



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0028997
(43) 공개일자 2020년03월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07F 7/00 (2006.01) C07F 11/00 (2006.01)
C07F 15/02 (2006.01) C07F 5/06 (2006.01)
C12N 15/11 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07F 7/003 (2018.08)
C07F 11/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7004035
(22) 출원일자(국제) 2018년07월13일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년02월11일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/042050
(87) 국제공개번호 WO 2019/032241
국제공개일자 2019년02월14일
(30) 우선권주장
62/532,241 2017년07월13일 미국(US)

(71) 출원인
노오쓰웨스턴 유니버시티
미국 일리노이 60208 에반스톤클라크 스트리트 633
(72) 발명자
머킨 채드 에이.
미국 60091 일리노이주 윌멧 웨스트 블랙호크 로드 2737
왕 순치
미국 60201 일리노이주 에반스톤 아파트 3엔 1923
서먼 에비뉴
(74) 대리인
유미특허법인

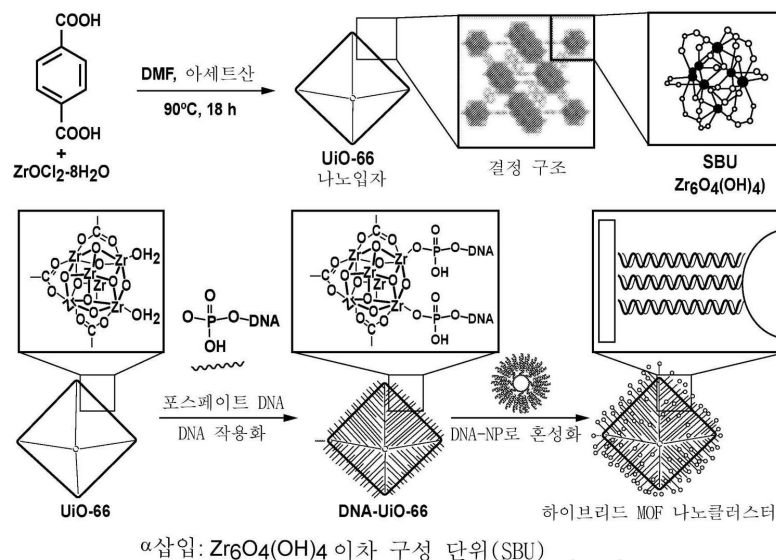
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 올리고뉴클레오타이드-작용화된 금속-유기 프레임워크 나노입자를 제조하는 일반적인 직접적인 방법

(57) 요약

본 개시내용은 일반적으로 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 금속-유기 프레임워크 나노입자, 이를 제조하는 방법, 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07F 15/02 (2013.01)

C07F 5/06 (2013.01)

C12N 15/111 (2013.01)

C12N 2310/351 (2013.01)

C12N 2320/32 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

올리고뉴클레오타이드-작용화된 금속-유기 프레임워크 (MOF) 나노입자로서,

올리고뉴클레오타이드는 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드이고, 포스페이트는 MOF 나노입자의 금속 이온과 금속-포스페이트 결합을 형성하는, 올리고뉴클레오타이드-작용화된 금속-유기 프레임워크 (MOF) 나노입자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 MOF 나노입자는 지르코늄 (Zr), 크롬 (Cr), 철 (Fe), 및/또는 알루미늄 (Al)을 포함하는, 나노입자.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 MOF는 UiO-66, UiO-67-bpy, UiO68-N₃/PCN-58, PCN-222/MOF-545, PCN-223, PCN-224, MIL-101 (Al), MIL-101 (Fe), 또는 MIL-101(Cr)을 포함하는, 나노입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 3' 말단 상에 포스페이트기를 갖는, 나노입자.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 5' 말단 상에 포스페이트기를 갖는, 나노입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 펩타이드, 단백질, 나노입자, 항체, 소분자, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 제제를 더 포함하고, 상기 제제는 나노입자에 캡슐화되는, 나노입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 (GGT)_n 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 n은 2 내지 20인, 나노입자.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, MOF 나노입자의 표면 상의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드의 밀도는 약 2 pmol/cm² 내지 약 24 pmol/cm²인, 나노입자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 MOF 나노입자는 표면 상에 복수의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드는 유전자 발현을 조절하는, 나노입자.

청구항 10

제9항에 있어서, 적어도 하나의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인, 나노입자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 RNA인, 나노입자.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 RNA는 작은 간섭 RNA (siRNA)인, 나노입자.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 하나의 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 제조하는 방법으로서,

(a) 금속 이온과 다중-덴테이트 리간드를 혼합하여 MOF 나노입자를 형성하는 단계; 및

(b) MOF 나노입자를 복수의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 생성함으로써, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트기가 금속-포스페이트 결합을 통해 MOF 나노입자 표면상의 불포화 배위 금속 부위 (CUS)와 결합되도록 하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 2, 3, 또는 4개의 배위 작용기를 포함하는, 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 이중-덴테이트 리간드인, 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 삼중-덴테이트 리간드인, 방법.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 적어도 하나의 카복실레이트 작용기를 포함하는, 방법.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 적어도 하나의 고리 질소를 갖는 적어도 하나의 복소환형기를 포함하는, 방법.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 포름산, 아세트산, 옥살산, 프로판산, 부탄산, (E)-부테인산, 벤젠-1,4-디카복실산, 벤젠-1,3-디카복실산, 벤젠-1,3,5-트리카복실산, 2-아미노-1,4-벤젠디카복실산, 2-브로모-1,4-벤젠디카복실산, 바이페닐-4,4'-디카복실산, 바이페닐-3,3',5,5'-테트라카복실산, 바이페닐-3,4',5-트리카복실산, 2,5-디하이드록시-1,4-벤젠디카복실산, 1,3,5-트리스(4-카복시페닐)벤젠, (2E,4E)-헥사-2,4-디엔산, 1,4-나프탈렌디카복실산, 피렌-2,7-디카복실산, 4,5,9,10-테트라하이드로피렌-2,7-디카복실산, 아스파르트산, 글루탐산, 아데닌, 4,4'-바이피리딘, 피리미딘, 피라진, 피리딘-4-카복실산, 피리딘-3-카복실산, 이미다졸, 1H-벤즈이미다졸, 2-메틸-1H-이미다졸, 또는 이들의 혼합물을 포함하는, 방법.

청구항 20

제13항에 있어서, 상기 다중-덴테이트 리간드는 테레프탈산 (H_2BDC), 2,2'-바이피리딘-5,5'-디카복실산 (H_2BPY), 2',5'-비스(아지도메틸)-[1,1':4',1''-테르페닐]-4,4''-디카복실산, ($H_2TPDC-N_3$), 4,4',4'',4'''-포르피린 테트라벤조산 (H_2TCPP), 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 21

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 금속 이온은 12-연결 Zr_3 클러스터, 6-연결 Zr_3 클러스터,

8-연결 Zr_3 클러스터, Cr_3 클러스터, Fe_3 클러스터, Al_3 클러스터, 또는 이들의 조합을 포함하는, 방법.

청구항 22

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 단계 (b) 이전에 MOF 나노입자를 제제와 접촉시켜 제제를 나노입자에 캡슐화하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 23

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 염 용액을 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자에 첨가하는 단계 (d)를 더 포함하고, 단계 (d)는 단계 (c) 후인, 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 염 용액은 0.5 M의 최종 농도로 첨가되는 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 하나 이상의 나노입자와 접촉시키는 단계 (e)를 추가로 포함하고, 각각의 상기 하나 이상의 나노입자는 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자의 표면 상에 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하기에 충분히 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 단계 (e)는 단계 (d) 후인, 방법.

청구항 26

표적 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부에 상보적인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드와 유전자를 인코딩하는 표적 폴리뉴클레오타이드를 혼성화하는 것을 포함하는 유전자의 발현을 억제하는 방법으로,

상기 올리고뉴클레오타이드는 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 나노입자의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드이고, 상기 표적 폴리뉴클레오타이드와 상기 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드 사이의 혼성화는 유전자 산물의 발현을 억제하기에 충분한 상보성의 정도로 표적 폴리뉴클레오타이드의 길이에 걸쳐 일어나는, 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 유전자 산물의 발현은 *생체내*에서 억제되는 방법.

청구항 28

제26항에 있어서, 상기 유전자 산물의 발현은 *시험관내*에서 억제되는 방법.

청구항 29

톨-유사 수용체 (TLR)의 활성을 상향조절하는 방법으로서, 상기 TLR을 갖는 세포를 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 30

제29항에 있어서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 TLR 작용제를 포함하는, 방법.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 상기 TLR은 톨-유사 수용체 1 (TLR1), 톨-유사 수용체 2 (TLR2), 톨-유사 수용체 3 (TLR3), 톨-유사 수용체 4 (TLR4), 톨-유사 수용체 5 (TLR5), 톨-유사 수용체 6 (TLR6), 톨-유사 수용체 7 (TLR7), 톨-유사 수용체 8 (TLR8), 톨-유사 수용체 9 (TLR9), 톨-유사 수용체 10 (TLR10), 톨-유사 수용체 11 (TLR11), 톨-유사 수용체 12 (TLR12), 및 톨-유사 수용체 13 (TLR13)으로 구성된 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, *시험관내*에서 수행되는, 방법.

청구항 33

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 생체내에서 수행되는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 정부 지원의 서술

[0002] 본 발명은 미국 공군과학연구소에 의해 수여된 FA9550-14-1-0274; 육군연구부서에 의해 수여된 W911NF-15-1-0151; 국립 과학 재단에 의해 수여된 DMR1121262; 및 국립 보건원에 의해 수여된 U54 CA199091 하에서 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 대해 소정의 권리를 가진다.

[0003] 전자 제출된 자료의 참조에 의한 통합

[0004] 본원은 개시내용의 별도의 부분으로 컴퓨터 판독가능한 형태로 서열목록 (파일명: 2017-128_Seqlisting.txt; 크기: 4,923 바이트; 생성: 2018년 7월 12일)을 함유하고, 이것은 전체적으로 참고로 포함된다.

[0005] 기술분야

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드를 함유하는 금속-유기 프레임워크 나노입자, 이를 제조하는 방법, 및 이를 사용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0007] DNA는 그것의 프로그래밍가능하고 서열-특이적 상호작용의 장점에 의해 나노물질을 변형시키기 위한 다용도이고 강력한 리간드라는 것이 알려져 있다.¹⁻³ 예를 들어, 구형 나노입자 (NP) 상에 DNA를 조밀하게 작용화함으로써, 올리고뉴클레오타이드 (3'-5' 또는 5'-3')를 배향시키고 구형 핵산-나노입자 콘주게이트 (SNA)를 생성할 수 있어,⁴ 연구 및 의학에서의 다양한 적용을 가능하게 하는 흔치않은 생물학적 특성을 나타낸다. 사실상, 유전자 조절을 위한 많은 생체진단 시스템 및 치료적 리드 화합물이 현재 SNA를 기반으로 하고 있다.^{5,6} 또한, 이들은 DNA-프로그래밍가능한 어셈블리의 개념을 기반으로 하는 결정 엔지니어링 접근법에 대한 중심 구축 블록이 되었다.⁷⁻⁹ 지금까지는, DNA로 귀금속,^{1,2,10} 옥사이드,¹¹ 양자점 나노입자를 변형시키기 위한 몇 개의 접근법이 개발되었다.¹² 그러나, 선호되는 말단-상 방식에서 올리고뉴클레오타이드로 MOF 나노입자를 직접적으로 변형시키기 위한 일반적인 방식은 없다. 사실상, 모든 이전의 접근법은 비특이적 상호작용, 예컨대 정전 흡착 및 반데르발스 상호작용을 이용하였거나,^{13,14} 또는 DNA와 작용화 이전에 입자 표면 상에 반드시 고정화되어 있는 커플링제를 요구하여,^{15,16} 낮은 제어 및 일반성을 초래한다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. Nature 1996, 382, 607.

(비특허문헌 0002) Alivisatos, A. P.; Johnsson, K. P.; Peng, X. G.; Wilson, T. E.; Loweth, C. J.; Bruchez, M. P.; Schultz, P. G. Nature 1996, 382, 609.

(비특허문헌 0003) Jones, M. R.; Seeman, N. C.; Mirkin, C. A. Science 2015, 347, 1260901.

(비특허문헌 0004) Cutler, J. I.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 1376.

(비특허문헌 0005) Seferos, D. S.; Giljohann, D. A.; Hill, H. D.; Prigodich, A. E.; Mirkin, C. A. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 15477.

(비특허문헌 0006) Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. Science 2006, 312, 1027.

- (비특허문헌 0007) Park, S. Y.; Lytton-Jean, A. K. R.; Lee, B.; Weigand, S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. *Nature* 2008, 451, 553.
- (비특허문헌 0008) Nykypanchuk, D.; Maye, M. M.; van der Lelie, D.; Gang, O. *Nature* 2008, 451, 549.
- (비특허문헌 0009) Macfarlane, R. J.; Lee, B.; Jones, M. R.; Harris, N.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. *Science* 2011, 334, 204.
- (비특허문헌 0010) Cai, H.; Xu, Y.; Zhu, N. N.; He, P. G.; Fang, Y. Z. *Analyst* 2002, 127, 803.
- (비특허문헌 0011) Grancharov, S. G.; Zeng, H.; Sun, S. H.; Wang, S. X.; O'Brien, S.; Murray, C. B.; Kirtley, J. R.; Held, G. A. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 13030.
- (비특허문헌 0012) Zhang, C.; Macfarlane, R. J.; Young, K. L.; Choi, C. H. J.; Hao, L. L.; Auyeung, E.; Liu, G. L.; Zhou, X. Z.; Mirkin, C. A. *Nat. Mater.* 2013, 12, 741.
- (비특허문헌 0013) Zhang, H. T.; Zhang, J. W.; Huang, G.; Du, Z. Y.; Jiang, H. L. *Chem. Commun.* 2014, 50, 12069.
- (비특허문헌 0014) He, C. B.; Lu, K. D.; Liu, D. M.; Lin, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 5181.
- (비특허문헌 0015) Morris, W.; Briley, W. E.; Auyeung, E.; Cabezas, M. D.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 7261.
- (비특허문헌 0016) Kahn, J. S.; Freage, L.; Enkin, N.; Garcia, M. A. A.; Willner, I. *Adv. Mater.* 2017, 29, 1602782.
- (비특허문헌 0017) Hwang, Y. K.; Hong, D. Y.; Chang, J. S.; Jhung, S. H.; Seo, Y. K.; Kim, J.; Vimont, A.; Daturi, M.; Serre, C.; Ferey, G. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2008, 47, 4144.
- (비특허문헌 0018) Wang, S. Z.; Morris, W.; Liu, Y. Y.; McGuirk, C. M.; Zhou, Y.; Hupp, J. T.; Farha, O. K.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2015, 54, 14738.
- (비특허문헌 0019) Roder, R.; Preiss, T.; Hirschle, P.; Steinborn, B.; Zimpel, A.; Hohn, M.; Radler, J. O.; Bein, T.; Wagner, E.; Wuttke, S.; Lachelt, U. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 2359.
- (비특허문헌 0020) McGuire, C. V.; Forgan, R. S. *Chem. Commun.* 2015, 51, 5199.
- (비특허문헌 0021) Doonan, C.; Ricco, R.; Liang, K.; Bradshaw, D.; Falcaro, P. *Acc. Chem. Res.* 2017, 50, 1423.
- (비특허문헌 0022) Cavka, J. H.; Jakobsen, S.; Olsbye, U.; Guillou, N.; Lamberti, C.; Bordiga, S.; Lillerud, K. P. *J. Am. Chem. Soc.* 2008, 130, 13850.
- (비특허문헌 0023) Nakayama, H.; Eguchi, T.; Nakamura, N.; Yamaguchi, S.; Danjyo, M.; Tsuhako, M. *J. Mater. Chem.* 1997, 7, 1063.
- (비특허문헌 0024) Nonglaton, G.; Benitez, I. O.; Guisle, I.; Pipelier, M.; Leger, J.; Dubreuil, D.; Tellier, C.; Talham, D. R.; Bujoli, B. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 1497.
- (비특허문헌 0025) Horcajada, P.; Chalati, T.; Serre, C.; Gillet, B.; Sebric, C.; Baati, T.; Eubank, J. F.; Heurtaux, D.; Clayette, P.; Kreuz, C.; Chang, J. S.; Hwang, Y. K.; Marsaud, V.; Bories, P. N.; Cynober, L.; Gil, S.; Ferey, G.; Couvreur, P.; Gref, R. *Nat. Mater.* 2010, 9, 172.
- (비특허문헌 0026) He, C. B.; Liu, D. M.; Lin, W. B. *Chem. Rev.* 2015, 115, 11079.
- (비특허문헌 0027) Shearer, G. C.; Chavan, S.; Bordiga, S.; Svelle, S.; Olsbye, U.; Lillerud, K. P. *Chem. Mater.* 2016, 28, 3749.
- (비특허문헌 0028) Cottrell, T. L. *The strengths of chemical bonds*; Butterworth Scientific Publications: London, 1954; p 310.
- (비특허문헌 0029) Auyeung, E.; Macfarlane, R. J.; Choi, C. H. J.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. *Adv.*

Mater. 2012, 24, 5181.

(비특허문헌 0030) Langer, R.; Tirrell, D. A. Nature 2004, 428, 487.

(비특허문헌 0031) Brodin, J. D.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2015, 112, 4564.

(비특허문헌 0032) Bergman, D. J.; Stockman, M. I. Phys. Rev. Lett. 2003, 90, 90.

(비특허문헌 0033) Jiang, H. L.; Feng, D. W.; Liu, T. F.; Li, J. R.; Zhou, H. C. J. Am. Chem. Soc. 2012, 134, 14690-14693.

(비특허문헌 0034) Kelty, M. L.; Morris, W.; Gallagher, A. T.; Anderson, J. S.; Brown, K. A.; Mirkin, C. A.; Harris, T. D. Chem. Commun. 2016, 52, 7854-7857.

(비특허문헌 0035) Park, J.; Jiang, Q.; Feng, D. W.; Mao, L. Q.; Zhou, H. C. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 3518-3525.

(비특허문헌 0036) Jiang, D. M.; Burrows, A. D.; Edler, K. J. Crystengcomm 2011, 13, 6916-6919.

(비특허문헌 0037) Taylor-Pashow, K. M. L.; Della Rocca, J.; Xie, Z. G.; Tran, S.; Lin, W. B. J. Am. Chem. Soc. 2009, 131, 14261-+.

(비특허문헌 0038) O'Brien, M. N.; Jones, M. R.; Brown, K. A.; Mirkin, C. A. J. Am. Chem. Soc. 2014, 136, 7603-7606.

(비특허문헌 0039) Kumar, P. S.; Pastoriza-Santos, I.; Rodriguez-Gonzalez, B.; Garcia de Abajo, F. J.; LizMarzan, L. M. Nanotechnology 2008, 19.

(비특허문헌 0040) Hurst, S. J.; Lytton-Jean, A. K. R.; Mirkin, C. A. Anal. Chem. 2006, 78, 8313-8318.

(비특허문헌 0041) Zhang, C.; Macfarlane, R. J.; Young, K. L.; Choi, C. H. J.; Hao, L. L.; Auyeung, E.; Liu, G. L.; Zhou, X. Z.; Mirkin, C. A. Nat. Mater. 2013, 12, 741-746.

(비특허문헌 0042) Auyeung, E.; Macfarlane, R. J.; Choi, C. H. J.; Cutler, J. I.; Mirkin, C. A. Adv. Mater. 2012, 24, 5181-5186.

(비특허문헌 0043) Li, P.; Klet, R. C.; Moon, S. Y.; Wang, T. C.; Deria, P.; Peters, A. W.; Klahr, B. M.; Park, H. J.; Al-Juaid, S. S.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. Chem. Commun. 2015, 51, 10925.

(비특허문헌 0044) Kelty, M. L.; Morris, W.; Gallagher, A. T.; Anderson, J. S.; Brown, K. A.; Mirkin, C. A.; Harris, T. D. Chem. Commun. 2016, 52, 7854.

(비특허문헌 0045) Chen, Y.; Li, P.; Modica, J. A.; Drout, R. J.; Farha, O. K. J Am Chem Soc 2018, 140, 5678.

(비특허문헌 0046) Wang, S. Z.; McGuirk, C. M.; Ross, M. B.; Wang, S. Y.; Chen, P. C.; Xing, H.; Liu, Y.; Mirkin, C. A. J. Am. Chem. Soc. 2017, 139, 9827.

(비특허문헌 0047) D'Astolfo, D. S.; Pagliero, R. J.; Pras, A.; Karthaus, W. R.; Clevers, H.; Prasad, V.; Lebbink, R. J.; Rehmann, H.; Geijsen, N. Cell 2015, 161, 674-690.

(비특허문헌 0048) Hoffman, R. M. Lancet Oncol. 2002, 3, 546-556.

(비특허문헌 0049) Torchilin, V. Drug Discovery Today: Technol. 2008, 5, e95-e103.

(비특허문헌 0050) Desnick, R. J.; Schuchman, E. H. Nat. Rev. Genet. 2002, 3, 954-966.

(비특허문헌 0051) Leader, B.; Baca, Q. J.; Golan, D. E. Nat. Rev. Drug Discovery 2008, 7, 21-39.

(비특허문헌 0052) Petros, R. A.; DeSimone, J. M. Nat. Rev. Drug Discovery 2010, 9, 615-627.

(비특허문헌 0053) Ghosh, P.; Yang, X. C.; Arvizo, R.; Zhu, Z. J.; Agasti, S. S.; Mo, Z. H.;

Rotello, V. M. J. Am. Chem. Soc. 2010, 132, 2642-2645.

(비특허문헌 0054) Gu, Z.; Biswas, A.; Zhao, M.; Tang, Y. Chem. Soc. Rev. 2011, 40, 3638-3655.

(비특허문헌 0055) Xu, X. M.; Costa, A.; Burgess, D. J. Pharm. Res. 2012, 29, 1919-1931.

(비특허문헌 0056) Schwarze, S. R.; Ho, A.; Vocero-Akbani, A.; Dowdy, S. F. Science 1999, 285, 1569-1572.

(비특허문헌 0057) Lawrence, M. S.; Phillips, K. J.; Liu, D. R. J. Am. Chem. Soc. 2007, 129, 10110-+.

(비특허문헌 0058) Cronican, J. J.; Thompson, D. B.; Beier, K. T.; McNaughton, B. R.; Cepko, C. L.; Liu, D. R. ACS Chem. Biol. 2010, 5, 747-752.

(비특허문헌 0059) Brodin, J. D.; Sprangers, A. J.; McMillan, J. R.; Mirkin, C. A. J. Am. Chem. Soc. 2015, 137, 14838-14841.

(비특허문헌 0060) Fu, A. L.; Tang, R.; Hardie, J.; Farkas, M. E.; Rotello, V. M. Bioconjugate Chem. 2014, 25, 1602-1608.

(비특허문헌 0061) Lykourinou, V.; Chen, Y.; Wang, X. S.; Meng, L.; Hoang, T.; Ming, L. J.; Musselman, R. L.; Ma, S. Q. J. Am. Chem. Soc. 2011, 133, 10382-10385.

(비특허문헌 0062) Shih, Y. H.; Lo, S. H.; Yang, N. S.; Singco, B.; Cheng, Y. J.; Wu, C. Y.; Chang, I. H.; Huang, H. Y.; Lin, C. H. Chempluschem 2012, 77, 982-986.

(비특허문헌 0063) Liang, K.; Ricco, R.; Doherty, C. M.; Styles, M. J.; Bell, S.; Kirby, N.; Mudie, S.; Haylock, D.; Hill, A. J.; Doonan, C. J.; Falcaro, P. Nat. Commun. 2015, 6, 7240.

(비특허문헌 0064) Li, P.; Moon, S. Y.; Guelta, M. A.; Harvey, S. P.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. J. Am. Chem. Soc. 2016, 138, 8052-8055.

(비특허문헌 0065) Doonan, C.; Ricco, R.; Liang, K.; Bradshaw, D.; Falcaro, P. Acc. Chem. Res. 2017, 50, 1423-1432.

(비특허문헌 0066) Lian, X. Z.; Fang, Y.; Joseph, E.; Wang, Q.; Li, J. L.; Banerjee, S.; Lollar, C.; Wang, X.; Zhou, H. C. Chem. Soc. Rev. 2017, 46, 3386-3401.

(비특허문헌 0067) Gkaniatsou, E.; Sicard, C.; Ricoux, R.; Mahy, J. P.; Steunou, N.; Serre, C. Mater. Horiz. 2017, 4, 55-63.

(비특허문헌 0068) Liu, W. L.; Lo, S. H.; Singco, B.; Yang, C. C.; Huang, H. Y.; Lin, C. H. J. Mater. Chem. B 2013, 1, 928-932.

(비특허문헌 0069) Cao, Y.; Wu, Z. F.; Wang, T.; Xiao, Y.; Huo, Q. S.; Liu, Y. L. Dalton Trans. 2016, 45, 6998-7003.

(비특허문헌 0070) Lian, X. Z.; Erazo-Oliveras, A.; Pellois, J. P.; Zhou, H. C. Nat. Commun. 2017, 8.

(비특허문헌 0071) Sindoro, M.; Yanai, N.; Jee, A. Y.; Granick, S. Acc. Chem. Res. 2014, 47, 459-469.

(비특허문헌 0072) Morris, W.; Wang, S. Z.; Cho, D.; Auyeung, E.; Li, P.; Farha, O. K.; Mirkin, C. A. ACS Appl. Mater. Interfaces 2017.

(비특허문헌 0073) Frohlich, E. Int. J. Nanomed. 2012, 7, 5577-5591.

(비특허문헌 0074) Baati, T.; Njim, L.; Neffati, F.; Kerkeni, A.; Bouttemi, M.; Gref, R.; Najjar, M. F.; Zakhama, A.; Couvreur, P.; Serre, C.; Horcajada, P. Chem. Sci. 2013, 4, 1597-1607.

(비특허문헌 0075) He, C. B.; Liu, D. M.; Lin, W. B. Chem. Rev. 2015, 115, 11079-11108.

- (비특허문헌 0076) Ruyra, A.; Yazdi, A.; Espin, J.; Carne-Sanchez, A.; Roher, N.; Lorenzo, J.; Imaz, I.; Maspoch, D. *Chem. - Eur. J.* 2015, 21, 2508-2518.
- (비특허문헌 0077) Morris, W.; Briley, W. E.; Auyeung, E.; Cabezas, M. D.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 7261-7264.
- (비특허문헌 0078) He, C. B.; Lu, K. D.; Liu, D. M.; Lin, W. B. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 5181-5184.
- (비특허문헌 0079) Mirkin, C. A.; Letsinger, R. L.; Mucic, R. C.; Storhoff, J. J. *Nature* 1996, 382, 607-609.
- (비특허문헌 0080) Cutler, J. I.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134, 1376-1391.
- (비특허문헌 0081) Patel, P. C.; Giljohann, D. A.; Daniel, W. L.; Zheng, D.; Prigodich, A. E.; Mirkin, C. A. *Bioconjugate Chem.* 2010, 21, 2250-2256.
- (비특허문헌 0082) Choi, C. H. J.; Hao, L. L.; Narayan, S. P.; Auyeung, E.; Mirkin, C. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013, 110, 7625-7630.
- (비특허문헌 0083) Young, K. L.; Scott, A. W.; Hao, L. L.; Mirkin, S. E.; Liu, G. L.; Mirkin, C. A. *Nano Lett.* 2012, 12, 3867-3871.
- (비특허문헌 0084) Banga, R. J.; Chernyak, N.; Narayan, S. P.; Nguyen, S. T.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2014, 136, 9866-9869.
- (비특허문헌 0085) Calabrese, C. M.; Merkel, T. J.; Briley, W. E.; Randeria, P. S.; Narayan, S. P.; Rouge, J. L.; Walker, D. A.; Scott, A. W.; Mirkin, C. A. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2015, 54, 476-480.
- (비특허문헌 0086) Rosi, N. L.; Mirkin, C. A. *Chem. Rev.* 2005, 105, 1547-1562.
- (비특허문헌 0087) Rosi, N. L.; Giljohann, D. A.; Thaxton, C. S.; Lytton-Jean, A. K. R.; Han, M. S.; Mirkin, C. A. *Science* 2006, 312, 1027-1030.
- (비특허문헌 0088) Radovic-Moreno, A. F.; Chernyak, N.; Mader, C. C.; Nallagatla, S.; Kang, R. S.; Hao, L. L.; Walker, D. A.; Halo, T. L.; Merkel, T. J.; Rische, C. H.; Anantmula, S.; Burkhardt, M.; Mirkin, C. A.; Gryaznov, S. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2015, 112, 3892-3897.
- (비특허문헌 0089) Mondloch, J. E.; Bury, W.; Fairen-Jimenez, D.; Kwon, S.; DeMarco, E. J.; Weston, M. H.; Sarjeant, A. A.; Nguyen, S. T.; Stair, P. C.; Snurr, R. Q.; Farha, O. K.; Hupp, J. T. *J. Am. Chem. Soc.* 2013, 135, 10294-10297.
- (비특허문헌 0090) Morris, W.; Voloskiy, B.; Demir, S.; Gandara, F.; McGrier, P. L.; Furukawa, H.; Cascio, D.; Stoddart, J. F.; Yaghi, O. M. *Inorg. Chem.* 2012, 51, 6443-6445.
- (비특허문헌 0091) Feng, D. W.; Gu, Z. Y.; Li, J. R.; Jiang, H. L.; Wei, Z. W.; Zhou, H. C. *Angew. Chem., Int. Ed.* 2012, 51, 10307-10310.
- (비특허문헌 0092) Chen, Y.; Li, P.; Modica, J. A.; Drout, R. J.; Farha, O. K. *J. Am. Chem. Soc.* 2018, 140, 5678-5681.
- (비특허문헌 0093) Li, P.; Modica, J. A.; Howarth, A. J.; Vargas, E. L.; Moghadam, P. Z.; Snurr, R. Q.; Mrksich, M.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. *Chem* 2016, 1, 154-169.
- (비특허문헌 0094) Li, P.; Klet, R. C.; Moon, S. Y.; Wang, T. C.; Deria, P.; Peters, A. W.; Klahr, B. M.; Park, H. J.; Al-Juaid, S. S.; Hupp, J. T.; Farha, O. K. *Chem. Commun.* 2015, 51, 10925-10928.
- (비특허문헌 0095) Kelty, M. L.; Morris, W.; Gallagher, A. T.; Anderson, J. S.; Brown, K. A.; Mirkin, C. A.; Harris, T. D. *Chem. Commun.* 2016, 52, 7854-7857.
- (비특허문헌 0096) Wang, S. Z.; McGuirk, C. M.; Ross, M. B.; Wang, S. Y.; Chen, P. C.; Xing, H.; Liu, Y.; Mirkin, C. A. *J. Am. Chem. Soc.* 2017, 139, 9827-9830.

(비특허문헌 0097) Narayan, S. P.; Choi, C. H. J.; Hao, L. L.; Calabrese, C. M.; Auyeung, E.; Zhang, C.; Goor, O. J. G. M.; Mirkin, C. A. *Small* 2015, 11, 4173-4182.

(비특허문헌 0098) Libanati, C. M.; Tandler, C. J. *J. Cell Biol.* 1969, 42, 754-765.

(비특허문헌 0099) Bansal, V. K., Serum Inorganic Phosphorus. In *Clinical Methods: The History, Physical, and Laboratory Examinations*, 2nd ed.; Walker, H. K.; Hall, W. D.; Hurst, J. W., Eds. Boston, 1990.

(비특허문헌 0100) Feng, D. W.; Liu, T. F.; Su, J.; Bosch, M.; Wei, Z. W.; Wan, W.; Yuan, D. Q.; Chen, Y. P.; Wang, X.; Wang, K. C.; Lian, X. Z.; Gu, Z. Y.; Park, J.; Zou, X. D.; Zhou, H. C. *Nat. Commun.* 2015, 6.

(비특허문헌 0101) Li, P.; Chen, Q.; Wang, T. C.; Vermeulen, N. A.; Mehdi, B. L.; Dohnalkova, A.; Browning, N. D.; Shen, D.; Anderson, R.; Gomez-Gualdrón, D. A.; Cetin, F. M.; Jagiello, J.; Asiri, A. M.; Stoddart, J. F.; Farha, O. K. *Chem* 2018, 4, 1022-1034.

발명의 내용

- [0009] 본 명세서에서는, 고밀도의 올리고뉴클레오타이드로 MOF 나노입자를 작용화하기 위한 일반적인 전략이 제공된다. 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드를 사용하여, MOF 나노입자 표면 상에 조밀한 불포화 배위 금속 부위 (CUS)가 화학적으로 처리될 수 있다.¹⁷⁻²¹ 고체상 핵자기 공명 (SSNMR) 분광법 및 분말 X-선 회절 (PXRD)은 MOF의 DNA-작용화가 금속-포스페이트 배위에 의해 발생하고 MOF 구조의 구조 완전성 및 다공성이 변형 후 보존된다는 것을 확인한다 (도 1). 일반성의 개념증명으로, 이 접근법은 4개의 금속 노드 (Zr, Fe, Cr, Al) 및 4개의 상이한 유기 링커를 특징으로 하는 일련의 9개의 상이한 MOF로 연장되었다.
- [0010] 따라서, 일부 양태에서 본 개시내용은 올리고뉴클레오타이드-작용화된 금속-유기 프레임워크 (MOF) 나노입자를 제공하고, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드이고, 포스페이트는 MOF 나노입자의 금속 이온과 금속-포스페이트 결합을 형성한다. 일부 구현예에서, MOF 나노입자는 지르코늄 (Zr), 크롬 (Cr), 철 (Fe), 및/또는 알루미늄 (Al)을 포함한다. 추가 구현예에서, MOF는 UiO-66, UiO-67-bpy, UiO68-N₃/PCN-58, PCN-222/MOF-545, PCN-223, PCN-224, MIL-101 (Al), MIL-101 (Fe), 또는 MIL-101(Cr)을 포함한다.
- [0011] 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 그것의 3' 말단상에 포스페이트기를 갖는다. 추가 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 그것의 5' 말단상에 포스페이트기를 갖는다. 일부 구현예에서, 본 개시내용의 나노입자는 펩타이드, 단백질, 나노입자, 항체, 소분자, 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택된 제제를 추가로 포함하고, 여기서 상기 제제는 나노입자에 캡슐화된다.
- [0012] 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 (GGT)_n 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 n은 2-20이다. 추가 구현예에서, MOF 나노입자의 표면상의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드의 밀도는 약 2 pmol/cm² 내지 약 24 pmol/cm²이다. 일부 구현예에서, MOF 나노입자는 그것의 표면에 복수의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 적어도 하나의 올리고뉴클레오타이드는 유전자 발현을 조절한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 추가 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 RNA이다. 또 추가의 구현예에서, RNA는 작은 간섭 RNA (siRNA)이다.
- [0013] 일부 양태에서, 본 개시내용은 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 제조하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 (a) 금속 이온과 다중-덴테이트 리간드를 혼합하여 MOF 나노입자를 형성하는 단계; 및 (b) MOF 나노입자를 복수의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드와 접촉시켜 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 생성함으로써, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드의 포스페이트기가 금속-포스페이트 결합을 통해 MOF 나노입자 표면상의 불포화 배위 금속 부위 (CUS)와 결합되도록 하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 2, 3, 또는 4 배위 작용기를 포함한다. 추가 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 이중-덴테이트 리간드이다. 또 추가의 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 삼중-덴테

이트 리간드이다. 일부 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 적어도 하나의 카복실레이트 작용기를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 적어도 하나의 고리 질소를 갖는 적어도 하나의 복소환형 그룹을 포함한다. 추가 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 포름산, 아세트산, 옥살산, 프로판산, 부탄이산, (E)-부텐이산, 벤젠-1, 4-디카복실산, 벤젠-1,3-디카복실산, 벤젠-1,3,5-트리카복실산, 2-아미노-1,4-벤젠디카복실산, 2-브로모-1,4-벤젠디카복실산, 바이페닐-4,4'-디카복실산, 바이페닐-3,3',5,5'-테트라카복실산, 바이페닐-3,4',5-트리카복실산, 2,5-디하이드록시-1,4-벤젠디카복실산, 1,3,5-트리스(4-카복시페닐)벤젠, (2E,4E)-헥사-2,4-디엔이산, 1,4-나프탈렌디카복실산, 피렌-2,7-디카복실산, 4,5,9,10-테트라하이드로피렌-2,7-디카복실산, 아스파르트산, 글루탐산, 아테닌, 4,4'-바이피리딘, 피리미딘, 피라진, 피리딘-4-카복실산, 피리딘-3-카복실산, 이미다졸, 1H-벤즈이미다졸, 2-메틸-1H-이미다졸, 또는 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, 다중-덴테이트 리간드는 테레프탈산 (H_2BDC), 2,2'-바이피리딘-5,5'-디카복실산 (H_2BPY), 2',5'-비스(아지도메틸)-[1,1':4',1''-테르페닐]-4,4''-디카복실산, ($H_2TPDC-N_3$), 4,4',4'',4'''-포르피린 테트라벤조산 (H_2TCPP), 또는 이들의 조합을 포함한다. 추가 구현예에서, 금속 이온은 12-연결 Zr_3 클러스터, 6-연결 Zr_3 클러스터, 8-연결 Zr_3 클러스터, Cr_3 클러스터, Fe_3 클러스터, Al_3 클러스터, 또는 이들의 조합을 포함한다. 또 추가의 구현예에서, 본 방법은 단계 (b) 이전에 MOF 나노입자를 제제와 접촉시켜 나노입자에 제제를 캡슐화하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본 방법은: 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자에 염 용액을 첨가하는 단계 (d)를 추가로 포함하고, 여기서 단계 (d)는 단계 (c) 이후이다. 일부 구현예에서, 염 용액은 0.5 M의 최종 농도로 첨가된다. 또 추가의 구현예에서, 본 방법은: 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 하나 이상의 나노입자와 접촉시키는 단계 (e)를 추가로 포함하고, 여기서 각각의 하나 이상의 나노입자는 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자의 표면 상에 올리고뉴클레오타이드를 혼성화하기에 충분히 상보성인 올리고뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 단계 (e)는 단계 (d) 후이다.

[0014] 일부 양태에서 표적 폴리뉴클레오타이드의 모두 또는 일부에 상보성인 하나 이상의 올리고뉴클레오타이드와 유전자를 인코딩하는 표적 폴리뉴클레오타이드를 혼성화하는 것을 포함하는 유전자의 발현을 억제하는 방법이 제공되고, 올리고뉴클레오타이드는 본 개시내용의 나노입자의 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드이고, 여기서 표적 폴리뉴클레오타이드와 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드 사이의 혼성화는 유전자 산물의 발현을 억제하기에 충분한 상보성의 정도로 표적 폴리뉴클레오타이드의 길이에 걸쳐 일어난다. 일부 구현예에서, 유전자 산물의 발현은 *생체내*에서 억제된다. 일부 구현예에서, 유전자 산물의 발현은 *시험관내*에서 억제된다.

[0015] 일부 양태에서, 본 개시내용은 톨-유사 수용체 (TLR)의 활성을 상향조절하는 방법을 제공하고, 상기 방법은 TLR을 갖는 세포를 본 개시내용의 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 TLR 작용제를 포함한다. 추가 구현예에서, TLR은 톨-유사 수용체 1 (TLR1), 톨-유사 수용체 2 (TLR2), 톨-유사 수용체 3 (TLR3), 톨-유사 수용체 4 (TLR4), 톨-유사 수용체 5 (TLR5), 톨-유사 수용체 6 (TLR6), 톨-유사 수용체 7 (TLR7), 톨-유사 수용체 8 (TLR8), 톨-유사 수용체 9 (TLR9), 톨-유사 수용체 10 (TLR10), 톨-유사 수용체 11 (TLR11), 톨-유사 수용체 12 (TLR12), 및 톨-유사 수용체 13 (TLR13)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 *시험관내*에서 수행된다. 일부 구현예에서, 본 방법은 *생체내*에서 수행된다.

도면의 간단한 설명

[0016] **도 1**은 (a) UiO-66 MOF 나노입자의 용매열 합성의 도식적 표현^a; (b) 말단 포스페이트-변형된 DNA 및 MOF-NP 코어-위성 하이브리드 구조의 후속적인 서열-특이적 어셈블리를 이용한, MOF의 DNA 변형을 도시한다.

도 2는 DNA 작용화된 MOF 나노입자의 특성규명을 도시한다: (a) UiO-66의 SEM 및 (b) DNA 작용화된 UiO66의 TEM 이미지. (c) 포스페이트 작용화된 올리고뉴클레오타이드의 $31P\{1H\}$ SSNMR 스펙트럼. 삽도: 미결합된 포스포디에스테르 (청색), 측면 상 Zr 결합된 포스포디에스테르 (회색) 및 Zr 결합된 말단 포스페이트 (적색)에 상응하는 3개의 인 공명. (d) 모의실험된 UiO-66 (블랙), DNA 작용화 전 (적색) 및 후 (청색) 225 nm UiO-66의 PXRD. (e) 상보성 DNA로 조립된 MOF 및 50 nm 금 나노입자 응집체의 용융 전이. 기준자 = 패널 a에서 500 nm 및 패널 b에서 2 μm .

도 3은 합성되고 추가로 DNA로 작용화된 9개 MOF의 라이브러리를 나타낸다. DNA 표면 적용범위에 영향을 미치는 인자를 체계적으로 조사하기 위해, (a) 유기 링커 길이, (b) 금속 노드 연결성, 및 (c) 금속 클러스터의 유형이

독립적으로 그리고 고의적으로 변화되었고, DNA 표면 적용범위가 표면 SBU 밀도, SBU 배위수, 및 M-O 결합 해리 에너지에 대해 플롯팅되었다. 기준자 = 200 nm.

도 4는 UiO-66, UiO-67-bpy 및 UiO-68-N₃의 PXRD 스펙트럼을 도시한다.

도 5는 PCN-222, PCN-223 및 PCN-224의 PXRD 스펙트럼을 나타낸다.

도 6은 MIL-101(Cr), MIL-101(Fe) 및 MIL-101(Al)의 PXRD 스펙트럼을 나타낸다.

도 7은 (a) UiO-66 (225 ± 35 nm); (b) UiO-67-bpy (173 ± 19 nm); 및 (c) UiO-68-N₃/PCN-58 (148 ± 39 nm)의 SEM 및 TEM 이미지를 나타낸다.

도 8은 (a) PCN-222 (195 x 48 nm); (b) PCN-223 (538 x 48 nm); 및 (c) PCN-224 (110 ± 24 nm)의 SEM 및 TEM 이미지를 나타낸다.

도 9는 (a) MIL-101(Cr) (78 ± 16 nm); (b) MIL-101(Fe) (470 ± 57 nm); 및 (c) MIL-101(Al) (434 ± 86 nm)의 SEM 및 TEM 이미지를 나타낸다.

도 10은 DNA 상호연결된 MOF NP-Au NP 어셈블리의 TEM 및 EDX 특성구명을 나타낸다. (a) 상보성 225 nm DNA-UiO-66 MOF NP 및 20 nm DNA-Au NP로부터 형성된 나노클러스터의 대표적인 HAADF 이미지. 삽도: MOF NP-AuNP 클러스터, 및 단일 나노클러스터의 도식적 예시. (b) MOF NP 및 AuNP 상에서 프로그래밍가능한 DNA 리간드가 어셈블리의 구조 메이크업 (Au NP 크기 및 MOF-대-Au NP 화학양론)에 대해 어떻게 조절을 제공하는지를 입증하는 나노클러스터 어셈블리의 TEM 이미지. 모든 기준자는 100 nm이고, 단 패널 a에 대해서는 제외로 여기서는 1 μm이다.

도 11은 다양한 형상: (a) 구형 AuNP (삽도), (b) Au 나노 큐브 (삽도), (c) 옥타헤드랄 AuNP (삽도), (d) Au 나노프리즘 (삽도)의 상보성 DNA-변형된 AuNP로 조립된 225 nm DNA 변형된 MOF NP 코어의 TEM 이미지를 나타낸다. 모든 기준자는 100 nm이다.

도 12는 DNA-변형된 금속 NP (AgNP, AuNS, Fe₃O₄)의 어셈블리의 탐구를 도시한다. 상보성 DNA-UiO-66 MOF NP 주위에 조립된 DNA-변형된 은 나노입자 (a), 상보성 DNA-UiO-66 MOF NP 주위에 조립된 DNA-변형된 금 나노스타 (b), 및 상보성 DNA-UiO-66 MOF NP 주위에 조립된 DNA-변형된 산화철 나노입자 (c)를 나타내는 EDS 원소 맵핑. 모든 기준자는 100 nm이다.

도 13은 MOF-NP 나노클러스터가 단일 가닥 DNA의 것에 비교하여 향상된 세포 흡수 능력을 보인다는 것을 나타낸다. 핵산의 상이한 형태: (1) 225 nm UiO-66 (Tamra-DNA로 라벨링됨) 및 20 nm AuNP로 합성된 혼성화된 나노클러스터, 및 (2) 각각 8 시간 및 24 시간 동안 1 x 10⁻⁶ M의 총 DNA 농도에서 염료 라벨링된 단일 가닥 DNA로 인큐베이션된 SK-OV-3 세포의 형광 현미경사진. 기준자 = 10 μm.

도 14는 MOF-NP 나노클러스터에 의해 유도된 무시할만한 세포독성 또는 항-증식성 효과를 입증하는 MTT 검정의 결과를 나타낸다.

도 15는 플루오레세인 캡슐화된 Cy5-DNA-UiO-66 (a) Cy5 채널, (b) 플루오레세인 채널, (c) 병합된 이미지의 공초점 현미경검사 이미지를 나타낸다.

도 16은 용액에서 MOF-AuNP 나노클러스터의 형성을 확인하는 동결-TEM 이미지를 나타낸다.

도 17은 용액에서 MOF-AuNP 나노클러스터의 형성을 확인하는 동결-TEM 이미지를 나타낸다.

도 18은 UV-vis 분광법을 조립된 MOF-나노입자 응집체와 유리 콜로이드성 나노입자의 흡광을 비교하기 위해 사용한 실험의 결과를 나타낸다.

도 19는 세포 흡수를 확인하는 혼성화된 나노클러스터의 공초점 Z-스택 이미지를 나타낸다.

도 20은 NU-1000 (좌측) 및 PCN-222 (우측) NP의 크기 분석을 도시한다.

도 21은 NU-1000 및 PCN-222 NP에 대해 인슐린 캡슐화된 DNA-MOF 콘주게이트의 합성된 상태로의 PXRD 스펙트럼을 나타낸다.

도 22는 DNA-NU-1000 (좌측) 및 DNA-PCN-222 (우측) NP의 형태가 DNA 작용화-후 유지된다는 것을 입증하는 SEM

이미지를 나타낸다.

도 23은 Tamra-DNA-NU-1000 NP (적색) 및 NU-1000 NP (흑색)의 전형적인 UV-vis 스펙트럼을 도시한다.

도 24는 인슐린의 캡슐화 및 DNA 작용화 후의 상당한 표면적 감소를 밝히는 N_2 흡착-탈착 등온을 나타낸다.

도 25는 인슐린이 중간기공 및 미세기공 둘 모두를 점한다는 것을 시사하는 NU-1000 및 PCN-222의 DFT 기공 크기 분포를 나타낸다.

도 26은 하기를 도시한다: (a) 말단 포스페이트-변형된 DNA를 사용한 표면 작용화가 이어지는 MOF NP의 메조포러스 채널에서 인슐린 캡슐화의 도식적 예시. (b) 2개의 메조포러스 Zr MOF: NU-1000 및 PCN-222/MOF-545 및 그것의 각각의 유기 링커의 결정 구조. (c) 사용된 말단 포스페이트 변형된 핵산 (3' 또는 5').

도 27은 하기를 나타낸다: (a) 합성된 상태의 NU-1000 NP의 주사 전자 현미경검사 이미지 (좌측) 및 투과 전자 현미경검사 (우측) 이미지. (b) 합성된 상태의 PCN-222 NP의 SEM (좌측) 및 TEM (우측) 이미지. (c) 합성된 상태의 NP (상단부) 및 DNA 작용화된 NP (하단부)에 대해 DLS에 의해 측정된 세포 배지에서 NU-1000 및 PCN-222의 콜로이드성 안정성. (d) NU-1000 및 PCN-222 MOF NP에 대한 DNA 장입 및 인슐린 캡슐화 밀도.

도 28은 하기를 나타낸다: (a) 인슐린 (AF647 채널) 및 DNA (TAMRA 채널)의 공편재화를 확인한 10 μ m 인슐린@DNA-NU-1000 입자의 대표적인 공초점 형광 현미경사진. (b) 단일 10 μ m 인슐린@DNA-NU-1000 결정의 Z-스택 이미지. (c) 400 rpm 웨이킹으로 37°C에서 세포의 배지 (90% DMEM 배지 + 10% 혈청)로 인큐베이션된 DNA-NU-1000 NP 및 DNA-PCN-222 NP의 열화 프로파일. (d) 400 rpm 웨이킹으로 37°C에서 모의실험된 세포내 배지 (1 x PBS, pH = 7.0)에서 인큐베이션된 DNA-NU-1000 NP 및 DNA-PCN-222 NP의 열화 프로파일. (e) 고유 인슐린 (적색), 인슐린@MOF NP (NU-1000에 대해 오렌지색, PCN-222에 대해 분홍색), 및 인슐린@DNA-MOF NP (NU-1000에 대해 갈색, PCN-222에 대해 자주색)에 대해 ELISA에 의해 측정된 바와 같은 인슐린 활성 검정.

도 29는 하기를 나타낸다: (a-c) 유리 인슐린 + DNA (a), 인슐린@DNA-NU-1000 (b), 및 인슐린@DNA-PCN-222 (c)로 6시간 처리 후 SK-OV 세포의 유세포측정 플롯 및 공초점 형광 현미경사진. (d) 유세포측정에 의해 측정된 바와 같은 상이한 작제물에서 전달된 인슐린의 세포 흡수. 647 nm에서의 형광은 다양한 인큐베이션 시간 (0.5 시간 및 2 시간)에서 인슐린으로 처리 후 SK-OV 세포에서 측정되었다. (e) MTT 검정은 인슐린@DNA-PCN-222 및 인슐린@DNA-NU-1000 NP에 의해 유도된 주목할 만한 세포독성이 없음을 입증한다. 기준자 = 10 μ m.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017]

금속-유기 프레임워크 (MOF)는 화학적 전달대상물의 저장 및 운반에 대한 보장을 보유하는 모듈식, 결정성, 및 다공성 물질의 부류이다. MOF가 벌크 형태로 연구되었지만, MOF 나노입자의 외부 표면 작용성을 의도적으로 조작하는 방법은 거의 개발되지 않았다. 그것의 표면을 개질하기 위한 일반화가능한 접근법은 벌크 MOF 구조에 독립적인 입자 표면 상에 화학적 작용성을 부여할 수 있게 한다. 또한, 화학적으로 프로그래밍가능한 리간드, 예컨대 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA)의 사용은 입자간 상호작용의 조작을 허용할 수 있다. 본 명세서에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드로 MOF 나노입자의 외부 금속 노드의 표면 작용화를 위한 배위 화학-기반 전략이 제공된다. 4개의 상이한 금속 중 (Zr, Cr, Fe, 및 Al)을 함유하는 9개의 뚜렷한 원형의 MOF 입자의 외부 표면은 올리고뉴클레오타이드로 성공적으로 작용화되어, 이 전략의 일반성을 설명한다. 올리고뉴클레오타이드의 프로그래밍가능하고 특이적 상호작용을 이용함에 의해, 11개의 뚜렷한 MOF 입자-무기 입자 코어-위성 더스터가 합성되었다. 이들 하이브리드 나노클러스터에서, 구성 블록의 상대적인 화학양론, 크기, 형상, 및 조성물은 모두 독립적으로 제어될 수 있다. 본 개시내용은 프로그래밍가능한 물질 구성 블록으로 그리고 세포내 공정을 측정 및 조작하기 위한 프로브로서 유용한 신규한 세트의 올리고뉴클레오타이드-나노입자 콘주게이트에 대한 접근을 제공한다.

[0018]

세포내 전달을 통한 작용성 단백질을 직접적으로 보충하는 것은 그것의 고유의 환경 외부에서의 내재된 불안정성, 그것의 큰 크기 및 하전된 표면으로 인해 도전과제로 남아있다. 단백질의 효과적인 세포내 전달을 위한 올리고뉴클레오타이드-MOF 나노입자 (MOF NP) 콘주게이트의 합성이 또한 본 명세서에서 제공된다. 이러한 전달 비히클의 간단한 2-단계 제조는 2개의 물 안정한 지르코늄 MOF NP인 NU-1000 및 PCN-222/MOF-545의 메조포러스 채널 내에 단백질을 캡슐화하고, 이어서 포스페이트 중결된 올리고뉴클레오타이드 표면 작용화에 의해 실현되었다. 이 시스템에 대한 모델 단백질로 인슐린이 선택되었다. 천연 단백질 자체의 것과 비교하여, 이 전략을 사용하여 높은 단백질 장입 (대략 40 wt%) 및 세포 흡수의 10-배 향상이 달성되었다. 3D 올리고뉴클레오타이드 셸은 콜로이드에서 MOF NP를 안정화시킬뿐만 아니라 주목할 만한 세포독성없이 그것의 세포 내재화를 향상

시켰다. 이 접근법은 생물학적 프로브 또는 잠재적 치료제로서 다양한 단백질의 전달을 용이하게 하도록 일반화될 수 있다.

[0019] 단백질은 많은 생명 과정에서 중요한 역할을 한다. 활성 단백질의 세포내 전달은 대사 경로의 평가,⁴⁸ 세포 과정의 조절,³ 및 단백질 결핍 질환에 대한 치료제⁵⁰⁻⁵²를 포함한 많은 잠재적 생물의학 응용에 대해 매력적이다⁴⁷. 지난 수십년 동안, 생존 세포에 의한 단백질 내재화를 용이하게 하기 위한 일련의 기술, 예컨대 형질감염 제제, 나노캐리어⁵³⁻⁵⁵ 및 광범위한 단백질 표면 개질⁵⁶⁻⁵⁹의 사용이 개발되어 왔다. 비록 각각의 전략에는 그 고유의 장점이 있지만, 많은 것이 주목할 만한 세포독성, 단백질 활성 감소 또는 낮은 전달 적재물, 제한된 화학적 안정성 및 전달 효율 부여를 겪는다.⁶⁰ 최근에, MOF는 높은 단백질 장입 능력, 및 효율적인 효소적 촉매작용에 대한 상당히 개선된 열 및 화학적 안정성을 포함한 유리한 특성으로 이어지는, 그것의 메조포러스 및 안정한 프레임워크 구조에 기인하여, 작용성 단백질의 고정화 및 저장을 위한 유망한 재료의 부류로 부각되었다.⁶¹⁻⁶⁷ 비교적으로, MOF NP를 갖는 단백질의 세포내 전달은 그것의 종종 불량한 콜로이드성 안정성 및 양으로 하전된 표면,⁷¹⁻⁷² 제한된 세포 흡수 효율 및 이롭지 않은 생체이용률 부여⁷³⁻⁷⁶에 부분적으로 기인하여 덜 탐구되었다⁶⁸⁻⁷⁰. 따라서, MOF NP 응집을 감소시키고, 양전하 유도된 세포독성을 최소화하며, 그것의 세포내 전달을 용이하게 하는 효과적인 접근법의 개발은 매우 요망된다.⁷⁷⁻⁷⁸

[0020] 복수 올리고뉴클레오타이드로 치밀하게 작용화된 NP로부터 합성된 구형 핵산 (SNA)-NP 콘주게이트⁷⁹는 양이온성 또는 바이러스 형질감염의 사용 없이 효과적으로 세포로 도입하는 독특한 능력을 나타낸다.⁸⁰ 조밀하게 패키징된 올리고뉴클레오타이드는 세포 표면 포착제 수용체에 의해 인식되어 카베올린-매개된 세포내이입을 통해 나노입자 흡수를 촉진한다.⁸¹⁻⁸² 중요하게는, 다양한 SNA-NP 콘주게이트가 상이한 코어 조성물로 합성되어^{59, 77, 83-85}, 세포내 진단⁸⁶, 유전자 조절⁸⁷ 및 면역조절 전략⁸⁸에서 유리한 특성을 나타낸다. 본 명세서에서, 단백질의 세포내 전달을 위한 올리고뉴클레오타이드-MOF NP 콘주게이트를 합성하기 위한 간단한 전략이 제공된다 (도 26a).

[0021] 본 명세서 및 첨부된 청구항들에서 사용된 바와 같이, 단수 형태 "a", "an" 및 "the"는 문맥에서 달리 명확히 명시되지 않는 한 복수의 참조를 포함한다.

[0022] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "약"은 대략을 의미하는 것으로 또한 이해된다.

[0023] 핵산-금속 유기 프레임워크 (MOF) 나노입자 콘주게이트

[0024] 금속-유기 프레임워크 (MOF)는 유기 리간드에 배워된 금속/금속 이온을 함유하는 1, 2, 또는 3-차원 미세다공성 물질이다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, MOF는, 비제한적으로, 본 명세서에 전체적으로 참고로 포함된 미국 특허 출원 공개 번호 2009/0211445에 개시된 ICP를 포함한 무한한 배위 중합체 (ICP)를 포함한다.

[0025] 본 개시내용은 MOF 및 금속-유기 프레임워크의 표면에 부착된 복수의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 나노입자를 제공한다. MOF는 (1) 금속 및 (2) 다중-덴테이트 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 리간드는 유기 리간드이다. 다중-덴테이트 리간드는 각각 상이한 금속 원자에 배위결합하여 MOF를 형성하는 적어도 2개의 작용기를 갖는다. MOF는 복수의 동일한 다중-덴테이트 리간드 또는 2개 이상의 다중-덴테이트 리간드의 조합/혼합물을 포함할 수 있다. 다중-덴테이트 리간드는 2개 이상(예를 들어, 2, 3, 4)의 배위 작용기, 예컨대 카복실레이트 작용기 (COOH 또는 COO⁻), 또는 적어도 1개의 고리 질소 (예를 들어, 피리딘, 피리미딘, 피라지딘, 이미다졸릴)를 갖는 복소환형기를 포함할 수 있다. 일부 경우에, 다중-덴테이트 리간드는 2, 3, 또는 4개의 카복실레이트 작용기를 포함한다. 일부 경우에, 다중-덴테이트 리간드는 적어도 1개의 카복실레이트 작용기 및 적어도 1개의 복소환형기 - 예를 들어, 피라졸레이트, 이미다졸레이트, 또는 테트라졸레이트를 포함한다. 다중-덴테이트 리간드의 예는 포름산, 아세트산, 옥살산, 프로판산, 부탄산, (E)-부텐산, 벤젠-1,4-디카복실산, 벤젠-1,3-디카복실산, 벤젠-1,3,5-트리카복실산, 2-아미노-1,4-벤젠디카복실산, 2-브로모-1,4-벤젠디카복실산, 바이페닐-4,4'-디카복실산, 바이페닐-3,3',5,5'-테트라카복실산, 바이페닐-3,4',5-트리카복실산, 2,5-디하이드록시-1,4-벤젠디카복실산, 1,3,5-트리스(4-카복시페닐)벤젠, (2E,4E)-헥사-2,4-디엔산, 1,4-나프탈렌디카복실산, 피렌-2,7-디카복실산, 4,5,9,10-테트라하이드로피렌-2,7-디카복실산, 아스파르트산, 글루탐산, 아데닌, 4,4'-바이피리딘, 피리미딘, 피라진, 피리딘-4-카복실산, 피리딘-3-카복실산, 이미다졸, 1H-벤즈이미다졸, 및 2-메틸-1H-이미다졸을 포함한다. 일부 경우에, 다중-덴테이트 리간드는 테레프탈산 (H₂BDC), 2,2'-바이피리딘-5,5'-디

카복실산 (H_2BPY), 2',5'-비스(아지도메틸)-[1,1':4',1''-테르페닐]-4,4''-디카복실산 ($H_2TPDC-N_3$), 또는 4,4',4'',4'''-포르피린 테트라벤조산 (H_2TCPP)을 포함한다. 일부 경우에, 다중-덴테이트 리간드는 테레프탈산 (H_2BDC), 2,2'-바이피리딘-5,5'-디카복실산 (H_2BPY), 2',5'-비스(아지도메틸)-[1,1':4',1''-테르페닐]-4,4''-디카복실산, ($H_2TPDC-N_3$), 4,4',4'',4'''-포르피린 테트라벤조산 (H_2TCPP), 1,2,4,5-테트라키스(4-카복시페닐)벤젠, 1,3,5-트리스(4'-카복시[1,1'-바이페닐]-4-일)벤젠, 1,3,5-트리스(4-카복시페닐)벤젠, 2,5-디하이드록시테레프탈산, 2,6-나프탈렌디카복실산, 2-하이드록시테레프탈산, 2-메틸이미다졸, 3,3',5,5'-테트라카복시디페닐메탄, 4,4',4''-s-트리아진-2,4,6-트리일-트리벤조산, 9,10-안트라센디카복실산, 바이페닐-3,3',5,5'-테트라카복실산, 바이페닐-3,4',5-트리카복실산, 이미다졸, 테레프탈산 (즉, 1,4-벤젠디카복실산), 트리메산, [1,1':4',1'']테르페닐-3,3',5,5'-테트라카복실산, 또는 이들의 조합이다.

[0026] 다양한 구현예에서, MOF는 나노입자 코어를 형성하고 올리고뉴클레오타이드는 코어의 외부 표면에 부착된 층을 형성한다. 다양한 구현예에서, 금속-유기 프레임워크는 3차원 구조를 갖는다. 다양한 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 말단에서 금속-유기 프레임워크에 부착된다. 다양한 구현예에서 올리고뉴클레오타이드의 하나의 말단은 금속-유기 프레임워크의 표면에 부착되고 올리고뉴클레오타이드의 다른 말단은 금속-유기 프레임워크의 표면으로부터 멀리 (또는 원위에) 배향된다. 다양한 구현예에서, 연결 기는 금속-유기 프레임워크 및 올리고뉴클레오타이드 둘 모두에 공유결합된다.

[0027] 일부 구현예에서, MOF 나노입자의 금속은 복수의 금속 이온을 포함한다. 일부 경우에, MOF는 복수의 동일한 금속 이온을 포함하고, 반면에 다른 경우 MOF는 상이한 금속 이온의 조합/혼합물을 포함한다. 고려된 금속 이온은 지르코늄 (Zr), 크롬 (Cr), 철 (Fe), 알루미늄 (Al), 및 이들의 혼합물을 포함한다. 일부 구현예에서, MOF는 UiO-66, UiO-67-bpy, UiO68- N_3 /PCN-58, PCN-222/MOF-545, PCN-223, PCN-224, MIL-101 (Al), MIL-101 (Fe), 또는 MIL-101(Cr)을 포함한다. 적합한 금속 이온은, 비제한적으로, 12-연결 Zr_3 클러스터, 6-연결 Zr_3 클러스터, 8-연결 Zr_3 클러스터, Cr_3 클러스터, Fe_3 클러스터, Al_3 클러스터, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0028] 다양한 양태에서, 본 개시내용은 유전자 산물의 발현을 억제하기에 충분한 조건 하에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 나노입자와 표적 올리고뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계를 포함하는, 표적 올리고뉴클레오타이드에 의해 인코딩된 유전자 산물의 발현을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 유전자 산물의 발현은 *생체 내*에서 억제된다. 일부 구현예에서, 유전자 산물의 발현은 *시험관 내*에서 억제된다. 다양한 구현예에서, 유전자 산물의 발현은 나노입자와 표적 올리고뉴클레오타이드를 접촉시키는 단계의 부재에서 유전자 산물의 발현에 비하여 적어도 약 5%, 예를 들어, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 및/또는 적어도 약 95% 억제된다. 다양한 양태에서, 본 개시내용은 또한, 본 명세서에서 기재된 바와 같은 나노입자와 표적 분자를 접촉시키는 단계를 포함하는 표적 분자를 검출하는 방법을 제공하고, 여기서 표적 분자와 나노입자 사이의 접촉은 검출가능한 변화를 초래한다. 일부 구현예에서, 검출은 *시험관 내*이다. 일부 구현예에서, 검출은 *생체 내*이다.

[0029] **올리고뉴클레오타이드**

[0030] 본 개시내용에 의해 고려된 올리고뉴클레오타이드는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 DNA, RNA, 이들의 변형된 형태 및 조합을 포함한다. 따라서, 올리고뉴클레오타이드는 DNA를 포함한다. 일부 구현예에서, DNA는 이중가닥 이고, 추가 구현예에서 DNA는 단일가닥이다. 추가 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 RNA를 포함하고, 또 추가의 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 이중가닥 RNA를 포함하고, 특정 구현예에서, 이중가닥 RNA는 작은 간섭 RNA (siRNA)이다. 용어 "RNA"는 2개의 별개의 가닥의 듀플렉스뿐만 아니라 단일가닥 구조를 포함한다. 단일가닥 RNA는 또한 이차 구조를 갖는 RNA를 포함한다. 일부 양태에서, 헤어핀 루프를 갖는 RNA가 고려된다.

[0031] 본 명세서에서 개시된 MOF에서 사용된 올리고뉴클레오타이드는 포스페이트가 MOF 나노입자의 금속 이온과 금속-포스페이트 결합을 형성하도록 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 그것의 3' 말단에 포스페이트기를 갖는다. 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 그것의 5' 말단에 포스페이트기를 갖는다.

[0032] 일부 구현예에서, 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 $(GGT)_n$ 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 여기서 n은 2 내지 20이다. 추가 구현예에서, n은 2 이상, 3 이상, 4 이상, 5 이상, 6 이상, 7 이상, 8 이상, 9 이상, 10 이상, 11 이상, 12 이상, 13 이상, 14 이상, 15 이상, 16 이상, 17 이상, 18 이상, 19 이상, 또는 20

이다. 추가 구현예에서, n은 3 미만, 4 미만, 5 미만, 6 미만, 7 미만, 8 미만, 9 미만, 10 미만, 11 미만, 12 미만, 13 미만, 14 미만, 15 미만, 16 미만, 17 미만, 18 미만, 19 미만, 또는 20 미만이다.

[0033] 일부 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 MOF 및 표적 올리고뉴클레오타이드의 일부인 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화가 일어나도록 올리고뉴클레오타이드의 표적 서열에 대해 충분히 상보적인 서열로 구성된다. 다양한 양태에서 올리고뉴클레오타이드는 단일가닥이거나, 또는 이중가닥 분자가 또한 표적 올리고뉴클레오타이드의 단일 가닥 서열에 혼성화하는 단일 가닥 서열을 포함하는 한 이중가닥이다. 일부 양태에서, MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화는 이중-가닥 표적 올리고뉴클레오타이드와 삼중 구조를 형성할 수 있다. 또 다른 양태에서, 삼중 구조는 단일-가닥 표적 올리고뉴클레오타이드에 대한 MOF의 일부인 이중-가닥 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화에 의해 형성될 수 있다. 삼중 올리고뉴클레오타이드 복합체의 추가의 설명은, 그 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입된, PCT/US2006/40124에서 찾아볼 수 있다.

[0034] "올리고뉴클레오타이드"는 개별적으로 중합된 뉴클레오타이드 서브유닛을 포함하는 것으로 당업계에서 이해된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "뉴클레오타이드" 또는 그것의 복수형은 본 명세서에서 논의된 바와 같고 달리는 당업계에서 알려진 변형된 형태와 교환가능하다. 특정 사례에서, 본 기술은 자연 발생 뉴클레오타이드, 및 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 비-자연 발생 뉴클레오타이드를 포용하는 용어 "핵염기"를 사용한다. 따라서, 뉴클레오타이드 또는 핵염기는 자연 발생 핵염기 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U)을 의미한다. 비-자연 발생 핵염기는, 예를 들어 그리고 비제한적으로, 잔틴, 디아미노퓨린, 8-옥소-N6-메틸아데닌, 7-데아자잔틴, 7-데아자구아닌, N4,N4'-에타노시토신, N',N'-에타노-2,6-디아미노퓨린, 5-메틸시토신 (mC), 5-(C3-C6)-알킬닐-시토신, 5-플루오로우라실, 5-브로모우라실, 슈도이소시토신, 2-하이드록시-5-메틸-4-트리아졸로피리딘, 이소시토신, 이소구아닌, 이노신 및 Benner 등의 미국 특허 번호 5,432,272 및 Susan M. Freier and Karl-Heinz Altmann, 1997, Nucleic Acids Research, vol. 25: pp 4429-4443에 기재된 "비-자연 발생" 핵염기를 포함한다. 용어 "핵염기"는 또한 알려진 퓨린 및 피리미딘 헤테로사이클뿐만 아니라 이들의 복소환형 유사체 및 호변이성질체를 포함한다. 추가의 자연 및 비-자연 발생 핵염기는 미국 특허 번호 3,687,808 (Merigan, et al.), Chapter 15 by Sanghvi, Antisense Research and Application, Ed. S. T. Crooke and B. Lebleu, CRC Press, 1993, Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613-722 (특히 하기 참고: 페이지 622 및 623, 및 Concise Encyclopedia of Polymer Science and Engineering, J. I. Kroschwitz Ed., John Wiley & Sons, 1990, 페이지 858-859, Cook, Anti-Cancer Drug Design 1991, 6, 585-607, 이들 각각은 그 전체적으로 참고로 여기에 편입됨)에서 개시된 것들을 포함한다. 다양한 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 또한 가장 고전적인 관점에서는 뉴클레오사이드 염기가 아니지만 뉴클레오사이드 염기로서 작용하는 특정 "보편적인 염기"를 포함한, 핵염기 같이 작용할 수 있는 복소환형 화합물과 같은 화합물을 포함한 비-자연 발생 뉴클레오타이드의 범주인 하나 이상의 "뉴클레오사이드 염기" 또는 "기본 단위"를 포함한다. 보편적인 염기는 3-니트로피롤, 선택적으로 치환된 인돌 (예를 들어, 5-니트로인돌), 및 선택적으로 치환된 하이포잔틴을 포함한다. 다른 바람직한 보편적인 염기는, 당업계에서 알려진 이들 보편적인 염기를 비롯하여, 피롤, 디아졸 또는 트리아졸 유도체를 포함한다.

[0035] 변형된 뉴클레오타이드는 EP 1 072 679 및 WO 97/12896에 기재되어 있고, 그 개시내용은 본 명세서에 참고로 편입된다. 변형된 뉴클레오타이드는 비제한적으로, 5-메틸시토신 (5-me-C), 5-하이드록시메틸 시토신, 잔틴, 하이포잔틴, 2-아미노아데닌, 아데닌 및 구아닌의 6-메틸 및 다른 알킬 유도체, 아데닌 및 구아닌의 2-프로필 및 다른 알킬 유도체, 2-티오우라실, 2-티오티민 및 2-티오시토신, 5-할로우라실 및 시토신, 피리미딘 염기의 5-프로필닐 우라실 및 시토신 및 다른 알킬닐 유도체, 6-아조 우라실, 시토신 및 티민, 5-우라실 (슈도우라실), 4-티오우라실, 8-할로, 8-아미노, 8-티올, 8-티오알킬, 8-하이드록실 및 다른 8-치환된 아데닌 및 구아닌, 5-할로 특히 5-브로모, 5-트리플루오로메틸 및 다른 5-치환된 우라실 및 시토신, 7-메틸구아닌 및 7-메틸아데닌, 2-F-아데닌, 2-아미노-아데닌, 8-아자구아닌 및 8-아자아데닌, 7-데아자구아닌 및 7-데아자아데닌 및 3-데아자구아닌 및 3-데아자아데닌을 포함한다. 추가의 변형된 염기는 삼환형 피리미딘, 예컨대 펜옥사진 시티딘(1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤즈옥사진-2(3H)-온), 페노티아진 시티딘 (1H-피리미도[5,4-b][1,4]벤조티아진-2(3H)-온), G-클램프, 예컨대 치환된 펜옥사진 시티딘 (예를 들어 9-(2-아미노에톡시)-H-피리미도[5,4-b][1,4]벤즈옥사진-2(3H)-온), 카바졸 시티딘 (2H-피리미도[4,5-b]인돌-2-온), 피리도인돌 시티딘 (H-피리도[3',2':4,5]피롤로[2,3-d]피리미딘-2-온)을 포함한다. 변형된 염기는 또한 퓨린 또는 피리미딘 염기가 다른 헤테로사이클, 예를 들어, 7-데아자-아데닌, 7-데아자구아노신, 2-아미노피리딘 및 2-피리돈으로 대체된 것들을 포함할 수 있다. 추가의 핵염기는 미국 특허 번호 3,687,808에 개시된 것, The Concise Encyclopedia Of Polymer Science And Engineering, 페이지 858-859, Kroschwitz, J. I., ed. John Wiley & Sons, 1990에 개시된 것, Englisch et al., 1991, Angewandte Chemie, International Edition, 30: 613에 개시된 것, 및 Sanghvi, Y. S., Chapter

15, Antisense Research and Applications, 페이지 289-302, Crooke, S. T. and Lebleu, B., ed., CRC Press, 1993에 개시된 것들을 포함한다. 특정의 이들 염기는 결합 친화도를 증가시키는 데 유용하고, 2-아미노프로필아데닌, 5-프로피닐우라실 및 5-프로피닐시토신을 비롯하여, 5-치환된 피리미딘, 6-아자피리미딘 및 N-2, N-6 및 0-6 치환된 퓨린을 포함한다. 5-메틸시토신 치환은 0.6-1.2°C만큼 핵산 듀플렉스 안정성을 증가시키는 것으로 밝혀졌고, 특정 양태에서 2'-O-메톡시에틸 당 변형과 조합된다. 그 개시내용 본 명세서에 참고로 편입되는 미국 특허 번호 3,687,808; 4,845,205; 5,130,302; 5,134,066; 5,175,273; 5,367,066; 5,432,272; 5,457,187; 5,459,255; 5,484,908; 5,502,177; 5,525,711; 5,552,540; 5,587,469; 5,594,121, 5,596,091; 5,614,617; 5,645,985; 5,830,653; 5,763,588; 6,005,096; 5,750,692 및 5,681,941을 참고한다.

[0036] 사전결정된 서열의 올리고뉴클레오타이드를 제조하는 방법은 잘-알려져 있다. 예를 들어, Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed. 1989) 및 F. Eckstein (ed.) Oligonucleotides and Analogues, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991)를 참고한다. 고체상 합성 방법이 폴리리보뉴클레오타이드 및 폴리데옥시리보뉴클레오타이드 둘 모두에 대해 바람직하다 (DNA를 합성하는 잘-알려진 방법이 또한 RNA를 합성하는 데 유용하다). 폴리리보뉴클레오타이드는 또한 효소적으로 제조될 수 있다. 비-자연 발생 핵염기가 또한 올리고뉴클레오타이드 안으로 편입될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 7,223,833; Katz, J. Am. Chem. Soc., 74:2238 (1951); Yamane, et al., J. Am. Chem. Soc., 83:2599 (1961); Kosturko, et al., Biochemistry, 13:3949 (1974); Thomas, J. Am. Chem. Soc., 76:6032 (1954); Zhang, et al., J. Am. Chem. Soc., 127:74-75 (2005); 및 Zimmermann, et al., J. Am. Chem. Soc., 124:13684-13685 (2002)를 참고한다.

[0037] 본 명세서에서 개시된 MOF는 일반적으로 길이 약 5 뉴클레오타이드 내지 약 100 개의 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 더 구체적으로, 본 명세서에서 개시된 MOF는 길이 약 5 내지 약 90 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 80 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 70 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 60 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 50 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 45 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 40 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 35 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 30 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 25 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 20 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 15 개의 뉴클레오타이드, 길이 약 5 내지 약 10 개의 뉴클레오타이드, 및 올리고뉴클레오타이드가 원하는 결과를 달성할 수 있는 정도로 구체적으로 개시된 크기의 길이인 모든 올리고뉴클레오타이드 중간체인 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 길이 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 또는 그 초과 개의 뉴클레오타이드의 올리고뉴클레오타이드가 고려된다.

[0038] 본 명세서에서 정의된 바와 같은 올리고뉴클레오타이드는 또한 압타머를 포함한다. 압타머의 생산 및 사용은 당해 분야의 숙련가에게 알려져 있다. 일반적으로, 압타머는 표적 리간드에 단단히 결합하고 신중하게 구별할 수 있는 핵산 또는 펩타이드 결합 종이다 (Yan et al., RNA Biol. 6(3) 316-320 (2009), 본 명세서에서 전체적으로 참고로 편입됨). 일부 구현예에서, 압타머는 지수 강화 (SELEX) 과정에 의한 리간드의 체계적인 진화로 불리는 기술에 의해 수득될 수 있다 (Tuerk et al., Science 249:505-10 (1990), 미국 특허 번호 5,270,163, 및 미국 특허 번호 5,637,459, 이들 각각은 본 명세서에서 전체적으로 참고로 편입됨). 핵산 압타머의 일반적인 논의는, 예를 들어 그리고 비제한적으로, Nucleic Acid and Peptide Aptamers: Methods and Protocols (Mayer, Humana Press에 의해 편집됨, 2009) 및 Crawford et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics 2(1): 72-79 (2003)에서 발견된다. 비제한적으로 RNA 압타머의 선택, DNA 압타머의 선택, 표적 단백질에 공유적으로 결합할 수 있는 압타머의 선택, 변형된 압타머 라이브러리의 사용, 및 진단제 및 치료제로서 압타머의 사용을 비롯한 압타머의 추가의 논의는 Molekulyarnaya Biologiya, Vol. 34, No. 6, 2000, pp. 1097-1113으로부터 번역된 Kopylov et al., Molecular Biology 34(6): 940-954 (2000)에 제공되어 있고, 이것은 본 명세서에서 전체적으로 참고로 편입된다. 다양한 양태에서, 압타머는 길이 10-100 개 사이의 뉴클레오타이드이다.

[0039] 다양한 양태에서, 본 방법은 표적 올리고뉴클레오타이드에 대해 100% 상보성, 즉, 완전히 일치하는 올리고뉴클레오타이드의 사용을 포함하는 반면, 다른 양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드가 표적 유전자 산물의 원하는 억제를 달성할 수 있는 정도로 올리고뉴클레오타이드의 길이 전반에 걸쳐 표적 올리고뉴클레오타이드에 적어도 (이상을 의미함) 약 95% 상보성, 올리고뉴클레오타이드의 길이 전반에 걸쳐 표적 올리고뉴클레오타이드에 적어도 약 90%, 적어도 약 85%, 적어도 약 80%, 적어도 약 75%, 적어도 약 70%, 적어도 약 65%,

적어도 약 60%, 적어도 약 55%, 적어도 약 50%, 적어도 약 45%, 적어도 약 40%, 적어도 약 35%, 적어도 약 30%, 적어도 약 25%, 적어도 약 20% 상보성이다. 하이브리드화의 정도는 표적 올리고뉴클레오타이드의 얻어진 검출, 또는 유전자 산물 발현의 억제 정도보다 상당히 낮다는 것이 당해 분야의 숙련가에 의해 이해될 것이다.

[0040] **올리고뉴클레오타이드 밀도**

[0041] 본 명세서에서 제공된 바와 같은 MOF는 MOF의 표면 상에 올리고뉴클레오타이드의 밀도를 갖는다. 일부 양태에서, 세포에 의한 MOF 열화 및/또는 흡수에 대한 올리고뉴클레오타이드의 내성은 MOF 표면과 연관된 올리고뉴클레오타이드의 밀도에 의해 영향을 받는다. 본 명세서에서 전체적으로 참고로 편입된 PCT/US2008/65366에 기재된 바와 같이, 올리고뉴클레오타이드 작용화된 나노입자의 표면 상의 올리고뉴클레오타이드의 더 높은 밀도는 세포에 의한 나노입자의 증가된 흡수와 연관된다.

[0042] MOF를 안정하게 하기에 적절한 표면 밀도 및 MOF와 올리고뉴클레오타이드의 원하는 조합에 대해 이를 얻기 위해 필요한 조건은 실험적으로 결정될 수 있다. 광범위하게, 사용된 올리고뉴클레오타이드가 작을수록 그 올리고뉴클레오타이드의 표면 밀도는 더 높아질 수 있다. 일반적으로, 안정한 MOF 조성물을 제공하기 위해 적어도 1 pmol/cm²의 표면 밀도가 적절한 것이다. 일부 양태에서, 표면 밀도는 적어도 10 pmol/cm²이다. 올리고뉴클레오타이드가 MOF에 적어도 2 pmol/cm², 적어도 3 pmol/cm², 적어도 4 pmol/cm², 적어도 5 pmol/cm², 적어도 6 pmol/cm², 적어도 7 pmol/cm², 적어도 8 pmol/cm², 적어도 9 pmol/cm², 적어도 10 pmol/cm², 적어도 약 15 pmol/cm², 적어도 약 20 pmol/cm², 적어도 약 25 pmol/cm², 적어도 약 30 pmol/cm², 적어도 약 35 pmol/cm², 적어도 약 40 pmol/cm², 적어도 약 45 pmol/cm², 적어도 약 50 pmol/cm², 적어도 약 55 pmol/cm², 적어도 약 60 pmol/cm², 적어도 약 65 pmol/cm², 적어도 약 70 pmol/cm², 적어도 약 75 pmol/cm², 적어도 약 80 pmol/cm², 적어도 약 85 pmol/cm², 적어도 약 90 pmol/cm², 적어도 약 95 pmol/cm², 적어도 약 100 pmol/cm², 적어도 약 125 pmol/cm², 적어도 약 150 pmol/cm², 적어도 약 175 pmol/cm², 적어도 약 200 pmol/cm², 적어도 약 250 pmol/cm², 적어도 약 300 pmol/cm², 적어도 약 350 pmol/cm², 적어도 약 400 pmol/cm², 적어도 약 450 pmol/cm², 적어도 약 500 pmol/cm², 적어도 약 550 pmol/cm², 적어도 약 600 pmol/cm², 적어도 약 650 pmol/cm², 적어도 약 700 pmol/cm², 적어도 약 750 pmol/cm², 적어도 약 800 pmol/cm², 적어도 약 850 pmol/cm², 적어도 약 900 pmol/cm², 적어도 약 950 pmol/cm², 적어도 약 1000 pmol/cm² 또는 그 초과와 표면 밀도로 존재하는 방법이 또한 제공된다. 올리고뉴클레오타이드가 MOF에 2 pmol/cm² 미만, 3 pmol/cm² 미만, 4 pmol/cm² 미만, 5 pmol/cm² 미만, 6 pmol/cm² 미만, 7 pmol/cm² 미만, 8 pmol/cm² 미만, 9 pmol/cm² 미만, 10 pmol/cm² 미만, 약 15 pmol/cm² 미만, 약 20 pmol/cm² 미만, 약 25 pmol/cm² 미만, 약 30 pmol/cm² 미만, 약 35 pmol/cm² 미만, 약 40 pmol/cm² 미만, 약 45 pmol/cm² 미만, 약 50 pmol/cm² 미만, 약 55 pmol/cm² 미만, 약 60 pmol/cm² 미만, 약 65 pmol/cm² 미만, 약 70 pmol/cm² 미만, 약 75 pmol/cm² 미만, 약 80 pmol/cm² 미만, 약 85 pmol/cm² 미만, 약 90 pmol/cm² 미만, 약 95 pmol/cm² 미만, 약 100 pmol/cm² 미만, 약 125 pmol/cm² 미만, 약 150 pmol/cm² 미만, 약 175 pmol/cm² 미만, 약 200 pmol/cm² 미만, 약 250 pmol/cm² 미만, 약 300 pmol/cm² 미만, 약 350 pmol/cm² 미만, 약 400 pmol/cm² 미만, 약 450 pmol/cm² 미만, 약 500 pmol/cm² 미만, 약 550 pmol/cm² 미만, 약 600 pmol/cm² 미만, 약 650 pmol/cm² 미만, 약 700 pmol/cm² 미만, 약 750 pmol/cm² 미만, 약 800 pmol/cm² 미만, 약 850 pmol/cm² 미만, 약 900 pmol/cm² 미만, 약 950 pmol/cm² 미만, 또는 약 1000 pmol/cm² 미만의 표면 밀도로 존재하는 방법이 또한 제공된다.

[0043] MOF에서 올리고뉴클레오타이드의 밀도는 표면 상의 올리고뉴클레오타이드 및/또는 MOF 자체와 특이적 생체분자 및/또는 비-생체분자 상호작용을 조절한다는 것이 고려된다. 다양한 조건 하에서, 일부 폴리펩타이드는 올리고뉴클레오타이드의 밀도에 의해 야기되는 입체 장애에 기초하여 MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드와 상호작용하는 것이 금지될 수 있다. 입체 장애에 의해 달리 배제되는 생체분자 및/또는 비-생체분자와 올리고뉴클레오타이드의 상호작용이 바람직한 양태에서, MOF 내의 올리고뉴클레오타이드의 밀도는 생체분자 및/또는 비-생체분자가 올리고뉴클레오타이드와 상호작용할 수 있도록 감소된다.

[0044] 올리고뉴클레오타이드 표면 밀도는 MOF와 연관된 올리고뉴클레오타이드의 안정성을 조절하는 것으로 또한 고려된다. 따라서, 한 구현예에서, 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MOF가 제공되며, 여기서 올리고뉴클레오타이드는 MOF의 일부가 아닌 동일한 올리고뉴클레오타이드의 반감기와 적어도 실질적으로 동일한 반감기를 갖는다. 다른 구현예에서, MOF와 연관된 올리고뉴클레오타이드는 MOF의 일부가 아닌 동일한 올리고뉴클레오타이드의 반감기보다 약 5% 내지 약 1,000,000-배 큰 반감기를 갖는다.

[0045] **표적 올리고뉴클레오타이드를 검출하는 방법**

[0046] 본 개시내용은 표적 분자를 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 표적 분자를 검출하는 방법을 제공한다. 접촉시키는 것은, 다양한 양태에서, 본 개시내용에 의해 제공된 바와 같은 유전자 발현의 조절을 초래한다. 또 다른 양태에서, 접촉시키는 것은 검출가능한 변화를 초래하고, 여기서 검출가능한 변화는 표적 분자의 검출을 나타낸다. 검출가능한 표지의 검출은 본 명세서에서 기재된 임의의 방법에 의해 수행되고, 검출가능한 표지는 MOF의 일부인 분자 상에 있거나 표적 분자 상에 있을 수 있다.

[0047] **유전자 발현을 억제하는 방법**

[0048] 본 개시내용에 의해 제공된 추가의 방법은, 표적 올리고뉴클레오타이드를 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물과 접촉시키는 것을 포함하는 표적 올리고뉴클레오타이드로부터 발현된 유전자 산물의 발현을 억제하는 방법을 포함하고, 여기서 접촉시키는 것은 유전자 산물의 발현을 억제하기에 충분하다. 유전자 산물의 억제는 본 개시내용의 조성물과 표적 올리고뉴클레오타이드의 하이브리드화를 초래한다.

[0049] MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드의 서열이 표적 올리고뉴클레오타이드에 특이적으로 혼성화하기 위해 그것의 표적 올리고뉴클레오타이드의 서열에 100% 상보성일 필요는 없음이 당 업계에서 이해된다. 또한, MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드는 개재 또는 인접한 분절이 하이브리드화 이벤트에 관여하지 않도록 하나 이상의 분절에 걸쳐 표적 올리고뉴클레오타이드에 혼성화할 수 있다 (예를 들어, 비제한적으로 루프 구조 또는 헤어핀 구조). 상보성 퍼센트는 MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드의 길이에 걸쳐 결정된다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 20개 뉴클레오타이드 중 18개가 총 길이 100개의 뉴클레오타이드의 표적 올리고뉴클레오타이드에서 20개 뉴클레오타이드 영역에 상보성인 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MOF가 주어지면, MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드는 90 퍼센트 상보적일 것이다. 이 실시예에서, 나머지 비상보성 뉴클레오타이드는 상보성 뉴클레오타이드와 클러스터링되거나 또는 산재될 수 있고, 서로에 대해서 인접하거나 또는 상보성 뉴클레오타이드일 필요는 없다. MOF의 일부인 올리고뉴클레오타이드와 표적 올리고뉴클레오타이드의 영역의 상보성 퍼센트는 당업계에서 알려진 BLAST 프로그램 (기본 국소 정렬 검색 도구) 및 PowerBLAST 프로그램 (Altschul et al., J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)을 사용하여 일상적으로 결정될 수 있다.

[0050] 유전자 산물 발현을 억제하는 방법은 표적 유전자 산물의 발현이 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 MOF의 부재에서 유전자 산물 발현에 비교하여 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 100% 억제되는 방법들을 포함한다. 환언하면, 제공된 방법은 표적 유전자 산물의 발현의 임의의 억제 정도를 본질적으로 초래하는 방법들을 포용한다.

[0051] 억제의 정도는 체액 샘플 또는 생검 샘플로부터 또는 당 업계에 잘 알려진 이미징형성 기술에 의해 생체내에서 결정된다. 대안적으로, 억제의 정도는 세포 배양 분석에서 시험관내에서, 일반적으로 본 명세서에서 기재된 바와 같은 조성물의 사용으로 유래하는 생체내에서 예상될 수 있는 억제의 정도의 예측가능한 척도로 결정된다. 본 개시내용에 의해 표적 올리고뉴클레오타이드의 억제가 주어진 세포에 대한 억제의 효과를 평가하기 위해 사용되는 것으로 고려된다. 비-제한적인 예로서, 유전자 산물이 신호 형질도입 경로의 일부인 유전자 산물의 억제 효과를 연구할 수 있다. 대안적으로, 유전자 산물이 세포자멸적 경로에 관여한다고 가정되는 유전자 산물의 억제를 연구할 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 기재된 임의의 방법은 원하는 결과를 달성하기 위해 조합하여 사용될 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 그리고 비제한적으로, 본 명세서에서 기재된 방법은 표적 올리고뉴클레오타이드를 검출할 뿐만 아니라 그것의 발현을 조절하는 것 둘 모두를 허용하도록 조합될 수 있다. 일부 구현예에서, 이 조합은 시험관내 또는 생체내에서 시간에 따른 표적 올리고뉴클레오타이드 발현의 억제를 정량하는 데 사용될 수 있다. 일 양태에

서, 특정 시점에서 배양물로부터 세포를 제거하고 각각의 시점에서 표적 올리고뉴클레오타이드의 상대적 발현 수준을 평가함으로써 시간에 따른 정량화가 달성된다. 일 양태에서, 검출가능한 표지의 시각화를 통해 평가된 바와 같은 표적 올리고뉴클레오타이드의 양에서의 경시적 감소는 표적 올리고뉴클레오타이드의 억제율을 나타낸다.

[0053] 따라서, 표적 올리고뉴클레오타이드에 혼성화하고 및 그 발현을 억제하기 위한 주어진 올리고뉴클레오타이드의 유효성을 결정하는 것뿐만 아니라 세포에 대한 주어진 올리고뉴클레오타이드의 억제 효과를 결정하는 것이 고려되는 양태이다.

[0054] **제제**

[0055] 일부 양태에서, 본 개시내용은 제제를 더 포함하는 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자를 고려한다. 다양한 구현예에서, 제제는 펩타이드, 단백질, 나노입자 (예를 들어 및 비제한적으로, 귀금속, 산화금속, 또는 양자점) 항체, 소분자, 또는 이들의 조합이다. 본 개시내용의 임의의 구현예에서, 제제는 나노입자에 캡슐화된다. 나노입자에 제제를 캡슐화하는 방법은 일반적으로 당업계에서 알려져 있고⁹⁴⁻⁹⁵ 본 명세서에 기재되어 있다 (예를 들어, 실시예 2 참고).

[0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 "제제"는 치료 또는 진단 목적에 유용한 임의의 화합물을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어는 상태의 치료 또는 진단을 위해 환자에게 투여되는 임의의 화합물을 포함하는 것으로 이해된다.

[0057] 단백질 치료제는, 비제한적으로 펩타이드, 효소, 구조 단백질, 수용체 및 다른 세포 또는 순환 단백질뿐만 아니라 이들의 단편 및 유도체를 포함하고, 그의 비정상적인 발현은 하나 이상의 장애를 일으킨다. 치료제는 또한 하나의 특정 구현예로서, 화학치료제를 포함한다. 다양한 구현예에서, 치료제는 또한 방사선험성 물질을 포함한다.

[0058] 다양한 양태에서, 단백질 치료제는 비제한적으로 IL-1 알파, IL-1 베타, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-11, 집락 자극 인자-1 (CSF-1), M-CSF, SCF, GM-CSF, 과립구 집락 자극 인자 (G-CSF), 인터페론-알파 (IFN-알파), 공동 인터페론, IFN-베타, IFN-감마, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, 에리트로포이에틴 (EPO), 트롬보포이에틴 (TPO), 안지오프로이테틴, 예를 들어 Ang-1, Ang-2, Ang-4, Ang-Y, 인간 안지오프로이테틴-유사 폴리펩타이드, 혈관 내피성 성장 인자 (VEGF), 안지오키톤, 뼈 형태형성 단백질-1, 뼈 형태형성 단백질-2, 뼈 형태형성 단백질-3, 뼈 형태형성 단백질-4, 뼈 형태형성 단백질-5, 뼈 형태형성 단백질-6, 뼈 형태형성 단백질-7, 뼈 형태형성 단백질-8, 뼈 형태형성 단백질-9, 뼈 형태형성 단백질-10, 뼈 형태형성 단백질-11, 뼈 형태형성 단백질-12, 뼈 형태형성 단백질-13, 뼈 형태형성 단백질-14, 뼈 형태형성 단백질-15, 뼈 형태형성 단백질 수용체 IA, 뼈 형태형성 단백질 수용체 IB, 뇌 유래된 신경친화성 인자, 섬모 호중구 인자, 섬모 호중구 인자 수용체, 사이토카인-유도된 중성구 화학주성 인자 1, 사이토카인-유도된 중성구, 화학주성 인자 2 α , 사이토카인-유도된 중성구 화학주성 인자 2 β , β 내피성 세포 성장 인자, 엔도텔린 1, 표피 성장 인자, 상피성-유래된 중성구 유인물질, 섬유모세포 성장 인자 4, 섬유모세포 성장 인자 5, 섬유모세포 성장 인자 6, 섬유모세포 성장 인자 7, 섬유모세포 성장 인자 8, 섬유모세포 성장 인자 8b, 섬유모세포 성장 인자 8c, 섬유모세포 성장 인자 9, 섬유모세포 성장 인자 10, 섬유모세포 성장 인자 산성, 섬유모세포 성장 인자 염기성, 신경교 세포주-유래된 호중구 인자 수용체 α 1, 신경교 세포주-유래된 호중구 인자 수용체 α 2, 성장 관련된 단백질, 성장 관련된 단백질 α , 성장 관련된 단백질 β , 성장 관련된 단백질 γ , 헤파린 결합 표피 성장 인자, 간세포 성장 인자, 간세포 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 I, 인슐린-유사 성장 인자 수용체, 인슐린-유사 성장 인자 II, 인슐린-유사 성장 인자 결합 단백질, 각질형성세포 성장 인자, 백혈병 억제 인자, 백혈병 억제 인자 수용체 α , 신경 성장 인자 신경 성장 인자 수용체, 뉴로트로핀-3, 뉴로트로핀-4, 태반 성장 인자, 태반 성장 인자 2, 혈소판-유래된 내피성 세포 성장 인자, 혈소판 유래된 성장 인자, 혈소판 유래된 성장 인자 A 사슬, 혈소판 유래된 성장 인자 AA, 혈소판 유래된 성장 인자 AB, 혈소판 유래된 성장 인자 B 사슬, 혈소판 유래된 성장 인자 BB, 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 α , 혈소판 유래된 성장 인자 수용체 β , 사전-B 세포 성장 자극 인자, 줄기 세포 인자 수용체, TNF0, TNF1, TNF2를 포함한 TNF, 형질전환 성장 인자 α , 형질전환 성장 인자 β , 형질전환 성장 인자 β 1, 형질전환 성장 인자 β 1.2, 형질전환 성장 인자 β 2, 형질전환 성장 인자 β 3, 형질전환 성장 인자 β 5, 잠재 변환 성장 인자 β 1, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 I, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 II, 형질전환 성장 인자 β 결합 단백질 III, 종양 괴사 인자 수용체 유형 I, 종양 괴사 인자 수용체 유형 II, 우로키나제-유형 플라스미노겐 활성화제 수용체, 혈관 내피성 성장 인자, 및 키메라 단백질 및 이들의 생물학적으로 또는 면역학적으로 활성인 단편을 포함한 사이토카인 또는 조혈 인자들을

포함한다. 생물 제제의 예는, 비제한적으로, 면역-조절 단백질, 예컨대 사이토카인, 종양 항원에 대한 단클론성 항체, 종양 억제인자 유전자, 및 암 백신을 포함한다. 본 발명의 조성물 및 방법과 공조하여 사용될 수 있는 인터류킨의 예는, 비제한적으로, 인터류킨 2 (IL-2), 및 인터류킨 4 (IL-4), 인터류킨 12 (IL-12)를 포함한다. 사이토카인이외의 다른 면역-조절제는, 비제한적으로 바실러스 칼메트-구에린, 레바미솔, 및 옥트레오타이드를 포함한다.

[0059] 다양한 구현예에서, 미국 특허 7,667,004 (본 명세서에서 전체적으로 참고로 편입됨)에 기재된 치료제가 본 명세서에서 개시된 조성물 및 방법에서 사용에 대해 고려되고, 비제한적으로, 알킬화제, 항생제, 항대사성 제제, 호르몬제, 식물-유래된 제제, 및 생물 제제를 포함한다.

[0060] 알킬화제의 예는, 비제한적으로, 비스클로로에틸아민 (질소 머스타드, 예를 들어 클로르암부실, 사이클로포스파마이드, 이포스파마이드, 메클로르에타민, 멜팔란, 우라실 머스타드), 아지리딘 (예를 들어 티오테파), 알킬 알콘 설포네이트 (예를 들어 부설판), 니트로소우레아 (예를 들어 카무스틴, 로무스틴, 스트렙토조신), 비고전적 알킬화제 (알트레타민, 다카바진, 및 프로카바진), 백금 화합물 (예를 들어, 카보플라틴, 시스플라틴 및 백금 (IV) (Pt(IV)))을 포함한다.

[0061] 항생제의 예는, 비제한적으로, 안트라사이클린 (예를 들어 독소루비신, 다우노루비신, 에피루비신, 이다루비신 및 안트라센디온), 미토마이신 C, 블레오마이신, 닥티노마이신, 필카토마이신을 포함한다. 추가의 항생제는 하기에 상세히 논의되어 있다.

[0062] 항대사성 제제의 예는, 비제한적으로, 플루오로우라실 (5-FU), 플록수리딘 (5-FuDR), 메토틱세이트, 류코보린, 하이드록시우레아, 티오구아닌 (6-TG), 머캅토피린 (6-MP), 사이타라빈, 펜토스타틴, 플루다라빈 포스페이트, 클라드리빈 (2-CdA), 아스파라기나제, 이마티닙 메실레이트 (또는 GLEEVEC®), 및 켄시타빈을 포함한다.

[0063] 호르몬제의 예는, 비제한적으로, 합성 에스트로겐 (예를 들어 디에틸스티베스트롤), 항에스트로겐 (예를 들어 타목시펜, 토레미펜, 플루옥시메스테롤 및 랄록시펜), 안티안드로겐 (바이칼루타마이드, 닐루타마이드, 플루타미드), 방향화효소 억제제 (예를 들어, 아미노글루테티미드, 아나스트로졸 및 테트라졸), 케토코나졸, 고세렐린 아세테이트, 류프롤라이드, 메게스트롤 아세테이트 및 미페프리스톤을 포함한다.

[0064] 식물-유래된 제제의 예는, 비제한적으로, 빈카 알칼로이드 (예를 들어, 빈크리스틴, 빈블라스틴, 빈데신, 빈졸리딘 및 비노렐빈), 포도필로톡신 (예를 들어, 에토포시드 (VP-16) 및 테니포시드 (VM-26)), 캄프토테신 화합물 (예를 들어, 20(S) 캄프토테신, 토포테칸, 루비테칸, 및 이리노테칸), 타산 (예를 들어, 파클리탁셀 및 도세탁셀)을 포함한다.

[0065] 사용에 대해 고려된 화학치료제는, 비제한적으로, 하기를 포함하는 알킬화제: 질소 머스타드, 예컨대 메클로르-에타민, 사이클로포스파마이드, 이포스파마이드, 멜팔란 및 클로르암부실; 니트로소우레아, 예컨대 카무스틴 (BCNU), 로무스틴 (CCNU), 및 세무스틴 (메틸-CCNU); 에틸렌아민/메틸멜라민, 예컨대 트리에틸렌멜라민 (TEM), 트리에틸렌, 티오포스포라미드 (티오테파), 헥사메틸멜라민 (HMM, 알트레타민); 알킬 설포네이트, 예컨대 부설판; 트리아진, 예컨대 다카바진 (DTIC); 엽산 유사체, 예컨대 메토틱세이트 및 트리메트렉세이트, 피리미딘 유사체, 예컨대 5-플루오로우라실, 플루오로데옥시우리딘, 켄시타빈, 시토신 아라비노시드 (AraC, 사이타라빈), 5-아자시티딘, 2,2'-디플루오로데옥시시티딘, 퓨린 유사체, 예컨대 6-머캅토피린, 6-티오구아닌, 아자티오프린, 2'-데옥시코포르마이신 (펜토스타틴), 에리트로하이드록시노닐아데닌 (EHNA), 플루다라빈 포스페이트, 및 2-클로로데옥시아데노신 (클라드리빈, 2-CdA)을 포함한 항대사물질; 세포분열저지성 약물, 예컨대 파클리탁셀, 빈블라스틴 (VLB), 빈크리스틴, 및 비노렐빈을 포함한 빈카 알칼로이드, 탁소테르, 에스트라무스틴, 및 에스트라무스틴 포스페이트를 포함한 천연 생성물; 에피포도필로톡신, 예컨대 에토포시드 및 테니포시드; 항생제, 예컨대 액티모마이신 D, 다우노마이신 (루비도마이신), 독소루비신, 미톡산트론, 이다루비신, 블레오마이신, 필리카마이신(미트라마이신), 미토마이신C, 및 악티노마이신; 효소, 예컨대 L-아스파라기나제; 생물학적 반응 조절제, 예컨대 인터페론-알파, IL-2, G-CSF 및 GM-CSF; 백금 배위 착물, 예컨대 시스플라틴, Pt(IV) 및 카보플라틴, 안트라센디온, 예컨대 미톡산트론, 치환된 우레아, 예컨대 하이드록시우레아, N-메틸하이드라진 (MIH) 및 프로카바진을 비롯한 메틸하이드라진 유도체, 부신피질 억제제, 예컨대 미토탄 (o,p'-DDD) 및 아미노글루테티미드를 포함한 여러 종류 제제; 아드레코르티코스테로이드 길항제, 예컨대 프레드니손 및 등가물, 텍사메타손 및 아미노글루테티미드를 포함한 호르몬 및 길항제; 프로게스틴, 예컨대 하이드록시프로게스테론 카프로에이트, 메드록시프로게스테론 아세테이트 및 메게스트롤 아세테이트; 에스트로겐, 예컨대 디에틸스티베스트롤 및 에티닐 에스트라디올 등가물; 항에스트로겐, 예컨대 타목시펜; 테스토스테론 프로피오네이트 및 플루옥시메스테론/등가물

을 포함한 안드로겐; 안티안드로겐, 예컨대 플루타미드, 고나도트로핀-방출 호르몬 유사체 및 류프롤라이드; 및 비-스테로이드 안티안드로겐, 예컨대 플루타미드를 포함한다.

[0066] 화학치료제는 또한, 비제한적으로, 항-PD-1 항체, 알킬화제, 혈관신생 억제제, 항체, 항대사물질, 세포분열억제제, 항증식제, 항바이러스제, 오로라 키나제 억제제, 세포자멸사 프로모터 (예를 들어, Bcl-2 계열 억제제), 사멸 수용체 경로의 활성화제, Bcr-Abl 키나제 억제제, BITE (이중특이적 T 세포 연관체) 항체, 항체 약물 콘주게이트, 생물학적 반응 조절제, 브루톤 티로신 키나제 (BTK) 억제제, 사이클린-의존적 키나제 억제제, 세포 주기 억제제, 사이클로옥시게나제-2 억제제, DVD, 백혈병 바이러스 종양유전자 동족체 (ErbB2) 수용체 억제제, 성장 인자 억제제, 열충격 단백질 (HSP)-90 억제제, 히스톤 탈아세틸화효소 (HDAC) 억제제, 호르몬 요법, 면역치료제, 세포자멸사 단백질 (IAP)의 억제제의 억제제, 삼입작용 항생제, 키나제 억제제, 키네신 억제제, Jak2 억제제, 라파마이신 억제제의 포유동물 표적, 마이크로RNA, 미토겐-활성화된 세포의 신호-조절된 키나제 억제제, 다가결합 단백질, 비-스테로이드 항-염증성 약물 (NSAID), 폴리 ADP (아데노신 디포스페이트)-리보오스 중합효소 (PARP) 억제제, 백금 화학치료제 (예를 들어, 시스플라틴), 폴로-유사 키나제 (Plk) 억제제, 포스포이노시티드-3 키나제 (PI3K) 억제제, 프로테아솜 억제제, 퓨린 유사체, 피리미딘 유사체, 수용체 티로신 키나제 억제제, 레티노이드/텔로이드 식물성 알칼로이드, 토포이소머라제 억제제, 유비퀴틴 리가제 억제제, 및 동종의 것뿐만 아니라 이들 제제들 중 하나 이상의 조합을 포함한다. 추가의 화학치료제가, 그 전체적으로 참고로 본 명세서에 편입되는, 미국 특허 출원 공개 번호 2018/0072810에서 개시되어 있다.

[0067] 일부 구현예에서, 제제는 소분자를 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "소분자"는 화합물, 예를 들어 선택적으로 유도될 수 있는 펩타이드메틱, 또는 천연 또는 합성인 임의의 다른 저분자량 유기 화합물을 지칭한다. 이러한 소분자는 치료적으로 전달가능한 물질일 수 있거나 또는 전달을 용이하게 하기 위해 추가로 유도체화될 수 있다.

[0068] "저분자량"은 1000 달톤 미만, 전형적으로 300 내지 700 달톤의 분자량을 갖는 화합물을 의미한다. 다양한 양태에서, 저분자량 화합물은 약 100, 약 150, 약 200, 약 250, 약 300, 약 350, 약 400, 약 450, 약 500, 약 550, 약 600, 약 650, 약 700, 약 750, 약 800, 약 850, 약 900, 또는 약 1000 달톤이다.

[0069] 면역 조절

[0070] 툴-유사 수용체 (TLR)는 선천성 면역계의 조절에 중요한 역할을 하는, 감시 세포에서 발현되는 단백질의 부류이다. 포유동물 면역계는 감염성 질환과 싸우기 위해 두 가지 일반적인 전략을 사용한다. 병원체 노출은 면역자극성 사이토카인, 케모카인 및 다반응성 IgM 항체의 생성을 특징으로 하는 선천적 면역 반응을 신속하게 촉발시킨다. 선천적 면역계는 다양한 감염성 미생물 군에 의해 발현되는 병원체 관련 분자 패턴 (PAMP)에 노출됨에 의해 활성화된다. PAMP의 인식은 툴-유사 수용체 계열의 구성원에 의해 매개된다. 특이적 올리고뉴클레오타이드에 반응하는 TLR 4, TLR 8 및 TLR 9와 같은 TLR 수용체는 엔도솜이라 불리는 특별한 세포내 구획 내측에 위치한다. TLR 4, TLR 8 및 TLR9 수용체의 조절 기전은 DNA-단백질 상호작용에 기초한다.

[0071] 박테리아 DNA에서 발견된 것들에 유사한 CpG 모티프를 함유하는 합성 면역자극성 올리고뉴클레오타이드는 TLR 수용체의 유사한 반응을 자극한다. 따라서 면역조절 올리고뉴클레오타이드는 면역 결핍 및 암의 치료를 포함하여 다양한 잠재적 치료 용도를 갖는다.

[0072] 면역계의 하향 조절은 툴-유사 수용체의 발현을 담당하는 유전자를 녹다운시키는 것을 포함할 것이다. 이 안티센스 접근법은 임의의 툴-유사 단백질의 발현을 녹아웃시키기 위해, 특정한 안티센스 올리고뉴클레오타이드 계열로 작용화된 금속-유기 프레임워크 (MOF) 나노입자의 사용을 포함한다.

[0073] 따라서, 일부 구현예에서, 툴-유사 수용체를 조절하기 위해 본 개시내용의 MOF 나노입자를 이용하는 방법이 개시된다. 상기 방법은 각각 TLR 작용제 또는 TLR 길항제의 사용을 통하여 툴-유사-수용체를 상향-조절 또는 하향-조절한다. 조절된 툴-유사 수용체는 툴-유사 수용체 1, 툴-유사 수용체 2, 툴-유사 수용체 3, 툴-유사 수용체 4, 툴-유사 수용체 5, 툴-유사 수용체 6, 툴-유사 수용체 7, 툴-유사 수용체 8, 툴-유사 수용체 9, 툴-유사 수용체 10, 툴-유사 수용체 11, 툴-유사 수용체 12, 및 툴-유사 수용체 13을 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 툴-유사 수용체를 갖는 세포를 올리고뉴클레오타이드-작용화된 MOF 나노입자와 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 말단-포스페이트-변형된 올리고뉴클레오타이드는 TLR 작용제를 포함한다. 추가 구현예에서, TLR은 툴-유사 수용체 1 (TLR1), 툴-유사 수용체 2 (TLR2), 툴-유사 수용체 3 (TLR3), 툴-유사 수용체 4 (TLR4), 툴-유사 수용체 5 (TLR5), 툴-유사 수용체 6 (TLR6), 툴-유사 수용체 7 (TLR7), 툴-유사 수용체 8 (TLR8), 툴-유사 수용체 9 (TLR9), 툴-유사 수용체 10 (TLR10), 툴-유사 수용체 11 (TLR11), 툴-유사 수용체 12 (TLR12), 및

톨-유사 수용체 13 (TLR13)으로 구성된 군으로부터 선택된다. 다양한 구현예에서, TLR은 시험관내에서 조절된다. 일부 구현예에서, TLR은 생체내에서 조절된다.

[0074] 실시예

[0075] MOF 나노입자가 합성되고 DMF (3 회) 및 물 (3 회)로 용매 교환되어 과잉 금속 이온 및 유기 리간드를 제거한다. MOF 나노입자의 결정도 및 결정자 크기는 각각 분말 x-선 회절 (PXRD) 및 투과 전자 현미경검사 (TEM)에 의해 결정된다. 다음으로, 포스페이트 변형된 핵산은 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 말단에서 화학적으로 변형된 포스포르아미다이트를 이용하는 DNA 합성기에서 합성된다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 제조자에 의해 권장된 조건 하에서 탈보호되고 역상 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)로 정제된다. 농도의 특성규명 및 결정은 각각 매트릭스 보조된 레이저 탈착 이온화 (MALDI-TOF) 질량 분광분석법 및 UV-Vis 분광법에 의해 결정된다. 과량의 포스페이트 중결된 핵산 (대략 100 nmol)을 MOF NP 콜로이드 (대략 2 pmol)에 첨가하고, 그 다음 진탕기에 두어 밤새 인큐베이션하였다. 이어서, 반응 혼합물에 2M 염화나트륨 용액을 서서히 첨가하여 최종 농도 0.5M에 도달하는 염-노화 절차를 사용하여 음으로 하전된 올리고머를 스크리닝하고 고밀도의 표면-고정화된 올리고뉴클레오타이드를 달성한다. 과량의 올리고뉴클레오타이드는 원심분리 (5 x 5000 rpm, 10 min)에 의해 제거되고, 이어서 물에 DNA-MOF 나노입자 콘주게이트의 재현탁이 뒤따랐다. MOF 나노입자 상의 DNA 표면 적용범위는 유도적으로 커플링된 플라즈마 원자 방출 분광법 (ICP-AES) 및 UV-가시광 분광법 (UV-vis)에 의해 결정된다. 먼저, MOF 나노 입자의 표면적은 TEM으로부터 얻은 기하학적 근사치 및 반경/가장자리 길이에 기초하여 계산될 수 있다. 둘째로, 결정화상 정보에 기초하여 주어진 크기의 MOF에 대해 입자 당 금속 원자의 수가 계산될 수 있다. 마지막으로, MOF 나노입자 샘플의 물 농도는 MOF 샘플의 금속 함량의 ICP-AES 분석에 의해 수득된다.

[0076] 실시예 1

[0077] 물질

[0078] 달리 언급되지 않는 한 모든 시약은 상업적 공급원으로부터 입수하였고 추가 정제없이 사용하였다. 이 연구에 사용된 모든 올리고뉴클레오타이드는 Glen Research에서 구입한 시약으로 고체-지지 MM12 합성기상에서 합성되었다. 모든 실험에 사용된 물은 Milli-Q Biocel 시스템 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로부터 수득된 초순수 탈이온화 (DI) 등급 (18.2 MΩ · cm 저항률)이었다.

[0079] 방법

[0080] MOF 나노입자의 합성 및 특성규명

[0081] 9개 MOF 나노입자의 합성

[0082] **UiO-66.** UiO-66은 용매열 반응 조건을 통해 합성되었다. 1,4-벤젠디카복실산 (50 mg, 0.30 mmol)을 1 mL의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF)에 용해시켰다. 별도의 바이알에, 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (21 mg, 0.066 mmol)를 3 mL의 DMF에 용해시켰다. 두 용액을 10 mL 신틸레이션 바이알에서 함께 혼합하고, 2.0 mL 아세트산을 반응 혼합물에 첨가하였다. 간단한 초음파처리 후, 용액을 90°C에서 18시간 동안 가열하여 UiO-66 나노입자를 생성하였다.

[0083] **UiO-67-bpy.** UiO-67-bpy는 유사한 방법을 통해 합성되었다. 바이페닐-4,4'-디카복실산 (150 mg, 0.6 mmol)을 20 mL의 DMF에 첨가하여, 백색 현탁액을 야기하였다. 별도의 바이알에서, 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (105 mg, 0.33 mmol)를 3 mL의 DMF에 용해시켰다. 2 개의 분획을 25 mL 신틸레이션 바이알에서 함께 혼합하고, 2.5 mL의 아세트산을 반응 혼합물에 첨가하였다. 간단한 초음파처리 후, 현탁액을 90°C에서 18시간 동안 가열하여 UiO-67-bpy를 생성하였다.

[0084] **UiO-68-아자이드/PCN-58.** 2',5'-비스(아지도메틸)-[1,1':4',1''-테르페닐]-4,4''-디카복실산 (TPDC-2CH₂N₃)은 문헌에 보고된 방법에 따라 합성되었다.³³ 10 mL 신틸레이션 바이알에서, TPDC-2CH₂N₃ (100 mg, 0.075 mmol)를 1 mL의 DMF에 첨가하였다. 별도의 바이알에서, 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (21 mg, 0.066 mmol)를 3 mL의 DMF에 용해시켰다. 2 개의 분획을 10 mL 신틸레이션 바이알에서 함께 혼합하고, 240 μL 아세트산을 반응 혼합물에 첨가하였다. 현탁액을 90°C에서 18시간 동안 가열하였다.

[0085] **PCN-222/MOF-545.** PCN-222/MOF-545 나노결정의 합성은 약간의 변형을 한 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.³⁴ 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (37.5 mg, 0.116 mmol) 및 테트라키스(4-카복시페닐)-포르피린 (6.5 mg,

0.0082 mmol)을 테플론-라이닝된 캡을 구비한 22 mL 보로실리케이트 바이알에서 DMF (16.25 mL)에 용해시켰다. 디클로로아세트산 (0.25 mL, 3.0 mmol)을 첨가하고, 얻어진 용액을 130℃에서 18시간 동안 가열하여 어두운 자주색 막대-형상화된 나노결정 및 황색 모액을 수득하였다. 나노결정을 원심분리 (15000 rpm, 5 분)에 의해 수집하고, 이어서 DMF와 용매 교환하였다.

[0086] **PCN-223.** PCN-223 나노결정의 합성은 약간의 변형을 한 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.³⁴ 10 mL 신틸레이션 바이알에서, 3 mL의 DMF 내 5,10,15,20-테트라키스 (4-카복시페닐)포르피린 (H_2TCPP , 5.2 mg, 0.007 mmol), 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (9.8 mg, 0.03 mmol), 및 아세트산 (0.4 mL)을 초음파로 용해하고 90℃에서 18시간 동안 가열하였다. 반응이 완료된 후, PCN-223 나노입자를 원심분리에 의해 수집하고, 이어서 신선한 DMF로 3회 세정하였다.

[0087] **PCN-224.** PCN-224 나노결정의 합성은 약간의 변형을 한 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.³⁵ 25 mL 신틸레이션 바이알에서, 10 mL의 DMF 내 5,10,15,20-테트라키스 (4-카복시페닐) 포르피린 (10 mg, 0.013 mmol), 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (30 mg, 0.093 mmol), 및 벤조산 (300 mg, 2.4 mmol)을 용해하고 혼합물은 90℃ (오일욕)에서 5시간 동안 교반 (300 rpm)하였다. 반응이 수행된 후, PCN-224 나노입자를 원심분리 (12000 rpm, 30 min)에 의해 수집하고, 이어서 신선한 DMF로 3회 세정하였다.

[0088] **MIL-101-Cr.** MIL-101-Cr 나노결정의 합성은 약간의 변형을 한 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.³⁶ 테레프탈산 (H_2BDC , 55 mg 0.33 mmol) 및 크롬 니트레이트 9수화물 ($Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$, 132 mg, 0.33 mmol)을 10 mL의 물에 용해시켰다. 수득한 현탁액은 실온에서 1시간 동안 교반하고 그 다음 테플론-라이닝된 고압증기멸균기에서 자생 압력하에서 180℃에서 8시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 혼합물을 여과하여 재결정화된 테레프탈산을 제거하였다. 생성물을 7000 rpm에서 15분 동안의 원심분리 후 여과액으로부터 녹색 분말로서 분리한 후, 에탄올로 3회 세정하였다.

[0089] **MIL-101-Fe.** MIL-101 (Fe) $Fe_3O(H_2O)_2Cl(BDC)_3$ 나노입자는 이전에 보고된 마이크로웨이브 가열 방법을 사용하여 합성되었다.³⁷ 구체적으로, 57.5 mg (0.346 mmol)의 테레프탈산 및 93.5 mg (0.346 mmol)의 $FeCl_3 \cdot H_2O$ 를 15 mL의 DMF에 용해시켰다. 용액을 HP500 마이크로웨이브에 넣고 밀봉하였다. 반응물을 그 다음 150℃로 빠르게 (30 초 이내) 가열하고 이 온도에서 10분 동안 유지시켰다. 실온으로 냉각시킨 후, 입자를 원심분리에 의해 분리하고, DMF 및 에탄올로 세정하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 나노입자를 원심분리에 의해 분리하고 DMF세정하여 과잉 반응물을 제거하였다.

[0090] **MIL-101-Al.** MIL-101 (Al) 나노결정의 합성을 위해, 45 mg (0.27 mmol)의 테레프탈산을 5 mL의 DMF에 용해시켰다. 별도의 바이알에, 120 mg (0.5 mmol)의 $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ 를 5 mL의 DMF에 첨가하고, 여기에 5 mL의 테레프탈산 DMF 용액을 첨가했다. 간단한 초음파처리 후, 현탁액을 실온에서 밤새 방치하여 완전하게 용해시켰다. 500 μ L의 아세트산을 용액에 첨가하고 그 다음 18시간 동안 통상적인 오븐에서 110℃로 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 입자를 원심분리에 의해 분리하고 DMF 및 에탄올로 세정하여 과잉 반응물을 제거하였다.

[0091] **분말 X-선 회절**

[0092] 합성된 MOF 나노입자 및 DNA 작용화된 MOF 나노입자 콘주게이트의 결정도는 분말 X-선 회절 (PXRD)에 의해 확인되었다. 분말 X-선 회절 패턴은 45 kV 및 160 mA에서 2.5-30° 범위에 걸쳐 $2\theta = 0.05^\circ$ 스캔 속도로 Rigaku Smartlab 기기 (일본 도쿄)에서 수집되었다.

[0093] **투과 전자 현미경검사 및 주사 전자 현미경검사**

[0094] MOF 나노입자는 200 kV의 가속 전압을 갖는 SE 또는 TE 모드로 Hitachi HD-2300 주사 투과 전자현미경을 사용하여 분석되었다. MOF 결정 또는 MOF-DNA 콘주게이트를 함유하는 회석 용액을 TEM 그리드 상에 직접적으로 드롭-캐스팅함에 의해 샘플을 TEM 그리드 상에 분산시켰다. 각각의 합성에 대한 평균 결정 크기는 유사한 합성 조건 하에서 다중 합성으로부터 100개 초과 결정의 가장자리 길이를 측정함으로써 결정되었다.

[0095] **올리고뉴클레오타이드의 합성**

[0096] 올리고뉴클레오타이드는 표준 CPG 고상 지지체 상에서 Mermaid MM12 DNA 합성기 (Bio Automation)를 사용하여 합성되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 제조자에 의해 권고된 조건 하에서 탈보호되었고 역상 고성능 액체

크로마토그래피 (HPLC)에 의해 정제되었다. 농도의 특성규명 및 결정은 각각 매트릭스 보조된 레이저 탈착 이온화 (MALDI-TOF) 질량 분광분석법 및 UV-Vis 분광법에 의해 결정되었다. 합성된 올리고뉴클레오타이드의 완전한 목록은 표 1에서 발견될 수 있다.

표 1

표 1. 이 연구에 사용된 DNA 서열.

티올레이트화 가닥		
#	서열 이름	서열
1	AuNP-결합된 어셈블리 가닥	5' - HS-(스페이서) ₂ -TTGTTAATATGAGTCGTT - 3'
2	AgNP-결합된 어셈블리 가닥	5' - (DS) ₃ -(스페이서) ₂ -TTGTTAATATGAGTCGTT - 3'
3	AuNP-용융 가닥	5' - AAGGAA-A-TTCCTAAATATTCGTCCT - 3'
말단 포스페이트 가닥		
#	서열 이름	서열
4	MOF-결합된 가닥	5' - 포스페이트-(스페이서) ₂ -AACGACTCATATTAACAA - 3'
5	MOF-결합된 상보성 가닥	5' - 포스페이트-(스페이서) ₂ -TTGTTAATATGAGTCGTT - 3'
6	MOF-염료 장입 가닥	5' - 포스페이트-(스페이서) ₂ -AACGACTCATATTAACAA-Tamra - 3'
7	MOF-염료 장입 가닥 #2	5' - 포스페이트-(스페이서) ₂ -AACGACTCATATTAACAA-Cy5 - 3'
8	MOF-CPR-T	5' - 포스페이트-T - 3'
9	MOF-CPR-T2	5' - 포스페이트-TT - 3'
10	MOF-CPR-T20	5' - 포스페이트-TTTTTTTTTTTTTTTTTT - 3'
11	MOF-용융 가닥	5' - TTCCTT-A-TTGTTAATATGAGTCGTT - 3'
스트레인화 알킨 가닥		
#	서열 이름	서열
12	AzideNP-결합된 어셈블리 가닥	5' - DBCO-TEG-(스페이서) ₂ -TTGTTAATATGAGTCGTT - 3'

모든 변형된 포스포르아미다이트는 Glen Research에 의해 제조되었다.

1. "스페이서"는 18-O-디메톡시트리틸헥사에틸렌글리콜, 1-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (스페이서 포스포르아미다이트 18)를 지칭한다.

2. "DS"는 3-디메톡시트리틸옥시-2-(3-((R)-α-리포아미도)프로판아미도)프로필-1-O-(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)-포스포르아미다이트 (디티올 세리놀 포스포르아미다이트)를 지칭한다.

3. "HS"는 1-O-디메톡시트리틸-헥실-디설파이드, 1'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (티올-개질제 C6 S-S)를 지칭한다.

4. "5' 포스페이트"는 [3-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-2,2-디카복시에틸]프로필-(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)-포스포르아미다이트 (화학적 인산화 시약 II)를 지칭한다.

5. "3' 포스페이트"는 3-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-2,2-(디카복시메틸아미도)프로필-1-O-석시노일-장쇄 알킬아미노-CPG (3'-CPR II CPG)를 지칭한다

6. "Tamra"는 1-디메톡시트리틸옥시-3-[O-(N-카복시-(테트라메틸-로다민)-3-아미노프로필)]-프로필-2-O-석시노일-장쇄 알킬아미노-CPG (3'-Tamra CPG)를 지칭한다.

7. "DBCO-TEG"는 10-(6-옥소-6-(디벤조[b,f]아자사이클로옥트-4-인-1-일)-카프라미도-N-에틸)-O-트리에틸렌글리콜-1-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포르아미다이트 (5'-DBCO-TEG 포스포르아미다이트)를 지칭한다.

나노입자의 DNA 작용화

MOF 나노입자의 DNA 작용화. 전형적인 DNA 작용화 실험에서, 과량의 포스페이트 종결된 핵산 (대략 100 nmol)을 MOF NP 콜로이드 (대략 2 pmol)에 첨가하고, 그 다음 진탕기 상에 놓고 (본 명세서에서 기재된 바와 같이) 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 음으로 하전된 인접하는 올리고뉴클레오타이드 가닥들 사이의 정전 반발을 감소시키는 0.5 M의 최종 농도로 염화나트륨을 느리게 용액에 첨가하여, DNA의 높은 표면 밀도를 탈성하도록 하였다. 과량의 올리고뉴클레오타이드를 원심분리 (5 x 5000 rpm, 10 분)에 의해 제거하고, 이어서 물에 DNA-나노MOF 콘주게이트를 재현탁하였다.

은 및 금 나노입자의 DNA 작용화. 시트레이트-캡핑된 구형 금 및 은 나노입자 (Ted Pella)를 추가의 변형 없이 그대로 사용하였다. 이방성 금 나노입자는 다른 곳에 광범위하게 상세히 기술된 절차에 따라 합성하였다.^{38,39} 티

을-변형된 올리고뉴클레오타이드로 AuNP의 DNA-작용화는 다른 곳에 광범위하게 상세히 기술된 절차에 따라 수행하였다.⁴⁰ 간단히, 100 nmol의 AuNP-결합된 어셈블리 가닥 (서열 1)을 대략 1 시간 동안 100 mM 디티오프레이트(DTT, pH = 8)의 용액으로 처리하고 후속으로 Nap-5 크기 배제 칼럼 (GE Healthcare)을 사용하여 정제하여 나머지 DTT를 제거하였다. 계면활성제 Tween-20을 AuNP의 용액에 첨가하여 최종 계면활성제 농도를 0.01 vol%로 하고, 이어서 정제된 티올레이트화 DNA (AuNP의 O.D. 당 대략 4-5 nmol)를 첨가하였다. 염화나트륨 (NaCl) 5M 용액을 "염 노화" 공정에서 다음 몇 시간에 걸쳐 나노입자 용액에 느리게 첨가하여 가닥 사이의 정전 반발에 대해 보호함으로써 입자 표면 상의 DNA의 밀도를 증가시켰다. 최종 염 농도를 0.5 M NaCl로 맞춘 후, 입자를 밤새 방치하고, 이어서 3 라운드의 원심 분리 (4000-15000 rpm; 나노 입자 크기에 따라 10-60 분으로 변화된 시간)에 의한 정제, 상청액의 제거 및 Nanopure 물 (18.2 MΩ, Millipore)에 나노입자 펠렛의 재현탁이 뒤따라 임의의 미반응된 DNA, 염 및 계면활성제를 제거하였다. 최종 라운드의 원심분리에 따른 상청액의 제거 후, 정제된 입자에 염을 첨가하여 최종 농도를 모든 후속적인 어셈블리 반응이 일어나는 염 농도인 0.2 M NaCl로 한 번 더 맞추었다.

[0109] **산화철 나노입자의 DNA 작용화.** 클릭 화학을 통한 산화철 및 카드뮴 셀레나이드 나노입자의 DNA-작용화를 다른 곳에 상세히 기술된 절차에 따라 수행하였다.⁴¹ 간단히, 소수성 나노입자는 먼저 양친매성 중합체 코팅 층을 이용한 표면 개질에 의해 수성상으로 이전되었다. 전형적인 중합체 코팅 공정에서, 0.2M과 동등한 중합체 단량체 단위의 초기 농도의 클로로포름 내 아자이드 작용화된 폴리-말레인 무수물-알트-1-옥타데센 (N_3 -PMAO) 용액을 대략 0.1 μ M의 농도에서 클로로포름에 용해된 나노결정의 용액에 첨가하였다. 나노결정 표면의 nm^2 당 중합체 단량체 단위의 비는 입자의 전체 적용범위를 달성하기 위해 적어도 대략 100이어야 했다. 그런 다음 혼합물을 부드럽게 셰이킹하면서 2분 동안 대략 50°C로 가열했다. 실온으로 냉각시킨 후, 회전식 증발에 의해 용매를 천천히 증발시켜, 플라스크의 바닥에 얇은 막을 초래하였다. 나트륨 보레이트 완충액 (75 mM, pH = 9)을 첨가하여 나노입자를 수용액으로 옮겼다. 과잉의 N_3 -PMAO를 제거하기 위해, 수크로스 구배 원심분리를 적용하였다. 정제된 나노입자를 그 다음 과량의 정제된 DBCO-DNA (# 12, 아자이드NP-결합된 어셈블리 가닥)로 작용화시켰다. 염화나트륨 (NaCl) 5M 용액을 "염 노화" 공정에서 다음 몇 시간에 걸쳐 나노입자 용액에 느리게 첨가하여 가닥 사이의 정전 반발에 대해 보호함으로써 입자 표면 상의 DNA의 밀도를 증가시켰다.

[0110] **염료 장입 실험.** 5 mL 스크류 바이알에서, Cy5-DNA (서열 7) 작용화된 UiO-66 NP를 50 mM 플루오로세인 용액 (1 mL)에 침지시키고 25°C에서 24시간 동안 정치하였다. 결정은 원심분리 (10,000 rpm, 40°C, 5 min)에 의해 수집하고 그 다음 물로 세정하고, 그리고 이 사이클을 10회 반복하였다.

[0111] **공초점 형광 현미경검사.** 공초점 형광 현미경검사는 Nikon AIR+ 공초점 레이저 현미경 시스템 상에서 수행하여 MOF 나노입자의 외부 표면이 Cy5-라벨링된 DNA로 작용화되고 후속으로 플루오레세인으로 캡슐화될 수 있음을 확인하였다. 작은 크기의 나노입자로 인해, 광-표백은 사용될 수 있는 레이저 여기의 강도를 상당히 제한한다. 결과적으로, 단면 이미지는 낮은 휘도를 나타낸다. 그러나, Cy5와 플루오레세인의 공편재화를 여전히 명확하게 볼 수 있어 (도 15), MOF 나노입자의 내부 기공은 여전히 DNA 작용화-후 접근가능하다는 것을 시사한다.

[0112] **DNA 표면 적용범위의 정량화**

[0113] **UV-Vis 분광법 (UV-Vis).** UV-Vis 분광법은 온도 스테이지가 구비된 Cary 5000 (Agilent) UV-Vis 분광기 상에서 수행되었다. 일 센티미터 (cm) 석영 광학 셀을 이용하여 측정하였다. MOF 나노입자-DNA 콘주게이트 상의 DNA의 표면 적용범위는 염료 라벨링된 DNA 서열 #6을 사용하여 UV-Vis에 의해 결정되었다.

[0114] **유도적으로 커플링된 플라즈마-원자 방출 분광법 (ICP-AES).** 각각의 MOF의 DNA 적용범위는 나노입자 표면적 및 NP 물 농도에 기초하여 정량화되었다. TEM으로부터 수득된 각각의 MOF NP의 반경/가장자리 길이로, 각각의 나노입자의 표면적은 기하학적 근사치: UiO-66, UiO-67-bpy, UiO-68-N3, 및 MIL-101(Fe)에 대해 팔면체; PCN-224, MIL-101(Cr) 및 MIL-101(Al)에 대해 구형체; PCN-222에 대해 막대; PCN-223에 대해 타원체에 기초하여 계산되었다. 각각의 MOF NP 샘플의 물 농도는 결정화상 정보에 더하여 이들 MOF 샘플의 금속 함량의 ICP-AES 분석에 의해 얻었고, 이에 기초하여 입자당 금속 원자의 수가 주어진 크기의 MOF NP에 대해 계산될 수 있다. ICP-AES 분석은 자동화 샘플 교환기를 갖춘 Thermo iCap 7600 ICP-OES 기기 상에서 수행했다. MOF 샘플을 DMF (1 mL)에 분산시키고, 10 μ l의 MOF 샘플을 HNO₃ (990 μ l)에 첨가하였다. 완전하게 MOF를 소화시키기 위해 샘플을 60°C에서 15시간 동안 가열하였다. 알려지지 않은 샘플을 내부 다중-원소 표준으로 제조하고 생성된 표준 곡선에 비교하였다.

- [0115] $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ 매직 앵글 스피닝 고체 상태 핵자기 공명 분광법. $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ 매직 앵글 스피닝 (MAS) NMR 분광법은 Varian 400 MHz VNMRs 시스템 (512 스캔, 5초 채주기 시간, 및 10,000 Hz 회전 속도) 상에서 수행하여 DNA의 포스페이트 모이어티와 금속 클러스터 사이의 결합을 직접적으로 조사했다.
- [0116] MOF-NP 코어-위성 나노클러스터의 특성규명
- [0117] MOF-NP 코어-위성 나노클러스터의 실리카 캡슐화. 콜로이드성 용액으로부터 고체상으로의 MOF-NP 코어-위성 나노클러스터의 고정화는 실리카 캡슐화에 의해 달성되었다.⁴² 간단히, N-트리메톡시실릴프로필-N,N,N-트리메틸염화암모늄 (TMSPA) (2 μL , 7.2 μmol)을 1 mL 0.2 M NaCl 용액 내 나노클러스터에 (DNA 포스페이트 백본의 수에 비하여) 큰 과량으로 첨가하고, 트리에톡시실란 (TEOS) (4 μL , 21.7 μmol)의 첨가 전에 혼합물을 대략 30 분 동안 교반시켰다. 현탁액을 20분 동안 실온에서 격렬하게 교반하고, 이어서 정제하여 3 라운드의 원심분리에 의해 과량의 실리카를 제거하고, 물에 재현탁하였다. TEM을 위해, 실리카-캡슐화된 나노클러스터를 물에서 재현탁시키고 TEM 그리드 상에 드롭-캐스팅하였다.
- [0118] MOF-AuNP 나노클러스터의 세포 배양, 세포 흡수, 및 세포 세포독성 연구
- [0119] 세포 배양 및 흡수 실험. MOF-NP 하이브리드 나노클러스터의 세포 세포독성 및 흡수 특성을 평가하였다. 구체적으로, Tamra 포스포르아미다이트 라벨링된 DNA를 합성하고 형광 표지로서 225 nm UiO-66 나노결정 상에서 작용화하고, 이것을 그 다음 20 nm AuNP와 혼성화하여 Tamra-MOF-AuNP 나노클러스터를 형성하였다. McCoy의 5A 배지 중 인간 난소암 세포 (SK-OV-3)를 하기의 상이한 형태의 핵산으로 인큐베이션하였다: 먼저, 100 μl 의 MOF-AuNP 나노클러스터의 현탁액; 두번째로, 100 μl 의 동등량의 염료 라벨링된 유리 Tamra-DNA 가닥. 세포 섬유상 액틴 (F-액틴)을 Alexa Fluor 488 Phalloidin으로 염색하고, 모든 비-흡수된 입자는 HEPES 완충 용액으로 세정함에 의해 세포로부터 제거하였다. 세포 소포에서 MOF-AuNP 나노클러스터의 강화는 공초점 레이저 스캐닝 현미경검사에 의해 경시적으로 실증되었고 (도 13), 여기서 동등량의 단일 가닥 염료-라벨링된 DNA에 비교하여 세포 소포에서 나노클러스터의 강한 축적이 관측되었다.
- [0120] MTT 검정. 24시간 동안 상이한 양의 MOF-AuNP 나노클러스터로 인큐베이션 후 SK-OV-3 세포의 세포 생존력을 MTT 검정뿐만 아니라 세포 생존력 테스트에 의해 평가하였으며, 이는 세포에 대한 무시할만한 세포독성 또는 항-증식 효과를 나타냈다. 간단히 말하면, SK-OV-3 세포를 37°C에서 24시간 동안 5×10^4 세포/mL의 밀도에서 10% 우태 혈청 (FBS) 및 5% CO_2 를 갖는 McCoy의 5A 배지에서 96-웰 세포 배양판에 씨딩하였다. 이후, 배양 배지를 상이한 용량으로 탄소 도트를 함유하는 200 μL 의 McCoy의 5A 배지로 교체하고 추가로 8시간 또는 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 10 μL 의 5 mg/mL MTT 용액을 각각의 세포 웰에 첨가하였다. 세포를 추가로 4시간 동안 인큐베이션한 후, 이어서 MTT를 갖는 배양 배지를 제거하고, 그 다음 100 μL 의 DMSO를 첨가하였다. 수득한 혼합물을 실온에서 15분 동안 진탕하였다. 492 nm에서의 MTT의 흡광도를 자동 ELISA 분석기 (SPR-960)에서 측정하였다. 각각의 실험은 5회 수행하였고 평균 데이터를 제시하였다.
- [0121] 결과/논의
- [0122] 초기 연구를 위해, UiO-66이 그것의 높은 안정성 및 광범위하게 특성규명된 구조로 인해 선택되었다.²² UiO-66은 아세트산을 사용하여 결정 크기를 조절하도록 용매열 조건하에서 합성하여, 225 ± 35 nm (가장자리 길이) 옥타헤드랄 나노입자를 생성하였다. UiO-66의 결정도 및 결정자 크기는 각각 PXRD 및 주사 전자 현미경검사 (SEM)에 의해 결정되었다 (도 2a, d). 다음으로, 포스페이트-개질된 핵산을 올리고뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 말단 중 어느 하나에서 화학적으로 개질된 포스포르아미다이트를 사용하는 DNA 합성기에서 합성하였다. 전형적인 DNA-MOF 입자 작용화 실험에서, 과량의 올리고뉴클레오타이드를 MOF 나노입자의 콜로이드성 현탁액에 첨가하고, 후속으로 (본 명세서에 기재된 바와 같이) 밤새 인큐베이션하였다. 염-노화 절차를 사용하여 음으로 하전된 올리고머를 스크리닝하고 고밀도의 표면-고정화된 올리고뉴클레오타이드를 달성하였다. 투과 전자 현미경검사 (TEM) 이미지 및 PXRD는 입자의 형상 및 결정도가 DNA 개질 후 보존되었다는 것을 확인했다 (도 2b, d).
- [0123] MOF 나노입자 표면 상에 핵산의 고정화를 확인하기 위해, $^{31}\text{P}\{\text{H}\}$ 매직 앵글 스피닝 (MAS) 고체상 NMR 분광법을 사용하여 말단 포스페이트-작용화된 DNA와 Zr-기반 SBU 사이의 상호작용을 조사하였다 (도 2c). 하나의 염기 ("CPR-T₁"), 2개의 염기 ("CPR-T₂"), 및 20개의 염기 ("CPR-T₂₀")의 길이의, 화학적 인산화 시약 (CPR)으로 합성된 올리고-T 서열을 합성하고, MOF 나노입자 상에 화학적으로 흡착시켰다. 도 2c에 도시된 바와 같이, -0.3 ppm을 중심으로 한 좁은 인 공명은 유리 핵산 샘플에서 결합되지 않은 포스페이트에 해당한다. CPR-T₁@UiO66 경우

에, Zr-포스페이트 결합 형성은 인 공명에서 -0.3으로부터 -5.1 ppm으로의 4.8 ppm 상향영역 편이에 의해 검증되었다.²³ CPR-T₂@UiO-66 경우에, 3개의 공명이 관측되었고 -5.9 ppm에서 미결합된 포스포디에스테르 (-0.2 ppm), Zr-O-P (포스포디에스테르, -2.8 ppm), 및 Zr-O-P (말단 포스페이트) 공명의 P 원자에 배치되었다 (도 2c 삽도). 데이터는 고정화가 두 가지 방식, 즉 두 포스페이트가 Zr-풍부 표면과 결합할 수 있는 말단 상 및/또는 측면 상으로 일어날 수 있다는 것을 제안했다. 2개 Zr-O-P 방식 (말단 포스페이트 대 포스포디에스테르) 사이의 상당한 피크 강도 차이는 내부 포스포디에스테르의 것과 비교하여 Zr 중심에 대한 말단 포스페이트의 증가된 친화도에 기인한다; 이 차이는 주로 내부 포스포디에스테르에 의해 느껴지는 증가된 입체 장애에 기인하고 Zr-포스페이트 상호작용을 연구한 이전의 보고서와 일치하지만, MOF의 맥락에서는 아니다.²⁴ CPRdT₂₀@UiO-66에 대해, 표면 작용화를 확장함에 의해 유의한 화학적 편이가 관측된다. 이 변화는 말단 포스페이트에 대한 백본의 증가된 비율, 각각의 백본 포스페이트에 대한 뚜렷한 화학적 환경, 및 더 긴 올리고뉴클레오타이드 가닥에 대해 접근가능한 더 큰 자유도에 기인한다. 이와 함께, 이들 데이터는 DNA의 말단 포스페이트 부분이 MOF 나노입자의 외부 표면에서 이전에 용매-결합된 Zr 부위에 배위한다는 결론을 지지하였다.

[0124] MOF 표면상의 DNA 적용범위의 정도는 유도적으로 커플링된 플라즈마 원자 방출 분광법 (ICP-AES) 및 UV-가시광 분광법 (UV-vis)에 의해 결정되었다. 표면적 UiO-66에 대한 입자당 및 Zr 원자는 (본 명세서에 기재된 바와 같은) 결정자 크기, 형상 및 구조의 기하학적 근사치에 기초하여 계산되었다. DNA 표면 적용범위를 정량하기 위해, Tamra 염료-표지된 DNA를 사용하여 UiO-66 입자를 개질시켰다. 556 nm에서의 Tamra의 흡수를 측정하여 UiO-66에 대한 평균 DNA 장입이 17 ± 6 pmol/cm²임을 결정했으며, 이는 (본 명세서에서 기재된 바와 같이) ICP-AES에 의해 측정된 인 및 Zr 농도와 관련이 있다. 이 연구에서 실현된 DNA 표면 적용범위는 리간드 스트럿 개질 접근법을 사용한 보고서보다 약 2배 더 높다.¹⁵ 높은 DNA 표면 적용범위는 DNA-작용화된 UiO-66 나노입자 및 상보성 DNA를 갖는 금 NP (직경 = 50 nm)로부터 형성된 응집체(높은 DNA 표면 적용범위를 갖는 입자의 특징인 특성)의 열 용융 분석에 의해 또한 확인되었다.¹

[0125] 이 접근법의 일반성을 평가하기 위해, 4개의 뚜렷한 금속 노드, 4개의 뚜렷한 유기 링커, 및 5개의 상이한 위상 기하학을 나타내는, UiO-66, UiO-67-bpy (2,2'-바이피리딘-5',5'-디카복실산), UiO-68-N3/PCN-58, PCN-222/MOF-545, PCN-223, PCN-224, MIL-101 (Al), MIL-101 (Fe), 및 MIL101 (Cr)을 포함한, 상이한 금속 및 유기 링커를 함유하는 9개의 뚜렷한 MOF 구조를 선택하였다 (도 3). 높은 화학적 안정성에 더하여, 이들 MOF는 나노 의학 분야에서 가능성을 보여준다.^{25,26} MOF 나노입자 합성, 특성규명, 및 표면 작용화와 정량화는 문헌 보고서에 따라 설명된 것 (도 4-9)과 유사하게 수행되었다. 이들 상이한 MOF를 비교할 때, SBU 밀도, SBU 배위수 및 금속-산소 결합 해리 에너지가 표면 작용화에 어떻게 영향을 미치는지를 시험하였다.

[0126] DNA 표면 적용범위는 나노입자 표면 상에 존재하는 SBU의 밀도와 상관관계가 있는 것으로 가정되었다. 이를 테스트하기 위해, 동일한 기본 위상기하학을 갖는 3개의 등압 Zr-기반 프레임워크, 즉 UiO-66, UiO-67-bpy, 및 UiO-68-N₃를 합성했다. 이 계열 내에서, 표면 금속 노드의 밀도는 증가하는 유기 링커 길이의 함수로 감소하며, 이때 Zr 옥사이드 클러스터 SBU 표면 밀도((100) 일면이 노출된 것을 가정)는 각각 UiO-66, UiO-67-bpy, 및 UiO-68-N₃에 대해 0.27, 0.16, 및 0.11 nm⁻²인 것으로 추정된다. 도 3a에서 나타낸 바와 같이, 각각의 MOF 표면에 Zr SBU 밀도의 함수로서 DNA 표면 적용범위를 플롯팅함에 의해, DNA 대 Zr SBU의 비가 본질적으로 일정한(더 많은 표면 Zr을 갖는 구조는 더 많은 DNA를 가짐) 선형 관계가 관찰되었다. 이것은 상이한 MOF에서 DNA 작용화와 표면 SBU 밀도 사이의 정량적 상관관계의 첫 번째 실증으로, 의도된 용도에 적합한 DNA 표면 장입을 갖는 MOF 구조를 선택하는 방법을 제공한다. DNA 장입 밀도가 높을수록 나노물질 콜로이드성 안정성과 높은 DNA-장입이 입자 프로브 성능과 상관되는 특정 생물학적 적용에 유의하게 영향을 줄 수 있다.

[0127] 높은 SBU 배위수를 갖는 MOF가 (나노입자 표면상의 더 많은 용매-결합된 CUS로 인해) 더 높은 DNA 작용화 밀도를 초래할 것이라는 것을 시험하기 위해, 3개의 Zr-기반 포르피린성 MOF인, PCN-222, PCN-223, 및 PCN-224를 동일한 테트라카복시페닐 포르피린 링커 (H₂TCP)로부터 합성하였다. 이것은 상이한 SBU 연결성으로 인해 다양한 총 위상기하학을 공유하는 구조를 초래했다 (도 3b). 구체적으로, 8-, 12- 및 6-의 배위수를 갖는 3개의 상이한 옥타헤드랄 Zr₆ SBU가 이들 프레임워크 각각을 한정하고, 각각 0.28, 0.25, 및 0.28 nm⁻²의 비교할만한 표면 SBU 밀도를 산출한다. 도 3b에 도시된 바와 같이, 비교할만한 표면 SBU 밀도를 갖는 3개의 MOF에 대한 SBU 배위수에 따라 DNA 표면 적용범위가 증가하는 경향이 보였다. 이는 고도로 배워진 금속 클러스터가 배워 불포화

로 인해 더 높은 수준의 표면 결합을 노출하기 때문이며,²⁷ 이는 후속적인 포스페이트-DNA 흡착에 유리하다.

[0128] 더 강한 금속-포스페이트 결합의 형성이 DNA 흡착의 더 큰 범위를 촉진시킬 것인지의 여부는 다음에 시험되었다 (도 3c). 3개의 등구조 MIL-101 프레임워크가 합성되었다: MIL-101 (Cr), MIL-101 (Fe), 및 MIL-101 (Al). 3가지 MOF 모두에서 동일한 구조가 발견되기 때문에, DNA 표면 적용범위를 결정하는 데 포스페이트-금속 접착 강도 (흡착 후)의 중요성을 평가할 수 있다. Fe-O, Cr-O 및 Al-O 결합에 대해 각각 409, 477 및 512 kJ/mol의 금속-산소 결합 해리 에너지 (BDE)가 보고되었다.²⁸ DNA 표면 적용범위에서의 증가가 BDE의 함수로 관찰되었다 (도 3c).

[0129] 마지막으로, DNA-MOF 나노입자 콘주게이트 표면에서의 올리고뉴클레오타이드의 안정성 및 밀도의 이해와 함께, 상이한 DNA-NP 크기, 형태 및 조성을 갖는 이러한 구조의 하이브리드화 및 어셈블리 특성을 연구하였다. 특히, DNA-MOF 나노입자 및 원형의 무기 금 나노입자 (AuNP) SNA 콘주게이트를 사용하여 하이브리드 코어-위성 나노클러스터를 합성하였다. 전형적인 실험에서, 상이한 크기의 AuNP는 MOF 나노입자 상의 것에 상보성인 DNA 서열로 작용화되어 어셈블리를 용이하게 하고, 보체가 혼합되고, 염이 노화되고, 생성된 코어-위성 하이브리드 구조는 저속 원심분리에 의해 분리되었다. 조립된 나노클러스터의 형태를 확인하기 위해, 도 10a에서 나타낸 바와 같이, DNA- 나노입자 어셈블리를 안정화시키기 위해 개발된 실리카 캡슐화 프로토콜을 사용하였다.²⁹ 중요하게는, 비상보성 DNA-작용화된 입자를 혼합하면 MOF-AuNP 나노클러스터는 형성되지 않았다.

[0130] DNA-매개된 하이브리드화 반응의 화학양론을 변형시킴에 의해 (MOF NP:AuNP 비를 1:20로부터 1:2000로 변형시킴에 의해), 중심 MOF 입자에 대한 금속 NP의 장입을 제어할 수 있다 (도 10b). MOF-NP 나노클러스터 위성 구조의 형성은 높은 AuNP:MOF 비에서 중합체 구조보다 선호되었다; 일단 형성되면, 그것들은 클러스터 간 하이브리드화를 통한 연장된 네트워크의 형성을 억제하는 나노클러스터 주변에 동일한 비상보성 DNA만을 노출시켰다. 이 DNA-매개된 접근법의 일반성을 더 탐구하기 위해, 위성 구조는 금 나노스타, 육면체, 팔면체 및 삼각형 프리즘, 은 구형체 및 Fe₃O₄ 구형체를 포함하여 다양한 DNA-작용화된 NP 구성 블록을 갖는 MOF 입자 코어로 체계적으로 조립되었다. 얻어진 구조의 TEM 및 에너지-분산형 X-선 분광법 (EDX) 맵핑은 그것의 깨끗한 형성을 보여준다 (도 11 및 12). 세포의 세포독성 및 MOF-NP 하이브리드 나노클러스터의 흡수 특성을 또한 평가하였다. 세포 소포에서 MOF-AuNP 나노클러스터의 경시적 강화는 공초점 레이저 스캐닝 현미경검사에 의해 실증되었으며 (도 13 및 19), 여기서 주목할 만한 세포독성 없이, 동등량의 단일 가닥 염료-라벨링된 DNA에 비교하여 세포 소포에서 나노클러스터의 강한 축적이 관측되었다 (도 14). 이와 함께, 구현된 구조는 프로그래밍 가능한 어셈블리에 대한 그리고 디자이너 올리고뉴클레오타이드 상호작용이 관련된 응용분야에서의 이들 새로운 DNA-개질된 MOF NP의 다목적성과 잠재적 유용성을 설명한다.

[0131] 극저온-투과 전자 현미경검사 (동결-TEM) 이미지는 용액에서 MOF-AuNP 나노클러스터의 형성을 확인했다 (도 16 및 17). MOF-NP 코어-위성 나노클러스터의 광학 특성은 또한 유리 콜로이드성 나노입자의 흡광을 조립된 MOF-나노입자 응집체와 비교하기 위해 결정되었다. 모든 경우에 흡광 최대는, 플라스몬 나노입자를 조립하는 것으로부터 잘-알려진 효과인, 유리 입자 LSPR로부터 약 20 nm만큼 적색-편이된다 (도 18).

[0132] 본 실시예는 본 명세서에서 개시된 기술에 대한 몇 가지 이점을 보여주었다. 첫째, 유기 링커의 선택과는 독립적이며 다양한 금속 클러스터에 광범위하게 적용될 수 있는 DNA-개질된 MOF의 합성에 대한 접근법을 제공한다. 둘째, 실현된 구조는 안정적이고, 본래 MOF 특성을 많이 가지고 있으며, 상보성 DNA-개질된 NP 구성 블록으로 프로그래밍 가능하게 조립할 수 있다. 셋째, DNA로 MOF NP를 개질하기 위한 디자인 규칙이 이 작업을 통해 등장하고 있다. 가장 주목할만한 것은, DNA 표면 적용범위가 MOF 나노입자 표면 SBU 밀도, 배위수, 및 금속-포스페이트 결합 강도와 직접적으로 관련되는 것이 본 명세서에서 제시되었다. 마지막으로, 본 명세서에서 기재된 실험은 생물학,³⁰ 촉매작용³¹ 및 광학³²에 유용한 특성을 갖는 디자이너 재료를 제조하는데 사용될 수 있는 조정 가능한 특성을 갖는 광범위한 부류의 NP 구성 블록으로의 경로를 제공한다.

[0133] **실시예 2**

[0134] **물질**

[0135] 달리 언급되지 않는 한 모든 시약은 상업적 공급원으로부터 입수하였고 추가 정제없이 사용하였다. 인간 제2형 인슐린 (분자식: C₂₅₇H₃₈₃N₆₅O₇₇S₆, 분자량: 5807.57, 카탈로그 번호: 91077C-100MG)은 미국의 Sigma-Aldrich로부터 구매되었다. 인슐린인, Alexa fluor 647 라벨링된 인슐린 (인간)은 미국의 NanoCS로부터 구매되었다. ELISA

키트는 미국의 Fisher Scientific으로부터 구매되었다. 이 연구에 사용된 모든 올리고뉴클레오타이드는 Glen Research에서 구입한 시약으로 고체-지지 MM12 합성기상에서 합성되었다. 모든 실험에 사용된 물은 Milli-Q Biocel 시스템 (Millipore, Billerica, MA, USA)으로부터 수득된 초순수 탈이온화 (DI) 등급 (18.2 MΩ · cm 저항률)이었다.

[0136] **MOF NP 합성**

[0137] **150 nm NU-1000 MOF NP의 합성.** 8 mg (34.3nmol)의 지르코늄 클로라이드 및 2 mg (3 nmol)의 1,3,6,8-테트라키스(p-벤조산)피렌 (H4TBAPy) 리간드를 2.0 mL의 N,N-디메틸포름아미드 (DMF)에 용해시키고, 0.4 ml 아세트산 및 0.2 ml DI 수를 또한 혼합물 용액에 첨가하여 반투명한 황색 용액을 생성하였다. 10개 샘플 바이알을 동일한 조건하에서 한번에 제조하고, 90℃에서 오븐 안에 30분 동안 넣어 두었으며, 그 시간 동안 밝은 황색 현탁액이 형성되었다. 실온으로 냉각시킨 후, 10개 바이알을 조합하고 나노결정을 원심분리 (15000 rpm, 30 분)에 의해 수집하고, 이어서 DMF 및 아세톤으로 3회 용매 교환하고, 그 다음 후속으로 HCl로 활성화시켰다.

[0138] **10 μm NU-1000 MOF 입자의 합성.** 10 μm NU-1000 입자의 합성은 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.⁴³ 간단히, 70 mg의 ZrCl₄ (0.30 mmol) 및 2700 mg (22 mmol)의 벤조산을 8 mL의 N,N-디에틸포름아미드 (DEF) (6-드램 바이알 내)에 혼합하고 초음파로 용해하였다. 맑은 용액을 오븐에서 80℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 40 mg (0.06 mmol)의 H₄TBAPy를 이 용액에 첨가하고 혼합물을 20분 동안 초음파처리하였다. 황색 현탁액을 오븐에서 120℃에서 48시간 동안 가열하였다. 실온으로 냉각시킨 후, 황색 단일 결정은 바이알 벽 상에 존재하였다. 샘플은 DMF 및 아세톤으로 세정하고 후속으로 HCl로 활성화시켰다.

[0139] **PCN-222 MOF NP의 합성.** 200 nm PCN-222/MOF-545 나노결정의 합성은 약간의 변형을 한 문헌에 보고된 방법에 기초하였다.⁴⁴ 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (37.5 mg, 0.116 mmol) 및 테트라키스(4- 카복시페닐)-포르피린 (6.5 mg, 0.0082 mmol)을 테플론-라이닝된 캡을 갖는 22 mL 보로실리케이트 바이알에서 DMF (16.25 mL)에 용해시켰다. 디클로로아세트산 (0.25 mL, 3.0 mmol)을 첨가하고, 수득한 용액을 130℃에서 18시간 동안 가열하여 어두운 자주색 막대-형상화된 나노결정 및 황색 모액을 수득하였다. 나노결정을 원심분리 (15000 rpm, 5 분)에 의해 수집하고, 이어서 DMF와 용매 교환하였다. 수득한 나노입자의 크기 분석을 수행하였다 (도 20).

[0140] **분말 X-선 회절.** MOF 나노입자 (합성된 상태, 인슐린 캡슐화된 것, 및 인슐린 캡슐화된 DNA-MOF 콘주게이트)의 결정도는 분말 X-선 회절 (PXRD)에 의해 확인되었다. 분말 X-선 회절 (PXRD) 데이터 (도 21)는 Cu 회전 애노드 X-선원이 장착된 Rigaku 모델 ATX-G 회절분석기 상에서 수집되었다.

[0141] **인슐린 캡슐화.** 활성화된 MOF 나노입자 (3 mg)를 1시간 동안 실온에서 인슐린 용액 (DI 수 내, 0.4 mg/mL)으로 처리하여 인슐린을 캡슐화하였다. 인슐린 장입은 문헌에 보고된 방법에 기초하여 유도적으로 커플링된 플라즈마-광학 방출 분광법 (ICP-OES) 및 열중량측정 분석 (TGA)에 의하여 측정되었다.⁴⁵ MOF NP의 표면에 부착된 인슐린을 제거하기 위해 상청액을 경사분리하고 고체 샘플을 그 다음 DI 수로 3회 세정하여 결정의 표면에 부착된 인슐린 분자를 제거하였다.

[0142] **DNA 합성 및 작용화**

[0143] **올리고뉴클레오타이드의 합성.** 올리고뉴클레오타이드 (표 2)는 표준 CPG 고상 지지체 상에서 Mermaid MM12 DNA 합성기 (Bio Automation)를 사용하여 합성되었다. 모든 올리고뉴클레오타이드는 제조자에 의해 권고된 조건 하에서 탈보호되었고 역상 고정능 액체 크로마토그래피 (HPLC)에 의해 정제되었다. 농도의 특성규명 및 결정은 각각 매트릭스 보조된 레이저 탈착 이온화 (MALDI-TOF) 질량 분광분석법 및 UV-Vis 분광법에 의해 결정되었다.

표 2

표 2. 이 실시예에서 사용된 DNA 서열.

#	서열 명칭	서열
13	폴리 G	5' - (dGGT) ₁₀ -포스페이트 - 3'
214	폴리 G-염료	5' - (Tamra-dT)-(dGGT) ₁₀ -포스페이트 - 3'

3' 포스페이트는 3-(4,4'-디메톡시트리틸옥시)-2,2-(디카복시메틸아미도)프로필-1-O-석시노일-장쇄 알킬아미노-CPG (3'-CPR II CPG)를 지칭한다.

Tamra-dT는 5'-디메톡시트리틸옥시-5-[N-((테트라메틸로다민일)-아미노헥실)-3-아크릴이미도]-2'-테옥시우리딘-3'-[(2-시아노에틸)-(N,N-디이소프로필)]-포스포라미다이트 (Tamra-dT)를 지칭한다.

[0144]

[0145] **DNA 작용화.** MOF NP의 DNA 작용화는 약간의 변형을 하여 이전에 보고된 방법에 기초하여 수행하였다.⁴⁶ 전형적인 DNA 작용화 실험에서, 과량의 포스페이트 중결된 핵산 (대략 100 nmol)을 MOF NP 콜로이드 (대략 2 mg)에 첨가하고, 그 다음 진탕기 상에 놓고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 과량의 올리고뉴클레오타이드는 원심분리 (3 x 10000 rpm, 15 분)에 의해 제거하고, 이어서 물에 재현탁하였다. SEM 이미지는 DNA-NU-1000 및 DNA-PCN-222 나노입자 (NP)의 형태가 DNA 작용화 후 유지되었다는 것을 확인했다 (도 22). Tamra-DNA-NU-1000 NP 및 NU-1000 NP의 UV-vis 스펙트럼이 또한 획득되었다 (도 23).

[0146]

DNA-NU-1000 및 DNA-PCN-222의 열화 프로파일

[0147]

모의실험된 세포의 매트릭스에서 열화 프로파일. 혈관내 및 간질액을 시뮬레이션하기 위해, MOF NP를 온화한 셰이킹 (400 rpm)으로 37°C에서 DMEM 완충액 + 혈청 (pH = 7.0)으로 인큐베이션하였다. 구체적으로, 대략 50 µg의 DNA-NU-1000 및 DNA-PCN-222를 먼저 200 µL 물에 분산하여 모액 (0.25 mg/mL)을 형성하였다. 다음으로, 20 µL의 모액 및 980 µL (DMEM 완충액 + 혈청 용액) (pH=7.0)를 함유하는 7개의 동일한 샘플을 열 진탕기 상에서 각각 0.5, 1.5, 6, 12, 24, 48, 및 72 시간 인큐베이션하였다. 각각의 시점에서, 하나의 샘플을 수집하고 원심분리 (15000 rpm, 15 분)하여 나머지 MOF NP를 제거하였다. 상청액의 UV-vis 흡광도를 측정하고 링커 방출의 백분율을 경시적으로 표준 곡선에 기초하여 계산하였다.

[0148]

모의실험된 세포내 매트릭스에서 열화 프로파일. 유사한 절차에 따라 1 x PBS 용액에서 DNA-NU-1000 및 DNA-PCN-222의 열화 프로파일을 측정하여 세포내 매트릭스 (pH=7.0, 100 mM NaCl)에서의 열화를 시뮬레이션하였다.

[0149]

질소 흡착 등온선 측정. N₂ 흡착 등온선 측정은 77K에서 Micromeritics Tristar II 3020 (Micromeritics, Norcross, GA) 상에서 수행하였다. 20 내지 30 mg의 물질을 각각의 측정에 사용하였다. 표면적은 Brunauer-Emmett-Teller (BET) 방정식을 적용하여 추정하였다. T-플롯 내부 및 외부 표면적은 N₂ 등온선의 제2 선형 영역 (0.26 P/P₀ 내지 1.0 P/P₀)에서 Harkins 및 Jura 방정식에 의해 결정하였다 (도 24). NU-1000 및 PCN-222의 DFT 기공 크기 분포는 인슐린이 중간기공 및 미세기공 둘 모두를 점한다는 것을 제안했다 (도 25).

[0150]

세포 흡수 실험 및 세포독성 평가

[0151]

세포 배양 및 인큐베이션. 인간 난소암 세포 SK-OV-3(ATCC® HTB-77™) 및 마우스 흑색종 세포 B16-F10 (ATCC® CRL-6475)를 37°C에서 5% CO₂를 갖는 인큐베이터에서 인큐베이션하였다. 이들 두 세포주에 대한 배지는, 대략적으로 10% 우태 혈청 (FBS) 및 1% 항생제를 함유하는, McCoy의 5A 배지 (ATCC® 30-2007™) 및 돌베코 변형된 이글 배지 (DMEM) (ATCC® 30-2002™)였다. 세포는 허용가능한 합류점을 얻기 위해 2 또는 3일 마다 계대하였다.

[0152]

공초점 형광 현미경검사에 의한 세포 이미지형성. 공초점 형광 현미경검사를 공초점 레이저 현미경 (Zeiss LSM 800) 시스템 상에서 수행하여 인슐린@DNA-MOF NP가 세포에 의해 내재화되었음을 확인하였다. SKOV-3 세포를 5 x 10⁴ 합류점으로 번성물에 분주하였다. 인슐린-캡슐화된 MOF 및 유리 인슐린을 그 다음 세포 (표 3)와 함께 인큐

배이션하였다. 6 시간 후, 배지 내 입자를 세정하고 세포를 4% 포름알데하이드로 고정시켰다. 세포 골격 액틴 (F-액틴)은 AlexaFluor 488 Phalloidin (ThermoFisher A12379)으로 염색하였다.

표 3

표 3. 이 연구에 사용된 서열에 대한 DNA 및 인슐린 농도

#	설명	DNA 농도	인슐린 농도
1	AF647 인슐린@ tamra-DNA-NU-1000	100 nM	~ 180 nM
2	AF647 인슐린@tamra-DNA-PCN-222	100 nM	~ 140 nM
	Tamra-DNA	100 nM	
3	AF647 인슐린		160 nM

[0153]

[0154]

유세포측정에 의한 세포 흡수. LSR-II 유세포측정 기계를 사용하여 올리고뉴클레오타이드 및 인슐린 둘 모두의 세포 흡수를 식별하였다. Skov-3 세포를 먼저 5×10^5 농도로 유동 튜브에서 인큐베이션하였다. 그런 다음 인슐린@DNA-MOF, 및 대조군 (유리 인슐린 + 유리 DNA)을 그 다음 세포로 인큐베이션하였다 (표 3). 15 분 또는 2 시간 후, 입자를 세정하고 세포를 4% 포름알데하이드로 고정시켰다. 유동 데이터는 먼저 SSA 및 FSA 파라미터로 게이팅하고 각각의 채널에서의 양성 게이팅은 음성 대조군에 기초되었다.

[0155]

MTT 검정. 인슐린@DNA-MOF 작제물의 항-증식성 효과를 MTT 검정에 의해 평가하였다. 구체적으로, B16-F10 세포를 37°C에서 24시간 동안 10% 우태 혈청 (FBS) 및 5% CO₂로 5×10^4 세포/mL의 밀도에서 DMEM 배지 내 96-웰 세포 배양판에 씨딩하였다. 다음으로, 배양 배지를 (비-라벨링된 DNA 및 인슐린과 함께) 상이한 농도에서 샘플을 함유하는 200 μ L의 DMEM 배지로 대체하고 72시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 10 μ L의 5 mg/mL MTT 용액 (10% SDS)을 각각의 세포 웰에 첨가하였다. 세포를 4시간 동안 더 인큐베이션하고, 이어서 MTT를 갖는 배양 배지를 제거하였다. 마지막으로, 100 μ L의 10 % SDS를 첨가하고 37°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 492 nm에서 MTT의 흡광도는 977nm에서 기준 흡광도와 함께 자동 ELISA 분석기 (SPR-960) 상에서 측정하였다. 각각의 실험은 3회 수행하였고 평균 데이터를 제시하였다.

[0156]

결과/논의

[0157]

수성-안정성 및 메조포러스 채널 구조에 기인하여, 두 지르코늄 메조포러스 MOF, NU-1000 및 PCN-222/MOF-545,⁸⁹⁻⁹¹를 모델 효소로서 인슐린을 캡슐화하기 위해 나노입자로 합성하였다 (도 26b).⁹²⁻⁹³ 다음으로, 이들 인슐린@MOF NP를 말단 포스페이트-변형된 DNA로 표면 작용화하여 인슐린@DNA-MOF를 생성하였으며 (도 26c), 여기서 3D 올리고뉴클레오타이드 셸이 입체 및 정전 장벽을 만들어 높은 유전 매질에서 MOF NP를 안정화시키고 이들에게 세포 도입에 관한 작용성을 부여하였다.⁷⁷ 이 전략은 상이한 기공 크기의 MOF로, 그리고 높은 적재물과 함께 세포 막을 가로 질러 작용성 효소를 전달하기 위한 핵산-MOF-기반 전달 비히클의 라이브러리를 만들기 위해 일반화될 수 있다.

[0158]

MOF NP 합성 및 인슐린 캡슐화는 문헌 보고서에 따라 실현되었다.⁹⁴⁻⁹⁵ 간단히, NU-1000 MOF NP (180(20) x 70(10) nm)를 90°C에서 DMF 내 지르코늄 클로라이드 (ZrCl₄), (4,4',4'',4'''-(포르핀-5,10,15,20-테트라일)테트라키스(벤조산) (H₄TBAPy), 및 아세트산의 용매열 반응을 통해 합성하였다 (도 27a). PCN-222 NP (210(30) x 50(10) nm)는 130°C에서 N,N-디메틸포름아미드 (DMF) 내 지르코닐 클로라이드 옥타하이드레이트 (ZrOCl₂·8H₂O), 테트라키스(4-카복시페닐)포르피린 (TCPP), 디클로로아세트산의 용매열 반응을 통해 합성하였다 (도 27b). 다음으로, NU-1000의 활성화된 결정을 인슐린을 함유하는 비스-트리스-프로판 완충액 (BTP, pH = 7) 용액으로 처리하였다. MOF NP에 의한 인슐린의 캡슐화 효율은 유도적으로 커플링된 플라즈마-광학 방출 분광법 (ICP-OES)에 의해 결정되었고, 및 39 및 34 wt%의 최대 장입이 각각 NU-1000 및 PCN-222 NP에 대해 결정되었다, (도 27d). 상청액 내 과잉의 인슐린 및 입자 외부 표면 상에 흡착된 것들을 DI 수 및 트립신 용액을 이용한 순차적인 단계의 세정에 의해 제거하였다.

[0159]

핵산으로 인슐린@MOF NP를 작용화하기 위해, 조밀한 불포화 배위 Zr을 말단 포스페이트-변형된 올리고뉴클레오

타이드를 사용하여 NU-1000 및 PCN-222 NP 표면 상에서 화학적으로 다루었다.⁹⁶ 포스페이트 변형된 핵산은 3' 포스페이트 변형된 포스포르아미다이트를 이용하여 DNA 합성기 상에서 합성하였다. 여기서 사용된 서열인, 5' (dGGT)₁₀-포스페이트 3'는 폴리 dT 셀에 비하여 G-풍부 셀을 갖는 SNA의 세포 흡수가 향상되었음을 나타낸 이전의 연구에 기초하여 선택하였다.⁹⁷ 전형적인 DNA 작용화 실험에서, 과잉의 올리고뉴클레오타이드를 MOF NP의 콜로이드성 분산물에 첨가하고 (본 명세서에서 기재된 바와 같이) 4시간 동안 인큐베이션하였다. 양 MOF NP의 DNA 적용범위의 정량화는 P 대 Zr 비에 기초한 ICP-OES에 의해 달성되었으며, 여기서 8 ± 1 nmol/mg 및 10 ± 1 nmol/mg의 DNA 장입이 각각 NU-1000 및 PCN-222 NP에 대해 측정되었다 (도 27d). 분말 X-선 회절 (PXRD) 및 주사 전자 현미경검사 (SEM)은 MOF NP의 결정도 및 형태가 DNA 작용화 후 보존되었다는 것을 확인했다 (도 22). 중요하게는, 동적 광 산란 (DLS)은 DNA 표면 작용화가 생체-관련된 배지에서 MOF NP 콜로이드성 안정성을 상당히 증가시켰다는 것을 확인했다. 도 27c에서 나타난 바와 같이, DNA 작용화된 NU-1000 및 PCN-222 NP는 적어도 24시간 동안 세포 배지 (90% DMEM 완충액 + 10% 우태 혈청)에서 콜로이드성으로 안정하였고, 반면에 작용화되지 않은 NU-1000은 한 시간 미만에서 응집하여, 추가의 시험관내 적용을 방해하였다.

[0160] 콜로이드성 안정성에 더하여, 세포내 단백질 전달 비히클에 대한 또 다른 바람직한 설계 고려사항은 혈청/세포외 매트릭스에서의 안정성과 단백질 전달대상물을 방출하는 세포 내부 분해성이다. 생리적 조건 하에서, 세포내액은 혈청의 것 (대략 1 mM)에 비하여 상당히 더 높은 무기 포스페이트 농도 (대략 10 mM)를 나타낸다.⁹⁸⁻⁹⁹ 따라서, 인슐린@DNA-NU-1000 및 인슐린@DNA-PCN-222의 열화 프로파일이 (본 명세서에서 기재된 바와 같이) 세포외 및 세포내 둘 모두를 모방하도록 설계된 용액에 이들을 노출시킴에 의해 평가되었다. 혈청 유체를 시뮬레이션하기 위해, MOF NP를 온화한 웨이킹 (400 rpm)으로 37°C에서 90% DMEM 완충액 + 10% 혈청 (pH = 7.0)으로 인큐베이션하였으며, 여기서 5% 미만의 열화가 비히클 둘 모두에 대해 12시간 이내에 발생하였고, 20% 미만이 96시간 이내에 발생하여, DNA-MOF가 탁월한 순환 안정성을 나타낸다는 것을 시사한다 (도 28a, b). 그에 반해서, MOF NP가 온화한 웨이킹으로 37°C에서 세포내 배지 모의체(1 x 포스페이트 완충 식염수, pH = 7.0)에서 인큐베이션된 경우, 비히클은 더 빠른 속도로 열화되기 시작했다 (도 28c, d). 흥미롭게도, DNA-PCN-222는 DNA-NU-1000의 것 (반감기 = 40 시간)에 비교하여 훨씬 더 빠른 열화 (반감기 = 1 시간)를 나타내어, 유기 링커의 의도된 선택이 프레임워크 안정성과, 따라서 단백질 방출 동역학에 대해 심오한 영향을 미칠 수 있었다는 것을 시사한다. DNA-MOF NP가 세포외 조건 하에서 안정하고 조절가능한 세포내 열화 동역학을 갖기 때문에 이러한 결과는 유망하다.

[0161] MOF NP 표면 상의 핵산의 고정화를 직접적으로 시각화하기 위해, 공초점 현미경검사를 사용하여 인슐린@DNA-NU-1000 MOF NP를 이미지화하였다. 공초점 현미경검사의 해상도 한계때문에, $2.8 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$ NU-1000 입자를 인슐린 라벨링된 AlexaFluor 647 염료 (AF647)로 캡슐화하고, 이전에 기재된 바와 같이 말단 TAMRA-라벨링된 DNA로 추가로 작용화하였다. 대표적인 이미지에서, AF647 및 TAMRA 신호의 공편재화는 인슐린의 성공적인 캡슐화와 이어서 DNA의 작용화를 확인한다 (도 28a). 인슐린 및 DNA의 상대 분포에 관하여 상세한 정보를 얻기 위해, 단일 MOF 입자의 Z-스택 이미지를 취하였으며, 여기서 TAMRA 신호 (DNA)는 우선적으로 주변을 차지하는 것으로 관측되었고 반면 AF647 (인슐린)은 입자 전반에 걸쳐 존재하였다 (도 28b). MOF의 중심 부분에 비해 입자의 양 단부에서 관찰된 AF647 신호가 증가한 것은 단백질이 이전에 연구된 확산-유도된 기전인, 1D 채널을 따라 이동한다는 것을 나타냈다.⁹³ MOF 기공의 큰 직경 (NU-1000에 대해 3.2 nm 및 PCN-222에 대해 3.7 nm)때문에,⁹¹ 단일 가닥 DNA가 MOF 기공을 통해 침투하고 내부 표면을 작용화하여, 입자 내부의 형광 신호로 이어질 것으로 예상된다. N₂ 흡착 등온선에 의해 확인된 바와 같이, 감소된 N₂ 흡수 용량이 MOF 둘 모두에 대해 인슐린 캡슐화 후 관찰되었고, 다공도의 추가의 손실이 DNA 작용화 후에 관찰되었다 (도 24 및 25). 기공 크기 분포 분석은 인슐린이 중간기공 및 미세기공을 둘 모두를 점유하였음을 확인했다. 전략의 일반성에 대한 중요한 질문은 DNA 작용화 공정 동안에 인슐린이 MOF NP 기공에서 누출되거나 촉매 활성을 상실하는지 여부를 확인하는 것이었다. 이 질문을 시험하기 위해, 효소-결합 면역흡착 검정 (ELISA)을 이용하여 인슐린@DNA-NU-1000 및 인슐린@DNA-PCN-222 작제물의 캡슐화 효능을 결정하였다. 두 경우 모두에, 인슐린 활성 손실은 관측되지 않아, DNA 작용화가 비히클로부터 단백질 침출을 유발하지 않았다는 것을 시사한다 (도 28e).

[0162] 이전에 언급된 바와 같이, SNA-나노입자 콘주게이트의 주요 특징은 세포에 효과적으로 들어가는 그것의 능력이다. 따라서, 인슐린@DNA-MOF가 향상된 세포 흡수를 실증했는지 여부를 시험했다. 구체적으로, NU-1000 및 PCN-222 NP를 AF647 라벨링된 인슐린으로 캡슐화하고 TAMRA 라벨링된 DNA로 작용화하고, (본 명세서에서 기재된 바와 같이) 0.5 시간, 2 시간, 6 시간, 및 24시간 동안 인간 난소 선암종 세포인 SKOV-3으로 인큐베이션하였다. 대조군으로, 유리 TAMRA-라벨링된 DNA 및 AF-647 라벨링된 인슐린의 혼합물을 동일한 농도에서의 세포와 함께

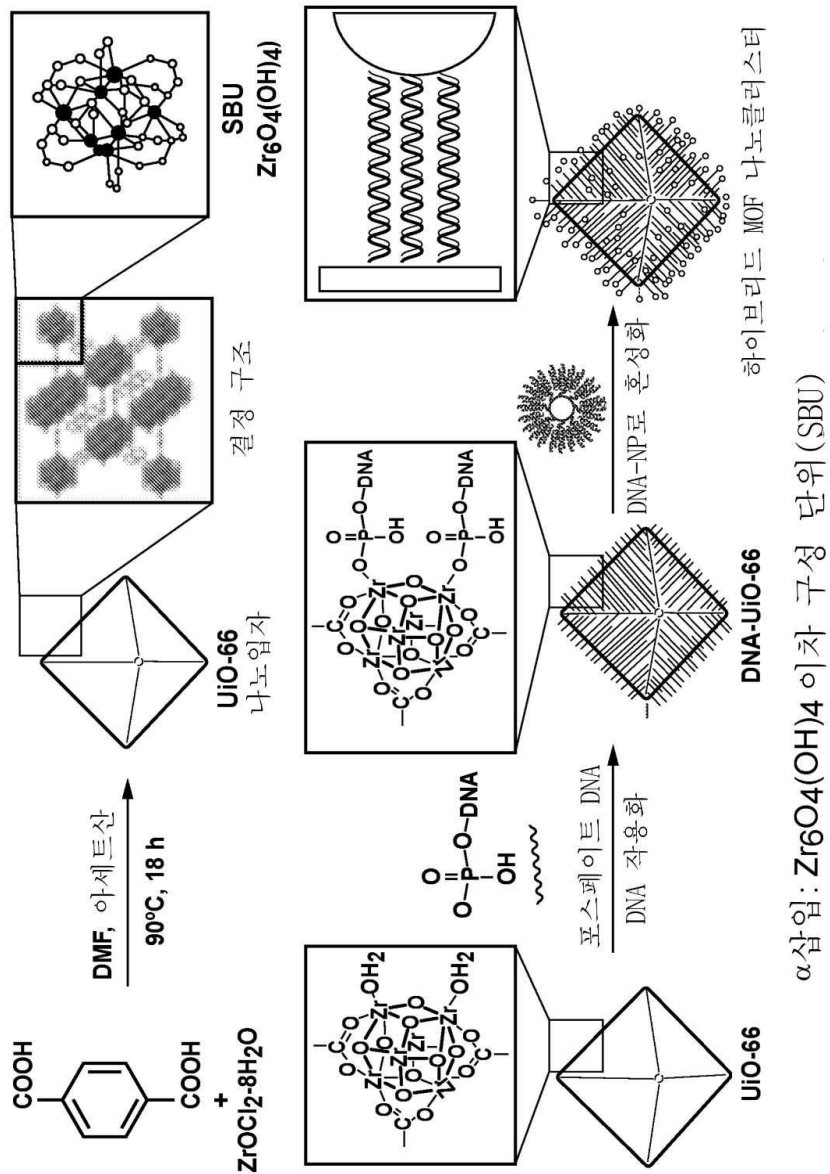
인큐베이션하였다. 세포 소포에서 인슐린의 농축은 공초점 레이저 스캐닝 현미경검사에 의해 실증되었으며, 여기서 세포 소포에서의 AF647 염료 및 TAMRA 신호의 강한 공편재화가 관측되었다 (도 29a-c). Z-스택 이미지는 인슐린@DNA-MOF NP가, 세포막에 부착되는 것과는 대조적으로, 세포에 의해 내재화되었다는 것을 확인했다. 처리 2시간 후, 유세포측정을 수행하고, 유리 인슐린 + DNA 대조군으로 처리된 세포와 비교하여 인슐린@DNA-MOF로 처리된 세포에서 형광이 10-배수 증가되었음을 입증하였다 (도 29d). 인슐린@DNA-MOF는 통상적인 형태의 것에 비교하여 세포 흡수에서 유사한 수준의 향상을 나타낸다. 마지막으로, DNA 작용화된 MOF NP가 형질감염 시약의 필요없이 세포로 효과적으로 유입하는 것을 입증한 후, 무시할만한 세포독성 또는 항-증식성 효과를 갖는 MTT 검정에 의해 평가된 두 구조의 시험관내 세포독성이 관찰되었다 (도 29e).

[0163]

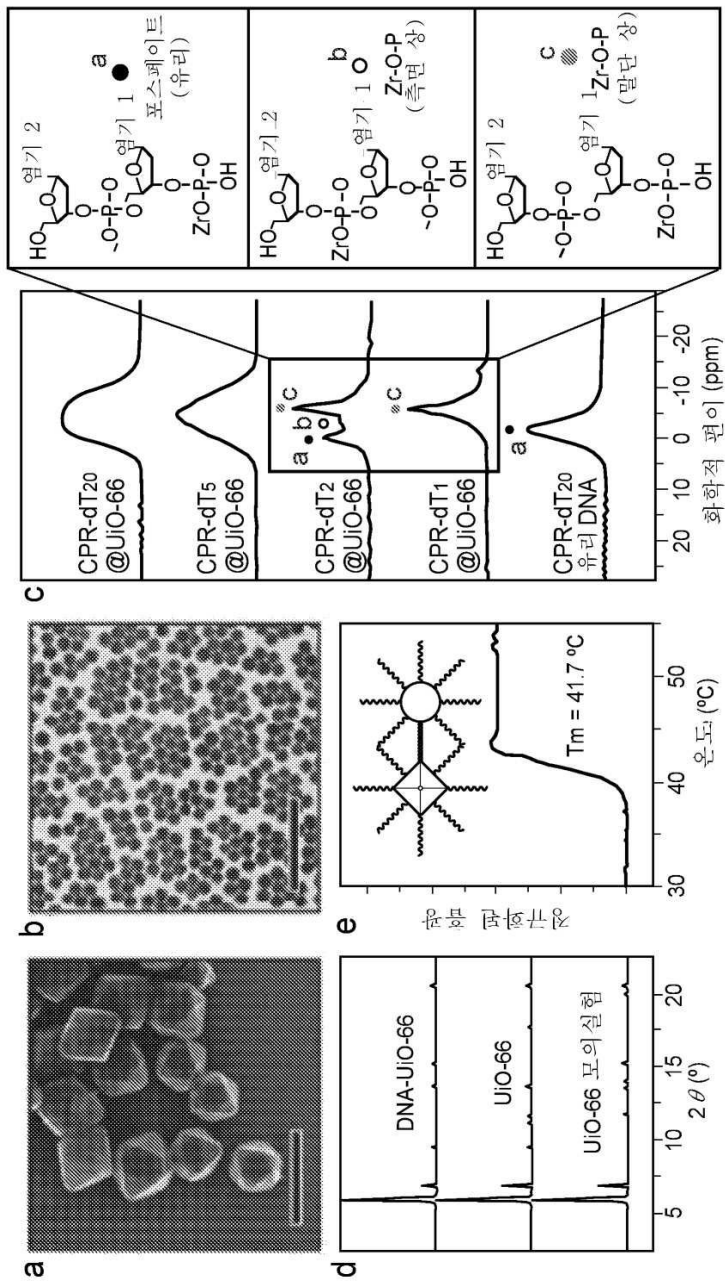
요약하면, 단백질 캡슐화된 핵산-MOF NP 콘주게이트를 제조하기 위한 합성 전략이 본 명세서에서 개시되어 있으며, 높은 적재물 및 무시할만한 세포독성에서 세포막을 가로 질러 단백질을 효율적으로 전달하기 위한 이들 구조의 사용이 입증되었다. 본 명세서에서 표면 핵산 작용화는 모두 단백질 활성을 보유하면서 단백질 캡슐화된 MOF NP의 콜로이드성 안정성 및 세포내 전달 효율을 유의하게 향상시킨다는 것을 보여준다. 실시예는 이들 고도의 모듈식 물질이 생물학적 적용에 유용할 수 있도록 하는 MOF 표면 나노구조의 중요한 역할을 강조한다. 본 개시내용의 조성물 및 방법은 MOF 기공 크기를 조정함에 의해 다양한 단백질이 캡슐화될 수 있게 하고,^{93, 100-101} 또한 다양한 목적, 예컨대 생체내 이미징형성,⁴⁸ 유전자 조절,⁷⁸ 치료제,⁵¹ 및 근본적인 세포 과정을 연구하는 것⁵⁰에 중요한 단백질 및 핵산 표적을 함께 전달할 수 있다는 것이 또한 고려된다.

도면

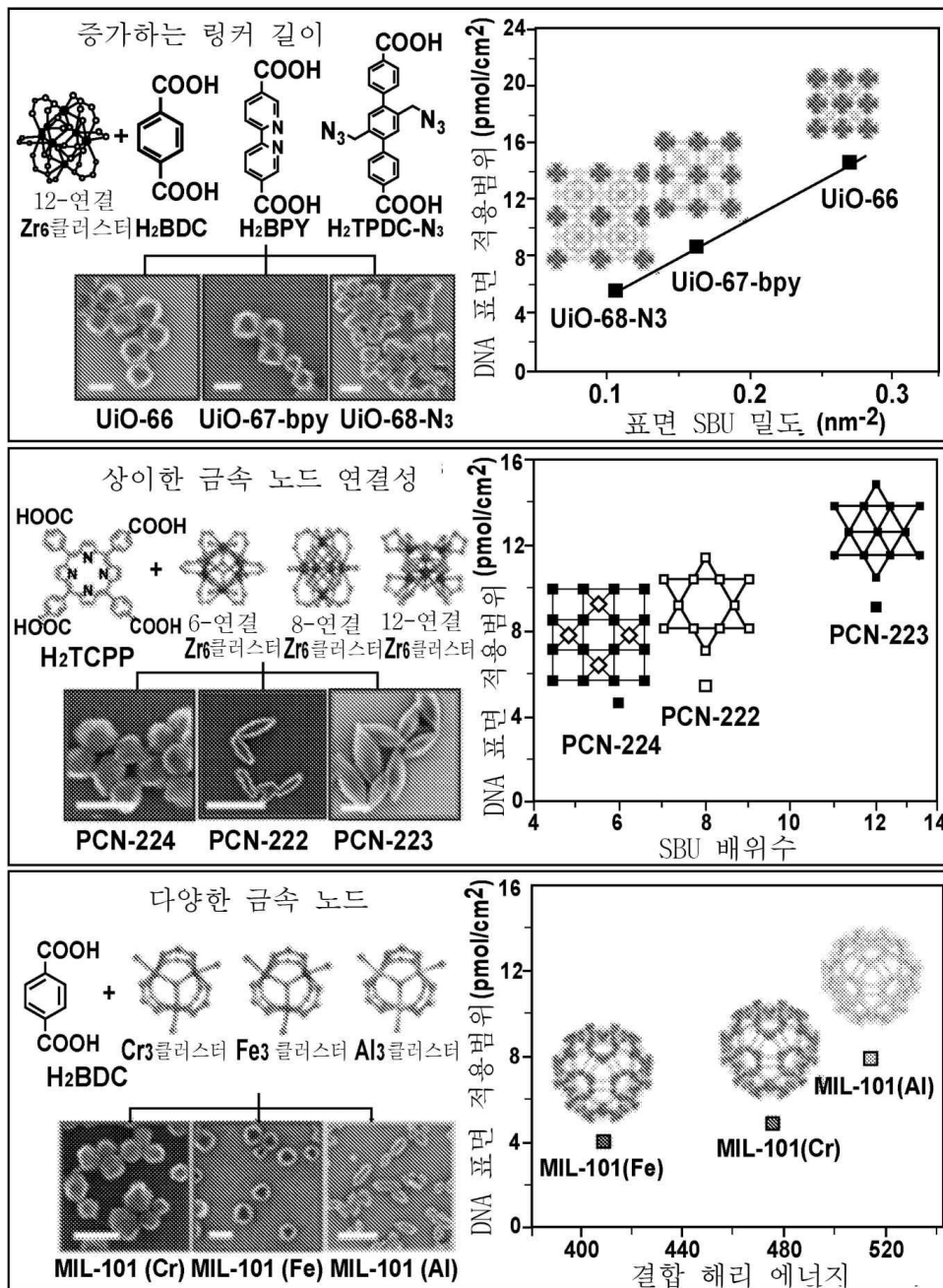
도면1



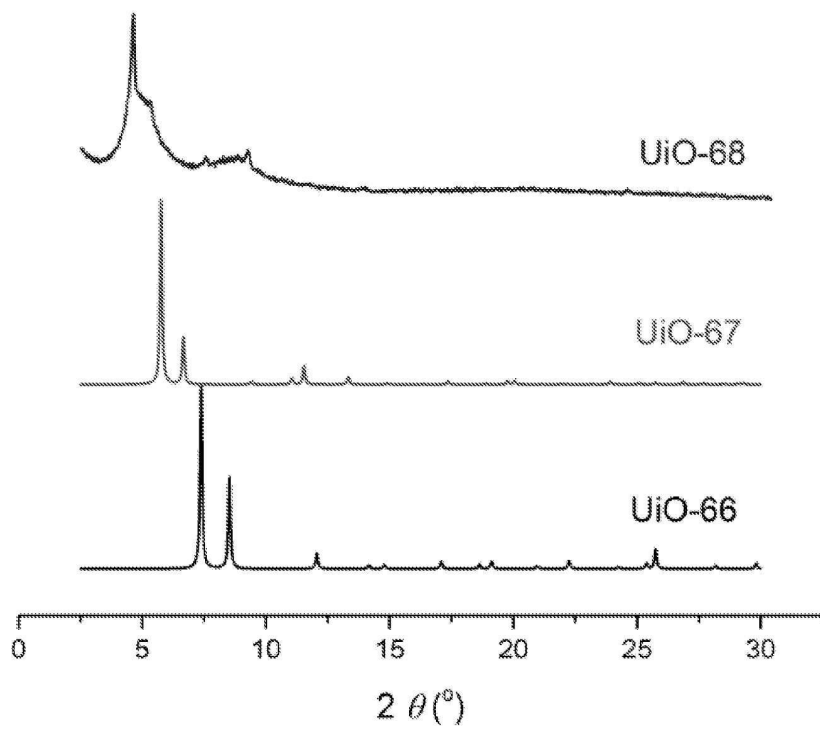
도면2



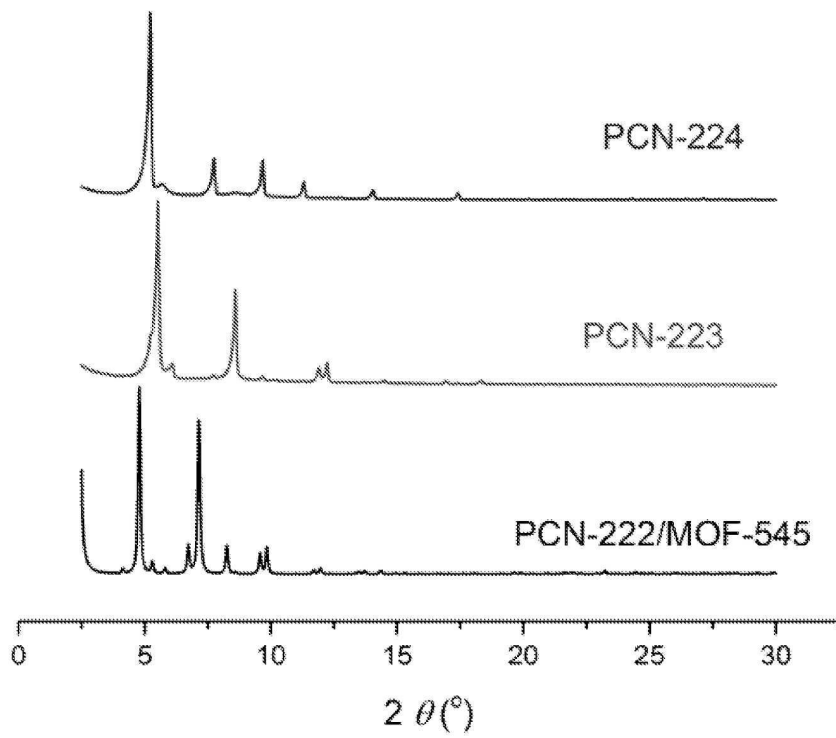
도면3



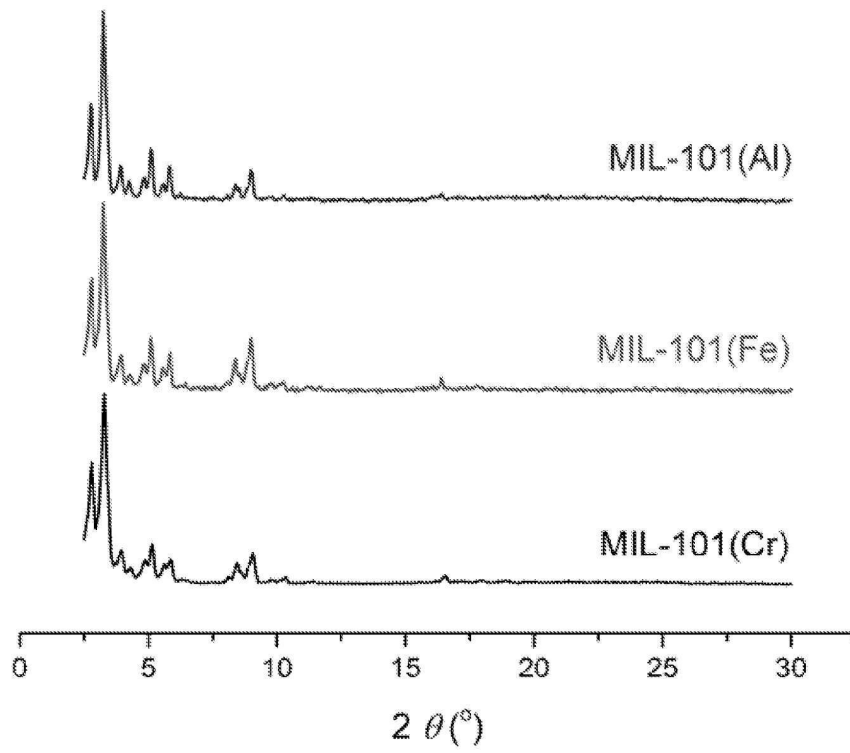
도면4



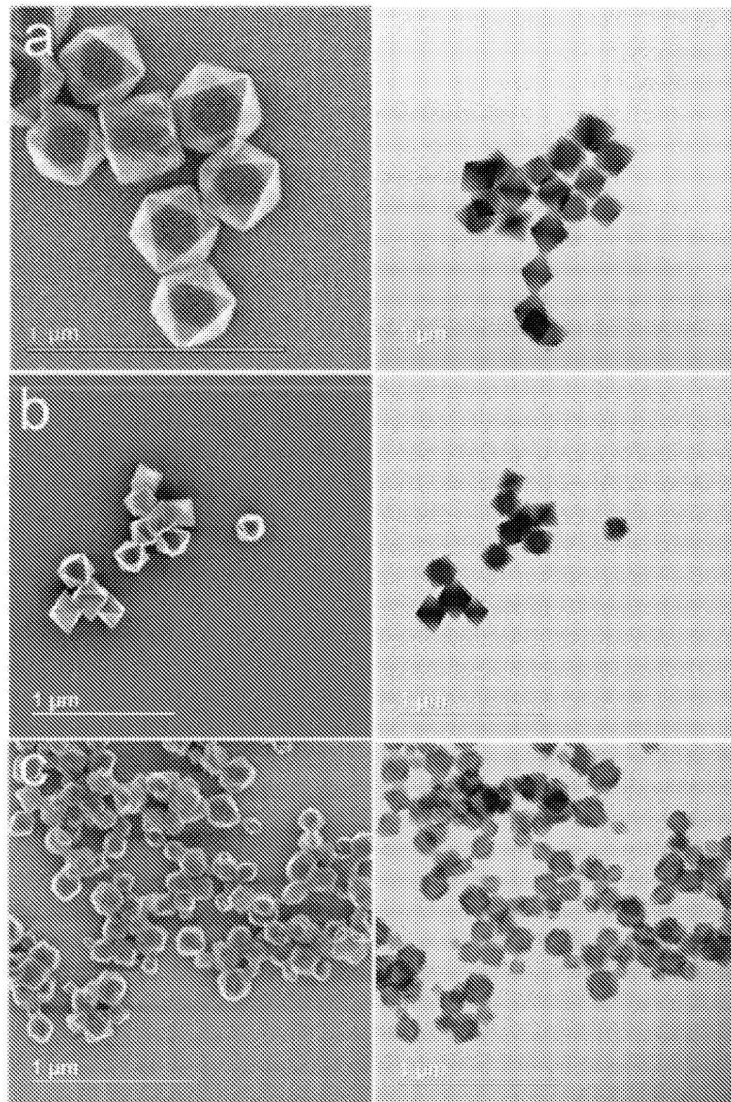
도면5



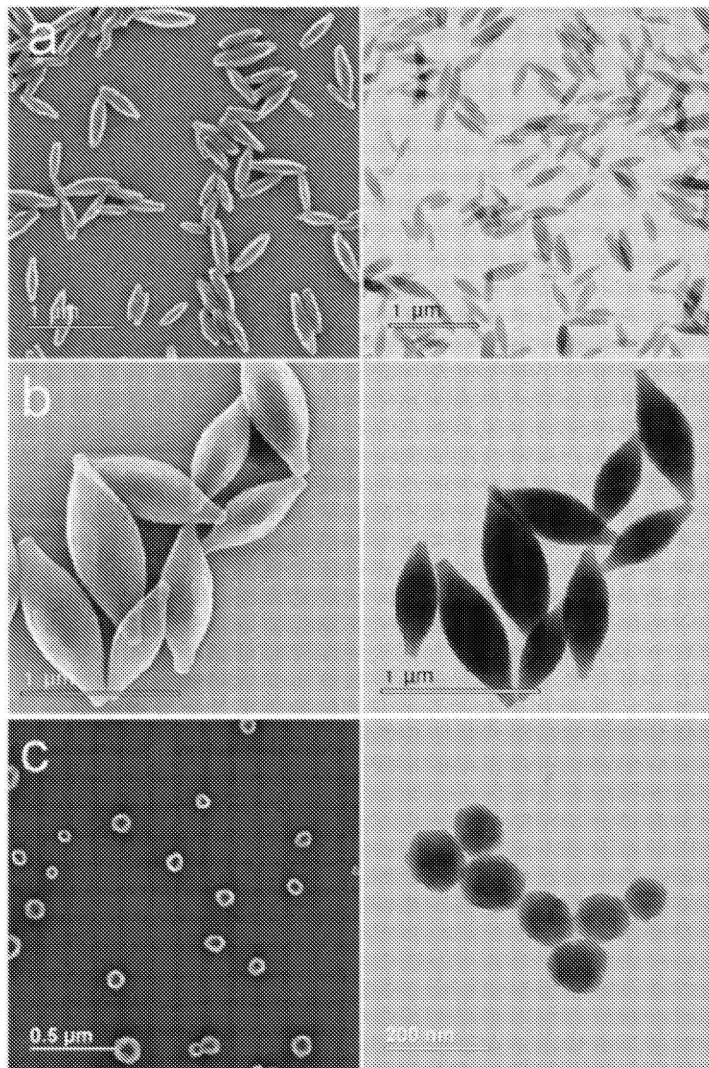
도면6



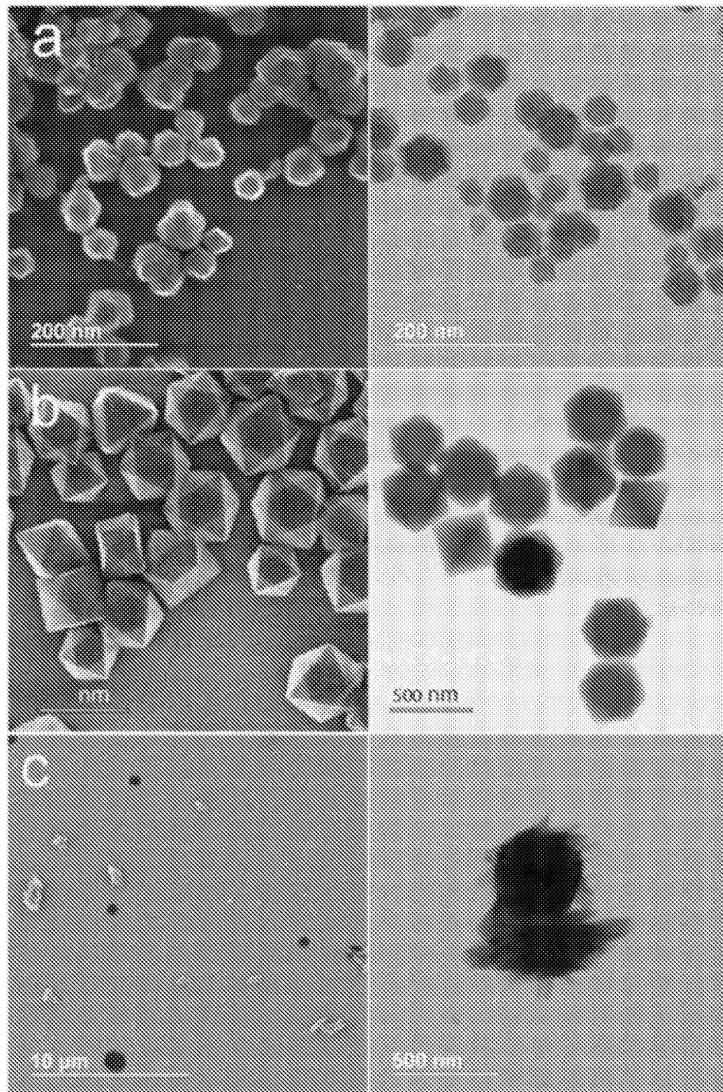
도면7



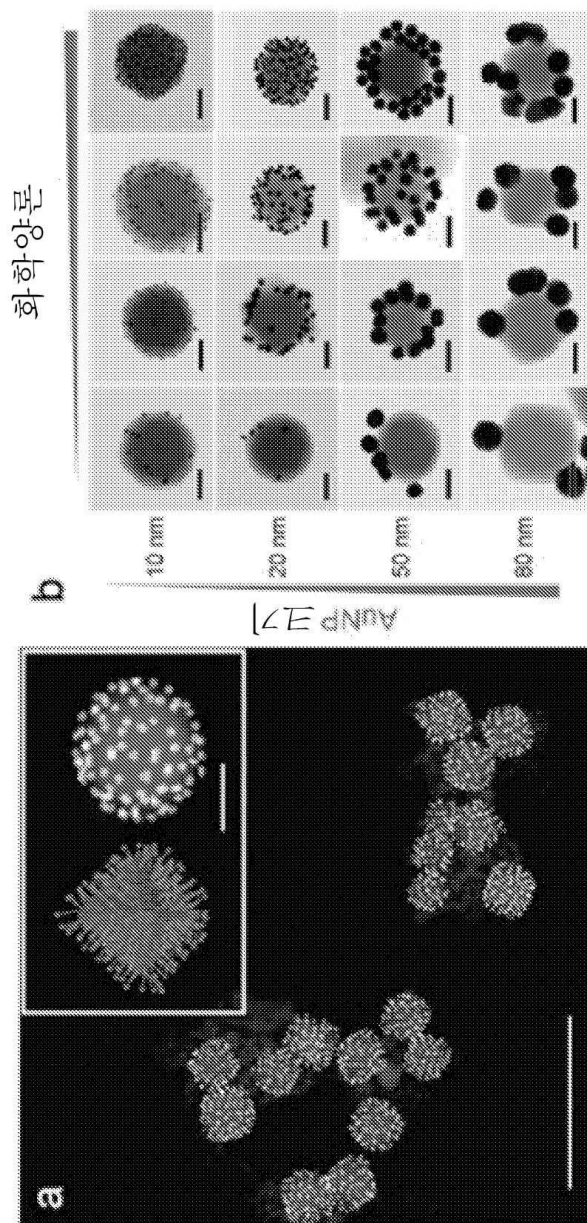
도면8



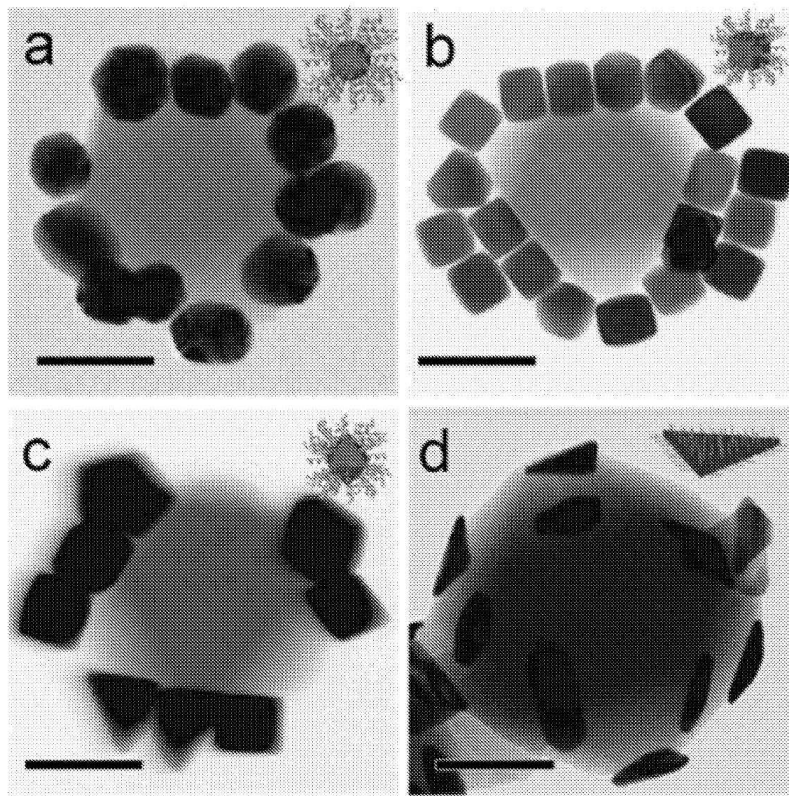
도면9



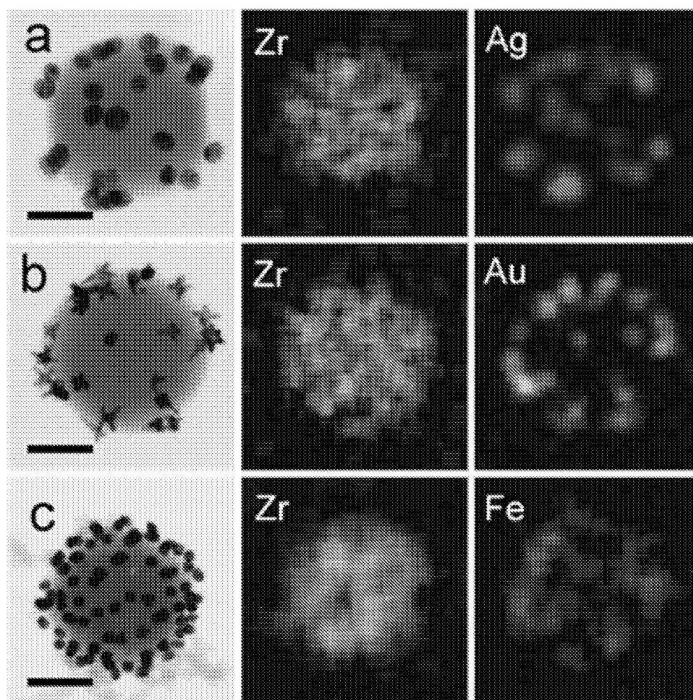
도면10



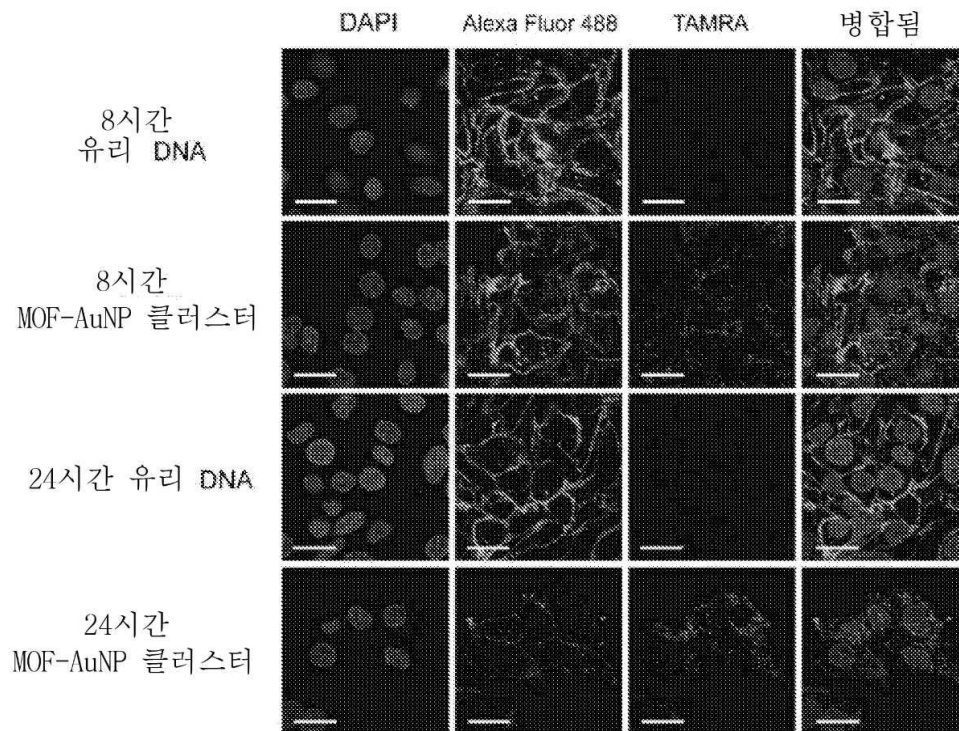
도면11



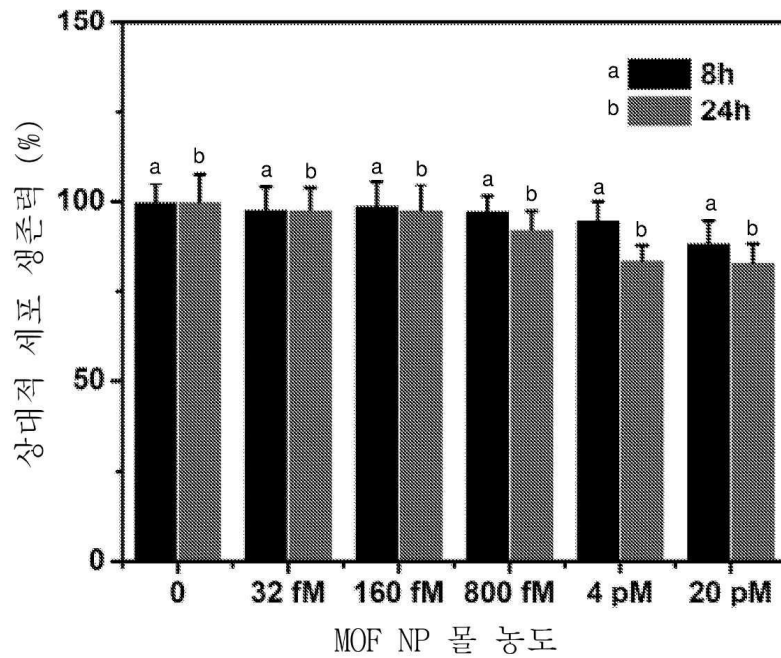
도면12



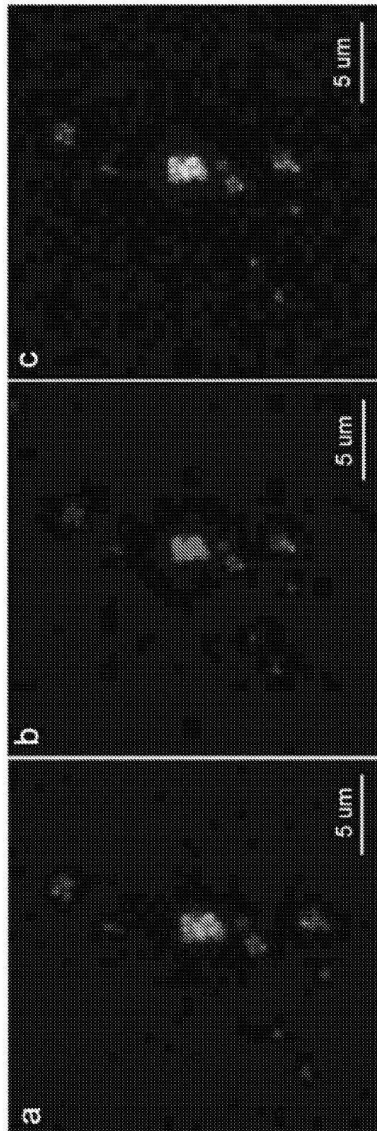
도면13



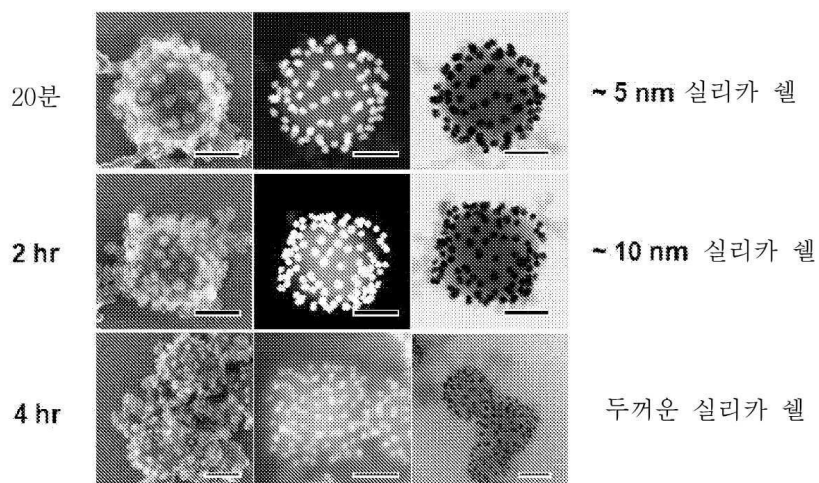
도면14



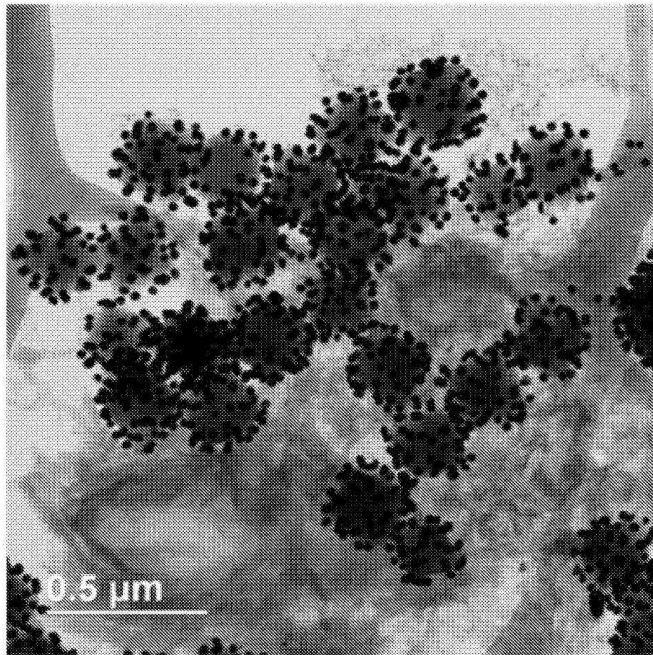
도면15



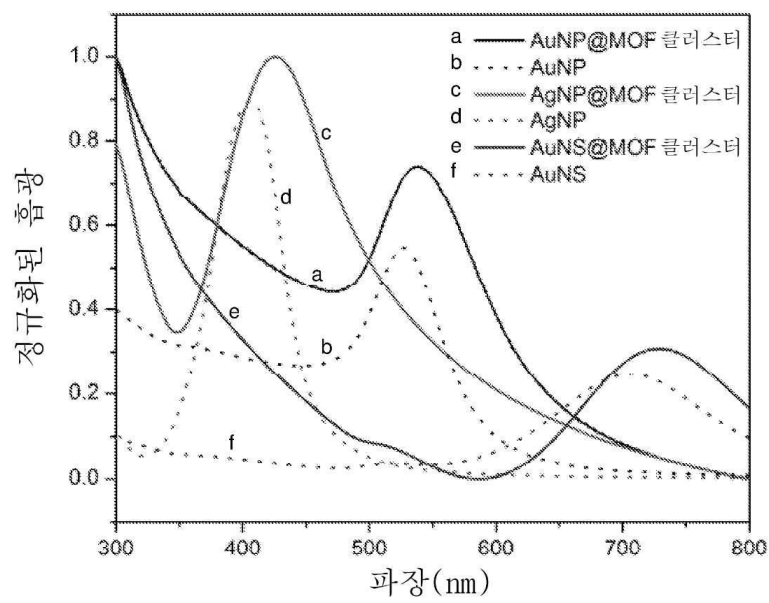
도면16



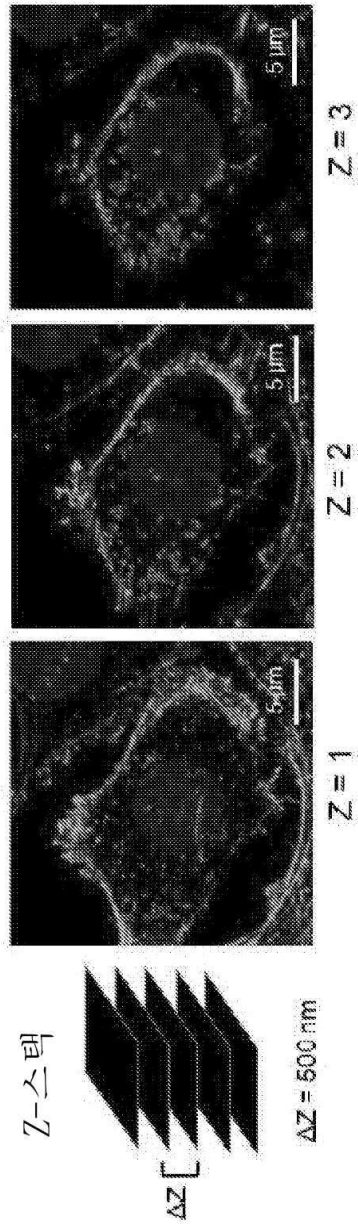
도면17



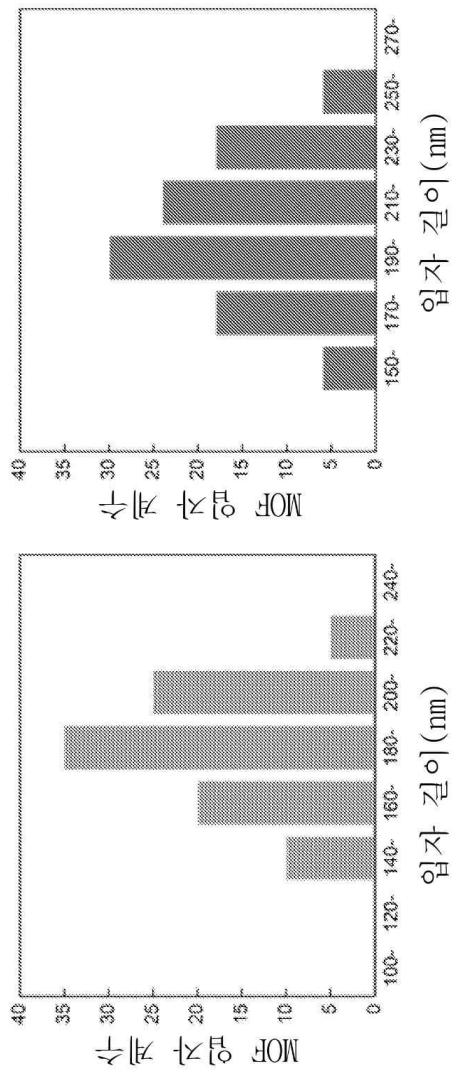
도면18



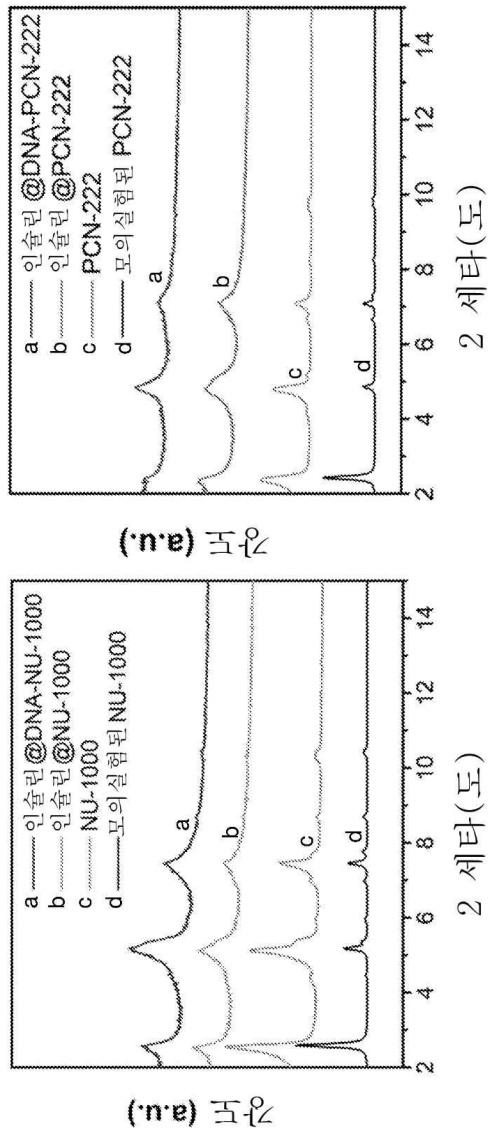
도면19



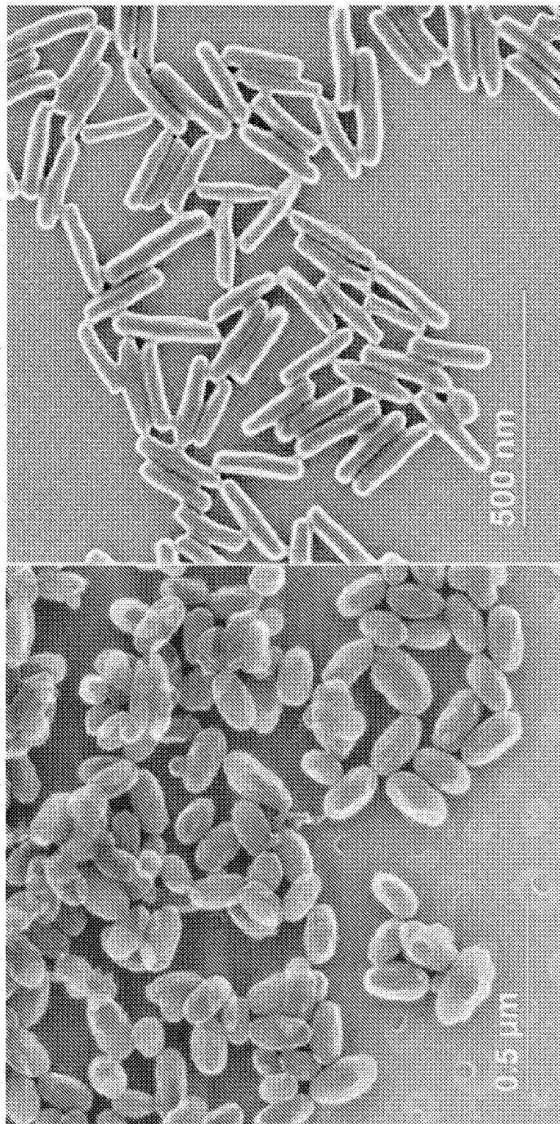
도면20



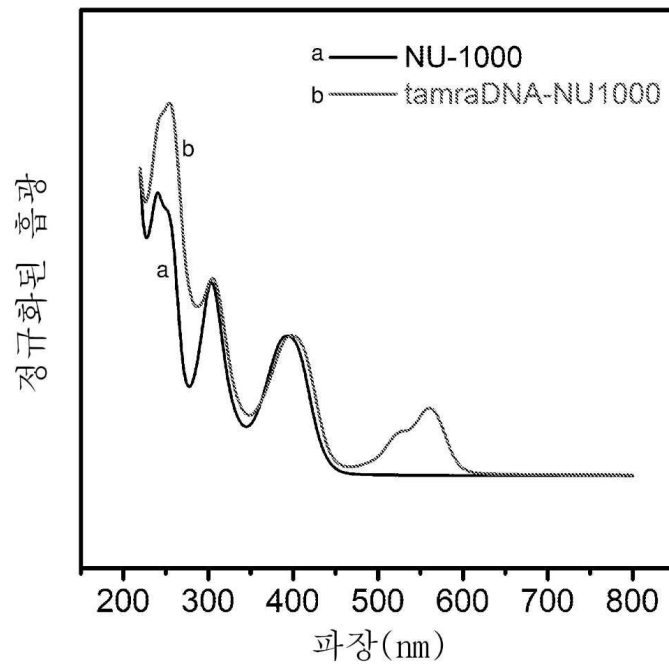
도면21



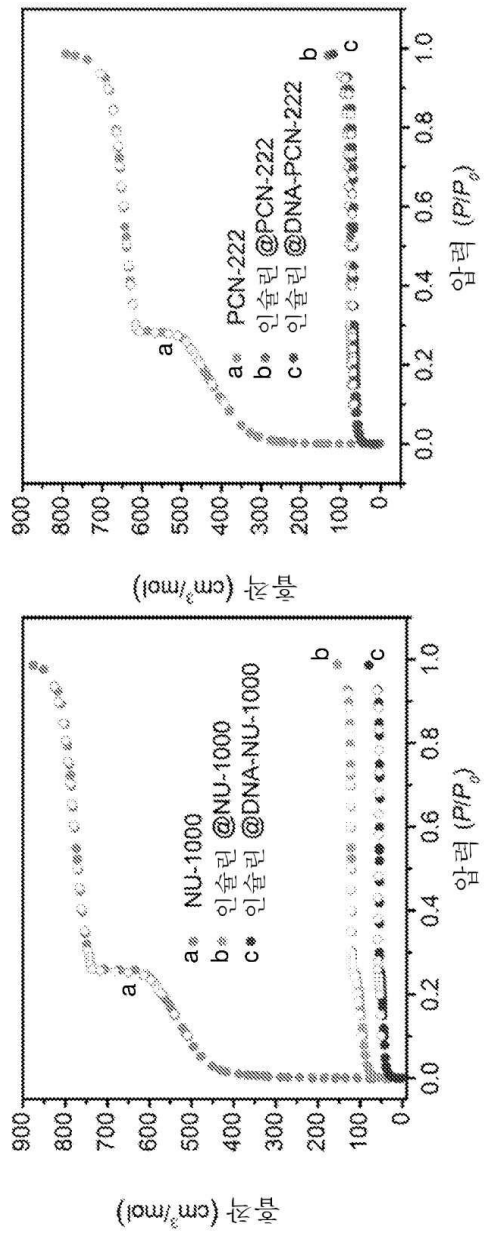
도면22



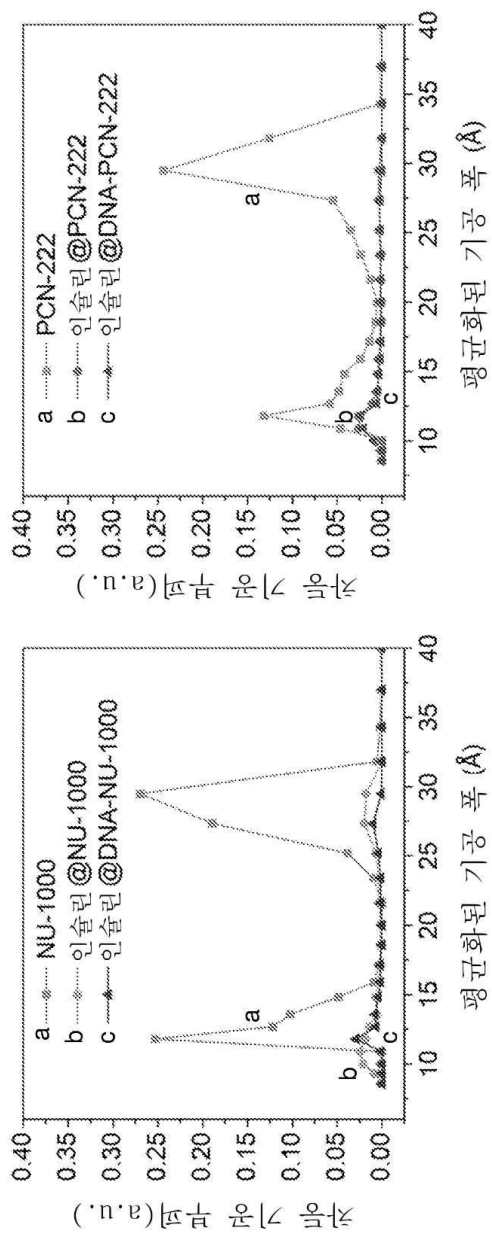
도면23



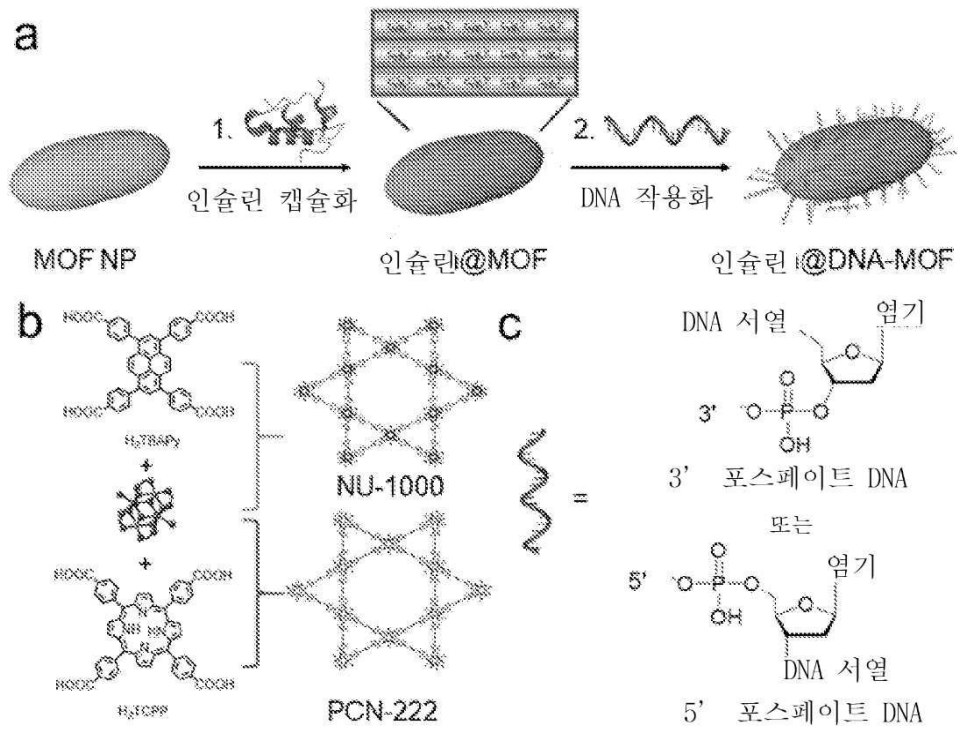
도면24



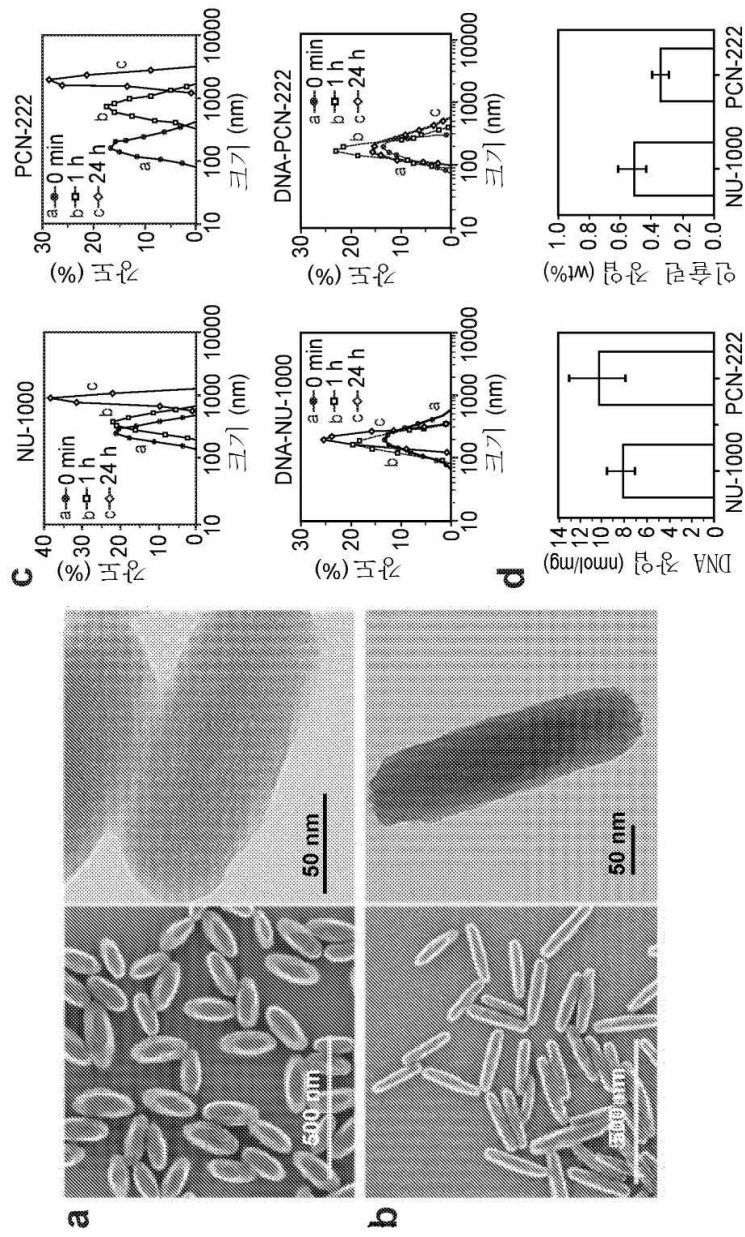
도면25



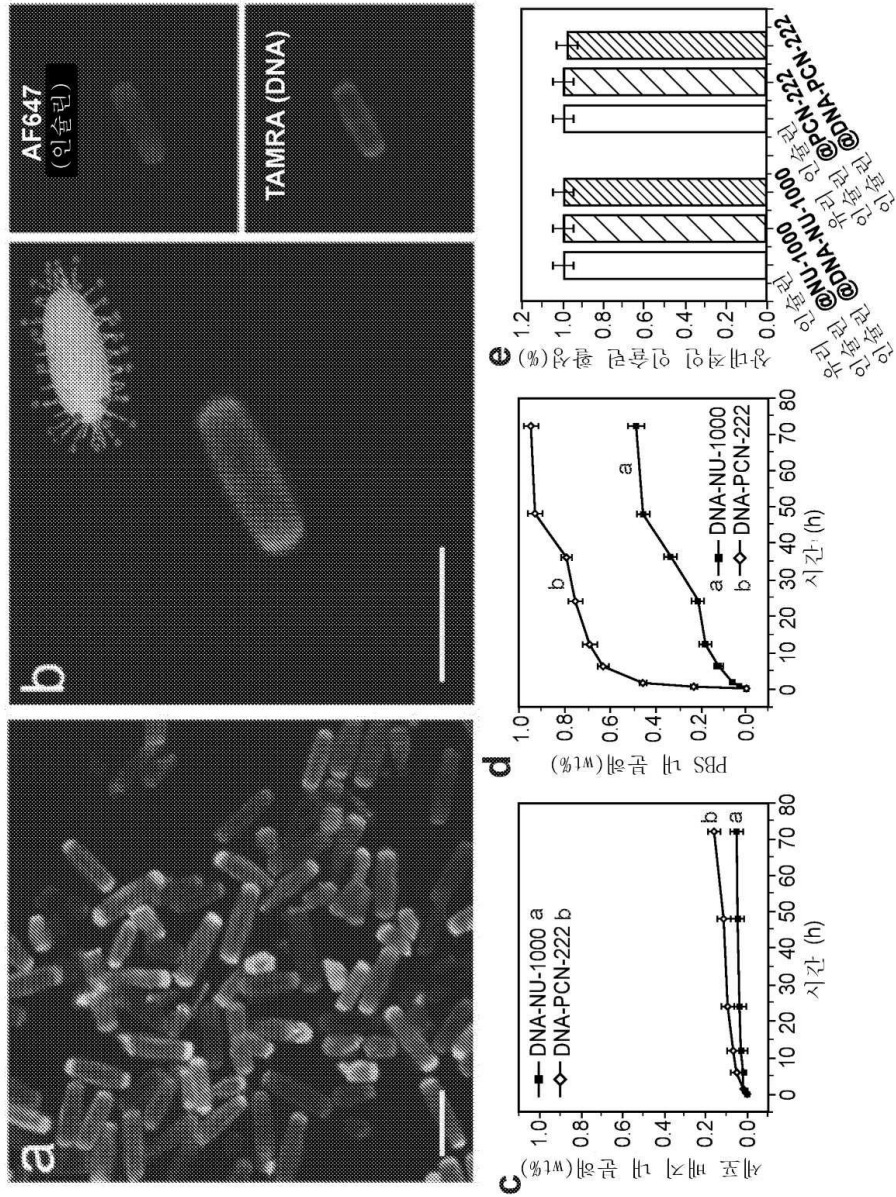
도면26



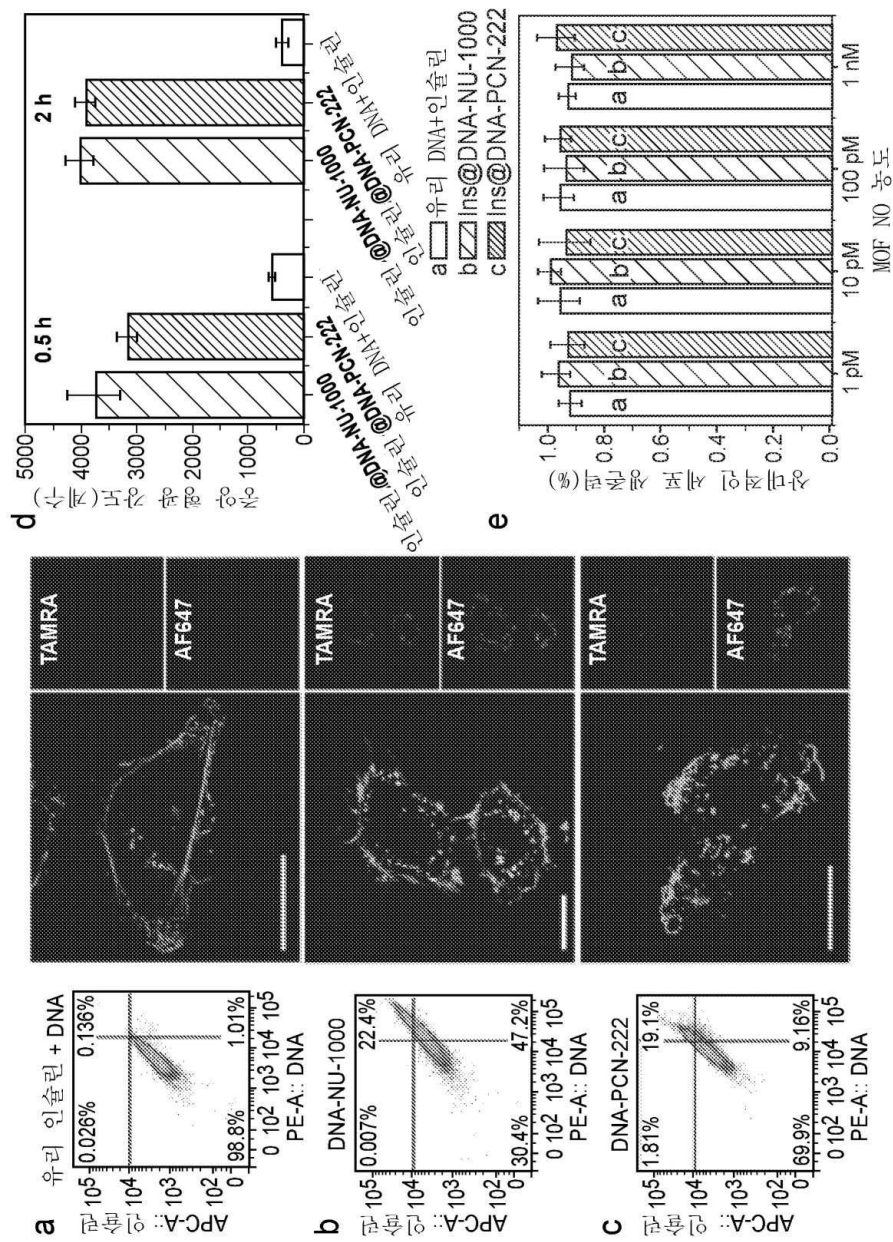
도면27



도면28



도면29



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Northwestern University

<120> GENERAL AND DIRECT METHOD FOR PREPARING

OLIGONUCLEOTIDE-FUNCTIONALIZED METAL-ORGANIC FRAMEWORK

NANOPARTICLES

<130> 30938/2017-128

<150> US 62/532,241

<151> 2017-07-13

<160> 14
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> AuNP-bound assembly strand
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> HS-(Spacer)2
 <400> 1

ttgttaatat gagtcgtt

18

<210> 2
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> AgNP-bound assembly strnd
 <220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)
 <223> (DS3)-(Spacer)2
 <400> 2

ttgttaatat gagtcgtt

18

<210> 3
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide
 <220><221> misc_feature
 <223> AuNP=melt strand

<400> 3
aaggaaattc ttaaataattc gtctt 25
<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<220><221> misc_feature
<223> MOF-bound Strand
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Phosphate-(Spacer)2
<400> 4
aacgactcat attaaca 18
<210> 5
<211>
> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<220><221> misc_feature
<223> MOF-bound complementary Strand
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(1)
<223> Phosphate-(Spacer)2
<400> 5
ttgttaatat gattcggtt 18
<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Polynucleotide
<220><221> misc_feature
<223> MOF-dye loading strand
<220><221> misc_feature

<222>

(1)..(1)

<223> Phosphate-(Spacer)2

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Tamra

<400> 6

aacgactcat attaaca

18

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> MOF-dye loading strand #2

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Phosphate-(Spacer)2

<220><221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Cy5

<400> 7

aacgactcat attaaca

18

<210> 8

<211> 1

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> MOF-CPR-T

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Phosphate

<400> 8

t	1
<210> 9	
<211> 2	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<220><221> misc_feature	
<223> MOF-CPR-T2	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> Phosphate	
<400> 9	
tt	2
<210> 10	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<220><221> misc_feature	
<223> MOF-CPR-T20	
<220><221> misc_feature	
<222> (1)..(1)	
<223> Phosphate	
<400> 10	
tttttttttt tttttttttt	20
<210> 11	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Synthetic Polynucleotide	
<220><221> misc_feature	
<223> MOF-melt strand	
<400> 11	

ttccttattg ttaatatgag tcgtt 25

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> AzideNP-bound assembly strand

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> DBCO-TEG-(Spacer)2

<400> 12

ttgttaatat ggtcgtt 18

<210> 13

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> polyG

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> phosphate

<400> 13

dggtddgtdg gtdggtddgt dggtddgtdg gtdggtddgt 40

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Polynucleotide

<220><221> misc_feature

<223> polyG-dye

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> Tamra-dT

<220><221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> phosphate

<400> 14

dggtddggtg gtdggtddgt dggtddggtg gtdggtddgt

40