(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0175241
(43) 공개일자 2023년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/44 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
B82Y 5/00 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/44 (2013.01)
C07K 19/00 (2023.08)
(21) 출원번호 10-2023-7039385
(22) 출원일자(국제) 2022년04월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월15일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2022/060737
(87) 국제공개번호 WO 2022/223802
국제공개일자 2022년10월27일
(30) 우선권주장
21169934.3 2021년04월22일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
테크니쉐 우니베르지테트 뮌헨
독일 80333 뮌헨 아르씨스스트라쎄 21
(72) 발명자
엥겔렌 보우터
독일 80798 뮌헨 젠트너슈트라쎄 35
지글 크리스티안
독일 82327 투찡 하웁트슈트라쎄 81
디에츠 헨드릭
독일 85540 하르 쭌프트슈트라쎄 43
(74) 대리인
특허법인필앤온지

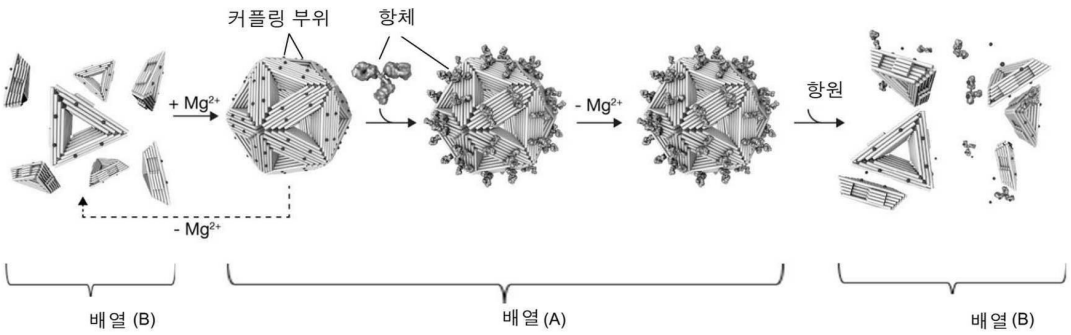
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **형태 전환 나노구조체**

(57) 요 약

본 발명은 조건부 전환 가능한 나노구조체 및 이를 포함하는 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성과 연결시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체 또는 항원 결합 단편과 같은 커플링 분자가 불리한 조건에서 나노구조체의 서브유닛 상호작용을 안정화할 수 있다는 발견에 기초한다. 추가적으로, 본 발명은 또한 본 발명의 나노구조체를 포함하는 시스템뿐만 아니라 본 발명의 나노구조체 또는 시스템을 활용하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 약제로 사용하기 위한 또는 진단 방법에 사용하기 위한 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 물질 및/또는 조성물도 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
B82Y 5/00 (2013.01)
C07K 2317/35 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

적어도 두 개의 커플링 부위를 포함하는 나노구조체로,

여기서 상기 적어도 두 개의 커플링 부위는 적어도 하나의 커플링 분자에 결합하며,

여기서 상기 적어도 두 개의 커플링 부위는 커플링 부위 세트가 되도록 구성되며, 선택적으로 여기서 하나의 커플링 부위 세트는 하나의 커플링 분자에 결합하도록 구성되는 나노구조체.

청구항 2

제1항에 있어서,

여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함하고, 여기서 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체 각각은 적어도 하나의 커플링 부위 세트 중 적어도 하나의 커플링 부위를 포함하며, 바람직하게는 여기서 적어도 하나의 제1 개체의 적어도 하나의 커플링 부위와 적어도 하나의 제2 개체의 적어도 하나의 커플링 부위는 적어도 하나의 제1 개체와 적어도 하나의 제2 개체의 대칭 위치에 위치하며, 선택적으로 여기서 적어도 하나의 커플링 분자는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 나노구조체의 적어도 하나의 제1 개체가 나노구조체의 적어도 하나의 제2 개체에 커플링되도록 구성되는 나노구조체.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 여기서 상기 나노구조체는

적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 임의 개수의 적어도 하나의 제1 개체, 및 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 임의의 수의 적어도 하나의 제2 개체와 같은, 복수 개의 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함하며, 선택적으로 여기서 상기 나노구조체는 복수개의 커플링 부위 세트, 바람직하게 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 임의의 수의 커플링 부위 세트를 포함하며, 바람직하게 여기서 각각의 커플링 부위 세트는 2개의 커플링 부위로 이루어진 나노구조체.

청구항 4

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 제1 배열(A), 및 적어도 하나의 제2 배열(B), 선택적으로 적어도 하나의 제3 배열(C), 적어도 하나의 제4 배열(D) 또는 임의의 다른 수의 배열을 취하도록 구성된 나노구조체.

청구항 5

제4항에 있어서, 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하도록 구성되고/구성되거나, 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합하지 않는 경우 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하도록 구성되고, 선택적으로 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 경쟁 분자가 거의 또는 전혀 존재 하지 않을 때, 적어도 하나의 제1 배열 (A)를 취하도록 구성되며/구성되거나, 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 경쟁 분자가 더 많은 양으로 존재할 때 적어도 하나의 제2 배열 (B)를 취하도록 구성되는, 나노구조체.

청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서, 여기서 상기 나노구조체가 제1 용액에서 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하도록 구

성되고, 여기서 제1 용액은 바람직하게는 제2 용액에 비해 더 높은 농도의 마그네슘 이온을 포함하고/포함하거나 여기서 나노구조체는 제2 용액에서 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하도록 구성되고, 여기서 제2 용액은 바람직하게는 제1 용액에 비해 더 낮은 농도의 마그네슘 이온을 포함하고, 선택적으로 제1 용액의 마그네슘 이온 농도는 20 mM보다 높으며/높거나 제2 용액의 마그네슘 이온 농도는 20 mM보다 낮은, 나노구조체.

청구항 7

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 나노구조체는 DNA, RNA, DNA 압타머, RNA 압타머, 또는 펩타이드 핵산(PNA)과 같은 핵산,

폴리펩타이드,

펩타이드,

당단백질,

펩타이드 모방체, 및

항체, 항체 유사 분자, 항원 결합 유도체 또는 이의 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체로

이루어진 그룹으로부터 선택되는 적어도 하나의 분자를 포함하는 나노구조체.

청구항 8

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 여기서 상기 나노구조체는 적어도 부분적으로 DNA 오리가미 구조체에 의해 형성되고,

여기서 DNA 오리가미 구조체는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥을 포함하고;

여기서 DNA 오리가미 구조체는 복수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 스테이플 가닥을 추가로 포함하고;

여기서 각각의 스테이플 가닥은 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이며; 그리고

여기서, 스테이플 가닥 각각은 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥 중 적어도 하나에 결합하도록 구성되고, 여기서 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥은 원하는 나노구조체가 형성되도록 접히고/접히거나 배열되는, 나노구조체.

청구항 9

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 여기서 적어도 하나의 커플링 부위는 분자이고, 바람직하게는 여기서 적어도 하나의 커플링 부위 및/또는 적어도 하나의 커플링 분자는

항원,

항원 단편,

항원 모방체,

항체, 항체 유사 분자, 항체 모방체, 항원 결합 유도체 또는 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체,

DNA 가닥,

비오틴 분자,

스트렙타비딘 분자,

말레이미드-티올 화학 분자,

클릭 화학 분자,

SNAP-태그 단백질, 및 CLIP-태그 분자로 이루어진 그룹으로부터 선택된 분자이고, 바람직하게는 여기서 상기 커플링 분자는 항체, 항체-유사 분자, 항체 모방체, 항원 결합 유도체 또는 이의 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체이고, 그리고 여기서 상기 커플링 부위는 항원, 항원 단편, 및/또는 항원 모방체인 나노구조체.

청구항 10

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 여기서 상기 커플링 분자는 IgG 항체, IgG 항체 단편, IgG 항체 모방

체, IgM 항체, IgM 항체 단편, IgM 항체 모방체, IgD 항체, IgD 항체 단편, IgD 항체 모방체, IgA 항체, IgA 항체 단편, IgA 항체 모방체, IgE 항체, IgE 항체 단편, 또는 IgE 항체 모방체이며, 바람직하게는 여기서 상기 항체, 항체 단편 또는 항체 모방체는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 포함하고, 더 바람직하게 여기서 상기 항원 결합 부위는 커플링 부위 세트의 적어도 2개의 커플링 부위에 결합하는 나노구조체.

청구항 11

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 있어서, 여기서 나노구조체는 최대 길이를 포함하고, 여기서 최대 길이가 1000 nm 미만, 바람직하게는 100 nm와 같이 500 nm 미만인 나노구조체.

청구항 12

앞선 청구항 중 어느 하나의 항에 따른 나노구조체를 포함하는 시스템으로서,

여기서 상기 시스템은

(i) 적어도 2개의 커플링 부위를 포함하는 적어도 하나의 나노구조체, 및

(ii) 적어도 하나의 커플링 분자를 포함하며,

여기서, 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 적어도 하나의 커플링 분자에 결합할 수 있고, 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 커플링 부위 세트가 되도록 구성되는 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서, 여기서 시스템은

적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함하는 적어도 하나의 나노구조체, 및, 적어도 하나의 커플링 분자, 바람직하게는 복수의 커플링 분자를 포함하는 하며,

여기서, 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체 각각은 적어도 하나의 커플링 부위 세트 중 적어도 하나의 커플링 부위를 포함하고, 바람직하게는 여기서 적어도 하나의 제1 개체 상의 적어도 하나의 커플링 부위 및 적어도 하나의 제2 개체 상의 적어도 하나의 커플링 부위는 개체들의 대칭 위치에 위치하며,

여기서, 적어도 하나의 커플링 분자는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 나노구조체의 적어도 하나의 제1 개체를 나노구조체의 적어도 하나의 제2 개체에 커플링하도록 구성되는 시스템.

청구항 14

적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법으로, 여기서 상기 방법은:

(i) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 나노구조체를 제공하는 단계;

(ii) 적어도 하나의 커플링 분자를 제공하는 단계, 여기서 나노구조체는 (ii)에 제공된 적어도 하나의 커플링 분자가 (i)에 제공된 나노구조체의 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하고; 및

(iii) 적어도 하나의 분자를 식별하는 단계;를 포함하고,

여기서 상기 적어도 하나의 분자는 바람직하게는 경쟁 분자이고,

여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 분자를 식별할 때 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하고, 이로써 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결시킬 수 있으며,

선택적으로 여기서 상기 나노구조체는 적어도 하나의 제1 배열(A)에서 분자 또는 제2 나노구조체를 둘러싸고, 바람직하게는 분자는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자로부터 선택되고,

추가로 선택적으로 여기서 분자 또는 제2 나노구조체, 바람직하게는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자로부터 선택된 분자는 나노구조체가 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취할 때 나노구조체의 형태적 재구성 시 방출 및/또는 활성화되는, 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법

청구항 15

약제로 사용하기 위한 및/또는 진단 방법에 사용하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체, 또는 제12항 또는 제13항에 따른 시스템을 포함하는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 조건부 전환 가능한 나노구조체 및 이를 포함하는 시스템에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성과 연결시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 항체 또는 항원 결합 단편과 같은 커플링 분자가 불리한 조건에서 나노구조체의 서브유닛 상호작용을 안정화할 수 있다는 발견에 기초한다. 추가적으로, 본 발명은 또한 본 발명의 나노구조체를 포함하는 시스템뿐만 아니라 본 발명의 나노구조체 또는 시스템을 활용하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 약제로 사용하기 위한 또는 진단 방법에 사용하기 위한 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 물질 및/또는 조성물도 제공된다.

배 경 기 술

[0002] 분자 인식은 살아있는 시스템의 기본 기능이며 예를 들어 적응 면역 체계에 의한 T 세포 인식 또는 세포막을 통한 분자 신호 전달에 필요하다. 현대 의학의 주요 발전은 특정 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 치료용 항체와 같이 유사한 분자 인식 특성을 나타내는 치료법의 개발이다. DNA 나노기술 분야의 최근 발전으로 인해 자연적으로 발생하는 분자에서 관찰되는 것과 유사한 분자 인식 특성을 나타내는 "지능형(intelligent)" 나노 규모 장치 개발의 잠재적인 후보로 고려되었다. 이러한 지능형 나노구조체를 개발하려면 분자 인식이 신호 전달 메커니즘과 결합되어야 하며 일반적으로 이에 국한되지는 않지만 구조적 재구성을 부여하여 약물 운반체에서 피전달체를 방출하거나 치료제를 활성화시키는 결과를 가져온다.

[0003] 최근에는 나노구조체를 제조하는 새로운 방법이 개발되었다. 여기에는 US 7,842,793 B3에 개시된 바와 같은 핵산 나노구조체를 제조하는 방법이 포함된다. 본 개시내용은 미리 결정된 구조를 갖도록 설계될 수 있는 핵산 나노구조체를 기반으로 하는 나노규모 장치, 시스템 및 효소 공장을 생성하는 방법인 "DNA 오리가미(origami)"라고 불리는 기술에 관한 것이다. DNA 오리가미는 DNA 분자를 사용하여 나노미터 규모의 3차원 구조를 생산한다. 화학적 변형 또는 단일 가닥 DNA 돌출부는 원하는 구조의 핵산 나노구조체의 설계 및 구축을 위하여, 그리고 다른 분자에 DNA 오리가미 구조체의 연결을 위하여 오리가미 구조체에 배치될 수 있다. 따라서 DNA 오리가미 구조체는 세포 신호 전달 메커니즘을 조절하는 데 사용될 수 있다.

[0004] 최근에는 다양한 나노크기 장치를 제조하기 위해 DNA 오리가미 기술이 사용되었다. 예를 들어, WO 2012/061719 A2는 생물학적 활성 개체를 특정 세포 집단에 표적화 전달하는 데 유용한 DNA 오리가미 장치를 개시한다. 이 장치는 생물학적 활성 물질의 표적 전달을 가능하게 할 수 있지만 두 가지 다른 결합 표적에 결합할 수 있는 특정 상호 작용 분자, 특히 압타머에 의존한다.

[0005] US 9,863,930 B2는 다양한 분석물을 검출하는데 사용할 수 있는 다양한 분자 바코드 쌍안정 스위치를 개시한다. 특히, 분자 바코드 쌍안정 스위치는 DNA 오리가미를 사용하여 제조될 수 있다.

[0006] 그러나 분자 신호에 의해 유도된 나노입자의 재구성을 제어하는 모듈의 통합은 여전히 해결되지 않은 과제로 남아 있다. 현재까지 일종의 분자 재구성을 보여주는 소수의 개발된 DNA 오리가미 나노입자의 대부분은 구조 전환 압타머에 의존한다. 일반적으로 이러한 압타머는 준안정 폐쇄 구성으로 구조를 잠근다. 압타머 자물쇠에 대한 항원의 결합은 열린 상태로의 평형 이동을 유도한다. 구조 전환 압타머 사용의 본질적인 한계는 개방 상태와 폐쇄 상태의 안정성 사이의 복잡한 균형이며, 이를 위해서는 다양한 구조와 압타머 유형에 대한 광범위한 조정이 필요하다. 또한 훨씬 더 적은 수의 항원에 대해 제한된 수의 압타머만 알려져 있으며 일반적으로 적절한 친화력으로 결합하거나 적절한 기능을 위해 색다른 금속 이온이 필요하다. 마지막으로 압타머는 큰 구조적 이질성을 보여 모듈 설계를 본질적으로 어렵게 만든다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 상기의 관점에서, 분자 인식이 신호 전달 메커니즘에 결합될 수 있게 하는 나노구조체를 개발하는 것이 해당 분

야에서 계속해서 요구되고 있다. 또한, 많은 수의 분자를 인식하고, 인식 시 그 형태를 안정적으로 변경할 수 있는 나노구조체의 개발이 시급하다. 더욱이, 높은 친화력으로 표적 분자에 결합하는 나노구조체도 시급히 필요하다. 본 발명의 목적은 종래 기술의 단점과 불리한점을 극복하거나 적어도 완화하는 것이다. 즉, 본 발명의 목적은 새로운 형태 전환 나노구조체를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 일반적으로 이를 통해 본 발명의 주요 측면은 다음과 같이 설명될 수 있다.

[0009] **첫 번째 측면**에서, 본 발명은 적어도 2개의 커플링 부위를 포함하는 나노구조체에 관한 것이다.

[0010] **두 번째 측면**에서, 본 발명은 나노구조체를 포함하는 시스템에 관한 것이다.

[0011] **세 번째 측면**에서, 본 발명은 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법에 관한 것이다.

[0012] **네 번째 측면**에서, 본 발명은 약제로 사용하거나 진단 방법에 사용하기 위한 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 물질에 관한 것이다.

[0013] **다섯 번째 측면**에서, 본 발명은 약제로 사용하기 위한, 또는 진단 방법에 사용하기 위한 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도면은 다음을 나타낸다.

도 1은 정이십면체 DNA 오리가미 쉘의 IgG 매개 안정화 및 항원으로 유발된 분해를 보여준다. DNA 오리가미 서브유닛에 전략적으로 탑재된 항원(삼각형 모양으로 표시된 "개체")은 2가 항체("커플링 분자")가 항원 단편에 결합될 때 불리한 조건에서 서브유닛 상호작용을 안정화하기 위해 서로 다른 DNA-오리가미 서브유닛(삼각형 양으로 표시된 "개체") 사이의 분자 다리 역할을 할 수 있게 해준다. 형태 상보적인 돌출부와 오목부는 다층 DNA 오리가미 서브유닛의 20개의 동일한 복사본에서 정이십면체 쉘의 자가 조립을 제어한다. 정이십면체 쉘의 자가 조립에는 형태 보완적 특징 사이의 뭉툭한 말단 적층 접촉을 안정화하기 위해 Mg2+ 이온의 추가가 필요하다. 항체 특이적 항원은 DNA 오리가미 서브유닛("삼각형") 단량체 표면의 대칭 위치에 구비된다. 쉘 조립으로 인해 각 삼각형-삼각형 경계면의 반대편에 항원이 위치하게 된다. 항원 특이적 항체("커플링 분자")는 쉘에 장착된 항원에 2가로 결합하고 삼각형-삼각형 상호작용을 안정화한다. 이어서 정이십면체 쉘을 희석하여 Mg2+ 이온 농도를 불안정하게 만들면 쉘은 준안정적인 "스프링 장착" 상태로 유지된다. 제어된 분해는 쉘에서 안정화 항체를 대체하는 보조 항원("경쟁 항원")을 추가하여 촉발되어 DNA 오리가미 구조체의 형태적 재구성을 유도한다. 범례: Mg^{2+} = 마그네슘 이온; 1개의 삼각형 = 1개의 DNA 오리가미 서브유닛("개체"); "커플링 부위" = 항원 단편(바람직하게는 스테이플 가닥을 통해 DNA-오리가미 서브유닛에 장착됨); 항체 = "커플링 분자".

도 2는 Mg2+ 의존성 IgG 매개 쉘 안정화의 구조적 특성화 및 평가를 보여준다. (a) 상단: 25mM $MgCl_2$ 에서 삼각형-삼각형 경계면을 교차 연결하는 항-디곡시게닌 항체를 사용하여 독립형 얼음에 있는 정이십면체 쉘의 예시적인 Cryo-EM 현미경 사진. 하단: 다양한 방향의 2차원 클래스 평균. (b) 각 삼각형-삼각형 경계면을 연결하는 2개의 항-디곡시게닌 항체를 사용하여 조립된 정이십면체 쉘의 Cryo -EM 재구성. (c) 수동으로 배치된 IgG 항체(PDB: 1IGT)가 있는 실린더 모델(왼쪽)과 Cryo-EM 재구성 (오른쪽)에 묘사된 두 개의 항-디곡시게닌 항체에 의해 가교된 삼각형-삼각형 경계면을 확대. 주목할 만한 점은 Fab 단편 둘 다에 더하여 항체의 Fc 영역 일부가 재구성된다는 것이다. (d) 감소된 Mg2+ 농도에서 항체 매개 안정화의 도식적 표현. (e) 8, 12, 16 및 20mM $MgCl_2$ 가 보충된 0.5X TBE 완충액 내 0.75% 아가로스 겔의 레이저 스캔 형광 이미지. 조립된 쉘을 25mM $MgCl_2$에서 항-디곡시게닌 항체가 있는 경우와 없는 경우로 나누어 배양한 후 해당 $MgCl_2$ 농도로 희석하고 해당 겔에서 전기영동했다. 범례: 단량체 = 단일 삼각형 단량체, 이량체 = 2개의 삼각형 서브유닛에 의해 형성된 이량체, 쉘 = 완전히 조립된 정이십면체 쉘. (f) 항 -디곡시게닌 항체 없이(왼쪽) 또는 함께(오른쪽) 배양하고 12mM $MgCl_2$로 희석한 쉘의 음성 염색 TEM 이미지. (g) 항-디곡시게닌 항체 없이 및 항-디곡시게닌 항체와 함께 배양한 후 다양한 최종 $MgCl_2$ 농도로 희석한 쉘의 정규화된 FRET 비율. 삼각형 서브유닛의 각 측면은 대칭 위치에서 Cy3 및 Cy5 형광단으로 기능화되어 쉘이 조립될 때만 에너지 전달이 발생한다. 22 ~ 14mM 사이의 $MgCl_2$ 농도에서 FRET 비율

의 초기 감소는 정전기 반발력 증가로 인해 쉘이 부풀어오르기 때문에 발생한다.

도 3는 정이십면체 쉘의 항원 유발 분해를 보여준다. (a) 쉘 안정화 항-디곡시게닌 항체와 결합하기 위해 경쟁하는 가용성 디곡시게닌 리간드를 추가하여 항체가 스프링 장착 쉘에서 옮겨지고 결과적으로 불안정한 Mg2+ 이온 농도에서 쉘의 분해가 촉발된다. 12mM $MgCl_2$ 가 보충된 0.5X TBE 완충액에 담긴 0.75% 아가로스 겔의 레이저 스캔 형광 이미지. 항-디곡시게닌 항체가 장착된 조립된 쉘을 증가하는 농도의 디곡시게닌과 함께 배양했다. 항-디곡시게닌 안정화 쉘은 가용성 디곡시게닌 항원의 농도가 증가함에 따라 분해된다. 25μM 가용성 디곡시게닌이 없는 경우(왼쪽)와 존재하는 경우(오른쪽)의 항 디곡시게닌 안정화 쉘의 음성 염색 TEM 이미지. (b) (a)와 유사하지만 항-디니트로페놀 안정화 쉘을 사용하고 가용성 2,4-디니트로페놀 리간드가 첨가. (c) 가용성 디곡시게닌 리간드의 농도가 증가함에 따라 항-디곡시게닌에 의해 안정화된 쉘의 정규화된 FRET 비율. (d) 가용성 2,4-디니트로페놀의 농도가 증가함에 따라 항-디니트로페놀에 의해 안정화된 쉘의 정규화된 FRET 비율. 점선은 실험 데이터에 대한 Hill 방정식의 비선형 최소 제곱 최적화를 나타낸다. (e) 왼쪽: AND-게이트 로직 게이트 쉘 분해는 디곡시게닌 및 2,4-디니트로페놀 리간드와 각 항체를 삼각형-삼각형 경계면에 설치하여 실현된다. 결과적으로 AND 게이트 쉘을 분해하려면 가용성 디곡시게닌 및 2,4-디니트로페놀의 존재가 모두 필요하다. 오른쪽: 12 mM $MgCl_2$가 보충된 0.5X TBE 완충액에 담긴 0.75% 아가로스 겔의 레이저 스캔 형광 이미지. 항-디곡시게닌 및 항-디니트로페놀 항체가 장착된 조립된 AND-게이트 쉘을 증가하는 농도의 상단: 디곡시게닌, 중간: 2,4-디니트로페놀 및 하단: 디곡시게닌 및 2,4-디니트로페놀과 함께 배양했다. 상단: 25μM 디곡시게닌, 중간: 5mM 2,4-디니트로페놀 및 하단: 25μM 디곡시게닌 및 5mM 2,4-디니트로페놀과 함께 배양된 항-디곡시게닌 및 항-디니트로페놀이 장착된 쉘의 음성 염색 TEM 이미지. (f) 항-디곡시게닌과 항-디니트로페놀의 조합으로 안정화되고 가용성 디곡시게닌(25μM)과 2,4-디니트로페놀(5mM)의 조합으로 배양된 AND-게이트 쉘의 정규화된 FRET 비율.

도 4는 항원에 의해 유발되는 바이러스 페이로드의 방출을 보여준다. (a) B형 간염 바이러스(HBV) 코어 캡시드를 사용하여 삼각형 서브셋의 기능화를 보여주는 도식(왼쪽에서 오른쪽으로)으로, 여기서 HBV 입자의 결합은 삼각형의 쉘 안쪽을 향한 표면의 특정 항체; 루멘에 HBV 코어 캡시드가 있는 완전한 쉘의 조립; 항-Dig IgG 항체 및 이온 강도 감소에 의한 스프링 로딩에 의한 스테이플링; 가용성 디곡시게닌 항원을 첨가하여 항원에 의해 유발되는 쉘 파열 및 바이러스 페이로드 방출에 의해 매개된다. 쉘 내부에 위치한 HBV 결합 항체가 쉘에서 분리되어 HBV 입자가 쉘에 자유롭게 떠다니는 중간 단계는 표시되지 않는다. (b, c, d) 각각 바이러스 페이로드의 방출을 유도하는, 바이러스 페이로드가 있는 상태에서 40mM $MgCl_2$로 조립된 쉘, 스프링 로딩 조건(12mM $MgCl_2$)에서 바이러스 페이로드로 포장된 Anti-Dig 스테이플 쉘, 용해성 디곡시게닌 항원을 추가하여 분해된 쉘의 음성 염색 TEM 이미지. (b,c)의 스케일 바는 50nm 및 (d) 의 스케일 바는 100nm.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하에서, 본 발명의 구성들이 설명될 것이다. 이들 구성은 특정 구현예와 함께 나열되어 있지만, 추가적인 구현예를 생성하기 위해 임의의 방식으로, 임의의 개수로 결합될 수 있다는 것을 이해해야 한다. 다양하게 설명된 실시예와 바람직한 구현예는 본 발명을 명시적으로 설명된 구현예에만 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 설명은 명시적으로 설명된 구현예 중 2개 이상을 결합하거나 명시적으로 설명된 실시예 중 하나 이상을 개시된 및/또는 바람직한 요소 중 임의의 수와 결합한 실시예를 지원하고 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 출원에 기술된 모든 구성들의 임의의 순열 및 조합은 문맥상 달리 나타내지 않는 한 본 출원의 설명에 개시된 것으로 간주되어야 한다.

[0016] 첫 번째 측면에서, 본 발명은 적어도 2개의 커플링 부위를 포함하는 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 적어도 하나의 커플링 분자(즉, 하나의 커플링 분자 또는 복수의 커플링 분자)에 결합할 수 있고, 여기서 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 커플링 부위트 세트가 되도록 구성된다.

[0017] 바람직한 구현예에서, 상기 커플링 부위 세트는 하나의 커플링 분자에 결합하도록 구성된다. 일반적으로, 적어도 2개의 커플링 부위를 포함하는 나노구조체는 나노구조체가 이들 2개의 커플링 부위만을 포함하고, 하나의 커플링 부위 세트가 단지 하나의 커플링 분자에만 결합하도록 구성된다는 의미로 해석되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다. 대신, 나노구조체는 또한 2개 이상의 커플링 부위를 가질 수 있으며, 하나의 커플링 부위 세트는 하나 이상의 커플링 분자에 결합하도록 구성될 수 있다.

[0018] 다른 바람직한 구현예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함하며, 여기서 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체 각각은 적어도 하나의 커플링 부위 세트 중 적어도 하나의 커플링 부위를 포함하고, 바람직하게는 적어도 하나의 제1 개체의 적어도 하나의 커플링 부위와 적어도 하나

의 제2 개체의 적어도 하나의 커플링 부위는 적어도 하나의 제1 개체와 적어도 하나의 제2 개체의 대칭 위치에 위치한다.

[0019] 바람직한 구현예에서, 커플링 부위 세트는 동일한 커플링 부위, 즉 동일한 커플링 분자에 커플링되도록 구성된 커플링 부위만을 포함할 수 있다. 다른 구현예에서, 커플링 부위 세트는 서로 다른 상호작용에 의해 커플링 분자에 커플링되도록 구성된 적어도 2개의 별개의 커플링 부위를 포함할 수 있다. 커플링 부위 세트는 두 개의 커플링 부위로 형성될 수 있다. 그러나 다른 구현예에서는, 커플링 부위 세트는 또한 복수의 커플링 부위에 의해 형성될 수도 있다.

[0020] 본 발명은 일반적으로 나노구조체에 관한 것이다. 본 발명의 실시예에서, 나노구조체는 US 7,842,793 B2에 예시적으로 개시된 바와 같은 DNA 오리가미 구조체, 즉 DNA 오리가미 장치일 수 있다. 그러나, 본 기술이 이에 제한되는 것은 아니며, 이는 단지 예시에 불과하며, 본 발명을 실시하기 위해 다른 나노구조체가 활용될 수도 있음을 이해해야 한다. 다만, 본 명세서에서 사용되는 용어 "나노구조체(nanostructure)"는 바람직하게는 다수의 DNA-오리가미 서브유닛(개체)으로 구성된 DNA-오리가미 구조체를 의미한다. 일부 실시양태에서, 본 발명에 따른 나노구조체의 내부는 속이 비어 있을 수 있고 치료 분자 및/또는 피전달체(cargo) 분자와 같은 분자를 포함할 수 있다.

[0021] "개체(entity)"라는 용어는 나노구조체 및/또는 DNA-오리가미 서브유닛을 의미할 수 있다.

[0022] "커플링 부위(coupling site)"라는 용어는 커플링 분자가 결합하는 나노구조체의 서브유닛("개체") 상의 부위를 의미할 것이다. 바람직하게는, 커플링 부위는 항원, 항원성 단편 또는 항원 모방체이다. 대안적으로, 커플링 부위는 비오틴 분자, 스트렙타비딘 분자, 또는 특정한 다른 분자에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 분자이다.

[0023] 본 명세서에 사용된 "커플링 부위 세트(coupling site set)"는 적어도, 바람직하게는 2개의 커플링 부위로 이루어진 커플링 부위 세트를 의미할 것이다. 바람직하게는, 커플링 분자는 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 (예를 들어, 서로 다른 DNA-오리가미 서브유닛에 있는 두 개의 항원 결합 구조에 대한 항체의 결합에 의해) 나노구조체의 제2 서브유닛(예를 들어, "제2 개체")에 하나의 서브유닛 (예를 들어, "제1 개체")이 커플링되도록 구성되어진다.

[0024] 본 발명에 따른 "적어도 하나"라는 용어는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 임의의 다른 숫자를 포함할 것이다. 예를 들어, 용어 "적어도 하나"의 제1 개체는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 기타 임의의 수의 제1 개체를 포함할 것이다. 마찬가지로, "적어도 하나"의 제2 개체라는 용어에는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 또는 기타 임의의 수의 제2 개체를 포함할 것이다.

[0025] 또 다른 구현예에서, 적어도 하나의 커플링 분자는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 나노구조체의 적어도 하나의 제1 개체를 나노구조체의 적어도 하나의 제2 개체에 커플링시키도록 구성된다.

[0026] "커플링 분자(coupling molecule)"이라는 용어는 커플링 부위에 결합하는 분자를 의미할 것이다. 바람직하게는, 커플링 분자는 항체와 같은 항원 결합 구조체이다. 대안적으로, 커플링 부위는 스트렙타비딘 분자 또는 다른 분자에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 분자다. 본 발명의 주요 분석에서는 커플링 분자가 분석에 인위적으로 첨가된다. 커플링 분자는 커플링 부위에 가역적으로 결합할 수 있다. 즉, 커플링 분자는 커플링 부위에 가역적으로 결합하고 반복적으로 분리될 수 있다. 따라서, 커플링 분자는 커플링 부위에 반복적으로 결합 및 분리될 수 있다.

[0027] 또한, 나노구조체는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 임의 개수의 적어도 하나의 제1 개체, 및 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개, 11개, 12개, 13개, 14개, 15개, 16개, 17개, 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개, 26개, 27개, 28개, 29개, 30개 또는 임의의 수의 적어도 하나의 제2 개체와 같은 복수개의 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함한다.

[0028] 추가 구현예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것으로, 여기서 나노구조체는 복수의 커플링 부위 세트, 바람직하게는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 또는 임의 개수의 커플링 부위 세트를 포함하며, 바람직하게는 여기서 각각의 커플링 부위

세트는 2개의 커플링 부위로 이루어진다.

[0029] 또 다른 구현예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것으로서, 복수의 커플링 부위 세트 중 제1 커플링 부위 세트에 결합하는 커플링 분자는 복수의 커플링 부위 세트 중 제2 커플링 부위 세트에 결합하는 커플링 분자와 동일한 커플링 분자이거나, 또는 여기서 복수의 커플링 부위 세트 중 제1 커플링 부위 세트에 결합하는 커플링 분자는 복수의 커플링 부위 세트 중 제2 커플링 부위 세트에 결합하는 커플링 분자와 다른 커플링 분자이다.

[0030] 나노구조체는 적어도 하나의 제1 배열(A) 및 적어도 하나의 제2 배열(B)을 포함하는 다양한 배열을 취하도록 구성될 수 있다. 일부 구현예에서, 이들 배열은 "개방형" 및 "폐쇄형" 배열으로도 지칭될 수 있다. 나노구조체가 취하는 배열에 따라 나노구조체는 나노구조체의 다른 부분에 대한 접근성을 변경할 수 있다. 예를 들어, 제1 배열(A)보다 제2 배열(B) 에서 나노구조체 내부에 대한 접근이 더 용이할 수 있다.

[0031] 바람직한 구현예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 제1 배열(A), 적어도 하나의 제2 배열(B), 선택적으로 적어도 하나의 제3 배열(C), 적어도 하나의 제4 배열(D), 또는 다른 수의 배열을 취하도록 구성될 수 있다. 따라서, 본 발명의 임의의 실시양태의 나노구조체는 상이한 배열(예를 들어 배열 (A), (B), (C), (D) 등)을 취할 수 있다.

[0032] 커플링 부위가 커플링 분자에 결합되어 있는지 아닌지 여부에 따라, 서로 다른 배열을 취하는 나노구조체의 가능성이 바뀔 수 있다. 예로서, 커플링 부위의 전부(또는 일부)가 커플링 분자에 의해 커플링되는 경우, 나노구조체는 결합 부위 중 어느 것도 커플링 분자에 의해 커플링되지 않을 때의 경우보다 예를 들어 제1 배열(A)을 취할 가능성이 더 높을 수 있다. 따라서, 커플링 부위의 커플링 상태에 따라 나노구조체 내부로의 접근성이 달라질 수 있다. 따라서, 커플링 부위의 커플링 상태는 나노구조체를 "개방" 및/또는 "폐쇄"할 수 있다. 이는 또한 나노구조체의 내부에 존재할 수 있는 피전달체 분자 및/또는 치료 분자와 같은 분자의 방출을 포함할 수 있음이 이해될 것이다.

[0033] 나노구조체는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 각각의 커플링 부위 세트에 결합할 때 제2 배열(B)보다 더 높은 확률로 제1 배열(A)을 취하도록 구성될 수 있다. 따라서 특히 바람직한 구현예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 나노구조체는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하도록 구성되고/되거나 여기서 나노구조체는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합하지 않을 때 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하도록 구성된다.

[0034] 그러나, 또한 커플링 분자가 각각의 커플링 부위 세트에 결합하지 않는 경우에도 나노구조체는 제1 배열(A)과 제2 배열(B)을 모두 취할 수 있다. 보다 구체적으로, 제1 배열(A)과 제2 배열(B) 사이에는 평형이 있을 수 있다. 이 평형에서, 제1 배열(A)이 "바람직"할 수 있다. 즉, 나노구조체는 제2 배열(B)보다 가능성이 더 높은 배열(A)을 취할 수 있으며, 그 반대도 마찬가지이다. 또한, 나노구조체는 제1 배열(A)과 제2 배열(B) 사이의 적어도 하나 또는 복수의 평형 상태를 취하도록 구성될 수 있다. 예를 들어, 나노구조체는 제1 배열(A)과 제2 배열(B) 사이의 제1 및 제2 평형 상태를 취하도록 배열될 수 있으며, 여기서 나노구조체가 제2 배열(B)을 취할 가능성은 첫 번째 평형 상태보다 두 번째 평형 상태에서 다를 (예를 들어, 더 높은) 수 있다.

[0035] 위의 내용은 단지 예시일 뿐이며, 제1 및 제2 평형 상태는 서로 다른 확률로 제1 배열(A)과 제2 배열(B)을 취할 수 있다는 것이 이해될 것이다. 일반적으로, 제2 배열(B)은 첫 번째 평형 상태보다 두 번째 평형 상태에서 더 높은 확률로 취해질 수 있다.

[0036] 다른 구현예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 경쟁 분자가 거의 또는 전혀 존재하지 않을 때 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하도록 구성되고/거나 나노구조체는 적어도 하나의 경쟁 분자가 더 많은 양으로 존재할 때 적어도 하나의 제2 배열(A)을 취하도록 구성된다.

[0037] 따라서, 나노구조체가 적어도 하나의 경쟁 분자가 거의 또는 전혀 존재하지 않는 환경에 있는 경우, 그러한 나노구조체는 배열 (A)를 가질 가능성이 더 높다. 반대로, 나노구조체가 더 많은 양의 적어도 하나의 경쟁 분자가 존재하는 환경에 있는 경우, 그러한 나노구조체가 배열 (B)를 가질 가능성이 더 높다. 일반적으로, 나노구조체는 각 커플링 부위 또는 커플링 부위 세트의 서브유닛이 각각의 커플링 분자에 결합될 때 제1 배열(A)을 취할 수 있다. 그러나 적어도 하나 또는 다수의 경쟁 분자는 적어도 하나의 커플링 분자의 방출을 유도 및/또는 촉발할 수 있다. 따라서, 나노구조체가 다량의 적어도 하나의 경쟁 분자가 존재하는 환경에 있는 경우, 적어도 하나의 결합 분자가 나노구조체로부터 방출될 가능성이 더 높다. 이러한 경우, 나노구조체는 예를 들어 배열(A)에서 배열(B)로 재구성될 수 있다.

[0038] 본원에 사용된 용어 "경쟁 분자(competing molecule)"는 바람직하게는 항원, 항원 단편 또는 항원 모방체인 분

자를 지칭한다. 대안적으로, 경쟁 분자는 비오틴 분자, 스트렙타비딘 분자, 또는 특정한 다른 분자에 특이적으로 결합하는 임의의 다른 분자일 수 있다. 경쟁 분자는 적어도 하나의 커플링 분자를 결합하기 위해 커플링 부위와 경쟁한다. 경쟁 분자는 예를 들어 체액 샘플, 세포, 유기체 등과 같은 샘플에 존재할 수 있다. 경쟁 분자를 검출하는 것이 본 발명의 한 목적이다.

[0039] 일반적으로, 커플링 부위가 각각의 커플링 분자에 결합되지 않거나, 부분적으로 결합되거나, 모두 결합될 때, 나노구조체가 배열 (A)(예를 들어, 폐쇄된 배열) 및/또는 배열 (B)(예를 들어, 개방된 배열)을 취할 수도 있다는 것이 이해될 것이다.

[0040] 또 다른 바람직한 실시예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것으로서, 나노구조체는 제1 용액에서 적어도 하나의 제1 배열(A)을 취하도록 구성되고, 여기서 제1 용액은 바람직하게는 제2 용액에 비해 더 높은 농도의 마그네슘 이온을 포함하며/또는 포함하거나 나노구조체는 제2 용액에서 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하도록 구성되고, 여기서 제2 용액은 바람직하게는 제1 용액에 비해 더 낮은 농도의 마그네슘 이온을 포함한다.

[0041] 그러나 제1 용액과 제2 용액의 조건은 실험적 및/또는 생물학적 설정에 따라 달라질 수 있음을 이해해야 한다. 통상의 기술자는 제1 용액과 제2 용액의 이상적인 조건을 결정하는 방법을 알고 있다. 예를 들어, 한 실시양태에서, 제1 용액의 마그네슘 이온 농도는 20mM보다 더 높고 / 이거나 제2 용액의 마그네슘 이온 농도는 20mM보다 더 낮다.

[0042] 일부 구현예에서, 나노구조체는 제1 부분과 제2 부분을 포함할 수 있고, 여기서 제1 부분은 제2 부분에 대해 이동 가능할 수 있다. 더욱이, 제1 부분과 제2 부분은 각각 적어도 하나의 커플링 분자에 결합할 수 있는 커플링 부위 세트의 적어도 2개의 커플링 부위 중 하나를 포함할 수 있거나, 제1 부분과 제2 부분은 적어도 하나의 커플링 분자에 결합할 수 있는 적어도 2개의 커플링 부위를 각각 포함할 수 있다. 일부 바람직한 구현예에서, "부분"은 개체일 수 있다.

[0043] 또한, 커플링 부위 세트의 서브세트는 제1 부분에 포함된 적어도 하나의 커플링 부위와 제2 부분에 포함된 적어도 하나의 커플링 부위를 포함할 수 있다. 즉, 각 부분은 적어도 하나의 커플링 부위를 포함할 수 있다. 제1 부분과 제2 부분은 예를 들어 힌지 또는 회전축에 의해 서로 이동 가능하게 부착될 수 있다.

[0044] 일반적으로, 예를 들어 제1 부분과 제2 부분을 포함하는 나노구조체는 나노구조체가 하나의 제1 부분과 하나의 제2 부분만을 포함한다는 의미로 해석되어서는 안 된다는 것이 이해되어야 한다. 대신에, 나노구조체는 또한 하나 이상의 제1 부분과 하나 이상의 제2 부분을 가질 수도 있다. 즉, (명시적으로 언급되지 않거나 통상의 기술자에게 명확하지 않은 경우) 관사(예: "a", "an")의 사용은 복수형을 배제하는 것으로 이해되어서는 안 된다. 예를 들어, 2개의 제1 부분 및/또는 2개의 제2 부분을 포함하는 나노구조체는 "제1 부분 및 제2 부분을 포함하는 나노구조체"에 포함되는 것으로 해석되어야 한다. 일부 구현예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 추가 부분, 즉 세 번째, 네 번째, 다섯 번째, 여섯 번째, 일곱 번째, 여덟 번째, 또는 임의의 다른 개수의 추가 부분을 포함할 수 있다.

[0045] 특히 바람직한 것은 나노구조체는 DNA, RNA, DNA 압타머, RNA 압타머, 또는 펩타이드 핵산(PNA)과 같은 핵산, 폴리펩타이드, 펩타이드, 당단백질, 펩타이드 모방체, 및 항체, 항체 유사 분자, 항원 결합 유도체 또는 이의 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체로 이루어진 그룹으로부터 선택된 적어도 하나의 분자를 포함한다.

[0046] 추가의 바람직한 구현예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 핵산을 포함하며, 여기서 상기 핵산은 적어도 하나의 변형을 포함할 수 있으며, 예를 들어 변형된 뉴클레오시드간 결합, 변형된 핵염기, 또는 예를 들어 2'-O-메톡시-에틸(MOE) 또는 2'-O-메틸(OMe) 변형 같은 2'-O-알킬 변형과 같은 변형된 당 모이어티, 에틸렌 가교 핵산(ENA), 2'-플루오로 N3-P5'-포스포르아미다이트 같은 2'-플루오로 (2'-F) 핵산, 1',5'-안히드로헥시톨 핵산(HNA) 또는 잠금 핵산(LNA)으로부터 선택된 화학적 변형을 포함할 수 있다.

[0047] 또 다른 구현예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 나노구조체는 DNA 오리가미 구조체에 의해 적어도 부분적으로 형성된다. DNA 오리가미 구조체는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥, 즉 바람직하게는 공지된 서열을 갖는 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 스캐폴드 DNA, 및 선택적으로 적어도 하나의 스테이플 가닥을 포함할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 용어 "DNA-오리가미 구조체"는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥 및 복수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 스테이플 가닥을 포함하는 나노구조체를 의미할 것이다. DNA 오리가미 구조체는 자가 조립에 의해 형성될 수 있으며 해당 스캐폴딩 및 스테이플 가닥을 설계하기 위한 사용 가능한 소프트웨어는 DNA 오리가미 제조 기술에 도움이 될 수 있다.

[0048] 본 명세서에 사용된 용어 "스캐폴딩 가닥(scaffolding strand)"은 DNA-오리가미 구조체 및/또는 DNA-오리가미

서브유닛("개체")의 주요 부분을 구성 및/또는 횡단하는 가닥을 의미할 것이다.

[0049] 본 발명에 사용된 용어 "스테이플 가닥(staple strand)"은 스캐폴딩 가닥에 적어도 부분적으로 상보적인 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 분자를 의미한다. 일반적으로, 스테이플 가닥은 예를 들어 커플링 부위를 DNA-오리가미 구조체 및/또는 DNA-오리가미 서브유닛("개체")에 도입하는 데 사용될 수 있다.

[0050] DNA 오리가미 구조체는 복수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 스테이플 가닥을 포함할 수 있으며, 여기서 각 스테이플 가닥은 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥에 적어도 부분적으로 상보적일 수 있다. 또한, 스테이플 가닥 각각은 두 개의 별개의 위치에서 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥에 결합하도록 구성될 수 있으며, 여기서 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥은 원하는 나노구조체가 형성될 수 있도록 접히고/되거나 배열될 수 있다.

[0051] 바람직한 구현예는 본 발명의 나노구조체에 관한 것으로서, 여기서 나노구조체는 DNA 오리가미 구조체에 의해 적어도 부분적으로 형성되며,

[0052] 여기서 상기 DNA 오리가미 구조체는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥을 포함하고;

[0053] 여기서 DNA 오리가미 구조체는 복수의 단일 가닥 올리고뉴클레오티드 스테이플 가닥을 추가로 포함하고 ;

[0054] 여기서 각각의 스테이플 가닥은 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥에 적어도 부분적으로 상보적이며; 그리고

[0055] 여기서, 스테이플 가닥 각각은 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥 중 적어도 하나에 결합하도록 구성되고, 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥은 원하는 나노구조체가 형성되도록 접히고/접히거나 배열된다.

[0056] 추가 구현예에서, 적어도 하나의 커플링 부위는 적어도 하나의 스테이플 가닥에 존재한다.

[0057] 더욱이, 나노구조체가 DNA 오리가미 구조체에 의해 적어도 부분적으로 형성되고 DNA 오리가미 구조체가 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥 및 복수의 스테이플 가닥을 포함하는 구현예에서, 분자는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥 또는 링커 분자에 의한 스테이플 가닥 중 하나에 결합될 수 있으며, 여기서 상기 링커 분자는 적어도 하나의 스캐폴딩 가닥의 일부 또는 스테이플 가닥의 일부에 상보적인 DNA 가닥 부분에 연결될 수 있다.

[0058] 나노구조체가 적어도 하나의 제1 개체와 적어도 하나의 제2 개체를 포함하는 구현예에서, 적어도 하나의 제1 개체와 적어도 하나의 제2 개체는 동일한 모양, 또는 구별 가능한 모양을 포함할 수 있다. 게다가, 모양은 예를 들어 삼각형 모양, 원형 모양, 직육면체, 즉 직사각형 모양, 또는 임의의 다른 모양일 수 있다. 유사하게, 나노구조체가 제1 부분과 제2 부분을 포함하는 구현예에서, 제1 부분과 제2 부분은 동일한 모양, 또는 구별 가능한 모양을 포함할 수 있다. 모양은 예를 들어 삼각형 모양, 둥근 모양, 직육면체, 즉 직사각형 모양, 또는 임의의 다른 모양일 수 있다.

[0059] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 커플링 부위는 분자일 수 있다. 바람직한 실시양태는 본 발명의 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 적어도 하나의 커플링 부위는 분자이다. 특히 바람직한 구현예에서, 적어도 하나의 커플링 부위 및/또는 적어도 하나의 커플링 분자는 항원, 항원 단편, 항원 모방체, 항체, 항체 유사 분자, 항체 모방체, 항원 결합 유도체 또는 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체, DNA 가닥, 비오틴 분자, 스트렙타비딘 분자, 말레이미드-티올 화학 분자, 클릭 화학 분자, SNAP- 태그 단백질, 및 CLIP-태그 분자 등으로 이루어진 그룹에서 선택된 분자이다.

[0060] 특히 바람직한 구현예에서, 커플링 부위는 항원, 항원 단편 및/또는 항원 모방체이다.

[0061] 추가 실시예에서, 커플링 분자는 항체, 항체 유사 분자, 항체 모방체, 항원 결합 유도체 또는 이의 항원 결합 단편과 같은 항원 결합 구조체이다.

[0062] 따라서, 한 바람직한 실시양태에서, 커플링 부위와 커플링 분자 사이의 상호작용은 항체-항원 상호작용의 특이적 결합을 특징으로 한다. 통상의 기술자는 유사한 특정 상호작용을 식별할 수 있으며, 이는 또한 본 발명의 범위 내에 속하게 된다. 예로서, 스트렙타비딘 분자와 비오틴 분자의 특이적 결합도 사용될 수 있다. 예를 들어 커플링 부위는 스트렙타비딘 분자일 수 있고 커플링 분자는 비오틴 분자일 수 있으며, 그 반대일 수도 있다. 그러나 매우 다양한 상호작용이 이러한 나노구조체에서 활용될 수 있으며, 이는 특정하고 제한된 상호작용에 의존하는 기술에 비해 유리할 수 있다. 따라서, 이용 가능한 광범위한 상호작용으로 인해, 선행 기술에 개시된 나노구조체에 비해 더 다양하고 유연한 조건부 전환 가능한 나노구조체가 제공된다.

[0063] 또한, 바람직하게는 커플링 분자가 IgG 항체, IgG 항체 단편, IgG 항체 모방체, IgM 항체, IgM 항체 단편, IgM 항체 모방체, IgD 항체, IgD 항체 단편, IgD 항체 모방체, IgA 항체, IgA 항체 단편, IgA 항체 모방체, IgE 항

체, IgE 항체 단편 또는 IgE 항체 모방체이며, 바람직하게는 상기 항체, 항체 단편 또는 항체 모방체는 2개의 동일한 항원 결합 부위를 포함하고, 더욱 바람직하게는 상기 항원 결합 부위는 커플링 부위 세트의 상기 적어도 2개의 커플링 부위에 결합한다.

[0064] 또 다른 특히 바람직한 구현예는 상기 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 1개의 IgG 항체, 1개의 IgG 항체 단편, 1개의 IgG 항체 모방체, 1개의 IgM 항체, 1개의 IgM 항체 단편, 1개의 IgM 항체 모방체, 1개의 IgD 항체, 1개의 IgD 항체 단편, 1개의 IgD 항체 단편, IgD 항체 모방체, 1개의 IgA 항체, 1개의 IgA 항체 단편, 1개의 IgA 항체 모방체, 1개의 IgE 항체, 1개의 IgE 항체 단편 또는 1개의 IgE 항체 모방체는 1개의 커플링 부위 세트에 결합한다.

[0065] 본 발명의 나노구조체는 임의의 길이를 가질 수 있다. 바람직한 구현예에서, 나노구조체는 최대 길이를 포함하고, 특히 바람직한 실시 형태에서, 최대 길이는 1000 nm 미만, 바람직하게는 500 nm 미만, 예를 들어 약 100 nm 또는 그 이하이다.

[0066] 본 발명의 추가 측면은 본 발명에 따른 나노구조체를 포함하는 시스템에 관한 것이며, 여기서 시스템은

[0067] (i) 적어도 2개의 커플링 부위를 포함하는 적어도 하나의 나노구조체, 및

[0068] (ii) 적어도 하나의 커플링 분자를 포함하며,

[0069] 여기서, 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 적어도 하나의 커플링 분자에 결합할 수 있고, 여기서 상기 적어도 2개의 커플링 부위는 커플링 부위 세트가 되도록 구성된다.

[0070] "시스템"이라는 용어는 적어도 하나의 DNA-오리가미 구조체("나노구조체")와 적어도 하나의 커플링 분자를 포함하는 구조체를 의미한다. 그러나 일부 실시예에서 시스템은 복수의 커플링 분자를 포함할 수 있다.

[0071] 바람직한 실시양태에서, 시스템은 다음을 포함한다:

[0072] (i) 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체를 포함하는 적어도 하나의 나노구조체,

[0073] 여기서 적어도 하나의 제1 개체 및 적어도 하나의 제2 개체 각각은 적어도 하나의 커플링 부위 세트 중 적어도 하나의 커플링 부위를 포함하고, 바람직하게는 적어도 하나의 제1 개체 상의 적어도 하나의 커플링 부위와 적어도 하나의 제2 개체 상의 적어도 하나의 커플링 부위는 개체들의 대칭 위치에 위치하며, 및

[0074] (ii) 적어도 하나의 커플링 분자, 바람직하게는 복수의 커플링 분자를 포함하며,

[0075] 여기서, 적어도 하나의 커플링 분자는 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 나노구조체의 적어도 하나의 제1 개체를 나노구조체의 적어도 하나의 제2 개체에 커플링하도록 구성된다.

[0076] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 결합될 수 있는 본 발명의 또 다른 측면은 본 발명의 나노구조체의 서로 다른 배열 사이를 조건부로 전환하여 나노구조체의 형태적 재구성으로 적어도 하나의 분자의 식별을 연결할 수 있는 방법에 관한 것이다. 후자는 특정 구현예에서 본 발명의 나노구조체 내의 공동 및/또는 구멍에 포함될 수 있는 치료 및/또는 피전달체 분자의 방출을 허용할 수 있다. 따라서, 이 방법은 특정 분자의 식별 시 나노구조체가 분자를 특이적으로 방출하도록 허용할 수 있다.

[0077] 즉, 본 발명은 나노구조체에 포함된 적어도 커플링 부위 세트의 일부의 결합에 따라 서로 다른 배열을 취할 수 있는 조건부 전환 가능한 나노구조체에 관한 것이며, 여기서 치료 및/또는 피전달체 분자의 접근성은 나노구조체가 취하는 배열에 따라 변경된다. 예를 들어, 치료 및/또는 피전달체 분자는 한 배열에서 다른 배열보다 훨씬 더 쉽게 접근할 수 있으며, 어떤 경우에는 두 배열 중 하나에서만 접근될 수도 있다. 이는 커플링 부위 세트 중 적어도 커플링 부위의 서브세트의 커플링에 따라 조절된 치료 및/또는 피전달체 분자에 대한 접근을 가능하게 할 수 있다. 이는 각각의 경쟁 분자의 적어도 서브세트의 존재 또는 부재에 기초하여 치료 및/또는 피전달체 분자와 같은 분자의 방출을 제어할 수 있으므로 유리할 수 있다.

[0078] 용어 "분자의 식별(identification of a molecule)"은 예를 들어, 항원, 종양 세포와 같은 질병 세포 등과 같은 것의 식별에 관련된 것이다. 상기 식별은 *생체 내*, *생체 외* 또는 *시험관 내에서* 발생할 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 식별은 포유동물, 바람직하게는 인간과 같은 유기체의 생체내에서 일어난다. 다른 실시양태에서, 식별은 예를 들어 포유동물, 바람직하게는 인간과 같은 유기체로부터 얻은 샘플에서 *시험관 내에서* 일어난다. 나노구조체는 바람직하게는 경쟁 분자와 같은 특정 분자를 식별할 때 다른 배열을 취하여 경쟁 분자와 같은 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결시킨다. 또한, 본 발명의 범위에는 경쟁 분자와 같은 특정 분자

의 특정 역치보다 더 높거나 그에 상응하는 경쟁 분자와 같은 특정 분자의 양을 확인하여 나노구조체의 형태적 재구성을 유도할 필요성이 더 포함된다.

[0079] "형태적 재구성"이라는 용어는 하나의 배열에서 다른 배열로의 재구성, 예를 들어 배열(A)에서 배열(B)으로의 재구성을 의미한다. 나노구조체는 바람직하게는 적어도 하나의 경쟁 분자가 적어도 하나의 커플링 분자와 경쟁하고, 적어도 하나의 커플링 분자가 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합하지 않는 경우 배열 (B)를 취한다. 형태적 재구성 시, 나노구조체의 중공 내부 부분 내에 포함된 치료 분자 및/또는 피전달체 분자와 같은 분자가 방출 및/또는 활성화될 수 있다.

[0080] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 조합될 수 있는 본 발명의 바람직한 측면은 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법에 관한 것이며, 여기서 방법은 다음으로 구성된다:

[0081] (i) 본 발명에 따른 나노구조체를 제공하는 단계;

[0082] (ii) 적어도 하나의 커플링 분자를 제공하는 단계로,

[0083] 여기서 나노구조체는 (ii)에 제공된 적어도 하나의 커플링 분자가 (i)에 제공된 나노구조체의 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합할 때 적어도 하나의 제1 배열(A)를 취하고, 및

[0084] (iii) 적어도 하나의 분자를 식별하는 단계로,

[0085] 여기서 상기 적어도 하나의 분자는 바람직하게는 경쟁 분자이고,

[0086] 여기서 나노구조체는 적어도 하나의 분자를 식별할 때 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하고,

[0087] 이로써 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 것이 가능하도록 한다.

[0088] 본 발명의 설명 및 첨부된 청구항에서 방법 단계가 언급될 때마다, 본 텍스트에서 단계가 언급되는 순서는 우연일 수 있다는 점에 유의해야 한다. 즉, 달리 명시되지 않거나 당업자에게 명확하지 않은 한, 단계가 언급되는 순서도 다를 수 있다. 예를 들어, 본 문서에서 방법이 단계 (A)와 (B)를 포함한다고 명시하는 경우 이는 반드시 단계 (A)가 단계 (B)보다 선행한다는 의미는 아니지만 단계 (A)가 단계 (B)와 동시에 (적어도 부분적으로) 수행되거나 단계 (B)가 단계 (A)보다 먼저 수행될 수도 있다. 또한, 단계 (X)가 다른 단계 (Z)보다 선행한다고 해서 단계 (X)와 (Z) 사이에 단계가 없다는 의미는 아니다. 즉, (Z) 단계 이전의 (X) 단계는 (Z) 단계 직전에 (X) 단계가 수행되는 상황을 포함할 수 있을 뿐만 아니라, 단계 (X)는 하나 이상의 단계, 예를 들어 (Y1), (Y2), (Y3) 전에 수행되고, 이어서 단계 (Z)가 수행되는 상황을 포함할 수 있다. "이후" 또는 "이전"과 같은 용어가 사용되는 경우 해당 고려 사항이 적용된다.

[0089] 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법의 바람직한 실시예에서, 나노구조체는 적어도 하나의 제1 배열(A)에서 분자 또는 제2 나노구조체를 둘러싸고, 바람직하게는 여기서 상기 분자는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자로부터 선택된다.

[0090] 나노구조체가 예를 들어 제1 배열(A)일 때, 나노구조체의 다른 개체들이 챔버 및/또는 공동을 형성하도록 구성될 수 있다. 또한, 치료 분자 및/또는 피전달체 분자는 예를 들어 막대(rod)에 의해, 직접 또는 간접적인 회합에 의해, 또는 입체적 수단에 의해 나노구조체의 다양한 개체들의 내부 표면에 부착될 수 있다. 치료 분자 및/또는 피전달체 분자는 나노구조체가 제2 배열(B)에 있을 때 챔버 및/또는 공동을 떠나도록 구성될 수 있다. 방법은 커플링 부위를 동일한 커플링 분자에 커플링시키는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 방법은 커플링 부위를 별개의 커플링 분자에 커플링시키는 것을 포함할 수 있다.

[0091] 또한, 나노구조체가 적어도 하나의 제2 배열 (B)을 취할 때 분자 또는 제2 나노구조체, 바람직하게는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자로부터 선택된 분자는 나노구조체의 형태적 재구성 시 방출 및/또는 활성화되는 것이 바람직하다.

[0092] 따라서, 나노구조체의 커플링 부위에 대한 커플링 분자의 결합에 따라, 간단히 말하면, 나노구조체는 서로 다른 상태 사이에서 전환될 수 있다. 이것은 다양한 적용이 가능하도록 한다. 특히, 이러한 나노구조체는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자를 운반하는 데 사용될 수 있다. 이는 예를 들어 특정 세포 유형 및/또는 분자의 식별 시 치료 및/또는 피전달체 분자의 제어 방출에 사용될 수 있다. 따라서, 치료 분자 및/또는 피전달체 분자는 나노구조체의 한 배열에서는 접근 가능하지만 다른 배열에서는 접근할 수 없으며, 배열은 특정 세포 유형 및/또는 분자의 존재 또는 부재에 따라 달라질 수 있다. 이는 치료 분자 및/또는 피전달체 분자에 대한 접근성이 특정

세포 유형 및/또는 분자의 존재 또는 부재에 따라 조절되어야 하는 응용 분야, 바람직하게는 본 발명의 나노구조체의 형태적 재구성에 의해 달성되는 응용 분야에 특히 유익할 수 있다.

[0093] 나노구조체가 예를 들어 제1 배열(A) 일 때 나노구조체의 다른 개체들은 챔버 및/또는 홀을 형성하도록 구성된 공동을 각각 포함할 수 있다. 또한, 치료 분자 및/또는 피전달체 분자는 예를 들어 막대에 의해, 직접 또는 간접적인 결합에 의해, 또는 입체적 수단에 의해 나노구조체의 다양한 개체의 내부 표면에 부착될 수 있으며, 여기서 치료 분자 및/또는 피전달체 분자는 나노구조체가 제2 배열(B)에 있을 때 공동을 떠나도록 구성될 수 있다. 통상의 기술자는 막대는 개체와 적어도 하나의 치료 및/또는 피전달체 분자 사이의 임의 유형의 유연한 링크일 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0094] 바람직한 실시양태에서, 방법은 *생체내*, *생체외*, *시험관내* 또는 *현장내* 방법이다.

[0095] 추가 실시예는 적어도 하나의 분자의 식별을 나노구조체의 형태적 재구성에 연결하는 방법에 관한 것이며, 여기서 나노구조체는 적어도 하나의 분자가 적어도 하나의 분자와 경쟁할 때 적어도 하나의 제2 배열(B)을 취하며, 적어도 하나의 커플링 분자는 적어도 하나의 커플링 부위 세트에 결합하지 않으며, 바람직하게는 여기서 용액의 마그네슘 이온 농도가 20mM 미만이다.

[0096] 추가 측면에서, 본 발명은 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 복수개의 나노구조체 또는 시스템을 포함하는 물질에 관한 것이다.

[0097] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 정의된 바와 같은 본 발명에 따른 하나 또는 복수개의 나노구조체를 포함하거나 시스템을 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0098] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 본 발명의 측면과 결합될 수 있는 본 발명의 추가 측면은 약제로 사용하기 위에 정의된 바와 같은 적어도 하나 또는 복수개의 나노구조체 또는 시스템을 포함하는 물질에 관한 것이다.

[0099] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 조합될 수 있는 본 발명의 또 다른 측면은 약제로 사용하기 위한, 상기 정의되어진 본 발명에 따른 적어도 하나의 또는 복수개의 나노구조체를 포함하는 조성물, 또는 시스템에 관한 것이다.

[0100] 약제로서 사용하기 위한 물질 및/또는 조성물은 본 발명의 나노구조체가 표적 약물 전달과 같은 질병의 표적 치료를 가능하게 할 수 있으므로 유리할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 실시양태에 따른 나노구조체(들)는 나노구조체 내에 포함된 치료 및/또는 피전달체 분자와 같은 성분, 예를 들어 약물과 같은 물질의 방출을 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 그러한 방출은 정의된 위치 및/또는 시간 및/또는 정의된 조건 하에서 표적 방출 또는 제어 방출이다.

[0101] 상기 정의된 본 발명에 따른 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하거나 시스템을 포함하는 물질은 암과 같은 증식성 질환의 예방 및/또는 치료에, 면역학적 장애의 예방 및/또는 치료에, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 같은 바이러스성 질환의 예방 및/또는 치료에, 혈액 응고 장애의 예방 및/또는 치료에, 대사 장애의 예방 및/또는 치료에, 감염성 장애의 예방 및/또는 치료에, 및/또는 당뇨병의 예방 및/또는 치료에 사용을 위한 것일 수 있다.

[0102] 본 발명의 추가로 바람직한 측면에서, 상기 정의된 본 발명에 따른 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하거나 상기 정의된 시스템을 포함하는 조성물 은 다음과 같은 암과 같은 증식성 질환의 예방 및/또는 치료에, 면역학적 장애의 예방 및/또는 치료에, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 같은 바이러스성 질환의 예방 및/또는 치료에, 혈액 응고 장애의 예방 및/또는 치료에, 대사 장애의 예방 및/또는 치료에, 감염성 장애의 예방 및/또는 치료에, 및/또는 당뇨병의 예방 및/또는 치료에 사용을 위한 것일 수 있다.

[0103] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 결합될 수 있는 본 발명의 추가 측면은 진단 방법에 사용을 위한, 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 물질, 또는 위에 정의된 시스템에 관한 것이다.

[0104] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 조합될 수 있는 본 발명의 또 다른 측면은 진단 방법에 사용을 위한, 본 발명에 따른 적어도 하나 또는 복수의 나노구조체를 포함하는 조성물 또는 상기 정의된 시스템에 관한 것이다.

[0105] 본 발명의 임의의 다른 바람직한 실시양태 및/또는 측면과 조합될 수 있는 본 발명의 다른 측면은 상기 정의된 바와 같은 나노구조체에 대한 코딩 서열, 스캐폴딩 가닥 및/또는 스테이플 가닥의 서열을 포함하고/포함하거나

나노구조체의 서열을 포함하는 벡터, 특히 발현 벡터에 관한 것이다.

[0106] "벡터"는 숙주 세포에서 핵산을 전달하거나 유지할 수 있는 임의의 성분일 수 있으며, 예를 들어 플라스미드(예: DNA 플라스미드), 네이키드 핵산, 바이러스 벡터, 바이러스, 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 다른 분자와 복합체를 형성한 핵산, 뿐만 아니라 고체상 입자에 고정된 핵산을 포함하지만 이에 국한되지는 않는다. 벡터에 대해서는 아래에서 자세히 설명한다. 벡터는 외인성 유전자 및/또는 단백질을 숙주 세포에 전달하거나 유지하기 위한 성분으로서 유용할 수 있다. 벡터는 세포를 형질도입, 형질감염 또는 형질전환시켜 세포가 세포 고유의 핵산 및/또는 단백질이 아닌 다른 핵산 및/또는 단백질을 또는 세포 고유가 아닌 방식으로 복제하거나 발현하도록 할 수 있다. 표적 세포는 세포 배양 조건하에 유지되거나 다른 생체내 실시 양태에서 살아있는 유기체의 일부인 세포일 수 있다. 벡터에는 바이러스 입자, 리포솜, 단백질 코팅 등과 같이 핵산이 세포 내로 유입되는 데 도움이 되는 물질이 포함될 수 있다. 핵산을 세포 내로 전달하는 모든 방법이 사용될 수 있다. 달리 명시하지 않는 한, 벡터라는 용어는 핵산을 세포 내로 전달하는 특정 방법을 의미하지 않으며 특정 세포 유형이 형질도입의 대상임을 의미하지 않는다. 본 발명은 예를 들어 본 발명의 나노구조체를 코딩하는 핵산을 포함하여 본 발명의 임의의 핵산의 전달 또는 유지를 위한 임의의 특정 벡터에 제한되지 않는다.

[0107] "발현 벡터"라는 용어는 RNA를 전사하도록 설계된 임의의 이중 가닥 DNA 또는 이중 가닥 RNA, 예를 들어 하류 유전자 또는 관심 코딩 영역(예: cDNA 또는 단백질 또는 관심 있는 RNA를 코딩하는 게놈 DNA 단편)에 작동가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함하는 구조체(construct)을 의미한다. 수용 세포내로 발현 구조체의 형질감염 또는 형질전환은 상기 세포가 발현 구조체에 의해 암호화된 RNA 또는 단백질을 발현하도록 한다. 발현 구조체은 예를 들어 박테리오파지, 아데노바이러스, 레트로바이러스, 폭스바이러스 또는 헤르페스바이러스로부터 유래된 유전적으로 조작된 플라스미드, 바이러스 또는 인공 크로모좀이거나 하기 "발현 벡터" 하에 기술된 추가 실시양태일 수 있다. 발현 구조체는 살아있는 세포에서 복제될 수 있거나 합성적으로 만들어질 수 있다. 본 출원의 목적을 위해, 용어 "발현 구조체", "발현 벡터", "벡터" 및 "플라스미드"는 일반적이고 예시적인 의미에서 본 발명의 적용을 입증하기 위해 상호교환적으로 사용되며, 특정 유형의 발현 구조체로 본 발명을 제한하려는 의도는 아니다. 또한, 발현 구조체 또는 벡터라는 용어는 분석에 사용된 세포가 이미 내생적으로 이러한 DNA 서열을 포함하는 경우도 포함하도록 의도된다. 발현 벡터는 바람직하게는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다.

[0108] 용어 "인코딩" 또는 더 간단히 "코딩"은 하나 이상의 아미노산을 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 능력을 의미한다. 이 용어에는 시작 또는 정지 코돈이 필요하지 않다. 아미노산 서열은 폴리뉴클레오티드 서열 및 그 상보체에 의해 제공되는 6개의 서로 다른 판독 프레임 중 어느 하나로 인코딩될 수 있다. 아미노산 서열은 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA), 또는 DNA나 RNA와 유사한 인공 합성 폴리머에 의해 인코딩될 수 있다.

[0109] 상기 정의된 바와 같은 나노구조체 및/또는 벡터를 포함하는 재조합 세포가 또한 제공된다. 때때로 "숙주 세포"라고도 불리는 "재조합 세포"는 핵산으로 형질전환되기 쉬운 모든 세포이다. 바람직하게는, 본 발명의 재조합 세포 또는 숙주 세포는 식물 세포, 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 인간 세포와 같은 포유동물 세포이다. 바람직한 재조합 세포는 본 발명의 나노구조체의 재조합 발현에 적합한 세포로부터 선택된다.

[0110] 본 발명의 또 다른 측면은 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제와 함께 상기 정의된 나노구조체, 시스템, 조성물, 물질, 벡터 및/또는 숙주 세포를 포함하는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0111] 본 발명의 약학적 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제형화되어야 한다. 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 약제 및/또는 화합물의 투여 경로의 예에는 정맥내, 질내, 경구, 비강내, 척수강내, 동맥내, 피내, 피하, 경피(국소), 뇌 실내, 실질 내, 종양 내, 경점막, 직장, 기관지, 비경구 투여, 및 약제 및/또는 화합물의 투여를 위한 임의의 기타 임상적으로/의학적으로 허용되는 방법 등이 포함된다.

[0112] 본 발명의 임의의 다른 측면 또는 특정 실시양태와 조합될 수 있는, 본 발명의 다른 측면은 암과 같은 증식성 질환, 면역학적 장애, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 같은 바이러스성 질환, 혈액 응고 장애, 대사 장애, 감염성 장애, 및/또는 당뇨병의 예방 및/또는 치료 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 치료적으로 유효한 양의 나노구조체, 시스템, 화합물, 물질, 및/또는 약학적 조성물의 치료적으로 유효한 양을 개체에 투여하는 단계를 포함한다.

[0113] "치료적으로 유효한 양"이 되기 위해 필요한 양을 계산하기 위해, 통상의 기술자 및/또는 의사는 세포 배양 분석 및 동물 연구에서 얻은 데이터를 사용하여 인간에게 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화할 수 있다. 이러한 화합물 및/또는 약학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED50을 포함하는 순환 농

도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 사용된 투여 경로에 따라 이 범위 내에서 달라질 수 있다. 사용된 모든 화합물에 대해 치료적으로 유효한 용량은 처음에는 세포 배양 분석을 통해 추정할 수 있다. 용량은 세포 배양에서 측정된 IC50(즉, 증상의 최대 억제율의 절반을 달성하는 시험 화합물의 농도)을 포함하는 순환 혈장 농도 범위를 달성하기 위해 동물 모델에서 제형화될 수 있다. 이러한 정보는 인간에게 유용한 용량을 보다 정확하게 결정하는 데 사용될 수 있다. 약학적 조성물은 투여 지침과 함께 용기, 팩 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0114] 본 발명은 추가로 암과 같은 증식성 질환, 면역학적 장애, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 감염과 같은 바이러스성 질환, 혈액 응고 장애, 대사 장애, 감염성 장애, 및/또는 당뇨병의 예방 및/또는 치료를 위한 약제의 제조에 사용을 위한 본 발명에 따른 나노구조체, 시스템, 화합물, 물질 및/또는 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0115] 여기에 사용된 "[본] 발명의", "본 발명에 따라서", "본 발명에 따른" 등의 용어는 본 명세서에 기재 및/또는 청구된 본 발명의 모든 측면 및 실시양태를 지칭하도록 의도된다.

[0116] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "포함하는"이라는 용어는 "포함하는" 및 "이루어진"을 모두 포괄하는 것으로 해석되어야 하며, 두 의미 모두 명확하게 의도된 것이며, 따라서 본 발명에 따라 개별적으로 개시된 실시양태이다. 본 명세서에서 사용된 "및/또는"은 서로의 유무에 관계없이 두 개의 지정된 특징 또는 구성요소 각각의 구체적인 개시로 간주된다. 예를 들어, "A 및/또는 B"는 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각에 대한 구체적인 개시로 간주되며, 마치 각각이 본 문서에 개별적으로 설명되어 있는 것과 같다. 본 발명의 맥락에서, "약" 및 "대략"이라는 용어는 의심스러운 해당 특징의 기술적 효과를 여전히 보장하기 위해 통상의 기술자가 이해할 정확도의 간격을 의미한다. 이 용어는 일반적으로 표시된 숫자 값과의 편차를 ±20%, ±15%, ±10%, 예를 들어 ±5%로 나타낸다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 주어진 기술적 효과에 대한 수치의 구체적인 편차는 기술적 효과의 성격에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 자연적 또는 생물학적 기술적 효과는 일반적으로 인공적 또는 공학적 기술적 효과보다 그러한 편차가 더 클 수 있다. 통상의 기술자가 이해하는 바와 같이, 주어진 기술적 효과에 대한 수치의 구체적인 편차는 기술적 효과의 성격에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 자연적 또는 생물학적 기술적 효과는 일반적으로 인공적 또는 공학적 기술적 효과보다 그러한 편차가 더 클 수 있습니다. 단수 명사(예: "a", "an" 또는 "the")를 지칭할 때 부정관사 또는 정관사를 사용하는 경우, 달리 명시하지 않는 한 해당 명사의 복수형도 포함된다.

[0117] 본 명세서에서 모든 수치 값은 명시적으로 표시되었는지 여부에 관계없이 용어 "약"에 의해 수정되는 것으로 가정된다. "약"이라는 용어는 일반적으로 통상의 기술자가 인용된 값과 동등하다고 간주하는(즉, 동일한 기능 또는 결과를 갖는) 숫자의 범위를 의미한다. 많은 경우, "약"이라는 용어에는 가장 가까운 유효 숫자로 반올림된 숫자가 포함될 수 있다. 본 발명의 특히 바람직한 실시양태에서, 용어 "약"은 수치 값의 최대 20%의 각각의 수치 값의 편차를 의미할 수 있지만, 더욱 바람직하게는 15%, 10%, 5%, 더욱 바람직하게는 4%, 3%, 2%이고, 가장 바람직하게는 1%를 의미할 수 있다. 다만, 본 명세서에서 "약", "실질적으로", "대략" 등 상대적인 용어가 사용될 경우, 해당 용어는 정확한 용어도 포함하는 것으로 해석되어야 한다. 즉, 예를 들어 "실질적으로 하나"는 "(정확히) 하나"도 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0118] 특정 문제에 본 발명의 교시를 적용하고, 본 발명의 변형 또는 이에 대한 추가 특징(추가 측면 및 실시양태 등)을 포함하는 것은 여기에 포함된 교시에 비추어 본 기술 분야의 숙련된 기술을 갖고 있는 통상의 기술자의 능력 내에 있을 것이라는 점을 이해해야 한다. 문맥상 달리 지시하지 않는 한, 위에서 설명한 특징의 설명 및 정의는 본 발명의 임의의 특정 측면 또는 실시양태에 제한되지 않으며 기술된 모든 측면 및 실시예에 동일하게 적용된다.

[0119] 본 명세서에 인용된 모든 참고문헌, 특허 및 간행물은 그 전체가 참고로 포함된다.

[0120] 실시예

[0121] 이제 본 발명의 특정 측면 및 실시양태가 실시예로서 그리고 여기에 제시된 설명, 도면 및 표를 참조하여 예시될 것이다. 본 발명의 방법, 용도 및 다른 측면에 대한 이러한 실시예들은 단지 대표적인 것일 뿐이며, 본 발명의 범위를 그러한 대표적인 예로만 제한하는 것으로 간주되어서는 안 된다.

[0122] 실시예들은 다음을 보여준다.

[0123] **실시예 1: 정이십면체 DNA 오리가미 쉘의 IgG 매개 안정화 및 항원으로 유발된 분해 및 제제의 항원 유발 방출**

[0124] 본 발명은 DNA 오리가미 나노입자의 항원 유발 로직 게이트 재구성을 위한 일반적인 전략을 기반으로 한다. 본

발명 기술의 디자인 원리는 본질적으로 모듈식이며 두 개 또는 그 이상의 배열 상태를 채택할 수 있는 임의의 동적 DNA 오리가미 시스템에 적용될 수 있다.

[0125] 도 1은 본 명세서에 사용된 표기법을 예시하기 위해 본 기술의 일부 실시양태에 사용되는 구성요소를 도시한다. 보다 구체적으로, 도 1은 폐쇄형 배열(A) 및 개방형 배열(B)으로도 지칭될 수 있는 서로 다른 배열(A) 및 (B)를 취할 수 있는 나노구조체를 도시한다. 도 1에 도시된 바와 같은 3차원 나노구조체는 DNA 오리가미를 사용하여, 즉 스캐폴딩 가닥과 스테이플 가닥을 결합하여 필요한 부분과 전체 장치를 형성함으로써 실현될 수 있다. 이러한 디자인은 예를 들어 caDNAno 와 같은 소프트웨어를 사용하여 수행될 수 있다. 즉, 다수의 개체를 포함하는 나노구조체는 일부 실시양태에서 하나의 스캐폴딩 가닥으로 만들어질 수 있는 반면, 다른 실시양태에서는 나노구조체의 개체는 복수의 스캐폴딩 가닥을 이용하여 구성될 수 있다.

[0126] 나노구조체는 바람직하게는 커플링 부위 세트의 커플링 부위 각각 또는 적어도 서브셋이 각각의 커플링 분자에 의해 커플링될 때 제1 배열(A)을 취하는 것으로 구성되고, 커플링 부위의 서브셋이 전혀 없거나, 감소된 양의 커플링 부위의 서브셋이 각각의 커플링 분자에 의해 커플링될 때 제2 배열(B)을 취하도록 구성된다.

[0127] 도 1에 도시된 실시양태에서, 커플링 부위는 동일한 배열, 즉 동일한 디자인의 커플링 분자에 커플링하도록 구성되고, 나노구조체는 2가 특성, 즉 한 가지 유형의 커플링 부위를 갖는 나노구조체이다. 그러나 위에서 이미 언급했듯이 이는 반드시 필요한 것은 아니다. 본 발명의 일부 실시양태에서, 커플링 부위는 별개의 커플링 분자에 결합할 수 있다. 후자는 다가 나노구조체, 즉 복수의 서로 다른 커플링 부위를 갖는 구조를 말한다.

[0128] 도 1에 묘사된 제안된 메커니즘은 두 가지 디자인 원리를 기반으로 한다. 첫째, 본 발명자들은 2개의 동일한 항원 결합 부위를 2가로 표시하는 고도로 보존된 IgG 항체 구조를 사용했다. 이 2가 특성을 활용하여 항체는 DNA 오리가미 서브유닛에 전략적으로 위치한 항원(- 단편)에 의해 제어되는 미리 정의된 배열로 DNA 오리가미 나노입자를 잠그는 분자 다리로 사용된다. 둘째, "스프링이 장착된(spring-loaded)" 나노입자의 항원-유발 활성화 또는 재구성은 나노입자로부터 "항체 가교(antibody bridges)"를 대체하는 가용성 항원의 존재에 의해 시작된다.

[0129] 도 1의 실시예에서, 배열(A)는 폐쇄형 배열이다("케이지"-유사 구조와 같은, 예를 들어, 이 특정 실시양태에서, 20개의 동일한 DNA-오리가미 서브유닛(삼각형)은 정이십면체 DNA 오리가미 쉘을 형성하여 조립된 캡시드-유사 구조이다). 배열(B)는 DNA 오리가미 서브유닛(삼각형)가 항체 브리지를 통해 결합되지 않는 개방형 배열이다. 따라서 단일 삼각형은 배열(B)의 음성 염색 TEM 영상에서 볼 수 있다.

[0130] 원리 증명으로서, 도 1은 20개의 동일한 다층 DNA 오리가미 삼각형으로 자체 조립된 T=1 캡시드 유사 구조(정이십면체 DNA 오리가미 쉘)의 항체 매개 스프링 장착 및 후속 항원 유발 분해를 보여준다 (도 1). 항체 결합을 제어하기 위해 화학적으로 변형된 스테이플 올리고뉴클레오티드를 통해 "커플링 부위"(항원 단편, 예: 디곡시게닌 리간드)가 각 삼각형 측면의 대칭 위치에 도입된다. 정이십면체 쉘(T=1 캡시드)의 자가 조립 후, 쉘 선호 완충 조건([Mg2+] > 20mM) 에서 삼각형 경계면의 형태 상보적 오목부 및 돌출부의 활성화에 의해 제어되는 항-디곡시게닌 항체가 각 개별 삼각형 서브유닛을 교차연결하기 위해 첨가된다. 적층 접점을 비활성화하기 위한 Mg2+ 농도의 후속 감소로 인해 캡시드 어셈블리의 스프링 장착이 가해진다. 마지막으로 보조 항원("경쟁 항원", 예를 들어 수용성 디곡시게닌 항원)을 추가하면 DNA 오리가미에 장착된 항원에서 항체를 제거하는 경쟁 반응에 의해 캡시드 분해가 유발된다(도 1). 정이십면체 쉘의 항원에 의한 분해는 특정 항원 역치(EC50 ~ 1 μM)에서 발생하며, 이는 서브유닛 경계면당 탑재된 항체의 수에 따라 달라진다. 이 개념은 항체의 특정 조합을 설치하거나, 정교한 분자 로직 연산을 생성하거나, 용량-반응 곡선을 조정함으로써 더 자세히 탐구될 수 있다.

[0131] 도 1의 실시양태는 원리 증명으로 여러 구성 요소에서 자체 조립된 입자를 기반으로 하지만, 동일한 개념이 구조나 스위치와 같은 박스 같은 단분자 물체를 작동하는 데 적용될 수 있으며, 분자 진단, 로직-게이트 치료법 또는 약물 전달 수단을 포함한 분야에 적용될 수 있지만 이에 국한되지는 않는다. 마지막으로, 예를 들어 IgG 항체의 고도로 보존된 2가 특성과 사실상 모든 분자 표적에 대한 항체 생성의 용이성을 고려하면, 본 발명은 다양한 항원, 소분자, 펩타이드 및 단백질을 식별하는 데 사용될 수 있다.

[0132] 항원-항체 인식 요소와 DNA 나노구조체를 연결하는 현재 모듈과 달리 도 1에 표시된 나노구조체의 모든 인식 요소는 여러 구성 요소의 확산 상호 작용에 의존하기보다는 나노구조체 자체에 통합된다. 이로 인해 발명자의 개념은 희석 효과에 덜 민감해지며, 이는 잠재적인 미래 생물 의학 응용 분야에 중요한 요구 사항이다. 중요한 것은, 발명자의 디자인 원리가 형상 상보적 적층 접점에 의해 자체 조립이 매개되는 다중 구성 요소 시스템에 제한되지 않는다는 것이다. 온도 또는 가닥 변위 의존성 상보적 점성 말단, pH 의존성 삼중체 또는 i- 모티프와

같은 다른 전략은 본 발명의 나노구조체의 직접적인 자가 조립 및 항체 강화 인터페이스에 의한 구조의 후속 스프링 장착을 구상할 수 있으며, 이는 또한 본 발명의 범위 내에 있다.

[0133] 도 1의 메커니즘의 구체적인 예시와 나노구조체로부터 물질/개체의 방출을 위한 이의 예시적인 사용은 바이러스 페이로드의 항원에 의해 유발되는 방출을 보여주는 도 4에 도시되어 있다. (a) B형 간염 바이러스 코어 캡시드가 있는 삼각형 서브셋의 기능화를 보여주는 (왼쪽에서 오른쪽으로) 도식으로, 여기서 HBV 입자의 결합은 삼각형의 쉘 안쪽을 향한 표면에서 특정 항체에 의해; 루멘에 HBV 코어 캡시드가 있는 완전한 쉘의 조립에 의해; 항-Dig IgG 항체 및 이온 강도 감소에 의한 스프링 장착에 의한 스테이플링에 의해; 가용성 디곡시게닌 항원을 첨가하여 항원에 의해 유발되는 쉘 파열 및 바이러스 페이로드의 방출에 의해 매개된다. 쉘 내부에 위치한 HBV 결합 항체가 쉘에서 분리되어 HBV 입자가 쉘에 자유롭게 떠다니는 중간 단계는 표시되지 않는다. (b, c, d) 각각은, 바이러스 페이로드의 방출을 유도하는, 바이러스 페이로드의 존재 하에서 40mM $MgCl_2$에서 조립된 쉘, 스프링 장착 조건(12mM $MgCl_2$)에서 바이러스 페이로드로 포장된 항-Dig 스테이플 쉘, 가용성 디곡시게닌 항원을 추가하여 분해된 쉘의 음성 염색 TEM 이미지. (b, c)의 스케일 바는 50nm 및 (d)는 100nm.

[0134] **실시예 2: 정이십면체 쉘의 항원 유발 분해의 구조적 특성**

[0135] Mg2+ 의존성 IgG 매개 쉘 안정화를 구조적으로 특성화하고 평가하기 위해 발명자들은 Cryo-EM 및 레이저 스캐닝 형광 현미경을 수행했다. 25mM $MgCl_2$ 에서 삼각형-삼각형 경계면을 교차 결합하는 항-디곡시게닌 항체를 사용하여 독립된 얼음 내 정이십면체 쉘의 예시적인 Cryo-EM 현미경 사진은 도 2(a), 상단에 나타냈다. 각 삼각형-삼각형 경계면을 연결하는 두 개의 항-디곡시게닌 항체를 사용하여 조립된 정이십면체 쉘의 Cryo-EM 재구성은 도 2(a) 하단에 나와 있다.

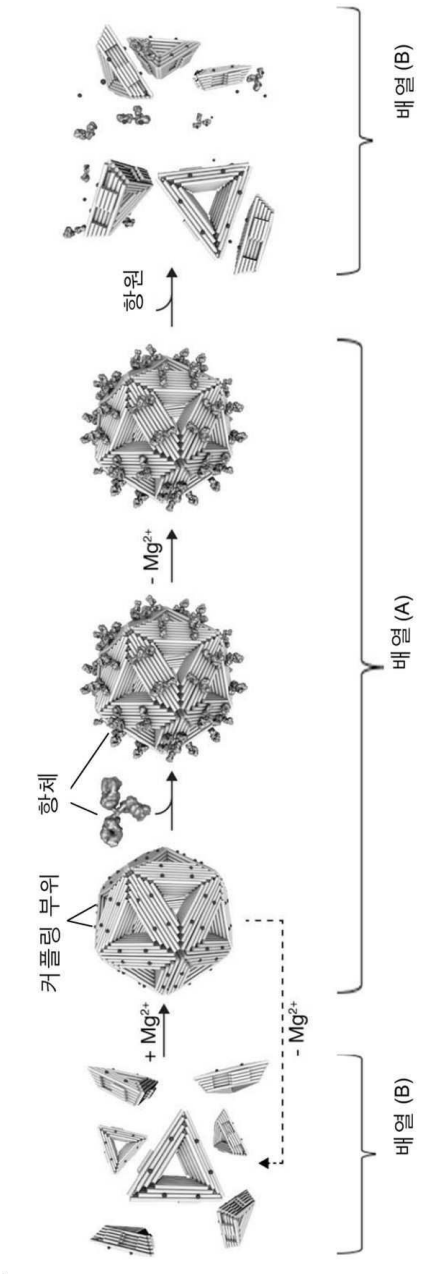
[0136] 그 후, 발명자들은 레이저 스캐닝 현미경을 수행하였다. 도 2 e)는 8, 12, 16 및 20mM $MgCl_2$ 가 보충된 0.5X TBE 완충액 내 0.75% 아가로스 겔의 레이저 스캔 형광 이미지를 보여준다. 조립된 쉘을 25mM $MgCl_2$에서 항-디곡시게닌 항체 유무에 관계없이 배양한 후 해당 $MgCl_2$ 농도로 희석하고 해당 젤에서 전기영동했다. 본 발명자들은 또한 배열(A) 및 배열(B)를 특성화하기 위해 TEM을 사용했다. 항 디곡시게닌 항체 없이(왼쪽) 또는 항 디곡시게닌 항체와 함께(오른쪽) 배양하고 12mM $MgCl_2$로 희석한 쉘의 음성 염색 TEM 이미지가 그림 2(f)에 나와 있으며, 디옥시게닌 항체 없이 그리고 항체와 함께 배양되고 이어서 다양한 최종 $MgCl_2$ 농도로 희석한 쉘의 정규화된 FRET 비율이 도 2(e)에 나와 있다. 삼각형 서브유닛의 각 측면은 대칭 위치에서 Cy3 및 Cy5 형광단으로 기능화되어 쉘이 조립될 때만 에너지 전달이 발생한다. 22~ 14mM 사이의 $MgCl_2$ 농도에서 FRET 비율의 초기 감소는 정전기 반발력 증가로 인해 쉘이 부풀어오르기 때문에 발생한다. 정이십면체 쉘의 항원에 의해 유발되는 분해를 추가로 특성화하기 위해 발명자들은 레이저 스캐닝 현미경을 사용하여 입증했다. 도 3(a)는 쉘-안정화 항-디옥시게닌 항체와 결합하기 위해 경쟁하는 가용성 디옥시게닌 리간드를 추가하면 항체가 스프링 장착 쉘에서 옮겨져 결과적으로 불안정한 Mg2+ 이온 농도에서 껍질의 분해를 촉발함을 보여준다. 항-디곡시게닌 항체가 장착된 조립된 쉘을 증가하는 농도의 디곡시게닌과 함께 배양하여 그림 3(a)에 표시된 대로 항 -디곡시게닌 안정화된 껍질(25μM 가용성 디곡시게닌) 이 증가하는 농도의 가용성 디곡시게닌 항원에서 분해됨을 입증했다. 도 3(b)는 증가하는 농도의 가용성 2,4- 디니트로페놀 리간드에서 항- 디니트로페놀 안정화 쉘이 분해되는 것을 보여준다.

[0137] 도 3(f)는 왼쪽 부분에서 AND-게이트 로직 게이트 쉘 분해는 디곡시게닌과 2,4 -디니트로페놀 리간드 모두와 각각의 항체를 삼각형-삼각형 경계면에 설치하여 실현됨을 보여준다. 결과적으로 AND-게이트 쉘의 분해에는 가용성 디곡시게닌과 2,4-디니트로페놀 둘 다의 존재가 필요하다. 도 3(f)는 오른쪽 부분에서 12mM $MgCl_2$ 가 보충된 0.5X TBE 완충액 내 0.75% 아가로스 겔의 레이저 스캔 형광 이미지를 보여준다. 항- 디곡시게닌 및 항- 디니트로페놀 항체가 장착된 조립된 AND-게이트 쉘을 증가하는 농도의 상단: 디곡시게닌, 중간: 2,4-디니트로페놀 및 하단: 디곡시게닌 및 2,4-디니트로페놀과 함께 인큐베이션했다. 상단: 25μM 디곡시게닌, 중간: 5 mM 2,4- 디니트로페놀 및 하단: 25 μM 디곡시게닌 및 5mM 2,4- 디니트로페놀로 배양된, 항-디곡시게닌 및 항-디니트로페놀이 장착된 쉘의 음성 염색 TEM 이미지.

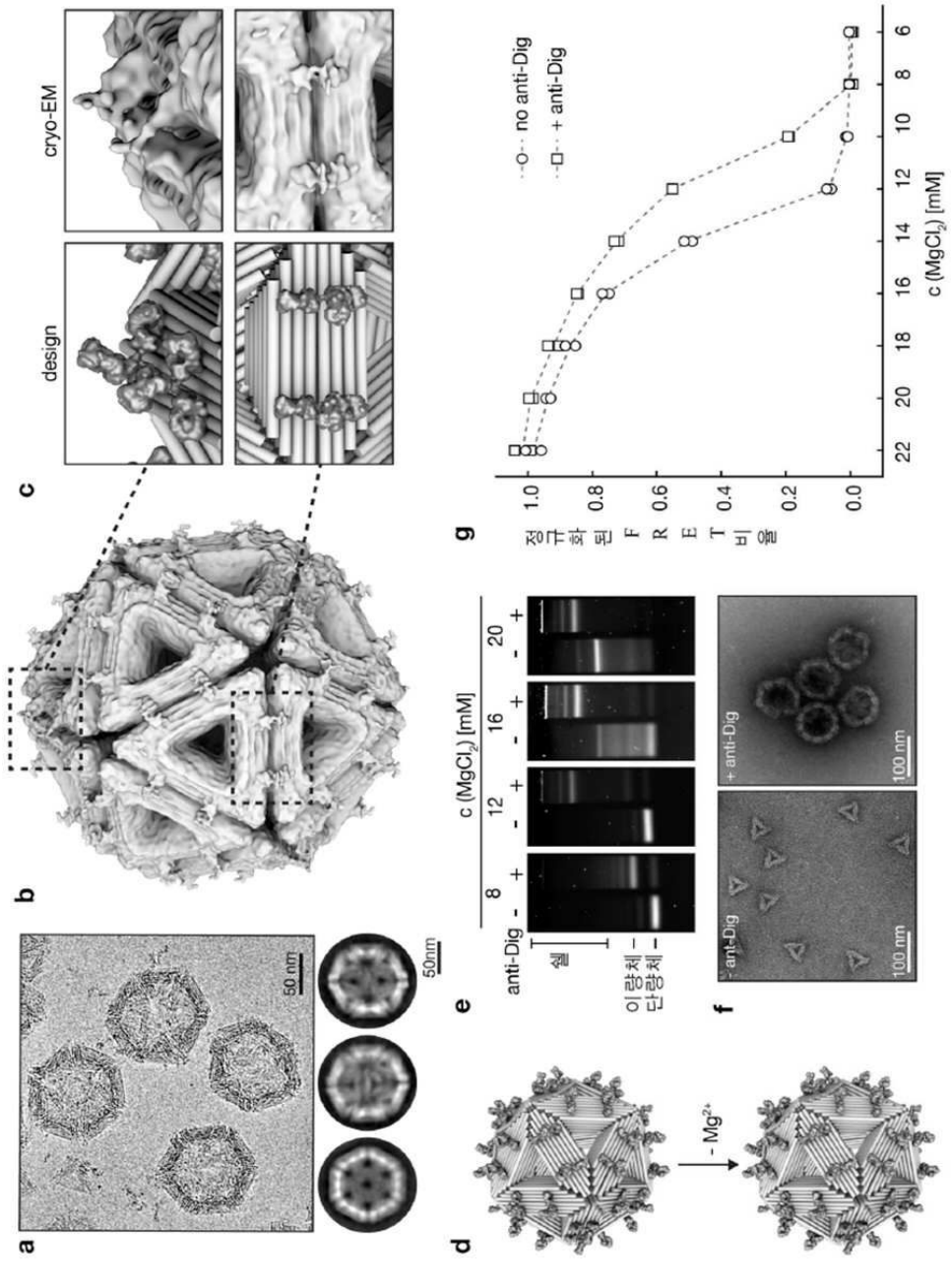
[0138] 상기에서는 첨부 도면을 참조하여 바람직한 실시예를 설명하였지만, 통상의 기술자는 이 실시예가 단지 설명의 목적으로만 제공된 것이며 결코 청구범위에 의해 정의된 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다는 것을 이해할 것이다.

도면

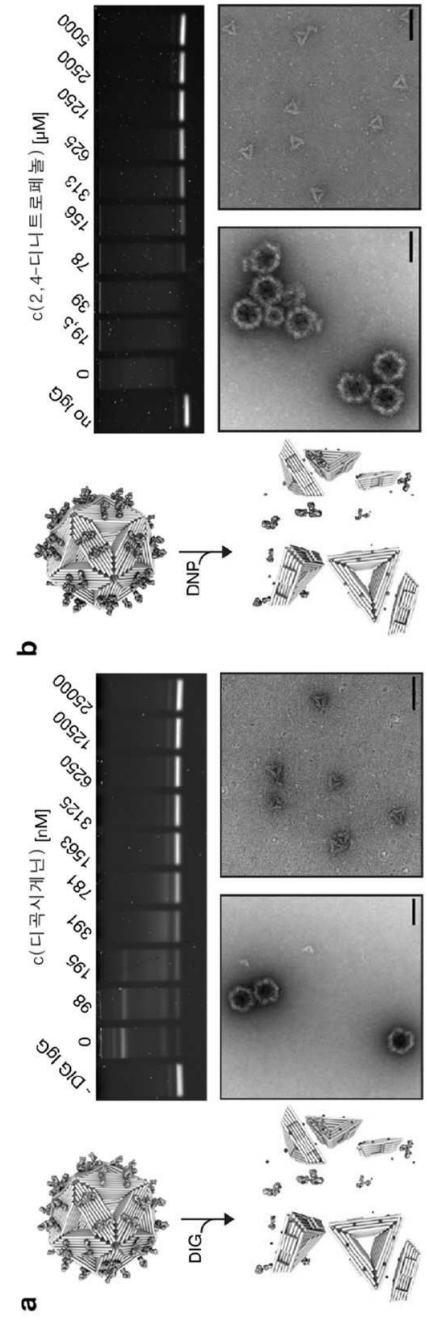
도면1



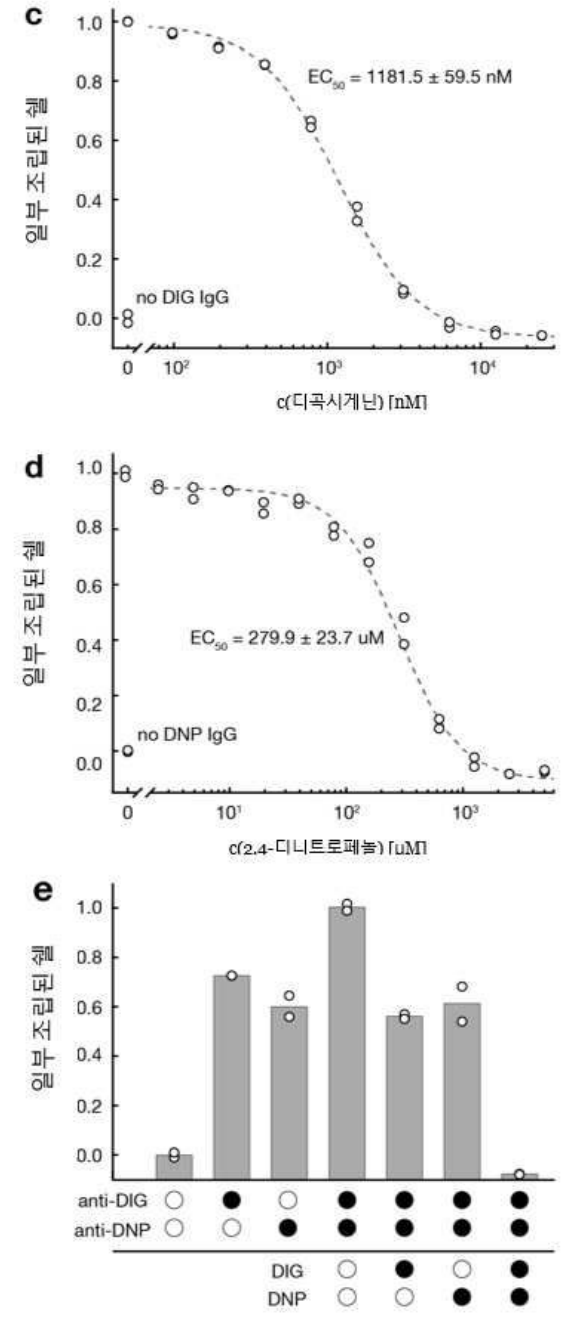
도면2


a
50 nm
50nm
b
c
design
cryo-EM
d
- Mg2+
e
c (MgCl2) [mM]
8
12
16
20
anti-Dig
셀
이량체
단량체
f
- anti-Dig
+ anti-Dig
100 nm
g
no anti-Dig
+ anti-Dig
정규화된 FRET 비율
c (MgCl2) [mM]

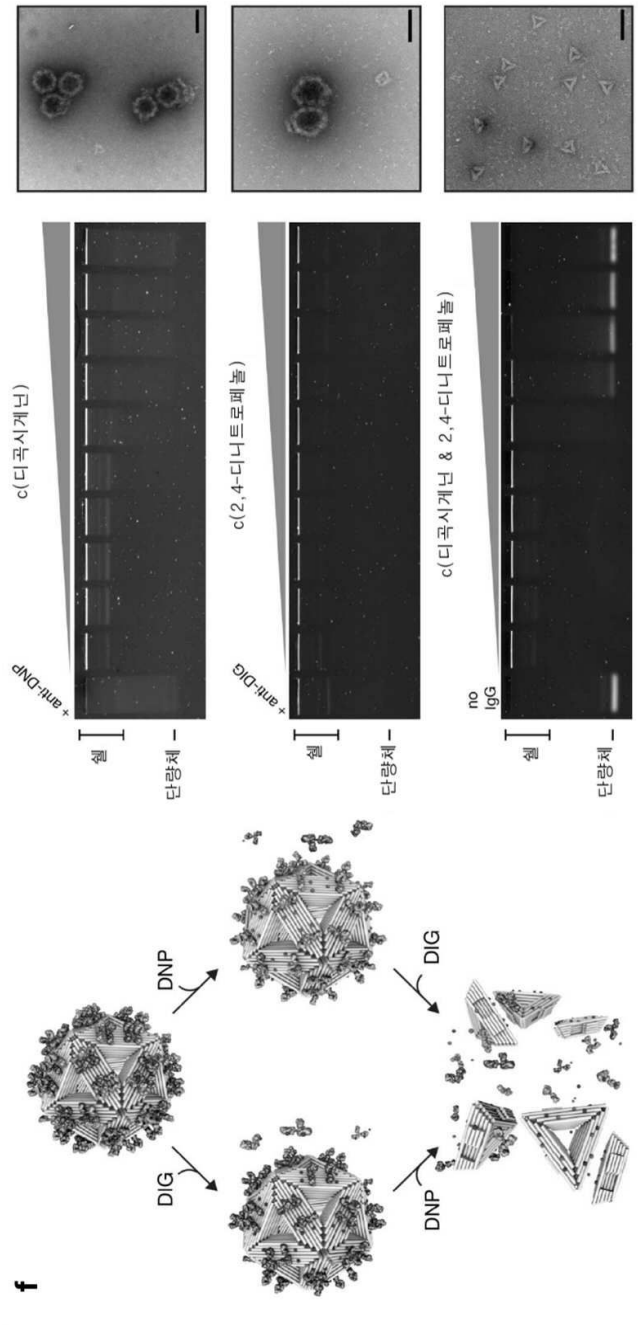
도면3a


a
DIG
- DIG IgG
0
98
195
391
781
1563
3125
6250
12500
25000
c(디곡시게닌) [nM]
b
DNP
no IgG
0
19.5
39
78
156
313
625
1250
2500
5000
c(2,4-디니트로페놀) [μM]

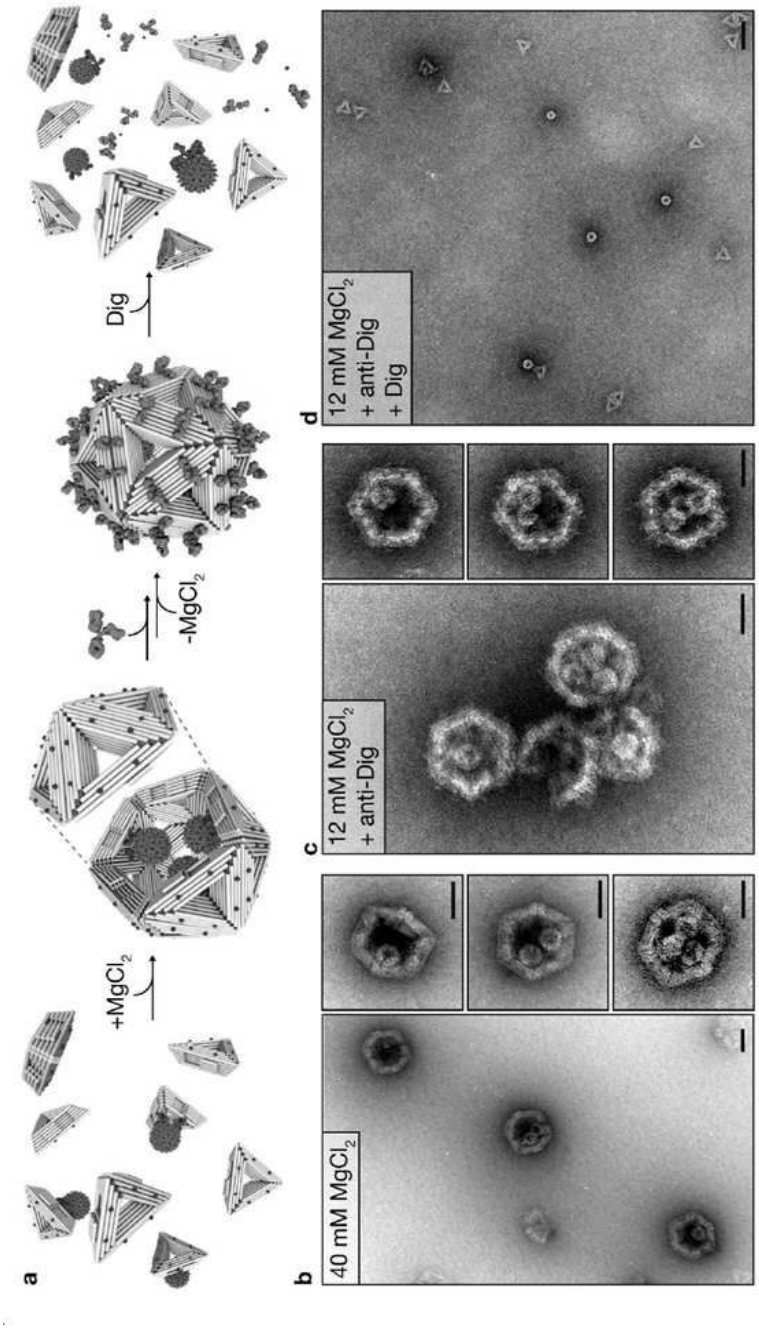
도면3b


c
일부 조립된 쉘
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
EC50 = 1181.5 ± 59.5 nM
no DIG IgG
0
10²
10³
10⁴
c(디곡시게닌) [nM]
d
일부 조립된 쉘
EC50 = 279.9 ± 23.7 uM
no DNP IgG
10¹
c(2,4-디니트로페놀) [uM]
e
anti-DIG
anti-DNP
DIG
DNP

도면3c


c(디곡시게닌)
+anti-DNP
겔
단량체
c(2,4-디니트로페놀)
+anti-DIG
겔
단량체
c(디곡시게닌 & 2,4-디니트로페놀)
no IgG
겔
단량체
DNP
DIG
DIG
DNP
f

도면4


a
+MgCl2
-MgCl2
Dig
b
40 mM MgCl2
c
12 mM MgCl2
+ anti-Dig
d
12 mM MgCl2
+ anti-Dig
+ Dig