



PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12Q 1/68, 1/70, C12N 9/12	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 97/20069 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Juni 1997 (05.06.97)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP96/05245 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1996 (27.11.96) (30) Prioritätsdaten: 195 44 317.9 28. November 1995 (28.11.95) DE 196 44 302.4 24. Oktober 1996 (24.10.96) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): EMRICH, Thomas [DE/DE]; Blombergstrasse 9, D-82393 Iffeldorf (DE). LEYING, Her- mann [DE/DE]; Benediktenwandstrasse 11, D-83673 Bichl (DE). HINZPETER, Matthias [DE/DE]; Baudererstrasse 19, D-80689 München (DE). KARL, Gerlinde [DE/DE]; Badgasse 12, D-82467 Garmisch-Partenkirchen (DE). (74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, CN, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> <i>Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen</i> <i>Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen</i> <i>eintreffen.</i>	
(54) Title: METHOD OF DETECTING TELOMERASE ACTIVITY (54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUM NACHWEIS VON TELOMERASE-AKTIVITÄT (57) Abstract <p>The invention relates to a method of detecting telomerase activity involving the following steps: (a) a test specimen is prepared; (b) a first primer suitable as a telomerase substrate and nucleoside triphosphates are added and the reaction mixture is incubated under conditions conducive to primer extension by the telomerase; (c) amplification of the extension product produced by the telomerase; (d) the amplification product obtained in step (c) is immobilised on a solid phase; and (e) the immobilised amplification product is detected or quantitatively measured. The invention also relates to a reagent kit for carrying out the claimed process.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität, wobei man: (a) eine zu testende Probe bereitstellt; (b) einen als Telomerasesubstrat geeigneten ersten Primer und Nucleosidtriphosphate zugibt und das Reaktionsgemisch unter Bedingungen inkubiert, bei denen eine Primerextension durch die Telomerase stattfinden kann; (c) eine Amplifikation des durch die Telomerase erzeugten Extensionsprodukts durchführt; (d) das in Schritt (c) erzeugte Amplifikationsprodukt an einer Festphase immobilisiert; und (e) das immobilisierte Amplifikationsprodukt qualitativ oder/und quantitativ nachweist. Weiterhin betrifft die Erfindung einen zur Durchführung des Verfahrens geeigneten Reagenzienkit.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AM	Armenien	GB	Vereinigtes Königreich	MX	Mexiko
AT	Österreich	GE	Georgien	NE	Niger
AU	Australien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BB	Barbados	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BE	Belgien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BF	Burkina Faso	IE	Irland	PL	Polen
BG	Bulgarien	IT	Italien	PT	Portugal
BJ	Benin	JP	Japan	RO	Rumänien
BR	Brasilien	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
BY	Belarus	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CA	Kanada	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KR	Republik Korea	SG	Singapur
CG	Kongo	KZ	Kasachstan	SI	Slowenien
CH	Schweiz	LI	Liechtenstein	SK	Slowakei
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CM	Kamerun	LR	Liberia	SZ	Swasiland
CN	China	LK	Litauen	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
EE	Estland	MG	Madagaskar	UG	Uganda
ES	Spanien	ML	Mali	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	MN	Mongolei	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MR	Mauretanien	VN	Vietnam
GA	Gabon	MW	Malawi		

Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität

B E S C H R E I B U N G

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität sowie dafür geeignete Reagenzien.

Telomere sind spezifische Strukturen an den Enden von Chromosomen und bestehen bei eukaryontischen Organismen aus einer Anhäufung von sich wiederholenden definierten Nucleotidsequenzen (Repeats), die beispielsweise bei Menschen die Sequenz TTAGGG enthalten. In somatischen Zellen führt jede Replikation der Zelle unweigerlich zu einer Verkürzung der Telomerenden und ab einer bestimmten Unterschreitung der Telomerlänge schließlich zum Absterben der Zelle.

Virus-transformierte oder immortalisierte Zellen dagegen zeigen keine Reduzierung in ihrer Telomerlänge. Dies ist durch die Aktivität eines endogenen Ribonucleoproteins in diesen Zellen begründet, welches als Telomerase bezeichnet wird und in einer der Reversen Transkriptase ähnlichen Reaktion der Telomerverkürzung entgegenwirken kann.

Da die Expression der Telomerase nach bisherigen Erkenntnissen auf Tumorzellen, Keimzellen und immortalisierte Zellen beschränkt ist, stellt dieses Protein einen vielversprechenden Parameter für eine Diagnostik von Tumoren sowie einen Angriffspunkt für eine Tumorthherapie dar (vgl. z.B. die Übersichtsartikel von Greider, 1994, Curr. Opin. Gen. Dev. 4, 203-211; Counter et al., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 2900-2904 und Hiyama et al., 1995, Nature Med. 1, 249-255).

Die in der Literatur beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität basieren alle auf einer in vitro-Detektion der Enzymaktivität. Ein immunologischer Nachweis des humanen Enzyms ist derzeit nicht möglich, da seine Proteinsequenz noch

- 2 -

nicht bekannt ist. Lediglich die Sequenz der Telomerase aus Tetrahymena wurde kürzlich beschrieben (Collins et al., 1995, Cell 81, 677-686).

Bei den in der Literatur beschriebenen Nachweisverfahren unterscheidet man zwischen zwei prinzipiellen Methoden. Die erste Methode beruht darauf, daß ein aus der Telomerasequenz abgeleitetes synthetisches Oligonucleotid als Primer dient. Dieser Primer wird zusammen mit unmarkierten Didesoxynucleotiden und einem radioaktiv markierten Desoxynucleotid einer Probe, z.B. einem Telomerase enthaltenden Zellextrakt zugesetzt, wobei der Primer durch die Telomerase spezifisch elongiert und das Syntheseprodukt dabei radioaktiv markiert wird. Der Reaktionsansatz wird anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Bandenmuster durch Exposition eines Röntgenfilms mit nachfolgender Entwicklung sichtbar gemacht (Morin, 1989, Cell 59, 521-529; Nilsson et al., 1993, Oncogene 9, 3043-3048).

Auch bei der anderen Nachweismethode wird zunächst ein Telomerase-spezifisches Elongationsprodukt erzeugt. Dieses wird jedoch in einer anschließenden Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und gleichzeitig durch Zusatz von radioaktiven Desoxynucleotiden markiert. Der Nachweis der markierten PCR-Produkte erfolgt durch Gelelektrophorese (Kim et al. 1994, Science 266, 2011-2015).

WO 95/13381 beschreibt ein Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität, wobei ein zu testender Zellextrakt mit einem Primer in Kontakt gebracht wird, der keine telomeren Repeatsequenzen enthält, wobei die Telomerase eine Extension des Primers durch Anfügen telomerer Repeatsequenzen katalysieren kann. Anschließend erfolgt ein Amplifikationsschritt unter Zugabe eines zweiten Primers. Der Nachweis der Telomerase-Aktivität erfolgt schließlich durch gelelektrophoretische Auftrennung der resultierenden Amplifikationsprodukte.

Diese Nachweisverfahren des Standes der Technik besitzen jedoch

einige Nachteile. So hat ein Nachweisverfahren ohne Amplifikationsschritt eine zu geringe Sensitivität für routinemäßige Anwendungen, da Extraktmengen mit 10^6 bis 10^7 Zellen eingesetzt werden müssen. Zur Untersuchung von primärem Tumormaterial, das nur in geringer Menge zur Verfügung steht, ist diese Methode deshalb nicht verwendbar. Weiterhin bewegt sich die Expositionsdauer der Gele im Bereich von 2 bis 7 Tagen, was ebenfalls auf die geringe Sensitivität zurückzuführen ist. Bei der einen Amplifikationsschritt enthaltenden Nachweismethode tritt dieser Nachteil zwar nicht auf, da routinemäßig nur 10^5 Zelläquivalente pro Test eingesetzt werden müssen und 10^3 Zelläquivalente reproduzierbar nachgewiesen werden können. Die Expositionszeiten der Gele betragen jedoch auch bei diesen Verfahren noch mindestens einen Tag (Kim et al., 1994, Supra; Chadeneau et al., 1995, Cancer Res. 55, 2533-2536).

Beide in der Literatur beschriebenen Nachweismethoden haben den Nachteil, daß die Markierung des Elongationsprodukts bzw. des PCR-Produkts mit radioaktiven Markierungsgruppen erfolgen muß, um befriedigende Ergebnisse zu erhalten. Dies führt zu hohen Expositionszeiten und zum unerwünschten Entstehen von radioaktivem Abfall. Weiterhin hat die elektrophoretische Auftrennung des Reaktionsansatzes, gefolgt von anschließender Exposition und Entwicklung eines Röntgenfilms einen hohen manuellen Aufwand zur Folge.

Darüberhinaus erlaubt keine der genannten Methoden einen hohen Probendurchsatz. Für eine Automatisierung, wie sie z.B. für die Routineanalytik oder für ein Effektor-Screening notwendig ist, sind sie nicht geeignet.

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, Nachteile der Verfahren des Standes der Technik mindestens teilweise zu beseitigen. Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität, dadurch gekennzeichnet, daß man

(a) eine zu testende Probe bereitstellt,

- 4 -

- (b) einen als Telomerasesubstrat geeigneten ersten Primer und Nucleosidtriphosphate zugibt und das Reaktionsgemisch unter Bedingungen inkubiert, bei denen eine Primerextension durch die Telomerase stattfinden kann,
- (c) eine Amplifikation des durch die Telomerase erzeugten Extensionsprodukts durchgeföhrt,
- (d) das in Schritt (c) erzeugte Amplifikationsprodukt an einer Festphase immobilisiert und
- (e) das immobilisierte Amplifikationsprodukt qualitativ oder/und quantitativ nachweist.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß durch Immobilisierung des Amplifikationsprodukts die Spezifität der Telomerase-reaktion beibehalten wird, d.h. ein positives Signal kann reproduzierbar auf eine Telomerase-Aktivität zurückgeföhrt werden. Die nach dem Stand der Technik erforderliche gelelektrophoretische Auftrennung des Reaktionsansatzes ist somit überflüssig. Weiterhin wird eine sehr hohe Sensitivität erreicht. In bestimmten Testformaten kann durch das erfindungsgemäße Verfahren sogar ein Sensitivitätsgewinn gegenüber den Verfahren des Standes der Technik erzielt werden. Außerdem ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren die Verwendung von nicht-radioaktiven Markierungen möglich und bevorzugt, wodurch die beim Umgang mit radioaktiven Substanzen auftretenden Schwierigkeiten vermieden werden können. Diese Vorteile machen das erfindungsgemäße Verfahren hervorragend für Routineanwendungen in automatisierten Nachweisgeräten geeignet.

Das erfindungsgemäße Verfahren ermöglicht einen spezifischen Nachweis von amplifizierten Telomerase-Extensionsprodukten, ohne daß eine Separation der Reaktionsprodukte erforderlich ist. Dies konnte nicht ohne weiteres erwartet werden, da sämtliche Amplifikationsansätze neben den Telomerase-Extensionsprodukten auch unspezifische Nebenprodukte wie z.B. Primer-Dimere, Repeatsequenzen enthalten. So mußte man befürchten, daß auch diese unspezifischen Produkte beim Nachweis mit einer gegen die Repeatsequenz gerichteten Fang- oder Detek-

tionssonde erfaßt werden. Ebenso war zu befürchten, daß bei Zusatz eines internen Standards dieser stets mitdetektiert werden würde. Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß durch Auswahl geeigneter Hybridisierungsbedingungen und gegebenenfalls durch Zusatz unmarkierter Oligonucleotide, die komplementär zu den Primersequenzen sind, ein hochspezifischer Nachweis von Telomeraseextensionsprodukten ohne Separationsschritt gelingt.

Der Nachweis der Telomerase-Aktivität erfolgt vorzugsweise durch Verwendung von Markierungsgruppen, insbesondere von nicht-radioaktiven Markierungsgruppen. Als nicht-radioaktive Markierungsgruppen können alle bekannten Markierungsgruppen verwendet werden, z.B. immunologisch reaktive Gruppen, z.B. Nucleotidanaloga oder Haptene, die mit einem Nachweisantikörper reagieren können, Enzyme wie etwa Peroxidase, Galactosidase oder alkalische Phosphatase, fluoreszierende oder lumineszierende Gruppen, z.B. Elektrochemilumineszenz-Gruppen, oder andere Nachweisgruppen wie etwa NMR-aktive Markierungsgruppen oder elektronendichte Gruppen. Bevorzugt sind immunologisch reaktive Gruppen wie etwa Nucleotidanaloga, z.B. Halogenderivatisierte Nucleotide wie etwa Br-dUTP, oder mit organischen Resten, die mindestens ein C-Atom enthalten, derivatisierte Nucleotide wie etwa CH₃-dCTP, oder Haptene, z.B. Digoxigenin, Digoxin, Fluorescein etc., lumineszierende Gruppen wie etwa lumineszierende Metallkomplexe, z.B. Ruthenium-Komplexe, und fluoreszierende Gruppen wie etwa Fluorescein.

Die nicht-radioaktiven Markierungsgruppen können einerseits direkt in das Amplifikationsprodukt eingebaut werden. Dieser Einbau kann beispielsweise durch Verwendung von markierten Nucleotiden oder/und markierten Primern erfolgen. Andererseits können die Amplifikationsprodukte auch indirekt z.B. durch Verwendung einer geeigneten Markierungssonde markiert werden, d.h. einer Sonde, die selbst eine oder mehrere Markierungsgruppen enthält und spezifisch mit dem Amplifikationsprodukt hybridisiert. Als Markierungssonden kann man z.B. Oligonucleo-

- 6 -

tide oder/und Nucleinsäureanaloga verwenden. Die Hybridisierung der Sonde an das Amplifikationsprodukt kann vor oder/und nach dem Immobilisierungsschritt erfolgen.

Schritt (a) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt das Bereitstellen einer zu testenden Probe. Vorzugsweise ist diese Probe ein Zellextrakt, insbesondere ein Extrakt aus humanen Zellen. Der Zellextrakt kann jedoch auch aus anderen eukaryontischen Organismen wie etwa Hefen oder Tetrahymena stammen. Vorzugsweise wird der Zellextrakt durch Lyse von Zellen in einem Puffer hergestellt, der 0,01 - 5 Gew.-% eines nichtionischen oder/und zwitterionischen Detergens enthält. Andererseits ist eine Lyse der Probe auch durch gegebenenfalls mehrmaliges Auftauen/Einfrieren möglich. Anschließend werden vorzugsweise unlösliche Bestandteile, wie etwa zelluläre Rückstände, durch Zentrifugation oder/und Filtration entfernt und der Überstand gesammelt. Gute Ergebnisse werden mit einer Extraktmenge erhalten, die 10^2 bis 10^5 Zelläquivalenten entspricht. Auch bei Verwendung von nur 1 - 10 Zelläquivalenten werden noch spezifische Signale erhalten. Wenn es sich bei der zu testenden Probe um Gewebe, z.B. Tumorgewebe, handelt, werden vorzugsweise 10 - 1000 ng Gewebe für einen Test verwendet.

Schritt (b) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt die Zugabe eines als Telomerasesubstrat geeigneten einzelsträngigen Primers zur Probe und die Inkubation des resultierenden Reaktionsgemisches unter Bedingungen, bei denen eine Primerextension durch die Telomerase stattfinden kann. Der Primer ist vorzugsweise ein Oligodesoxyribonucleotid. Die Länge des Primers ist vorzugsweise 10 - 50 und besonders bevorzugt 12 - 30 Nucleotide. Bei diesem Verfahren kann man einerseits einen ersten Primer verwenden, der frei von telomeren Repeatsequenzen ist. Ein bevorzugtes Beispiel für einen derartigen Primer ist ein von Morin et al. (1991), Nature 353, 454 - 456, beschriebener Primer P1 mit der in SEQ ID NO. 1 gezeigten Nucleotidsequenz. Weiterhin wurde überraschenderweise festgestellt, daß auch Primer geeignet sind, die aus dem 5'-Bereich einer

- 7 -

retroviralen LTR-Sequenz, z.B. aus dem 5'-Bereich der LTR-Sequenz von HIV stammen. Ein Beispiel für einen solchen Primer ist in SEQ ID NO. 2 gezeigt. Neben einzelsträngigen Primern können im übrigen auch doppelsträngige Primer mit einem 3'-Überhang eingesetzt werden.

Andererseits kann man auch einen ersten Primer verwenden, der telomere Repeatsequenzen enthält, z.B. den Primer P1-Telo mit der in SEQ ID NO. 3 gezeigten Nucleotidsequenz.

Bei Verwendung von nicht-radioaktiven Markierungsgruppen wird der Extensionsschritt (b) vorzugsweise so durchgeführt, daß nur unmarkierte Nucleosidtriphosphate an den ersten Primer angefügt werden können. Der Grund hierfür ist, daß bei Anwesenheit von nicht-radioaktiv markierten Nucleosidtriphosphaten im Reaktionsgemisch, die von der Telomerase als Substrat verwendet werden können, eine partielle Hemmung der Telomerase-Aktivität gefunden wird, die zu einer etwas ineffizienteren Primerelongation führt. Dennoch ist in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung der Einbau von nicht-radioaktiven Markierungsgruppen auch während der Primerextension möglich.

Vorzugsweise werden jedoch nicht-radioaktive Markierungsgruppen erst beim nachfolgenden Amplifikationsschritt (c) in das Produkt eingeführt. Dies kann beispielsweise dadurch erreicht werden, daß man nicht-radioaktiv markiertes CTP (kein Bestandteil der telomeren Repeat-Sequenzen) verwendet. In diesem Fall kann die Reaktion als "Eintopfreaktion" ohne Kompartimentierung durchgeführt werden. Andererseits können die nicht-radioaktiv markierten Nucleosidtriphosphate erst später mit dem Reaktionsgemisch in Kontakt gebracht werden. Dies kann beispielsweise durch Kompartimentierung erreicht werden, wobei die nicht-radioaktiv markierten Nucleosidtriphosphate während des Extensionsschritts (b) vom Reaktionsgemisch durch eine entfernbare Barriere, z.B. eine bei höheren Temperaturen schmelzbare Wachsschicht abgetrennt sind. Andererseits ist natürlich auch eine sequentielle Zugabe der Reaktanten möglich.

- 8 -

Weiterhin kann es bevorzugt sein, daß man nach dem Extensionsschritt (b) eine zusätzliche Template-unabhängige Elongation des von der Telomerase erzeugten Extensionsprodukts durchführt. Diese Elongation wird vorzugsweise durch eine enzymatische Reaktion, z.B. durch Anfügen von Nucleotiden, z.B. durch eine Polyadenylierung mittels Terminaler Transferase oder durch Anligation von kurzen DNA-Fragmenten mittels DNA-Ligase durchgeführt.

Schritt (c) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt eine Amplifikation des durch die Telomerase erzeugten Extensionsprodukts. Die Art des Amplifikationsschritts ist für das erfindungsgemäße Verfahren nicht kritisch. Typischerweise erfolgt die Amplifikation durch Zugabe eines geeigneten Enzyms, das eine Polymerisierung von Nucleinsäuren bewirken kann, z.B. einer Nucleinsäure-Polymerase oder einer Nucleinsäure-Ligase. Vorzugsweise verwendet man ein thermostabiles Enzym und führt die Amplifikation in mehreren Zyklen durch.

Vorzugsweise werden zur Amplifikation zwei Primer verwendet, wobei als erster Primer das Telomerase-Substrat und als zweiter Primer ein geeigneter komplementärer Primer verwendet werden kann. Durch enzymatische Katalyse z.B. durch eine Template-abhängige DNA-Polymerase entsteht das Amplifikationsprodukt durch Anfügen von Nucleotiden an den ersten und zweiten Primer. Der zweite Primer kann vorzugsweise mit der telomeren Repeatsequenz hybridisieren wie etwa der in SEQ ID NO. 4 gezeigte Primer P2. Besonders bevorzugt wird hierzu ein sogenannter Ankerprimer verwendet, der an seinem 5'-Ende einen nicht zur telomeren Repeatsequenz komplementären Bereich enthält. Ein derartiger Ankerprimer hat die Vorteile, daß keine Amplifikationsprodukte entstehen können, die länger als das ursprüngliche Template sind, und daß Primer-Dimere, die bei Verwendung eines Repeatsequenzen enthaltenden Primers ebenfalls Repeatsequenzen enthalten müssen, nicht verlängert werden. Besonders bevorzugt werden Ankerprimer verwendet, die an ihrem 5'-Ende eine von Repeatsequenzen freie Extension enthalten, die

mindestens 4 und insbesondere mindestens 5 nt lang ist. Günstigerweise ist die Länge dieses Sequenzbereichs 4 - 20 Nucleotide. Am meisten bevorzugt sind Ankerprimer mit einer GC-reichen Sequenz am 5'-Ende. Oligonucleotide oder Nucleinsäureanalogue, vorzugsweise mit einer Länge von 10 - 50 nt, die eine zu einer telomeren Repeatsequenz komplementäre Sequenz und 5'-seitig davon von Repeatsequenz freie Extension aufweisen, sind generell als Primer in einem Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität geeignet. Ein Beispiel für einen geeigneten Ankerprimer mit einer 5'-seitigen 6 nt langen Ankersequenz ist der in SEQ ID NO. 5 gezeigte Primer TE-ACT. Ein besonders bevorzugter Ankerprimer ist der in SEQ ID NO. 13 dargestellte Primer TE-3.2. Mit diesem Primer und mit analogen Primern, denen im Vergleich zu TE-3.2 am 3'-Ende bis maximal 3 Nucleotide fehlen, werden besonders gute Testresultate erhalten.

Das Enzym ist vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase, mit der viele Amplifikationszyklen ohne Inaktivierung der Polymerase durchgeführt werden können. Ein besonders bevorzugtes Amplifikationsverfahren ist die Methode der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).

Wenn nach der Extension eine zusätzliche Elongation, z.B. durch Terminale Transferase erfolgt, kann für den anschließenden Amplifikationsschritt (c) ein zweiter Primer verwendet werden, der komplementär zu dem durch Elongation an das Extensionsprodukt angefügten Sequenzabschnitt ist. Ein Beispiel hierfür ist der in SEQ ID NO. 6 gezeigte Primer P3.

Alternativ kann die Amplifikation durch andere, dem Fachmann bekannte Methoden erfolgen. So kann die Reaktion auch durch eine Template-abhängige DNA-Ligase katalysiert werden, wobei das Amplifikationsprodukt durch Anfügen eines Oligodeoxyribonucleotids an die Primer durch die DNA-Ligase erzeugt wird. Vorzugsweise ist die DNA-Ligase eine thermostabile DNA-Ligase und besonders bevorzugt wird ein derartiges Verfahren nach der

Technik der Ligase-Ketten-Reaktion (LCR) durchgeführt.

Schritt (d) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt die Immobilisierung des Amplifikationsprodukts an einer Festphase. Als Festphase kann beispielsweise die Wand des Reaktionsgefäßes dienen. Alternativ können auch partikuläre Festphasen eingesetzt werden. Vorzugsweise wird die Festphase ausgewählt aus Mikrotiterplatten, Mikroreaktionsgefäßen, Membranen, Mikrochips, Biocore-Systemen und gegebenenfalls magnetischen Mikrobeads. Aufgrund des Immobilisierungsschritts wird im Vergleich zu den Verfahren des Standes der Technik eine große Zeitersparnis bei geringerem manuellen Aufwand erreicht. Weiterhin ist ein hoher Probandumsatz und eine Automatisierung, z.B. für die Routineanalytik oder für das Screening von Effektoren möglich.

Die Immobilisierung der Amplifikationsprodukte an der Festphase kann grundsätzlich nach jeder bekannten Methode erfolgen, z. B. durch adsorptive Bindung. Vorzugsweise erfolgt die Immobilisierung jedoch durch spezifische Wechselwirkungen, z.B. über Ankergruppen. Beispiele für geeignete Ankergruppen sind immunologisch reaktive Gruppen, die mit einem Festphase-gebundenen Antikörper reagieren können, oder andere Gruppen, die zu einer hochaffinen Bindung mit einem immobilisierten Partner in der Lage sind. Ein bevorzugtes Beispiel für eine Ankergruppe ist Biotin, das mit hoher Affinität an eine mit Avidin oder Streptavidin beschichtete Festphase binden kann. Für hohe Probenzahlen kann beispielsweise die von Savoysky et al. (Nucleic Acids Res. 24 (1996), 1175-1176) beschriebene Immobilisierungsmethode verwendet werden, bei der ein biotinylierter Telomerase-Extensionsprimer verwendet wird, so daß bei der Amplifikationsreaktion Produkte entstehen, die Biotin als Immobilisierungsgruppe aufweisen. Gleichzeitig wird während der Amplifikation $[Me-^3H]TTP$ eingebaut. Die biotinylierten und $[^3H]$ -markierten Amplifikationsprodukte werden an Streptavidinbeschichtete Fluoromikropartikel immobilisiert. Diese Immobilisierung wird aufgrund von Wechselwirkungen der von $[^3H]$

- 11 -

freigesetzten β -Quanten mit den Fluoromikropartikeln durch Szintillationsmessung nachgewiesen.

Die Einführung der Ankergruppen in das Amplifikationsprodukt kann in verschiedenen Stadien des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgen. So kann man beispielsweise einen oder mehrere Primer verwenden, welche bereits Ankergruppen, z.B. Biotingruppen, enthalten. Andererseits können biotinylierte Nucleotide auch durch Elongation des primären Extensionsprodukts, z.B. mit Terminaler Transferase oder mit DNA-Ligase, oder beim Amplifikationsschritt (c) eingeführt werden.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist es jedoch gar nicht erforderlich, daß das Amplifikationsprodukt selbst eine Ankergruppe enthält. Eine Verankerung an die Festphase kann beispielsweise auch durch Zugabe einer Fangsonde erreicht werden, die eine oder mehrere Ankergruppen trägt und mit dem Amplifikationsprodukt eine unter den Reaktionsbedingungen stabile Hybridisierung eingehen kann. Beispiele für geeignete Fangsonden sind Oligonucleotide, welche telomere Repeatsequenzen oder dazu komplementäre Sequenzen enthalten und eine oder mehrere Ankergruppen, z.B. Biotingruppen enthalten. Besonders bevorzugt sind Fangsonden, die an ihrem 5'-Ende eine Ankergruppe enthalten. Als Fangsonde kann z.B. das in SEQ ID NO. 7 gezeigte Oligonucleotid P4 mit einer 5'-Biotingruppe eingesetzt werden.

Andererseits können auch Nucleinsäureanaloge als Fangsonden eingesetzt werden, z.B. peptidische Nucleinsäuren (Nielsen et al. (1991), Science 254, 1497 - 1500 und Dueholm et al. (1994), J.Org.Chem. 59, 5767 - 5773). Peptidische Nucleinsäuren weisen ein über Säureamidbindungen verknüpftes Rückgrat auf, das Nucleobasen als Seitengruppen enthält. Die Verwendung von peptidischen Nucleinsäuren als Fangsonden - und auch als Markierungssonden - ist in bestimmten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens bevorzugt.

- 12 -

Schritt (e) des erfindungsgemäßen Verfahrens umfaßt den qualitativen oder/und quantitativen Nachweis des Amplifikationsprodukts. Der Nachweis erfolgt über die im Amplifikationsprodukt enthaltenen Markierungsgruppen bzw. über die an das Amplifikationsprodukt gebundenen Markierungssonden auf an sich bekannte Weise. Vorzugsweise erfolgt der Nachweis bei Verwendung von nicht-radioaktiven Markierungsgruppen in automatisierten Meßvorrichtungen. Bevorzugt sind Meßvorrichtungen, in denen der Nachweis der Markierungsgruppen durch colorimetrische oder/und spektrophotometrische Methoden erfolgt, z.B. durch enzymatische Umsetzung eines Substrats bzw. durch Chemilumineszenz oder Fluoreszenz.

Der Nachweis wird vorzugsweise unter solchen Bedingungen durchgeführt, die eine spezifische Detektion von amplifizierten Telomeraseextensionsprodukten auch in Anwesenheit unspezifischer Nebenprodukte ermöglichen. Hierzu kann man Hybridisierungsbedingungen auswählen, die eine solche spezifische Detektion erlauben, oder/und dem Ansatz unmarkierte Oligonucleotide oder Nucleinsäureanaloga (Kompetitoren) zusetzen, die komplementär zu den Primersequenzen sind, so daß diese Sequenzbereiche maskiert werden und die Hybridisierung mit der Fang- oder Detektionssonde spezifisch an internen Sequenzen der Amplifikationsprodukte erfolgt.

Beispiele für geeignete Hybridisierungsbedingungen sind 37°C und ein Formamid-freier oder Formamid-enthaltender Puffer (z.B. 5xSSC, 10 % Formamid, 0,1 % Sarkosyl, 0,02 % SDS, 1 % Blockierungsreagenz in Maleinsäurepuffer). Beispiele für geeignete unmarkierte Kompetitoren sind die in SEQ ID NO. 14 und 15 angegebenen Oligonucleotide.

Im folgenden sind einige bevorzugte Ausführungsformen für die Testdurchführung angegeben:

Version 1:

Als Telomerasesubstrat wird ein von telomer-spezifischen

- 13 -

Repeats freier Primer verwendet, z.B. mit der in SEQ ID NO. 1 oder 2 dargestellten Sequenz. Alternativ kann auch ein Repeat-enthaltender Primer, z.B. P1-Telo (SEQ ID NO. 3) verwendet werden. Dieser Primer wird zusammen mit unmarkierten Nucleosid-triphosphaten dATP, dGTP und dTTP im Extensionsschritt (b) eingesetzt. Das durch die Telomerase erzeugte Extensionsprodukt wird dann in Schritt (c) einer Amplifikation unterzogen. Die für die Amplifikation benötigten Komponenten können, sofern sie die Extensionsreaktion nicht stören, bereits in Schritt (b) im Reaktionsgemisch vorliegen. Andere Komponenten liegen in kompartimentierter Form, z.B. unter einer schmelzbaren Wachs-schicht, im gleichen Reaktionsgefäß vor.

Das Reaktionsgemisch in Schritt (c) enthält neben den bereits in Schritt (b) anwesenden Komponenten einen zweiten Primer, der eine Sequenz komplementär zur humanen Telomer-Repeat-Sequenz enthält, z.B. den Primer P2 mit der in SEQ ID NO. 4 gezeigten Sequenz, oder den Primer TE-ACT mit der in SEQ ID NO.5 gezeigten Sequenz, mindestens ein mit einer Ankergruppe versehenes Nucleosid-triphosphat, z.B. biotinyliertes dUTP, mindestens ein nicht-radioaktiv markiertes Nucleosidtriphosphat, z.B. Br-dUTP, Br-dCTP, CH₃-dCTP, DIG-dUTP oder DIG-dCTP, und eine thermostabile DNA-Polymerase, z.B. Taq-Polymerase.

Die Immobilisierung des Amplifikationsprodukts gemäß Schritt (d) erfolgt auf einer Mikrotiterplatte, die mit einem Konjugat aus Streptavidin und Rinderserumalbumin beschichtet ist. Der Nachweis des Amplifikationsprodukts erfolgt anschließend mit Hilfe eines Konjugats aus einem gegen die Markierungsgruppe, z.B. Br-dU, Br-dC, CH₃-dC bzw. DIG gerichteten Antikörper oder Antikörperfragments und einem Enzym, z.B. Peroxidase.

Version 2:

Alternativ zu Version 1 wird das in Schritt (b) erzeugte Telomerase-Extensionsprodukt mit Hilfe von Terminaler Trans-ferase und einem oder mehreren Nucleotiden, z.B. dATP, elongiert. Die Amplifikation erfolgt in diesem Fall durch

- 14 -

Zusatz eines Oligo-dT-Primers, z.B. des Primers P3 mit der in SEQ ID NO. 6 gezeigten Sequenz, sowie markierten und unmarkierten Nucleotiden (siehe Version 1). Der Nachweis des Amplifikationsprodukts erfolgt wie oben beschrieben.

Diese Version bietet Sensitivitätsvorteile, da eine zusätzliche Einführung von Markierungsgruppen (ca. 50 - 100 Markierungsgruppen pro Amplifikationsprodukt) erfolgen kann. Dies ist insbesondere bei kurzen Telomer-Produkten von Bedeutung. Zusätzlich werden bei dieser Versuchsdurchführung ausschließlich Telomerase-katalysierte Volllänge-Extensionsprodukte amplifiziert, da durch die Wahl des Primers eine Hybridisierung mit Repeatsequenzen innerhalb des Elongationsprodukts ausgeschlossen wird. Dies führt ebenfalls zu einer erhöhten Dichte an Markierungsgruppen.

Alternativ kann die Immobilisierung der Amplifikationsprodukte bei den Versionen 1 und 2 durch Einsatz eines biotinylierten ersten oder/und zweiten Primers anstelle des Einbaus von biotinyliertem Nucleosidtriphosphat erfolgen. Die Biotinylierung der Primer kann beispielsweise an ihrem 5'-Ende erfolgen.

Version 3:

Im Gegensatz zu Version 1 und 2 wird ein Amplifikationsprodukt erzeugt, das nur Markierungsgruppen, aber keine Festphasenankergruppen enthält. Bei dieser Version wird daher während der PCR nur eine einfache Markierung der DNA durch Zusatz von nicht-radioaktiv markierten Nucleotiden durchgeführt. Die Immobilisierung erfolgt durch Denaturierung der Amplifikationsprodukte mit anschließende Hybridisierung an biotinylierte Fangsonden, z.B. ein Oligonucleotid mit der in SEQ ID NO. 7 gezeigten Nucleotidsequenz.

Bei allen Varianten ist alternativ eine sequentielle Testführung ohne Kompartimentierung durch Wachs möglich. Die Gesamtdauer aller Testdurchführungen beträgt maximal ca. 10 h und vorzugsweise maximal 6 bis 8 h. Eine schematische Darstellung

der Versionen 1 - 3 des erfindungsgemäßen Verfahrens ist in Abb. 1 gezeigt.

Version 4:

Die Telomerase-katalysierte Extension des Telomerase-Substrats, z.B. des Primers P1 bzw. eines biotinylierten Primers P1, erfolgt analog Version 1. Anschließend erfolgt eine Amplifikation des Extensionsprodukts unter Zusatz eines zweiten Primers, z.B. des Primers TE-ACT. Die Amplifikation findet in Abwesenheit von markierten Nucleotiden statt. Daher ist während Schritt (b) keine Kompartimentierung notwendig. Nach der Amplifikation werden analog Version 3 die Amplifikationsprodukte denaturiert und (i) bei Verwendung eines biotinylierten Primers mit einer Markierungssonde, z.B. einem DIG-Gruppenenthaltendem Oligonucleotid, oder (ii) bei Verwendung von nicht-biotinylierten Primern mit einer Markierungssonde und einer biotinylierten Fangsonde hybridisiert. Der Nachweis erfolgt wie in Version 1 beschrieben.

Zusätzlich kann in einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens eine Standardisierung der Amplifikationsreaktion durch Zugabe einer vorbestimmten Menge eines Amplifikationsstandards erfolgen.

Ein derartiger Amplifikationsstandard kann beispielsweise hergestellt werden, indem man nach Klonierung eines Telomerase-Extensionsprodukts in einen Klonierungsvektor 3'-seitig der dem ersten Primer entsprechenden Sequenz eine beliebige, nicht in den Telomerase-Extensionsprodukten enthaltene DNA-Sequenz mit Hilfe rekombinanter Techniken einfügt. Eine definierte Menge dieses Konstrukts wird dann während der Amplifikationsreaktion dem Ansatz zugesetzt und zusammen mit den Telomerase-Extensionsprodukten mit Hilfe der ersten und zweiten Primer amplifiziert. Ein Aliquot des Amplifikationsansatzes wird dann mit Hilfe einer ersten Fangsonde und ein weiteres Aliquot mit Hilfe einer zweiten Fangsonde analysiert. Mit der ersten Fangsonde lassen sich Amplifikationsprodukte nachweisen, die

- 16 -

sowohl von Telomerase-Elongationsprodukten als vom zugesetzten Standard resultieren, während die zweite Fangsonde lediglich einen Nachweis der vom Standard abgeleiteten Amplifikationsprodukte ermöglicht. Eine Normierung der Meßwerte auf den Standardwert erlaubt nun eine quantitative Aussage über die Telomerase-Aktivität in der getesteten Probe.

Bei Verwendung von 2 oder mehreren unterschiedlichen Markierungsgruppen, die so ausgewählt werden, daß sie nebeneinander nachweisbar sind, können mehrere Detektionen, z.B. die Detektion der Telomerase-Extensionsprodukte und des Standards, sequentiell im gleichen Reaktionsgefäß erfolgen, d.h. die Untersuchung von zwei separaten Aliquots entfällt.

Ein Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens besteht weiterhin darin, daß Standards eingesetzt werden können, die beim Nachweis der Telomeraseextensionsprodukte, z.B. durch Immunoblot nach Gelelektrophorese, eine Bande ergeben, die außerhalb der Banden der Telomeraseextensionsprodukte liegt. Somit ist eine bessere Quantifizierung möglich.

Alternativ lassen sich bei geeigneter Auswahl der Fangsonden mit der ersten Fangsonde lediglich die vom Standard resultierenden Amplifikationsprodukte und mit einer zweiten Fangsonde lediglich die vom Telomerase-Extensionsprodukt stammenden Amplifikationsprodukte immobilisieren.

Beispiele für geeignete Amplifikationsstandards sind in SEQ ID NO. 8 und Abb. 5 gezeigt. Ein Beispiel für eine Fangsonde, die sich spezifisch zum Nachweis des in SEQ ID NO. 8 gezeigten Amplifikationsstandards eignet, ist das in SEQ ID NO. 9 dargestellte Oligonucleotid P5. Der Nachweis des in Abb. 5 gezeigten Standards kann z.B. durch das in SEQ ID NO. 9 dargestellte Oligonucleotid TE-CAT erfolgen.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zum Nachweis von Telomerase-Aktivität, umfassend

- 17 -

- (a) einen als Telomerasesubstrat geeigneten Primer,
- (b) Nucleosidtriphosphate,
- (c) Mittel zur Amplifikation des Telomerase-Extensionsprodukts,
- (d) Markierungsgruppen
- (e) Festphasenankergruppen und
- (f) eine Festphase.

Die Markierungsgruppen sind vorzugsweise nicht-radioaktive Markierungsgruppen und können in Form von entsprechend markierten Nucleosidtriphosphaten oder/und markierten Primern vorliegen. Andererseits können die Markierungsgruppen auch auf einer oder mehreren Markierungs sonden vorliegen, die unter Testbedingungen mit dem Amplifikationsprodukt hybridisieren.

Die Festphasenankergruppen sind vorzugsweise Biotin und die Festphase ist mit Streptavidin oder/und Avidin beschichtet. Besonders bevorzugt wird die Festphase aus Mikrotiterplatten, Mikroreaktionsgefäßen, Membranen, Mikrochips, Biocore-Systeme und gegebenenfalls magnetischen Mikrobeads ausgewählt.

Die Festphasenankergruppen können einerseits in Form von entsprechend modifizierten Nucleosidtriphosphaten bzw. auf einem Primer vorliegen. Andererseits können die Festphasenankergruppen auch auf einer Fangsonde vorliegen, die mit dem Amplifikationsprodukt hybridisiert.

Die Mittel zur Amplifikation des Telomerase-Extensionsprodukts umfassen vorzugsweise einen zweiten Primer und ein zur Amplifikation von Nucleinsäuren geeignetes Enzym, vorzugsweise eine thermostabile DNA-Polymerase.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform enthält der Reagenzienkit eine oder mehrere Markierungs- oder/und Fangsonden, die Markierungs- oder/und Festphasenankergruppen aufweisen und mit Amplifikationsprodukt hybridisieren. Die Markierungs- und Fangsonden werden vorzugsweise aus Oligonu-

- 18 -

cleotiden und Nucleinsäureanaloga, insbesondere peptidischen Nucleinsäuren ausgewählt.

Sofern gewünscht, kann der Reagenzienkit auch Mittel zur weiteren Elongation eines Telomerase-Extensionsprodukt umfassen, z.B. ein Enzym wie Terminale Transferase oder DNA-Ligase.

Darüberhinaus kann der Reagenzienkit auch einen internen Standard zur Quantifizierung der Nachweisreaktion und entsprechende Mittel zum separaten Nachweis von Standard und Amplifikationsprodukt enthalten.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines Oligonucleotids aus dem 5'-Bereich der LTR-Sequenz von Retroviren als Telomerase-Substrat. Vorzugsweise stammt das Oligonucleotid aus dem 5'-Bereich der LTR-Sequenz von HIV und besonders bevorzugt weist das Oligonucleotid eine Länge von 10 - 50 Nucleotiden auf und umfaßt an seinem 3'-Ende (a) die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Sequenz, (b) eine mindestens 80 % und insbesondere mindestens 90 % homologe Sequenz oder (c) mindestens die 10 letzten Nucleotide einer Sequenz gemäß (a) oder (b).

Weiterhin wird die vorliegende Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele, Sequenzprotokolle und Abbildungen erläutert. Es zeigen:

- SEQ ID NO. 1 einen als Telomerase-Substrat geeigneten Primer (P1);
- SEQ ID NO. 2 einen weiteren als Telomerase-Substrat geeigneten Primer (P-LTR);
- SEQ ID NO. 3 einen weiteren als Telomerase-Substrat geeigneten Primer (P1-Telo);
- SEQ ID NO. 4 einen Amplifikationsprimer (P2);
- SEQ ID NO. 5 einen zur Amplifikation geeigneten Ankerprimer (TE-ACT);

- SEQ ID NO. 6 einen zur Amplifikation geeigneten Oligo-dT-Primer (P3);
- SEQ ID NO. 7 eine Fangsonde (P4);
- SEQ ID NO. 8 einen Amplifikationsstandard für eine quantitative Bestimmung der Telomerase-Aktivität durch PCR;
- SEQ ID NO. 9 eine für einen standardisierten PCR-Ansatz verwendete Fangsonde (P5);
- SEQ ID NO. 10 eine weitere Fangsonde für einen standardisierten PCR-Ansatz (TE-CAT);
- SEQ ID NO. 11
und 12 zwei zur Herstellung eines Amplifikationsstandards verwendete Primer (P1-ST und TE-ACT-ST);
- SEQ ID NO. 13 einen zur Amplifikation geeigneten Ankerprimer (TE-3.2);
- SEQ ID NO. 14
und 15 zwei Kompetitor-Oligonucleotide.
- Abb. 1 eine schematische Darstellung von drei bevorzugten Ausführungsformen des erfindungsgemäßen Verfahrens;
- Abb. 2 das Ergebnis eines nicht-radioaktiven Nachweises von Telomerase im Mikrotiterplattenformat;
- Abb. 3 die Darstellung verschiedener erfindungsgemäßer Testführungen;
- Abb. 4 den Nachweis von Telomerase in Abhängigkeit von der eingesetzten Extraktmenge;
- Abb. 5 einen Amplifikationsstandard;
- Abb. 6 die Spezifität des Nachweises von Telomerase in Zelllinien und Gewebeproben und
- Abb. 7 die Sensitivität des Telomerasenachweises in Zelllinien und Gewebeproben.

Beispiele:

1. Reaktionsansatz zum Nachweis von Telomerase gemäß Version 1 des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Es wurden 48 µl Telomerase/PCR-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 3; 1,5 mM MgCl₂, 63 mM KCl, 0,05% Tween-20 (W/V); 1mM EGTA, 40 µM

- 20 -

dNTP (N = A, G, C, U jeweils 10 μM), 300 nM Primer P1 oder P-LTR (SEQ ID NO. 1 oder 2) oder P1-Telo (SEQ ID NO. 3), 20 $\mu\text{g/ml}$ T4g32-Protein, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin (RSA) (W/V), 2 U Taq DNA-Polymerase) in ein vorbeschichtetes PCR-Reaktionsgefäß vorgelegt. Dann wurden 2 μl einer Probe (z.B. S 100-Extrakt aus 10^5 Zelläquivalenten) zugesetzt und 10 - 30 min bei 25°C inkubiert.

Das vorbeschichtete PCR-Reaktionsgefäß enthielt lyophilisiert an seinem Boden, mit einer Wachsschicht (z.B. Aml Wax, Perkin Elmer) übergossen folgende Komponenten: 100 ng Primer P2 oder TE-ACT (SEQ ID NO. 4 oder 5; 223 nM in 50 μl), 30 ng DIG-dUTP (0,5 μM in 50 μl) und 370 ng biotinyliertes dUTP (7,5 μM in 50 μl).

Anschließend wurde eine PCR mit 25 Zyklen (30 s bei 94°C; 30 s bei 50°C, 90 s bei 72°C) durchgeführt. Beim Erhitzen auf 94°C schmolz die Wachsschicht und die lyophilisierten Reagenzien kam mit dem übrigen Reaktionsgemisch in Kontakt.

Nach der PCR wurde ein Aliquot des Ansatzes in eine mit Streptavidin-Thermo RSA-beschichtete Mikrotiterplatte überführt und dort 30 min bei 37°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit jeweils 200 μl Waschpuffer (150 mM NaCl, 15 mM Na-Citrat, pH 7,0) gewaschen.

Dann erfolgte die Zugabe von Anti-DIG-Peroxidase-Konjugat (bei Verwendung einer anderen Markierungsgruppe ein entsprechendes anderes Peroxidase-Konjugat) und eine 60-minütige Inkubation bei 37°C. Dann wurde nochmals dreimal in jeweils 200 μl Waschpuffer gewaschen.

Zum Nachweis wurden 200 μl TMB-Substratreagenz (100 $\mu\text{g/ml}$ 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin, 1 mM Citronensäure, 100 mM Na-Acetat, 0,01% H_2O_2) zugesetzt. Der Nachweis erfolgte in einem Mehrkanalphotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2. Reaktionsansatz zum Nachweis von Telomerase gemäß Version 2 des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Die Reaktion wurde bis zum Telomerase-Extensionsschritt wie unter Punkt 1 beschrieben durchgeführt. Dann wurden 2,5 U/ μ l Terminale Transferase in 200 mM K-Cacodylat, 5mM CoCl_2 , zugegeben und 60 min bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurde eine PCR wie unter Punkt 1 beschrieben durchgeführt. Anstelle von Primer P2 wurde der Primer P3 mit der in SEQ ID NO. 6 angegebenen Sequenz verwendet.

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben.

Alternativ zu den oben beschriebenen Verfahren wurde die Immobilisierung der Amplifikationsprodukte auch durch Verwendung von biotinylierten Telomerase/PCR-Primer (P1-Bio oder P1.TeloBio) anstelle des Einbaus von biotinyliertem dUTP durchgeführt.

3. Reaktionsansatz zum Nachweis von Telomerase gemäß Version 3 des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Die Telomerase-Extension erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben. Das vorbeschichtete PCR-Reaktionsgefäß enthielt dieselben Komponenten wie unter Punkt 1 beschrieben, aber kein biotinyliertes Nucleosidtriphosphat.

Die Durchführung der PCR erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben. Nach der PCR wurden 10 μ l des Ansatzes in 40 μ l Denaturierungspuffer (125 mM NaOH, 0,2 mM EDTA) gegeben und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Dann wurden 450 μ l Hybridisierungspuffer (62,5 mM Na-Phosphat, pH 6,5, 630 mM NaCl, 0,0625% RSA (W/V) und 1 μ M biotinylierte Fangsonde, z.B. Oligonucleotid P1-Bio oder P4) zugegeben und 200 μ l des Ansatzes in eine mit SA-Thermo RSA-beschichtete Mikrotiterplatte überführt. Dann wurde 60 min bei 37°C inku-

- 22 -

biert und anschließend dreimal mit jeweils 200 µl Waschpuffer gewaschen.

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben.

Alle Varianten des erfindungsgemäßen Verfahrens wurden alternativ auch mit einer sequentiellen Testführung ohne Kompartimentierung durch Wachs durchgeführt. Die Gesamtdauer aller Testformate betrug maximal 6 h.

4. Reaktionsansatz zum Nachweis von Telomerase gemäß Version 4 des erfindungsgemäßen Verfahrens:

Der Telomerase-Extensionsschritt wurde wie unter Punkt 1 durchgeführt. Als Telomerase-Substrate wurden sowohl unbiotinylierte als auch biotinylierte Primer verwendet. Im Gegensatz zu Version 1 wurde kein vorbeschichtetes Reaktionsgefäß verwendet.

Die nachfolgende PCR wurde, wie unter Punkt 1 beschrieben, aber in Abwesenheit von markierten Nucleotiden durchgeführt.

Nach der Amplifikation erfolgte eine Denaturierung wie unter Punkt 3 beschrieben. Bei Verwendung eines biotinylierten Primers wurde eine DIG-markierte Markierungssonde und bei Verwendung eines unbiotinylierten Primers eine DIG-markierte Markierungssonde und eine biotinylierte Fangsonde zugegeben.

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben.

5. Standardisierter Reaktionsansatz:

Mit Hilfe der Primer P1-ST (SEQ ID NO. 11) und TE-ACT-ST (SEQ ID NO. 12) wurde ein Sequenzbereich aus der kodierenden Region des bakteriellen Enzyms Chloramphenicol-Acetyl-Transferase amplifiziert. Das resultierende 202 Bp lange PCR-Fragment (Abb. 5) enthielt Sequenzen aus dem Chloramphenicol-Acetyltransferase-Gen, die von den Sequenzen der beiden Telomerase Primer

- 23 -

P1 (SEQ ID NO. 1) und TE-ACT (SEQ ID NO.5) flankiert werden.

Beim Telomerase-Extensionsschritt wurde eine definierte Menge dieses PCR-Produkts (1 - 20 attomol) zugegeben, das - bei Verwendung der entsprechenden Primer - ebenso wie die Telomerase-Extensionsprodukte amplifiziert wurde.

Der Nachweis und die Quantifizierung des Standards erfolgte über Hybridisierung eines DIG-markierten, CAT-spezifischen Primers TE-CAT (SEQ ID NO. 10), wenn während der Amplifikation biotinylierter Primer eingesetzt wurde, oder durch Hybridisierung mit einer biotinylierten, CAT-spezifischen Fangsonde, wenn der Einbau von Markierungsgruppen während der Amplifikation erfolgte.

6. Reaktionsansatz PCR-ELISA

Der Telomerase-Extensionsschritt und die Amplifikation wurden in einem einzigen, nicht-vorbeschichteten Reaktionsgefäß durchgeführt.

Hierzu wurden der Probe (1 - 3 μ l Zellextrakt entsprechend 1×10^3 bis 3×10^3 Zelläquivalenten oder 1 - 50 μ g Gesamtprotein) bzw. einer positiven Kontrolle (Extrakt aus Zellen mit bekannter Telomerase-Aktivität) oder einer negativen Kontrolle (RNase- oder hitzebehandelter Zellextrakt) ein Reaktionsgemisch zugegeben, welches einen biotinylierten Telomerase-Primer (z.B. P1, t-LTR oder P1-Telo) einen Ankerprimer (TE-ACT oder TE-3.2), unmarkierte dNTP und thermostabile DNA-Polymerase enthielt.

Das Reaktionsgemisch wurde zur Durchführung einer kombinierten Primerelongation/Amplifikation in einen Thermocycler gegeben. Dort wurde zunächst eine Primerelongation für 10 - 30 min bei 25°C durchgeführt. Dann wurde 5 min zur Inaktivierung der Telomerase auf 94°C erhitzt. Anschließend wurde wie unter Punkt 1 beschrieben eine PCR mit 30 Zyklen durchgeführt, wonach ein zehnminütiges Erhitzen auf 72°C folgte.

- 24 -

Ein Aliquot des Amplifikationsansatzes wurde dann denaturiert und in Anwesenheit unmarkierter Kompetitor-Oligonucleotide mit einer DIG-markierten Fangsonde hybridisiert. Das resultierende Produkt wurde mittels der Biotingruppen an eine Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatte immobilisiert.

Der Nachweis der immobilisierten Amplifikationsprodukte erfolgte wie unter Punkt 1 beschrieben. Alternativ wurde der Reaktionsansatz gelelektrophoretisch aufgetrennt (z.B. nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel), und die Banden auf eine Membran transferiert und dort sichtbar gemacht.

7. Ergebnisse:

In Abbildung 1 sind die unter den Punkten 1 - 3 beschriebenen Testformate exemplarisch dargestellt.

Abbildung 2 zeigt den nicht-radioaktiven Nachweis von Telomerase nach Immobilisierung auf Mikrotiterplatten. Pro 50 μ l Ansatz (Primer: P1-Bio) wurden 1×10^5 Zelläquivalente (HeLa-Extrakt) eingesetzt. A: Die Einführung der Markierungsgruppen erfolgte während des PCR-Schritts mit den jeweils angegebenen Nucleotiden (DIG-dUTP, Fluorescein-dUTP, Br-dUTP), die Immobilisierung erfolgte in einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte und der Nachweis mit den entsprechenden Antikörper-Konjugaten. B: Spezifität der Reaktion: Bei Zusatz von RNase, durch den die Telomerase-Aktivität inhibiert wird, konnten keine Amplifikationsprodukte nachgewiesen werden.

Abbildung 3 zeigt das Ergebnis bei verschiedenen Testformaten. A: das Ergebnis eines Doppelmarkierungsexperiments (DIG-dUTP/Bio-dUTP) gemäß Version 1; B: Einfachmarkierungsexperiment (DIG-dUTP) unter Verwendung eines biotinylierten Primers P1 (P1-Bio) gemäß Version 1; C: Einfachmarkierungsexperiment (DIG-dUTP) unter Verwendung des Primers P1 als Telomerase-Substrat und des Primers P1-Bio als Fangsonde gemäß Version 3.

Abbildung 4 zeigt den Nachweis von Telomerase in Abhängigkeit

von eingesetzter Extraktmenge. Es wurde ein Einfachmarkierungsexperiment (DIG-dUTP) unter Verwendung des biotinylierten Primers P1-Bio gemäß Version 1 durchgeführt. A: Spezifität des Tests. Nach RNase- bzw. Temperaturbehandlung konnte kein Amplifikationsprodukt mehr nachgewiesen werden. B: Sensitivität des Tests: Ausgehend von 1×10^4 Zelläquivalenten wurde der eingesetzte Extrakt (-/+ RNase-Behandlung) \log_{10} titriert. 5% des PCR-Ansatzes wurden anschließend zum Nachweis auf einer Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatte eingesetzt. Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, daß 1 - 10 Zelläquivalente noch deutlich über dem Hintergrund (ohne) liegende Signale ergeben.

Abbildung 6 zeigt den spezifischen Nachweis von Telomeraseaktivität in Zelllinien und Gewebeproben. A: Die humane Telomerase-positive Embryo-Nierenzelllinie 293 und humane Telomerase-negative Lungenfibroblastenzelllinie EMR90 wurden durch einen erfindungsgemäßen Telomerase PCR-ELISA (Punkt 6) analysiert. Als negative Kontrollen wurden ein Lysereagenz ohne Extrakt (Lysereagenz), mit RNase behandelte 293-Zellen (+RNase) oder hitzebehandelte 293-Zellen (+ ΔT) verwendet. Alle Kontrollen ergaben negative Ergebnisse. Die Kontrolle P1 ist ein synthetisches Oligonucleotid, das von der Telomerase nicht als Substrat akzeptiert wird. Die Tests wurden wie unter Punkt 6 beschrieben mit einer Extraktmenge entsprechend jeweils 1×10^3 Zelläquivalenten durchgeführt. B: Es wurde die Telomeraseaktivität in durch Biopsien erhaltenem Normalgewebe und primärem Tumorgewebe analysiert. Dabei wurden ein Prostatakarzinom und ein Blasenkarzinom jeweils mit normalem Prostata- und Blasenewebe (normal) verglichen. Die Tests wurden wie in Abschnitt (A) beschrieben unter Verwendung von 20 μg Gesamtprotein durchgeführt.

Abbildung 7 zeigt die Sensitivität des erfindungsgemäßen Telomerase PCR-ELISA. A: Ein Extrakt von Telomerase-positiven 293-Zellen wurde seriell mit Lysereagenz verdünnt. Die jeweils angegebenen Zelläquivalente wurden wie unter Punkt 6 beschrieben analysiert. Die Ergebnisse sind für RNase-behandelte

- 26 -

Extrakte (+RNase) oder nicht mit RNase behandelte Extrakte (-RNase) angegeben. B: 293-Zellen wurden seriell in Kulturmedium vor der Lyse verdünnt und dann mit Lysereagenz wie zuvor beschrieben behandelt. Die angegebene Anzahl von Zellen wurde im Telomerase PCR-ELISA analysiert. Die Tests wurden wie zuvor beschrieben durchgeführt. Es sind Ergebnisse für mit RNase behandelte Proben (+RNase) sowie für Proben ohne RNase-Behandlung (-RNase) angegeben. C: Es wurde die Telomeraseaktivität in seriell verdünnten Extrakten gemessen, die aus Blasenkarzinomtumorgewebe und normalem Blasengewebe erhalten wurden. Die angegebenen Mengen an Gewebematerial wurden wie zuvor beschrieben getestet.

- 27 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Mannheim GmbH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 68298

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Telomerase-Detektion

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 15

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30
(EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

AATCCGTCGA GCAGAGTT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 32 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

ACCCTTTTAG TCAGTGTGGA AAATCTCTAG CA

32

- 28 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

TTAGGGTTAG GGTAGGG

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CCCTTACCCT TACCCTTACC CTA

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 24 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCGCGGCTAA CCCTAACCCT AACC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

TTTTTTTTTT TTTTTTMH

19

- 29 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

CCCTAACCCCT AACCCCTAACCTAA

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

GATCCAATCC GTCGAGCAGA GTTAACTACC TTCAACTCCA TCATGAGGGT TAGGGTTAGG

60

GATC

64

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 22 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

CATGATGGAG TTGAAGGTAG TT

22

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

AAGACGGGTG AGCTGGTGAT A

21

- 30 -

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

AATCCGTCGA GCAGAGTTCC CGCCTGATGA ATGCTC

36

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 44 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

GCGCGGCTAA CCCTAACCCCT AACCAGAAAC TGCCGGAAAT CGTC

44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GGGCGGCCCT TACCCTTACC CTTACCCTAA

30

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 18 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

CCTAACCCCTA ACTCTGCT

18

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 18 Basenpaare
 - (B) ART: Nucleotid
 - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGGCGGCCCT TACCCTTA

PATENTANSPRÜCHE

1. Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität,
dadurch gekennzeichnet,
daß man
 - (a) eine zu testende Probe bereitstellt,
 - (b) einen als Telomerasesubstrat geeigneten ersten Primer und Nucleosidtriphosphate zugibt und das Reaktionsgemisch unter Bedingungen inkubiert, bei denen eine Primerextension durch die Telomerase stattfinden kann,
 - (c) eine Amplifikation des durch die Telomerase erzeugten Extensionsprodukts durchführt,
 - (d) das in Schritt (c) erzeugte Amplifikationsprodukt an einer Festphase immobilisiert und
 - (e) das immobilisierte Amplifikationsprodukt qualitativ oder/und quantitativ nachweist.

2. Verfahren nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Nachweis des Amplifikationsprodukts über nicht-radioaktive Markierungsgruppen erfolgt.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß die nicht-radioaktiven Markierungsgruppen ausgewählt werden aus immunologisch reaktiven Gruppen, lumineszierenden Gruppen und fluoreszierenden Gruppen.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine direkte Markierung des Amplifikationsprodukts durch Einbau von Markierungsgruppen erfolgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 3,
dadurch gekennzeichnet,

- 33 -

daß eine indirekte Markierung des Amplifikationsprodukts durch Hybridisierung mit einer Markierungssonde erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Immobilisierung des Amplifikationsprodukts an der Festphase durch adsorptive Wechselwirkungen erfolgt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Immobilisierung an der Festphase über Ankergruppen erfolgt.
8. Verfahren nach Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Biotin als Ankergruppe und eine Avidin- oder Streptavidin-beschichtete Festphase verwendet.
9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase ausgewählt wird aus Mikrotiterplatten, Mikroreaktionsgefäßen, Membranen, Mikrochips, Biocore-Systemen und gegebenenfalls magnetischen Mikrobeads.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Amplifikation durch Zugabe eines Enzyms durchführt.
11. Verfahren nach Anspruch 10,
dadurch gekennzeichnet,
daß man thermostabiles Enzym verwendet.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Enzym eine Nucleinsäure-Polymerase oder eine Nucleinsäure-Ligase verwendet.

- 34 -

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Amplifikation zwei Primer verwendet.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 - 13,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Amplifikation durch PCR oder LCR erfolgt.
15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 14,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen ersten Primer verwendet, der frei von
telomeren Repeatsequenzen ist.
16. Verfahren nach Anspruch 15,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen ersten Primer verwendet, der aus dem 5'-
Bereich einer retroviralen LTR-Sequenz stammt.
17. Verfahren nach Anspruch 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen ersten Primer aus dem 5'-Bereich der LTR-
Sequenz von HIV verwendet.
18. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen ersten Primer verwendet, der telomere
Repeatsequenzen enthält.
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 13 - 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß man bei der Amplifikation einen zweiten Primer
verwendet, der an seinem 5'-Ende einen nicht zur telome-
ren Repeatsequenz komplementären Bereich enthält.
20. Verfahren nach Anspruch 19,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Primer an seinem 5'-Ende eine Extension

- 35 -

mit einer Länge von mindestens 4 Nucleotiden aufweist.

21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß der zweite Primer an seinem 5'-Ende eine GC-reiche Extension aufweist.
22. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 21,
dadurch gekennzeichnet,
daß man nach dem Extensionsschritt (b) eine weitere Template-unabhängige Elongation des Extensionsprodukts durchführt.
23. Verfahren nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß eine enzymatische Elongation des Extensionsprodukts durchgeführt wird.
24. Verfahren nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Elongation mit Terminaler Transferase durchgeführt wird.
25. Verfahren nach einem der Ansprüche 22 - 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß man beim Amplifikationsschritt einen zweiten Primer verwendet, der eine Hybridisierung mit dem durch Elongation an das Extensionsprodukt angefügten Sequenzabschnitt ermöglicht.
26. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß der Extensionsschritt (b) so durchgeführt wird, daß nur unmarkierte Nucleosidtriphosphate an den ersten Primer angefügt werden können.
27. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 26,

- dadurch gekennzeichnet,**
daß die Immobilisierung an der Festphase über Ankergruppen erfolgt, die in die Amplifikationsprodukte durch Verwendung von Ankergruppen enthaltenden Primern oder/und durch Verwendung von Ankergruppen enthaltenden Nucleosid-triphosphaten insbesondere während des Amplifikationsschritts (c) eingeführt werden.
28. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Immobilisierung an der Festphase über Ankergruppen erfolgt, die in einer mit dem Amplifikationsprodukt hybridisierenden Fangsonde enthalten sind.
29. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß man bei der Amplifikation einen internen Standard zusetzt, der einen quantitativen Nachweis der Amplifikationsprodukte ermöglicht.
30. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 29,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Reaktion als Ein-Topf-Reaktion durchführt.
31. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 - 30,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Immobilisierung oder/und den Nachweis des Amplifikationsprodukts unter solchen Bedingungen durchführt, die eine spezifische Detektion des Telomeraseextensionsprodukts ohne Abtrennung von Amplifikationsnebenprodukten erlauben.
32. Verfahren nach Anspruch 31,
dadurch gekennzeichnet,
daß die spezifische Detektion durch Auswahl geeigneter Hybridisierungsbedingungen ermöglicht wird.

33. Verfahren nach Anspruch 31 oder 32,
dadurch gekennzeichnet,
daß die spezifische Detektion durch Zusatz von unmarkierten Oligonucleotiden oder Nucleinsäureanaloga ermöglicht wird, die komplementär zu den Primersequenzen sind.
34. Reagenzienkit zum Nachweis von Telomerase-Aktivität, umfassend
- (a) einen als Telomerasesubstrat geeigneten Primer,
 - (b) Nucleosidtriphosphate,
 - (c) Mittel zur Amplifikation des Telomerase-Extensionsprodukts,
 - (d) Markierungsgruppen
 - (e) Festphasenankergruppen und
 - (f) eine Festphase.
35. Reagenzienkit nach Anspruch 34,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen nicht-radioaktive Markierungsgruppen sind.
36. Reagenzienkit nach Anspruch 34 oder 35,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphasenankergruppen Biotin sind und die Festphase mit Streptavidin oder/und Avidin beschichtet ist.
37. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 36,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphase aus Mikrotiterplatten, Mikroreaktionsgefäßen, Membranen, Mikrochips, Biocore-Systemen und gegebenenfalls magnetischen Mikrobeads ausgewählt ist.
38. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen auf Nucleosidtriphosphaten

vorliegen.

39. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungsgruppen auf einem Primer vorliegen.
40. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß Markierungsgruppen auf einer Markierungssonde vorliegen, die mit dem Amplifikationsprodukt hybridisiert.
41. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphasenankergruppen auf Nucleosidtriphosphaten vorliegen.
42. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphasenankergruppen auf einem Primer vorliegen.
43. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Festphasenankergruppen auf einer Fangsonde vorliegen, die mit dem Amplifikationsprodukt hybridisiert.
44. Reagenzienkit nach Anspruch 40 oder 43,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungs- bzw. Fangsonde aus Oligonucleotiden und Nucleinsäureanaloga ausgewählt ist.
45. Reagenzienkit nach Anspruch 44,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Markierungs- bzw. Fangsonde eine peptidische Nucleinsäure ist.

46. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 45, weiterhin umfassend Mittel zur weiteren Elongation eines Telomerase-Extensionsprodukts.
47. Reagenzienkit nach einem der Ansprüche 34 - 46, weiterhin umfassend einen internen Standard zur Quantifizierung der Nachweisreaktion.
48. Verwendung eines Oligonucleotids aus dem 5'-Bereich der LTR-2Sequenz von Retroviren als Telomerase-Substrat.
49. Verwendung nach Anspruch 47, **dadurch gekennzeichnet**, daß das Oligonucleotid aus dem 5'-Bereich der LTR-Sequenz von HIV stammt.
50. Oligonucleotid mit einer Länge von 10 - 50 Nucleotiden, das an seinem 3'-Ende (a) die in SEQ ID NO. 2 gezeigte Sequenz, (b) eine dazu mindestens 80 % homologe Sequenz oder (c) mindestens die 10 letzten Nucleotide einer Sequenz gemäß (a) oder (b) umfaßt.
51. Verwendung eines Oligonucleotids oder eines Nucleinsäureanalogons mit einer zur telomeren Repeatsequenz komplementären Sequenz und 5'-seitig davon einer Extensionssequenz, die mindestens 4 und insbesondere 4 - 10 Nucleotide lang ist, als Primer in einem Verfahren zum Nachweis von Telomerase-Aktivität.

Abb. 1

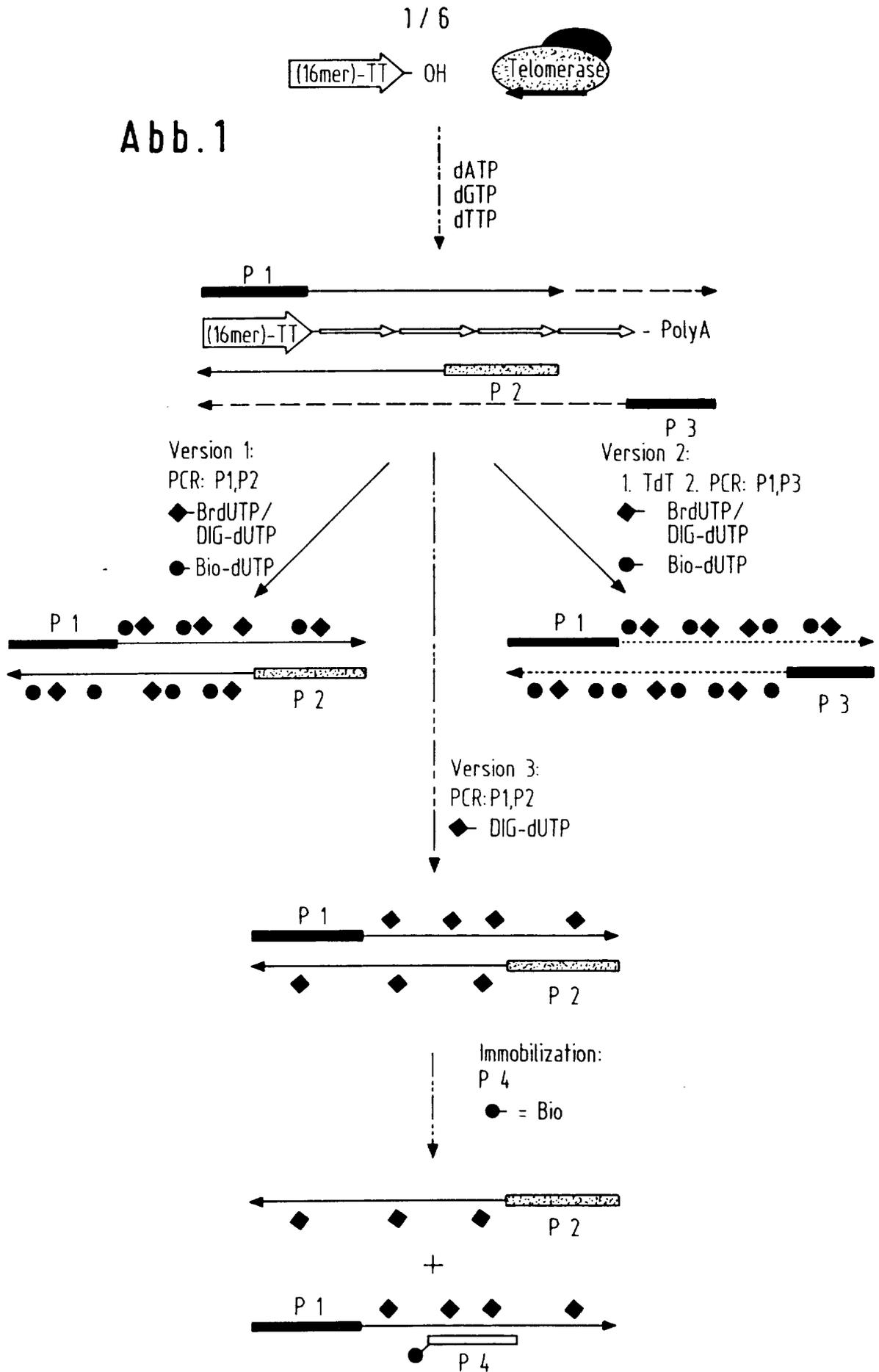


Abb. 2

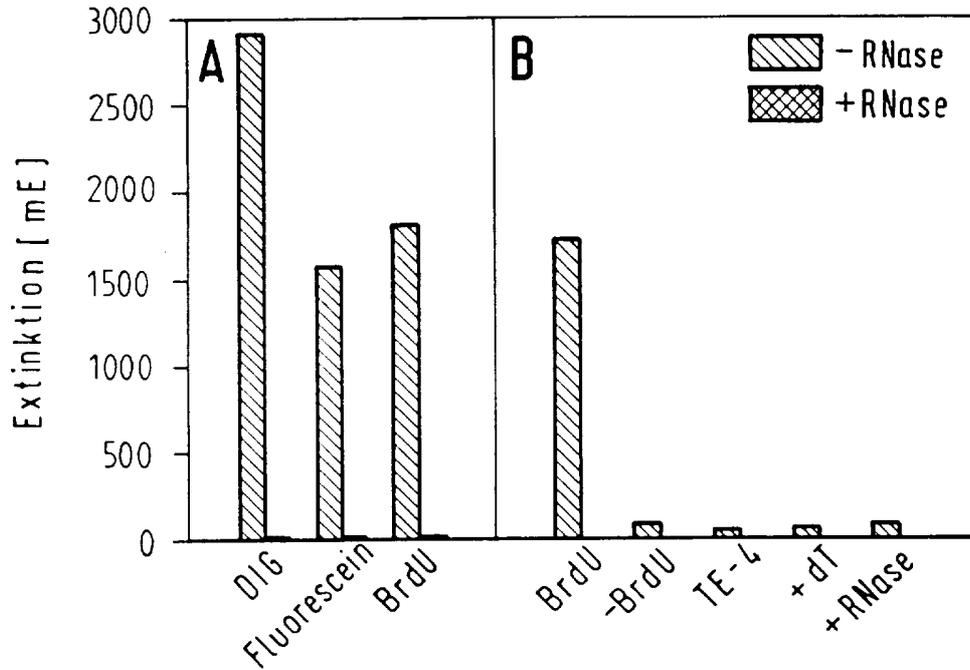


Abb. 3

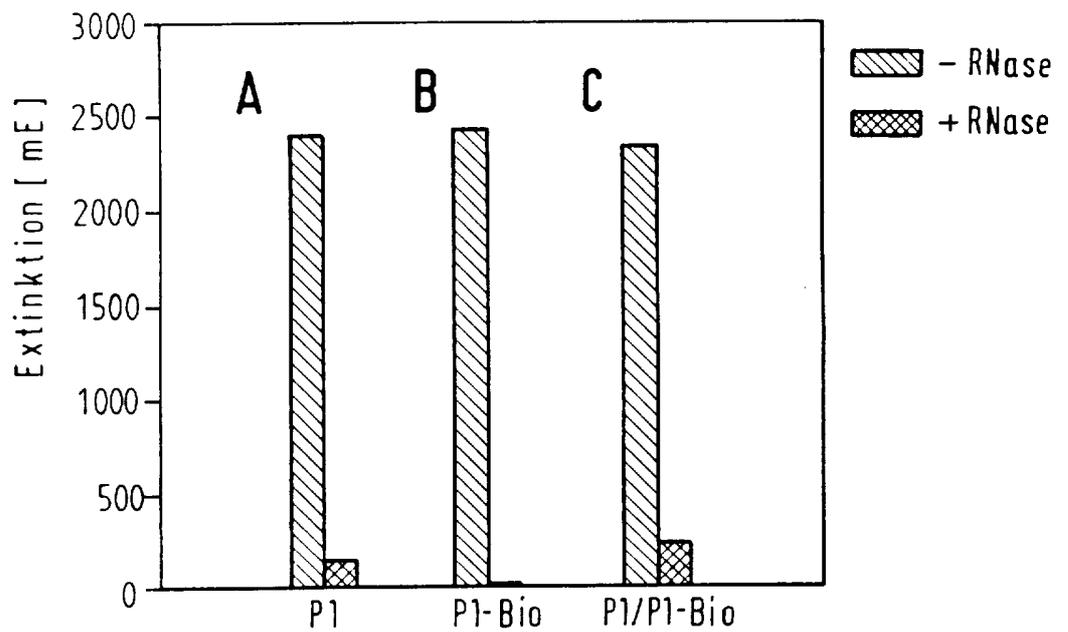


Abb. 4

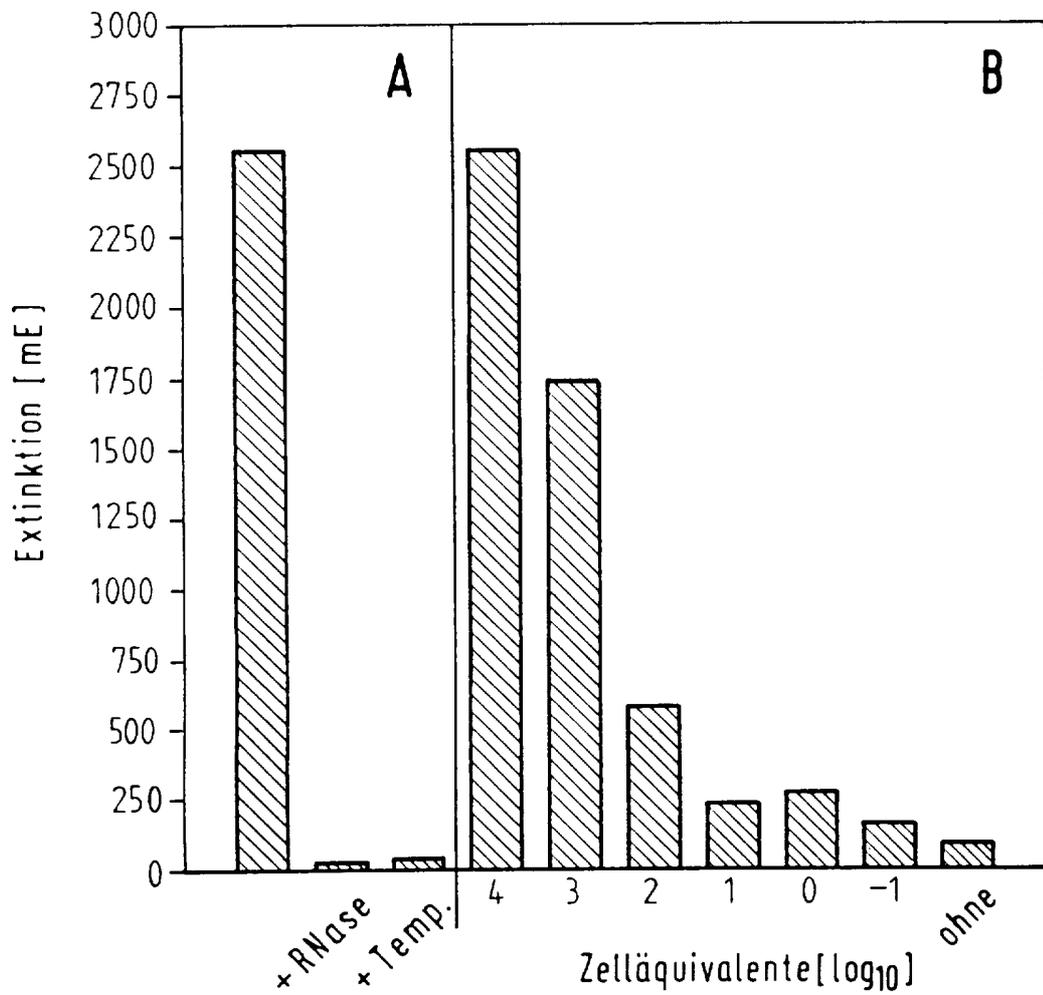


Abb . 5

P1 4779
AATCCGTCGA GCAGAGTTCC CGCTGATGA ATGCTCATCC GGAATTCGGT ATGGCAATGA AAGACGGTGA GCTGGTGATA TGGGATAGTG TTCACCCCTTG
← aus pSV2CAT →
TE-1-ST TE-CAT
TTACACCGTT TTCCATGAGC AACTGAAAC GTTTTCATCG CTCGGGAGTG AATACCACGA CGATTTCCGG CAGTTTCTGG TTAGGGTTAG GGTTAGCCGC GC
4620
TE-1-ST TE-ACT-ST TE-ACT

Abb. 6

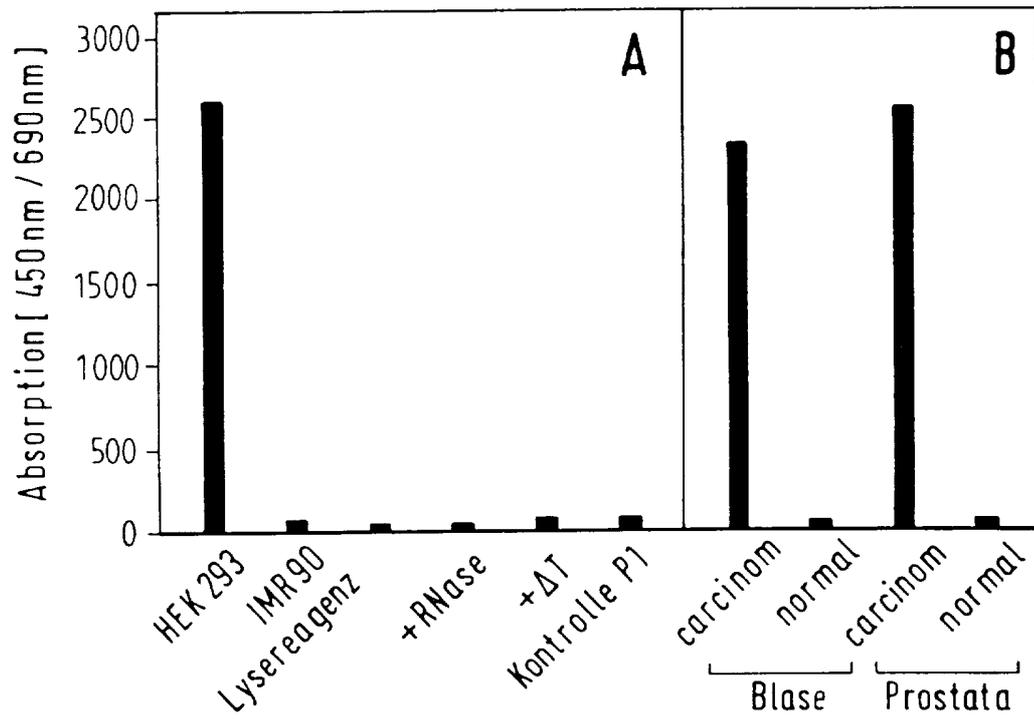
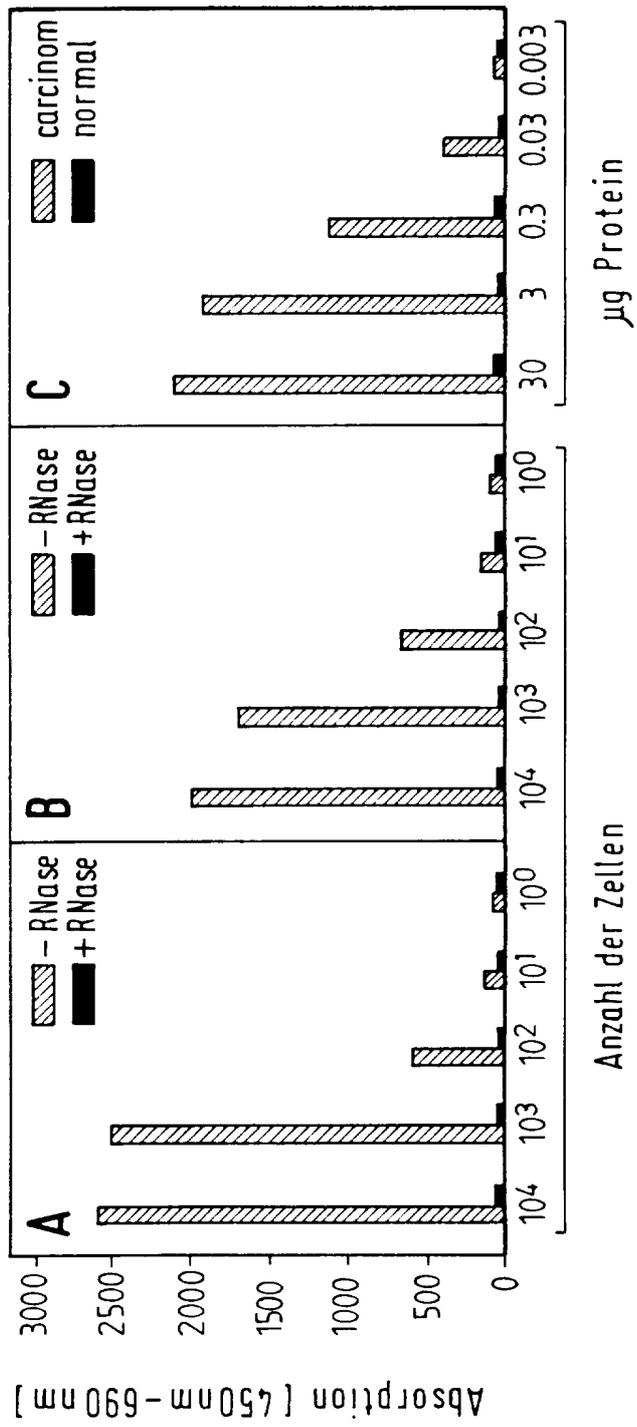


Abb. 7



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 96/05245

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12Q1/68 C12Q1/70 C12N9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED
 Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
 IPC 6 C12Q C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 13381 A (GERON CORP) 18 May 1995 cited in the application see the whole document ---	1-15, 18-21, 26-28, 34-45, 47,51
X	WO 91 04753 A (CETUS CORP) 18 April 1991 see the whole document ---	50
X	WO 93 09813 A (IMP CANCER RES TECH) 27 May 1993 see the whole document ---	50
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.
 Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">7 April 1997</p>	Date of mailing of the international search report <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">17.04.97</p>
--	---

Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Authorized officer <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Müller, F</p>
---	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 96/05245

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SCIENCE, vol. 266, - 23 December 1994 pages 2011-2015, XP002028668 KIM N. W. ET AL.,: "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer" cited in the application abstract, figures 1 and 2, references ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	EP 0 437 774 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 July 1991 see the whole document ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	NUCLEIC ACID RESEARCH, vol. 23, no. 18, - 25 September 1995 pages 3794-3795, XP002028669 WRIGHT W. ET AL.,: "Modification of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity" see the whole document ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	WO 93 11261 A (KEYGENE N V) 10 June 1993 claim 1, figure 2. ---	1-15, 18-21, 26-47,51
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 91, - April 1994 pages 2900-2904, XP002028670 COUNTER C. M. ET AL.,: "Telomerase activity in human ovarian carcinoma" cited in the application material and methodes (Telomerase assay), result and discussion ---	1
A	CELL, vol. 59, - 3 November 1989 pages 521-529, XP002028671 MORIN G. B.: "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats" cited in the application discussion and 'experimental procedures' -----	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PC., EP 96/05245

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9513381 A	18-05-95	AU 1178195 A	29-05-95
		AU 1209095 A	29-05-95
		AU 1330795 A	29-05-95
		CA 2173872 A	18-05-95
		EP 0728207 A	28-08-96
		JP 9502102 T	04-03-97
		WO 9513382 A	18-05-95
		WO 9513383 A	18-05-95

WO 9104753 A	18-04-91	NONE	

WO 9309813 A	27-05-93	EP 0613379 A	07-09-94
		GB 2275928 A,B	14-09-94
		JP 7504885 T	01-06-95

EP 0437774 A	24-07-91	DE 4001154 A	18-07-91
		AT 149511 T	15-03-97
		CA 2034313 A	18-07-91
		JP 4211400 A	03-08-92
		JP 7014359 B	22-02-95

WO 9311261 A	10-06-93	AU 2945792 A	28-06-93

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 96/05245

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12Q1/68 C12Q1/70 C12N9/12

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12Q C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 13381 A (GERON CORP) 18.Mai 1995 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-15, 18-21, 26-28, 34-45, 47,51
X	WO 91 04753 A (CETUS CORP) 18.April 1991 siehe das ganze Dokument ---	50
X	WO 93 09813 A (IMP CANCER RES TECH) 27.Mai 1993 siehe das ganze Dokument ---	50
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- * 'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
 - * 'E' älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
 - * 'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
 - * 'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
 - * 'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
 - * 'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
 - * 'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
 - * 'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
 - * '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

2

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 7. April 1997	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 17. 04. 97
Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+ 31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Müller, F

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	SCIENCE, Bd. 266, - 23.Dezember 1994 Seiten 2011-2015, XP002028668 KIM N. W. ET AL.,: "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer" in der Anmeldung erwähnt Zusammenfassung, Figuren 1 und 2, Referenzen ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	EP 0 437 774 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24.Juli 1991 siehe das ganze Dokument ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	NUCLEIC ACID RESEARCH, Bd. 23, Nr. 18, - 25.September 1995 Seiten 3794-3795, XP002028669 WRIGHT W. ET AL.,: "Modification of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity" siehe das ganze Dokument ---	1-15, 18-21, 26-47,51
Y	WO 93 11261 A (KEYGENE N V) 10.Juni 1993 Anspruch 1, Abbildung 2. ---	1-15, 18-21, 26-47,51
A	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 91, - April 1994 Seiten 2900-2904, XP002028670 COUNTER C. M. ET AL.,: "Telomerase activity in human ovarian carcinoma" in der Anmeldung erwähnt Material und Methoden (Telomerase assay), Ergebnisse und Diskussion ---	1
A	CELL, Bd. 59, - 3.November 1989 Seiten 521-529, XP002028671 MORIN G. B.: "The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats" in der Anmeldung erwähnt Diskussion und 'experimental procedures' -----	1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 96/05245

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9513381 A	18-05-95	AU 1178195 A	29-05-95
		AU 1209095 A	29-05-95
		AU 1330795 A	29-05-95
		CA 2173872 A	18-05-95
		EP 0728207 A	28-08-96
		JP 9502102 T	04-03-97
		WO 9513382 A	18-05-95
		WO 9513383 A	18-05-95

WO 9104753 A	18-04-91	KEINE	

WO 9309813 A	27-05-93	EP 0613379 A	07-09-94
		GB 2275928 A,B	14-09-94
		JP 7504885 T	01-06-95

EP 0437774 A	24-07-91	DE 4001154 A	18-07-91
		AT 149511 T	15-03-97
		CA 2034313 A	18-07-91
		JP 4211400 A	03-08-92
		JP 7014359 B	22-02-95

WO 9311261 A	10-06-93	AU 2945792 A	28-06-93
