(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117222437 A
(43)申请公布日 2023.12.12

(21)申请号 202280030065.3
(22)申请日 2022.04.22
(30)优先权数据
21169934.3 2021.04.22 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.10.20
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/060737 2022.04.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/223802 EN 2022.10.27
(71)申请人 慕尼黑工业大学
地址 德国慕尼黑
(72)发明人 沃特·艾林戈 克里斯蒂安·西格亨德里克·迪兹
(74)专利代理机构 北京市立方律师事务所 11330
专利代理师 杨剑
(51)Int.Cl.
A61K 49/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书16页 附图6页

(54)发明名称

构象切换的纳米结构

(57)摘要

本发明涉及一种可条件切换的纳米结构以及包含所述纳米结构的系统。具体而言,本发明涉及一种将至少一种分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法。本发明进一步基于下述发现,即偶联分子例如抗体或抗原结合片段可以在其他不利的条件下稳定纳米结构的亚基相互作用。此外,本发明还涉及一种包含本发明的纳米结构的系统以及利用本发明的纳米结构或系统的方法。最后,还提供了包含至少一个或多个纳米结构的物质和/或组合物,其用作药物或用于诊断方法。

CN 117222437 A

1.一种纳米结构,其包含至少两个偶联位点,其中所述至少两个偶联位点可以与至少一个偶联分子结合,并且其中所述至少两个偶联位点被配置成偶联位点组,任选地其中一个偶联位点组被配置成与一个偶联分子结合。

2.根据权利要求1所述的纳米结构,其中所述纳米结构包含至少一个第一实体和至少一个第二实体,其中所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体中的每一者包含至少一个偶联位点组的至少一个偶联位点,优选地其中所述至少一个第一实体的至少一个偶联位点和所述至少一个第二实体的至少一个偶联位点位于所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体的对称位置上,任选地其中当所述至少一个偶联分子结合到所述至少一个偶联位点组时,所述至少一个偶联分子被配置成将所述纳米结构的至少一个第一实体偶联到所述纳米结构的至少一个第二实体。

3.根据权利要求1或2所述的纳米结构,其中所述纳米结构包含多个所述至少一个第一实体和多个所述至少一个第二实体,例如至少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个或任何数量的所述至少一个第一实体,以及至少1、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个或任何数量的所述至少一个第二实体,任选地其中所述纳米结构包含多个偶联位点组,优选地至少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个或任何数量的偶联位点组,优选地其中每个偶联位点组由两个偶联位点组成。

4.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述纳米结构被配置成呈现至少一种第一构型(A)和至少一种第二构型(B),任选地呈现至少一种第三构型(C)、至少一种第四构型(D)或任何其他数量的构型。

5.根据权利要求4所述的纳米结构,其中当至少一个偶联分子结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第一构型(A),和/或其中当至少一个偶联分子不结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第二构型(B),任选地其中当存在少量或不存在至少一个竞争分子时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第一构型(A),和/或其中当存在更大量的至少一个竞争分子时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第二构型(B)。

6.根据权利要求4或5所述的纳米结构,其中所述纳米结构被配置成在第一溶液中呈现所述至少一种第一构型(A),其中所述第一溶液与第二溶液相比优选包含更高浓度的镁离子,和/或其中所述纳米结构被配置成在所述第二溶液中呈现所述至少一种第二构型(B),其中所述第二溶液与所述第一溶液相比优选包含更低浓度的镁离子,任选地其中所述第一溶液的镁离子浓度高于20mM,和/或所述第二溶液的镁离子浓度低于20mM。

7.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述纳米结构包含选自由核酸例如DNA、RNA、DNA适体、RNA适体或肽核酸(PNA),多肽,肽,糖蛋白,肽模拟物以及抗原结合构建体例如抗体、抗体样分子、抗原结合衍生物或其抗原结合片段组成的组的至少一种分子。

8.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述纳米结构至少部分由DNA折纸结构形成,

其中所述DNA折纸结构包含至少一个支架链;

其中所述DNA折纸结构还包含多个单链寡核苷酸装订链;

其中每个装订链与至少一个支架链至少部分互补;并且

其中所述装订链中的每一者被配置成与所述至少一个支架链中的至少一者结合,其中所述至少一个支架链被折叠和/或排列,以便形成所需纳米结构。

9.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述至少一个偶联位点是分子,优选地其中所述至少一个偶联位点和/或所述至少一个偶联分子是选自由抗原,抗原性片段,抗原模拟物,抗原结合构建体例如抗体、抗体样分子、抗体模拟物、抗原结合衍生物或抗原结合片段,DNA链,生物素分子,链霉亲和素分子,马来酰亚胺-硫醇化学分子,点击化学分子,SNAP标签蛋白和CLIP标签分子组成的组的分子,优选地其中所述偶联分子是抗原结合构建体例如抗体、抗体样分子、抗体模拟物、抗原结合衍生物或其抗原结合片段,并且其中所述偶联位点是抗原、抗原性片段和/或抗原模拟物。

10.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述偶联分子是IgG抗体、IgG抗体片段、IgG抗体模拟物、IgM抗体、IgM抗体片段、IgM抗体模拟物、IgD抗体、IgD抗体片段、IgD抗体模拟物、IgA抗体、IgA抗体片段、IgA抗体模拟物、IgE抗体、IgE抗体片段或IgE抗体模拟物,优选地其中所述抗体、抗体片段或抗体模拟物包含两个相同的抗原结合位点,更优选地其中所述抗原结合位点与偶联位点组的所述至少两个偶联位点结合。

11.根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述纳米结构包含最大长度,并且其中所述最大长度小于1000nm,优选地小于500nm,例如100nm。

12.一种系统,其包含根据前述权利要求中任一项所述的纳米结构,其中所述系统包含:

(i)至少一个纳米结构,其包含至少两个偶联位点,其中所述至少两个偶联位点可以与至少一个偶联分子结合,并且其中所述至少两个偶联位点被配置成偶联位点组,和

(ii)至少一个偶联分子。

13.根据权利要求12所述的系统,其中所述系统包含:

至少一个纳米结构,其包含至少一个第一实体和至少一个第二实体,其中所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体中的每一者包含至少一个偶联位点组的至少一个偶联位点,优选地其中所述至少一个第一实体上的至少一个偶联位点和所述至少一个第二实体上的至少一个偶联位点位于所述实体的对称位置上,和

至少一个偶联分子,优选为多个偶联分子,

其中当所述至少一个偶联分子结合到所述至少一个偶联位点组时,所述至少一个偶联分子被配置成将所述纳米结构的至少一个第一实体偶联到所述纳米结构的至少一个第二实体。

14.一种将至少一个分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法,其中所述方法包括:

(i)提供根据权利要求1至11中任一项所述的纳米结构;

(ii)提供至少一个偶联分子,

其中当(ii)中所提供的至少一个偶联分子结合到(i)中所提供的纳米结构的至少一个偶联位点组时,所述纳米结构呈现至少一种第一构型(A),和

(iii)鉴定所述至少一个分子,

其中所述至少一个分子优选为竞争分子,

其中所述纳米结构在鉴定鉴定所述至少一个分子后呈现至少一种第二构型(B),

从而能够将至少一个分子的鉴定与所述纳米结构的构象重构联系起来,

任选地其中所述纳米结构在至少一种第一构型(A)中包封有分子或第二纳米结构,优选地其中所述分子选自治疗剂分子和/或货物分子,

进一步任选地其中当所述纳米结构呈现所述至少一种第二构型(B)时,所述分子或第二纳米结构、优选选自治疗剂分子和/或货物分子的所述分子,在所述纳米结构的构象重构后被释放和/或激活。

15.包含至少一个或多个根据权利要求1至11中任一项所述的纳米结构的组合物或者根据权利要求12或13所述的系统,其用作药物和/或用于诊断方法。

构象切换的纳米结构

技术领域

[0001] 本发明涉及可条件切换的纳米结构和包含所述纳米结构的系统。具体而言,本发明涉及一种将至少一种分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法。本发明进一步基于下述发现,即偶联分子例如抗体或抗原结合片段可以在其他不利的条件下稳定纳米结构的亚基相互作用。此外,本发明还涉及一种包含本发明的纳米结构的系统以及利用本发明的纳米结构或系统的方法。最后,还提供了包含至少一个或多个纳米结构的物质和/或组合物,其用作药物或用于诊断方法。

背景技术

[0002] 分子识别是生命系统的基本特点,并且为例如适应性免疫系统识别T细胞或跨细胞膜的分子信号转导所需。现代医学的一个关键进展是开发出具有类似的分子识别特征的疗法,例如靶向特定细胞表面受体的治疗性抗体。DNA纳米技术领域的最新进展使其成为开发“智能”纳米级装置的潜在候选者,这些装置显示出与在天然存在的分子中观察到的类似的分子识别特征。为了开发此类智能纳米结构,必须将分子识别与信号转导机制偶联,提供通常但不限于导致货物从药物载体释放或激活治疗剂的构象重构。

[0003] 近年来,已经开发出制造纳米结构的新方法。它们包括如US 7,842,793 B3中公开的用于制造核酸纳米结构的方法。所述公开涉及一种被称为“DNA折纸”的技术,这是一种在可以被设计成具有预定结构的核酸纳米结构的基础上产生纳米级装置、系统和酶工厂的方法。DNA折纸利用DNA分子产生纳米级的三维结构。可以在折纸结构上放置化学修饰或单链DNA突出部分,以设计和构建核酸纳米结构的所需结构,并将DNA折纸结构与其他分子相连。因此,DNA折纸结构可以用于调节细胞信号传导机制。

[0004] 最近,DNA折纸技术已被用于制造不同的纳米级装置。例如,WO 2012/061719 A2公开了可用于将生物活性实体靶向递送至特定细胞群体的DNA折纸装置。尽管这种装置可能能够实现生物活性实体的靶向递送,但它依赖于特定的相互作用分子,特别是可以与两个不同的结合靶结合的适体。

[0005] US 9,863,930 B2公开了可用于检测不同分析物的各种带有分子条形码的双稳态开关。具体而言,所述带有分子条形码的双稳态开关可以使用DNA折纸制造。

[0006] 然而,控制由分子信号诱导的纳米粒子重构的模块的整合在很大程度上仍然是未得到满足的挑战。迄今为止,开发的几种显示出某种分子重构的DNA折纸纳米粒子大多依赖于结构切换适体。通常,这些适体将结构锁定在亚稳定的封闭构型中。抗原与所述适体锁的结合诱导平衡向开放状态的转变。使用结构切换适体的一个固有限制是开放与关闭状态的稳定性之间的这种复杂平衡,这需要对不同的结构和适体类型进行广泛的调整。此外,已知只有有限数量的适体可用于更少数量的抗原,并且它们通常以中等亲和力结合,或者需要外来金属离子才能正常发挥作用。最后,适体表现出很大的结构异质性,这使得模块化设计本身就很困难。

[0007] 鉴于上述情况,在本领域中对开发允许将分子识别与信号转导机制偶联的纳米结

构存在着持续的需求。还迫切需要开发能够识别大量分子并在识别后可靠地改变构象的纳米结构。此外,还迫切需要以高亲和力与靶分子结合的纳米结构。本发明的目的是克服或至少减轻现有技术的缺点和不利之处。也就是说,本发明的目的是提供新型构象切换的纳米结构。

发明内容

[0008] 通常,并且通过简要描述的方式,本发明的主要方面可以描述如下:

[0009] 第一方面,本发明涉及一种包含至少两个偶联位点的纳米结构。

[0010] 第二方面,本发明涉及一种包含纳米结构的系统。

[0011] 第三方面,本发明涉及一种用于将至少一种分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法。

[0012] 第四方面,本发明涉及一种包含至少一个或多个纳米结构的物质,其用于药物或诊断方法。

[0013] 第五方面,本发明涉及一种包含至少一个或多个纳米结构的组合物,其用作药物或用于诊断方法。

具体实施方式

[0014] 在下文中将描述本发明的要素。这些要素与特定实施方式一起列出,然而应当理解,它们可以以任何方式和任何数量组合,以产生附加的实施方式。各种描述的示例和优选实施方式不应被解释为将本发明仅限于明确描述的实施方式。本说明书应当被理解为支持并涵盖将两个或更多个所述明确描述的实施方式相组合或将一个或多个所述明确描述的实施方式与任何数量的所述公开和/或优选的要素相组合的实施方式。此外,除非上下文另有指示,否则本申请中所有描述的要素的任何排列和组合都应当被认为由本申请的描述所公开。

[0015] 第一方面,本发明涉及一种纳米结构,其包含至少两个偶联位点,其中所述至少两个偶联位点可以与至少一个偶联分子(即一个偶联分子或多个偶联分子)结合,并且其中所述至少两个偶联位点被配置成偶联位点组。

[0016] 在一个优选实施方式中,所述偶联位点组被配置成与一个偶联分子结合。通常应当理解,所述包含至少两个偶联位点的纳米结构不应被解释为意味着所述纳米结构只包含这两个偶联位点,并且所述一个偶联位点组被配置成仅与一个偶联分子结合。相反,所述纳米结构也可能具有超过两个偶联位点,并且一个偶联位点组可能被配置成与超过一个偶联分子结合。

[0017] 在另一个优选实施方式中,所述纳米结构包含至少一个第一实体和至少一个第二实体,其中所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体中的每一者包含至少一个偶联位点组的至少一个偶联位点,优选地其中所述至少一个第一实体的至少一个偶联位点和所述至少一个第二实体的至少一个偶联位点位于所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体的对称位置上。

[0018] 在一个优选实施方式中,所述偶联位点组可以只包含相同的偶联位点,即被配置成与同一偶联分子偶联的偶联位点。在其他实施方式中,所述偶联位点组可以包含至少两

个不同的偶联位点,其被配置成通过不同的相互作用与偶联分子偶联。所述偶联位点组可以由两个偶联位点形成。然而,在其他实施方式中,所述偶联位点组也可以由多个偶联位点形成。

[0019] 本发明总体上涉及纳米结构。在本发明的实例中,所述纳米结构可以是DNA折纸结构,即DNA折纸装置,正如在US 7,842,793 B2中示例性公开的。然而应当理解,现有技术不限于此,并且应当理解这仅仅是示例性的,并且还可以利用其他纳米结构来实施本发明。然而,本文所使用的术语"纳米结构"应该优选是指由多个DNA折纸亚基(实体)组成的DNA折纸结构。在某些实施方式中,根据本发明的纳米结构的内部可以是中空的,并包含分子,例如治疗剂分子和/或货物分子。

[0020] 术语"实体"应指纳米结构和/或DNA折纸亚基。

[0021] 术语"偶联位点"应指纳米结构的亚基("实体")上与偶联分子结合的位点。优选地,偶联位点是抗原、抗原性片段或抗原模拟物。可选地,所述偶联位点是生物素分子、链霉亲和素分子或与特定不同分子特异性结合的任何其他分子。

[0022] 本文所使用的"偶联位点组"应指至少由并且优选地由两个偶联位点组成的偶联位点组。优选地,当结合到一个偶联位点组(例如通过抗体与不同DNA折纸亚基上的两个抗原结合构建体的结合)时,所述偶联分子被配置成将所述纳米结构的一个亚基(例如"第一实体")偶联到第二个亚基(例如"第二实体")。

[0023] 根据本发明,术语"至少一个"应包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或任何其他数量。例如,术语"至少一个"第一实体应包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或任何其他数量的第一实体。同样地,术语"至少一个"第二实体应包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或任何其他数量的第二实体。

[0024] 在又一个实施方式中,当所述至少一个偶联分子结合到所述至少一个偶联位点组时,所述至少一个偶联分子被配置成将所述纳米结构的至少一个第一实体偶联到所述纳米结构的至少一个第二实体。

[0025] 术语"偶联分子"应指与偶联位点结合的分子。优选地,偶联分子是抗原结合构建体,例如抗体。可选地,所述偶联位点是链霉亲和素分子或与不同分子特异性结合的任何其他分子。在本发明的主要测定法中,所述偶联分子被人工添加到所述测定法。所述偶联分子可以可逆地结合到所述偶联位点,即所述偶联分子可以可逆地与所述偶联位点结合并反复分离。因此,偶联分子可以重复地与偶联位点偶联和解偶联。

[0026] 此外优选地,所述纳米结构包含多个所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体,例如至少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个或任何数量的所述至少一个第一实体,以及至少1、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个或任何数量的所述至少一个第二实体。

[0027] 另一个实施方式涉及本发明的纳米结构,其中所述纳米结构包含多个偶联位点组,优选地至少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个或任何数量的偶联位点组,优选地其中每个偶联位点组由两个偶联位点组成。

[0028] 另一个实施方式涉及本发明的纳米结构,其中结合到多个偶联位点组中的第一偶联位点组的偶联分子是与结合到多个偶联位点组的第二偶联位点组的偶联分子相同的偶联分子,或者其中结合到多个偶联位点组中的第一偶联位点组的偶联分子是与结合到多个偶联位点组的第二偶联位点组的偶联分子不同的偶联分子。

[0029] 所述纳米结构可以被配置成呈现出不同的构型,包括至少一种第一构型(A)和至少一种第二构型(B)。在某些实施方式中,这些构型也可以被称为“开放”和“关闭”构型。根据所述纳米结构呈现的构型,所述纳米结构可以改变所述纳米结构的不同部分的可及性。例如,与第一构型(A)相比,在第二构型(B)下所述纳米结构的内部可能更加可及。

[0030] 在一个优选的实施方式中,所述纳米结构被配置成呈现至少一种第一构型(A)和至少一种第二构型(B),任选地呈现至少一种第三构型(C)、至少一种第四构型(D)或任何其他数量的构型。因此,本发明的任何实施方式的纳米结构均可以呈现不同构型(例如构型(A)、(B)、(C)、(D)等)。

[0031] 根据所述偶联位点是否与偶联分子偶联,纳米结构呈现不同构型的可能性可能发生改变。例如,与偶联位点均未被偶联分子偶联时的情况相比,当所有(或一部分)偶联位点被偶联分子偶联时纳米结构更可能呈现例如第一构型(A)。因此,根据偶联位点的偶联状态,纳米结构内部的可及性可能发生改变。因此,偶联位点的偶联状态可以“打开”和/或“关闭”所述纳米结构。应该理解,这也可以包括分子的释放,例如可能存在于纳米结构内部的货物分子和/或治疗剂分子的释放。

[0032] 当至少一个偶联分子结合到所述至少一个相应的偶联位点组时,所述纳米结构可以被配置成以比第二构型(B)更高的概率呈现第一构型(A)。因此,一个特别优选的实施方式涉及本发明的纳米结构,其中当至少一个偶联分子结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第一构型(A),和/或其中当至少一个偶联分子不结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第二构型(B)。

[0033] 然而当没有偶联分子结合到相应的偶联位点组时,所述纳米结构也可以呈现所述第一构型(A)和第二构型(B)两者。更具体而言,在所述第一构型(A)与第二构型(B)之间可以存在平衡。在这种平衡中,所述第一构型(A)可以是“优选的”,即所述纳米结构可以以比第二构型(B)更高的可能性呈现这种第一构型(A),反之亦然。此外,所述纳米结构可以被配置成在所述第一构型(A)与第二构型(B)之间呈现至少一个或多个平衡状态。例如,所述纳米结构可以被配置成在所述第一构型(A)与第二构型(B)之间呈现第一和第二平衡状态,其中所述纳米结构呈现第二构型(B)的概率在所述第二平衡状态下可以与在所述第一平衡状态下不同(例如更高)。

[0034] 应当理解,上面的描述仅仅是实例,并且所述第一和第二平衡状态可以以不同的概率呈现所述第一构型(A)和第二构型(B)。通常,与第一平衡状态相比,在第二平衡状态下可以以更高的概率呈现所述第二构型(B)。

[0035] 在另一个实施方式中,所述当存在少量或不存在至少一个竞争分子时,纳米结构被配置成呈现所述至少一种第一构型(A),和/或其中当存在更大量的至少一个竞争分子时,所述纳米结构被配置成呈现所述至少一种第二构型(B)。

[0036] 因此,当所述纳米结构处于存在少量或不存在所述至少一个竞争分子的环境中时,这种纳米结构更可能具有构型(A)。相反,当所述纳米结构处于存在更大量的所述至少

一个竞争分子的环境中时,这种纳米结构更可能具有构型(B)。通常,当每个偶联位点或当偶联位点组的子组与其相应的偶联分子偶联时,纳米结构可以呈现所述第一构型(A)。然而,至少一个或多个竞争分子可以诱导和/或触发至少一个偶联分子的释放。因此,当所述纳米结构处于存在大量所述至少一个竞争分子的环境中时,至少一个偶联分子更可能从所述纳米结构释放。在这种情况下,所述纳米结构可以,例如从构型(A)重构成构型(B)。

[0037] 本文所使用的术语“竞争分子”是指优选为抗原、片段或抗原模拟物的分子。可选地,所述竞争分子可以是生物素分子、链霉亲和素分子或与特定不同分子特异性结合的任何其他分子。所述竞争分子与所述偶联位点竞争结合所述至少一个偶联分子。所述竞争分子可能存在于例如样品如体液样品、细胞、生物体等中。本发明的一个目的是检测竞争分子。

[0038] 通常应当理解,当所述偶联位点与它们相应的偶联分子未偶联、部分偶联或全部偶联时,所述纳米结构也可以呈现构型(A)(例如关闭构型)和/或构型(B)(例如开放构型)。

[0039] 另一个优选实施方式涉及本发明的纳米结构,其中所述纳米结构被配置成在第一溶液中呈现所述至少一种第一构型(A),其中所述第一溶液与第二溶液相比优选包含更高浓度的镁离子,和/或其中所述纳米结构被配置成在所述第二溶液中呈现所述至少一种第二构型(B),其中所述第二溶液与所述第一溶液相比优选包含更低浓度的镁离子。

[0040] 然而,应当理解,第一和第二溶液的条件可能随着实验和/或生物设置而发生改变。专业技术人员知道如何确定第一和第二溶液的理想条件。例如,在一个实施方式中,所述第一溶液的镁离子浓度高于20mM,和/或所述第二溶液的镁离子浓度低于20mM。

[0041] 在某些实施方式中,所述纳米结构可以包含第一部分和第二部分,其中所述第一部分可以相对于所述第二部分移动。此外,所述第一部分和第二部分可以各自包含可与所述偶联分子结合的偶联位点组的至少两个偶联位点之一,或者所述第一部分和所述第二部分可以各自包含可以与至少一个偶联分子结合的至少两个偶联位点。在某些优选实施方式中。“部分”可以是实体。

[0042] 此外,偶联位点组的子组可以包括被所述第一部分包含的至少一个偶联位点和被所述第二部分包含的至少一个偶联位点。也就是说,每个部分可以包含至少一个偶联位点。所述第一部分和所述第二部分可以彼此可移动地附连,例如通过铰链或旋转轴。

[0043] 通常应该理解,所述纳米结构包含例如第一部分和第二部分不应被解释为意味着所述纳米结构只包含一个第一部分和一个第二部分。相反,所述纳米结构也可以具有超过一个第一部分和超过一个第二部分。换句话说,(除非明确陈述或除非专业技术人员清楚),否则没有具体数目的指称不应被理解为排除复数。例如,包含两个第一部分和/或两个第二部分的纳米结构也应被解释为被“包含第一部分和第二部分的纳米结构”所涵盖。在某些实施方式中,所述纳米结构可以包含至少一个额外部分,即第三、第四、第五、第六、第七、第八或任何其他数量的额外部分。

[0044] 特别优选情况下,所述纳米结构包含至少一种分子,所述分子选自由核酸(例如DNA、RNA、DNA适体、RNA适体或肽核酸(PNA))、多肽、肽、糖蛋白、肽模拟物(peptidomimetic)和抗原结合构建体(例如抗体、抗体样分子、抗原结合衍生物或其抗原结合片段)组成的组。

[0045] 在另一个优选实施方式中,所述纳米结构包含至少一个核酸,其中所述核酸可以包含至少一个修饰,例如选自修饰的核苷间键、修饰的核碱基或修饰的糖部分的化学修饰,

例如2'-O-烷基修饰如2'-O-甲氧基-乙基(MOE)或2'-O-甲基(OMe)修饰、乙烯桥接核酸(ENA)、2'-氟(2'-F)核酸例如2'-氟-N3-P5'-亚磷酰胺、1',5'-失水己糖醇核酸(HNA)或锁核酸(LNA)。

[0046] 另一个实施方式涉及本发明的纳米结构,其中所述纳米结构至少部分由DNA折纸结构形成。所述DNA折纸结构可以包含至少一个支架链,即优选为具有已知序列的单链多核苷酸支架DNA,和任选的至少一个装订链。本文所使用的术语"DNA折纸结构"应指包含至少一个支架链和多个单链寡核苷酸装订链的纳米结构。所述DNA折纸结构可以通过自组装形成,并且用于设计相应的支架和装订链的可用软件可以有助于DNA折纸制造技术。

[0047] 本文所使用的术语"支架链"应指构成和/或横贯DNA折纸结构和/或DNA折纸亚基("实体")的主要部分的链。

[0048] 本发明中所使用的术语"装订链"应指与支架链至少部分互补的单链寡核苷酸分子。通常,装订链可用于将例如偶联位点引入到DNA折纸结构和/或DNA折纸亚基("实体")中。

[0049] 所述DNA折纸结构可以包含多个单链寡核苷酸装订链,其中每个装订链可以与至少一个支架链至少部分互补。此外,所述装订链中的每一者可以被配置成在两个不同位置中与所述至少一个支架链结合,其中所述至少一个支架链可以被折叠和/或排列,以便可以形成所需纳米结构。

[0050] 一个优选实施方式涉及本发明的纳米结构,其中所述纳米结构至少部分由DNA折纸结构形成,

[0051] 其中所述DNA折纸结构包含至少一个支架链;

[0052] 其中所述DNA折纸结构还包含多个单链寡核苷酸装订链;

[0053] 其中每个装订链与至少一个支架链至少部分互补;并且

[0054] 其中所述装订链中的每一者被配置成与所述至少一个支架链中的至少一者结合,其中所述至少一个支架链被折叠和/或排列,以便形成所需纳米结构。

[0055] 在另一个实施方式中,在至少一个装订链中存在至少一个偶联位点。

[0056] 此外,在所述纳米结构至少部分由DNA折纸结构形成并且所述DNA折纸结构包含至少一个支架链和多个装订链的实施方式中,所述分子可以通过接头分子结合到所述至少一个支架链或装订链中的一者,其中所述接头分子可以连接到与所述至少一个支架链的一部分或装订链的一部分互补的DNA链部分。

[0057] 在所述纳米结构包含至少一个第一实体和至少一个第二实体的那些实施方式中,所述至少一个第一实体和至少一个第二实体可以具有相同的形状或可区分的形状。此外,所述形状可以是例如三角形、圆形、长方体(即矩形)或任何其他形状。类似地,在所述纳米结构包含第一和第二部分的实施方式中,所述第一部分和第二部分可以包含相同的形状或可区分的形状。所述形状可以是例如三角形、圆形、长方体(即矩形)或任何其他形状。

[0058] 在某些实施方式中,所述至少一个偶联位点可以是分子。优选实施方式涉及本发明的纳米结构,其中所述至少一个偶联位点是分子。在特别优选的实施方式中,所述至少一个偶联位点和/或所述至少一个偶联分子是选自由抗原、抗原性片段、抗原模拟物、抗原结合构建体(例如抗体、抗体样分子、抗体模拟物、抗原结合衍生物或抗原结合片段)、DNA链、生物素分子、链霉亲和素分子、马来酰亚胺-硫醇化学分子、点击化学分子、SNAP标签蛋白和

CLIP标签分子等组成的组的分子。

[0059] 在特别优选的实施方式中,所述偶联位点是抗原、抗原性片段和/或抗原模拟物。

[0060] 在另一个实施方式中,所述偶联分子是抗原结合构建体,例如抗体、抗体样分子、抗体模拟物、抗原结合衍生物或其抗原结合片段。

[0061] 因此,在一个优选实施方式中,偶联位点与偶联分子之间的相互作用以抗体-抗原相互作用的特异性结合为特征。本领域技术人员可以鉴定类似的特异性相互作用,这也应在本发明的范围之内。例如,也可以使用链霉亲和素分子与生物素分子的特异性结合,例如,所述偶联位点可以是链霉亲和素分子并且所述偶联分子可以是生物素分子,反之亦然。然而,在此类纳米结构中可以利用多种相互作用,这与依赖于特定且有限的相互作用的现有技术相比可能是有利的。因此,由于可用的相互作用范围广泛,与现有技术中公开的纳米结构相比提供了更加通用且灵活的可条件切换的纳米结构。

[0062] 此外,优选地,所述偶联分子是IgG抗体、IgG抗体片段、IgG抗体模拟物、IgM抗体、IgM抗体片段、IgM抗体模拟物、IgD抗体、IgD抗体片段、IgD抗体模拟物、IgA抗体、IgA抗体片段、IgA抗体模拟物、IgE抗体、IgE抗体片段或IgE抗体模拟物,优选地其中所述抗体、抗体片段或抗体模拟物包含两个相同的抗原结合位点,更优选地其中所述抗原结合位点与偶联位点组的所述至少两个偶联位点结合。

[0063] 另一个特别优选的实施方式涉及上述纳米结构,其中一个IgG抗体、一个IgG抗体片段、一个IgG抗体模拟物、一个IgM抗体、一个IgM抗体片段、一个IgM抗体模拟物、一个IgD抗体、一个IgD抗体片段、一个IgD抗体模拟物、一个IgA抗体、一个IgA抗体片段、一个IgA抗体模拟物、一个IgE抗体、一个IgE抗体片段或一个IgE抗体模拟物结合到一个偶联位点组。

[0064] 本发明的纳米结构可以具有任何长度。在一个优选实施方式中,所述纳米结构包含最大长度,并且在特别优选的实施方式中,所述最大长度小于1000nm,优选地小于500nm,例如约100nm或更小。

[0065] 本发明的另一方面涉及一种系统,其包含根据本发明的纳米结构,其中所述系统包含:

[0066] (i)至少一个纳米结构,其包含至少两个偶联位点,其中所述至少两个偶联位点可以与至少一个偶联分子结合,并且其中所述至少两个偶联位点被配置成偶联位点组,和

[0067] (ii)至少一个偶联分子。

[0068] 术语“系统”应指包含至少一个DNA折纸结构(“纳米结构”)和至少一个偶联分子的结构。然而,在某些实施方式中,所述系统可以包含多个偶联分子。

[0069] 在一个优选实施方式中,所述系统包含:

[0070] (i)至少一个纳米结构,其包含至少一个第一实体和至少一个第二实体,其中所述至少一个第一实体和所述至少一个第二实体中的每一者包含至少一个偶联位点组的至少一个偶联位点,优选地其中所述至少一个第一实体上的至少一个偶联位点和所述至少一个第二实体上的至少一个偶联位点位于所述实体的对称位置上,和

[0071] (ii)至少一个偶联分子,优选为多个偶联分子,

[0072] 其中当所述至少一个偶联分子结合到所述至少一个偶联位点组时,所述至少一个偶联分子被配置成将所述纳米结构的至少一个第一实体偶联到所述纳米结构的至少一个第二实体。

[0073] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种用于在本发明的纳米结构的不同构型之间条件切换,从而能够将至少一种分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法。在特定实施方式中,后者允许释放治疗剂和/或货物分子,其可以包含在本发明的纳米结构的空腔和/或孔中。因此,所述方法可以允许所述纳米结构在鉴定特定分子后特异性释放分子。

[0074] 换句话说,本发明涉及一种可条件切换的纳米结构,其可以根据所述纳米结构包含的偶联位点组的至少一个子组的偶联而呈现不同构型,其中治疗剂和/或货物分子的可及性可以根据所述纳米结构呈现的构型而发生改变。例如,在一种构型下治疗剂和/或货物分子可能比在另一种构型下明显更加可及,在某些情况下其甚至可能只在两种构型之一下才可及。这可以允许以所述偶联位点组的至少一个偶联位点子组的偶联为条件获得治疗剂和/或货物分子。这可能是有利的,因为它可以根据相应竞争分子的至少一个子组的存在或不存在来控制分子(例如治疗剂和/或货物分子)的释放。

[0075] 术语“分子的鉴定”应该涉及例如抗原、病变细胞如肿瘤细胞等的鉴定。所述鉴定可以在体内、离体或体外进行。在一个优选实施方式中,所述鉴定在生物体(例如哺乳动物,优选为人类)体内进行。在另一个实施方式中,所述鉴定在从例如生物体(例如哺乳动物,优选为人类)获得的样品中体外进行。所述纳米结构优选地在鉴定特定分子例如竞争分子后呈现不同构型,从而将分子例如竞争分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来。在本发明的范围内还包括鉴定特定分子(例如竞争分子)的量的必要性,所述量高于或对应于所述特定分子(例如竞争分子)用于诱导纳米结构的构象重构的特定阈值。

[0076] 术语“构象重构”是指从一种构型重构成另一种构型,例如从构型(A)重构成构型(B)。当至少一个竞争分子与至少一个偶联分子竞争,并且所述至少一个偶联分子不结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构优选地呈现构型(B)。在构象重构后,包含在所述纳米结构的中空内部中的分子例如治疗剂分子和/或货物分子可以被释放和/或激活。

[0077] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的一个优选方面涉及一种用于将至少一个分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法,其中所述方法包括:

[0078] (i)提供根据本发明的纳米结构;

[0079] (ii)提供至少一个偶联分子,

[0080] 其中当(ii)中所提供的至少一个偶联分子结合到(i)中所提供的纳米结构的至少一个偶联位点组时,纳米结构呈现至少一种第一构型(A),和

[0081] (iii)鉴定所述至少一个分子,

[0082] 其中所述至少一个分子优选为竞争分子,

[0083] 其中所述纳米结构在鉴定所述至少一个分子后呈现至少一种第二构型(B),

[0084] 从而能够将至少一个分子的鉴定与所述纳米结构的构象重构联系起来。

[0085] 无论何时在本说明书和随附的权利要求书中叙述方法步骤时,都应该注意在本文中叙述所述步骤的顺序可能是偶然的。也就是说,除非另有规定或除非专业技术人员清楚,否则叙述所述步骤的顺序也可以不同。例如,当本文指出例如方法包括步骤(A)和(B)时,这并不一定意味着步骤(A)先于步骤(B),而是也可能步骤(A)与步骤(B)(至少部分)同时进行,或者步骤(B)先于步骤(A)。此外,当步骤(X)被叙述为先于另一个步骤(Z)时,这并不意

味在步骤(X)与(Z)之间不存在步骤。也就是说,步骤(X)先于步骤(Z)可以包括步骤(X)直接在步骤(Z)之前进行的情况,而且还包括步骤(X)在一个或多个步骤例如(Y1)、(Y2)、(Y3)之前进行,然后是步骤(Z)的情况。当使用诸如“之后”或“之前”等的术语时,相应的注意事项也适用。

[0086] 在用于将至少一个分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法的优选实施方式中,所述纳米结构在至少一种第一构型(A)下包封有分子或第二纳米结构,优选地其中所述分子选自治疗剂分子和/或货物分子。

[0087] 当所述纳米结构处于例如第一构型(A)时,所述纳米结构的不同实体可以被配置成形成腔室和/或空腔。此外,治疗剂分子和/或货物分子可以例如通过杆、通过直接或间接缔合或通过空间排列方式附连到所述纳米结构的不同实体的内表面。当所述纳米结构处于第二构型(B)时,所述治疗剂分子和/或货物分子可以被配置成离开所述腔室和/或空腔。所述方法可以包括将所述偶联位点与相同的偶联分子偶联。或者,所述方法可以包括将所述偶联位点与不同的偶联分子偶联。

[0088] 此外优选地,当所述纳米结构呈现所述至少一种第二构型(B)时,所述分子或第二纳米结构、优选选自治疗剂分子和/或货物分子的所述分子,在所述纳米结构的构象重构后被释放和/或激活。

[0089] 因此,简而言之,根据偶联分子与纳米结构上的偶联位点的结合,所述纳米结构可以在不同状态之间切换。这允许许多不同的应用。特别是,这种纳米结构可用于携带治疗剂分子和/或货物分子。例如,这可用于在鉴定例如特定细胞类型和/或分子后控制释放治疗剂和/或货物分子。因此,所述治疗剂分子和/或货物分子可能在所述纳米结构的一种构型下可及,但在不同构型下不可及,并且所述构型可以根据特定细胞类型和/或分子的存在或不存在而不同。这对于根据特定细胞类型和/或分子的存在或不存在来调节治疗剂分子和/或货物分子的可及性的应用可能是特别有益的,其优选地通过本发明的纳米结构的构象重构来实现。

[0090] 所述纳米结构的不同实体可以各自包含空腔,当所述纳米结构处于例如第一构型(A)下时其被配置成形成腔室和/或孔。此外,所述治疗剂分子和/或货物分子可以例如通过杆、通过直接或间接缔合或通过空间排列方式附连到所述纳米结构的不同实体的内表面,其中当所述纳米结构处于第二构型(B)时,所述治疗剂分子和/或货物分子可以被配置成离开所述空腔。本领域技术人员将会理解,杆可以是实体与至少一个治疗剂和/或货物分子之间的任何类型的柔性连接。

[0091] 在优选实施方式中,所述方法是体内、离体、体外或原位方法。

[0092] 另一个实施方式涉及用于将至少一个分子的鉴定与纳米结构的构象重构联系起来的方法,其中当所述至少一个分子与所述至少一个偶联分子竞争,并且所述至少一个偶联分子不结合到至少一个偶联位点组时,所述纳米结构呈现至少一种第二构型(B),优选地其中所述溶液的镁离子浓度低于20mM。

[0093] 另一方面,本发明涉及一种物质,其包含多个根据本发明的纳米结构或包含如上所定义的系统。

[0094] 本发明的另一方面涉及一种组合物,其包含至少一个或多个根据本发明的纳米结构或包含如上所定义的系统。

[0095] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种物质,其包含如上所定义的至少一个或多个纳米结构或系统,并用作药物。

[0096] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种组合物,其包含至少一个或多个根据本发明的纳米结构或如上所定义的系统,并用作药物。

[0097] 所述物质和/或组合物用作药物可能是有利的,因为本发明的纳米结构可以实现疾病的靶向治疗,例如靶向药物递送。例如,根据本发明的实施方式的纳米结构可用于释放包含在所述纳米结构内的药剂,例如治疗剂和/或货物分子,例如药物。优选地,这种释放是在确定的位置和/或时间和/或在确定的条件下的靶向释放或控制释放。

[0098] 此外,所述包含至少一个或多个根据本发明的纳米结构或包含如上所定义的系统的物质可以用于增殖性疾病例如癌症的预防和/或治疗、免疫障碍的预防和/或治疗、病毒性疾病例如人免疫缺陷病毒(HIV)感染的预防和/或治疗、凝血障碍的预防和/或治疗、代谢障碍的预防和/或治疗、传染性障碍的预防和/或治疗、和/或糖尿病的预防和/或治疗。

[0099] 在本发明的另一个优选方面中,所述包含至少一个或多个根据本发明的纳米结构或包含如上所定义的系统的组合物可以用于增殖性疾病例如癌症的预防和/或治疗、免疫障碍的预防和/或治疗、病毒性疾病例如人免疫缺陷病毒(HIV)感染的预防和/或治疗、凝血障碍的预防和/或治疗、代谢障碍的预防和/或治疗、传染性障碍的预防和/或治疗、和/或糖尿病的预防和/或治疗。

[0100] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种物质,其包含如上所定义的至少一个或多个纳米结构或系统,并用于诊断方法。

[0101] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种组合物,其包含至少一个或多个根据本发明的纳米结构或如上所定义的系统,并用于诊断方法。

[0102] 可以与本发明的任何其他优选实施方式和/或方面组合的本发明的另一方面涉及一种载体、特别是表达载体,其包含编码纳米结构的序列、支架链和/或装订链的序列和/或包含如上所定义的纳米结构的序列。

[0103] “载体”可以是能够在宿主细胞中递送或维持核酸的任何试剂,并包括例如但不限于质粒(例如DNA质粒)、裸核酸、病毒载体、病毒、与一种或多种多肽或其他分子复合的核酸以及固定在固相粒子上的核酸。载体在下文中详细描述。载体可用作在宿主细胞中递送或维持外源基因和/或蛋白质的试剂。载体可能能够转导、转染或转化细胞,从而使所述细胞复制或表达对所述细胞来说不是天然的核酸和/或蛋白质或以对所述细胞来说非天然方式复制或表达核酸和/或蛋白质。靶细胞可以是维持在细胞培养条件下或者在其他体内实施方式中的细胞,其是活生物体的一部分。载体可以包括有助于实现核酸进入细胞的材料,例如病毒颗粒、脂质体、蛋白质外壳等。可以使用任何将核酸转移到细胞中的方法;除非另有说明,否则术语载体并不暗示将核酸递送到细胞中的任何特定方法,或者暗示任何特定细胞类型是转导的对象。本发明不限于将任何特定载体用于递送或维持本发明的任何核酸,包括例如编码本发明的纳米结构的核酸。

[0104] 术语“表达载体”意味着被设计用于转录RNA的任何双链DNA或双链RNA,例如包含可操作地连接到感兴趣的下游基因或编码区(例如cDNA或编码蛋白质的基因组DNA片段或

任何感兴趣的RNA)的至少一个启动子的构建体。将表达构建体转染或转化到受体细胞中允许所述细胞表达由所述表达构建体编码的RNA或蛋白质。表达构建体可以是源自例如噬菌体、腺病毒、逆转录病毒、痘病毒或疱疹病毒的基因工程质粒、病毒或人工染色体,或下文在“表达载体”下描述的其他实施方式。表达构建体可以在活细胞中复制,也可以人工合成。出于本申请的目的,术语“表达构建体”、“表达载体”、“载体”和“质粒”可互换使用,以在一般的说明性意义上展示本发明的应用,并且不旨在将本发明限制于特定类型的表达构建体。此外,术语表达构建体或载体还旨在包括其中用于测定的细胞已经内源性包含这种DNA序列的实例。表达载体优选包含与核酸可操作连接的启动子序列。

[0105] 术语“编码”是指核苷酸序列编码一个或多个氨基酸的能力。所述术语不需要起始或终止密码子。氨基酸序列可以在由多核苷酸序列及其互补序列提供的六个不同阅读框中的任一者中编码。氨基酸序列可以由脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)或与DNA或RNA类似的人工合成的聚合物编码。

[0106] 另一方面,还提供了一种包含本文所定义的纳米结构和/或载体的重组细胞。“重组细胞”、有时也被称为“宿主细胞”,是对核酸转化敏感的任何细胞。优选地,本发明的重组或宿主细胞是植物细胞、细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞例如人类细胞。优选的重组细胞选自适合于重组表达本发明的纳米结构的细胞。

[0107] 本发明的另一方面涉及一种药物组合物,其包含如上所定义的纳米结构、系统、组合物、物质、载体和/或宿主细胞,以及药学上可接受的载体和/或赋形剂。

[0108] 本发明的药物组合物应被配制成与其预期给药途径相容。在特别优选的实施方式中,本发明的药物和/或化合物的给药途径的实例包括静脉内、阴道、口服、鼻内、鞘内、动脉内、真皮内、皮下、透皮(局部)、脑室内、脑实质内、肿瘤内、透黏膜、直肠、支气管、肠胃外给药,以及用于给药药物和/或化合物的任何其他临床/医学上可接受的方法。

[0109] 可以与本发明的任何其他方面或特定实施方式组合的本发明的另一个方面涉及一种预防和/或治疗增殖性疾病例如癌症、免疫障碍、病毒性疾病例如人免疫缺陷病毒(HIV)感染、凝血障碍、代谢障碍、传染性障碍和/或糖尿病的方法,所述方法包括向受试者给药治疗有效量的根据本发明的纳米结构、系统、化合物、物质和/或药物组合物。

[0110] 为了计算“治疗有效量”所需的量,本领域技术人员和/或医生可以使用从细胞培养测定和动物研究获得的数据来制定在人类中使用的剂量范围。此类化合物和/或药物组合物的剂量优选在包括很少或没有毒性的ED_{50}的循环浓度范围内。取决于所使用的剂型和所使用的给药途径,剂量可以在这个范围内变化。对于所使用的任何化合物来说,治疗有效剂量可以最初从细胞培养测定估算。可以在动物模型中制定剂量,以达到包括在细胞培养中所确定的IC_{50}(即实现症状的半最大抑制的测试化合物浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可用于更准确地确定在人类中的有用剂量。所述药物组合物可以与给药说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

[0111] 本发明还涉及根据本发明的纳米结构、系统、化合物、物质和/或药物组合物在制备用于预防和/或治疗增殖性疾病例如癌症、免疫障碍、病毒性疾病例如人免疫缺陷病毒(HIV)感染、凝血障碍、代谢障碍、传染性障碍和/或糖尿病的药物中的用途。

[0112] 本文所使用的术语“(本)发明的”、“根据本发明”、“按照本发明”等意指在本文中描述和/或要求保护的本发明的所有方面和实施方式。

[0113] 本文所使用的术语“包含”应当被解释为涵盖“包括”和“由……组成”两者,这两种含义都被特别地意图涵盖,因此都是根据本发明单独公开的实施方式。当在本文中使用时,“和/或”应被视为具体公开了所述两个指定特征或组分中的每一者,无论是否包含另一者。例如,“A和/或B”应被视为具体公开了(i)A、(ii)B和(iii)A和B两者中每一种情况,如同每一者在本文中被单独列出。在本发明的上下文中,术语“约”和“大约”表示本领域技术人员将理解仍能确保所讨论的特征的技术效果的精确度区间。所述术语通常表示与指示数值偏差±20%、±15%、±10%,以及例如±5%。如本领域普通技术人员将理解的,对于给定技术效果来说,数值的这种具体偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果通常可能比人造或工程技术效果的偏差更大。正如本领域普通技术人员将会理解的,对于给定技术效果来说,数值的这种具体偏差将取决于技术效果的性质。例如,自然或生物技术效果通常可能比人造或工程技术效果的偏差更大。如果在提及单数名词时使用不定冠词或定冠词,则除非另有特别说明,否则这包括该名词的复数。

[0114] 在本文中假定所有数值都由术语“约”修饰,无论是否明确指出。术语“约”通常是指本领域技术人员认为等同于所叙述的值(即具有相同的功能或结果)的数字范围。在许多情况下,术语“约”可以包括四舍五入到最接近的有效数字的数字。在本发明的特别优选的实施方式中,术语“约”可以是指相应数值的最大为所述数值的20%的偏差,然而更优选为15%、10%、5%,甚至更优选为4%、3%、2%,最优选为1%。然而,无论何时在本说明书中使用相对术语例如“约”、“基本上”或“大约”时,这种术语也应被解释为包括精确术语。也就是说,例如“基本上一个”应被解释为也包括“(确切地)一个”。

[0115] 应当理解,根据本文所包含的教导,将本发明的教导应用于特定问题以及纳入本发明的变体或其附加特点(例如其他方面和实施方式),将在本领域普通技术人员的能力范围之内。除非上下文另有规定,否则上文阐述的特点的描述和定义不限于本发明的任何特定方面或实施方式,并且同样适用于所描述的所有方面和实施方式。

[0116] 本文中引用的所有参考文献、专利和出版物均整体通过引用并入本文。

[0117] 附图和序列说明

[0118] 附图示出了:

[0119] 图1示出了二十面体DNA折纸壳的IgG介导的稳定化和抗原触发的解体。策略性固定在DNA折纸亚基(“实体”,用三角形显示)上的抗原允许二价抗体(“偶联分子”)充当不同DNA折纸亚基(“实体”,用三角形显示)之间的分子桥,以在与抗原性片段结合时在其他不利的条件下稳定亚基相互作用。形状互补的突起和凹陷控制着二十面体壳从20个相同拷贝的多层DNA折纸亚基的自组装。所述二十面体壳的自组装需要添加Mg^{2+}离子以稳定形状互补特征之间的平端堆叠接触。抗体特异性抗原被安装在DNA折纸亚基(“三角形”)单体表面上的对称位置处。壳组装导致抗原定位在每个三角形-三角形界面的相反侧处。抗原特异性抗体(“偶联分子”)与壳固定的抗原二价结合,并稳定三角形-三角形相互作用。通过随后稀释所述二十面体壳至使其不稳定的Mg^{2+}离子浓度时,壳保持在亚稳的“弹簧加载”状态下。通过添加辅助抗原(“竞争抗原”)将稳定化抗体从壳中置换出来,从而诱导DNA折纸结构的构象重构,来触发受控解体。图例:Mg^{2+}=镁离子;1个三角形=1个DNA折纸亚基(“实体”);“偶联位点”=抗原片段(优选地通过装订链固定在DNA折纸亚基上);抗体=“偶联分子”。

[0120] 图2示出了Mg^{2+}依赖性IgG介导的壳稳定化的结构表征和评估。(a)上图:在25mM

$MgCl_2$下用抗地高辛抗体交联三角形-三角形界面的二十面体壳在独立冰中的示例性Cryo-EM显微照片。下图:来自不同方向的二维类别平均值。(b)组装的二十面体壳的Cryo-EM重建,其中两个抗地高辛抗体桥接每个三角形-三角形界面。(c)在(左)具有手动定位的IgG抗体的圆柱体模型(PDB:1IGT)和(右)Cryo-EM重建中描绘的由两个抗地高辛抗体交联的三角形-三角形界面处的放大图。值得注意的是,除了两个Fab片段之外,抗体的Fc区的部分被重建。(d)在降低的Mg^{2+}浓度下抗体介导的稳定化的示意图。(e)在补充有8、12、16和20mM $MgCl_2$的0.5X TBE缓冲液中的0.75%琼脂糖凝胶的激光扫描荧光图像。在25mM $MgCl_2$条件下,将组装的壳与抗地高辛抗体(anti-Dig)或不与抗地高辛抗体一起温育,随后稀释至相应的$MgCl_2$浓度并在相应的凝胶上电泳。图注:单体=单个三角形单体,二聚体=由2个三角形亚基形成的二聚体,壳=完全组装的二十面体壳。(f)不与抗地高辛抗体(左)或与抗地高辛抗体(右)温育并稀释至12mM $MgCl_2$的壳的负染色的TEM图像。(g)与抗地高辛抗体和不与抗地高辛抗体温育并随后稀释至各种最终$MgCl_2$浓度的壳的归一化FRET比率。三角形亚基的每一侧在对称位置处用Cy3和Cy5荧光团进行功能化,仅在壳组装时产生能量转移。在22至14mM之间的$MgCl_2$浓度下FRET比率的初始降低是由增加的静电排斥导致的壳膨胀引起的。

[0121] 图3示出了二十面体壳的抗原触发的解体。(a)通过添加与稳定壳的抗地高辛抗体竞争结合的可溶性地高辛(DIG)配体,将抗体从弹簧加载的壳中置换出来,从而在使其不稳定的Mg2+离子浓度下触发壳的解体。在补充有12mM $MgCl_2$的0.5X TBE缓冲液中的0.75%琼脂糖凝胶的激光扫描荧光图像。将装配有抗地高辛抗体的组装的壳与浓度增加的地高辛温育。抗地高辛抗体稳定化的壳在提高的可溶性地高辛抗原浓度下解体。在不存在(左)和存在(右)25μM可溶性地高辛的情况下,抗地高辛抗体稳定化的壳的负染色TEM图像。(b)与(a)中类似,但使用抗二硝基酚抗体稳定化的壳并添加可溶性2,4-二硝基酚(DNP)配体。(c)在浓度逐渐提高的可溶性地高辛配体下由抗地高辛抗体稳定化的壳的归一化FRET比率。(d)在浓度逐渐提高的可溶性2,4-二硝基酚下由抗二硝基酚抗体稳定化的壳的归一化FRET比率。虚线表示Hill方程对实验数据的非线性最小二乘优化。(e)左:通过在三角形-三角形界面上安装地高辛和2,4-二硝基酚配体以及相应的抗体两者,实现了与门逻辑门控的壳解体。因此,与门壳的解体需要可溶性地高辛和2,4-二硝基酚两者的存在。右:在补充有12mM $MgCl_2$的0.5X TBE缓冲液中的0.75%琼脂糖凝胶的激光扫描荧光图像。将装配有抗地高辛和抗二硝基酚抗体的组装的与门壳与浓度逐渐提高的地高辛(上)、2,4-二硝基酚(中)以及地高辛和2,4-二硝基酚(下)温育。与25μM地高辛(上)、5mM 2,4-二硝基酚(中)以及25μM地高辛和5mM 2,4-二硝基酚(下)温育的装配有抗地高辛和抗二硝基酚抗体的壳的负染色TEM图像。(f)由抗地高辛和抗二硝基酚抗体的组合稳定化并与可溶性地高辛(25μM)和2,4-二硝基酚(5mM)的组合温育的与门壳的归一化FRET比率。

[0122] 图4示出了病毒有效载荷的抗原触发的释放。(a)(从左到右)示出了用乙型肝炎病毒(HBV)核心衣壳功能化三角形子组的方案,其中HBV颗粒的结合由三角形的壳朝内的表面处的特异性抗体介导;在管腔中具有HBV核心衣壳的完整壳的组装;通过抗Dig IgG抗体装订并通过降低离子强度进行弹簧加载;通过添加可溶性地高辛抗原进行抗原触发的壳破裂和病毒有效载荷的释放。图中未示出位于壳内部的HBV结合抗体与壳分离,使HBV粒子自由漂浮在壳中的中间步骤。(b、c、d)分别是在病毒有效载荷存在下在40mM $MgCl_2$下组装的壳,

在弹簧加载条件(12mM $MgCl_2$)下包装有病毒有效载荷的抗Dig抗体装订的壳,以及通过添加可溶性地高辛抗原而解体、导致病毒有效载荷的释放的壳的负染色TEM图像。(b、c)中的比例尺为50nm,(d)中的比例尺为100nm。

[0123] 实施例

[0124] 现在将通过实施例并参考本文阐述的描述、附图和表格说明本发明的某些方面和实施方式。本发明的方法、用途和其他方面的这些实施例仅仅是代表性的,并且不应被视为将本发明的范围仅限于这些代表性实施例。

[0125] 所述实施例显示:

[0126] 实施例1:IgG介导的稳定化和二十面体DNA折纸壳的抗原触发解体以及抗原触发的药剂释放

[0127] 本发明基于抗原触发的DNA折纸纳米粒子的逻辑门控重构的通用策略。本发明的技术的设计原理固有地是模块化的,并且可以应用于任何可以采用两种或更多种构型状态的动态DNA折纸系统。

[0128] 图1描绘了在本技术的某些实施方式中使用的组件,以说明在本说明书中使用的符号。更具体来说,图1描绘了可以呈现不同构型(A)和(B)的纳米结构,所述构型也可以被称为封闭构型(A)和开放构型(B)。如图1中所示的三维纳米结构可以使用DNA折纸来实现,即通过将支架链和装订链组合来形成所需的部分和整个装置。此类设计可以例如使用诸如caDNAno的软件来进行。也就是说,在某些实施方式中包含多个实体的纳米结构可以由一个支架链制成,而在其他实施方式中纳米结构的实体可以利用多个支架链来构建。

[0129] 所述纳米结构优选被配置成当偶联位点组的每个或至少一部分偶联位点被其相应的偶联分子偶联时呈现第一构型(A),并且当没有偶联位点或减少量的一部分偶联位点被其相应的偶联分子偶联时呈现第二构型(B)。

[0130] 在图1中描绘的实施方式中,偶联位点具有相同的构型,即它们被配置成与设计相同的偶联分子偶联,并且纳米结构在本质上是二价的,即纳米结构具有一种类型的偶联位点。然而,正如上文已经提到的,这不是必需的。在本发明的某些实施方式中,偶联位点可以与不同的偶联分子结合。后者是指多价纳米结构,即具有多个不同偶联位点的结构。

[0131] 图1中描绘的建议机制是基于两个设计原理。首先,本发明人使用IgG抗体的高度保守的结构,其二价地显示出两个相同的抗原结合位点。利用这种二价特征,抗体被用作分子桥以将DNA折纸纳米粒子锁定在预先定义的构型中,由在DNA折纸亚基上的策略性定位抗原(片段)控制。其次,“弹簧加载的”纳米粒子的抗原触发的激活或重构由可溶性抗原的存在引发,所述可溶性抗原将“抗体桥”从所述纳米粒子中置换出来。

[0132] 在图1的实例中,构型(A)是封闭构型(例如“笼”状结构,例如在这个特定实施方式中,由20个相同的DNA折纸亚基(三角形)组装的衣壳样结构形成二十面体DNA折纸壳)。构型(B)是开放构型,其中DNA折纸亚基(三角形)不通过抗体桥偶联。因此,在构型(B)的负染色TEM图像中可以看到单个三角形。

[0133] 作为原理证明,图1示出了抗体介导的弹簧加载和随后的抗原触发的T=1衣壳样结构(二十面体DNA折纸壳)解体,所述结构由20个相同的多层DNA折纸三角形自组装而成(图1)。为了控制抗体结合,通过化学修饰的装订寡核苷酸,在每个三角形边上的对称位置处引入“偶联位点”(抗原片段,例如地高辛配体)。二十面体壳(T=1衣壳)自组装完成后,在

由有利的缓冲液条件([Mg2+]>20mM)下壳的三角形界面上形状互补的凹陷和突起的激活控制,添加抗地高辛抗体以交联单个三角形亚基。随后降低Mg^{2+}浓度以使堆叠接触失活,导致衣壳组装体的弹簧加载。最后,添加辅助抗原("竞争性抗原",例如可溶性地高辛抗原),通过从DNA折纸固定的抗原中去除抗体的竞争性反应来触发衣壳解体(图1)。二十面体壳的抗原触发解体发生在特定抗原阈值(EC50~1μM)下,所述阈值取决于每个亚基界面固定的抗体的数量。这一概念可以通过安装特定的抗体组合、创建复杂的分子逻辑运算或定制剂量响应曲线来进一步探索。

[0134] 尽管图1的实施方式基于从多个组分自组装的粒子作为原理证明,但相同的概念可应用于驱动单分子物体例如盒状结构或开关,其应用包括但不限于分子诊断、逻辑门控疗法或药物递送载体。最后,考虑到例如IgG抗体的高度保守的二价性质以及易于产生针对几乎任何分子靶的抗体,本发明可用于鉴定广泛种类的抗原、小分子、肽和蛋白质。

[0135] 与目前将DNA纳米结构与抗原-抗体识别元件相接的模块相反,如图1中所示的纳米结构的所有识别元件都集成在纳米结构本身上,而不是依赖于多个组分的扩散相互作用。这使得发明人的概念对稀释效应不敏感,而稀释效应是未来潜在的生物医学应用的关键要求。重要的是,本发明人的设计原理不限于其自组装由形状互补的堆叠接触介导的多组分系统。可以设想其他策略如依赖于温度或链置换的互补黏性末端、依赖于pH的三链体或i-基序来指导本发明的纳米结构的自组装以及随后通过抗体增强的界面对结构进行弹簧加载,这也应该在本发明的范围之内。

[0136] 图1的机制的具体实例及其用于从纳米结构释放药剂/实体的示例性用途示出在图4中,图4示出了抗原触发的病毒有效载荷的释放。(a)(从左到右)示出了用乙型肝炎病毒(HBV)核心衣壳功能化三角形子组的方案,其中HBV颗粒的结合由三角形的壳朝内的表面处的特异性抗体介导;在管腔中具有HBV核心衣壳的完整壳的组装;通过抗Dig IgG抗体装订并通过降低离子强度进行弹簧加载;通过添加可溶性地高辛抗原进行抗原触发的壳破裂和病毒有效载荷的释放。图中未示出位于壳内部的HBV结合抗体与壳分离,使HBV粒子自由漂浮在壳中的中间步骤。(b、c、d)分别是在病毒有效载荷存在下在40mM $MgCl_2$下组装的壳,在弹簧加载条件(12mM $MgCl_2$)下包装有病毒有效载荷的抗Dig抗体装订的壳,以及通过添加可溶性地高辛抗原而解体、导致病毒有效载荷的释放的壳的负染色TEM图像。(b、c)中的比例尺为50nm,(d)中的比例尺为100nm。

[0137] 实施例2:二十面体壳的抗原触发解体的结构表征

[0138] 为了在结构上表征和评估Mg2+依赖性IgG介导的壳稳定化,本发明人进行了Cryo-EM和激光扫描荧光显微术。图2(a)的上图中示出了在独立的冰中抗地高辛抗体在25mM $MgCl_2$下交联三角形-三角形界面的二十面体壳的示例性Cryo-EM显微照片。图2(a)的下图中示出了用两个抗地高辛抗体桥接每个三角形-三角形界面的组装的二十面体壳的Cryo-EM重建。

[0139] 然后,本发明人进行了激光扫描显微术。图2e)示出了在补充有8、12、16和20mM $MgCl_2$的0.5X TBE缓冲液中的0.75%琼脂糖凝胶的激光扫描荧光图像。将组装的壳在25mM $MgCl_2$下与抗地高辛抗体和不与抗地高辛抗体一起温育,随后稀释至相应的$MgCl_2$浓度并在相应的凝胶上电泳。本发明人进一步使用TEM来表征构型(A)和构型(B)。图2(f)中示出了不与抗地高辛抗体(左)或与抗地高辛抗体(右)温育并稀释至12mM $MgCl_2$的壳的负染色的TEM

图像,并且图2(e)中示出了与抗地高辛抗体和不与抗地高辛抗体温育并随后稀释至各种最终$MgCl_2$浓度的壳的归一化FRET比率。三角形亚基的每一侧在对称位置处用Cy3和Cy5荧光团进行功能化,从而仅在壳组装时产生能量转移。在22至14mM之间的$MgCl_2$浓度下FRET比率的初始降低是由增加的静电排斥导致的壳膨胀引起的。为了进一步表征二十面体壳的抗原触发解体,本发明人使用激光扫描显微术来证明二十面体壳的抗原触发解体。图3(a)示出了添加可溶性地高辛配体与稳定壳的抗地高辛抗体竞争结合,将抗体从弹簧加载的壳中置换出来,从而在不稳定的Mg^{2+}离子浓度下触发壳的解体。将装配有抗地高辛抗体的组装的壳与浓度增加的地高辛温育,以证明抗地高辛抗体稳定的壳(25μM可溶性地高辛)在可溶性地高辛抗原浓度增加时解体,如图3(a)中所示。图3(b)示出了抗二硝基酚抗体稳定化的壳在可溶性2,4-二硝基酚配体浓度提高时解体。

[0140] 图3(f)在左侧部分中显示了通过在三角形-三角形界面上安装地高辛和2,4-二硝基酚配体以及相应的抗体两者,实现了与门逻辑门控的壳解体。因此,与门壳的解体需要可溶性地高辛和2,4-二硝基酚两者的存在。图3(f)在右侧部分中显示了在补充有12mM $MgCl_2$的0.5X TBE缓冲液中的0.75%琼脂糖凝胶的激光扫描荧光图像。将装配有抗地高辛和抗二硝基酚抗体的组装的与门壳与浓度逐渐提高的地高辛(上)、2,4-二硝基酚(中)以及地高辛和2,4-二硝基酚(下)温育。与25μM 地高辛(上)、5mM 2,4-二硝基酚(中)以及25μM地高辛和5mM 2,4-二硝基酚(下)温育的装配有抗地高辛和抗二硝基酚抗体的壳的负染色TEM图像。

[0141] 尽管在上文中已参考附图描述了优选实施方式,但本领域技术人员将会理解,提供该实施方式仅用于说明性目的,而不应被解释为限制由权利要求书定义定的本发明的范围。

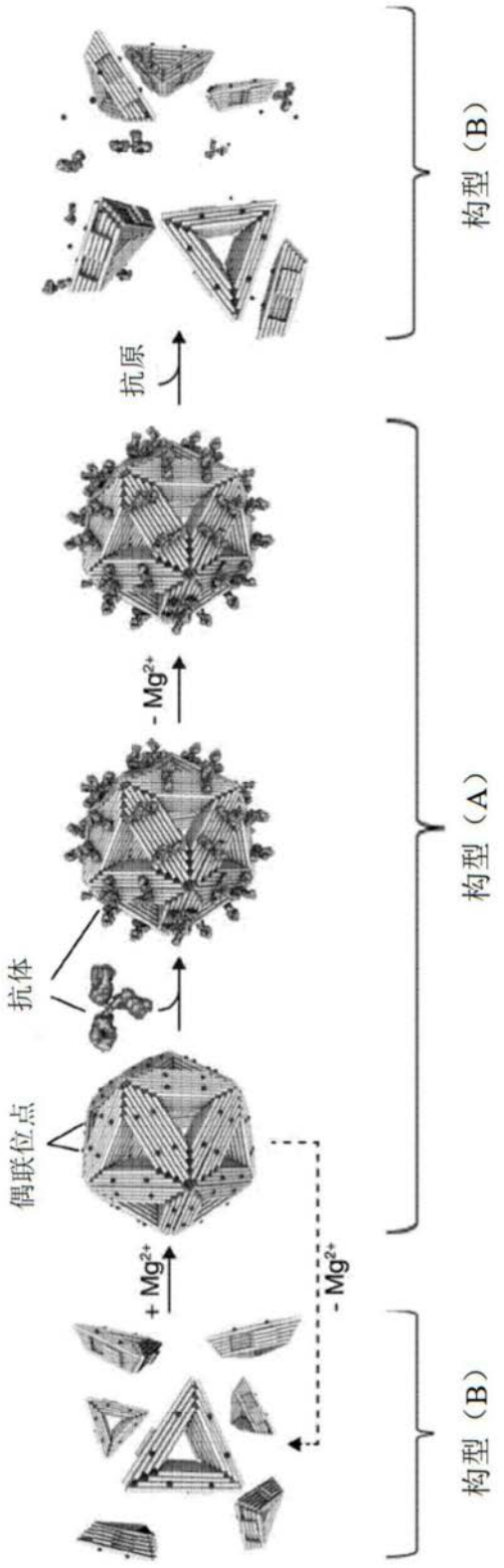


图1

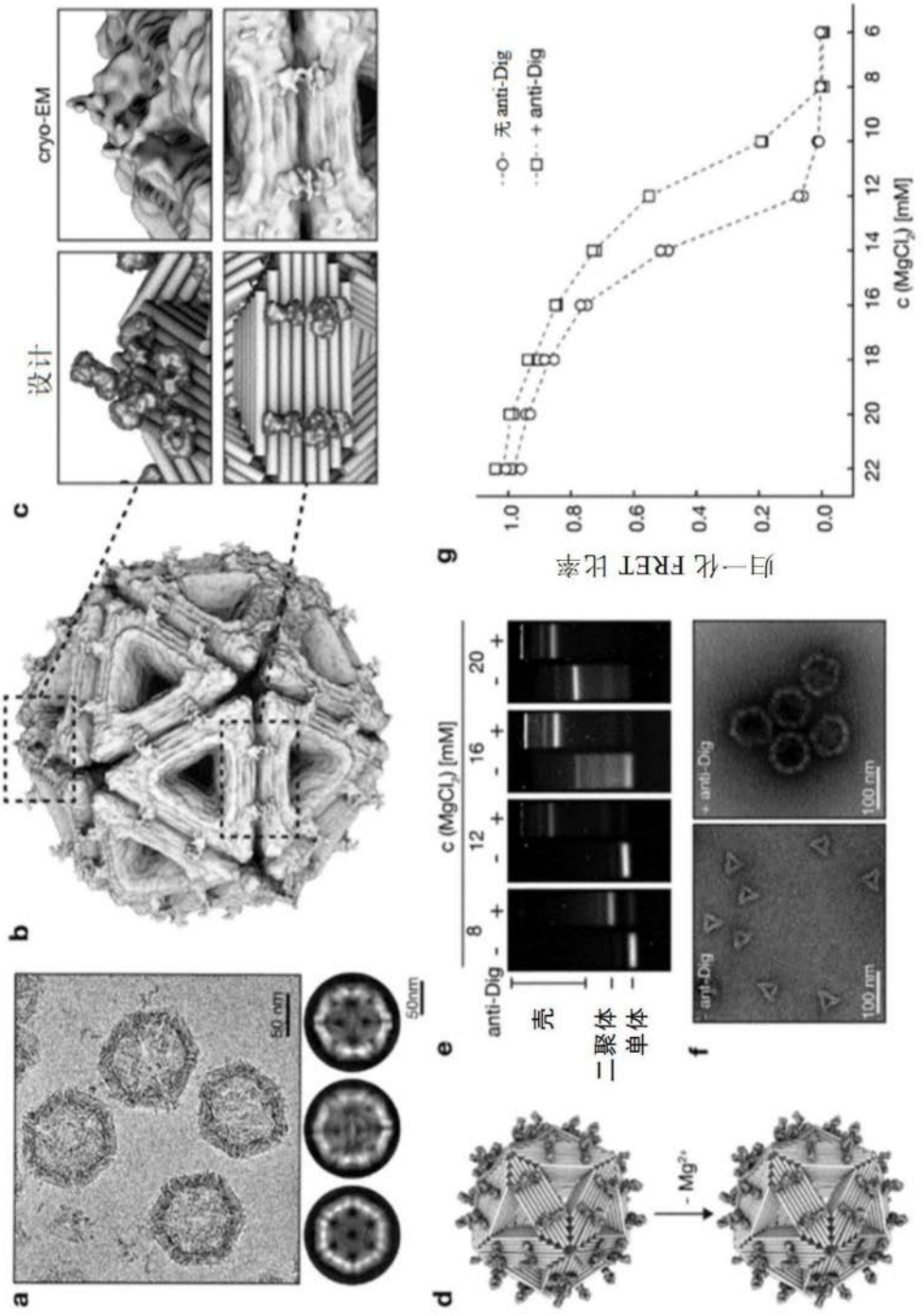

a
50 nm
50nm
b
c
设计
cryo-EM
d
- Mg2+
e
anti-Dig
8
12
16
20
c (MgCl2) [mM]
壳
二聚体
单体
f
- anti-Dig
+ anti-Dig
100 nm
g
归一化 FRET 比率
无 anti-Dig
+ anti-Dig
c (MgCl2) [mM]

图2

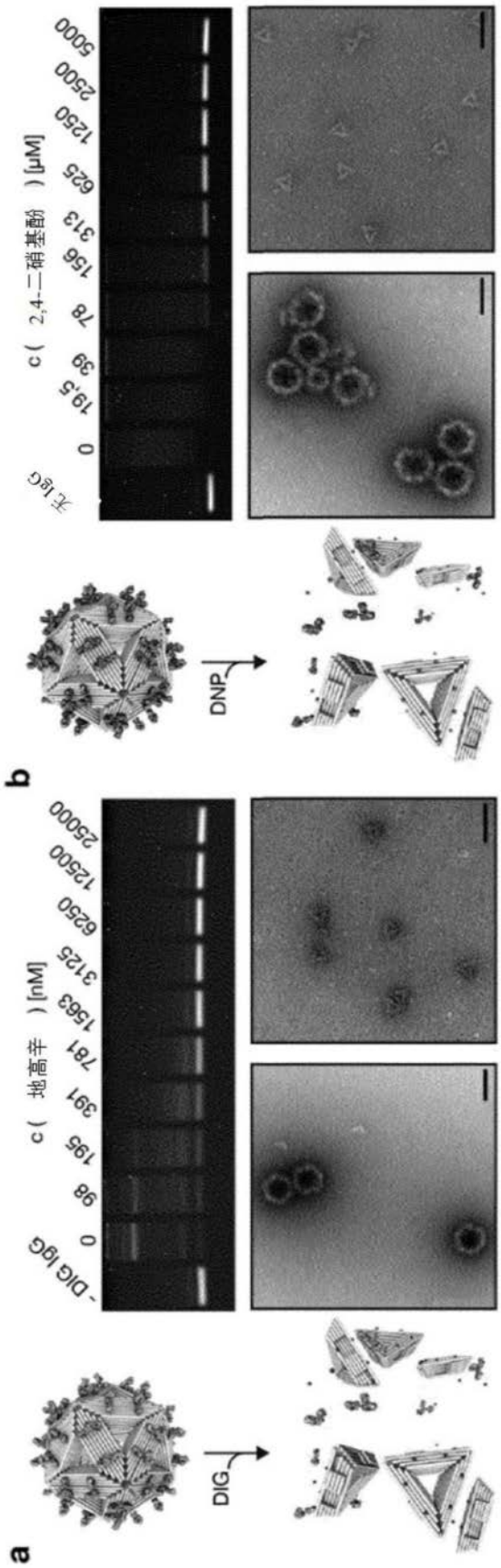

a
DIG
抗-DIG IgG
0
98
195
391
781
1563
3125
6250
12500
25000
c（地高辛）[nM]
b
DNP
无 IgG
0
19.5
39
78
156
313
625
1250
2500
5000
c（2,4-二硝基酚）[μM]

图3

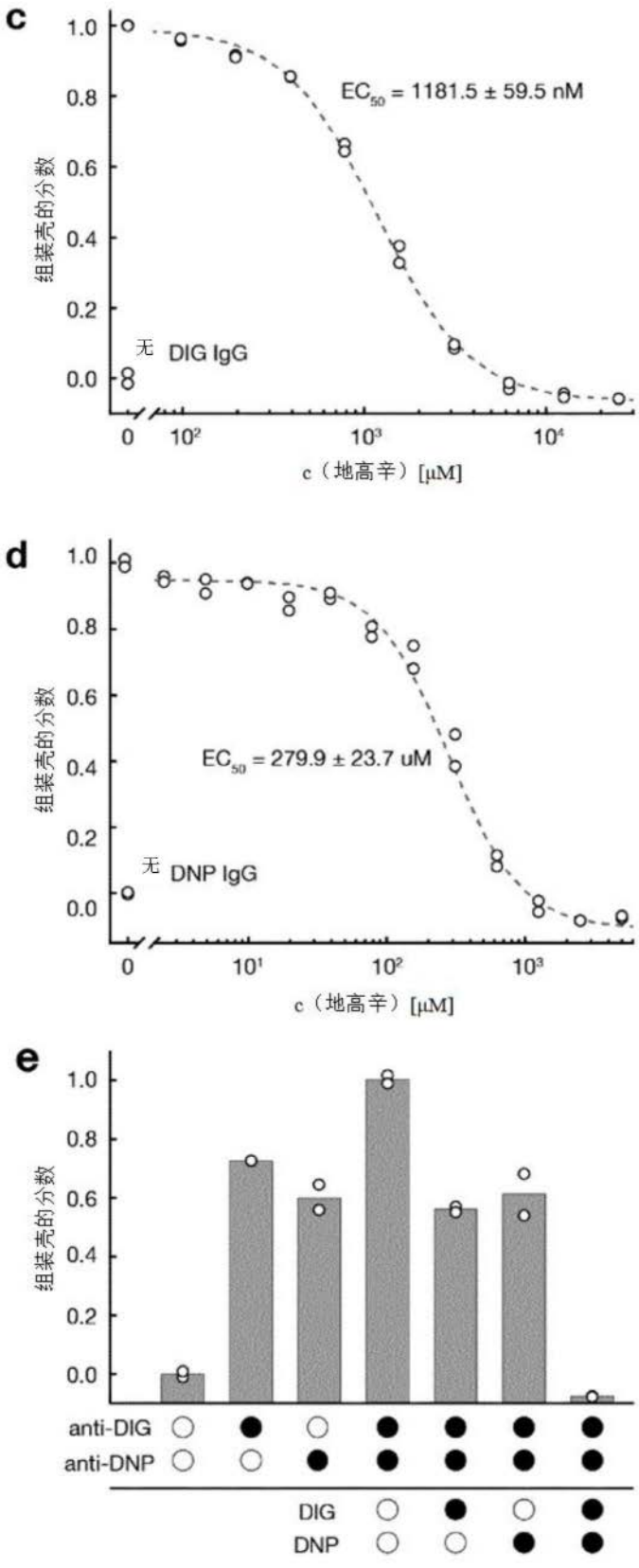

c
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
组装壳的分数
EC50 = 1181.5 ± 59.5 nM
无 DIG IgG
0
10²
10³
10⁴
c（地高辛）[μM]
d
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
组装壳的分数
EC50 = 279.9 ± 23.7 uM
无 DNP IgG
0
10¹
10²
10³
c（地高辛）[μM]
e
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
组装壳的分数
anti-DIG
anti-DNP
DIG
DNP

图3续图

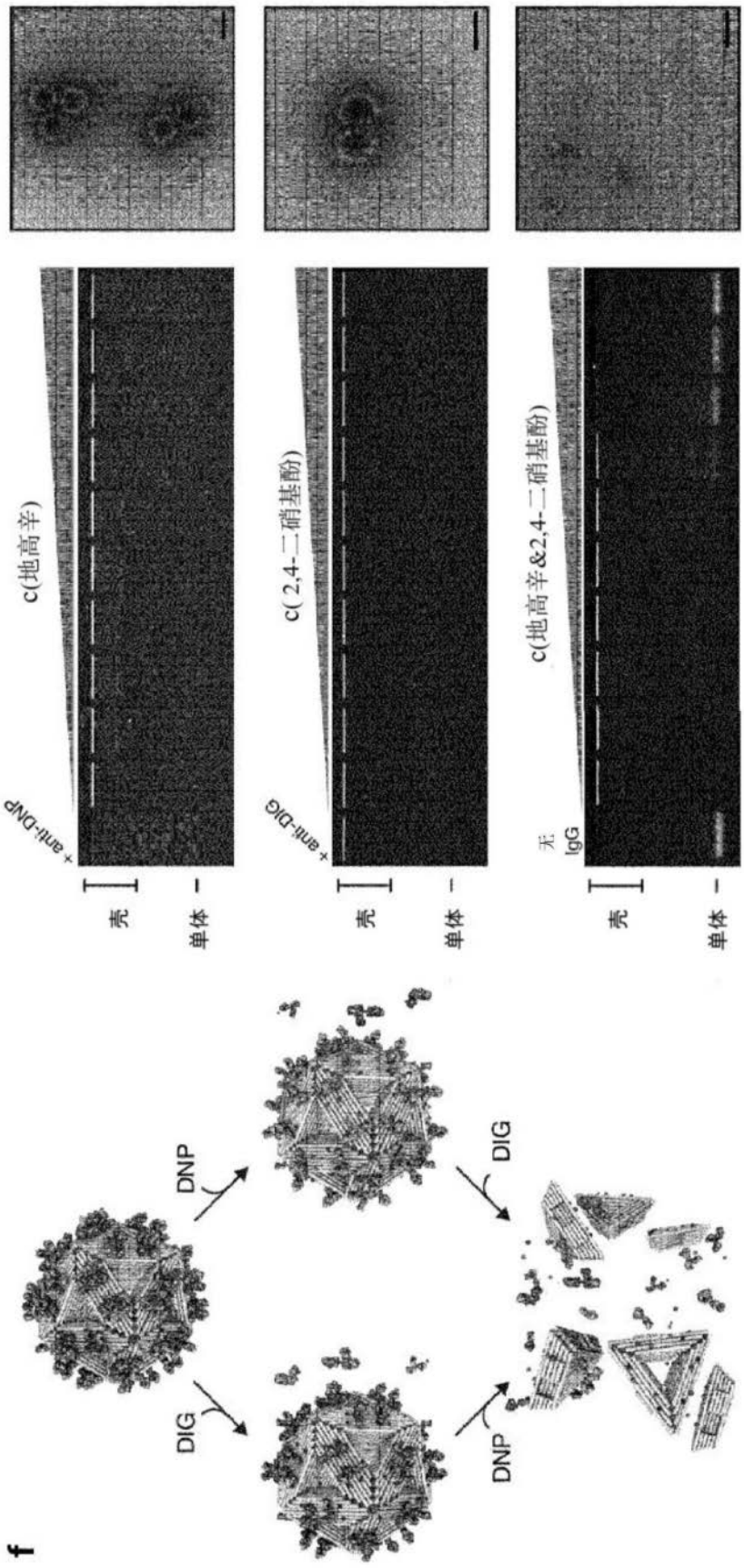

c(地高辛)
+ anti-DNP
壳
单体
c(2,4-二硝基酚)
+ anti-DIG
壳
单体
c(地高辛&2,4-二硝基酚)
无
IgG
壳
单体
f
DNP
DIG
DIG
DNP

图3续图

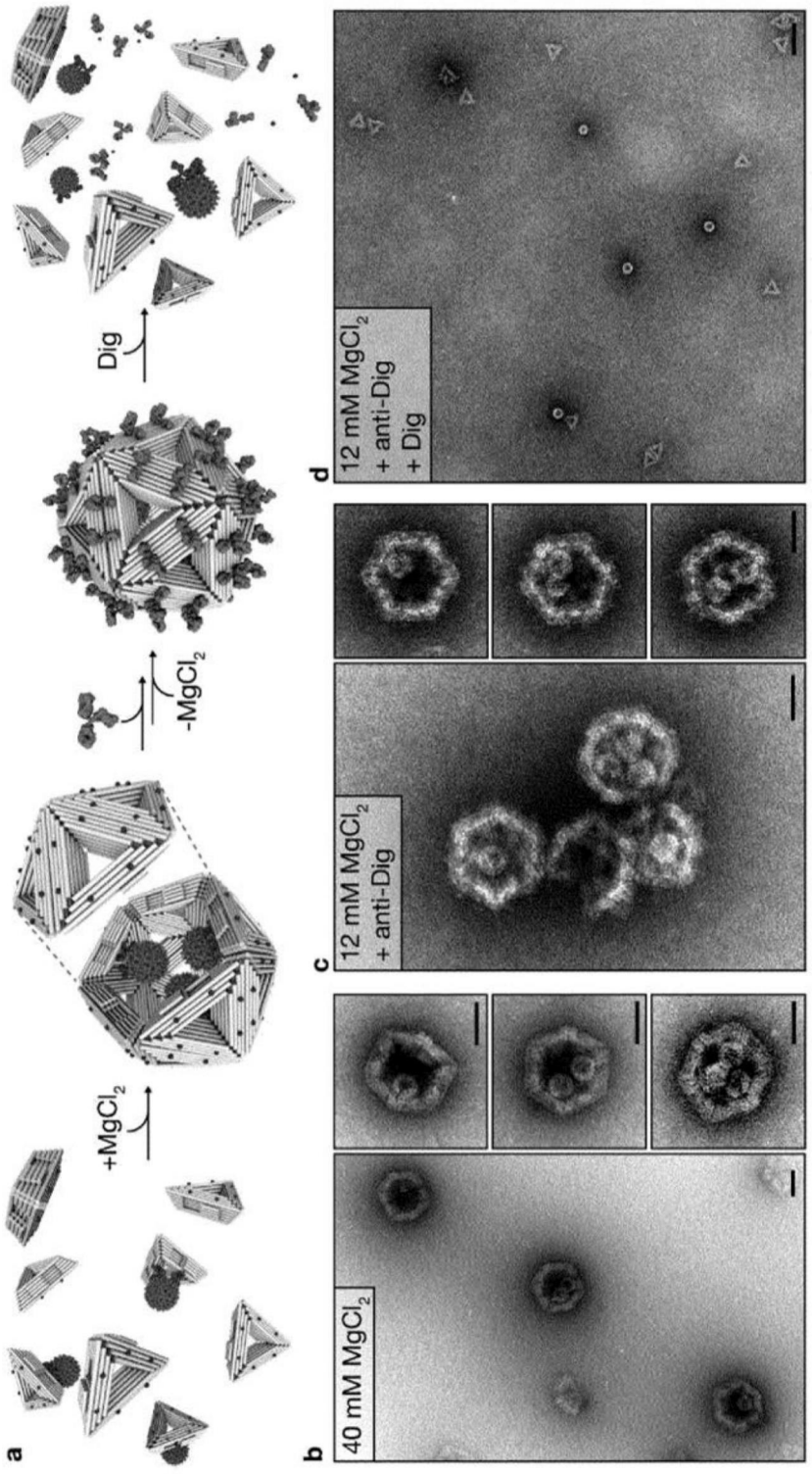

a
+MgCl2
-MgCl2
Dig
b
40 mM MgCl2
c
12 mM MgCl2
+ anti-Dig
d
12 mM MgCl2
+ anti-Dig
+ Dig

图4