



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112655699 B

(45) 授权公告日 2022.09.16

(21) 申请号 201911306468.2

B82Y 30/00 (2011.01)

(22) 申请日 2019.12.18

B82Y 40/00 (2011.01)

A23L 3/37 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112655699 A

(43) 申请公布日 2021.04.16

(30) 优先权数据

10-2019-0127972 2019.10.15 KR

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

(72) 发明人 李承祐 安东俊 林东权 李在源

李相烨

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

专利代理师 刘烽

(51) Int. Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

C09K 5/20 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2018174325 A1, 2018.09.27

CN 101918437 A, 2010.12.15

Laura E. Wilkins, et al.. site-specific conjugation of antifreeze proteins onto polymer-stabilized nanoparticles. 《Polym Chem.》. 2019, 第10卷 (第23期), 第2986-2990页.

Michelle L. Personick, et al.. Making Sense of the Mayhem behind Shape Control in the Synthesis of Gold Nanoparticles. 《Journal of the American Chemical Society》. 2013, 第135卷第18238-18247页.

审查员 陈皓

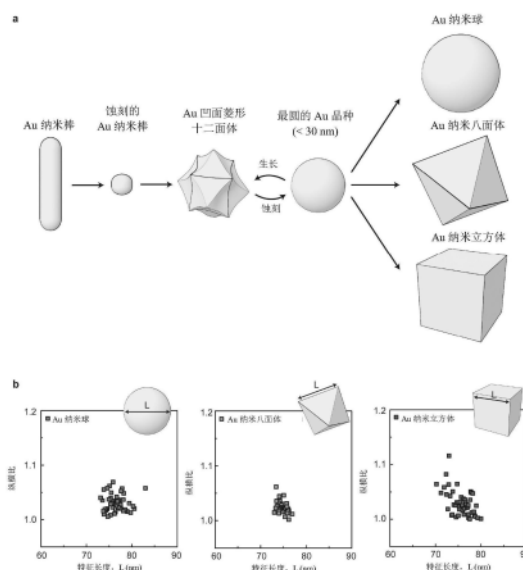
权利要求书2页 说明书17页 附图18页

(54) 发明名称

包含具有肽的金纳米颗粒的抗冻组合物

(57) 摘要

本发明提供了一种纳米结构, 所述纳米结构包括: 核, 所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面; 以及寡肽, 所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且包括 (Thr)_n-、(Ala)_n-、(Ser)_n- 或 (Gly)_n-, 其中所述纳米结构是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构, 并且n是2至7的整数。



1. 一种纳米结构产品, 包括:
核, 所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面; 和寡肽, 所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并具有 $(\text{Thr})_n^-$ 、 $(\text{Ala})_n^-$ 或 $(\text{Gly})_n^-$,
其中所述纳米结构产品是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构产品, 并且
 n 是 2 至 7 的整数。
2. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核具有四面体、截顶四面体、六面体、截顶六面体、八面体、截顶八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体、六八面体或菱形十二面体的形状。
3. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核由金 (Au)、银 (Ag)、铂 (Pt)、钯 (Pd)、铝 (Al)、铜 (Cu)、氧化铁 (Fe_3O_4) 或二氧化硅 (SiO_2) 或包含其中的至少两种的合金制成。
4. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核由金 (Au)、铂 (Pt)、铁 (Fe)、氧化铁 (Fe_3O_4)、硅 (Si) 或二氧化硅 (SiO_2) 或包含其中的至少两种的合金制成。
5. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中 n 是 3 至 6。
6. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述寡肽具有 $(\text{Thr})_n^-$ 或 $(\text{Ala})_n^-$ 。
7. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核具有 50nm 至 100nm 的直径。
8. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中每平方纳米 0.07 至 0.25 个寡肽附接至所述平面。
9. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核具有六面体或八面体的形状。
10. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述核由金 (Au) 制成。
11. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中 n 是 5。
12. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中每平方纳米 0.1 至 0.2 个寡肽附接至所述平面。
13. 根据权利要求 1 所述的纳米结构产品, 其中所述冷冻控制通过抑制所述冰的重结晶来进行。
14. 一种用于控制冷冻的组合物, 所述组合物包括根据权利要求 1 所述的纳米结构产品。
15. 一种用于冷冻细胞的组合物, 所述组合物包括根据权利要求 1 所述的纳米结构产品。
16. 一种用于冷冻食品的组合物, 所述组合物包括根据权利要求 1 所述的纳米结构产品。
17. 一种用于控制冷冻的方法, 所述方法包括:
制备纳米结构产品, 所述纳米结构产品包括: 核, 所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面; 以及寡肽, 所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并具有 $(\text{Thr})_n^-$ 、 $(\text{Ala})_n^-$ 或 $(\text{Gly})_n^-$, 其中所述纳米结构产品是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构产品, 并且 n 是 2 至 7 的整数; 以及
将所制备的纳米结构产品添加至溶剂。
18. 一种用于冷冻保存细胞的方法, 所述方法包括:

制备纳米结构产品,所述纳米结构产品包括:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且具有 (Thr) n-、(Ala) n-或 (Gly) n-,其中所述纳米结构产品是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构产品,并且n是2至7的整数;以及

将所制备的纳米结构产品添加至含有所述细胞的溶液。

19.一种用于冷冻保存食品的方法,所述方法包括:

制备纳米结构产品,所述纳米结构产品包括:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且具有 (Thr) n-、(Ala) n-或 (Gly) n-,其中所述纳米结构产品是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构产品,并且n是2至7的整数;以及

将所制备的纳米结构产品添加至用于处理的所述食品。

包含具有肽的金纳米颗粒的抗冻组合物

技术领域

[0001] 本发明涉及一种抗冻组合物,所述抗冻组合物包含附接有肽的金纳米颗粒。

背景技术

[0002] 抗冻蛋白 (AFP) 和抗冻糖蛋白 (AFGP) (下文统称为“AF (G) P”) 在抑制冰晶生长中的作用和能力激发了本发明所属技术领域的技术人员了解并利用其表现出抗冻活性的机制,从而允许本领域技术人员将AF (G) P用于多种转化应用。据信,具有特定序列的规则排列的AF (G) P粘附至冰晶的小平面,并且因此,在锚定AF (G) P的区域之间形成的生长冰晶的微米曲率或纳米曲率使水分子在热力学上更难以结晶。

[0003] 尽管尚需解决潜在机制的全面合理化,但两个来源可能如下涉及在AF (G) P的冰粘附中。在研究的初始阶段,氢键合被认为是为此目的最普遍的合理化途径。这是直观的解释,因为所有氨基酸都具有羰基和胺基,AF (G) P中的羰基和胺基可与水分子广泛形成氢键。人造冷冻保护剂,如具有一堆羟基的聚(乙烯醇) (PVA) 和氧化石墨烯 (GO) 提供氢键在冰晶抑制方面的重要性的进一步证据。

[0004] 然而,已发现仅依赖于氢键合的方法在AF (G) P之间是不一致的。(Sonnichsen, F.D.; DeLuca, C.I.; Davies, P.L.; Sykes, B.D. Refined solution structure of type III antifreeze protein: hydrophobic groups may be involved in the energetics of the protein-ice interaction. *Structure* 1996, 4, 1325-1337.; Chao, H.; Houston, M.E.; Hodges, R.S.; Kay, C.M.; Sykes, B.D.; Loewen, M.C.; Davies, P.L.; Sonnichsen, F.D. A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice. *1997 Biochemistry*, 36, 14652-14660.; Zhang, W.; Laursen, R.A. Structure-function relationships in a type I antifreeze polypeptide the role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity. *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 34806-34812.; Haymet, A.D.J.; Ward, L.G.; Harding, M.M. Winter flounder “antifreeze” proteins: synthesis and ice growth inhibition of analogues that probe the relative importance of hydrophobic and hydrogen-bonding interactions. *J. Am. Chem. Soc.* 1999, 121, 941-948.; Yang, C.; Sharp, K.A. Hydrophobic tendency of polar group hydration as a major force in type I antifreeze protein recognition. *Proteins* 2005, 59, 266-274.; Wierzbicki, A.; Dalal, P.; Cheatham III, T.E.; Knickelbein, J.E.; Haymet, A.D.J.; Madura, J.D. Antifreeze proteins at the ice/water interface: three calculated discriminating properties for orientation of type I proteins. *Biophys. J.* 2007, 93, 1442-1451.; Nutt, D.R.; Smith, J.C. Dual function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13066-13073.; Smolin, N.; Daggett, V. Formation of ice-like water structure on the surface of an antifreeze protein. *J. Phys. Chem. B* 2008, 112, 6193-6202.; Mochizuki,

K.;Molinero,V.Antifreeze Glycoproteins Bind Reversibly to Ice Via Hydrophobic Groups.J.Am.Chem.Soc.2018,140,4803-4811.)。例如,经验证明,当苏氨酸(Thr)与丝氨酸(Ser)的比例较高时,包括Thr和Ser的共寡肽表现出对冰生长的更有效抑制(Chao,H.;Houston,M.E.;Hodges,R.S.;Kay,C.M.;Sykes,B.D.;Loewen,M.C.;Davies,P.L.;Sonnichsen,F.D.A diminished role for hydrogen bonds in antifreeze protein binding to ice.1997Biochemistry,36,14652-14660.;Zhang,W.;Laursen,R.A.Structure-function relationships in a type I antifreeze polypeptide the role of threonine methyl and hydroxyl groups in antifreeze activity.J.Biol.Chem.1998,273,34806-34812.)。从氢键合的观点来看,这是违反直觉的,因为Thr比Ser更疏水。这一结果暗示AF(G)P的疏水性也有助于它们的冰结合,并且由此导致冰生长的抑制。在使用两亲性糖聚合物的研究中,已经证实了亲疏水二元性在抑制冰生长中的这种重要性。除这些经验观察结果之外,最近还进行了用于在理论上支持上述讨论的数值模拟。

[0005] 用于抑制冰生长的另一种关键因素是这种两亲性部分的面部组构。通常,组装的AF(G)P形成平面阵列,所述平面阵列进而有助于冰与AF(G)P之间的相互作用。迄今为止,在开发的大多数人工冷冻保护剂中,小的或聚合物的大分子本身在没有这种平面组构的情况下使用。这些分子冷冻保护剂的一般优点可主要体现在其化学部分的多样性非常适合于冰生长抑制以及合成的通用性和成本有效性优势的目的。缺乏适当的微米/纳米材料也促使使用非几何学限定的分子冷冻保护剂,其进而需要使用相对高浓度的冷冻保护剂来有效抑制冰生长。

[0006] 同时,在过去二十年中,金(Au)胶体纳米颗粒(NP)的合成和应用已经取得了重大进展。随着用于生产具有高度均匀且不同形状的金(Au)NP的各种合成途径的出现,Au胶体已经吸引了众多领域的浓厚兴趣,如生物医学疗法/传感器、等离子体学、光学超材料、光电子学、太阳能转化以及许多其他应用。这些开发中的许多主要集中于利用Au胶体等离子体效应(即局部表面等离子体共振(LSPR))。

[0007] 然而,精确控制Au NP的形状和大小二者的能力不仅可用来调节LSPR效应,而且可用来改善冰与冷冻保护剂分子部分之间的纳米级界面相互作用。

[0008] 现有技术文献

[0009] 专利文献

[0010] EP2565200A1

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种能够控制冷冻的材料和/或一种包含所述材料的组合物。

[0012] 此外,本发明的另一个目的是提供一种用于冷冻保存以用于提高细胞的存活率的组合物以及其方法。

[0013] 此外,本发明的另一个目的是提供一种用于食品冷冻保存的组合物,所述组合物即使在冷冻时也可以维持食物的质地;以及其方法。

[0014] 1.一种纳米结构,所述纳米结构包括:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个

平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且包含 (Thr)_n-、(Ala)_n-、(Ser)_n-或 (Gly)_n- ,其中所述纳米结构是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构,并且n是2至7的整数。

[0015] 2. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核具有四面体、截顶四面体、六面体、截顶六面体、八面体、截顶八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体、六八面体或菱形十二面体的形状。

[0016] 3. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核由金 (Au)、银 (Ag)、铂 (Pt)、钯 (Pd)、铝 (Al)、铜 (Cu)、氧化铁 (Fe₃O₄) 或二氧化硅 (SiO₂) 或包含它们中的至少两种的合金制成。

[0017] 4. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核由金 (Au)、铂 (Pt)、铁 (Fe)、氧化铁 (Fe₃O₄)、硅 (Si) 或二氧化硅 (SiO₂) 或包含它们中的至少两种的合金制成。

[0018] 5. 根据上述1所述的纳米结构,其中n是3至6。

[0019] 6. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述寡肽包含 (Thr)_n-或 (Ala)_n-。

[0020] 7. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核具有50nm至100nm的直径。

[0021] 8. 根据上述1所述的纳米结构,其中每nm² (平方纳米) 0.07至0.25个寡肽附接至所述平面。

[0022] 9. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核具有六面体或八面体的形状。

[0023] 10. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述核由金 (Au) 制成。

[0024] 11. 根据上述1所述的纳米结构,其中n是5。

[0025] 12. 根据上述1所述的纳米结构,其中每nm² 0.1至0.2个寡肽附接至所述平面。

[0026] 13. 根据上述1所述的纳米结构,其中所述冷冻控制通过抑制所述冰的重结晶来进行。

[0027] 14. 一种用于控制冷冻的组合物,所述组合物包含根据上述1至13中任一项所述的纳米结构。

[0028] 15. 一种用于冷冻细胞的组合物,所述组合物包含根据上述1至13中任一项所述的纳米结构。

[0029] 16. 一种用于冷冻食品的组合物,所述组合物包含根据上述1至13中任一项所述的纳米结构。

[0030] 17. 一种用于控制冷冻的方法,所述方法包括:制备包括以下的纳米结构:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且包含 (Thr)_n-、(Ala)_n-、(Ser)_n-或 (Gly)_n- ,其中所述纳米结构是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构,并且n是2至7的整数;以及将所述制备的纳米结构添加至溶剂中。

[0031] 18. 一种用于冷冻保存细胞的方法,所述方法包括:制备包括以下的纳米结构:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并且包含 (Thr)_n-、(Ala)_n-、(Ser)_n-或 (Gly)_n- ,其中所述纳米结构是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构,并且n是2至7的整数;以及将所述制备的纳米结构添加至含有所述细胞的溶液中。

[0032] 19. 一种用于冷冻保存食品的方法,所述方法包括:制备包括以下的纳米结构:核,所述核包括被配置为与冰晶的至少一个平面处于平面接触的一个或多个平面;以及寡肽,

所述寡肽与所述核的至少一个平面缀合并包含 (Thr) $_n$ -、(Ala) $_n$ -、(Ser) $_n$ -或 (Gly) $_n$ -，其中所述纳米结构是以胶体形式存在于水中以控制冷冻的多面体形状的纳米结构，并且 n 是2至7的整数；以及将所述制备的纳米结构添加至用于处理的所述食品。

[0033] 通过使用根据本发明的材料和/或包含所述材料的组合物，有可能抑制冰的重结晶并控制冷冻。因此，可在细胞冷冻保存期间提高细胞的存活率，并且即使在冷冻时也可维持食品的质地。

附图说明

[0034] 通过以下结合附图的详细描述，将更清楚地理解本发明的上述和其他目的、特征和其他优点，其中：

[0035] 图1A是示出Au胶体的合成过程的视图(a)，和示出根据通过根据本发明的实施方案的方法制备的Au纳米颗粒(NP)的长度 L 和纵横比的确认分布的结果的视图(b)，并且图1B是示出Au NP的不同形状的视图，其中(a)是四面体和截顶四面体，(b)是六面体和截顶六面体，并且(c)是八面体和截顶八面体；

[0036] 图2是根据Au NP的形状的透射电子显微镜和扫描电子显微镜图像(a)；Au纳米球的大规模(200mL)合成浴的照片(b)和示出相应的UV-Vis吸收光谱的图，所述图展示在小规模(20mL)和大规模(200mL)合成中基本上没有出现峰；以及示出硫醇介导的寡肽与Au胶体的表面的附接的视图(c)；

[0037] 图3是示出其中将2聚体、5聚体和7聚体寡肽分别设置为0.60nm、1.00nm和1.40nm的模拟模型的视图(a)，以及示出裸Au胶体和寡肽缀合的Au胶体的吸收光谱的视图(b)至(d)；

[0038] 图4是示出用于寡肽的荧光定量的标准浓度曲线的图(a)和示出从脱离的寡肽获得的荧光强度的图(b)；

[0039] 图5是示出模拟模型的视图(a)，和示出根据寡肽密度的寡肽缀合的Au纳米立方体(NC)的LSPR消光峰移位的计算结果的图(b)；

[0040] 图6是示出冰晶随时间推移从去离子(DI)水和Au NC的溶液重结晶的平均最大晶粒尺寸(MLGS)的图(a)，以及示出从去离子水(第1行)、裸Au NC悬浮液(第2行)、(Thr) $_5$ -Cys-(第3行)、(Ser) $_5$ -Cys-(第4行)、(Ala) $_5$ -Cys-(第5行)和(Gly) $_5$ -Cys-(第6行)缀合的Au NC悬浮液重结晶的冰的暗场光学显微镜(DFOM)图像；

[0041] 图7是示出从去离子水(第1行)、裸Au NC悬浮液(第2行)、(Thr) $_5$ -Cys-(第3行)、(Ser) $_5$ -Cys-(第4行)、(Ala) $_5$ -Cys-(第5行)和(Gly) $_5$ -Cys-(第6行)缀合的Au NC悬浮液获得的明场偏光显微镜(BFPOM)图像的视图；

[0042] 图8是示出去离子水、裸Au NC悬浮液、(Thr) $_5$ -Cys-、(Ser) $_5$ -Cys-、(Ala) $_5$ -Cys-和(Gly) $_5$ -Cys-缀合的Au NC悬浮液的冰粒的时间依赖性立方平均半径的图(a)，以及示出与相应NC对应的DFOM图像的视图(b)；

[0043] 图9是示出根据 (Thr) $_n$ -Cys-缀合的Au NC的浓度，持续30分钟的重结晶冰域的MLGS值的图(a)，以及示出当在Au NC中 n 分别为2、5和7时重结晶的冰的 (Thr) $_n$ -Cys-结合DFOM图像的视图(b)；

[0044] 图10是示出根据寡肽浓度的重结晶的冰的MLGS的图(a)和示出含有1、10、100、

250、500和1000 μ M(按从左上至右下的顺序)的重结晶的冰晶的DFOM图像的视图(b)；

[0045] 图11是拍摄以显示出用于单晶冰的定向生长的冷却设备的照片(a)，使用(a)拍摄以显示出生长中单晶冰的DFOM图像的照片(b)，示出在含有Au NC的溶液中生长的冰晶的DFOM图像的照片(c)，示出在具有随机聚集的裸Au NC的水-冰界面以及具有均匀分散的Au NC的过冷水中选择性地拍摄的DF显微镜散射光谱的照片(d)，示出在含有(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的溶液中生长的冰晶的DFOM图像的照片(e)，以及示出在(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的冰和过冷水区域中拍摄的DF显微镜散射光谱的照片(f)；

[0046] 图12是示出对应于图11(b)的延时明场偏光显微镜(BFPM)图像的照片；

[0047] 图13是示出模拟模型的视图(a)，以及示出(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC及其簇的数值模拟的DF散射光谱的图(b)至(e)。

[0048] 图14是示出分散在冰和水中的Au NC的DF散射的时域有限差分法(FDTD)计算的图；

[0049] 图15是示出ZrAc的DIS活性的简化图(a)，示出在0和10秒时含有20mg/ml ZrAc的定向生长冰的照片(b)，以及示出对于去离子水、0.20nM的(Thr)₅-Cys-Ac NC和20mg/ml的ZrAc的蔗糖辅助的DIS分析结果的照片(c)；

[0050] 图16是拍摄以显示出裸Au NC(第1行)和寡肽缀合的Au NC(第2行至第5行)的模拟的冰生长的延时照片(a)，示出在冰生长期间裸Au NC以及(Thr)₅-Cys-、(Ser)₅-Cys-、(Ala)₅-Cys-和(Gly)₅-Cys-缀合的Au NC的时间追踪的z方向运动的图(b)，示出从伞形采样模拟获得的寡肽缀合的Au NC的计算的自由能的变化图(c)，以及示出寡肽缀合的Au NC的氢键寿命的计算结果的图(d)；

[0051] 图17是示出在全原子分子动力学(AA MD)模拟期间在(a)开始时间(0s)和(b)结束时间(300ns)时的(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的形狀的照片；

[0052] 图18是示出具有各种密度的(Thr)_n-Cys-缀合的Au NC的AA MD模型的照片(a)，以及示出具有各种n和寡肽密度的(Thr)_n-Cys-缀合的Au NC的时间追踪的z方向运动的图(b)；

[0053] 图19是示出根据Au胶体的形状来调节水与冰之间的界面接触的图(a)，示出(Thr)₅-Cys-缀合的Au纳米球(NS)、纳米八面体(NO)和纳米立方体(NC)的重结晶的冰的最大晶粒的时间追踪的MLGS和生长速率的图(b)，以及示出具有(Thr)₅-Cys-缀合的Au NS和NC的规则阵列的模拟的冰晶生长的照片(c)；并且

[0054] 图20是示出在去离子水和0.2或0.6nM的(Thr)₅-Cys-缀合的Au NS悬浮液的条件在不同的过冷温度下冰晶的生长速率的图(a)，以及示出在去离子水和0.2或0.6nM的(Thr)₅-Cys-缀合的Au NS悬浮液的条件，单冰晶的延时BFOM图像的照片(b)。

具体实施方式

[0055] 在下文中，将参考附图更详细地描述本发明。然而，示出了本发明的一些实施方案，但不限于此。实际上，这些发明实际上可以各种形式体现，并且不应被解释为将本发明限制于本公开中提出的实施方案。除非另外明确指出，否则在说明书和所附权利要求书中使用的单数形式也可包括复数形式。

[0056] 如本文所用，术语“热滞后”是指其中冷冻温度和熔融温度不同地出现的现象。如

果在水中存在成核剂,则冷冻温度和熔融温度基本上彼此相同。但是,如果不存在成核剂或成核剂是抗冻蛋白,则冷冻温度低于熔融温度。

[0057] 如本文所用,术语“冰重结晶”是指从小冰晶生长至较大冰晶的过程,并且术语“奥斯特瓦尔德熟化 (Ostwald ripening)”是指由于关于周围环境的能量和晶体的表面能的差异而产生的压差而发生的这种重结晶,其可以溶解-扩散-再冷冻或升华-扩散-冷凝机制进行。

[0058] 在冷冻保存中,细胞膜可由于熔融期间的冰重结晶而受损,从而由于发生细胞脱水所致的细胞和组织受损。由于生活在低温环境中的生物体可能更容易因冰重结晶而受损,因此已经开发了AFP或AFGP。因为AF (G) P粘附至冰的表面以抑制冰生长,所以它们已被用作冰重结晶引起问题的领域中的添加剂。本发明的发明人已经开发了使用源自AF (G) P的肽来控制冷冻的材料,并且已经通过证明AF (G) P来源的肽的空间排列极大地影响抗冻效应而完成了本发明。

[0059] 在本公开中,“抗冻蛋白 (antifreeze protein)”和“抗冻蛋白 (anti-freeze protein)”或“AFP”可互换使用,并且“抗冻糖蛋白 (antifreeze glycoprotein)”和“抗冻糖蛋白 (anti-freeze glycoprotein)”或“AFGP”可互换使用。AFP和AFGP统称为“AF (G) P”。AF (G) P存在于多种动物、植物、真菌和细菌中,并且已知它们与冰晶缀合以抑制冰的生长和重结晶。AF (G) P的这些性质已被用于在低温下保存生物样品。根据最近的研究,AF (G) P具有根据其类型与冰缀合的三级结构的特殊类型,并且已知在与冰接触的方向上存在大量的Thr,并且Ala以辅助方式存在。

[0060] 在本公开中,术语“抗冻 (antifreezing)”、“抗冻 (anti-freezing)”、“冷冻控制 (freezing control)”、“冷冻控制 (freeze control)”、“冷冻遏制 (freezing suppression)”和“冷冻遏制 (freeze suppression)”可互换使用,并且是指降低冰点、防止冰形成或降低冰形成的速度、防止冰再结晶、降低冰重结晶的速度或使冰晶的尺寸保持较小的作用。

[0061] 如本文所用,术语“胶体”是指混合物或分散的材料,其中微观分散的可溶性颗粒或不溶性颗粒悬浮在其他材料中。与其中溶剂和溶质具有一相的溶液不同,胶体具有分散相和连续相。

[0062] 在本公开中,术语“寡肽”、“多肽”、“肽”和“蛋白质”可互换使用,并且是指包含通过肽键共价键合的氨基酸残基的聚合化合物。在本发明中,可使用通过本领域已知的技术合成的肽。合成肽的方法可以是:化学方法或生物学方法,其中化学方法可以是例如溶液相方法;固相方法,包括叔丁氧基羰基 (Boc) /苄基 (Bzl) 策略和9-苄基甲氧基羰基 (Fmoc) /叔丁基 (t-Bu) 策略 (Kent SBH, Mitchell AR, Engelhard M, Merrifield RB (1979) Mechanisms and prevention of trifluoroacetylation in solid-phase peptide synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 76 (5):2180-2184); 用于将第一氨基酸固定至树脂并按序列顺序延伸肽链的方法;或使用微波的方法;并且生物学方法可以是使用微生物的方法,但不限于此。

[0063] 在本公开中,术语“平面接触”和“平面或小平面接触”可互换使用,并且是指其中当使一个表面与另一个表面接触时,在其间的边界处基本上形成平面并且与在所述边界处形成曲面的线接触、点接触或曲面接触的情况分开使用的情况。本发明的纳米结构具有可与冰晶平面处于平面接触的一个或多个平面,并且相应的平面具有疏水性官能团或亲水性

官能团,或者另外,并且具有带由此暴露的疏水性或亲水性官能团的氨基酸残基。能够平面接触的多面体可以是四面体、截顶四面体、六面体、截顶六面体、八面体、截顶八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体、六八面体或菱形十二面体,但不限于此。在本发明的一个实施方案中,多面体是六面体或八面体。

[0064] 如本文所用,术语“截顶多面体”是指为阿基米德多面体之一并且由多面体的截断顶点制成的多面体(图1B)。

[0065] 如本文所用,术语“核”是指形成纳米结构的基本骨架的部分。核可使用对细胞或身体无毒、基本上无毒或毒性较小的元素。在本发明的一个实施方案中,核可由例如金(Au)、银(Ag)、铂(Pt)、钯(Pd)、铝(Al)、铜(Cu)、氧化铁(Fe_3O_4)或二氧化硅(SiO_2)或包含它们中的至少两种的合金制成,并且在本发明的另一个实施方案中,核可由金(Au)、铂(Pt)、铁(Fe)、氧化铁(Fe_3O_4)、硅(Si)或二氧化硅(SiO_2)或包含它们中的至少两种的合金制成,但不限于此。在本发明的另一个实施方案中,核由金(Au)制成。

[0066] 在本发明的一个实施方案中,核具有150nm或更小、10nm至140nm、20nm至130nm、30nm至120nm、40nm至110nm、50nm至100nm、60nm至90nm或75nm的直径,然而,其直径不限于上述范围,只要根据本发明的纳米结构可以以胶体形式悬浮在溶液中。核的直径可进行调整以便具有本领域技术人员考虑所使用的核的材料、密度、形状等的胶体性质。然而,当核的直径小于10nm时,可能不会发生冷冻控制效应。

[0067] 如本文所用,术语“直径”是指面对多面体的平面之间的最短距离,并且当纳米结构为球形时,其意味着半径的两倍。

[0068] 根据本发明的纳米结构包括核和与所述核缀合的寡肽。寡肽可以是具有疏水性官能团的氨基酸,例如His、Gly、Pro、Ala、Val、Ile、Leu或Met,并且可以是具有亲水性官能团的氨基酸,例如Arg、Ser、Thr、Tyr、Cys、Asp或Glu,并且可以是具有疏水性官能团和亲水性官能团的氨基酸,如Thr。

[0069] 在本发明的一个实施方案中,缀合至核的寡肽可包含选自以下组成的组的一个或多个氨基酸: $(\text{Thr})_n$ 、 $(\text{Ala})_n$ 、 $(\text{Gly})_n$ 和 $(\text{Ser})_n$, 并且在另一个实施方案中,寡肽是 $(\text{Thr})_n$ 或 $(\text{Ala})_n$; 其中n是1至8的整数、2至7的整数、3至6的整数或5,但不限于此。除非另外定义,否则在本公开中,寡肽描述从N末端至C末端的序列。例如, $(\text{Thr})_5$ -是指(N-末端) Thr-Thr-Thr-Thr-Thr-(C-末端), 并且是指直接或通过连接至C末端的另外氨基酸缀合至本发明的纳米结构的寡肽。

[0070] 在本发明的另一个实施方案中,使用AF(G)P的结构性质,由 $(\text{Thr})_5$ -缀合的Au纳米颗粒(NP)制备寡肽,并且此外,为了确认亲水性或疏水性官能团的作用,分别制备具有 $(\text{Ser})_5$ (其中- CH_3 被Thr中的H取代)、 $(\text{Ala})_5$ (其中-OH被Thr中的H取代) 和 $(\text{Gly})_5$ (其中- CH_3 和-OH两者均被Thr中的H取代)的Au NP。特别地,可在C-末端进一步包含Cys以将寡肽缀合至核,但是此外,可添加本领域已知的用于将寡肽缀合至核表面的构型。

[0071] 在本发明的一个实施方案中,缀合至核的寡肽可以以最多每 nm^2 0.07至0.25、0.075至0.23、0.1至0.2或0.13至0.17附接,但是缀合的寡肽的数量可取决于寡肽的性质、如寡肽的长度或序列而变化。与冰界面的缀合力与每单位面积缀合的寡肽的数量以及可与水相互作用的官能团(疏水性和亲水性基团)的数量相关。

[0072] 本发明人已经证实,本发明的纳米结构具有与具有基本上相同直径的球形纳米结

构相比更高的抑制冰重结晶的效应。此外,本发明的纳米结构具有使得冰形成末端为钝性的形状而不是锯齿状或针状的效果。

[0073] 如果冰晶具有锯齿状或针状形状,则在冷冻和储存细胞或食品时,细胞膜和/或细胞壁被破坏,从而导致细胞的存活率降低和食品的质地劣化。然而,当添加包含根据本发明的纳米结构的组合物时,如上所述形成的冰无方向地生长,从而提高在细胞的冷冻保存期间细胞的存活率,并在冷冻保存期间维持食品的质地。因此,由于这些优点,根据本发明的纳米结构不仅可用于作用于常规冷冻控制的原材料,而且可适合于冷冻细胞和食品。

[0074] 在本发明的一个实施方案中,根据本发明的用于控制冷冻的组合物包含纳米结构,所述纳米结构包括:核,所述核包括被构造成与冰晶的至少一个平面处于平面接触的至少一个平面,并且具有四面体、截顶四面体、六面体、截顶六面体、八面体、截顶八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体、六八面体或菱形十二面体的形状;以及寡肽,所述寡肽与所述核的一个或多个平面缀合并包含 $(\text{Thr})_n$ -、 $(\text{Ala})_n$ -、 $(\text{Ser})_n$ -或 $(\text{Gly})_n$ -。在本发明的另一个实施方案中,根据本发明的用于控制冷冻的组合物中的纳米结构包括的核具有选自以下组成的组的两种或更多种形状:四面体、截顶四面体、六面体、截顶六面体、八面体、截顶八面体、十面体、十二面体、二十面体、四六面体、六八面体和菱形十二面体。

[0075] 在本发明的一个实施方案中,可使用根据本发明的细胞冷冻保存组合物进行冷冻保存的细胞可包括原核细胞;真核细胞;微生物;动物细胞;癌细胞,精子;卵;干细胞,包括成体干细胞、胚胎干细胞和去分化的干细胞;血细胞,包括脐带血、白细胞、红细胞和血小板;以及组织细胞,包括肾细胞、肝细胞和肌肉细胞;但不限于此。

[0076] 在本发明的一个实施方案中,提供了:一种用于控制冷冻的方法,所述方法包括:制备根据本发明的纳米结构,以及将所述制备的纳米结构添加至溶剂;一种用于冷冻保存细胞的方法,所述方法包括:制备根据本发明的纳米结构,以及将所述制备的纳米结构添加至含有细胞的溶液;以及一种用于冷冻保存食品的方法,所述方法包括:制备根据本发明的纳米结构,以及将所述制备的纳米结构添加至用于处理的所述食品。

[0077] 当在本公开中使用范围描述数值时,认为在本发明中公开了在相应范围内的所有数值。

[0078] 本领域技术人员将理解其中应不可避免地使用“约”的情况,并且如本文所用的术语“约”将被理解为包括误差界限内的数值。

[0079] 如本文所用的术语“基本上相同”是指其中在误差界限内存在相同或未识别程度的差异的情况。如本文所用,术语“基本上不含(substantially free)”、“基本上不含(be substantially free)”或与其类似的表述是指零或误差界限内包括零的情况,或者对于本领域技术人员而言可忽略的情况。

[0080] 实施例

[0081] 实施例1. 方法

[0082] 1.1 Au胶体的合成

[0083] 通过种子介导的方法结合对顶点/边缘的选择性蚀刻合成Au胶体(Au纳米球(NS)、Au纳米立方体(NC)和Au纳米八面体(NO))。首先,使用银辅助方法来合成Au纳米棒(NR)(图1)。通过将300 μ L的10mM硼氢化钠注入含有125 μ L的10mM HAuCl_4 和5mL的100mM溴化十六烷基三甲铵(CTAB)的水溶液中来合成Au NR的Au晶种。然后,通过连续添加200mL的100mM

CTAB、10mL的10mM HAuCl_4 、1.8mL的10mM硝酸银、1.14mL的100mM L-抗坏血酸和240 μL 的晶种溶液来生长Au NR。在温和搅拌1分钟后,将溶液静置2小时。

[0084] 为了获得高度均匀的NS晶种,通过将60 μM 的 HAuCl_4 注入含有2光密度(OD)浓度的Au NR的50mM CTAB水溶液中来选择性地蚀刻掉Au NR的两端。在40℃下温和搅拌4小时后,将蚀刻的Au NR悬浮在100mM的氯化十六烷基吡啶(CPC)水溶液中。通过混合20mL的10mM CPC、350 μL 的10mM HAuCl_4 、4.5mL的100mM抗坏血酸和1mL的10D浓度的蚀刻Au NR,使这些蚀刻的Au NR生长为凹菱形十二面体(CRD),并且通过与60 μM 的 HAuCl_4 水溶液在40℃温和搅拌下混合4小时来蚀刻成NS晶种。使用5mL的蚀刻的CRD作为晶种,将CRD生长和随后的顶点/边缘蚀刻重复2次,以改善NS晶种的均匀性。

[0085] 这些NS晶种用于产生Au NS、Au NC和Au NO。为了获得Au NS,使用2mL的蚀刻CRD作为晶种,遵循上述CRD生长和蚀刻方法。为了合成Au NC,将5mL的100mM CPC、500 μL 的100mM KBr、100 μL 的10mM HAuCl_4 、150 μL 的100mM抗坏血酸和500 μL 的10D浓度的NS晶种混合并允许反应1小时。在温和搅拌1小时下,将100 μL 的10mM HAuCl_4 、13 μL 的100mM抗坏血酸和500 μL 的10D浓度的NS晶种添加至含有5mL的100mM CPC的水溶液中来生成Au NO。

[0086] 1.2寡肽缀合至Au胶体

[0087] 为了使Au胶体与抗冻寡肽缀合,利用C-末端半胱氨酸(Cys)的假共价键合。简言之,将如上所述合成并悬浮在去离子(DI)水中的Au胶体与过量的寡肽混合,并孵育30分钟以确保完全覆盖。在孵育后,通过离心将过量的寡肽除去3次,并重新悬浮在水中0.01重量%('wt.%')的十二烷基硫酸钠(SDS)中。

[0088] 1.3 Au胶体散射的数值模拟

[0089] 为了从理论上预测Au胶体的散射行为,使用由商业软件包(2014 CST Microwave Studio)支持的时域有限差分法(FDTD)。Au的介电常数是基于Johnson,P.B.;Christy,R.W.Optical constants of the noble metals.Phys.Rev.B 1972,6(12),4370-4379;根据单体数量(n),寡肽的厚度从0.60nm至1.40nm变化。这些厚度根据寡肽的构象来确定,所述构象通过全原子(AA)分子动力学(MD)模拟来计算。为了反映DF显微镜光谱分析(图11),数值地计算Au胶体的散射截面(nm^2)光谱。针对图3b至d中所示的UV-Vis吸收光谱的合理化来计算裸Au胶体或寡肽缀合的Au胶体的吸收截面(nm^2)光谱。

[0090] 为了从理论上定量寡肽厚度对Au胶体的UV-Vis吸收光谱的影响,数值模拟了局部表面等离子体共振(LSPR)消光峰的位移作为彼此具有不同厚度的寡肽层的折射率的函数。然后,使用如通过以下等式给出的有效介质理论(麦克斯韦-加纳特近似法)将用于这种数值模拟的折射率与寡肽密度相关联:

$$[0091] \quad \left(\frac{\epsilon_{eff} - \epsilon_h}{\epsilon_{eff} + 2\epsilon_h} \right) = \delta_i \left(\frac{\epsilon_i - \epsilon_h}{\epsilon_i + 2\epsilon_h} \right)$$

[0092] 其中, ϵ_{eff} 、 ϵ_i 、 ϵ_h 和 δ_i 分别表示介质的有效介电常数、包含物的有效介电常数、主体的有效介电常数和包含物的体积分数。包含物和主体介质分别设置为寡肽和水($\epsilon_h = 1.33$)。寡肽的介电常数从McMeekin,T.L.;Groves,M.L.;Hipp,N.J.Refractive indices of amino acids,proteins,and related substances;American Chemical Society: Washington,DC,1964获得。

[0093] 1.4 附接至Au胶体上的寡肽的定量

[0094] 为了实验地定量附接至Au胶体上的寡肽的量,通过 NaBH_4 对寡肽进行还原性脱离并且进行硫醇选择性检测器介导的荧光测定(Lee,H.E.;Ahn,H.Y.;Mun,J.;Lee,Y.Y.;Kim,M.;Cho,N.H.;Chang,K.;Kim,W.S.;Rho,J.;Nam,K.T.Amino-acid-and peptide-directed synthesis of chiral plasmonic gold nanoparticles.Nature 2018,556(7701),360-365.)。首先,将寡肽缀合的Au胶体离心3次,并且重新悬浮于0.01wt.%的十二烷基硫酸钠(SDS)中以彻底除去未缀合的寡肽。为了使寡肽与Au胶体脱离,将25uL的100mM NaBH_4 添加至75uL的寡肽缀合的Au胶体。在室温下孵育5分钟后,将溶液再次离心以使Au胶体与释放的寡肽分离。将含有自由分散的寡肽的上清液等分试样进一步孵育过夜,以使剩余的 NaBH_4 失活。

[0095] 通过使用硫醇检测荧光检测器(硫醇检测测定试剂盒,Cayman Chemical,700340)对脱离的寡肽进行定量。在硫醇测定缓冲液(100mM磷酸钾,1mM EDTA,pH 7.4)存在下,将寡肽与硫醇检测荧光检测器按1:1的比例混合。然后,将溶液在室温下孵育5分钟,从而使检测器与硫醇基团反应以发射荧光信号。在380nm的激发波长和480至520nm的发射波长下监测荧光。最后,使用标准曲线作为参考,从测量的荧光强度计算脱离的寡肽的浓度(图4)。

[0096] 1.5冰重结晶抑制(IRI)的表征

[0097] 对于IRI活性分析,同时进行splat和蔗糖夹心测定以确定冰重结晶的程度(Mitchell,D.E.;Clarkson,G.;Fox,D.J.;Vipond,R.A.;Scott,P.;Gibson,M.I.Antifreeze protein mimetic metallohelices with potent ice recrystallization inhibition activity.J.Am.Chem.Soc.2017,139(29),9835-9838.;(9) Budke,C.;Heggemann,C.;Koch,M.;Sewald,N.;Koop,T.Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory.J.Phys.Chem.B 2009,113(9),2865-2873.)。在本文中,将寡肽缀合的Au胶体离心并重悬在去离子水中,以在表征之前彻底消除来自剩余有机配体的副作用。为了使用splat测定测试IRI活性,将10uL样品从1.5m的高度滴到预冷却至-70℃的玻璃盖玻片的表面上,以形成冰的薄膜。将具有冰薄膜的玻璃盖玻片转移至设定在-20℃的Peltier冷却器上。然后,将玻璃盖玻片的温度以5℃/分钟的速率逐渐升高至-6℃,并在相应温度下对样品进行退火。在冰重结晶30分钟的过程中,拍摄了暗场光学显微镜(DFOM)图像。通过使用内部开发的代码对这些DFOM图像进行定量,以验证重结晶冰的晶粒尺寸。选择视场中的最大冰晶域中的十个,并获得其平均直径以评价IRI活性。使用来自每个样品的三个独立实验的平均结果计算平均最大晶粒尺寸(MLGS)。

[0098] 为了使用蔗糖夹心测定表征IRI活性,将样品在45wt.%蔗糖存在下夹在两个盖玻片之间,并置于Peltier冷却器上。在将样品冷冻至-50℃后,将Peltier冷却器的温度以10℃/分钟的速率升高至-8℃。然后,将样品在相应的温度下退火30分钟。为了评价IRI活性,每5分钟拍摄DFOM图像,并使用内部开发的代码测量冰晶的半径。计算时间追踪的平均冰晶半径的立方,以定量IRI活性。进行了三个单独实验,并从结果中得出平均值。

[0099] 1.6单晶冰的定向生长

[0100] 首先,通过将双面胶带粘贴在载玻片上并将盖玻片置于其顶部来开发玻璃微流体通道。然后,将去离子水注入此通道中,且然后用透明指甲油密封。为了诱导空间温度(T)梯

度,将通道的一端置于-20℃的Peltier冷却器上,而其另一端则保持在室温(15℃至20℃)条件下。在这种条件下,在Peltier冷却器和环境温度区域之间的某个地方形成单晶冰-水界面。

[0101] 1.7蔗糖辅助动力学冰成型(DIS)测定

[0102] 为了证实和表征DIS活性,在蔗糖水溶液存在下观察冰晶的形状。首先,将溶解在45wt.%蔗糖溶液中的样品夹在两个盖玻片之间并在-50℃下冷冻。在其之后,将样品以0.5℃/分钟的速率缓慢加热,直到几乎没有冰晶残留。然后,将样品以0.1℃/分钟的速率冷却以诱导冰晶的生长。在冷却10分钟后拍摄DFOM图像。

[0103] 1.8热滞后(TH)的表征

[0104] 为了证实样品的TH活性,在各种过冷温度下监测单冰晶的生长速率。简言之,使用定制的纳升渗透计将样品快速冷却至-50℃,以形成多晶冰晶。然后,使温度缓慢升高,直到剩下单冰晶。当单冰晶保持其大小超过4分钟时,将温度设置为熔点。在其之后,将温度降低至目标温度,并通过监测其生长4分钟来测量冰晶的生长速率。将TH评价为熔点与观察到冰晶生长的温度之间的差异(生长速率>0μm/分钟)。

[0105] 1.9全原子分子动力学(AA MD)模拟

[0106] 使用CHARMM36力场,用GROMACS v5.1.4执行AA MD模拟。(Abraham,M.J.;Murtola,T.;Schulz,R.;Pall,S.;Smith,J.C.;Hess,B.;Lindahl,E.GROMACS:high performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers.*SoftwareX* 2015,1,19-25.;Huang,J.;MacKerell Jr,A.D.CHARMM36 all-atom additive protein force field:validation based on comparison to NMR data.*J.Comput.Chem.*2013,34(25),2135-2145.)。使用MarvinSketch制备寡肽的结构,并使用CGenFF(Vanommeslaeghe,K.;MacKerell,A.D.Automation of the CHARMM general force field(CGenFF)I:bond perception and atom typing.*J.Chem.Inf.Model.*2012,52(12),3144-3154.)推导参数。考虑到冰的实际熔点(T_m)(272.2K),使用了TIP4P/ICE水模型(Berendsen,H.J.C.;Postma,J.P.M.;van Gunsteren,W.F.;DiNola,A.;Haak,J.R.Molecular dynamics with coupling to an external bath.*J.Chem.Phys.*1984,81(8),3684-3690.)。Au NC被设计为包含665个Au原子(即边长为2nm)。CHARMM-金属力场使无机界面处的生物分子之间的相互作用合理化(Abascal,J.L.;Sanz,E.;Garcia Fernandez,R.;Vega,C.A potential model for the study of ices and amorphous water:TIP4P/Ice.*J.Chem.Phys.*2005,122(23),234511.)。使用Materials Studio(Accelrys Inc.,San Diego,CA,2011)中的纳米簇生成器制备具有各种尺寸和形状的金胶体。分别使用用于平衡和生产运行的Berendsen和Parrinello-Rahman算法将所有MD系统维持在1巴(Heinz,H.;Vaia,R.A.;Farmer,B.L.;Naik,R.R.Accurate simulation of surfaces and interfaces of face-centered cubic metals using 12-6 and 9-6 Lennard-Jones potentials.*J.Phys.Chem.C* 2008,112(44),17281-17290.;Parrinello,M.;Rahman,A.Polymorphic transitions in single crystals:a new molecular dynamics method.*J.Appl.Phys.*1981,52(12),7182-7190.)。邻区列表是使用Verlet截断方案构建的,其中截断半径为1.2nm,并在每个步骤进行更新。LINCS算法用于约束键长(Hess,B.;Bekker,H.;Berendsen,H.J.;Fraaije,J.G.LINCS:a linear constraint solver for

molecular simulations. J. Comput. Chem. 1997, 18 (12), 1463-1472.)。所有模拟都使用蛙跳积分器 (leap-frog integrator) 以 2fs 的时间步长进行。静电相互作用使用 PME 计算, 其中截断值为 1.2nm (Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle mesh Ewald: An $N \cdot \log(N)$ method for Ewald sums in large systems. J. Chem. Phys. 1993, 98 (12), 10089-10092.)。

[0107] 分别使用 665、3925 和 7813 个 Au 原子制得 2nm 的小 Au NC、5nm 的大 Au NS 和 5nm 的大 Au NC。将寡肽以约 2.5 个肽/nm² 成比例地附接至 Au NP 的表面积。因此, 分别将 60、196 和 375 个寡肽附接至小 Au NC、大 Au NS 和大 Au NC。

[0108] 分别对于 2nm 的小 Au 胶体在 10.8nm x 10.4nm x 8.6nm 的单元和对于 5nm 的大 Au 胶体在 14.7nm x 14.9nm x 13.0nm 的单元中建立连续的冰生长系统。将晶种冰插入其中以生长, 并使用固定的无序水分子来防止冰向下生长。

[0109] GROMACS 和 MDAnalysis 20 中的实用程序用于评价氢键合寿命分析。寡肽与水/冰分子之间氢键合的寿命在 298 至 300ns 计算时间的时期内积分。将从寡肽的功能性部分如胺、羰基和羟基氢键合的所有可能性考虑在内。PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, 版本 2.0 Schrödinger, LLC) 用于可视化模拟结果。

[0110] 1.10 用于具有肽的 Au 胶体的结合能计算的 AAMD 模拟

[0111] 为了计算具有肽的 Au 胶体与冰晶之间的结合能 (即自由能的变化), 对抽取系统 (伞形采样模拟) 进行数值模拟。为此, 制备了具有总计 200,000 个原子的 10x 10x 12nm³ 的系统框, 包括 Au 颗粒、冰表面和液态水层。为了生成 z 方向反应坐标, 使用 DMP 选项中的抽取代码以 1000kJ/mol nm² 的力常数将 Au 颗粒从冰界面抽取约 4nm 持续 500ps。然后, 将采样窗口的间隔定义为 1Å, 并提取 40 个伞形采样窗口。将每个窗口平衡 1ns, 并且然后进行 10NS 的生产运行。使用 GROMACS 软件包中的 WHAM 工具获得平均力势 (PMF)。然后, 从 PMF 曲线计算结合自由能作为最高与最低能态之间的差。

[0112] 实施例 2. 结果和讨论

[0113] 2.1 抗冻 Au 胶体的合成

[0114] 以足够高的产率和可扩展性合成具有高度均匀和不同形状 Au NP。图 2a 示出本发明中使用的 Au NP 的扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 图像。为了系统地研究界面接触对冰生长和重结晶的抑制的影响, 合成了 Au NP 以具有 75nm 的相同大小、但不同的形状, 简言之纳米球 (NS)、纳米八面体 (NO) 和纳米立方体 (NC)。通过多边形 Au 胶体的生长和它们的顶点的随后选择性蚀刻, 以足够大的规模获得了高度均匀的 Au 胶体 (图 2b)。即使在将合成批次从 20mL 按比例放大至 200mL 之后, Au NS 的 LSPR 仍保持一致 (参见图 2b 的右图中的 UV-Vis 吸收光谱), 从而提供本发明中的 Au 胶体合成的可扩展性和可靠性的证据。

[0115] 通过半胱氨酸的硫醇基团和 Au 之间的假共价键合, 将寡肽缀合至上述制备的 Au NP。尽管 AF (G) P 与冰之间的界面相互作用的完整合理化途径仍然难以捉摸, 但已知具有亲水性和疏水性的线性且规则排列的官能部分 (例如 Thr) 与抑制冰生长和重结晶相关 (Doxey, A.C.; Yaish, M.W.; Griffith, M.; McConkey, B.J. Ordered surface carbons distinguish antifreeze proteins and their ice-binding regions. Nat. Biotechnol. 2006, 24, 852-855.; Garnham, C.P.; Campbell, R.L.; Davies, P.L. Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2011, 108, 7363-7367.; Davies, P.L. Ice-binding proteins: a remarkable

diversity of structures for stopping and starting ice growth. Trends Biochem. Sci. 2014, 39, 548-555.; Meister, K.; Lotze, S.; Olijve, L.L.; DeVries, A.L.; Duman, J.G.; Voets, I.K.; Bakker, H.J. Investigation of the ice-binding site of an insect antifreeze protein using sum-frequency generation spectroscopy. J. Phys. Chem. Lett. 2015, 6, 1162-1167.; Dolev, M.B.; Braslavsky, I.; Davies, P.L. Ice-binding proteins and their function. Annu. Rev. Biochem. 2016, 85, 515-542.; Hudait, A.; Odendahl, N.; Qiu, Y.; Paesani, F.; Molinero, V. Ice-nucleating and antifreeze proteins recognize ice through a diversity of anchored clathrate and icelike motifs. J. Am. Chem. Soc. 2018, 140, 4905-4912.)。提供多个氢键合和疏水位点的寡肽直接附接至Au NP上(图2c)。具有不同序列的Cys封端(C')的寡肽用于系统地研究不同部分对冰生长抑制的影响,包括按从N末端至C末端的顺序(Thr)_n-Cys、(Ser)_n-Cys、(Ala)_n-Cys和(Gly)_n。在本文中,为了在冰生长抑制方面相应不同的寡肽序列之间进行比较,将n固定为5。此外,对于(Thr)_n-Cys将n控制从2、5和7控制,以研究n对冰结合和所得冰生长抑制的影响。图2c中所示的相应寡肽的构象是从AAMD模拟确定的。在缀合这些合成寡肽之前,几乎除去了在Au NP合成过程中在Au NP表面上固有形成的有机配体,以避免它们对与冰相互作用的副作用。

[0116] 在混合试剂后,经由假共价键合自发进行寡肽的缀合。在缀合过程期间,通过经由UV-Vis吸收光谱法测量的LSPR消光的红移峰来原位监测此类合成寡肽在Au NP上的附接。这些LSPR峰位移相等地出现在所有若干模拟结果中,具有一致性(时域有限差分(FDTD)方法,图3所示)。

[0117] 注意,进行寡肽的这些附接直到LSPR消光峰不再移位。这意味着寡肽最大程度地附接至Au NP上,简言之完全缀合,并且本发明人已经使用了使用这些Au NP的冰生长抑制的上限。

[0118] 一旦将n固定为5,无论Au NP的形状或寡肽序列如何,在完全缀合后,观察到LSPR消光峰几乎一致的红移。相比之下,较长的寡肽缀合的Au NC的LSPR消光峰比较短的寡肽缀合的Au NC的LSPR消光峰红移更多(图3d)。

[0119] 然后,通过将寡肽与Au NP化学脱离并直接计数来定量所附接的寡肽密度(图4)。给定n为5聚体,无论Au NP的形状和肽序列如何,附接的寡肽(即(Thr)₅-Cys)的数量几乎一致在每nm² Au NP表面为0.13至0.17中。这些结果与LSPR消光峰的红移在寡肽缀合后以几乎一致的程度出现一致。Thr的n增加导致待附接至Au NP上的可及寡肽数量减少。当寡肽的长度从2聚体增加至7聚体时,每nm² Au NP表面的寡肽的数量分别从约0.23减少至约0.075。对于更长的寡肽,静电排斥和空间位阻变得更显著,并且结果,可附接至Au NP上的寡肽的最大密度降低。较长的寡肽缀合的Au NC的更多红移的LSPR消光峰(图3),即使在其表面密度相对较低的情况下也与理论预测一致(图5);这可归因于以下事实:与较短的寡肽缀合的Au NC的LSPR位移相比,较长的寡肽缀合的Au NC的LSPR位移对寡肽密度的增加更敏感。

[0120] 2.2抗冻Au胶体的冰重结晶抑制

[0121] 接下来,验证了寡肽缀合的Au NP对冰重结晶抑制(IRI)的影响(图6)。为此,进行了splat测定(即,非平衡、快速冷冻),其是用于IRI的定量的标准。(Voets, I.K. From ice-

binding proteins to bio-inspired antifreeze materials. *Soft Matter* 2017, 13, 4808-4823.; Biggs, C. I.; Bailey, T. L.; Graham, B.; Stubbs, C.; Fayter, A.; Gibson, M. I. Polymer mimics of biomacromolecular antifreezes. *Nat. Commun.* 2017, 8, 1546.; Wu, S.; Zhu, C.; He, Z.; Xue, H.; Fan, Q.; Song, Y.; Francisco, J. S.; Zeng, X. C.; Wang, J. Ion-specific ice recrystallization provides a facile approach for the fabrication of porous materials. *Nat. Commun.* 2017, 8, 15154.). 具体地说, 通过将去离子水滴置于冷却台 (-70°C) 上来制备冰片。然后, 在暗场 (DF) 模式下使用光学显微镜 (OM) 来验证重结晶冰晶粒尺寸的空间分布。基于 DFOM 图像, 追踪重结晶冰域的平均最大晶粒尺寸 (MLGS) 以推断 IRI 行为。为了避免可能由 splat 测定引起的假阳性, 还进行了蔗糖夹心测定, 以便双重确认 IRI 行为, 如从 splat 测定中观察到。

[0122] 类似于奥斯特瓦尔德熟化 (Gibson, M. I. Slowing the growth of ice with synthetic macromolecules: beyond antifreeze (glyco) proteins. *Polym. Chem.* 2010, 1, 1141-1152.; Budke, C.; Heggemann, C.; Koch, M.; Sewald, N.; Koop, T. Ice recrystallization kinetics in the presence of synthetic antifreeze glycoprotein analogues using the framework of LSW theory. *J. Phys. Chem. B* 2009, 113, 2865-2873.; Budke, C.; Dreyer, A.; Jaeger, J.; Gimpel, K.; Berkemeier, T.; Bonin, A. S.; Nagel, L.; Plattner, C.; DeVries, A. L.; Sewald, N.; Koop, T. Quantitative efficacy classification of ice recrystallization inhibition agents. *Cryst. Growth Des.* 2014, 14, 4285-4294.), 对于 30 分钟的退火时间, 重结晶导致冰晶粒尺寸持续增加 (图 6a 中的时间追踪的 MLGS, 以及图 6b 的第 1 行中的对应 DFOM 图像)。在退火 30 分钟后, 观察到约 89 μm 的 MLGS。以 0.2 nM 的浓度添加裸 Au NC 对冰重结晶的影响可忽略不计 (图 6a, 图 6b 的第 2 行)。注意, 每个冰域具有单一结晶度, 如图 7 中所示的 BFPOM 分析所证实。每个冰域内的微红裂纹源于基底与生长中单晶冰之间聚集和捕获的裸 Au NC。这一结果表明, 无寡肽的裸 Au NC 与重结晶冰晶的亲合力可忽略不计。

[0123] 在一方面, 当添加寡肽缀合的 Au NC 时, 在相同浓度 (0.2 nM) 下, 冰粒重结晶受到显著抑制。具有不同寡肽如 (Thr)₅-Cys、(Ser)₅-Cys、(Ala)₅-Cys 和 (Gly)₅-Cys 的 Au NC 的 IRI 行为在图 6a 中分别用绿色、红色、橙色、和紫色突出显示, 并且相应的 DFOM 图像在图 6b 中示出了。值得注意地, 就 IRI 而言, 发现 (Thr)₅-Cys-缀合的 Au NC 显著降低 MLGS 并表现出比其他 5 聚体寡肽更高的效应。(Ser)₅-Cys-和 (Gly)₅-Cys-缀合的 Au NC 诱导的 IRI 活性可忽略不计 (MLGS: 85 至 87 μm), 而 IRI 活性则被 (Ala)₅-Cys-缀合的 Au NC 中度诱导 (MLGS: 约 55 μm)。

[0124] 与 Ser 和 Gly 相比, 由于在其接枝处提供的额外甲基, Thr 更具疏水性, 同时, 由于在其接枝处提供的羟基, Thr 比 Ala 更具亲水性。总体而言, 可得出结论: 与 Ser、Ala 和 Gly 相比, Thr 在亲水性和疏水性之间更好地平衡。在这方面, (Thr)₅ 的羟基和甲基均可共同促进冰结合。蔗糖夹心测定的结果提供 (Thr)₅-Cys-缀合的 Au NC 的明显 IRI 效应的进一步证据, 其与 (Ser)₅-Cys-、(Ala)₅-Cys-和 (Gly)₅-Cys-缀合的 Au NC 形成显著对比 (图 8)。

[0125] 此外, 已经表明, 不同于有机分子冷冻保护剂如丙二醇、二甲基亚砜 (DMSO)、乙二醇 (EG) 和甘油的依数行为, 例如, MLGS 被还原的趋势根据从约 0.15 nM 的 (Thr)₅-Cys-缀合的 Au NC 的浓度逐渐饱和 (图 9a 和 b)。如上所述, 与 Au NCs 杂交的 (Thr)₅-Cys 的密度是每 nm² Au NC 表面约为 0.13; 并且当寡肽缀合的 Au 胶体的浓度为 0.2 nM 时, 附接至 Au NC 上的 (Thr)₅-

Cys的总浓度是约0.87 μ M。当0.87 μ M的(Thr)₅-Cys自由分散在去离子水中而无Au NC介导的组构时,可能观察不到任何IRI活性(图10)。对于自由分散的(Thr)₅-Cys,IRI开始显示超过100 μ M,并且随着(Thr)₅-Cys浓度增加,IRI活性也增加。表现出IRI所需的最小分子浓度比附接至Au NC上的(Thr)₅-Cys的分子浓度高10²倍,由此意味着附接至Au NC的平面几何形状的抗冻部分可能在生长中冰晶上更好地相互作用并随后抑制冰重结晶。

[0126] 此外,评价了寡肽缀合的Au NC的Thr单体数量(n)对IRI的影响(图9a和b)。发现5聚体优于7聚体。这可归因于以下事实:5聚体Thr(每nm² Au NC表面约为0.13)比7聚体Thr(每nm² Au NC表面约为0.075)更容易附接至Au NC。令人感兴趣地,尽管附接的寡肽的数量少得多,但在IRI方面,具有(Thr)₅的Au NC也优于(Thr)₂-缀合的Au NC(每nm² Au NC表面约为0.23),原因是这些(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC仍然能够比(Thr)₂-Cys-缀合的Au NC具有更高数量的Thr部分。这一结果与来自下面将描述的分子动力学(MD)模拟的结果良好匹配。

[0127] 此外,在约熔融温度(T_m)下冰的连续且缓慢结晶(除重结晶外)的环境下,而不是在远低于T_m的温度下快速冷却的环境下,也证实了裸Au NC与(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC之间在冰亲和力方面的这种显著差异。为此,本发明人使用了如图11a中所示的冷却台。特别地,使用Peltier装置在一侧将温度局部降低至-20℃以下,而另一侧保持在15℃至20℃。以这种方式,从-20℃至室温诱导4cm的空间温度梯度。将去离子水引入位于上述装置中的玻璃微流体通道中,以诱导单晶冰从-20℃逐渐生长至环境温度区域(图11b)。缺乏晶界(图11b)与单色明场偏光显微镜(BFPOM)图像相结合(图12)提供了生长中的冰的单结晶性的证据。

[0128] 在单晶冰的这种定向生长过程中,发现裸Au NC被从生长中的冰晶上推开,并随机累积在冰和水之间的界面处(图11c和d)。在另一方面,(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC自发地吞没在生长中的单晶冰中(图11e和f)。特别地,已经证实,(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC均匀地分布在生长中的冰晶内。在这方面,认为AF(G)P激发的(Thr)₅寡肽在改善冰与Au NC之间的界面接触和所得的IRI效应中起关键作用。如从DFOM图像中观察到,单体和二聚体(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC均匀地分散在生长中的冰中,而从单体跨越至五聚体的裸Au NC的各种簇模体随机聚集在水/冰界面处(图11、13和15)。

[0129] 注意,(Thr)₅-Cys随机组构到Au NC上,这与AF(G)P的抗冻部分形成显著对比。AF(G)P的防冻部分的规整性可能与冰结晶度有效地相称。(Garnham,C.P.;Campbell,R.L.;Davies,P.L.Anchored clathrate waters bind antifreeze proteins to ice.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2011,108,7363-7367.;Meister,K.;Lotze,S.;Olijve,L.L.;DeVries,A.L.;Duman,J.G.;Voets,I.K.;Bakker,H.J.Investigation of the ice-binding site of an insect antifreeze protein using sum-frequency generation spectroscopy.J.Phys.Chem.Lett.2015,6,1162-1167.;Hudait,A.;Odendahl,N.;Qiu,Y.;Paesani,F.;Molinero,V.Ice-nucleating and antifreeze proteins recognize ice through a diversity of anchored clathrate and icelike motifs.J.Am.Chem.Soc.2018,140,4905-4912.;Nutt,D.R.;Smith,J.C.Dual function of the hydration layer around an antifreeze protein revealed by atomistic molecular dynamics simulations.J.Am.Chem.Soc.2008,130,13066-13073.)。如此,AF(G)P可结合至冰晶的特定平面,而本发明的AF(G)P缀合的Au NC可结合至所有冰晶平面,这

是由于(Thr)₅-Cys的空间排布的随机性。可通过在单晶冰的类似平衡的定向生长下不存在动态冰成型(DIS)来确认本发明的AF(G)P缀合的Au NC的非特异性结合。生长中的冰与水之间的界面线(即图11e中的冷冻锋面)从过冷的地方均匀地生长至环境温度区域。相比之下,添加已知结合至冰的特定平面(即棱柱平面)的乙酸锆(ZrAc)选择性地抑制了相应冰晶平面的生长,因为由于DIS而产生的锯齿状形态在生长中的冰与水之间的边界处清楚地观察到(图15a和b)。蔗糖辅助的DIS测定提供了在根据本发明的AF(G)P-缀合的Au NC中不存在DIS的证据(图15c)。由于源自DIS的生长中的冰的锋利突出物可能容易地破裂细胞或组织(Ishiguro,H.;Rubinsky,B.Mechanical interactions between ice crystals and red blood cells during directional solidification.Cryobiology 1994,31,483-500.; Wang,J.H.A comprehensive evaluation of the effects and mechanisms of antifreeze proteins during lowtemperature preservation.Cryobiology 2000,41,1-9.),所以在使用冷冻保护剂的实际生物医学应用方面,冰生长的全方位抑制可能是有利的。

[0130] 使用MD模拟在理论上证实了寡肽缀合的Au NC与生长中的冰之间的这种改善的界面相互作用。使用AA模拟来反映图11中的实际实验条件。构建了连续冰生长系统,其中冰从底部生长至顶部,如图16a所示。Au NC被设置为置于生长中的冰晶的次级棱柱平面上,这被称为生长最快的面(1 1 2 0)。生长中的冰晶与Au NC之间的适当空间(1nm)允许种冰(ice seeding)效应最小化,同时诱导自由接触。为了模拟本发明的寡肽缀合的Au NC,将具有(Thr)₅-Cys、(Ser)₅-Cys、(Ala)₅-Cys和(Gly)₅-Cys序列的寡肽设置为随机附接至Au NC。在268K下持续冰生长300ns的过程中,单独追踪了裸Au NC和寡肽缀合的Au NC。

[0131] 与实验结果相似,裸Au NC被生长中的冰晶连续向上推,而寡肽缀合的Au NC直接吸附至冰晶上并完全抑制冰生长(图16a)。如此,通过(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的直接吸附而被抑制的生长中的冰平面变得更加弯曲,从而诱导开尔文(Kelvin)效应。然而,其他寡肽缀合的Au NC在268K下较少吸附至生长中的冰晶上,以使得在冰生长过程中维持平坦的冷冻锋面而无显著曲率。实际上,(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的z方向移动几乎保持完整(0.04nm的位移持续300ns),这与裸Au NC(1.2nm的位移持续300ns)或(Ser)₅-Cys/(Gly)₅-Cys-缀合的Au NC(1.0至1.2的位移持续300ns)的相当大的位移形成显著对比。同时,(Ala)₅-Cys-缀合的Au NC表现出0.8nm的中等位移持续300ns。来自MD模拟的这些预测与IRI实验结果良好匹配(图6)。值得注意的是,通过将温度从268K进一步降低至263K,发生在生长中的冰内(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC的完全吞没(图17)。

[0132] 此外,测量了在5聚体-Thr/-Ser/-Ala/-Gly寡肽缀合的Au NC与冰水分子之间的结合期间的自由能变化($\Delta G_{\text{结合}}$)和氢键合寿命(图16c和d)。类似于关于IRI/冰亲和力的实验分析和关于z方向移动的理论分析,Au NC上的Thr组件在它们吸附至生长中的冰晶上期间表现出自由能的最大降低和最长的氢键合寿命:其中 $\Delta G_{\text{结合}}$ 和氢键合寿命按Thr、Ala、Ser和Gly的顺序。再次,已经证实由于氢键合和疏水性基团的相互作用,通过寡肽缀合的Au NC直接吸附至生长中的冰上而协同抑制了冰的生长。

[0133] 通过MD模拟,还研究了在z方向移动方面n对IRI的影响(图18)。一旦附接至Au NC上的寡肽的表面密度固定,(Thr)₅-Cys就优于(Thr)₂-Cys和(Thr)₇-Cys两者。此外,(Thr)₅-Cys数量的一半表现出比全数量的情况更好的性能。这些结果与实验结果完全一致。

[0134] 2.3 Au胶体形状对IRI行为的影响

[0135] 评价了Au胶体形状对IRI行为的影响(图19)。由于使用具有不同形状的金胶体,因此可调节冰与寡肽组件之间的界面接触(图19a)。在本文中,Au NS、NO和NC的所有尺寸均等于75nm;将所有(Thr)₅-Cys-缀合的Au NP的浓度设置为0.2nM。如图19b所示,IRI效应按照Au NC、NO和NS的顺序降低。这一实验结果表明,与点接触相比,小平面接触可能有利于生长中的冰与(Thr)₅-Cys-缀合的Au胶体之间的界面相互作用。

[0136] 通过大规模AA MD模拟进一步证实了Au胶体形状对IRI行为的这种影响。然后,比较了Au NS与Au NC之间的冰生长的抑制(图19c和d),两者都附接有(Thr)₅-Cys。在这种MD模拟中,将Au NS和NC设置为以相同间距规则排布。在268K下连续冰生长100ns期间,Au NC之间的生长中的冰的曲率半径小于Au NS。这种现象主要是因为Au NC可比Au NS更一致地接触生长中的冰晶。如此,通过减小生长中的冰晶的曲率半径,从而由于增强的开尔文效应而导致冷冻温度的更大降低,Au NC的小平面接触确实比Au NS的点接触更具优势。实际上,超过0.6nM的(Thr)₅-Cys-缀合的Au NC开始诱导0.01℃的热滞后(TH),而Au NS则没有诱导热滞后(图20)。因此,从上述结果可看出,胶体冷冻保护剂的形状在增强IRI效应中起关键作用。

[0137] 出于权利要求书的目的,以下描述的权利要求不应以任何方式解释为比其字面意义更窄,并且因此说明书中的说明性实施方案不应被理解为权利要求。因此,应当理解,已经通过举例的方式描述了本发明并且不意图限制权利要求的范围。因此,本发明仅由以下权利要求书限制。本申请中引用的所有出版物、公布的专利、专利申请、书籍和期刊文章的全部内容以引用的方式并入本文。

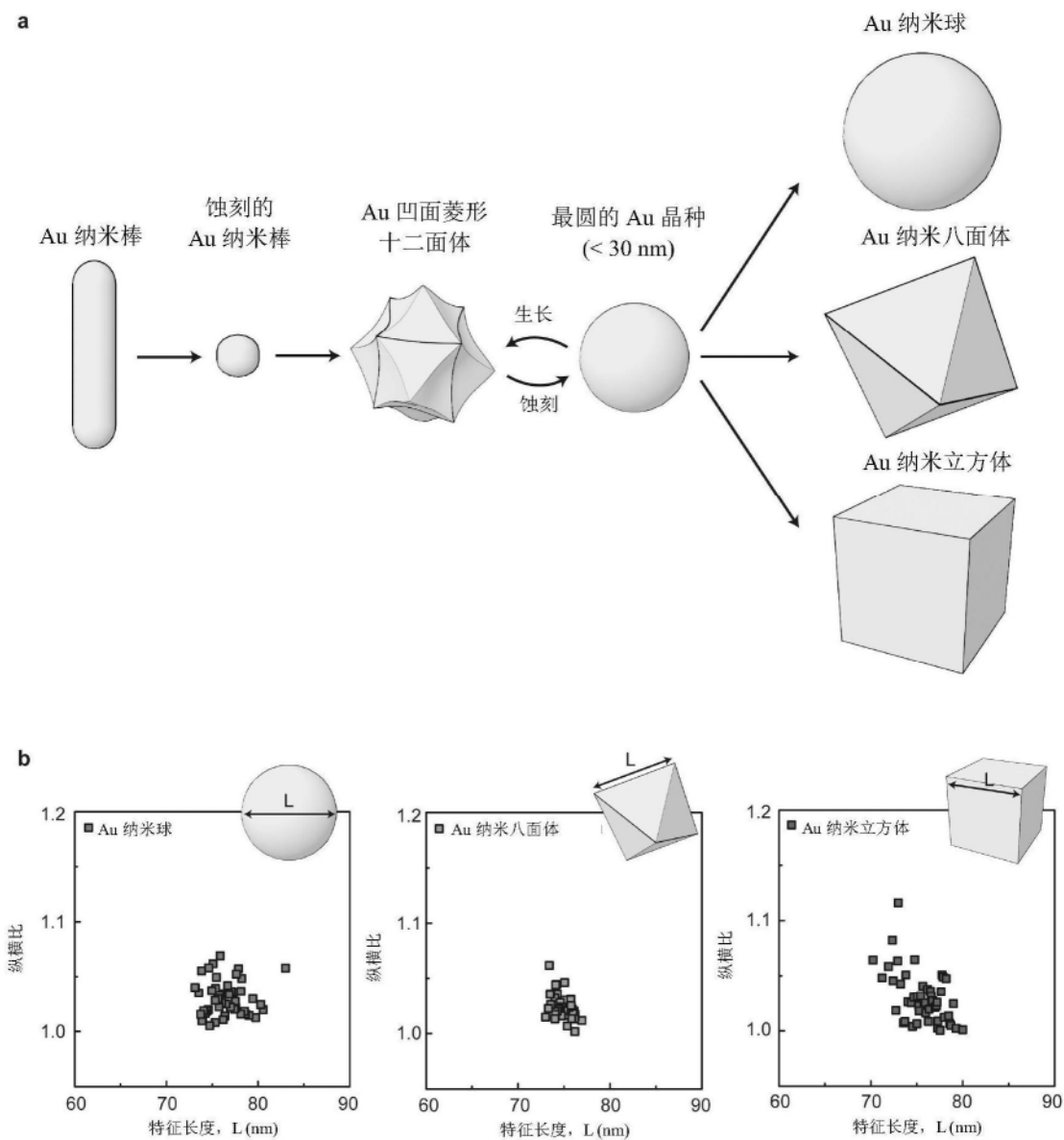


图1A

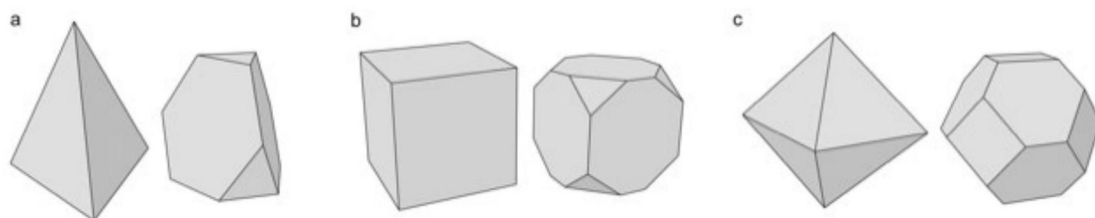


图1B

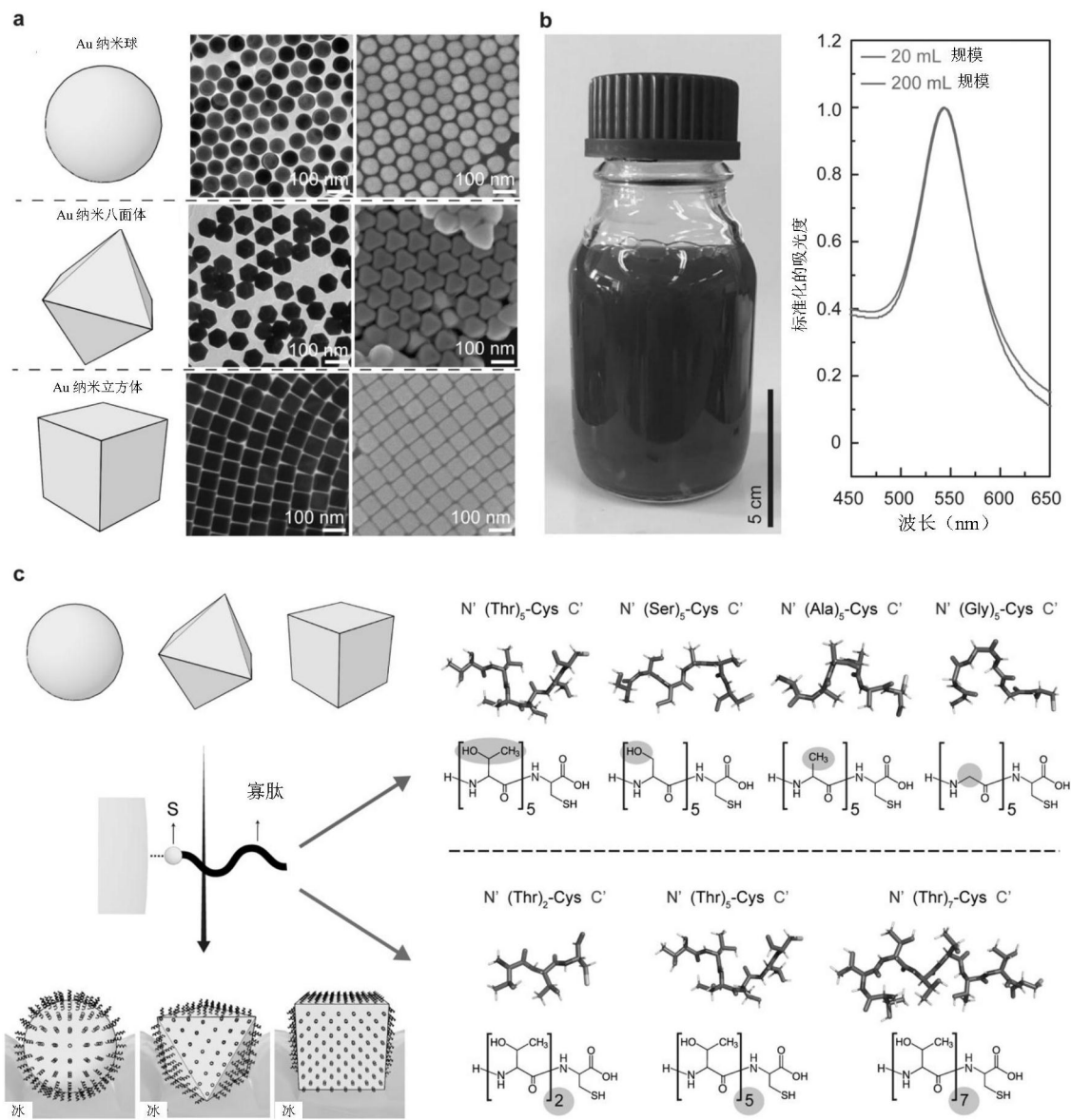


图2

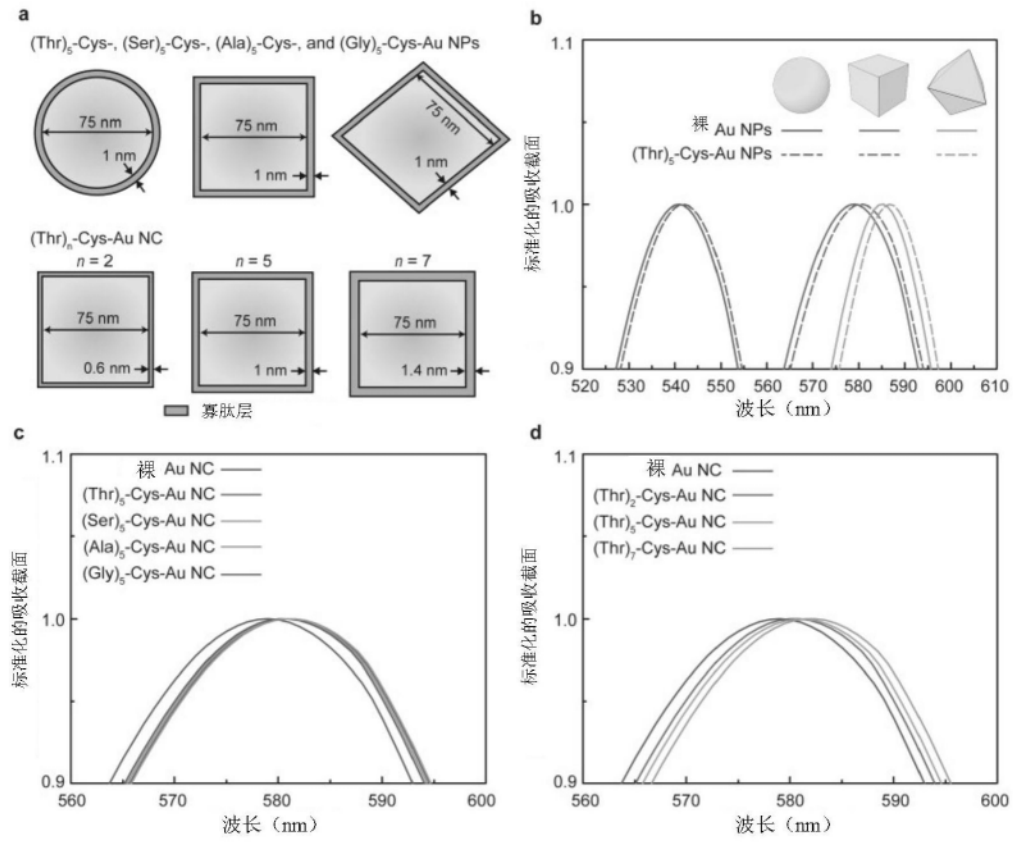


图3

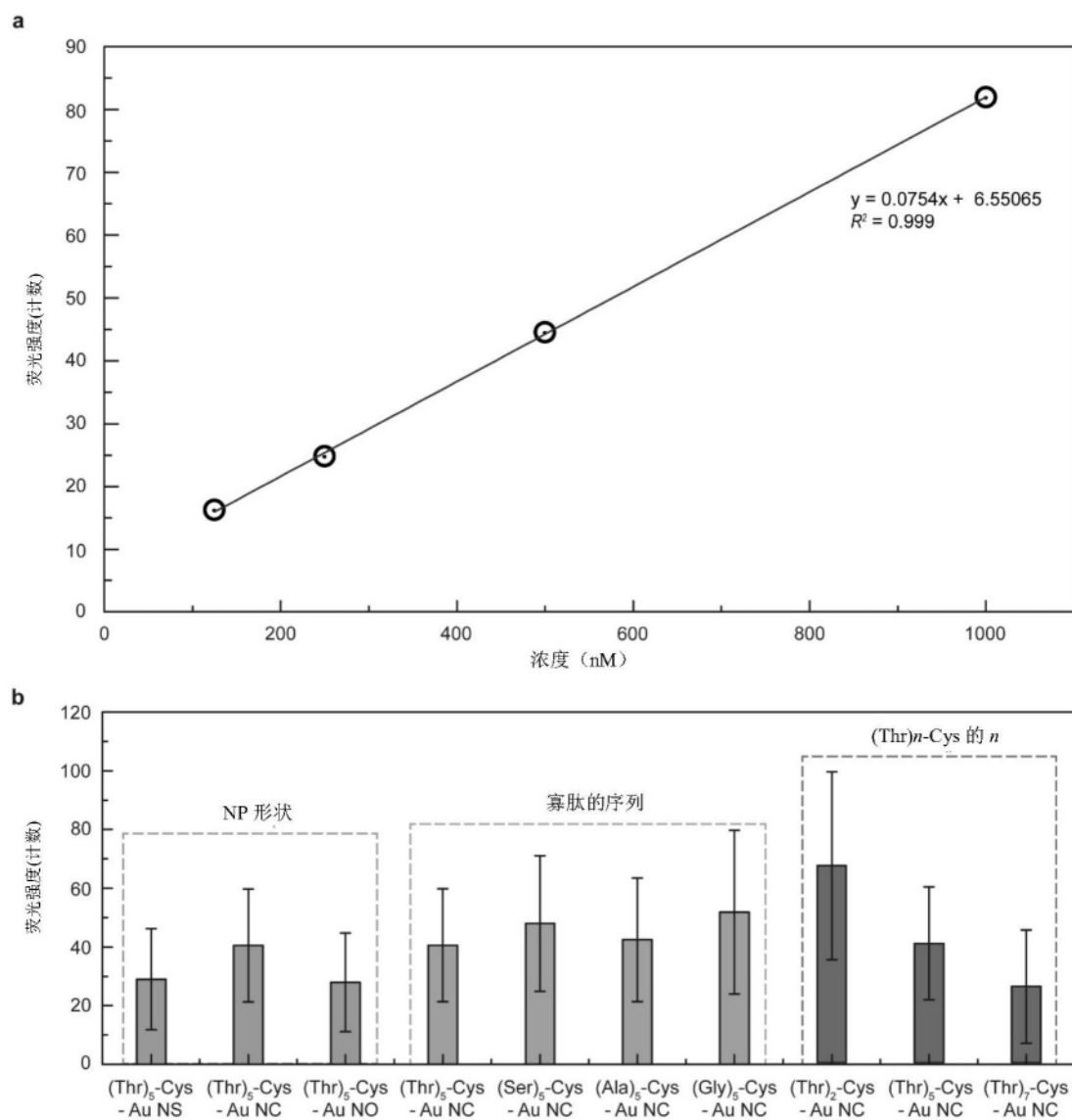


图4

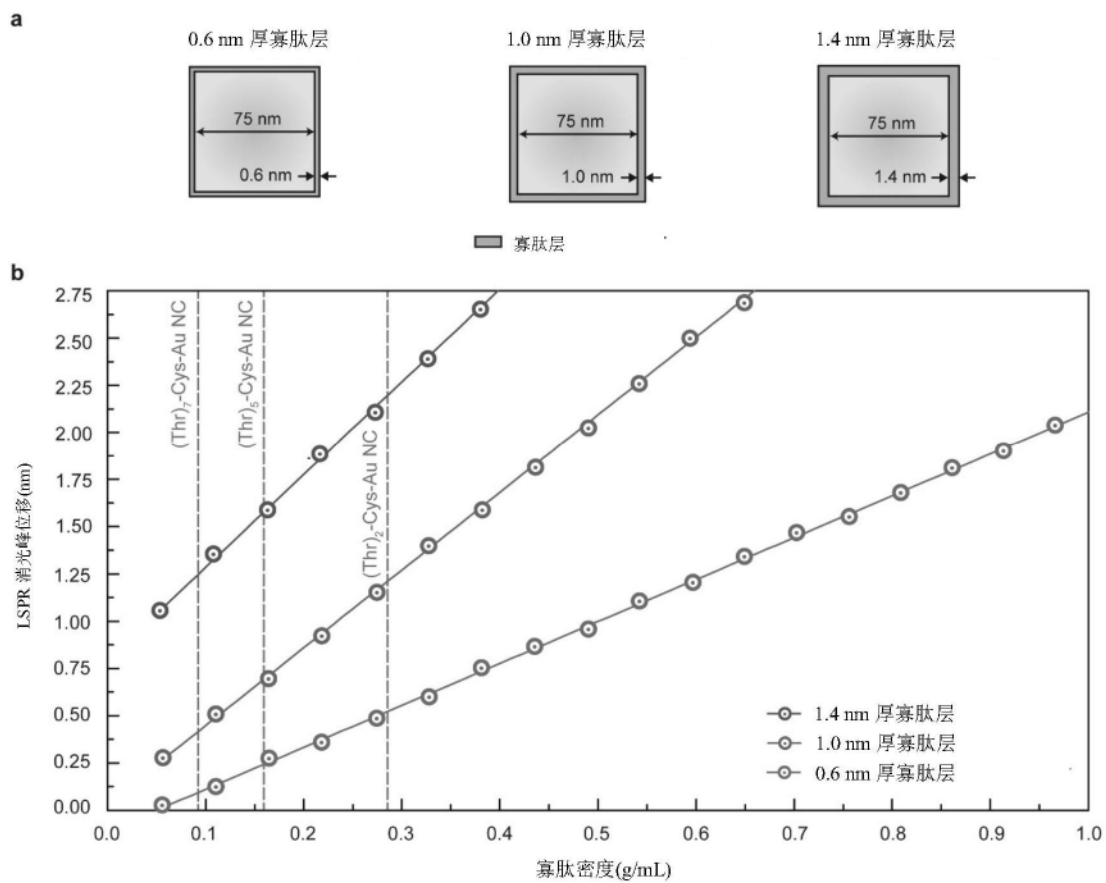


图5

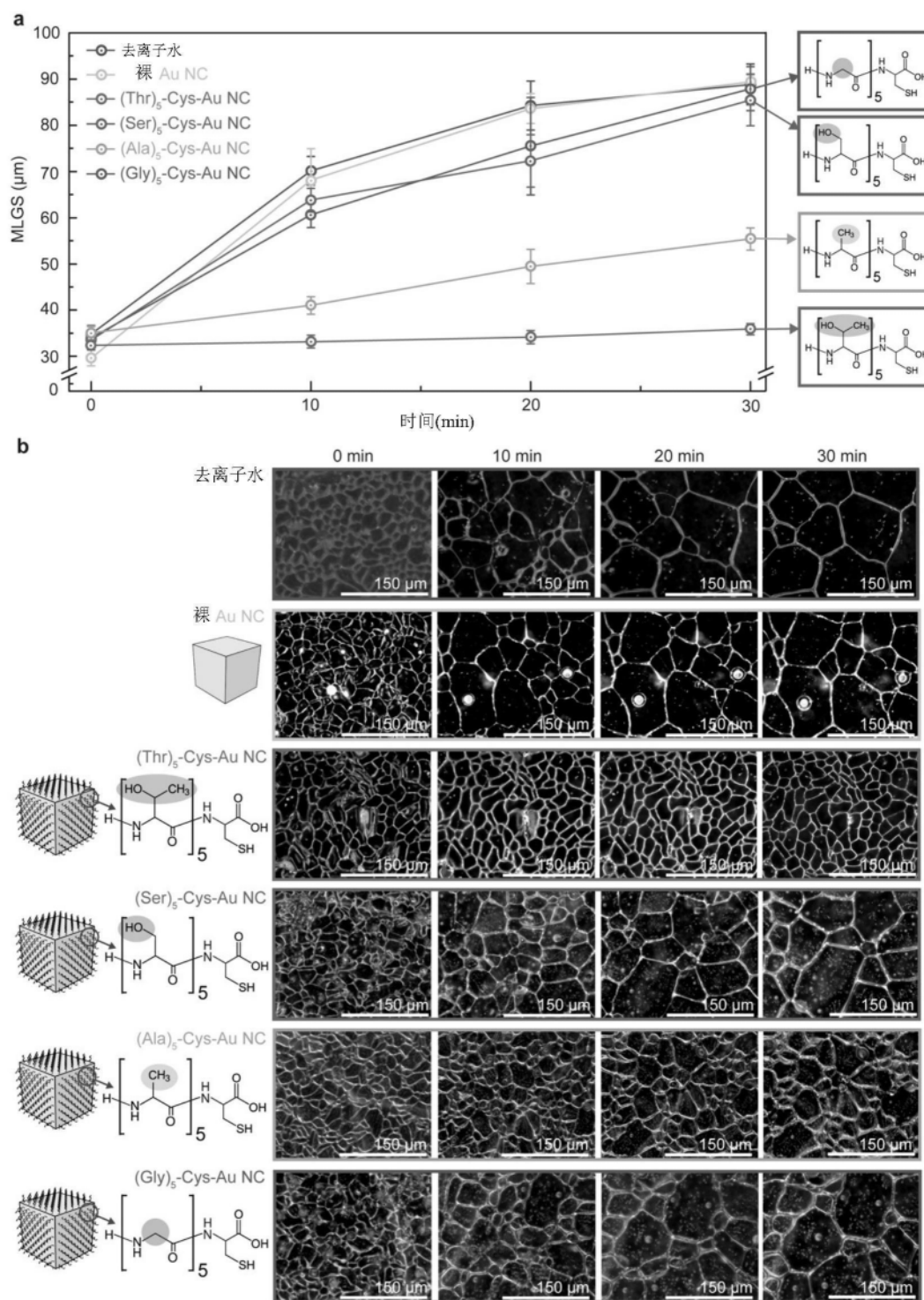


图6

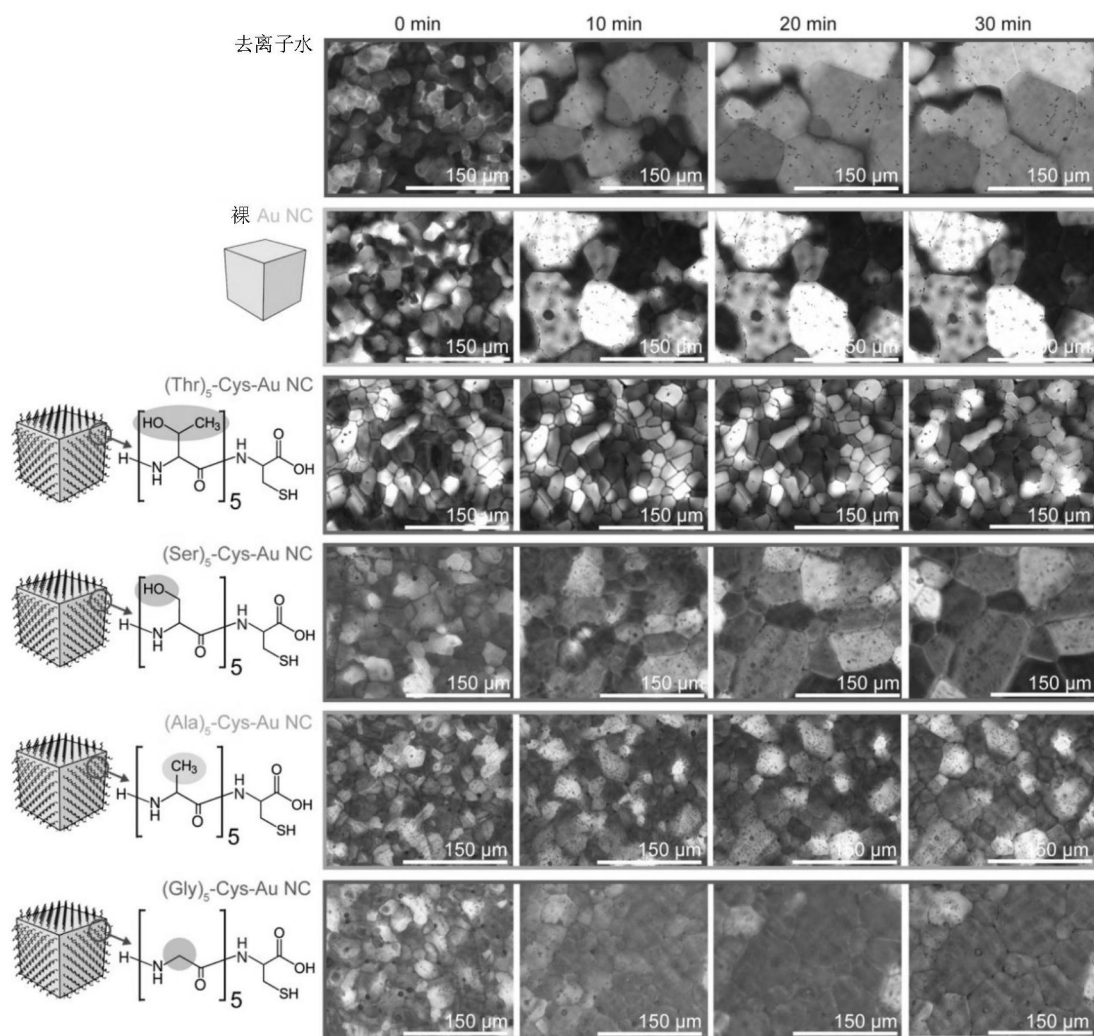


图7

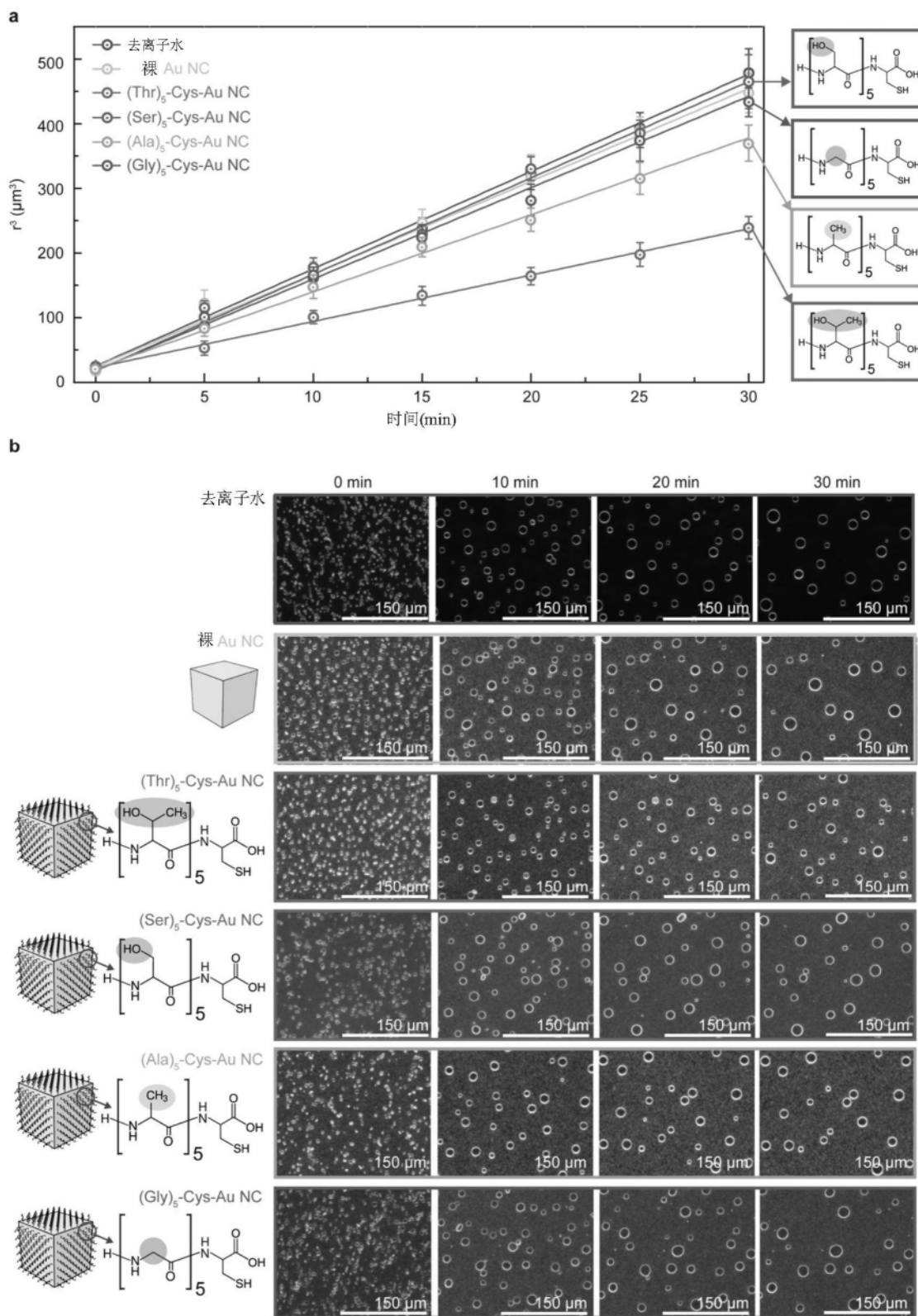


图8

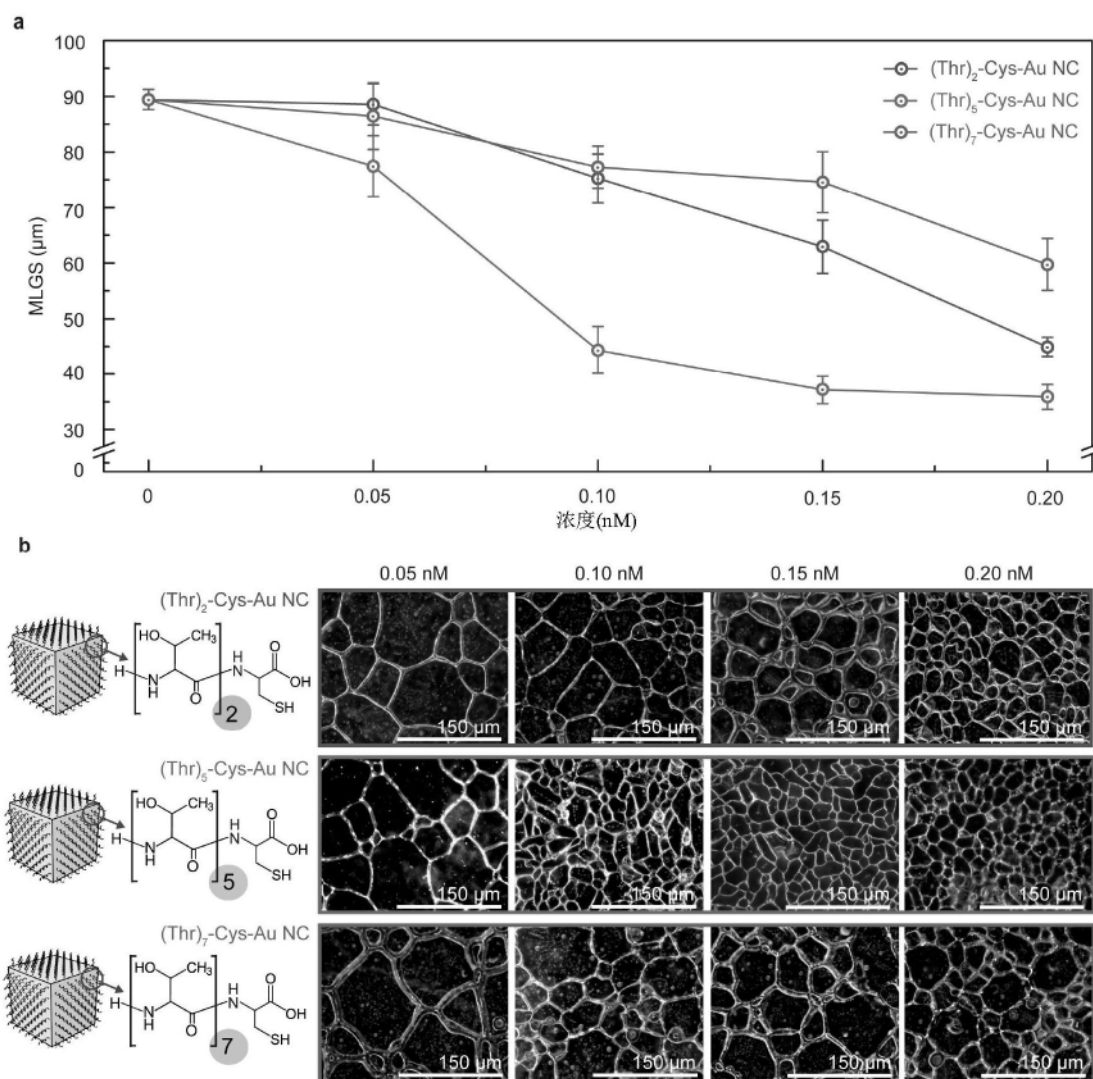


图9

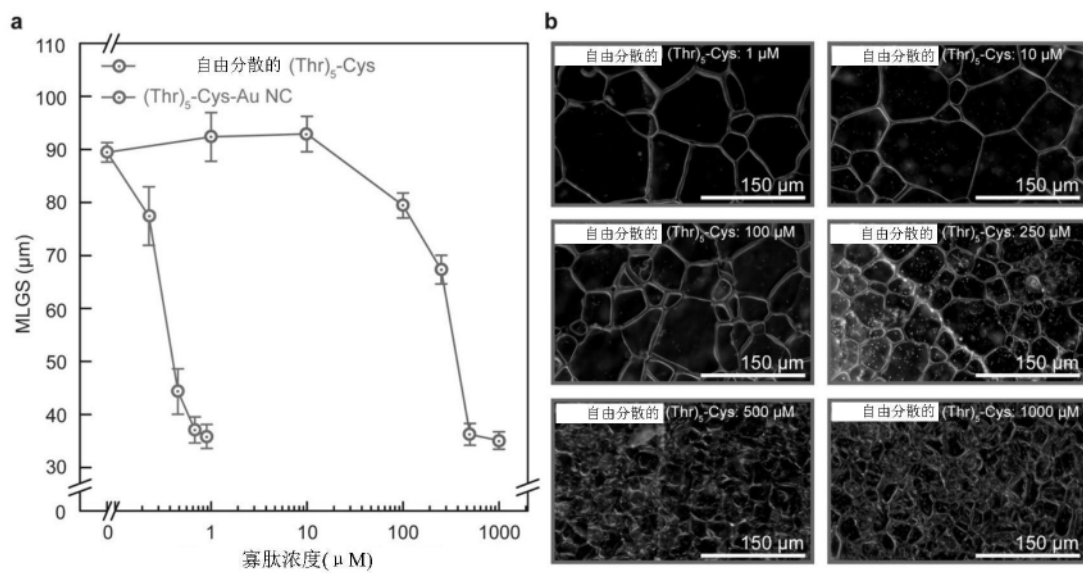


图10

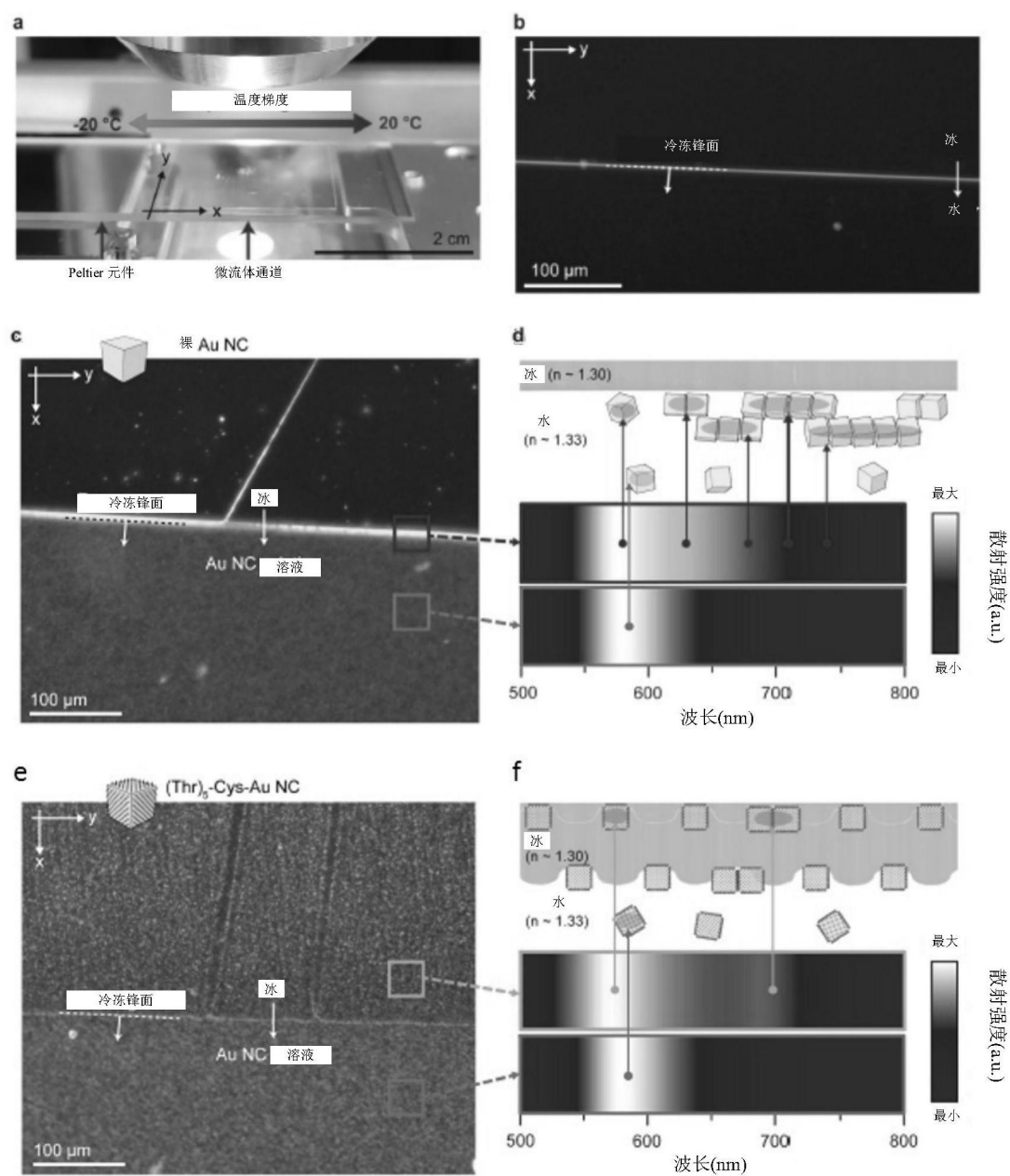


图11

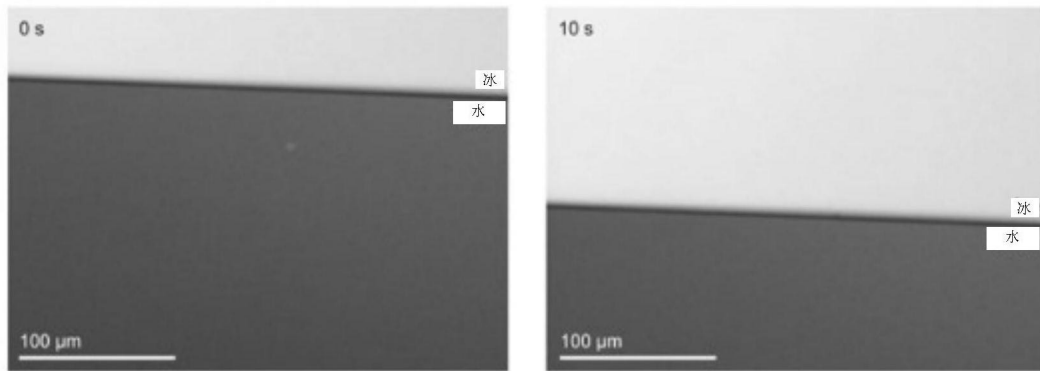


图12

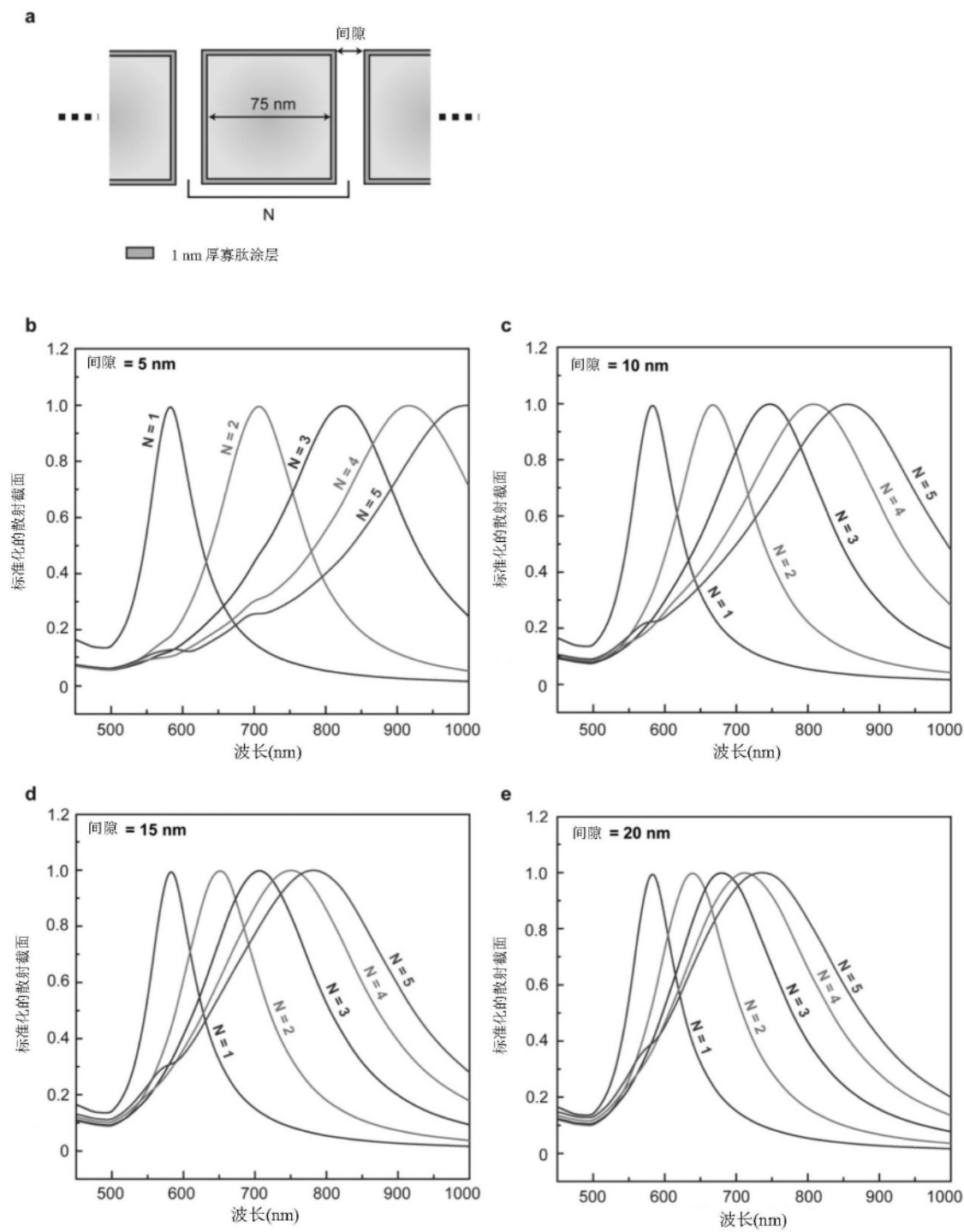


图13

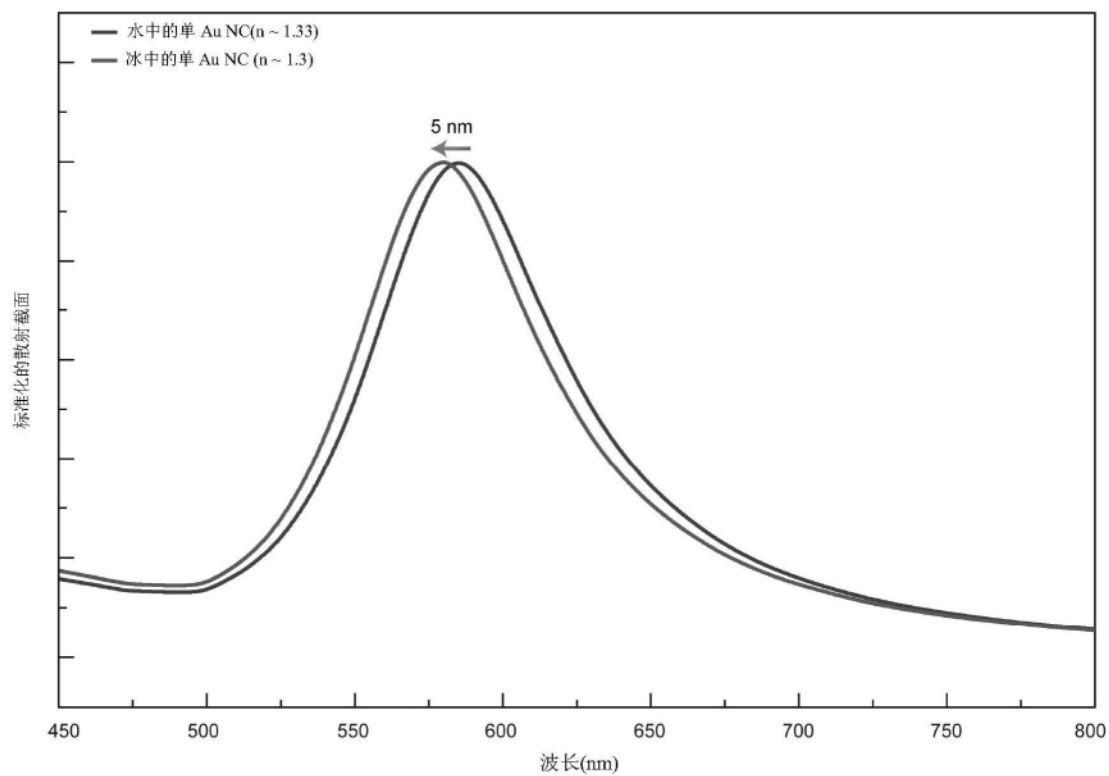


图14

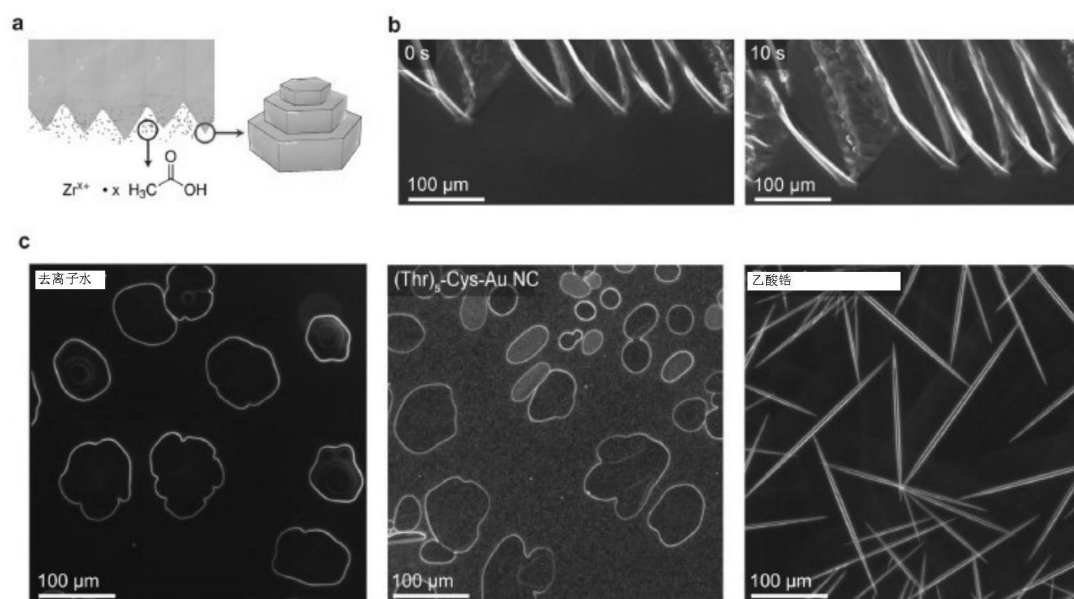


图15

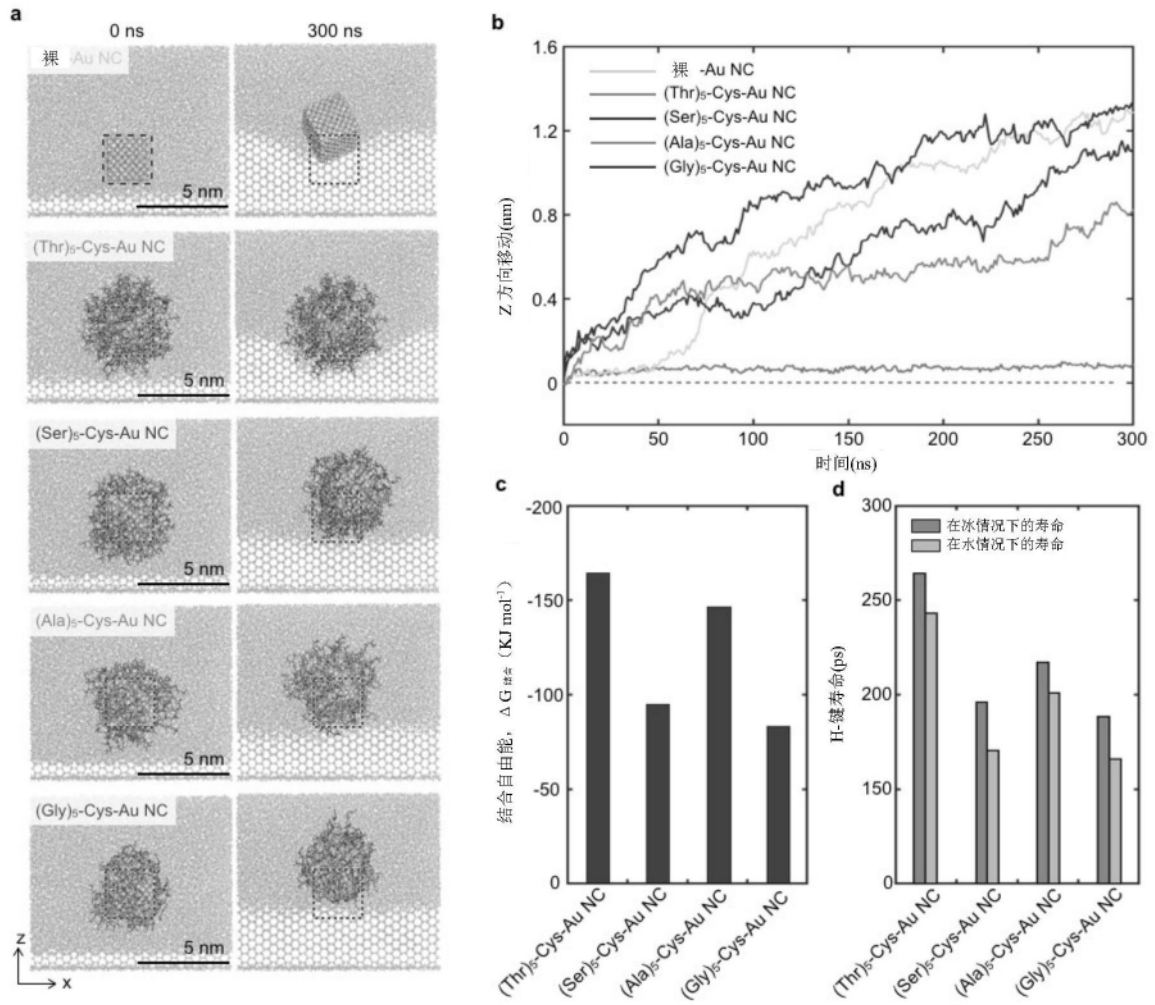


图16

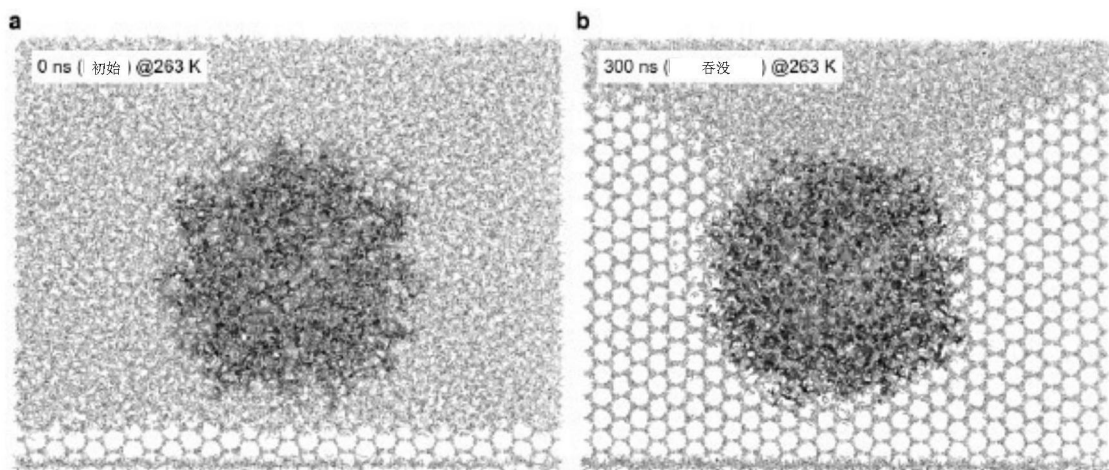


图17

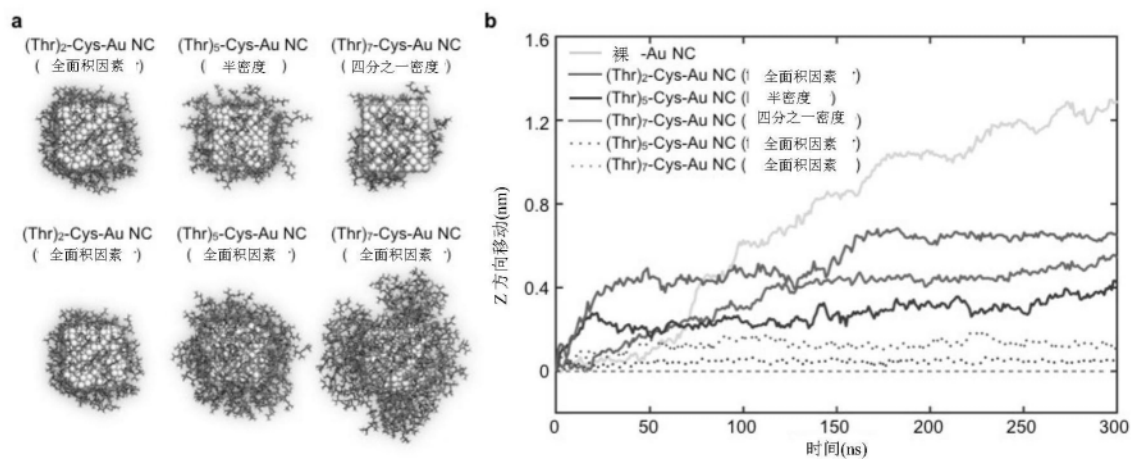


图18

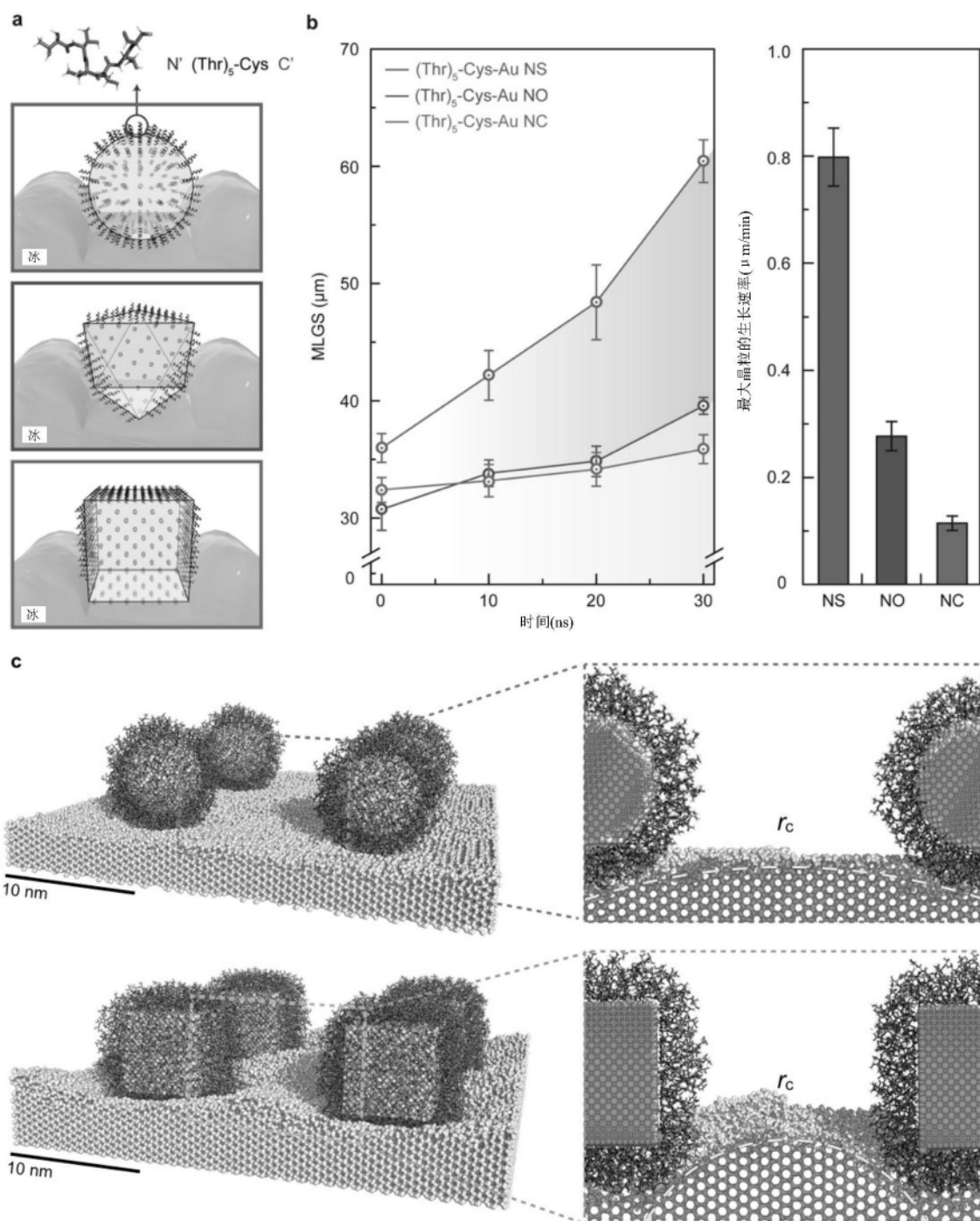


图19

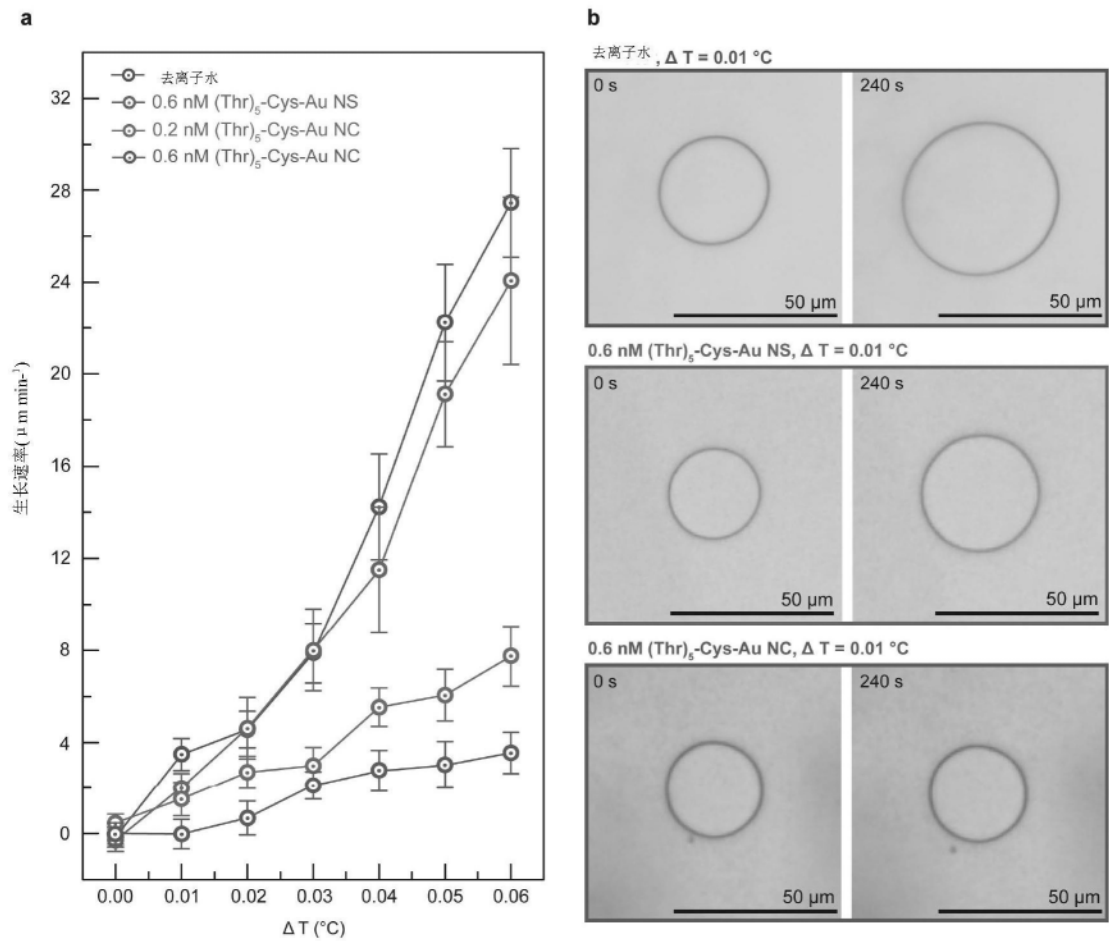


图20