(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202292389 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.12.05

(22) Дата подачи заявки
2021.02.22

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2018.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82Y 30/00 (2011.01)
A61K 47/54 (2017.01)
C07H 21/04 (2006.01)

(54) ПРОГРАММИРУЕМЫЕ ОБОЛОЧКИ ДЛЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ ВИРУСОВ

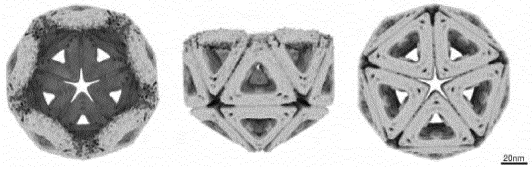
(31) **20158577.5**
(32) **2020.02.20**
(33) **EP**
(86) **PCT/EP2021/054307**
(87) **WO 2021/165528 2021.08.26**

(71) Заявитель:
ТЕХНИШЕ ЮНИВЕРЗИТЕТ МЮНХЕН (DE)

(72) Изобретатель:
Дитц Хендрик (DE)

(74) Представитель:
Микуцкая Т.Ю., Файбисович А.С., Рогова Е.В. (RU)

(57) Изобретение относится к наноструктуре на основе макромолекулы, такой как наноструктура на основе ДНК, для инкапсуляции вируса или вирусной частицы, к композиции, содержащей вирус или вирусную частицу, инкапсулированную такой наноструктурой на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению, и к способу инкапсуляции вируса или вирусной частицы путем использования такой наноструктуры на основе макромолекулы.



202292389 A1

202292389 A1

Описание изобретения

ПРОГРАММИРУЕМЫЕ ОБОЛОЧКИ ДЛЯ ИНКАПСУЛЯЦИИ ВИРУСОВ

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе макромолекулы, такой как наноструктура на основе ДНК, для инкапсуляции вируса или вирусной частицы, к композиции, содержащей вирус или вирусную частицу, инкапсулированную такой наноструктурой на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению, и к способу инкапсуляции вируса или вирусной частицы с использованием такой наноструктуры на основе макромолекулы.

Предшествующий уровень техники

Вирусные инфекции ежегодно становятся причиной миллионов заболеваний и смертей в мире, приносят множество страданий, а также влекут огромные потери для общества и экономики в виде затрат на здравоохранение, потерь рабочего времени и других, более сложно измеряемых проблем, таких как проблемы психического здоровья, связанные с потерей родителей, детей и попечителей, а также стигматизация. Прогнозируется, что изменение климата и глобальная миграция повысят угрозу вспышек вирусных заболеваний, поскольку переносчики инфекций распространяются в регионах, которые до сих пор были слишком холодными для их выживания. Распространенность вирусных инфекций будет увеличиваться из-за расширения среды обитания людей, урбанизации и роста мегаполисов с ростом плотности населения, роста количества поездок, не только локальных, но и на дальние расстояния, а также из-за множества других факторов, вызывающих заболевания (1). Вирусы относятся к классу патогенов, которые с наибольшей вероятностью адаптируются к новым условиям окружающей среды вследствие короткого времени генерации и генетической изменчивости, способствующей быстрой эволюции (2). Для большинства вирусных заболеваний (~70% вирусов, в настоящее время включенных в перечень ВОЗ) эффективное лечение

недоступно. Немногочисленные существующие виды антивирусной терапии почти исключительно нацелены на конкретный вирус и не могут применяться против новых патогенов. Кроме того, проблема антивирусной терапии состоит в том, что для того, чтобы она была эффективна, ее необходимо начинать в короткие сроки после инфицирования, до того, как вирусная нагрузка станет слишком высокой и вызовет симптомы заболевания. Возникающие вирусные угрозы требуют быстрой реакции, но готовых к использованию, широко применимых антивирусных препаратов в настоящее время не существует.

В связи с этим, полезно сначала рассмотреть, как работают современные виды антивирусной терапии. Существующие антивирусные препараты нацелены на вирус-специфические белки, по большей части на полимеразы, либо на основные вирусные или клеточные структуры, которые способствуют репликации и распространению вируса. Основными пригодными для воздействия этапами в цикле репликации вируса являются (1) прикрепление вирусных частиц к клеточной мембране клеток-хозяев; (2) внедрение в клетки-хозяева; (3) высвобождение капсида вируса в цитоплазму и перенос вирусного генома к месту репликации; (4) синтез вирусных нуклеиновых кислот и белков и посттрансляционная обработка вирусных белков; (5) сборка компонентов вируса с получением новых вирусных частиц; (6) высвобождение вновь образованных вирусов из инфицированной клетки. Большая часть клинически доступных антивирусных препаратов представляют собой ингибиторы полимеразы, которые являются специфичными для данного вирусного фермента. Примеры таких препаратов – ацикловир (3), активный против вирусов простого герпеса и ветряной оспы; тенофовир, активный против вируса гепатита В (ВГВ) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), и софосбувир, активный против вируса гепатита С (ВГС). Примеры препаратов, нацеленных на различные стадии жизненного цикла вируса: энфувиртид (4), который ингибирует слияние ВИЧ (стадия 2); амантадин (5), который ингибирует декапсидацию вируса гриппа А (стадия 3); или осильтамивир – ингибитор нейраминидазы (6), который препятствует высвобождению вируса

гриппа А из клеток-хозяев (стадия 6) (6). Однако эти препараты могут действовать только при репликации или распространении вируса, но не могут уничтожить или нейтрализовать его. Ни один из этих антивирусных препаратов не имеет широкого применения.

Недавно была представлена конструкция наноструктуры ДНК в форме звезды в качестве матрицы для отображения нескольких мотивов связывания со свойствами распознавания пространственного рисунка, которые придают поверхности вируса лихорадки денге (DENV) сенсорные и вирусоингибирующие свойства (Kwon и др.; (56)). Хотя утверждается, что технологию конструирования молекулярной платформы можно адаптировать для выявления других болезнетворных патогенов и борьбы с ними путем генерирования необходимых паттернов лигандов на специальных наноархитектурах ДНК, также утверждается, что требуется заданная наноархитектура ДНК с точными свойствами распознавания многовалентного пространственного рисунка, поскольку без оптимальной идентичности формы для предотвращения образования требуемых взаимодействий «шпильки» наносится ущерб сенсорным и ингибирующим свойствам. Таким образом, это предложение, очевидно, не обеспечивает универсально применимого подхода для нацеливания на различные или еще не охарактеризованные вирусные частицы, например, необходимого в случае возникновения нового вируса, как видно в настоящее время с коронавирусом. Кроме того, довольно открытая конструкция наноструктур несет опасность, состоящую в том, что белки капсида вируса все еще могут выступать наружу, быть иммунологически активными и/или приводить в действие процесс вирусной инфекции.

Ранее было разработано множество дополнительных наноструктур на основе олигонуклеотидов, которые содержат определенные полости. В публикации CN 110 272 980 описана структура оболочки ядра, полученная из мономеров ДНК, обладающих тройничной структурой, в которой полученную структуру сферической формы используют для выявления молекул микроРНК. В документе US 2018/016569 описана наноструктура на основе ДНК,

содержащая полость – так называемую наноклетку. В публикации WO2017/049136 описана цилиндрическая наноструктура нуклеиновой кислоты, имеющая сферическую форму, с полостью, содержащей связующую последовательность для нуклеиновых кислот или пептидов. В публикации WO2013/148186 описана наноструктура, содержащая ядро из нуклеиновых кислот с липидным покрытием, которая используется для инкапсуляции терапевтического средства. В публикации WO2017/189870 описаны наноструктуры на основе нуклеиновых кислот, имеющие различную геометрическую форму. Источник Li и др. (57) описывают сферические наноструктуры на основе ДНК. Во всех этих случаях полости, содержащиеся в этих структурах, слишком малы для обеспечения успешной инкапсуляции вирусов целиком, и/или структуры являются слишком открытыми, вследствие чего поверхности белков вирусов все еще могут взаимодействовать со структурами клетки-мишени хозяина.

Последние несколько недель показали, что в геномах вирусов, таких как вирусы COVID-19, часто имеются мутации, которые могут ослабить или даже свести к нулю успех таких вариантов лечения, как вакцинация. Таким образом, имеется большая необходимость в терапевтическом вмешательстве, которое допускает быструю адаптацию к новым разработкам, например, применительно к инфицирующей способности данного вируса. Ни один из подходов, упомянутых выше, не является модульным и достаточно гибким для обеспечения быстрой адаптации структур к мутационным изменениям вирусов.

Таким образом, хотя к настоящему времени были разработаны или предложены различные стратегии лечения вирусных инфекций, все еще существует потребность в разработке концепции универсальной антивирусной лекарственной платформы для нацеливания на различные вирусные патогены. В частности, представляется очень желательной концепция, которая не опирается на ранее детализированные сведения о генетике и свойствах вируса-мишени.

Сущность изобретения

Задачей настоящего изобретения является обеспечение конструкций, позволяющих осуществлять инкапсуляцию вируса или вирусной частицы. Решение этой проблемы, т.е. использование макромолекулярных строительных блоков, таких как наноструктуры на основе ДНК, еще не было изучено или предложено в работах из уровня техники.

Поэтому в одном своем аспекте настоящее раскрытие предлагает наноструктуру на основе макромолекулы, заключающую в себе полость с диаметром по меньшей мере 20 нм для инкапсуляции вируса или вирусной частицы.

В конкретном варианте воплощения раскрытие предлагает наноструктуру на основе макромолекулы, которая представляет собой наноструктуру на основе ДНК.

В другом аспекте раскрытие предлагает композицию, содержащую вирус или вирусную частицу, инкапсулированную наноструктурой на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте предложен способ инкапсуляции вируса или вирусной частицы, содержащий этапы: обеспечения наноструктуры на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению и приведения упомянутой наноструктуры на основе макромолекулы в контакт со средой, содержащей или предположительно содержащей упомянутый вирус или вирусную частицу.

В настоящем раскрытии предполагаются все сочетания любого одного или более вышеуказанных аспектов и/или вариантов воплощения, а также сочетания с любым одним или более вариантов воплощения, изложенных в подробном описании и примерах.

Другие признаки, задачи и преимущества композиций и способов, изложенных в настоящем документе, станут ясными из описания и чертежей, а также из формулы изобретения

Перечень фигур чертежей

Фиг. 1 показывает принципы конструирования. (A) Триангуляционное

число икосаэдрических оболочек. Каждый окрашенный треугольник представляет собой одну из 20 граней, образующих икосаэдр. Маленькие треугольники представляют собой треугольные конструкционные блоки. Индексы (h,k) указывают на местоположение пентамеров в оболочке. (Aa) Икосаэдрическая оболочка, инкапсулирующая капсид вируса. (B) Природные икосаэдрические оболочки вирусов. Слева – оболочка T=1, построенная из идентичных субъединиц (MVM) (22). Справа – оболочка T=3, построенная из нескольких копий трех различных субъединиц (CCMV) (23). (C) Моделирование ENRG-MD (38) типичного прототипа конструкции субъединицы оболочки в начале (слева) и в конце (справа) моделирования. (D и E) Цилиндрическая модель треугольников ДНК-оригами и соответствующих оболочек. Стороны треугольников изменяются за счет выступов (светлых) и углублений (темных). Стрелки указывают на стороны, дополняющие форму. Для каждой конструкции оболочки одна из ее 20 икосаэдрических граней была смещена (см. (A)). α представляет собой угол скоса сторон, # – число треугольников ДНК-оригами, из которых сконструирована оболочка (детали конструкции см. на Фиг. 36-39).

Фиг. 2 показывает структуры оболочек и субъединиц оболочки. (A) Микрофотографии криоэлектронного микроскопа (Cryo EM) скомпонованных оболочек в свободно стоящем льду (O, T=1) и на кружевных угольных сетках с углеродной подложкой (T=3, T=4). (B-E) реконструкции субъединиц оболочки, сделанные на криоэлектронном микроскопе, и полностью скомпонованные оболочки (октаэдр для оболочек T=4). Средние значения двумерного класса показывают скомпонованные оболочки с различных ориентаций. (F) Валидация на электронном микроскопе дизайна оболочки T=9. Сверху слева представлены реконструкции криоэлектронного микроскопа для трех треугольников, образующих оболочку T=9. Сверху справа представлен негатив микрофотографии электронного микроскопа для скомпонованных оболочек. Снизу представлено сопоставление шлифов для оболочки модели со шлифами томограммы, рассчитанной из серии наклонов

электронного микроскопа. Стрелки указывают на положения пентамеров в оболочке.

Фиг. 3 показывает выход и стабильность оболочки. (A) Флуоресцентные изображения, просканированные лазером, применительно к 0,5% агарозным гелям показывают сборку в виде октаэдров, T=1, T=3 и T=4 оболочки при 40°C с концентрацией мономера 5 нМ в различных точках времени. Сплошные линии показывают профили интенсивности треков в поперечном сечении, полученные для однодневных образцов. (B) Эксперименты по замене треугольников. Голубой: оболочки T=1, помеченные парой FRET (fluorescence resonance energy transfer, резонансный перенос энергии флуоресценции). Оранжевый: не помеченные оболочки. Символы показывают сигналы FRET, измеренные в зависимости от времени инкубации в присутствии указанных концентраций Mg^{2+}. Столбики погрешностей представляют собой данные РЭМ (растрового электронного микроскопа) повторных измерений (детали конструкции см. Фиг. 44). (C) Слева: схематические изображения ковалентной стабилизации оболочек с использованием фрагментов CNVK (циановинилкарбозола), помещенных на участки стэкинга комплементарной пары оснований. Справа: флуоресцентное изображение, просканированное лазером, для 0,5% агарозного геля, на котором образцы оболочки были помещены в условия дестабилизации оболочки (низкое содержание соли, 5 мМ Mg^{2+}). Слева направо: трек маркера, не освещенная оболочка T=1 (поддается разборке), образец, освещенный в течение 30 мин светом с длиной волны 365 нм (остается нетронутым), образец, освещенный светом с длиной волны 365 нм, дополнительно освещают светом с длиной волны 310 нм в течение 1 мин для обращения ковалентной связи (поддается разборке). S=субъединицы. C=завершенные оболочки. P=карман. (D) Негативное изображение ПЭМ (просвечивающего электронного микроскопа) для октаэдрических оболочек, покрытых смесью 1:1 олиголизина и олиголизина-ПЭГ (полиэтиленгликоля) и инкубированных в течение 1 ч и 24 ч в 55% сыворотке мыши при 37°C.

Фиг. 4 показывает программирование частичной сборки оболочки и

захвата вирусного капсида (здесь: коровые частицы вируса гепатита B (ВГВ). (A-C) Цилиндрические модели треугольников оригами ДНК и соответствующих частичных оболочек. Стороны треугольников изменяются за счет выступов и углублений. Стрелки указывают на стороны, дополняющие форму. Белые кресты обозначают деактивированные сайты взаимодействия. (D-F) Трехмерные реконструкции полуоктаэдра (D), половины оболочки T=1 (E) и оболочки T=1 без вершины пятиугольника (F), полученные с помощью криоэлектронного микроскопа. Стрелки указывают на плотность, обусловленную якорными сайтами для крепления фрагментов, связывающихся с вирусом. (G) Реконструкция в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для коровой частицы ВГВ (Идентификатор EMD-0271 банка данных электронной микроскопии). (H) Слева: Разрез крио-ЭМ-карты октаэдрической оболочки ДНК с захватом коровой частицы ВГВ. Плотность вокруг минимальной нуклеосомы ВГВ приписывается слою антител, соединяющих коровые частицы ВГВ с октаэдрической оболочкой. Справа: реконструкция в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для двух октаэдрических полуоболочек, координирующих захваченную частицу вируса гепатита B. (I) Слева: Разрез карты, аналогичный случаю (H). Пороги электронной плотности различаются, что заставляет коровую частицу ВГВ выглядеть более толстой в полуоболочке T=1 по сравнению с захваченной в полуоктаэдре. Справа: реконструкция в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для половины оболочки T=1, поглощающей коровую частицу ВГВ. (J) Негатив РЭМ-изображений оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника, поглощающей до трех коровых частиц ВГВ. (K) Лабораторные эксперименты по блокировке вирусов ELISA 2,5 пМ коровой частицы ВГВ, инкубированной предварительно скомпонованными смесями 1 нМ олигонуклеотид-конъюгированного захватывающего антитела и различных концентраций половин оболочек T=1. Столбики погрешностей представляют собой стандартное отклонение трехкратных измерений.

Фиг. 5 показывает принцип дизайна треугольных субъединиц. (A) Схематические изображения треугольных конструкций T=1 с углом скоса альфа. (B) Поперечное сечение стороны треугольников, состоящих из 4x6 спиралей в упаковке в виде квадратной решетки без угла скоса (слева) и с таковым (справа). Сторона поворачивается вокруг самой длинной спирали, обозначенной как «0». d – это расстояние между центрами двух соседних спиралей (2,6 нм), а x – радиальное расстояние от любой спирали до спирали «0». Для преобразования нм в пары оснований мы использовали рост 0,34 нм на паре оснований. (C и D) Схема, иллюстрирующая расчет длин спиралей. Слева представлена цилиндрическая модель треугольника. Средние схематические изображения длин a(x) и b(x) различных спиралей в треугольнике в зависимости от расстояния x до спирали ‘0’. Справа представлены формулы для расчета разности длин отдельных спиралей. (E) Маршрутизация скаффолда через треугольную структуру. Слева представлен скаффолд, образующий петлю вокруг всего треугольника до его соединения со следующим слоем. Справа показано, что каждый угол образован определенной областью скаффолда (различные синие точки) и соединен только одним пересечением с соседним углом (красные). (F) 1,5% агарозного геля, содержащего буфер 0,5xTBE и 5,5 мМ $MgCl_2$, показывающий исходные складные ширмы согласно (46). (G) Интегрированные профили треков для двух треков, обозначенных пунктирными квадратами в (B). $T=1_{петля}$ образует множество агрегатов и хуже образует треугольники. Изменение маршрутизации скаффолда на угол $T=1_{угол}$ сильно повышает выход по фолдингу. Затем все треугольники, представленные в данной работе, конструируют с усовершенствованной маршрутизацией скаффолда по $T=1_{угол}$. A: некачественно сформированные агрегаты, M: правильно сложенные мономеры. (H)+(I) Цилиндрическая модель треугольника T=1 с примерной маршрутизацией нити скаффолда для первых четырех спиралей. (H) Скаффолд образует петлю вокруг всего треугольника до его соединения со следующей спиралью. (I) Каждый угол образуется определенной областью скаффолда

(различные синие точки) и соединяется только с одним пересечением (красное) с соседним углом.

Фиг. 6 показывает реконструкцию в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для треугольника октаэдра. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника октаэдра в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК (свободного секреторного компонента), которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 7 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для треугольника T=1. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника T=1 в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 8 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для треугольника T=3. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника T=3 в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 9 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа треугольника T=4, $T_{равн}$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника $T_{равн}$ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с

различных углов зрения.

Фиг. 10 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа треугольника T=4, $T_{изо}$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника $T_{изо}$ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 11 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа треугольника T=9, $T_{пент}$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа треугольника $T_{пент}$ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 12 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для треугольника T=9, $T_{гекс1}$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника $T_{гекс1}$ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 13 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для треугольника T=9, $T_{гекс2}$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольника $T_{гекс2}$ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 14 показывает коррекцию для дефектов фолдинга в $T_{гекс1}$. (A)

Расчетная схема треугольника $T_{гекс1}$ с фиксированным углом. (B) Увеличение по местоположению поврежденного угла, показывающее различия между двумя вариантами расчетной схемы. (C и D) Карта, полученная с помощью криоэлектронного микроскопа для двух вариантов треугольника $T_{гекс1}$. Стрелки указывают на местоположение поврежденного угла. (E) 1,5% гелей агарозы с различными концентрациями $MgCl_2$, демонстрирующими димеризацию треугольников $T_{пент}$ и $T_{гекс1}$. Все стороны, не вовлеченные в связывание двух треугольников, были пассивированы поли-T-удлинителями на стэкинг-контактах. Тогда как поврежденный угол препятствует связыванию двух треугольников друг с другом из-за отсутствия стэкинг-контактов, треугольник с фиксированными углами связывается с $T_{пент}$ и компонуется с образованием димеров. Трек 1: $T_{пент}$ + $T_{гекс1}$ (поврежденный угол), Трек 2: $T_{пент}$ + $T_{гекс1}$ (фиксированный угол). D: димер, M: мономер.

Фиг. 15 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для скомпонованного октаэдра при 17,5 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для октаэдра в свободно стоящем льду при 17,5 мМ $MgCl_2$. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Классы после 3D классификации в relion3. (E) Уточнение, без использования какой-либо симметрии (C1). (F) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии при четырех-, трех и двукратном складывании (слева направо).

Фиг. 16 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа оболочки T=1 при 20 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для оболочки T=1 в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Классы после 3D классификации в relion3. (E) Уточнение без использования какой-либо симметрии (C1). (F) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии при пяти-, трех и

двукратном фолдинге (слева направо).

Фиг. 17 показывает реконструкцию с помощью крио электронного микроскопа для оболочки T=1 при 25 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для оболочки T=1 на кружевной угольной сетке с углеродной подложкой. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии при пяти-, трех и двукратном фолдинге (соответственно, слева направо).

Фиг. 18 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для оболочки T=3 при 20 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для оболочки T=3 на кружевной угольной сетке с углеродной подложкой. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии при пяти-, трех- и двукратном фолдинге (слева направо).

Фиг. 19 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для оболочки T=4 при 25 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для оболочки T=4 на кружевной угольной сетке с углеродной подложкой. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии при пяти-, трех- и 2-двукратном фолдинге (слева направо).

Фиг. 20 показывает негатив томограмм электронного микроскопа треугольника T=1 с углом скоса -5°. (A) Сверху слева: Схематические изображения треугольных конструкций T=1 с измененным на 5° углом скоса в обоих направлениях (исходный угол скоса 20,9°). Сверху справа: Изображение, просканированное лазером, на агарозном геле, на котором реакции сборки

оболочки всех трех вариантов конструкции были подвергнуты электрофорезу. Снизу: примерные негативные микрофотографии ТЭМ и средние значения двумерного класса продуктов сборки оболочки. (B) Негативное изображение ТЭМ скомпонованных треугольников T=1 и со сниженным на -5° углом скоса, скомпонованных при 35 мМ $MgCl_2$. Пунктирные квадраты указывают на сборки, томограммы которых показаны на (C) и (D). (C) Четыре шлифа томограммы скомпонованной оболочки T=1. Белые стрелки указывают на местоположения снятия напряжения, которое накапливается из-за неправильного угла скоса. (D) Четыре шлифа томограммы не полностью закрытой сборки.

Фиг. 21 показывает данные ТЭМ и HIM для оболочек T=1, T=3 и T=9. (A) 0,5% гелей агарозы, содержащих буфер 0,5x TBE и 20 мМ $MgCl_2$. Гели функционировали в течение 1,5 ч при напряжении смещения 90 В. Буфер был заменен по истечении 45 мин. В то время как октаэдрические треугольники компонуются при всех тестируемых концентрациях $MgCl_2$ с образованием оболочек в ходе реакции фолдинга треугольника, треугольники T=1 компонуются только при 20мМ $MgCl_2$ или выше с образованием закрытых оболочек. В растворе имеются штапельные нити, поскольку треугольники складываются с четырехкратным избытком штапельных нитей по сравнению с нитями скаффолда и не очищаются до их загрузки в агарозный гель. Реакционные смеси, подвергнутые фолдингу, содержали различные количества $MgCl_2$ (15-30 мМ) и были подвергнуты термическому отжигу с линейным изменением температуры от 60°C до 45°C, со снижением температуры на 1°C в час. sc: эталонный скаффолд, pas.: пассивированный треугольник, 15-30: концентрация $MgCl_2$ в мМ при реакции фолдинга, P: карман, C: оболочка, M: мономер, S: избыточные штапельные нити. (B) Негативные РЭМ-изображения октаэдров и оболочек T=1, скомпонованных, соответственно, в ходе реакции фолдинга треугольников при 20-25 мМ $MgCl_2$. Однонитчатые избыточные штапельные нити еще видны. (C) Негативное РЭМ-изображение скомпонованных треугольников T=1, скомпонованных при

25 мМ $MgCl_2$. (D) HIM-изображения оболочек T=3, покрытых 5 нМ слоем AuPd. (E) Негативные РЭМ-изображения скомпонованных оболочек T=9. Сверху: примерные изображения полностью или частично скомпонованных оболочек. Белые стрелки указывают на правильные местоположения пентамеров в сборке. Снизу: Четыре шлифа томограммы, показывающие три полностью скомпонованных оболочки T=9.

Фиг. 22 показывает пример процедуры для извлечения полного выхода оболочки из гелей агарозы (выполнено с помощью Igor Pro 7). Были извлечены профили треков для треков, содержащих образец (оранжевый), а также пустого трека (синего) для получения сигнала фона. Затем был вычтен фон, нормализован график и аппроксимирован по Гауссу к максимуму оболочки. Область под Гауссовой кривой соответствует полному выходу оболочки.

Фиг. 23 показывает эксперименты по обмену субъединиц. Гели агарозы были использованы для извлечения соотношения FRET для экспериментов по обмену субъединиц. Гели были использованы при 25 мМ (A), 22,5 мМ (B) и 20 мМ $MgCl_2$ (C). Все гели представляют собой 0,5% гелей агарозы, содержащие буфер 0,5x TBE, с различными концентрациями $MgCl_2$, и приведены в действие на 1,5 ч при напряжении смещения 90 В. Буфер был заменен по истечении 45 мин. Тот же гель был просканирован в канале Cy3 (слева) и FRET (справа). Треугольники с олигонуклеотидами, помеченными Cy3 и Cy5, в подходящих местоположениях (см. Фиг. 43) и не помеченные треугольники были скомпонованы по отдельности при 25 мМ $MgCl_2$, до перемешивания скомпонованных оболочек и регулировки концентрации $MgCl_2$. Смеси были инкубированы в течение времени до 14 суток при 40°C. В определенные точки времени были взяты аликвоты, заморожены в жидком азоте и выдержаны при -20°C. В качестве эталона для полностью замененных субъединиц, помеченные и не помеченные треугольники были скомпонованы в соотношении 1:1 при 25 мМ $MgCl_2$ (смешанные).

Фиг. 24 показывает принцип конструирования треугольных субъединиц для полуоболочек. Цилиндрическая модель треугольников ДНК-оригами,

скомпонованных в полуоктаэдры (A+D), половины оболочек T=1 (B+E) или оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника вершина (C+F). Стороны треугольников изменяются за счет выступов (светлых) и углублений (темных). Стрелки указывают на стороны, дополняющие форму. В зависимости от активации определенных сторон, треугольники образуют различные виды сборок. Все стороны, не задействованные в связывании треугольников, были пассивированы поли-T-удлинениями на стэкинг-контактах.

Фиг. 25 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для полуоктаэдрической оболочки. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для полуоктаэдрической оболочки в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Классы после 3D классификации в relion3. (E) Уточнение без использования какой-либо симметрии (C1). (F) Карта электронной плотности полуоктаэдрической оболочки, реконструированная с симметрией C4.

Фиг. 26 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для половины оболочки T=1. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для половины оболочки T=1 в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) Классы после 3D классификации в relion3. (D) Уточнение без использования какой-либо симметрии (C1). (E) Уточнение с использованием симметрии C5. (F) Уточнение для нескольких тел с использованием шести тел, обозначенных цветами в relion3.

Фиг. 27 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации.

(C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Классы после 3D классификации в relion3. (E) Уточнение без использования какой-либо симметрии (C1). (F) Карта электронной плотности оболочки T=1 при отсутствующей одной вершиной пятиугольника, реконструированный с симметрией C5.

Фиг. 28 показывает негативное изображение электронного микроскопа для инкапсулированных минимальных нуклеосом ВГВ с использованием полуоктаэдра (A), половины оболочки T`=1 (B) и оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника (C). Все оболочки были скомпонованы при 30 мМ $MgCl_2$, инкубированы за ночь антителом 17H7 с измененным ДНК, а затем инкубированы частицами ВГВ в течение 1-4 ч или за ночь.

Фиг. 29 показывает негативный контроль связывания ВГВ. (A) Негативные изображения коровых частиц ВГВ и половин оболочек T=1 в отсутствие антител 17H7. (B) Негативные изображения половин оболочек T=1, снабженных антителами 4D06 HБСAg и коровыми частицами ВГВ.

Фиг. 30 показывает реконструкцию в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для полуоктаэдрической оболочки с захваченной коровой частицей ВГВ. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для полуоктаэдрической оболочки с коровыми частицами ВГВ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) Классы после 3D классификации в relion3. Одна половина класса 1 и класса 2 плохо определена из-за усреднения нескольких конформаций второй полуоболочки. (D) Уточнение для нескольких тел с тремя телами (две полуоболочки и коровая частица ВГВ), с использованием частиц в классе 3 и в классе 4 в (C). (E) Первый собственный вектор многотельного уточнения, показывающий вращательное движение второй полуоболочки. (F) Второй собственный вектор многотельного уточнения, показывающий скользящее движение второй полуоболочки.

Фиг. 31 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного

микроскопа для половины оболочки T=1 с захваченной коровой частицей ВГВ. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для половины оболочки T=1 с захваченной коровой частицей ВГВ в свободно стоящем льду. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Классы после 3D классификации в relion3. (E) Уточнение без (слева) и с (справа) использованием симметрии C5.

Фиг. 32 показывает блокировку вирусов ELISA in vitro. (A) Схематические изображения блокировки ELISA in vitro. Коровая частица ВГВ сама по себе может связываться с иммобилизованными антителами CAgHB и может быть визуализирована путем последующей промывки анти-CAgHB, конъюгированного с пероксидазой хрена (horseradish peroxidase, HRP). При поглощении коровой частицы ВГВ половинной частицей T=1, оболочка стерически препятствует связыванию коровой частицы с поверхностью, и сигнал HRP снижается. (B) Эксперименты по блокировке вирусов ELISA in vitro для 2,5 пМ коровой частицы ВГВ, инкубированной предварительно скомпонованными смесями 1 нМ олигонуклеотид-конъюгированного захватывающего антитела и половин оболочек T=1 с различными концентрациями. Столбики погрешностей представляют собой стандартное отклонение трехкратных измерений. (C) Негативные РЭМ-изображения выбранных образцов для блокировки ELISA in vitro, обозначенных числами в (B). Концентрация половин оболочек T=1 составляла: (1) 3,1 пМ, (2) 12,5 пМ, (3) 50 пМ, (4) 100 пМ.

Фиг. 33 показывает стратегию конструирования треугольника T=1 и структуры треугольного «кирпича». (A) Схематическое представление димеризации треугольника T=1 (показано оранжевым) с выступающим «кирпичом» (показан синим), вид сверху и сбоку. Каждый цилиндр представляет собой двухцепочечную спираль ДНК. Цилиндры, окрашенные красным внутри треугольника и темно-синим внутри хвоста, означают спирали, соединяющие два объекта. Тонкие линии между двумя структурами

указывают на клейкие концы однонитчатых ДНК, простирающиеся от треугольника до «кирпичеобразной» структуры. (B) Поле зрения негативного РЭМ-изображения димеризованных структур (слева) и средние значения двумерного класса димера, вид сверху и сбоку (справа).

Фиг. 34 показывает реконструкцию с помощью криоэлектронного микроскопа для треугольного «кирпича». (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа для треугольного «кирпича» в свободно стоящем льду при 5 мМ $MgCl_2$. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная с различных углов зрения.

Фиг. 35 показывает реконструкцию в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа заостренной оболочки при 22,5 мМ $MgCl_2$. (A) Микрофотография криоэлектронного микроскопа заостренной оболочки в свободно стоящем льду при 22,5 мМ $MgCl_2$. (B) Средние значения двумерного класса, показывающие различные ориентации. (C) График, показывающий различные кривые ССК, которые были использованы для оценки разрешения. (D) Карта электронной плотности, показанная по оси симметрии для пяти-, двух и трехкратного фолдинга (соответственно, слева направо). (E) Разрез карты плотности показан в (D).

Фиг. 36 показывает расчетную схему октаэдра и треугольников T=1, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла.

В этой связи следует отметить применительно к Фиг. 36-43 и 51, что эти Фигуры показывают виды схем сложного расположения различных олигонуклеотидов, образующих наноструктуры. Все олигонуклеотиды, используемые при образовании этих наноструктур, как показано на Фиг. 36-43 и 51, представлены в Таблице 1 и включены в Перечень последовательностей. Таким образом, Таблица 1 содержит всю информацию о последовательностях,

необходимую для генерирования наноструктур, схематически показанных на Фиг. 36-43 и 51, которые включены лишь в целях иллюстрации. Никакой дополнительной информации на этих Фигурах нет.

Фиг. 37 показывает расчетную схему треугольников T=1 с переменным углом скоса и треугольника T=3, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла.

Фиг. 38 показывает расчетную схему треугольников T=4 и $T_{пент}$, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла.

Фиг. 39 показывает расчетную схему треугольников T=9, $T_{гекс1}$ и $T_{гекс2}$, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла.

Фиг. 40 показывает расчетную схему треугольников полуоболочки T=1, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. (A)+(B) Треугольник $T_{пент}$ может быть использован для компоновки половин оболочек T=1, наряду с треугольником $T_{кольц}$, или для компоновки оболочек T=1, в которых отсутствует вершина пятиугольника, наряду с треугольниками $T_{кольцо1}$ и $T_{кольцо2}$ (Фиг. 42). Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла. Каждая сторона снабжена тремя ручками для прикрепления антител (последовательность: GCAGTAGAGTAGGTAGAGATTAGGCA-олигонуклеотид). (C)+(D) Увеличение углубления и выступа треугольников $T_{пент}$ и $T_{кольц}$ в (A) и (B). Шесть олигонуклеотидов, образующих углубление, были изменены с помощью «липких» концов ДНК, комплементарных к частям скаффолда в выступе, для повышения прочности связывания.

Фиг. 41 показывает расчетную схему треугольников октаэдрической оболочки и полуоболочки T=1, полученную с помощью программы caDNAno

v0.1. Олигонуклеотиды, которые соединяют две различные стороны, имеют пять дополнительных одноцепочечных тимидинов у угла. Каждая сторона снабжена тремя ручками для прикрепления антител (последовательность: GCAGTAGAGTAGGTAGAGATTAGGCA-олиго). Треугольники $T_{кольцо1}$ и $T_{кольцо2}$ могут образовывать оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника, наряду с треугольником $T_{пент}$ (Фиг. 40).

Фиг. 42 показывает расчетные схемы для измененных оболочек T=1, полученные с помощью программы caDNAno v0.1. (A) Треугольник T=1 с выступающими олигонуклеотидами. (B) Структура треугольного «кирпича» с местами присоединения. (C) Одноцепочечный скаффолд с 20 ручками для прикрепления треугольника (серый) и одна ручка – для прикрепления Cy5 (красный).

Фиг. 43 показывает расчетную схему для треугольника T=1 с модификациями, полученную с помощью программы caDNAno v0.1. Треугольник T=1 с модификациями Cy3 (зеленая звезда) и Cy5 (красная звезда) на конце 5'.

Фиг. 44 показывает моделирование на икосаэдрических полотнах. (a-e) Проекция треугольной сетки и схематические изображения различных частичных оболочек: полуоктаэдрической оболочки (a), пентамера (b), половины оболочки T=1 (c), кольца (d) и T=1 оболочек с отсутствующей вершиной пятиугольника (e). (i-k) Трехмерные реконструкции частичных оболочек, показанных на Фиг. 4(A-C), полученные с помощью криоэлектронного микроскопа. На вставках представлены типичные средние значения двумерного класса, показывающие скомпонованные оболочки с различных ориентаций.

Фиг. 45 показывает захват коровых частиц вируса гепатита B (ВГВ). (a) Негативные РЭМ-изображения коровых частиц ВГВ, захваченных в полуоктаэдрических оболочках. Вставка: схематическое представление двух полуоктаэдрических оболочек (серых), снабженных антителами (голубыми) с захваченной коровой частицей ВГВ (красной). (b) Негативные РЭМ-

изображения коровых частиц ВГВ, захваченных в половинах оболочки T=1. Вставка: то же, что и в (A) с половиной оболочки T=1. (c) Негативное РЭМ-изображение треугольников T=1, измененных с девятью антителами, самоскомпонованными вокруг коровых частиц ВГВ в качестве матриц. Вставка: то же, что и в (A) с одиночными треугольниками. (d) Слева: средние значения двумерного класса по ЭМ. В середине: реконструкция в соответствии с данными криоэлектронного микроскопа для двух октаэдрических полуоболочек, координирующих захваченную частицу вируса гепатита B. Справа: вырез КЭМ-карты октаэдрической оболочки ДНК с захваченной коровой частицей ВГВ. Плотность вокруг коровой частицы ВГВ обусловлена антителами, соединяющими коровые частицы ВГВ с октаэдрической оболочкой. Красные стрелки: коровая частица ВГВ. Голубые стрелки: антитела, соединяющие оболочку с коровой частицей ВГВ. (e) То же, что и в (d), для половины оболочки T=1. Пороги электронной плотности различаются, что заставляет коровую частицу ВГВ выглядеть толще в полуоболочке T=1 по сравнению с полуоктаэдром (справа). (f) Негативные РЭМ-изображения оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника, поглощающей до трех коровых частиц ВГВ. (g) Эксперименты по блокировке вирусов ELISA в лабораторных условиях. Сверху: схематическое представление эксперимента ELISA. Снизу: все эксперименты выполнены при отношении антитела (Ab) к ВГВ, составляющем 400:1. Полуоболочки имеют 90 участков связывания антител. Сплошные заштрихованные точки обозначают 2,5 пМ коровые частицы ВГВ, инкубированные предварительно скомпонованными смесями 1 нМ захватывающих антител, конъюгированных с олигонуклеотидами, и различных концентраций полуоболочек T=1. Вставка (i) иллюстрирует низкую концентрацию полуоболочек, при которой антитела насыщают участки связывания полуоболочки, а избыточные антитела находятся в растворе. Вставка (ii) иллюстрирует случай, когда концентрация антител равна концентрации участков связывания на полуоболочке; полуоболочка насыщена антителами, при этом в растворе остается мало антител. Вставка (iii)

иллюстрирует случай, когда в среднем с половиной оболочки связаны 4 антитела. Два контрольных испытания были выполнены при том же стехиометрическом соотношении 400:1 для Ab:ВГВ для количественного определения эффективности блокировки вирусов в зависимости от концентрации полуоболочек. Незаштрихованная точка представляет смесь коровых частиц ВГВ, антител и не функционализированных полуоболочек T=1. Незаштрихованный квадрат представляет ВГВ плюс антитело без полуоболочки. Зеленая точка показывает эффективность блокировки, составляющую примерно 80%, при соотношении Ab:полуоболочки, равном 5:1. Планки погрешностей представляют собой стандартное отклонение для трехкратных измерений.

Фиг. 46 показывает нейтрализацию AAB2 (аденоассоциированный вирус 2) полуоболочками ДНК-оригами. (a) Схема, иллюстрирующая, что успешное инфицирование клеток HEK293T AAB2 приводит к экспрессии eGFP, тогда как клетки, подвергаемые воздействию AAB2, захваченного в полуоболочки ДНК, не экспрессируют eGFP. Желтые круги = AAB2, синие Y = антитело анти-AAB2 IgG, серые угловые блоки: полуоболочки ДНК. (b) РЭМ-изображения, демонстрирующие захват вирусных частиц AAB2 в полуоболочках ДНК-оригами. Захват был успешным в присутствии сыворотки и БСА. Дебрис от сыворотки виден на РЭМ-изображениях. (c) Количественное определение инфицированных клеток путем проточной цитометрии для условий: только AAB2, анти-AAB2, применяемый в концентрации IC50 (1 нМ), и полуоболочки ДНК-оригами с анти-AAB2, конъюгированным с внутренней частью. Анти-AAB2 и полуоболочки ДНК были, соответственно, preинкубированы с AAB2. Полуоболочки были использованы при общей идентичной концентрации антител, как и в случае только анти-AAB2, с ~ 36 антител на оболочке, и ~ 7 полуоболочек на вирусную частицу. Данные были количественно определены с использованием проточной цитометрии и представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, n = 3 биологически независимых эксперимента. Однонаправленный анализ

вариантов ANOVA был выполнен для тестирования значительного ингибирования по сравнению с контрольными значениями, как только анти-AAB2, так и вариант полуоболочка оригами + анти-AAB2 продемонстрировали значительную нейтрализацию по сравнению со случаем только контрольных значений AAB2 ($p \leq 00001$). Конъюгирование анти-AAB2 с полуоболочками ДНК-оригами приводит к значительно большей способности к нейтрализации, чем свободный анти-AAB2 ($p \leq 0{,}001$). (d) Репрезентативные изображения эпифлуоресцентной микроскопии, демонстрирующие экспрессию eGFP инфицированными клетками. Для каждого из условий, приведена экспрессия eGFP (зеленые), ядра клеток (синие) и наружный слой. Масштабные линейки составляют 100 мкм.

Фиг. 47 показывает однореакторную сборку в ходе реакции фолдинга треугольника октаэдра и оболочки T=1. (A) 0,5% гелей агарозы, содержащих буфер 0,5x TBE и 20 мМ $MgCl_2$. Гели действовали в течение 1,5 ч при напряжении смещения 90 В. Буфер был заменен по истечении 45 мин. Тогда как октаэдрические треугольники компонуются при всех тестируемых концентрациях $MgCl_2$ с получением оболочек в ходе реакции фолдинга треугольника, только треугольники T=1 компонуются при 20мМ $MgCl_2$ или выше, с получением закрытых оболочек. В растворе имеются штапельные нити, поскольку треугольники подвергаются фолдингу с четырехкратным избытком штапельных нитей по сравнению с нитями скаффолда и не очищаются перед их загрузкой в агарозный гель. Реакционные смеси, подвергнутые фолдингу, содержали различные количества $MgCl_2$ (15-30 мМ) и были подвергнуты термическому отжигу с изменением температуры от 60°C до 45°C, с понижением температуры на 1°C в час. sc: эталон скаффолда, pas: пассивированный треугольник, 15-30: концентрация $MgCl_2$ в мМ, присутствующего в реакции фолдинга, P: карман, C: оболочка, M: мономер, S: избыточные штапельные нити. (B) Негативные РЭМ-изображения, соответственно, октаэдров и оболочки T=1, скомпонованной в ходе реакции фолдинга для треугольников при 20-25 мМ $MgCl_2$. Однонитчатые избыточные

штапельные нити еще видны. (C) Негативные РЭМ-изображения оболочек T=1, скомпонованных из треугольников, очищенных ПЭГ, при 20 мМ $MgCl_2$ в течение 2 суток при 40°C. Вместо использования гелевой очистки, для очистки треугольников ДНК-оригами была использована ПЭГ-очистка, как было ранее описано (1).

Фиг. 48 показывает негативные РЭМ-изображения $T_{кольцо1}$ и $T_{кольцо2}$. (A) Цилиндрическая модель кольца ДНК-оригами, содержащего 10 треугольников. (B) Негативные изображения колец, образованных $T_{кольцо1}$ и $T_{кольцо2}$, скомпонованными в течение одних суток при 40°C ($c_{треугольник}$=10 нМ, c_{MgCl2}=25 мМ). Белые цифры показывают число треугольников внутри кольца. (C) Примерные частицы, показывающие кольца с 8, 10 или 12 треугольниками, а также не полностью закрытые кольца.

Фиг. 49 Определение характеристики доза-отклик для способности к нейтрализации и жизнеспособности клетки. Полные кривые IC50 как для свободного антитела (анти-AAB2, A), так и для оригами полуоболочки + анти-AAB2 (B). Концентрация системы полуоболочки + анти-AAB2 в (B) нормализована до концентрации анти-AAB2. Условия «только буфер оригами» и «только полуоболочка» не содержат анти-AAB2, но соответствующие точки данных установлены для легкой визуализации. Концентрация только полуоболочек идентична концентрации, используемой при условии «максимальное содержание состава полуоболочка + анти-AAB2». Под каждым графиком находится приблизительное число антител анти-AAB2 и количество полуоболочек на вирусной частице AAB2. Все соотношения получены, исходя из общего числа вирусных частиц. (C) Кратное повышение способности к нейтрализации, которое достигается путем конъюгирования антитела анти-AAB2 с оригами полуоболочки, для каждой из концентраций на кривых IC50 (A и B), обозначенных как C1–C8. (D) Репрезентативные эпифлуоресцентные изображения, демонстрирующие экспрессию eGFP инфицированными клетками для оригами полуоболочки без конъюгированного анти-AAB2. Масштабные линейки составляют 100 мкм. (E) Жизнеспособность клеток

HEK293T, подвергаемых воздействию структуры оригами полуоболочки в течение 24 ч и 48 ч. Концентрации полуоболочек идентичны концентрациям, используемым при определении характеристики IC_{50} (B). Воздействие на клетки HEK293T оригами полуоболочками ДНК не привело к дозозависимой токсичности. Данные представлены как среднее значение ± стандартное отклонение, n = 3 биологически независимых эксперимента.

Фиг. 50 Инкапсуляция круговой оцДНК и наночастиц золота в оболочку T=1. (A) Слева представлена схема измененных мономеров T=1 с ручками оцДНК. Посередине представлена круговая оцДНК с прикрепленными комплементарными ручками, помеченная CY5. Справа представлена инкапсулированная оцДНК в оболочке T=1. Иллюстрация показывает полуоболочку, но подразумевается полная оболочка. (B) Слева представлены схематические изображения пустой оболочки, инкапсулированной круговой оцДНК, инкапсулированной одиночной наночастицы золота и инкапсулированной круговой оцДНК, помеченной золотом. (C) Шлифы негативной РЭМ-томограммы каждой оболочки в (B). (D) Флуоресцентные гели оболочек T=1, подвергнутые лазерному сканированию, с карго и без него. Оба гелевых изображения получены из одного и того же геля, но с различными длинами волн. Каждый столбик геля имеет цветовую маркировку соответствующей частицей на участках (C) и (D). Слева гелевое изображение показывает безопасное излучение SYBR, где видны полосы для скаффолда и для скомпонованных оболочек. На правом геле излучение из CY5 указывает, что карго находится в том же положении, что и скомпонованная оболочка.

Фиг. 51 Расчетные схемы УФ-сварки на стэкинг-контактах, полученные с помощью программы caDNAno v0.1. Выступы и углубления имеют клейкие «липкие» концы ДНК и одно возможное дополнительное тиминовое основание (желтый круг) для УФ-сварки для стабилизации частичных оболочек в среде клетки. (A) Выступ и углубление полуоктаэдра (см. Фиг. 41A). (B)+(C) Выступ и углубление треугольников T=1 полуоболочки $T_{пент}$ и $T_{кольцо}$ (см. Фиг. 40C,D). Сторона 1 связывается со стороной 2 (B) и стороной 3 $T_{пент}$ и

со стороной 3 $T_{кольцо}$ (C).

Фиг. 52 показывает репрезентативные гейты для обработки образца проточной цитометрией. Слева направо: популяции клетки были сначала гейтированы по площади прямого рассеяния (forward scatter-площадь поверхности, FCS-A), в отличие от площади бокового рассеяния (side scatter-площадь поверхности, SSC-A) (гейт «R1»), отдельные клетки были выбраны путем гейтирования SSC-A по высоте бокового рассеяния (side scatter высота, SSC-H) (гейт «R2»), а затем оценены на экспрессию eGFP (гейт «R3»). (A) Необработанные клетки были использованы в качестве негативного контроля. (B) и (C) дают репрезентативные гейты для образцов, обработанных, соответственно, только в анти-AAB2 и оригами полуоболочки + анти-AAB2, при концентрации, соответствующей C4 на Фиг. 49.

Сведения, подтверждающие возможность осуществления изобретения

Настоящее раскрытие предлагает конструкции, которые допускают инкапсуляцию вируса или вирусной частицы.

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют то же значение, что и обычно понимаемое обычными специалистами в данной области техники, к которой относится данное изобретение.

Термины «содержащий» и «включающий в себя» используются в настоящей работе в их открытом и не ограничивающем смысле, если не указано иное. Применительно к таким последним вариантам воплощения, термин «содержащий», таким образом, включает в себя более узкий термин «состоящий из».

Термины, относящиеся к единственному числу, и аналогичные ссылочные обозначения в контексте описания изобретения (особенно в контексте следующей формулы изобретения) следует рассматривать как охватывающие как единственное, так и множественное число, если иное не будет указано в настоящей работе или не будет явно противоречить контексту. Например, термин «клетка» включает в себя несколько клеток, а также смеси

клеток. Там, где для соединений, солей и т.п. используется форма множественного числа, это также применимо к одиночному соединению, соли и т.п.

Таким образом, в одном аспекте раскрытие обеспечивает наноструктуру на основе макромолекулы, заключающую в себе полость с диаметром по меньшей мере 20 нм для инкапсуляции вируса или вирусной частицы.

В контексте настоящего раскрытия, термин «наноструктура на основе макромолекулы» относится к наноструктуре, которая образована комплектом макромолекул, в которой макромолекулы выбраны из ДНК, РНК, белков и их гибридов, в частности, гибридов, выбранных из гибридов ДНК-РНК и гибридов ДНК-белок, включая гибриды ДНК-(линкер белка)-ДНК.

В контексте настоящего раскрытия, термин «ДНК» относится к дезоксирибонуклеиновой кислоте, состоящей из одноцепочечных мономерных звеньев, называемых нуклеотидами, в которых каждый нуклеотид состоит из азотсодержащего нуклеинового основания, сахарного фрагмента 2-дезоксирибозы и фосфатной группы, в которых отдельные нуклеотиды связаны в одну цепочку фосфатной группой, связывающей OH-группу в позиции 5’ сахарного фрагмента 2-дезоксирибозы с OH-группой в позиции 3’ соседнего сахарного фрагмента 2-дезоксирибозы. В конкретных вариантах воплощения азотсодержащие нуклеиновые основания независимо выбраны из цитозина [C], гуанина [G], аденина [A] и тимина [T]. В конкретных вариантах воплощения одно или более нуклеиновых оснований представляют собой неканонические основания, в частности, неканоническое основание, выбранное из перечня: измененный аденозин, в частности, N6-карбамоил-метиладенин или N6-метиаденин; измененный гуанин, в частности, 7-деазарианин или 7-метилгуанин; измененный цитозин, N4-метилцитозин, 5-карбоксилцитозин, 5-формилцитозин, 5-гликозилгидроксиметилцитозин, 5-гидроксицитозин, или 5-метилцитозин; измененный тимидин, в частности, α-глутамилтимидин или α-путресцинилтимин; урацил или их модификация, в частности, урацил, основание J, 5-дигидроксипентаурацил; или 5-

гидроксиметилдезоксиурацил; дезоксиархеозин и 2,6-диаминопурин. Участок одноцепочечной ДНК может взаимодействовать с комплементарным участком ДНК путем взаимодействия комплементарных нуклеиновых оснований, в которых цитозин и гуанин, а также аденин и тимин комплементарны друг другу, соответственно путем образования двух (A/T) и трех (G/C) водородных связей между нуклеиновыми основаниями. Две одноцепочечные ДНК могут быть полностью комплементарны друг другу, как и в случае геномной ДНК, или могут быть частично комплементарны друг другу, включая ситуации, где одна одноцепочечная ДНК частично комплементарна к двум или более другим одноцепочечным цепям ДНК. Взаимодействие двух комплементарных одноцепочечных последовательностей ДНК приводит к образованию двойной спирали двухцепочечной ДНК.

Как хорошо известно, ДНК развивалась в природе как носитель генетической информации, кодирующей белки. ДНК дополнительно включает в себя не кодирующие области, которые включают в себя области, обладающие регуляторными функциями. Таким образом, любое применение на основе ДНК обычно критически зависит от специфической последовательности ДНК и почти всегда обеспечивается только за счет присвоения имени специфической последовательности ДНК. Напротив, в контексте настоящего изобретения такое кодирование и/или регуляторные функции не играют никакой роли и могут присутствовать, а могут и нет, поскольку базовые последовательности ДНК сконструированы и выбраны исключительно таким образом, чтобы было получено желаемое расположение субъединиц в виде двойной спирали. Таким образом, в одном варианте воплощения в качестве матрицы может быть выбрана любая форма длинной одноцепочечной последовательности ДНК, будь то ДНК, возникающая в природе (такая как ДНК бактериофага), либо синтетически полученная ДНК, и может быть сконструирован комплект коротких одноцепочечных последовательностей ДНК, в которых каждая последовательность комплементарна к одной или более различных частей матрицы и, таким образом, образует один или более участков двойной

спирали. В совокупности, все такие участки двойной спирали, созданные за счет взаимодействия всего комплекта коротких одноцепочечных последовательностей ДНК с матрицей, затем образуют желаемое трехмерное расположение. Исходя из данной последовательности одноцепочечных матриц, конструирование комплекта комплементарных последовательностей может быть налажено с использованием известных технологий, таких как, например, способы, описанные для синтеза дискретных объектов мегадальтонного масштаба со структурно заданными трехмерными формами (18, 24-35). В частности, может быть использована итеративная конструкция с помощью программы caDNAno (37) в сочетании с моделированиями молекулярной динамики на основе эластичных сетей (38).

В дополнение к взаимодействию комплементарных нуклеиновых оснований различных участков одноцепочечной ДНК посредством водородных связей, возможны дополнительные взаимодействия между различными цепями ДНК, включая стэкинг-взаимодействия между обрубленными концами двух двухцепочечных спиралей ДНК (36), что, таким образом, способствует конструированию и образованию сложных наноструктур на основе ДНК за счет комплементарности форм субъединиц в виде двойной спирали. Таким образом, два трехмерных расположения, образованные в соответствии с предыдущим абзацем, могут взаимодействовать с друг с другом за счет стэкинг-взаимодействий между субъединицами в виде двойной спирали, присутствующими на двух трехмерных расположениях, включая специфические взаимодействия между двумя трехмерными расположениями, имеющими комплементарные выступы и углубления (или выпуклости и отверстия), как показано, например, на Фиг. 7-13 D.

В контексте настоящего раскрытия термин «РНК» относится к рибонуклеиновой кислоте, состоящей из одноцепочечных мономерных звеньев, называемых нуклеотидами, в которой каждый нуклеотид состоит из азотсодержащего нуклеинового основания, фрагмента рибозного сахара и

фосфатной группы, в которых отдельные нуклеотиды связаны в одну цепочку фосфатной группой, связывающей ОН-группу в позиции 5’ фрагмента рибозного сахара с ОН-группой в позиции 3’ соседнего фрагмента рибозного сахара. В конкретных вариантах воплощения азотсодержащие нуклеиновые основания независимо выбраны из цитозина [C], гуанина [G], аденина [A] и урацила [U]. В конкретных вариантах воплощения один или более нуклеиновых оснований представляют собой неканонические основания, в частности, неканоническое основание, выбранное из перечня: псевдоуридин, риботимидин и инозин. В отличие от ДНК, РНК чаще всего находится в одноцепочечной форме, но образование двухцепочечных форм возможно путем взаимодействия комплементарных нуклеиновых оснований, в которых цитозин и гуанин, а также аденин и урацил, комплементарны друг другу, соответственно путем образования двух (A/U) и трех (G/C) водородных связей между нуклеиновыми основаниями. В конкретном варианте воплощения раскрытие обеспечивает наноструктуру на основе макромолекулы, которая представляет собой наноструктуру на основе РНК.

В конкретном варианте воплощения упомянутая полость имеет диаметр по меньшей мере 50 нм, по меньшей мере100 нм, по меньшей мере 150 нм, по меньшей мере 200 нм или по меньшей мере 250 нм.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая полость имеет диаметр по большей мере 1000 нм.

В контексте настоящего изобретения термин «диаметр» относится к диаметру наименьшего круга, который охвачен поверхностью наноструктуры на основе макромолекулы. Для ясности, в случае наноструктуры на основе макромолекулы в форме капсулы (или сфероцилиндра), диаметр представляет собой диаметр полусферических концов и/или диаметр цилиндрической центральной части.

В конкретном варианте воплощения наноструктура на основе макромолекулы обладает молекулярной массой по меньшей мере 1 миллион дальтон, в частности, по меньшей мере 10 миллионов дальтон, в частности, по

меньшей мере 20 миллионов дальтон, точнее, по меньшей мере 30 миллионов дальтон. В других конкретных вариантах воплощения наноструктура на основе ДНК обладает молекулярной массой по меньшей мере 50 миллионов дальтон, по меньшей мере 80 миллионов дальтон, по меньшей мере 100 миллионов дальтон, по меньшей мере 200 миллионов дальтон, или по меньшей мере 500 миллионов дальтон. В конкретных вариантах воплощения наноструктура на основе ДНК обладает молекулярной массой не больше 1500 миллионов дальтон.

В конкретных вариантах воплощения соотношение между численным значением молекулярной массы наноструктуры на основе макромолекулы (в миллионах дальтон) и численным значением объема полости, ограниченной упомянутой наноструктурой на основе макромолекулы (в нм^3), составляет менее 10000, в частности, менее 9000. В конкретных вариантах воплощения упомянутое соотношение имеет значение 1000-10000, в частности, 2000-9000. Например, в случае определенных октаэдрических наноструктур, где молекулярная масса составляет примерно 40 миллионов дальтон, и где ограниченный объем составляет примерно 113000 нм^3, упомянутое соотношение составляет примерно 2800.

В конкретных вариантах воплощения соотношение между площадью внешней поверхности наноструктуры на основе макромолекулы, покрытой макромолекулами, образующими упомянутую наноструктуру на основе макромолекулы, и площадью внешней поверхности, не покрытой упомянутыми макромолекулами (за исключением площади поверхности отверстия наноструктуры на основе макромолекулы в форме оболочки), равно по меньшей мере 1, в частности, по меньшей мере 2, в частности, по меньшей мере 4, в частности, по меньшей мере 6, в частности, по меньшей мере 8. В других конкретных вариантах воплощения соотношение равно по меньшей мере 10. В конкретных вариантах воплощения соотношение составляет от 1 до 20, в частности, от 2 до 18, от 4 до 16, от 6 до14, более конкретно от 8 до 12. Например, в случае, когда наноструктура на основе макромолекулы

представляет собой оболочку в форме полусферы, для расчета упомянутого соотношения используется только площадь искривленной поверхности, но не площадь поверхности отверстия, т.е., площадь поверхности плоской грани полусферы.

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК образована самособирающимися строительными блоками на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения каждый из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК образован из матричной цепи одноцепочечных ДНК и комплекта олигонуклеотидов, комплементарных к упомянутой матрице одноцепочечных ДНК, в которой каждый из упомянутых олигонуклеотидов комплементарен либо к одному смежному участку последовательности ДНК либо по меньшей мере к двум несмежным фрагментам последовательности ДНК на упомянутой матрице одноцепочечных ДНК.

В конкретном варианте воплощения молекулярная масса каждого самособирающегося строительного блока на основе ДНК составляет от 4,5 до 5,5 миллионов дальтон.

В конкретном варианте воплощения каждый самособирающийся строительный блок на основе ДНК содержит от 7500 до 8500 пар оснований.

В конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК состоит из от 4 до 180 таких самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая матрица одноцепочечных ДНК представляет собой одноцепочечную ДНК нитчатого бактериофага или выведена из одноцепочечной ДНК нитчатого бактериофага.

В контексте настоящего изобретения термин «нитчатый бактериофаг» относится к типу бактериофага или к вирусу бактерий, который характеризуется его нитевидной формой, которая обычно содержит геном

круговой одноцепочечной ДНК и инфицирует грам-отрицательные бактерии. Нитчатый фаг включает в себя Ff-фаг, такой как фаг M13, f1 и fd1, а также фаг Pf1.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая матрица одноцепочечных ДНК имеет последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1 (M13 8064) и 2 (M13 7249) (см. Таблицу 1). В конкретных вариантах воплощения упомянутая одноцепочечная ДНК является круговой.

В контексте настоящего изобретения матрица одноцепочечных ДНК, которая «выведена из одноцепочечной ДНК нитчатого бактериофага», относится к конструкции ДНК, которая выведена из встречающейся в литературе последовательности ДНК нитчатого бактериофага, возникающей в природе, посредством одного или более из: (i) открытия круговой структуры для линейной последовательности; (ii) удаления одного или более нуклеотидов; (iii) введения одного или более нуклеотидов; (iii) замены одного или более нуклеотидов; (iv) добавления одного или более нуклеотидов; и (v) модифицирования одного или более нуклеотидов. Тогда как любое такое изменение может иметь вредное, или по меньшей мере скорее непредсказуемое влияние на биологию бактериофага, его инфицирующую способность и его способность к распространению, такие влияния не играют никакой роли в контексте настоящего изобретения, поскольку, как уже было указано выше, упомянутая матрица одноцепочечных ДНК используется лишь как голая матрица, без каких-либо требований к каким-либо функциональным свойствам, и все структурные аспекты, такие как правильное формирование трехмерной формы упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, реализуются путем надлежащего выбора упомянутого комплекта комплементарных олигонуклеотидов.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая матрица одноцепочечных ДНК имеет идентичность последовательности по меньшей мере 80 %, в частности по меньшей мере 90 %, более конкретно по меньшей мере 95 %, по отношению к последовательности возникающего в природе или

описанного в других работах нитчатого бактериофага, в частности, по отношению к фагу M13, f1 или fd1, в частности, по отношению к последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 1 (M13 8064) и 2 (M13 7249).

В конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК представляет собой закрытую трехмерную геометрическую форму, в частности, закрытую трехмерную геометрическую форму, выбранную из сферы, сфероцилиндра и полиэдра, в частности тетраэдра, октаэдра или икосаэдра, образованного на месте из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, в присутствии упомянутого вируса или вирусной частицы, которые подлежат инкапсуляции.

В другом конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК представляет собой оболочку с отверстием для доступа к упомянутой полости.

В контексте настоящего изобретения термин «оболочка» относится к структуре, которая представляет собой часть закрытой трехмерной геометрической формы, в частности закрытой трехмерной геометрической формы, выбранной из сферы, сфероцилиндра и полиэдра, в частности тетраэдра или октаэдра.

В еще одном конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК представляет собой сочетание первой оболочки и второй оболочки с отверстием для доступа соответственно к первой и ко второй внутренней полости, причем упомянутая первая и упомянутая вторая внутренняя полость вместе образуют упомянутую полость.

В конкретном варианте воплощения упомянутая первая и упомянутая вторая оболочки соединены по меньшей мере одним линкером.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый линкер представляет собой линкер, выбранный из линкера ДНК, линкера РНК, полипептидного линкера, белкового линкера и химического линкера.

В контексте настоящего изобретения термин «линкер ДНК» относится к линкеру, образованному из ДНК, причем последовательность упомянутого

линкера ДНК не комплементарна к ДНК упомянутой матрицы одноцепочечных ДНК или к любому из упомянутого комплекта олигонуклеотидов, комплементарных к упомянутой матрице одноцепочечных ДНК, причем упомянутый линкер ДНК на одном конце связан с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой первой оболочки, а на другом конце – с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой второй оболочки.

В контексте настоящего изобретения термин «полипептидный линкер» относится к линкеру, образованному по меньшей мере из 2, в частности по меньшей мере из 5, по меньшей мере из 10, или по меньшей мере из 20 аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, причем упомянутый полипептид не имеет третичную или четвертичную структуру, и при этом упомянутый полипептидный линкер на одном конце связан с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой первой оболочки, а на другом конце – с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой второй оболочки.

В контексте настоящего изобретения термин «белковый линкер» относится к линкеру, образованному по меньшей мере из 20, в частности по меньшей мере из 50, по меньшей мере из 100, по меньшей мере из 200 аминокислотных остатков, по меньшей мере из 500 аминокислотных остатков, или по меньшей мере из 1000 аминокислотных остатков, в частности, менее 1500 аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, причем упомянутый полипептид имеет третичную и/или четвертичную структуру, и при этом упомянутый белковый линкер на одном конце связан с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой первой оболочки, а на другом конце – с последовательностью ДНК, образующей самособирающийся строительный блок на основе ДНК упомянутой второй оболочки. В конкретных вариантах

воплощения упомянутый белковый линкер ковалентно связан с упомянутыми последовательностями ДНК. В других конкретных вариантах воплощения упомянутый белковый линкер не ковалентно связан с упомянутыми последовательностями ДНК, в частности, в которых упомянутый белковый линкер представляет собой белковый линкер на основе антитела, в частности, выбранного из диатела и полного антитела, включая антитело IgG.

В контексте настоящего изобретения термин «химический линкер» относится к непрерывной цепи от 1 до 30 атомов (например, 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 или 30 атомов; таким образом, в контексте настоящего изобретения термин «от... и до...» используется так, чтобы границы были обозначены как включенные) в ее остове, т.е., длина линкера задана как самое короткое соединение, измеренное по числу атомов или связей между двумя последовательностями ДНК, соединенными упомянутым химическим линкером. В контексте настоящего изобретения химический линкер предпочтительно представляет собой C_{1-20}-алкиленовую, C_{1-20}-гетероалкиленовую, C_{2-20}-алкениленовую, C_{2-20}-гетероалкениленовую, C_{2-20}-алкиниленовую, C_{2-20}-гетероалкиниленовую, циклоалкиленовую, гетероциклоалкиленовую, ариленовую, гетероариленовую, аралкиленовую, или гетероаралкиленовую группу, которая необязательно может быть замещена. Линкер может содержать один или более структурных элементов, таких как карбоксамид, сложный эфир, простой эфир, тиоэфир, дисульфид, мочевина, тиомочевина, углеводородные фрагменты, и т.п. Линкер также может содержать сочетания двух или более их этих структурных элементов. Каждый из этих структурных элементов может присутствовать в линкере более одного раза, например, два, три, четыре, пять или шесть раз. В некоторых вариантах воплощения линкер может содержать дисульфидную связь. Понятно, что линкер должен быть прикреплен за один этап, либо за два или более последующих этапов к двум последовательностям ДНК, соединенным упомянутым химическим линкером. Для этой цели линкер будет нести на себе две группы, предпочтительно, на ближнем и дальнем

конце, которые могут (i) образовывать ковалентную связь с группой, присутствующей в одной из двух связываемых последовательностей ДНК, или (ii) которые активируются или могут быть активированы для образования ковалентной связи с одной двух последовательностей ДНК.

В конкретном варианте воплощения наноструктура на основе ДНК основана на икосаэдрической структуре.

В конкретном варианте воплощения каждый из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК представляет собой призмоид.

В контексте настоящего изобретения термин «призмоид» относится к полиэдру, в котором все вершины лежат в двух параллельных плоскостях.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый призмоид представляет собой треугольный призмоид. В других вариантах воплощения упомянутый призмоид представляет собой прямоугольный призмоид.

В конкретных вариантах воплощения наноструктура на основе ДНК получена на основе смеси треугольного и прямоугольного призмоида.

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе ДНК:

в которой каждый упомянутый треугольный или упомянутый прямоугольный призмоид образован соответственно из m треугольных или прямоугольных плоскостей, где m представляет собой целое число, независимо выбранное из 4, 5, 6, 7 и 8, в частности, независимо выбранное из 5, 6 и 7, точнее, где упомянутое целое число представляет собой 6,

в которой соответственно три или четыре кромки каждой из упомянутых m плоскостей образованы n параллельными участками двойных спиралей ДНК, причем n представляет собой целое число, независимо выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6, в частности, независимо выбранное из 2, 3, 4 и 5, точнее, независимо выбранное из 3 и 4,

в которой каждая плоскость соединена с плоскостью выше и/или за упомянутой плоскостью (i) за счет стэкинг-взаимодействий между двойными

спиралями ДНК, образующими упомянутые плоскости, и (ii) частично за счет участков ДНК в упомянутой матрице одноцепочечных ДНК и/или упомянутых олигонуклеотидов, образующих упомянутый конструкционный блок на основе ДНК, образующий перемычку между по меньшей мере двумя из упомянутых плоскостей, и

в которой, соответственно, по меньшей мере два из трех или четырех боковых трапецоидов содержат определенный рисунок углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения среднее значение длины каждого из n участков двойных спиралей ДНК в m плоскостях соответственно треугольного или прямоугольного призмоида составляет от 80 до 200 пар оснований.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый треугольный призмоид представляет собой треугольную усеченную пирамиду. В конкретных вариантах воплощения упомянутый прямоугольный призмоид представляет собой прямоугольную усеченную пирамиду.

В контексте настоящего изобретения термин «треугольная усеченная пирамида» относится к трехмерной геометрической форме в виде треугольной пирамиды, а термин «прямоугольная усеченная пирамида» относится к трехмерной геометрической форме в виде прямоугольной пирамиды, где вершина пирамиды была удалена, что приводит к образованию плоскости наверху, параллельной основанию пирамиды.

В конкретном варианте воплощения по меньшей мере для части упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК длина по меньшей мере одной кромки каждой из упомянутых m плоскостей снижается от первой до m-ой плоскости, вследствие чего между плоскостями, перпендикулярными к упомянутой первой плоскости, и плоскостью

трапецоида, образованной упомянутыми m кромками, образуется угол скоса (см. Фиг. 5). В конкретных вариантах воплощения соответственно все три или четыре трапециевидные плоскости демонстрируют угол скоса.

В конкретном варианте воплощения угол скоса составляет от 16 до 26°, в частности от 18 до 24°, более конкретно от 20 до 22°, наиболее конкретно около 20,9°.

В конкретном варианте воплощения упомянутая наноструктура на основе ДНК содержит по меньшей мере один комплект самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, в которых соответственно все три или четыре боковых трапецоида содержат определенный рисунок углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения, в частности, в случае наноструктуры на основе ДНК в виде закрытой трехмерной геометрической формы, все упомянутые самособирающиеся строительные блоки на основе ДНК идентичны.

В конкретном варианте воплощения упомянутая наноструктура на основе ДНК содержит два или более комплекта самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения упомянутая наноструктура на основе ДНК является стержневидной.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая наноструктура на основе ДНК содержит два или более комплекта самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В частности, в таком варианте воплощения упомянутая стержневидная наноструктура на основе ДНК содержит по меньшей мере первый и второй комплект самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, при этом упомянутый первый и второй комплект различаются по меньшей мере углом

скоса. В конкретном варианте воплощения по меньшей мере один комплект состоит из самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, демонстрирующих только два угла скоса. В конкретном варианте воплощения упомянутый по меньшей мере один комплект состоит из прямоугольных усеченных пирамид, которые содержат угол скоса на каждом из двух противолежащих трапецоидов.

В конкретном варианте воплощения боковые трапецоиды, образующие ободупомянутой оболочки или соответственно упомянутой первой и второй оболочки, не содержат определенного рисунка углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из упомянутых самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

В конкретном варианте воплощения упомянутая наноструктура на основе ДНК представляет собой оболочку, выбранную из:

(i) полуоктаэдра (Фиг. 4A), который состоит из комплекта из четырех копий треугольной усеченной пирамиды, в котором стэкинг-контакты комплементарной пары оснований на одной из треугольных кромок треугольной усеченной пирамиды инактивируют путем укорочения цепи либо путем добавления неспаренных тимидинов (Фиг. 4A, см. Фиг. 24A,D);

(ii) половины оболочки T=1 (Фиг. 4B), которая состоит из двух комплектов по пять копий в каждом случае двух различных треугольных усеченных пирамид, причем пять копий первого комплекта образуют закрытый пентамер, а пять копий второго комплекта закрепляются на кромках упомянутого пентамера (Фиг. 4B, см. Фиг. 24B,E); и

(iii) оболочки-«ловушки» T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника (Фиг. 4C), которая состоит из трех комплектов по пять копий в каждом случае трех различных треугольных усеченных пирамид,

причем пять копий первого комплекта образуют закрытый пентамер, пять копий второго комплекта закрепляются на кромках упомянутого пентамера, пять копий второго комплекта закрепляются на кромках упомянутого пентамера, а пять копий третьего комплекта входят в зазоры между пятью копиями упомянутого второго комплекта (Фиг. 4C, см. Фиг. 24C,F).

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе ДНК, дополнительно содержащей один или более типов конструкций «кирпичей» ДНК, причем каждый тип таких конструкций «кирпичей» ДНК характеризуется одним или более сайтами взаимодействия для специфического взаимодействия за счет стэкинг-контактов типа «кромка к кромке» с одним или более комплементарными сайтами взаимодействия, присутствующими на плоскости соответственно упомянутого треугольного или прямоугольного призмоида на внешней поверхности упомянутой наноструктуры на основе ДНК, причем упомянутые конструкции «кирпичей» ДНК покрывают свободное пространство соответственно между тремя или четырьмя кромками упомянутой плоскости (см. Фиг. 33).

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе ДНК, дополнительно содержащей одну или более поперечных связей в одном из упомянутых, соответственно, треугольном или прямоугольном призмоиде, и/или между двумя из соответственно упомянутых треугольного или прямоугольного призмоидов.

В контексте настоящего изобретения термин «поперечная связь» относится к любой постоянной или переменной связи соответственно в одном из упомянутых треугольном или прямоугольном призмоидов, и/или соответственно между двумя из упомянутых треугольного или прямоугольного призмоидов. Любая такая связь может быть достигнута *априори* за счет связывания двух олигонуклеотидов, используемых для образования самособирающихся конструкционных блоков на основе ДНК перед сборкой, или *априори*, например, путем химического или

фотохимического добавления связей между различными частями трехмерной наноструктуры. Постоянные связи могут быть созданы, например, путем фотохимического поперечного сшивания Т остатков, надлежащим образом расположенных в структуре при формировании ковалентных связей димер циклобутанпиримидина (CPD) (41), а переменные связи могут быть созданы, например, путем фотохимического поперечного сшивания обрубленных концов двух субъединиц в виде двойной спирали между фрагментом 3-циановинилкарбозида (cnvK), расположенным на первом обрубленном конце, и тиминовым остатком (T), расположенным на другом обрубленном конце (40).

В конкретном варианте воплощения настоящее изобретение относится к наноструктуре на основе макромолекулы, дополнительно содержащей по меньшей мере один фрагмент, специфически взаимодействующий с упомянутым вирусом или вирусной частицей.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе ДНК в соответствии с настоящим изобретением, в которой упомянутый по меньшей мере один фрагмент связан с одним из упомянутых соответственно треугольным или прямоугольным призмоидом, образующих наноструктуру на основе ДНК таким образом, чтобы упомянутый по меньшей мере один фрагмент был расположен внутри упомянутой наноструктуры на основе ДНК и направлен в полость, образованную упомянутой наноструктурой на основе ДНК.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый по меньшей мере один фрагмент специфически взаимодействует с упомянутым вирусом или вирусной частицей благодаря способности специфически связываться с упомянутым вирусом или вирусной частицей. В конкретных вариантах воплощения упомянутый по меньшей мере один фрагмент представляет собой антитело или связывающий фрагмент на основе антитела, содержащего по меньшей мере антиген-участок связывания антител, в частности, по меньшей мере VH домен антитела или по меньшей мере сочетание VH- и VL-домена

антитела.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый по меньшей мере один фрагмент специфически взаимодействует с упомянутым вирусом или вирусной частицей благодаря способности связываться с инактивным упомянутым вирусом или вирусной частицей.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая наноструктура на основе макромолекулы содержит, в среднем, от одного до десяти участков связывания на основе антител, прикрепленных к внутреннему участку полости, образованному упомянутой наноструктурой на основе макромолекулы, в частности, от четырех до десяти, более конкретно четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять участков связывания на основе антител.

В таких конкретных вариантах воплощения упомянутый участок связывания на основе антитела представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv).

В таком конкретном варианте воплощения, в котором упомянутая наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе олигонуклеотида, упомянутый участок связывания на основе антитела, в частности, упомянутый scFv-фрагмент связан с одноцепочечным олигонуклеотидом, имеющим последовательность, которая комплементарна или иным образом способна вступать в сайт-специфические взаимодействия с участками олигонуклеотидов, присутствующими во внутренней полости, образованной упомянутой наноструктурой на основе олигонуклеотида.

В другом аспекте раскрытие предлагает композицию, содержащую вирус или вирусную частицу, инкапсулированную наноструктурой на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению.

В конкретных вариантах воплощения упомянутая композиция образуется в процессе удаления упомянутого вируса или вирусной частицы из среды, содержащей упомянутый вирус или вирусную частицу. В других конкретных вариантах воплощения упомянутый состав образуется в процессе

внедрения упомянутого вируса или вирусной частицы как карго в упомянутой наноструктуре на основе макромолекулы.

В другом аспекте раскрытие предлагает композицию, содержащую карго, отличный от вируса или вирусной частицы, где упомянутый карго, такой как сложная макромолекула, инкапсулируется наноструктурой на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению.

В еще одном аспекте раскрытие обеспечивает способ инкапсуляции вируса или вирусной частицы, содержащий этапы: обеспечения наноструктуры на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению и приведения упомянутой наноструктуры на основе макромолекулы в контакт со средой, содержащей или предположительно содержащей упомянутый вирус или вирусную частицу.

В конкретных вариантах воплощения упомянутый способ предназначен для удаления упомянутого вируса или вирусной частицы из упомянутой среды. В конкретном варианте воплощения упомянутый способ предназначен для инкапсуляции упомянутого вируса или вирусной частицы с целью переноса упомянутого вируса или вирусной частицы.

В еще одном аспекте предлагается способ инкапсуляции карго, отличного от вируса или вирусной частицы, такого как сложная макромолекула, содержащий этапы: обеспечения наноструктуры на основе макромолекулы согласно настоящему изобретению и приведения упомянутой наноструктуры на основе макромолекулы в контакт со средой, содержащей или предположительно содержащей упомянутый карго.

ТАБЛИЦА 1: Перечень последовательностей.

SEQ ID NO:	Описание	Последовательность / Детали
	Матрицы	
1	M13 8064	GGCAATGACCTGATAGCCTTTGTAGATCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTC CGGCATTAATTTATCAGCTAGAACGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTT GACTGTCTCCGGCCTTTCTCACCCTTTTGAATCTTTACCTACACATTACTC AGGCATTGCATTTAAAATATATGAGGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCGT TGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAAAAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTG GTACAACCGATTTAGCTTTATGCTCTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTA ATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTTATTGGATGTTAATGCTACTACTATTAG TAGAATTGATGCCACCTTTTCAGCTCGCGCCCCAAATGAAAATATAGCTA AACAGGTTATTGACCATTTGCGAAATGTATCTAATGGTCAAACTAAATCTA CTCGTTCGCAGAATTGGGAATCAACTGTTATATGGAATGAAACTTCCAGA CACCGTACTTTAGTTGCATATTTAAAACATGTTGAGCTACAGCATTATATT CAGCAATTAAGCTCTAAGCCATCCGCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGA GCAATTAAAGGTACTCTCTAATCCTGACCTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTC TGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTAAAACGCGATATTTGAAGTCTTTCGGG CTTCCTCTTAATCTTTTTGATGCAATCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGTC AGGGTAAAGACCTGATTTTTGATTTATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGT TTAAAGCATTTGAGGGGGATTCAATGAATATTTATGACGATTCCGCAGTAT TGGACGCTATCCAGTCTAAACATTTTACTATTACCCCCTCTGGCAAAACTT CTTTTGCAAAAGCCTCTCGCTATTTTGGTTTTTATCGTCGTCTGGTAAACG AGGGTTATGATAGTGTTGCTCTTACTATGCCTCGTAATTCCTTTTGGCGTT ATGTATCTGCATTAGTTGAATGTGGTATTCCTAAATCTCAACTGATGAATC TTTCTACCTGTAATAATGTTGTTCCGTTAGTTCGTTTTATTAACGTAGATTT TTCTTCCCAACGTCCTGACTGGTATAATGAGCCAGTTCTTAAAATCGCATA AGGTAATTCACAATGATTAAAGTTGAAATTAAACCATCTCAAGCCCAATT TACTACTCGTTCTGGTGTTTCTCGTCAGGGCAAGCCTTATTCACTGAATG

		AGCAGCTTTGTTACGTTGATTTGGGTAATGAATATCCGGTTCTTGTCAAGA TTACTCTTGATGAAGGTCAGCCAGCCTATGCGCCTGGTCTGTACACCGTT CATCTGTCCTCTTTCAAAGTTGGTCAGTTCGGTTCCCTTATGATTGACCGT CTGCGCCTCGTTCCGGCTAAGTAACATGGAGCAGGTCGCGGATTTCGAC ACAATTTATCAGGCGATGATACAAATCTCCGTTGTACTTTGTTTCGCGCTT GGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGATGAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTGCCT CTTTCGTTTTAGGTTGGTGCCTTCGTAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTT TAATGGAAACTTCCTCATGAAAAAGTCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAG CCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTGTCTTTCGCTGCTGAGGGTGACGAT CCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCTGCAAGCCTCAGCGACCGAATATAT CGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCGGTAT CAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATACA ATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAA AATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTGTTCCTTTCTATTCTCACTCCGCTGA AACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAATCCCATACAGAAAATTCATTTACTA ACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTAGATCGTTACGCTAACTATGAGGG CTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGTAGTTTGTACTGGTGACGAAACTC AGTGTTACGGTACATGGGTTCCTATTGGGCTTGCTATCCCTGAAAATGAG GGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTG GCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGTGATACACCTATTCCGGGCTATACTT ATATCAACCCTCTCGACGGCACTTATCCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCC GCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGAGTCTCAGCCTCTTAATACTTTCATG TTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAGGCAGGGGGCATTAACTGTTTATAC GGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACCCCGTTAAAACTTATTACCAGTACA CTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATGACGCTTACTGGAACGGTAAATTC AGAGACTGCGCTTTCCATTCTGGCTTTAATGAGGATTTATTTGTTTGTGAA TATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCTCAACCTCCTGTCAATGCTGGCGG CGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCGGCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAG

		GGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTCTGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGT GGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGATGGCAAACGCTAATAA GGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACAGTCTGACGCT AAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACTGATTACGGTGCTGCTATCGATGG TTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTGA TTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATT CACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGT TGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTAT TGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATAT GTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATA AGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTGGGTATTCCGTTATTATTGCGTTTC CTCGGTTTCCTTCTGGTAACTTTGTTCGGCTATCTGCTTACTTTTCTTAAA AAGGGCTTCGGTAAGATAGCTATTGCTATTTCATTGTTTCTTGCTCTTATTA TTGGGCTTAACTCAATTCTTGTGGGTTATCTCTCTGATATTAGCGCTCAAT TACCCTCTGACTTTGTTCAGGGTGTTCAGTTAATTCTCCCGTCTAATGCGC TTCCCTGTTTTTATGTTATTCTCTCTGTAAAGGCTGCTATTTTCATTTTTGA CGTTAAACAAAAAATCGTTTCTTATTTGGATTGGGATAAATAATATGGCTG TTTATTTTGTAACTGGCAAATTAGGCTCTGGAAAGACGCTCGTTAGCGTT GGTAAGATTCAGGATAAAATTGTAGCTGGGTGCAAAATAGCAACTAATCT TGATTTAAGGCTTCAAAACCTCCCGCAAGTCGGGAGGTTCGCTAAAACG CCTCGCGTTCTTAGAATACCGGATAAGCCTTCTATATCTGATTTGCTTGCT ATTGGGCGCGGTAATGATTCCTACGATGAAAATAAAAACGGCTTGCTTGT TCTCGATGAGTGCGGTACTTGGTTTAATACCCGTTCTTGGAATGATAAGG AAAGACAGCCGATTATTGATTGGTTTCTACATGCTCGTAAATTAGGATGG GATATTATTTTTCTTGTTCAGGACTTATCTATTGTTGATAAACAGGCGCGTT CTGCATTAGCTGAACATGTTGTTTATTGTCGTCGTCTGGACAGAATTACTT TACCTTTTGTCGGTACTTTATATTCTCTTATTACTGGCTCGAAAATGCCTCT GCCTAAATTACATGTTGGCGTTGTTAAATATGGCGATTCTCAATTAAGCCC

		TACTGTTGAGCGTTGGCTTTATACTGGTAAGAATTTGTATAACGCATATGA TACTAAACAGGCTTTTTCTAGTAATTATGATTCCGGTGTTTATTCTTATTTA ACGCCTTATTTATCACACGGTCGGTATTTCAAACCATTAAATTTAGGTCAG AAGATGAAATTAACTAAAATATATTTGAAAAAGTTTTCTCGCGTTCTTTGT CTTGCGATTGGATTTGCATCAGCATTTACATATAGTTATATAACCCAACCTA AGCCGGAGGTTAAAAAGGTAGTCTCTCAGACCTATGATTTTGATAAATTC ACTATTGACTCTTCTCAGCGTCTTAATCTAAGCTATCGCTATGTTTTCAAG GATTCTAAGGGAAAATTAATTAATAGCGACGATTTACAGAAGCAAGGTTA TTCACTCACATATATTGATTTATGTACTGTTTCCATTAAAAAAGGTAATTCA AATGAAATTGTTAAATGTAATTAATTTTGTTTTCTTGATGTTTGTTTCATCA TCTTCTTTTGCTCAGGTAATTGAAATGAATAATTCGCCTCTGCGCGATTTT GTAACTTGGTATTCAAAGCAATCAGGCGAATCCGTTATTGTTTCTCCCGAT GTAAAAGGTACTGTTACTGTATATTCATCTGACGTTAAACCTGAAAATCTA CGCAATTTCTTTATTTCTGTTTTACGTGCAAATAATTTTGATATGGTAGGTT CTAACCCTTCCATTATTCAGAAGTATAATCCAAACAATCAGGATTATATTG ATGAATTGCCATCATCTGATAATCAGGAATATGATGATAATTCCGCTCCTTC TGGTGGTTTCTTTGTTCCGCAAAATGATAATGTTACTCAAACTTTTAAAAT TAATAACGTTCGGGCAAAGGATTTAATACGAGTTGTCGAATTGTTTGTAA AGTCTAATACTTCTAAATCCTCAAATGTATTATCTATTGACGGCTCTAATCT ATTAGTTGTTAGTGCTCCTAAAGATATTTTAGATAACCTTCCTCAATTCCTT TCAACTGTTGATTTGCCAACTGACCAGATATTGATTGAGGGTTTGATATTT GAGGTTCAGCAAGGTGATGCTTTAGATTTTTCATTTGCTGCTGGCTCTCA GCGTGGCACTGTTGCAGGCGGTGTTAATACTGACCGCCTCACCTCTGTTT TATCTTCTGCTGGTGGTTCGTTCGGTATTTTTAATGGCGATGTTTTAGGGC TATCAGTTCGCGCATTAAAGACTAATAGCCATTCAAAAATATTGTCTGTGC CACGTATTCTTACGCTTTCAGGTCAGAAGGGTTCTATCTCTGTTGGCCAG AATGTCCCTTTTATTACTGGTCGTGTGACTGGTGAATCTGCCAATGTAAAT AATCCATTTCAGACGATTGAGCGTCAAAATGTAGGTATTTCCATGAGCGT

		TTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATTGTTCTGGATATTACCAGCAA GGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGCAAGTGATGTTATTACTAATCA AAGAAGTATTGCTACAACGGTTAATTTGCGTGATGGACAGACTCTTTTAC TCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTTCTCAGGATTCTGGCGTACCG TTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCCTGTTTAGCTCCCGCTCTGAT TCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTCGTCAAAGCAACCATAGTAC GCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCA GCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTCGCTTTC TTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCTTTCCCCGTCAAGCTCTAAAT CGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCC CAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGAT AGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGA CTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTCTTT TGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGAACCACCATCAAACAGGATTTT CGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTCAGG GCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAAAAG AAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTG GCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACC CCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAG CGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAATTCG AGCTCGGTACCCGGGGATCCTCAACTGTGAGGAGGCTCACGGACGCGAA GAACAGGCACGCGTGCTGGCAGAAACCCCCGGTATGACCGTGAAAACG GCCCGCCGCATTCTGGCCGCAGCACCACAGAGTGCACAGGCGCGCAGT GACACTGCGCTGGATCGTCTGATGCAGGGGGCACCGGCACCGCTGGCTG CAGGTAACCCGGCATCTGATGCCGTTAACGATTTGCTGAACACACCAGTG TAAGGGATGTTTATGACGAGCAAAGAAACCTTTACCCATTACCAGCCGCA GGGCAACAGTGACCCGGCTCATACCGCAACCGCGCCCGGCGGATTGAGT

		GCGAAAGCGCCTGCAATGACCCCGCTGATGCTGGACACCTCCAGCCGTA AGCTGGTTGCGTGGGATGGCACCACCGACGGTGCTGCCGTTGGCATTCT TGCGGTTGCTGCTGACCAGACCAGCACCACGCTGACGTTCTACAAGTCC GGCACGTTCCGTTATGAGGATGTGCTCTGGCCGGAGGCTGCCAGCGACG AGACGAAAAAACGGACCGCGTTTGCCGGAACGGCAATCAGCATCGTTTA ACTTTACCCTTCATCACTAAAGGCCGCCTGTGCGGCTTTTTTTACGGATT TTTTTATGTCGATGTACACAACCGCCCAACTGCTGGCGGCAAATGAGCAG AAATTTAAGTTTGATCCGCTGTTTCTGCGTCTCTTTTTCCGTGAGAGCTAT CCCTTCACCACGGAGAAAGTCTATCTCTCACAAATTCCGGGACTGGTAA ACATGGCGCTGTACGTTTCGCCGATTGTTTCCGGTGAGGTTATCCGTTCC CGTGGCGGCTCCACCTCTGAAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAAC GTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGC ACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGAT CGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCT GGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCT TCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTT ACGATGCGCCCATCTACACCAACGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCG CCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAA TGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATG GCGTTCCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAATGCGA ATTTTAACAAAATATTAACGTTTACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTT CCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGATTATCAACCGGGGTACATATGATTGACAT GCTAGTTTTACGATTACCGTTCATCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTC A
2	M13 7249	TGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGT GGACTCTTGTTCCAAACTGGAACAACACTCAACCCTATCTCGGGCTATTC TTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCGGAACCACCATCAAACAGGAT TTTCGCCTGCTGGGGCAAACCAGCGTGGACCGCTTGCTGCAACTCTCTC

		AGGGCCAGGCGGTGAAGGGCAATCAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTGAA AAGAAAAACCACCCTGGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCG TTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAA GCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGG CACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTG TGAGCGGATAACAATTTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGAA TTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGCATGCA AGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTG GCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGG CGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCA GCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGT GCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTC GTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAA CGTGACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATC CGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAG GAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTCCTATTGGTTAAAAAAT GAGCTGATTTAACAAAAATTTAATGCGAATTTTAACAAAATATTAACGTTT ACAATTTAAATATTTGCTTATACAATCTTCCTGTTTTTGGGGCTTTTCTGAT TATCAACCGGGGTACATATGATTGACATGCTAGTTTTACGATTACCGTTCA TCGATTCTCTTGTTTGCTCCAGACTCTCAGGCAATGACCTGATAGCCTTTG TAGATCTCTCAAAAATAGCTACCCTCTCCGGCATTAATTTATCAGCTAGAA CGGTTGAATATCATATTGATGGTGATTTGACTGTCTCCGGCCTTTCTCACC CTTTTGAATCTTTACCTACACATTACTCAGGCATTGCATTTAAAATATATGA GGGTTCTAAAAATTTTTATCCTTGCGTTGAAATAAAGGCTTCTCCCGCAA AAGTATTACAGGGTCATAATGTTTTTGGTACAACCGATTTAGCTTTATGCT CTGAGGCTTTATTGCTTAATTTTGCTAATTCTTTGCCTTGCCTGTATGATTT ATTGGATGTTAATGCTACTACTATTAGTAGAATTGATGCCACCTTTTCAGC TCGCGCCCCAAATGAAAATATAGCTAAACAGGTTATTGACCATTTGCGAA

		ATGTATCTAATGGTCAAACTAAATCTACTCGTTCGCAGAATTGGGAATCA ACTGTTATATGGAATGAAACTTCCAGACACCGTACTTTAGTTGCATATTTA AAACATGTTGAGCTACAGCATTATATTCAGCAATTAAGCTCTAAGCCATCC GCAAAAATGACCTCTTATCAAAAGGAGCAATTAAAGGTACTCTCTAATCC TGACCTGTTGGAGTTTGCTTCCGGTCTGGTTCGCTTTGAAGCTCGAATTA AAACGCGATATTTGAAGTCTTTCGGGCTTCCTCTTAATCTTTTTGATGCAA TCCGCTTTGCTTCTGACTATAATAGTCAGGGTAAAGACCTGATTTTTGATT TATGGTCATTCTCGTTTTCTGAACTGTTTAAAGCATTTGAGGGGGATTCAA TGAATATTTATGACGATTCCGCAGTATTGGACGCTATCCAGTCTAAACATT TTACTATTACCCCCTCTGGCAAAACTTCTTTTGCAAAAGCCTCTCGCTATT TTGGTTTTTATCGTCGTCTGGTAAACGAGGGTTATGATAGTGTTGCTCTTA CTATGCCTCGTAATTCCTTTTGGCGTTATGTATCTGCATTAGTTGAATGTGG TATTCCTAAATCTCAACTGATGAATCTTTCTACCTGTAATAATGTTGTTCCG TTAGTTCGTTTTATTAACGTAGATTTTTCTTCCCAACGTCCTGACTGGTATA ATGAGCCAGTTCTTAAAATCGCATAAGGTAATTCACAATGATTAAAGTTG AAATTAAACCATCTCAAGCCCAATTTACTACTCGTTCTGGTGTTTCTCGTC AGGGCAAGCCTTATTCACTGAATGAGCAGCTTTGTTACGTTGATTTGGGT AATGAATATCCGGTTCTTGTCAAGATTACTCTTGATGAAGGTCAGCCAGC CTATGCGCCTGGTCTGTACACCGTTCATCTGTCCTCTTTCAAAGTTGGTCA GTTCGGTTCCCTTATGATTGACCGTCTGCGCCTCGTTCCGGCTAAGTAAC ATGGAGCAGGTCGCGGATTTCGACACAATTTATCAGGCGATGATACAAAT CTCCGTTGTACTTTGTTTCGCGCTTGGTATAATCGCTGGGGGTCAAAGAT GAGTGTTTTAGTGTATTCTTTTGCCTCTTTCGTTTTAGGTTGGTGCCTTCG TAGTGGCATTACGTATTTTACCCGTTTAATGGAAACTTCCTCATGAAAAAG TCTTTAGTCCTCAAAGCCTCTGTAGCCGTTGCTACCCTCGTTCCGATGCTG TCTTTCGCTGCTGAGGGTGACGATCCCGCAAAAGCGGCCTTTAACTCCCT GCAAGCCTCAGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTG TCATTGTCGGCGCAACTATCGGTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCG

		AAAGCAAGCTGATAAACCGATACAATTAAAGGCTCCTTTTGGAGCCTTTT TTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTTG TTCCTTTCTATTCTCACTCCGCTGAAACTGTTGAAAGTTGTTTAGCAAAAT CCCATACAGAAAATTCATTTACTAACGTCTGGAAAGACGACAAAACTTTA GATCGTTACGCTAACTATGAGGGCTGTCTGTGGAATGCTACAGGCGTTGT AGTTTGTACTGGTGACGAAACTCAGTGTTACGGTACATGGGTTCCTATTG GGCTTGCTATCCCTGAAAATGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTC TGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGTACTAAACCTCCTGAGTACGGT GATACACCTATTCCGGGCTATACTTATATCAACCCTCTCGACGGCACTTAT CCGCCTGGTACTGAGCAAAACCCCGCTAATCCTAATCCTTCTCTTGAGGA GTCTCAGCCTCTTAATACTTTCATGTTTCAGAATAATAGGTTCCGAAATAG GCAGGGGGCATTAACTGTTTATACGGGCACTGTTACTCAAGGCACTGACC CCGTTAAAACTTATTACCAGTACACTCCTGTATCATCAAAAGCCATGTATG ACGCTTACTGGAACGGTAAATTCAGAGACTGCGCTTTCCATTCTGGCTTT AATGAGGATTTATTTGTTTGTGAATATCAAGGCCAATCGTCTGACCTGCCT CAACCTCCTGTCAATGCTGGCGGCGGCTCTGGTGGTGGTTCTGGTGGCG GCTCTGAGGGTGGTGGCTCTGAGGGTGGCGGTTCTGAGGGTGGCGGCTC TGAGGGAGGCGGTTCCGGTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATG AAAAGATGGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGA AAACGCGCTACAGTCTGACGCTAAAGGCAAACTTGATTCTGTCGCTACT GATTACGGTGCTGCTATCGATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCT AATGGTAATGGTGCTACTGGTGATTTTGCTGGCTCTAATTCCCAAATGGCT CAAGTCGGTGACGGTGATAATTCACCTTTAATGAATAATTTCCGTCAATAT TTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTCGCCCTTTTGTCTTTGGCGCT GGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAAATAAACTTATTCCGT GGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTATGTATTTTCTAC GTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAATCATGCCAGTTCTTTTG GGTATTCCGTTATTATTGCGTTTCCTCGGTTTCCTTCTGGTAACTTTGTTCG

		GCTATCTGCTTACTTTTCTTAAAAAGGGCTTCGGTAAGATAGCTATTGCTA TTTCATTGTTTCTTGCTCTTATTATTGGGCTTAACTCAATTCTTGTGGGTTA TCTCTCTGATATTAGCGCTCAATTACCCTCTGACTTTGTTCAGGGTGTTCA GTTAATTCTCCCGTCTAATGCGCTTCCCTGTTTTTATGTTATTCTCTCTGTA AAGGCTGCTATTTTCATTTTTGACGTTAAACAAAAAATCGTTTCTTATTTG GATTGGGATAAATAATATGGCTGTTTATTTTGTAACTGGCAAATTAGGCTC TGGAAAGACGCTCGTTAGCGTTGGTAAGATTCAGGATAAAATTGTAGCTG GGTGCAAAATAGCAACTAATCTTGATTTAAGGCTTCAAAACCTCCCGCAA GTCGGGAGGTTCGCTAAAACGCCTCGCGTTCTTAGAATACCGGATAAGCC TTCTATATCTGATTTGCTTGCTATTGGGCGCGGTAATGATTCCTACGATGAA AATAAAAACGGCTTGCTTGTTCTCGATGAGTGCGGTACTTGGTTTAATAC CCGTTCTTGGAATGATAAGGAAAGACAGCCGATTATTGATTGGTTTCTAC ATGCTCGTAAATTAGGATGGGATATTATTTTTCTTGTTCAGGACTTATCTAT TGTTGATAAACAGGCGCGTTCTGCATTAGCTGAACATGTTGTTTATTGTCG TCGTCTGGACAGAATTACTTTACCTTTTGTCGGTACTTTATATTCTCTTATT ACTGGCTCGAAAATGCCTCTGCCTAAATTACATGTTGGCGTTGTTAAATAT GGCGATTCTCAATTAAGCCCTACTGTTGAGCGTTGGCTTTATACTGGTAAG AATTTGTATAACGCATATGATACTAAACAGGCTTTTTCTAGTAATTATGATT CCGGTGTTTATTCTTATTTAACGCCTTATTTATCACACGGTCGGTATTTCAA ACCATTAAATTTAGGTCAGAAGATGAAATTAACTAAAATATATTTGAAAA AGTTTTCTCGCGTTCTTTGTCTTGCGATTGGATTTGCATCAGCATTTACAT ATAGTTATATAACCCAACCTAAGCCGGAGGTTAAAAAGGTAGTCTCTCAG ACCTATGATTTTGATAAATTCACTATTGACTCTTCTCAGCGTCTTAATCTAA GCTATCGCTATGTTTTCAAGGATTCTAAGGGAAAATTAATTAATAGCGACG ATTTACAGAAGCAAGGTTATTCACTCACATATATTGATTTATGTACTGTTTC CATTAAAAAAGGTAATTCAAATGAAATTGTTAAATGTAATTAATTTTGTTT TCTTGATGTTTGTTTCATCATCTTCTTTTGCTCAGGTAATTGAAATGAATA ATTCGCCTCTGCGCGATTTTGTAACTTGGTATTCAAAGCAATCAGGCGAA

		TCCGTTATTGTTTCTCCCGATGTAAAAGGTACTGTTACTGTATATTCATCTG ACGTTAAACCTGAAAATCTACGCAATTTCTTTATTTCTGTTTTACGTGCAA ATAATTTTGATATGGTAGGTTCTAACCCTTCCATTATTCAGAAGTATAATCC AAACAATCAGGATTATATTGATGAATTGCCATCATCTGATAATCAGGAATA TGATGATAATTCCGCTCCTTCTGGTGGTTTCTTTGTTCCGCAAAATGATAA TGTTACTCAAACTTTTAAAATTAATAACGTTCGGGCAAAGGATTTAATACG AGTTGTCGAATTGTTTGTAAAGTCTAATACTTCTAAATCCTCAAATGTATT ATCTATTGACGGCTCTAATCTATTAGTTGTTAGTGCTCCTAAAGATATTTTA GATAACCTTCCTCAATTCCTTTCAACTGTTGATTTGCCAACTGACCAGATA TTGATTGAGGGTTTGATATTTGAGGTTCAGCAAGGTGATGCTTTAGATTTT TCATTTGCTGCTGGCTCTCAGCGTGGCACTGTTGCAGGCGGTGTTAATAC TGACCGCCTCACCTCTGTTTTATCTTCTGCTGGTGGTTCGTTCGGTATTTT TAATGGCGATGTTTTAGGGCTATCAGTTCGCGCATTAAAGACTAATAGCCA TTCAAAAATATTGTCTGTGCCACGTATTCTTACGCTTTCAGGTCAGAAGG GTTCTATCTCTGTTGGCCAGAATGTCCCTTTTATTACTGGTCGTGTGACTG GTGAATCTGCCAATGTAAATAATCCATTTCAGACGATTGAGCGTCAAAAT GTAGGTATTTCCATGAGCGTTTTTCCTGTTGCAATGGCTGGCGGTAATATT GTTCTGGATATTACCAGCAAGGCCGATAGTTTGAGTTCTTCTACTCAGGC AAGTGATGTTATTACTAATCAAAGAAGTATTGCTACAACGGTTAATTTGCG TGATGGACAGACTCTTTTACTCGGTGGCCTCACTGATTATAAAAACACTT CTCAGGATTCTGGCGTACCGTTCCTGTCTAAAATCCCTTTAATCGGCCTCC TGTTTAGCTCCCGCTCTGATTCTAACGAGGAAAGCACGTTATACGTGCTC GTCAAAGCAACCATAGTACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAGCGCGGCG GGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAG CGCCCGCTCCTTTCGCTTTCTTCCCTTCCTTTCTCGCCACGTTCGCCGGCT TTCCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGT GCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAAACTTGATTTGGGTGATGGTTCACG TAGTGGGCCATCGCCC

	Октаэдр Т	
3-154	ядро	От ядра_1 к ядру_152 (см. перечень последовательностей)
155-160	сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_6 (см. перечень последовательностей)
161-168	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
169-174	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_6 (см. перечень последовательностей)
175-182	сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
183-188	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_6 (см. перечень последовательностей)
189-196	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
	Т=1	
197-351	Ядро	от ядра_1 к ядру_155 (см. перечень последовательностей)
352-358	сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
359-365	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
366-372	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
373-379	сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
380-386	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
387-393	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см.

		перечень последовательностей)
	T=1 (FRET)	
394-548	ядро	от ядра_1 к ядру_155 (см. перечень последовательностей)
549-555	сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
556-562	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
563-569	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
570-576	сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
577-583	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
584-590	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
	T=1 (-5°)	
591-746	ядро	от ядра_1 к ядру_156 (см. перечень последовательностей)
747-753	сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
754-760	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
761-767	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
768-774	сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
775-781	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
782-788	сторона3_выступ	от стороны_3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см.

		перечень последовательностей)
	T=1 (+5°)	
789-940	ядро	от ядра_1 к ядру_152 (см. перечень последовательностей)
941-947	сторона1_углубление	от сторона1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
948-954	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
955-961	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
962-968	сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
969-985	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
976-982	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
	T=3	
983-1145	ядро	от ядра_1 к ядру_163 (см. перечень последовательностей)
1146-1153	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
1154-1161	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
1162-1168	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
1169-1175	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
	T=4 (изо)	
1176-1343	ядро	от ядра_1 к ядру_168 (см. перечень последовательностей)
1344-1351	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см.

		перечень последовательностей)
1352-1359	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
1360-1367	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
	T=4 (равн)	
1368-1538	ядро	от ядра_1 к ядру_171 (см. перечень последовательностей)
1539-1545	сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
1546-1552	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
1553-1559	сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
	T=9 (пент)	
1560-1705	ядро	от ядра_1 к ядру_146 (см. перечень последовательностей)
1706-1713	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
1714-1721	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
1722-1728	сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_ выступ _7 (см. перечень последовательностей)
	T=9 (гекс1)	
1729-1891	ядро	от ядра_1 к ядру_163 (см. перечень последовательностей)
1892-1899	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
1900-1907	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
1908-1915	сторона3_выступ	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_8 (см.

		перечень последовательностей)
	T=9 (гекс1) broken	
1916-2078	ядро	от ядра_1 к ядру_163 (см. перечень последовательностей)
2079-2086	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
2087-2094	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2095-2102	сторона3_выступ	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
	T=9 (гекс2)	
2103-2266	ядро	от ядра_1 к ядру_164 (см. перечень последовательностей)
2267-2274	сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_ выступ _8 (см. перечень последовательностей)
2275-2282	сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2283-2290	сторона3_углубление/выступ	от стороны3_углубление/выступ_1 к стороне3_углубление/выступ_8 (см. перечень последовательностей)
	T_октаэдр (половина)	
2291-2436	Ядро	от ядра_1 к ядру_146 (см. перечень последовательностей); ядро, комбинируемое с опцией A1 или A2 и опцией B1 или B2
2437-2454	A1: прикрепление антитела	от AB_крепления_1 к AB_креплению_18 (см. перечень последовательностей); AB_крепление_18 (SEQ ID No: 2454), используемое вместо стороны3_выступ_4 (SEQ ID NO: 2496 или 2525)
2455-2471	A2: нет прикрепления антитела	от no_AB_крепления_1 к no_AB_креплению_17 (см. перечень последовательностей)

2472-2478	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
2479-2486	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2487-2492	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3 (см. перечень последовательностей)
2493-2500	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
2501-2507	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
2508-2515	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2516-2521	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_6 (см. перечень последовательностей)
2522-2529	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3 (см. перечень последовательностей)
	T_пент T=1 (2 или 3 треугольника)	
2530-2691	Ядро	от ядра_1 к ядру_162 (см. перечень последовательностей); ядро, комбинируемое с опцией A1 или A2 и опция B1, B2

		или B3
2692-2702	A1: прикрепление антитела	от AB_крепления_1 к AB_креплению_11 (см. перечень последовательностей)
2703-2713	A2: нет прикрепления антитела	от no_AB_крепления_1 к no_AB_креплению_11 (см. перечень последовательностей)
2714-2720	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_2 к стороне1_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
2721-2728	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2729-2735	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
2736-2742	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с клейкими «липкими» концами ДНК для T_кольц_T=1 (2 треугольника): сторона1_выступ	от стороны1_выступ_2 к стороне1_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
2743-2750	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с клейкими «липкими» концами ДНК для T_кольц_T=1 (2 треугольника): сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
2751-2757	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T:	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_7 (см. перечень последовательностей)

	сторона3_углубление	
2758-2765	B3: стэкинг-контакт с клейкими «липкими» концами ДНК для Т_кольц_Т=1 (2 треугольника): сторона3_углубление	от стороны3_углубление_1 к стороне3_углубление_8 (см. перечень последовательностей); сторона3_углубление_5 (SEQ ID NO: 2762), сторона3_углубление_7 (SEQ ID NO: 2764) и сторона3_углубление_8 (SEQ ID NO: 2765), используемый вместо ядро_129 (SEQ ID: 2658) и ядро_142 (SEQ ID NO: 2671)
	Т_кольц Т=1 (2 треугольника)	
2766-2914	Ядро	от ядра_1 к ядру_149 (см. перечень последовательностей); ядро, комбинируемое с опцией A1 или A2 и опция B1, B2 или B3
2915-2929	A1: прикрепление антитела	от АВ_крепления_1 к АВ_креплению_15 (см. перечень последовательностей)
2930-2943	A2: нет прикрепления антитела	от no_АВ_крепления_1 к no_АВ_креплению_14 (см. перечень последовательностей) (плюс АВ_крепление_15)
2944-2950	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
2951-2957	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
2958-2964	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
2965-2971	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
2972-2979	B1: все активные стэкинг-	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень

	контакты: сторона3_выступ	последовательностей)
2980-2986	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с тремя основаниями, удаленными для T_пент T=1 (2 или 3 треугольника): сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_7(см. перечень последовательностей)
2987-2993	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с тремя основаниями, удаленными для T_пент T=1 (2 или 3 треугольника): сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
2994-3000	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с тремя основаниями, удаленными для T_пент T=1 (2 или 3 треугольника): сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_7 (см. перечень последовательностей)
3001-3007	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T; или B3: стэкинг-контакт с тремя основаниями, удаленными для T_пент T=1 (2 или 3	от стороны2_выступ_1 к стороне2_выступ_7 (см. перечень последовательностей)

	треугольника): сторона2_выступ	
3008-3015	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
3016-3023	B3: стэкинг-контакт с тремя основаниями, удаленными для T_пент T=1 (2 или 3 треугольника): сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
	T_кольц1 T=1 (3 треугольника)	
3024-3190	Ядро	от ядра_1 к ядру_167 (см. перечень последовательностей); ядро, комбинируемое с опцией A1 или A2 и опция B1 или B2
3191-3199	A1: прикрепление антитела	от AB_крепления_1 к AB_креплению_9 (см. перечень последовательностей)
3200-3208	A2: нет прикрепления антитела	от no_AB_крепления_1 к no_AB_креплению_9 (см. перечень последовательностей)
3209-3215	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
3216-3223	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
3224-3231	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)

3232-3238	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона1_выступ	от стороны1_выступ_1 к стороне1_выступ_7 (см. перечень последовательностей)
3239-3246	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона2_углубление	от стороны2_углубление_1 к стороне2_углубление_8 (см. перечень последовательностей)
3247-3254	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-T: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
	T_кольц2 T=1 (3 треугольника)	
3255-3421	Ядро	от ядра_1 к ядру_167 (см. перечень последовательностей); ядро, комбинируемое с опцией A1 или A2 и опция B1 или B2
3422-3429	A1: прикрепление антитела	от AB_крепления_1 к AB_креплению_8 (см. перечень последовательностей)
3430-3437	A2: нет прикрепления антитела	от no_B_крепления_1 к no_AB_креплению_8 (см. перечень последовательностей)
3438-3446	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона1_углубление	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубления_8 (см. перечень последовательностей)
3447-3454	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона2_выступ	от стороны2_выступ_1 к стороне2_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
3455-3462	B1: все активные стэкинг-контакты: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
3463-3470	B2: стэкинг-контакт,	от стороны1_углубление_1 к стороне1_углубление_8 (см.

	пассивированный поли-Т: сторона1_углубление	перечень последовательностей)
3471-3478	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-Т: сторона2_выступ	от сторона2_выступ_1 к стороне2_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
3479-3486	B2: стэкинг-контакт, пассивированный поли-Т: сторона3_выступ	от стороны3_выступ_1 к стороне3_выступ_8 (см. перечень последовательностей)
	треугольный «кирпич»	
3487-3630	Ядро хвоста	от ядра_1 к ядру_144 (см. перечень последовательностей)
3631-3663	Поли-Т задняя часть	от задней части_1 к задней части_33 (см. перечень последовательностей)
3664-3684	3Т поли-Т передняя часть	от передней части_1 к передней части_21 (см. перечень последовательностей)
3685-3696	крепление поли-Т f Хвост-клейкая часть	от хвостовой клейкой части_1 к хвостовой клейкой части_12 (см. перечень последовательностей)
	Т=1 для треугольного «кирпича»	
3697-3754	ядро сторона 1	от ядра_1 к ядру_58 (см. перечень последовательностей)
3755-3812	ядро сторона 2	от ядра_1 к ядру_58 (см. перечень последовательностей)
3813-3870	ядро сторона 3	от ядра_1 к ядру_58 (см. перечень последовательностей)
3871-3888	крепление ядра Т1 клейкие	от клейких_1 к клейким_18 (см. перечень последовательностей)
3689-3892	3Т соединение со стороной1	сторона1_I1_h51; сторона1_I2_h45; сторона1_O1_h13; сторона1_O2_h18 (см. перечень последовательностей)
3893-3896	3Т соединение со стороной2	сторона2_I1_h43; сторона2_I2_h37; сторона2_O1_h25; сторона2_O2_h30 (см. перечень последовательностей)
3897-3900	3Т соединение со стороной3	сторона3_I1_h59; сторона3_I2_h53; сторона3_O1_h1;

		сторона3_O2_h6 (см. перечень последовательностей)
	октаэдр для лабораторных условий	
3901-4028	Ядро	от ядра_1 к ядру_128 (см. перечень последовательностей)
4029-4036	бугорок S1	S1_1-S1_8 (см. перечень последовательностей)
4037-4044	бугорок S2	S2_1-S2_8 (см. перечень последовательностей)
4045-4052	бугорок S3	S3_1-S3_8 (см. перечень последовательностей)
4053-4058	отверстие S1	S1_1-S1_6 (см. перечень последовательностей)
4059-4064	отверстие S2	S2_1-S2_6 (см. перечень последовательностей)
4065-4070	отверстие S3	S3_1-S3_6 (см. перечень последовательностей)
4071-4073	в качестве признака	от признака_1 к признаку_3 (см. перечень последовательностей)
4074-4079	hd h11 1	S1-S3; от S1_связующего к S3_связующему (см. перечень последовательностей)
4080-4083	hd h11 2	от S1_связующего к S3_связующему (см. перечень последовательностей)
4083-4088	hd h12	S1-S3; от S1_связующего к S3_связующему (см. перечень последовательностей)
4089-4094	hd h22	S1-S3; от S1_связующего к S3_связующему (см. перечень последовательностей)

Следует принимать во внимание, что определенные признаки изобретения, которые для ясности описаны применительно к отдельным вариантам воплощения, также могут быть обеспечены в своем сочетании в одном варианте воплощения. И наоборот, различные признаки изобретения, которые для краткости описаны применительно к одному варианту воплощения, также могут быть обеспечены по отдельности или в любой подходящей подкомбинации. Все сочетания вариантов воплощения, относящихся к изобретению, специально охватываются настоящим изобретением и раскрыты в настоящей работе точно так же, как если бы каждое сочетание было бы явно и по отдельности раскрыто. В добавление, все подкомбинации различных вариантов воплощения и их элементов также специально охватываются настоящим изобретением и раскрыты в настоящей работе точно так же, как если бы каждая такая подкомбинация была бы явно и по отдельности раскрыта в настоящей работе.

Объем настоящего изобретения не должен ограничиваться конкретными вариантами воплощения, описанными в настоящей работе. Действительно, различные модификации изобретения, в добавление к описанным в настоящей работе, станут ясными специалистам в данной области техники из вышеуказанного описания. Предполагается, что такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

Насколько это возможно согласно соответствующему патентному законодательству, все патенты, заявки, публикации, методы испытания, литература, и другие материалы, приведенные в настоящей работе, таким образом, включены в настоящую работу в виде ссылок.

Следующий раздел «Примеры» иллюстрирует изобретение, описанное выше, но тем не менее, никоим образом не предназначен для ограничения объема изобретения. Другие модели испытания, известные как таковые специалистам в данной области техники, также могут определять полезные эффекты заявленного изобретения.

Примеры

Введение

Была представлена успешная конструкция набора молекулярных строительных блоков, порожденных природой, которые самокомпонуются с образованием большого семейства икосаэдрических оболочек размером с вирус. Блоки, сконструированные из ДНК-оригами, сконструированы в соответствии с принципами симметрии, которые диктуют минимальное число отдельных связей на икосаэдрической оболочке и имеют программируемые схемы и силы взаимодействия типа «замок-ключ». Эти программируемые оболочки могут обеспечить новый способ дезактивации вирусов, основанный на концепции захвата всех вирусов в предварительно сконструированные макромолекулярные оболочки для эффективной блокировки молекулярных взаимодействий между вирусом и клетками-хозяевами. Форма оболочек прочная, с небольшим количеством дефектов и с высоким выходом, что было подтверждено с помощью анализов криоэлектронной микроскопии и сдвига электрофоретической подвижности. Для демонстрации осуществимости нашей концепции захвата вируса и блокировки взаимодействия были использованы коровые частицы вируса гепатита В. Осознание перспектив наших новых способов борьбы с вирусными инфекциями имеет потенциал для снижения заболеваемости, затрат на здравоохранение и снижения экономического бремени, вызванного в настоящее время неизлечимыми вирусными заболеваниями. Кроме того, наши способы обладают особым потенциалом для лечения возникающих и еще не описанных вирусов, поскольку наш способ не зависит от какой-либо конкретной вирусной структуры или взаимодействия вируса и хозяина. Были показаны примеры для дополнительного расширения функциональности оболочек, для создания «умных» антиген-чувствительных агентов. В добавление к антивирусным агентам возможные применения этих оболочек включают в себя разделенные конструкционные системы для использования в качестве носителей антигенов для вакцинации, средств доставки лекарств, защитных контейнеров и

синтетических органелл.

Для разработки нашей антивирусной концепции, мы рассмотрели, как иммунная защита млекопитающих может защитить нас от вторжения вирусных патогенов. С одной стороны, могут появиться нейтрализующие антитела, которые связываются со специфическими антигенами вирусов, а затем могут блокировать инфекцию, например, путем ингибирования взаимодействия вируса с рецептором клетки-хозяина, или путем связывания с вирусным капсидом, для ингибирования снятия оболочки с генома. К сожалению, большая часть антител, вырабатываемых в нашем теле в ответ на воздействие патогена, не обладает нейтрализующей активностью. Кроме того, клетке-хозяину требуется время для вырабатывания эффективных нейтрализующих антител. В течение этого периода времени вирус беспрепятственно размножается и может распространяться и даже сохранять устойчивость, а также может передаваться другим людям. Некоторые вирусные возбудители даже выработали механизмы, позволяющие избежать нейтрализацию антителами. Например, ВИЧ защищает чувствительные участки поверхности гибкими белковыми цепями, а ВГС делает так, что его засасывают липиды (7, 8).

Антитела намного меньше вирусов, и как правило, одно антитело покрывает лишь небольшой участок поверхности вируса. С другой стороны, клетки млекопитающих также вырабатывают интерфероны и (ретро-) вирусные факторы рестрикции, которые могут ингибировать вторжение вирусов, примером чего является природный фактор рестрикции TRIM5α, который собирается в гексагональную оболочку, окружающую целиком ретровирусные капсиды ВИЧ-1 (9, 10). Пример TRIM5α показывает, что инкапсуляция вируса в принципе может представлять собой эффективную терапевтическую стратегию, но решетка природного TRIM5α является высокоспецифичной, и ее невозможно легко изменить и адаптировать к различным вирусам.

Наш способ дезактивации вирусов основан на воссоздании и

синтетической интеграции функциональных аспектов нейтрализующих антител и структурообразующих природных факторов рестрикции, таких как TRIM5α. Мы предполагаем захват вирусов в сконструированные *de novo* макромолекулярные оболочки для покрытия больших площадей поверхности вирусов с целью эффективной блокировки молекулярных взаимодействий между вирусом и клетками-хозяевами. Мы предполагаем получение оболочек, внутреннее пространство которых допускает блочное, высоко многовалентное прикрепление фрагментов, распознающих вирусы, с симметрией, соразмерной вирусу. Тот же тип оболочки «платформы» можно затем использовать модульно, для нацеливания на различные вирусы. Поскольку сродство экспоненциально растет с числом образованных связей (11), многовалентное прикрепление позволяет использовать авидность для эффективного улавливания вирусов в оболочки, функционализированные отдельными молекулами, слабо связанными с вирусом. В качестве прикрепляемых молекул, связывающих вирус, мы предполагаем антитела, фрагменты антител или аптамеры, все из которых в принципе могут быть получены без подробных сведений о целевом вирусе, и ни один из которых не должен априори обладать какой-либо вирусонейтрализующей функцией. Это связано с тем, что в нашей концепции материал оболочки, а не фрагменты, непосредственно контактирующие с вирусом, будет предотвращать доступ к поверхностям вирусов. Таким образом, с помощью нашей концепции любой вирусосвязывающий агент, включая не нейтрализующие антитела, слабо связывающие аптамеры или другие молекулы, такие как гепарин, который связывает самые разнообразные вирусы из различных классов (12), может быть использован в качестве внутреннего покрытия на оболочке для создания эффективного антивирусного средства.

Здесь мы описываем принципы конструирования для создания толстых и прочных макромолекулярных оболочек с размерами, заданными пользователем, пригодными для вмещения вирусов целиком. Мы выполнили конструирование таких искусственных макромолекулярных оболочек с

размерами, соответствующими размеру вируса, с высоким качеством структуры и высокой производительностью. Мы дополнительно модифицировали наши конструкции для создания заданных частичных оболочек, которые характеризуются отверстиями для поглощения целевых вирусов. Были использованы коровые частицы вируса гепатита В (ВГВ) для демонстрации осуществимости нашей концепции захвата вируса и блокировки взаимодействия. В этой статье также описаны способы дальнейшего расширения функциональности оболочек для создания «более умных» антиген-чувствительных агентов.

Схематически, конструирование наших макромолекулярных оболочек опирается на несколько теоретических концепций. Во-первых, самосборка молекулярных комплексов, таких как капсиды вирусов, происходит обычно без внешнего управления или подвода энергии. Поэтому всю информацию о желаемой целевой оболочке необходимо закодировать посредством формы субъединиц оболочки и локальных взаимодействий между ними (13). Конструкторы белков ранее преуспели в создании искусственных макромолекулярных клеток (14-17) путем комбинирования и модифицирования природных невирусных белковых скаффолдов, которые отображают подходящие симметрии олигомеризации. Однако эти искусственно сконструированные белки-клетки намного меньше подавляющего большинства природных вирусов и не могут быть легко изменены, а следовательно, не подходят для наших целей. Наноинженеры ДНК ранее создали различные полиэдрические структуры на основе методов ДНК-оригами, сначала конструируя вершины, запрограммированные на компоновку в различные каркасные многогранники, за счет изменения угла при вершине (18). Однако выходы были низкими, поскольку гибкость вершин ограничивала специфичность для целевой структуры. Затем мы сконструировали блоки, которые мы последовательно собирали в более жесткие вершины и большие каркасные многогранники более высокого порядка (19). Выходы для блоков и результирующих многогранников стали выше, но последовательная пошаговая

сборка оказалась трудоемкой, а полученные каркасные многогранники были все еще слишком скелетоподобны, т.е., слишком полны отверстий, чтобы быть эффективными для покрытия поверхностей вирусов. В этой работе нам наконец удалось сконструировать искусственные оболочки на основе ДНК, которые демонстрируют исключительную управляемость, размеры и симметрию, соразмерную вирусу, и высокую производительность сборки, с обеспечением, таким образом, мощной платформы для сопряжения с большими природными макромолекулярными сборками, такими как вирусы.

Пример 1: Принципы конструирования оболочки

Каспер и Клуг разъяснили геометрические принципы, которые управляют структурой природных вирусных капсидов, в 1962 (20) путем картирования двумерной триангулированной сети позиций белка с получением трехмерной поверхности с положительной кривизной в результате систематической замены 12 шестикратных вершин пятикратными вершинами. Согласно теории Каспера и Клуга, которая была недавно расширена (21), число отдельных сред, занимаемых белками в икосаэдрическом капсиде, описывается его триангуляционным числом (Т-числом), которое можно вычислить с помощью проекции треугольной сетки для расположения пентамеров и гексамеров в икосаэдрическом капсиде (T=h2+hk+k2, Фиг. 1A). Общее число белков, требуемых для конструирования природного капсида, равно Т умноженное на шестьдесят. Это связано с тем, что природные белковые субъединицы по умолчанию являются асимметричными, и гомотримеризация является минимально необходимой для конструирования тройной симметричной субъединицы, которая может быть скомпонована с получением икосаэдрической оболочки с двадцатью треугольными гранями (Фиг. 1B, слева: T=1 мелкого вируса мышей (22)). Для конструирования капсидов большего размера, вмещающих бóльшие геномы, вирусы используют более одного белка капсида или белки капсида, которые могут принимать различные конформации. Например, капсид вируса хлоротической крапчатости вигны (23) собирается в общей сложности из 180 белков с

идентичной последовательностью с получением капсида T=3, в котором белок встречается в трех различных конформациях (Фиг. 1B, справа).

Для адаптации требуемой локальной симметрии для икосаэдрических оболочек, мы создали жесткие псевдосимметричные треугольные субъединицы (Фиг. 1C, слева) с использованием методов ДНК-оригами (24-29). ДНК-оригами представляет собой способ биомолекулярного конструирования, который позволяет создавать дискретные объекты мегадальтонного масштаба со структурно заданными трехмерными формами (30, 31). Результирующие объекты могут быть скомпонованы путем гибридизации с получением многогранников более высокого порядка (18) и с получением решеток (32-35). Наши субъединицы сконструированы так, чтобы они самособирались в объекты более высокого порядка путем бокового взаимодействия «кромка с кромкой», с использованием штабелирования пары оснований (36) вместо гибридизации, таким образом, имитируя взаимодействия типа «замок-ключ» в белках. Боковые взаимодействия пары оснований по типу «кромка с кромкой» могут быть модульно активированы и дезактивированы, возможность чего мы использовали для конструирования частичных оболочек. Каждая сторона созданных нами треугольных субъединиц эквивалентна одной белковой субъединице природного капсида. Общая форма оболочки регулируется геометрическими закономерностями, обеспечиваемыми треугольными субъединицами. Эти закономерности задаются выбором конкретной длины каждой треугольной кромки, уникальным топологическим рисунком на кромке для регулирования парных взаимодействий кромки с кромкой в комплекте различных треугольных блоков и конкретным выбором угла скоса кромок, регулирующего эффективную кривизну оболочки. Мы получили целевой угол скоса путем настройки спиральной соединяемости кромок треугольника в вершинах (Фиг. 5), что потребовало существенного отклонения от правил многослоевого соединения ДНК-оригами по умолчанию. Было использовано итеративное конструирование с помощью программы caDNAno (37) в сочетании с

моделированиями молекулярной динамики на основе эластичных сетей (38) для получения возможных конструктивных решений, которые соответствовали желаемым геометрическим спецификациям (Фиг. 1C).

Поскольку в нашей системе каждая треугольная кромка представляет один белок, триангуляционное число Каспера и Клуга теперь дает количество уникальных треугольных кромок, требуемых для создания конкретной оболочки. Таким образом, оболочки T=1 и T=3 могут быть в равной мере сконструированы с одним треугольником, с тремя идентичными кромками для оболочки T=1 (Фиг. 1D, справа) и тремя различными кромками для оболочки T=3 (Фиг. 1E, слева). Оболочка T=4 требует наличия двух отдельных треугольных субъединиц, например, одного треугольника с тремя уникальными кромками и другого треугольника с тремя идентичными кромками (Фиг. 1E, средний). Оболочка T=9 требует наличия трех различных треугольников, каждый из которых имеет три уникальные кромки (Фиг. 1E, справа). Чем больше число T, тем больше общее число треугольников на целевой оболочке, заданное 20T. Были использованы конструктивные решения, в которых все углы скоса треугольника для конкретной целевой оболочки были одинаковыми. Тогда как T=9 представляло собой самую большую оболочку, которую мы намеревались сконструировать, мы также сконструировали треугольные субъединицы для меньшего октаэдрического контейнера («O») (Фиг. 1D, слева).

Пример 2: Субъединица и структуры оболочки

Мы закодировали различные треугольные конструкции в последовательностях ДНК (см. способы ниже), получили соответствующие комплекты олигонуклеотидов и самоскомпоновали варианты треугольников в однореакторной смеси согласно ранее описанным процедурам (39). Анализ качества гель-электрофоретического фолдинга потребовал некоторых итераций конструкции для повышения выходов сборки треугольных субъединиц (Фиг. 5). Для подтверждения трехмерных структур сконструированных треугольников мы исследовали все треугольные

субъединицы с использованием анализа одиночной частицы с помощью криотрансмиссионной электронной микроскопии (крио-ЭМ) (Фиг. 2). Полученные трехмерные электронные карты имели разрешения в диапазоне от 13 до 22 Å (Фиг. 6-13), что позволило нам оценить общие трехмерные формы, угол скоса, правильность размещения всех спиралей, правильность формы сконструированных боковых выступов и углублений для крепления по типу «кромка к кромке» и возникновение систематических дефектов фолдинга. Например, один из треугольников для оболочки T=9 (Тгекс1) имел систематический структурный дефект на одной из его вершин, что снижало его способность к образованию боковых взаимодействий по типу «кромка с кромкой» (Фиг. 14). На основе данных криоэлектронного микроскопа мы усовершенствовали конструкцию и устранили дефект.

Затем мы успешно скомпоновали итеративно усовершенствованные варианты треугольников с получением закрытых оболочек, имеющих ожидаемые размеры, что было подтверждено непосредственным формированием изображения с помощью криоэлектронного микроскопа (Фиг. 2A, дополнительные изображения см. на Фиг. 15-19). Проверка отдельных частиц (Фиг. 2A) и средних значений для двумерного класса (Фиг. 2B-F) позволила обнаружить частицы, отображающие сконструированную симметрию. Например, можно четко видеть три оси симметрии октаэдра (четырех-, трех-, двукратный фолдинг, Фиг. 2B) и оболочки T=1 (пяти-, трех-, двукратный фолдинг, Фиг. 2C). Частицы с более высоким числом T для оболочки имели более круглый внешний вид из-за большого числа треугольников на частицу, а базовая треугольная сетка, предсказанная согласно представлению Каспара и Клуга, стала четко видна (Фиг. 2D-F). Поскольку отдельные частицы отображали расчетную симметрию, мы реконструировали трехмерные карты оболочек путем наложения соответствующей симметрии (Фиг. 2B-E). Полученные карты имели разрешения в диапазоне от 20 до 40 ангстрем. Разрешения карт октаэдра и оболочки T=1 было достаточно, чтобы различить отдельные двойные спирали ДНК. Для оболочки T=1 мы также

рассчитали трехмерную карту без наложения какой-либо априорной симметрии, и эта карта была полностью икосаэдрической и хорошо накладывалась на одноуровневую карту, которую мы реконструировали с наложенной симметрией, хотя и с меньшим разрешением. Этот работа успешно доказала концепцию икосаэдрической симметрии (Фиг. 16E).

Для разъяснения влияния ориентационной специфичности взаимодействий между субъединицами, мы изменили угол скоса субъединиц T=1 по отношению к идеальной геометрии (α=20,9°). Мы сконструировали два дополнительных варианта треугольника T=1, угол скоса которых отклонялся на +5° или -5° от идеальной икосаэдрической формы. Уменьшение или увеличение угла скоса вызывало появление больших структур, похожих на оболочку, в добавление, соответственно, к оболочкам T=1 или октаэдрам (Фиг. 20). Исходя из этих данных, мы пришли к выводу, что правильный целевой угол скоса должен находиться в диапазоне +-5°.

Мы также успешно построили крио-ЭМ карты октаэдра с наложенной симметрией и без таковой (Фиг. 15E). Карты оболочек, на которых отсутствовал один или более треугольников, были реконструированы по отдельности (Фиг. 15D, 16D), что позволяло качественно оценить целевое качество и выход, а также отобразить спроектированную общую симметрию. Мы исследовали самые большие оболочки T=9 с помощью негативных изображений ЭМ-томографии (Фиг. 2F, Фиг. 21E). Разрезы томограмм скомпонованных оболочек T=9 показывают полностью закрытые оболочки, а также правильное расположение пентамеров согласно спроектированному T-числу (стрелки на Фиг. 2F и Фиг. 21E). Комплект оболочек показал наличие внутренних полостей в диапазоне от ~50 нм до ~280 нм. Этот диапазон размеров соответствует размерам многих вирусных патогенов.

Пример 3: Выход и стабильность оболочки

Анализ электрофоретической подвижности геля низкой плотности (Фиг. 3A, Фиг. 22) показал, что сборка оболочки осуществлялась за счет исчезновения треугольных мономеров, возникновения мазка, указывающего

на присутствие олигомерных частиц, с последующим появлением преобладающей полосы высокой интенсивности, что во всех случаях соответствовало полностью сформированной оболочке. Октаэдр и оболочки T=1 формировались, соответственно, в течение 15 и 60 минут, что достаточно быстро для обеспечения самосборки этих оболочек непосредственно в ходе однореакторной реакции фолдинга треугольника (Фиг. 24). Октаэдры были образованы с конечным полным выходом оболочки ~95%. Оболочки T=1 были образованы с выходом до 70%. Оболочки T=3 и T=4 были образованы с выходом примерно 40% (Фиг. 3A). В целом, при молекулярных массах в диапазоне от 43 до 925 мегадальтон (от 8 до 180 треугольных субъединиц, в зависимости от конструкции), наши сборки оболочек были не только существенно больше, чем любая другая ранее описанная однореакторная скомпонованная искусственная макромолекулярная сборка с заданным размером, но наши оболочки также были образованы с повышенными на порядки выходами по сравнению с ранее сконструированными многогранниками нуклеиновой кислоты (18, 19).

Эксперименты с заменой субъединиц с флуоресцентно помеченными субъединицами показал, что в условиях, благоприятных для оболочки, треугольники, которые встроены в закрытые оболочки, не обмениваются с раствором (Фиг. 3B, Фиг. 23A,B). В условиях равновесия (Фиг. 3B, Фиг. 23C), треугольники меняются местами. Для заданного применения, оболочки должны быть стабильными без оборота субъединиц в физиологических текучих средах, чего мы достигли путем стабилизации после сборки. Например, сначала мы скомпоновали оболочки при условиях высокой ионной прочности, где стэкинг пары оснований эффективен, с последующей ковалентной фотосшивкой стэкинг-контактов типа «кромка к кромке» с использованием стратегически размещенных фрагментов циановинилкарбозола (CNVK), расположенных на краях треугольной субъединицы, которые образуют ковалентные межтреугольные поперечные связи при освещении светом с длиной волны 365 нм (Фиг. 3C) (40). Анализ

гель-электрофоретической подвижности оболочек, освещенных УФ-излучением и измененных с помощью CNVK, показал, что неосвещенные оболочки распадались в условиях низкого электрофореза соли, тогда как освещенные оболочки оставались стабильными, с подтверждением, таким образом, ковалентного межтреугольного связывания (Фиг. 3C). Для перехода к физиологическим условиям мы также успешно протестировали стабилизацию треугольных субъединиц оболочки с внутренними ковалентными связями с помощью точечной УФ-сварки, как было ранее описано (41). Дополнительное покрытие оболочек смесью олиголизина и ПЭГ-олиголизина (42) позволило нам перемещать оболочки в сыворотку мыши, где оболочки оставались нетронутыми (Фиг. 3 D).

Пример 4: Захват и нейтрализация вирусов

Мы предлагаем несколько стратегий использования нашей системы оболочки для блокировки поверхности вирусов, предотвращающей возможные взаимодействия между вирусом и клеткой. Одна из стратегий состоит в создании самособирающихся защитных оболочек из треугольных конструкционных блоков на поверхности вирусов. Вторая стратегия состоит в координации и поглощении одного вируса двумя противолежащими полуоболочками, тогда как вирус находится посередине. Третья стратегия состоит в поглощении вирусов в предварительно изготовленных оболочках, характеризующихся достаточно большими входными порталами, подобно тому, как насекомоядное растение захватывает свою добычу. Мы демонстрируем последние две стратегии. Для выполнения этой задачи мы спроектировали новые варианты треугольных субъединиц, чтобы направить самосборку к образованию фрагментов оболочки, задаваемых пользователем, включающих в себя полуоктаэдр (Фиг. 4A), полуоболочки T=1 (Фиг. 4B) и оболочки-«ловушки» T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника (Фиг. 4C). Для приготовления полуоктаэдра вместо полного октаэдра, мы деактивировали стэкинг-контакты комплементарной пары оснований на одной из треугольных кромок соответствующей субъединицы путем укорочения

цепи либо путем добавления неспаренных тимидинов (Фиг. 4A, см. Фиг. 24 A, D). Для создания полуоболочек T=1 требуются две треугольные субъединицы, одна из которых образует закрытый пентамер, а другая крепится к кромкам пентамера (Фиг. 4B, см. Фиг. 24 B, E). Для создания варианта оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника требуются три варианта треугольных субъединиц (Фиг. 4C, см. Фиг. 24 C, F). Измененные оболочки успешно самособираются из треугольных конструкционных блоков, что было подтверждено криоэлектронной микроскопией структур раствора (Фиг. 4D-F, см. Фиг. 25-27). Результирующие средние значения двумерного класса и трехмерные карты электронной плотности позволили выявить ожидаемые структурные признаки. Следует отметить, что мы уже задействовали девять сайтов на треугольной кромке для закрепления фрагментов, связывающих вирусы, на измененных субъединицах оболочки, которые проявились в виде «пиков» на картах криоэлектронной микроскопии (Фиг. 4 D,E, стрелки).

Для демонстрации способности к захвату вирусов мы захватили коровые частицы вируса гепатита B (Фиг. 4G) в каждом из вышеописанных вариантов оболочки. Для придания специфичности мы конъюгировали антитела против HBc 17H7 (изотип IgG-2b), которые связывают и распознают вирусный капсид, состоящий из частиц для внутренней части оболочки, путем гибридизации антител, меченных оцДНК, с комплектом якорных точек на треугольных субъединицах, которые, как мы предсказали, могут сделать внутреннее пространство оболочек специфически клейкими для целевого вируса. Действительно, когда мы инкубировали коровые частицы ВГВ с оболочками ДНК, приготовленными указанным образом при стехиометрии приблизительно 1:1, все свободные вирусные частицы были эффективно захвачены частицами нашей оболочки, как видно по негативным РЭМ-изображениями (Фиг. 28). Мы не наблюдали никакого связывания ВГВ ни в отсутствие антител ВГВ, конъюгированных к внутренней части оболочки (Фиг. 29A), ни в присутствии антител, специфических для других мишеней (Фиг. 29B). Мы выполнили исследования на криоэлектронном микроскопе,

чтобы убедиться в надлежащем захвате целевого вируса в наших оболочках, и реконструировали трехмерные карты октаэдраической оболочки и оболочки T=1 с захваченными коровыми частицами ВГВ (Фиг. 4 H, I, см. Фиг. 30, 31). Эти карты, по нашему мнению, прекрасно демонстрируют осуществимость предложенной нами системы захвата вирусов.

Для варианта полуоктаэдра большая часть частиц состояла из двух полуоктаэдров, координирующих одиночную коровую частицу ВГВ (Фиг. 4H). Мы наблюдали две полуоктаэдрические оболочки в различных относительных конформациях на общей коровой частице ВГВ (Фиг. 30). Карта, полученная с помощью криоэлектронного микроскопа, также выявляет сигнатуры антител, которые соединяют оболочку ДНК с захваченной коровой частицей ВГВ (Фиг. 4H, слева). Сигнатуры аналогичного антитела можно обнаружить на карте с комплексом полуоболочек T=1 для ВГВ (Фиг. 4I, слева), хотя и с более высоким порогом плотности. Мы не стали реконструировать карту, полученную с помощью криоэлектронного микроскопа для коровых частиц ВГВ, захваченных в оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника, поскольку положения коровых частиц ВГВ изменялись слишком сильно. Вместо этого, ПЭМ-изображения с негативным окрашиванием демонстрируют способность этих вариантов оболочки типа «насекомоядного растения» поглощать даже более одной коровой частицы ВГВ (Фиг. 4J, см. Фиг. 28 E, F).

Наконец, в качестве подтверждение концепции способности наших оболочек ингибировать взаимодействие с поверхностями вирусов, мы выполнили в лабораторных условиях испытания по блокировке вирусов с использованием антител, связывающих ВГВ, иммобилизованных на твердой фазе, имитирующей поверхность клетки (Фиг. 4K, Фиг. 32). Мы оценили степень связывания коровой частицы ВГВ с твердой фазой за счет связывания ортогонального репортерного антитела, специфического к ядру ВГВ, связанного с пероксидазой хрена (HRP). Как и в стандартных ферментных иммуносорбентных анализах, остаточные коровые частицы ВГВ, связанные с

поверхностью и доступные для связывания, будут выявлены путем получения колориметрического сигнала, катализируемого HRP. В присутствии наших оболочек, поглощающих вирусы (половины оболочек T=1), взаимодействия вирусов с твердой фазой были блокированы до 99%, с подтверждением, таким образом, сильного связывания оболочек с ядром ВГВ и желаемой способности к ингибированию взаимодействия для наших оболочек. Все контрольные образцы оболочек без антител, захватывающих ВГВ (анти-HBc 17H7), и коровые частицы ВГВ, непосредственно инкубированные захватывающим антителом (анти-HBc 17H7) без оболочек, приводили к минимальной блокировке вирусов по сравнению с сигналом, генерированным голыми коровыми частицами ВГВ, которые представляют 0% блокировки вирусов. Примечательно, что при наличии всего 4 захватывающих антител на оболочку, достигается эффективность блокировки вирусов >80%, что демонстрирует способность наших оболочек экранировать вирус, поступающий снаружи, за счет стерической окклюзии.

Пример 5: Расширение функциональности оболочки

Предлагаемые нами варианты оболочки добавляют слой ДНК толщиной ~15 нм вокруг захваченной вирусной частицы (не считая внутреннего пространства, созданного слоем веществ, связывающих вирусы), и трудно представить, как взаимодействие клетки с вирусами еще может происходить через такие толстые оболочки. Однако в предлагаемых нами конструкциях имеется несколько отверстий, особенно в полостях в треугольных субъединицах, которые могут допустить остаточные взаимодействия. В качестве демонстрации способа герметизации полости в треугольных субъединицах мы сконструировали «кирпич» ДНК, имеющий треугольное поперечное сечение, приблизительно соответствующее размерам треугольной полости в субъединицах оболочки. Мы закрепили «кирпич» через несколько точек крепления к внешней поверхности треугольника оболочки T=1 (детали конструкции на Фиг. 33, см. Фиг. 34 для крио-ЭМ структуры «кирпича») и частично воткнули его в полости в субъединицах оболочки. «Кирпич» также

может действовать как разделитель, который дополнительно отделяет поверхности клеток от поверхностей вирусов, захваченных в оболочки еще на 40 нм. «Кирпич» может быть добавлен к уже скомпонованным оболочкам, или, в качестве альтернативы, блоки треугольников и «кирпичей» могут быть также сначала димеризованы, с последующим запуском сборки оболочки. Оба способа дают полностью скомпонованные «заостренные» оболочки T=1 при тех же условиях, что и для неизмененной оболочки T=1. Мы решили структуру заостренной оболочки T=1 с использованием крио-ЭМ анализа одиночной частицы (Фиг. 5A, Фиг. 35). Полученная карта частично совпадает с картами неизмененной оболочки T=1, но центральное отверстие треугольных субъединиц оболочки теперь блокируется добавленным модулем канала (Фиг. 35E). То, что закрытие полости «кирпичом» ДНК легко сработало, демонстрирует прочность и структурную модульность наших оболочек. «Кирпич» также можно рассматривать как модель для ранее описанных мембранных каналов на основе ДНК (43) или для любого другого функционального модуля, который желательно прикрепить к оболочке.

В наших экспериментах по захвату вирусов (Фиг. 4) мы установили до девяти антител на треугольнике; т.е. половина оболочки T=1 потенциально может содержать 90 фрагментов, связывающихся с вирусом. Хотя можно было бы создать даже более прикрепленных сайтов, 90 – это уже очень большое число. Некоторые из этих сайтов также могут быть использованы для установки дополнительных фрагментов, связывающихся с вирусом для повышения специфичности, или для прикрепления молекул с протеолитической активностью, таких как трипсин или протеиназа K, что может придать нашим оболочкам дополнительную вироцидную активность за счет «сбривания» поверхностных белков захваченных вирусов.

Пример 6: Захват вирусов

Вирусы могут быть захвачены или координированы сегментами предварительно скомпонованной икосаэдрической оболочки, характеризующимися достаточно большими апертурами (Фиг. 45 a,b, Фиг. 28).

В качестве альтернативы защитные оболочки могут быть образованы непосредственно на поверхности вирусных частиц (Фиг. 45c). Оба подхода, проиллюстрированные в экспериментах, мы выполнили для коровых частиц гепатита B (ВГВ) (Фиг. 45a-c вставка, красный). Для придания специфичности ВГВ мы конъюгировали анти-HBc 17H7 (изотип IgG-2b) к оболочкам ДНК путем гибридизации антител, помеченных оцДНК, для комплекта якорных точек на треугольных субъединицах (Фиг. 45a-c вставка, голубой). Мы не наблюдали никакого связывания ВГВ ни в отсутствие антител ВГВ (Фиг. 29), ни в присутствии антител, специфических для других мишеней (Фиг. 29).

Мы определили трехмерные крио-ЭМ карты октаэдраических и 203 полуоболочек T=1 с захваченными минимальными нуклеосомами ВГВ (Фиг. 45d, e, Фиг. 30-31). Для варианта полуоктаэдра большая часть частиц состояла из двух противолежащих полуоктаэдров, координирующих одиночную коровую частицу ВГВ в их середине (Фиг. 45d, Фиг. 30). Микрофотографии и крио-ЭМ карта также выявили сигнатуры, отражающие антитела, которые связывают оболочку ДНК с захваченной коровой частицей ВГВ (Фиг. 45d, справа). Сигнатуры аналогичного антитела можно обнаружить на данных изображения для комплексов ВГВ с половиной оболочки T=1 (Фиг. 45e, справа). Мы также захватили коровые частицы ВГВ в более крупные варианты оболочки T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника (Фиг. 45f), которые могут вмещать несколько частиц ВГВ в их внутренние полости (Фиг. 45f, Фиг. 28).

Для тестирования способности наших оболочек предотвращать взаимодействие захваченного вируса с поверхностями, мы выполнили в лабораторных условиях испытания по блокировке вирусов с использованием антител, связывающих ВГВ, иммобилизованных на твердой поверхности (Фиг. 45g, Фиг. 32). Мы количественно определили степень связывания коровой частицы ВГВ с поверхностью за счет связывания ортогонального репортерного антитела, специфического к ядру ВГВ, связанного с пероксидазой хрена (HRP). Остаточные коровые частицы ВГВ, связанные с

поверхностью, были выявлены при получении колориметрического сигнала, катализируемого HRP.

В присутствии наших оболочек, засасывающих вирусы (половины оболочек T=1), взаимодействия вирусов с поверхностью были блокированы до 99% (Фиг. 45g снизу), с подтверждением, таким образом, способности к ингибированию взаимодействия для наших оболочек. Контрольные эксперименты с оболочками без антител, захватывающих ВГВ, приводили к минимальной блокировке вирусов по сравнению с сигналом, генерированным голыми коровыми частицами ВГВ, что соответствует базовому уровню 0% блокировки вирусов.

Коровые частицы ВГВ, непосредственно инкубированные антителами, но без каких-либо имеющихся оболочек, практически не блокировались от связывания с поверхностью. Этот результат указывает на то, что сами по себе антитела не полностью пассивируют поверхность капсида ВГВ, даже если они были добавлены при 400-кратном избытке по сравнению с частицами ВГВ. Однако, напротив, при использовании оболочек, функционализированных в среднем всего с пятью антителами, мы достигли эффективности блокировки вирусов более 80%. Блокировка была почти полной (до 99%) при использовании более пяти антител в оболочке. Таким образом, данные показывают, что способ захвата в оболочку может быть высокоэффективным, даже когда между поверхностью вируса и окружающей оболочкой возникает лишь небольшое количество физических взаимодействий. Наши данные указывают на то, что оболочки, а не антитела, используемые для удержания вируса внутри оболочки, экранируют вирус от ее наружного пространства за счет стерической окклюзии.

Пример 7: Нейтрализация вируса в человеческих клетках

Мы протестировали способность к нейтрализации для полуоктаэдрических оболочек, полученных методом ДНК-оригами, с использованием вирионов серотипа аденоассоциированного вируса 2 (AAB2) (46), несущего экспрессионную кассету с усиленным зеленым

флуоресцентным белком (eGFP) (59), с использованием как микроскопии, так и проточной цитометрии (Фиг. 46a). Мы стабилизировали оболочки ДНК с помощью точечной УФ-сварки и ПЭГ242-олиголизина/олиголизин, как было описано выше. Частицы AAB2 были успешно захвачены в полуоболочки ДНК, функционализированные антителом против AAB2 внутри оболочки в сыворотке в присутствии бычьего сывороточного альбумина (БСА), как видно по непосредственному формированию изображения с помощью ТЭМ (Фиг. 46b). Поскольку AAB принадлежит к совершенно другому семейству вирусов, нежели ВГВ, эти данные также устанавливают модульность оболочки: заменяя фрагменты, связывающиеся с вирусом, можно улавливать различные типы вирусов.

Мы количественно определили эффективность нейтрализации вируса путем определения кривых дозовой зависимости для полуоболочек ДНК, функционализированных в среднем 36 антителами против AAB2 на полуоболочку, и свободных антител против AAB2 в качестве эталона (Фиг. 49). Число eGFP-положительных клеток было использовано для получения данных об эффективности инфекции методом анализа проточной цитометрии. Полуоболочки ДНК нейтрализовали AAB2 при оцененной полумаксимальной ингибирующей концентрации (IC50) ~0,3 нМ (Фиг. 49). В наших условиях IC50 соответствовало приблизительно 2,5 полуоболочки на инфекционную вирусную частицу. Полуоболочки ДНК обладали повышенной способностью к нейтрализации по сравнению с активностью свободных частиц анти-AAB2 (Фиг. 46c,d, Фиг. 49). Это повышение нейтрализации лучше всего видно на изображении, полученном с помощью флуоресцентной микроскопии (Фиг. 46d), где в образцах с полуоболочками ДНК, захватывающими AAB2, остается мало eGFP-позитивных клеток, тогда как в образцах, подвергаемых воздействию, идентичному дозировке антител против AAB2, свободно присутствующих в растворе, появляется множество eGFP-позитивных клеток. Этот эксперимент демонстрирует, что оболочки могут функционировать в физиологических условиях, в которых присутствуют живые клетки. Он также

показывает, что оболочки могут дополнительно повышать уже довольно мощные способности к нейтрализации, имеющиеся у антител против AAB2.

Как сказано выше для in vitro экспериментов по блокировке ВГВ, показанных на Фиг. 4, повышенная нейтрализация предполагает, что оболочки захватывают вирусы многовалентным образом и что материал оболочки дополнительно способствует окклюзии вируса на поверхности агента.

Мы также исследовали, оказывают ли воздействие полуоболочки, полученные методом ДНК-оригами, без каких-либо конъюгированных антител, и обнаружили низкую, но не пренебрежимо малую активность по нейтрализации при самой высокой тестируемой концентрации оригами (Фиг. 49). Мы предполагаем, что эта активность возникает в результате электростатических взаимодействий между оболочками ДНК, покрытыми ПЭГ-олиголизином/олиголизином, и частицами AAB2. Наконец, мы проверили, влияет ли воздействие полуоболочек ДНК на жизнеспособность клеток, и не обнаружили существенного влияния ни при одной концентрации, используемой в данном исследовании (Фиг. 49).

Обсуждение

Мы экспериментально успешно продемонстрировали подход на основе симметрии для самосборки вирусоподобных оболочек различных размеров с высоким выходом и надежностью. Эта способность обеспечивается жесткими строительными блоками, которые соответствуют неоднородным частицам (44), характеризующимся специфическим взаимодействиям типа «замок-ключ», геометрия которых может быть спроектирована и реализована с субнанометровой точностью. Исключительная программируемость строительных блоков оболочки дополнительно позволяет создавать частичные оболочки с заданным размером, такие как полуоболочки или оболочки с входными порталами, которые мы предлагаем в качестве вирусонейтрализующих агентов для захвата и инактивации вирусов. Мы испытали эту концепцию с коровыми частицами ВГВ в качестве модельной вирусной частицы, и в наших экспериментах мы достигли до 99% инактивации

за счет поглощения ВГВ в окружающую оболочку.

В нашей концепции все распознающие элементы встроены в наночастицу, а не опираются на каскадные реакции между несколькими диффузными компонентами. Этот делает нашу концепцию нечувствительной к разбавлению, что является решающим требованием для возможного будущего биомедицинского применения. Помимо предложенного применения в качестве вирусонейтрализующих агентов для захвата и инактивации вирусов, варианты наших оболочек также могут быть использованы как носители антигенов для вакцинации, как носители ДНК или РНК для генной терапии или генной модификации, как средства доставки лекарств, как защитные контейнеры, или для создания разделенных систем, таких как синтетические органеллы. Наши оболочки характеризуются широким диапазоном размеров внутренней полости, а также могут использоваться как альтернативные векторы доставки генов, способные вмещать намного больше геномной информации по сравнению с объемом информации, которая может быть доставлена, например, с использованием аденоассоциированных вирусов (ААВ) (45, 46), являющихся популярными векторами генной терапии. Поставляемые нуклеиновые кислоты можно комбинировать с белками или с белковыми комплексами, обеспечивающими, например, подавление генов на основе CRISPR/Cas или делающими генную модификацию более безопасной и эффективной.

Тогда как природные вирусы компонуются из белковых субъединиц, мы сконструировали икосаэдрические оболочки, которые состоят исключительно из ДНК, с переносом, таким образом, принципов конструирования вирусов из белковой химии в область нуклеиновых кислот. Нуклеиновые кислоты долговечны, коммерчески доступны и легко функционализируются и изменяются, как мы также показали в данной работе. Путем использования нуклеиновых кислот для поглощения вирусных патогенов мы открыли новую область для разработки препаратов для борьбы с вирусными угрозами. Использование агентов на основе нуклеиновых кислот потенциально дает

преимущество, состоящее в предотвращении нейтрализации, фагоцитоза и деградации с помощью врожденной и адаптивной иммунной системы, нацеленной на белковые структуры. В последнее время появляются способы получения объектов на основе ДНК в масштабе (47). Эти способы могут способствовать трансформации нашей концепции борьбы с вирусными заболеваниями в возможные терапевтические методики для клинического применения.

Способы

1. **Самосборка субъединиц оболочки**

Все эксперименты по самосборке были выполнены в стандартизованных «буферах, подвергнутых фолдингу», содержащих x мМ $MgCl_2$ в добавление к 5 мМ трис-основания, 1 мМ EDTA, 5 мМ NaCl при pH 8 (FoBx). Одноцепочечные объекты ДНК-оригами были самоскомпонованы при однореакторных реакциях фолдинга, содержащих 50 нМ скаффолда ДНК и 200 нМ каждой штапельной нити. Объекты ДНК-оригами, содержащие несколько скаффолдов, были самоскомпонованы с использованием каждой цепи ДНК скаффолда при концентрации 10 нМ и 200 нМ каждой штапельной нити. Отдельные скаффолды были ортогональны по последовательности и были сконструированы и получены, как описано ранее (48, 49). Буфер, подвергнутый фолдингу (FoB20), был использован с x = 20 мМ $MgCl_2$. Все реакционные смеси были подвергнуты термическому отжигу с изменениями температуры, как подробно представлено в Таблице 2 для устройств термоциклирования Tetpad (Bio-Rad). Штапельные нити были закуплены у IDT (Integrated DNA Technologies).

ТАБЛИЦА 2: Диапазоны температур и молекулы скаффолда, используемые для самосборки строительных блоков оболочки.

Объект	Температура фазы денатурации (15 мин) (°C)	Диапазон температур (1°C/1 ч)	Температура хранения (°C)	Скаффолд
Октаэдр Т	65	60-56°C	20	M13 8064
Т=1	65	58-54°C	20	M13 8064
Т=1 -5°	65	58-54°C	20	M13 8064
Т=1 +5°	65	58-54°C	20	M13 8064
Т=3	65	54-52°C	20	M13 8064
Т=4_изо	65	56-54°C	20	M13 8064
Т=4_равн	65	58-54°C	20	M13 8064
Т=9_пент	65	56-52°C	20	M13 7249
Т=9_гекс1	65	56-52°C	20	M13 8064
Т=9_гекс2	65	58-54°C	20	M13 8064
Октаэдр Т_половина	65	58-54°C	20	M13 8064
Т_пент Т=1 (2/3 треугольника)	65	58-54°C	20	M13 8064
Т_ кольц Т=1 (2 треугольника)	65	56-52°C	20	M13 8064
Т_кольц1 Т=1 (3 треугольника)	65	56-52°C	20	M13 8064
Т_кольц2 Т=1 (3 треугольника)	65	56-52°C	20	M13 8064
Треугольный «кирпич»	65	60-44°C	20	M13 8064

(последовательности скаффолдов/матриц см. в Таблице 1; последовательности штапельных нитей см. в Таблице 1 и Перечне последовательностей).

2. Очистка субъединиц оболочки и самосборка оболочек

Все субъединицы оболочки очищали с использованием гелевой очистки, а если необходимо, концентрировали с помощью ультрафильтрации (Amicon Ultra 500 мкл с отсечением по молекулярной массе 100 кДа) перед самосборкой субъединиц в оболочки. Обе процедуры были выполнены, как было описано ранее (39), со следующими изменениями: для очистки геля были использованы 1,5% гелей агарозы, содержащих 0,5x TBE и 5,5 мМ $MgCl_2$. Для ультрафильтрации тот же фильтр был заполнен образцом, очищенным гелем несколько раз (примерно 2-5 раз, ~400 мкл на каждом этапе), для повышения концентрации объектов, восстанавливаемых из фильтра. Прежде чем установить фильтр вверх дном в новый патрубок фильтра, мы выполнили два этапа промывки в 1xFoB5 (~400 мкл) для достижения заданных условий буфера для сборки оболочки. Для компоновки очищенных (и концентрированных) субъединиц оболочки в оболочки, мы отрегулировали концентрации субъединицы и $MgCl_2$ путем добавления 1xFoB5 и 1,735 М $MgCl_2$ в подходящих количествах. Типичные концентрации субъединицы находились в диапазоне 5-100 нМ (для измерений на криоэлектронном микроскопе см. Таблицу 3). Типичные концентрации $MgCl_2$ для самосборки оболочки находились в диапазоне 10-40 мМ. Самосборка оболочки была выполнена при 40°C. Время реакции варьировалось в зависимости от типа оболочки (см. Фиг. 3A). Как все субъединицы оболочки, так и скомпонованные оболочки могут храниться при комнатной температуре в течение нескольких месяцев.

3. Связывание полуоболочек с ядром ВГВ

Девять штапельных нитей на внутренней стороне треугольников были модифицированы с помощью ручек с 26 одноцепочечными основаниями на концах 5’ (последовательность: «GCAGTAGAGTAGGTAGAGATTAGGCA-олигонуклеотид», подробности конструкции см. Фиг. 40, 41, Таблица 1 и Перечень последовательностей). Треугольники были очищены и скомпонованы, как описано выше. Олигонуклеотиды, комплементарные к

ручкам-последовательностям и модифицированные тиоловой группой на конце 3’, были связаны с антителом HB-ядро 17H7, с использованием поперечного сшивателя Sulfo-SMCC (сульфосукцимидил-4-[N-малеимидометил]циклогексан-1-карбоксилат). Продукт был затем очищен с использованием *proFIRE®* (Dynamic Biosensors*)*. Антитела, модифицированные с помощью ДНК, были добавлены к скомпонованным оболочкам и инкубированы в течение ночи при 25°C. Минимальные нуклеосомы ВГВ были инкубированы измененными оболочками в течение 1-4 часов при 25°C.

4. Стабилизация октаэдрического олиголизина

Октаэдрические оболочки были скомпонованы при 35мМ $MgCl_2$ и сшиты УФ-излучением, как описано в (41), в течение 1 ч с использованием источника ксенонового света Asahi Spectra *300W MAX-303*. Оболочки были инкубированы в соотношении 0,6:1 со смесью олиголизина K10 и олиголизина K10-ПЭГ5K (1:1) в течение 1 ч при комнатной температуре, как аналогично описано в (42).

5. Внешняя модификация оболочки T=1

Треугольник T=1 и треугольный «кирпич» (Фиг. 5A) были димеризованы с использованием клейких концов однонитчатых ДНК, выступающих из треугольника T=1. Выступающие последовательности содержали три тимидина для гибкости плюс мотивы длинной последовательности из 7 оснований, которые были комплементарны непосредственно к однонитчатым доменам скаффолда «кирпича» (Фиг. 42). Реакции димеризации были проведены при комнатной температуре в течение ночи с использованием концентрации мономера 40 нМ в присутствии 11 мМ $MgCl_2$.

6. Электрофорез в геле

Распределение по размерам реакций фолдинга или сборок оболочки было исследовано с использованием электрофореза в агарозном геле. Для растворов, включающих в себя только субъединицы оболочки, были использованы 1,5% гелей агарозы, содержащих буфер 0,5xTBE (22,25 мМ трис

основания, 22,25 мМ борной кислоты, 0,5 мМ EDTA) и 5,5 мМ $MgCl_2$. Для растворов, включающих в себя олигомерные сборки, такие как оболочки, была использована концентрация агарозы 0,5%. Электрофорез в геле был выполнен в буферах 0,5xTBE с добавлением той же концентрации $MgCl_2$, что и в растворах, в которых были инкубированы оболочки. Для концентрации $MgCl_2$ более 15 мМ для охлаждения геля была использована ледяная ванна. Электрофорез в геле был выполнен в течение 1,5-2 часов при напряжении смещения 90 В. Гели агарозы были затем просканированы на лазерном сканере Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) с размером пикселей 50 мкм/пикс.

7. Негативное изображение ТЭМ

Образцы были инкубированы на покрытых углеродом сетках Cu400 ТЭМ с коллодиевым тлеющим разрядом (собственное производство) в течение от 30 до 120 с, в зависимости от структуры и концентрации $MgCl_2$. Сетки были окрашены 2% водным раствором уранилформиата, содержащим 25 мМ гидроксида натрия. Формирование изображения было выполнено с увеличениями 10000-42000x. Изображения треугольников T=3 были получены на Phillips CM100, снабженном ПЗС-камерой AMT 4Mpx. Все другие данные негативных изображений были получены на микроскопе FEI Tecnai T12, работающем при 120 кВ, с камерой Tietz TEMCAM-F416. Микрофотографии ТЭМ были пропущены через фильтр верхних частот для удаления градиентов окрашивания дальнего действия, и контраст был автоматически выровнен (Adobe Photoshop CS6). Для получения подробной информации об отдельных частицах и исследования успешной инкапсуляции, в качестве технологии визуализации было использовано негативное изображение ЭМ-томографии. Сетки были приготовлены, как описано выше, и серия наклонов была получена с увеличениями 15000-30000x с использованием FEI Tecnai 120. Стол наклоняли в положениях от -50° до 50, и микрофотографии были получены с шагом 2°.

Вся серия наклонов была затем обработана с помощью IMOD (50) с получением томограммы. Микрофотографии были совмещены друг с другом

путем расчета взаимной корреляции последовательной серии наклонов изображения. Затем генерировали томограмму с использованием обратного проецирования с фильтрацией. В фильтре Гаусса был использован порог отсечки 0,25-0,5 и спад 0,035.

8. Криоэлектронная микроскопия

Концентрации ДНК-оригами, используемые для приготовления сеток, полученных с помощью криоэлектронного микроскопа, подытожены в Таблице 3. Образцы с концентрациями более 100 нМ были нанесены на сетку C-flat толщиной 1,2/1,3 или 2/1 в тлеющем разряде 1 (Protochip). Образцы, содержащие оболочки с концентрацией мономеров менее 30 нМ, были инкубированы на сетках с тлеющим разрядом со сверхтонкой углеродной пленкой, нанесенной на кружевную углеродную пленку на медной сетке на 400 ячеек (Ted Pella). Концентрация всех одиночных треугольников была повышена более чем до 500 нМ при осаждении ПЭГ (39). Было выполнено смешивание 1 мл реакции фолдинга (концентрация мономера ~50 нМ) с 1 мл ПЭГ, центрифугирование при относительном центробежном ускорении 21000 в течение 25 мин и повторное взвешивание в 50-100 мкл 1xFoB5. Все треугольники ДНК-оригами, используемые для сборки оболочек, были очищены гелем и концентрированы путем ультрафильтрации, как описано выше, до повышения концентрации $MgCl_2$. Погружное замораживание в жидком этане было выполнено с помощью FEI Vitrobot Mark B со временем блоттинга 1,5-2 с, силой блоттинга -1 и временем стекания 0 с при 22°C и влажностью 95%. Образцы с концентрацией мономеров менее 100 нМ были инкубированы на опорном слое в течение 60-90 с перед блоттингом. Все крио-ЭМ изображения были получены с помощью электронного микроскопа Titan Krios G2, скорректированного по (Thermo Fisher), функционирующего при 300 кВ и снабженного прямым электронным детектором Falcon III 4k (Thermo Fisher). Мы использовали программное обеспечение EPU для автоматизированного приема данных для отдельных частиц (настройки микроскопа для всех отдельных комплектов данных см. в Таблице 3).

Расфокусировка для всех снимков была задана на уровне -2 мкм. Обработка изображений была выполнена сначала в RELION-2 (51), а затем в RELION-3 (52). Записанное видео было подвергнуто обработке в MotionCor2 (53) для совмещения фильмов, а также обработке в CTFFIND4,1 (54) для оценки CTF. После безэталонной двумерной классификации, наилучшие средние значения двумерного класса, судя по визуальному осмотру, были выбраны для дополнительной обработки. Подмножество этих частиц было использовано для расчета исходной модели. После одного-двух раундов трехмерной классификации, классы, показывающие наибольшее количество признаков или полностью скомпонованные оболочки, были выбраны для трехмерной автоматической обработки и последующей обработки. Для соответствующих оболочек с октаэдрической (O) или икосаэдрической (I1) симметрией были использованы последние два этапа.

ТАБЛИЦА 3: Условия формирования изображения криоэлектронным микроскопом.

Объект	Концентр. (nM)	Число частиц	Число фракций	Дозировка (e/A^2)	Размер пикселей (A/пикс.)	Разреш.результ. 3й карты (A)	Сим-метрия
Октаэдрический мономер	700	16524	5	42,57	2,28	18,69	C1
Мономер T=1	500	9496	7	51,16	2,28	20,27	C1
Мономер T=3	500	11080	7	53,17	2,28	19,09	C1
T=4_изо	500	16904	7	48,53	2,28	17,22	C1
T=4_равн	500	34288	7	48,26	2,28	21,21	C1
T=9_пент	800	25053	8	47,9	1,79	14,92	C1
T=9_гекс1	800	38498	13	36,85	1,79	12,92	C1
T=9_гекс2	800	11481	8	48	1,79	15,04	C1
Октаэдрическая оболочка (17,5 мМ)	130	3384	11	42,71	2,28	19,64	O
Оболочка T=1 (20 мМ)	110	2578	10	51,11	2,28	21	I1
Оболочка T=1 (25 мМ)	50 (кружевная угольная сетка)	720	7	31,26	2,28	22,21	I1
Оболочка T=3 (20 мМ)	20	612	-	22,96	3,71	36,15	I1
Оболочка T=4 (25 мМ)	21 (T_изо) 7 (T_равн)	255	-	25	3,71	47,87	I1

Октаэдрическая_полуоболочка (30 мМ)	180	6801	10	40,44	2,9	20,41	C4
Октаэдрическая_полуоболочка (30 мМ) + Ядро HBV	40	2707	7	44,38	2,9	23	C1
T=1 (FRET)_полуоболочка (2 треугольника, 30 мМ)	180	8725	10	40,44	2,9	15,16	C1
T=1 (FRET)_полуоболочка + Ядро HBV (2 треугольника, 30 мМ)	50	1770	7	44,79	2,9	23	C5
T=1 (FRET)_15мер оболочка (3 треугольника, 30 мМ)	210	3194	10	29,17	2,9	22,3	C5
заостренная оболочка (22,5 мМ)	150	3847	8 (dataset1) 11 (dataset 2)	25,76 (dataset1) 30,00 (dataset 2)	3,76	22	I1
треугольный «кирпич»	1000	38132	7	78,6	2,28	11,9	C1

9. Блокировка вирусов ELISA в лабораторных условиях

Различные концентрации скомпонованных полуоболочек T1 были инкубированы в течение ночи при комнатной температуре, при концентрации 2 нМ захватывающих антител, конъюгированных с олигонуклеотидами (анти-HBc 17H7, изотип IgG-2b) в FoB30-T (FoB30 + 0,05% Tween-20). На следующий день предварительно инкубированные смеси были добавлены к 5 пМ коровых частиц ВГВ и инкубированы в течение ночи при комнатной температуре с выходом 1 нМ захватывающего антитела, 2,5 пМ коровой частицы ВГВ и 0-200 пМ полуоболочек T=1. Плоскодонный прозрачный микропланшет на 96 лунок (Nunc MaxiSorp) был обработан в течение ночи при 4°C антителом против CAgHB с концентрацией 100 мкл на лунку (1 мкг/мл в ПБС). После четырехкратной промывки в ПБС-Т с концентрацией 200 мкл на лунку (ПБС + 0,05% Tween-20) поверхность лунки блокировалась за счет инкубации 5% бычим сывороточным альбумином в ПБС (200 мкл на лунку) в течение 2 часов при комнатной температуре. После четырехкратной промывки FoB30-T (200 мкл на лунку), 90 мкл предварительно инкубированных образцов были добавлены в лунки и инкубированы в течение 2 часов при комнатной температуре с последующей промывкой и последующей инкубацией в течение 1 часа антителом для обнаружения, конъюгированным пероксидазой хрена HRP (анти-CAgHB-HRP в FoB30-T) (100 мкл на лунку). После промывки в FoB30-T был добавлен 100 мкл/лунка субстрат HRP (3,3',5,5'-тетраметилбензидин, Life Technologies) (100 мкл на лунку), и образование продукта было проконтролировано в времени путем измерения оптической плотности при 650 нМ с интервалом 60 с в планшет-ридере, предварительно уравновешенном до 30°C (CLARIOstar, BMГ LABTECH). Активность HRP была рассчитана путем подгонки наклонов линейной регрессии к линейному режиму кинетических данных (обычно первые 5 мин). Эффективность блокировки вирусов была рассчитана применительно к контролю только коровых частиц ВГВ и контрольных измерений. Все эксперименты были выполнены троекратно. Антитела, используемые для

ELISA, были любезно предоставлены компанией Centro De Ingenieria Genetica y Biotecnologia de sancti spiritus (Куба).

10. Гелиевая ионная микроскопия (ГИМ)

Формирование изображения было выполнено с использованием негативно окрашенных ТЭМ-сеток, покрытых 5 нМ слоем AuPd, и устройства для ионного напыления Quorum Q150T в ORION Nanofab (Zeiss). Было использовано ускоряющее напряжение 30 кВ и ток пучка 0,3-0,4 пА. Изображения были получены в растровом режиме с помощью детектора Everhart-Thornley 2k.

11. Получение коровых частиц ВГВ

Коровые частицы вируса гепатита В генотипа D (подтип ayw2) были получены рекомбинантным образом в клетках *E. Coli* K802 и BL21 (закуплены у Латвийского биомедицинского научно-исследовательского центра, Рига, Латвия). Коротко говоря, частицы были получены путем обработки ультразвуком и осветления из бактериальных белковых экстрактов и очищены осадком сульфата аммония и последующей анионообменной и эксклюзионной хроматографии, как описано (55). Конечные препараты постоянно поддерживались при 4°C в темноте в стандартном ПБС (включающем в себя 0,05% NaN_3, 1 мМ ДТТ).

12. Получение антитела против HBc

Антитело 17H7 против ядра ВГВ (анти-HBc) (изотип IgG-2b) было получено в Главном центре моноклональных антител при Мюнхенском центре Гельмгольца в Мюнхене (HMGU). Коротко говоря, мышиные HBc-распознающие В-клетки были генерированы по общей гибридомной технологии. Мышей заражали пептидом NLEDPASRDLVVC (75-86 аминокислот ядро ВГВ). Отбирали гибридомные клоны мыши, и секретированные антитела анализировали путем иммунного окрашивания и осаждения HBcAg и ELISA для распознавания нативного антигена и путем анализа вестерн-блоттинга, предназначенного для обнаружения денатурированного антигена. Конечные препараты 17H7 очищали с помощью

стандартной аффинной хроматографии с использованием столбика А/Г белка, концентрировали до 0,8 мг/мл (5,33 мкМ) белка и выдерживали в стандартном ПБС (137 мМ NaCl, 10 мМ фосфата, 2,7 мМ KCl, pH 7,4) при 4°С, в темноте.

13. Инкапсуляция карго в оболочках Т=1

Девять штапельных нитей субъединиц оболочек Т=1 были изменены путем добавления 16 оснований на концах 5'. Эти девять измененных штапельных нитей и неизмененных штапельных нитей Т=1 подвергаются фолдингу с помощью скаффолда р8064 для получения треугольников Т=1 с девятью «ручками» оцДНК (Фиг. 50А, слева). Шестнадцати-основные ручки оцДНК располагаются на стороне оболочки, обращенной вовнутрь поверхности мономеров. Восемь из этих 9 цепей были ориентированы внутрь мономера, а следовательно, могли быть недоступны для карго. Карго одноцепочечной ДНК был получен путем прикрепления штапельных нитей к круговому скаффолду оцДНК р8064 с выступом длиной в 16 оснований, комплементарным к ручкам на субъединицах оболочки. Олиго нуклеотид, содержащий краситель CY5, также был гибридизован со скаффолдом для обеспечения считывания флуоресценции путем лазерного сканирования гелей агарозы (Фиг. 50А, середина и Фиг. 42С). Во избежание появления несвязанных штапельных нитей в растворе карго, которые могут пассивировать мономеры, 20 различных штапельных нитей смешивают со скаффолдами в соотношении 1:2. Для отжига штапельных нитей с круговой оцДНК используют буфер FOB15, с температурами порядка 65°С в течение 15 мин, при 60°С-44°С при1 ч/1°С. Для инкапсуляции наночастиц золота, ручки, комплементарные к ручкам мономера, прикрепляют к наночастицам золота с диаметром 30 нм (Cytodiagnostics, OligoREADY Gold Nanoparticle Conjugation Kit). Схема и негатив среза ТЭМ-томограммы показаны на Фиг. 50, В и С. Для повышения видимости инкапсулированной круговой оцДНК на РЭМ-изображениях наночастицы золота с диаметром 20 нм (Cytodiagnostics, OligoREADY Gold Nanoparticle Conjugation Kit) были прикреплены к скаффолду круговой оцДНК (схема и негатив ТЭМ показаны на Фиг. 50, В и С

после изображения справа). Оболочки T=1 с карго и без него были скомпонованы в буфере 1xFoB20 при 40°C в течение 3 суток. Субъединицы оболочки были очищены гелем перед сборкой. Концентрация треугольников составляла 16 нм. Концентрация карго (любого типа) составляла 0,8 нМ.

14. Связывание полуоболочек и ядра ВГВ

Антитело 17H7 против ядра ВГВ (анти-HBc) (изотип IgG-2b) было получено в Главном центре моноклональных антител при Мюнхенском центре Гельмгольца в Мюнхене (HMGU). Коротко говоря, мышиные HBc-распознающие B-клетки были генерированы по общей гибридомной технологии. Мышей заражали пептидом NLEDPASRDLVVC (75-86 аминокислот ядро ВГВ). Отбирали гибридомные клоны мыши, и секретированные антитела анализировали путем иммунного окрашивания и осаждения HBcAg и ELISA для распознавания нативного антигена и путем анализа вестерн-блоттинга, предназначенного для обнаружения денатурированного антигена. Конечные препараты 17H7 очищали с помощью стандартной аффинной хроматографии с использованием столбика A/Г белка, концентрировали до 0,8 мг/мл (5,33 мкМ) белка и выдерживали в стандартном ПБС (137 мМ NaCl, 10 мМ фосфата, 2,7 мМ KCl, pH 7,4) при 4°C, в темноте.

15. Стабилизация оболочки олиголизином

Полные октаэдрические оболочки были скомпонованы при 35 мМ $MgCl_2$ и сшиты УФ-излучением, как описано в (33), в течение 1 ч при длине волны 310 нМ, с использованием источника ксенонового света Asahi Spectra *300W MAX-303*. Оболочки были инкубированы в соотношении N:P со смесью олиголизина K10 и олиголизина K10-ПЭГ5K, равном 0,6:1, в течение 1 ч при комнатной температуре, как аналогично описано в (34). Октаэдры были инкубированы в 55% сыворотке мыши в течение 1 ч и 24 ч при 37°C. Для обеспечения формирования негативного изображения образцы были разбавлены ПБС до конечной концентрации сыворотки мыши 5% непосредственно перед нанесением на негатив сетки.

Частичные оболочки, используемые для экспериментов по

нейтрализации вируса в естественных условиях, были скомпонованы при 60 мМ $MgCl_2$ и сшиты УФ-излучением, как описано в (33), в течение 30 мин, с использованием источника ксенонового света Asahi Spectra *300W MAX-303*. Мы ввели клейкие «липкие» концы ДНК длиной в три основания на каждом стэкинг-контакте и добавили один тимидин на концах обоих олигонуклеотидов (см. Фиг. 51) для ковалентного сшивания треугольных субъединиц. Клейкие «липкие» концы ДНК были необходимы для компенсации снижения стэкинга обрубленных концов, вызванного добавлением тимидинов для точечной УФ-сварки. Оболочки были инкубированы в соотношении N:P со смесью олиголизина K10 и олиголизина K10-ПЭГ5K (1:1), равном 0,6:1, в течение 1 ч при комнатной температуре, как аналогично описано в (34). Антитела, измененные ДНК, были добавлены к скомпонованным оболочкам и инкубированы в течение ночи при комнатной температуре.

16. Клеточная культура и анализ нейтрализации

Клетки HEK293T (линия клеток эмбриональной почки человека, DSMZ) культивировали в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM, Gibco, кат. № 31966047) с помощью 10% инактивированной нагреванием эмбриональной бычьей сыворотки (ЭБС, Sigma-Aldrich, кат. № F9665). Клетки культивировали обычным образом в увлажненном инкубаторе при 37°C, с 5% CO_2. eGFP, несущие AAB2 (Biocat, кат. № AA002-GVO-GC) были использованы для эксперименты по трансдукции, где концентрация инфекционных частиц была определена титрованием в соответствии с протоколом изготовителя. Вкратце, клетки высеивали в 24-луночные планшеты при содержании 80000 клеток/мл за 16–24 ч перед трансдукцией и собирали через 72 ч после трансдукции для количественного определения эффективности трансдукции путем проточной цитометрии. Образцы были получены и проанализированы с использованием соответственно проточного цитометра AttuneTM NxT и программного обеспечения (Thermofisher). Для анализа было записано 20000 событий с отдельными клетками, которые были

гейтированы со стороны площади поверхности рассеивания в зависимости от высоты. EGFP возбуждали лазером 488 нм, и испускание было измерено с полосовым фильтром 530/30 нм. В качестве негативного контроля были использованы необработанные клетки. Концентрация инфекционных частиц была определена равной 1,23 × 109 BOE (включений, образующих единицы)/мл. Общее число вирусных частиц AAB2 было измерено с помощью ELISA в соответствии с протоколом изготовителя (Progen, кат. № PRATV) и определено равным 2,24 × 10^{12} ВЧ/мл. Для экспериментов по нейтрализации клетки культивировали, как указано выше. 48-луночные планшеты были покрыты поли-L-лизином (Sigma Aldrich кат. № P2636, 0,1 мг /мл, 10 мин инкубации при комнатной температуре), а затем дважды промыты водой, а затем в ПБС. Клетки HEK293T высеивали при содержании 80000 клеток/мл за 16–24 ч перед трансдукцией. Исходные растворы были приготовлены в течение ночи для связывания конъюгированного анти-AAB2 с полуоболочками оригами. Связывание происходило в присутствии 0,1 мг /мл бычьего сывороточного альбумина (БСА). Аналогично, конъюгированный анти-AAB2 и полуоболочки без антитела были также приготовлены аналогичным образом. На следующий день полуоболочки покрывали составом ПЭГ-олиголизин/664 олиголизин путем инкубации при комнатной температуре в течение 2 ч. Затем было приготовлено каждое из различных условий титрования и разбавлено в общей сложности 33,5 мкл на условие с использованием ПБС. Было добавлено и смешано 4 мкл разбавленного образца AAB-2 (1/100, в ПБС), и образцы были оставлены для инкубации (2 ч, комнатная температура). Клетки были промыты в ПБС и 62,5 мкл DMEM (модифицированной по способу Дульбекко среда Игла) с 2% ФБС и были добавлены к каждой лунке. Смеси (37,5 мкл) были затем добавлены покапельно к каждой лунке. Клетки были инкубированы в течение 2 ч перед добавлением 100 мкл DMEM с 18% ФБС и однократно состава антибиотик/антимикотик. Клетки были инкубированы дополнительно в течение 22 ч перед удалением среды, клетки были однократно промыты в ПБС

и 250 мкл DMEM с 10% ФБС, и один раз был добавлен состав антибиотик/антимикотик. Через 48 ч после трансдукции клетки были трипсинизированы и приготовлены для проточной цитометрии. Эффективность трансдукции была количественно определена путем проточной цитометрии, как было указано выше, а репрезентативные гейты представлены на Фиг. 52. Статистический анализ был выполнен с помощью программы Graphpad Prism (GraphPad Software Inc.). Для эпифлуоресцентной визуализации процедура была идентична тому, что было описано выше, за исключением того, что клетки высеивали в 8-камерных предметных стеклах (NuncTM Lab-TekTM, Thermofisher). Через 48 ч клетки были промывали в ПБС, а затем фиксировали с помощью 2% параформальдегида (ПФА). Клетки были промыты снова (1× ПБС), а ядра клеток были окрашены (Hoescht 3342, разбавленный в ПБС, 5 мин, комнатная температура). Клетки были промыты в ПБС, и образцы были установлены с использованием водной среды для заключения Fluoromount-G. Образцы были отображены с использованием инвертированного микроскопа Tikon Eclipse Ti2-E, с использованием объектива 10×. Изображения были собраны с использованием программного обеспечения NIS-Elements AR и обработаны с использованием программы ImageJ.

17. Анализ цитотоксичности

Цитотоксичность была количественно определена по жизнеспособности клетки после 24 или 48 ч инкубации клеток со смесями полуоболочек. Клетки HEK293T высеивали в обработанные поли-L-лизином 96-луночные планшеты при содержании 80000 клеток/мл. Клеткам давали осесть в течение ночи, среда была удалена, и клетки подвергались воздействию смесей полуоболочек в процедуре, идентичной процедуре анализа нейтрализации. Клетки были инкубированы в растворах полуоболочек в течение дополнительных 24 ч или 48 ч, и был добавлен реагент alamarBlue (Invitrogen, 10 мкл на лунку). Планшеты были смешаны и инкубированы в течение 4 ч перед считыванием на планшете-ридере (CLARIOstar). Были сняты показания оптической

плотности при 570-600 нм, в соответствии с протоколом изготовителя. Измеренные значения были нормализованы относительно контрольных лунок, которые были обработаны идентично, но введенный ПБС не содержал структур оригами. Все условия были измерены по меньшей мере трижды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. C. Gortazar et al., Crossing the interspecies barrier: opening the door to zoonotic pathogens. PLoS pathogens 10, e1004129 (2014).

2. S. S. Morse et al., Prediction and prevention of the next pandemic zoonosis. Lancet 380, 1956-1965 (2012).

3. J. J. O'Brien, D. M. Campoli-Richards, Acyclovir. An updated review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. Drugs 37, 233-309 (1989).

4. J. LaBonte, J. Lebbos, P. Kirkpatrick, Enfuvirtide. Nat Rev Drug Discov 2, 345-346 (2003).

5. W. L. Davies et al., Antiviral Activity of 1-Adamantanamine (Amantadine). Science 144, 862-863 (1964).

6. Y. K. Gupta, M. Meenu, P. Mohan, The Tamiflu fiasco and lessons learnt. Indian J Pharmacol 47, 11-16 (2015).

7. J. M. Steichen et al., A generalized HIV vaccine design strategy for priming of broadly neutralizing antibody responses. Science 366, (2019).

8. K. O. Saunders et al., Targeted selection of HIV-specific antibody mutations by engineering B cell maturation. Science 366, (2019).

9. B. K. Ganser-Pornillos, O. Pornillos, Restriction of HIV-1 and other retroviruses by TRIM5. Nat Rev Microbiol 17, 546-556 (2019).

10. K. A. Skorupka et al., Hierarchical assembly governs TRIM5alpha recognition of HIV- 1 and retroviral capsids. Sci Adv 5, eaaw3631 (2019).

11. M. Mammen, S. K. Choi, G. M. Whitesides, Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. Angew Chem Int Ed Engl 37, 2754-2794 (1998).

12. V. Cagno, E. D. Tseligka, S. T. Jones, C. Tapparel, Heparan Sulfate Proteoglycans and Viral Attachment: True Receptors or Adaptation Bias? Viruses 11, (2019).

13. F. H. Crick, J. D. Watson, Structure of small viruses. Nature 177, 473-475 (1956).

14. J. B. Bale et al., Accurate design of megadalton-scale two-component icosahedral protein complexes. Science 353, 389-394 (2016).

15. N. P. King et al., Accurate design of co-assembling multi-component protein nanomaterials. Nature 510, 103-108 (2014).

16. Y. T. Lai et al., Structure of a designed protein cage that self-assembles into a highly porous cube. Nature chemistry 6, 1065-1071 (2014).

17. G. L. Butterfield et al., Evolution of a designed protein assembly encapsulating its own RNA genome. Nature 552, 415-420 (2017).

18. R. Iinuma et al., Polyhedra self-assembled from DNA tripods and characterized with 3D DNA-PAINT. Science 344, 65-69 (2014).

19. K. F. Wagenbauer, C. Sigl, H. Dietz, Gigadalton-scale shape-programmable DNA assemblies. Nature 552, 78-83 (2017).

20. D. L. Caspar, A. Klug, Physical principles in the construction of regular viruses. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology 27, 1-24 (1962).

21. R. Twarock, A. Luque, Structural puzzles in virology solved with an overarching icosahedral design principle. Nature communications 10, 4414 (2019).

22. A. L. Llamas-Saiz et al., Structure determination of minute virus of mice. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr 53, 93-102 (1997).

23. J. A. Speir, S. Munshi, G. Wang, T. S. Baker, J. E. Johnson, Structures of the native and swollen forms of cowpea chlorotic mottle virus determined by X-ray crystallography and cryo-electron microscopy. Structure 3, 63-78 (1995).

24. P. W. K. Rothemund, Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. Nature 440, 297-302 (2006).

25. S. M. Douglas et al., Self-assembly of DNA into nanoscale three-dimensional shapes. Nature 459, 414-418 (2009).

26. C. E. Castro et al., A primer to scaffolded DNA origami. Nature methods 8, 221-229 (2011).

27. R. Veneziano et al., Designer nanoscale DNA assemblies programmed from the top down. Science 352, 1534 (2016).

28. E. Benson et al., DNA rendering of polyhedral meshes at the nanoscale. Nature 523, 441-444 (2015).

29. K. E. Dunn et al., Guiding the folding pathway of DNA origami. Nature 525, 82-86 (2015).

30. X. C. Bai, T. G. Martin, S. H. Scheres, H. Dietz, Cryo-EM structure of a 3D DNA-origami object. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 20012-20017 (2012).

31. J. J. Funke, H. Dietz, Placing molecules with Bohr radius resolution using DNA origami. Nature nanotechnology 11, 47-52 (2016).

32. R. Jungmann et al., DNA origami-based nanoribbons: assembly, length distribution, and twist. Nanotechnology 22, 275301 (2011).

33. W. Liu, H. Zhong, R. Wang, N. C. Seeman, Crystalline two-dimensional DNA-origami arrays. Angewandte Chemie 50, 264-267 (2011).

34. Y. Suzuki, M. Endo, H. Sugiyama, Lipid-bilayer-assisted two-dimensional self-assembly of DNA origami nanostructures. Nature communications 6, 8052 (2015).

35. Y. Ke et al., DNA brick crystals with prescribed depths. Nature chemistry 6, 994-1002 (2014).

36. T. Gerling, K. F. Wagenbauer, A. M. Neuner, H. Dietz, Dynamic DNA devices and assemblies formed by shape-complementary, non-base pairing 3D components. Science 347, 1446-1452 (2015).

37. S. M. Douglas et al., Rapid prototyping of 3D DNA-origami shapes with caDNAno. Nucleic acids research 37, 5001-5006 (2009).

38. C. Maffeo, J. Yoo, A. Aksimentiev, De novo reconstruction of DNA origami structures through atomistic molecular dynamics simulation. Nucleic acids research 44, 3013-3019 (2016).

39. K. F. Wagenbauer et al., How we make DNA origami. Chembiochem : a European journal of chemical biology, (2017).

40. T. Gerling, H. Dietz, Reversible Covalent Stabilization of Stacking Contacts in DNA Assemblies. Angewandte Chemie 58, 2680-2684 (2019).

41. T. Gerling, M. Kube, B. Kick, H. Dietz, Sequence-programmable covalent bonding of designed DNA assemblies. Sci Adv 4, eaau1157 (2018).

42. N. Ponnuswamy et al., Oligolysine-based coating protects DNA nanostructures from low-salt denaturation and nuclease degradation. Nature communications 8, 15654 (2017).

43. M. Langecker et al., Synthetic lipid membrane channels formed by designed DNA nanostructures. Science 338, 932-936 (2012).

44. N. Kern, D. Frenkel, Fluid-fluid coexistence in colloidal systems with short-ranged strongly directional attraction. J Chem Phys 118, 9882-9889 (2003).

45. M. F. Naso, B. Tomkowicz, W. L. Perry, 3rd, W. R. Strohl, Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. BioDrugs 31, 317-334 (2017).

46. D. Wang, P. W. L. Tai, G. Gao, Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. Nat Rev Drug Discov 18, 358-378 (2019).

47. F. Praetorius et al., Biotechnological mass production of DNA origami. Nature 552, 84-87 (2017).

48. F. A. S. Engelhardt et al., Custom-Size, Functional, and Durable DNA Origami with Design-Specific Scaffolds. ACS nano, (2019).

49. B. Kick, F. Praetorius, H. Dietz, D. Weuster-Botz, Efficient Production of Single- Stranded Phage DNA as Scaffolds for DNA Origami. Nano letters, (2015).

50. J. R. Kremer, D. N. Mastronarde, J. R. McIntosh, Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. Journal of structural biology 116, 71-76 (1996).

51. D. Kimanius, B. O. Forsberg, S. H. Scheres, E. Lindahl, Accelerated cryo-EM structure determination with parallelisation using GPUs in RELION-2. Elife 5, (2016).

52. J. Zivanov et al., New tools for automated high-resolution cryo-EM structure determination in RELION-3. Elife 7, (2018).

53. S. Q. Zheng et al., MotionCor2: anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. Nature methods 14, 331-332 (2017).

54. A. Rohou, N. Grigorieff, CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. Journal of structural biology 192, 216-221 (2015).

55. Sominskaya I, Skrastina D, Petrovskis I, Dishlers A, Berza I, et al. (2013) A VLP library of Cterminally truncated Hepatitis B core proteins: correlation of RNA encapsidation with a Th1/Th2 switch in the immune responses of mice. PLoS One 8: e75938.

56. P. S. Kwon et al., Designer DNA architecture offers precise and multivalent spatial pattern-recognition for viral sensing and inhibition. Nat. Chem. 12, 26–35 (2020).

57. H. LI et ak, Nucleic acid-based nanoengineering: novel structures for biomedical applications, INTERFACE FOCUS 1, 772-724 (2011).

58. E. Stahl, T. G. Martin, F. Praetorius, H. Dietz, Facile and scalable preparation of pure and dense DNA origami solutions. Angewandte Chemie 53, 12735-12740 (2014).

59. P. Guo et al., Rapid AAV-Neutralizing Antibody Determination with a Cell-Binding Assay. Mol Ther Methods Clin Dev 13, 40-46 (2019).

Формула изобретения

1. Наноструктура на основе макромолекулы,

где указанная наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе ДНК, образованную самособирающимися строительными блоками на основе ДНК,

где указанная наноструктура представляет собой оболочку с отверстием для доступа к полости,

в которой каждый из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК образован из матричной цепи одноцепочечных ДНК и комплекта олигонуклеотидов, комплементарных к указанной матрице одноцепочечных ДНК,

в которой каждый из указанных олигонуклеотидов комплементарен либо к одному смежному участку последовательности ДНК, либо к по меньшей мере двум несмежным участкам последовательности ДНК на у указанной матрице одноцепочечных ДНК,

в которой каждый из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК представляет собой треугольный и/или прямоугольный призмоид, предпочтительно треугольный призмоид,

и в которой к внутреннему участку полости, образованной указанной наноструктурой на основе макромолекулы, прикреплены от одного до десяти участков связывания на основе антител.

2. Наноструктура на основе макромолекулы, имеющая молекулярную массу по меньшей мере 1 миллион дальтон, заключающая в себе полость с диаметром по меньшей мере 20 нм для инкапсуляции вируса или вирусной частицы, где указанная наноструктура на основе макромолекулы предпочтительно представляет собой наноструктуру на основе ДНК.

3. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 2, в которой указанная наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе ДНК, образованную самособирающимися строительными блоками на основе ДНК, в которой каждый из упомянутых самособирающихся

строительных блоков на основе ДНК предпочтительно образован из матричной цепи одноцепочечных ДНК и комплекта олигонуклеотидов, комплементарных к указанной матрице одноцепочечных ДНК, где каждый из указанных олигонуклеотидов комплементарен либо к одному смежному участку последовательности ДНК, либо к по меньшей мере двум несмежным участкам последовательности ДНК на указанной матрице одноцепочечных ДНК.

4. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 2 или п. 3, которая имеет закрытую трехмерную геометрическую форму, предпочтительно закрытую трехмерную геометрическую форму, выбранную из сферы, сфероцилиндра и полиэдра, предпочтительно тетраэдра, октаэдра или икосаэдра, и которая образована на месте в присутствии указанного подлежащего инкапсуляции вируса или вирусной частицы, предпочтительно из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

5. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 2 или п. 3, которая представляет собой оболочку с отверстием для доступа к указанной полости.

6. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 2 или п. 3, которая представляет собой комбинацию первой и второй оболочки с отверстием для доступа соответственно к первой и ко второй внутренней полости, в которой указанная первая и указанная вторая внутренняя полость вместе образуют указанную полость, где указанная первая и указанная вторая оболочка предпочтительно соединены по меньшей мере одним линкером.

7. Наноструктура на основе макромолекулы по любому из п.п. 2-6, которая имеет в основе икосаэдрическую структуру.

8. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 7, в которой указанная наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе ДНК, образованную самособирающимися строительными блоками на основе ДНК, где каждый из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК представляет собой треугольный и/или прямоугольный призмоид, предпочтительно треугольный призмоид.

9. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 1 или п. 8,

в которой каждый указанный треугольный и/или прямоугольный призмоид образован из m треугольных или, соответственно, прямоугольных плоскостей, где m представляет собой целое число, независимо выбранное из 4, 5, 6, 7 и 8, предпочтительно независимо выбранное из 5, 6 и 7, более предпочтительно указанное целое число представляет собой 6,

где три или, соответственно, четыре кромки каждой из упомянутых m плоскостей образованы n параллельными участками двойных спиралей ДНК, причем n представляет собой целое число, независимо выбранное из 1, 2, 3, 4, 5 и 6, предпочтительно независимо выбранное из 2, 3, 4 и 5, более предпочтительно независимо выбранное из 3 и 4,

где каждая плоскость соединена с плоскостью выше и/или за упомянутой плоскостью (i) за счет стэкинг-взаимодействий между двойными спиралями ДНК, образующими указанные плоскости, и (ii) частично участками ДНК в указанной матрице одноцепочечных ДНК и/или указанных олигонуклеотидов, образующих указанный строительный блок на основе ДНК, образующий перемычку между по меньшей мере двумя из указанных плоскостей, и

в которой по меньшей мере два из трех или, соответственно, четырех боковых трапецоидов содержат специфический рисунок углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

10. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 9, в которой по меньшей мере для части указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК длина по меньшей мере одной кромки каждой из указанных m плоскостей снижается от первой к m-ой плоскости, так что между плоскостями, перпендикулярными к указанной первой плоскости, и каждой из трапециевидных плоскостей, образованных указанными m кромками, возникают углы скоса.

11. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 9 или п. 10, содержащая по меньшей мере один комплект самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, в которой все три или, соответственно, четыре боковых трапецоида содержат специфический рисунок углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

12. Наноструктура на основе макромолекулы по п. 9 или п. 10, в которой боковые трапецоиды самособирающихся строительных блоков на основе ДНК, образующих обод указанной оболочки или, соответственно, указанной первой и второй оболочки, не содержат специфического рисунка углублений и/или выступов, образованных отсутствующими или дополнительными участками двойной спирали ДНК, для специфического взаимодействия с комплементарным рисунком на боковом трапецоиде другого из указанных самособирающихся строительных блоков на основе ДНК.

13. Наноструктура на основе макромолекулы по любому из п.п. 1-12, в которой указанная наноструктура на основе макромолекулы представляет собой наноструктуру на основе ДНК, которая представляет собой оболочку, выбранную из:

(a) полуоктаэдра, который состоит из комплекта по четыре копии треугольной усеченной пирамиды, где стэкинг-контакты комплементарной пары оснований на одной из треугольных кромок треугольной усеченной пирамиды инактивированы либо путем укорочения цепи, либо путем добавления неспаренных тимидинов;

(b) половину оболочки T=1, которая состоит из двух комплектов в каждом случае по пять копий двух различных треугольных усеченных пирамид, причем пять копий первого комплекта образуют закрытый пентамер, а пять копий второго комплекта закреплены на кромках указанного пентамера; и

(c) оболочка-«ловушка» T=1 с отсутствующей вершиной пятиугольника, которая состоит из трех комплектов в каждом случае по пять копий трех различных треугольных усеченных пирамид, причем пять копий первого комплекта образуют закрытый пентамер, пять копий второго комплекта закреплены на кромках указанного пентамера, пять копий второго комплекта закреплены на кромках указанного пентамера, а пять копий третьего комплекта закреплены в зазорах между пятью копиями указанного второго комплекта.

14. Наноструктура на основе макромолекулы по любому из п.п. 8-13, дополнительно содержащая:

(a) один или более типов конструкций «кирпичей» ДНК, где каждый тип таких конструкций «кирпичей» ДНК характеризуется одним или более сайтами взаимодействия для специфического взаимодействия за счет стэкинг-контактов типа «кромка к кромке» с одним или более комплементарными сайтами взаимодействия, присутствующими на плоскости треугольной или прямоугольной усеченной пирамиды, на внешней поверхности указанной наноструктуры на основе ДНК, причем упомянутые конструкции «кирпичей» ДНК покрывают свободное пространство между тремя или, соответственно, четырьмя кромками указанной плоскости;

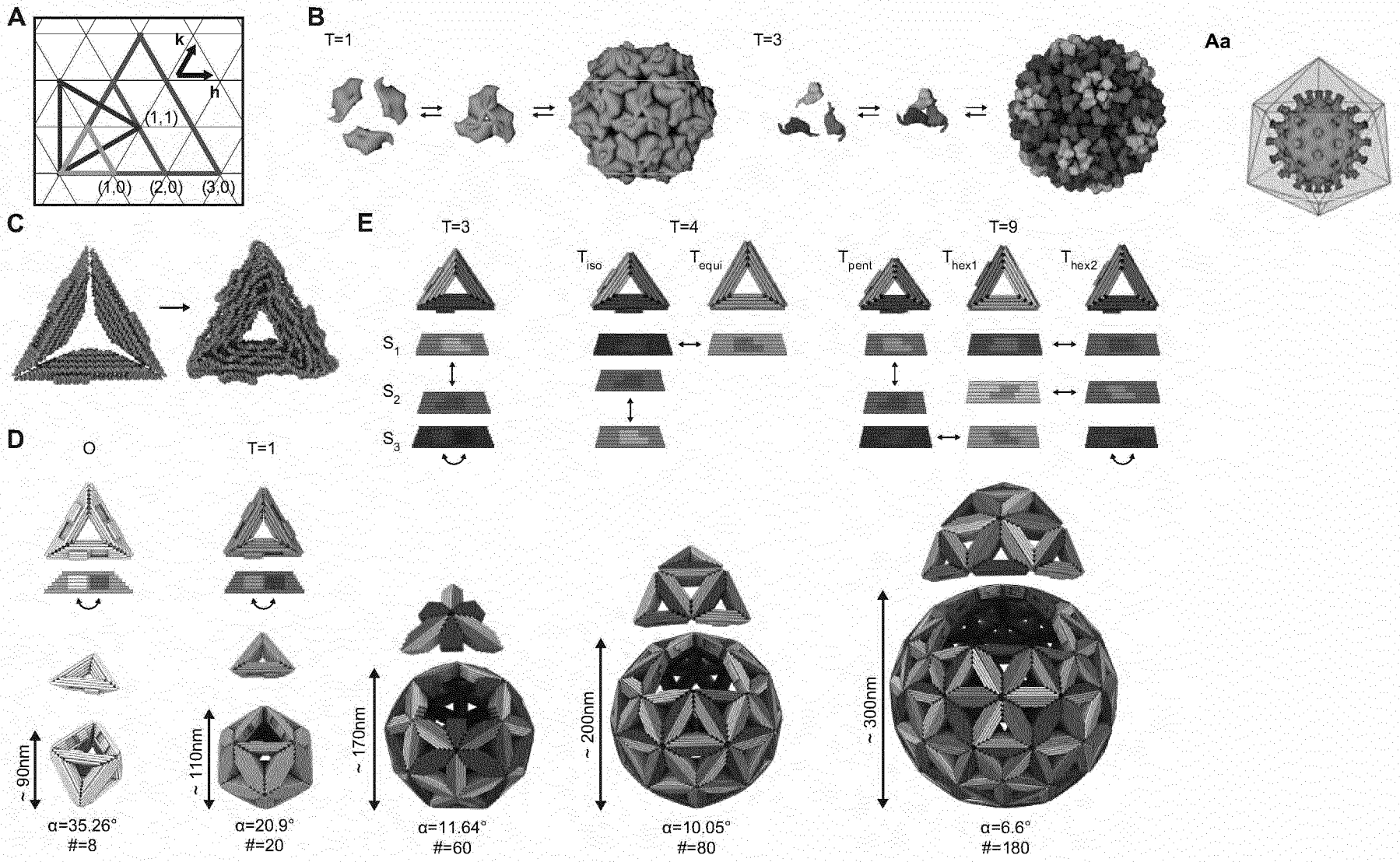
(b) одну или более поперечных связей в одном из упомянутых треугольных или прямоугольных призмоидов, и/или между двумя указанными треугольными и/или прямоугольными призмоидами; и/или

(c) по меньшей мере один фрагмент, специфически взаимодействующий с указанным вирусом или вирусной частицей.

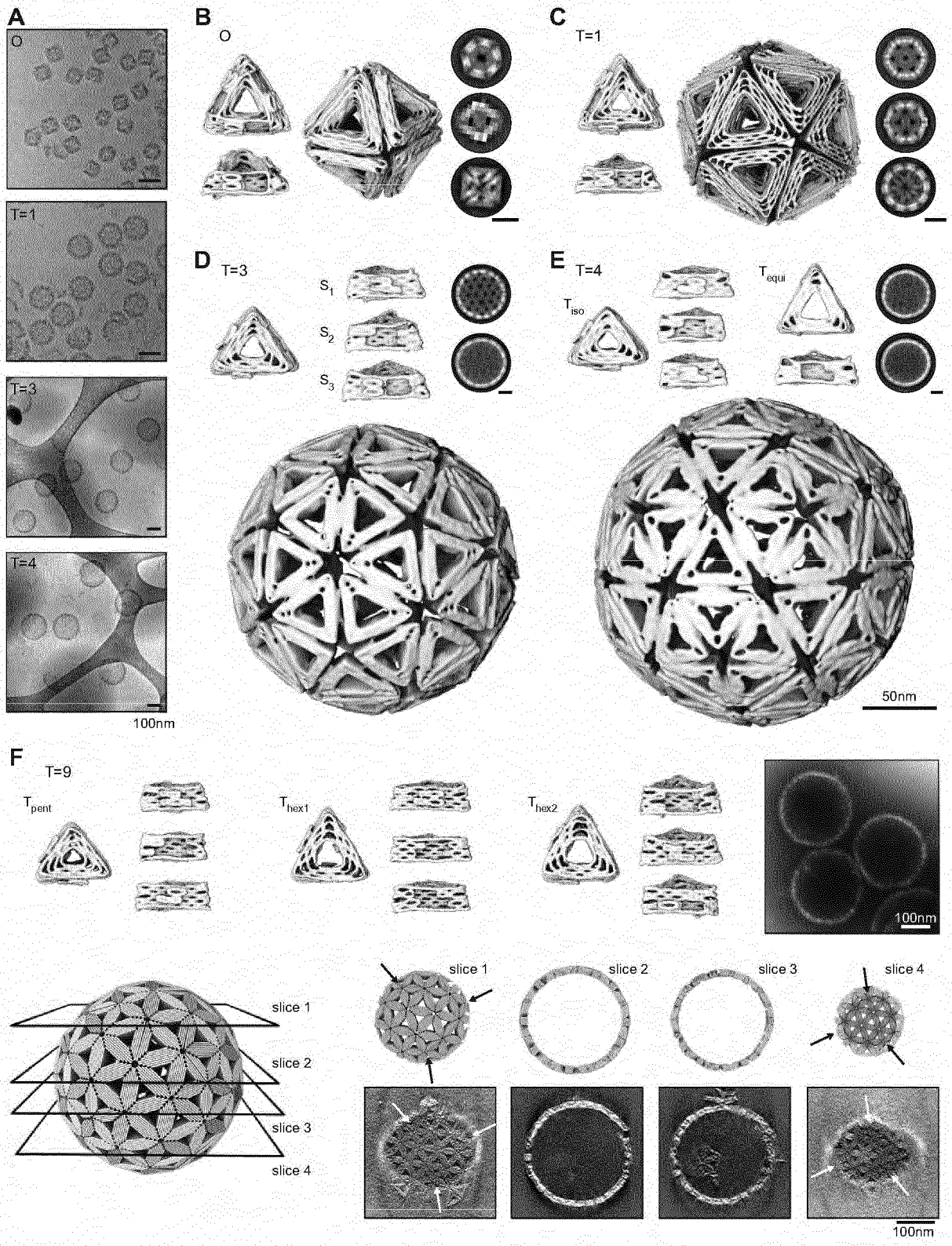
15. Композиция, содержащая вирус или вирусную частицу, инкапсулированную макромолекулой по любому из п.п. 1-14.

16. Способ инкапсуляции вируса или вирусной частицы, содержащий этапы: обеспечения наноструктуры на основе макромолекулы по любому из п.п. 1-14 и приведения упомянутой наноструктуры на основе макромолекулы в контакт

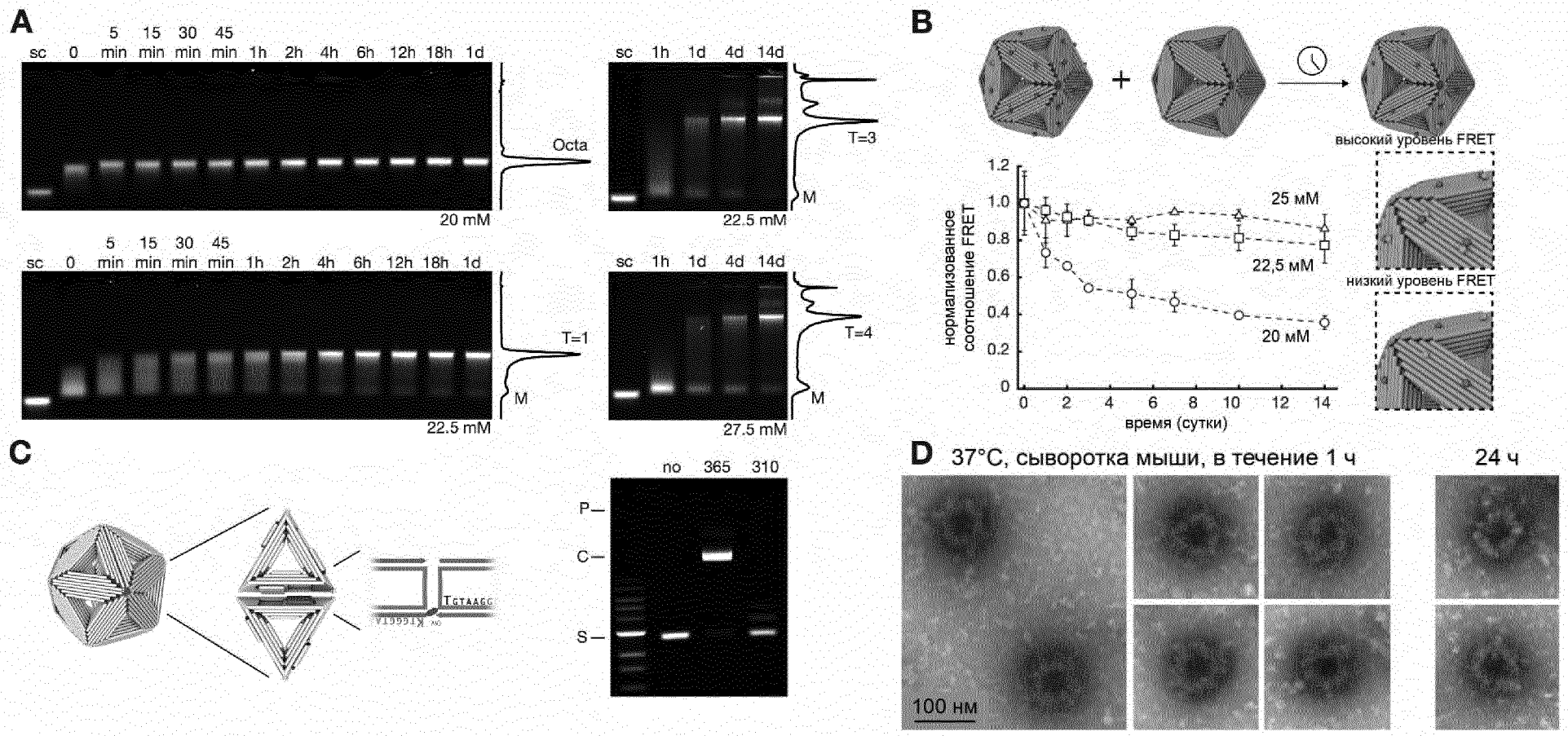
со средой, содержащей или предположительно содержащей указанный вирус или вирусную частицу.


A
k
h
(1,1)
(1,0)
(2,0)
(3,0)
B
T=1
T=3
Aa
C
E
T=3
T=4
T=9
T iso
T equi
T pent
T hex1
T hex2
S 1
S 2
S 3
D
O
T=1
~ 90nm
~ 110nm
~ 170nm
~ 200nm
~ 300nm
α=35.26°
#=8
α=20.9°
#=20
α=11.64°
#=60
α=10.05°
#=80
α=6.6°
#=180

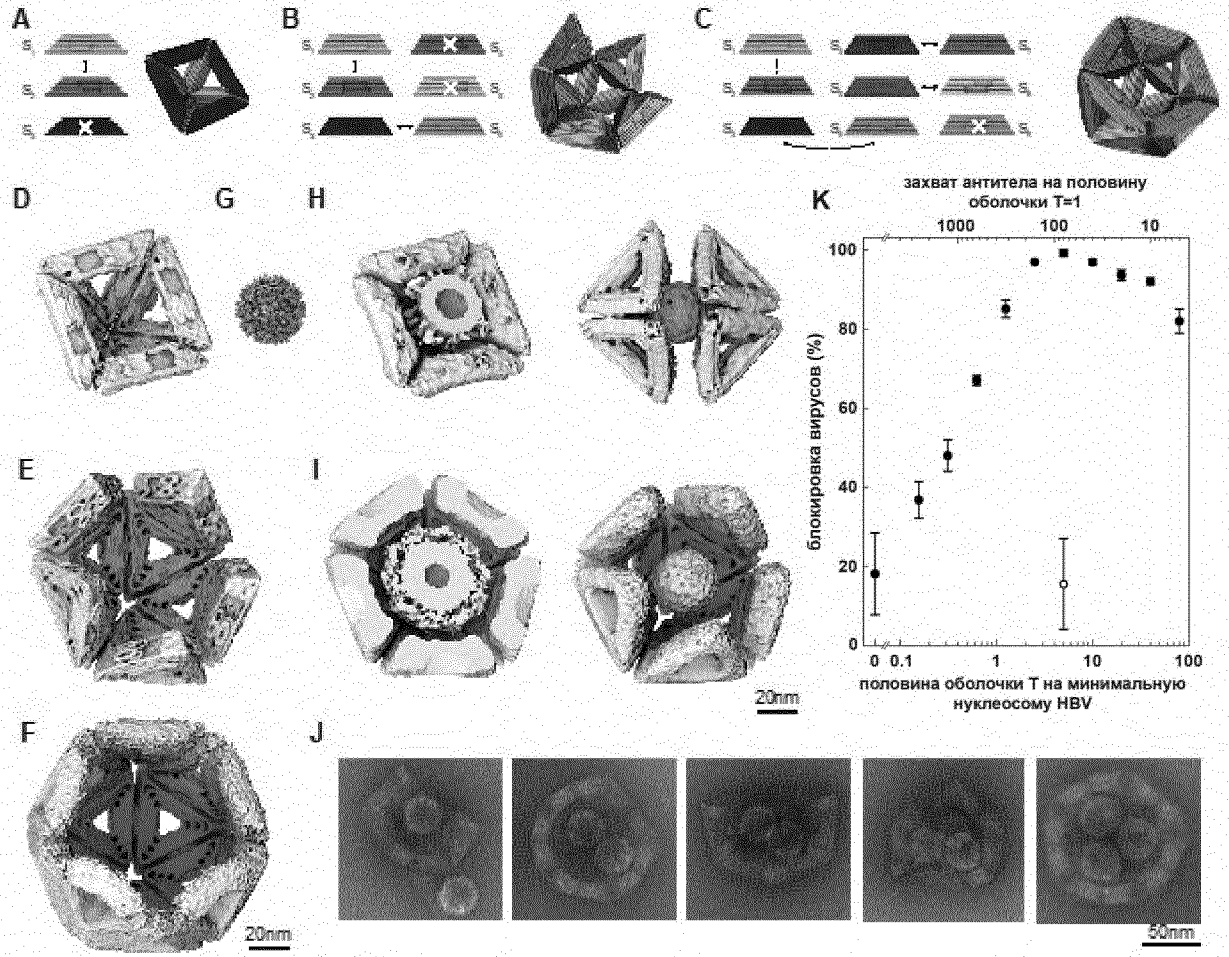
Фиг. 1


A
O
T=1
T=3
T=4
100nm
B
O
C
T=1
D
T=3
S1
S2
S3
E
T=4
Tiso
Tequi
50nm
F
T=9
Tpent
Thex1
Thex2
100nm
slice 1
slice 2
slice 3
slice 4
100nm

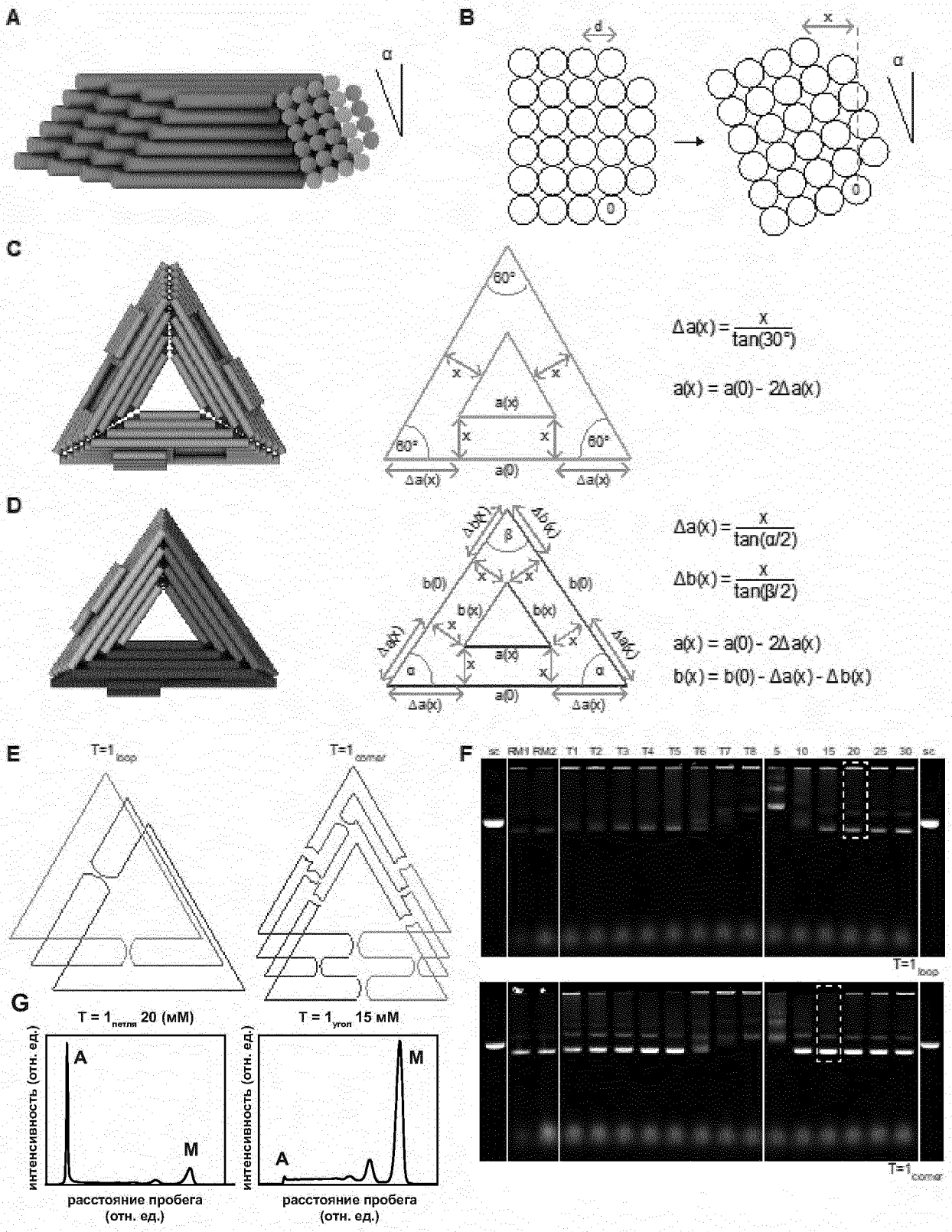
Фиг. 2


A
sc 0 5 min 15 min 30 min 45 min 1h 2h 4h 6h 12h 18h 1d
Octa
20 mM
sc 1h 1d 4d 14d
T=3
M
22.5 mM
T=1
T=4
27.5 mM
B
высокий уровень FRET
низкий уровень FRET
нормализованное соотношение FRET
25 мМ
22,5 мМ
20 мМ
время (сутки)
C
no 365 310
P
C
S
D
37°C, сыворотка мыши, в течение 1 ч
24 ч
100 нм

Фиг. 3

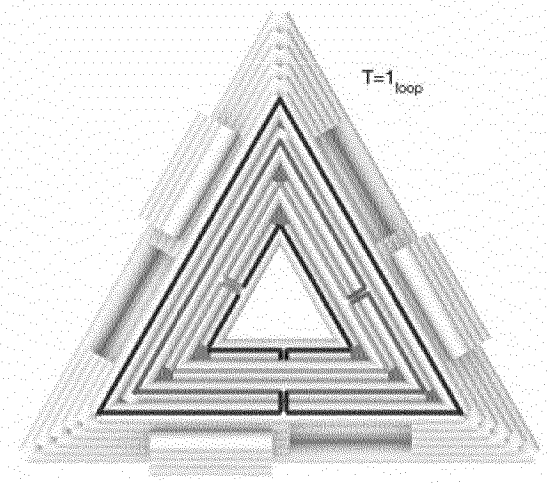

A
B
C
D
G
H
K
захват антитела на половину оболочки T=1
1000
100
10
100
80
60
40
20
0
блокировка вирусов (%)
0
0.1
1
10
100
половина оболочки T на минимальную нуклеосому HBV
E
I
20nm
F
J
20nm
50nm

Фиг. 4

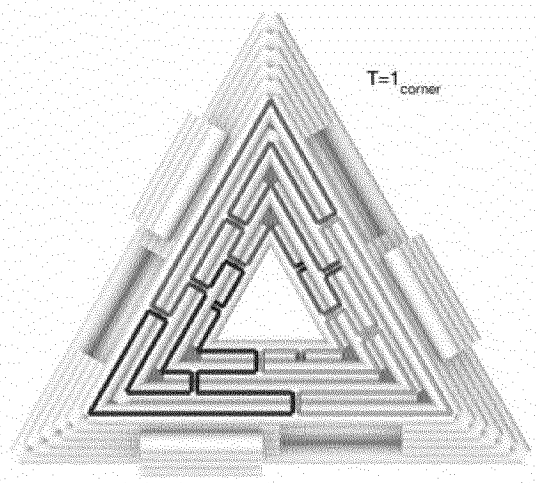

A
α
B
d
x
α
0
0
C
60°
x
x
a(x)
x
x
60°
60°
Δa(x)
a(0)
Δa(x)
Δa(x) = x / tan(30°)
a(x) = a(0) - 2Δa(x)
D
Δb(x)
β
Δb(x)
b(0)
x
x
b(0)
b(x)
b(x)
Δa(x)
x
x
Δa(x)
a(x)
α
x
x
α
Δa(x)
a(0)
Δa(x)
Δa(x) = x / tan(α/2)
Δb(x) = x / tan(β/2)
a(x) = a(0) - 2Δa(x)
b(x) = b(0) - Δa(x) - Δb(x)
E
T=1loop
T=1corner
F
sc RM1 RM2 T1 T2 T3 T4 T5 T6 T7 T8 5 10 15 20 25 30 sc
T=1loop
T=1corner
G
T = 1петля 20 (мМ)
T = 1угол 15 мМ
интенсивность (отн. ед.)
A
M
расстояние пробега (отн. ед.)
интенсивность (отн. ед.)
M
A
расстояние пробега (отн. ед.)

Фиг. 5

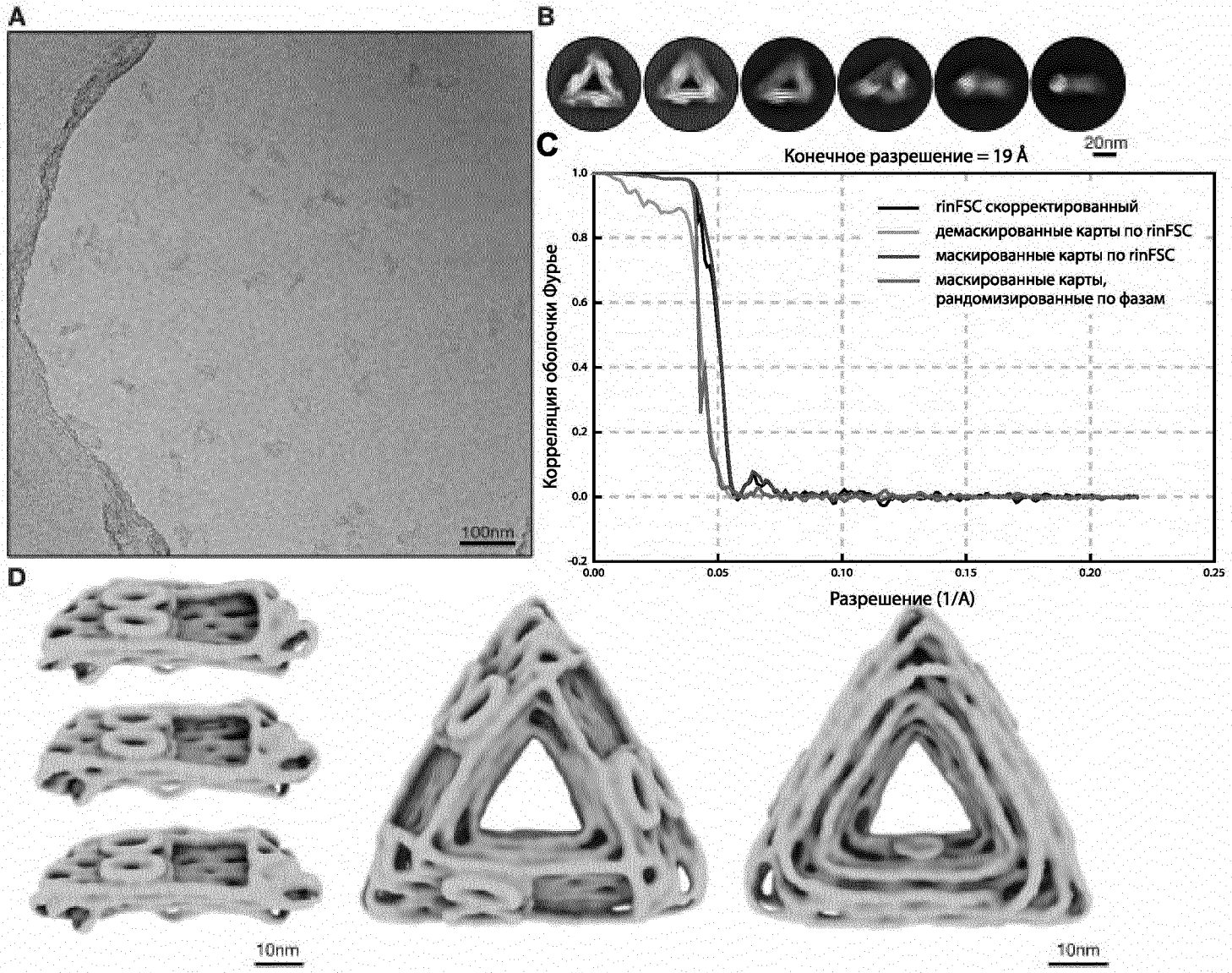
H



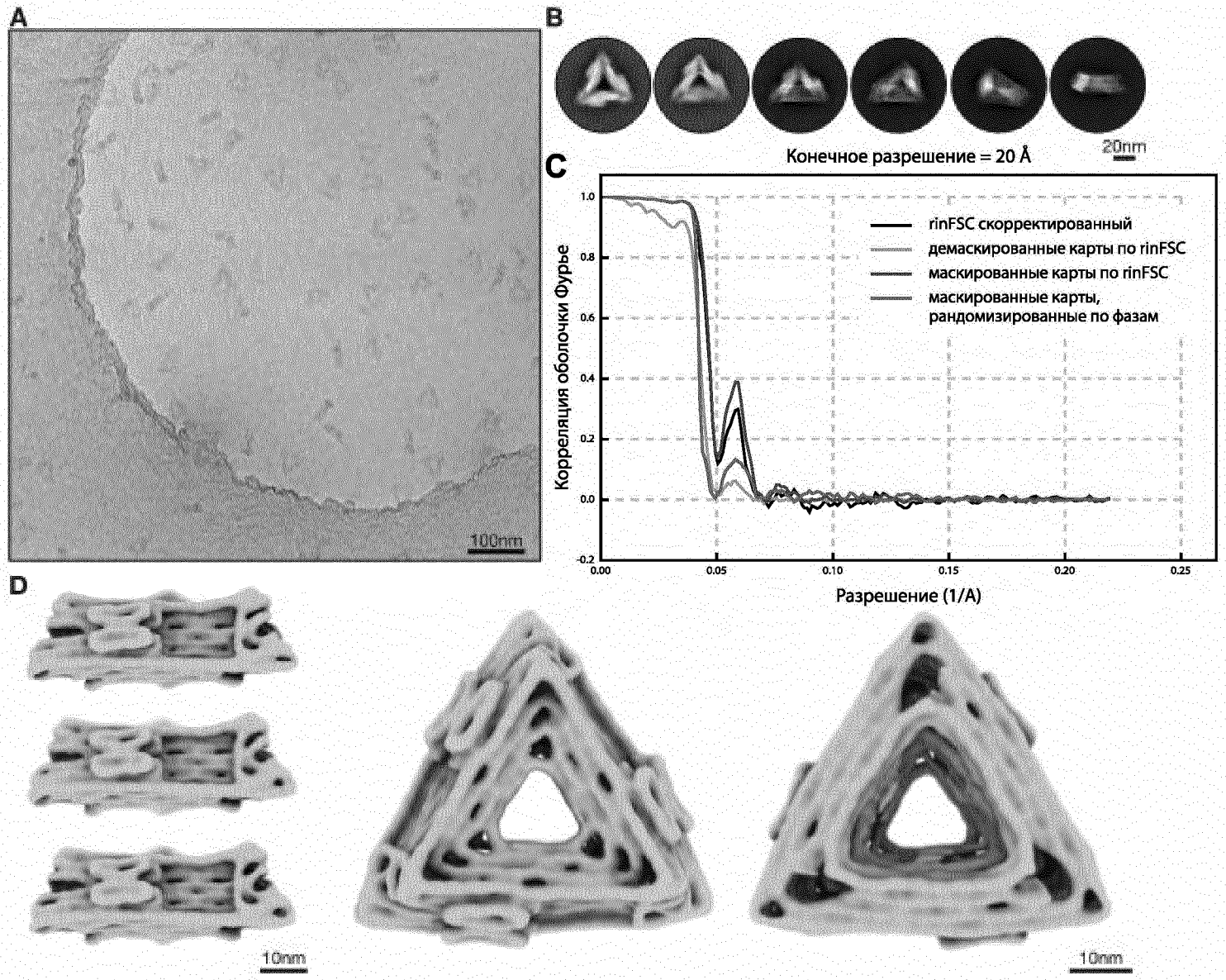
I



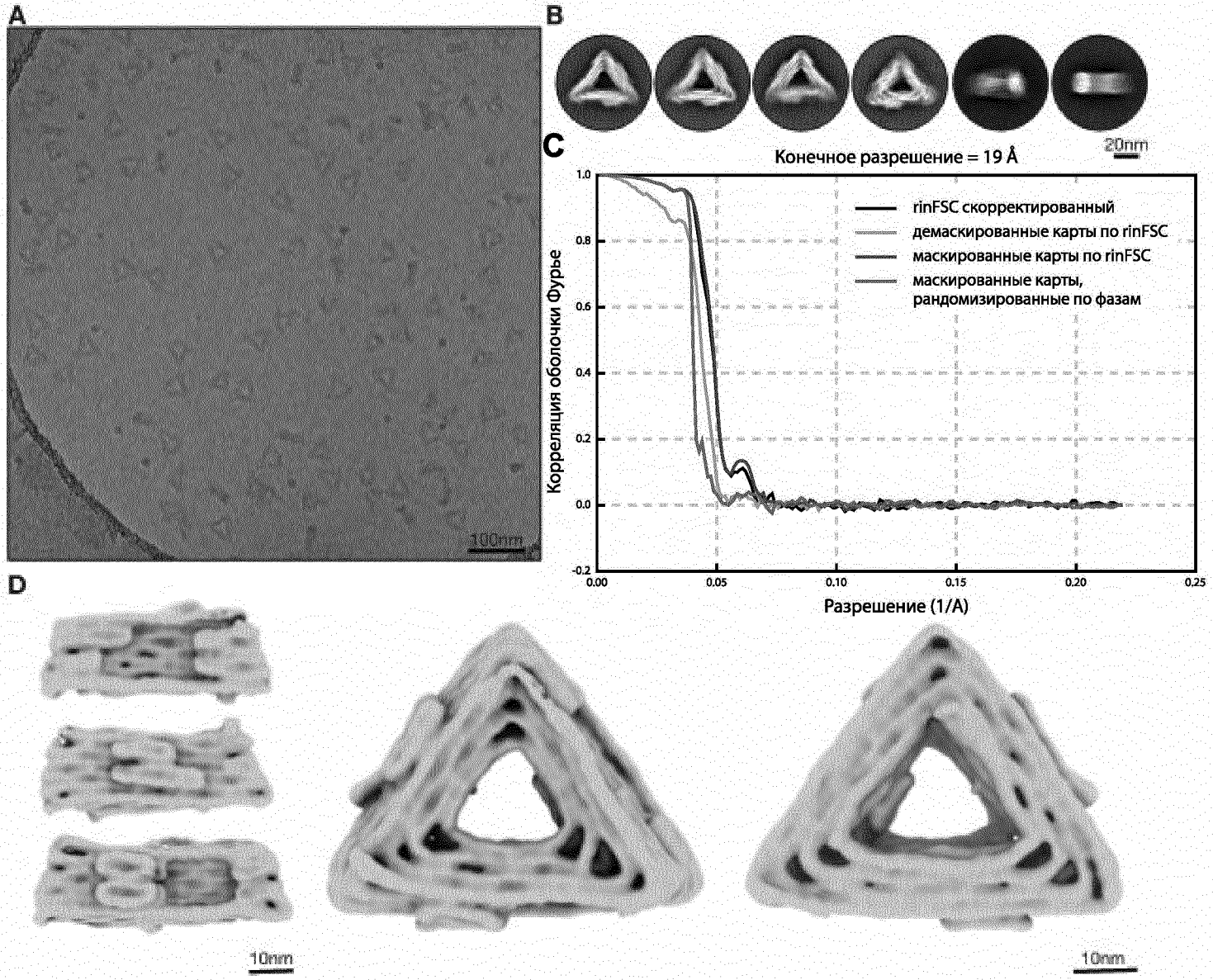
Фиг. 5 (продолжение)


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 19 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
D
10nm
10nm

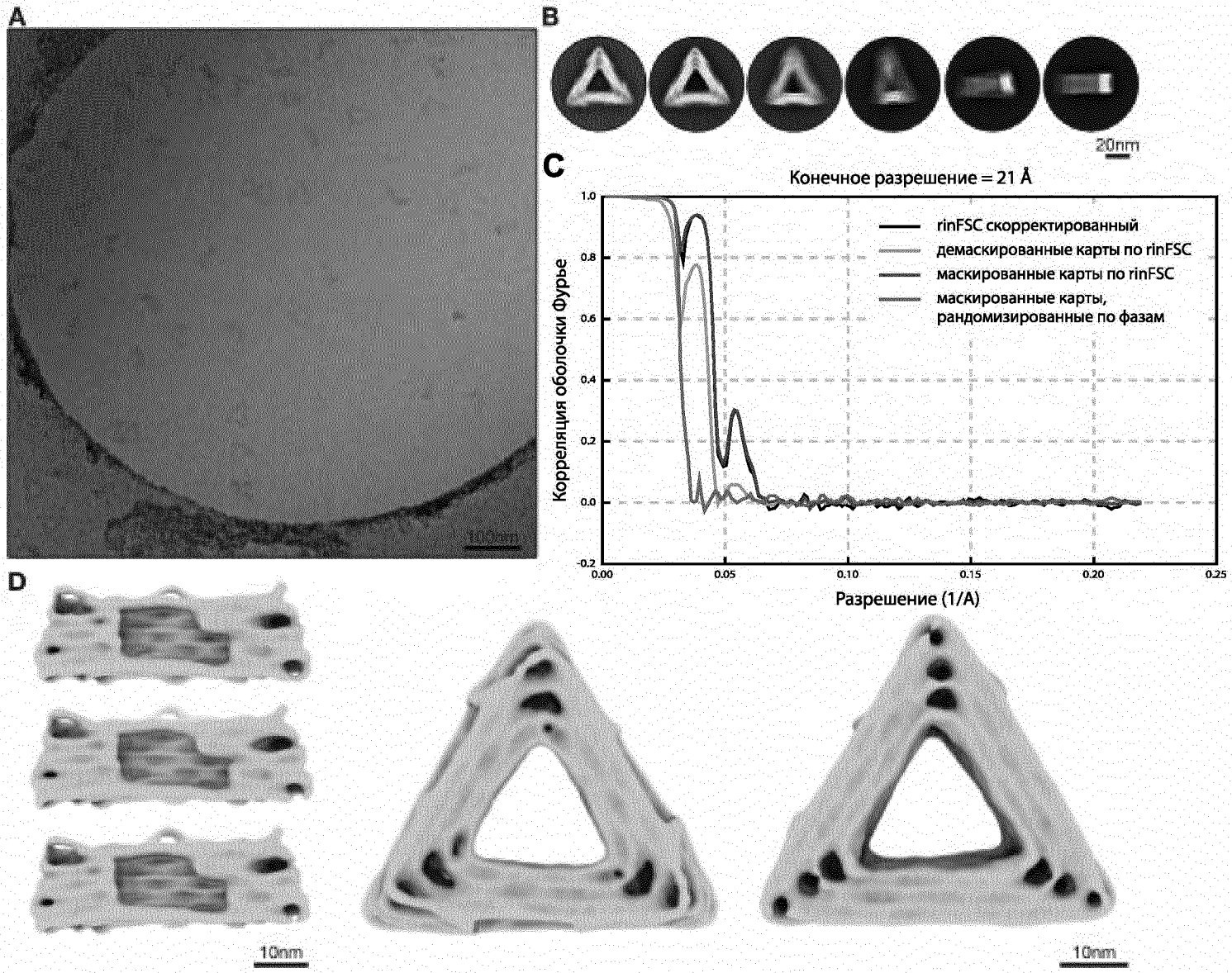
Фиг. 6


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 20 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
D
10nm
10nm

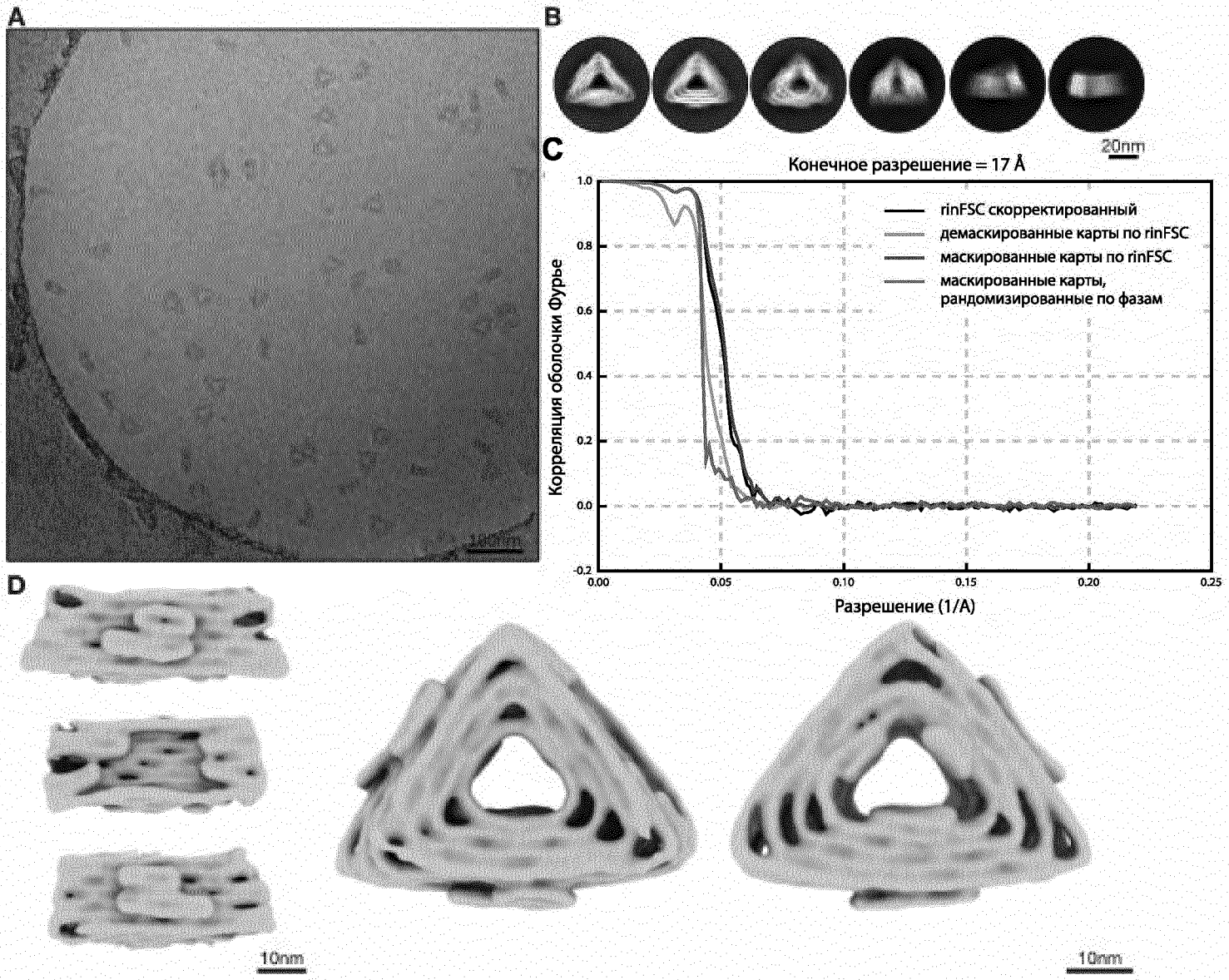
Фиг. 7


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 19 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
D
10nm
10nm

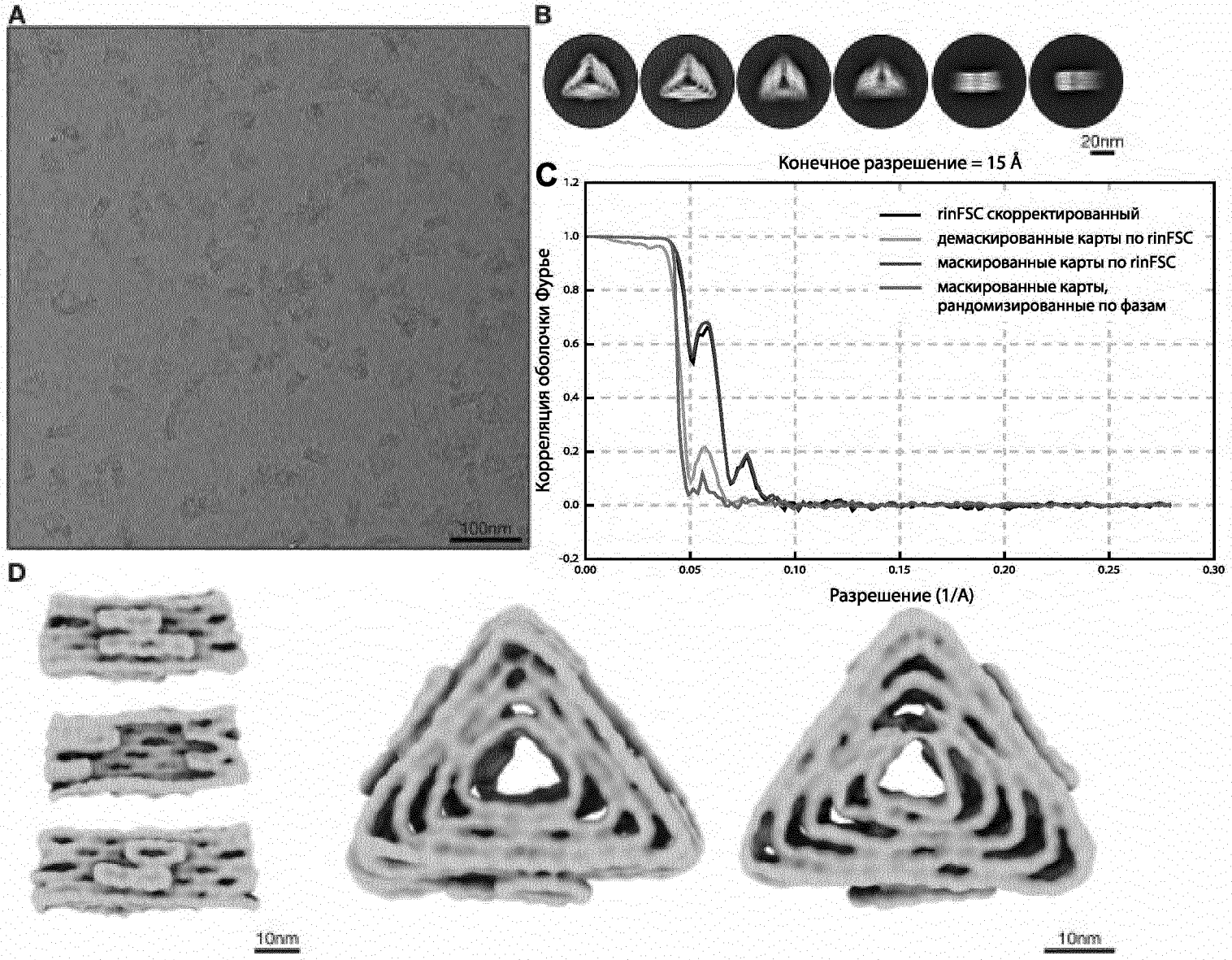
Фиг. 8


A
B
20nm
C
Конечное разрешение = 21 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
D
10nm
10nm

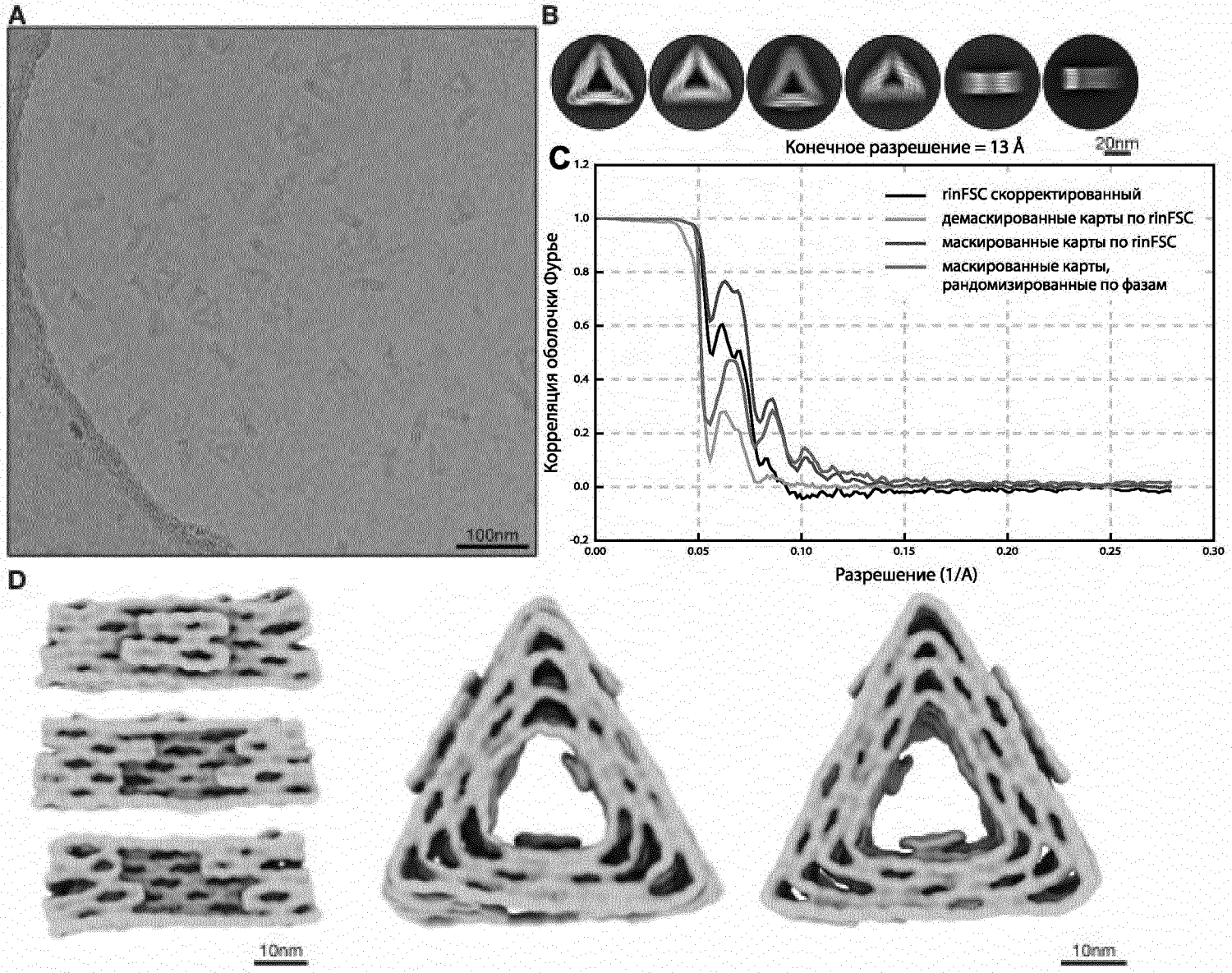
Фиг. 9


A
B
20nm
C
Конечное разрешение = 17 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
D
10nm
10nm

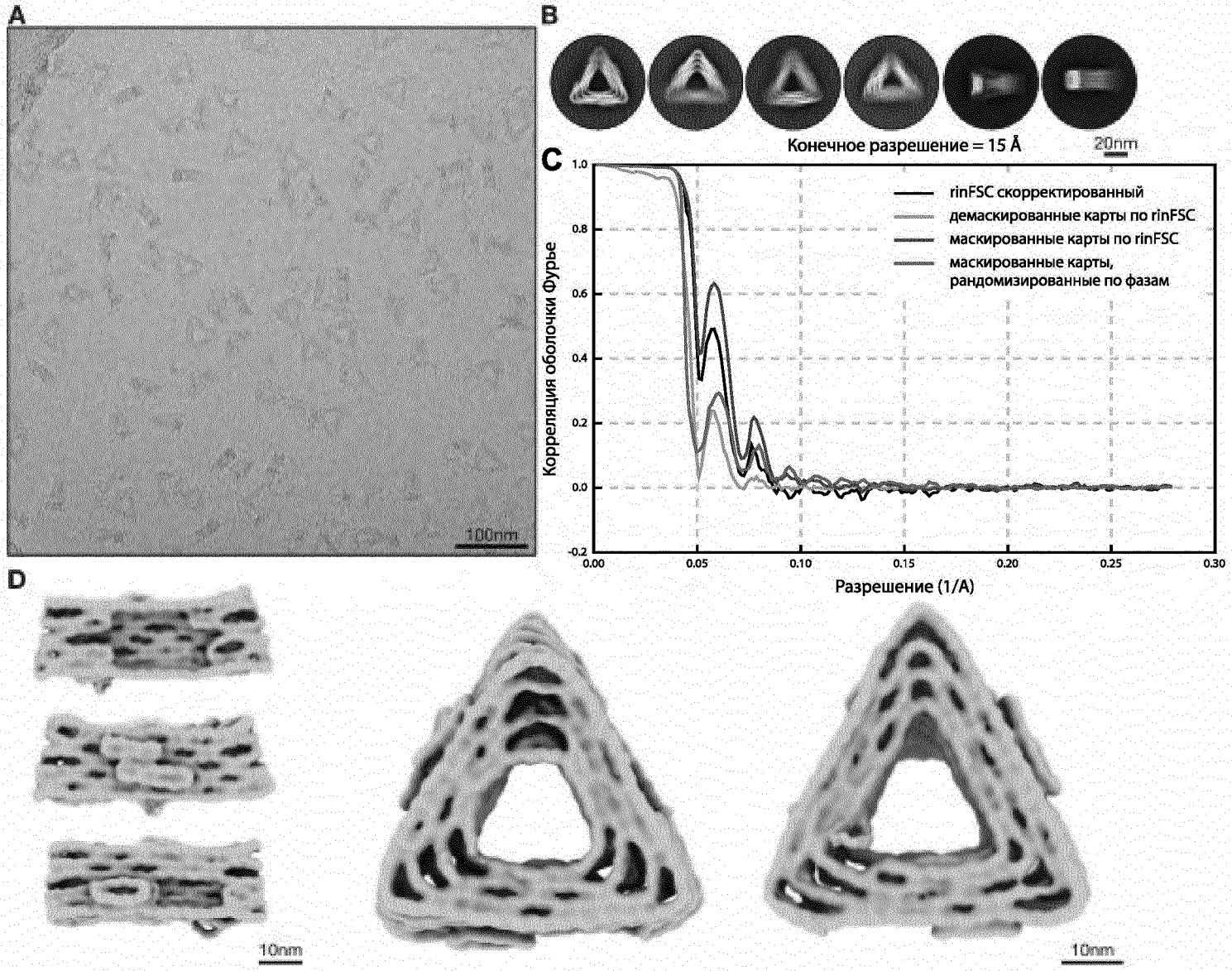
Фиг. 10


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 15 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
D
10nm
10nm

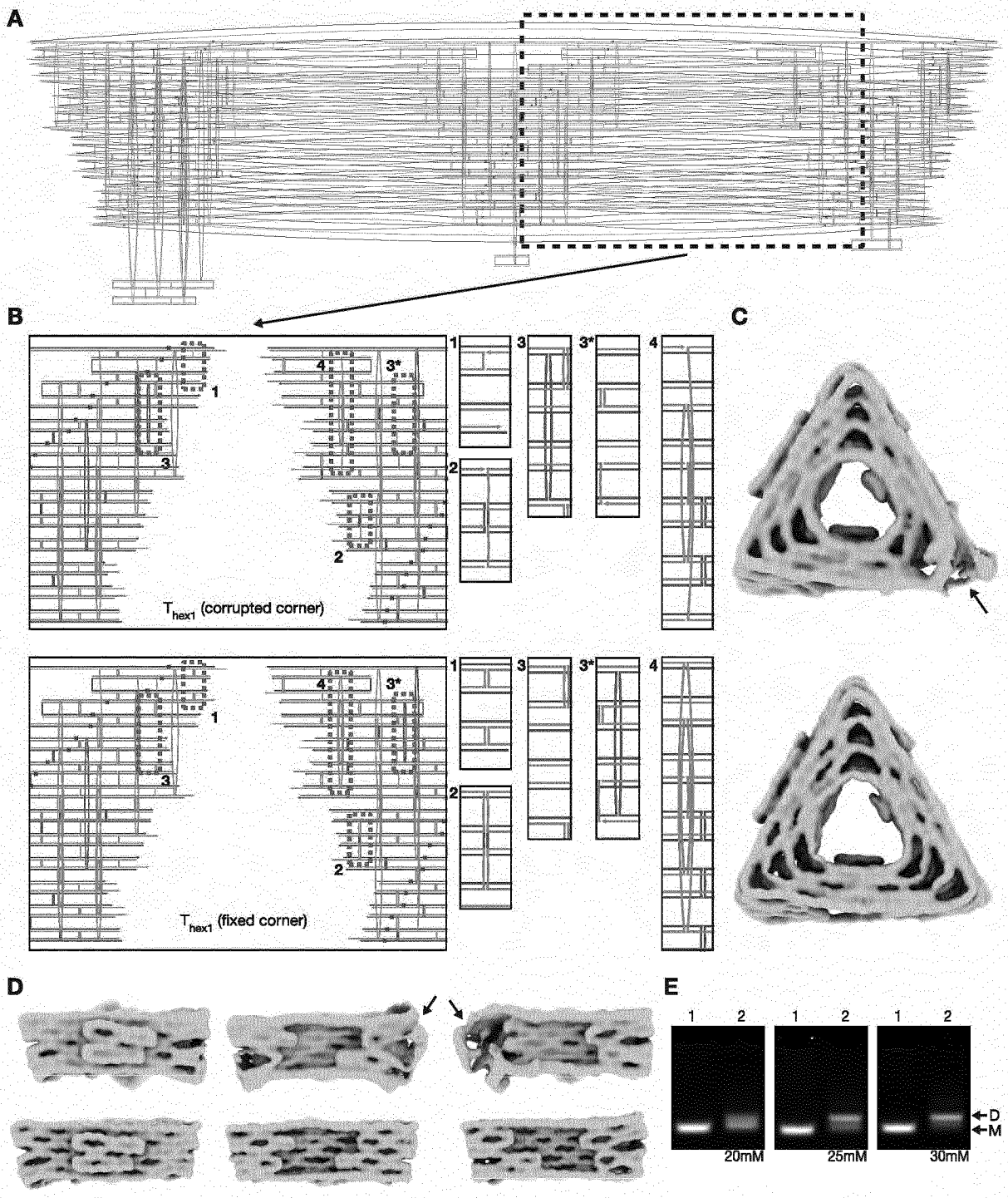
Фиг. 11


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 13 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
D
10nm
10nm

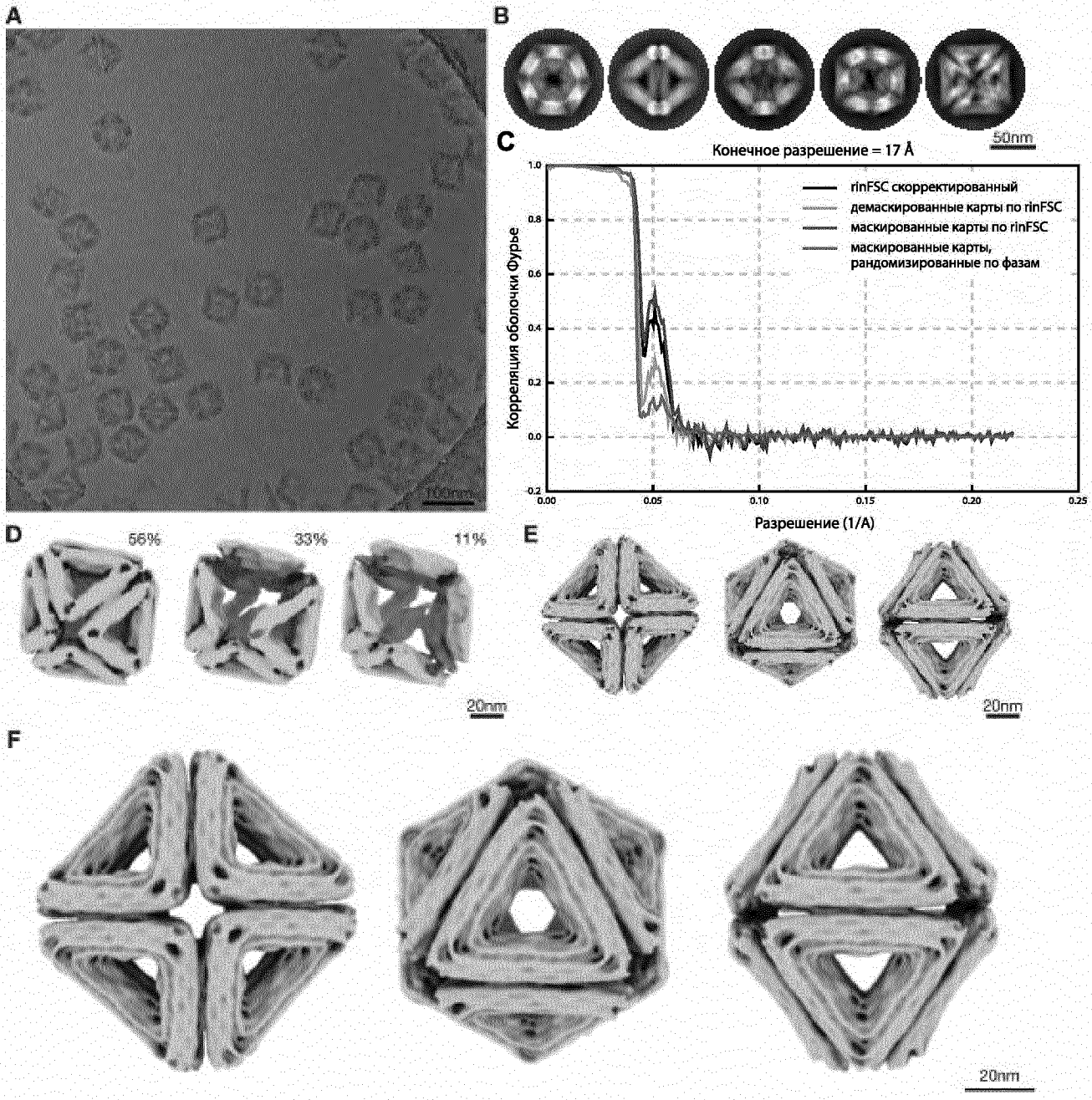
Фиг. 12


A
100nm
B
Конечное разрешение = 15 Å
20nm
C
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
D
10nm
10nm

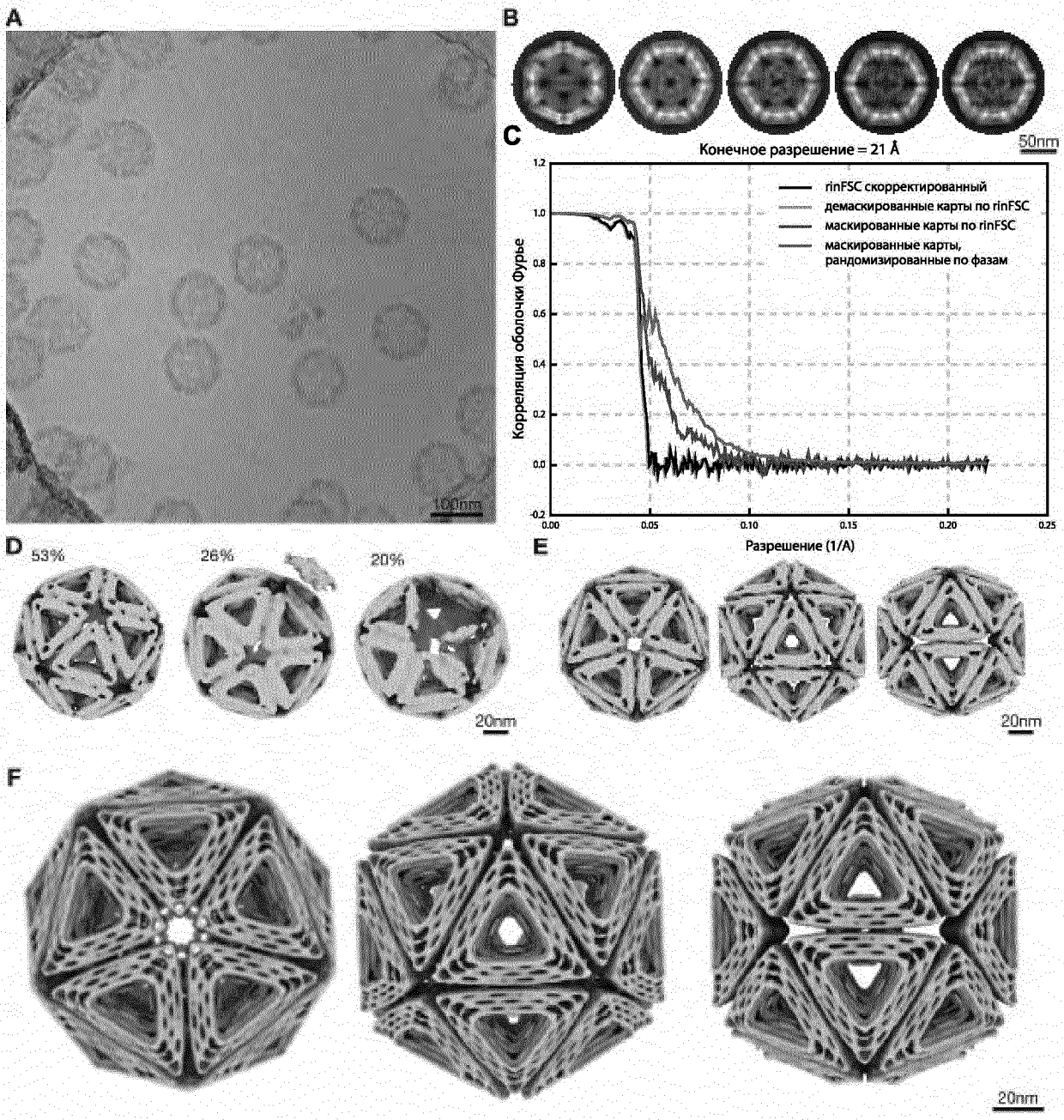
Фиг. 13


A
B
C
1
2
3
3*
4
T_{hex1} (corrupted corner)
T_{hex1} (fixed corner)
D
E
1
2
D
M
20mM
25mM
30mM

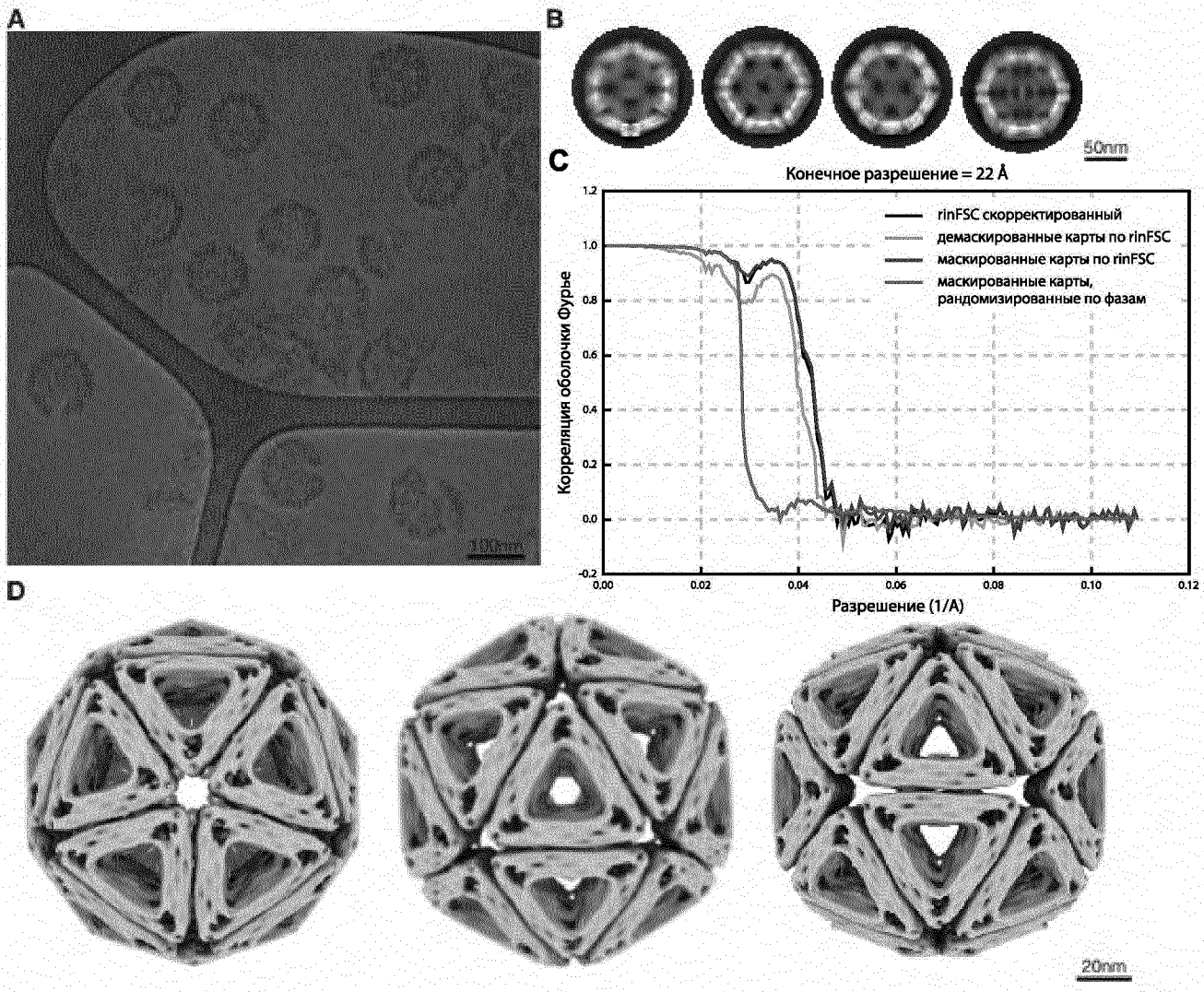
Фиг. 14


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 17 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
56%
33%
11%
20nm
E
20nm
F
20nm

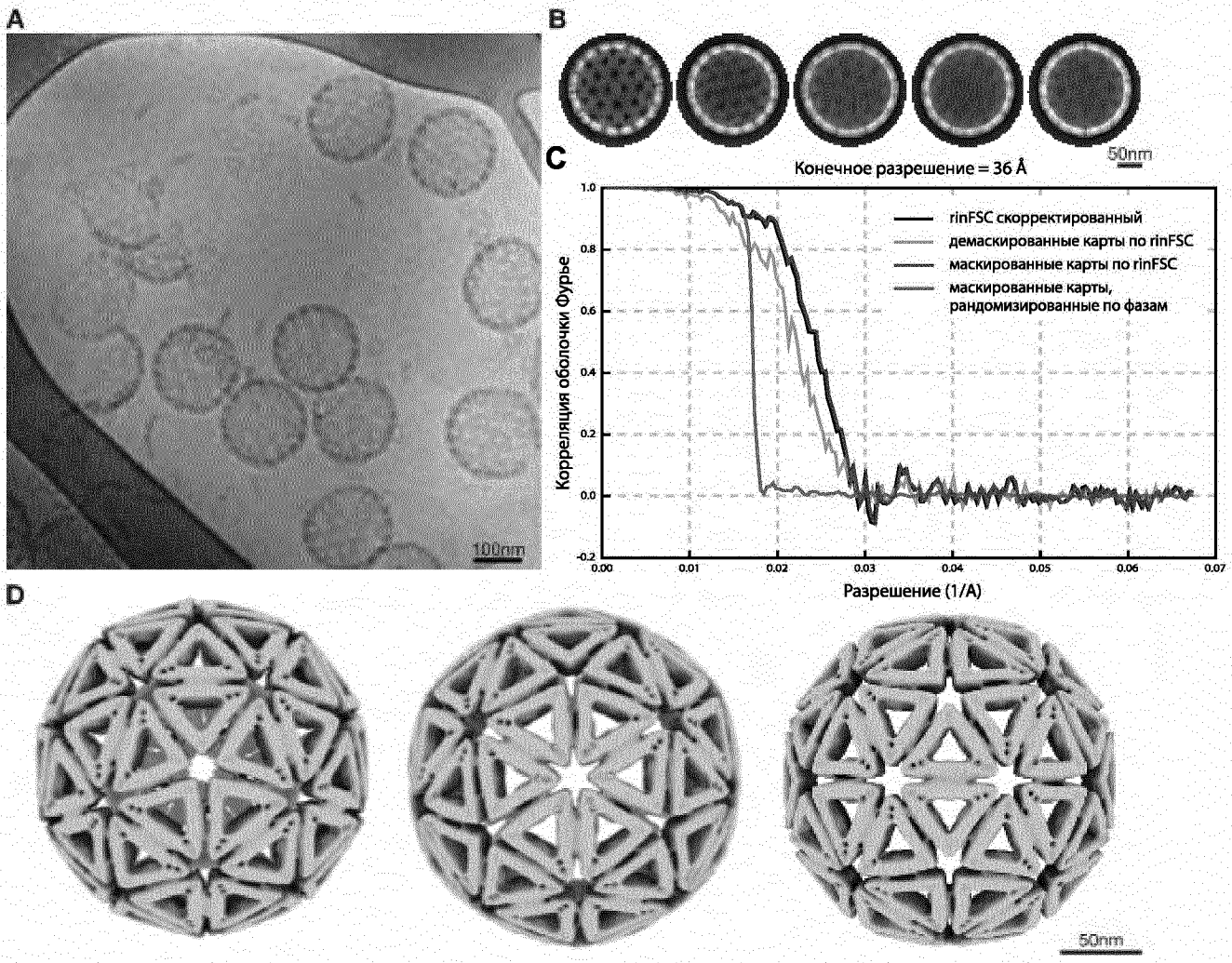
Фиг. 15


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 21 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
53%
26%
20%
20nm
E
20nm
F
20nm

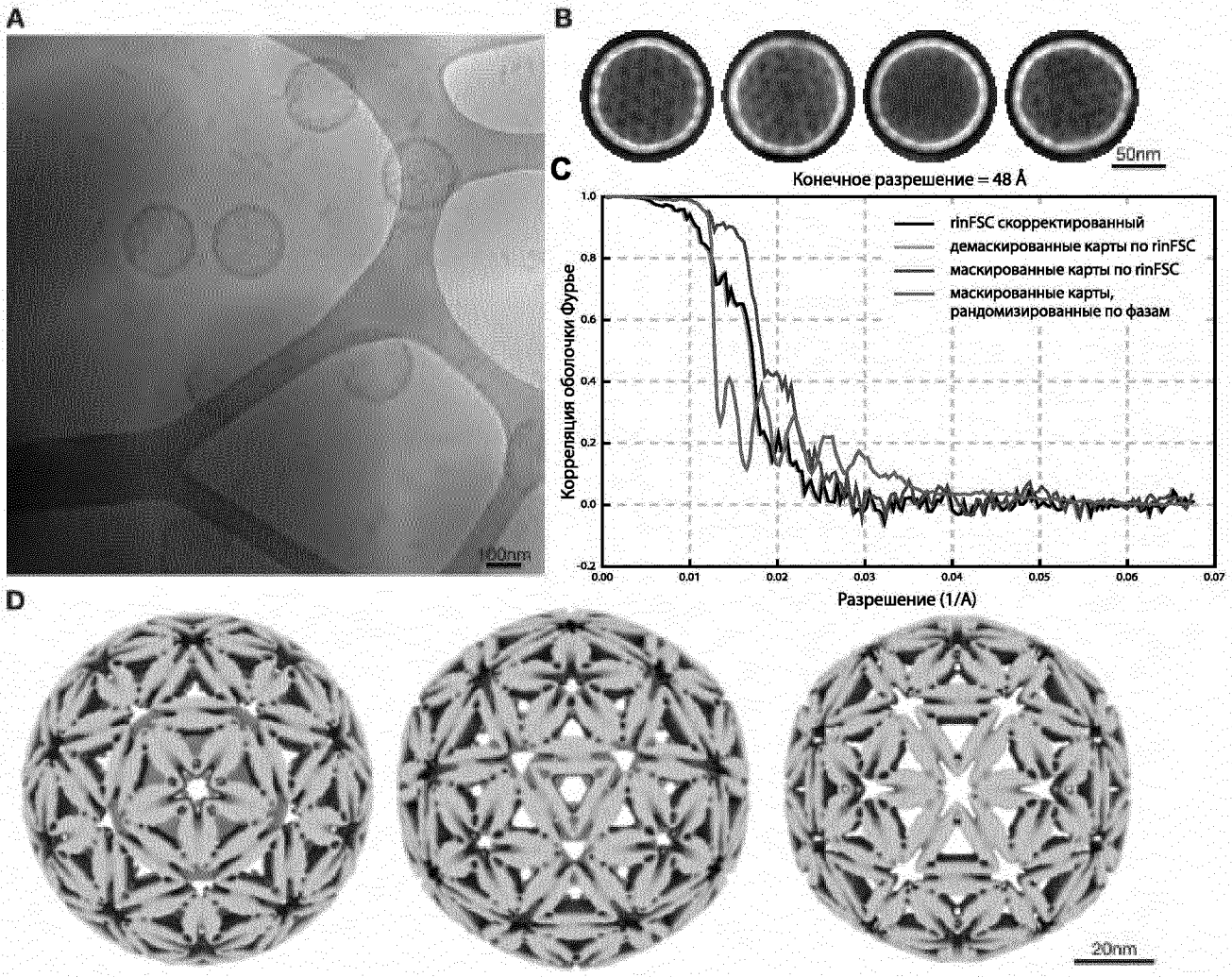
Фиг. 16


A
B
50nm
C
Конечное разрешение = 22 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
20nm

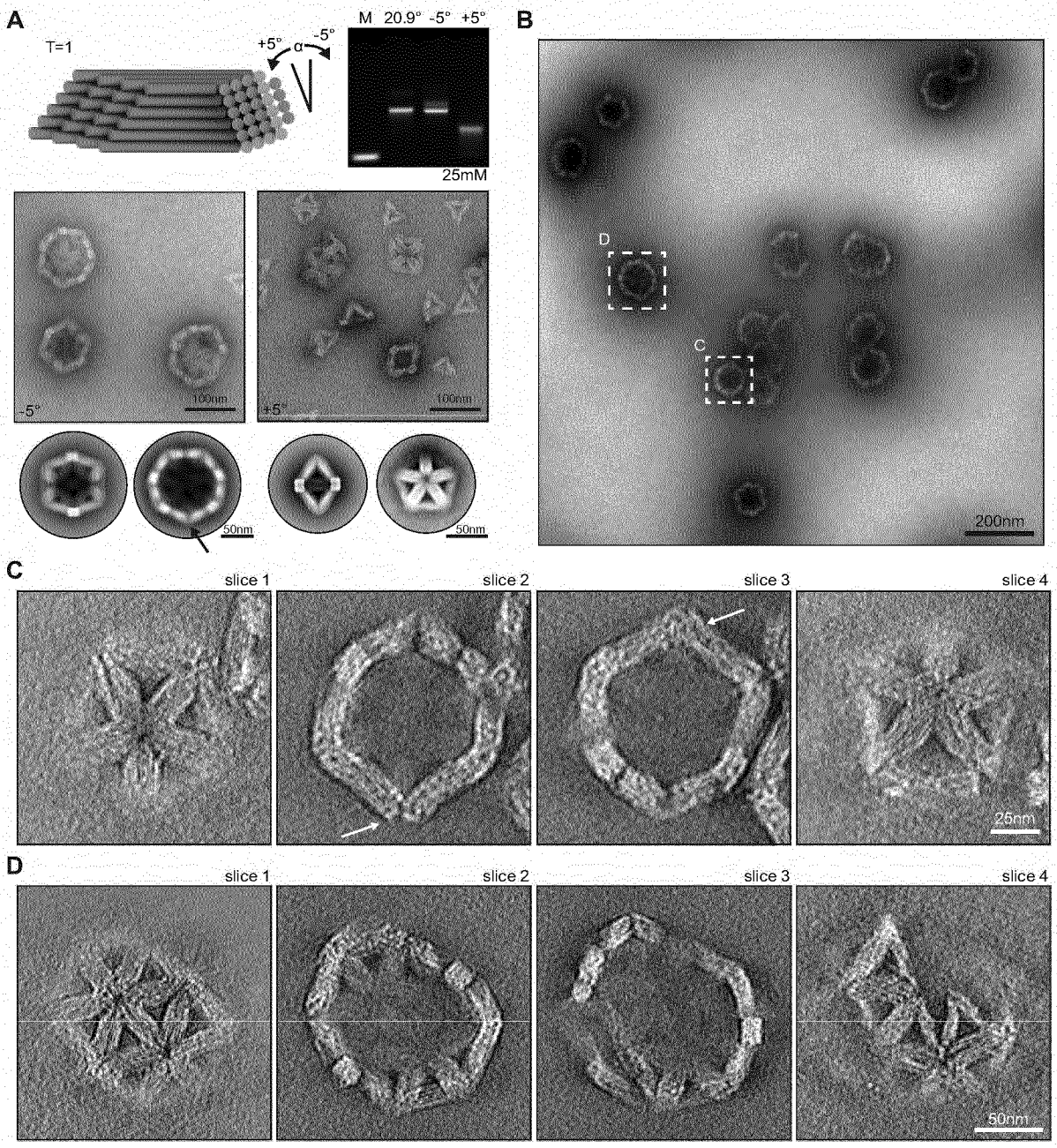
Фиг. 17


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 36 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
D
50nm

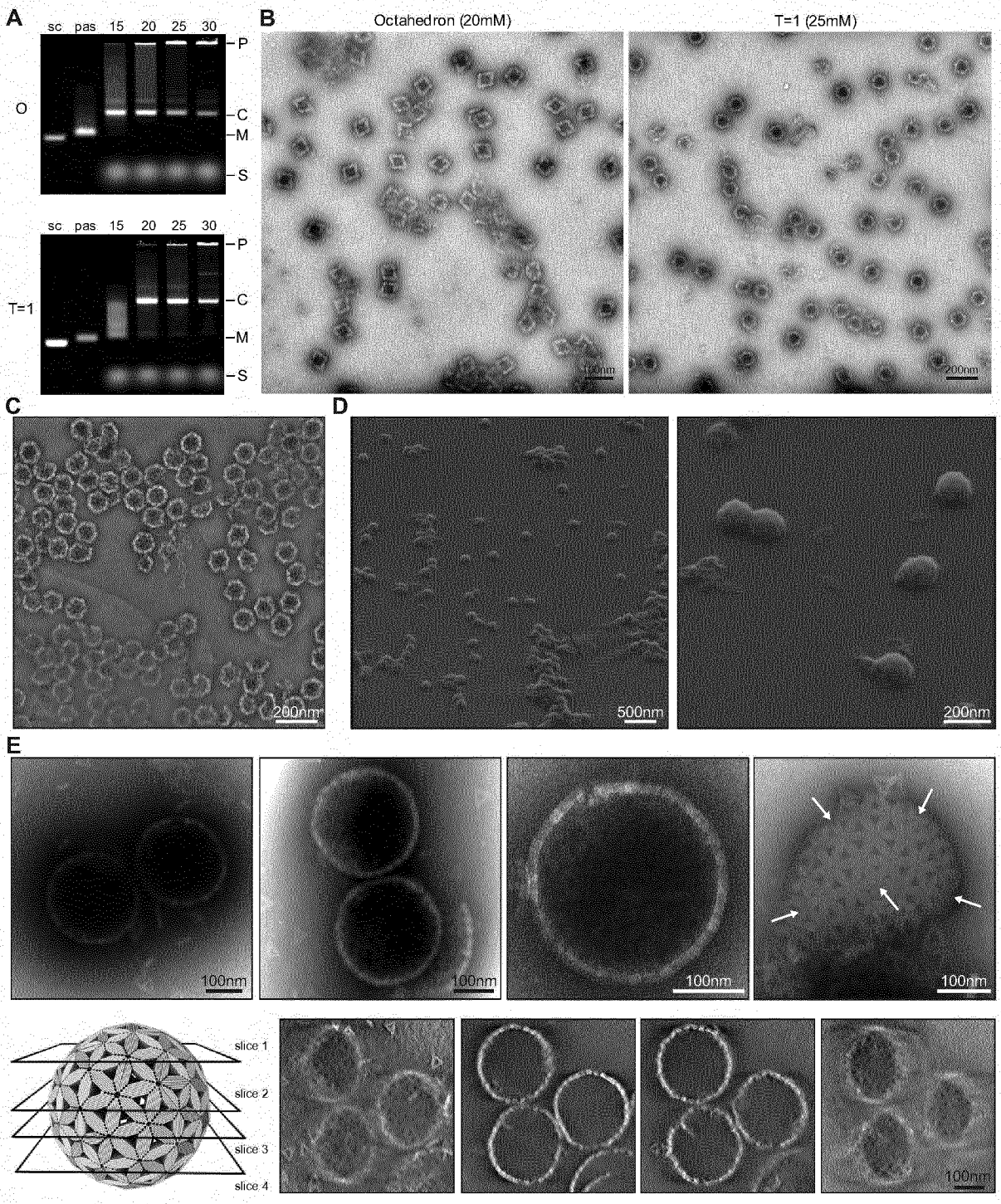
Фиг. 18


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 48 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.01
0.02
0.03
0.04
0.05
0.06
0.07
D
20nm

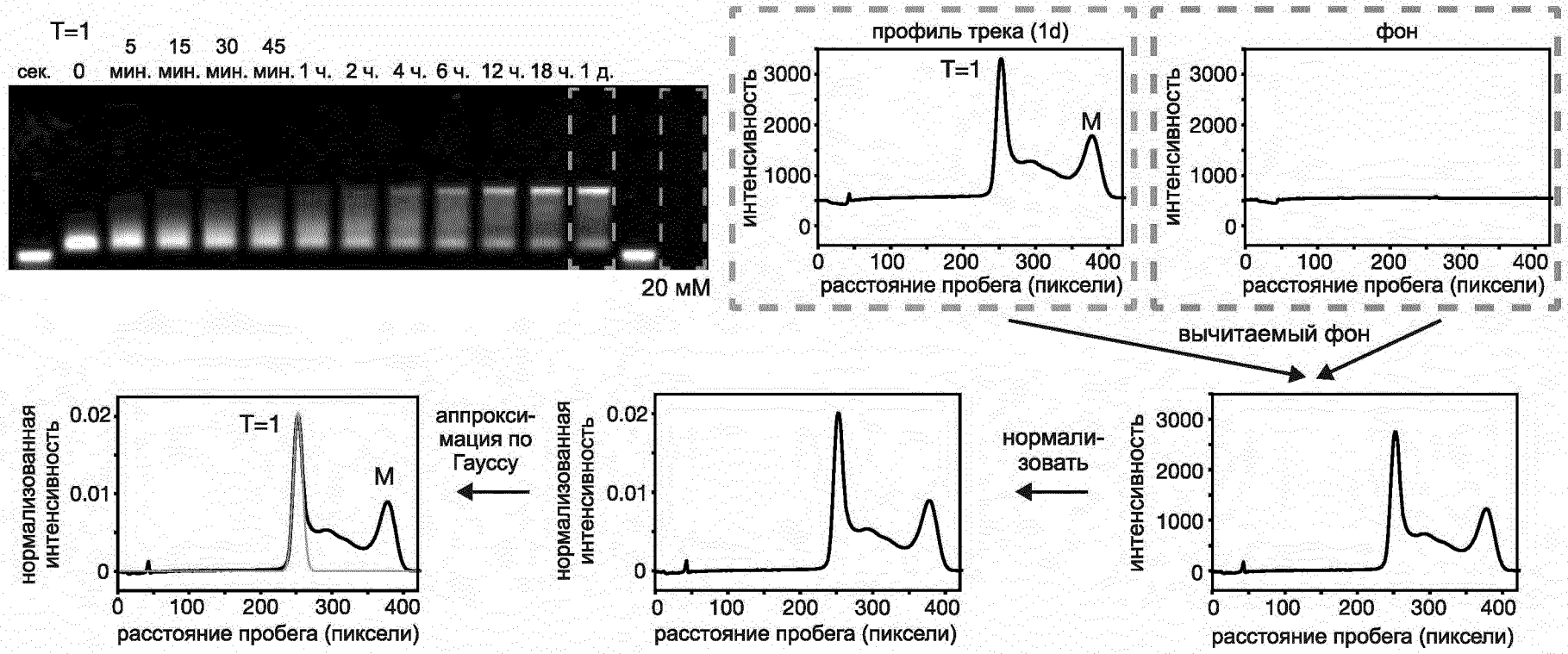
Фиг. 19


A
T=1
+5°
α
-5°
M 20.9° -5° +5°
25mM
-5°
100nm
+5°
100nm
50nm
50nm
B
D
C
200nm
C
slice 1
slice 2
slice 3
slice 4
25nm
D
slice 1
slice 2
slice 3
slice 4
50nm

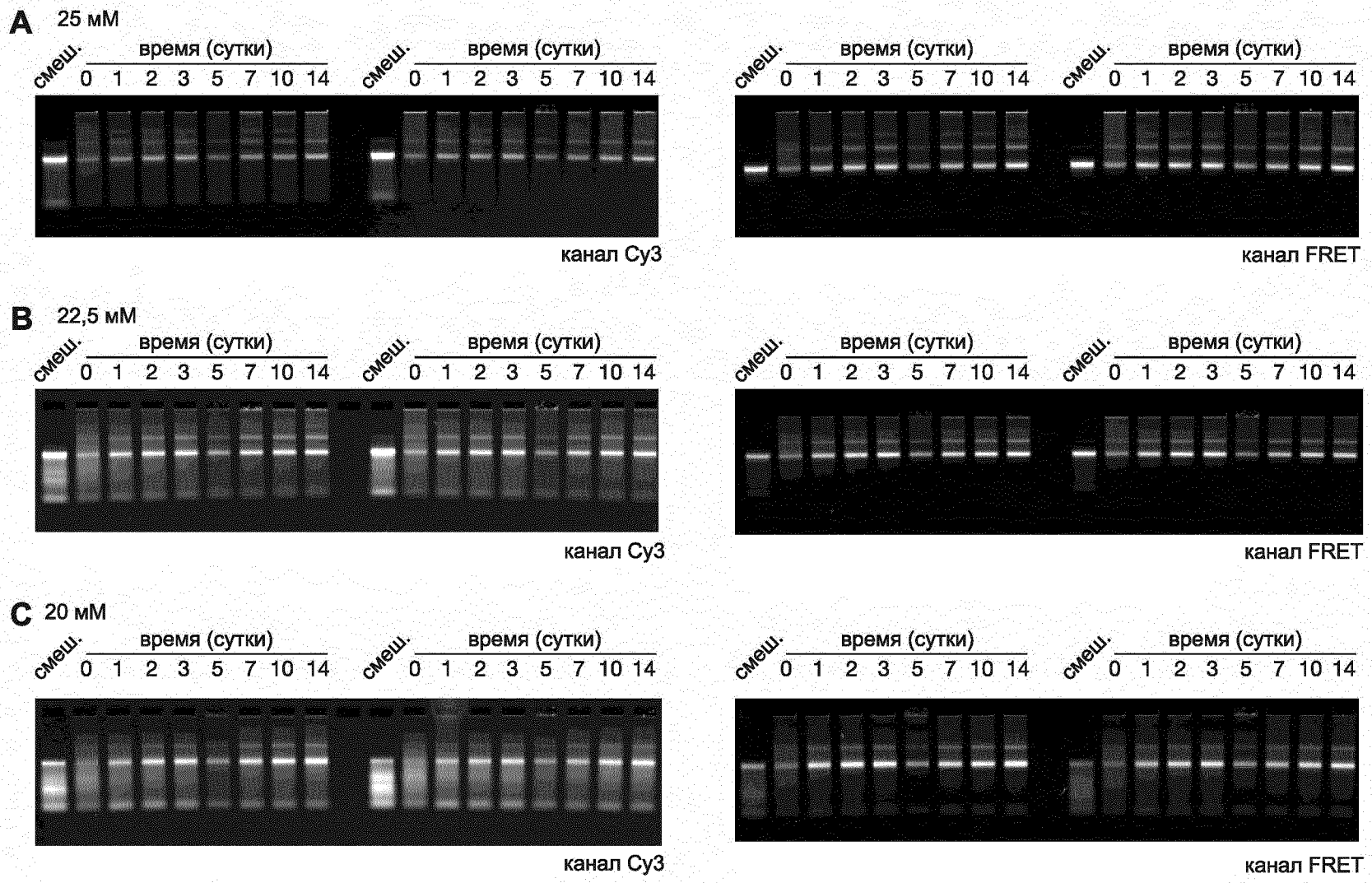
Фиг. 20


A
sc pas 15 20 25 30
P
O
C
M
S
sc pas 15 20 25 30
P
T=1
C
M
S
B
Octahedron (20mM)
T=1 (25mM)
100nm
200nm
C
200nm
D
500nm
200nm
E
100nm
100nm
100nm
100nm
slice 1
slice 2
slice 3
slice 4
100nm

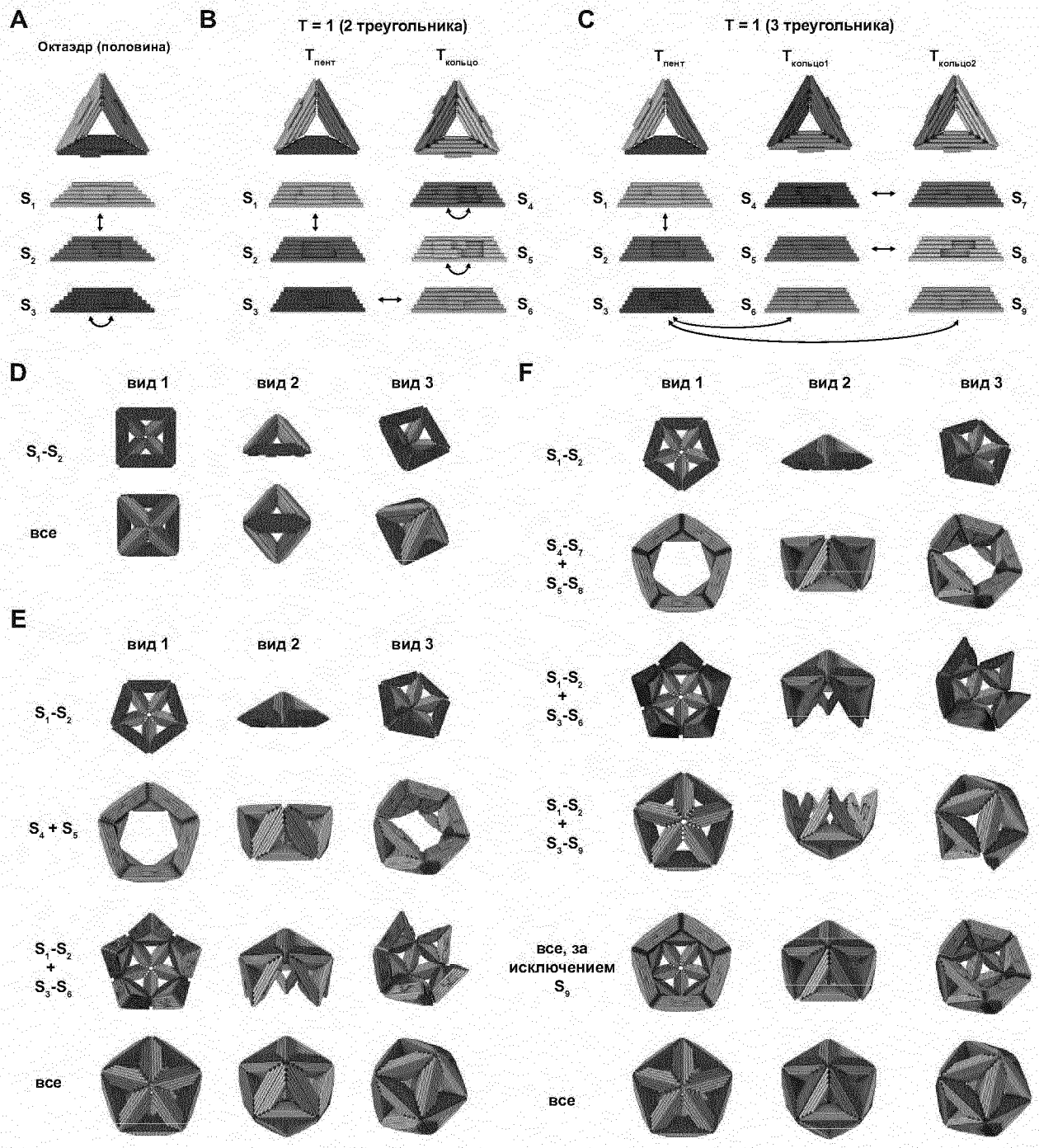
Фиг. 21


T=1
сек. 0 5 мин. 15 мин. 30 мин. 45 мин. 1 ч. 2 ч. 4 ч. 6 ч. 12 ч. 18 ч. 1 д.
20 мМ
профиль трека (1d)
T=1
M
интенсивность
3000
2000
1000
0
0 100 200 300 400
расстояние пробега (пиксели)
фон
вычитаемый фон
нормализовать
аппроксимация по Гауссу
нормализованная интенсивность
0.02
0.01

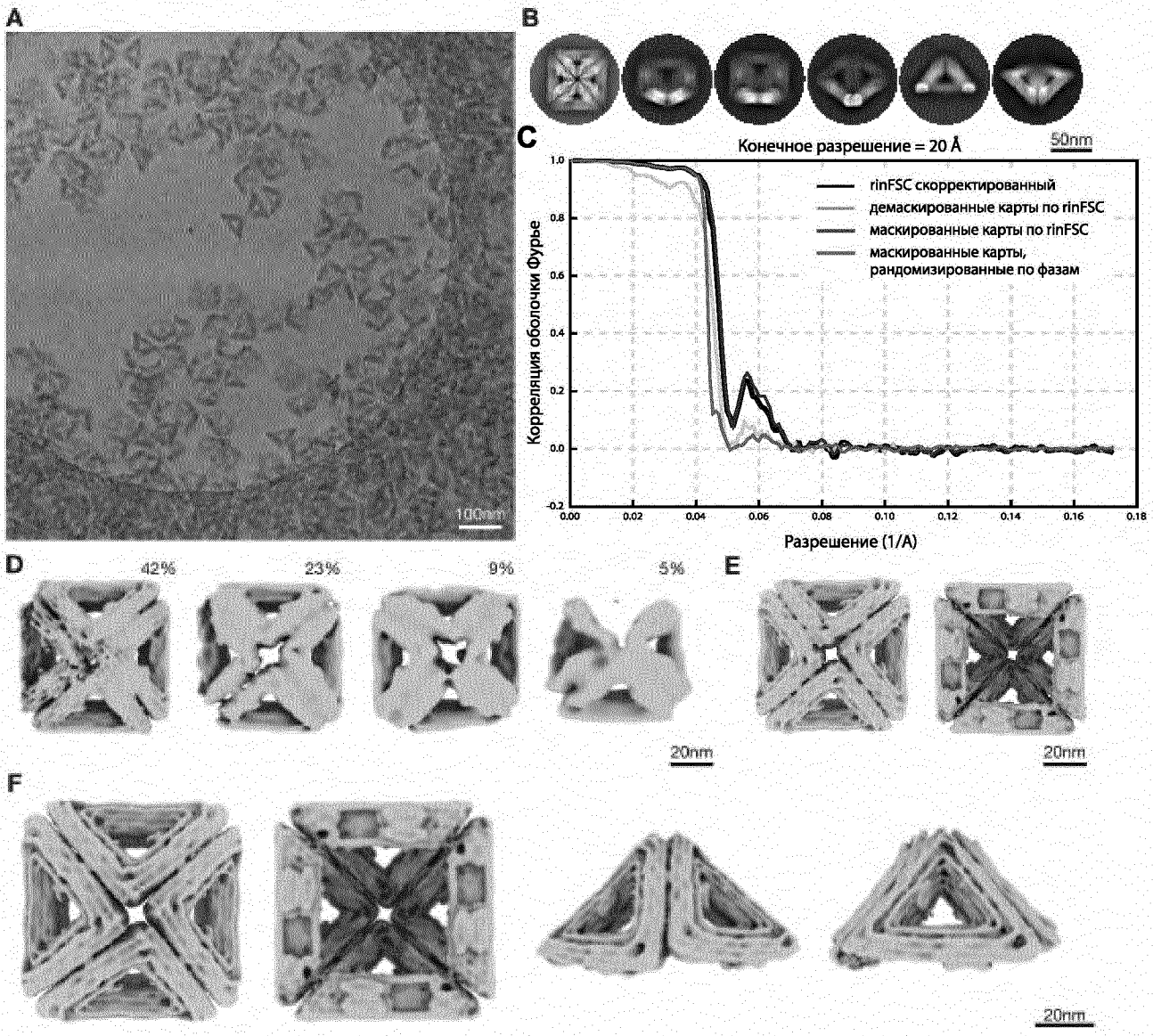
Фиг. 22


A
25 мМ
смеш.
время (сутки)
0 1 2 3 5 7 10 14
канал Cy3
канал FRET
B
22,5 мМ
C
20 мМ

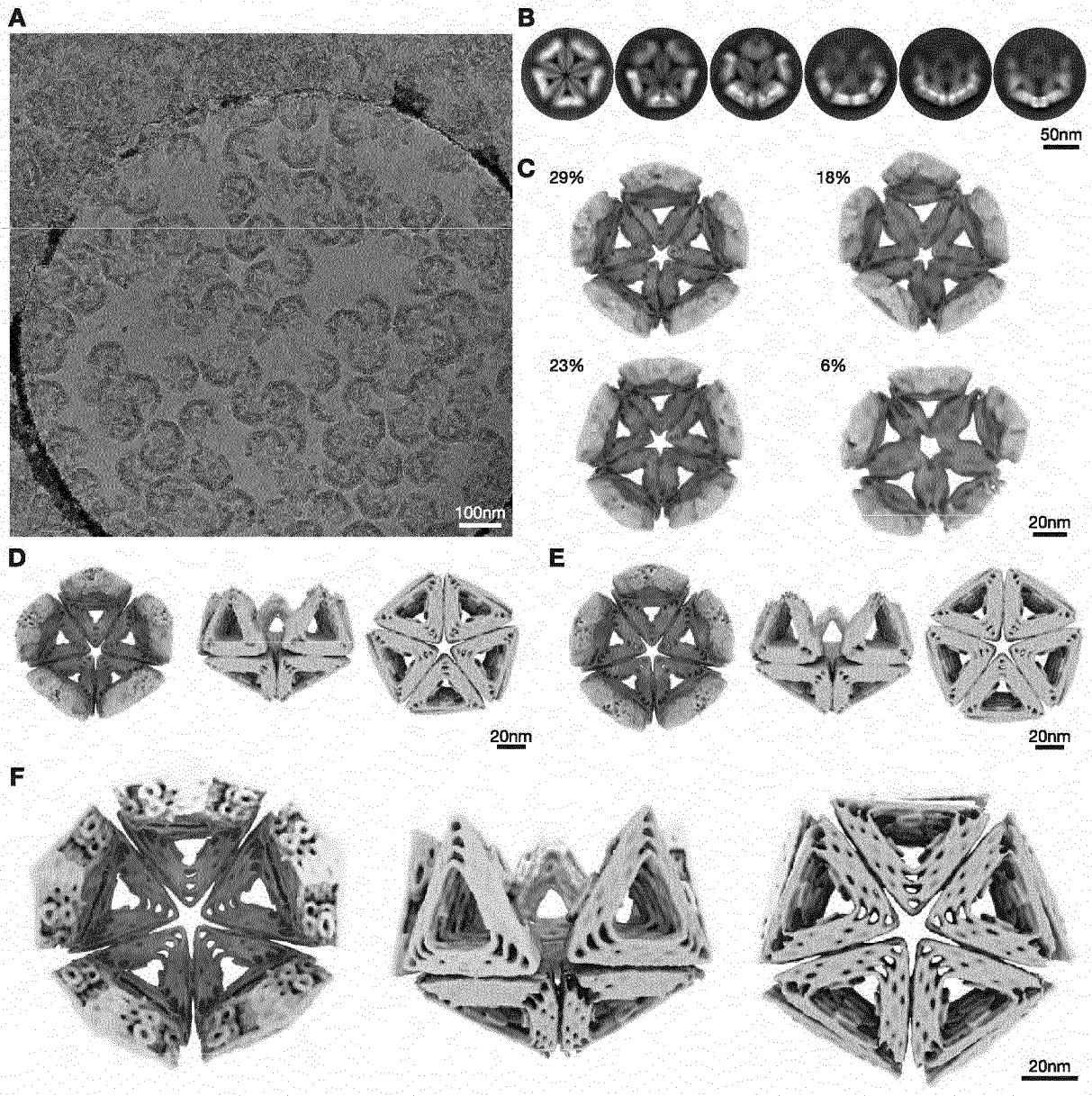
Фиг. 23


A
Октаэдр (половина)
S1
S2
S3
B
T = 1 (2 треугольника)
Tпент
Tкольцо
S1
S2
S3
S4
S5
S6
C
T = 1 (3 треугольника)
Tпент
Tкольцо1
Tкольцо2
S1
S2
S3
S4
S5
S6
S7
S8
S9
D
вид 1
вид 2
вид 3
S1-S2
все
E
вид 1
вид 2
вид 3
S1-S2
S4 + S5
S1-S2 + S3-S6
все
F
вид 1
вид 2
вид 3
S1-S2
S4-S7 + S5-S8
S1-S2 + S3-S6
S1-S2 + S3-S9
все, за исключением S9
все

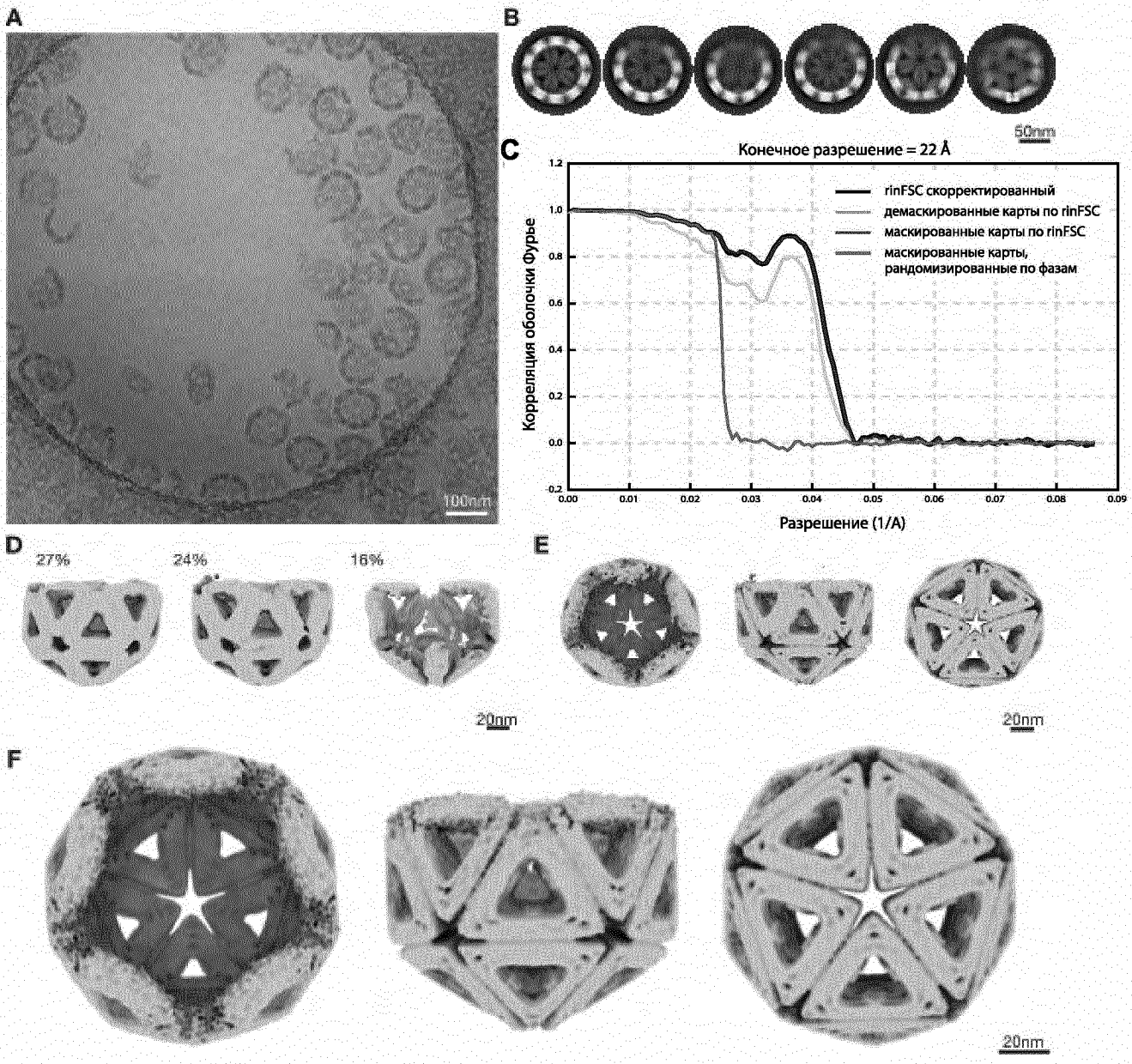
Фиг. 24


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 20 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
42%
23%
9%
5%
20nm
E
20nm
F
20nm

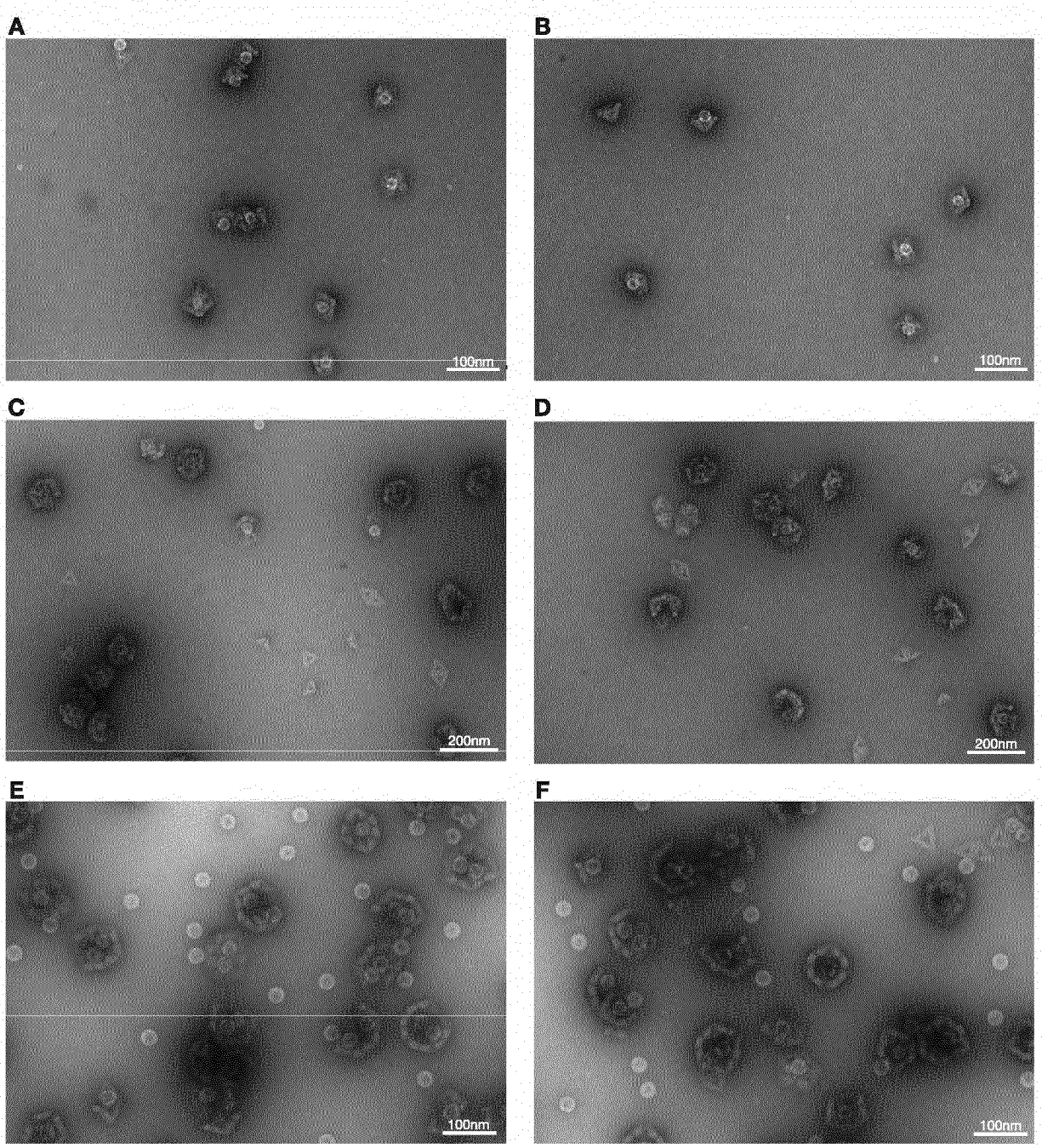
Фиг. 25



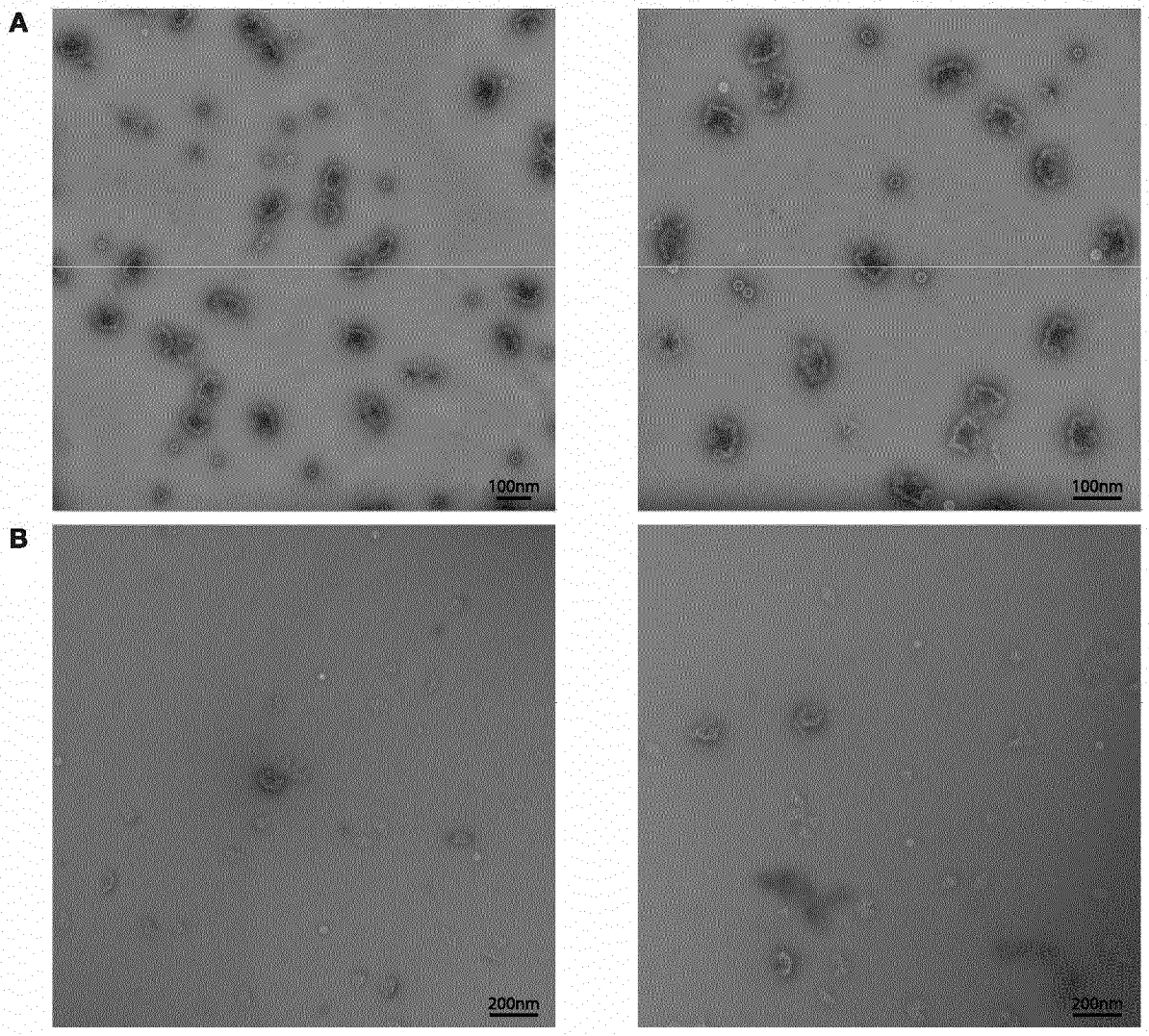
Фиг. 26


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 22 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
27%
24%
16%
20nm
E
20nm
F
20nm

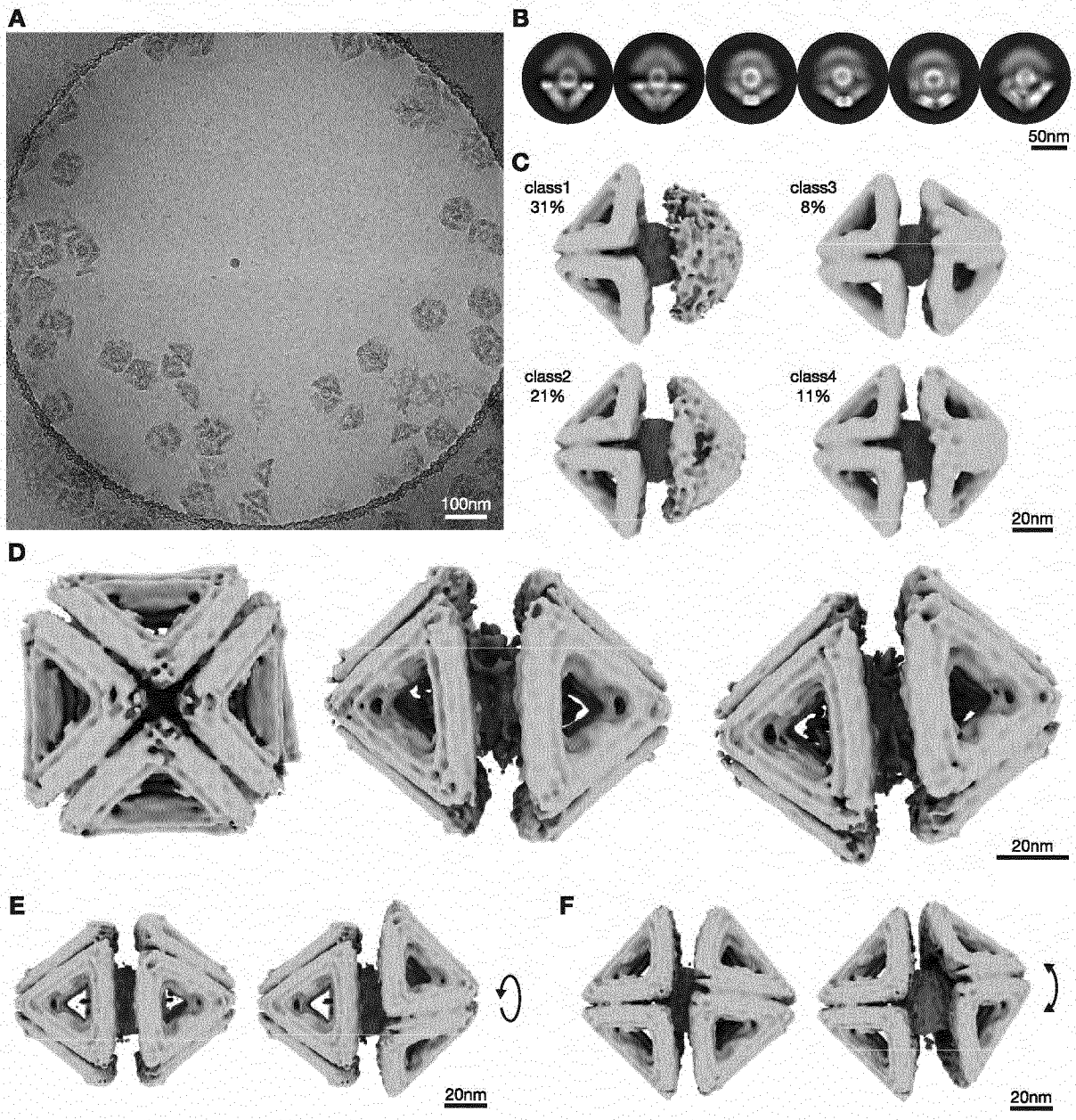
Фиг. 27



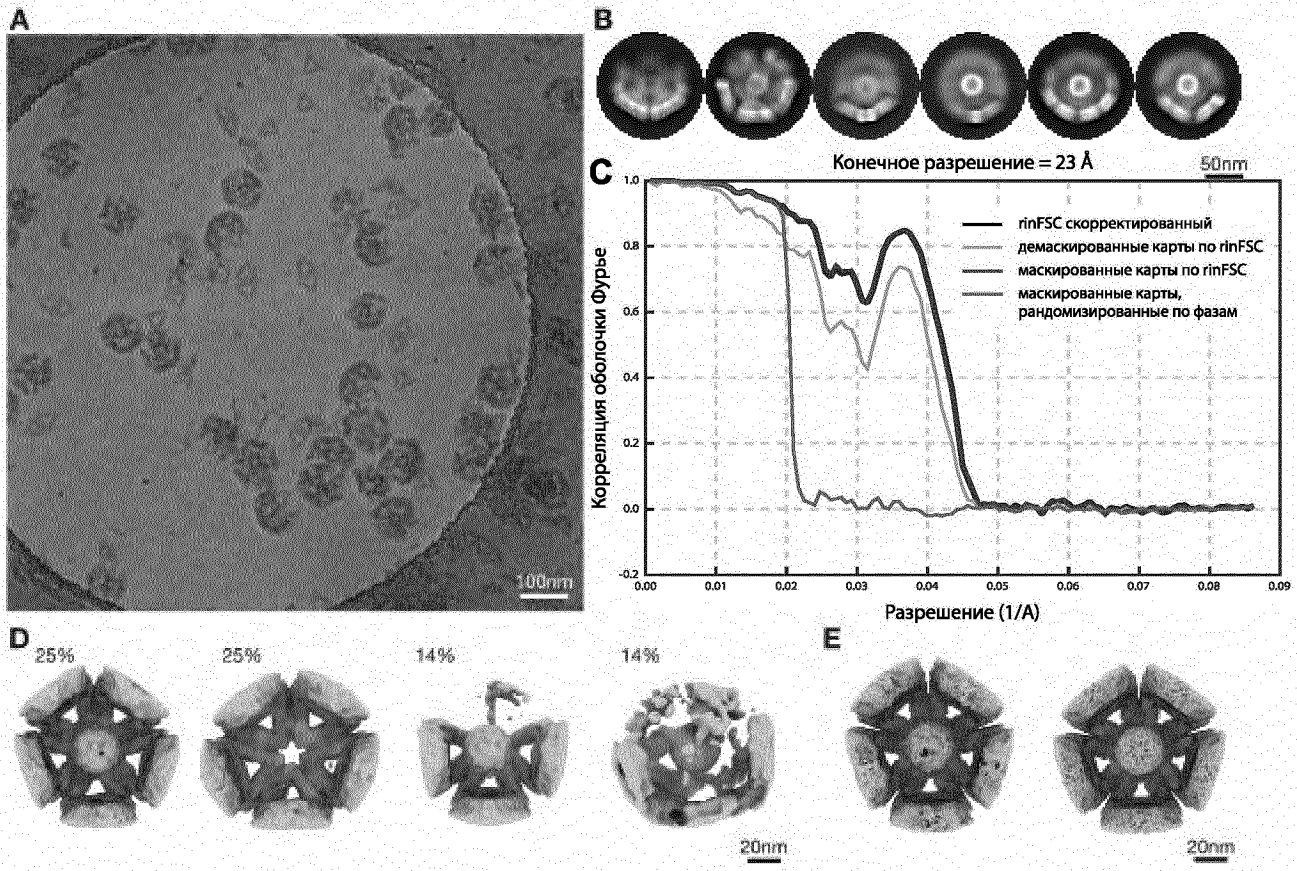
Фиг. 28



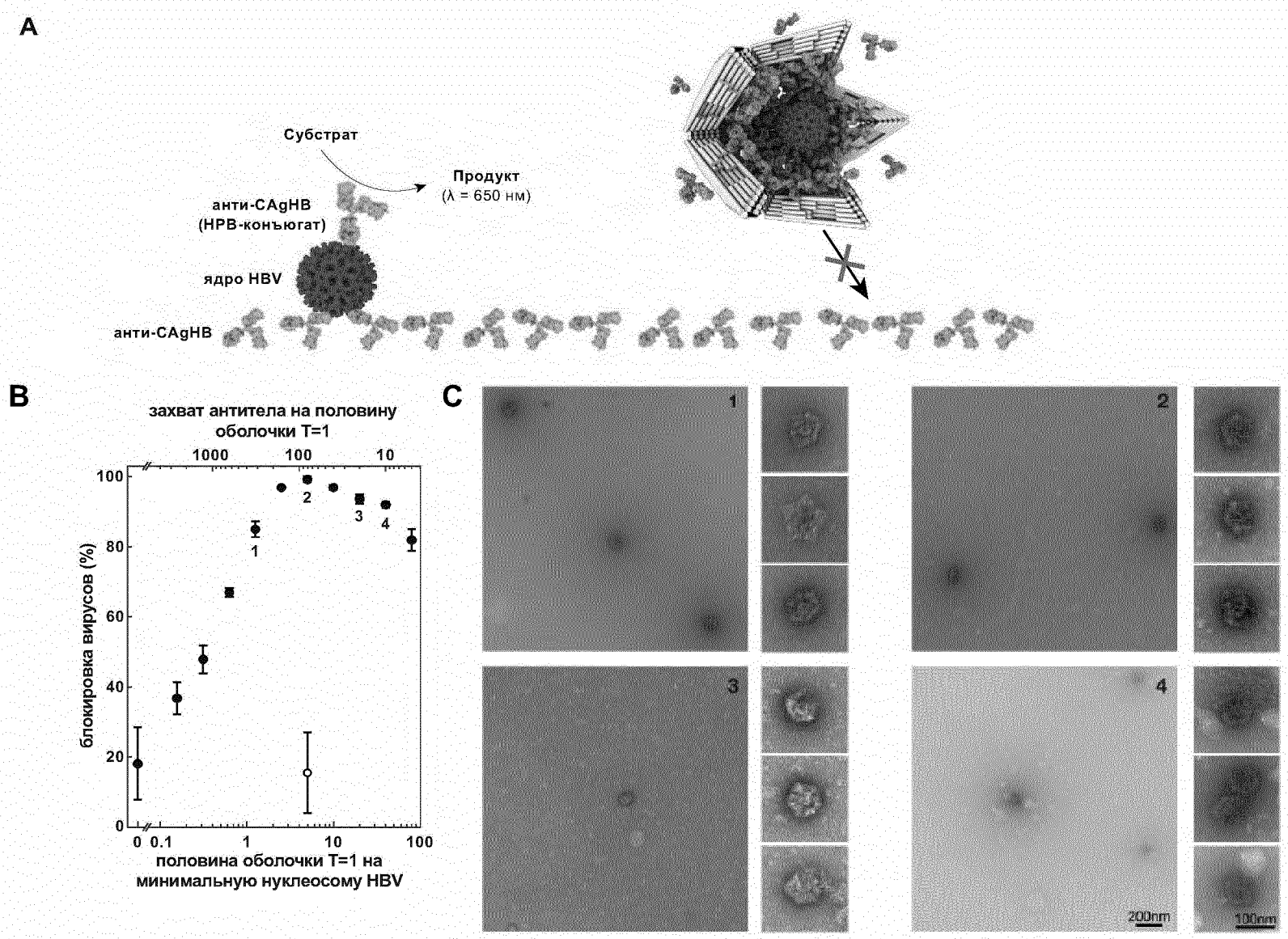
Фиг. 29


A
100nm
B
50nm
C
class1
31%
class3
8%
class2
21%
class4
11%
20nm
D
20nm
E
20nm
F
20nm

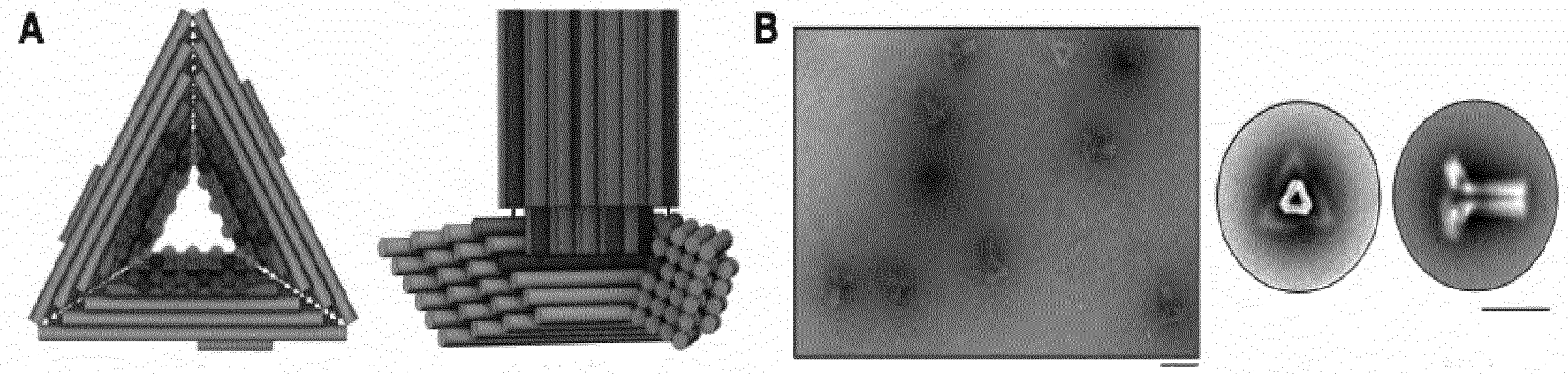
Фиг. 30


A
100nm
B
C
Конечное разрешение = 23 Å
50nm
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
25%
25%
14%
14%
20nm
E
20nm

Фиг. 31

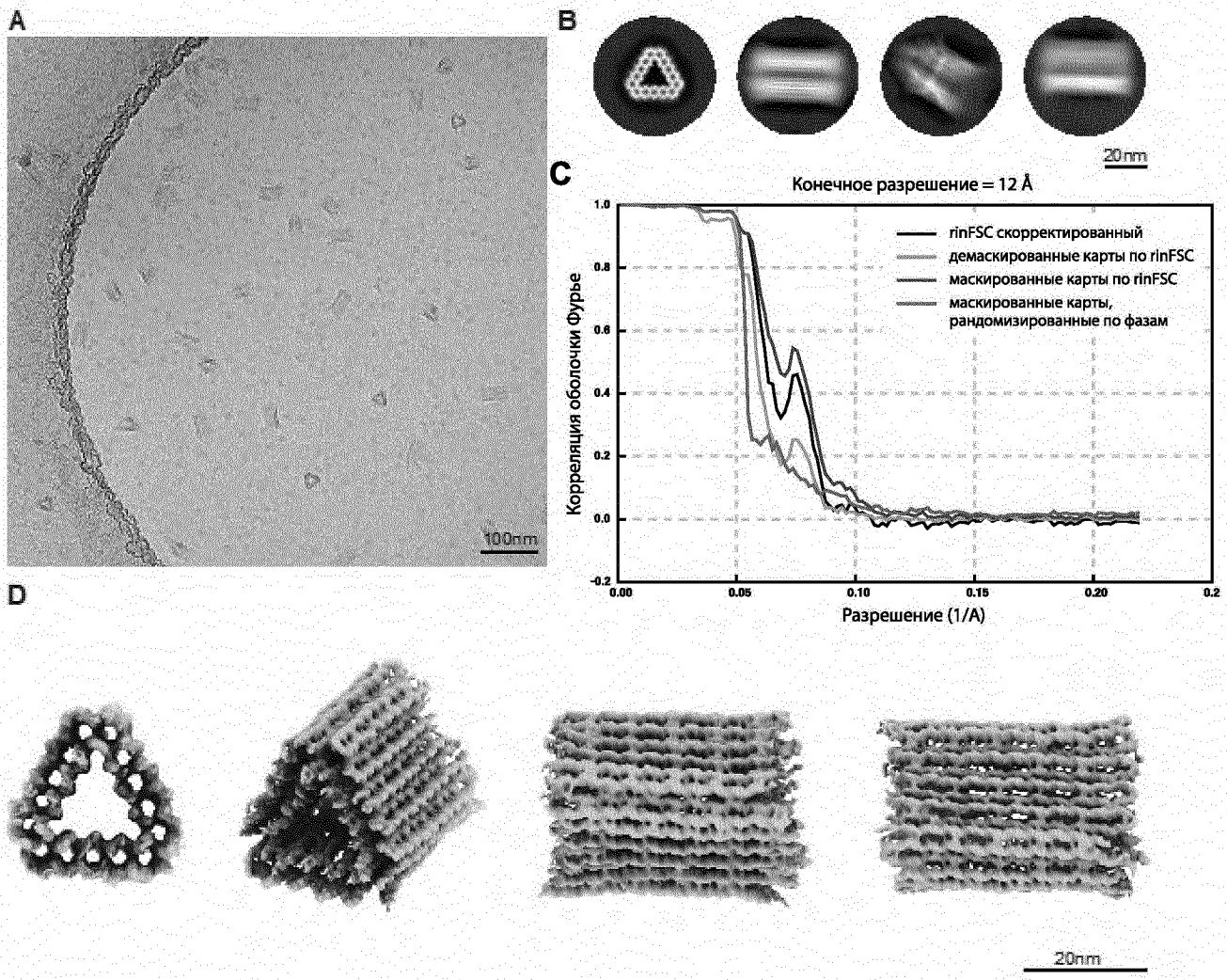

A
Субстрат
Продукт
(λ = 650 нм)
анти-CAgHB
(HPB-конъюгат)
ядро HBV
анти-CAgHB
B
захват антитела на половину
оболочки T=1
1000
100
10
блокировка вирусов (%)
100
80
60
40
20
0
0
0.1
1
10
100
1
2
3
4
половина оболочки T=1 на
минимальную нуклеосому HBV
C
1
2
3
4
200nm
100nm

Фиг. 32

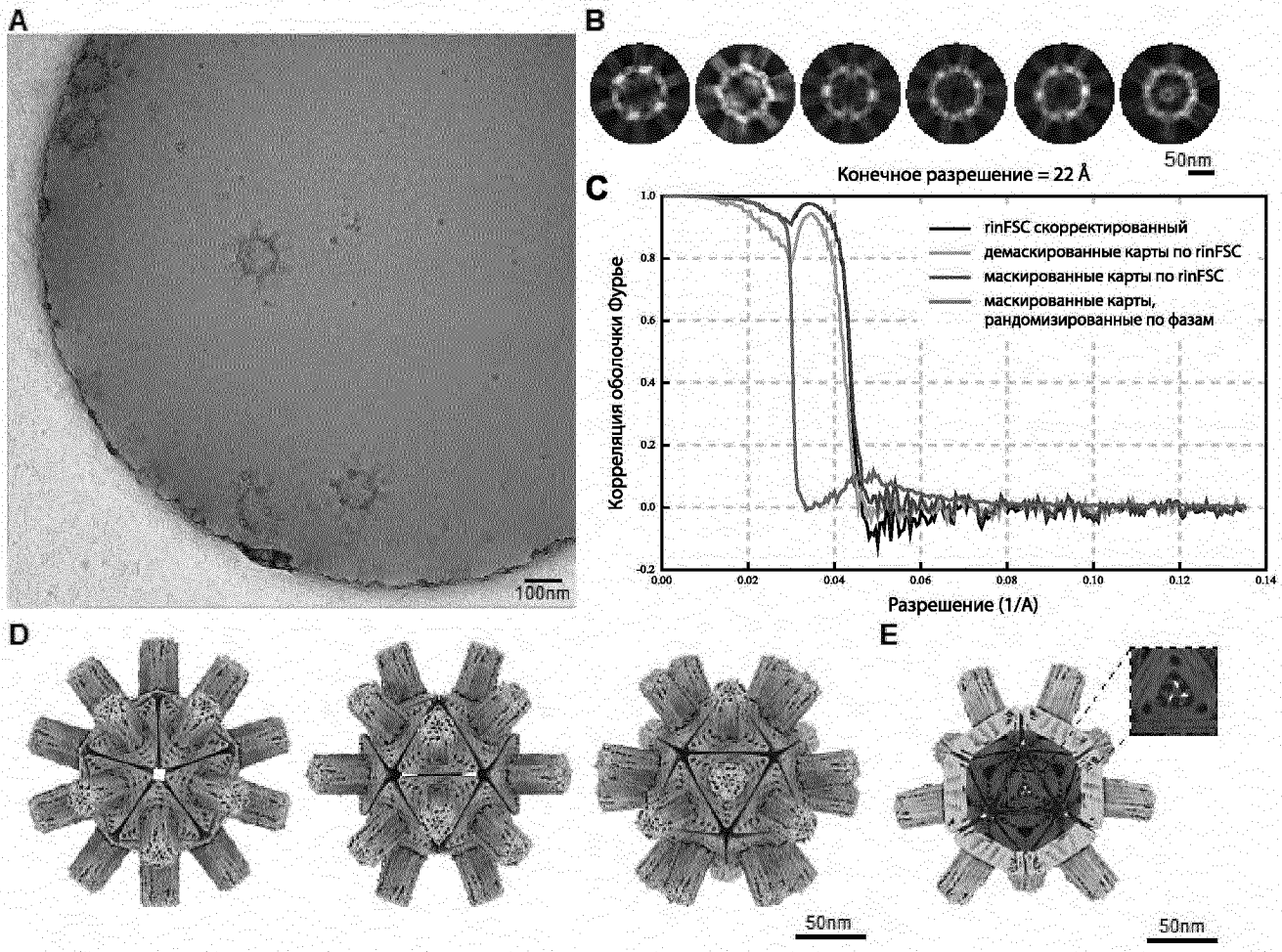


вид сверху **вид сбоку** **вид сверху** **вид сбоку**

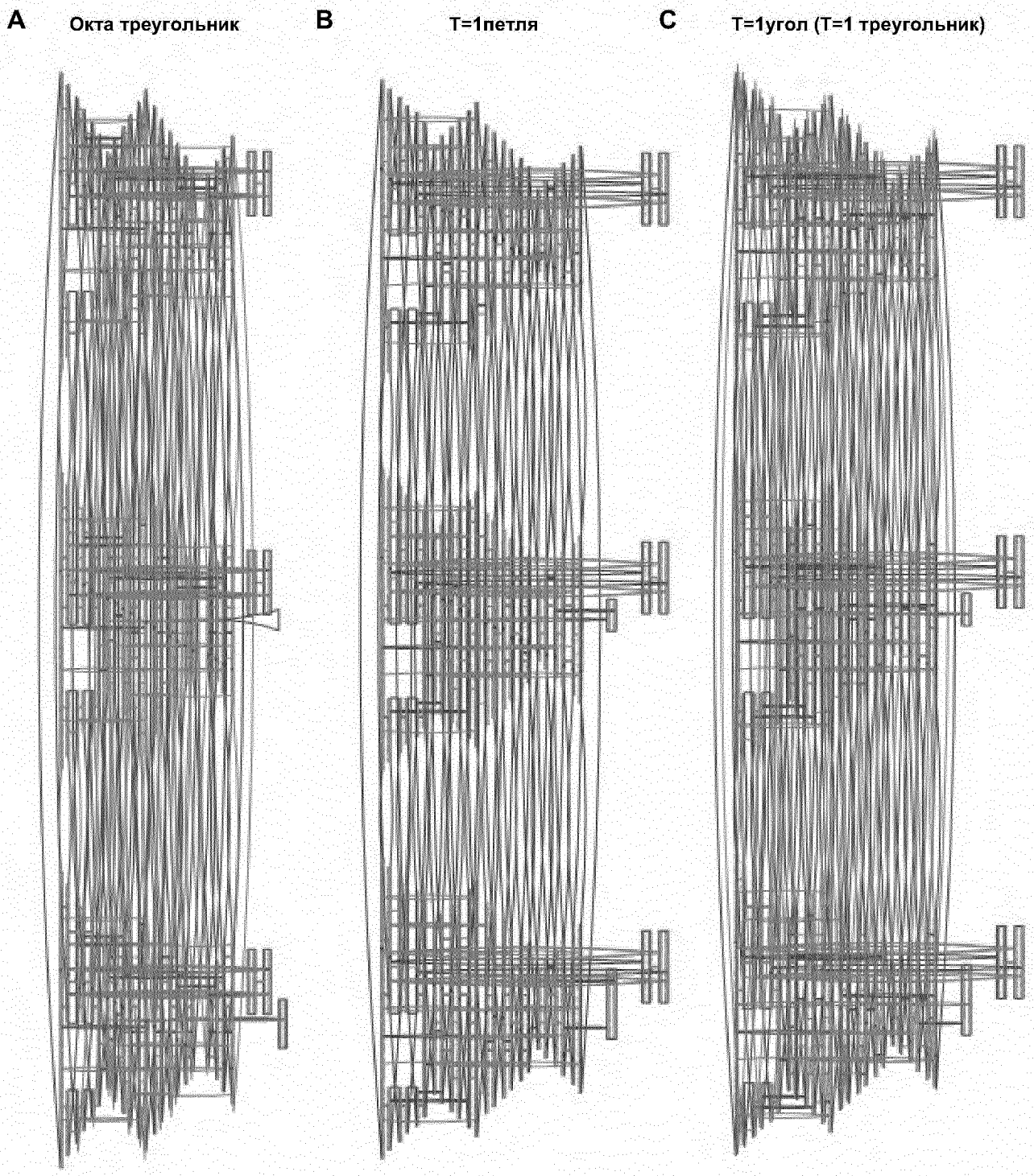
Фиг. 33


A
100nm
B
20nm
C
Конечное разрешение = 12 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.2
D
20nm

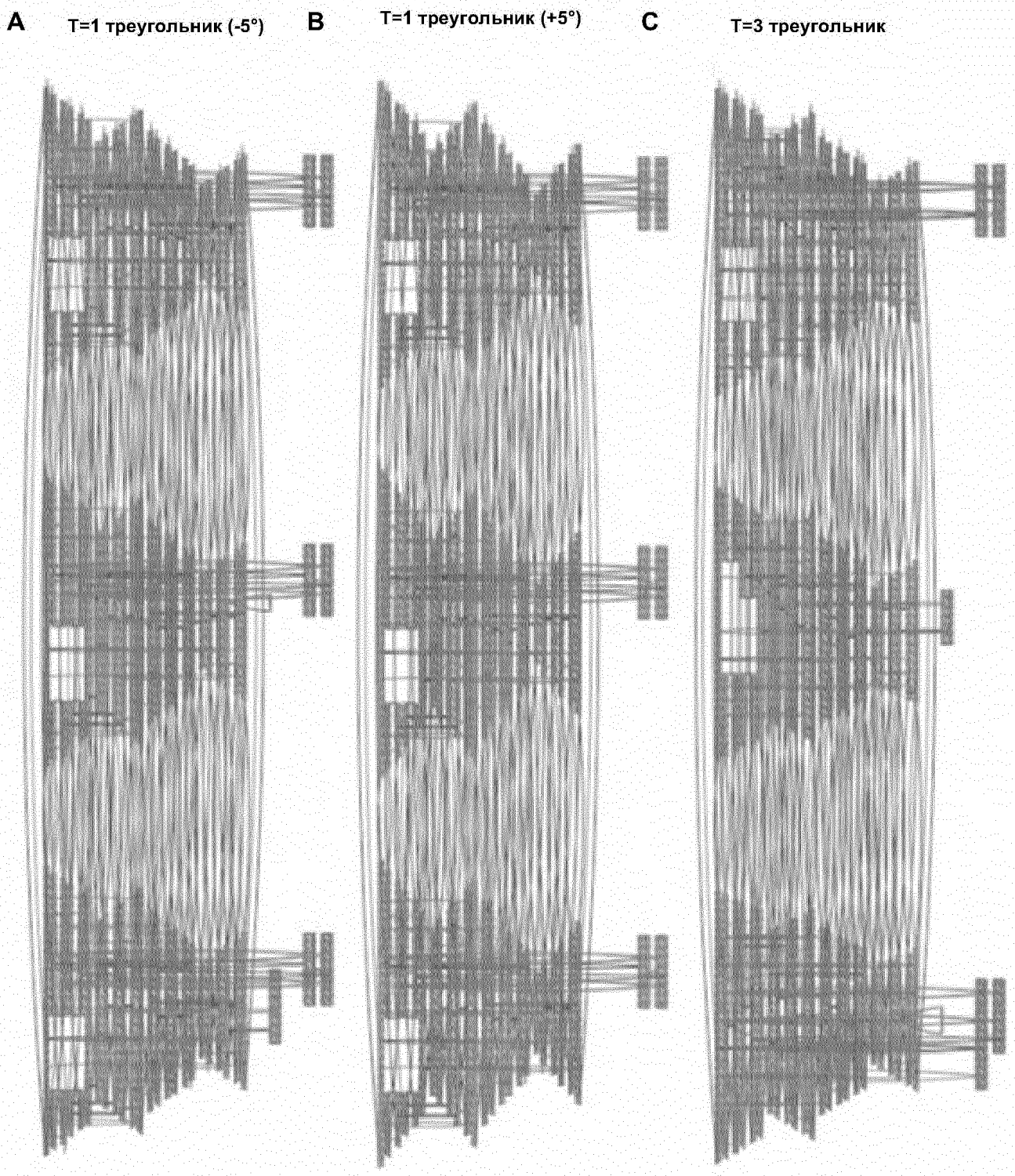
Фиг. 34


A
100nm
B
50nm
C
Конечное разрешение = 22 Å
rinFSC скорректированный
демаскированные карты по rinFSC
маскированные карты по rinFSC
маскированные карты, рандомизированные по фазам
Корреляция оболочки Фурье
Разрешение (1/A)
D
50nm
E
50nm

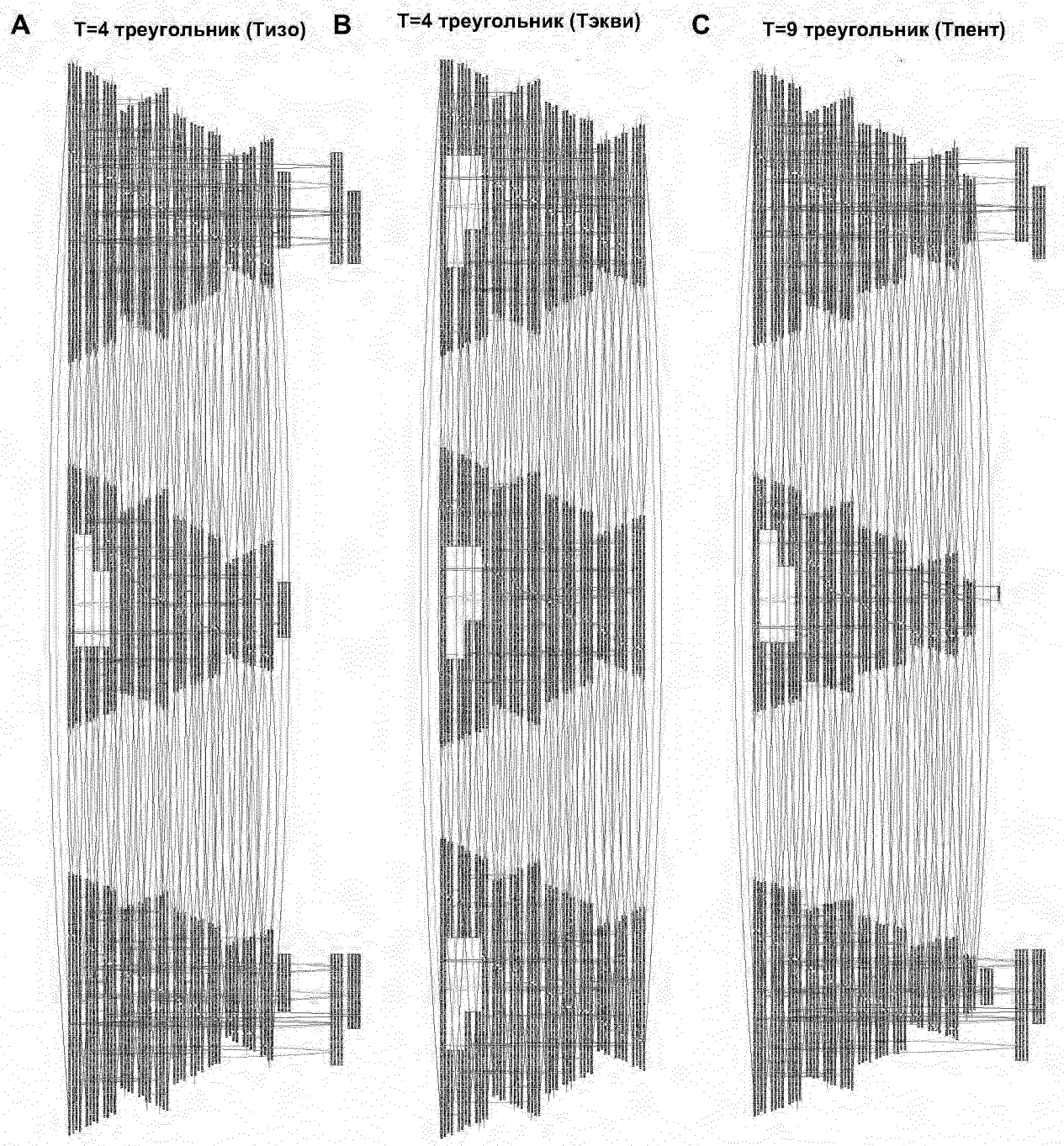
Фиг. 35



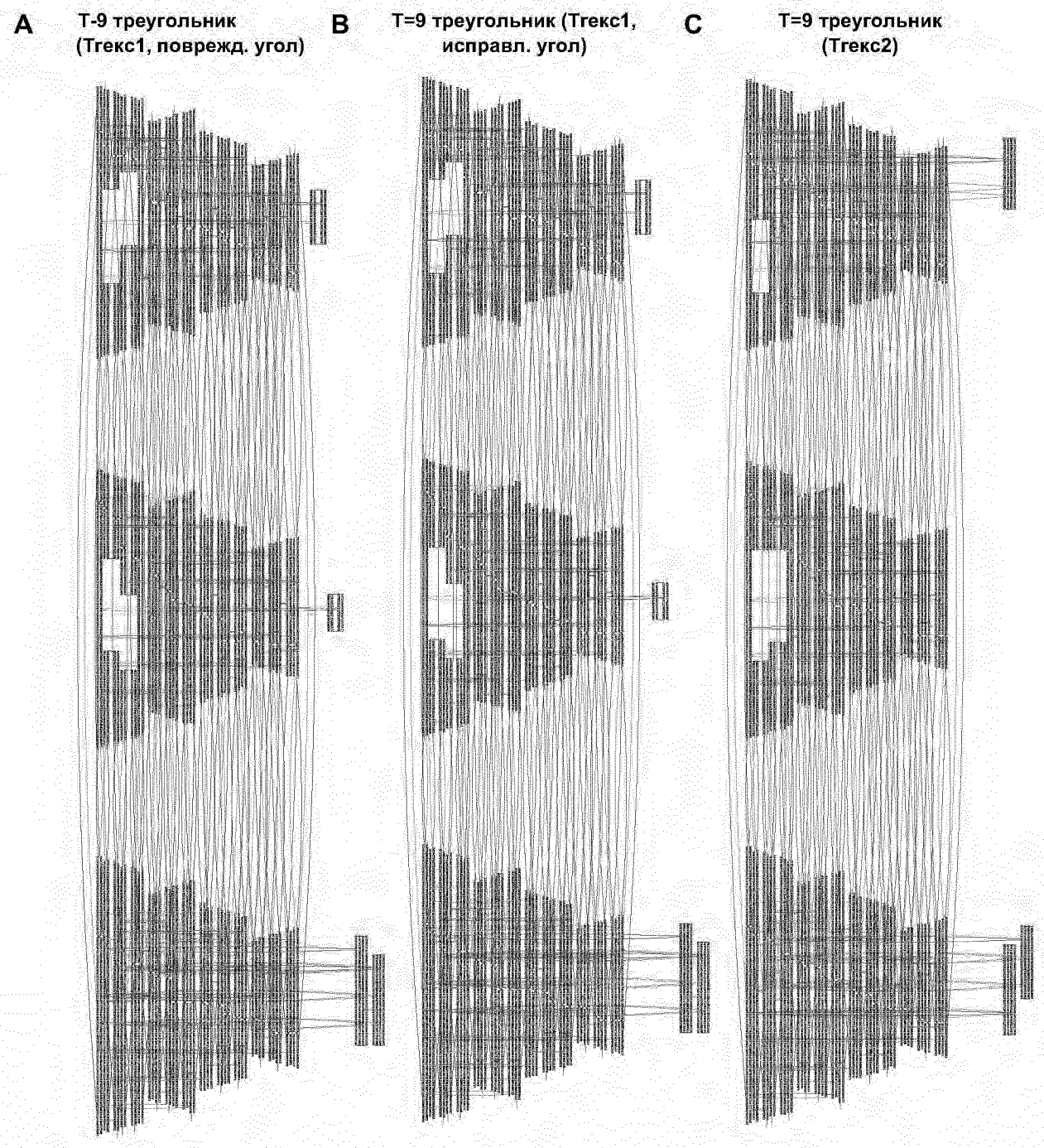
Фиг. 36



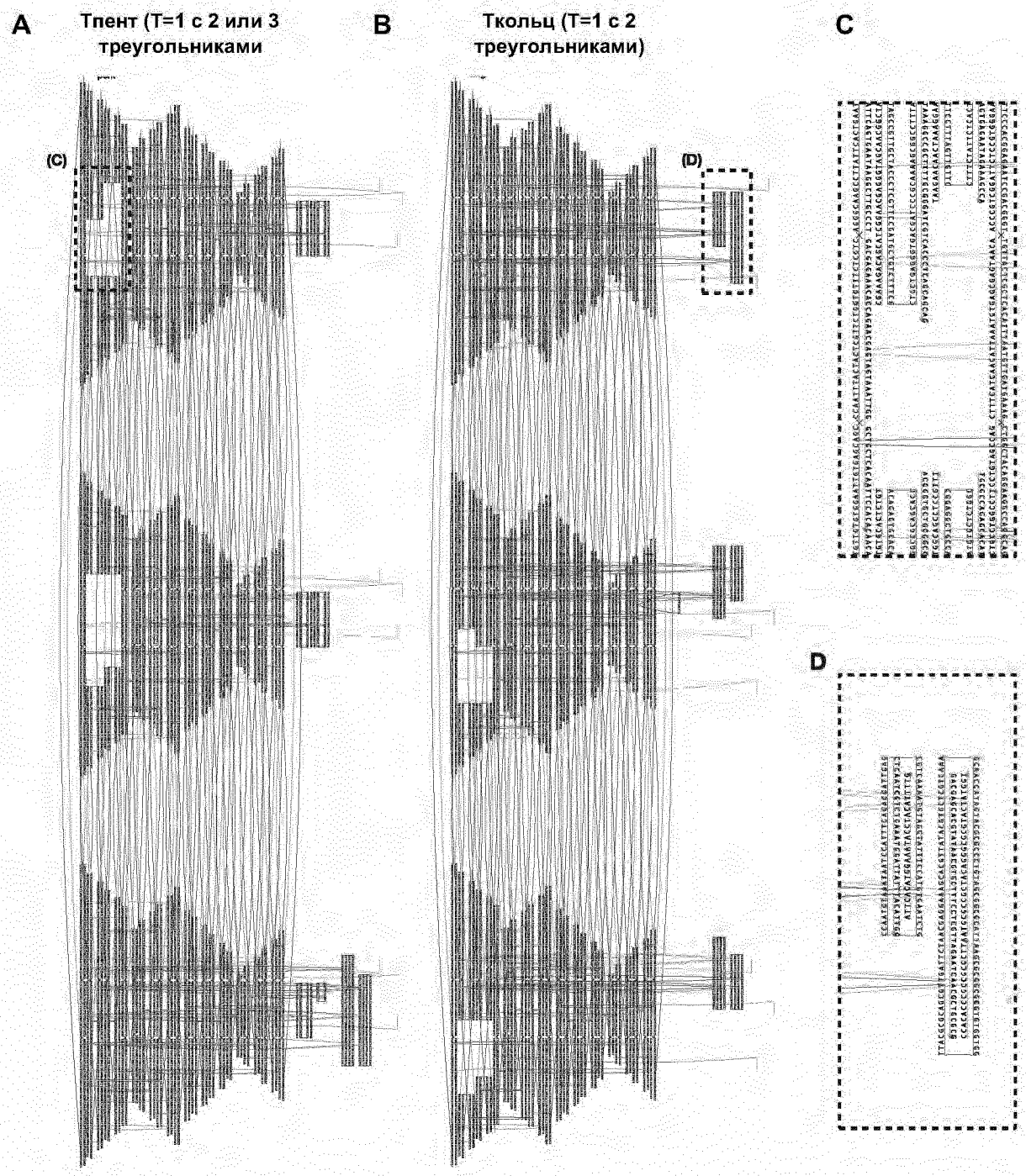
Фиг. 37


A
T=4 треугольник (Тизо)
B
T=4 треугольник (Тэкви)
C
T=9 треугольник (Тпент)

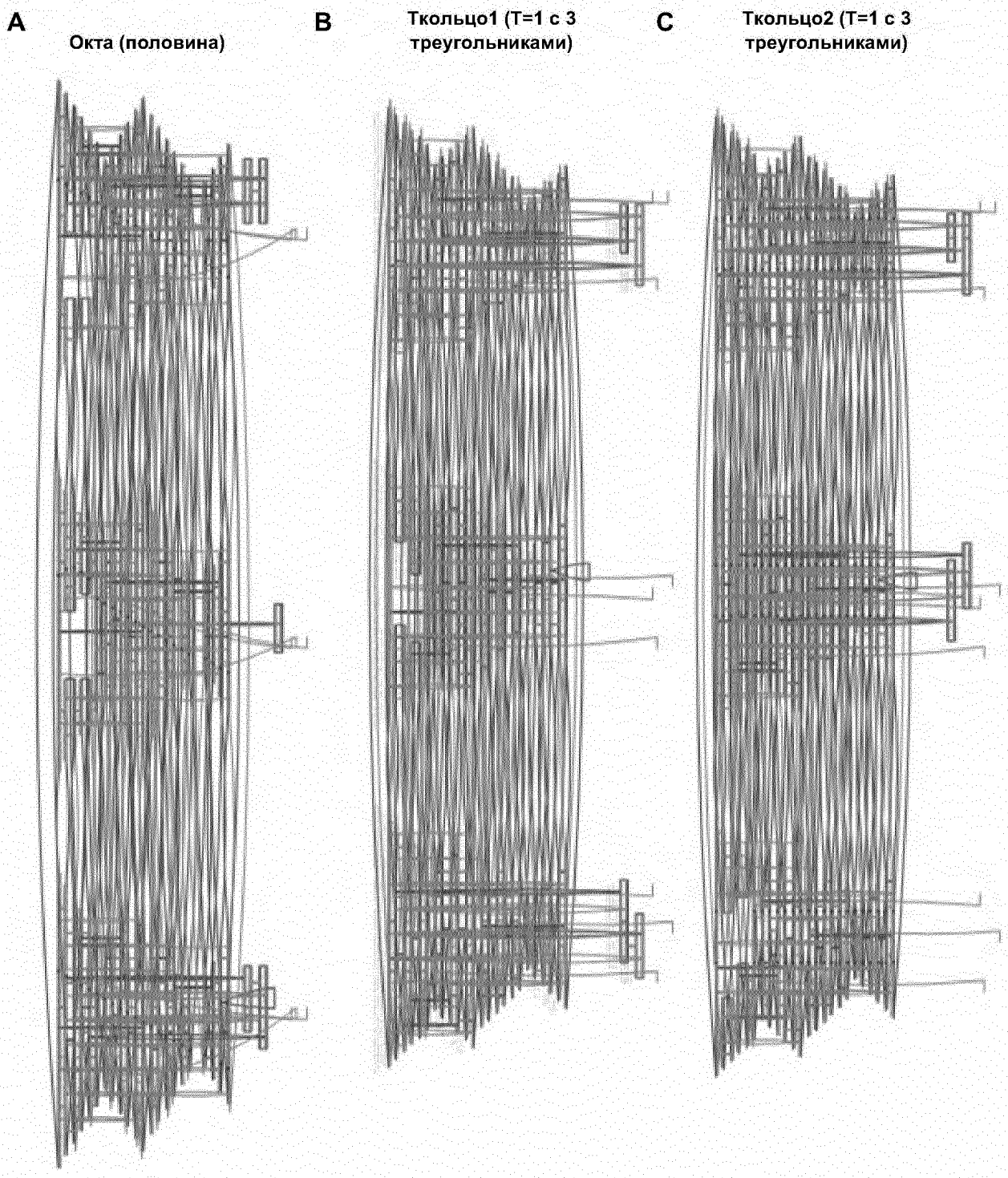
Фиг. 38


A
T-9 треугольник
(Тгекс1, поврежд. угол)
B
T=9 треугольник (Тгекс1,
исправл. угол)
C
T=9 треугольник
(Тгекс2)

Фиг. 39

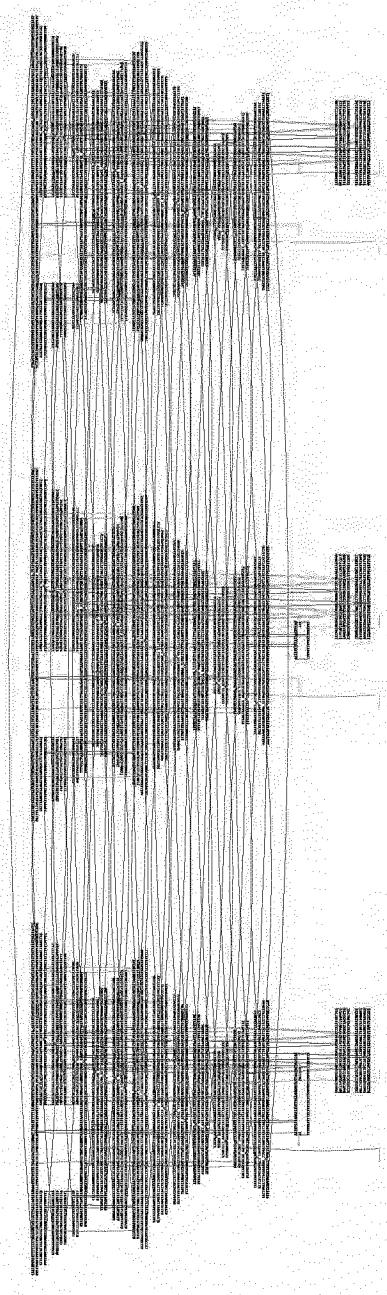

A
Тпент (T=1 с 2 или 3 треугольниками
B
Ткольц (T=1 с 2 треугольниками)
C
D
(C)
(D)

Фиг. 40

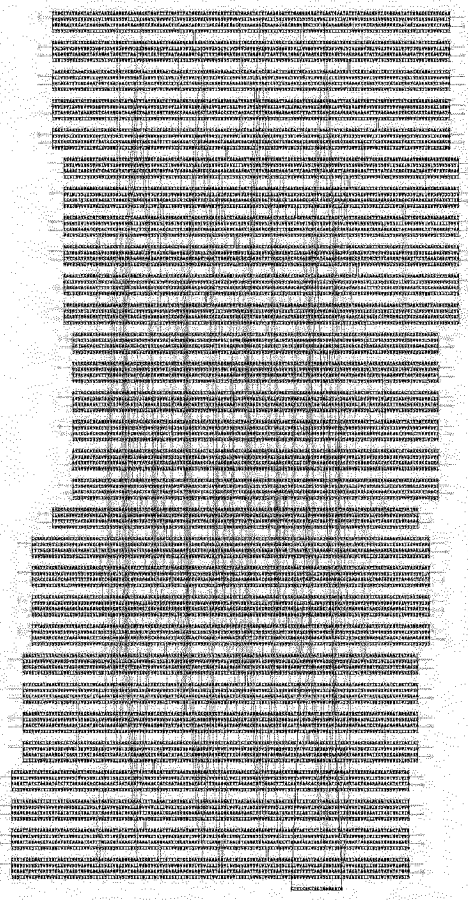

A
Окта (половина)
B
Ткольцо1 (T=1 с 3 треугольниками)
C
Ткольцо2 (T=1 с 3 треугольниками)

Фиг. 41

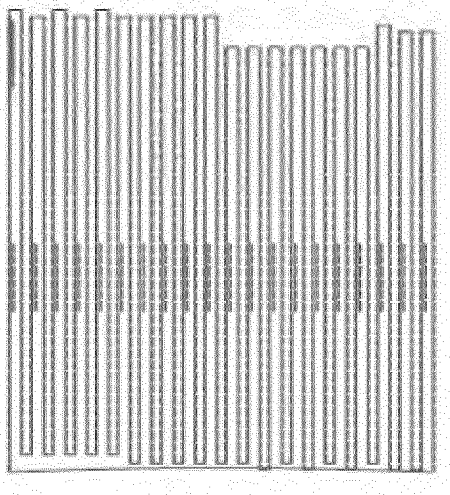
A треугольник T=1 с 12 местами соединений



B Треугольная структура «кирпичей»

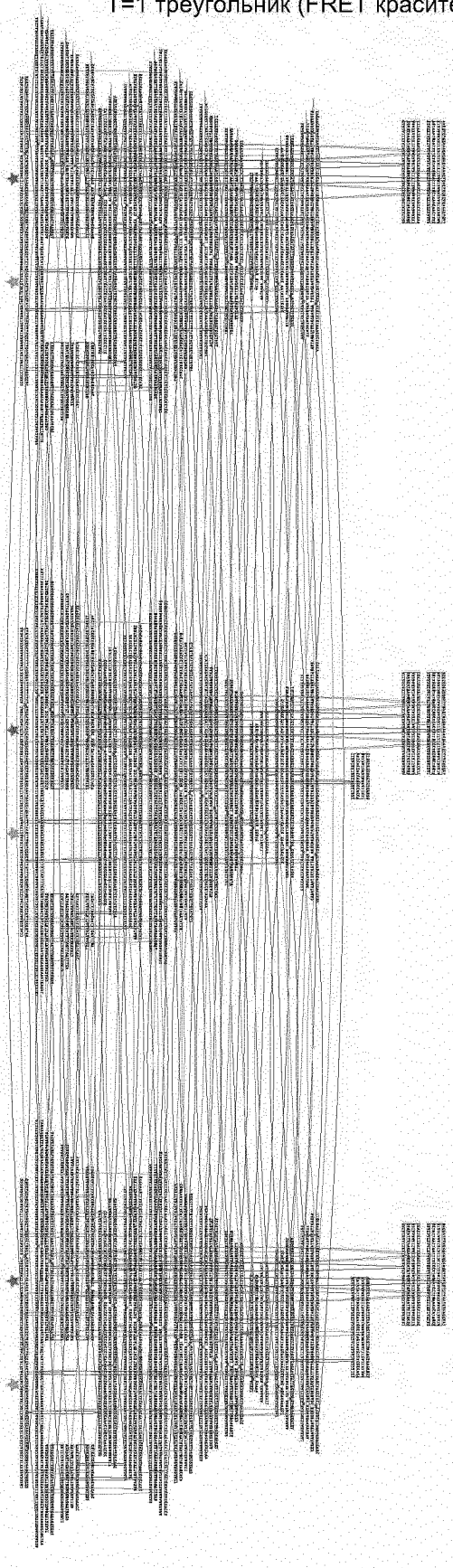


C Инкапсулированный скаффолд с ручками

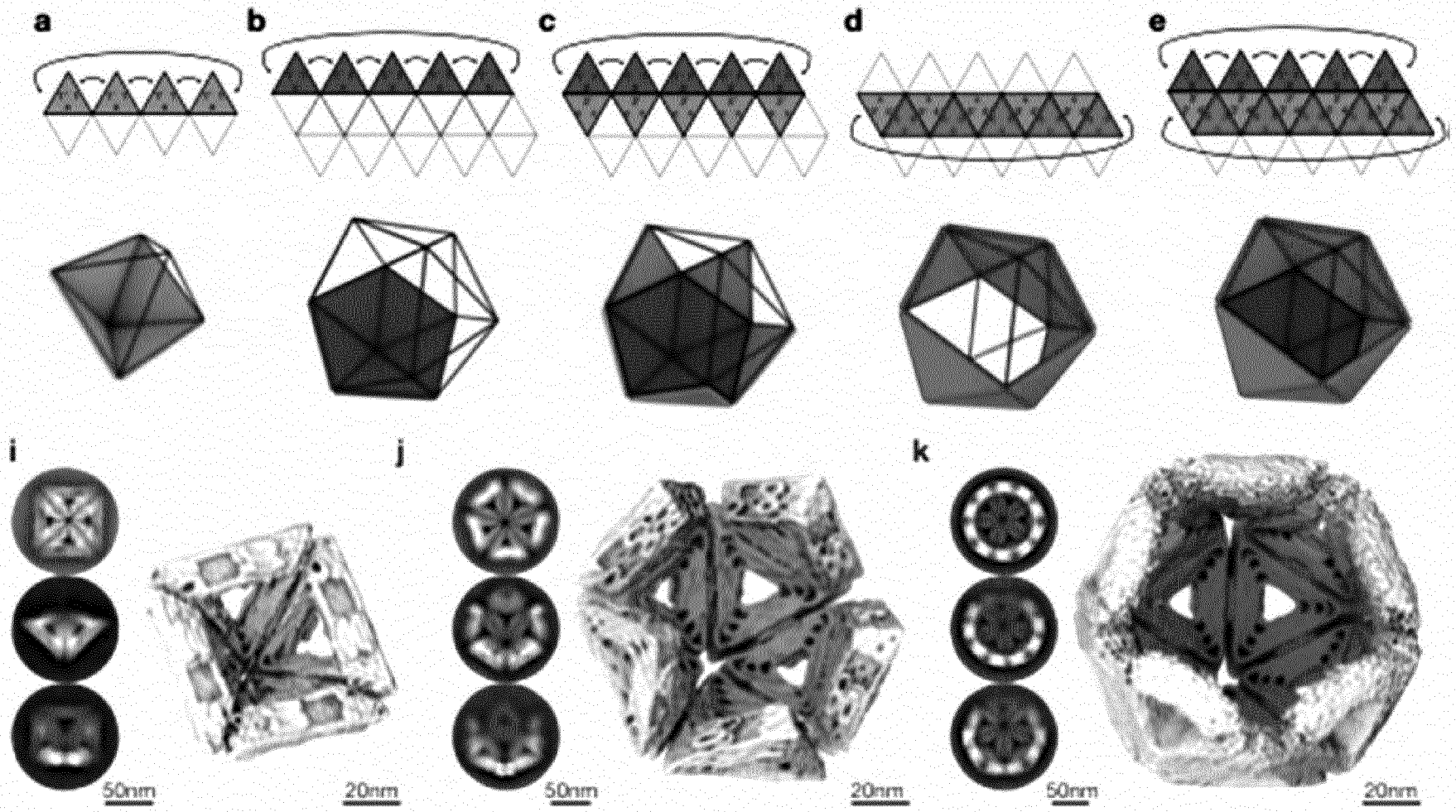


Фиг. 42

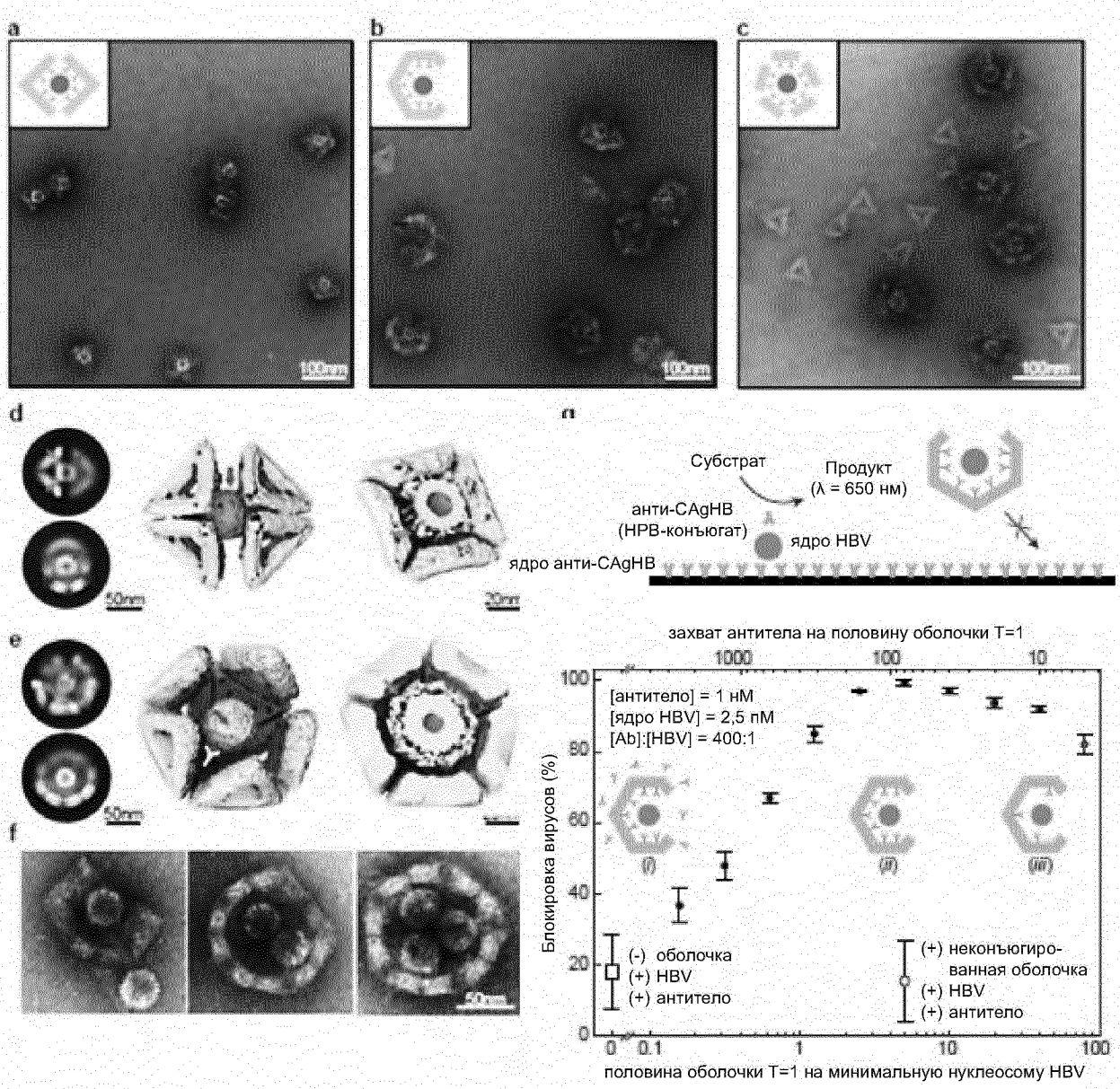
T=1 треугольник (FRET красители)



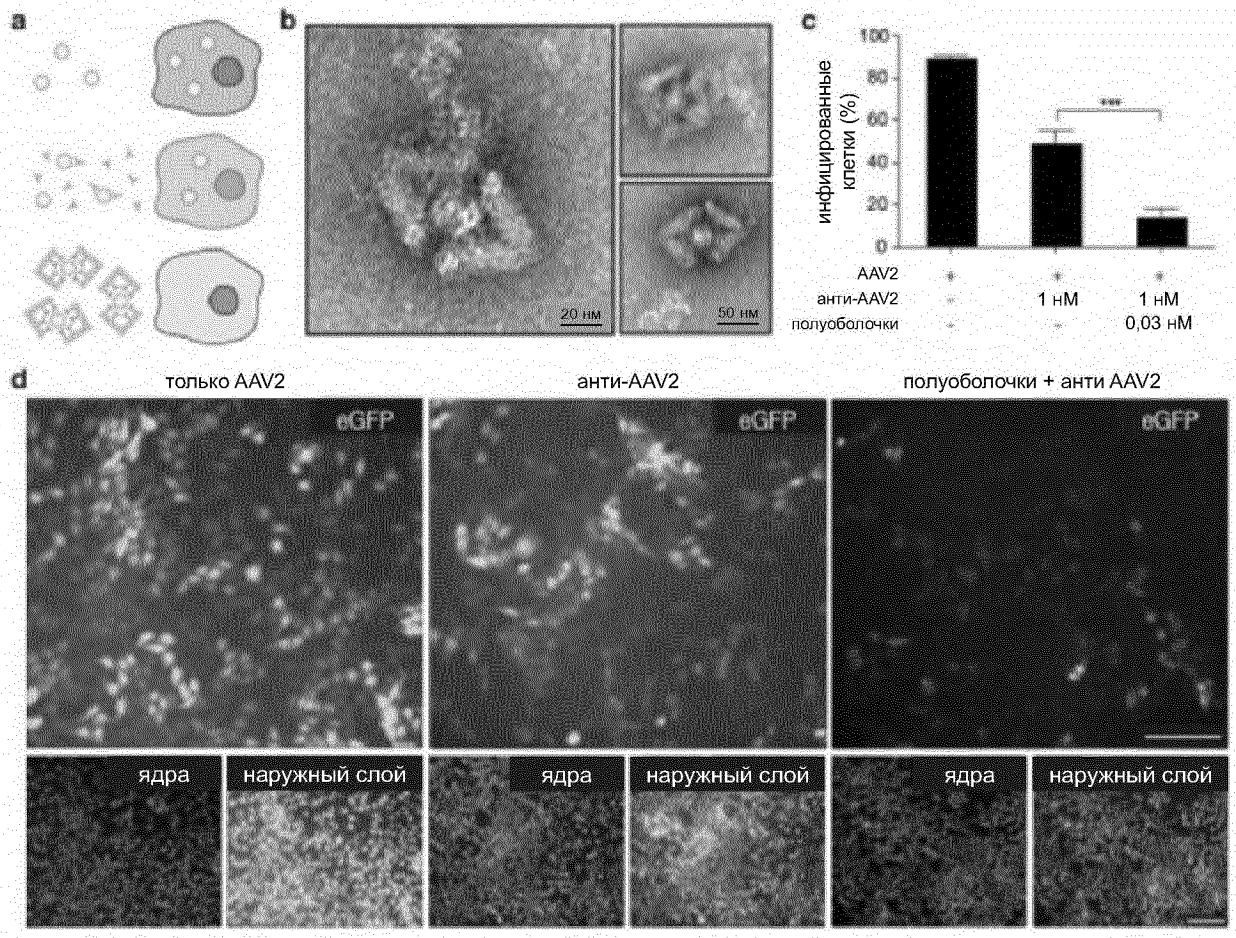
Фиг. 43



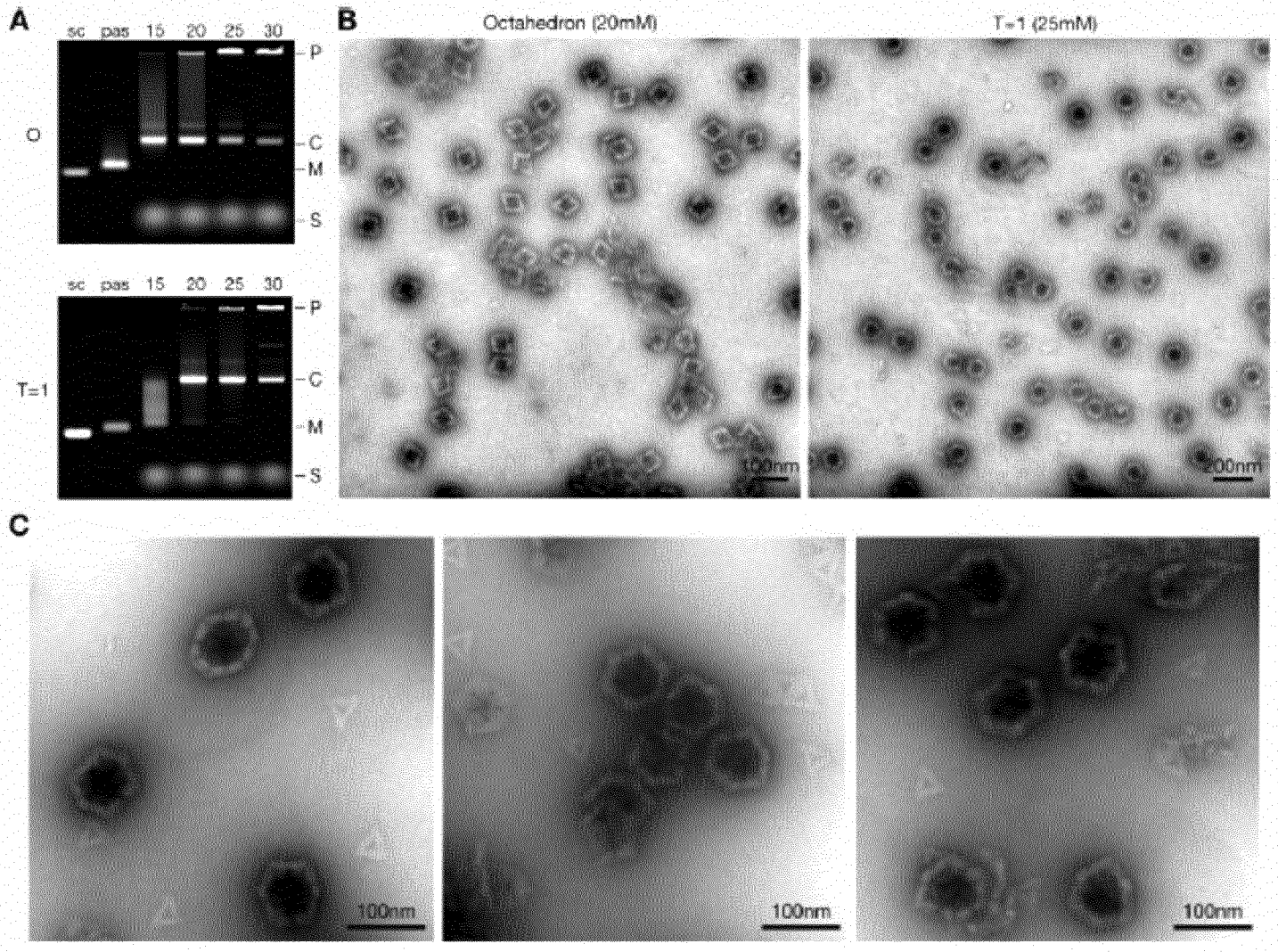
Фиг. 44


a
b
c
100nm
d
50nm
20nm
e
50nm
f
50nm
g
Субстрат
Продукт
(λ = 650 нм)
анти-CAgHB
(HPB-конъюгат)
ядро HBV
ядро анти-CAgHB
захват антитела на половину оболочки T=1
1000
100
10
[антитело] = 1 нМ
[ядро HBV] = 2,5 пМ
[Ab]:[HBV] = 400:1
Блокировка вирусов (%)
(i)
(ii)
(iii)
(-) оболочка
(+) HBV
(+) антитело
(+) неконъюгиро-
ванная оболочка
(+) HBV
(+) антитело
0
0.1
1
10
100
половина оболочки T=1 на минимальную нуклеосому HBV

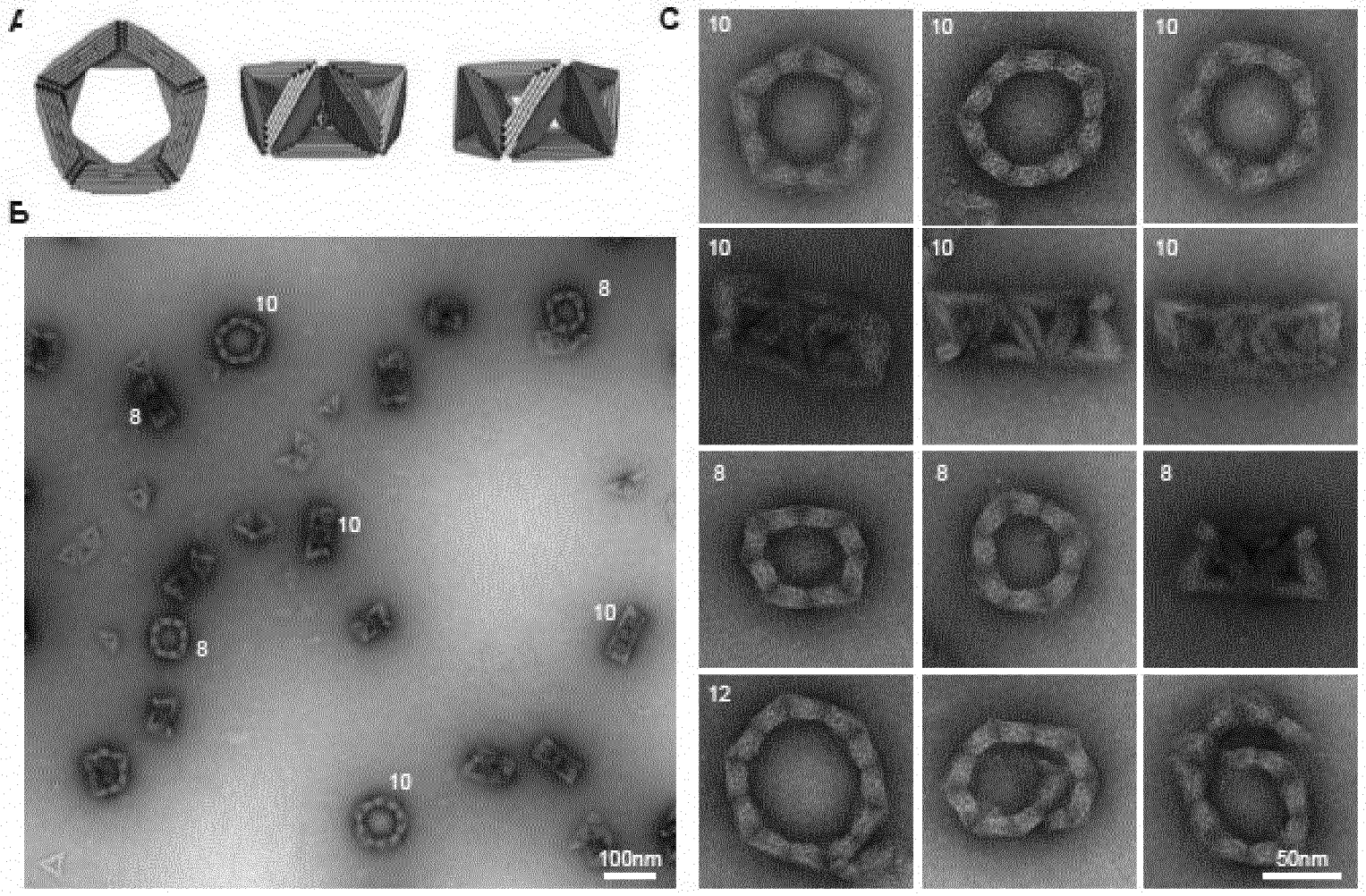
Фиг. 45


a
b
20 нм
50 нм
c
инфицированные клетки (%)
100
80
60
40
20
0
***
AAV2
анти-AAV2
полуоболочки
1 нМ
1 нМ
0,03 нМ
d
только AAV2
анти-AAV2
полуоболочки + анти AAV2
eGFP
eGFP
eGFP
ядра
наружный слой
ядра
наружный слой
ядра
наружный слой

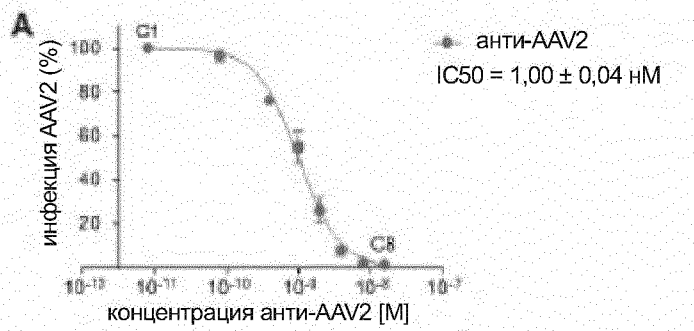
Фиг. 46


A
sc pas 15 20 25 30
O
P
C
M
S
sc pas 15 20 25 30
T=1
P
C
M
S
B
Octahedron (20mM)
T=1 (25mM)
100nm
200nm
C
100nm
100nm
100nm

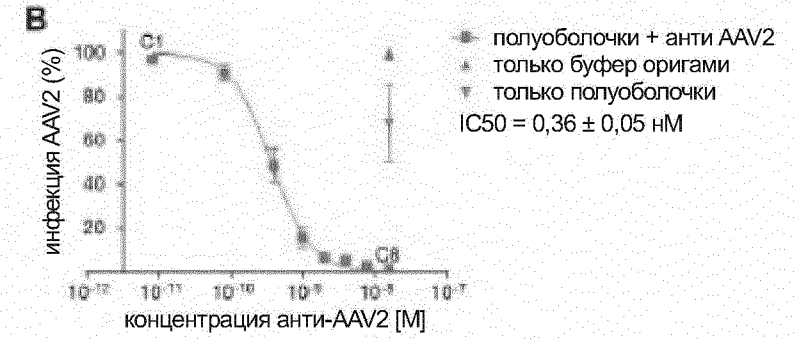
Фиг. 47



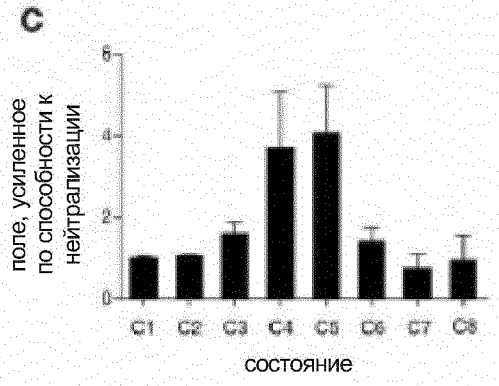
Фиг. 48

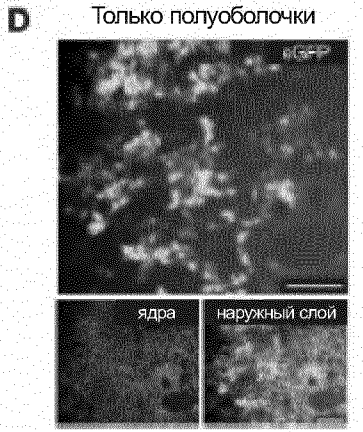


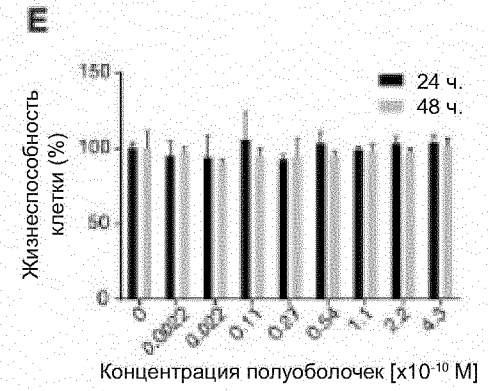
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
анти-AAV2: AAV2	2	20	100	250	500	1000	2000	4000



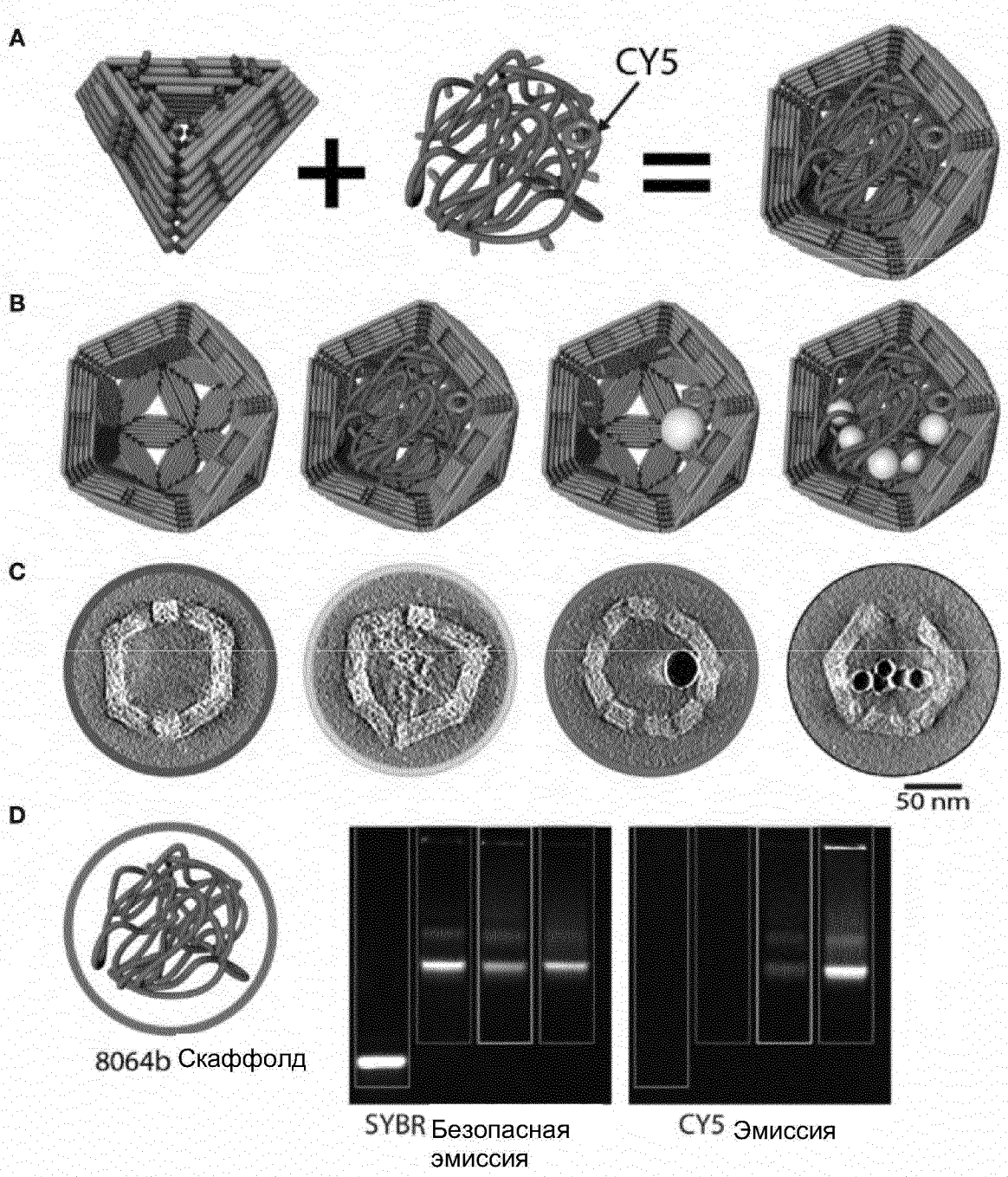
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8
анти-AAV2: полуоболочки	36	36	36	36	36	36	36	36
полуоболочки: AAV2	0.05	0.5	2.5	7	14	28	56	110



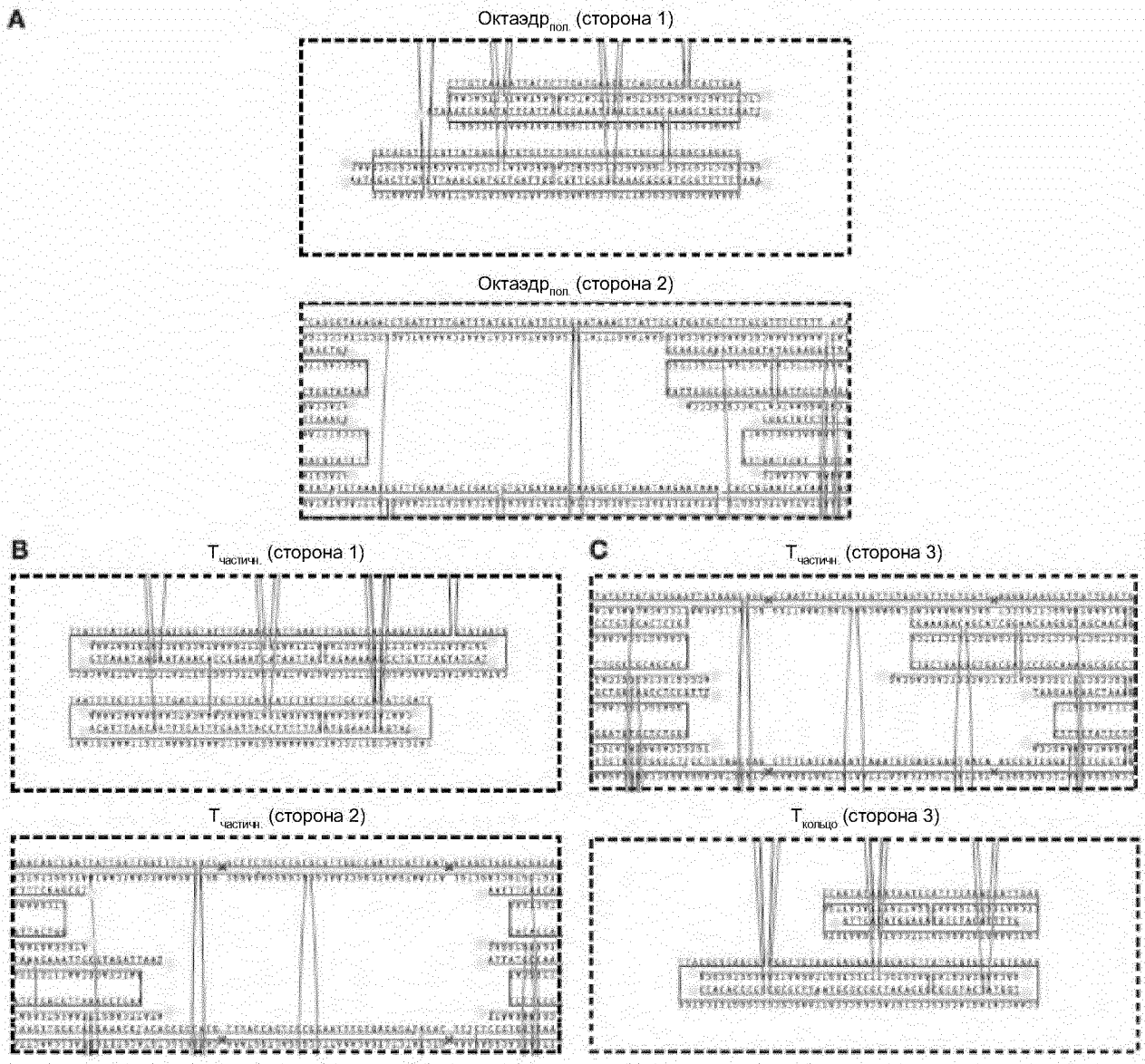




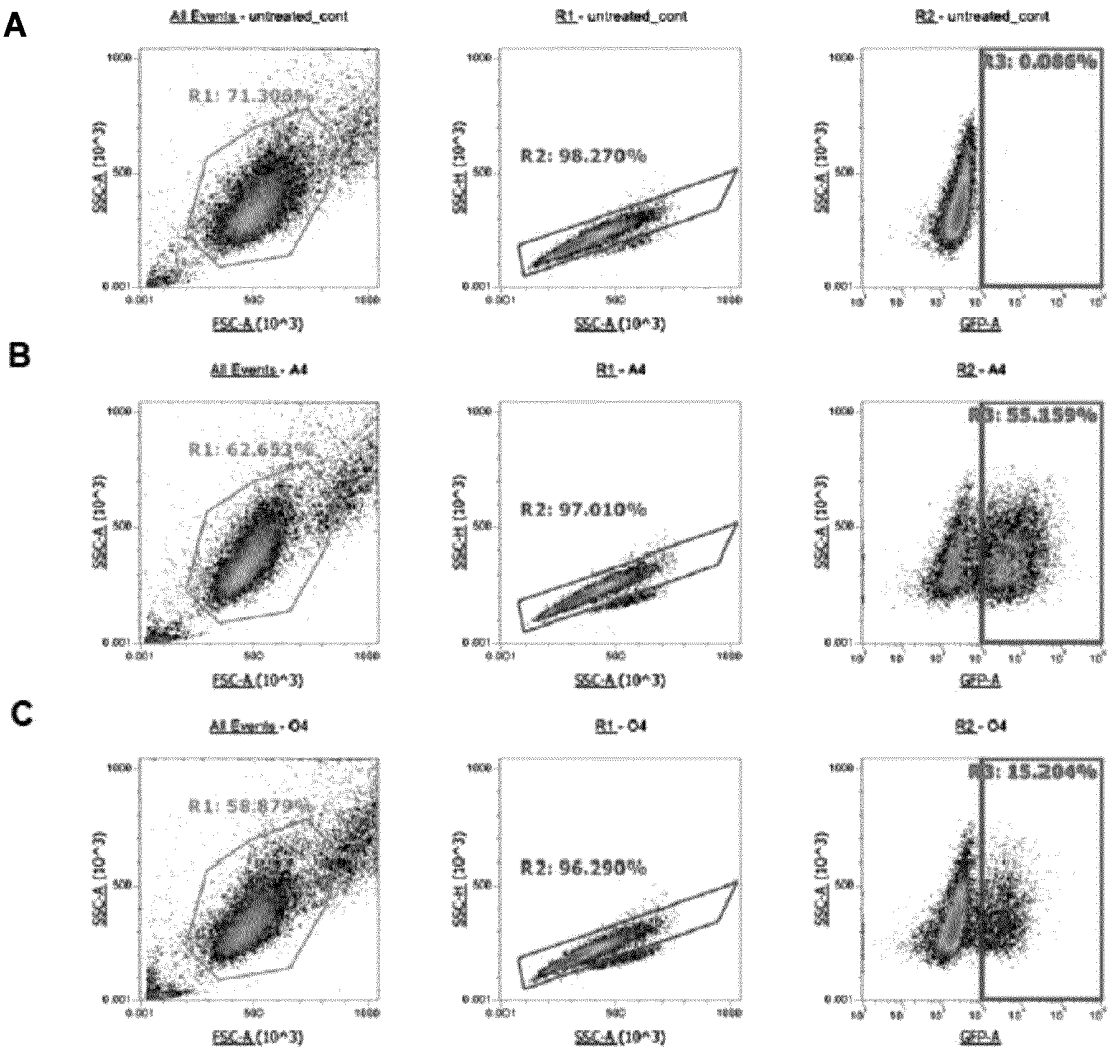
Фиг. 49


A
CY5
B
C
50 nm
D
8064b Скаффолд
SYBR Безопасная эмиссия
CY5 Эмиссия

Фиг. 50


A
Октаэдр$_{пол.}$ (сторона 1)
Октаэдр$_{пол.}$ (сторона 2)
B
$T_{частич.}$ (сторона 1)
$T_{частич.}$ (сторона 2)
C
$T_{частич.}$ (сторона 3)
$T_{кольцо}$ (сторона 3)

Фиг. 51


A
All Events - untreated_cont
R1: 71.3088%
R1 - untreated_cont
R2: 98.270%
R2 - untreated_cont
R3: 0.066%
B
All Events - A4
R1: 62.693%
R1 - A4
R2: 97.010%
R2 - A4
R3: 55.159%
C
All Events - O4
R1: 58.879%
R1 - O4
R2: 96.250%
R2 - O4
R3: 15.204%
SSC-A (10^3)
FSC-A (10^3)
SSC-H (10^3)
GFP-A

Фиг. 52