

РЕПУБЛИКА БЪЛГАРИЯ

(19) BG

(11) 63573 B1



ОПИСАНИЕ КЪМ ПАТЕНТ

ЗА

ИЗОБРЕТЕНИЕ

7(51) C 07 H 21/00
C 07 H 21/04
C 07 H 21/02
C 12 N 5/10
C 12 N 9/12
C 12 N 15/11
C 12 N 15/52
C 12 N 15/63

ПАТЕНТНО ВЕДОМСТВО

(21) Регистров № 101103
(22) Заявено на 04.01.97
(24) Начало на действие
на патента от: 06.07.95

Приоритетни данни

(31) 272102	(32) 07.07.94	(33) US
330123	27.10.94	US
472802	07.06.95	US
482115	07.06.95	US

(41) Публикувана заявка в
бюлетин № 10 на 31.10.97
(45) Отпечатано на 31.05.2002
(46) Публикувано в бюлетин № 5
на 31.05.2002
(56) Информационни източници:

(62) Разделена заявка от рег. №

(73) Патентоприетел(и):
GERON CORPORATION
MENLO PARK, CA (US)

(72) Изобретател(и):
Bryant Villeponteau
Junli Feng
San Carlos, CA
Walter Funk
Union City, CA
William H. Andrews
Richmond, CA (US)

(74) Представител по индустриална
собственост:
Румяна Стефанова Слабова, 1124 София,
ул. "Леонардо да Винчи" 3

(86) № и дата на PCT заявка:
PCT/US95/08530, 06.07.95

(87) № и дата на PCT публикация:
WO96/01835, 25.01.96

(54) ТЕЛОМЕРАЗА НА БОЗАЙНИЦИ

(57) Изобретението се отнася до нуклеинови киселини, които включват РНК компонента на теломераза на бозайници. Те могат да се използват като фармацевтични, терапевтични и диагностични средства.

12 претенции, 4 фигури

BG 63573 B1

(54) ТЕЛОМЕРАЗА НА БОЗАЙНИЦИ.

ОБЛАСТ НА ТЕХНИКАТА

Настоящото изобретение се отнася до човешка теломераза, рибонуклеопротеинов ензим, който участва в синтеза на човешката теломерна ДНК. Изобретението предлага методи и препарати, отнасящи се до областите на молекулярната биология, химия, фармакология и на лечебната и диагностична технология.

ПРЕДШЕСТВАЩО СЪСТОЯНИЕ НА ТЕХНИКАТА

ДНК в краищата или теломерите на еукариотните хромозоми обикновено се състои от тандемно повторени прости последователности. Теломеразата представлява рибонуклеопротеинов ензим, който синтезира едната верига на теломерната ДНК, използвайки като матрица последователност, която се съдържа в РНК-компонента на ензима. Виж Blackburn, 1992, *Annu. Rev. Biochem.* 61:113-129, включен тук за справка.

Досега в научната литература не е съобщавано за РНК-компонента на човешката теломераза, макар и да е известно, че човешката теломераза синтезира теломерни повторени единици с последователността 5'-TTAGGG-3'. Виж Morion, 1989, *Cell* **59**:521-529 и Morion, 1991, *Nature* **353**:454-456, включени тук за справка. Тази информация не беше достатъчна, за да спомогне за изолирането и идентифицирането на останалата част от нуклеотидната последователност на РНК-компонента на човешката теломераза. РНК-компонентът на теломеразните ензими на *Saccharomyces cerevisiae*, на определени видове *Tetrahymena*, както и на тези от други цилиати, такива като *Euplotes* и *Glaucoma*, беше секвениран и докладван в научната литература. Виж Singer and Gottschling, 21 Oct. 1994, *Science* **266**:404-409; Lingner *et al.*, 1994, *Genes & Development* **8**:1984-1988; Greider and Blackburn, 1989, *Nature* **337**:331-337; Romero and Blackburn, 1991, *Cell* **67**:343-353; и Shippen-Lentz and Blackburn, 1990, *Science* **247**:546-552, всеки от които е включен тук за справка. Теломеразните ензими на тези цилиати синтезират теломерни повторени единици, различни от тези при хората.

Налице е голяма необходимост от повече информация за човешката теломераза. На учените отдавна е известно, че теломеразите имат важна биологична роля в съхраняването на хромозомната структура и функция, независимо от привидно простата природа на повторените единици на теломерната ДНК. От по-скоро учените спекулират, че загубата на теломерна ДНК може да действа като отключваща клетъчното състаряване и стареене и че регулацията на теломеразата може да има важни биологични последици. Виж Harley, 1991, *Mutation Research* **256**:271-282, включен тук за справка.

Описани са също така методи за установяване на теломеразна активност, както и за идентифициране на съединения, които регулират или повлияват теломеразната активност, заедно с методи за терапия и диагностика на клетъчното стареене и имортализация чрез контролиране на теломерната дължина и на теломеразната активност. Виж РСТ-патентните публикации с номера 95/13381, публикувана на 18 май 1995; 95/13382, публикувана на 18 май

1995, и 93/23572, публикувана на 25 ноември 1993; и патентните заявки на САЩ със сериини номера: неопределен (изобретатели С. Harley, N. Kim, S. Weinrich), подадена на 7 юни 1995; 08/315 214, подадена на 28 септември 1994; 08/315 216, подадена на 28 септември 1994; 08/288 501, подадена на 10 август 1994; 08/014 838, подадена на 8 февруари 1993; 08/153 051 и 08/151 477, всяка подадена на 12 ноември 1993; 08/060 952, подадена на 13 май 1993; 08/038 766, подадена на 24 март 1994; и 07/882 438, подадена на 13 май 1992, всички включени тук за справка.

Биха могли да се реализират значителни подобрения на, и нови възможности за, опосредстваните от теломераза лечения, теломеразни тестове и методи за скрининг, ако бяха достъпни в чиста и изолируема форма нуклеинови киселини, включващи РНК-компонента и/или кодиращи белтъчните компоненти на теломеразата и ако бяха известни нуклеотидните последователности на подобни нуклеинови киселини. Настоящото изобретение е отговаря на тези и други потребности и предоставя такива подобрения и възможности.

ТЕХНИЧЕСКА СЪЩНОСТ НА ИЗОБРЕТЕНИЕТО

В един първи аспект настоящото изобретение предоставя РНК-компонента на, както и гена за РНК-компонента на човешката теломераза в съществено чиста форма, както и нуклеинови киселини, включващи цялата или най-малкото полезната част от нуклеотидната последователност на РНК-компонента на човешката теломераза. Настоящото изобретение предоставя също така нуклеинови киселини на РНК-компонентите от други видове, които нуклеинови киселини показват значителна хомология с РНК-компонента на човешката теломераза, включващи, но не ограничени до РНК-компонентите на бозайници, такива като примати. Другите полезни нуклеинови киселини на изобретението включват нуклеинови киселини с последователности, комплементарни на РНК-компонента; нуклеинови киселини с последователности близки, но различни от нуклеотидните последователности на РНК-компонента и които взаимодействат с РНК-компонента, с гена за РНК-компонента или с

белтъчните компоненти на човешката теломераза по подходящ начин; и нуклеинови киселини, които не показват значителна хомология с последователността, или комплементарност, на РНК-компонента или на гена за РНК-компонента, но въздействат върху РНК-компонента по желан и подходящ начин. Нуклеиновите киселини на изобретението, както е описано по-пълно по-долу, включват молекули ДНК и РНК, както и техни модифицирани аналози и обслужват различни ползотворни цели.

Един тип полезна нуклеинова киселина на изобретението представлява антисенс-олигонуклеотид, олигонуклеотид, формиращ тройна спирала или друг олигонуклеотид или олигонуклеотид-миметик (напр., антисенс-ПНК - пептидна нуклеинова киселина/полиамидна нуклеинова киселина), който може да се използва *in vivo* или *in vitro* за инхибиране активността на човешката теломераза. Такива олигонуклеотиди могат да блокират теломеразната активност по редица начини, включително чрез преустановяване транскрипцията на теломеразния ген (например, чрез образуване на тройна спирала) или чрез свързване с РНК-компонента на теломеразата по начин, който пречи на "сглобяването" на функционална рибонуклеопротеинова теломераза или който възпрепятства РНК-компонента, вече аранжиран в теломеразния ензимен комплекс, да служи като матрица за синтезата на теломерна ДНК. Тези олигонуклеотиди на изобретението, обикновено и в зависимост от начина на действие, обхващат специфични последователности от около 10 до около 25 до 200 или повече нуклеотиди, които са или идентични или комплементарни на специфична последователност от нуклеотиди в РНК-компонента на теломеразата или в гена за РНК-компонента на теломеразата.

В едно приложение изобретението предоставя антисенс-полинуклеотиди, комплементарни на полинуклеотидните последователности на теломеразния РНК-компонент, обикновено комплементарни на полинуклеотидни последователности, които са съществено идентични на природната последователност на гена за теломеразния РНК-компонент в бозайници. Такива антисенс-полинуклеотиди се използват за инхибиране транскрипцията и/или

стабилността и/или функционалността на видовете теломеразни РНК-компоненти, като по този начин предизвикват редукция в количеството на съответната теломеразна активност в клетка (напр. неопластична клетка на пациент). Такива антисенс-полинуклеотиди могат да функционират като агенти, модулиращи теломеразата чрез инхибиране формирането на функционален (каталитично активен и високо специфичен) холоензим, който е необходим за коректна репликация на теломерите и за репарация в клетката. Антисенс-полинуклеотидите могат да се комбинират с други антинеопластични терапевтични модалности, такива като йонизираща радиация и химиотерапия (напр., с агенти, увреждащи ДНК, такива като блеомицин, цис-платина, азотен мустард, доксирубицин, нуклеотидни аналози и др. подобни). Антисенс-полинуклеотидите могат да предизвикат клетъчна смърт в чувствителни клетки (напр. реплициращи се клетки, изискващи теломеразна активност за репарация или репликация на ДНК). Антисенс-полинуклеотидите са съществено идентични с поне 25 последователни нуклеотиди от последователността, комплементарна на РНК-последователността от теломераза на бозайници, представена тук. Антисенс-полинуклеотидите обикновено представляват едноверижна ДНК, едноверижна РНК, полинуклеотиди с метилфосфонатен гръбнак, полинуклеотиди с фосфоротиолатен гръбнак, полинуклеотиди със смесен гръбнак, полиамидни нуклеинови киселини и др. подобни антисенс-структури, известни в областта на техниката. В един аспект на изобретението се прилага антисенс-полинуклеотид за инхибиране транскрипцията и/или активността на теломеразния РНК-компонент и на теломеразната активност в клетка, такава като реплицираща се човешка клетка.

В едно приложение изобретението предоставя полинуклеотид, който се сдвоява погрешно с матрицата, който полинуклеотид има последователност, съществено идентична с теломеразния РНК компонент на бозайници и включва теломерна повторена матрична последователност, имаща поне една погрешно сдвояваща се база по отношение на, но иначе комплементарна на, човешката теломеразна повторена последователност 5'-TTAGGG-3'. Полинуклеотид,

сдвояващ се погрешно с матрицата, обикновено включва погрешно сдвояване на единичен нуклеотид в природната матрична последователност, но може да включва погрешно сдвояване на два нуклеотида в матричната последователност, или като съседни погрешно сдвояващи се нуклеотиди, или като погрешно сдвояващи се нуклеотиди, разделени от един или повече правилно сдвояващи се (комплементарни) нуклеотиди. Сдвояващите се погрешно с матрицата полинуклеотиди на изобретението като правило са в състояние да проявят теломеразна активност в комбинация с полипептидния компонент на човешката теломераза, като по този начин водят до погрешно включване на база в избрани (погрешно сдвояващи се) нуклеотидни позиции на човешката теломеразна повторена последователност след репликация, репарация и/или прибавяне на теломерен повтор. Така се получават теломери, които разчитат на непрекъснатото присъствие на теломеразния сенс-РНК компонент за трайна репликация и запазване на теломерната дължина.

Друг тип полезна нуклеинова киселина на изобретението представлява рибозим, способен да разкъсва специфично РНК-компонента на човешката теломераза, инактивирайки ензима. Друг един тип полезна нуклеинова киселина на изобретението представлява сонда или праймер, който се свързва специфично с РНК-компонента на човешката теломераза и може да се използва, напр., за детекция на наличието на теломераза в проба. Накрая, полезните нуклеинови киселини на изобретението включват рекомбинантни експресионни плазмиди за получаване на нуклеиновите киселини на изобретението. Един такъв особено полезен тип плазмид представлява плазмид, който се използва за генна терапия при хората. Полезните плазмиди на изобретението за генна терапия при хората се явяват в разнообразни типове, включващи не само тези, които кодират антисенс-олигонуклеотиди или рибозими, но също и тези, които направляват експресията на РНК-компонента на човешката теломераза или на делетирана или по друг начин изменена (мутирала) версия на РНК-компонента на човешката (или на други видове с последователности на РНК-компонентите, съществено хомоложни на човешкия РНК-компонент) теломераза или на гена за същата.

В едно приложение чрез ковалентно свързване на допълнителен химичен заместител или повреме или след синтезата на полинуклеотида се получава производно на полинуклеотида, което съдържа участък, комплементарен на теломеразния РНК-компонент при бозайници, който (участък) е достатъчен, за да хибридизира при физиологични условия. По този начин се образува производно на полинуклеотида, което е в състояние да хибридизира специфично със споменатия теломеразен РНК-компонент. Производното на полинуклеотида може да се локализира в ендогенния теломеразен ензим, притежаващ споменатия РНК-компонент, при което споменатото производно предизвиква изменение или химична модификация на РНК-компонента и/или белтъчния компонент на теломеразата и по този начин модифицира, обикновено като я редуцира, ензимната активност на теломеразата.

В едно приложение изобретението предоставя полинуклеотиди, които са подходящи за диагностика на заболявания, свързани с наднормено натрупване на теломеразен РНК-компонент и/или на теломеразен РНК-компонент с увредена (аберантна) структура. За диагностика на болестни състояния (напр., неоплазия или пренеоплазия) могат да се използват полинуклеотидни сонди, включващи последователности, които са съществено идентични или съществено комплементарни на нуклеотидна последователност на теломеразен РНК-компонент при бозайници. Диагностиката се извършва чрез детекция на натрупването на теломеразен РНК-компонент и/или на теломеразен РНК-компонент със структурни изменения (напр., скъсяване, вариции в последователността, делеции или инсерции и др. подобни), и/или на преустройства или амплификация на гена за теломеразния РНК-компонент в клетки, взети от пациент, или чрез детекция на патогномичен алел на теломеразния РНК-компонент при бозайници (напр., чрез RFLP или чрез алел-специфичен PCR-анализ). Детекцията често се извършва чрез хибридизация *in situ* като се използва белязан (напр., ^{32}P , ^{35}S , ^{14}C , ^3H , флуоресцентен, биотинилиран, белязан с дигоксигенин) антисенс-полинуклеотид,

комплементарен на теломеразен РНК-компонент от бозайници, макар че могат да се използват пренос на РНК (Northern blotting), капков пренос (dot blotting) или хибридизация в разтвор на тотална или поли A⁺ РНК, изолирана от клетъчна проба, както и амплификация чрез PCR (полимеразна верижна реакция) или LCR (лигазна верижна реакция) като се използват праймери, специфични за теломеразния РНК-компонент. Клетки, които съдържат изменено количество (обикновено значително повишено) теломеразен РНК-компонент в сравнение с не-неопластични клетки от същия клетъчен(и) тип(ове), се идентифицират като кандидати за "заболели" клетки, такива като пренеопластични или действително неопластични клетки и могат да се идентифицират като клетки с метастатичен потенциал. По подобен начин детекцията на патогномонични преустройства или амплификация на генния локус за теломеразния РНК-компонент или на близко разположени локуси в клетъчна проба идентифицира наличието на паталогично състояние или предразположение за развитие на болестно състояние (напр., рак, генетично заболяване). Полинуклеотидните сонди за теломеразния РНК-компонент се използват също така за съдебна идентификация на индивиди, като например за тестиране на бащинство, за идентифициране на криминално заподозрени или на неразпознати трупове.

В един втори аспект изобретението предоставя методи за лечение на състояние, свързано с теломеразната активност в клетка или в група от клетки чрез създаване на контакт на клетката(ите) с терапевтично ефективно количество от агент, който променя теломеразната активност в тази клетка. Такива агенти включват нуклеинови киселини, кодиращи теломеразния РНК-компонент, олигонуклеотиди, образуващи тройна спирала, антисенс-олигонуклеотиди, рибозими, както и плазмиди и други вектори за генна терапия (напр., аденовирусни вектори, адено-асоциирани вирусни вектори и т.н.), предназначени за генна терапия при хората чрез експресия на теломеразен РНК-компонент, на антисенс-РНК на теломеразния РНК-компонент или на теломеразен РНК-компонент с погрешно сдвояващи се бази, както е описано по-горе. В друг близък аспект изобретението предоставя фармацевтични препарати,

включващи тези терапевтични агенти заедно с фармацевтично приемлив носител или сол, които могат да формират комплекс за липофекция, липозома или на имунолипозома за целенасочено доставяне на терапевтичния агент. Изобретението предоставя също така комбинирани препарати на подобни опосредствани от теломеразата терапевтични агенти с други фармацевтични агенти, такива като антинеопластични агенти и други цитотоксични или цитостатични агенти; противогъбни агенти (напр., за лечение на пациенти, болни от СПИН); нуклеотиди, нуклеозиди и техни аналози; и други фармацевтични агенти, подходящи за лечение на болестни състояния, такива като неоплазия, хиперплазия, инфекция с HIV (човешки имунодефицитен вирус)/СПИН и на свързани с тях патологии, както и на други заболявания, които се характеризират с абнормален теломерен метаболизъм. Методите могат да включват използването на производни на полинуклеотидите, които са в състояние да хибридизират специфично с теломеразния РНК-компонент в теломеразата от бозайници, при което производното на полинуклеотида се доставя в клетки от бозайници, имащи теломеразна активност и инхибира теломеразната активност чрез локализиране в теломеразния РНК-компонент и инактивиране или инхибиране на теломеразната активност.

Изобретението предоставя също така терапевтични агенти, които инхибират неоплазията или апоптозата чрез модулиране на теломеразната функция като се инхибира или увеличава формирането на теломеразен РНК-компонент; такива агенти могат да се използват като фармацевтични препарати. Такива фармацевтични препарати ще се използват за лечение на различни човешки и ветеринарни заболявания, такива като: неоплазия, хиперплазия, невродегенеративни заболявания, стареене, СПИН, гъбни инфекции и др. подобни. В едно приложение агентът се състои от вектор за гена терапия, който е в състояние да транскрибира последователност на теломеразен РНК-компонент или негов комплемент или като алтернатива, ензимно неактивен теломеразен РНК-компонент, който може конкурентно да инхибира образуването на функционален теломеразен холоензим.

В един трети аспект изобретението предоставя диагностични методи за определяне нивото, количеството или наличието на РНК-компонента на човешката теломераза, на теломераза или на теломеразна активност в клетка, в клетъчна популация или в тъканна проба, както и в екстракт на всяка от по-горе изброените. В един близък аспект насотящото изобретение обезпечава полезни реактиви за такива методи (включително праймерите и сондите, отбелязани по-горе), които е възможно да се пакетират под формата на комплект (кит) заедно с указания за използване на комплекта при практикуване на диагностичния метод.

Настоящото изобретение предоставя метод за диагностика на заболяване (напр., неоплазия) в пациент-човек, при което диагностичният тест (напр., полинуклеотидна хибридизация *in situ* на фиксирани клетки посредством белязана сонда за теломеразен РНК-компонент, която се свързва специфично с теломеразния РНК-компонент или с генни последователности) се използва, за да се определи дали в биологична проба от пациента-човек е налице предетерминирана патогномонична концентрация на теломеразен РНК-компонент; ако тестът показва наличието на теломеразен РНК-компонент извън нормата (напр., над предетерминираната патогномонична концентрация) се поставя диагноза за болестно състояние на пациента или за предразположение към заболяване.

В едно приложение полинуклеотидите на изобретението се използват за диагностика на патологични състояния или на генетични заболявания, които включват неоплазия, хиперплазия, преждевременно или абнормално клетъчно стареене или други болестни състояния, свързани с функцията на теломеразата. По-специално това са състояния и заболявания, които включват изменения в структурата или натрупване на теломеразен РНК-компонент, на негова гена последователност или (на последователности), които са скачени с алела на патогномоничния теломеразен РНК-компонент, което може да се детектира чрез RFLP и/или чрез алел-специфичен PCR или чрез други подходящи методи за детекция. Методът обикновено е за диагностика на заболяване (напр., неоплазия) в пациент-човек, при което диагностичният тест (напр., определяне на

количеството и/или на структурата на теломеразния РНК-компонент) се използва, за да се определи дали в клетките от биологичната проба на пациента-човек е налице предетерминирана патогномонична концентрация или структура на теломеразния РНК-компонент; ако тестът показва наличие на патогномонично количество теломеразен РНК-компонент извън нормата (напр., над предетерминиранията патогномонична концентрация) се поставя диагноза за болестно състояние на пациента или за предразположение към заболяване.

В един четвърти аспект настоящото изобретение предоставя препарати на рекомбинантна теломераза и методи за получаване на такива препарати. Така настоящото изобретение обезпечава рекомбинантна човешка теломераза, която включва белтъчните компоненти на човешката теломераза, както и белтъчните компоненти на теломераза от видове бозайници с РНК-компонент, съществено хомоложен на РНК-компонента на човешката теломераза, които белтъчни компоненти са в асоциация с рекомбинантен РНК-компонент на изобретението. Подобни молекули рекомбинантни РНК-компоненти на изобретението включват тези, които се различават от природните молекули РНК-компоненти по една или повече базови субституции, делеции, терминални добавки и/или инсерции, както и молекули РНК-компоненти, идентични с природната молекула РНК-компонент, които се произвеждат в рекомбинантните клетки-гостоприемници. Методът за получаване на такива рекомбинантни теломеразни молекули включва трансформиране на еукариотна клетка-гостоприемник, която експресира белтъчните компоненти на теломеразата, с рекомбинантен експресионен вектор, който кодира молекула РНК-компонент на изобретението и култивиране на споменатите клетки-гостоприемници, трансформирани със споменатия вектор при условия, такива че теломеразният белтъчен компонент и теломеразният РНК-компонент се експресират и се свързват като образуват активна теломеразна молекула, способна да прибавя последователности (без да е необходимо това да е същата последователност, която се добавя от нативната теломераза) към теломерите на хромозомната ДНК.

В един пети аспект изобретението предоставя методи за пречистване на белтъчните компоненти на човешката теломераза, както и на белтъчните компоненти на теломераза от видове бозайници с РНК-компонент, съществено хомоложен на РНК-компонента на човешката теломераза. Настоящото изобретение обезпечава също така методи за изолиране и идентифициране на нуклеинови киселини, кодиращи такива белтъчни компоненти. В сродни аспекти настоящото изобретение обезпечава пречистена човешка теломераза и пречистена теломераза от видове бозайници с РНК-компонент, съществено хомоложен на РНК-компонента на човешката теломераза, както и пречистени нуклеинови киселини, които кодират един или повече компоненти на такива теломеразни препарати. Настоящото изобретение предоставя също така фармацевтични препарати, включващи като активна съставка белтъчните компоненти на теломеразата или нуклеинова киселина, която кодира или взаимодейства с нуклеинова киселина, която кодира белтъчен компонент на теломеразата.

В един шести аспект изобретението предоставя методи за идентифициране на агенти, които модулират (т.е., инхибират, усилват или променят специфичността) активността на човешката теломераза. Такива модулиращи теломеразата агенти често са малки молекули (напр., по-малки от около 3000 Далтона) и могат да се използват за модифициране на теломеразната активност *in vitro* и *in vivo*, често за постигане на терапевтичен ефект и се използват като лабораторни реактиви и/или лекарствени препарати.

В едно приложение изобретението предоставя методи за идентифициране в банка или библиотека от агенти на кандидат-агенти, които модулират теломеразната активност чрез модулиране на нековалентното свързване на РНК-компонента на теломераза от бозайници с теломеразен белтъчен компонент. Теломеразният РНК-компонент може да се получи от рекомбинантна матрица в клетка-гостоприемник или да се синтезира химично, ако това е желателно. Обикновено белтъчен компонент на теломераза от бозайници, такъв, който може да се пречисти от клетки, експресиращи

теломераза и от който може да се отстрани природният теломеразен РНК-компонент (напр., чрез третиране с РНКаза), се привежда в контакт с теломеразен РНК-компонент на бозайници при подходящи условия на свързване във водна среда, което позволява нековалентно свързване между РНК и белтъчните компоненти в отсъствие на добавен агент (т.е., в контролна реакция на свързване). Степента на нековалентно взаимодействие между теломеразния РНК-компонент и белтъчния компонент в присъствието на един или повече агенти, избрани от библиотеката или банката от агенти, се сравнява със степента на нековалентно свързване в контролната реакция на свързването, включваща теломеразния РНК и белтъчен компонент и несъдържаща агента(тите); агентите, които предизвикват статистически достоверно покачване в степента на нековалентно свързване между теломеразния РНК и белтъчен компонент по този начин се определят като кандидат-агенти за модулиране на теломеразата. Относителната степен на нековалентно свързване може да се определи по който и да е подходящ метод, включително чрез определяне афинитета на специфично свързване, напр., чрез тест на конкузентно свързване, чрез определяне на теломеразната каталитична активност върху матрица от теломерен повтор или чрез друг подходящ тест на функционално нековалентно взаимодействие между РНК и белтъчния компонент на теломераза от бозайници, такъв като изместване в гел (gel shift) или EMSA (тест за изместване на електрофоретичната подвижност).

В едно приложение на теста за нековалентно свързване с цел определяне на кандидат-агенти за модулиране на теломеразата, единият или и двата компонента на теломеразата, т.е., теломеразният РНК-компонент или белтъчният компонент, се бележат с подходящ белег, който може да се детектира, и поотделно се определя нековалентното свързване в присъствието или отсъствието на агент, избран от библиотеката или банката от агенти. Определянето на нековалентното свързване включва измерване на степента, до която белязан теломеразен компонент (РНК-компонент или белтъчен компонент) се свързва със своя родствен теломеразен компонент (съответно, белтъчен

компонент или РНК-компонент), независимо от това дали споменатият родствен теломеразен компонент е отделно белязан или е небелязан. Измерването се извършва чрез "улавяне" (capturing) (напр., имобилизиране) на свързаните комплекси, включващи споменатия белязан теломеразен компонент и споменатия родствен теломеразен компонент и разделяне (напр., чрез измиване) на несвързания белязан теломеразен компонент от споменатия свързан комплекс, при което се отделя фракция на свързания комплекс, който свързан комплекс се детектира в отделената фракция чрез определяне наличието на белега, който може да се детектира. Агентите, които предизвикват статистически достоверна редукция или усилване на нековалентното свързване на теломеразния РНК и белтъчен компонент по този начин се идентифицират като кандидат-агенти за модулиране на теломеразата. Агенти, които редуцират нековалентното свързване са кандидати за инхибиране на теломеразата (антагонисти), докато агенти, които усилват нековалентното свързване на теломеразните компоненти са кандидати за агонисти на теломеразата.

В едно приложение кандидат-агентите за модулиране на теломеразата се идентифицират по тяхната способност да предизвикват статистически достоверно повишаване или понижаване на ензимната активност на теломеразата от бозайници, включваща пречистен теломеразен белтъчен компонент и теломеразен РНК-компонент.

В едно приложение кандидат-агентите за модулиране на теломеразата се идентифицират по тяхната способност да предизвикват, в метаболитно активна клетка от бозайник, статистически достоверна редукция или усилване на транскрипцията на полинуклеотидна последователност-свидетел (напр., бета-галактозидазен ген, луциферазен ген, HPRT-ген), която е оперативно свързана с транскрипционна регулаторна последователност на ген за РНК-компонент на теломеразата от бозайници, като се предпочита това да е ген за РНК-компонент на човешка теломеразата. Като вариант, ендогенен ген за теломеразен РНК-компонент в клетка от бозайник се прицелва с хомоложна прицелна конструкция, за да се разположи полинуклеотидната последователност-свидетел в оперативна

връзка с транскрипционната регулаторна последователност пред (напр., промотор) ендогенния ген за теломеразния РНК-компонент в хромозомния локус на ендогенния ген. В един алтернативен вариант екзогенен полинуклеотид, включващ полинуклеотид-свидетел, се свързва оперативно с транскрипционна регулаторна област на ген за теломеразен РНК-компонент от бозайници (напр., промотор и разположени пред гена (upstream) места за свързване на транскрипционни фактори); екзогенният полинуклеотид се пренася в клетка от бозайник, при което той (полинуклеотидът) може да се интегрира нехомоложно в хромозомен локус и/или да се поддържа или реплицира като епизомен полинуклеотид. Агентите, които предизвикват статистически достоверна модулация на транскрипцията на полинуклеотида-свидетел в клетки, третирани с агента, по този начин се идентифицират като кандидат-агенти за модулиране на теломеразата от бозайници.

Препаратите за идентифициране на кандидат-агенти за модулиране на теломеразата обикновено включват: (1) белтъчен компонент на теломеразата от бозайници, такъв който може да се пречисти от клетки на бозайници, експресиращи теломеразата, за предпочитане от клетки на примати (напр., хора) и който обикновено се отделя от асоциирания РНК-компонент, ако има такъв, чрез третиране с РНКза или чрез друго третиране, съвместимо с отстраняването на РНК-компонента при запазване капацитета на белтъка да реконституира теломеразната активност в присъствието на родствения теломеразен РНК-компонент при подходящи условия на свързване, (2) РНК-компонент на теломеразата от бозайници, за предпочитане човешки РНК-компонент, който се получава чрез транскрипция на рекомбинантен полинуклеотид в клетка, и (3) условия за свързване във водна среда (напр., физиологични условия, условия на теломеразен тест) и по желание (4) полинуклеотид-свидетел, включващ поне една последователност на повтор от теломеразата на бозайници, която (последователност) може да се реплицира или удължава и обикновено е комплементарна на последователността от участъка матрица на споменатия РНК-компонент, комплементарен на теломерния повтор, и по-желание (5)

нуклеотиди, подходящи за репликация и/или удължаване на споменатата(тите) последователност(и) на теломерния повтор на полинуклеотида-свидетел в условия на теломерен тест; към такъв препарат обикновено се прибавя агент за оценка на нековалентното свързване и/или на теломеразната активност в сравнение с контролен препарат, несъдържащ споменатия агент.

В един седми аспект изобретението предоставя също така нулеви алели на гени за теломеразни РНК-компоненти на бозайници, такива каквито се получават чрез хомоложно генно прицелване на хетероложен полинуклеотид в ген за РНК-компонент на теломеразата от бозайници с цел функционално инактивиране на гена за теломеразния РНК-компонент. Изобретението предоставя също така "нокаут"-животни, включващи нулев алел на теломеразния РНК-компонент, а като вариант предоставя "нокаут"-животни, хомозиготни по нулевите алели за теломеразния РНК-компонент, в които съществено липсва ендогенна теломеразна активност, което произтича от отсъствието на ендогенен теломеразен РНК-компонент. Такива "нокаут"-животни, успоредно с други приложения, се използват като търговски продукти за токсикологичен скрининг или за предоставяне (продажба) на фармацевтични изследователски лаборатории с цел идентифициране или изследване на агенти, модулиращи теломеразата, като домашни любимци и като селскостопански животни.

В един осми аспект изобретението предоставя метод за имортализация на клетки от бозайници, такива като желани клетки за ферментация в биореактор или желан щам клетки, който има предимства като търговски продукт, предназначен за изследвания. Методът включва въвеждане в клетка от бозайник на полинуклеотид, който експресира функционален теломеразен РНК-компонент, който е способен да образува функционален теломеразен ензим в присъствието на теломеразен белтъчен компонент.

Други особености и предимства на изобретението ще станат ясни от следващото описание на фигурите, предпочетените приложения на изобретението, примерите и претенциите.

Дефиниции

Терминът "полинуклеотид на теломеразния РНК-компонент", така както се използва тук, се отнася за полинуклеотид от най-малко 20 нуклеотида, при което полинуклеотидът обхваща сегмент от най-малко 20 нуклеотида, които са най-малко 85 процента идентични на природна последователност на РНК-компонент на теломераза от бозайници, обикновено РНК-компонент на теломераза от примати, такъв като РНК-компонент на теломераза от хора или маймуни. Някои полинуклеотиди на теломеразни РНК-компоненти, които имат различия в последователността в сравнение с природна последователност на теломеразен РНК-компонент или нейния комплемент, могат да бъдат подходящи за хибридизационни сонди, PCR-праймери, LCR-амплимери, РНК-компоненти с погрешно сдвояващи се бази и др. подобни.

Терминът "съответства на" се използва тук, за да се отбележи, че една полинуклеотидна последователност е хомоложна (т.е., е идентична, без да е строго еволюционно родствена) с цялата или част от референтна полинуклеотидна последователност или че една полинуклеотидна последователност е идентична с референтна полинуклеотидна последователност. Противно на това терминът "комплементарен на" се използва тук, за да се отбележи, че комплементарната последователност е хомоложна на цялата или на част от референтна нуклеотидна последователност. За илюстрация, нуклеотидната последователност "TATAC" съответства на референтна последователност "TATAC" и е комплементарна на референтна последователност "GTATA".

За описание на родството в последователностите между два или повече полинуклеотида се използват следните термини: "референтна последователност", "прозорец за сравнение", "идентичност в последователностите", "процент на идентичност в последователностите" и "съществена идентичност". "Референтна последователност" е дефинирана последователност, която се използва като база за сравняване на последователности; референтната последователност може да бъде част от по-голяма последователност, например, сегмент от

последователност на пълноразмерен ген за теломеразен РНК-компонент. Най-общо, референтната последователност е дълга най-малко 20 нуклеотида, често най-малко 25 нуклеотида дълга и често най-малко 50 нуклеотида дълга. Тъй като от два полинуклеотида е възможно всеки (1) да включва последователност (т.е., част от пълната полинуклеотидна последователност), която е сходна за двата полинуклеотида и (2) може освен това да включва последователност, която е дивергентна за двата полинуклеотида, за да се идентифицират и сравнят локални области на сходство в последователностите, сравняванията на последователностите между два (или повече) полинуклеотида обикновено се извършват чрез сравняване на последователности от двата полинуклеотида по протежение на "прозорец за сравняване".

"Прозорец за сравняване", както се използва тук, се отнася за концептуален сегмент от най-малко 25 последователни нуклеотидни позиции, по които една полинуклеотидна последователност може да бъде сравнена с референтна последователност от най-малко 25 последователни нуклеотида и при което за оптимално напасване на двете последователности участъкът от полинуклеотидната последователност в прозореца за сравняване може да включва 20 процента или по-малко добавки или делеции (т.е. гепове) в сравнение с референтната последователност (която не включва добавки и делеции). Оптималното съпоставяне на последователности с цел напасване на прозорец за сравняване може да се извърши чрез алгоритъма за локална хомология на Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:432, чрез алгоритъма за напасване по хомология на Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, чрез метода за търсене на сходство на Pearson and Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A)* 85:2444, чрез компютъризираното приложение на тези алгоритми (GAP, BESTFIT, FASTA and TFASTA in the Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или чрез оглеждане (инспекция), като се избира най-доброто напасване (т.е., което дава най-висок процент хомология по протежение на прозореца за сравняване), получаващо се посредством различните методи.

Терминът "идентичност в последователностите" означава, че две полинуклеотидни последователности са идентични (т.е. кагато се сравняват нуклеотид по нуклеотид) по протежение на прозореца за сравняване. Терминът "процент на идентичност в последователностите" се пресмята чрез сравняване на две оптимално напаснати последователности по протежение на прозореца за сравняване, като се определя броят на позициите, в които и в двете последователности се появява една и съща база на нуклеинова киселина (напр., А, Т, G, С, U или I), за да се получи броят на съвпадащите позиции. След това броят на съвпадащите позиции се разделя на общия брой позиции в прозореца за сравняване (т.е. на големината на прозореца) и резултатът се умножава по 100, за да се получи процентът на идентичност в последователностите. Терминът "съществена идентичност", така както се използва тук, отбелязва една характеристика на полинуклеотидна последователност, при която полинуклеотидът включва последователност, която има най-малко 80 процента идентичност в последователността, за предпочитане най-малко 85 процента идентичност и често 89 до 95 процента идентичност в последователността в сравнение с референтна последователност по протежение на прозореца за сравняване от най-малко 20 нуклеотидни позиции, често по протежение на прозорец от най-малко 30-50 нуклеотида. Процентът на идентичност в последователностите се изчислява чрез сравняване на референтната последователност с полинуклеотидната последователност, което може да включва делеции или добавки, които са общо 20 процента или по-малко от референтната последователност по протежение на прозореца за сравняване. Референтната последователност може да бъде част от по-голяма последователност, например, сегмент от последователност на пълноразмерен ген за теломеразен РНК-компонент, както е показано тук.

Специфична хибридизация тук се дефинира като образуване на хибриди между полинуклеотидна сонда (напр., полинуклеотид на изобретението, който може да включва субституции, делеции и/или добавки) и специфичен прицелен полинуклеотид (напр., теломеразен РНК-компонент или геномна гена

последователност), при което сондата хибридизира предимно със специфичната мишена по такъв начин, че например при пренос на РНК (Northern blot), приготвена от подходящ клетъчен източник (напр., соматична клетка, експресираща теломеразен РНК-компонент), да може да се идентифицира единична ивица, съответстваща на един или повече от видовете РНКи на гена за теломеразния РНК-компонент (или на специфично разкъсани или процесирани видове теломеразен РНК-компонент). Полинуклеотидите на изобретението, които хибридизират специфично с теломеразен РНК-компонент от бозайници или с човешки теломерни последователности, могат да се приготвят на базата на данните за последователностите, приведени тук и съгласно методите и термодинамичните принципи, известни в областта на техниката и описани в Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. and Berger and Kimmel. *Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques* (1987). Academic Press, Inc., San Diego, CA, които са включени тук за справка.

Терминът "подходящи условия за свързване", така както се използва тук, се отнася за условия на водна среда, при които теломеразен РНК-компонент от бозайници асоциира със своя родствен белтъчен компонент и формира ензимно активен теломеразен холоензим, способен каталитично да реплицира, репарира и/или добавя теломерни повтори от подходяща матрица, включваща теломерни повтори; подобна матрица от теломерни повтори може да присъства или отсъства. Подходящите условия за свързване често могат да бъдат физиологични условия. "Физиологични условия", така както се използва тук, се отнася за температура, рН, йонна сила, вискозитет и др. подобни биохимични параметри, които са съвместими с живия организъм и/или които съществуват обикновено вътреклетъчно в жива култивирана клетка от бозайник, в частност условия, съществуващи в ядрото на споменатата клетка от бозайник. Например, вътреядрените или цитоплазмени условия в клетка от бозайник, култивирана при типични лабораторни условия на култивиране, са физиологични условия. Подходящите реакционни условия *in vitro* за транскрипционни коктейли *in vitro* са

най-общо физиологични условия, като могат да бъдат дадени за пример разнообразие от ядрени екстракти, известни в областта на техниката. Най-общо, физиологичните условия *in vitro* могат да включват 50-200 mM NaCl или KCl, pH 6,5-8,5, 20-45°C и 0,001-10 mM двувалентен катион (напр., Mg²⁺, Ca²⁺); за предпочитане около 150 mM NaCl или KCl, pH 7,2-7,6, 5 mM двувалентен катион и често включват 0,01-1,0 процент неспецифичен белтък (напр., BSA). Често може да присъства нейонен детергент (Tween, NP-40, Triton X-100), обикновено 0,001 до 2%, типично 0,05-0,2% (обем/обем). Конкретните условия на водна среда могат да се изберат от терапевта съгласно конвенционални методи. Като най-общо указание могат да се прилагат следните условия на буферизирана водна среда: 10-250 mM NaCl, 5-50 mM Tris HCl, pH 5-8 с оптимална добавка на двувалентен(и) катион(и) и/или метални хелатори и/или нейонни детергенти и/или мембранни фракции и/или пеногасители и/или сцинтилатори.

Термините "белег" или "белязан", така както се използват тук, се отнасят за включването на маркер, който може да се детектира, напр., чрез включване на радиоактивно белязана аминокиселина или присъединяване към полипептид на биотинилирани групи, които могат да се детектират чрез маркиран авидин (напр., стрептавидин, съдържащ флуоресцентен маркер или ензимна активност, която може да се детектира чрез оптични или колориметрични методи). В областта на техниката са известни различни методи за бележене на полипептиди и гликопротеини, които могат да се използват. Примерите на белези за полипептиди включват, но не са ограничени до, следните: радиоактивни изотопи (напр., ³H, ¹⁴C, ³⁵S, ¹²⁵I, ¹³¹I), флуоресцентни белези (напр., FITC, родамин, лантанидови фосфори), ензимни белези (напр., пероксидаза от хрян, бета-галактозидаза, луцифераза, алкална фосфатаза), биотинови групи, предварително определени полипептидни епитопи, които се разпознават от вторичен "сигнализатор" (напр., последователности, свързващи се с левцинов "цип"; свързващи места за вторични антитела; полипептид, активиращ транскрипцията; домени, свързващи метали; епитопни "щампи"). В някои

приложения бележите се присъединяват посредством "изнасящи" (spacer) рамена с различна дължина за редуциране на потенциалното стерично пречене.

Терминът "статистически достоверен", така както се използва тук, означава резултат (т.е. стойност от някакъв тест), който е по правило поне две стандартни отклонения над или под средната стойност от най-малко три отделни определяния на контролната проба в теста и/или който е статистически достоверен съгласно t-теста на Student или съгласно друга мярка за статистическа достоверност, приета в областта на техниката.

Термините "патогномонична концентрация", "патогномонично количество", "патогномоничен профил на хибридизация", така както се използват тук, се отнасят съответно за концентрация, количество или профил на разпределение на теломеразен РНК-компонент в проба, които указват на наличието на патологично състояние (напр., неопластично, на стареене, имунодефицитно, невродегенеративно, възпалително и т.н.) или на предразположение към развитието на неопластично заболяване, такова като карцинома, саркома или левкемия. Патогномонично количество е количеството теломеразен РНК-компонент в клетка или клетъчна проба, което попада извън границите на нормалните клинични стойности, установени чрез проспективни и/или ретроспективни статистически клинични изследвания. Най-общо, индивид с неопластично заболяване (напр., карцинома, саркома или левкемия) ще показва количество теломеразен РНК-компонент в клетка или тъканна проба, което е извън концентрационните граници, характерни за нормалните, незаболели индивиди; обикновено патогномоничната концентрация се отклонява от средната стойност в норма поне с около едно стандартно отклонение, като по-често тя е поне около две стандартни отклонения или повече над средната стойност в норма. Почти всички клинични диагностични тестове, обаче, дават известен процент фалшиво-положителни и фалшиво-отрицателни резултати. Чувствителността и селективността на диагностичния тест трябва да бъдат достатъчни, за да удовлетворят диагностичните цели и всяко имащо отношение регулаторно изискване. Най-общо, диагностичните методи на изобретението се

използват за идентифициране на индивиди като кандидат-болни при определяне на допълнителен параметър в диференциална диагноза на заболяването, поставена от компетентен лекар.

Терминът "алел на заболяване", така както се използва тук, се отнася за алел на ген, който е в състояние да причини видимо заболяване. Един алел на заболяване може да бъде доминантен или рецесивен и може да причини заболяването директно или когато присъства в комбинация със специфичен генетичен фон или вече съществуващо патологично състояние. Един алел на заболяване може да присъства в генното депо или може да се получи *de novo* в индивид чрез соматична мутация.

Терминът "antineoplastичен агент" се използва тук за означаване на агенти, които имат функционалното свойство да инхибират развитието или напредването на неоплазма в човек, което често включва инхибиране на метастазирането или на метастатичния потенциал.

Терминът "оперативно свързан", така както се използва тук, се отнася за свързване на полинуклеотидни елементи във функционална връзка. Една нуклеинова киселина е "оперативно свързана", когато е поставена във функционална връзка с друга последователност от нуклеинова киселина. Например, един промотор или инхансър е оперативно свързан с кодираща последователност ако той повлиява транскрипцията на кодиращата последователност. Оперативно свързани означава, че ДНК-последователностите, които са свързани, обикновено са прилежащи, а където е необходимо да се свържат две кодиращи области - прилежащи и в рамка за четене. Тъй като, обаче, инхансърите по правило функционират, когато са на няколко килобази разстояние от промотора и тъй като интронните последователности могат да бъдат с различни дължини, някои полинуклеотидни елементи могат да бъдат оперативно свързани, без да са прилежащи. Един структурен ген (напр., HSV *tk* ген), който е оперативно свързан с полинуклеотидна последователност, съответстваща на транскрипционна регулаторна последователност на ендегенен

ген, като правило се експресира до голяма степен по същия начин във времето и по начин, специфичен за клетъчния тип, както природният ген.

Терминът "транскрипционна единица" или "транскрипционен комплекс", така както се използва тук, се отнася за полинуклеотидна последователност, която включва структурен ген (екзони), цис-действащ свързан промотор и други цис-действащи последователности, необходими за ефективна транскрипция на структурните последователности, дистални регулаторни елементи, необходими за съответната тъканно специфична и в хода на развитието транскрипция на структурните последователности, както и допълнителни цис-последователности, които са от значение за ефективна транскрипция и трансляция (напр., място за полиаденилиране; последователности, контролиращи стабилността на мРНК).

Терминът "модулиране на транскрипцията" се използва тук за обозначаване на капацитета, както за усилване на транскрипцията, така и за инхибиране на транскрипцията на структурна последователност, свързана в цис; подобно усилване или инхибиране може да зависи от появата на специфично събитие, такова като стимулиране с индуктор и/или може да се прояви само в определени типове клетки.

Терминът "транскрипционна регулаторна област", така както се използва тук, се отнася за ДНК-последователност, включваща функционален промотор и всякакви асоциирани с него транскрипционни елементи (напр., инхансър, ССААТ-блок, ТАТА-блок, SP1-място и т.н.), които са съществени за транскрипцията на полинуклеотидната последователност, която е оперативно свързана с транскрипционната регулаторна област.

Терминът "нулев алел", така както се използва тук, означава, че даден генен локус включва най-малко една мутация или структурно изменение, така че нулевият алел е съществено възпрепятстван да направлява ефективната експресия на функционален генен продукт. Една "нокаут-клетка" е клетка, която има най-малко един нулев алел на ендогенен ген, като обикновено тя е хомозиготна по нулевия алел. Така например една "нокаут"-клетка може да бъде хомозиготна по нулевите алели в локуса за теломеразния РНК-компонент, така

че "нокаут"-клетката е съществено възпрепятствана да експресира функционален теломеразен РНК-компонент.

Кратко описание на фигурите

Фиг. 1. Теломеразна активност в клетки, експресиращи мутантна матрица на TRC3. Фракционирани на DEAE-sepharose екстракти от стабилни трансформанти, експресиращи мутантен TRC3, се тестват за теломеразна активност чрез използването на конвенционални тестове при различни реакционни условия. Екстрактите от клетки, експресиращи MuC=17 (стартове 1, 4, 7, 10, 13, 16, отбелязани с **C***), MuC TRC3 (стартове 2, 5, 8, 11, 14, 17, отбелязани с **C**) или MuA TRC3 (стартове 3, 6, 9, 12, 15, 18, отбелязани с **A**) се тестват при нормални реакционни условия (стартове 1-6), нормални плюс 0,5 mM ddCTP (стартове 7-9), нормални минус dTTP, плюс 0,5 mM ddTTP (стартове 10-12) или нормални минус dATP, плюс 0,5 mM ddATP (стартове 13-18). Тестовите реакции в стартове 1-9 съдържат 8 мкМ тотален dGTP, от които 1 мкМ е ^{32}P -dGTP (800 Ки/ммол). Преди теломеразните тестове (стартове 1-3, 16-18) екстрактите се третират с РНаза (25 мкг/мл за 10 мин на 30°C), свободна от ДНаза. Фланкиращите стартове съдържат ДНК-маркери с големини в нуклеотиди (nt), както е означено.

Фиг. 2. Устойчивото (steady-state) ниво на теломеразен РНК-компонент (hTR) и GAPDH-РНК се определя чрез използване на количествен RT-PCR. Контролите показват, че всички RT-измервания са в линейната област до 25 цикъла. Чрез RT-PCR се анализират пет нормални клетъчни линии (стартове 1-5), отрицателни за теломеразата и пет туморни клетъчни линии (стартове 6-10), положителни за теломеразата: 1) първичен фетален бял дроб; 2) първична фетална кожа от ръка; 3) първична простата на възрастен; 4) първични синовиални фибробласти; 5) фибробласти от препуциум; 6) меланома LOX; 7) левкемия U251; 8) карцинома на белия дроб NCIH23; 9) тумор на дебелото черво SW620; 10) тумор на млечната жлеза MCF7. Продуктите от PCR се бележат с ^{32}P , разделят се на 6% PAGE (полиакриламидна гел-електрофореза) и се измерват

количествено, като се използва PhosphorImager. Относителната транскрипция се изразява в свободно избрани единици.

Фиг. 3. Стойности за дължината на TRF в клетки с антисенс на теломеразния РНК-компонент и с контролния вектор. Клетки HeTe7, които експресират стабилно 10-3-hTR-антисенс или контролния вектор, се селектират в среда с хигромицин и пурамицин и се събират при 23 PDL след трансфекцията. Пречиства се ядрена ДНК, срязва се с *HinI* и *RsaI* и се нанася на 0,5% агарозен гел. ДНК в гела се третира с олигонуклеотидната сонда (TTAGGG), за да се бележат теломерните терминални рестриктазни фрагменти (TRF). Гелът се сканира с Molecular Dynamic's PhosphorImager и TRF-стойностите се измерват, както е описано (Allsopp *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**: 10114). Пунктираните линии показват средите TRF-стойности за групата антисенс и контролната група.

Фиг. 4 Схематично представяне на метода за PCR *in situ*.

Описание на предпочетените приложения

Настоящото изобретение предоставя методи, реактиви, генетично модифицирани животни и клетки, както и фармацевтични препарати, имащи отношение към рибонуклеопротеиновата човешка теломераза.

Номенклатурата, използвана по-нататък, лабораторните процедури на клетъчно култивиране, молекулярна генетика и химия на нуклеиновите киселини, както и по-долу описаната хибридизация, могат да включват процедури, добре познати и широко използвани в областта на техниката. Като методи за рекомбинантни нуклеинови киселини, за полинуклеотидна синтеза, култивиране на микроби и трансформация (напр., електропорация, липофекция) се използват стандартни техники. Техниките и процедурите се извършват основно според конвенционални методи от областта на техниката и някои основни публикации (виж, предимно, Sambrook *et al.* *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2d ed. (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., включен тук за справка), които са дадени в този документ.

от рестриктазния ензим *HindIII*, които (места) обхващат цялата последователност за зрелия РНК-компонент, както и транскрипционни контролни елементи на гена за РНК-компонента в ламбда-клона 28-1.

```

'           '           '           '           '           50
GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGTACT
'           '           '           '           '           100
CAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAACCTGACA
'           '           '           '           '           150
AGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGATAAT
'           '           '           '           '           200
GTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTGACATATAACTCAAAGCATT
'           '           '           '           '           250
TAGCATCTACTCTATGTAAGGTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAAAAA
'           '           '           '           '           300
CAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAAAGTTTACAACCTGGCAGATGCTAT
'           '           '           '           '           350
GAAAGAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAGAGG
'           '           '           '           '           400
GAGATATTTTACTTTTCTTTCAGATCGAGGACCGACAGCGACAACCTCCAC
'           '           '           '           '           450
GGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAAAGTTTAAAGATCATCCTGTTCAT
'           '           '           '           '           500
TTATATGTAAGAACTGCACTATACTGGCCATTATAAAAATTCGCGGCCGGG
'           '           '           '           '           550
TGCGGTGGCTCATACTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCGGGT
'           '           '           '           '           600
GGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTAAA
'           '           '           '           '           650
CCCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAAAGTAGCTGGGCCTGGTGGCAGGCG
'           '           '           '           '           700
CCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGAACC
'           '           '           '           '           750
CGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCATCCA
'           '           '           '           '           800
GCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTACAAT
'           '           '           '           '           850
TTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTACCTCATCAAGACACAGCACTACT
'           '           '           '           '           900
TTAAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTTCTTTCCCTAATAAAAGGGAG
'           '           '           '           '           950
ATTCAGTCTTAAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGCCAT
'           '           '           '           '           1000
CCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATCTAAGGAGAAGGGGGCAG
'           '           '           '           '           1050
GGTAGGAACCTCGGACGCATCCCAGTGAAGCCGAGACAAGATTCTGCTGTAG
'           '           '           '           '           1100
TCAGTGTCTGCCTGGGAATCTATTTTACAAAAGTTCTCCAAAAAATGTGAT
'           '           '           '           '           1150
GATCAAAAAGTAGGAATTAGTGTCTGTGTCTTAGGCCCTAAAATCTTCCT
'           '           '           '           '           1200
GTGAATTCCATTTTTAAGGTAGTTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGCAGA
'           '           '           '           '           1250
GGATAGAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTCACCTTTAAAGA
'           '           '           '           '           1300

```


последователност за SP1 се открива при нуклеотиди 1354-1359; и при нуклеотиди 1234-1245 се открива косенсусна последователност на елемент за отговор спрямо бета/гама-интерферон. Устойчивото ниво (steady state) на транскрипция на гена за РНК-компонента на човешката теломераза в човешки клетки, такива като HT1080 (експресиращи теломераза), не се променя съществено, когато се делетират последователностите пред нуклеотид 1159 във вектори, стабилно трансфектирани в клетките.

ДНК от дървесна маймуна, за която се смята, че е от не-човешките примати, най-много дивергирали генетично по отношение на хората, може да се амплифицира с праймери за PCR, състоящи се от последователности, които съответстват или са комплементарни на представените полинуклеотидни последователности на човешкия теломеразен РНК-компонент. Смята се, че и други не-човешки примати притежават гени за теломеразни РНК-компоненти, които могат да се амплифицират с праймерите за PCR, изведени от последователността на гена за РНК-компонента на човешката теломераза.

Полинуклеотиди на теломеразния РНК-компонент

Разкриването на последователностите на РНК-компонента на теломераза от бозайници и неговия ген, както е показано по-горе за човешката теломераза и във Фиг. 5 за теломеразата на дървесна маймуна, прави възможно конструирането на изолирани полинуклеотиди, които включват последователност от най-малко 15 последователни нуклеотида, обикновено най-малко 20 до 25 последователни полинуклеотида, които са съществено идентични с последователността за РНК-компонента на теломераза от бозайници или с генната последователност за РНК-компонент на бозайници. Освен това, теломеразният РНК-компонент на бозайници (и ген) правят възможно конструирането на сонди за хибридизация на нуклеинови киселини и на праймери за PCR, които могат да се използват за детектиране на последователности от РНК и ДНК на родствен теломеразен РНК-компонент и/или ген в клетка, клетъчна проба, тъканен срез, реакционен съд, хибридизационна мембрана и др. подобни.

Полинуклеотидите, включващи РНК-компонент на теломераза от бозайници, могат да включват последователности, които улесняват транскрипцията (експресионни последователности); последователности, стабилизиращи РНК и др. подобни. Общите принципи за конструиране на такива полинуклеотиди, като се имат предвид понастоящем представената информация за последователностите, указанията и насоката на изобретението, са добре известни в областта на техниката и са описани още в Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. (1989), Cold Spring Harbor, N.Y. Като пример, но не като ограничение, такива полинуклеотиди могат да включват промотор, и по желание (условно), инхансър за експресия в еукариотни гостоприемници, и по желание, последователност, необходима за репликация на вектора. Една типична еукариотна експресионна касета включва полинуклеотидна последователност, която при транскрипцията си продуцира транскрипт на теломеразен РНК-компонент от бозайници; такава полинуклеотидна последователност се свързва след т.е., 5' към 3' по посока на транскрипцията от подходящ промотор, такъв като HSV *tk*-промотор или *pgk* (фосфоглицераткиназен) промотор и е възможно да бъде свързана с инхансър.

Освен това, когато не се желае експресията на функционален теломеразен РНК-компонент, не е необходимо полинуклеотидите на това изобретение да транскрибират функционален транскрипт на теломеразен РНК-компонент. Полинуклеотидите на това изобретение могат да служат като хибридизационни сонди и/или праймери за PCR (амплимери) и/или олигомери за LCR за детектиране на РНК- или ДНК-последователности на теломеразен РНК-компонент.

Като алтернатива полинуклеотидите на това изобретение могат да служат като хибридизационни сонди или праймери за детектиране на РНК- или ДНК-последователности на родствени гени, или на ген за теломеразен РНК-компонент в родствени видове, обикновено видове бозайници. За подобна хибридизация и приложения в PCR не е необходимо полинуклеотидите на изобретението да транскрибират функционален теломеразен РНК-компонент.

Ето защо, полинуклеотидите на изобретението могат да съдържат съществени делеции, добавки, нуклеотидни субституции и/или транспозиции, толкова дълги, че да се запази специфичната хибридизация с, или специфичната амплификация на, последователност за теломеразен РНК-компонент на бозайници.

Геномни или кДНК-клонове на теломеразен РНК-компонент от бозайници и съответните генни последователности могат да се изолират от библиотека от клонове (напр., която може да се получи от Clontech, Palo Alto, CA), като се използват хибридизационни сонди, проектирани на базата на нуклеотидните последователности, поместени тук, и като се използват конвенционални хибридизационни методи за скрининг (напр., Benton WD and Davis RW (1977) *Science* 196: 180; Goodspeed et al. (1989) *Gene* 76: 1). Когато се желае кДНК-клон, се предпочитат библиотеки от клонове, съдържащи кДНК, получена от соматична клетъчна РНК или от друга РНК на клетки, експресиращи теломеразен РНК-компонент. Алтернативно, чрез химична синтеза на олигонуклеотиди могат да се конструират синтетични полинуклеотидни последователности, съответстващи на целите или на част от последователностите, разкрити тук. Като алтернатива за амплификацията на ДНК-фрагменти от геномна ДНК, РНК-изолати или от библиотеки на кДНК-клонове, може да се използва полимеразна верижна реакция (PCR), като се използват праймери на основата на данните за последователностите, разкрити тук. Патенти на САЩ 4 683 195 и 4 683 202 описват метода на PCR.

Такива полинуклеотиди имат различни приложения, включително като сонди за теломеразен РНК-компонент, като матрици за получаване на функционален или нефункционален теломеразен РНК-компонент в клетки, като търговски диагностични реактиви за стандартизиране на тест за детекция на теломеразен РНК-компонент, като полинуклеотиди за въвеждане в животни с цел генна терапия; успоредно с другите приложения такива полинуклеотиди могат да се използват също като хранителни вещества, горивни енергийни източници, UV-абсорбиращи слънцезащитни агенти и като съставки на разтвори, повишаващи вискозността.

Важни аспекти на настоящото изобретение са плазмидите, описани тук, които се конструират по време на клонирането на РНК-компонента на човешката теломераза и на гена за РНК-компонента. Тези плаزمиди могат да се използват за получаване на РНК-компонента на, както и на гена за, човешката теломераза в съществено чиста форма, което представлява друг важен аспект на настоящото изобретение. Освен това, специалистите се досещат, че други нуклеинови киселини, както и неплазмидни нуклеинови киселини в съществено чиста форма, които включват цялата или поне полезната част от нуклеотидната последователност на РНК-компонента, представляват полезни вещества, които предоставя настоящото изобретение.

Като генерална точка, отнасяща се до нуклеиновите киселини и съдържащите ги препарати на изобретението, специалистите се досещат, че нуклеиновите киселини на изобретението включват, както ДНК-, така и РНК-молекули, както и синтетични, неестествени аналози на същите, хетерополимери на дезоксирибонуклеотиди, рибонуклеотиди и/или техни аналози. Конкретният препарат от нуклеинова киселина или от аналог на нуклеинова киселина ще зависи от целта, за която ще се използва веществото и от обкръжението(ята), в което ще бъде поставено веществото. Модифицираните или синтетични, неприродни нуклеотиди, са предназначени да служат на различни цели и да остават стабилни при различни условия, такива като тези, в които присъстват нуклеази, което е добре известно в областта на техниката. Модифицираните или синтетични неприродни нуклеотиди, в сравнение с природните рибо- или дезоксирибонуклеотиди, могат да се различават по отношение на въглехидрата (захарта), фосфатната връзка или базовите позиции на нуклеотида, или в някои случаи могат дори да съдържат ненуклеотидна база (или въобще да не съдържат база). Виж, напр., Arnold et al., PCT-патентна публикация No. 89/02439, озаглавена "Non-nucleotide Linking Reagents for Nucleotide Probes" ("Ненуклеотидни свързващи реактиви за нуклеотидни проби"), включена тук за справка. Точно така, както нуклеиновите киселини на изобретението могат да включват голямо

разнообразие от нуклеотиди, по същия начин тези нуклеинови киселини могат да изпълняват голямо разнообразие от ползотворни функции.

Изолиране на родствени гени

Както беше посочено в гореизложеното описание, достъпът до пречистени нуклеинови киселини, включващи последователността на РНК-компонента на човешката теломераза, предоставя ценни диагностични и терапевтични методи и реактиви, както и други важни предимства. Едно важно предимство на настоящото изобретение е това, че методите и реактивите на изобретението могат да се използват за изолиране на РНК-компонент и на гени за РНК-компонент, които са съществено хомоложни на човешкия РНК-компонент на настоящото изобретение. Фразата "съществено хомоложен" се отнася до степента на хомология, която се изисква за специфична хибридизация на олигонуклеотид или на последователност от нуклеинова киселина на човешкия РНК-компонент с последователност от нуклеинова киселина на РНК-компонент от други видове бозайници. При условие, че е налице такава съществена хомология обикновените специалисти в тази област могат да използват нуклеиновите киселини и олигонуклеотидни праймери и сонди на изобретението, за да идентифицират и изолират съществено хомолжни последователности.

Например, може да се сондира геномна или кДНК-библиотека за детекция на хомложни последователности. Може също така да се използват праймери, съответстващи на области от последователността на РНК-компонента, както и амплификация чрез PCR в условия на ниска или умерена строгост, за да се амплифицира специфична хомоложна последователност на нуклеинова киселина в препарати от РНК или ДНК на видове бозайници. Чрез използване на тези и други подобни техники обикновените специалисти могат лесно да изолират не само нуклеинови киселини на варианти на РНК-компоненти от човешки клетки, но и нуклеинови киселини на хомоложни РНК-компоненти от други клетки на бозайници, такива като клетки от примати, от бозайници, които представляват ветеринарен интерес, т.е., рогат добитък, овце, коне, кучета и

котки; и от гризачи, т.е., плъхове, мишки и хамстери. На свой ред тези нуклеинови киселини могат да се използват за получаване на трансгенни животни с голяма ценност за скриниране и тестиране на фармацевтични препарати, които регулират теломеразната активност. Например, чрез използване на плазмид на изобретението, може да се "нокаутира" гена за РНК-компонента или да се замести природният ген за РНК-компонента с рекомбинантен индуцируем ген в ембрионалните стволови клетки *mus spretus* и след това да се получи трансгенна мишка, която ще бъде полезна като модел или тест-система за изследване на заболявания, свързани със стареенето или състаряването. Пример 9, по-долу, илюстрира как тази методология е била използвана за идентифициране и изолиране на последователности на РНК-компоненти от примати.

Други хомолози от бозайници на човешките и маймунските теломеразни РНК-компоненти и/или родствените гени могат да се идентифицират и изолират чрез скриниране на подходяща не-човешка геномна библиотека от бозайник или библиотека от кДНК-клонове, като такава, получена от мишка, плъх, заек, морско свинче, хамстер, куче, говедо, бик, вълк, прасе или от друга геномна библиотека или библиотека от кДНК-клонове в подходящ вектор, такъв като дрождени изкуствени хромозоми, космиди или бактериофага ламбда (напр., lambda Charon 35), с полинуклеотидна сонда, включваща последователност от около поне 20 последователни нуклеотида (или техни комплементи) от полинуклеотидна последователност на човешки или маймунски теломеразен РНК-компонент. Хибридизацията и миенето обикновено се извършват в условия на висока строгост, съгласно конвенционални процедури за хибридизация. Положителните клонове се изолират и секвенират. За илюстрация, а не като ограничение, един пълноразмерен полинуклеотид, съответстващ на нуклеотидната последователност от 559 (нуклеотида) на човешкия теломеразен РНК-компонент може да се бележи и да се използва като хибридизационна сонда за изолиране на геномни клонове от не-човешка библиотека от геномни клонове в lambdaEMBL4 или lambdaGEM11 (Promega Corporation, Madison, Wisconsin); типични хибридизационни условия за скрининг на реплики от (фагови)

плаки (Benton and Davis (1978) *Science* 196:180; Dunn *et al.* (1989) *J. Biol. Chem.* 246:13057) могат да бъдат 50% формамид, 5 x SSC или SSPE, 1-5 x разтвор на Denhardt, 0,1-1% SDS, 100-200 мкг нарязана хетероложна ДНК или РНК, 0-10% декстрансулфат, 1×10^5 до 1×10^7 срт/мл денатурирана сонда със специфична активност от около 1×10^8 срт/мкг и инкубиране на 42°C - 37°C за около 6-36 часа. Условието на прехибридизация са по същество същите с изключение на това, че не е включена сондата и времето за инкубация обикновено е редуцирано. Типичните условия за миене са: 1-3xSSC, 0,1-1% SDS, 45 - 70°C със смяна на миещия разтвор на около 5-30 минути. За изолиране на полинуклеотиди на нечовешки теломеразни РНК-компоненти с полинуклеотидна сонда от човешки теломеразен РНК-компонент, често се предпочита да се хибридизира при по-ниска строгост, такава като приблизително 39°C , и да се мие поетапно при следните температури на отделните стъпки: 37°C , 39°C , 42°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C , 65°C и 70°C , като се спира след всяка стъпка и се отчита фононият сигнал в пробата (възможно е сигналът да се детектира чрез автордиограма и/или фосфорна сцинтиграфия (imaging), ако се използва радиоактивно белязана проба) и спиране на миещите стъпки, когато се постигне подходящо отношение сигнал/фон, което се определя емпирично.

Полинуклеотидите, включващи последователности от приблизително поне 30-50 нуклеотида, за предпочитане поне 100 нуклеотида, съответстващи или комплементарни на нуклеотидните последователности, показани тук за последователностите на човешкия и маймунски теломеразен РНК-компонент, могат да служат като PCR-праймери и/или хибридизационни сонди за идентифициране и изолиране на герминални гени, съответстващи на представените генни последователности и последователности на РНК-компоненти. Такива герминални гени могат да се изолират чрез различни конвенционални методи от областта на техниката, включващи, но не ограничени до, скрининг чрез хибридизация на геномни библиотеки в бактериофага ламбда или космидни библиотеки, или PCR-амплификация на геномни последователности като се използват праймери, изведени от последователностите, разкрити тук.

Човешките геномни библиотеки са общодостъпни и могат да се конструират *de novo* от човешка ДНК.

За специалиста е очевидно, че в полинуклеотидите на изобретението могат да се въведат нуклеотидни субституции, делеции и добавки. Вариация в нуклеотидната последователност може да се получи от полиморфизми в последователностите на различни алели и др. подобни. Такива нуклеотидни субституции, делеции и добавки, обаче, не биха нарушили съществено способността на полинуклеотидите да хибридизират с една от полинуклеотидните последователности на човешки или маймунски теломеразен РНК-компонент, показани тук, при условия на хибридизация, които са достатъчно строги, за да дадат специфична хибридизация.

Полинуклеотидите на теломеразните РНК-компоненти от бозайници могат да бъдат къси олигонуклеотиди (напр., дълги 20-100 бази), такива които да се използват като хибридизационни сонди и праймери за PCR (или LCR). Полинуклеотидните последователности могат да включват също част от по-дълъг полинуклеотид (напр., клониращ вектор, включващ клон на теломеразен РНК-компонент) и могат да бъдат слети, чрез полинуклеотидна връзка, с друга полинуклеотидна последователност. Полинуклеотидите на теломеразните РНК-компоненти обикновено включват поне 25 последователни нуклеотиди, които са съществено идентични с последователност на природен теломеразен РНК-компонент или ген, по-скоро полинуклеотидите на теломеразните РНК-компоненти включват поне 50 до 100 последователни нуклеотиди, които са съществено идентични с последователност на природен теломеразен РНК-компонент от бозайници. Специалистите, обаче, ще се досетят, че минималната дължина на полинуклеотид на теломеразен РНК-компонент, която се изисква за специфична хибридизация, ще зависи от няколко фактора, между които: съдържанието на G/C, разположението на неправилно сдвояващи се бази (ако има такива), степента на уникалност на последователността в сравнение с популацията от прицелни полинуклеотиди и химичната природа на

полинуклеотида (напр., метилфосфонатен гръбнак, полиамидна нуклеинова киселина, фосфоротиолат и т.н.).

Ако е желателно PCR-амплимерите за амплифициране на съществено пълноразмерни копия кДНК могат да се изберат по преценка на практикуващия. По подобен начин могат да се изберат амлимери за амплификация на части от гена за теломеразния РНК-компонент (маймунски или човешки).

Всяка от тези последователности може да се използва като хибридизационна сонда или PCR-амплимер, за да се детектира наличието на теломеразен РНК-компонент, например за диагноза на неопластично заболяване, което се характеризира с наличието на завишено или редуцирано ниво на теломеразен РНК-компонент в клетки или за да се извърши типизиране на тъкани (т.е., идентифициране на тъкани, характеризирани се с експресията на теломеразен РНК-компонент), и др. подобни. Последователностите могат също така да се използват за детектиране на последователност на геномен ген за теломеразен РНК-компонент в проба от ДНК, като такава за съдебен анализ на ДНК (напр., чрез RFLP-анализ, разпределение на продуктите от PCR по дължина и т.н.) или за диагноза на заболявания, които се характеризират чрез амплификация и/или преустройства на гена за теломеразния РНК-компонент.

Като пример, а не като ограничение, за амплифициране на полинуклеотидна последователност (напр., кДНК) на теломеразен РНК-компонент или като хибридизационни сонди (напр., като биотинилирани или крайно белязани олигонуклеотидни сонди) може да се използва следната двойка олигонуклеотидни праймери:

5'-AGCACACTGGCCCAGTCAGTCAGGTTTG-3' и

5'-GGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGA-3'.

Други подходящи праймери за PCR, праймери за LCR, хибридизационни сонди, праймери и др. подобни са очевидни за специалистите, като се имат предвид последователностите на теломеразните РНК-компоненти, разкрити тук и които могат да се получат незабавно. Полинуклеотидите на човешкия теломеразен РНК-компонент и техните комплементи могат да служат като хибридизационни

сонди или праймери за детекция на РНК- или ДНК-последователности на теломеразен РНК-компонент от бозайници. За целите на такива хибридизационни или PCR-приложения могат да се съдържат съществени делеции, нуклеотидни субституции и/или транспозиции, толкова дълги, че да се запази специфичната хибридизация или специфичната амплификация на човешкия теломеразен РНК-компонент. Такива нуклеотидни субституции, делеции и добавки, обаче, не биха нарушили съществено способността на полинуклеотида да хибридизира с последователност на теломеразен РНК-компонент или ген при условия на хибридизация, които са достатъчно строги, за да дадат специфична хибридизация.

Като пример, а не като ограничение, един полинуклеотид на човешки теломеразен РНК-компонент може да включва последователността от нуклеотид 48 до нуклеотид 209, която се смята за достатъчна, за да реконституира холоензима на човешката теломераза в присъствието на теломеразен белтъчен компонент:

5' -UCUAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAAGGCGCCGUGCUUUUUGCUCCCCGCGCGCUGUUU
UUCUCGCGUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUCCACCGUUCAUUCUAGAG
CAAACA AAAA AUGUCAGCUGCUGGCCCGUUCGCCCCUCCC-3'

или като ДНК

5' -TCTAACCCSTAAC TGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGCTCCCCGCGCGCTGTTT
TTCTCGCTGACTTTCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCUCCACCGTTCATTCTAGAG
CAAACA AAAA ATGTCAGCTGCTGGCCCGUUCGCCCCUCCC-3'

Един полинуклеотид на човешки теломеразен РНК-компонент може също така да включва или да се състои от нуклеотиди 1-559 и може да включва терминални добавки от други нуклеотиди или нуклеотидни последователности. Вариант, получен чрез "приплъзване" по матрицата, състоящ се от нуклеотиди 48-209, но в който матричната последователност на теломерния повтор е изменена, е в състояние да се конкурира със скъсен РНК-компонент, състоящ се от дивия тип последователност 48-209, за свързване с теломеразния белтъчен компонент и да реконституира теломеразния холоензим.

Структурният анализ на човешкия теломеразен РНК-компонент показва области, които имат склонност да формират вторични структури, такива като фуркетни бримки. Например, областта от приблизително нуклеотид 200 до нуклеотид 350 на човешкия теломеразен РНК-компонент има съществен характер на фуркетна бримка. Други части от теломеразния РНК-компонент също имат значителен характер на вторични структури. Имайки предвид тази отбелязана вторична структура, опитният специалист може да използва други нуклеотидни последователности, за които е предсказано чрез компютърен анализ, че приемат формата на подобна вторична структура. Макар че за определяне на нуклеотидните последователности, които придобиват съществено еквивалентни вторични структури, са подходящи различни компютърни програми, могат да се използват програмните продукти на UWGCG за секвенционен анализ FOLD, SQUIGGLES, CIRCLES, DOMES, MOUNTAINS и STEMLOOP и др. подобни. По подобен начин, като миметици на характерната вторична структура на областта(ите) от човешкия теломеразен РНК-компонент, която е желателно да бъде имитирана, чрез програми за молекулно моделиране могат да се проектират ненуклеотидни структурни миметици, такива като пептидни нуклеинови киселини и подобни на тях. Такива структурни миметици могат да се използват за лечение или за различни приложения (напр., конкурентен антагонист и т.н.)

Антисенс

Един особено полезен тип нуклеинова киселина на изобретението представлява антисенс-олигонуклеотид, който може да се използва *in vivo* или *in vitro* за инхибиране активността на човешката теломераза. Антисенс-олигонуклеотидите включват специфична последователност от около 10 до около 25 до 200 или повече (т.е., достатъчно голяма, за да формира стабилен дуплекс, но достатъчно малка в зависимост от начина на получаване, за да се въведе *in vivo*, ако е желателно) нуклеотиди, комплементарни на специфична последователност от нуклеотиди в РНК-компонента на човешката теломераза.

Механизмът на действие на такива олигонуклеотиди може да включва свързване с РНК-компонента: за да се възпрепятства "сглобяването" на функционална рибонуклеопротеинова теломераза, което да попречи на РНК-компонента да служи като матрица за синтеза на теломерна ДНК; за да се дестабилизира теломеразният РНК-компонент и да се редуцира неговият полуживот и/или за да се инхибира транскрипцията на гена за теломеразния РНК-компонент.

Илюстративните антисенс-олигонуклеотиди на изобретението, които служат за инхибиране на теломеразната активност *in vivo* и/или *in vitro*, включват олигонуклеотидите, споменати по-горе във връзка с теста за определяне дали клон рGRN7 съдържа ДНК за РНК-компонента на човешката теломераза. За демонстриране на инхибирането на теломеразната активност *in vitro*, както е отбелязано по-горе, се използват три такива олигонуклеотида. Последователността на всеки от тези олигонуклеотиди е показана по-долу:

T3 5'-CTCAGTTAGGGTTAGACAAA-3'

P3 5'-CGCCCTTCTCAGTTAGGGTTAG-3'

TA3 5'-GGCGCCTACGCCCTTCTCAGTT-3'

Тези олигонуклеотиди могат също така да се използват за инхибиране на теломеразната активност в човешки клетки.

Настоящото изобретение предоставя широко разнообразие от антисенс-олигонуклеотиди, които са способни да инхибират теломеразната активност. Друг полезен антисенс-олигонуклеотид на изобретението е олигонуклеотидът Tel-AU, който има последователността 5'-CAGGCCACCCCTCCGCAACC-3', и който, подобно на всеки от антисенс-олигонуклеотидите на изобретението, може да се синтезира чрез използване на фосфоротиоатни нуклеотиди, хирал-метилфосфонати, природни нуклеотиди или смеси от същите, за да им се придаде стабилност и желаната T_m (температура на топене). За получаването на нуклеинови киселини на изобретението с повече желателни свойства (т.е., устойчиви на нуклеази, по-плътна свързване и т.н.), отколкото имат тези, получени чрез използване на природни олигонуклеотиди, могат да се използват широко

разнообразие от модифицирани нуклеотидни аналози, такива като O-метилрибонуклеотиди, фосфоротиоатни нуклеотиди и метилфосфонатни нуклеотиди. Други техники за превръщане на олигонуклеотидите в устойчиви към нуклеази, включват тези, описани в PCT-патентна публикация No. 94/126333.

Допълнителните приложения, насочени към модулиране на теломеразната активност, включват методи, които използват специфични антисенс-полинуклеотиди, комплементарни на цялата или на част от последователността на човешкия теломеразен РНК-компонент (hTR), такива като антисенс-полинуклеотиди към гена за човешкия теломеразен РНК-компонент или към неговата транскрибирана РНК, в това число към скъсени форми, които могат да бъдат асоциирани с теломеразния холоензим. Такива комплементарни антисенс-полинуклеотиди могат да включват нуклеотидни субституции, добавки, делеции или транспозиции, толкова дълги, че да се запази като функционално свойство на полинуклеотида специфичното свързване към съответната прицелна последователност, съответстваща на теломеразния РНК-компонент или на неговия ген. Комплементарните антисенс-полинуклеотиди включват разтворими антисенс РНК- или ДНК-олигонуклеотиди, които могат да хибридизират специфично с видовете теломеразни РНК-компоненти и да възпрепятстват транскрипцията на гена за теломеразния РНК-компонент (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* **247**: 53; Holcenberg et al., WO91/11535; U.S.S.N. 07/530,165; WO91/09865; WO91/04753; WO90/13641; and EP 386563, всяка от които е включена тук за справка). Поради това антисенс-полинуклеотидите инхибират продукцията на функционален теломеразен РНК-компонент. Тъй като експресията на теломеразния РНК-компонент (скоростта на транскрипция и/или стабилността на РНК) е свързана с активирането и ензимната активност на теломеразния холоензим, антисенс-полинуклеотидите, които възпрепятстват транскрипцията на РНК, съответстваща на теломеразния РНК-компонент и/или взаимодействието на теломеразния РНК-компонент с белтъчния компонент на човешката теломераза и/или взаимодействието на теломеразния РНК-компонент

с теломерните последователности, могат да инхибират теломеразната активност и/или да обърнат фенотип, такъв като имортализация или неопластична трансформация на клетки, експресиращи теломеразна активност в отсъствието на антисенс-полинуклеотиди. Препарати, съдържащи терапевтично ефективна дозировка от антисенс-полинуклеотиди на теломеразния РНК-компонент могат да се прилагат за лечение на заболявания, които изискват теломеразна активност за клетъчната патогенеза (напр., неоплазия) или за инхибиране образуването или запазването на гамети (т.е. като контрацептиви), ако е желателно. Могат да се получат антисенс-полинуклеотиди с различни дължини, макар че такива антисенс-полинуклеотиди обикновено включват последователност от около поне 25 последователни нуклеотида, които са съществено комплементарни на природна полинуклеотидна последователност на теломеразен РНК-компонент и които са обикновено перфектно комплементарни на последователност на човешки теломеразен РНК-компонент, често бидейки комплементарни на последователността от теломеразния РНК-компонент, която е комплементарна на последователността на теломерния повтор или комплементарна на част от теломеразния РНК-компонент, която контактува с теломеразната полипептидна субединица.

Антисенс-полинуклеотидите могат да се продуцират от хетероложна експресионна касета в клетка-трансфектант или в трансгенна клетка. Хетероложната експресионна касета може да бъде част от вектор за генна терапия, такъв като аденовирусен или адено-асоцииран вирусен вектор или друг вектор за генна терапия. Хетероложната касета може да бъде на полинуклеотид, който е неспособен на независима репликация и който се пренася в клетките чрез някой от многото подходящи методи, известни на специалистите (напр., липофекция, биолистикс, липозоми, имунолипозоми, електропорация и т.н.) Като алтернатива антисенс-полинуклеотидите могат да включват разтворими олигонуклеотиди, които се въвеждат във външната обкръжаваща среда, или във културалната среда *in vitro*, или в интерстициалните пространства и телесни течности (напр., кръв, CSF) за приложение *in vivo*. Показано е, че разтворимите

антисенс-полинуклеотиди, присъстващи във външната среда, получават достъп до цитоплазмата и инхибират специфичните РНК-видове. В някои приложения антисенс-полинуклеотидите включват метилфосфонатни групи, С-5 пропенилови групи, 2' флуорорибозни захари или са полиамидни нуклеинови киселини (PNAs) (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, включени тук за справка). За основните методи, отнасящи се до антисенс-полинуклетоидите, виж *Antisense RNA and DNA*, (1988), D.A. Melton, Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

Като допълнение към антисенс-полинуклеотидите на изобретението за инхибиране на теломеразната активност могат да се конструират олигонуклеотиди, които ще се свързват с дуплексна нуклеинова киселина, или в нагънатия РНК-компонент, или в гена за РНК-компонента, формирайки тройна нуклеинова киселина, съдържаща спирала или триплексна нуклеинова киселина. Такива олигонуклеотиди на изобретението се конструират като се използват правилата за сдвояване на базите при формиране на тройна спирала и нуклеотидната последователност на РНК-компонента (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) *op.cit.*; Rigas *et al.* (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **83**: 9591, включени тук за справка). Такива олигонуклеотиди могат да блокират теломеразната активност по редица начини, включително чрез възпрепятстване транскрипцията на теломеразния ген или чрез свързване с дуплексна област от РНК-компонента на теломеразата по начин, който пречи на РНК-компонента или да формира функционална рибонуклеопротеинова теломераза или да служи като матрица за синтеза на теломерна ДНК. Олигонуклеотидите на изобретението, които образуват тройна спирала, обикновено и в зависимост от начина на действие, включват специфична последователност от около 10 до около 25 до 200 или повече (т.е., достатъчно голяма, за да формира стабилна тройна спирала, но достатъчно малка, в зависимост от начина на получаване, за да се въведе *in vivo*,

ако е желателно) нуклеотиди, "комплементарни" (в този контекст комплементарен означава способен да формира стабилна тройна спирала) на специфична последователност в РНК-компонента на теломеразата или в гена за РНК-компонента на теломеразата.

В допълнение към антисенс-олигонуклеотидите и олигонуклеотидите на изобретението, формиращи тройна спирала, за инхибиране на теломеразната активност могат да се използват също сенс-олигонуклеотиди, които са идентични по последователност на поне част от РНК-компонента на човешката теломераза. Олигонуклеотидите на изобретението от този тип се характеризират с това, че включват или (1) по-малко от пълната последователност на РНК-компонента, необходима за формиране на функционален теломеразен ензим или (2) пълната последователност на РНК-компонента, необходима за формиране на функционален теломеразен ензим, както и субституции или инсерции на един или повече нуклеотиди, които превръщат получаващата се РНК в нефункционална. И в двата случая се наблюдава инхибиране на теломеразната активност в резултат на свързването на "мутантния" РНК-компонент с белтъчните компоненти на човешката теломераза, което води до формиране на неактивна теломеразна молекула. Ето защо, механизмът на действие на подобни олигонуклеотиди включва "сглобяването" на нефункционална рибонуклеопротеинова теломераза или възпр епятстване "сглобяването" на функционална рибонуклеопротеинова теломераза. Един пример може да бъде вариант, получен чрез "приплъзване по матрицата", състоящ се от нуклеотиди 48-209, но в който матричната последователност на теломерния повтор е изменена. Такива варианти, получени чрез "приплъзване" по матрицата, са в състояние да се конкурират за свързване с теломеразния белтъчен компонент. Сенс-олигонуклеотидите на изобретението от този тип обикновено включват специфична последователност от около 20, 50, 100, 200, 400, 500 или повече нуклеотиди, идентични на специфична последователност от нуклеотиди в РНК-компонента на човешката теломераза.

Освен това, антисенс-полинуклеотидите могат да включват дериватизиран заместител, който не се повлиява съществено по отношение на

хбридизацията с РНК-компонента на теломераза от бозайници. Антисенс-полинуклеотиди, които са модифицирани чрез прибавянето на химични заместители, могат да се включват в метаболитно активна еукариотна клетка, за да хбридизират с теломеразен РНК-компонент на теломераза в клетката. Такива антисенс-полинуклеотиди обикновено се дериватизират, като се присъединяват допълнителни химични заместители, или по време или след полинуклеотидната синтеза, респективно, и по този начин се локализируют в комплементарна последователност на теломеразния РНК-компонент, като причиняват изменение или химична модификация на локална ДНК-последователност и/или на теломеразния белтъчен компонент. Предпочитаните химични заместители, които се присъединяват, включват: еуропиум (III) тексафирин, "съшиващи" агенти, псорален, метални хелатори (напр., желязо/EDTA хелатор за катализирано от желязо скъсване), топоизомеразни, ендонуклеази, екзонуклеази, лигази, фосфодиестерази, фотодинамични порфирини, химиотерапевтични медикаменти (напр., адриамицин, доксирубицин), интеркалиращи агенти, агенти за модифициране на базите, имуноглобулинови вериги и олигонуклеотиди. Хелаторите желязо/EDTA са особено предпочитани химични заместители, когато е желателно локално скъсване на полинуклеотидна последователност (Hertzberg et al. (1982) *J. Am. Chem. Soc.* **104**: 313; Hertzberg and Dervan (19984) *Biochemistry* **23**: 3934; Taylor et al. (1984) *Tetrahedron* **40**: 457; Dervan, PB (1986) *Science* **232**: 464). Предпочитаните химични методи за присъединяване включват: директно свързване, напр., чрез прибавена реактивоспособна аминогрупа (Corey and Schultz (1988) *Science* **238**: 1401, включена тук за справка) и други химични методи за директно свързване, макар че могат да се използват също методите за свързване със стрептавидин/бионин и дигоксигенин/анти-дигоксигенин. Методи за свързване на химични заместители са приведени в патенти на САЩ 5 135 720 и 5 055 556, които са включени тук за справка. По преценка на практикуващия могат да се използват други химични методи за свързване. Полинуклеотидите, които съответстват на целия или на съществена част от теломеразен РНК-компонент на бозайник (т.е., "сенс-

полинуклеотиди") могат също да се дериватизират и да се използват за взаимодействие с теломерните повторени последователности в генома и получаване на адукти или на друга модификация от страна на химичното обкръжение в теломерните области на хромозомите.

Матрици с погрешно сдвоени бази

И така, други ценни олигонуклеотиди на изобретението включват изменена или мутантна последователност на РНК-компонента на човешката теломераза. Yu *et al.*, 1990, *Nature* 344: 126, показва, че мутантна форма на РНК-компонента на теломераза от *Tetrahymena* може да бъде включена в теломеразата на клетки от *Tetrahymena* и че включването има поразяващ ефект върху тези клетки. Такива мутантни форми включват тези, в които последователността 5'-СТААССТА-3' е променена (мутирала) на 5'-СААСССАА-3', 5'-ССААССССАА-3' или 5'-СТСАСССТСА-3'. Всяка от тези изменени последователности на РНК-компонента променя теломерните повторени единици, включени в хромозомната ДНК, и по този начин засяга хромозомната структура и функция. Такива олигонуклеотиди могат да бъдат проектирани така, че да съдържат разпознавателни места за рестриктазни ензими, които са от полза в методите за диагностика на наличието на изменения РНК-компонент чрез смилане с рестриктазни ензими на теломерна ДНК или на удължен теломеразен субстрат.

За да се илюстрира този аспект на изобретението, се провежда място-специфична мутагенеза като се използва плазмид (означен pGRN33, който може да се получи от Американската колекция на типовите култури под ключов No. ATCC 75926), който включва *HindIII-SacI* фрагмент от ~ 2,5 кб от ламбда клон 28-1 (виж Пример 7, по-долу), както и началото за репликация на SV40 (но не и промоторна активност). Получените плазмиди, означени pGRN34 (включващ 5'-СААСССАА-3'), pGRN36 (включващ 5'-ССААССССАА-3') и pGRN37 (включващ 5'-СТСАСССТСА-3'), се трансформират в еукариотна клетка-гостоприемник (293-производна клетъчна линия, експресираща големия Т-антиген на SV40), а

теломеразните тестове се извършват като се използват клетъчни екстракти от трансформантите.

Тестовите показват, че теломеразната активност в клетките води до образуването на нуклеинови киселини, включващи изменените последователности, което показва, че геномният клон съдържа функционален ген за РНК-компонент и че плазмидите включват изменен, но функционален ген за РНК-компонент. Тези резултати илюстрират по какъв начин настоящото изобретение предоставя препарати на рекомбинантни теломерази и методите за получаването на такива препарати. Настоящото изобретение предоставя рекомбинантна човешка теломераза, която включва белтъчните компоненти на човешката теломераза във функционална връзка с рекомбинантен РНК-компонент на изобретението. Такива рекомбинантни молекули на РНК-компонента на изобретението включват тези, които се различават от природните молекули на РНК-компонента по една или повече субституции на бази, делеции или инсерции, както и молекули на РНК-компонента, идентични на природна молекула РНК-компонент, които се продуцират в рекомбинантните клетки-гостоприемници. Методът за получаване на такива рекомбинантни теломеразни молекули включва трансформиране на еукариотна клетка-гостоприемник, която експресира белтъчните компоненти на теломеразата, с рекомбинантен експресионен вектор, който кодира молекула на РНК-компонент на изобретението, и култивиране на споменатите клетки-гостоприемници, трансформирани със споменатия вектор при условия такива, че да се експресират белтъчните компоненти и РНК-компонента, които да се свържат формирайки активна теломеразна молекула, способна да прибавя последователности (незадължително същата последователност, която се добавя от нативната теломераза) към теломерите на хромозомната ДНК. Други ценни приложения на такива рекомбинантни ДНК експресионни вектори (или плазмиди), включват плазмиди, които включват гена за РНК-компонента на човешката теломераза с делеция, инсерция или друга модификация, която превръща гена в нефункционален. Такива плазмиди са особено ценни за генна

терапия при хората и се използват, за да се "нокаутира" ендегенният ген за РНК-компонента, макар че за да се умъртвят третираните клетки необратимо е необходима високоефективна система за трансформация и рекомбинация.

Приложения на рибозими

Други олигонуклеотиди на изобретението, наречени рибозими, могат също да се използват за инхибиране на теломеразната активност. За разлика от антисенс- и другите олигонуклеотиди, описани по горе, които се свързват с РНК, ДНК или теломеразен белтъчен компонент, рибозимът не само се свързва, но също и специфично разкъсва и по този начин потенциално инактивира прицелна РНК, такава като РНК-компонент на човешката теломераза. Такъв рибозим може да включва 5'- и 3'- крайни последователности, комплементарни на теломеразната РНК. В зависимост от мястото на скъсване един рибозим може да инактивира теломеразния ензим. Виж РСТ-патентна публикация No. 93/32572, по-горе. След преглед на РНК-последователността на човешкия теломеразен РНК-компонент, специалистите ще забележат, че в нея са налице няколко използвани рибозимни прицелни места, чувствителни на скъсване, например, от рибозим с мотив "глава на чук" (hammerhead). Илюстративните рибозими на изобретението от този тип включват рибозимите по-долу, които представляват РНК-молекули с посочената последователност:

- 1: 5'-UAGGGUACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACAAAAAU-3';
- 2: 5'-UUAGGGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGACAAAA-3';
- 3: 5'-UCUCAGUCUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAAGGGUUA-3'; и
- 4: 5'-CCCGAGACUGAUGAGUCCGUGAGGACGAAACCCGCG-3'

Други оптимални прицелни места за рибозим-опосредствано инхибиране на теломеразната активност могат да се определят, както е описано от Sullivan *et al.*, РСТ-патентна публикация No. 94/02595 и Draper *et al.*, РСТ-патентна публикация No. 93/23569, и двете включени тук за справка. Както е описано от Hu *et al.*, РСТ-патентна публикация No. 94/03596, включена тук за справка, антисенс и

рибозимни функции могат да бъдат комбинирани в един олигонуклеотид. Нещо повече, рибозимите могат да включват един или повече модифицирани нуклеотиди или модифицирани връзки между нуклеотидите, както е описано по-горе във връзка с описанието на илюстративните антисес-олигонуклеотиди на изобретението. В един аспект се модифицира каталитичната субединица на РНаза Р (човешка или на *E. coli*) (виж, Altman S (1995) *Biotechnology* 13: 327), за да се получи водеща последователност, която съответства на частта от теломеразния РНК-компонент при бозайници, която образува базови двойки с теломерната повторена последователност. В един аспект се модифицира каталитичната субединица на РНаза Р (човешка или на *E. coli*), за да се получи водеща последователност, която е комплементарна на част от теломеразния РНК-компонент, така че вариантът на РНаза Р може да скъсва теломеразния РНК-компонент. Такива рибозими, получени по генно-инженерен път, могат да се експресират в клетки или могат да се пренесат чрез разнообразие от способности (напр., липозоми, имунолипозоми, биолистикс, директно поемане от клетките и т.н.). Други форми на рибозимите (рибозими от типа на интроните от група I (Cech T (1955) *Biotechnology* 13; 323; рибозими от типа "глава на чук" (hammerhead) (Edgington SM (1922) *Biotechnology* 10: 256) могат да се проектират на базата на представената информация за последователността на теломеразния РНК-компонент, така че да катализират скъсването на човешкия теломеразен РНК-компонент и/или на човешки последователности от теломерни повтори.

Изобретението предоставя широко разнообразие от олигонуклеотиди за инхибиране на теломеразната активност. Такива олигонуклеотиди могат да се използват в терапевтичните методи на изобретението за лечение на заболявания, които методи включват въвеждане в пациент на терапевтично ефективна доза от теломеразен инхибитор или активатор на изобретението. За да се определи количеството агент, което би трябвало да се включи в една терапевтично ефективна доза, може да се измери инхибирането или активирането на теломеразата, като се използват протоколите за тестиране, описани в съвисящите патентни заявки на САЩ и РСТ-патентна

публикация No. 93/23572, отбелязана по-горе. Както беше отбелязано в тези приложения и дискутирано по-горе, инхибирането на теломеразната активност превръща една безсмъртна (immortal) клетка в смъртна (mortal), доколкото активирането на теломеразната активност може да удължи репликативния жизнен период на клетката. Терапията посредством инхибиране на теломеразата е едно ефективно лечение за раковите заболявания, които включват неконтролиран растеж на безсмъртни клетки, а активирането на теломеразата представлява ефективно лечение за предотвратяване на преждевременното стареене. Доставянето на агенти, които инхибират или блокират теломеразната активност, такива като антисенс-олигонуклеотид, олигонуклеотид, формиращ тройна спирала, рибозим или плазмид, който направлява експресията на мутантен РНК-компонент на теломеразата, може да преустанови теломеразното действие и задължително води до клетъчно състаряване и клетъчна смърт на третираните клетки.

Терапевтични и профилактични аспекти

Като допълнение настоящото изобретение предоставя терапевтични методи, които правят сигурно, че нормалните клетки ще си останат смъртни; например, РНК-компонентът може да се модифицира, като се използват стандартни генно-инженерни процедури за делетиране посредством генетична рекомбинация на цял или на част от природен ген, кодиращ компонента (напр., чрез мутагенеза *in vitro*). Такива клетки след това ще са необратимо смъртни. Тази процедура е ценна за генна терапия, при която в пациент се въвеждат нормални клетки, модифицирани да съдържат експресионни плаزمиди, и се иска гаранция за това, че не са въведени ракови клетки, или ако такива клетки са въведени, то тези клетки са превърнати необратимо в смъртни.

Тъй като теломеразата е активна само в туморни, герминални и определени стволови клетки на хематопоеичната система, останалите нормални клетки не се засягат при терапията посредством инхибиране на теломеразата. Могат също така да бъдат предприети стъпки, за да се избегне контактът на

теломеразния инхибитор с герминалните или стволови клетки, макар че това може да не бъде съществено. Например, тъй като герминалните клетки експресират теломеразна активност, инхибирането на теломеразата може да повлияе негативно сперматогенезата и жизнеността на спермата, което предполага, че теломеразните инхибитори могат да бъдат ефективни контрацептивни или стерилизиращи агенти. Този контрацептивен ефект, обаче, може да бъде нежелателен при пациент, поел теломеразен инхибитор на изобретението за лечение на рак. В такива случаи теломеразен инхибитор на изобретението може да се достави по начин, който гарантира, че инхибиторът ще се произвежда само през периода на лечението, така че негативното влияние върху герминалните клетки е само временно.

Другите терапевтични методи на изобретението използват теломеразната РНК нуклеинова киселина на изобретението, за да стимулират теломеразна активност и за да удължат репликативния жизнен период на клетката. Тези методи могат да се реализират чрез доставяне в клетката на функционален рекомбинантен теломеразен рибонуклеопротеин на изобретението. Например, рибонуклеопротеинът може да се достави в клетката в липозома или генът за РНК-компонента на човешката теломераза (или рекомбинантен ген с други регулаторни елементи) може да се използва в еукариотен експресионен плазмид (със или без последователност, кодираща експресията на белтъчните компоненти на теломеразата) за активиране на теломеразната активност в различни нормални човешки клетки, в които иначе отсъства детектируема теломеразна активност като резултат от ниски нива на експресия на РНК-компонента или на белтъчен компонент на теломеразата. Ако теломеразният РНК-компонент не е достатъчен за стимулиране на теломеразна активност, тогава за стимулиране на теломеразната активност РНК-компонентът може да се трансфектира заедно с гени, експресиращи белтъчните компоненти на теломеразата. И така, изобретението предоставя методи за лечение на състояние, свързано с теломеразната активност в клетка или в група от клетки,

чрез създаване на контакт между клетката(ите) и терапевтично ефективно количество от агент, който променя теломеразната активност в тази клетка.

Клетките, които включват извънредни копия на гена за теломеразния РНК-компонент, могат да покажат повишаване на теломеразната активност и съпътстващо удължаване на репликативния жизнен период. Такава терапия може да се извърши *ex vivo* върху клетки, които след това ще се въведат с гостоприемник или може да се извърши *in vivo*. Предимствата от стабилизирането или увеличаването на теломерната дължина чрез прибавяне на екзогенни теломеразни гени *ex vivo* в нормални диплоидни клетки включва: стабилизирането на теломерите може да спре клетъчното стареене и да позволи потенциално неограничена амплификация на клетките; и нормални диплоидни клетки с удължен жизнен период могат да се култивират *in vitro* за тестване на медикаменти, за вирусно производство или за други ползотворни цели. Нещо повече, *ex vivo* амплифицираните стволови клетки от различни типове могат да се използват в клетъчната терапия на определени заболявания, както е отбелязано по-горе.

Стабилизацията на теломерите може също така да потисне раковата тенденция в реплициращи се клетки чрез непозволяване на теломерите да станат критично къси, когато клетките наближават криза. По време на кризата се генерира масивна геномна нестабилност, тъй като се загубва предпазният ефект на теломерната "шапка". "Генетичните карти" са разбъркани и почти всички клетки умират. Малкото клетки, които избягват от този процес, са обикновено анеуплоидни с много генни преустройства и приключват с възстановяване стабилността на техните хромозоми чрез експресия на теломераза. Ако кризата може да се избегне чрез съхраняване на теломерите дълги, то тогава може да се избегне също и геномната нестабилност, свързана с кризата, като се ограничават шансовете на една индивидуална клетка да претърпи необходимия брой генетични мутации, нужни за образуването на ракови метастази.

Клетките, които могат да бъдат цели за теломеразна генна терапия (терапия, включваща покачване на теломеразната активност в прицелна клетка)

включват, но не са ограничени до, хематопоеични стволови клетки (сърдечни и церебрални васкуларни заболявания), кожни фибробласти и базални кожни кератиноцити (заздравяване на рани и изгаряния), хондроцити (артрити), мозъчни астроцити и микроглиални клетки (болест на Алцхаймер), остеоласти (остеопороза), ретинални клетки (очни болести) и панкреатични островни клетки (диабет тип I).

Терапевтичните методи на изобретението обикновено включват въвеждането на олигонуклеотид, който функционира, като инхибира или стимулира теломеразната активност при физиологични условия *in vivo* и остава стабилен при тези условия. Както е отбелязано по-горе, модифицираните нуклеинови киселини могат да бъдат полезни за придаването на такава стабилност, както и за осигуряване доставянето на олигонуклеотида в желаната тъкан, орган или клетка. Методите, полезни за доставяне на олигонуклеотиди за терапевтични цели са описани в Inoue *et al.*, патент на САЩ 5 272 065, включен тук за справка.

Освен че олигонуклеотидите могат да се приложат директно като медикамент в подходящ фармацевтичен препарат, олигонуклеотидите могат също така да се прилагат, като се използват генна терапия и рекомбинантни ДНК експресионни плазмиди на изобретението. Един такъв илюстративен плазмид е описан в Пример 8, по-долу. Най-общо такива плазмиди ще включват промотор и, условно, инхансър (различен от всеки, съдържащ се в промоторните последователности), който служи да направлява транскрипцията на олигонуклеотид, както и други регулаторни елементи, които допринасят за поддържане на епизомите или за хромозомна интеграция и високи нива на транскрипция, ако е желателно. За генна терапия често се използват вектори на базата на аденовируси, които са подходящи за използване в комбинация с реактивите и методите на настоящото изобретение. Виж РСТ-патентни публикации с номера 94/12650; 94/12649; и 94/12629. Полезните промотори за такива цели включват металотионеинов промотор, конститутивен аденовирусен главен късен промотор, индуцируем от дексаметазон MMTV-

промотор, промотор на SV40, промотор MRP polIII, конститутивен MSPV-промотор, индуцируем от тетрациклин CMV-промотор (такъв като човешкия непосредствено ранен CMV-промотор) и конститутивен CMV-промотор. Един полезен за генна терапия плазмид може да включва други функционални елементи, такива като маркери за селекция, области за идентификация и други гени. Рекомбинантните ДНК-експресионни плазмиди могат също така да се използват за получаване на олигонуклеотидите на изобретението за приложение чрез способи, различни от генната терапия, въпреки че може би е по-икономично късите олигонуклеотиди да се правят чрез химична синтеза *in vitro*.

В сродни аспекти изобретението набляга на фармацевтични препарати, включващи терапевтично ефективно количество от теломеразен инхибитор или теломеразен активатор на изобретението. Фармацевтичните препарати на теломеразните инхибитори на изобретението включват мутантен РНК-компонент на човешката теломераза, антисенс-олигонуклеотид или олигонуклеотид, формиращ тройна спирала, които свързват РНК-компонента или гена за същия на човешката теломераза, рибозим способен да къса РНК-компонента на човешката теломераза, комбинации на същите или с други лекарства във фармацевтично приемлив носител или сол. Други фармацевтични препарати на изобретението включват препарат на теломеразен активатор, такъв като пречистена човешка теломераза или мРНК за белтъчните компоненти на теломеразата и РНК-компонента на теломеразата, които се използват за лечение на заболяване, свързано със стареенето. В един аспект, мутантен сенс теломеразен РНК-компонент от бозайник се въвежда в клетъчна популация; споменатият мутантен сенс теломеразен РНК-компонент включва най-малко едно базово несъответствие по отношение на повторената последователност на човешката теломераза, но е способен да прояви теломеразна активност в комбинация с полипептиден компонент на човешката теломераза, продуцирайки погрешно включване в избрани нуклеотидни позиции на човешкия теломеразен повтор, като при това се образуват теломери, които за съществена репликация разчитат на непрекъснатото присъствие на мутантния сенс теломеразен РНК-

компонент. Предоставен е метод, при който мутантен сенс теломеразен РНК-компонент се въвежда в клетъчна популация за период, достатъчен, за да се въведат теломерни последователности, които са съществено нефункционални като матрици за природния теломеразен РНК-компонент на бозайници, последвано от отделяне на мутантния сенс теломеразен РНК-компонент, което води до бърза загуба на средната теломерна дължина в клетъчната популация, до ускорено стареене и клетъчна смъртност.

Терапевтичният агент може да се достави в препарат, подходящ за парентерално, назално, орално или друг начин на приложение. Виж РСТ-патентна публикация No. 93/23572, по-горе.

Диагностични методи

В допълнение към фармацевтичните препарати и терапевтични методи, описани по-горе, настоящото изобретение предоставя диагностични методи и реактиви. Изобретението предоставя диагностични методи за определяне нивото, количеството или присъствието на РНК-компонента на човешката теломераза, теломераза или теломеразна активност в клетка, клетъчна популация или тъканна проба. В един сроден аспект настоящото изобретение обезпечава ценни реактиви за такива методи, условно пакетирани под формата на набор от реактиви (kit) заедно с инструкции за ползване на комплекта с цел практикуване на диагностичния метод. Както беше отбелязано по-горе във връзка с тестовете, проведени за да се установи, че клон pGRN7 съдържа кДНК за РНК-компонента на човешката теломераза, нивата на РНК-компонента в туморни клетки са завишени. Ето защо, детектирането на РНК-компонента представлява полезно диагностициране на туморни клетки.

Освен това, сонди или праймери, които се свързват специфично с РНК-компонента на човешката теломераза (или с всяка от веригите на гена за същата), могат да се използват в диагностични методи за детектиране наличието на теломеразна нуклеинова киселина в проба. Праймерите и сондите представляват олигонуклеотиди, които са комплементарни на, така че ще се

свържат с, прицелна нуклеинова киселина. Въпреки че праймерите и сондите могат да се различават по последователност и дължина, първичният диференциращ фактор е този на функцията (им): праймерите служат за инициране синтезата на ДНК както при амплификацията чрез PCR, докато сондите се използват обикновено само за свързване с прицелна нуклеинова киселина. Типичните дължини на един праймер или сонда могат да обхващат от 8 до 20 до 30 или повече нуклеотиди. Един праймер или сонда може също така да се бележи, за да се улесни детекцията (т.е., за тази цел обикновено се използват радиоактивни или флуоресцентни молекули) или пречистването/разделянето (т.е., за тази цел често се използва биотин или авидин).

Един специално предпочитан диагностичен метод на изобретението включва детекцията на последователности на теломеразен РНК-компонент в клетъчни или тъканни проби, взети от пациенти, заподозрени в риск от раково заболяване. Такива методи обикновено включват свързване на белязана сонда или праймер с последователност на РНК-компонент при условия такива, че само перфектно съответстващите си (комплементарни) последователности ще се свържат (хибридизират) една с друга. Детекцията на белязаното вещество, свързано с РНК в пробата, ще корелира с наличието на теломеразна активност и наличието на ракови клетки. Някои клетки могат да експресират РНК-компонента на теломеразата, но да останат отрицателни за теломеразата вследствие липсата на експресия на белтъчните компоненти на теломеразата. Ако е желателно да се детектира наличието на теломеразна активност в такива клетки, то би трябвало най-напред да се изолира белтък и след това да се определи дали белтъчната фракция съдържа теломеразния РНК-компонент, което би сигнализирано за наличието на теломеразна активност. Диагностичните методи на изобретението могат да бъдат от специална полза за детектиране наличието на теломеразна активност в тъканни биопсии и хистологични срези, в които методът се извършва *in situ*, обикновено след амплификация на теломеразния РНК-компонент чрез използване на специфичните праймери за PCR на изобретението.

Изобретението предоставя също така полинуклеотидни сонди за теломеразен РНК-компонент, предназначени за диагноза на болестни състояния (напр., неоплазия или пренеоплазия) чрез детекция на теломеразен РНК-компонент или на преустройства или амплификация на гена за теломеразния РНК-компонент в клетки, взети от пациент, както и за детекция на патогномоничен алел на теломеразен РНК-компонент (напр., чрез RFLP или алел-специфичен PCR-анализ). Детекцията обикновено се извършва чрез хибридизация *in situ*, като се използва белязан (напр., ³²P, ³⁵S, ¹⁴C, ³H, флуоресцентен, биотинилиран, свързан с дигоксигенин) полинуклеотид на теломеразен РНК-компонент, въпреки че може да се използват и пренос на РНК (Northern blotting), капков пренос (dot blotting) или хибридизация в разтвор на тотална РНК или поли А⁺ РНК, изолирана от клетъчна проба. Може да се използва и амплификация посредством PCR чрез праймери, специфични за теломеразния РНК-компонент. Клетки, които съдържат изменено количество теломеразен РНК-компонент в сравнение с не-неопластични клетки от същия клетъчен тип(ове), се идентифицират като клетки, които са кандидати за заболяване. По подобен начин детекцията на патогномонични преустройства или амплификация на генния локус за теломеразния РНК-компонент или на тясно скачени локуси в клетъчна проба идентифицира наличието на патологично състояние или на предразположение към развитието на патологично състояние (напр., рак, генетично заболяване). Полинуклеотидните сонди се използват също така за съдебна идентификация на индивиди, например за тестиране на бащинство, за идентификация на криминално заподозрени или на неразпознати трупове.

В човешката популация може да има малки изменения в основната първична последователност на теломеразния РНК-компонент, които включват алелни варианти, полиморфизми на рестриктазните места и конгенитални болестотворни алели на теломеразния РНК-компонент, свързани с генетично заболяване.

Ако е желателно по преценка на практикуващия могат да се изберат PCR-амплимери за амплификация на съществено пълноразмерни копия на теломеразния РНК-компонент. По подобен начин могат да се изберат амплимери за амплификация на части от гена за теломеразния РНК-компонент или РНК.

Експресия на теломеразния РНК-компонент

Експресионните плаزمиди на изобретението могат да бъдат полезни в зависимост от дължината и предназначенията функция на праймера, сондата или на друга нуклеинова киселина, която включва последователности от РНК-компонента на човешката теломераза. Например рекомбинантната продукция на пълноразмерен РНК-компонент на изобретението може да се извърши като се използва рекомбинантен ДНК експресионен плазмид на изобретението, който включва нуклеинова киселина, съдържаща нуклеотидната последователност на РНК-компонента, която е разположена под контрола на подходящ промотор за транскрипция. Клетките-гостоприемници за такива плазмиди могат да бъдат или прокариотни или еукариотни, а промоторът, както и другите регулаторни елементи и маркери за селекция, избрани за включване в експресионния плазмид, ще зависят от клетката-гостоприемник за продукция.

Интактният ген за РНК-компонента, т.е., промоторът, който включва всяка регулаторна последователност в 5'-областта на гена, заедно с областта, кодираща РНК-компонента, могат да се използват за експресия на РНК-компонента в човешки клетки, в това число в човешки клетки, които са имортализирани чрез вирусна трансформация или рак. Промоторът на гена за РНК-компонента може да се регулира, макар че по тази и по други причини е възможно да се желае експресията на РНК-компонента под контрола на друг промотор. От друга страна промоторът на гена за РНК-компонента може да се използва независимо от кодиращата последователност на РНК-компонента за експресията на други кодиращи последователности, които представляват интерес. Например, би могла да се изследва регулацията на транскрипцията на гена за РНК-компонента, като промоторът на РНК-компонента се слее с

кодираща последователност на кодираща последователност-свидетел, такава като последователност, кодираща бета-галактозидаза или друг ензим или белтък, чиято експресия може лесно да се отчете. И така, промоторът и другите регулаторни елементи на гена за РНК-компонента на човешката теломераза могат да се използват за експресия в човешки клетки не само на РНК-компонента, но също и на белтъчните компоненти на човешката теломераза, на антисенс- или други олигонуклеотиди, както и на други генни продукти, които представляват интерес. Експресионните плазмиди, включващи интактния ген за РНК-компонента на човешката теломераза, могат да са от специална полза за разнообразие от цели, включително за генна терапия. Специалистите се досещат, че за продукцията на полезните нуклеинови киселини на изобретението могат да се използва широко разнообразие от експресионни плазмиди и че терминът "плазмид", така както се използва тук, се отнася за който и да е тип нуклеинова киселина (от фаг, вирус, хромозома и т.н.), която може да носи специфична генетична информация в клетката-гостоприемник и да запазва тази информация за период от време.

Изолиране на теломеразен белтъчен компонент

Реактивите на настоящото изобретение позволяват също клонирането и изолирането на нуклеинови киселини, кодиращи белтъчните компоненти на човешкия, както и на теломеразни ензими от други бозайници, които преди това не са били достъпни. Достъпът до такива нуклеинови киселини допълва ползата, която се допринася от нуклеиновите киселини, включващи последователности от нуклеинови киселини на РНК-компонента на човешката теломераза. Например, както беше отбелязано по-горе, терапевтичните ефекти в някои случаи могат да се подсилят чрез използване на пречистени препарати на белтъчните компоненти на човешката теломераза и чрез достъпа до нуклеинови киселини, които кодират същите. Нуклеиновите киселини на изобретението, които кодират РНК-компонента на човешката теломераза, могат да се използват за изолиране на нуклеинови киселини, кодиращи белтъчните компоненти на

човешката теломераза, което позволява достъп до такива предимства. И така, изобретението предоставя методи за изолиране и пречистване на белтъчните компоненти на човешката теломераза, както и за идентифициране и изолиране на нуклеинови киселини, които кодират белтъчните компоненти на човешката теломераза. В сродни аспекти настоящото изобретение обезпечава пречистена човешка теломераза, пречистени нуклеинови киселини, които кодират белтъчните компоненти на човешката теломераза, рекомбинантни експресионни плазмиди за белтъчните компоненти на човешката теломераза. Изобретението предоставя също така фармацевтични препарати, включващи като активна съставка или белтъчните компоненти на човешката теломераза, или нуклеинова киселина, която или кодира тези белтъчни компоненти, или взаимодейства с нуклеинови киселини, кодиращи тези белтъчни компоненти, такива като антисенс-олигонуклеотиди, олигонуклеотиди, формиращи тройна спирала, рибозими или рекомбинантни ДНК експресионни плазмиди за всеки от горните.

Клонираният РНК-компонент на човешката теломераза може да се използва за идентифициране и клониране на нуклеинова киселина, кодираща белтъчните компоненти на рибонуклеопротеиновия теломеразен ензим. За идентификация и клониране на белтъчните компоненти могат да се използват няколко различни метода. Например, може да се използва афинитетно свързване на ензима или на частично денатуриран ензим чрез използване като афинитетен лиганд или на (1) нуклеотидни последователности, комплементарни на РНК-компонента, за да се свържат с РНК-компонента на интактния ензим; или на (2) РНК-компонента, който да се свърже с белтъчните компоненти на частично или напълно денатуриран ензим. Лигандът може да бъде фиксиран към твърда подложка или да бъде модифициран по химичен път (напр., биотинилиран) за последваща имобилизация върху подложката. Пропускането на клетъчни екстракти, съдържащи човешка теломераза, последвано от миене и елуиране на теломеразния ензим, свързан с подложката, обезпечава високо пречистен препарат на теломеразния ензим. Възможно е белтъчните компоненти да се пречистят допълнително или да се анализират директно чрез белтъчно

секвениране. Определената белтъчна последователност може да се използва за приготвянето на праймери и сонди за клониране на кДНК или за идентифициране на клон в геномна банка, който включва нуклеинови киселини, които кодират белтъчен компонент на теломеразата.

Афинитетно свързване на теломеразата чрез използване на конструиран РНК-компонент (генно-инженерен продукт) може да се извърши също така, като се използват теломеразна РНК, транскрибирана *in vitro*, и система за реконституция на теломеразната ензимна активност. Виж Autexier and Greider, 1994, *Genes & Development* 8:563-575, включен тук за справка. РНК се конструира така, че да съдържа "щампа", подобно на епитопните "щампи" на белтъците. "Щампата" може да бъде РНК-последователност, за която е налице плътно свързващ се лиганд, напр., антитель, специфично за РНК-последователност; белтък, свързващ нуклеинова киселина в специфична последователност или органично багрило, което се свързва плътно със специфична РНК-последователност. Толерантността на теломеразата към последователността на "щампата" и към нейното място могат да се тестват чрез използване на стандартни методи. В тези методи синтезата на изменения РНК-компонент и стъпката на реконституция могат също да се извършат *in vivo*. След това за изолиране на ензима може да се приложи афинитетно свързване чрез използване на имобилизирания лиганд за РНК-"щампата".

За изолиране на белтъчните компоненти на теломеразния ензим може да се използва също така скриниране на експресията. В този метод с белязана теломеразна РНК могат да се скринират експресионни кДНК-библиотеки и да се идентифицират кДНКи, кодиращи белтъци, които се свързват специфично с теломеразната РНК. За изолирането на нуклеинови киселини, кодиращи белтъчните компоненти на теломеразния ензим, може да се използва също така молекулярно-генетичен подход за инхибиране на транслацията. В този метод теломеразната РНК-последователност се разполага пред маркер за селекция. При експресия в подходяща система маркерът ще функционира. Когато се експресира кДНК, кодираща белтък, свързващ теломеразна РНК, белтъкът ще се

свърже с последователността, която разпознава, при което ще блокира транслацията на маркера за селекция и така ще позволи да се идентифицира клонът, кодиращ белтъка. В други приложения на този метод, блокираната транслация на маркера за селекция ще позволи на трансформираната клетка да расте. Други системи, които могат да се приложат, включват "interaction trap system", описана в PCT-патентна публикация No. WO 94/10300; системата "one-hybrid", описана в Li and Herskowitz, 17 Dec. 1993, *Science* **262**:1870-1874, и Zervos *et al.*, 29 Jan. 1993, *Cell* **72**:223-232; и системата "two-hybrid", която може да се закупи от Clontech.

За да се улесни пречистването на теломеразния ензим и идентификацията на нуклеинови киселини, които кодират белтъчните компоненти на ензима, могат да се използват тестове за свързване на теломеразна РНК и за теломеразна активност, за да се детектират специфично свързващи се белтъци и активност. Например, нуклеиновите киселини, които включват последователности на РНК-компонента могат да се използват като афинитетни реактиви за изолиране, идентифициране и пречистване на пептиди, белтъци и на други съединения, които се свързват специфично с последователност, която се съдържа в РНК-компонента, така както (се свързват) белтъчните компоненти на човешката теломераза. За детектирането на подобно свързване и изолиране на компонентите, които се свързват специфично с РНК-компонента, са на разположение няколко различни подхода, в това число изместване в гел (gel shift), филтърно свързване (filter binding), картиране на белтъчната "стъпка" (footprinting), детекция с РНК-сонда след белтъчен пренос (Northwestern) и фотохимично съшиване (photocrosslinking). Тези тестове могат да се използват за идентифициране на свързващи белтъци, за проследяване пречистването на свързващи белтъци, за характеризиране на местата за свързване с РНК, за определяне на молекулния размер на свързващите белтъци, за бележене на белтъци за препаративно изолиране с цел последваща имунизация на животни. С имунизацията се цели образуването на антитела, които да се използват, в

спрегната система на транскрипция/транслация, за изолирането на белтъка или идентифицирането на нуклеинова киселина, кодираща белтъка.

Пречистване на теломеразен белтъчен компонент от бозайници

Теломеразен белтъчен компонент от бозайници може да се пречисти чрез конвенционални биохимични методи от клетки, експресиращи теломераза, такива като HT1080-клетки, 293-клетки и други подходящи имортализирани клетъчни линии. За пример и не като ограничение, човешка теломераза може да се пречисти от клетъчни екстракти съществено съгласно метода, разкрит в Патентната заявка на САЩ 08/288 501, подадена на 10 август 1994, която е включена тук за справка. Екстрактите на теломераза от бозайници могат да бъдат очистени от теломеразния РНК-компонент чрез обработка с РНКзна активност или по друг подходящи начини за дисоцииране и/или разграждане на теломеразния РНК-компонент при запазване на теломеразния белтъчен компонент съществено интактен и способен на реконституция с екзогенно добавен РНК-компонент, такъв, който може да се получи рекомбинантно или по подобен начин. Пречистеният по този начин теломеразен белтъчен компонент и условно очистен от ендогенен теломеразен РНК-компонент може да се използва в тестовете за скрининг на агентите, описани тук, както и за други цели.

Генна терапия

Пренасянето на екзогенен генетичен материал в клетките (т.е., трансфекция опосредствана от ДНК) представлява основен метод за фундаментални изследвания в клетъчната биология, както и база за развитието на ефективни методи за генна терапия при хората. Досега по-голямата част от одобрените изпитания за пренос на гени в САЩ се основават на ретровирусни вектори, дефицитни по репликацията, които носят терапевтична полинуклеотидна последователност като част от ретровирусния геном (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). Описани са също така и аденовирусни вектори за потенциално използване в човешката генна терапия (Rosenfeld *et al.*, (1992) *Cell* 68: 143).

Друг метод за пренос на гени, който е одобрен за използване при хората, е физичният пренос на плазмидна ДНК в липозоми директно в туморните клетки *in situ*. За разлика от вирусните вектори, които трябва да се намножат в култивирани клетки, плазмидната ДНК може да се пречисти до хомогенност и по този начин да се редуцира потенциалната възможност от патогенна контаминация. В някои ситуации (напр., туморни клетки) може да е необходимо екзогенната ДНК да се интегрира стабилно в трансдуцираната клетка, тъй като преходната експресия може да бъде достатъчна, за да убие туморните клетки. Преносът на ДНК, опосредстван от липозоми, е описан от различни изследователи (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).

Липозомите са описани също така като носители на екзогенни полинуклеотиди (Wang and Huang (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 84: 7851; Trubetskoy *et al.* (1992) *Biochem. Biophys. Acta* 1131: 311. Би могло да се очаква, че имунолипозомите ще имат хипотетично подобрена специфичност към клетъчните типове в сравнение с липозомите с оглед на това, те че включват специфични антитела, които вероятно се свързват с повърхностни антигени върху специфични типове клетки. Behr *et al.* (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86: 6982 съобщават за използването само на липополиамин като реактив за опосредстване на трансфекцията, без необходимостта от какъвто и да е допълнителен фосфолипид за формиране на липозоми.

В съгласие с гореказаното, полинуклеотид, съществено идентичен на най-малко 25 нуклеотида, за предпочитане на 50 до 100 нуклеотида и повече от последователността на теломеразния РНК-компонент или нейния комплемент, се свързва оперативно с хетероложен промотор, за да образува транскрипционна единица, която е способна да експресира теломеразен РНК-компонент или

антисенс-полинуклеотид на теломеразния РНК-компонент в човешка клетка. Такава транскрипционна единица може да бъде включена в трансген, аденовирусен вектор или друга модалност за генна терапия, за да се достави в човешките клетки, например за лечение на заболяване, опосредствано от теломеразата (напр., неоплазия). Подходящите методи за доставяне на конструкция за експресия на теломеразен сенс или антисенс РНК-компонент ще се изберат от специалистите като се имат предвид приетата практика и изискванията за регулация.

Приложения на трансгенни животни

Геномни клонове на теломеразен РНК-компонент от бозайници, особено на гени за теломеразен РНК-компонент, които са съществено идентични на мишия теломеразен РНК-компонент, могат да се използват за конструирането на хомоложни прицелни конструкции с цел получаването на клетки и трансгенни животни, които имат поне един функционално разрушен алел за теломеразен РНК-компонент. Указания за конструирането на хомоложни прицелни конструкции могат да бъдат намерени в областта на техниката, в това число: Rahemtulla *et al.* (1991) *Nature* **353**: 180; Jasin *et al.* (1990) *Genes Devel.* **4**: 157; Koh *et al.* (1992) *Science* **256**: 1210; Mookina *et al.* (1992) *Nature* **357**: 161; Grusby *et al.* (1991) *Science* **253**: 1417; Bradley *et al.* (1992) *Bio/Technology* **10**: 534, включени тук за справка). Хомоложното прицелване може да се използва за получаването на така наречените "нокаут" мишки, които са хетерозиготни или хомозиготни по инактивиран алел за теломеразен РНК-компонент. Такива мишки могат да се продават търговски като животни за изследвания с цел изучаване развитието на имунната система, неоплазията, сперматогенезата, могат да се използват като домашни любимци, могат да се използват като животински белтък (хранителен белтък) и за други цели.

Химерни прицелни мишки се получават съгласно Hogan, *et al.*, и *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) и *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J.

Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987), които са включени тук за справка. Ембрионалните стволови клетки се манипулират съгласно публикувани процедури (*Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, E.J. Robertson, ed., IRL Press, Washington, D.C., (1987); Zijlstra *et al.* (1989) *Nature* **342**:435; и Schwartzberg *et al.* (1989) *Science* **246**: 799, всеки от които е включен тук за справка.

Като допълнение към това, кДНК за теломеразен РНК-компонент или геномно генно копие могат да се използват за конструиране на трансгени за експресия на високи нива теломеразен РНК-компонент и/или под ^Aтранскрипционния контрол на транскрипционни контролни последователности, които природно не се явяват в съседство с гена за теломеразния РНК-компонент. Като пример, но не като ограничение, един конститутивен промотор (напр., HSV-*tk*- или рgk-промотор) или транскрипционна регулаторна последователност, специфична за даден клетъчен ред (напр., промотор/инхансър на гените за CD4 или CD8) могат да бъдат свързани оперативно с полинуклеотидна последователност на теломеразен РНК-компонент, за да се образува трансген (обикновено в комбинация с маркер за селекция, такъв като експресионната касета на *neo*-гена). Такива трансгени могат да се въведат в клетките (напр., ES-клетки, хематопоеични стволови клетки) и съгласно конвенционални методи да се получат трансгенни клетки или трансгенни животни (но не хора). Трансгенните клетки и/или трансгенни животни могат да се използват за скриниране на антинеопластични агенти и/или за скриниране на потенциални карциногени, тъй като свръхекспресията на теломеразен РНК-компонент или неадекватната експресия на теломеразен РНК-компонент може да доведе до пренеопластично състояние или неопластично състояние.

Тестове за скрининг на агенти

Полинуклеотидите на теломеразния РНК-компонент, препаратите на теломеразни белтъчни компоненти, матриците на теломерни повтори, реакциите на свързване и др. подобни се практикуват съгласно **Експерименталните**

Примери. Най-общо, теломеразните белтъчни компоненти се получават чрез конвенционално пречистване от клетки на бозайници, експресиращи теломераза и се очистват от асоциирания РНК-компонент преди използването им в тестовете, описани тук. Конкретните условия на водна среда могат да се изберат от практикуващия съгласно конвенционални методи. За главна насока могат да се използват следните условия на буферирана водна среда: 10-250 mM NaCl, 5-50 mM Tris HCl, рН 5-8, с условно добавяне на двувалентен(и) катион(и) и/или метални хелатори и/или нейонни детергенти и/или мембранни фракции. По преценка на специалистите към тези основни условия могат да се направят добавки, отстранявания, модификации (такива като рН) и замествания (такива като заместване на NaCl с KCl или заместване на буфера). Модификациите на основните условия на реакциите на свързване могат да се правят до тогава, докато в контролната(ите) реакция(и) се наблюдава образуване на специфичен теломеразен холоензим и/или теломеразна активност. Условията, които не позволяват специфично свързване и разкъсване в контролните реакции (не съдържащи агент) не са подходящи за използване в тестовете по свързване.

За определяне свързването на теломеразен РНК-компонент с имобилизиран теломеразен белтъчен компонент се предпочита видът теломеразен РНК-компонент да се бележи с маркер, който може да се детектира, обикновено биотинилова група, флуоресцентна група или радиоактивно белязан включен нуклеотид. Подходящото бележение на теломеразен белтъчен компонент включва, но не се ограничава до радиоактивно бележение чрез включване на радиоактивно белязана аминокиселина (напр., ^{14}C -белязан левцин, ^3H -белязан глицин, ^{35}S -белязан метионин), радиоактивно бележение чрез посттранслационно радиоактивно йодиране с ^{125}I или ^{131}I (напр., реакцията на Bolton-Hunter и хлорамин Т), бележение чрез посттранслационно фосфорилиране с ^{32}P (напр., фосфоролиза и неорганичен радиоактивно белязан фосфат), флуоресцентно бележение чрез включване на флуоресцентен белег (напр., флуоресцин или родамин) или бележение чрез други конвенционални методи, известни в областта на техниката. В приложенията, в които единият от полипептидните видове е

имобилизиран чрез свързване със субстрат, другият компонент по правило се бележи с маркер, който може да се детектира).

Създават се условия за контакт между белязан теломеразен РНК- или белтъчен компонент и имобилизиран теломеразен ензим или РНК-компонент, съответно, и (се измерва) капацитетът на агент да променя количеството радиоактивен компонент, който се имобилизира (т.е., който се свързва с родствения теломеразен компонент и се каптира). Времето и температурата на инкубация на реакцията на свързване могат да варират до тогава, докато избраните условия позволяват да протече специфично свързване в контролната реакция, където не присъства агент. Предпочетените приложения ползват температура на реакцията от около поне 15 градуса, повече се предпочитат 35 до 42 градуса и време на инкубация от приблизително поне 15 секунди, макар че се предпочитат и по-дълги периоди на инкубация, така че в някои приложения се достига равновесието на свързване. Кинетиките на свързване и термодинамичната стабилност на свързаните комплекси определят свободата, с която се разполага за вариране на времето, температурата, солта, рН и други реакционни условия. За всяко конкретно приложение, обаче, желаните реакционни условия на свързване лесно могат да се калибрират от практикуващия като се използват конвенционални методи от областта на техниката, които могат да включват анализ на свързването използвайки анализа на Scatchard, анализа на Hill и други методи (*Proteins, Structures and Molecular Principles*, (1984) Creighton (ed.), W.H. Freeman and Company, New York).

Специфичното свързване на белязан теломеразен белтъчен компонент с имобилизиран теломеразен РНК-компонент, съответно, се определя чрез включване на небелязан конкурентен белтък (напр., албумин) и/или небелязана РНК. След като реакцията на свързване протече докрай, се детектира количеството белязан(и) вид(ове), който/които е/са специфично свързани с имобилизирания вид. За пример, а не като ограничение, след подходящ инкубационен период на свързване се отстранява водната фаза, съдържаща неимобилизиран белязан теломеразен белтъчен компонент като субстратът,

съдържащ имобилизиращия свързан вид на теломеразния холоензим и всеки свързан с него белязан теломеразен белтъчен компонент се промива с подходящ буфер, условно съдържащ небелязан блокиращ агент(и) и промиващият буфер се отстранява. След промиването се определя количеството детектируем белег, който остава специфично свързан с имобилизиращия белязан компонент (напр., чрез оптични, ензимни, автордиографски или други радиохимични методи).

В някои приложения е включено добавянето на небелязани блокиращи агенти, които инхибират неспецифичното свързване. Примерите за такива блокиращи агенти включват, но не се ограничават до следните: ДНК от телешки тимус, ДНК от сперма на съомга, дрождена РНК, олигонуклеотиди с различни дължини и смесена последователност (случайна или псевдослучайна), говежди серумен албумин, нейонни детергенти (NP-40, Tween, Triton X-100 и т.н.), белтъци от обезмаслено сухо мляко, реактив на Denhardt, поливинилпиролон, Фикол и други блокиращи агенти. Практикуващите могат по свое осмтрение да изберат блокиращи агенти в подходящи концентрации, които да се включват в тестовете по свързване.

В приложенията, в които се имобилизира теломеразен РНК-компонент или теломеразен белтъчен компонент, може да се използва ковалентно или нековалентно свързване със субстрата. Химичните методи за ковалентно свързване включват, но не се ограничават до добре охарактеризираните методи, известни в областта на техниката (Kadonaga and Tijan (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* **83**: 5889). Един пример, не като ограничение, е ковалентното свързване със субстрат, дериватизиран с бромциан (такъв като CNBr-дериватизирана Сефароза 4В). Може да бъде желателно използването на рамо (спейсер), за да се редуцира потенциалното стерично пречене на субстрата. Нековалентното свързване на белтъци към субстра включва, но не се ограничава до, свързване на белтъка със заредена повърхност и свързване със специфични антитела.

В едно приложение кандидат-терапевтичните агенти се идентифицират чрез тяхната способност да блокират свързването на теломеразен белтъчен компонент с теломеразен РНК-компонент.

Един теломеразен РНК-компонент, използван в тези методи, обикновено включва природна последователност на теломеразен РНК-компонент от бозайници (напр., човешки РНК-компонент), макар че понякога се използват мутантни последователности на теломеразен РНК-компонент ако мутантният теломеразен РНК-компонент се свързва с теломеразния белтъчен компонент при контролните условия на теста (напр., физиологични условия).

В едно приложение кандидат-агентите за модулиране на теломеразата се идентифицират по тяхната способност да причиняват в метаболитно активна клетка от бозайник, съществено значима редукция или усилване на транскрипцията на полинуклеотидна последователност-свидетел (напр., ген за бета-галактозидаза, ген за луцифераза, HPRT-ген), оперативно свързана с транскрипционна регулаторна последователност на ген за теломеразен РНК-компонент от бозайник, за предпочитане ген за човешки теломеразен РНК-компонент. В рестриктазно място или в място по запълнени краища (blunt-ended) на двойноверижна кДНК на теломеразен РНК-компонент от бозайник може да се включи ген-свидетел (напр., HPRT). За да се образува хомоложна прицелна конструкция или трансген в жива клетка от бозайник, ген-свидетелят се поставя под транскрипционния контрол на промотора на ендогенния ген за теломеразен РНК-компонент и свързаните с него транскрипционни регулаторни елементи. По този начин агенти, които предизвикват доза-зависима модулация на транскрипцията на ген-свидетеля се идентифицират като кандидати за модулиране на теломеразата.

В един вариант ендогенен ген за теломеразен РНК-компонент в клетка от бозайник се прицелва с хомоложна прицелна конструкция, за да се постави полинуклеотидна последователност-свидетел в оперативна връзка с транскрипционна регулаторна последователност (напр. промотор), разположена пред (upstream) ендогенния ген за теломеразен РНК-компонент в хромозомния локус на ендогенния ген. В алтернативен вариант един екзогенен полинуклеотид, включващ полинуклеотид-свидетел се свързва оперативно с транскрипционна регулаторна област на ген за теломеразен РНК-компонент от бозайник (напр.,

промотор и разположени пред него места за свързване на транскрипционни фактори); екзогенният полинуклеотид се пренася в клетка от бозайник, при което той може да се интегрира нехомоложно в хромозомен локус и/или да се запази или реплицира като епизомен полинуклеотид. По този начин агенти, които предизвикват съществено значима модулация на транскрипцията на полинуклеотида-свидетел в клетки, третирани с агента, се идентифицират като кандидат-агенти за модулиране на теломеразата от бозайници.

Агентите за модулиране на теломеразата, които редуцират клетъчния капацитет за репарация на теломерно увреждане или инхибират теломерната репликация (напр., чрез конкурентно инхибиране на ендогенната, природна теломеразата) са кандидати за антинеопластични агенти или за сенсibiliзирани агенти, които сенсibiliзират клетките (напр., неопластични клетки) към агентите, увреждащи теломерите (напр., алкилиращи агенти или йонизираща радиация).

Кандидатите за неопластични агенти след това се тестват допълнително за антинеопластична активност в тестове, които се използват рутинно за предсказване на (тяхната) пригодност за използване като антинеопластични медикаменти при хората. Примерите за тези тестове включват, но не се ограничават до: (1) способност на кандидат-агента да инхибира способността на трансформирани клетки, независими (в растежа си) от прикрепяне, да растат в мек агар, (2) способност да редуцира туморогенността на трансформирани клетки, трансплантирани в мишки *nu/nu*, (3) способност за обратимост на морфологичната трансформация на трансформирани клетки, (4) способност да редуцира растежа на тумори в мишки *nu/nu*, (5) способност да инхибира образуването на тумори или пренеопластични клетки в животински модели на спонтанна или индуцирана по химичен път карциногенеза, и (6) способност да индуцира по-диференциран фенотип в трансформирани клетки, към които е приложен агента.

Тестовите за детектиране способността на агенти да инхибират или усилват свързването теломеразен белтъчен компонент/теломеразен РНК-

компонент и/или ензимната активност на теломеразата улесняват високоефективния скрининг на банки от агенти (напр., библиотеки от съединения, пептидни библиотеки и др. подобни) за идентифициране на теломеразни антагонисти или агонисти. Такива антагонисти или агонисти могат да модулират теломеразната активност и по този начин да модулират компетентността за репарация на теломерите и репликативния потенциал.

Въвеждането в пациент на ефикасна доза от агент, способен да инхибира специфично теломеразната активност, може да се използва като терапевтичен или профилактичен метод за лечение на патологични състояния (напр., рак, възпаление, лимфопролиферативни заболявания, аутоимунно заболяване, невродегенеративни болести и др. подобни), които се повлияват ефективно чрез модулиране на теломеразната активност и на ДНК-репарацията и репликацията.

Както ще стане ясно за специалистите след изчитане на това изложение, настоящото изобретение предоставя ценни реактиви, имащи отношение към човешката теломераза, както и разнообразие от полезни терапевтични и диагностични методи. Горното описание по необходимост представлява ограничен пример на такива методи, които не трябва да се тълкуват като ограничаващи обхвата на изобретението. Останалите особености и предимства на изобретението ще станат очевидни от примерите и претенциите, които следват.

За специалистите следващите примери описват специфични аспекти на изобретението, за да илюстрират изобретението и предоставят описание на методите, използвани за изолиране и идентифициране на РНК-компонента на човешката теломераза. Примерите не бива да се тълкуват като ограничаващи изобретението, доколкото примерите по-скоро предоставят специфична методология, полезна за разбирането и практикуването на изобретението.

ЕКСПЕРИМЕНТАЛНИ ПРИМЕРИ

Преглед

Клонирането на РНК-компонента на човешката теломераза изискваше нов метод, включващ негативна селекция и цикли на позитивна селекция, описани по-долу. Първоначално, обаче, беше направен опит РНК-компонентът да се клонира като се използва обратна транскрипция и метод за клониране на краищата на кДНК, наречен 5'-RACE PCR-амплификация. Реакцията на обратна транскрипция се инициира с праймер, идентичен на повторената единица в едноверижната част на човешката теломерна ДНК и затова комплементарна на последователност, за която се смята, че присъства в РНК-компонента на човешката теломераза. Праймерът включва също така в своя 5'-край последователност, съответстваща на място, което се разпознава от рестриктазен ензим. Когато обаче кДНК, получена чрез реакцията на обратна транскрипция и PCR-амплификация, се изследва чрез електрофореза в гел и чрез анализ на нуклеотидната последователност на ивиците нуклеинови киселини, присъстващи в гела, се детектират само рибозомални РНК-последователности. Подобни проблеми се срещат и когато се опитват варианти на този 5'-RACE-подход чрез използване на вътрешни праймери.

Успешното усилие за клониране започна с приготвянето на кДНК от пречистени препарати на човешка теломераза, както и от клетъчни линии, които имат човешка теломеразна активност и от клетъчни линии, които нямат човешка теломеразна активност. Методът, използван за получаване на кДНК е описан с детайли в Пример 1, по-долу. Използват се две стъпки на негативна селекция и последователни цикли на позитивна селекция във връзка с препаратите на кДНК от двете човешки клетъчни линии, за да се намали концентрацията на нежелани последователности и да се повиши концентрацията на желаните последователности на РНК-компонента.

Стъпките на негативна селекция включват приготвянето на биотинилиран PCR-продукт от кДНК, получена от човешка клетъчна линия, която няма детектируема теломеразна активност. Биотинилираният PCR-продукт се денатурира и след това се рехибридизира в разтвор, съдържащ много по-ниска концентрация небиотинилиран PCR-продукт (100 биотинилиран продукт:1

небиотинилиран продукт) от кДНК, получена от човешка клетъчна линия, която има теломеразна активност. Като се има предвид възможността, че клетъчната линия, негативна за теломеразата, би могла да съдържа известно ниско количество РНК-компонент, се извършва стъпката на хибридизация, за да се избегне или отбере само РНК, която се експресира обилно и в двете клетъчни линии. След хибридизация при C_{0t} , избрано така, че да позволи хибридизация на най-обилно експресиращата се РНК, нежеланият материал се отстранява чрез свързване със стрептавидинилирани магнитни частици; надстоящата течност, която остава след събиране на частиците, съдържа желаната кДНК за РНК-компонента на човешката теломераза. Процесът на амплификация на кДНК чрез PCR е описан в Пример 2, по-долу.

Този материал се обогатява допълнително на желаната кДНК чрез последователни цикли на позитивна селекция. В стъпката на позитивна селекция, биотинилирана сонда, комплементарна на предсказаната матрична последователност в РНК-компонента на човешката теломераза се хибридизира с PCR-продукта от проба, обогатена (чрез негативна селекция) на PCR-амплифицирана кДНК от човешка клетъчна линия, която има теломеразна активност. След хибридизацията сонда/прицелен комплекс се свързват с авидинилирани магнитни перли, които след това се събират и използват като източник на нуклеинова киселина обогатена на последователности на РНК-компонент в допълнителни цикли на позитивна селекция. Процесът на позитивна селекция е описан с повече подробности в Примери 3 и 4, по-долу.

След третия цикъл на позитивна селекция продуктите от амплификацията се разделят чрез електрофореза в гел и от гела се отстраняват областите, съответстващи на нуклеинови киселини с големина ~ 200 бд (базови двойки). След това нуклеиновите киселини се елуират от гелните късчета и се амплифицират чрез PCR. Продуктите от амплификацията с PCR се смилат с рестриктазния ензим *NotI* и след това се включват чрез лигиране в мястото *NotI* на плазмида pBluescriptII SK+, който може да се закупи от Stratagene. Получените плазмиди се трансформират в гостоприемни клетки на *E. coli* и се изолират

индивидуални колонии, които се използват като източник на нуклеинова киселина за допълнителен анализ и секвениране на ДНК. Редица клонове, положителни при този тест, след това се анализират чрез секвениране на ДНК и чрез различни други тестове.

Тези други тестове включват следните: (1) определяне дали антисенс-олигонуклеотиди, комплементарни на предполагаемия РНК-компонент биха инхибирали теломеразна активност в екстракти от човешки клетки, за които се знае, че съдържат теломераза; (2) определяне дали PCR-праймери, специфични за последователността, съдържаща се в клона на предполагаемия РНК-компонент, биха могли да се използват за амплификация на нуклеинова киселина, присъстваща в теломеразна проба и дали полученият продукт, ако изобщо има такъв, би маркирал теломеразна активност по време на пречистването на теломераза; и (3) определяне дали PCR-праймери, специфични за последователността, съдържаща се в клона на предполагаемия РНК-компонент, биха могли да се използват за амплификация на нуклеинова киселина, присъстваща в клетъчни екстракти от клетки, в които се знае, че теломеразната активност е висока (т.е., туморни клетки) в по-голямо количество, отколкото в клетъчни екстракти от клетки, за които се знае, че не произвеждат или произвеждат само ниски количества теломеразна активност. Един клон, означен плазмид рGRN7, дава резултати в тези тестове, които са в съгласие с определението, че плазмидът включва кДНК, съответстваща на РНК-компонента на човешката теломераза.

И така, антисенс-олигонуклеотиди, съответстващи на последователности от предполагаемата последователност на РНК-компонента в рGRN7 показват инхибиране на теломеразна активност *in vitro*. По подобен начин, когато от клетъчни екстракти се пречисти теломераза чрез процес, включващ (1) хроматография на DEAE; (2) хроматография на Sephadex S300; и (3) разделяне чрез глицеролов градиент, на SP-Sepharose или на Phenyl-Sepharose; и се съберат фракциите, PCR-праймери, специфични за предполагаемата последователност на РНК-компонента в рGRN7 амплифицират нуклеинова киселина със съответната

големина, като количеството на амплифицирания продукт добре корелира с количеството теломеразна активност, наблюдавана в събраните фракции. Накрая, клетъчни екстракти от нормални (не се детектира теломеразна активност) и ракови (присъства теломеразна активност) клетки показват съответни количества PCR-продукт след обратна транскрипция и PCR-амплификация (RT-PCR) с праймери, специфични за предполагаемия РНК-компонент, включен в рGRN7. Протоколът за RT-PCR е описан в Примери 5 и 6, по-долу.

Горните резултати привеждат убедително доказателство, че РНК-компонентът на човешката теломераза е клониран, така че плазмидът рGRN7 след това се използва за изолиране на геномен клон на РНК-компонента от човешка клетъчна линия, както е описано в Пример 7, по-долу. Геномният клон се идентифицира в, и изолира от, геномна библиотека на човешка ДНК, включена в ламбда-вектора FIXII, закупен от Stratagene. Желаният клон, включващ генната последователност за РНК-компонента, съдържа инсерт от ~ 15 кб (килобази) и се означава като клон 28-1. Този клон е депозиран в Американската сбирка на типовите култури (American Type Culture Collection) и е на разположение под ключов No. 75925. От този фаг се субклонират различни рестриктазни фрагменти и се секвенират. Локализира се също така генът в дисталния край на рамото q на хромозома 3. По-горе е показана информацията за последователността, разположена между място, разпознаващо се от рестриктазния ензим *SauIII*A1 в единия край на инсерта от ~ 15 кб и вътрешно място, разпознаващо се от рестриктазния ензим *HindIII*. Двете места обхващат цялата последователност на зрелия РНК-компонент, както и транскрипционните контролни елементи на гена за РНК-компонента в ламбда-клона 28-1.

Пример 1

Приготвяне на кДНК за амплификация с PCR

РНК се получава от клетки 293 и IMR-90 чрез екстракция с гуанидин-тиоцианат или от пречистени теломеразни фракции чрез екстракции с

фенол/хлороформ. Тоталната РНК от клетки 293 се фракционира по големинна в 2% агарозен гел и се изолира РНК с големина, по-малка от 500 бд.

Синтезата на първа верига кДНК се извършва с обратната транскриптаза Superscript™, получена от Bethesda Research Laboratories (BRL). Около 0,5 до 1,0 мкг РНК се смесва с приблизително 40 нг случайни праймери (6-мер; рdN₆) във вода при краен обем 11 мкл. Разтворът се нагрява за 10 мин на 95⁰С и след това се охлажда на лед за 5-10 мин. Денатурираната нуклеинова киселина се събира чрез центрофугиране. Денатурираната РНК и сместа от праймери след това се ресуспендират чрез добавяне в посочения ред на: 4 мкл 5х буфер за синтеза на първа верига; 2 мкл 0,1 М дитиотреитол (ДТТ); 1 мкл РНКзин (Pharmacia); и 1 мкл dNTP (2,5 mM всеки от изходните разтвори). Реакционната смес се инкубира на 42⁰С за 1 мин, след това се добавя 1 мкл (200 единици) обратна транскриптаза (RTase) Superscript™(BRL) и се размесва в реакцията, която след това се инкубира 60 мин на 42⁰С. Получената реакционна смес, съдържаща наново синтезираната кДНК, се поставя на лед, докато се извърши синтезата на втората верига.

Синтезата на втора верига кДНК се извършва както следва. Около 20 мкл от реакционната смес за синтеза на първа верига кДНК (от горната) се смесват в посочения ред със следните компоненти: 111,1 мкл вода; 16 мкл 10х буфер за ДНК-лигаза от *E. coli*; 3 мкл dNTP (2,5 mM всеки изходен разтвор); 1,5 мк ДНК-лигаза от *E. coli* (15 единици от BRL); 7,7 мкл ДНК-полимераза от *E. coli* (40 единици от Pharmacia); и 0,7 мкл РНаза Н от *E. coli* (BRL). Получената смес се разбърква внимателно и се инкубира 2 часа на 16⁰С, през което време в епруветката с реакцията се добавя 1 мкл (10 единици) Т4 ДНК-полимераза и инкубацията продължава 5 мин на същата температура (16⁰С). Реакцията се спира и нуклеиновата киселина се събира чрез екстракция на реакцията с фенол/хлороформ два пъти, нуклеиновата киселина се утаява с етанол и реакционната смес се центрофугира за утаяване на нуклеиновата киселина.

Утайката с кДНК, събрана чрез центрофугиране, се ресуспендира в 20 мкл ТЕ-буфер и се лигира с двойнозерижен олигонуклеотид, наречен "NotAB", съставен от два олигонуклеотида (NH₂ е аминоксидна група):

NotA: 5'-pATAGCGGCCGCAAGAATTCA-NH₂

NotB: 5'-TGAATTCTTGCGGCCGCTAT-3'

Двойнозерижният олигонуклеотид се приготвя чрез смесване на 50 мкл от олигонуклеотида NotA (100 пмола) с 50 мкл от олигонуклеотида NotB (100 пмола) в 46,25 мкл вода, полученият разтвор се загрява 5 мин на 95⁰С и се добавят 3,75 мкл от буфер 20x SSC, докато разтворът все още е горещ. Епруветката, съдържаща сместа, след това се поставя в мензура, съдържаща гореща вода (при температура около 70-75⁰С), температурата, която се оставя бавно да падне до под 15⁰С, така че двата олигонуклеотида биха могли да хибридизират, за да образуват двойнозерижния олигонуклеотид NotAB. Получената нуклеинова киселина се събира чрез преципитация и центрофугиране.

Двойнозерижният олигонуклеотид NotAB се ресуспендира в около 30 мкл буфер ТЕ и след това се лигира с кДНК в реакционна смес, съдържаща 10 мкл от препарата на кДНК, описан по-горе, около 50 пмола (изчислено по OD₂₆₀) NotAB; 2 мкл 10X буфер за ДНК-лигаза; 1,2 мкл Т4 ДНК-лигаза; 0,2 мкл 10 мМ АТР; и вода до краен обем 20 мкл, чрез инкубиране на реакционната смес на 16⁰С през нощта. Реакцията след това се инактивира чрез нагряване на реакционната смес 10 мин на 65⁰С. За амплификация с PCR обикновено се използват около 1 до 2 мкл от получената смес; лигазата смес може да се амплифицира за 10 до 15 цикъла (94⁰С, 45 секунди; 60⁰С, 45 секунди; и 72⁰С, 1,5 мин) и да се съхранява като изходен разтвор (сток), както е описано в Пример-12.

Пример2

Амплификация на кДНК чрез PCR

кДНК се амплифицира рутинно чрез приготвяне на реакционна смес за амплификация, съставена от 5 мкл 10X буфер за PCR (500 мМ KCl; 100 мМ Tris, pH=8,3; и 20 мМ MgCl₂; 5-8 мкл dNTP (2,5 мМ всеки); 1 мкл Taq-полимераза

(Boehringer Mannheim); 0,1 мкл белтък на ген 32 (Boehringer Mannheim); 6 мкл праймер NotB (20 mM изходен разтвор); 2 мкл кДНК (приготвена, както е описано в Пример 1) и вода до 50 мкл. Тази смес след това се надсложва с 50 до 100 мкл минерално масло и PCR-амплификацията се извършва за 10 до 15 цикъла на 94⁰C, 45 секунди; 60⁰C, 45 секунди; и 72⁰C, 1,5 мин. След амплификацията реакционната смес се екстрахира с фенол/хлороформ и амплифицираната нуклеинова киселина се утаява с етанол и се събира чрез центрофугиране. Утайката след това се разтваря в 100 мкл буфер TE, за да се приготви изходен разтвор (сток).

Пример 3

PCR-амплификация за изключваща хибридизация и циклична селекция

За да се получи PCR-продукт, както за изключваща хибридизация, така и за циклична селекция, около 1 мкл изходен разтвор, приготвен както е описано в Пример 2, се амплифицира в 50 мкл реакционна смес за PCR, както е описано в Пример 2, с изключение на това, че се провеждат 21-24 цикъла на сдвояване на праймера с матрицата (annealing), удължаване и денатурация на матрицата. След амплификацията реакционните смеси се екстрахират с фенол/хлороформ, утаяват се с етанол и се събират чрез центрофугиране. Добивът на продукта се оценява чрез оцветяване с етидиев бромид след електрофореза в агарозен гел на малка аликвота от реакционната смес. За изключваща хибридизация се амплифицира кДНК-библиотека от негативни за теломеразата клетки (IMR-90) в присъствието на биотинилиран dUTP (дезоксиуридинтрифосфат). За да се проведе изключващата хибридизация, се използва отношение приблизително 100 към 1 на кДНК от негативни за теломеразата клетки (IMR-90) към кДНК от клетки, положителни за теломеразата (293). Използват се стандартни условия при 65⁰C за 48-72 часа. За най-малко два цикъла на циклична селекция се използват обикновено около 2 мкг продукт нуклеинова киселина от частично пречистена кДНК и негативно селектиран материал.

След цикличната селекция, описана в Пример 4, чрез PCR за 22 цикъла се амплифицират около 1 до 2 мкл от "изтощените" продукти (от тотален обем 20 мкл), както е описано в Пример 2, утаяват се с етанол и се събират чрез центрофугиране в подготовка за по-нататъшна циклична селекция.

Пример 4

Позитивна селекция на кДНК, амплифицирана с PCR

За стъпката на позитивна селекция от процеса на циклична селекция, използван за клониране на РНК-компонента на човешката теломераза, около 2 мкл от кДНК, амплифицирана с PCR, се разреждат в 25 мкл буфер TE, след това се смесват с 1,25 мкл 20X SSC и полученият разтвор се нагрява до 95⁰C за 3 мин. Температурата се понижава до 60⁰C за 5 мин и се добавя един мкл (0.1 мкг/мкл) биотинилирана сонда R2 или R4. Последователностите на тези сонди са показани по-долу. Сондите са O-метил-РНК сонди, така U е O-метил-уридин, A е O-метил-рибоаденин, G е O-метил-рибогуанин и I е инозин.

R2: 5'-UUAGGGUUAGII-биотин

R4: 5'-AUUGGGUUAUII-биотин

Сондата R2 е специфична за теломерния повтор, а сондата R4 е специфична за РНаза Р, която се използва за проследяване ефективността и ефикасността на процеса на циклична селекция. При извършване на цикличната селекция едновременно, но отделно за РНаза Р, молекула с известна последователност, можем да бъдем по-уверени, че процесът на циклична селекция функционира правилно и по отношение на молекулата, която представлява интерес, в този случай РНК-компонента на човешката теломераза.

След като сондата R2 или R4 се добави към сместа при 65⁰C, температурата на хибридизационната реакционна смес се понижава до 30⁰C чрез инкубиране на сместа при тази температура за 5 мин, като след това температурата на реакционните смеси се понижава още до 14⁰C чрез

инкубиране на тази температура за 60 мин. Накрая смесите се инкубират на 4⁰C за 2-12 часа.

Цялата хибридизационна реакционна смес за всяка проба (R2 или R4) се прибавя към 400 мкл 0,5X SSC при 4⁰C и след това се прибавя към епруветка с изстудени на лед магнитни перли, които са закупени от Promega и са измити предварително четири пъти с 0,5X SSC преди да се използват. Получената смес се инкубира 30 мин на 4⁰C, за да се осигури пълно свързване с магнитните перли. Епруветката с всяка реакция след това се инкубира за кратко на стайна температура върху магнитен статив (Promega), за да се съберат перлите. Перлите се ресуспендират в студен 0,5X SSC (600 мкл) и се поставят (в епруветка) на лед. Пробите се промиват повече от три пъти с 0,5X SSC по този начин. Нуклеиновата киселина се елуира от перлите чрез ресуспендиране на перлите в 100 мкл вода и инкубиране 2 мин на 65⁰C преди обратно поставяне на перлите върху магнитния статив за събиране. Този процес се повтаря три и повече пъти; последният път ресуспендираните перли се инкубират 5 мин на 65⁰C преди поставяне на перлите върху магнитния статив за събиране. Всички надстоящи течности от по 100 мкл (за всяка проба) се обединяват и се изсушават до 20 мкл в центрофуга SpeedVacTM. Получената ДНК след това се амплифицира с PCR за друг цикъл на амплификация и селекция. След всяка амплификация продуктите от PCR се екстрахират два пъти с фенол-хлороформ, утаяват се с етанол и се ресуспендират в 20 мкл буфер TE.

Амплификациите чрез PCR обикновено се потвърждават чрез електрофореза в агарозен гел. Освен това се използват различни контроли, за да се отчете процесът на циклична селекция. Като една контрола, върху нуклеинова киселина, която съдържа ген, придаващ неомицинова устойчивост, се поставят PCR-"рамена" (олигонуклеотиди с определена последователност, които служат като места за хибридизация на праймерите). Получената нуклеинова киселина се смесва с PCR-амплифицираната ДНК и се отчита при всяка селекция чрез количествен PCR. Като друга контрола се проследява РНаза Р, както в отбраната чрез РНаза Р, така и в отбраната чрез теломеразния РНК-компонент библиотека.

Пример 5

Протокол за RT-PCR

Синтезата на първа верига кДНК се извършва до голяма степен съгласно процедурата, описана в Пример 1. Основното е, че РНК се пречиства от всяка теломеразна фракция, съдържаща 0,1 до 1 мкг РНК; обикновено се използва около една трета до една пета от РНК, получена във фракция от 300 мкл. РНК се смесва с 40 до 80 нг случайни хексамери в 10 мкл, денатурира се 10 мин на 95⁰С (като се използва термоцикличен апарат) и се охлажда на лед. Денатурираната РНК и 6-мерите се добавят към реакционна смес, съдържаща 4 мкл 5X буфер за синтеза на първа верига, доставен от производителя на обратната транскриптаза (RTase, закупена от BRL), 2 мкл 0,1 М DTT, 1 мкл 10 мМ dNTP (всеки), 1 мкл инхибитор на РНaza (Pharmacia) и вода до краен обем 9 мкл. Комбинираната смес се поставя на водна баня от 42⁰С. След 1-2 мин инкубация към сместа се добавя 1 мкл SuperscriptTM II RTase (BRL). Инкубацията продължава за 60 мин на 42⁰С. Реакцията се спира чрез нагриване на епруветката 10 мин на 95-98⁰С. Първата верига кДНК се събира чрез кратко центрофугиране, разпределя се на аликвоти в нови епруветки, бързо се замразява на сух лед и се съхранява на -80⁰С или се използва веднага.

Пример 6

PCR-амплификация на кДНК с набор от специфични праймери

За PCR-реакция от 20 мкл с радиоактивно белязани нуклеотиди, 1 мкл кДНК, приготвена съгласно процедурата в Пример 5, се смесва с 20 пмола праймер 1, 20 пмола праймер 2, 2,5 мкл 2,5 мМ dNTP, 5 мкКи алфа-³²P-dATP, 2 единици Taq-полимераза (Boehringer Mannheim), 0,2 мкг белтък на T4-гена 32 (Boehringer Mannheim), 2 мкл 10X буфер (500 мМ KCl, 100 мМ Tris-HCl-pH 8.3 и 20 мМ MgCl₂) и вода до краен обем 20 мкл. В епруветката след това се прибавя една капка минерално масло.

Условията за PCR-амплификация на клона на теломеразния РНК-компонент са: 94⁰С за 45 сек., 60⁰С за 45 сек., 72⁰С за 1,5 мин. Броят на циклите варира в зависимост от типа пречистени вещества, използвани за приготвянето на РНК, но обикновено обхваща от 18 до 25 цикъла. За всяка проба се провеждат няколко реакции с различни цикли, както при всички количествени RT-PCR, за да се определи кога PCR-амплификацията достига плато и е нелинейна.

За РНаза Р, използвана като контрола, условията за PCR-амплификация са: 94⁰С за 45 сек., 50⁰С за 45 сек., 72⁰С за 1,5 мин. Отново броят на циклите варира от 15 до 22 цикъла, в зависимост от естеството на пробата. Последователностите на праймерите, използвани за амплификация на РНаза Р, са показани по-долу:

P3: 5'-GGAAGGTCTGAGACTAG-3'

P4: 5'-ATCTCCTGCCAGTCTG-3'

PCR-продуктът, получен с тези два праймера, е с големина около 110 бд.

След PCR, продуктите (5 до 10 мкл от реакционната смес) се нанасят на 6% нативен полиакриламиден гел и се провежда електрофореза. След електрофорезата гелът се изсушава и се експонира върху касета PhosphorImagerTM или върху автордиографски филм за анализ.

Пример 7

Клониране на гена за РНК-компонента на човешката теломераза

Процедурите, използвани за клониране на гена за РНК-компонента на човешката теломераза, се изпълняват, както е описано обстойно в Maniatis *et al.*, *Laboratory Molecular Cloning Manual*. От Stratagene се закупува геномна ДНК-библиотека на ДНК от човешката белодробна фибробластна клетъчна линия WI-38, включена във вектора на фага ламбда FIXII. Фагът се посява при концентрация около 25 000 плаки на петри в три групи от по 15 (150 мм) петрита. Петритата се приготвят с агар NZY и с покриваща (top) агароза NZY; клетките, използвани за трансформация на фагите са клетките XL1BlueMRAP2; трансформантите се култивират през нощта за около 16 часа на 37⁰С. След това

петритата се охлажда на 4°C за около час, след което плаките се "отпечатват" върху найлонови кръгчета C/P (филтърна хартия от Bio Rad). Процесът се повтаря, за да се получи двоен набор от филтърни отпечатьци. Филтрите (по два) се денатурират, неутрализират, уязновесяват с буфер 6X SSC, излагат се на облъчване с UV за съшиване на нуклеиновата киселина с мембраната и след това се изсушават върху хартия за пренос (blotter paper).

Прехибридизацията се провежда един час на 37°C в 50% формамиден буфер. Филтрите се сондират с радиоактивно белязан фрагмент *NotI* от клон pGRN7 от ~ 218 бд, който е изолиран чрез електроелуция от 5% полиакриламиден гел след разделяне чрез електрофореза и след това ник-транслиран с алфа- ^{32}P -dCTP чрез използване на набора за ник-транслация на Boehringer Mannheim Biochemicals, съгласно инструкциите на производителя. Използват се около 25 нг (~ 10 мкКи белег) от сондата на филтър и хибридизацията се провежда през нощта на 37°C в 50% формамиден буфер за хибридизация. След хибридизацията филтрите се промиват на стайна температура шест пъти; първите три промивки са с 6X SSC, съдържащ 0,1% SDS, а последните три промивки са само с 6X SSC. След първоначално експониране на няколко двойки филтри в касета PhosphorImagerTM, за да се провери ефективността на хибридизацията и силата на сигналите, филтрите се промиват на 65°C в 0,5X SSC. След това филтрите се поставят под филм на Kodak XAR5 като се използват два усилващи екрана и филмът се оставя за експониране около 100 часа на -70°C .

От филтъра, съдържащ затворно означен 28-1, се излъчва един силен сигнал, включващ гена за РНК-компонента на човешката теломераза. Плаката, отговаряща на сигнала, наблюдаван върху филтъра, се използва за получаването на вторични плаки, така че изолираната плака (потвърдена чрез сондиране с белязана pGRN7 нуклеинова киселина) би могла да се култивира за мащабно изолиране на фагова ДНК. Фаг 28-1, който може да се получи от Американската сбирка на типовите култури (American Type Culture Collection) под ключов No. 75925, обхваща инсерт ~ 15 kb и включва няколко рестриктазни фрагмента, които съдържат последователности, които хибридизират с

последователностите на РНК-компонента в рGRN7: фрагмент на рестриктазния ензим *EcoRI* от 4,2 кб; фрагмент на рестриктазния ензим *ClaI* от 4,2 кб; и фрагмент от рестриктазните места *HindIII-SacI* от 2,5 кб. Последният фрагмент обхваща цялата ~560 нуклеотидна последователност на РНК-компонента, показана по-горе и се смята, че включва целия ген за РНК-компонента. Плазмидът, включващ фрагмента на рестриктазните ензими *HindIII-SacI* от 2,5 кб във вектора рBluescript, се означава плазмид рGRN33 и е на разположение в Американската колекция на типовите култури под ключов No. ATCC _____. Доколкото човешкият ген може да включва други последователности, освен тези във фрагмента от 2,5 кб, тези последователности могат да се изолират от фага 28-1 или от други фагови клонове, идентифицирани чрез сондиране с фрагмента от 2,5 кб (или друга сонда на изобретението). Фрагментите от действието на рестриктазните ензими, отбелязани по-горе, се приготвят в отделни реакции на смилане с рестриктазните ензими; Продуктите от смиланията се разделят чрез електрофореза в 0,7% агарозен гел или, само за фрагмента от ~2,5 кб, в 3% полиакриламиден гел; и желаните ивици се изрязват от гела и се приготвят за субклонирание или като се използва наборът GeneClean™ Kit II (от Bio101, Inc.), или чрез електроелуция в диализни шлаухи Spectropor #2 w 0,1x TBE при 100 В (волта) за два часа (само за фрагмента от ~2,5 кб).

Тези рестриктазни ензимни фрагменти се субклонират в плазмиди на *E. coli* за експресия/мутагенеза, получени от плазмиди на основата на рUC или от плазмиди рBluescript, които включват също начало за репликация на SV40 (но без SV40 промоторна активност). Получените плазмиди могат да се използват за приготвяне на изменена (мутантна) нуклеинова киселина на РНК-компонента за въвеждане в човешки или други еукариотни клетки за различни цели, както е описано по-горе в **Описание на предпочетените приложения.**

Пример 8

Антисенс-плазмиди за РНК-компонента на човешката теломераза

Плазмиди за експресия на антисенс се приготвят чрез PCR-амплификация на кДНК за РНК-компонента като се използват следните набори от праймери: (1) NotB и G1, които продуцират антисенс нуклеинова киселина, която е по-малка от кДНК-инсерта в плазмид; и (2) NotB и R3C, които продуцират пълноразмерна (по отношение на инсерта в плазмид) нуклеинова киселина. Нуклеотидната последователност на NotB е показана в Пример 1, по-горе; нуклеотидните последователности на G1 и R3C са показани по-долу:

G1: 5'-GAGAAAAACAGCGCGCGGGGAGCAAAAGCA-3'

R3C: 5'-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG-3'

След PCR-амплификацията амплифицираните фрагменти се клонират в експресионен плазмид от ~10 кб в мястото *Pml*; като маркери за селекция плазмидът включва гени, придаващи устойчивост към пуромицин, DHFR и хигромицин В; началото за репликация на SV40; индуцируемият промотор на човешкия металотионенинов ген, поместен за експресия на антисенс-веригата на гена за РНК-компонента на човешката теломераза (може да се използва също и по-силен промотор за получаване на по-високи нива на експресия) и мястото за добавяне на поли А от късната област на SV40.

Получените плазмиди (означени pGRN42 за продукта на NotB/G1 и pGRN45 за продукта на NotB/R3C) се трансфектират по калциево-фосфатната процедура (виж Maniatis *et al.*, по-горе) във фибросаркомната клетъчна линия HT1080. Клетките HT1080 нормално са безсмъртни (имортални); експресията на антисенс РНК за РНК-компонента на човешката теломераза пречи на РНК-компонента на човешката теломераза да асоциира с белтъчните компоненти, което блокира образуването на активна теломераза и превръща клетките в смъртни (мортални).

Пример 9

**Идентифициране и изолиране на нуклеинови киселини на РНК-компоненти
от други бозайници**

За да се илюстрира как реактивите на изобретението могат да се използват за идентифициране и изолиране на съществено хомоложни нуклеинови киселини от други видове бозайници, за амплификация на хомоложните последователности с PCR се използват праймери за PCR, комплементарни на последователностите на човешкия РНК-компонент. Една илюстративна двойка праймери, използвана за демонстрация на този аспект на изобретението, се състои от праймер +10, който има последователността 5'-CACCGGGTTGCGGAGGGAGG-3' и праймер R7, който има последователността 5'-GGAGGGGCGAACGGGCCAGCA-3'. Приготвя се геномна ДНК от шимпанзе дървесна маймуна, маймуна Резус и песоглавец и се разтваря в буфер TE в концентрация от около 0,5 - 4 мг/мл.

За всеки тип тъкан се приготвя PCR-смес, която смес включва: 1 мкл геномна ДНК, 48 мкл Master Mix (Master Mix се състои от 1x буфер TaqExtender™ на Stratagene, 200 мкл от всеки dNTP и 0,5 mM от всеки праймер), и 0,5 мкл 1:1 смес на Taq-полимераза (5 единици/мкл, Boehringer Mannheim): Tth-полимераза (TaqExtender™-полимераза на Stratagene). Епруветките с реакциите се поставят в термоциклически апарат, който е програмиран най-напред да загрява реакционната смес на 94°C за 5 минути и след това да проведе 27 цикъла на инкубации при 94°C за 30 сек., 63°C за 10 сек. и 72°C за 45 сек. След завършване на реакцията на амплификация около 10 мкл от всяка реакционна смес се нанасят на 2% агарозен гел за електрофореза. След електрофореза, оцветяване на гела и облъчване с UV, може да се види, че всяка реакционна смес съдържа ивица с предсказаната (~200 бд) големина. Нуклеиновите киселини от тези ивици могат да се клонират и секвенират и останалата част от гените за РНК-компонента на всеки от тези видове бозайници може да се клонира, както е описано по-горе за гена за РНК-компонента на човешката теломераза. Пример 14, по-долу, описва специфичен пример за секвениране на гена за теломеразния РНК-компонент на дървесна маймуна.

Мутантни последователности на сенс човешки теломеразен РНК-компонент

Този пример демонстрира, че промяната на последователността на теломеразния РНК-компонент в матричната област променя последователността, синтезирана от човешката теломераза, което води до изменения в хромозомните теломеразни повтори.

За да се определи дали репрограмирането на матричната област в TRC3 би довело до съответни изменения в теломерния повтор, синтезиран от човешка теломеразна активност, се клонира и мутагенизира генен фрагмент, който експресира цялата генна последователност за теломеразния РНК-компонент (TRC3). Анализът чрез пренос на ДНК (Southern blot) показва, че TRC3 хибридира с ген, представен в едно копие в човешкия геном. Геномно копие на TRC3 се изолира от библиотека във фага ламбда и се показва, че има същата рестриктазна карта, както тази, наблюдавана при преносите на геномна ДНК (Southern blots), сондирани с TRC3. Изолира се фрагмент *HindIII-SacI* от 2,6 кб и се субклонира в модифицирана версия на pBluescript, което дава плазмиди pGRN33 на геномния TRC3. 5'- и 3'-краищата на РНК се картират чрез използване на удължаване на праймера (primer extension), RACE PCR и RT-PCR. Големината на РНК-транскрипта е ~550 бази, което се съгласува с неговата подвижност при преноси на РНК (Northern blot). Транскрибираната област за TRC3 е централна спрямо геномния клон с последователност от 1,4 кб отпред (upstream).

РНК се екстрахира от пречистени теломеразни препарати и след това се използва в следните експерименти. 5' RACE: Първа верига кДНК се приготвя като се използват антисенс-праймери за TRC3: (R3B 5'-CAACGAACGGCCAGCAGCTGACATT) в присъствието на ³²P-dATP. Продуктите от удължаването се разделят чрез PAGE (полиакриламидна гел-електрофореза) и се идентифицират чрез автордиография, изрязват се и се екстрахират. Към тези продукти от първата верига с T4 РНК-лигаза се лигира олигонуклеотид (NotA: 5'-pATAGCGGCCGCTT GCCTTCA-NH₂) и след това се провежда PCR, като се използва вътрешен (nested) праймер, R3c (5'-

GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG) и олигонуклеотид (NotB: 5'-TGAATTCTTGCGGCCGCTAT), комплементарен на олигонуклеотида NotA. PCR-продуктите се разделят на агарозен гел и ивиците се изрязват и секвенират директно чрез използване на олигонуклеотида G1 (5'-AGAAAAACAGCGCGCGGGGAGCAAAGCA) като праймер. Картиране на 3'-края: Опитите за провеждане на 3' RACE са неуспешни. Впоследствие се използва стратегия на RT-PCR, в която за инициране синтезата на първа верига кДНК се използва серия от антисенс-праймери, комплементарни на геномната ДНК-последователност. Праймерите в тази първа серия са разположени на интервали от приблизително 150 бд като се започне от 5'-края на транскрипта, продължавайки по посока на 3'-края. След това се провежда PCR като се използва праймерът за първа верига и праймер, чиято последователност е вътрешна за известния TRC3-транскрипт. PCR-ивици с предсказаната големина, чувствителни на обратна транскриптаза, се виждат когато се използва кДНК, получена с всички праймери, предназначени за интервала +100 до +450 (номерирани по отношение на 5'-края), но не и с който и да е от праймерите, предназначени за +558 до +950. Това помества предполагаемият 3'-край на зрелия TRC3-транскрипт между позиция +450 и +558. Последващи цикли на проектиране на праймери и RT-PCR стесняват този интервал до между +545 и +558.

Предсказаната матрична последователност на TRC3 се променя от CUAACCCUA на CCAACCCCA (MuC) или CAAACCCAA (MuA) чрез мутагенеза *in vitro* (проведена в съществената си част съгласно Perez *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* **269**: 22485) на геномния плазмид pGRN33. Ако се включат във функционална теломераза, тези мутантни РНКи биха служили като матрици за синтезата по-скоро на TTGGGG (MuC) или TTTGGG (MuA), отколкото на повтора див тип TTAGGG. Тези мутантни теломеразни активности биха могли да се различат лесно от активността див тип и само активността див тип би била чувствителна на терминация с ddATP. Приготвя се също двоен мутант (MuC+17), в който при (позиция) +180, в допълнение към матрицата MuC, присъства инсерция от 17 бд.

Този мутант позволява специфична детекция на изменената РНК със сонда към инсерцията от 17 бд или по големина.

Геномната последователност от 2,6 кб е достатъчна за експресия на TRC3 *in vivo*. Клетки се трансфектират преходно с плазмида MuC+17 и РНК, експресирана от трансфектираната ДНК, се детектира чрез RT-PCR при използване на включената последователност от 17 бд като праймер в стъпката на обратна транскрипция. РНК се детектира в клетки, трансфектирани с MuC+17, но не и във фалшиво трансфектирани клетки, което показва, че геномният клон от 2,6 кб е достатъчен за експресията на TRC3. След това от всеки от тези три мутантни плаزمиди се получават стабилни трансформанти чрез калциево-фосфатна трансфекция на клетки HT1080 заедно с pCMVneo. Отбират се устойчиви клонове в G418 и експресията на MuC+17 се потвърждава чрез RT-PCR (Irving et al. (1992) *Exp. Cell Res.* **202**: 161).

За тестиране на мутантна теломеразна активност се определят екстракти от нетрансфектирани клетки и от три стабилни трансформанта с интегрирани вектори MuC*, MuC или MuA (C*, C или A във Фиг. 1). Тъй като се очаква мутантните екстракти да съдържат както див тип, така и мутантна теломеразна активност, за да се различат се използват различни условия на тестиране. При нормални реакционни условия (dTTP, ³²P-dGTP и dATP) всички три екстракта от серията мутантни конструкции показват теломеразна активност див тип, която е чувствителна на РНаза (Фиг. 1, стартове 1-6). Както се очаква, тази активност не се повлиява, когато в реакциите се включи ddGTP (стартове 7-9) и се унищожава от ddTTP (стартове 10-12). Обратното, когато dATP се замени с ddATP, екстрактите C (старт 14) и A (старт 15) все още проявят теломеразна активност, чувствителна на РНаза (стартове 17 и 18), докато C* (старт 13) и контролният екстракт не. Тези резултати показват, че активностите, устойчиви на ddATP, представляват теломеразата, репрограмирана с MuC или MuA TRC3-РНК. За разлика от това, инсерцията от 17 бд в C* инхибира реконституцията, което показва, че теломеразната реконституция е много специфична за TRC3-последователността.

За да потвърдим факта, че последователността, синтезирана от мутанта MuA е (GGGTTT)_n, ние модифицирахме съществуващата PCR-методология за амплификация на теломеразни повтори, прибавени към уникален теломеразен праймер (Kim *et al.* (1994) *Science* 266: 2011). Чрез използването на синтетични праймери ние идентифицирахме реакционни условия, при които 3'-праймер с последователността d(CCCAAACCCAAACCCAA) би амплифицирал само повторите (TTTGGG)_n и не би амплифицирал повторите, съдържащи (TTAGGG)_n.

За да се направи разлика между теломерните повтори, прибавени от дивия тип теломераза и мутантната теломераза, един двустъпален тест се комбинира със стратегия за ограничаване достъпа на нуклеотиди в теломеразната реакция. Тъй като MuA и MuC ще образуват теломерните повторени последователности (TTTGGG)_n и (TTGGGG)_n, съответно, клетъчните екстракти се инкубират най-напред със субстрата TS в присъствието само на dTTP и dGTP за 10 мин на стайна температура, за да се създадат условия за добавянето на теломерни повтори. След това остатъчната теломеразна активност се разрушава чрез кипване на екстрактите за 5 мин. Теломеразните продукти със специфична ДНК-последователност след това се детектират чрез PCR-амплификация като се използват съответните обратни праймери в присъствието на всички 4 dNTPs и на следови количества от ³²P-dCTP, както е описано (Kim *et al.* (1994 *op.cit.*). За детектиране продуктите на MuA обратният праймер е (ACCCAA)₄, а условията на PCR са 94⁰C, 10 сек, 60⁰C, 30 сек и 72⁰C, 30 сек за 20 цикъла. За детектиране продуктите на MuC се използват три обратни праймера: (CCCCAA)₃, (CCAACC)₃ и (CCAACC)₃, съответно, които дават PCR-продукти със съответните отклонения в подвижността, съгласуващи се с местата на сдвояване (annealing) с теломеразните продукти. Използваните условия на PCR са същите, както по-горе, с изключение на това, че температурата на сдвояване (annealing) е 50⁰C. При същите условия не се образуват теломеразни продукти от екстрактите на родителските клетки или от клетки, трансфектирани TRC3-гена див тип. В тестове за специфичността на нашите условия за PCR-амплификация

синтетичните олигонуклеотиди, съдържащи (TTTGGG) n и (TTGGGG) n , образуват съответната стълбица от 6-нуклеотидни PCR-продукти с обратния праймер (ACCCAA) $_4$ или (CCCCAA) $_3$, съответно, докато олигонуклеотидите (TTAGGG) n не образуват каквито и да са PCR-продукти с обратния праймер (ACCCAA) $_4$ или (CCCCAA) $_3$.

Чрез използване на тези условия, екстрактите от MuA, но не и тези от MuC или клетките див тип, образуват продукти в модифицирания теломеразен тест, което показва, че теломеразата от клетки, съдържащи MuA, образува повтори (TTTGGG) n . Подобни методи се използват за анализ на мутанта MuC, който синтезира повтори (TTGGGG) n . Заедно горните данни съставляват строго свидетелство, че генът TRC3 кодира РНК-компонента на човешката теломераза и по тази причина ние преименувахме TRC3 на hTR от human Telomerase RNA (човешка теломеразна РНК).

Пример 11

Теломеразен РНК-компонент в смъртни и безсмъртни клетки

Повечето ракови клетки експресират високи нива на теломеразна активност, докато в повечето нормални соматични човешки клетки не се детектира теломераза (Kim *et al.* (1994) *op.cit.*). За да се определи дали нивата на теломеразния РНК-компонент са завишени в безсмъртни ракови клетъчни линии, нивата на теломеразния РНК-компонент и на GAPDH-транскрипта се анализират чрез използване на RT-PCR в пет смъртни първични клетъчни щама, които не показват детектируема теломеразна активност и пет безсмъртни ракови клетъчни линии с високи нива на теломеразна активност. Постоянните (steady state) нива от транскрипти на теломеразния РНК-компонент са 3 до 12 пъти по-високи в туморните клетъчни линии, отколкото в първичните клетки, когато се сравняват с нивата на GAPDH (Фиг. 2A). Доколкото нивата на теломеразния РНК-компонент са повишени в безсмъртните ракови клетки, експресиращи високи нива теломераза, е интересно, че ниски, но лесно детектиращи се нива на

теломеразен РНК-компонент присъстват също и в смъртни първични клетки, в които не се детектира теломеразна активност (стартове 1-5).

Нивата на теломеразния РНК-компонент се изследват също и в различни нормални човешки тъкани чрез анализ на РНК-пренос (Northern blot). Тестисите и яйчниците имат най-високите нива на теломеразен РНК-компонент, което се очаква, тъй като тези тъкани експресират високи нива на теломеразна активност. Редица други тъкани, обаче, също експресират теломеразен РНК-компонент (Фигури 2В и 2С). Те включват нормален бъбрек, простата, черен дроб при възрастни, всички които не притежават детектираща се теломеразна активност. Тези резултати потвърждават данните от клетъчните линии (Фиг. 2А) и навеждат на мисълта, че в редица човешки тъкани може да присъства теломеразна РНК, но да е неактивна. Подобни тъканно специфични различия в експресията на РНК се наблюдават в миши тъкани; много нормални миши тъкани, обаче, са позитивни за теломеразна активност. Явната засилена репресия на теломеразната активност в човешки клетки може да спомогне за обяснението, защо мишите клетки имортализират спонтанно в култури, докато човешките-не.

Пример 12

Експресията на антисенс hTR (човешки теломеразен РНК-компонент) транскрипти в HeLa-клетки води до клетъчна криза и клетъчна смърт

С цел да се изследва функцията на теломеразата в имортализирана клетка, в HeLa-клетки се въвежда конструкция, експресираща антисенс hTR. *EcoRI* ДНК-фрагмент от 200 бд, съдържащ последователността между позиции 1 и 193 на човешкия теломеразен РНК-компонент в кДНК-клона, TRC3, се включва в *EcoRI*-мястото на p10-3 и pBBS212, за да се получат съответно плазмидите p10-3-hTR и pBBBhTR. Плазмидът p10-3-hTR експресира антисенс а на теломеразния РНК-компонент под транскрипционния контрол на минималния промотор на CMV (цитомегаловирус), който се регулира от тетрациклин чрез петте Tet-оператора отпред (upstream) в две различни ориентации (Gossen *et al.* (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **89**: 5547). Плазмидът pBBS-hTR експресира антисенс а на hTR под

контрола на MPSV-промотора (Lin et al. (1994) *Gene* 147: 287). В HeLa-клетките паралелно се електропорират контролни експресионни вектори, в които отсъства последователността, кодираща антисенс hTR. Клонове, съдържащи антисенс или контролни плазмиди, се отбират в три отделни експеримента. Първоначално 41 култури, експресиращи антисенс hTR, растат идентично на клетките с контролния вектор. Обаче, на 23-то до 26-то ниво на удвояване на популацията (PDL) след трансфекцията, 33 от 41 култури, експресиращи антисенс, преживяват криза. (Таблица I). Клетъчната криза в тези култури се характеризира със забележително инхибиране на клетъчния растеж от 20 до 26 PD, следвано от закръгляне и отлепване на клетките от плаката за период от седмица. В 28 от 33 случая, в които клетките преживяват криза, в рамките на три седмици се наблюдават рядко (1%) ревертантни колонии, след като повечето от клетките са умряли. Ревертантните клетки могат да представляват варианти, които избягват инхибиращия ефект на антисенс hTR конструкцията. За разлика от антисенс-клоновете, нито една от клетъчните линии с контролните вектори няма изменения в растежа или смъртността за 50 удвоявания.

Таблица I

Антисенс hTR води до средно по-къси TRF и клетъчна криза

Провеждат се три независими експеримента, в които HeTe7 клетки (HeLa-клетки, които експресират високи нива от химерния белтък тетрациклинов репресор-VP16), се трансфектират чрез електропорация или с плазмида p10-3-hTR, експресиращ антисенс hTR под контрола на минималния промотор на CMV, индуциращ се от тетрациклин-VP16; или с pBBS-hTR, експресиращ антисенс hTR под контрола на MPSV-промотора (54). [В тези експерименти не се наблюдава тетрациклинова регулация. Експериментите с p10-3-hTR обикновено се извършват в отсъствието на тетрациклин – тъй като контролни експерименти с луцифераза или антисенс xTP под контрола на минималния промотор на CMV, индуциращ се от тетрациклин VP16 показва, че присъствието или отсъствието на тетрациклин има малък ефект върху експресията на луцифераза или антисенс

hTR в клетките HeTe7. В действителност, в ранни експерименти с антисенс hTR конструкции в клетки HeTe7, клетките преживяват криза на 23 до 26 PDL в присъствието на тетрациклин]. Като контрола клетките HeTe7 се трансфектират също и с родителския вектор при същите условия. Клоновете от всички изолати проявяват идентична морфология и профили на растеж до 20 PDL, по което време растежът на повечето от клоновете, експресиращи антисенс, спада забележително (p10-3-hTR и pBBS-hTR). При PDL 23-26 тези клетки преживяват криза, характеризираща се с появата на уголемени и закръглени клетки. Не всички клонове, обаче, получени от HeTe-клетките, трансфектирани с pBBS-hTR, преживяват криза; осем клон, експресиращи антисенс hTR, продължават да растат подобно на контролните култури. Клетките от всички колонии се събират при PDL 23 и се определят средните TRF-дължини. Р-стойностите се изчисляват чрез метода на несдвоен t-тест. Пропорцията от клонове, които преживяват криза, е посочена за всяка серия.

	Плазмид	Клетъчна криза	средна TRF	Р-стойност	Криза/Общо
1	p10-3	не	НО		0/7
	p10-3-hTR	да	НО		18/18
2	p10-3	не	$3,27 \pm 0,10$	0,0003	0/12
	p10-3-hTR	да	$3,72 \pm 0$		11/11
3	pBBS	не	$3,22 \pm 0,11$	0,0008	0/13
	pBBS-hTRa	да	$2,39 \pm 0,10$		4/4
	pBBS-hTRb	не	$3,03 \pm 0,20$		0/8
	HeTe7-клетки	не	$3,15 \pm 0,09$	-	родителски клетки

За да се определи дали теломерната дължина и инхибирането на теломеразата корелират с клетъчната криза в клоновете, експресиращи антисенс, при 23 PDL се тестват теломерната дължина и теломеразната активност с няколко предкризисни контроли и експериментални колонии. Всички колонии, съдържащи контролен вектор, имат средни TRF-дължини (3,22 и 3,27 kb), подобно на родителската клетъчна линия (3,15 kb), докато клоновете, съдържащи

антисенс векторните конструкции, които претърпяват криза, имат средни TRF-дължини между 2,39 и 2,72 кб или 17 до 26% по-къси от тези в родителската клетъчна линия (Фиг. 3). Тези данни са в съгласие със загубата на теломерни повтори в клоновете, съдържащи антисенс, вследствие инхибирането на теломеразната активност. За да се тестира това директно, теломеразната активност се определя в 14 от клоновете. Теломеразната активност като правило е ниска, но може да се детектира в много от антисенс клоновете, макар че скъсените теломери предполагат, че нивото и не е достатъчно за запазване на теломерната дължина, тъй като средната стойност за TRF пада от 3,22 до 2,39 кб ($P=0,0008$). В осемте колонии, съдържащи антисенс вектора (pBBD-hTRb), които не преживяват криза, теломерната дължина не е променена значително (3,03 срещу 2,39, $P=0,355$) и теломеразната активност е сходна с тази на контролите. Взети заедно тези резултати са свидетелство за това, че загубата на теломери води до криза и клетъчна смърт след като веднъж теломерите достигнат критична дължина.

Индукцията на клетъчна криза в HeLa-клетки, експресиращи антисенс на теломеразния РНК-компонент, привежда допълнителна подкрепа на идеята, че инхибирането на теломеразата може да обезпечи специфично и ефективно лечение на рак при хората.

Пример 13

Амплификация *in situ* и детекция

Детекция in situ на теломеразна РНК

А. Флуоресцентна хибридизация *in situ* (FISH)

Идентификацията на клетки, позитивни за теломеразата, в смесена популация от клетки или тъкани може да се извърши чрез хибридизация *in situ* с б^еязана сонда, насочена срещу РНК-компонента на теломеразата. Тъканна или клетъчна проба, фиксирана върху микроскопско стъкло и пермеабелизирана достатъчно, се използва за хибридизация *in situ*. Един пример за хибридизация *in situ* на човешка теломеразна РНК (hTR) се състои най-напред от денатуриране на

нуклеиновите киселини чрез потапяне на стъклата в 70% дейонизиран формамид/2X SSC разтвор, предварително загрят до 70-74⁰C за 2-3 мин. Стъклата след това се прехвърлят в ледено-студен 70% EtOH, след това в 95% EtOH и след това в 100% EtOH (4 мин всв всеки разтвор). 100-200 нг (на стъкло) от белязаната htRNA (ДНК-сонда от ~500 бд, белязана с биотин, дигоксигенин, радиоактивен изотоп, флуоресцентен маркер) се изсушават, ресуспендират се в 10 мкл 100% дейонизиран формамид, денатурират се чрез инкубиране на 75⁰C за 8 мин и веднага се охлаждат на лед. Към 10-те мкл от ресуспендираната сонда се прибавят 10 мкл 2X буфер за хибридизация (4X SSC; 4X разтвор на Denhardt; 20% декстрансулфат; 100 mM Tris, pH 7,5). Сместа сонда/хибридизационна смес (20 мкл) се добавя към фиксираната проба, покрива се с покривно стъкло и покривното стъкло се запечатва с епоксидна смола или лак за нокти. Пробата се инкубира на 37⁰C за 8-48 часа. След хибридизацията покривното стъкло се отстранява, пробата се промива два пъти с 2X SSC на 37⁰C (5 мин на промивка). Пробата след това се наблюдава под микроскоп.

В. Иницирано бележене *in situ* (PRINS)

Друг вариант на традиционния метод за детекция чрез хибридизация *in situ* представлява **Иницираното бележене *in situ* (PRINS)**. Детекцията на hTR чрез PRINS се състои от първоначална синтеза на кДНК на hTR чрез обратна транскриптаза (RT), следвана от PRINS-детекция чрез използване на сонда, специфична за hTR и удължаване на веригата чрез включване на белязани нуклеотиди. RT-реакцията на hTR може да се проведе по различни методи. Един пример на RT-реакция е този чрез използване на набора за PCR на РНК GeneAmp Thermostable rTth Reverse Transcriptase (Perkin Elmer). В този метод върху фиксирана и пермеабелизирана проба се поставят 10 мкл RT-смес (10 mM Tris-HCl pH 8.3; 90 mM KCl; 1 mM MnCl₂; 200 мкМ dNTPs; 2,5 Е rTth ДНК-полимераза; 0,4 мкМ обратен праймер [напр., R&G: 5'-GGAGGGGCGAACGGGCCAGCAG-3']), покрива се с покривно стъкло, запечатва се с лак за нокти, на слоен с минерално масло, и се инкубира на 70⁰C за 30 мин. По-нататък минералното масло се

отстранява чрез промиване за 5 мин в ксилен и след това 5 мин в 100% EtOH. Покривното стъкло се маха, промива се за кратко с ДерС-вода, след това с 100% EtOH и се изсушава на въздух 5 мин. След това върху пробата се поставят 10 мкл PRINS-смес (5% (обем/обем) глицерол; 10 mM Tris-HCl, pH .3; 100 mM KCl; 0,05% (тегло/обем) Tween 20; 0,75 mM EGTA; 2,5 mM MgCl₂; 0,4 мкМ прав праймер [напр., U3b: 5'-GCCTGGGAGGGGTGGTGGCTATTTTTTG-3']; 200 мкМ dA, dG, dCTP; 110 мкМ dTTP; 90 мкМ белязан dUTP). Покрива се с покривно стъкло, запечатва се с лак за нокти, на~~с~~лоява се с минерално масло и се инкубира на 70⁰C за 30 мин до 3 часа. Пробата след това се промива 3 пъти в буфера за миене (4X SSC; 0,05% Tween 20), нагрива се до 70⁰C за 2 мин. След това се наблюдава сигналът.

C. RT-PCR *in situ*

Детекцията на hTR чрез RT-PCR се състои от синтеза на кДНК на прицелната РНК чрез реакция с обратна транскриптаза (вирусна обратна транскриптаза или от присъщата на термостабилната ДНК-полимераза RT-активност), следвана от PCR-амплификация *in situ* на прицелната кДНК. За синтезата на кДНК на hTR могат да се използват различни RT-реакции, включително RT-протокола, дискутиран в Разд. 11.В. Освен това за RT-PCR могат да се използват още и същите буферни условия и праймерите, използвани в методите за детекция чрез PRINS, като вместо крайното инкубиране на 70⁰C за 30 мин до 3 часа, пробата се амплифицира в термоцикличен апарат за 30-40 цикъла на 94⁰C/ 40 сек, 55⁰C/90 сек (виж Разд. 11В). След PCR пробата се промива 3 пъти с миещия буфер (4X SSC; 0,05% Tween 20), загрят до 70⁰C за 2 мин. След това се наблюдава сигналът.

Друга алтернатива е кДНК, получена в първоначалната RT-реакция, да се амплифицира чрез използване на системата за PCR *in situ* GeneAmp *in situ* PCR system 1000 и GeneAmp *in situ* PCR core kit (Perkin Elmer).

Едностъпален RT-PCR *in situ* върху фиксирана и пермеабелизирана проба може да се проведе, като се използва протоколът за PCR на РНК GeneAmp

EZ tTth в комбинация с GeneAmp *in situ* PCR system 1000 (Perkin Elmer). Този метод се състои от поставянето на 40-50 мкл EZ RNA PCR буферна смес (50 mM Bicine; 115 mM калиев ацетат; 8% (тегло/обем глицерол, pH 8,2; 300 мкМ dA, dG, dCTP; 165 мкМ dTTP; 135 мкМ белязан dUTP; 5-10Е от rTth ДНК-полимераза; 2,5 mM Mn(OAc)₂; 0,45-1 мкМ праймери, специфични за htRNA, напр., R7 и U3B върху фиксирана и пермеабелизирана проба върху микроскопско стъкло, запечатването му със силиконова смазка и стяга, следвайки протокола на производителя (GeneAmp *in situ* PCR system 1000, Perkin Elmer). Пробата след това се поставя в апарата GeneAmp *in situ* PCR и се загрява за 120 сек на 94⁰C, след това се амплифицира за 30-40 цикъла на 94⁰C/45 сек, и 60⁰C/45 сек. След амплификацията пробата се промива и се визуализира, както е дискутирано по-горе.

За да се редуцират фоновите сигнали, които могат да се получат от директното включване на флуоресцентни маркери по време на PCR-амплификацията, може да се използва индиректна детекция, която се състои от PCR-амплификация чрез използването на немаркирани dNTPs, следвана от хибридизация *in situ*, като се използва маркирана хибридизационна сонда, специфична за амплифицирания продукт. В този метод сигналът се амплифицира по някой от методите за RT-PCR, описани по-горе, без белязани dNTPs или праймери и амплифицираният продукт се детектира чрез хибридизация *in situ*.

D. Прилагане на праймер за удължаване на продукта към PCR *in situ*

Успехът на PCR *in situ* зависи от преустановяване изтичането на амплифицирани продукти по клетъчния матрикс извън клетката. Ето защо, общо правило е, че продуктите от PCR, по-малки от 500 бд, са нежелателни за PCR *in situ*. За да се попречи на изтичането на PCR-продуктите, по-малки от 500 бд от клетъчния матрикс е общоприето да се използва включването на "обемисти" dNTPs (напр., dUTP, белязан с биотин, флуоресцентен маркер, дигоксигенин) в PCR-продукта. Друг начин за преустановяване изтичането на малък продукт при

PCR *in situ* би бил включването на праймер за удължаване на продукта в протокола за PCR *in situ*.

Методът включва използването на праймер, който съдържа повторена последователност от 3-4 бд (напр., [5'-ТТССС-3']₃₋₄) в 5'-края, следван от последователност, която е специфична за мишената (прицелната последователност) (виж Фиг. 4, праймер 1), в комбинация със съответен обратен праймер (праймер 2) и трети праймер, който се състои единствено от повторената последователност (праймер 3, напр., [5' ТТССС-3']₄) за амплификация на специфична мишена чрез PCR *in situ*. Присъствието на праймер 3 ще удължи PCR-продукта в резултат на "колебаещо" се свързване на праймер 3 към 3'-края на прицелния PCR-продукт. Удължаването на PCR-продуктите може да се индуцира чрез понижаване температурата на сдвояване на праймера с матрицата (annealing) в изходните условия на PCR.

Например, ако температурата на сдвояване на прицелната последователност в праймер 1 е 60°C, пробата ще се амплифицира първоначално за 15-20 цикъла от 94°C/45°C и 60°C/45°C, след това ще се амплифицира за 15-20 цикъла от 94°C/45°C и 50°C/45°C. Понижаването на температурата на сдвояване във втората стъпка на PCR ще благоприятства образуването на удължени PCR-продукти чрез повишаване шанса за "колебливо" свързване на праймер 3 с повторената последователност. Получените удължени PCR-продукти ще са по-малко податливи на изтичане през клетъчния матрикс, което води до по-добро задържане на сигнала при анализа чрез PCR *in situ*.

Пример 14

Теломеразен РНК-компонент на други (различни от хората) примати

За да се демонстрира, че последователности на теломеразен РНК-компонент от други бозайници могат да се получат като се използват праймери на основата на последователността на човешкия РНК-компонент, се използват праймери за PCR с човешка последователност за амплификацията на последователности на теломеразен РНК-компонент от геномна ДНК на дървесна

маймуна, вид, за който се смята, че е един от видовете не-човешки примати, който е най-много дивергирал еволюционно в сравнение с хората.

Геномна ДНК от дървесна маймуна се амплифицира с праймери F3b (5'-TCTAACCCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3') и H3+20 (5'-CTCAAGGTCATCGCCAAGGT-3'), както е описано. Наблюдава се единична ивица ДНК, която впоследствие се клонира във вектора pBluescriptII SK (Stratagene, San Diego, CA). Получените клонове се секвенират частично, като се използва методът за PCR с универсалния обратен праймер (5'-AACAGCTATGACCATG-3'), праймер 210-3' (5'-TCACGTCTCCTGCCAATTTGC-3') или праймер H3+20. Получената частична последователност на теломеразния РНК-компонент от дървесна маймуна е:

5' -GGCGCGCTTCCCTGAGCTGTGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTCACACATGCAGTTCG
CTTTCCTGCTGGTGGGGGGACGCCGATCGTGGCCATCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGG
GGCTTGTGAATCCCTAAATCTGACTGA-3'

и

5' -TTTTGAGAGATCATTAAGTATTTAATGAATATTTAGCTAGAAGATCTAAACGAAAATT
CAAGTTGTGTTCCCTTTAGTGGTCATCGGTTTATGCCGAAGGTTACAAATTTCTTCTTTGAA
AAATTAGACCATTGGCGATGATCCTTGA-3'

При наслагване върху последователността на гена за човешкия теломеразен РНК-компонент чрез използване на конвенцията за номериране на гена за човешкия теломеразен РНК-компонент (тиретата представляват празнини, въведени за да се оптимизира напасването) се получава следното успоредно съпоставяне (на последователностите):

		1900
човек	CGCGCGGGCGGATTCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTC	
маймуна	GGCGCGCTTCCCTGAGCTGT-GGACGTGCACC-AGGACTCGGCTC	
		1950
човек	ACACATGCAGTTCGCTTTCCTGTTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGCAGCA	
маймуна	ACACATGCAGTTCGCTTTCCTGCTGGT-GGGGGGACGCCGATCGTGGCCA	
		2000
човек	TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCAAACCTGACT	
маймуна	TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAATCCCTAAATCTGACT	
		2050
човек	GACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTCCAA	

маймуна GA

и

2300

човек TTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGATCTA
 маймуна TTTTGAGAGATCATTTAAGTATTTAATGAATATTTAGCTAGAAGATCTA

2350

човек AATGAACATTGGAAATTGTGTTCCTTTAATGGTCATCGGTTTATGCCAGA
 маймуна AACGAAAATT-GAAGTTGTGTTCCTTTAGTGGTCATCGGTTTATGCCGAA

2400

човек GGTTAGAAGTTTCTTTTTTGAATAATTAGACC-TTGGCGATGA-CCTTGAGC
 маймуна GGTTACAAATTTCTTCTTTGAATAATTAGACCATTGGCGATGATCCTTGA

Предхождащите примери описват различни аспекти на изобретението и как се получават определени нуклеинови киселини на изобретението. Примерите нямат за цел да дадат изчерпателно описание на многото други приложения на изобретението, които са обхванати от следващите претенции.

ПАТЕНТНИ ПРЕТЕНЦИИ

1. РНК-компонента на теломераза на бозайник в по същество чиста форма.

2. РНК-компонента съгласно претенция 1, характеризираща се със следната нуклеотидна последователност:

```
GGGUUGCGGAGGGAGGGUGGGCCUGGGAGGGGUGGUGGCCAUUUUUUGUC
UAACCCUAACUGAGAAGGGCGUAGGCGCCGUGCUUUUGUCUCCCCGCGCGC
UGUUUUUCUCGUGACUUUCAGCGGGCGGAAAAGCCUCGGCCUGCCGCCU
UCCACCGUUCAUUCUAGAGCAAACAAAAAUGUCAGCUGCUGGCCCGUUC
GCCCCUCCCGGGACCUGCGGGCGGGUCGUCGCCAGCCCCGAACCCGCC
UGGAGGCCGCGGUCGGCCGGGGCUUCUCCGGAGGCACCCACUGCCACCGC
GAAGAGUUGGGCUCUGUCAGCCGCGGGUCUCUCGGGGGCGAGGGCGAGGU
UCACCGUUUCAGGCCGCAGGAAGAGGAACGGAGCGAGUCCCGCGCGCGGC
GCGAUUCCUGAGCUAUGGGACGUGCACCCAGGACUCGGCUCACACAUGC
AGUUCGCUUUUCUGUUGGUGGGGGGAACGCCGAUCGUGCGCAUCCGUCAC
CCUCGCCGGCAGUGGGGGCUUGUGAACCCCAAACCUGACUGACUGGGC
CAGUGUGCU
```

3. Олигонуклеотид в по същество чиста форма, характеризиращ се с това, че включва последователност, идентична или точно комплементарна на непрекъснатата последователност от РНК-компонента съгласно претенция 2, с дължина от 10 до 500 нуклеотида.

4. Олигонуклеотид съгласно претенция 3, характеризиращ се с това, че при свързване с РНК-компонента на човешка теломераза инхибира или блокира активността на теломеразата.

5. Рекомбинантен експресионен плазмид характеризиращ се с това, че включва олигонуклеотид съгласно претенция 3 и промотор за направляване транскрипцията на РНК с последователност, комплементарна или идентична на олигонуклеотида.

6. Рекомбинантният експресионен плазмид съгласно претенция 5, характеризиращ се с това, че олигонуклеотидът притежава следната нуклеотидната последователност:

5'-GATCAGTTAGAAAGTTACTAGTCCACATATAAAGTGCCAAGTCTTGTACT
 CAAGATTATAAGCAATAGGAATTTAAAAAAGAAATTATGAAAAGTACA
 AGATTTAGTGCCTACTTAGATATGAAGGGGAAAGAAGGGTTTGAGATAAT
 GTGGGATGCTAAGAGAATGGTGGTAGTGTGACATATAACTCAAAGCATT
 TAGCATCTACTCTATGTAAGGTTACTGTGCTAAGTGCAATAGTGCTAAAAA
 CAGGAGTCAGATTCTGTCCGTAAAAAAGTTTACAACCTGGCAGATGCTAT
 GAAAGAAAAAGGGGATGGGAGAGAGAGAAGGAGGGAGAGAGATGGAGAGG
 GAGATATTTTACTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTTCTTTT
 CAGATCGAGGACCGACAGCCACAACCTCCAC
 GGAGTTTATCTAACTGAATACGAGTAAAACTTTTAAAGATCATCCTGTCTAT
 TTATATGTAAAACTGCACTATACTGGCCATTATAAAAAATTCGCGGCCGGG
 TGCCGGTGGCTCATACCTGTAATCCCAGCACTTTGGGAGGCCGAAGCGGGT
 GGATCACTTGAGCCCTGGCGTTCGAGACCAGCCTGGGCAACATGGTGAAA
 CCCCCGTCTCTACTAAAAACACAAAAACTAGCTGGGCGTGGTGGCAGGCG
 CCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAGGCTGAGACACGAGAATCGCTTGAACC
 CGGGAGCAGAGGTTGCAGTGAGCCGAGATCACGCCACTAGACTCCATCCA
 GCCTGGGCGAAAGAGCAAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAATCGTTACAAT
 TTATGGTGGATTACTCCCCTCTTTTTTACCTCATCAAGACACAGCACTACT
 TTAAGCAAAGTCAATGATTGAAACGCCTTTCTTTTCTTAATAAAAGGGAG
 ATTCAGTCCTTAAGATTAATAATGTAGTAGTTACACTTGATTAAAGCCAT
 CCTCTGCTCAAGGAGAGGCTGGAGAAGGCATTCTAAGGAGAAGGGGGCAG
 GGTAGGAACTCGGACGCATCCCCTGAGCCGAGACAAGATTCTGCTGTAG
 TCAGTGCTGCCTGGGAATCTATTTTCACAAAGTTCTCCAAAAAATGTGAT
 GATCAAACTAGGAATTAGTGTCTGTGTCTTAGGCCCTAAAATCTTCTCT
 GTGAATTCATTTTTAAGGTAGTCGAGGTGAACCGCGTCTGGTCTGCAGA
 GGATAGAAAAAGGCCCTCTGATACCTCAAGTTAGTTTACCTTTAAAGA
 AGGTTCGGAAGTAAAGACGCAAAGCCTTTCCCGGACGTGCGGAAGGGCAAC
 GTCCCTTCTCATGGCCGGAAATGGAACTTTAATTTCCCGTTCCCCCAAC
 CAGCCCGCCCCGAGAGAGTGAATCTCACGAGAGCCGCGAGAGTCAGCTTGG
 CCAATCCGTGCGGTGCGCGGCCGCTCCCTTTATAAGCCGACTCGCCCGGC
 AGCGCACCGGGTTGCGGAGGGAGGGTGGGCCTGGGAGGGGTGGTGGCCAT
 TTTTTGTCTAACCTAACTGAGAAGGGCGTAGGCGCCGTGCTTTTGTCTCC
 CCGCGCGCTGTTTTTCTCGCTGACTTTTACGCGGGCGGAAAAGCCTCGGCC
 TGCCGCCTTCCACCGTTCATTCTAGAGCAAACAAAAAATGTCAGCTGCTG
 GCCCGTTTCCGCCCTCCCAGGACCTGCGGCGGGTCTGCTGCCAGCCCCGA
 ACCCCGCTTGAGGCCGCGGGTCCGCGGGGGCTTCTCCGGAGGCACCCACT
 GCCACCGCGAAGAGTTGGGCTCTGTGAGCCGCGGGTCTCTCGGGGGCGAG
 GCGGAGGTTACCGTTTACGGCCGAGGAAGAGGAACGGAGCGAGTCCCG
 CGCGCGGCGCGATTCCCTGAGCTATGGGACGTGCACCCAGGACTCGGCTC
 ACACATGCAGTTCGCTTTCTTGTGGTGGGGGGAACGCCGATCGTGCGCA
 TCCGTCACCCCTCGCCGGCAGTGGGGGCTTGTGAACCCCCAAACCTGACT
 GACTGGGCCAGTGTGCTGCAAATTGGCAGGAGACGTGAAGGCACCTCCAA
 ATGCGGCCAAAATGAATGGGCAGTGAGCCAGGGTTGCCTGGAGCCGTTC
 TGCGTGGGTTCTCCCGTCTTCCGCTTTTTGTTGCCTTTTATGGTTGTATT
 ACAACTTAGTTCCTGCTCTGCAGATTTTGTGAGGTTTTTGTCTTCTCCCA
 AGGTAGATCTCGACCAGTCCCTCAACGGGGTGTGGGGAGAACAGTCATTT
 TTTTTGAGAGATCATTTAACATTTAATGAATATTTAATTAGAAGATCTA
 AATGAACATTTGAAATTTGTGTTTCTTTAATGGTCATCGGTTTTATGCCAGA
 GGTTAGAAGTTTTCTTTTTTGAATAATAGACCTTGGCGATGACCTTGAGC
 AGTAGGATATAACCCCCACAAGCTT-3'

7. Еукариотична клетка-гостоприемник, характеризираща се с това, че е трансформирана с рекомбинантен експресионен плазмид съгласно претен-

ция 4, кодиращ молекула РНК, която може да асоциира с белтъчни компоненти на теломераза на бозайници, за продуциране на теломеразна активност, способна да добавя последователности от повтарящи се единици от нуклеотиди към теломерите.

8. Метод за получаване на рекомбинантен теломеразен ензим, характеризира се с това, че включва трансформиране на еукариотна клетка-гостоприемник, която експресира белтъчни компоненти на теломераза, посредством рекомбинантен експресионен вектор, кодиращ РНК-компонента съгласно претенция 7, и култивиране на клетките-гостоприемници, трансформирани с вектора при такива условия, че белтъчните компоненти и РНК-компонента да се експресират и свързват за образуване на активна теломеразна молекула, способна да прибавя последователности към теломерите на хромозомната ДНК.

9. Метод за идентифициране на предполагаеми средства за модулиране на теломеразата, характеризира се с това, че включва:

провеждане на тест за хетеродимеризация или теломеразна активност, включващ: (1) полинуклеотид, включващ полинуклеотид, съществено идентичен с РНК-компонента на човешка теломераза и способен да се свързва с човешки теломеразен белтък, (2) съществено пречистен човешки теломеразен белтък и (3) агент;

определяне дали средството инхибира хетеродимеризацията или теломеразната активност на човешката теломеразна РНК и човешкия теломеразен белтък;

идентифициране на средства, които инхибират хетеродимеризацията или теломеразната активност като предполагаеми средства за модулиране на теломеразата, които инхибират теломеразната активност.

10. Метод за идентифициране на теломеразна активност в човешки клетки, характеризира се с това, че включва пренасяне в клетките на екзогенен полинуклеотид, съдържащ транскрипционна единица, с полинуклеотидна последователност от най-малко 25 последователни нуклеотида, която е по същество идентична или по същество комплементарна на последовател-

ност на човешка теломеразна РНК, оперативно свързана с хетероложна транскрипционна регулаторна последователност, която направлява транскрипцията на оперативно свързания полинуклеотид в клетките.

11. Метод за установяване наличието на неопластично състояние при пациент, характеризиращ се с това, че включва етапите на:

изолиране на клетъчна проба от пациент;

установяване на човешка теломеразна РНК-компонента в клетъчната проба за определяне на диагностичната стойност;

сравняване на диагностичната стойност със стандартна стойност за експресия на човешка теломеразна РНК-компонента в не-неопластични клетки от същия тип, от който е клетъчната проба;

поставяне на диагноза, като за наличието на неопластично състояние се посочва диагностична стойност, която е съществено по-голяма от стандартната стойност, така че да посочва наличието на неопластично състояние.

12. Метод за определяне наличието на теломеразна РНК-компонента на бозайници в клетка или клетъчна проба, характеризиращ се с това, че включва провеждането на амплификация или хибридизация с полинуклеотид на теломеразна РНК-компонента, с праймер за теломеразна РНК-компонента или с последователност, комплементарна на полинуклеотид на теломеразна РНК-компонента или на праймер за теломеразна РНК-компонента.

ПРИЛОЖЕНИЕ: 4 ФИГУРИ

Издание на Патентното ведомство на Република България
1113 София, бул. "Д-р Г. М. Димитров" 52-Б

Експерт: Ст. Стефанова

Редактор: Р.Георгиева

Пор. № 41426

Тираж: 40 ВК

ТЕКСТ КЪМ ФИГУРИТЕ

Фиг. 1

1. нормални; 2. условия на теста; 3. мутантен екстракт.

Фиг. 2

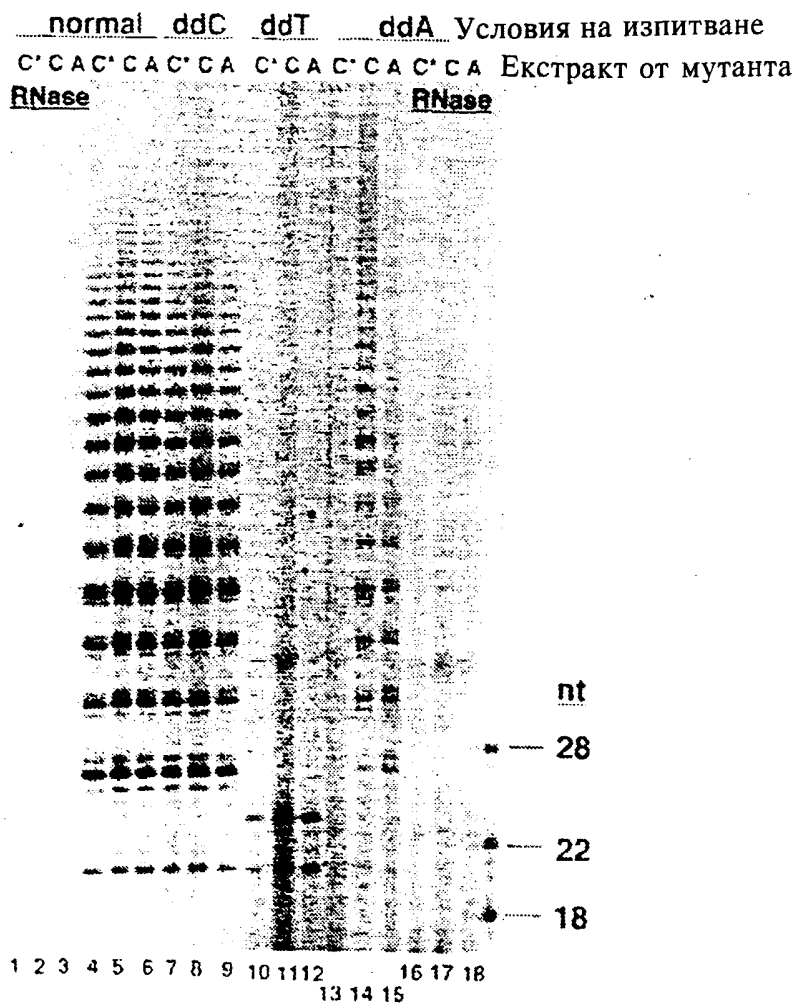
1. относителен сигнал; 2. клетъчен тип.

Фиг. 3

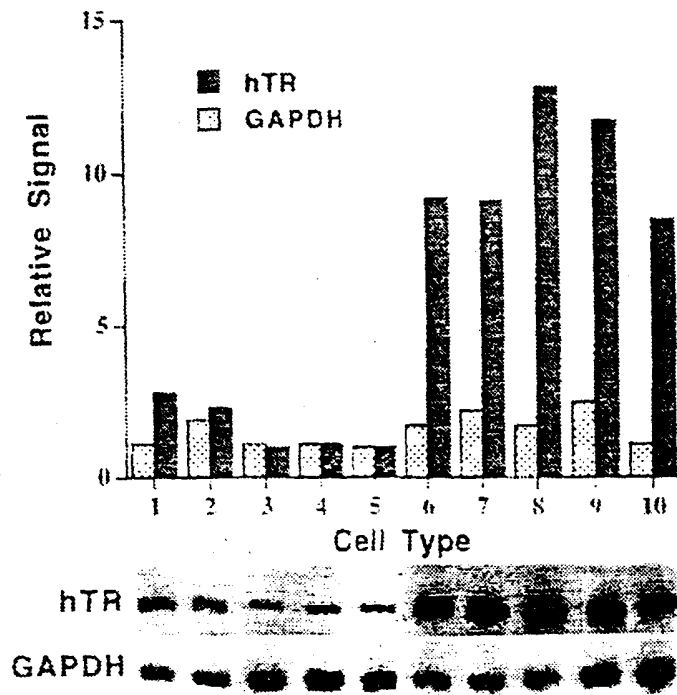
1. средна TRF (средна дължина на теломерните рестриктазни фрагменти); 2. антисенс p10-3-hTR; 3. контрола p10-3.

Фиг. 4.

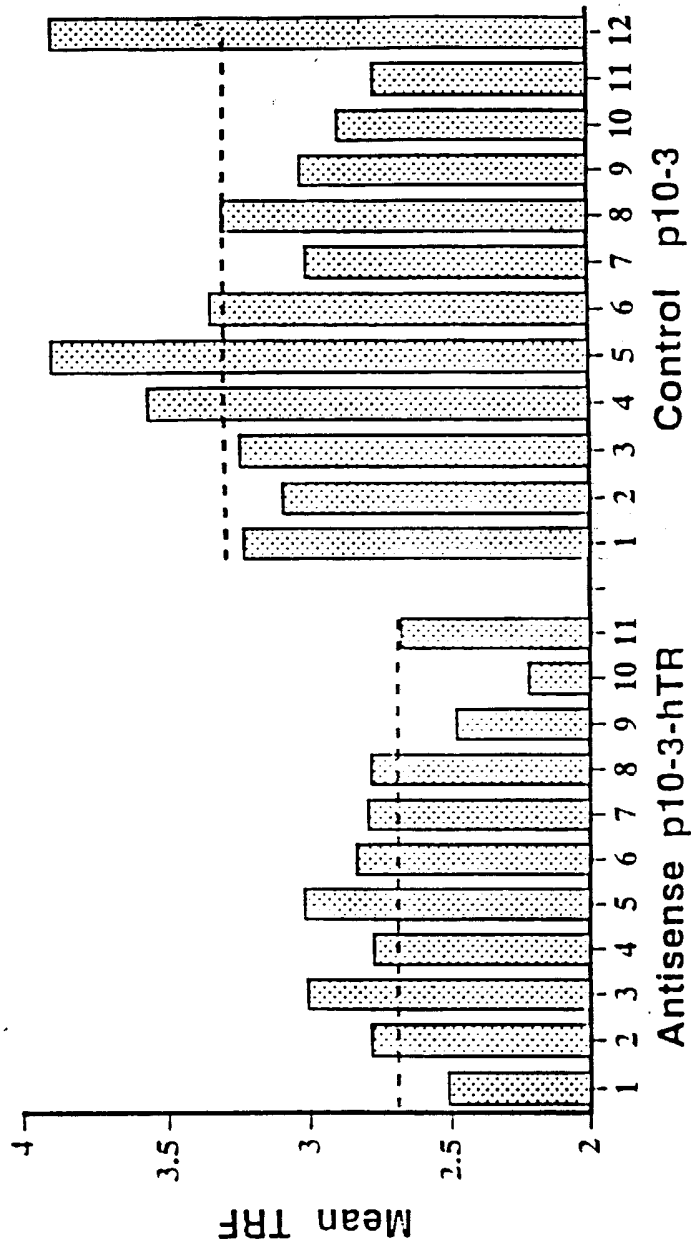
1. праймер 1; 2. матрична ДНК; 3. праймер 2; 4. праймер 3; 5. удължаване на продукта от PCR; 6. последователност на правия праймер; 7. последователност на обратния праймер.



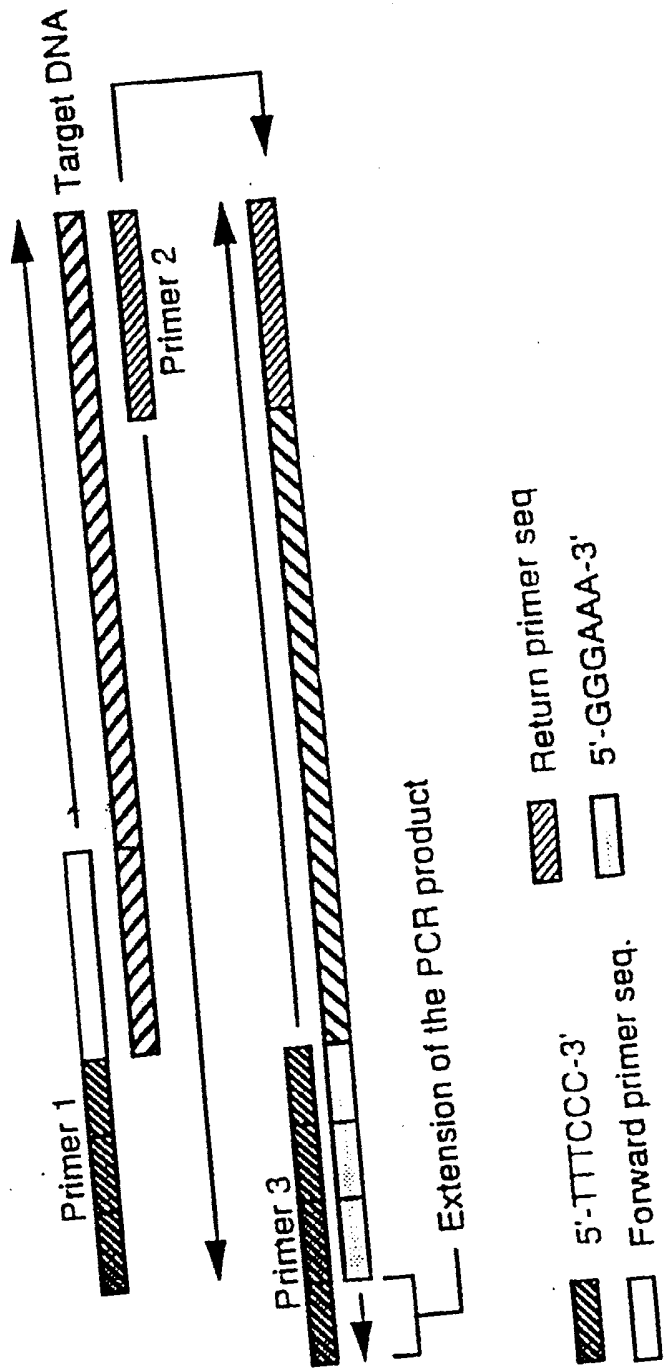
ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3



ФИГ. 4