inkuboitiin 42°C:ssa 1 min. ja sitten lisättiin 1 µl
(200 yksikköä) Superscript™ II RTasea (BRL) ja sekoitettiin
10 reaktion alkamiseen, jota sitten inkuboitiin 60 min.
42°C:ssa. Saatu reaktioseos, joka sisälsi juuri syntetisoi-
tua cDNA:ta, pantiin jäihin odottamaan toisen säikeen syn-
teesiä.

15 Toisen säikeen cDNA-synteesi suoritettiin seuraavasti. Noin
20 µl reaktioseosta ensimmäisen säikeen cDNA-synteesin
reaktioseoksesta (edeltä) sekoitettiin seuraavien kompo-
nenttien kanssa mainitussa järjestyksessä: 111,1 µl vettä,
16 µl 10x E.coli DNA-ligaasipuskuria; 3 µl dNTP:tä (2,5 mM
20 kukin varastoliuos); 1,5 µl E.coli DNA-ligaasia (15 yksik-
köä, BRL:tä); 7,7 µl E.coli DNA-polymeraasia (40 yksikköä
Pharmacialta); ja 0,7 µl E.coli RNase H:ta (BRL). Saatua
liuosta sekoitettiin kevyesti ja inkuboitiin 2 tuntia
16°C:ssa, jona aikana reaktioputkeen lisättiin 1 µl (10
25 yksikköä) T4 DNA polymeraasia, ja inkuboimista jatkettiin
vielä 5 min. samassa lämpötilassa (16°C). Reaktio pysäytet-
tiin, ja nukleinihappo kerättiin uuttamalla reaktio feno-
li/kloroformilla kahdesti, saostamalla nukleinihappo eta-
nolilla, ja sentrifugoimalla reaktioseos nukleinihapon
30 pellettoimiseksi.

Sentrifugoimalla kerätty cDNA-pelletti suspendoitiin uudel-
leen 20 µl:aan TE-puskuria ja sidottiin kaksisäikeiseen
oligonukleotidiin, jota kutsuttiin nimellä "NotAB", ja joka
35 koostui kahdesta oligonukleotidista (NH₂ on aminosuojaryh-
mä):

NotA: 5'-pATAGCGGCCGCAAGAATTCA-NH₂

NotB: 5'-TGAATTCTTGCGGCCGCTAT-3'

Kaksisäikeinen oligonukleotidi valmistettiin sekoittamalla 50 µl NotA-oligonukleotidia (100 pmol) 50 µl:n kanssa NotB-oligonukleotidia (100 pmol) 46,25 µl:aan vettä, kuumennettiin saatua seosta 5 min. 95°C:ssa ja lisättiin 3,75 µl 20x SSC-puskuria liuoksen vielä ollessa kuuma. Seosta sisältävä putki pantiin sitten keittimeen, jossa oli kuumaa vettä (lämpötilassa noin 70-75°C), jonka lämpötilan annettiin hietaasti laskea alle 15°C:n, jolloin kaksi oligonukleotidia voivat hybridisoitua ja muodostaa kaksisäikeisen NotAB:n. Saatu nukleiinihappo kerättiin saostamalla ja sentrifugomalla.

Kaksisäikeinen NotAB-oligonukleotidi suspendoitiin uudelleen noin 30 µl:aan TE-puskuria ja sidottiin sitten cDNA:han reaktioseoksessa, joka sisälsi 10 µl edellä kuvattua cDNA-valmistetta, noin 50 pmol (laskettu OD260:llä) NotAB:tä; 2 µl 10x T4 DNA-ligaasipuskuria; 1,2 µl T4 DNA-ligaasia; 0,2 µl 10 mM APT:tä; ja vettä kokonaistilavuuteen 20 µl inkuboimalla reaktioseosta 16°C:ssa yön yli. Reaktio lämpöaktivoitiin sitten uudelleen kuumentamalla reaktioseosta 10 min. 65°C:ssa. Noin 1-2 µl saatua seosta käytettiin tyypillisesti PCR-kopiolisäykseen; sidotun seoksen kopiomäärää voidaan lisätä 10-15 syklin ajan (94°C, 45 sekuntia; 60°C, 45 sekuntia; ja 72°C, 1,5 min.) ja säilytettiin varastoliuoksena esimerkissä 2.

Esimerkki 2

cDNA:n PCR-kopiolisäys

cDNA:n kopiomäärää lisättiin rutiinimenetelmällä valmistamalla kopiomäärää lisäävä reaktioseos, jossa oli 5 µl 10X PCR-puskuria (500 mM KCl; 100 mM Tris, pH=8,3; ja 20 mM MgCl₂; 5-8 µl dNTP (2,5 mM kukin); 1 µl Taq polymeraasia (Boehringer-Mannheim); 0,1 µl geenin 32 proteiinia (Boehringer-Mannheim); 6 µl Not B aluketta (20 µM varastoliuos); 2 µl cDNA:ta (valmistettu esimerkissä 1 kuvatulla tavalla), ja vettä 50 µl:ksi. Tämä seos levitettiin sitten 50-100 µl:n kanssa mineraaliöljyä, ja PCR-kopiolisäystä suoritet-

tiin 10-15 sykliä 94°C:ssa, 45 sekuntia; 60°C; ja 72°C, 1,5 min. Kopiomäärän lisäyksen jälkeen reaktioseos uutettiin fenoli/kloroformilla, ja kopiomäärältään lisääntynyt nukleinihappo saostettiin etanolilla ja kerättiin sentrifugomalla. Sakka liuotettiin sitten 100 µl:aan TE-puskuria varastoliuoksen valmistamiseksi.

Esimerkki 3

PCR-kopiolisäys subtraktiivista hybridisaatiota ja syklistä valikointia varten

PCR-tuotteen valmistamiseksi sekä subtraktiiviseen hybridisointiin että sykliseen valikointiin lisättiin kopiomäärää noin 1 µl:ssa esimerkissä 2 kuvatulla tavalla valmistettua varastoliuosta 50 µl:ssa PCR-reaktioseosta, joka oli valmistettu esimerkissä 2 kuvatulla tavalla, paitsi että suoritettiin syklit 21-24 alukkeen lämpökäsittelyssä, laajennuksessa ja tuotteen denaturoinnissa. Vahvistuksen jälkeen reaktioseokset uutettiin fenoli/kloroformilla, saostettiin etanolilla ja kerättiin talteen sentrifugoimalla. Tuotteen saanto arvioitiin värjäämällä etidiumbromidilla sen jälkeen kun reaktioseoksen pienestä erästä oli tehtu agarosigeeli-elektroforeesi. Subtraktiivista hybridisaatiota varten lisättiin kopiomäärää cDNA-kirjastossa telomeraasinegatiivisista soluista (IMR-90) biotinyloidun dUTP:n läsnäollessa. Subtraktiivisen hybridisaation suorittamiseksi käytettiin telomeraasinegatiivisista soluista (IMR-90) saadun cDNA:n suhdetta telomeraasiposiitivisista soluista (293) saatuun cDNA:han noin 100-1. Käytössä olivat standardiolosuhteet 65°C:ssa 48-72 tuntia. Tyypillisesti käytettiin noin 2 µg nukleinihappotuotetta, joka oli saatu osittain puhdistetusta cDNA:sta ja negatiivisesti valikoidusta materiaalista, ainakin kahteen kierrokseen syklistä valikointia.

Kun syklinen valikointi oli tapahtunut esimerkissä 4 kuvatulla tavalla, PCR-vahvistettiin noin 1-2 µl valikoituja "alaszveto"-tuotteita (kokonaistilavuudesta 20 µl) esimer-

kissä 2 kuvatulla tavalla 22 sykliä, saostettiin etanolilla ja kerättiin sentrifugoimalla valmisteeksi seuraavaa syklistä valikointia varten.

5 Esimerkki 4

PCR-vahvistetun cDNA:n positiivinen valikointi

Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kloonamiseksi suoritettun syklisen valikointiprosessin positiivista valikointivaihetta varten laimennettiin noin 2 µg PCR-kopiolisättyä cDNA:ta 25 µl:ksi TE-puskuria ja sekoitettiin sitten 1,25 µl:n kanssa 20X SSC:tä ja saatua liuosta kuumennettiin 95°C:ssa 3 min. Lämpötilaa alennettiin 60°C:een 5 minuutiksi, ja lisättiin yksi µl (0,1 µg/µl) biotinyloitua koetinta R2 tai R4. Näiden koettimien sekvenssit on esitetty alla. Koettimet ovat O-metyyli-RNA-koettimia, jolloin U on O-metyyliuridiini, A on O-metyyliriboadeniini, G on O-metyyliriboguaaniini, ja I on inosiini.

20 R2: 5'-UUAGGGUUAGII-biotiini
R4: 5'-AUUGGGUUAUII-biotiini

25 Koetin R2 on spesifinen telomeerin toistolle, ja koetin R4 on spesifinen RNase P:lle, jota käytettiin syklisen valintaprosessin tehon ja hyötysuhteen seuraamiseksi. Suorittamalla syklinen valinta samanaikaisesti mutta erillään RNase P RNA:sta, molekyylistä, jonka sekvenssi tunnetaan, voidaan paremmin luottaa siihen, että syklinen valintaprosessi toimii oikein kiinnostuksen kohteena olevan molekyylin suhteen, tässä tapauksessa ihmisen telomeraasin RNA-komponentin suhteen.

30
35
Joko koetin R2 tai R4 lisättiin seokseen 65°C:ssa, hybridisaatioreaktion lämpötilaa alennettiin 30°C:een inkuboiden seosta tuossa lämpötilassa 5 min., ja sitten reaktioseoksia edelleen alennettiin lämpötilaan 14°C inkuboiden tuossa lämpötilassa 60 min. Lopuksi seosta inkuboitiin 4°C:ssa 2-12 tuntia.

Koko hybridisaatioreaktio kummallekin näytteelle (R2 tai R4) lisättiin 400 µl:aan 0,5X SSC 4°C:ssa ja sitten lisättiin putkeen, jossa oli jääkylmiä magneettihelmiä, jotka oli hankittu Promegalta, ja esipestiin neljä kertaa 0,5X SSC:llä ennen käyttöä. Saatua seosta inkuboitiin 30 min. 4°C:ssa täydellisen sitoutumisen varmistamiseksi magneettihelmiin. Kumpaakin reaktioputkea inkuboitiin sitten lyhyesti huoneenlämmössä magneettitelineessä (Promega) helmien vetämiseksi alas. Helmet suspendoitiin uudelleen kylmään 0,5X SSC:hen (600 µl) ja pantiin (putkessa) jäihin. Näytteet pestiin vielä kolme kertaa 0,5X SSC:llä tällä tavalla. Nukleiinihappo eluoitiin helmistä suspendoimalla helmet uudelleen 100 µl:aan vettä ja inkuboimalla 2 min. 65°C:ssa ennen helmien panemista magneettitelineeseen keräämistä varten. Tämä prosessi toistettiin vielä kolme kertaa; viimeisellä kerralla uudelleensuspendoituja helmiä inkuboitiin 5 min. 65°C:ssa ennen panemista magneettitelineeseen keräämistä varten. Koko 100 µl superantanteja (kaikista näytteistä) yhdistettiin ja kuivattiin 20 µl:ksi SpeedVac[™]-sentrifuugissa. Talteenotetulle DNA:lle suoritettiin sitten PCR-kopiolisäys toista kopioimäärän lisäämis- ja valintakierrosta varten. Kunkin kopiomäärän lisäyksen jälkeen PCR-tuotteet uutettiin kahdesti fenoli-kloroformilla, saostettiin etanolilla ja suspendoitiin uudelleen 20 µl:aan TE-puskuria.

PCR-kopiolisäykset varmistettiin tyypillisesti agarosigeelelektroforeesilla. Lisäksi käytettiin erilaisia kontroleja syklisen valintaprosessin seuraamiseksi. Yhtenä kontrollina sijoitettiin PCR-"käsivarret" (määrätyn sekvenssin omaavat oligonukleotidit, jotka toimivat alukkeen hybridisaatiokohtina) nukleiinihappoon, joka sisälsi neomysiiniresistenssiä vahvistavan geenin. Saatu nukleiinihappo sekoitettiin PCR-kopiolisätyn cDNA:n kanssa ja seurattiin jokaisessa valinnassa kvantitatiivisella PCR:llä. Toisena kontrollina seurasi RNase P sekä RNase P-valikoituissa että telomeraasin RNA-komponentti-valikoiduissa kirjastoissa.

Esimerkki 5RT-PCR-työmenetelmä

Ensimmäinen säie cDNA:sta valmistettiin olennaisesti esimerkissä 1 kuvatun menetelmän mukaan. Periaatteessa RNA puhdistettiin kustakin telomeraasifraktiosta, jotka sisälsivät 0,1-1 µg RNA; tyypillisesti käytettiin noin yhdestä kolmasosasta yhteen viidesosaan RNA:ta, joka oli valmistettu 300 µl:sta fraktiota. RNA sekoitettiin 40-80 ng:n kanssa satunnaisheksameeria 10 µl:ssa, denaturoitiin 10 min. 95°C:ssa (käyttäen lämpösyklisointilaitetta), ja jäädytettiin jäissä. Denaturoitu RNA ja 6-meeri lisättiin reaktioseokseen, joka sisälsi 4 µl 5x ensimmäisen säikeen synteesipuskuria, jonka oli toimittanut käänteiskopioijaentsyymien valmistaja (RTase, toimitettu BRL:ltä), 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP (kutakin), 1 µl RNase-inhibiittoria (Pharmacia), ja vettä kokonaistilavuuteen 9 µl. Yhdistetty seos pantiin 42°C vesihauteeseen. 1-2 min. inkuboinnin jälkeen seokseen lisättiin 1 µl Superscript™ II RTase (BRL). Inkubointia jatkettiin 60 min. 95-98°C:ssa. cDNA:n ensimmäinen säie kerättiin talteen lyhyellä sentrifugoinnilla, liuotettiin uusiin putkiin, jäädytettiin nopeasti kuivalla jäällä, ja säilytettiin -80°C:ssa tai käytettiin välittömästi.

Esimerkki 6cDNA:n PCR-kopiolisäys spesifisellä alukekokoelmalla

20 µl:aa varten PCR-reaktiota, jossa oli radioaktiivisesti leimattuja nukleotideja, 1 µl cDNA:ta, joka oli valmistettu esimerkin 5 mukaan, sekoitettiin 2 pmol:n kanssa aluketta 1, 20 pmol:n kanssa aluketta 2, 2,5 µl:n kanssa dNTP:tä, 5 µCi:n kanssa alfa-³²P-dATP:tä, 2 yksikön kanssa Taq-polymeraasia (Boehringer-Mannheim), 0,2 µg:n kanssa T4 geenin proteiinia 32 (Boehringer-Mannheim), 2 µl:n kanssa 10x puskuria (500 mM KCl, 100 mM Tris-HCl, pH 8,3, ja 2 mM MgCl₂), ja vettä kokonaistilavuuteen 20 µl. Putkeen lisättiin sitten yksi tippa mineraaliöljyä.

PCR-kopiolisäyksen olosuhteet telomeraasin RNA-komponentin kloonille olivat: 94°C 45 sekuntia, 60°C 45 sekuntia, 72°C 1,5 minuuttia. Sykliä lukumäärä oli erilainen riippuen RNA:n valmistukseen käytettyjen puhdistettujen aineiden

5 tyypistä, mutta oli yleensä 18-25 sykliä. Kuten koko kvantitatiivisessa RT-PCR:ssä, kullekin näytteelle ajettiin useita reaktioita erilaisilla syklimäärillä sen määrittämiseksi, milloin PCR-kopiolisäys saavutti kyllästymis- ja ei-lineaarisen vaiheen.

10

Kontrollina käytetyille RNase P:lle PCR-kopiolisäyksen olosuhteet olivat: 94°C 45 sekuntia, 50°C 45 sekuntia ja 72°C 1,5 minuuttia. Jälleen oli syklien lukumäärä 15-22 sykliä riippuen näytteiden luonteesta. RNase P:n vahvistukseen

15 käytettyjen alukkeiden sekvenssit on esitetty alla:

P3: 5'-GGAAGGTCTGAGACTAG-3'

P4: 5'-ATCTCCTGCCCAGTCTG-3'

20

Näillä kahdella alukkeella saatu PCR-tuote on kooltaan noin 110 emäsparia.

PCR:n jälkeen tuotteet (5-10 µl reaktioseosta) ladattiin 6% puhtaaseen polyakryyliamidigeeliin ja elektroforesoitiin.

25 Elektroforeesin jälkeen geeli kuivattiin ja suoritettiin autoradiografikuvaus PhosphorImager[™]-laitteella analyysiä varten.

Esimerkki 7

Geenin kloonauksen ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia varten

Ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenin kloonaukseen käytettävät toimenpiteet suoritettiin kuten yleisesti on kuvattu julkaisussa Maniatis et al., Laboratory Molecular Cloning Manual. Ihmisen keuhkon fibroblastisolulinjasta WI-38 peräisin olevan DNA:n genomidna-kirjasto insertoituna faagi lambdavektoriin FIXII hankittiin Stratageneltä. Faagi

päällystettiin noin konsentraatiossa 25.000 plakkia maljaa kohti kolmelle 15 maljan (150 mm) yhdistelmälle. Maljat tehtiin NZY-agarin ja NZY pinta-agarosin avulla; faagin transformaatiota varten käytetyt solut olivat XL1BlueMRAP2-soluja; ja transformanttien annettiin kasvaa yön yli noin 16 tuntia 37°C:ssa. Maljoja jäähdytettiin sitten 4°C:ssa noin tunti ja sitten plakit "nostettiin" C/P-nailonkiekoille (suodatinpaperia Bio Rad:lta). Tämä prosessi toistettiin nostettujen suodattimien duplikaattikokoelman saamiseksi.

10 Suodattimet (duplikaatteina) denaturoitiin, neutraloitiin, tasapainotettiin 6x SSC-puskurilla, säteilytettiin UV-säteillä nukleinihapon ristisilloittamiseksi suodattimelle, ja kuivattiin sitten imupaperilla.

15 Esihybridisaatiota suoritettiin yksi tunti 37°C:ssa 50% formamidipuskurissa. Suodattimet varustettiin koettimella, joka oli ~218 emäsparin radioaktiivisesti leimattu NotI-fragmentti kloonista pGRN7, joka oli eristetty sähköeluoinnilla 5% polyakryyliamidigeelistä elektroforeesilla suoritettun erotuksen jälkeen, ja nick-translaatoitiin alfa-³²P-dCTP:llä käyttäen nick-translaatiosarjaa Boehringer-Mannheim Biochemicalsilta valmistajan ohjeiden mukaan. Noin 25 ng (~10 µCi:n leima) koetinta käytettiin suodatinta kohti, ja hybridisaatiota suoritettiin yön yli 37°C:ssa 50% formamidihybridisaatiopuskurissa. Hybridisaation jälkeen suodattimet pestiin huoneenlämmössä kuusi kertaa; ensimmäiset kolme pesua suoritettiin 6x SSC:llä, joka sisälsi 0,1% SDS, ja kolme viimeistä kertaa suoritettiin pelkällä 6x SSC:llä. Kun useammat duplikaattisuodattimet oli ensin altistettu

25 PhosphorImager[®]-kasetissa hybridisaation tehon ja signaalin vahvuuden tarkistukselle, suodattimet pestiin 65°C:ssa 0,5x SSC:ssä. Sitten suodattimet pantiin Kodak XAR5-filmin alle käyttäen kahta tehostinrasteria ja annettiin filmin saada säteilyä noin 100 tuntia -70°C:ssa.

30 Yksi vahva signaali tuli suodattimesta, joka sisälsi faagia, jolle myöhemmin annettiin numero 28-1, joka sisälsi geenin ihmisen telomeraasin RNA-komponentille. Suodattimel-

la havaittua signaalia vastaavaa plakkia käytettiin sekundaärimaljojen valmistamiseksi, niin että eristetty plakki (varmistettiin tutkimalla leimatulla pGRN7-nukleiinihapolla) voitiin viljellä faagi-DNA:n suurimittaista eristämistä varten. Faagi 28-1, jota saa American Type Culture Collectionilta talletusnumerolla 75925, sisältää ~15 ke:n insertin ja sisältää useita restriktiofragmentteja, jotka sisältävät sekvenssejä, jotka hybridisoituvat RNA-komponenttisekvenssien kanssa pGRN7:ssä: 4,2 ke:n EcoRI-restriktioentsyymifragmentti; 4,2 ke:n ClaI-restriktioentsyymifragmentti, ja 2,5 ke:n HindIII-SacI-restriktioentsyymifragmentti. Viimeinen fragmentti käsittää koko ~560 nukleotidin sekvenssin RNA-komponentista, joka on edellä esitetty ja jonka uskotaan sisältävän täydellisen geenin RNA-komponentille. Plasmidi, joka sisälsi 2,5 ke:n HindIII-SacI-restriktioentsyymifragmentin pBluescript-vektorissa, määritettiin plasmidiksi pGRN33, jota on saatavissa American Type Culture Collectionilta talletusnumerolla ATCC 75926. Ihmisen geeniin voi sisältyä muitakin sekvenssejä kuin ne, jotka ovat 2,5 ke:n fragmentissa, nuo sekvenssit voidaan erottaa faagista 28-1 tai muista faagiklooneista, jotka on identifioitu tutkimalla 2,5 ke:n fragmentilla (tai muulla keksinnön koettimella). Edellä mainitut restriktioentsyymifragmentit valmistettiin erillisissä restriktioentsyymileikkauksissa; leikkausten tuotteet erotettiin elektroforeesilla 0,7% agarosigeelillä tai ainoastaan ~2,5 ke:n fragmentin tapauksessa 3% polyakryyliamidigeelillä; ja halutut vyöhykkeet leikattiin geelistä ja preparoitiin subkloonausta varten joko käyttäen GeneClean™ Kit II (Bio101, Inc.:lta) tai sähköeluoimalla Spectropor #2 dialyysiputkeen 0,1x TBE:ssä 100 V:ssa kaksi tuntia (vain ~2,5 ke:n fragmentille).

Nämä restriktioentsyymifragmentit subkloonattiin E.coli ilmentymis/mutageneesi-plasmideihin, jotka oli saatu pUC-pohjaisista plasmideista tai pBluescriptII-plasmideista, jotka myös sisältävät replikoitumisalun SV40 (mutta ei SV40-promoottorin aktiivisuutta). Saatuja plasmideja voi-

daan käyttää muunnettujen (mutatoitujen) RNA-komponentin nukleiinihappojen valmistamiseksi vietäväksi ihmisen tai muuhun eukaryoottiseen soluun eri tarkoituksia varten, kuten edellä Edullisten toteutusmuotojen kuvaus - kohdassa on kuvattu.

Esimerkki 8

Antisense-plasmidit ihmisen telomeraasin RNA-komponentille

10 Antisense-ilmentymisplasmidit valmistettiin RNA-komponentin cDNA:n PCR-kopiolisäyksellä käyttäen seuraavia alukeyhdistelmiä: (1) NotB ja G1, joka tuottaa antisense-nukleiinihapon, joka on kapeampi kuin cDNA-insertti plasmidissa; ja (2) NotB ja R3C, joka tuottaa täysimittaisen (verrattuna 15 plasmidissa olevaan inserttiin) antisense-nukleiinihapon. NotB:n nukleotidisekvenssi on esitetty esimerkissä 1 edellä; alukkeiden G1 ja R3C nukleotidisekvenssit on esitetty alla.

20 G1: 5'-GAGAAAAACAGCGCGCGGGGAGCAAAGCA-3'
R3C: 5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGAAG-3'

PCR-kopiolisäyksen jälkeen kopiomäärältään suuremmat fragmentit kloonattiin ~10 ke:n ilmentymisplasmidiin PmlI-kohtaan; plasmidi sisältää puromysiiniresistenssin vahvistavan DHFR:n ja hygromysiini B-resistenssin vahvistavat geenit valikoitavina markkereina, replikoitumisalun SV40; induoitavan ihmisen metallotioneiinigeenipromoottorin sijoituneena ilmentämään antisense-säiettä ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenistä (voitaisiin käyttää myös vahvempaa promoottoria suurempien ilmentymistasojen saamiseksi), sekä SV40 myöhäispoly A-additiokohdan.

35 Saadut plasmidit (nimeltään pGRN42 NotB/G1-tuotteelle ja pGRN45 NotB/R3C-tuotteelle) transfektoitiin kalsiumfosfaattimenetelmällä (katso Maniatis et al., edellä) fibrosarkoomasolulinjaan HT1080. HT1080-solut ovat normaalisti immor-

taalisia; antisense-RNA:n ilmentymisen ihmisen telomeraasin RNA-komponentille tulisi estää ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia liittymästä yhteen proteiini-komponenttien kanssa, aktiivisen telomeraasin muodostumisen estämiseltä ja solujen tekemiseltä mortaaliksi.

Esimerkki 9

RNA-komponentin nukleiinihappojen identifioiminen ja eristäminen ei-ihmisenkaltaisista nisäkkäistä

Sen valaisemiseksi, kuinka keksinnön reagensseja voidaan käyttää identifioimaan ja eristämään olennaisesti homologia nukleiinihappoja muista nisäkäslajeista, käytettiin PCR-alukkeita, jotka ovat komplementaarisia ihmisen RNA-komponentin sekvensseille, lisäämään homologisten sekvenssien kopiomäärää PCR:ssä. Selventävä alukepari, jota voidaan käyttää esittämään keksinnön tätä puolta, koostuu alukkeesta +10, jolla on sekvenssi 5'-CACCGGGTTGCGGAGGGAGG-3', ja alukkeesta R7, jolla on sekvenssi 5'-GGAGGGGCGAAC-GGGCCAGCA-3'. Genomin DNA valmistettiin simpanssin, orava-saimirin, resusapinan ja paviaanin kudoksesta ja liuotettiin TE-puskuriin kosentraatioon noin 0,5-4 mg/ml.

Kullekin kudostyypille valmistettiin PCR-seos, joka seos käsitti: 1 µl genomin DNA:ta, 48 µl Master Mixiä (Master Mix sisältää 1x TaqExtender[™]-puskuria Stratageneltä, 200 µM kutakin dNTP:tä, ja 0,5 µM kutakin aluketta), ja 0,5 µl 1:1-seosta Taq-polymeraasia (5 yksikköä/µl, Boehringer-Mannheim):Tth-polymeraasia (TaqExtender[™]-polymeraasi Stratageneltä). Reaktioputket ladattiin lämpösyklisoijaan, joka ohjelmoitiin ensin kuumentamaan reaktioseos 94°C:een 5 minuutiksi ja sitten suorittamaan 27 sykliä inkuboitumista 94°C 30 sekuntia, 63°C 10 sekuntia ja 72°C 45 sekuntia. Kun kopiomäärän lisäysreaktio oli tapahtunut, pantiin noin 10 µl kutakin reaktioseosta 2% agarosigeelille elektroforeesia varten. Elektroforeesin, geelin värjäyksen ja UV-säteilytyksen jälkeen voitiin havaita, että kukin reaktioseos sisälsi vyöhykkeen ennustettua (~200 ep) kokoa. Nukleiini-

hapot näistä vyöhykkeistä voidaan kloonata ja sekvensoida ja jäljelle jäänyt osa RNA-komponenttigeeneistä kustakin näistä nisäkäslajeista voidaan kloonata, kuten edellä on kuvattu, geeniksi ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia varten. Esimerkki 14 jäljessä kuvaa spesifistä esimerkkiä oravasaimirin telomeraasin RNA-komponenttigeenin sekvensoinnista.

Esimerkki 10

10 Mutatoidun sense-ihmisen telomeraasin RNA-komponentin sekvenssit

Tämä esimerkki vahvistaa, että telomeraasin RNA-komponentin sekvenssin muuttaminen templaattialueella muuttaa sekvenssiä, joka syntetisoidaan ihmisen telomeraasin avulla johtaen muutoksiin myös kromosomaalisen telomeraasin toistoissa.

Sen määrittämiseksi, johtaisiko TRC3-templaattialueen mahdollisesti tuottama uudelleen ohjelmoituminen vastaaviin muutoksiin telomeerin toistossa, joka on syntetisoitu ihmisen telomeraasitoiminnassa, geenifragmentti, joka ilmentää koko telomeraasin RNA-komponentin (TRC3) geenisekvenssiä, kloonattiin ja mutagenisoitiin. Southern blot-analyysi osoitti, että TRC3 hybridisoitui yksittäiskopiogeeniksi ihmisen genomissa. TRC3:n genomikopio eristettiin lambda-faagikirjastosta, ja sillä osoitettiin olevan sama restriktiokartta kuin havaittiin genomien Southern bloteissa tutkittuna TRC3:lla. 2,6 ke:n HindIII-SacI-fagmentti eristettiin ja subkloonattiin pBluescriptin muunnettuun versioon, jolloin saatiin genomien TRC3 plasmidi pGRN33. RNA:n 5'- ja 3'-päätkartoitettiin käyttäen alukelisäystä RACE PCR ja RT-PCR. RNA-transkriptin koko oli ≈ 550 emästä, käsittelemällä sen kulkeutumisen Northern blot-analyysissä. Transkriboitu alue TRC3:lle oli keskeinen genomien kloonille, jolla oli 1,4 ke:n ylöspäin suuntautuva sekvenssi.

RNA uutettiin puhdistetuista telomeraasivalmisteista ja käytettiin sitten seuraaviin kokeisiin. 5'-RACE: Ensimmäisen säikeen cDNA valmistettiin käyttäen antisense-TRC3-alukkeita (R3B: 5'-CAACGAACGGCCA GCAGCTGACATT) ³²P-dATP:n läsnäollessa. Lisäystuotteet liuotettiin PAGE:lla ja identifioitiin autoradiografialla, leikattiin ja uutettiin. Oligonukleotidi (NotA: 5'-pATAGCGGCCGCTT GCCTTCA-NH₂) si-
dottiin näihin kahteen ensimmäisen säikeen tuotteeseen käyttäen T4 RNA-ligaasia, ja sitten suoritettiin PCR käyttäen ryhmäaluketta, R3c (5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG), ja oligonukleotidia (NotB: 5'-TGAATTCTTGCGGCCGCTAT), joka on komplementaarinen NotA-oligonukleotidille. PCR-tuotteet liuotettiin agarosigeeliin ja vyöhykkeet leikattiin ja sekvensoitiin suoraan käyttäen oligonukleotidia G1 (5'-
AGAAAAACAGCGCGCGGGGAGCAAAGCA) alukkeena. 3'-pään kartoitus: Yritykset suorittaa 3' RACE epäonnistuivat. Sen jälkeen käytettiin RT-PCR-strategiaa, jossa käytettiin sarjaa antisense-alukkeita, jotka olivat komplementaarisia genomien DNA-sekvenssille, ensimmäisen säikeen cDNA-synteesin aloittamiseksi. Alukkeet tässä sarjassa sijoitettiin suunnilleen 150 emäsparin välein alkaen transkriptin 5'-päästä edeten kohti 3'-päästä. Sitten suoritettiin PCR käyttäen ensimmäisen säikeen aluketta ja aluketta, jonka sekvenssi oli sisäinen tunnetulle TRC3-transkriptille (F3b: 5'-TCTAACCC-TAACTGAGAAGGGCGTAG). Käänteiskopioijaentsyymille herkät, ennalta arvioitujen kokoiset PCR-vyöhykkeet nähtiin, kun käytettiin cDNA:ta, joka oli valmistettu kaikilla alukkeilla, jotka suunniteltiin välille +100 - +450 (numerointi 5'-pään suhteen), mutta ei millään alukkeella, joka suunniteltiin välille +558 - +950. Tämä sijoitti kypsän TRC3-transkriptin oletetun 3'-pään kohtien +450 ja +558 välille. Seuraavat alukesuunnittelun ja RT-PCR:n vaiheet kavensivat tätä väliä välille +545 ja +558.

TCR3:n ennustettu templaattisekvenssi muuttui CUAACCCUA:sta CCAACCCCA:ksi (MuC) tai CAAACCCAA:ksi (MuA) genomien plasmidin pGRN33 in vitro-mutageneesillä (suoritettiin olennaisesti Perez et al.:n mukaan (1994) J. Biol. Chem. 269:

22485). Liitettynä funktionaaliseen telomeraasiin näiden mutantti-RNA:iden tulisi toimia templaattina TTGGGG:n (MuC) tai TTTGGG:n (MuA) synteessissä mieluummin kuin villikannan kaltaiselle toistolle TTAGGG. Nämä mutanttitelomeraasin toiminnat voitaisiin helposti erottaa villikannan toiminoista, koska ne eivät enää tarvitsisi dATP:tä toimintoihinsa ja vain villikannan toiminnat olisivat herkkiä ddATP:llä tapahtuvalle terminaatiolle. Valmistettiin myös kaksoismutantti (MuC+17), jossa oli läsnä 17 emäsparin insertio kohdassa +180 ep MuC-templaatin lisäksi. Tämä mutantti mahdollisti muunnetun RNA:n spesifisen havaitsemisen koettimella 17 emäsparin insertioon tai koon mukaan.

2,6 ke:n genomisekvenssi oli riittävä ilmentämään TRC3 in vivo. Solut transfektoitiin ohimenevästi MuC+17-plasmidilla ja transfektoidusta DNA:sta ilmentynyt RNA havaittiin RT PCR:llä käyttäen 17 emäsparin inserttisekvenssiä alukkeena käänteiskopiointivaiheessa. RNA havaittiin MuC+17-transfektoiduissa soluissa, mutta ei valetransfektoiduissa soluissa, osoittaen sitä, että 2,6 ke:n genomikloonin oli riittävä TRC3:n ilmentymiselle. Stabiilit transformantit johdettiin sitten kustakin näistä kolmesta mutanttiplasmidista kaliumfosfaattitransfektoidumalla HT1080-soluja yhdessä pCMVneo:n kanssa. Resistentit kloonit valikoitiin G418:ssa ja MuC+17:n RNA:n ilmentyminen vahvistettiin RT-PCR:llä (Irving et al. (1992) Exp. Cell Res. 202: 161).

Mutanttin telomeraasitoiminnan tutkimiseksi tutkittiin uutteen transfektoitumattomista soluista ja kolmesta stabiilista transformantista integroiduilla vektoreilla MuC*, MuC tai MuA (C*, C tai A kuvassa 1). Koska mutanttiuutteen odotettiin sisältävän sekä luonnossa esiintyvän tyyppisen että mutanttitelomeraasin toimintoja, käytettiin erilaisia koeolosuhteita näiden erottamiseksi. Normaaleissa reaktioolosuhteissa (dTTP, ³²P-dGTP ja dATP), kaikki kolme uutetta mutanttirakennesarjasta osoittivat villikannan kaltaista telomeraasitoimintaa, joka oli herkkä RNaselle (kuva 1, kaistat 1-6). Kuten odotettua, tähän toimintaan ei vaikut-

tanut, kun reaktioihin lisättiin ddCTP:tä (kuva 1, kaistat 7-9) ja kumottiin ddTTP:llä (kaistat 10-12). Sitä vastoin kun dATP korvattiin ddATP:llä, uutteilla C (kaista 14) ja A (kaista 15) vielä oli RNase-herkkä (kaistat 17 ja 18) telomeraasitoiminta, kun taas C*:llä (kaista 13) ja kontrolli-uutteella ei ollut. Nämä tulokset osoittavat, että ddATP-resistenttejä toimintoja edustava telomeraasi ohjelmoitiin uudelleen MuC- tai MuA-TCR3-RNA:lla. Sitä vastoin 17 ke:n insertio C*:ssä inhiboi uudelleenrakentumista osoittaen sitä, että telomeraasin uudelleenrakentuminen on erittäin spesifistä TCR3-sekvenssille.

Sen varmistamiseksi, että mutantilla MuA syntetisoitu sekvenssi oli (GGGTTT)_n, modifioimme olemassaolevaa PCR-menetelmää telomeraasitoistojen vahvistamiseksi lisättynä ainutlaatuihin telomeraasialukkeeseen (Kim et al. (1994) Science 266: 2011). Synteettisiä alukkeita käyttäen identifioimme reaktio-olosuhteet, joissa 3'-aluke yhdessä sekvenssin d(CCCAAACCCAAACCCAA) kanssa vahvistaisi vain (TTTGGG)_n-toistoja eikä vahvistaisi toistoja, jotka sisältävät sekvenssejä (TTAGGG)_n.

Eron saamiseksi telomeeritoistojen välille, joita lisättiin villikannan tyyppisellä versus mutatoitdulla telomeraasilla, yhdistettiin kaksivaiheinen koe strategiaan nukleotidien saatavuuden rajoittamiseksi telomeraasin reaktioon. Koska MuA ja MuC synnyttäisivät telomeerin toistosekvenssit (TTTGGG)_n ja (TTGGGG)_n, vastaavasti, solu-uutteet inkuboitettiin ensin TS-substraatilla siten, että läsnä oli vain dTTP ja dGTP, 10 minuuttia huoneenlämmössä, jotta telomeeritoistojen lisäys saattoi tapahtua. Jäljellä olevat telomeraasin toiminnat tuhottiin sitten keittämällä uutteita 5 minuuttia. Telomeraasituotteet, joissa oli spesifinen DNA-sekvenssi, havaittiin sitten PCR-kopiolisäyksellä käyttäen sopivia käänteisaluslückeita ja siten, että läsnä olivat kaikki 4 dNTP:tä ja hivenmääriä ³²P-dCTP kuvatulla tavalla (Kim et al. (1994) edellä). MuA-tuotteiden havaitsemiseksi käänteisaluslücke oli (ACCCAA)₄ ja PCR-olosuhteet olivat 94°C, 10

sekuntia, 60°C 30 sekuntia ja 72°C 30 sekuntia 20 syklin ajan. MuC-tuotteiden havaitsemiseksi käytettiin kolmea käänteisalusuketta: (CCCCAA)₃, (CCAACC)₃ ja (CCAACC)₃, vastaavasti, joista saatiin PCR-tuotteet, joissa oli vastaavat

5 liikkuvuuden siirtymät, jotka olivat yhdenmukaiset odotetun lämpökäsittelykohdan kanssa telomeraasituotteille. Käytetyt PCR-olosuhteet olivat samat kuin edellä, paitsi että lämpökäsittelyn lämpötila oli 50°C. Samoissa olosuhteissa ei syntynyt yhtään telomeraasituotetta parentaalisoluista tai

10 soluista, jotka oli transfektoitu villikannan TRC-3-geenillä. PCR-kopioimisemme olosuhteiden spesifisyyden tutkimiseksi suoritetuissa kokeissa synteettiset oligonukleotidit, jotka sisälsivät (TTTGGG)_n ja (TTGGGG)_n, synnyttivät sopivan 6 nukleotidin tikapuu-PCR-tuotteet käänteisalusukkeen (ACCCAA)₄ tai (CCCCAA)₃ kanssa, vastaavasti, kun taas oligonukleotidit (TTAGGG)_n eivät tuottaneet mitään PCR-tuotteita käänteisalusukkeen (ACCCAA)₄ tai (CCCCAA)₃ kanssa.

20 Näitä olosuhteita käyttäen synnyttivät MuA:sta, mutta ei MuC:stä tai villikannan soluista saadut uutteen tuotteita modifioidussa telomeraasikokeessa, osoittaen sitä, että MuA:ta sisältävistä soluista saatu telomeraasi synnytti (TTTGGG)_n-toistoja. Samanlaisia menetelmiä käytettiin analysoitaessa MuC-mutanttia, joka syntetisoi (TTGGGG)_n-toistoja. Yhdessä ylläolevat tiedot muodostavat vahvan todisteen siitä, että TRC3-geeni koodaa ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia, ja niinpä olemme nimenneet TRC3:n uudelleen hTR:ksi tarkoittamaan ihmisen telomeraasin RNA:ta

25 (human telomerase RNA).

Esimerkki 11

Telomeraasin RNA-komponentti mortaalissa ja immortaalisissa soluissa

35 Useimmissa syöpäsoluissa on suuri määrä telomeraasitoimintaa, kun taas useimmissa normaaleissa somaattisissa ihmis-soluissa telomeraasia ei havaita (Kim et al. (1994), edel-

lä). Sen määrittämiseksi, nousevatko telomeraasin RNA-komponentin tasot immortaalisissa syöpäsolulinjoissa, analysoitiin telomeraasin RNA-komponentin ja GAPDH-transkriptin tasot käyttäen RT-PCR:ää viidessä morttaalisessa primäärisolukannassa, joista puuttui havaittava telomeraasitoiminta, ja viidessä immortaalisessa syöpäsolulinjassa, joissa telomeraasitoiminta oli tasoltaan korkeata. Telomeraasin RNA-komponentin transkriptien vakiotilataso oli 3-12 kertaa suurempi tuumorisolulinjassa kuin primäärisissä soluissa-
 10 verrattuna GAPDH:n tasoon (kuva 2A). Samalla kun telomeraasin RNA-komponentin tasot nousivat immortaalisissa syöpäsoluissa ilmaisten telomeraasin korkeita tasoja, on mielenkiintoista että matalat, mutta helposti havaittavat telomeraasin RNA-komponentin tasot olivat läsnä myös mortta-
 15 lisissa primäärisoluissa, joissa ei ollut havaittavaa telomeraasitoimintaa (kaistat 1-5).

Telomeraasin RNA-komponentin tasot tutkittiin myös erilaisissa normaaleissa ihmisen kudoksissa Northern blot-analyysillä. Kiveksissä ja munasarjoissa oli korkeimmat telomeraasin RNA-komponentin tasot, jotka olivat odotettuja, koska näissä kudoksissa ilmeni suuret telomeraasitoiminnan tasot. Useissa muissa kudoksissa ilmeni kuitenkin myös telomeraasin RNA-komponenttia (kuvat 2B ja 2C). Näitä ovat
 20 normaali munuainen, eturauhanen ja aikuisen maksa, joista kaikista puuttuu telomeraasitoiminnan havaittavat tasot. Nämä tulokset vahvistavat tiedot solulinjoista (kuva 2A) ja esittävät, että telomeraasin RNA voi olla läsnä, mutta inaktiivinen monissa ihmisen kudoksissa. Samanlaisia kudosspesifisiä eroja RNA:n ilmenemisessä nähdään hiiren kudoksissa; monet normaalit hiiren kudokset ovat kuitenkin positiivisia telomeraasitoiminnalle. Ilmeinen lisääntynyt telomeraasitoiminnan ilmeneminen ihmissoluissa auttaa selvittämään, miksi hiiren solut spontaanisti kuolevat viljelmissä, joissa ihmisen solut eivät kuole.
 30
 35

Esimerkki 12

Antisense-hTR:n (ihmisen telomeraasin RNA-komponentin) transkriptien ilmentyminen HeLa-soluissa, joka johtaa solukriisiin ja solujen kuolemiseen

5

Telomeraasin toiminnan tutkimiseksi immortaalisisessa solussa, vietiin antisense-hTR:n ilmentymisrakenteet HeLa-soluihin. 200 emäsparin EcoRI-DNA-fragmentti, joka sisälsi 1-193 emäsparia ihmisen telomeraasin RNA-komponentin cDNA-kloonista TRC3, insertoitiin p10-3:n ja pBBS212:n EcoRI-kohtaan plasmidien p10-3-hTR ja pBBBhTR saamiseksi, vastaavasti.

10

Plasmidi p10-3-hTR ilmentää telomeraasin RNA-komponentin antisensen tetrasykliinisäädellyn minimaalisen CMV-promootorin suorittamassa transkription ohjauksessa, joka on sukua viidelle Tet-operaattorille ylöspäin kahdessa eri orientaatiassa, kuten on kuvattu (Gossen et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 5547).

15

Plasmidi-pBBS-hTR ilmentää hTR:n antisenseä MPSV-promootorin ohjauksessa (Lin et al. (1994) Gene 147: 287). Samanaikaisesti kontrolli-ilmentymisvektorit, joista puuttui antisense-hTR:ää koodaava sekvenssi, vietiin elektroporaation avulla HeLa-soluihin.

20

Antisense- tai kontrolliplasmidit sisältävät kloonit valittiin kolmeen eri kokeeseen. Ensin viljelmät 41, jotka ilmensivät antisense-hTR:ää, kasvoivat identtisesti solujen kanssa, joissa oli kontrollivektori. Kuitenkin 23-26 populaation kahdentavassa tasossa (PDL) transfektion jälkeen 33

25

41:stä antisenseä ilmentävistä viljelmistä läpikävi kriisin (taulukko I). Solukriisille näissä viljelmissä oli tunnusomaista merkittävä hidastuminen solujen kasvussa 20:stä

30

26:een PD:hen, jonka jälkeen seurasi solujen kupertuminen ylöspäin ja irtautuminen maljalta viikon kuluessa. 28:ssa tapauksessa 33:sta, joissa solut läpikävivät kriisin, havaittiin harvoja (< 1%) palautuvia soluja kolmessa viikossa sen jälkeen, kun useimmat solut olivat kuolleet. Palautuvat solut voivat edustaa muunnoksia, jotka välttävät inhiboivan vaikutuksen, joka on antisense-hTR-rakenteella. Vastoin antisense-klooneja ei yhdelläkään vektorikontrollisolulin-

35

jalla tapahtunut mitään muutosta kasvussa tai kuolemisessa yli 50 kahdentumisen kuluessa.

Taulukko I

5 Antisense-hTR johtaa lyhyempään keskimääräiseen TRF:ään ja solukriisiin

Suoritettiin kolme itsenäistä koetta, joissa HeTe7-solut (HeLa-solut, jotka ilmentävät tetrasykliinirepsessori-VP16:n kimeerisen proteiinin korkeita tasoja), transfektoitiin elektroporaatiolla joko plasmidilla p10-3-hTR, joka ilmentää antisense-hTR:ää tetrasykliini-VP16:n indusoiman CMV-minimaalisen promoottorin ohjauksessa, tai plasmidilla pBBS-hTR, joka ilmentää antisense-hTR:ää MPSV-promoottorin ohjauksessa (54). [Näissä kokeissa ei havaittu tetrasykliinillä tapahtuvaa säätelyä. Kokeet p10-3-hTR:llä suoritettiin tyypillisesti ilman tetrasykliiniä, koska kontrollikokeet lusiferaasilla tai antisense-hTR:llä tetrasykliini-VP16-indusoidun CMV-minimaalisen promoottorin ohjauksessa osoittivat, että tetrasykliinin läsnäololla tai poissaololla oli vähän vaikutusta lusiferaasin tai antisense-hTR:n ilmentymiseen HeTe7-soluissa. Aikaisemmissa kokeissa, jotka suoritettiin antisense-hTR-rakenteilla HeTe7-soluissa, solut todellakin läpikävivät kriisin 23-26 PDL:ssä tetrasykliinin läsnäollessa.] Kontrollina HeTe7-solut transfektoitiin myös parentaalivektorilla samoissa olosuhteissa. 11-18 stabiilia kloonia eristettiin kustakin transfektiosarjasta. Kaikista isolaateista saaduilla klooneilla oli identtinen morfologia ja kasvuprofiilit 20 PDL:ään saakka, jolloin eniten antisenseä ilmentävien kloonien kasvu hidastui merkittävästi (p10-3-hTR ja pBBS-hTR). PDL 23-26:ssa nämä solut läpikävivät kriisin, jolle oli tunnusomaista suurentuneiden ja kupristuneiden solujen ilmaantuminen. Kuitenkaan kaikki pBBS-hTR:llä transfektoiduista HeTe7-soluista eivät läpikäyneet kriisiä; 8 kloonia, jotka ilmensivät antisense-hTR:ää, jatkoivat kasvamista samalla tavalla kuin kontrolliviljelmit. Kaikista klooneista saadut solut korjattiin PDL 23:ssa ja keskimääräiset TRF-pituudet

määritettiin. P-arvot laskettiin pariutumattomien t-testin avulla. Kustakin sarjasta esitettiin kriisin läpikäyneiden kloonien osuus.

5

	Plasmidi	Solukriisi	Keskim. TRF	P-arvo	Kriisi/kaikki
1	p10-3	ei	ei määr.		0/7
	p10-3-hTR	kyllä	ei määr.		18/18
2	p10-3	ei	3,27 ± 0,10	0,0003	0/12
	p10-3-hTR	kyllä	2,72 ± 0,07		11/11
3	pBBS	ei	3,22 ± 0,11	0,0008	0/13
	pBBS-hTRa	kyllä	2,39 ± 0,10		4/4
	pBBS-hTRb	ei	3,03 ± 0,20	0,3551	0/8
	HeTe7-solut	ei	3,15 ± 0,09		parent.solut

10

15

20

25

30

35

Sen määrittämiseksi, korreloivatko telomeerin pituus ja telomeraasin inhibointi solukriisin kanssa antisenseä ilmentävissä klooneissa, telomeerin pituus ja telomeraasitoiminta tutkittiin useissa kriisiä edeltävissä kontrolli- ja kokeellisissa pesäkkeissä 23 PDL:ssä. Kaikki pesäkkeet, jotka sisälsivät kontrollivektorin, olivat keskimääräiset TRF:n pituudet (3,22 ja 3,27 ke) samat kuin emosolulinjassa (3,15 ke), kun taas klooneilla, jotka sisälsivät antisensevektorirakenteet ja jotka läpikävivät kriisin, olivat keskimääräiset TRF-pituudet välillä 2,39 ja 2,72 ke eli 17-26% lyhyemmät kuin emosolulinjassa (kuva 3). Nämä tiedot ovat yhtäpitäviä telomeerin toistojen kanssa, jotka ovat hävinneet antisenseä sisältävistä klooneista telomeraasitoiminnan inhiboitumisen vuoksi. Tämän testaamiseksi suoraan telomeraasitoiminta tutkittiin 14 kloonissa. Telomeraasitoiminta oli yleensä vähäinen mutta havaittava monissa antisense-klooneissa, vaikka lyhentyneet telomeerit antavat aiheen odottaa, että taso ei ollut riittävä säilyttämään telomeerin pituutta, koska keskimääräinen TRF putosi 3,22:sta 2,39 ke:hen ($P=0,0008$). Kahdeksassa kloonissa, jotka sisälsivät antisense-vektorin (pBBS-hTRb), ja jotka eivät läpikäyneet kriisiä, telomeerin pituus ei ollut merkittävästi muuttunut (3,03 vastaan 3,33, $P=0,355$), ja telomeraasitoiminta oli samanlaista kuin kontrolleissa. Yhteen-

vetona tuloksista voidaan todeta niiden kertovan siitä, että telomeerin häviäminen johtaa kriisiin ja solujen kuolemaan telomeerien saavuttaessa kriittisen pituuden.

- 5 Solukriisin indusoituminen HeLa-soluissa, jotka ilmentävät antisense-telomeraasin RNA-komponenttia, antaa edelleen tukea sille, että telomeraasin inhiboituminen voi muodostaa spesifisen ja tehokkaan terapeuttisen menetelmän ihmisen syöpää vastaan.

10

Esimerkki 13

In situ-kopioiden lisääntyminen ja havaitseminen

Telomeraasin RNA:n havaitseminen in situ

A. Fluoresenssin avulla tapahtuva in situ-hybridisaatio (FISH)

15

Telomeraasipositiivisten solujen identifiointi solujen tai kudosten sekapopulaatiossa voidaan suorittaa telomeraasin RNA-komponenttiin suunnatun leimatun koettimen in situ-hybridisaatiolla. Solunäytekudos kiinnitettiin mikroskoopipilasille ja kyllästettiin riittävästi ja käytettiin in situ-hybridisaatioon. Esimerkki in situ-hybridisaatiosta ihmisen telomeraasin RNA:lle (hTR) käsittää sen, että ensin denaturoidaan nukleiinihapot upottamalla lasit 2-3 minuutiksi 70% deionisoituun formamidi/2X SSC-liuokseen, joka oli esilämmitetty 70-74°C:een. Lasit siirretään sitten jääkylmään 70% EtOH:iin ja sitten 95% EtOH:iin ja sitten 100% EtOH:iin (4 min. kussakin liuoksessa). 100-200 ng (lasia kohti) leimattua hTRNA-koetinta (~500 emäsparin DNA-koetin, joka on leimattu biotiinilla, digoksigeenillä, radioisotopilla, fluoresenssileimalla) kuivataan, suspendoidaan uudelleen 10 µl:aan 100% deionisoitua formamidia, denaturoidaan inkuboimalla 75°C:ssa 8 min., ja välittömästi jäähdytetään jäällä. Lisätään 10 µl 2X hybridisaatiopuskuria (4X SSC; 4X Denhardtin liuos; 20% dekstraanisulfaatti; 100 mM Tris, pH 7,5) 10 µl:aan uudelleensuspendoitua koetinta. Lisätään koetin/hybridisaatioseos (20 µl) kiinnitettyyn näytteeseen, peitetään peittolasilevyllä, ja suljetaan

20

25

30

35

peittolasi kumisementillä tai kynsilakalla. Inkuboidaan näytettä 37°C:ssa 8-48 h. Hybridisaation jälkeen peittolasi poistetaan, näyte pestään kahdesti 2X SSC:llä/50% deionisoidulla formamidilla 37°C:ssa, ja pestään sitten kahdesti 2X SSC:llä 37°C:ssa (5 min. pesua kohti). Sitten näyte tutkitaan mikroskoopilla.

B. Primed in situ-leimaus (PRINS)

Toinen variaatio perinteiseen in situ-hybridisaation havaitsemismenetelmään on Primed in situ-leimaus (PRINS). hTR:n havaitseminen PRINSillä muodostuu niin, että ensin tehdään hTR:n cDNA-synteesi käänteikopioijaentsyymillä (RT), jonka jälkeen PRINS-havaitseminen käyttäen hTR-spesifistä oligonukleotidikoetinta ja ketjun pidennys leimattujen nukleotidien liittämiseksi. hTR:n RT-reaktio voidaan suorittaa erilaisilla menetelmillä. Eräs esimerkki RT-reaktiosta on käyttää GeneAmp Thermostable rTth Reverse Transcriptase RNA PCR-sarjaa (Perkin Elmer). Tässä menetelmässä 10 µl RT-seosta (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 90 mM KCl; 1 mM MnCl₂; 200 µM dNTP:itä; 2,5 U rTth DNA-polymeraasia; 0,4 µM palautusaluketta [esim. R7G: 5'-GGAGGGGCGAACGGGCCAGCAG-3']) viedään kiinnitettyyn näytteeseen, suljetaan päällyslasilla, ankkuroidaan kiinni kynsilakalla, peitetään mineraaliöljyllä ja inkuboidaan 70°C:ssa 30 min. Jälkeenpäin mineraaliöljy poistetaan pesemällä 5 min. ksyleenissä ja sitten 5 min. 100% EtOH:ssa. Päällyslasi otetaan pois, pestään lyhyesti DepC-vedellä, sitten 100% EtOH:lla ja kuivataan ilmassa 5 min. Sitten näytteeseen lisätään 10 µl PRINS-seosta (5% (t/t) glyserolia; 10 mM Tris-HCl, pH 0,3; 100 mM KCl; 0,05% (p/t) Tween 20; 0,75 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 0,4 µM edistävää aluketta [esim. U3b: 5'-GCCTGGGAGGGGTGGTGGCTATTT-TTTG-3']; 200 µM dA, dG, dCTP; 110 µM dTTP; 90 µM leimattua dUTP). Suljetaan päällyslasilla, ankkuroidaan kiinni kynsilakalla, peitetään mineraaliöljyllä ja inkuboidaan 70°C:ssa 30 min. - 3 h. Sitten näyte pestään 3 kertaa pesupuskurissa (4X SSC; 0,05% Tween 20), kuumennetaan 70°C:een 2 minuutiksi. Sitten signaali havaitaan.

C. in situ RT-PCR

hTR:n RT-PCT-havaitseminen muodostuu kohde-RNA:n cDNA-synteesistä käänteiskopioijaentsyymireaktiolla (viruskäänteiskopioijaentsyymi tai lämpöstabiilien DNA-polymeraasien sisäinen RT-toiminta), jonka jälkeen kohde-cDNA:n PCR-kopio-
 5 lisäys tapahtuu in situ. Erilaisia RT-reaktioita voidaan käyttää hTR:n cDNA-synteesissä, kuten kohdassa 11B mainittu RT-työjärjestys. Edelleen voidaan RT-PCR:lle myös käyttää
 10 samoja puskuriolosuhteita ja alukkeita, joita käytettiin PRINS-havaintomenetelmissä, mutta lopullisen 70°C:ssa 30 min - 3 h tapahtuvan inkubaation sijasta näytteen kopiomäärää lisätään lämpösyklisoijassa 30-40 sykliä 94°C/40 sekun-
 15 tia, 55°C/90 sekuntia (katso kohta 11B). PCR:n jälkeen näyte pestään 3 kertaa pesupuskurissa (4X SSC; 0,05% Tween 20) ja kuumennetaan 70°C:een 2 minuutiksi. Sitten signaali havaitaan.

Toinen vaihtoehtoinen menetelmä on lisätä kopiomäärää alkuperäisestä RT-reaktiosta syntyneessä cDNA:ssa käyttämällä
 20 GeneAmp in situ PCR system 1000:a ja GeneAmp in situ PCR core kit:iä (Perkin Elmer).

Eräs vaihe in situ RT-PCR:ssä kiinnitetyllä ja kyllästetyllä
 25 näytteellä voidaan suorittaa käyttäen GeneAmp EZ rTth RNA PCR-ohjetta yhdessä GeneAmp in situ PCR system 1000:a (Perkin Elmer). Tämä menetelmä muodostuu siitä, että vie-
 30 dään 40-50 µl EZ RNA PCR-puskuriseosta (50 mM Bicineä; 115 mM kaliumasettaattia; 8% (p/t) glyserolia, pH 8,2; 300 µM dA, dG, dCTP; 165 µM dTTP; 135 µM leimattua dUTP:tä; 5-10 U rTth DNA-polymeraasia; 2,5 mM Mn(OAc)₂; 0,45-1 µM htRNA-spesifisiä alukkeita, esim. R7 ja U3b) kiinnitettyyn ja
 35 kyllästettyyn näytteeseen mikroskooppilasilla ja suljetaan se silikonitiivisteellä ja nipistetään kiinni, jonka jälkeen seurataan valmistajan ohjeita (GeneAmp in situ PCR system 1000, Perkin Elmer). Näyte pannaan sitten GeneAmp in situ PCR-koneeseen ja kuumennetaan 120 sekuntia 94°C:ssa ja kopiomäärää lisätään sitten 30-40 sykliä 94°C/45 sekun-

tia ja 60°C/45 sekuntia. Kopiomäärän lisäämisen jälkeen näyte pestään ja sitä tarkastellaan visuaalisesti kuten edellä kerrottiin.

5 Taustasignaalien vähentämiseksi, jotka voivat nousta liitettessä fluoresoivia merkkejä suoraan PCR-kopiolisäyksen aikana, voidaan käyttää epäsuoraa havaitsemista, jossa suoritetaan PCR-vahvistus käyttäen ei-merkittyjä dNTP:itä ja sen jälkeen in situ-hybridisaatiota käyttäen merkittyä
10 hybridisaatiokoetinta, joka on spesifinen vahvistetulle tuotteelle. Tässä menetelmässä signaali vahvistetaan millä tahansa RT-PCR-menetelmällä, joka on edellä kuvattu, ilman leimattuja dNTP:itä tai alukkeita, ja kopiomäärältään lisätty tuote havaitaan in situ-hybridisaatiolla.

15

D. Tuotetta laajentavan alukkeen käyttö in situ PCR:ään

Onnistuminen in situ PCR:ssä riippuu kopiolisätyjen tuotteiden vuodon ehkäisemisestä solumatriisin sisällä solusta
20 ulos. Sen vuoksi yleensä pitää paikkansa, että PCR-tuotteet, jotka ovat pienempiä kuin 500 emäsparia, eivät ole toivottuja in situ PCR-menetelmään. Alle 500 emäsparin PCR-tuotteiden vuodon estämiseksi solumatriisista käytetään tavallisesti "bulkkisten" dNTP:iden (esim. biotiinin, fluoresenssimerkin, digoksigeenilla leimatun dUTP:n) liittämistä PCR-tuotteeseen. Toinen tapa ehkäistä pienen tuotteen
25 vuoto in situ PCR:ssä olisi liittää tuotetta laajentava aluke in situ PCR-ohjeeseen.

30

Menetelmä käsittää sen, että käytetään aluketta, joka sisältää 3-4 6 emäsparin toistuvaa sekvenssiä (esim. [5'-TTTCCC-3']₃₋₄) 5'-päässä, jonka jälkeen käytetään sekvenssiä, joka on spesifinen kohteelle (katso kuva 4, aluke 1), yhdessä sopivan palautusalukkeen kanssa (aluke 2), ja kolmatta aluketta, joka koostuu yksinomaan toistuvasta yksiköstä (aluke 3, esim. [5'-TTTCCC-3']₄) lisäämään spesifisen kohteen kopiomäärää in situ PCR:ssä. Alukkeen 3 läsnäolo
35 pidentää PCR-tuotetta alukkeen 3 vuorottaisen sitoutumisen

vuoksi kohde-PCR-tuotteen 3'-päähän. PCR-tuotteiden pidentyminen voidaan indusoida alentamalla alkuperäisten PCR-olosuhteiden lämpökäsittelylämpötilaa.

- 5 Jos kohdesekvenssin lämpökäsittelylämpötila esimerkiksi alukkeessa 1 on 60°C, näytettä vahvistetaan ensin 15-20 sykliä 94°C/45°C ja 60°C/45°C, sitten sitä vahvistetaan 15-20 sykliä 94°C/45°C ja 50°C/45°C. Alennettu lämpökäsittelylämpötila toisessa PCR-vaiheessa suosii pitempien PCR-tuotteiden syntymistä lisäämällä alukkeen 3 vuorottaisen sitoutumisen mahdollisuutta toistuviin sekvensseihin. Saadut pitemmät PCR-tuotteet ovat vähemmän alttiita vuodoille solumatriisin läpi, jolloin saadaan parempi signaalin retentio in situ PCR-analyysissä.

15

Esimerkki 14

Ei-ihmisenkaltaisen kädellisen telomeraasin RNA-komponentti

- 20 Kun halutaan osoittaa, että muun nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin sekvenssit voidaan saada käyttäen alukkeita, jotka perustuvat ihmisen RNA-komponentin sekvenssiin, käytettiin ihmisen sekvenssin PCR-alukkeita vahvistamaan telomeraasin RNA-komponenttia genomien DNA:sta, joka on peräisin oravasaimirista, lajista, jonka uskotaan olevan sellainen ei-ihmisenkaltaisten kädellisten laji, joka on evoluutiossa kaikkein erilaistunein ihmisiin verrattuna.

- 25 Oravasaimirin genomien DNA vahvistettiin alukkeilla F3b (5'-TCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3') ja H3+20 (5'-CTCAAGGTCATCGC-CAAGGT-3') kuvatulla tavalla. Todettiin yksittäinen DNA, ja se myöhemmin kloonattiin vektoriin pBluescriptII SK (Stratagene, San Diego, CA). Saadut kloonit sekvensoitiin osittain käyttäen PCR-menetelmää käänteisyleisalukkeella (5'-AACAGCTATGACCATG-3'), aluketta 210-3' (5'-TCACGTCTCCTGCAATTG-3'), tai aluketta H3+20. Oravasaimirin telomeraasin RNA-komponentin saadut osittaiset sekvenssit olivat:

30 5'-GGCGCGCTTCCCTGAGCTGTGGACGTGCACCAGGACTCGGCTCACACATGCAGTTCCGCTTTCCTGCTGGTGGGGGACGCCGATCGTGGCCATCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGCTTGTGAATCCCTAAATCTGACTGA-3'

ja

5'-TTTTGAGAGATCATTAAGTATTTAATGAATATTTAGCTAGAAGATCTAAACGAAAATT
CAAGTTGTGTTTCCTTTAGTGGTCATCGGTTTATGCCGAAGGTTACAAATTTCTTCTTTGAA
AAATTAGACCATTGGCGATGATCCTTGA-3'

5

Kun ne asetettiin vierekkäin ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenisekvenssin kanssa, saatiin seuraava yhteensopivuus käyttäen ihmisen telomeraasin RNA-komponentin numeerointisopimusta (yhdy sviivat ovat mukaanliitetttyjä välejä sekvenssien yhteensopivuuden optimoimiseksi):

10

	ihminen		1900
	apina	CGCGCGGCGCGATTCCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTC GGCGCGCTTCCCTGAGCTGT-GGACGTGCACC-AGGACTCGGCTC	
15	ihminen		1950
	apina	ACACATGCAGTTCGCTTTCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGCGCA ACACATGCAGTTCGCTTTCTGCTGGT-GGGGGGACGCCGATCGTGGCCA	
20	ihminen		2000
	apina	TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTGACT TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAATCCCTAAATCTGACT	
25	ihminen		2050
	apina	GACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTCCAA GA	

ja

30	ihminen		2300
	apina	TTTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGATCTA TTTTGAGAGATCATTAAGTATTTAATGAATATTTAGCTAGAAGATCTA	
35	ihminen		2350
	apina	AATGAACATTGGAAATTGTGTTTCCTTTAATGGTCATCGGTTTATGCCAGA AACGAAAATT-CAAGTTGTGTTTCCTTTAGTGGTCATCGGTTTATGCCGAA	
40	ihminen		2400
	apina	GGTTAGAAGTTTCTTTTTTGA AAAAATTAGACC-TTGGCGATGA-CCTTGAGC GGTTACAAATTTCTTCTTTGA AAAAATTAGACCATTGGCGATGATCCTTGA	

Edelläolevat esimerkit kuvaavat keksinnön erilaisia puolia ja sitä, kuinka keksinnön nukleinihapot valmistettiin.

Esimerkkien ei ole tarkoitettu antavan tyhjentävää kuvausta seuraavien patenttivaatimusten määrittämän keksinnön monista eri toteutusmuodoista.

PATENTTIVAATIMUKSET

1. Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti olennaisesti puhtaassa muodossa.

5

2. Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti, joks sisältää polynukleotidin, joka on olennaisesti identtinen seuraavan sekvenssin kanssa:

10

GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
 UAACCCUAAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
 UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
 UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
 GCCCCUCCCGGGACCUGCGGCGGGUCGUGCCCAGCCCCCGAACCCCGCC
 UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
 GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
 UCACCGUUUCAGGCCGCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
 GCGAUUCCUGAGCUAUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGC
 AGUUCGCUUCCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
 CCCUCGCCGCGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGC
 CAGUGUGCU.

15

20

3. Patenttivaatimuksen 1 RNA-komponentti, jolla on sekvenssi:

25

GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
 UAACCCUAAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
 UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
 UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
 GCCCCUCCCGGGACCUGCGGCGGGUCGUGCCCAGCCCCCGAACCCCGCC
 UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
 GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
 UCACCGUUUCAGGCCGCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
 GCGAUUCCUGAGCUAUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGC
 AGUUCGCUUCCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
 CCCUCGCCGCGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGC
 CAGUGUGCU.

30

35

4. Olennaisesti puhtaassa muodossa oleva oligonukleotidi, joka sisältää sekvenssin, joka on identtinen tai täysin komplementaarinen patenttivaatimuksen 3 RNA-komponentin vierekkäiselle sekvenssille, joka on pituudeltaan 10-500 nukleotidia.

5. Patenttivaatimuksen 4 oligonukleotidi, joka on oligode-
oksiribonukleotidi.

5 6. Patenttivaatimuksen 4 oligonukleotidi, joka on oligori-
bonukleotidi.

10 7. Patenttivaatimuksen 5 oligonukleotidi, joka sidottuna
ihmisen telomeraasin RNA-komponenttiin inhiboi tai salpaa
telomeraasitoimintaa.

8. Patenttivaatimuksen 5 oligonukleotidi, joka on plasmidi
pGRN33.

15 9. Patenttivaatimuksen 5 oligonukleotidi, joka on lambda-
kloonin 28-1.

20 10. Yhdistelmäilmentymisplasmidi, joka sisältää patentti-
vaatimuksen 5 oligonukleotidin ja sisältää edelleen pro-
moottorin, joka toimii ajaen oligonukleotidin kanssa sek-
venssiltään identtisen tai komplementaarisen RNA:n trans-
kriptiota.

25 11. Patenttivaatimuksen 10 mukainen yhdistelmäilmentymis-
plasmidi, jossa plasmidi toimii tuottaen oligonukleotidia
eukaryoottisissa isäntäsoluissa.

30 12. Patenttivaatimuksen 11 mukainen yhdistelmäilmentymis-
plasmidi, jossa plasmidi toimii tuottaen oligonukleotidia
prokaryoottisissa isäntäsoluissa.

35 13. Patenttivaatimuksen 11 mukainen yhdistelmäilmentymis-
plasmidi, jossa plasmidi sisältää ihmisen geenin ihmisen
telomeraasin RNA-komponenttia varten.

14. Patenttivaatimuksen 13 yhdistelmäilmentymisplasmidi,
jossa geeni sisältää nukleotidisekvenssin:

5'-GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGT
 ACTCAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAAC TG
 ACAAGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGAT
 AATGTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTTGACATATAA ACTCAAAGC
 ATTTAGCATCTACTCTATGTAAGGTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAA
 AAACAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAAACTTTACAACCTGGCAGATGC
 TATGAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAG
 AGGGAGATATTTTACTTTTCTTTCAGATCGAGGACCGACAGCGACA ACTC
 CACGGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAAACTTTTAAGATCATCCTGT
 CATTTATATGTAAAACTGCACTATACTGGCCATTATAAAAATTCGCGGCC
 GGGTGC GG TGGCTCATACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCG
 GGTGGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTG
 AAACCCCCGTCTCTACTAAAAACAAAAAACTAGCTGGGCGTGGTGCGAG
 GCGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGA
 ACCCGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCAT
 CCAGCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTAC
 AATTTATGGTGGATTACTCCCTCTTTTACCTCATCAAGACACAGCACT

ACTTTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTTCTTTCCTAATAAAAGG
 GAGATTCAAGTCCTTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGC
 CATCCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGG
 CAGGGTAGGAACTCGGACGCATCCCCTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTG
 TAGTCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTCACAAAGTTCTCCAAAAAATGT
 GATGATCAAACTAGGAATTAGTGTTCTGTGTCTTAGGCCCTAAAACTTT
 CCTGTGAATTCCATTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGC
 AGAGGATAGAAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAA
 AGAAGGTGCGAAGTAAAGACGCAAGCCTTTCCCGGACGTGCGGAAGGGC
 AACGTCCTTCCCTCATGGCCGGAATGGAACCTTTAATTTCCCGTTCCCCC
 AACCAGCCCCGCGAGAGAGTGACTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCT
 TGGCCAATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCC
 GGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGC
 CATTTTTTGTCTAACCCCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC
 TCCCCGCGCGCTGTTTTCTCGCTGACTTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCG
 GCCTGCCGCTTCCACCGTTTATTCTAGAGCAAACAAAAAATGTCAGCTG
 CTGGCCCGTTGCGCCCTCCCGGACCTGCGGCGGGTCTGCTGCCAGCCCC
 CGAACCCCGCCTGGAGGCGCGGTGCGCCGGGGCTTCTCCGGAGGCACCC
 ACTGCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTACGCCGCGGGTCTCTCGGGGGC
 GAGGGCGAGGTTACCGTTTCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTC
 CCGCGCGCGGCGGATTCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGG
 CTCACACATGCAGTTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGC
 GCATCCGTCAACCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTG
 ACTGACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTC
 CAAAGTCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCGGGGTTGCCTGGAGCCGT
 TCCTGCGTGGGTTCTCCCGTCTTCCGCTTTTTGTTGCCTTTTATGGTTGT
 ATTACAACCTTAGTTTCTGCTCTGCAGATTTTGTGAGGTTTTGCTTCTC
 CCAAGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCA
 TTTTTTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGAT
 CTAAATGAACATTGGAAATTGTGTTCTTTAATGGTCATCGGTTTATGCC
 AGAGGTTAGAAGTTTCTTTTTTGA AAAATTAGACCTTGGCGATGACCTTG
 AGCAGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT-3'.

15. Eukaryoottinen isäntäsolu transformoituna patenttivaatimuksen 10 yhdistelmäilmentymisplasmidin kanssa, joka koodaa RNA-molekyyliä, joka voi olla liittynyt yhteen ni-
säkkään telomeraasin proteiinikomponenttien kanssa tuotta-
maan telomeraasitoimintaa, joka pystyy lisäämään nukleoti-
dien toistuvien yksiköiden sekvenssejä telomeereihin.

16. Patenttivaatimuksen 14 isäntäsolu, jossa toistuva yksikkö on 5'-TTAAGGG-3'.

17. Patenttivaatimuksen 14 isäntäsolu, jossa toistuva yksikkö ei ole 5'-TTAAGGG-3'.

18. Patenttivaatimuksen 15 isäntäsolu, jossa RNA-molekyyli on:

GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC

UAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
GCCCCUCCCCGGGACCUGCGGGCGGUCGUGCCCAGCCCCCGAACCCCGCC
UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
UCACCGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
GCGAUUCCUGAGCUAUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGC
AGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
CCCUCGCCGGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCAAACCUGACUGACUGGGC
CAGUGUGCU.

19. Patenttivaatimuksen 15 isäntäsolu, jossa yhdistelmäilmentymisvektori sisältää nukleotidisekvenssin, joka määrittellään seuraavasti:

5'-GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGT
ACTCAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAAGT
ACAAGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGAT
AATGTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTGACATATAACTCAAAGC
ATTTAGCATCTACTCTATGTAAGGTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAA
AAACAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAACCACTTTTACAACCTGGCAGATGC
TATGAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAG
AGGGAGATATTTTACTTTTCTTTCAGATCGAGGACCGACAGCGACAACTC
CACGGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAACTTTTAAGATCATCCTGT
CATTTATATGTAAACTGCACTATACTGGCCATTATAAAATTCGCGGCC
GGGTGCGGTGGCTCATACCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGGCCGAAGCG
GGTGGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTG

AAACCCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAACTAGCTGGGCGTGGTGGCAG
 GCGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGA
 ACCCGGGAGCAGAGGTTGTCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCAT
 CCAGCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTAC
 AATTTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTACCTCATCAAGACACAGCACT
 ACTTTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTCTTTCTTAATAAAAGG
 5 GAGATTCAGTCCTTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGC
 CATCCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGG
 CAGGGTAGGAACTCGGACGCATCCCCTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTG
 TAGTCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTCACAAAGTTCTCAAAAAATGT
 GATGATCAAACTAGGAATTAGTGTTCTGTGTCTTAGGCCCTAAATCTT
 CCTGTGAATTCCATTTTAAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGC
 AGAGGATAGAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAA
 10 AGAAGGTCGGAAGTAAAGACGCAAAGCCTTCCCGGACGTGCGGAAGGGC
 AACGTCCTTCTCATGGCCGGAATGGAACCTTTAATTTCCCGTTCCTCCC
 AACCAGCCCGCCCGAGAGAGTGAATCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCT
 TGGCCAATCCGTGCGGTGCGGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCC
 GGCAGCGCACCGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGC
 CATTTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC
 TCCCCGCGCGCTGTTTTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCG
 15 GCCTGCCGCCTTCCACCGTTCATTCTAGAGCAAACAAAAATGTCAGCTG
 CTGGCCCGTTGCGCCCTCCCGGGACCTGCGGCGGGTCTGCTGCCAGCCCC
 CGAACCCCGCCTGGAGGCCGCGGTGCGCCGGGGCTTCTCCGGAGGCACCC
 ACTGCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTACGCCGCGGGTCTCTCGGGGGC
 GAGGGCGAGGTTACCGTTTCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTC
 CCGCGCGCGGCGCGATTCCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGG
 CTCACACATGCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGC
 20 GCATCCGTACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCAACCTG
 ACTGACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTC
 CAAAGTCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCGGGGTTGCCTGGAGCCGT
 TCCTGCGTGGGTCTCCCGTCTTCCGCTTTTGTGCTTTTATGGTTGT
 ATTACAACCTTAGTTCCTGCTCTGCAGATTTTGTGAGGTTTTTGCTTCTC
 CCAAGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCA
 TTTTTTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGAT
 CTAAATGAACATTGGAAATTGTGTTCCCTTTAATGGTCATCGGTTTATGCC
 25 AGAGGTAGAAAGTTCTTTTTTGAATAATTAGACCTTGGCGATGACCTTG
 AGCAGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT.

20. Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti, joka sisältää
 sekvenssin, joka on olennaisesti identtinen sekvenssille,
 joka sisältää ainakin 20 peräkkäistä nukleotidia patentti-
 vaatimuksen 3 RNA-komponentissa.

21. Menetelmä yhdistelmätelomeraasientsyymin tuottamiseksi,
 joka menetelmä käsittää sen, että transformoidaan eukary-
 oottinen isäntäsolu, joka ilmentää telomeraasin proteiini-
 komponentteja, yhdistelmäilmentymisvektorin kanssa, joka
 koodaa patenttivaatimuksen 19 RNA-komponenttia, ja viljel-

lään näitä transformoituja isäntäsoluja mainitun vektorin kanssa olosuhteissa, joissa proteiinikomponentit ja RNA-komponentit ilmentyvät ja yhdistyvät muodostaen aktiivisen telomeraasimolekyylin, joka pystyy lisäämään sekvenssejä kromosomaalisen DNA:n telomeereihin.

22. Koostumus, joka sisältää olennaisesti puhdasta, patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukaista ihmisen telomeraasin RNA-komponenttia ja olennaisesti puhdasta ihmisen telomeraasin proteiinia.

23. Patenttivaatimuksen 22 mukainen koostumus, jossa ihmisen telomeraasin RNA-komponentti on puhdistettu isäntäsolusta, joka ilmentää yhdistelmäpolynukleotidia, jonka sekvenssi on komplementaarinen ihmisen telomeraasin RNA-komponenttisekvenssin kanssa.

24. Patenttivaatimuksen 22 mukainen koostumus, joka edelleen sisältää mahdollisen telomeraasia moduloivan aineen.

25. Menetelmä mutanttien lisäksi telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidien identifioimiseksi, jossa menetelmässä:

syntetisoidaan mutantti telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidi, joka on olennaisesti identtinen telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidisekvenssin kanssa ja eroaa ainakin yhdessä nukleotidissa;

tutkitaan mutantin telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin sitoutumista olennaisesti puhtaaseen lisäksi telomeraasin proteiiniin.

26. Menetelmä mahdollisten telomeraasia moduloivien aineiden identifioimiseksi, jossa menetelmässä:

suoritetaan heterodimerisaatio tai telomeraasitoimintakoe, jossa on: (1) polynukleotidi, joka muodostuu polynukleoti-

dista, joka on olennaisesti identtinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentin kanssa ja pystyy sitoutumaan ihmisen telomeraasin proteiiniin, (2) olennaisesti puhdas ihmisen telomeraasin proteiini, ja (3) aine;

5

määritetään, inhiboiko aine ihmisen telomeraasin RNA:n ja ihmisen telomeraasin proteiinin heterodimerisaatiota tai telomeraasitoimintaa;

10

identifioidaan aineet, jotka inhiboivat mainittua heterodimerisaatiota tai telomeraasitoimintaa mahdollisiksi telomeraasia moduloiviksi aineiksi, jotka inhiboivat telomeraasitoimintaa.

15

27. Menetelmä telomeraasitoiminnan inhiboimiseksi ihmisen soluissa, jolloin siirretään soluihin eksogeeninen polynukleotidi, joka sisältää transkription yksikön, jossa on ainakin 25 peräkkäistä nukleotidia sisältävä polynukleotidisekvenssi, joka on olennaisesti identtinen tai olennaisesti komplementaarinen ihmisen telomeraasin RNA-sekvenssin kanssa, toimivasti sitoutuneena heterologiseen transkription säätelysekvenssiin, joka edistää toimivasti sitoutuneiden polynukleotidien transkriptiota mainituissa soluissa.

20

25
30
35

28. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa solut ovat neoplastisia soluja.

29. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa eksogeeninen polynukleotidi sisältää sekvenssin:

30

5'-GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
UAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU

UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
GCCCCUCCCGGGACCUGCGGGCGGGUCGUGCCCAGCCCCGAACCCGCC
UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
UCACCGUUUCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
GCGAUUCCUGAGCUAUGGGACGUGCACCAGGACUCGGCUCACACAUGC
AGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
CCCUCGCCGCGAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGC
CAGUGUGCU-3'

tai sen komplementin.

- 5 30. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa heterologinen transkription säätelysekvenssi käsittää promoottorin, joka on rakenteellisesti aktiivinen ihmisen soluissa.

- 10 31. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa eksogeeninen polynukleotidi on adenovirusgenomi, jossa on ihmisen telomeraasin RNA-komponentin transkription yksikkö.

32. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa transkription yksikkö tuottaa antisense-RNA:n, joka on olennaisesti komplementaarinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentille.

- 15 33. Patenttivaatimuksen 27 menetelmä, jossa eksogeenisessä polynukleotidissa on sekvenssi:

5'-GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGT
 ACTCAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAACTG
 ACAAGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGAT
 AATGTGGGATGCTAAGAGAAATGGTGGTAGTGTTGACATATAACTCAAAGC
 ATTTAGCATCTACTCTATGTAAGGTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAA
 AAACAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAAACTTTACAACCTGGCAGATGC
 TATGAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAG
 AGGGAGATATTTTACTTTTCTTTCAGATCGAGGACCGACAGCGCAACTC
 CACGGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAAACTTTTAAGATCATCCTGT
 CATTATATGTAAAACTGCACTATACTGGCCATTATAAAAATTTCGCGGCC
 GGGTGCGGTGGCTCATACTGTAAATCCCGAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCG
 GGTGGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCGAGCCTGGGCAACATGGTG
 AAACCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAACTAGCTGGGCGTGGTGGCAG
 GCGCCTGTAAATCCCGAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGA
 ACCCGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCAT
 CCAGCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTAC
 AATTTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTACCTCATCAAGACACAGCACT
 ACTTTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTTCTTTCCTAATAAAAGG
 GAGATTCAAGTCCCTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGC
 CATCCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGG
 CAGGGTAGGAACTCGGACGCATCCCACTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTG
 TAGTCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTACAAAAGTTCTCAAAAAATGT
 GATGATCAAACTAGGAATTAGTGTTCTGTGTCTTAGGCCCTAAATCTT
 CCTGTGAATTCATTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGC
 AGAGGATAGAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAA
 AGAAGGTCGGAAGTAAAGACGCAAAGCCTTTCCCGGACGTGCGGAAGGGC

AACGTCCTTCCTCATGGCCGGAATGGAACCTTTAATTTCCCGTTCCCCC
 AACCAGCCCCGCGGAGAGAGTGAAGTCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCT
 TGGCCAATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCC
 5 GGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGC
 CATTTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGC
 TCCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCG
 GCCTGCCGCCTTCCACCGTTCATTCTAGAGCAAAACAAAAATGTCAGCTG
 CTGGCCCCGTTCGCCCCCTCCCGGGACCTGCGGCGGGTTCGCTGCCCAGCCCC
 CGAACCCCGCCTGGAGGCCGCGGTGCGCCGGGGCTTCTCCGGAGGCACCC
 ACTGCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTCAGCCGCGGGTCTCTCGGGGGC
 10 GAGGGCGAGGTTACCGTTTCAGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTC
 CCGCGCGCGGCGGATTCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGG
 CTCACACATGCAGTTCGCTTCTCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGC
 GCATCCGTACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTG
 ACTGACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTC
 CAAAGTCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCGGGGTTCCTGGAGCCGT
 TCCTGCGTGGGTTCTCCCGTCTTCCGCTTTTTGTTGCCTTTTATGGTTGT
 ATTACAACCTAGTTCCTGCTCTGCAGATTTTGTGAGGTTTTTGTCTCTC
 15 CCAAGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCA
 TTTTTTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGAT
 CTAAATGAACATTGGAAATTGTGTTCTTCTTAATGGTCATCGGTTTATGCC
 AGAGGTTAGAAGTTCTTTTTTGA AAAATTAGACCTTGGCGATGACCTTG
 AGCAGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT-3'

20 tai sen komplementin.

34. Polynukleotidi ihmisen sairauden geeniterapiaan, joka
 sisältää transkription yksikön, joka sisältää ainakin 25
 peräkkäisen nukleotidin pituisen polynukleotidisekvenssin,
 25 joka on olennaisesti identtinen tai olennaisesti komplemen-
 taarinen ihmisen telomeraasin RNA-sekvenssin kanssa, toimi-
 vasti sitoutuneena heterologiseen transkription säätelysek-
 venssiin, joka edistää toimivasti sitoutuneiden polynukle-
 otidien transkriptiota mainituissa soluissa.

30 35. Ribotsyymi, joka lohkaisee ihmisen telomeraasin RNA-
 komponentin tai ihmisen telomeerin toistuvat sekvenssit.

36. Menetelmä telomeraasiin liittyvän tilan läsnäolon ha-
 35 vaitsemiseksi potilaassa, joka menetelmä käsittää seuraavat
 vaiheet:

eristetään solunäyte potilaasta;

havaitaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentin RNA solunäytteessä diagnostisen arvon määrittämiseksi;

5 verrataan diagnostista arvoa ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ilmentymisen standardiarvon kanssa standardisoiduissa normaalisoluihin, jotka ovat samaa tyyppiä kuin solunäyte;

10 diagnosoidaan telomeraasiin liittyvän tilan läsnäolon indikoima diagnostinen arvo, joka on riittävästi suurempi kuin standardiarvo, jolloin se indikoi patologisen tilan läsnäoloa.

15 37. Menetelmä neoplastisen tilan läsnäolon havaitsemiseksi potilaassa, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

eristetään potilaasta solunäyte;

20 havaitaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentti solunäytteessä diagnostisen arvon määrittämiseksi;

25 verrataan diagnostista arvoa ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ilmentymisen standardiarvon kanssa ei-neoplastisissa soluissa, jotka ovat samaa tyyppiä kuin solunäyte;

30 diagnosoidaan telomeraasiin liittyvän tilan läsnäolon indikoima diagnostinen arvo, joka on riittävästi suurempi kuin standardiarvo, jolloin se indikoi neoplastisen tilan läsnäoloa.

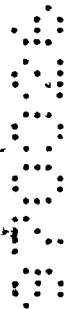
35 38. Menetelmä nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin läsnäolon määrittämiseksi solussa tai solunäytteessä, jossa menetelmässä suoritetaan vahvistus tai hybridisointi telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin, telomeraasin RNA-komponenttialukkeen, tai telomeraasin RNA-komponentille tai telomeraasin RNA-komponentin alukkeelle komplementaarisen sekvenssin kanssa.

39. Koostumus, joka sisältää nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin PCR-alueparin.

5 40. Patenttivaatimuksen 39 koostumus, jossa alukkeet koostuvat sekvensseistä, jotka vastaavat tai ovat komplementaarisia ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenisekvensseille.

10 41. Koostumus, joka sisältää nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin hybridisaatiokoettimen.

15 42. Patenttivaatimuksen 41 koostumus, jossa koetin sisältää ainakin 25 peräkkäistä nukleotidia, jotka vastaavat tai ovat komplementaarisia ihmisen telomeraasin RNA-komponentin geenisekvensseille.



PATENTTIVAATIMUKSET

1. Nisäkkään telomeraasin RNA-komponentti olennaisesti puhtaassa muodossa.

5

2. Patenttivaatimuksen 1 RNA-komponentti, jolla on sekvenssi:

10

```
GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
UAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGCUCCCCGCGCGC
UGUUUUUCUCGCUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
GCCCCUCCCCGGGACCUGCGGCGGGUCGCUGCCCAGCCCCCGAACCCCGCC
UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
UCACCGUUUCAGGCCGCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
GCGAUUCCCUGAGCUAUGGGACGUGCAGCCAGGACUCGGCUCACACAUGC
AGUUCGCUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
CCCUCGCCGCGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCCAAACCUGACUGACUGGGC
CAGUGUGCU.
```

15

20

3. Olennaisesti puhtaassa muodossa oleva oligonukleotidi, joka sisältää sekvenssin, joka on identtinen tai täsmälleen komplementaarinen patenttivaatimuksen 2 RNA komponentin pituudeltaan 10-500 vierekkäistä nukleotidia sisältävälle sekvenssille.

25

30

35

4. Patenttivaatimuksen 3 oligonukleotidi, joka nisäkkään telomeraasin RNA-komponenttiin sidottuna inhiboi tai salpaa telomeraasivaikutuksen.

40

45

50

5. Yhdistelmäilmentymisplasmidi, joka sisältää patenttivaa-
timuksen 3 oligonukleotidin ja edelleen sisältää promootto-
rin, joka toimii ajaen oligonukleotidille sekvenssiltään
identtisen tai komplementaarisen RNA:n transkriptiota.

55

60

6. Patenttivaatimuksen 5 yhdistelmäilmentymisplasmidi,
jossa oligonukleotidi käsittää nukleotidisekvenssin:

5'-GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGT
ACTCAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAAC TG
ACAAGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGAT
AATGTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTGACATATAACTCAAAGC
ATTTAGCATCTACTCTATGTAAGGTA CTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAA
AAACAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAA ACTTTACAACCTGGCAGATGC
TATGAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAG
AGGGAGATATTTTACTTTTCTTT CAGATCGAGGACCGACAGCGACA ACTC

CACGGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAGAACTTTTAAAGATCATCTCGTTCATTTATATGTATAAAAGTCAACTGACATACTGGCCATTATAAAATTCGCGGCCGGGTGCGGTGGCTCATACCTGTAATCCAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCGGGTGGATCACTTGAGCCCTGGCGTTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAACAAAAAACTAGCTGGGCGTGGTGGCAGGCGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGAACCCGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCATCCAGCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAATCGTTACAAATTTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTTACCTCATCAAGACACAGCACTACTTTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTCTTTCCTAATAAAAGGAGATTTCAGTCCTTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGCATCCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGGCAGGGTAGGAACTCGGACGCATCCCCTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTGTAGTCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTCACAAAGTTCTCAAAAAATGTGATGATCAAAACTAGGAATTAGTGTTCTGTGTCTTAGGCCCTAAAATCTTCTGTGAATTCCATTTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGCAGGATAGAAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAAAGAAGGTCGGAAGTAAAGACGCAAAGCCTTCCCGGACGTGCGGAAGGGCAACGTCCTTCTCATGGCCGGAAATGGAACTTTAATTTCCCGTTCCCCAACACGCCCGCCGAGAGAGTCACTCTACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTGGCCAATCCGTGCGGTGCGGCGCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCGGCAGCGCACCGGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCGTGGGAGGGTGGTGCCATTTTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCGTGCTTTTGTCTCCCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCTCGGCCTGCCGCTTCCACCGTTCAATCTAGAGCAAACAAAAAATGTCAGCTGCTGGCCCGTTTCGCCCCCTCCCGGGACCTGCGGCGGGTTCGCTGCCAGCCCCGAACCCCGCCTGGAGGCCGCGGTGCGCCGGGGCTTCTCCGGAGGCACCCACTGCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTACGCCGCGGGTCTCTCGGGGGGAGGGGCGAGGTTACCGTTTTCAGGCCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTCCGCGCGCGCGGCGGATTCCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGCTCACACATGCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGCGCATCCGTACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTGACTGACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTGCAAAGTCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCGGGGTTGCCTGGAGCCGTTCCTGCGTGGGTTCTCCCGTCTTCCGCTTTTTTGTGCTTTTATGGTTGTATTACAACTTAGTTCCCTGCTCTGCAGATTTTGTGTTAGGTTTTTGTCTCTCCAAGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCATTTTTTTTTTGAGAGATCATTTAAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGATCTAAATGAACATTGGAAATTGTGTTCTTTAATGGTCATCGGTTTATGCCAGAGGTTAGAAGTTTCTTTTTTTGAAAAATTAGACCTTGGCGATGACCTTGGAGCAGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT-3'.

7. Eukaryoottinen solu transformoituna patenttivaatimuksen 4 yhdistelmäilmentymisplasmidin kanssa, joka koodaa RNA-molekyyliä, joka voi olla yhdistynyt nisäkkään telomeraasin proteiinikomponenttien kanssa tuottamaan telomeraasivaikutuksen, joka pystyy lisäämään nukleotidien toistuvien yksiköiden sekvenssejä telomeereihin.

8. Menetelmä yhdistelmätelomeraasientsyymin tuottamiseksi, jossa menetelmässä transformoidaan eukaryoottinen isäntäsolu, joka ilmentää telomeraasin proteiinikomponentteja, yhdistelmäilmentymisvektorin kanssa, joka koodaa patenttivaatimuksen 7 RNA-komponenttia, ja viljellään isäntäsoluja, jotka on transformoitu mainitun vektorin kanssa olosuhteissa, joissa proteiinikomponentit ja RNA-komponentti ilmentyvät ja yhdistyvät muodostaen aktiivisen telomeraasimolekyylin, joka pystyy lisäämään sekvenssejä kromosomaalisen DNA:n telomeereihin.

9. Menetelmä mahdollisten telomeraasia moduloivien aineiden identifioimiseksi, jossa:

suoritetaan heterodimerisaatio tai telomeraasivaikutuskoe, joka käsittää: (1) polynukleotidin, joka muodostuu polynukleotidista, joka on olennaisesti identtinen ihmisen telomeraasin RNA-komponentille ja pystyy sitoutumaan ihmisen telomeraasin proteiiniin, (2) olennaisesti puhtaan ihmisen telomeraasin proteiinin, ja (3) aineen;

määritetään, inhiboiko aine ihmisen telomeraasin RNA:n ja ihmisen telomeraasin proteiinin heterodimerisaatiota tai telomeraasivaikutusta;

identifioidaan aineet, jotka inhiboivat heterodimerisaatiota tai telomeraasivaikutusta mahdollisiksi telomeraasia moduloiviksi aineiksi, jotka inhiboivat telomeraasivaikutusta.

10. Menetelmä telomeraasivaikutuksen inhiboimiseksi ihmisen soluissa, jossa menetelmässä siirretään soluihin eksogeeninen polynukleotidi, joka sisältää transkription yksikön, jossa on ainakin 25 peräkkäistä nukleotidia sisältävä polynukleotidisekvenssi, joka on olennaisesti identtinen tai olennaisesti komplementaarinen ihmisen telomeraasin RNA-sekvenssille, toimivasti sitoutuneena heterologiseen transkription säätelysekvenssiin, joka edistää toimivasti sitoutuneiden polynukleotidien transkriptiota mainituissa soluissa.

11. Menetelmä neoplastisen tilan läsnäolon havaitsemiseksi potilaassa, joka menetelmä käsittää seuraavat vaiheet:

eristetään potilaasta solunäyte;

havaitaan ihmisen telomeraasin RNA-komponentti solunäytteessä diagnostisen arvon määrittämiseksi;

verrataan diagnostista arvoa ihmisen telomeraasin RNA-komponentin ilmentymisen standardiarvon kanssa ei-neoplastisissa soluissa, jotka ovat samaa tyyppiä kuin solunäyte;

diagnosoidaan telomeraasiin liittyvän tilan läsnäolon indikoima diagnostinen arvo, joka on riittävästi suurempi kuin standardiarvo, jolloin se indikoi neoplastisen tilan läsnäoloa.

12. Menetelmä nisäkkään telomeraasin RNA-komponentin läsnäolon määrittämiseksi solussa tai solunäytteessä, jossa menetelmässä suoritetaan kopiomäärän lisäys tai hybridointi telomeraasin RNA-komponentin polynukleotidin, telomeraasin RNA-komponenttialukkeen, tai telomeraasin RNA-komponenttile tai telomeraasin RNA-komponentin alukkeelle komplementaarisen sekvenssin kanssa.

人 10

1/4

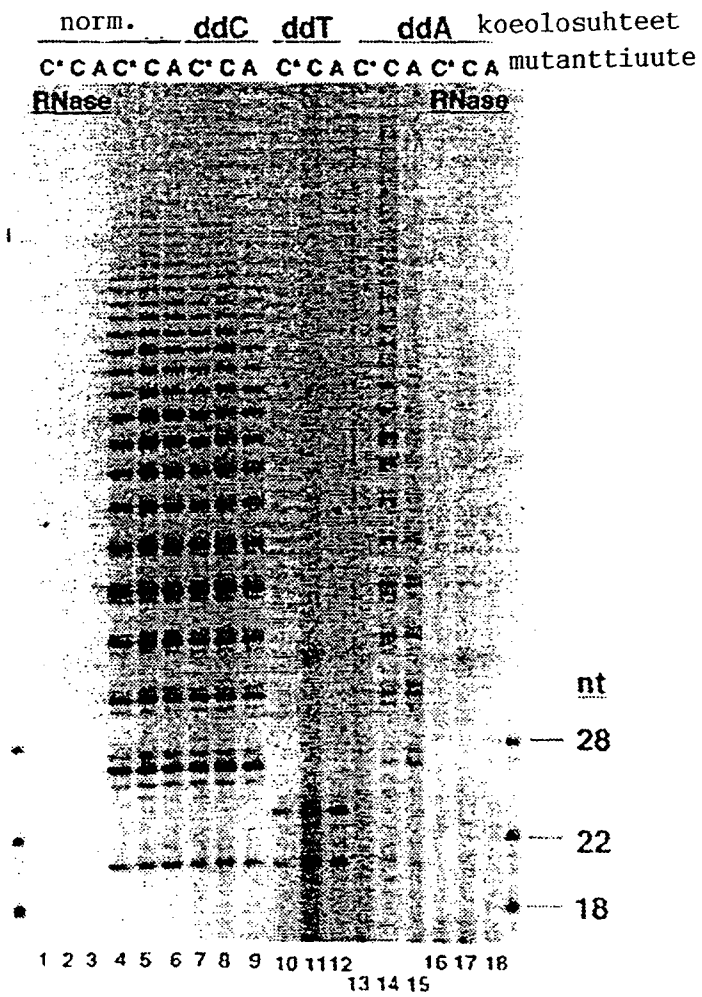


FIG. 1.

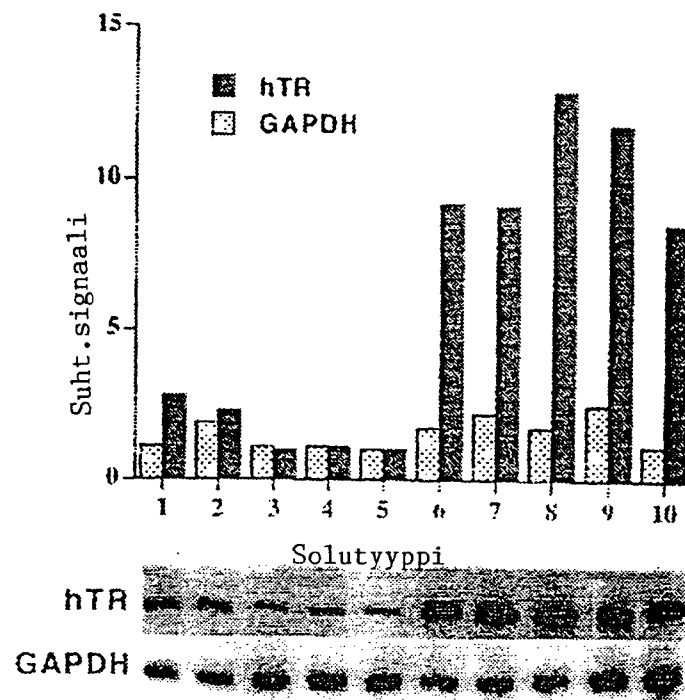


FIG. 2.

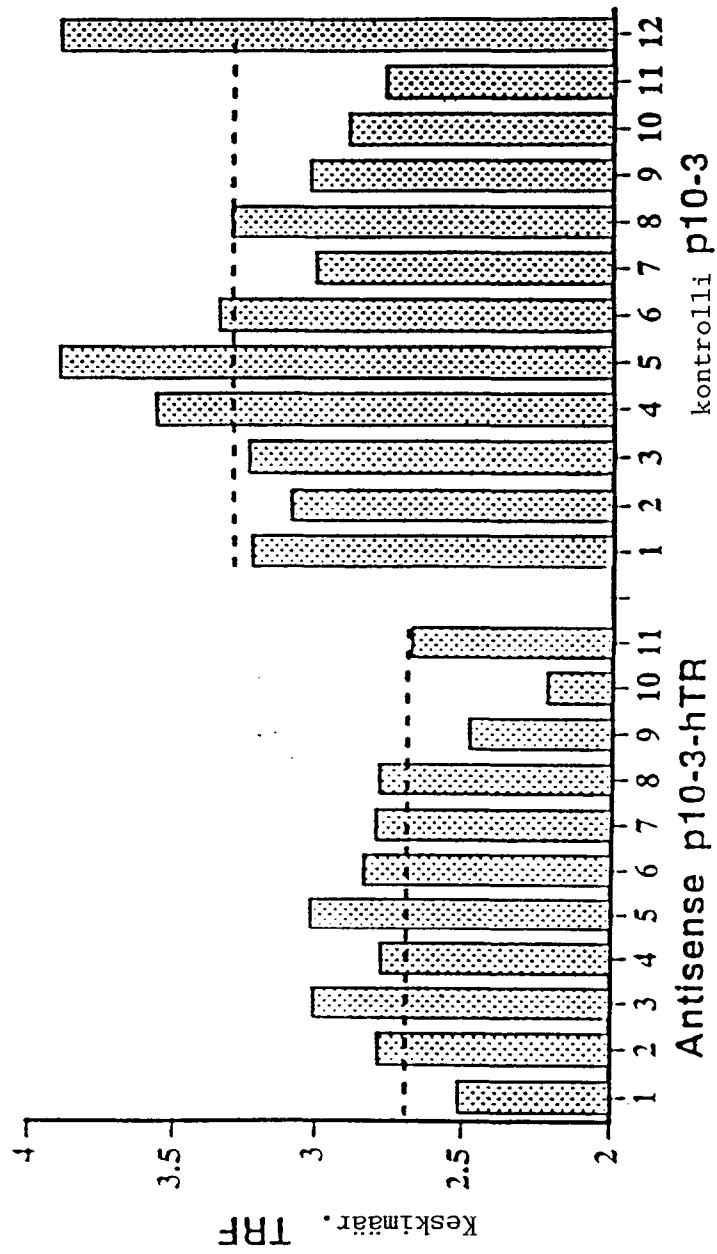


FIGURE 3

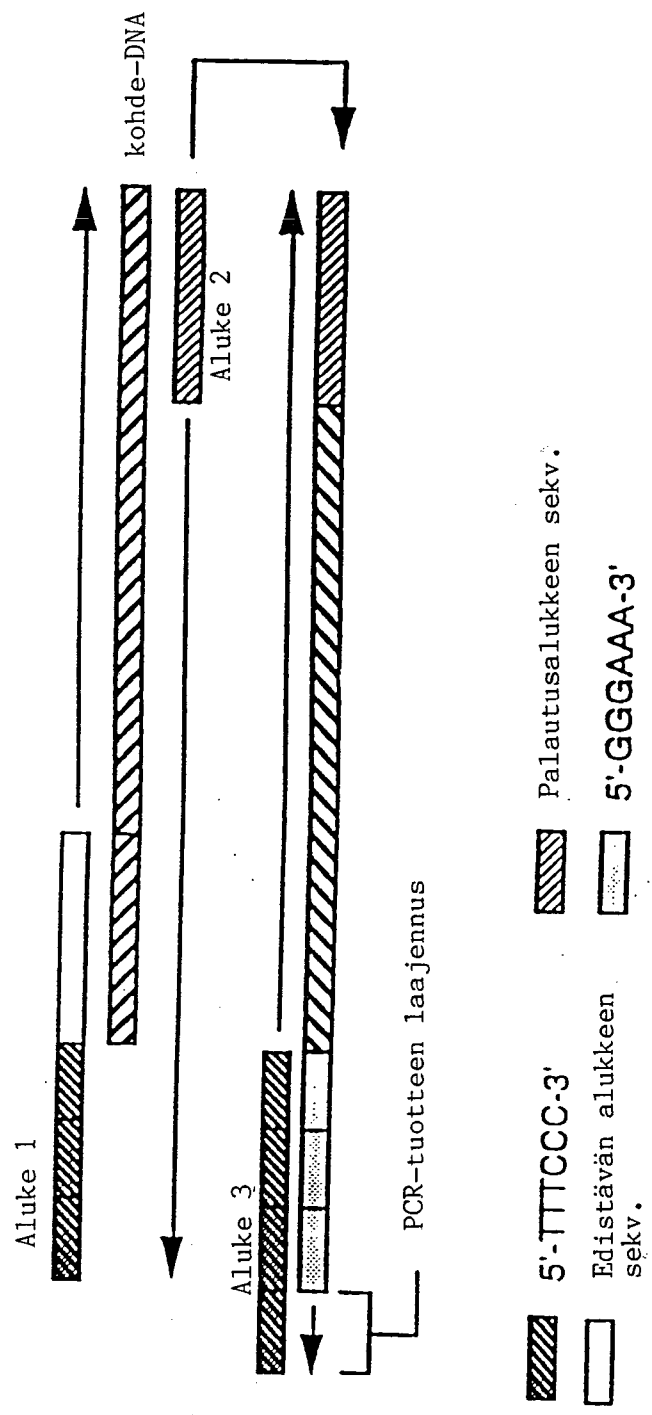


FIGURE 4