



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112334776 B

(45) 授权公告日 2024.07.09

(21) 申请号 201980041681.7
 (22) 申请日 2019.06.19
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112334776 A
 (43) 申请公布日 2021.02.05
 (30) 优先权数据
 18178946.2 2018.06.21 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.12.21
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2019/066132 2019.06.19
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/243391 EN 2019.12.26
 (73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
 (72) 发明人 F·伯格曼 D·海因德尔
 M·施赖姆尔 J·斯托克尔
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 72001
 专利代理师 任晓华 李唐

(51) Int.Cl.
 G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件
 US 2015344937 A1, 2015.12.03
 Suresh Gorle. "Structures, dynamics,
 and stabilities of fully modified locked
 nucleic acid (β -D-LNA and α -L-LNA)

duplexes in comparison to pure DNA and
 RNA duplexes".《The Journal of Physical
 Chemistry B》.2013,第5556-5564页.

Meghan A Campbell.Locked vs. unlocked
 nucleic acids (LNAs. UNA): contrasting
 structures work towards common
 therapeutic goals.《Chem Soc Rev》.2011,第
 5680-5689页.

Alexei A. Koshkin.LNA (Locked Nucleic
 Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly
 Stable LNA:LNA Duplexes".《J. Am. Chem.
 Soc.》.1998,第13252-13253页.

Alexei A. Koshkin.LNA (Locked Nucleic
 Acid): An RNA Mimic Forming Exceedingly
 Stable LNA:LNA Duplexes".《J. Am. Chem.
 Soc.》.1998,第13252-13253页.

Suresh Gorle. "Structures, dynamics,
 and stabilities of fully modified locked
 nucleic acid (β -D-LNA and α -L-LNA)
 duplexes in comparison to pure DNA and
 RNA duplexes".《The Journal of Physical
 Chemistry B》.2013,第5556-5564页.

Meghan A Campbell.Locked vs. unlocked
 nucleic acids (LNAs. UNA): contrasting
 structures work towards common
 therapeutic goals.《Chem Soc Rev》.2011,第
 5680-5689页.

审查员 熊壮壮

权利要求书3页 说明书11页
 序列表5页 附图9页

(54) 发明名称
 杂交全LNA寡核苷酸

(57) 摘要
 本报告涉及杂交完全由锁核酸(LNA)单体组
 成的单链(ss-)寡核苷酸。本文件展示成对完全
 互补ss-寡核苷酸的杂交实验,所述成对完全互
 补ss-寡核苷酸在给定的时间间隔内无法形成双

链体。本报告提供鉴定此类不相容寡核苷酸对的方法。在另一方面,本报告提供能够快速形成双链体的成对互补ss-寡核苷酸。本报告还提供了鉴定和选择相容寡核苷酸对的方法。在另一方面,本报告提供相容寡核苷酸对作为结合配偶体在结合测定(例如在免疫测定)中的用途。

1. 一种用于提供结合对的方法,所述结合对由第一单链LNA寡核苷酸和第二单链LNA寡核苷酸组成,所述两个寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供由8个至15个锁核酸(=LNA)单体组成的第一单链寡核苷酸,每个单体包含核碱基,所述第一单链寡核苷酸的核碱基形成第一核碱基序列;

(b) 提供由8个至15个LNA单体组成的第二单链寡核苷酸,所述第二单链寡核苷酸由至少与所述第一单链寡核苷酸数量相同的单体组成,所述第二单链寡核苷酸的每个单体均包含核碱基,所述第二单链寡核苷酸的核碱基形成所述第二单链寡核苷酸的第二核碱基序列,所述第二核碱基序列包含以反平行取向与所述第一核碱基序列互补的核碱基序列或其组成,并且在理论上表明所述第一和第二单链寡核苷酸具有彼此形成双链体的能力,所述双链体由8个至15个连续Watson-Crick碱基对组成;

(c) 在20°C至40°C的温度下在水溶液中混合并温育相等摩尔量的所述第一和第二单链寡核苷酸1s至5min的时间间隔,从而获得单链寡核苷酸混合物或含双链体混合物;然后

(d) 在20°C至40°C的温度下分离在步骤(c)中获得的混合物,然后检测和定量分离的双链体,前提是所述分离的双链体存在,以及检测和定量分离的单链寡核苷酸;然后

(e) 如果在步骤(d)中可检测到双链体存在,并且如果双链体的摩尔量高于单链寡核苷酸的摩尔量,则选择此结合对;

从而提供所述结合对,其中所述结合对选自以下的组:

5' tgctcctg 3' 和5' caggagca 3' ,

5' gcctgacg 3' 和5' cgtcaggc 3' ,

5' ctgcctgacg 3' 和5' cgtcaggcag 3' ,

5' gactgcctgacg 3' 和5' cgtcaggcagtc 3' ,

5' tgctcctgt 3' 和5' acaggagca 3' ,

5' gtgcttct 3' 和5' agacgcac 3' ,

5' gttggtgt 3' 和5' acaccaac 3' ,

5' caacacaccaac 3' 和5' gttggtgtgtg 3' ,

5' acacaccaac 3' 和5' gttggtgtgt 3' ,和/或

5' acaccaac 3' 和5' gttggtgt 3' 。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第一单链寡核苷酸由5个至9个单体组成。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述第一单链寡核苷酸由6个单体组成。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,其中,每个LNA单体包含选自由以下项组成的组的核碱基:腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述温度为20°C至37°C。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)之前,将所述第一单链寡核苷酸和所述第二单链寡核苷酸保持在-80°C至40°C的温度下。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,在步骤(c)之前,将所述第一单链寡核苷酸和所述第二单链寡核苷酸保持在20°C至40°C的温度下。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,在步骤(c)之前,将所述第一单链寡核苷酸和所述第二单链寡核苷酸保持在20°C至37°C的温度下。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)中,进行温育1秒至1分钟的时间间隔。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述水溶液包含缓冲液,所述缓冲液将溶液的pH保持在pH 6至pH8。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述水溶液包含缓冲液,所述缓冲液将溶液的pH保持在pH6.5至pH7.5。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述水溶液包含从10mmol/L至500mmol/L的总量的溶解物质。

13. 根据权利要求12所述的方法,其中,在步骤(c)中,所述水溶液包含从200mmol/L至300mmol/L的总量的溶解物质。

14. 根据权利要求1至13中任一项所述的方法,其中,步骤(d)包括使步骤(c)的温育的混合物经受以水性溶剂作为流动相的柱色谱法。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的所述单链寡核苷酸由 β -D-LNA单体组成。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中,(a)和(b)的所述单链寡核苷酸由 β -L-LNA单体组成。

17. 一种液体组合物,其包含水性溶剂以及由第一单链寡核苷酸和第二单链寡核苷酸组成的结合对,

其中每个寡核苷酸由8个至15个锁核酸(=LNA)单体组成,每个单体包含核碱基,所述单体的核碱基形成第一寡核苷酸的第一核碱基序列和第二寡核苷酸的第二核碱基序列,

其中选择所述第一核碱基序列和所述第二核碱基序列,以使所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,其中所述结合对可通过根据权利要求项1至16中任一项所述的方法获得;

并且其中所述结合对选自以下的组:

5' tgctcctg3' 和5' caggagca3' ,

5' gcctgacg3' 和5' cgtcaggc3' ,

5' ctgcctgacg3' 和5' cgtcaggcag3' ,

5' gactgcctgacg3' 和5' cgtcaggcagtc3' ,

5' tgctcctgt3' 和5' acaggagca3' ,

5' gtgcgtct3' 和5' agacgcac3' ,

5' gttggtgt3' 和5' acaccaac3' ,

5' caacacaccaac3' 和5' gttggtgtgtt3' ,

5' acacaccaac3' 和5' gttggtgtgt3' ,和/或

5' acaccaac3' 和5' gttggtgt3' 。

18. 根据权利要求17所述的组合物,其中,每个寡核苷酸由8个至15个LNA单体组成,

其中选择所述第一核碱基序列和所述第二核碱基序列,使得所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成5个至9个连续Watson-Crick碱基对的反平

行双链体,并且其中所述结合对可通过根据权利要求项2至16中任一项所述的方法获得。

19. 根据权利要求18所述的组合物,其中,每个寡核苷酸由9个至15个LNA单体组成,其中选择所述第一核碱基序列和所述第二核碱基序列,以使所述第一寡核苷酸和所述第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成9个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,

并且其中所述结合对可通过根据权利要求项3至16中任一项所述的方法获得。

20. 根据权利要求17至19中任一项所述的组合物,其中,每个LNA单体包含选自以下项组成的组的核碱基:腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶和5-甲基胞嘧啶。

21. 根据权利要求17至20中任一项所述的组合物,其中,每个单链寡核苷酸包含两个或三个不同的核碱基。

22. 根据权利要求21所述的组合物,其中,在每个单链寡核苷酸中的核碱基之中,G+C含量低于75%。

23. 根据权利要求21和22中任一项所述的组合物,其中,在每个单链寡核苷酸中的核碱基之中,每个胞嘧啶被5-甲基胞嘧啶取代。

24. 根据权利要求17至23中任一项所述的具有结合对的组合物在包含分析物特异性受体和固定相的异相免疫测定中的用途,其中所述结合对将分析物特异性受体固定在固定相上。

25. 一种用于执行用于检测分析物的异相免疫测定的试剂盒,所述试剂盒在单独的容器中包含固定相和分析物特异性受体,所述固定相附接有根据权利要求17至23中任一项所述的结合对的第一单链寡核苷酸,所述分析物特异性受体附接有根据权利要求17至23中任一项所述的结合对的第二单链寡核苷酸。

杂交全LNA寡核苷酸

[0001] 本报告涉及完全由锁核酸(LNA)单体组成的杂交单链(ss-)寡核苷酸。本文件示出用成对的完全互补ss-寡核苷酸进行的杂交实验,出乎意料地,所述完全互补ss-寡核苷酸未能在给定的时间间隔内形成双链体。本报告提供鉴定这种不相容的寡核苷酸对的有效方法。在另一方面,本报告提供成对的互补单链寡核苷酸,其完全由锁核酸(LNA)单体组成,出人意料地,其在没有事先变性的情况下能够快速形成双链体。本报告还提供鉴定和选择这种相容的全LNA ss寡核苷酸对的方法。在另一方面,本报告提供相容的寡核苷酸对在生化测定(例如结合测定、免疫测定中)作为结合配偶体的用途。讨论了具体的实施例,其中将相容的LNA寡核苷酸对用于固定不同的靶分子,例如分析物特异性捕获分子,在测定中以检测或确定样品中的分析物。

背景技术

[0002] 特别关注的是一般生化应用,其中结合对的两个配偶体的特异性相互作用以及它们彼此之间最终的连接起功能性作用。在异相免疫测定中,生物素:(链霉)亲和素结合对非常频繁地用于将分析物特异性捕获受体固定在固定相上。本报告在其他应用中概念化、解释并证明了适用于免疫测定的替代结合对。具体地,由两个能够通过杂交形成双链体的单链全LNA寡核苷酸制成的替代结合对提供生物素的技术替代物:(链霉)亲和素结合对。

[0003] 本公开的重点是在免疫测定过程中将捕获受体锚定在固定相上的手段。特别地,本公开集中于结合对,其在含有分析物的样品存在下促进捕获受体的固定化,和/或能够在复合物形成后锚定检测复合物。免疫测定中的结合对在技术上需要具有特异性特征。因此,两个结合配偶体的相互作用必须是特异性的。此外,连接形成的动力学,即结合对的两个分离的配偶体相互作用并最终缔合的速度,即彼此结合的速度期望高。另外,两个结合配偶体的连接一旦形成就期望是稳定的。此外,结合配偶体必须适合与其他分子(例如分析物特异性受体和固定相表面)化学缀合,以用于免疫测定。重要的是要认识到,在免疫测定中,受体和通常还有待检测的分析物仅在某些条件下才能保持其构象和功能,而这些条件可能会因具体考虑的特定受体或分析物而有所不同;因此,受体分子或分析物只能耐受这些条件的有限偏差。仅举几例,这样的条件可以包括(但不限于)在约pH 6至约pH 8的pH范围内的缓冲水溶液、一种或多种溶解盐、一种或多种辅助物质,总计约250mosm/kg至约400mosm/kg的溶质,在20℃至40℃的预选温度范围。

[0004] 要求结合对分离的配偶体适合于缀合,具体地是与捕获分子即受体的缀合,以及与固定相表面的缀合,而又不丧失它们与彼此特异性缔合和结合的能力。关于免疫测定中的缀合物,替代结合对的每个分离的结合配偶体必须在测定条件下起作用。相同的推理适用于与结合配偶体缀合的所有其他所需材料,例如但不限于测定过程中可能存在的分析物、载体材料、固定相和其他物质或化合物。

[0005] 先前已经提出了用具有互补序列的单链寡核苷酸,即能够通过杂交形成双链体的寡核苷酸作结合对工具,来连接大分子或将分子连接至固定相。EP 0488152公开了一种使用固定相的异相免疫测定法,其通过连接抗体和固定相的核酸双链体将分析物特异性捕获

抗体固定在固定相上。一个实施例中示出了一个杂交的寡核苷酸附着于抗体,而互补的寡核苷酸附着于固定相,从而形成连接双链体。在文件EP 0698792、WO 1995/024649、WO 1998/029736和EP 0905517中提供了类似的公开内容。WO 2013/188756公开流式细胞术的方法和组合物,所述组合物包含抗体、寡球和寡核苷酸探针,所述抗体缀合至第一寡核苷酸,所述寡球缀合至具有与第一寡核苷酸相同序列的第二寡核苷酸,所述寡核苷酸探针具有标记物和与第一和第二寡核苷酸互补的第三序列。在一个具体的实施例中,寡球是磁性的。本文件报道寡球的特定用途,作为标准化程序中的参考。

[0006] 修饰的寡核苷酸,例如肽核酸(PNA)和锁核酸(LNA)已研究用于生理学应用。LNA在核糖部分的2'-氧和4'-碳之间具有亚甲基接头,其将糖锁定为C3-内构象,因此LNA称为“锁核酸”。在涉及通过杂交形成双链体的技术应用中,这种化学修饰赋予核酸酶抗性以及对寡核苷酸靶的更高的亲和力和更高的特异性。WO 1998/39352公开了锁核酸(LNA)结构。WO 2000/056746公开了LNA单体的合成,所述LNA单体包括用于LNA的某些立体异构体的中间产物。通过化学合成,可以合成仅由LNA核苷类似物单体组成的单链(“全LNA”)。

[0007] 如上所述,锁核酸(LNA)单体是一种构象受限的核苷酸类似物,其在核糖环上添加了一个额外的2'-O、4'-C-亚甲基桥。LNA单体以2'-O、4'-C-亚甲基-(D-呋喃核糖基)核苷单体形式提供(Singh S.K. et al. Chem. Commun. 4 (1998) 455-456; Koskin A.A. et al. Tetrahedron 54 (1998) 3607-3630; Wengel J. Acc. Chem. Res. 32 (1999) 301-310)。WO 2000/066604和WO 2000/056746公开LNA核苷单体的某些立体异构体。包含DNA和LNA单体的混合DNA-LNA寡核苷酸显示出对3'-外切核酸降解的稳定性,并且当与互补的DNA和RNA杂交时,其热稳定性大大提高。实际上,与已合成的其他高亲和力核酸模拟物相比,例如与肽核酸(PNA)、己糖醇核酸(HNA)和2'-氟N3'-氨基磷酸酯相比,LNA表现出非凡的结合亲和力。Christensen U.等人报道了LNA-DNA混合寡核苷酸(也称为“混合体”)的杂交动力学(Biochem J 354 (2001) 481-484)。Eichert A.等人报道了由两个互补的ss-寡核苷酸组成的双链体的晶体结构,每个互补ss-寡核苷酸均由7个LNA单体组成(Nucleic Acids Research 38 (2010) 6729-6736)。

[0008] WO 1999/14226建议在亲和对的构建中使用LNA以附着到目的分子和固体支持物上。然而,本领域也已知互补的全LNA单链的杂交具有的技术问题。全LNA杂交的热力学分析在很大程度上是凭经验进行的,到目前为止,似乎不可能进行没有事先变性步骤(例如在杂交之前加热)的杂交单体的序列预测。

[0009] 到目前为止,大多数情况下都分析了混合的LNA-DNA寡核苷酸(也称为“混合体单链”或“混合体”)。迄今为止,仅有特别是由Koshkin A.A.等人(J Am Chem Soc 120 (1998) 13252-13253)和Möhrle B.P.等人(Analyst 130 (2005) 1634-1638)发表的关于仅由LNA单体制成的杂交单链寡核苷酸(即“全LNA”单链寡核苷酸)的表征的较少报道。Eze N.A.等人(Biomacromolecules 18 (2017) 1086-1096)报道,DNA-LNA混合体和DNA探针的缔合率低于 $10^5 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ 。根据这些作者的观点,考虑到三分之一单体可替代,用LNA单体取代一个或多个DNA单体似乎不会影响溶液中的杂交动力学。

[0010] 关于含有LNA的寡核苷酸的热力学行为的预测是由Tolstrup N等人(Nucleic Acids Research 31 (2003) 3758-3762)引用的专用计算机程序来辅助的。然而,由于这些寡核苷酸更复杂的特性,而不是缺乏实验数据,所述报告明确提到了LNA寡核苷酸的更高的预

测误差。具体地,本报告证明由8个或更多个LNA单体组成的互补ss-寡核苷酸在通过Watson-Crick碱基配对形成双链体分子的能力方面是不可预测的。

[0011] 因此,本报告的总体目的是鉴定和提供能够杂交的单链全LNA寡核苷酸的结合对,从而通过Watson-Crick碱基配对形成双链体分子。更具体地,寻找在非变性条件下能够形成双链体的结合对,更具体地,在与分析物检测测定(例如但不限于免疫测定)中的分析物特异性受体的功能兼容的条件下形成双链体的结合对。重要的是,寻求单链全LNA寡核苷酸,其可以储存并且可在环境温度(例如但不限于室温)下在水溶液中和彼此杂交,而无需间歇加热步骤以去除引起互补寡核苷酸的杂交不相容的任何分子内二级结构。

发明内容

[0012] 在与本文公开的所有其他方面和实施例有关的第一方面,本公开提供一种用于提供结合对的方法,所述结合对由第一单链LNA寡核苷酸和第二单链LNA寡核苷酸组成,所述两个寡核苷酸在20°C至40°C的温度下能够形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,所述方法包括以下步骤:

[0013] (a) 提供由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成的第一单链(ss-)寡核苷酸,每个单体包含核碱基,所述第一ss-寡核苷酸的核碱基形成第一核碱基序列;

[0014] (b) 提供由8个至15个LNA单体组成的第二ss-寡核苷酸,所述第二ss-寡核苷酸由至少与所述第一ss-寡核苷酸数量相同的单体组成,所述第二ss-寡核苷酸的每个单体均包含核碱基,所述第二ss-寡核苷酸的核碱基形成所述第二ss-寡核苷酸的第二核碱基序列,所述第二核碱基序列包含以反平行取向与所述第一核碱基序列互补的核碱基序列或由其组成,并且在理论上表明所述第一和第二ss-寡核苷酸具有彼此形成双链体的能力,所述双链体由8个至15个连续Watson-Crick碱基对组成;

[0015] (c) 在20°C至40°C温度下在水溶液中混合并温育相等摩尔量的所述第一和第二ss-寡核苷酸20分钟或更短的时间间隔,从而获得ss-寡核苷酸混合物或含双链体混合物;然后

[0016] (d) 在20°C至40°C的温度下分离步骤(c)中获得的混合物,然后检测和定量分离的双链体(如果分离的双链体存在的话)以及检测和定量分离所述ss-寡核苷酸;然后

[0017] (e) 如果在步骤(d)中可检测到双链体存在,并且双链体的摩尔量高于ss-寡核苷酸的摩尔量,则选择所述结合对;

[0018] 从而提供所述结合对。

[0019] 在与本文公开的所有其他方面和实施例有关的第二方面,本公开提供一种液体组合物,其包含水性溶剂和由第一单链寡核苷酸与第二单链寡核苷酸组成的结合对,

[0020] 其中每个寡核苷酸由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成,每个单体包含核碱基,所述单体的核碱基形成所述第一寡核苷酸的第一核碱基序列和所述第二寡核苷酸的第二核碱基序列,

[0021] 其中选择所述第一核碱基序列和第二核碱基序列,以使所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸能够在20°C至40°C温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,

[0022] 并且其中所述结合对可通过根据本文公开所述的第一方面的方法获得。

附图说明

- [0023] 图1单链LNA 1的HPLC分析(实例2)
- [0024] 图2单链LNA 2的HPLC分析(实例2)
- [0025] 图3混合的LNA 1和LNA 2的HPLC分析,立即注入HPLC系统(实例2)
- [0026] 图4注射前热变性后混合的LNA 1和LNA 2的HPLC分析(实例2),阳性对照:双链体形成
- [0027] 图5单链LNA 3的HPLC分析(实例2)
- [0028] 图6单链LNA 4的HPLC分析(实例2)
- [0029] 图7混合的LNA 3和LNA 4的HPLC分析,立即注入HPLC系统(实例2),缓慢形成双链体(比率 <0.05)
- [0030] 图8混合的LNA 3和LNA 4注射50分钟后的HPLC分析(实例2),缓慢形成双链体(比率为 0.05)
- [0031] 图9注射前热变性后混合的LNA 3和LNA 4的HPLC分析(实例2),阳性对照:双链体形成

具体实施方式

[0032] 结合对应理解为是一组两个不同的结合配偶体,其在非变性条件下能够彼此形成特异性的非共价分子间键。在本公开的上下文中,对非变性条件的最广泛理解是指不存在任何外部施加的影响,例如加热或添加一定量的变性化合物以使靶标物分子展开,从而破坏其二级或更高阶结构。在这方面,加热示例为将温度上升至大致高于 40°C 、 50°C 、 60°C 或更高的温度持续所期望的时间段,并且变性化合物可以示例为去污剂、离液剂或能够降低核酸双链体的解链温度的化合物例如甲酰胺。

[0033] 重要的是,每个第一和第二结合配偶体都不会与相同种类的配偶体形成特异性的键。也就是说,在两个第一配偶体或两个第二配偶体之间不发生特异性的分子内键。同时,在非变性条件下,每个分离的配偶体本身都具有结合另一配偶体的能力。具体地,在非变性条件下,所述分离的配偶体不会形成任何分子内键,这将使其无法与其他种类的配偶体形成键。例如,分子内折叠可导致二级结构,所述二级结构在非变性条件下将足够稳定以抑制或阻止两种不同种类的结合配偶体所期望的分子间键合。

[0034] 但是,影响一个或两个结合配偶体的分子内折叠可能不一定完全抑制所述所期望的两个不同种类的分子间键合;与没有分子内折叠的无阻碍结合配偶体相比,分子间结合的动力学预计会变慢。特别是考虑到标准化的高通量测定装置,例如(但不限于)自动免疫测定,这种设定通常需要来自先前分离的结合配偶体的结合对的分子间连接形式的快速形成。因此,在每个结合配偶体中不存在分子内折叠或在很大程度上使分子内折叠最小化是期望的技术特征。

[0035] 在本公开的上下文中,并且特别是关于免疫测定以及受体与其靶标物(分析物)的相互作用,更具体地,非变性条件理解为所述受体(例如抗体)获得和/或维持构象所允许的环境的总体特征,所述构象允许受体与其靶标物质(分析物)相互作用和结合。同时,由非变性条件赋予的环境允许所述靶标物获得和/或维持构象,所述构象允许靶标物与受体结合和/或保持与所述受体结合。

[0036] 特别地,全LNA寡核苷酸具有不能被本领域技术人员可用的现有工具可靠地预测的特征。由于实际原因,本研究仅限于由最多15个LNA单体组成的ss-寡核苷酸。

[0037] 因此,在与本文公开的所有其他方面和实施例有关的第一方面,本公开提供用于提供结合对的方法,所述结合对由第一单链LNA寡核苷酸和第二单链LNA寡核苷酸组成,所述两个寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,所述方法包括以下步骤:

[0038] (a) 提供由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成的第一单链(ss-)寡核苷酸,每个单体包含核碱基,所述第一ss-寡核苷酸的核碱基形成第一核碱基序列;

[0039] (b) 提供由8个至15个LNA单体组成的第二ss-寡核苷酸,所述第二ss-寡核苷酸由至少与所述第一ss-寡核苷酸数量相同的单体组成,所述第二ss-寡核苷酸的每个单体均包含核碱基,所述第二ss-寡核苷酸的核碱基形成第二ss-寡核苷酸的第二核碱基序列,所述第二核碱基序列包含以反平行取向与所述第一核碱基序列互补的核碱基序列或由其组成,并且通过互补性,预测所述第一和第二ss-寡核苷酸彼此形成双链体的能力,所述双链体由8个至15个连续Watson-Crick碱基对组成;

[0040] (c) 在20°C至40°C的温度下在水溶液中混合并温育相等摩尔量的所述第一和第二ss-寡核苷酸20分钟或更短的时间间隔,从而获得ss-寡核苷酸混合物或含双链体混合物;然后

[0041] (d) 在20°C至40°C的温度下分离步骤(c)中获得的混合物,然后检测和定量分离的双链体(如果分离的双链体存在的话),以及检测和定量分离所述ss-寡核苷酸;然后

[0042] (e) 如果在步骤(d)中可检测到双链体存在,并且双链体的摩尔量高于ss-寡核苷酸的摩尔量,则选择所述结合对;

[0043] 从而提供所述结合对。

[0044] 如本文中指定的全LNA ss-寡核苷酸可包含许多单体,其数目选自8、9、10、11、12、13、14和15。在本公开的所有方面和实施例的一个实施例中,所述第一ss-寡核苷酸由8个至12个单体(即选自8、9、10、11和12个单体的数目)组成,并且在本文公开的所有方面和实施例的一个更具体的实施例中,所述第一ss-寡核苷酸由8个单体组成。在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,所述第一ss-寡核苷酸由8个至10个单体(即选自8、9和10个单体的数目)组成,并且在本文公开的所有方面和实施例的一个更具体的实施例中,所述第一ss-寡核苷酸由9个单体组成。所述第一和第二ss-寡核苷酸不必具有相等的大小,即不必由相等数目的单体组成。然而,构成所述第一和第二ss-寡核苷酸的相等数目的单体是本公开的所有方面和实施例的一个特定实施例。

[0045] 如果两个寡核苷酸彼此平行但排列相反,则它们是反平行的。一个具体的例子是核酸双链体的两条互补链,它们以彼此相反的方向延伸。因此,所述双链体的每个末端都包括与相反的第二链的3'末端相邻/对齐的第一链的5'末端。与DNA和RNA类似,LNA表现出Watson-Crick碱基配对(Koshkin,A.A.et al.J Am Chem Soc 120(1998)13252-13260)。在本文公开的所有方面和实施例的一个实施例中,每个LNA单体包含选自以下的核碱基:腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤。在互补的相反链上涉及这些碱基的特定Watson-Crick碱基配对是本领域技术人员众所周知的可接受的特征,并且在技术领域广泛公开。除了列出的核碱基外,本领域

域技术人员还已知可以掺入全LNA ss-寡核苷酸中的其它核碱基。通常,这些包括其C-5原子衍生化的嘧啶。

[0046] 重要的是,在使两个不同的(即第一和第二)ss-寡核苷酸接触之后,所述方法的步骤(c)规定温育时间为20分钟或更短。在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,时间间隔选自1s至20min、1s至15min、1s至10min、1s至5min、1s至1min、1s至30s、1s至20s、1s至10s和1s至5s。在1s至10s和1s至5s中选择一个非常有利的的时间间隔。

[0047] 在步骤(c)中,独立于步骤(d)中的温度选择温度,反之亦然。在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,步骤(c)和(d)中的温度相差不超过5°C。在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,在步骤(c)和/或步骤(d)中温度为20°C至25°C。在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,在步骤(c)和/或步骤(d)中,温度为25°C至37°C。在本文公开的所有方面和实施例的另一个具体实施例中,在步骤(c)之前,将所述第一ss-寡核苷酸和第二ss-寡核苷酸保持在-80°C至40°C,具体地20°C至40°C,更具体地20°C至25°C,甚至更具体地25°C至37°C。在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,在步骤(c)中,水溶液包含缓冲液,所述缓冲液将溶液的pH保持在从pH 6至pH 8,更具体地从pH 6.5至pH 7.5。在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,在步骤(c)中,所述水溶液包含盐。在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,在步骤(c)中,所述水溶液包含从10mmol/L至500mmol/L,更具体地从200mmol/L至300mmol/L,更具体地从10mmol/L到150mmol/L,更具体地从50mmol/L至200mmol/L的总量的溶解物质。

[0048] 在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,步骤(d)包括使步骤(c)的温育的混合物经受以水性溶剂作为流动相的柱色谱。因此,使用柱色谱从ss-寡核苷酸分离双链体分子。在这方面,合适的色谱方法例如HPLC是技术人员众所周知的。

[0049] 在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,步骤(a)和(b)所述的ss-寡核苷酸由 β -D-LNA单体组成。也就是说,所述第一ss-寡核苷酸完全由 β -D-LNA单体组成,而所述第二ss-寡核苷酸完全由 β -D-LNA单体组成。在本文公开的所有方面和实施例的又一个实施例中,步骤(a)和(b)所述的ss-寡核苷酸由 β -L-LNA单体组成。也就是说,所述第一ss-寡核苷酸完全由 β -L-LNA单体组成,而所述第二ss-寡核苷酸完全由 β -L-LNA单体组成。

[0050] 通过本文公开所述的方法,以及通过其任何实施例,本公开提供在25°C至40°C的预选温度下由非变性互补单链全LNA寡聚体对形成的互补的全LNA双链体,每个单链全LNA寡聚体包含8个至15个LNA单体。

[0051] 在与本文公开的所有其他方面和实施例有关的第二方面,本公开提供一种液体组合物,其包含水性溶剂和由第一单链寡核苷酸与第二单链寡核苷酸组成的结合对,其中每个寡核苷酸由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成,每个单体包含核碱基,所述单体的核碱基形成了所述第一寡核苷酸的第一核碱基序列和所述第二寡核苷酸的第二核碱基序列,其中选择所述第一核碱基序列和第二核碱基序列,使得所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,并且其中所述结合对可通过根据本公开的第一方面的方法获得。

[0052] 在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,提供了一种液体组合物,其包含水性溶剂和由第一单链寡核苷酸和第二单链寡核苷酸组成的结合对,其中每个寡核苷酸由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成,每个单体包含核碱基,所述单体的核碱基形成所述第

一寡核苷酸的第一核碱基序列和所述第二寡核苷酸的第二核碱基序列,其中选择所述第一核碱基序列和第二核碱基序列,使得所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,并且其中所述结合对可通过根据本公开的第一方面的方法获得。

[0053] 在本文公开的所有方面和实施例的特定实施例中,提供了一种液体组合物,其包含水性溶剂和由第一单链寡核苷酸与第二单链寡核苷酸组成的结合对,其中每个寡核苷酸由8个至15个锁核酸(LNA)单体组成,每个单体包含核碱基,所述单体的核碱基形成所述第一寡核苷酸的第一核碱基序列和所述第二寡核苷酸的第二核碱基序列,其中选择所述第一核碱基序列和第二核碱基序列,使得所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成8个至15个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,并且其中所述结合对可通过根据本公开的第一方面的方法获得。

[0054] 在本文公开的所有方面和实施例的一个实施例中,每个寡核苷酸由9个至15个LNA单体组成,其中选择所述第一核碱基序列和第二核碱基序列,使得所述第一寡核苷酸和第二寡核苷酸能够在20°C至40°C的温度下形成9个连续Watson-Crick碱基对的反平行双链体,并且其中所述结合对可通过或根据第一方面及其实施例的方法获得或由其获得。

[0055] 在本文公开的所有方面和实施例的实施例中,每个ss-寡核苷酸包含两个或三个不同的核碱基。在本文公开的所有方面和实施例的一个实施例中,对于每个ss-寡核苷酸中所述的核碱基,G+C(包括G和C的类似物)含量低于75%。在一个具体的实施例中,所述G+C含量低于选自74%、73%、72%、71%和70%的值。在本文公开的所有方面和实施例的又一个实施例中,所述结合对中的每个LNA单体包含选自以下的核碱基:腺嘌呤、胸腺嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、7-脱氮鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤。在一个更具体的实施例中,在每个ss-寡核苷酸的所述核碱基中,每个胞嘧啶由5-甲基胞嘧啶取代。

[0056] 在本文公开的所有方面和实施例的一个实施例中,两个分离的相容性结合配偶体的结合对是一对选自以下组的全LNA ss-寡核苷酸:

[0057]	5' tgctcctg 3'	和5' caggagca 3' ,
[0058]	5' gcctgacg 3'	和5' cgtcaggc 3' ,
[0059]	5' ctgcctgacg 3'	和5' cgtcaggcag 3' ,
[0060]	5' gactgcctgacg 3'	和5' cgtcaggcagtc 3' ,
[0061]	5' tgctcctgt 3'	和5' acaggagca 3' ,
[0062]	5' gtgcgtct 3'	和5' agacgcac 3' ,
[0063]	5' gttggtgt 3'	和5' acaccaac 3' ,
[0064]	5' caacacaccaac 3'	和5' gttggtgtgttg 3' ,
[0065]	5' acacaccaac 3'	和5' gttggtgtgt 3' ,
[0066]	5' acaccaac 3'	和5' gttggtgt 3' .

[0067] 在一个具体的实施例中,前述组的任何选定对中的所述ss-寡核苷酸的单体是 β -D-LNA单体。在另一个具体实施例中,前述组的任何选定对中的所述ss-寡核苷酸的单体是 β -L-LNA单体。

[0068] 在本文公开的所有方面和实施例的一个实施例中,所述结合对的一个ss-寡核苷

酸连接至选自磁珠、顺磁珠、合成有机聚合物(乳胶)珠、多糖珠、试管、微孔板腔、比色皿、膜、支架分子、石英晶体、薄膜、滤纸、圆盘和芯片的固定相。在本文公开的所有方面和实施例的另一个实施例中,所述结合对的一个ss-寡核苷酸连接至选自肽、多肽、寡核苷酸、多核苷酸、糖、聚糖、半抗原和染料的分子。在本文公开的所有方面和实施例的又一个实施例中,ss-寡核苷酸共价附接至接头。在本文公开的所有方面和实施例的又一个实施例中,ss-寡核苷酸共价附接至在基于受体的分析物检测测定(例如但不限于免疫测定法)中有用的分析物特异性受体。

[0069] 从最广泛的意义上并与生物化学领域普遍接受的理解一致,受体是一种结构,所述结构对特定靶分子整体具有亲和力,或对所述靶分子的特定分子区域和/或三维方面具有亲和力。为了本公开的目的,将受体理解为与靶分子相互作用并结合靶分子。在生化测定中,可以使用受体来捕获其靶分子,以将所述靶标与复杂混合物分离,并确定作为分析物的靶分子。举例来说,免疫测定通常使用抗体或抗体衍生分子作为受体。捕获受体是以固定形式(即附着于固定相)提供的受体,或者优选以能够固定的形式提供的受体。固定化可以通过连接或能够连接所述固定相和所述受体的结合对来实现。

[0070] 在通用术语中,免疫测定提供一种或多种能够特异性结合靶分析物的受体。这样的受体可以通过分析物特异性免疫球蛋白来举例说明,因此称为免疫测定。然而,出于本公开的目的,也考虑任何其他类型的分析物特异性受体。因此,更通用的术语-基于受体的分析物检测测定是合适的。

[0071] 通常,所述靶分析物包含在样品中,其中所述样品是不同分子的复杂混合物。为了本公开的目的,考虑液体样品。所述液体样品包含液相,即通常为水性溶剂的液体溶剂。在所述水性溶剂中,多个分子以溶解状态存在。因此,在一个具体的实施例中,所述样品处于液态聚集状态,并且是单相均相混合物。在一个具体的实施例中,所述分析物以溶解形式包含在所述混合物中,并且另外一种或多种其他分子以溶解形式存在于所述混合物中。

[0072] 关于通过基于受体的分析物检测测定检测存在于液体样品中或认为存在于所述液体样品中的靶分析物,在第一基本步骤中,特异性结合所述分析物。特异性结合意味着受体存在或变得存在,其中所述受体对分析物具有结合亲和力和结合特异性,所述结合亲和力和结合特异性对于所述靶分析物是高的,而对于也存在于所述样品中的其他分子是低的或不存在的。在一个具体的实施例中(并举例说明许多现有的测定),将包含能够与分析物特异性结合的受体的化合物添加到所述样品中。重要的是,所述样品和包含受体的所述化合物的所述混合物必须提供允许所述受体与所述样品中所述靶分析物的特异性相互作用的条件。这包括在所述混合物中,条件必须允许所述受体与所述分析物的实际结合,并且期望用所述结合的靶分析物稳定所述受体。同时,期望所述样品和所述化合物的混合物不促进或稳定另外的分子与所述受体或与包含所述受体的化合物整体的非特异性结合。

[0073] 随后,固定所述分析物。固定化是检测过程中的重要步骤,因为它可以将所述分析物与周围的所述复杂混合物分离,具体地是与所述样品的其他分子分离。固定化需要固定相,所述靶分析物会附着在固定相上。一旦固定,就可以通过相分离从所述混合物中分离出所述分析物。然后从所述混合物中分离(即纯化)所述分析物,然后检测。

[0074] 考虑到基于受体的分析物检测测定和固定化步骤,需要提供固定相并在所述固定相和所述靶分析物之间建立连接。期望在自组装过程中建立连接。

[0075] 免疫测定是公认的生物分析方法,其中分析物的检测或定量取决于分析物和至少一种分析物特异性受体的反应,从而形成分析物:受体复合物。一个非限制性实例分别是抗原和抗体之间的反应。“夹心”免疫测定的具体实施例可以用于具有一个以上识别表位的分析物。因此,夹心测定需要至少两个与所述分析物上不重叠表位连接的受体。在“异相夹心免疫测定”中,一种所述受体具有分析物特异性捕获受体的功能;所述受体(在测定过程中)固定在固定相上。第二分析物特异性受体以溶解形式在液相中提供。一旦所述的分析物与第一和第二受体(受体-1:分析物:受体-2)结合,就形成了夹心状复合物。所述夹心状复合物也称为“检测复合物”。在检测复合物中,所述分析物夹在所述受体之间,即在这种复合物中,所述分析物代表第一受体和第二受体之间的连接元件。

[0076] 术语“异相”(相对于“均相”)表示测定过程中的两个基本且独立的步骤。在第一步中,形成并固定了包含标记物的检测复合物,但是未结合的标记物仍围绕所述复合物。在确定标记物依赖性信号之前,将未结合的标记物从固定的检测复合物冲洗掉,因此代表第二步。相反,均相测定通过一步温育产生分析物依赖性可检测信号,并且不需要洗涤步骤。

[0077] 在异相测定中,固定相官能化,这样在与分析物接触之前,固定相可能已经在其表面结合了功能捕获受体(第一受体);或所述固定相的表面官能化以便能够在第一受体与所述分析物反应后锚定第一受体。在后一种情况下,所述锚定过程不得干扰所述受体特异性捕获和结合所述分析物的能力。所述液相中存在的第二种受体用于检测结合的分析物。因此,在异相免疫测定中,允许所述分析物与所述第一(捕获)和第二(检测)受体结合。由此形成“检测复合物”,其中分析物夹在所述捕获受体和所述检测受体之间。在一个典型的实施例中,所述检测受体在与所述分析物接触之前被标记;或者,在分析物结合后,将标记物特异性附接到所述检测受体上。在将所述检测复合物固定在所述固定相上的情况下,在所述固定相上可检测的标记物的量对应于夹在中间的分析物的量。在通过洗涤步骤去除未结合的标记后,可以检测到表明分析物存在和分析物数量的固定标记物。

[0078] 另一个众所周知的实施例是竞争性异相免疫测定法,其最简单的形式由于缺少所述第二检测受体而不同于所述夹心型形式。相反,将具有所述分析物的样品与能够与所述分析物特异性受体交叉反应的人工生产标记的类似物混合。在所述测定中,所述分析物和类似物竞争结合固定的或变得固定的捕获受体。在所述结合步骤之后,固定的标记物的数量越高,能够竞争所述捕获受体的非标记分析物的数量越少。在洗涤步骤后确定固定的标记物。因此,在固定相上可检测到的标记的数量与所述样品中最初存在的分析物的数量成反比。

[0079] 异相免疫测定中必需的任何洗涤步骤都要求所述第一结合配偶体和所述第二结合配偶体的非共价连接必须足够稳定。然而,连接的所需稳定性的程度取决于要应用的洗涤步骤的强度。重要且出乎意料的是,本文所证明的结合对非常适合于促进免疫测定中的固定化步骤。也就是说,在免疫测定中,例如与固定相附接的结合对的第一结合配偶体和与分析物特异性(捕获)受体结合的结合对的第二结合配偶体非常适合于促进所述受体在所述固定相上的固定化。

[0080] 提供以下实例和附图以帮助理解本发明,本发明的真正范围在所附权利要求中阐明。应当理解的是,在不脱离本发明精神的前提下,可以对阐明的程序进行修改。

[0081] 实例1

[0082] LNA寡核苷酸的合成

[0083] 使用标准的自动固定相DNA合成程序并应用亚磷酰胺化学方法,在ABI 394DNA合成仪上以1 μ mol规模合成LNA寡核苷酸。Glen UnySupport PS(Glen Research cat no.26-5040)和LNA亚磷酰胺(Qiagen/Exiqon cat.No.33970(LNA-A(Bz)、339702(LNA-T)、339705(LNA-mC(Bz)和339706(LNA-G(dmF)) β -L-LNA类似物是根据A.A.Koshkin等人(J.Org.Chem 2001,66,8504-8512),从L-葡萄糖(Carbosynth,cat.No.MG05247)开始类似于D- β -LNA亚磷酰胺合成的,并且间隔物亚磷酰胺18(Glen Research cat.No.10-1918)和5'-生物素亚磷酰胺(Glen Research cat.No.10-5950)用作构建基块。在DNA级乙腈中,所有亚磷酰胺的浓度为0,1M。具有延长的偶联时间(180秒)、延长的氧化时间(45秒)和去三苯甲基化时间(85秒)的标准DNA循环以及标准合成试剂和溶剂用于组装LNA寡核苷酸。5'-生物素化LNA寡核苷酸合成为DMT_{off},而未修饰的LNA寡核苷酸合成为DMT_{on}。然后,应用标准切割程序,通过浓氨水从载体上切割LNA寡核苷酸。残留的保护基团通过用浓氨水处理(在56 $^{\circ}$ C下8小时)而切割。蒸发粗制LNA寡核苷酸,并通过RP HPLC(柱:PRP-1,7 μ m,250x 21.5mm(Hamilton,part no.79352)或XBridge BEH C180BD,5 μ m,10x 250mm(Waters part no.186008167))使用0,1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度洗脱。合并产物级分并通过用水透析(MWCO 1000, SpectraPor 6,part no.132638)3天而脱盐,从而也切割了DMT_{on}纯化的寡核苷酸的DMT基团。最后,将LNA寡核苷酸冻干。

[0084] 产量为85nmol至360nmol。

[0085] 通过RP18 HPLC(Chromolith RP18e,Merck part no.1.02129.0001)使用0,1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度对LNA寡核苷酸进行分析。典型的纯度 \geq 90%。通过LC-MS分析确认LNA寡核苷酸的身份。

[0086] 实例2

[0087] 使用RP-HPLC分析鉴定无需事先变性即能够形成双链体的LNA寡核苷酸序列

[0088] a) 一般方法:

[0089] 将来自实例1的LNA寡核苷酸溶解在缓冲液(0.01M HEPES pH 7.4,0.15M NaCl)中,并在RP18 HPLC(Chromolith RP18e,Merck part no.1.02129.0001)上使用0.1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度(10分钟内使用8%至24%乙腈;在260nm处检测)进行分析。

[0090] 将链和相应的反链LNA寡核苷酸以等摩尔浓度在室温(r.t.)混合并立即在RP18 HPLC(Chromolith RP18e,Merck part no.1.02129.0001)上使用0.1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度(10分钟内使用8%至24%B;在260nm处检测)进行分析。

[0091] 在第一个对照实验中,在室温下以等摩尔浓度将链和相应的反链LNA寡核苷酸混合,在室温下温育1小时,然后在RP18 HPLC(Chromolith RP18e,Merck part no.1.02129.0001)上使用0.1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度(10分钟内使用8%至25%乙腈;在260nm处检测)进行分析。

[0092] 在示出形成双链体(阳性对照)的第二个对照实验中,链和相应的反链LNA寡核苷酸在室温以等摩尔浓度混合,在95 $^{\circ}$ C(10分钟)热变性,并在达到室温后再次在RP18 HPLC(Chromolith RP18e,Merck part no.1.02129.0001)上使用0.1M pH 7的三乙基乙酸铵/乙腈梯度(10分钟内使用8%至24%乙腈;在260nm处检测)进行分析。

[0093] 如果与各个单链LNA寡核苷酸相比在不同保留时间形成新峰,则可以检测到双链

体形成。在阳性对照中,混合的链和反链在注射前进行热变性,产生双链体。在没有事先变性的情况下,在室温下将链和反链LNA混合后进行时间依赖性注射,可以监测形成双链体的动力学。

[0094] 如果没有事先变性,室温退火5分钟至60分钟后,形成的双链体和两条单链LNA之一的HPLC%比率(通过消光系数校正;如果两条链不完全等摩尔,则考虑较高比率值) ≥ 0.9 ,则确定LNA序列能够快速形成双链体(HPLC%通过消光系数校正;未考虑双链体的增色性)。

[0095] b) 鉴定快速形成双链体的序列

[0096] LNA 1:5'-tgctcctg-3'

[0097] LNA 2:5'-Bi-Heg-caggagca-3'

[0098] Heg为六乙二醇

[0099] Bi为通过生物素戊酸部分的羧基官能团附接的生物素标记物

[0100] 结果在附图中示出。

[0101] c) 鉴定缓慢形成双链体的序列

[0102] LNA 3:5'-ctgcctgacg-3'

[0103] LNA 4:5'-Bi-Heg-cgtcaggcag-3'

[0104] 结果在附图中示出。

[0105] 比率计算:

LNA	保留时间 [min]	HPLC%	消光系数(ϵ) [$l \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$]	HPLC% $\cdot \epsilon^{-1} \cdot 1000$
[0106] LNA 3 单链	3.365	45.14	98900	0.456
LNA 4 单链	7.148	49.98	109300	0.457
LNA 3/LNA 4双链	6.871	4.88	208200	0.023

[0107] $HPLC\% \cdot \epsilon^{-1} \cdot 1000$ (LNA 3/LNA 4双链) / $HPLC\% \cdot \epsilon^{-1} \cdot 1000$ (LNA 3单链) = $0.023 / 0.456 = 0.05$

[0108] $HPLC\% \cdot \epsilon^{-1} \cdot 1000$ (LNA 3/LNA 4双链) / $HPLC\% \cdot \epsilon^{-1} \cdot 1000$ (LNA 4单链) = $0.023 / 0.457 = 0.05$

[0001]		序列表	
[0002]	<110>	F. Hoffmann-La Roche AG	
[0003]		Roche Diagnostics GmbH	
[0004]	<120>	杂交全 LNA 寡核苷酸	
[0005]	<130>	P34851-WO (MI)	
[0006]	<150>	EP18178946.2	
[0007]	<151>	2018-06-21	
[0008]	<160>	20	
[0009]	<170>	PatentIn 版本 3.5	
[0010]	<210>	1	
[0011]	<211>	8	
[0012]	<212>	DNA	
[0013]	<213>	人工序列	
[0014]	<220>		
[0015]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0016]	<400>	1	
[0017]		tgctcctg	8
[0018]	<210>	2	
[0019]	<211>	8	
[0020]	<212>	DNA	
[0021]	<213>	人工序列	
[0022]	<220>		
[0023]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0024]	<400>	2	
[0025]		caggagca	8
[0026]	<210>	3	
[0027]	<211>	8	
[0028]	<212>	DNA	
[0029]	<213>	人工序列	
[0030]	<220>		
[0031]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0032]	<400>	3	
[0033]		gcctgacg	8
[0034]	<210>	4	
[0035]	<211>	8	
[0036]	<212>	DNA	
[0037]	<213>	人工序列	
[0038]	<220>		

[0039]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0040]	<400>	4	
[0041]		cgtcaggc	8
[0042]	<210>	5	
[0043]	<211>	10	
[0044]	<212>	DNA	
[0045]	<213>	人工序列	
[0046]	<220>		
[0047]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0048]	<400>	5	
[0049]		ctgcctgacg	10
[0050]	<210>	6	
[0051]	<211>	10	
[0052]	<212>	DNA	
[0053]	<213>	人工序列	
[0054]	<220>		
[0055]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0056]	<400>	6	
[0057]		cgtcaggcag	10
[0058]	<210>	7	
[0059]	<211>	12	
[0060]	<212>	DNA	
[0061]	<213>	人工序列	
[0062]	<220>		
[0063]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0064]	<400>	7	
[0065]		gactgcctga cg	12
[0066]	<210>	8	
[0067]	<211>	12	
[0068]	<212>	DNA	
[0069]	<213>	人工序列	
[0070]	<220>		
[0071]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0072]	<400>	8	
[0073]		cgtcaggcag tc	12
[0074]	<210>	9	
[0075]	<211>	9	
[0076]	<212>	DNA	
[0077]	<213>	人工序列	

[0078]	<220>	
[0079]	<223>	全 LNA 寡核苷酸
[0080]	<400>	9
[0081]	tgctcctgt	9
[0082]	<210>	10
[0083]	<211>	9
[0084]	<212>	DNA
[0085]	<213>	人工序列
[0086]	<220>	
[0087]	<223>	全 LNA 寡核苷酸
[0088]	<400>	10
[0089]	acaggagca	9
[0090]	<210>	11
[0091]	<211>	8
[0092]	<212>	DNA
[0093]	<213>	人工序列
[0094]	<220>	
[0095]	<223>	全 LNA 寡核苷酸
[0096]	<400>	11
[0097]	gtgctct	8
[0098]	<210>	12
[0099]	<211>	8
[0100]	<212>	DNA
[0101]	<213>	人工序列
[0102]	<220>	
[0103]	<223>	全 LNA 寡核苷酸
[0104]	<400>	12
[0105]	agacgcac	8
[0106]	<210>	13
[0107]	<211>	8
[0108]	<212>	DNA
[0109]	<213>	人工序列
[0110]	<220>	
[0111]	<223>	全 LNA 寡核苷酸
[0112]	<400>	13
[0113]	gttggtgt	8
[0114]	<210>	14
[0115]	<211>	8
[0116]	<212>	DNA

[0117]	<213>	人工序列	
[0118]	<220>		
[0119]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0120]	<400>	14	
[0121]		acaccaac	8
[0122]	<210>	15	
[0123]	<211>	12	
[0124]	<212>	DNA	
[0125]	<213>	人工序列	
[0126]	<220>		
[0127]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0128]	<400>	15	
[0129]		caacacacca ac	12
[0130]	<210>	16	
[0131]	<211>	12	
[0132]	<212>	DNA	
[0133]	<213>	人工序列	
[0134]	<220>		
[0135]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0136]	<400>	16	
[0137]		gttggtgtgt tg	12
[0138]	<210>	17	
[0139]	<211>	10	
[0140]	<212>	DNA	
[0141]	<213>	人工序列	
[0142]	<220>		
[0143]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0144]	<400>	17	
[0145]		acacaccaac	10
[0146]	<210>	18	
[0147]	<211>	10	
[0148]	<212>	DNA	
[0149]	<213>	人工序列	
[0150]	<220>		
[0151]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0152]	<400>	18	
[0153]		gttggtgtgt	10
[0154]	<210>	19	
[0155]	<211>	8	

[0156]	<212>	DNA	
[0157]	<213>	人工序列	
[0158]	<220>		
[0159]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0160]	<400>	19	
[0161]		acaccaac	8
[0162]	<210>	20	
[0163]	<211>	8	
[0164]	<212>	DNA	
[0165]	<213>	人工序列	
[0166]	<220>		
[0167]	<223>	全 LNA 寡核苷酸	
[0168]	<400>	20	
[0169]		gttggtgt	8

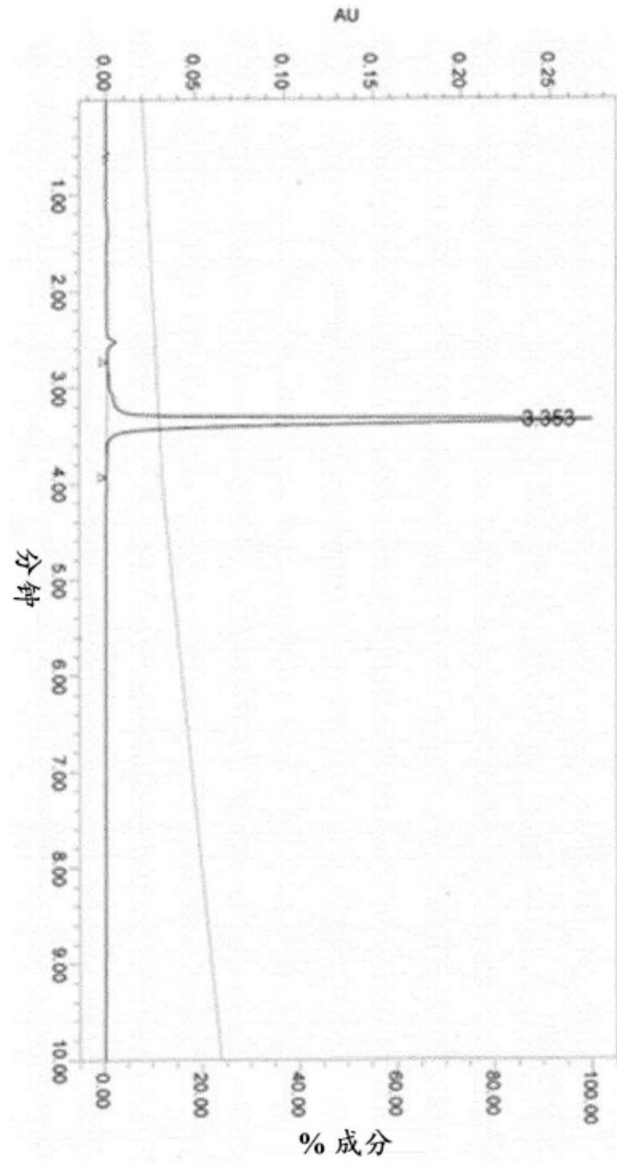


图1

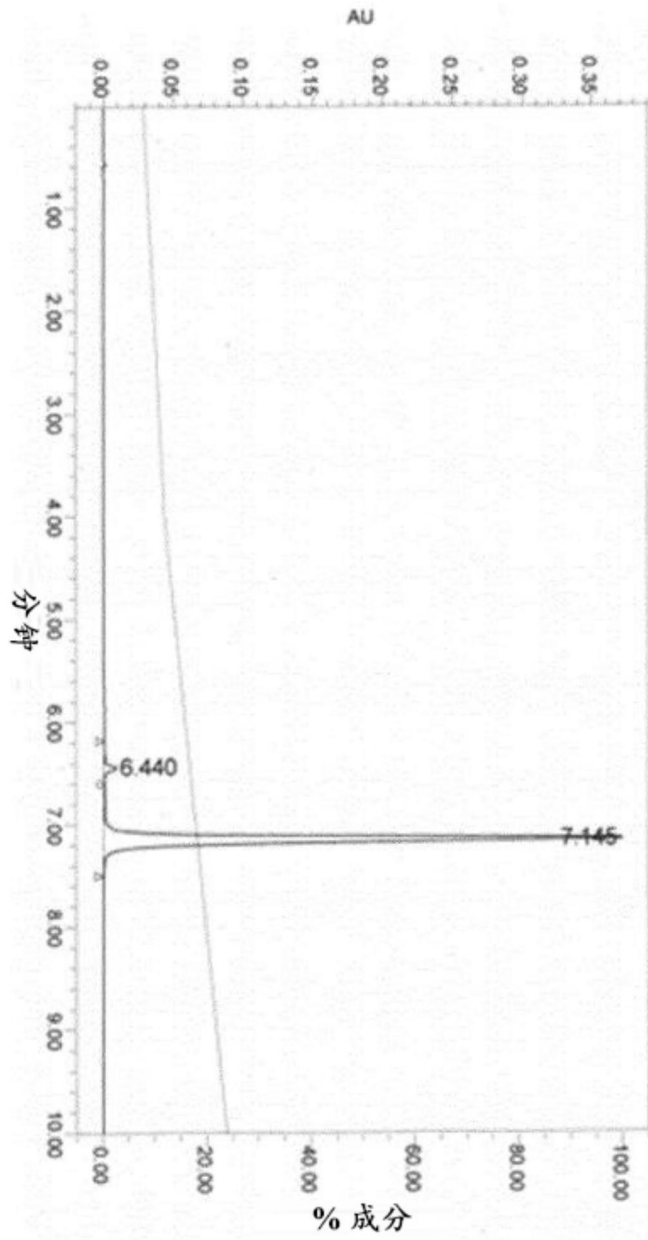


图2

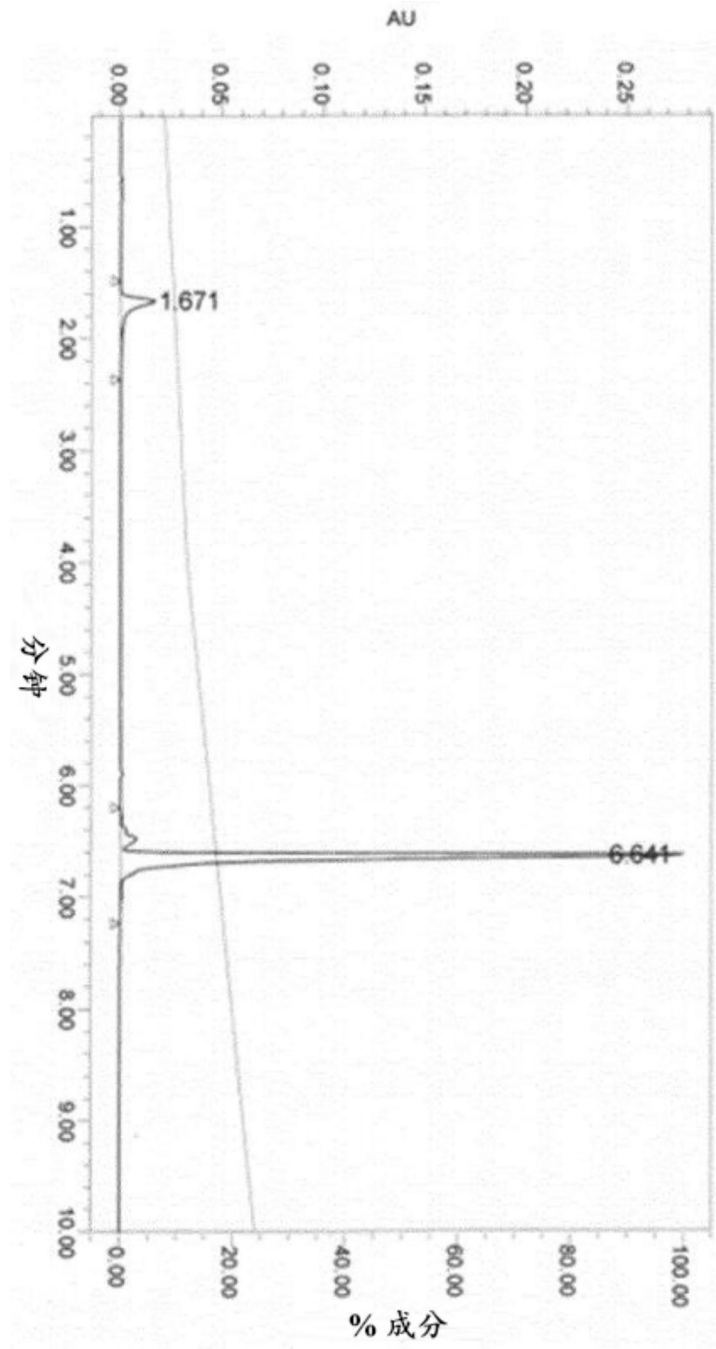


图3

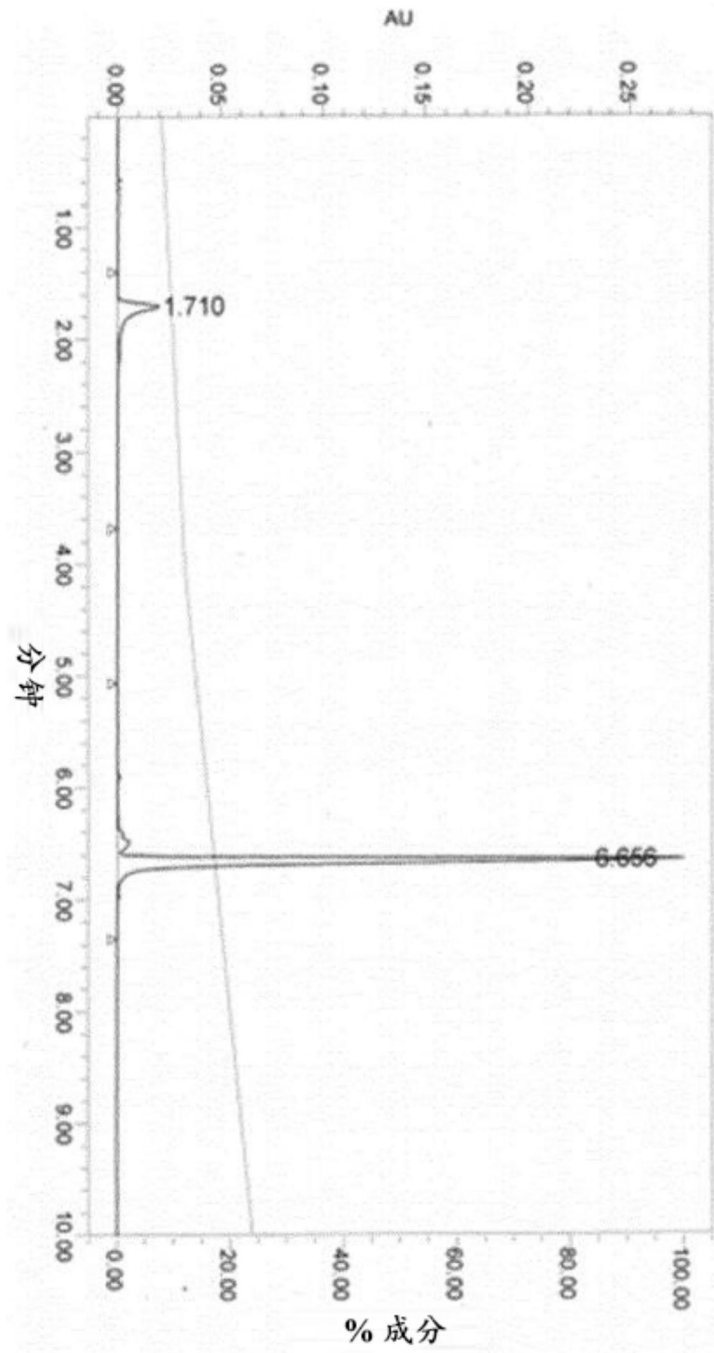


图4

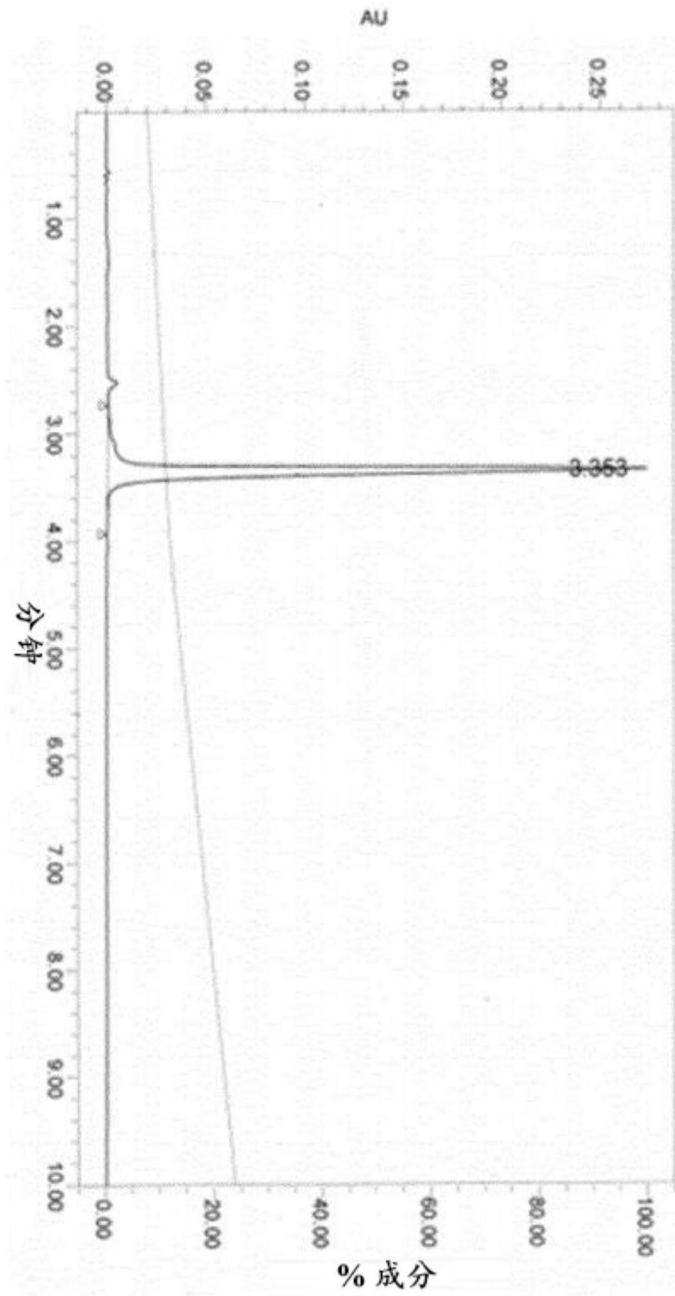


图5

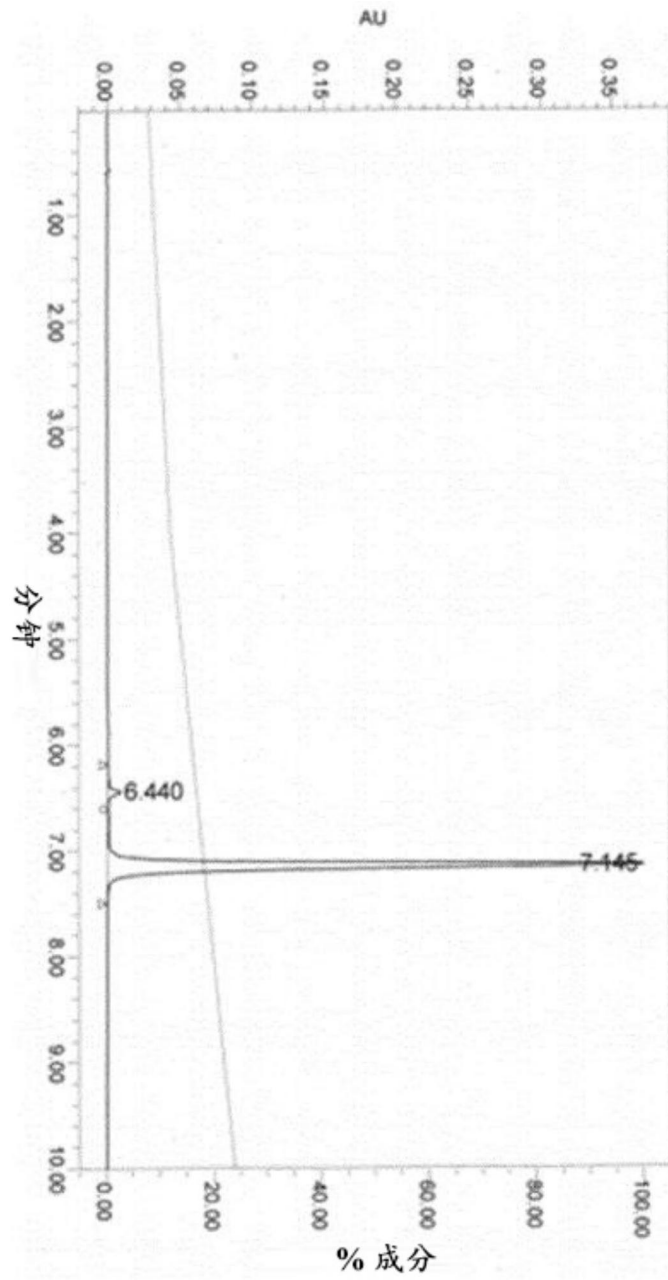


图6

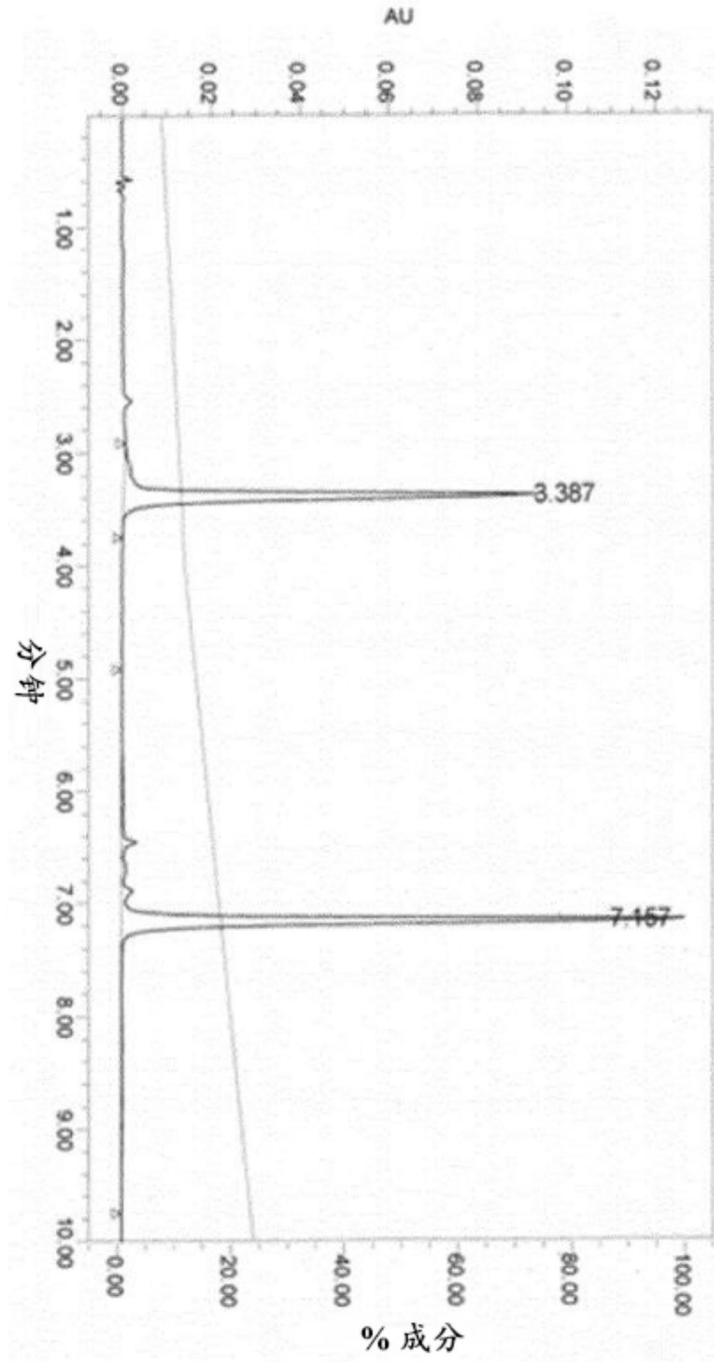


图7

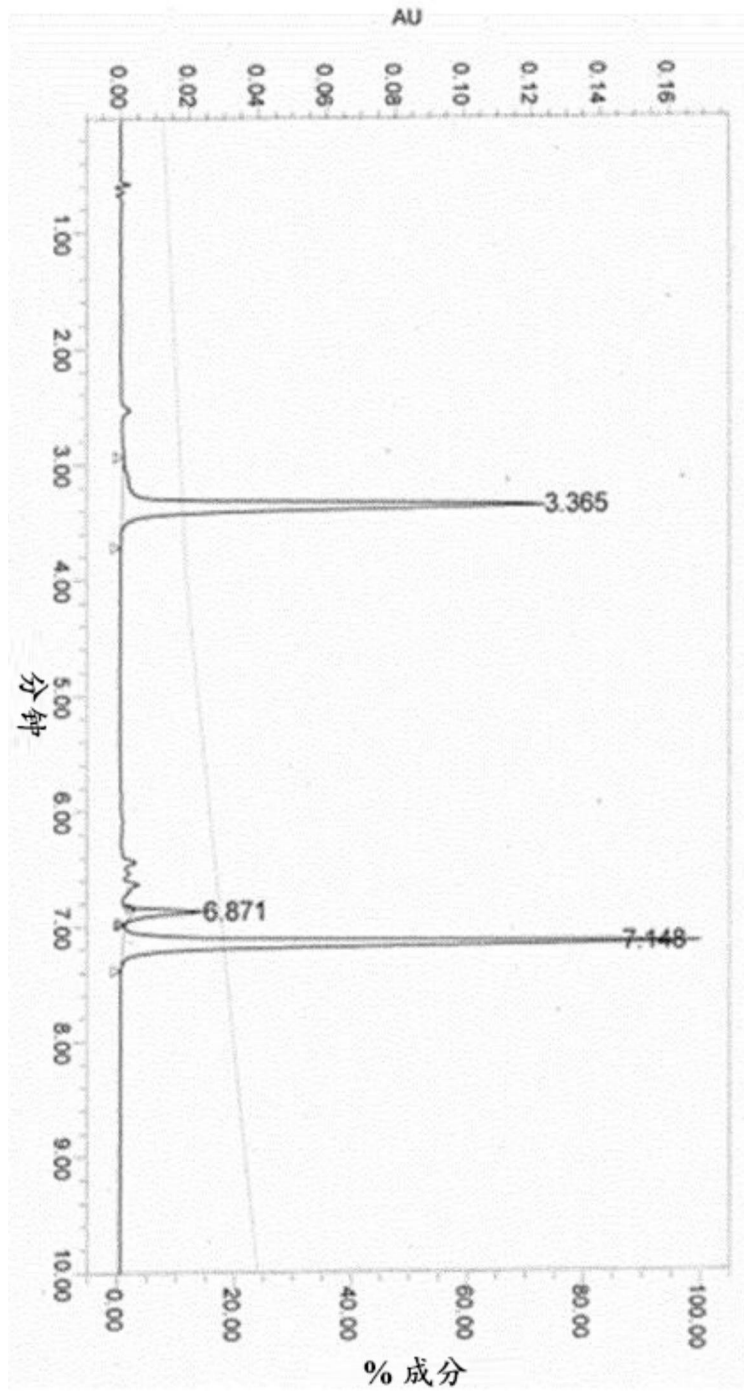


图8

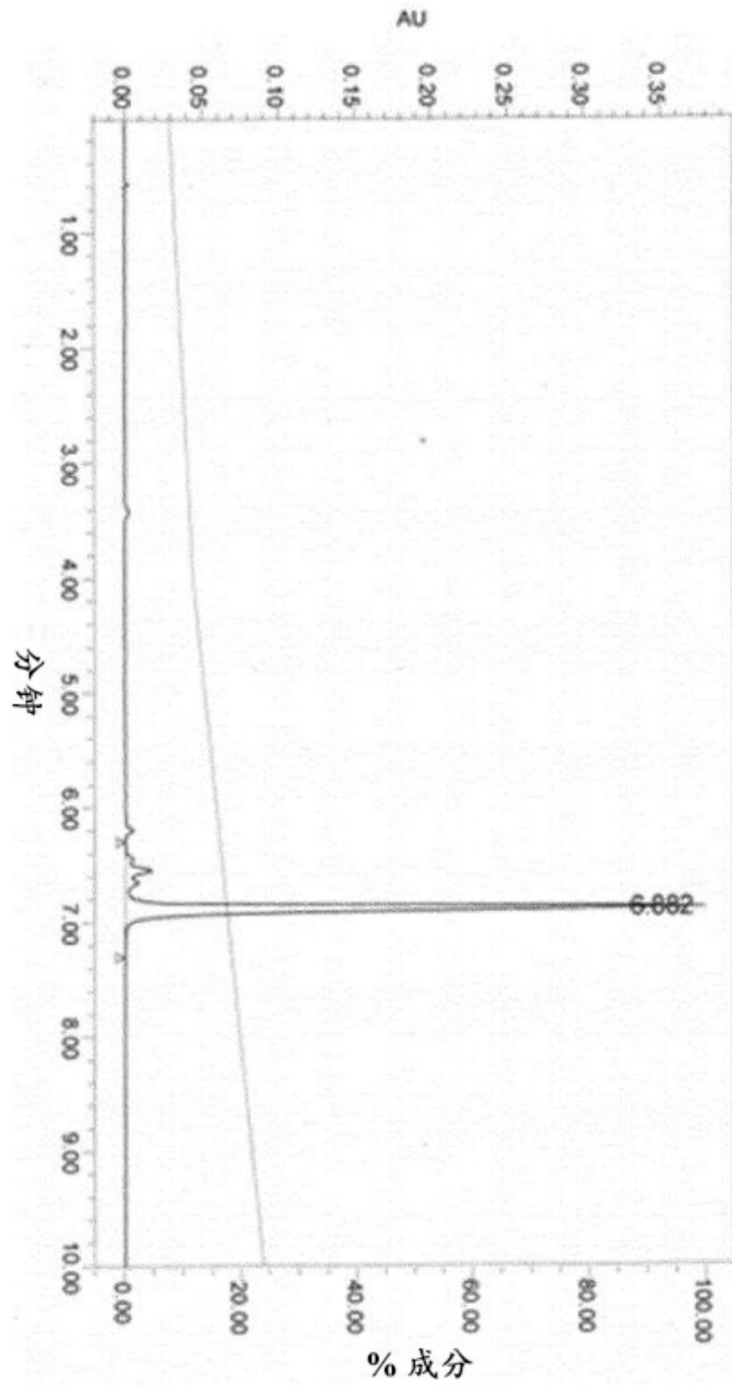


图9