

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2023-0147501
(43) 공개일자 2023년10월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 9/14 (2006.01) A61K 31/704 (2006.01)

A61K 49/08 (2006.01) A61L 27/04 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 9/143 (2013.01)

A61K 31/704 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0097806

(22) 출원일자 2022년08월05일

심사청구일자 2022년08월05일

(30) 우선권주장

1020220046023 2022년04월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김성열

서울특별시 성북구 삼선교로24길 58, 403호 (삼선동5가, 문화빌라)

(74) 대리인

최훈식

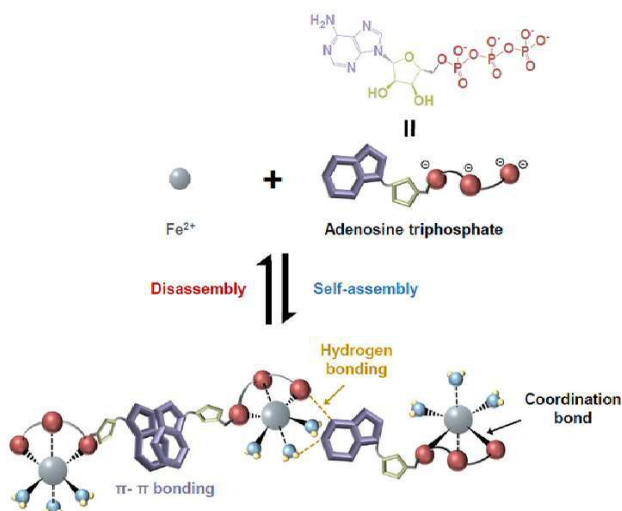
전체 청구항 수 : 총 22 항

(54) 발명의 명칭 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체

(57) 요약

본 발명은 철 이온; 및 1종 이상의 리간드;를 포함하고, 상기 리간드와 철 이온이 가역적으로 자가 조립 또는 자가 분해되고, 상기 리간드와 철 이온이 자가 조립되어 적어도 일부가 라운드 형태인 조립체를 형성하는 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 49/08 (2013.01)

A61K 9/145 (2013.01)

A61L 27/042 (2013.01)

C12N 5/0018 (2013.01)

A61L 2300/602 (2013.01)

A61L 2430/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711130532

과제번호 2020R1C1C1011038

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 나노 리간드 주기성의 제어와 동적인 제시를 통한 세포의 부착과 재생성 특성의 조절

기 여 율 1/1

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2021.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

철 이온; 및

1종 이상의 리간드;를 포함하고,

상기 리간드와 철 이온이 가역적으로 자가 조립 또는 자가 분해되고,

상기 리간드와 철 이온이 자가 조립되어 적어도 일부가 라운드 형태인 조립체를 형성하는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

유효성분을 더 포함하고,

상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체에 담지되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유효성분은, 아데노신, 구아노신, 우리딘, 사이티딘, 독소루비신, 약물, 단백질, 유기산, 유기염기, 향료 및 염료 중 적어도 어느 하나인,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가분해됨으로써 배출되고,

상기 유효성분은 방출시간 동안 지속적으로 방출되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 방출시간은 1일 내지 90일인,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 리간드는,
포스페이트 및 포스포네이트 중 적어도 어느 하나를 포함하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 7

제1항에 있어서,
상기 리간드는,
AMP, ADP, ATP, TMP, TDP, TTP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, UMP, UDP, UTP, DNA, RNA, AEP(2-아미노에틸 포스폰산, 2-aminoethylphosphonic acid), TNA(Threose nucleic acid), GNA(glycol nucleic acid), HNA(1,5-anhydrohexitol nucleic acid), ANA(1,5-anhydroatritol nucleic acid), FANA(2'-deoxy-2'-fluoroarabino nucleic acid) 및 CeNA(cyclohexenyl nucleic acid) 중 적어도 어느 하나인,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 8

제1항에 있어서,
상기 리간드는 AMP 및 ATP가 혼합된 것이고,
상기 AMP 및 ATP가 2:1 내지 1:2의 몰농도 비율로 포함되는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 9

제1항에 있어서,
상기 리간드가 ADP 및 ATP 중 적어도 어느 하나를 포함하는 경우, 상기 자가조립 복합체는 친수성을 가지고,
상기 리간드가 AMP를 포함하는 경우, 상기 자가조립 복합체는 소수성을 가지는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 10

제1항에 있어서,
상기 리간드는 AMP, ADP, ADP와 ATP의 혼합 리간드, 및 AMP와 ATP의 혼합 리간드 중 적어도 어느 하나이고,
상기 자가조립 복합체가 구형으로 구비되고,
복수의 상기 자가조립 복합체가 서로 부착되어 2차원적 플레이트 형상 또는 3차원적 집합체를 형성하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 2차원적 플레이트 형상은 상기 자기장의 인가시에 회전하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 12

제10항에 있어서,
상기 3차원적 집합체는 집합체 내부에 기공을 포함하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 13

제10항에 있어서,
상기 2차원적 플레이트 형상 및 3차원적 집합체 중 적어도 어느 하나는 내부에 세포를 담지하여 생체 내에 세포를 전달하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 14

제1항에 있어서,
이웃한 상기 리간드 사이의 $\pi-\pi$ 상호작용, 및 수소결합 중 적어도 어느 하나; 또는
철 이온과 상기 리간드 사이의 배위결합;에 의하여 자가조립 복합체를 형성하는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 15

제1항에 있어서,
상기 철 이온 및 리간드는 5:1 내지 1:1의 몰농도 비율로 포함되는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 16

제1항에 있어서,
상기 리간드의 종류에 따라 자가 분해 속도가 달라지는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 17

제1항에 있어서,
1일 내지 90일 동안 자가분해되는,
철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 18

제1항에 있어서,

킬레이트화제를 포함하는 조건, 강산 조건 및 강염기 조건 중 적어도 어느 하나의 조건에서 자가분해가 촉진되고,

상기 강산 조건의 pH는 2 내지 5이고, 상기 강염기 조건의 pH는 9 내지 12인,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 19

제15항에 있어서,

자가분해가 촉진되어 0.5초 내지 1분 동안 자가분해되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 20

제1항에 있어서,

상기 자가조립 복합체는 상자성을 가지고,

상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 자기 모멘트가 크게 형성되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 21

제1항에 있어서,

생체 내 또는 생체 외에서 상기 자가조립 복합체에 자기장 인가하는 경우, 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 더 빠르게 확산되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

청구항 22

제1항에 있어서,

물질 전달 캐리어, 세포 배양 배지, T2 조영제 및 인공뼈의 재료 중 적어도 어느 하나로 사용되는,

철 이온을 포함하는 자가조립 복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체에 관한 것으로, 보다 상세하게는 철 이온 및 리간드가 가역적으로 자가 조립 및 자가 분해되는 자가 조립 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 약물전달시스템이란 기존 약물의 부작용을 최소화하고 약물이 가지고 있는 효능 및 효과를 최적화시켜 질병 치유에 필요한 최소의 약물을 효과적으로 전달하기 위한 제형으로 정의될 수 있다.
- [0004] 약물전달시스템 분야는 저비용과 짧은 개발기간으로 기존 약물의 새로운 제형개발을 가능하게 함으로써 차세대 바이오산업의 핵심으로 인식되고 있으며, 다양한 기능과 성능을 가진 생체고분자 및 합성고분자를 이용하여 새로운 약물전달체를 개발하는 연구가 활발하다.
- [0005] 기존의 약물전달체는 인체 내부에 존재하지 않는 합성물질인 다이포스페이트와 금속이온을 이용한 자가조립 복합체 또는 체내 독성문제가 있는 Fe_3O_4 등 인공적으로 합성된 물질을 이용한다.
- [0006] 위의 기존 약물 전달 시스템은 인체 내 존재하지 않는 물질을 사용하기에 독성 문제가 존재하였고, 성장인자, 단백질 등의 전달로 가격경쟁력이 보장되지 않은 경우가 있었으며, 지속적인 약물 방출이 제어되지 않아 단기간에 국한되어 있다.
- [0007] 또한 체내에 약물전달체가 전달하여 원하는 표적에 장기간 혹은 원하는 기간동안 약물을 전달하여 약물로 인한 부작용을 줄이며 효능을 최대치로 끌어올려야 할 필요가 있다.
- [0008] 따라서 체내에 존재하는 자연물질을 이용하여 기존 기술보다 독성이 적고 무해하면서 지속적인 약물, 분자 또는 유효성분 등의 방출을 제어할 수 있으며, 약물을 표적기관에 효율적으로 전달될 수 있는 약물 전달 시스템을 개발할 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-2272781호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체를 제공하기 위한 것이다. 상기 자가조립 복합체는 가역적으로 자가 조립 및 자가 분해되어, 생체 내에 유효성분을 전달할 수 있다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 철 이온; 및 1종 이상의 리간드;를 포함하고, 상기 리간드와 철 이온이 가역적으로 자가 조립 또는 자가 분해되고, 상기 리간드와 철 이온이 자가 조립되어 적어도 일부가 라운드 형태인 조립체를 형성하는, 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체를 포함할 수 있다.
- [0014] 일 실시예에 있어서, 유효성분을 더 포함하고, 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체에 담지되는 것일 수 있다.
- [0015] 일 실시예에 있어서, 상기 유효성분은, 아데노신, 구아노신, 우리딘, 사이티딘, 독소루비신, 약물, 단백질, 유기산, 유기염기, 향료 및 염료 중 적어도 어느 하나일 수 있다.
- [0016] 일 실시예에 있어서, 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가분해됨으로써 배출되고, 상기 유효성분은 방출시간 동안 지속적으로 방출되는 것일 수 있다.
- [0017] 일 실시예에 있어서, 상기 방출시간은 1일 내지 940일인 것일 수 있다.
- [0018] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는, 포스페이트 및 포스포네이트 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다.
- [0019] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는, AMP, ADP, ATP, TMP, TDP, TTP, CMP, CDP, CTP, GMP, GDP, GTP, UMP,

UDP, UTP, DNA, RNA, AEP(2-아미노에틸포스포산, 2-aminoethylphosphonic acid), TNA(Threose nucleic acid), GNA(glycol nucleic acid), HNA(1,5-anhydrohexitol nucleic acid), ANA(1,5-anhydroatritol nucleic acid), FANA(2'-deoxy-2'-fluoroarabino nucleic acid) 및 CeNA(cyclohexenyl nucleic acid) 중 적어도 어느 하나일 수 있다.

- [0020] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는 AMP 및 ATP가 혼합된 것이고, 상기 AMP 및 ATP가 2:1 내지 1:2의 몰농도 비율로 포함되는 것일 수 있다.
- [0021] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드가 ADP 및 ATP 중 적어도 어느 하나를 포함하는 경우, 상기 자가조립 복합체는 친수성을 가지고, 상기 리간드가 AMP를 포함하는 경우, 상기 자가조립 복합체는 소수성을 가지는 것일 수 있다.
- [0022] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드는 AMP, ADP, ADP와 ATP의 혼합 리간드, 및 AMP와 ATP의 혼합 리간드 중 적어도 어느 하나이고, 상기 자가조립 복합체가 구형으로 구비되고, 복수의 상기 자가조립 복합체가 서로 부착되어 2차원적 플레이트 구조 또는 3차원적 집합체를 형성하는 것일 수 있다.
- [0023] 일 실시예에 있어서, 상기 2차원적 플레이트 형상은 상기 자기장의 인가시에 회전하는 것일 수 있다.
- [0024] 일 실시예에 있어서, 상기 3차원적 집합체는 집합체 내부에 기공을 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 일 실시예에 있어서, 상기 2차원적 플레이트 형상 및 3차원적 집합체 중 적어도 어느 하나는 내부에 세포를 담지하여 생체 내에 세포를 전달하는 것일 수 있다.
- [0026] 일 실시예에 있어서, 이웃한 상기 리간드 사이의 π - π 상호작용, 및 수소결합 중 적어도 어느 하나; 또는 철 이온과 상기 리간드 사이의 배위 결합;에 의하여 자가조립 복합체를 형성하는 것일 수 있다.
- [0027] 일 실시예에 있어서, 상기 철 이온 및 리간드는 5:1 내지 1:1의 몰농도 비율로 포함되는 것일 수 있다.
- [0028] 일 실시예에 있어서, 상기 리간드의 종류에 따라 자가 분해 속도가 달라지는 것일 수 있다.
- [0029] 일 실시예에 있어서, 1일 내지 90일 동안 자가분해되는 것일 수 있다.
- [0030] 일 실시예에 있어서, 킬레이트화제를 포함하는 조건, 강산 조건 및 강염기 조건 중 적어도 어느 하나의 조건에서 자가분해가 촉진되고, 상기 강산 조건의 pH는 2 내지 5이고, 상기 강염기 조건의 pH는 9 내지 12인 것일 수 있다.
- [0031] 일 실시예에 있어서, 자가분해가 촉진되어 0.5초 내지 1분 동안 자가분해되는 것일 수 있다.
- [0032] 일 실시예에 있어서, 상기 자가조립 복합체는 상자성을 가지고, 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 자기 모멘트가 크게 형성되는 것일 수 있다.
- [0033] 일 실시예에 있어서, 생체 내 및 생체 외에서 상기 자가조립 복합체에 자기장 인가하는 경우, 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 더 빠르게 확산되는 것일 수 있다.
- [0034] 일 실시예에 있어서, 물질 전달 캐리어, 세포 배양 배지, T2 조영제 및 인공뼈의 재료 중 적어도 어느 하나로 사용되는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0036] 이상 살펴본 바와 같은 본 발명에 따르면, 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체를 제공할 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 가역적으로 자가 조립 및 자가 분해되어, 생체 내에 유효성분을 전달할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0038] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의하여 Fe-ATP 자가조립 복합체가 형성되는 것을 모식적으로 나타낸 것이다.
- 도 2 내지 4은 각각 Fe-ATP, Fe-ADP 및 Fe-AMP 자가조립 복합체의 특성을 분석한 결과이다.
- 도 5는 철 이온과 ATP가 자가 조립되는 것을 관찰한 이미지이다.
- 도 6은 EDTA가 있는 조건에서 형성된 자가조립 복합체가 분해되는 것을 관찰한 결과이다.

도 7은 철 이온과 ATP의 농도를 다르게 하여 자가조립 복합체의 크기를 조절하면서 자가조립체를 제조하고 특성을 분석한 결과이다.

도 8은 Fe-ADP에서의 자가조립 복합체의 가역적 자기 특성(상자성)을 보여주는 그래프이다.

도 9는 자가조립 복합체가 영구자석이 인가되는 방향으로 이동하는 것을 나타내는 것이다.

도 10은 2D 플레이트를 형성한 자가조립 복합체가 자기장의 인가에 따라 회전하는 것을 나타낸 것이다.

도 11은 3D 스캐폴드를 형성한 자가조립 복합체가 자기장의 인가에 따라 이동하는 것을 나타낸 것이다.

도 12는 자기장 인가시에 자가조립 복합체의 크기에 따른 이동 속도 차이를 보여주는 것이다.

도 13은 Fe-ATP 자가조립체의 MRI 조영제로서의 성능을 확인하는 실험을 진행한 결과이다.

도 14는 생체 내에 자가조립체를 주입한 후, 생체 외부에서 자기장을 인가하여 자가조립체의 자기적 특성을 확인한 결과이다.

도 15 및 16는 생체 내/외에서 EDTA 조건에서 자가조립체가 자가 분해되는 것을 실험한 결과이다.

도 17은 2D 플레이트를 형성한 자가조립 복합체가 EDTA 조건에서 자가분해되는 것을 실험한 결과이다.

도 18은 철 이온, ATP 및 독소루비신(DOX)이 자가조립되는 것을 나타내는 모식도이다.

도 19는 자가조립 복합체에 독소루비신을 담지한 후 방출시간을 관찰한 결과이다.

도 20은 철 이온, ATP 및 약물 분자(트리암시놀론 아세트나이드)가 자가조립되는 것을 나타내는 모식도이다.

도 21은 자가조립 복합체에 약물분자(트리암시놀론 아세트나이드)를 담지한 후 방출시간을 관찰한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 기타 실시예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명 및 도면들에 포함되어 있다.

[0040] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 이하의 설명에서 달리 명시되지 않는 한, 본 발명에 성분, 반응 조건, 성분의 함량을 표현하는 모든 숫자, 값 및/또는 표현은, 이러한 숫자들이 본질적으로 다른 것들 중에서 이러한 값을 얻는 데 발생하는 측정의 다양한 불확실성이 반영된 근사치들이므로, 모든 경우 "약"이라는 용어에 의해 수식되는 것으로 이해되어야 한다. 또한, 본 기재에서 수치범위가 개시되는 경우, 이러한 범위는 연속적이며, 달리 지적되지 않는 한 이러한 범위의 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지의 모든 값을 포함한다. 더 나아가, 이러한 범위가 정수를 지칭하는 경우, 달리 지적되지 않는 한 최소값으로부터 최대값이 포함된 상기 최대값까지를 포함하는 모든 정수가 포함된다.

[0041] 또한, 본 발명에서 범위가 변수에 대해 기재되는 경우, 상기 변수는 상기 범위의 기재된 종료점들을 포함하는 기재된 범위 내의 모든 값들을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "5 내지 10"의 범위는 5, 6, 7, 8, 9, 및 10의 값들뿐만 아니라 6 내지 10, 7 내지 10, 6 내지 9, 7 내지 9 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 5.5, 6.5, 7.5, 5.5 내지 8.5 및 6.5 내지 9 등과 같은 기재된 범위의 범주에 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들면, "10% 내지 30%"의 범위는 10%, 11%, 12%, 13% 등의 값들과 30% 까지를 포함하는 모든 정수들 뿐만 아니라 10% 내지 15%, 12% 내지 18%, 20% 내지 30% 등의 임의의 하위 범위를 포함하고, 10.5%, 15.5%, 25.5% 등과 같이 기재된 범위의 범주 내의 타당한 정수들 사이의 임의의 값도 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0043] 도 1은 각각 본 발명의 일 실시예에 의한 철을 포함하는 자가조립 복합체를 모식적으로 나타낸 도면이다.

[0044] 도 1은 철 이온(Fe^{2+}) 및 ATP(Adenosine triphosphate)가 자가조립 및 자가분해되는 형태를 모식적으로 나타낸 것이다. 상기 철 이온은 ATP의 인산기 부위 및 물과 배위결합하여 금속 착물을 형성할 수 있다. 또한 상기 아데닌 부위의 방향족 고리는 $\pi-\pi$ 상호작용을 형성할 수 있다. 또한 상기 아데닌 부위의 질소와 상기 철 이온에 결합한 물 분자는 수소 결합을 형성할 수 있다.

- [0045] 상기 자가조립 복합체는 이처럼 배위 결합, π - π 상호작용 및 수소 결합을 포함하여 형성될 수 있고, 이들 중 적어도 어느 하나의 결합에 의하여 복합체가 형성될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일측면에 따르면, 본 발명의 실시예들은 철 이온; 및 1종 이상의 리간드;를 포함하고, 상기 리간드와 철 이온이 가역적으로 자가 조립 또는 자가 분해되고, 상기 리간드와 철 이온이 자가 조립되어 적어도 일부가 라운드 형태인 조립체를 형성하는, 철 이온을 포함하는 자가조립 복합체를 포함할 수 있다.
- [0049] 상기 자가조립 복합체는 유효성분을 더 포함할 수 있고, 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체에 담지되는 것일 수 있다. 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가조립될 때에 상기 자가조립 복합체 내부에 담지되어 구비될 수 있다.
- [0050] 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가분해될 때 배출될 수 있다. 따라서 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가분해되는 시간을 조절함으로써 방출되는 시간 및 속도를 조절할 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 리간드의 종류에 따라 자가분해 속도가 다를 수 있고, 상기 자가조립 복합체는 표면에서부터 일정 속도로 순차적으로 자가 분해될 수 있다. 따라서 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체가 자가분해되는 시간동안 지속적으로 방출될 수 있다. 즉 상기 유효성분은 방출시간 동안 지속적으로 방출되는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 자가조립 복합체가 자가분해되는 시간 즉, 방출시간은 1일 내지 90일인 것일 수 있다. 다만 상기 자가조립 복합체의 자가분해가 촉진되는 환경에서는 상기 방출시간은 0.5초 내지 1분일 수 있다. 또한 상기 자가조립 복합체의 자가분해가 촉진되는 환경에서는 상기 방출시간은 0.5초 내지 10초일 수 있다.
- [0052] 상기 유효성분은 상기 자가조립 복합체에 담지되어 자가분해 시 방출될 수 있는 물질일 수 있다. 예를 들어, 상기 유효성분은 아데노신, 구아노신, 유리딘, 사이티딘, 독소루비신, 약물, 단백질, 유기산, 유기염기, 향료 및 염료 중 적어도 어느 하나일 수 있다. 상기 약물은 트리암시놀론 아세토니드(triamcinolone acetonide)일 수 있다.
- [0054] 상기 리간드는 상기 철 이온과 배위 결합(coordination bond)하여 자가조립될 수 있는 물질일 수 있다. 상기 리간드는 상기 리간드와 결합하여 금속 착화합물을 형성할 수 있다.
- [0055] 상기 리간드는, 포스페이트 및 포스포네이트 중 적어도 어느 하나를 포함하는 것일 수 있다. 상기 포스페이트(phosphate) 또는 포스포네이트(phosphonate)는 상기 철 이온과 배위 결합할 수 있는 부분일 수 있다.
- [0056] 예를 들어, 상기 리간드는 AMP(아데노신 일인산, Adenosine monophosphate), ADP(아데노신 이인산, Adenosine diphosphate), ATP(아데노신 삼인산, Adenosine triphosphate), TMP(티미딘 일인산, Thymidine monophosphate), TDP(티미딘 이인산, Thymidine diphosphate), TTP(티미딘 삼인산, Thymidine triphosphate), CMP(사이티딘 일인산, Cytidine monophosphate), CDP(사이티딘 이인산, Cytidine diphosphate), CTP(사이티딘 삼인산, Cytidine triphosphate), GMP(구아노신 일인산, Guanosine monophosphate), GDP(구아노신 이인산, Guanosine diphosphate), GTP(구아노신 삼인산, Guanosine triphosphate), UMP(유리딘 일인산, Uridine monophosphate), UDP(유리딘 이인산, Uridine diphosphate), UTP(유리딘 삼인산, Uridine triphosphate), DNA, RNA, AEP(2-아미노에틸포스포산, 2-aminoethylphosphonic acid), TNA(트레오즈핵산, Threose nucleic acid), GNA(글리콜핵산, glycol nucleic acid), HNA(1,5-안하이드로헥시톨 핵산, 1,5-anhydrohexitol nucleic acid), ANA(1,5-안하이드로아트라이톨 핵산, 1,5-anhydroatritol nucleic acid), FANA(2'-데옥시-2'-플루오로아라비노 핵산, 2'-deoxy-2'-fluoroarabino nucleic acid) 및 CeNA(사이클로헥시닐 핵산, cyclohexenyl nucleic acid) 중 적어도 어느 하나인 것일 수 있다.
- [0057] 상기 철 이온은 예를 들어 상기 리간드의 인산기 부위 등 전자가 풍부한 부위와 배위 결합하여 금속 착화합물을 형성할 수 있다.
- [0059] 상기 자가조립 복합체는 적어도 일부가 라운드 형태로 형성될 수 있다. 또는 상기 자가조립 복합체는 구형으로 형성될 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 복수개의 상기 철 이온 및 리간드가 결합하여 형성되는 것일 수 있다. 상기 철 이온 및 리간드는 5:1 내지 1:1의 몰농도 비율로 결합할 수 있으며, 바람직하게는 1:1의 몰농도 비율로

결합할 수 있다.

- [0060] 상기 자가조립 복합체는 이웃한 상기 철 이온과 리간드 사이에 배위 결합, $\pi-\pi$ 상호작용 및 수소결합 중 적어도 어느 하나에 의하여 적어도 일부가 라운드인 형태이거나 구형을 형성하는 것일 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 이들 상호작용 또는 결합에 의하여 각각의 철 이온 및 리간드가 조밀하게 밀착될 수 있다. 따라서 상기 자가조립 복합체는 상기 철 이온 및 리간드가 조밀하게 뭉쳐져 형성되는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 자가조립 복합체는 상기 리간드의 종류 또는 배합 비율에 따라 더 조밀하게 형성되거나 느슨하게 형성될 수 있다. 상기 배합 비율을 몰농도 비율일 수 있다.
- [0063] 상기 리간드는 1종 또는 2종 이상이 함께 포함되어 자가조립 복합체를 형성할 수 있다.
- [0064] 상기 리간드가 예를 들어 이인산 또는 삼인산을 포함하는 경우 상기 자가조립 복합체는 친수성(hydrophilicity)을 가질 수 있다. 상기 리간드가 삼인산을 포함하는 경우 상기 자가조립 복합체는 -2가의 음전하를 띌 수 있다. 또한 상기 리간드가 이인산을 포함하는 경우 상기 자가조립 복합체는 -1가의 음전하를 띌 수 있다. 상기 리간드가 이인산 또는 삼인산을 포함하는 경우는, 상기 리간드가 ADP, ATP, TDP, TTP, CDP, CTP, GDP, GTP, UDP 및 UTP 중 적어도 어느 하나인 경우를 의미할 수 있다.
- [0065] 또한 상기 리간드가 예를 들어 일인산을 포함하는 경우 상기 자가조립 복합체는 소수성(hydrophobicity)을 가질 수 있다. 상기 리간드가 일인산을 포함하는 경우 상기 자가조립 복합체는 중성을 띌 수 있다. 상기 리간드가 일인산을 포함하는 경우는, 상기 리간드가 AMP, TMP, CMP, GMP 및 UMP 중 적어도 어느 하나인 경우를 의미할 수 있다.
- [0066] 또한 상기 리간드는 AMP 및 ATP가 혼합되어 포함될 수 있다. 이 경우 상기 자가조립 복합체는 친수성(hydrophilicity)을 가질 수 있다. 상기 리간드가 AMP 및 ATP가 혼합된 것인 경우, 상기 AMP 및 ATP가 2:1 내지 1:2의 몰농도 비율로 포함되는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 AMP 및 ATP는 1:1의 몰농도 비율로 포함되는 것일 수 있다.
- [0068] 상기 리간드가 ATP인 경우, 상기 자가조립 복합체는 구형의 형태를 띄고 균일한 직경으로 형성될 수 있다. 이때 상기 자가조립 복합체끼리의 뭉침이 일어나지 않을 수 있다. 상기 자가조립 복합체의 직경은 상기 리간드 및 철 이온의 농도에 따라 달라질 수 있지만, 같은 농도에서는 균일하게 형성될 수 있다.
- [0069] 상기 리간드가 AMP, AMP와 ADP의 혼합 리간드 또는 AMP와 ATP의 혼합 리간드인 경우 상기 자가조립 복합체는 구형으로 형성될 수 있고, 상기 자가조립 복합체끼리 집합체를 형성할 수 있다. 상기 자가조립 복합체가 결합한 집합체는 특정 형상을 가지지 않을 수 있다. 이 경우 복수의 상기 자가조립 복합체가 집합체를 형성하여 3차원적 형상을 가질 수 있다.
- [0071] 상기 자가조립 복합체는 자발적으로 자가 분해될 수 있다. 상기 자가조립 복합체가 자가 분해되는 경우, 생체 내 및 생체 외에서 1일 내지 90일 동안 자가분해되는 것일 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 자가 분해되면서 철 이온 또는 리간드를 방출할 수 있고, 상기 자가조립 복합체에 유효성분이 담지되어 있는 경우 상기 유효성분을 함께 방출할 수 있다.
- [0072] 상기 자가조립 복합체는 상기 유효성분을 서방형으로 방출할 수 있다.
- [0074] 상기 자가조립 복합체는 상기 리간드의 종류에 따라 자가 분해 속도가 달라질 수 있다. 상기 리간드의 종류 및 배합비에 따라 상기 자가조립 복합체의 전하 및 성질이 달라질 수 있고, 그러한 특성에 따라서 상기 자가조립 복합체가 자가조립된 정도가 달라질 수 있다. 따라서 상기 리간드의 종류 및 배합비를 조절하여 분해 속도를 조절할 수 있다.
- [0075] 예를 들어 리간드가 AMP인 경우 하나의 인산기가 철 이온(Fe^{2+})과 배위결합을 형성하고 상기 자가조립 복합체는 중성을 띄게 된다. 여기에서 상기 철 이온은 물 분자와 추가적으로 결합할 수 있다. 상기 중성의 자가조립 복합체는 소수성 특성으로 인하여 더 조밀하게 팩킹(packing)될 수 있고, 이 경우 자가 분해가 천천히 진행될 수 있

다

- [0076] 또한 예를 들어 리간드가 ADP인 경우 두 개의 인산기가 철 이온과 배위결합을 형성하고 상기 자가조립 복합체는 -1가의 전하를 띌 수 있다. 그러나 이 경우는 -2가의 전하를 띠는 경우인 ATP 리간드를 사용한 경우보다는 전하가 작아 팩킹이 더 느슨하게 형성될 수 있다. 또한 이 경우는 리간드가 AMP인 경우보다도 팩킹이 더 느슨하게 형성될 수 있다. 따라서 리간드가 ADP인 경우 자가 분해가 빨리 진행될 수 있다.
- [0077] 예를 들어 리간드 종류가 AMP, ADP, ATP 및 AMP+ATP의 혼합 리간드가 있는 경우 자가 분해가 진행되는 속도는 AMP, ATP, AMP+ATP 및 ADP의 순서로 빨라질 수 있다.
- [0078] 상기 자가 분해가 진행되는 속도는 상기 유효성분, 철 이온 및 리간드 중 적어도 어느 하나의 방출 속도에 해당할 수 있다.
- [0079] 상기 자가조립 복합체는 1일 내지 90일 동안 자가 분해될 수 있다. 다만 상기 자가조립 복합체가 생체 내에서 자가 분해되는 경우 3일 이내에 자가 분해될 수 있다.
- [0081] 또한 상기 자가조립 복합체를 특정 조건에 두면 자가 분해가 더 빨리 진행될 수 있다. 상기 자가조립 복합체는 킬레이트화제를 포함하는 조건, 강산 조건 및 강염기 조건 중 적어도 어느 하나의 조건에서 자가분해가 촉진될 수 있다.
- [0082] 상기 킬레이트화제는 상기 리간드 대신 철 이온과 결합을 형성하여 상기 자가조립 복합체가 자가 분해되는 것을 촉진시킬 수 있다. 상기 킬레이트화제는 상기 철 이온에 대하여 상기 리간드보다 친화력이 높은 물질일 수 있으며, 예를 들어 EDTA일 수 있다.
- [0083] 또한 상기 강산 또는 강염기 조건은 상기 철 이온과 리간드의 결합이 분해되는 것을 촉진시킬 수 있고, 역시 상기 자가조립 복합체의 자가 분해를 촉진시킬 수 있다. 상기 강산은 예를 들어 염산(HCl)일 수 있고, 상기 강염기는 예를 들어 NaCl일 수 있다.
- [0084] 예를 들어 상기 강산 조건의 pH는 2 내지 5이고, 상기 강염기 조건의 pH는 9 내지 12일 수 있다. 또한 바람직하게는 상기 강산 조건의 pH는 3 내지 4이고, 상기 강염기 조건의 pH는 10 내지 11일 수 있다.
- [0086] 상기 자가조립 복합체의 자가분해가 촉진되는 경우 0.5초 내지 10초 동안 자가분해될 수 있다.
- [0088] 상기 자가조립 복합체는 철 이온을 포함하고 있어 상자성을 가질 수 있다. 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 자기 모멘트가 크게 형성되는 것일 수 있다. 따라서 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 자기장을 인가하면 자기장에 의한 인력(또는 척력)이 더 크게 작용할 수 있다. 다시 말하면, 생체 내 및 생체 외에서 상기 자가조립 복합체에 자기장 인가하는 경우, 상기 자가조립 복합체가 크게 형성될수록 더 빠르게 확산되는 것일 수 있다.
- [0089] 또한 외부 자기장이 형성된 경우에만 자성을 띄므로 체내 및 체외에서 상기 자가조립 복합체를 조절하기 용이할 수 있다.
- [0090] 상기 자가조립 복합체는 상자성 특성에 의하여 MRI 조영제로 이용할 수 있다. 바람직하게는 상기 자가조립 복합체는 T2 조영제로 이용될 수 있다.
- [0092] 또한 상기 리간드가 AMP인 경우, 상기 자가조립 복합체가 매우 조밀하게 형성될 수 있고, 상기 자가조립 복합체가 3차원 적으로 조립되어 단단하게 형성될 수 있다. 상기 리간드가 AMP인 경우, 2차원 플레이트(plate) 구조 또는 3차원 스캐폴드(scaffold) 구조를 형성할 수 있고, 인공 뼈의 재료로 사용될 수 있다.
- [0093] 상기 자가조립 복합체를 이용하여 형성되는 2차원 또는 3차원의 구조 또한 자가조립 복합체와 마찬가지로 자가조립, 자가 분해 및 상자성을 가질 수 있다. 상기 2차원 구조는 자기장을 인가하는 경우, 상자성에 의하여 회전할 수 있다.
- [0094] 상기 2차원 플레이트 구조 또는 3차원 스캐폴드 구조의 경우, 내부에 기공을 포함하고 있을 수 있다. 상기 기공

에는 세포, 약물 및 기타 전달물질 중 적어도 어느 하나를 담지할 수 있다. 따라서 상기 구조체를 생체 내에 이식하여 세포 등과 같은 물질을 생체 내에 전달할 수 있다.

[0095] 예를 들어 PMMA 입자를 몰드로 사용하여 만든 뒤 PMMA를 녹여 제거할 수 있다. 이 때 PMMA가 제거된 빈 공간에 약물 또는 세포 등의 전달물질을 넣어 생체 내로 전달하는 캐리어로 이용할 수 있다.

[0097] 상기 자가조립 복합체는 물질 전달 캐리어, 세포 배양 배지, T2 조영제 및 인공뼈의 재료 중 적어도 어느 하나로 사용되는 것일 수 있다.

[0099] 이하 본 발명의 실시예 및 비교예를 기재한다. 그러나, 하기 실시예들은 본 발명의 바람직한 일 실시예일뿐 본 발명의 권리 범위가 하기 실시예들에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[실시예]

1. 실시예 1(Fe-AMP)

[0103] Fe-AMP 자가조립 복합체를 제조하였다.

[0104] FeCl₂ 용액 및 AMP 용액을 각각 20mM의 농도로 포함하는 DI 워터를 준비하였다.

[0105] FeCl₂ 용액 1mL을 AMP 용액 1mL(동일한 농도)에 첨가하고 볼텍스 믹서로 혼합하였다. 혼합된 용액은 37℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다.

[0106] 자발적인 자가 조립이 형성된 후, Fe-AMP 자가조립체를 포함하는 용액은 10000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다.

[0107] 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, 용액의 상층액을 버리고 DI 워터를 첨가하여 원심분리하는 과정을 2번 반복하였다.

[0108] 세척 후, 수집된 Fe-AMP 자가조립체 입자를 DI 워터 2mL에 분산시켰다.

2. 실시예 2(Fe-ADP)

[0111] Fe-ADP 자가조립 복합체를 제조하였다.

[0112] FeCl₂ 용액 및 ADP 용액을 각각 20mM로 포함하는 DI 워터를 준비하였다. FeCl₂ 용액 1mL를 ATP 용액 1mL(동일한 농도)에 첨가하고 볼텍스 믹서로 혼합하였다. 혼합된 용액을 37℃에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 자발적인 자가조립이 형성된 후, Fe-ADP 자가조립체를 포함하는 용액은 10000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다.

[0113] 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, 용액의 상층액을 버리고 DI 워터를 첨가한 후 원심분리하는 과정을 2번 수행하였다.

[0114] 세척 후, 수득된 Fe-ADP 자가조립체 입자를 DI 워터 2mL에 분산시켰다.

3. 실시예 3(Fe-ATP)

[0117] 크기를 조절할 수 있는 Fe-ATP 자가조립체를 합성하였다.

[0118] FeCl₂ 용액 및 ATP 용액을 포함하는 DI 워터를 다양한 농도로 준비하였다. FeCl₂와 ATP 용액은 각각 2.5mM, 5mM, 10mM, 20mM, 및 30mM의 농도에서, 100nm, 300nm, 1000nm, 1500nm 및 3000nm 크기의 Fe-ATP 자가조립체 입자를 생성할 수 있다.

[0119] 1mL의 FeCl₂ 용액을 1mL의 ATP 용액(동일한 농도)에 첨가하고, 볼텍스 믹서(vortex mixer)로 혼합하였다. 이 혼합된 용액은 37℃에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 자가조립이 형성된 후, Fe-ATP 자가조립체를 포함하는 용

액은 10000rpm에서 5분 동안 원심분리하였다.

[0120] 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, 상층액을 버리고 DI 워터를 첨가하고 용액을 원심분리하는 과정을 2번 수행하였다.

[0121] 세척 후, 수집된 Fe-ATP 자가조립체 입자들을 2mL DI 워터에 분산시켰다. 100mM EDTA 용액 100 μ L를 이 분산액에 부드럽게 첨가하고, 몇 초 이내에 Fe-ATP의 자가 분해를 관찰하였다.

표 1

[0122]

	철 이온 농도	ATP 농도	입자 크기
실시예 3-1	2.5mM	2.5mM	100nm
실시예 3-2	5mM	5mM	300nm
실시예 3-3	10mM	10mM	1000nm
실시예 3-4	20mM	20mM	1500nm
실시예 3-5	30mM	30mM	3000nm

[0123] **4. 실시예 4(Fe-(AMP+ATP))**

[0124] Fe-(AMP+ATP) 자가조립 복합체를 제조하였다.

[0125] FeCl₂ 용액, AMP 용액 및 ATP 용액을 각각 10mM의 농도로 포함하는 DI 워터를 준비하였다.

[0126] FeCl₂ 용액 1mL, AMP 용액 1mL 및 ATP 용액 1mL(동일한 농도)를 볼텍스 믹서를 이용하여 혼합하였다. 혼합된 용액은 37℃에서 12시간 동안 인큐베이션 하였다.

[0127] 자발적인 자가 조립이 형성된 후, Fe-(AMP+ATP) 자가조립체를 포함하는 용액은 10000rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다.

[0128] 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, 용액의 상층액을 버리고 DI 워터를 첨가하여 원심분리하는 과정을 2번 반복하였다.

[0129] 세척 후, 수집된 Fe-(AMP+ATP) 자가조립체 입자를 DI 워터 2mL에 분산시켰다.

[0132] **[실험 방법]**

[0133] **1. 주사전자현미경(SEM, Scanning electron microscopy) 이미징**

[0134] 자가조립 복합체의 형태적 특성을 확인하기 위하여 SEM(FEI, Quanta 250 FEG) 이미징을 수행하였다. 제조된 자가조립 복합체를 수집하여 실온의 진공 오븐에서 건조시키고, SEM 이미징 전에 90초 동안 백금 도금을 수행하였다.

[0136] **2. 시료진동식 자속계(VSM, Vibrating sample magnetometry) 측정**

[0137] 자가조립 복합체의 자기적 특성을 분석하기 위하여, 실온에서 -19000 Oe에서 19000 Oe 사이의 자기장을 인가하여 VSM(Tecnai 20, FEI, USA) 측정을 수행하였다. 샘플들의 건조 중량에 대해 정규화한 후, 생성된 자기 모멘트가 가역 히스테리시스 루프(reversible hysteresis loop)에 표시되었다.

[0139] **3. 투과전자 현미경(TEM, Transmission Electron Microscopy) 및 에너지 분산 X선 분광기(EDS, Energy-dispersive X-ray spectroscopy) 맵핑**

[0140] 자가조립 복합체의 크기 및 원소 조성을 확인하기 위하여, TEM 이미징 및 EDS 맵핑(Tecnai 20, FEI, USA)를 수행하였다.

[0142] **4. 현장 광학 현미경 이미징(In situ optical microscopy imaging)**

[0143] Fe-ATP 자가조립 복합체가 자발적으로 자가조립 또는 자가분해되는 모습을 확인하고, 상기 자가조립 복합체에 자기장을 인가하였을 때 이동하는 속도 및 방향을 확인하기 위하여 현장 광학 현미경 이미징(Nikon Eclipse Ts2)을 수행하였다.

[0145] **5. 2D Fe-AMP 플레이트 합성**

[0146] 2D Fe-AMP 플레이트 합성을 위하여, 500mM AMP 용액을 포함하는 DI 워터 20mL, 500mM FeCl₂ 용액을 포함하는 DI 워터 20mL 및 로다민(Rhodamine, Rhodamine 6G, CAS:989-38-8, Sigma-Aldrich) 용액을 포함하는 DI 워터 2mL(5mg/mL)을 준비했다.

[0147] 우선, 로다민 용액 2mL를 500mM FeCl₂ 용액 20mL에 첨가하였다. 이 용액에 500mM AMP 용액 20mL를 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 볼텍스 믹서(vortex mixer)를 사용하여 혼합하였다. 로다민이 담지된 Fe-AMP 자가조립체를 수집하기 위하여, 혼합 용액을 12000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상층액은 버렸다. 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, DI 워터 40mL를 로다민이 담지된 Fe-AMP 자가조립체에 첨가하고 12000rpm에서 10분 동안 원심분리하는 과정을 4번 반복하였다.

[0148] 그리고 나서, 로다민이 담지된 Fe-AMP 자가조립체를 37℃ 오븐에서 5일 동안 건조하였다. 건조된 자가조립체를 수집하고, 모르타르(mortar)를 사용하여 분쇄하였다. 약 10mg의 자가조립체를 이용하여 핸드 프레스로 2D Fe-AMP 플레이트(직경 13mm, 높이 1mm)를 제조하였다.

[0149] 이 2D 플레이트를 PBS 용액에 넣고, 자기장을 인가하여 플레이트를 관찰하였다. 영구자석의 위치에 따른 2D 플레이트의 움직임 및 1M EDTA 용액을 포함하는 DI 워터 1mL를 첨가한 후 2D 플레이트의 자가분해를 광학현미경(Nikon Eclipse Ts2)을 통해 관찰하였다.

[0151] **6. 2D Fe-AMP 세포 시트 제조**

[0152] 2D Fe-AMP에 세포를 배양하는 실험을 수행하였다.

[0153] 세포 시딩(cell seeding) 전에, 5번 실험에서 제조한 2D Fe-AMP 플레이트를 잘라 48-웰 세포 플레이트(48-well cell plate)에 넣었다. 이 플레이트를 10% 열-불활성화된 소 태아 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum), 4mM L-글루타민(L-glutamine), 및 50U/mL 페니실린/스트렙토마이신(penicillin and streptomycin)이 포함된 고글루코스(high glucose) Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)의 성장배지 50μL에서 37℃, 5% CO₂ 조건으로 배양하였고, 배지는 24시간 동안 8시간마다 바꿔주었다.

[0154] 그런 다음, 인간 중간엽줄기세포(hMSCs, human mesenchymal stem cells, Lonza, PT-2501, passage #5)를 2D Fe-AMP 플레이트에 약 2X10⁵ cells/cm²의 밀도로 시딩한 후, 세포 배양 후 48시간에 2D Fe-AMP 세포 플레이트(세포가 부착된 2D Fe-AMP 플레이트)를 수집하였다. 수집한 2D-Fe-AMP 세포 플레이트를 뒤집어 PBS 용액에 넣었다. 이 2D-Fe-AMP 세포 플레이트를 1M EDTA 용액을 포함하는 DI 워터 1mL에 넣자마자 자가분해되었고, 광학현미경(Nikon Eclipse Ts2)을 통해 관찰하였다.

[0156] **7. 3D Fe-AMP 뼈 스캐폴드 제조**

[0157] 폴리(메틸 메타크릴레이트)(PMMA, poly(methyl methacrylate)) 침출 방법을 이용하여 3D FE-AMP 거대 다공성 뼈 지지체(macroporous bone scaffold)를 합성하였다.

[0158] 우선, 원통형 폴리에틸렌 몰드(직경 8mm)에 PMMA 300mg(직경 125 ~ 150 μm; Bangs Laboratories, BB05N)을 충전하였다. 이 몰드에, 2M FeCl₂를 포함하는 DI 워터 200 μL를 첨가하고 볼텍스 믹서(vortex mixer)를 이용하여 5분 동안 부드럽게 혼합하였다. 이 혼합물을 포함하는 몰드를 밀봉하고 25℃에서 1일 동안 유지하였다.

[0159] 그 후, 3D Fe-AMP 집합체를 몰드에서 분리하고, 진탕 조건(shaking condition, 100rpm)에서 3일 동안 다이클로로메테인(DCM, dichloromethane) 50mL에 침지하여 PMMA를 침출시켰다. DCM은 24시간마다 교체하였다. 3일 후,

3D Fe-AMP 집합체를 DI 워터 50mL에 30분 동안 침지시켰다가 건조하였다.

[0160] 이 후 3D Fe-AMP 집합체를 1cm 또는 1.5cm 높이로 절단한 후, 뼈 치유 치료 전 30분 동안 자외선을 조사하여 살균하였다.

[0162] 8. 독소루비신(doxorubicin) 방출 실험

[0163] 자가조립 복합체의 물질 전달 성능을 실험하기 위하여 독소루비신 방출 실험을 수행하였다. 독소루비신(doxorubicin, 보령제약, 에이디마이신, 품목기준코드:199001007)을 포함하는 Fe-ATP, Fe-ADP, Fe-AMP 또는 Fe-(ATP+AMP, 1:1) 자가조립체를 합성하기 위하여, FeCl₂, ATP, ADP 및 AMP 용액을 포함하는 DI 워터(농도 100mM, 모두 동일한 농도)를 각각 준비하였다.

[0164] 독소루비신 용액(농도: 2g/L) 6mL에 100mM ATP(또는 ADP, AMP, ATP+AMP) 용액 2mL 및 100mM FeCl₂ 용액 2mL를 첨가하고 볼텍스 믹서로 혼합하였다. 반응하지 않은 시약을 제거하기 위하여, 상층액을 버리고, DI 워터를 첨가한 후 나머지 용액에 원심분리를 2회 수행하였다.

[0165] 세척 후, 수집된 Fe-ATP 자가조립체 입자들을 PBS 용액(pH 7.4) 1mL에 분산시키고, 투석백(dialysis bag, SnakeSkin™ Dialysis Tubing, 7kDa MWCO)으로 옮겼다. Fe-ATP(또는 Fe-ADP, Fe-AMP, Fe-(ATP+AMP, 1:1)) 자가조립체가 들어있는 투석백을 바이알(vial)에 넣고, PBS 용액(pH7.4) 4mL를 바이알에 첨가하여 전체 부피를 5mL로 유지시켰다. 1, 3, 7일째에, Fe-ATP(또는 Fe-ADP, Fe-AMP, Fe-(ATP+AMP, 1:1)) 자가조립체가 있는 투석백을 포함하는 바이알에서 상층액을 수집하여 방출된 독소루비신의 농도를 측정하였다.

[0166] PBS 용액은 전체 부피가 5mL로 유지되도록 추가적으로 바이알에 첨가되었다. 샘플 용액들은 0.5 μm 주사기 필터(syringe filter, Advantec)를 이용하여 여과하고, 상층액을 UV-Vis 분광법으로 분석하였다.

[0168] 9. 실험 성분

[0169] 상기 실험에서 사용한 물질들은 아래와 같다.

[0170] ATP : Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate (99 %, Sigma-Aldrich, 5 g, cat. No. A26209)

[0171] AMP : Adenosine-5'-monophosphate disodium salt (J61643, Alfa Aesar)

[0172] ADP : Adenosine 5' -diphosphate sodium salt (A2754, Sigma-Aldrich)

[0173] FeCl₂ : Iron(II) chloride (97 %, Sigma-Aldrich, 25 g, cat. No. 372870)

[0174] EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, 99.5 %, Junsei, 500 g, cat. No. 17385S0401)

[0175] Rhodamine: Rhodamine 6G (CAS: 989-38-8, Sigma-Aldrich)

[0176] PMMA: PMMA (125 to 150 μm in diameter; Bangs Laboratories, BB05N)

[0177] Doxorubicin: 보령제약, 에이디마이신 (품목기준코드: 199001007)

[0179] [실험예]

[0180] 1. 형태 분석

[0181] 도 2 내지 4는 Fe-AMP, Fe-ADP 및 Fe-ATP 자가조립체 각각의 형태 및 성분을 분석한 도면이다. EDS 매핑은 철(Fe) 및 인(P) 원소에 대하여 수행하였다.

[0182] 도 2의 위쪽 도면에서 SEM 이미지가 Fe-ATP 자가조립체가 균일한 크기를 가지고 형성된 것을 보여준다. 또한 TEM 및 EDS 이미지에서 철(Fe) 및 인(P) 원소가 존재하는 것을 확인할 수 있고(도 2의 오른쪽 아래), 철 이온(Fe²⁺) 및 ATP가 1:1의 비율로 포함되어 있는 것을 확인할 수 있다.

[0183] 도 3은 Fe-ADP 자가조립체에 대한 도면이고, 철과 인의 존재를 확인할 수 있었으며, 철 이온과 ADP가 1:1로 포

함된 것을 확인할 수 있다. 다만 TEM 및 EDS 이미지로 보아 자가조립체 사이에 약간의 뭉침이 있는 것이 보인다.

[0184] 도 4는 Fe-AMP 자가조립체에 대한 도면이고, 철과 인의 존재를 확인할 수 있었으며, 철 이온과 AMP가 1:1로 포함된 것을 확인할 수 있다. 다만 TEM 이미지에서 자가조립체 사이에 3차원 적으로 집합체가 많이 형성된 것을 확인할 수 있다.

[0186] 2. 자가조립 및 자가분해 확인

[0187] 철 이온과 리간드가 자가 조립 및 자가 분해되는 것을 관찰하였다. 여기에서 리간드는 ATP를 사용하였다.

[0188] 도 5에서 철 이온과 ATP 사이에 자발적으로 3분 정도 후에 자가 조립된 입자들이 보이고, 10분 이내에 자가조립체가 빠르게 형성되는 것을 확인할 수 있다. 도 6에서는 EDTA가 있는 조건에서 형성된 자가조립체가 분해되는 것을 관찰한 것이고, 10초 이내에 자가 조립체가 모두 분해되어 사라지는 것을 확인할 수 있다.

[0190] 3. 자가조립체의 크기에 따른 특성 확인

[0191] 도 7에서 철 이온과 ATP의 농도를 다르게 하여 자가조립체의 크기를 조절하면서 자가조립체를 제조하고 특성을 분석하였다. 다양한 크기의 Fe-ATP 자가조립체들은 서로 다른 자기 특성을 보여주고, 자기장 인가 시 이동 속도로 다르게 나타났다. 도 8은 Fe-ADP에서의 가역적 자기 특성(상자성)이 나타나는 것을 보여준다.

[0192] 도 7의 SEM 이미지에서 철 이온과 ATP의 농도가 높을 수록 구형의 자가조립체 크기가 크게 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 다만 동일한 농도에서 형성되는 자가조립 복합체의 크기는 거의 일정했다. 또한 자가조립체의 크기가 클수록 자기 모멘트가 높아지는 것을 VSM 측정 결과로 확인할 수 있다.

[0193] 또한 자가조립 복합체의 크기가 클수록 영구자석에 끌려오는 속도도 빠르게 나타났다. 이는 자가조립 복합체의 크기가 클수록 자기 모멘트가 크게 형성되기 때문이다.

[0194] 도 9 내지 11은 자가조립 복합체 또는 이들의 구조체가 영구자석이 인가되는 방향으로 이동하는 것으로, 자가조립체의 상자성을 확인할 수 있다. 도 10은 Fe-AMP의 2D 플레이트를 제조하여 실험한 결과이고, 자기장을 인가하면 플레이트가 회전하는 것을 확인할 수 있다. 도 11은 Fe-AMP의 3차원 스캐폴드 구조를 형성하여 실험한 결과이다. 자가조립체의 형태, 크기 등과 무관하게 상자성을 가지는 것을 확인할 수 있다.

[0195] 도 12은 자가조립체가 영구자석에 끌려오는 속도를 비교한 이미지이고, 각각 1.5 μm , 2 μm , 3 μm 및 3.5 μm 크기를 가지고 측정하였다. 여기에서 크기 차이가 가장 많이 나는 1.5 μm 및 3.5 μm 크기의 경우를 비교하였을 때, 속도가 두배 이상 차이나는 것을 확인할 수 있다. 이를 이용하여 자가조립체의 크기가 클수록 자기 모멘트가 큰 것도 확인할 수 있다.

[0197] 4. MRI 조영제 성능 확인

[0198] Fe-ATP 자가조립체의 MRI 조영제로서의 성능을 확인하는 실험을 진행하고 그 결과를 도 13에 도시하였다. 실험은 Fe-ATP 및 Fe-ATP+EDTA의 조건으로 수행하였고, 대조군으로 물을 이용하였다.

[0199] Fe-ATP 자가조립체는 T1 이미지에서는 관찰되지 않지만, T2에서는 MRI 신호를 보여주었다. 그러나 EDTA를 포함하는 경우에는 자가조립체가 분해되어 T2 신호를 얻지 못하였고, EDTA가 없는 조건에서 Fe와 ATP의 T2 조영제로서의 성능이 발휘되는 것을 확인할 수 있었다.

[0200] 도 13에서 마우스에 자가조립 복합체를 주입한 도면에서, 대조군(control, 초록색 원)과 비교하였을 때 Cy5.5를 포함하는 자가조립 복합체(빨간색 원)에서 T2 이미지가 나타나는 것을 확인할 수 있다. 따라서 자가조립 복합체가 생체 내에서 안정적으로 작용하는 것을 확인할 수 있다.

[0202] 5. 생체 내에서 자가조립체의 특성 확인

[0203] 생체 내에 자가조립체를 주입한 후, 생체 외부에서 자기장을 인가하여 자가조립체의 자기적 특성을 확인하고 도

14에 도시하였다. 여기에서 리간드는 ATP를 사용하였고, 전신 형광 현미경(whole-body fluorescence)을 이용하여 촬영하였다. 빨간색 부분이 자가조립체가 있는 부분이고, 자가조립체가 영구자석이 있는 방향으로 점점 이동하여 확산되는 것을 확인할 수 있다. 이로서 생체 외부에서 자기장을 인가하여 생체 내에 자가조립체가 적용되는 부위를 조절할 수 있다.

[0205] 도 15 및 16은 생체 내에서 자가조립체가 자가 분해되는 것을 실험한 것이다. Cy5 캡슐화된 Fe-ATP 자가조립체를 이용하여 EDTA가 있는 조건과 없는 조건에서 수행하였다. EDTA를 주입한 경우에만 Fe-ATP가 자가분해되어 퍼지는 것을 확인할 수 있다(도 15). 또한 마우스에 주입하여 생물 발광이미지를 촬영한 도 16에서는 EDTA의 존재 여부와 상관없이 형광이 관찰되었으나, EDTA를 주입한 경우에는 Fe-ATP 자가조립체가 분산되어 더 넓은 범위에서 관찰되었다.

[0206] 도 17는 로다민을 함유한 Fe-AMP의 2차원 플레이트 구조가 EDTA를 주입한 환경에서 빠르게 자가분해되는 것을 나타낸다. EDTA를 주입한 후 1분 정도 되었을 때 대부분의 자가조립 복합체가 분해되었으며, 5분 후에는 자가조립 복합체를 찾아볼 수 없었다.

[0208] 6. 약물 전달 실험

[0209] 자가조립체에 약물을 담지한 후 방출하는 실험을 수행하고 도 18 및 21에 도시하였다.

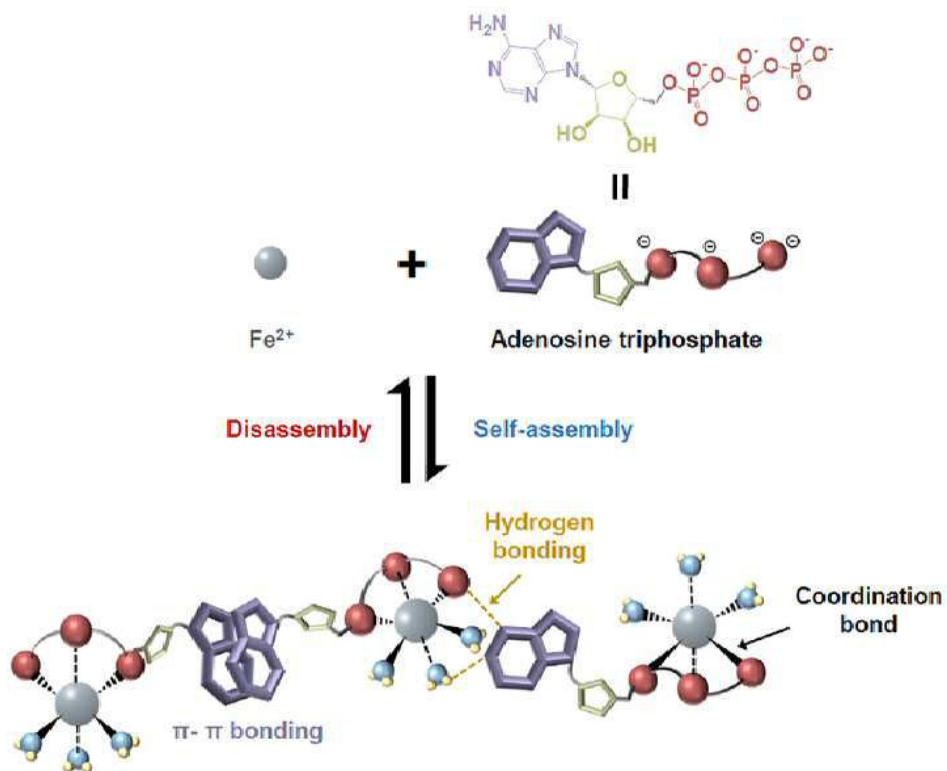
[0210] 도 18 및 19는 독소루비신을 이용하여 실험한 모식도와 결과이다. 모식도는 철 이온과 리간드가 자가조립될 때, 이들의 조밀 구조 내에 독소루비신이 침투하여 담지되는 것을 나타낸다. 도 19는 리간드의 종류에 따라 독소루비신이 방출되는 시간을 그래프로 나타낸 것이다. 리간드의 종류를 제외한 다른 조건은 모두 동일하게 적용되었고, 가장 조밀하게 패킹되는 Fe-AMP에서 방출량이 가장 적고, 가장 느슨하게 패킹되는 Fe-ADP에서 가장 빠르게 방출되는 것을 확인할 수 있다. 따라서 리간드의 종류를 조절하여 생체 내에서 약물이 방출되는 시간을 조절할 수 있다.

[0211] 도 20 및 21은 트리암시놀론 아세토니드(triamcinolone acetonide)를 이용하여 실험한 모식도와 결과이다. 자가조립 복합체가 자가 분해되면서 트리암시놀론 아세토니드가 방출되고, 그래프에서 약 70일이 지난 후에도 누적 방출량이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

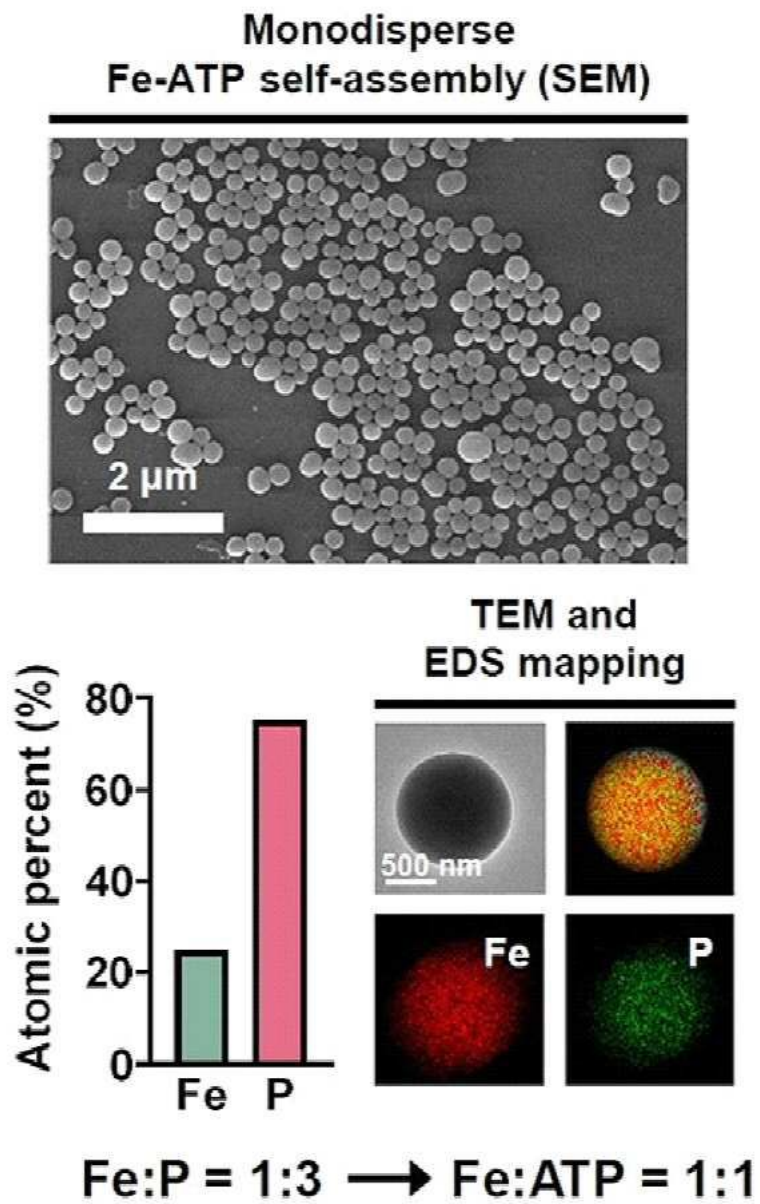
[0213] 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구의 범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구의 범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

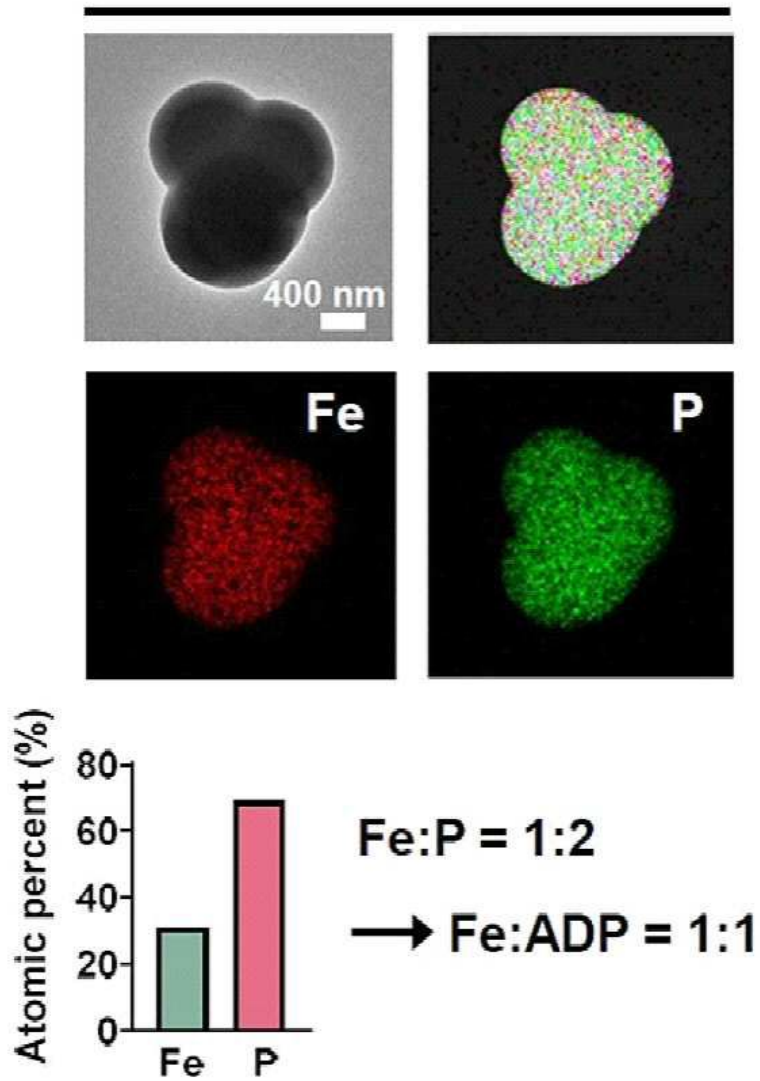


도면2

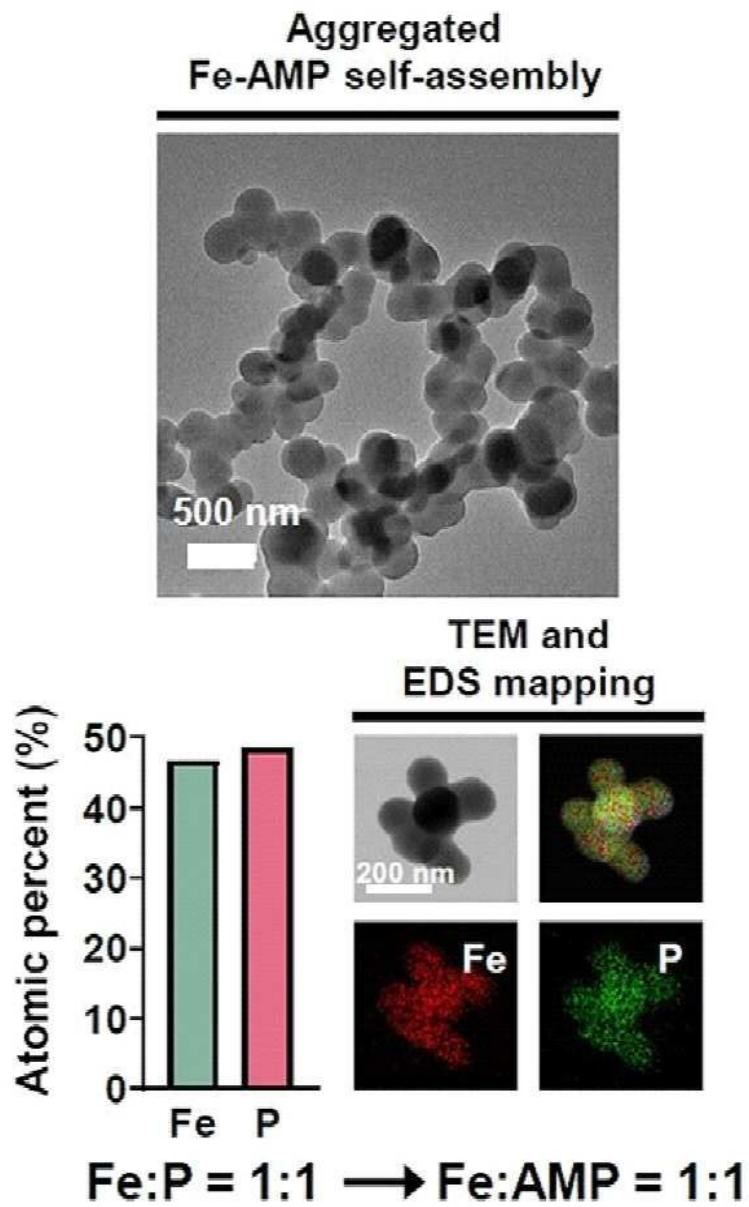


도면3

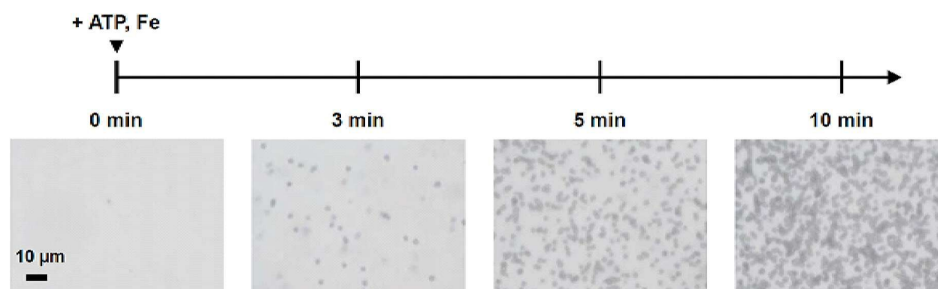
TEM and EDS mapping Fe-ADP self assembly



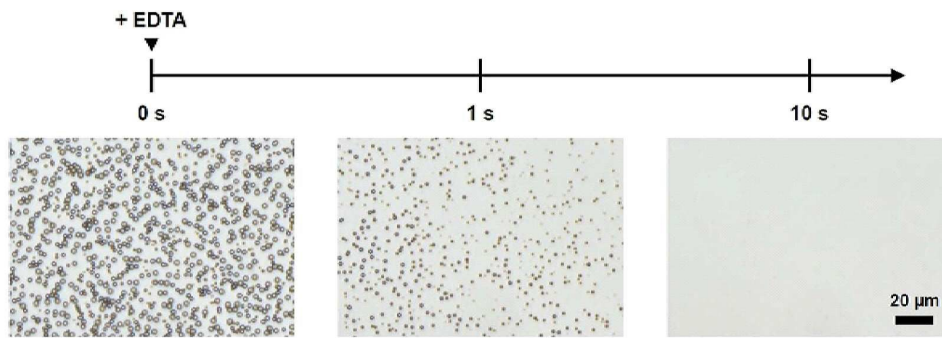
도면4



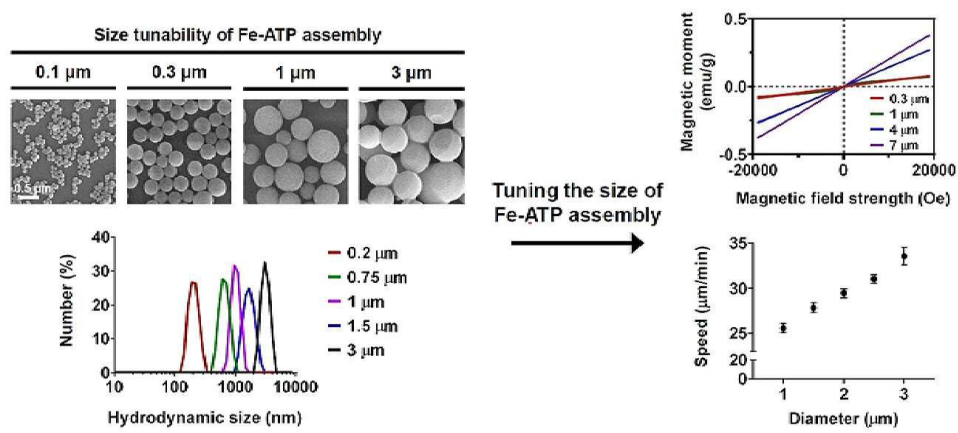
도면5



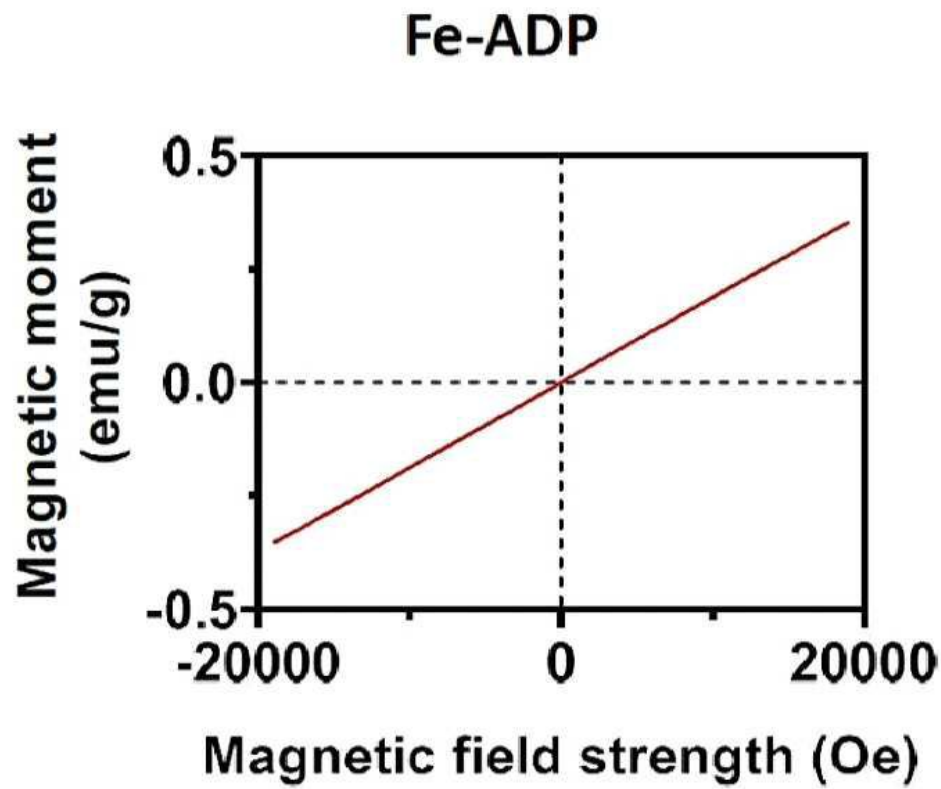
도면6



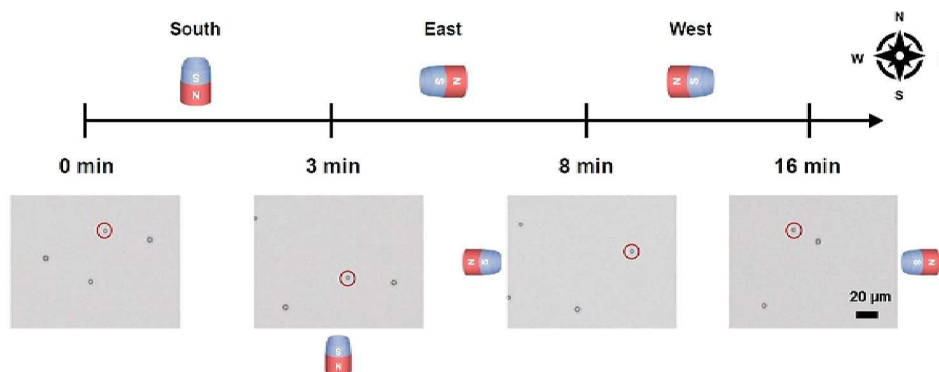
도면7



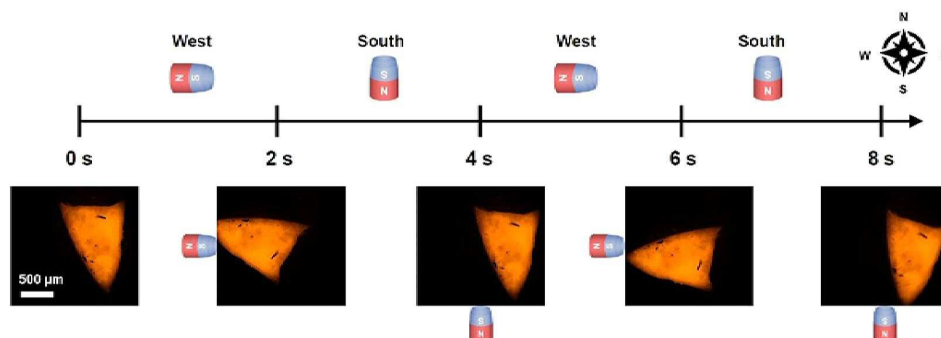
도면8



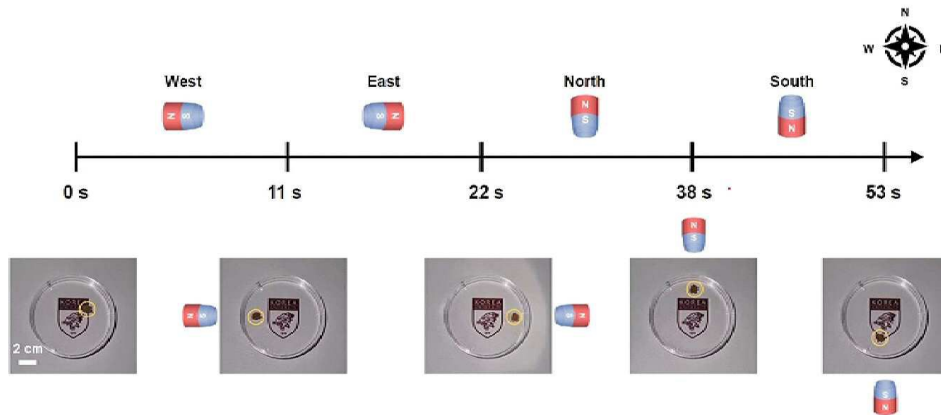
도면9



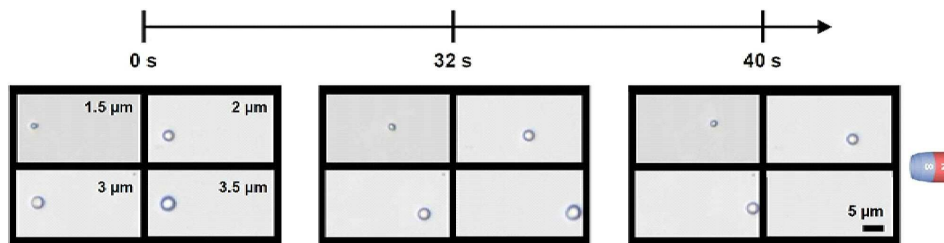
도면10



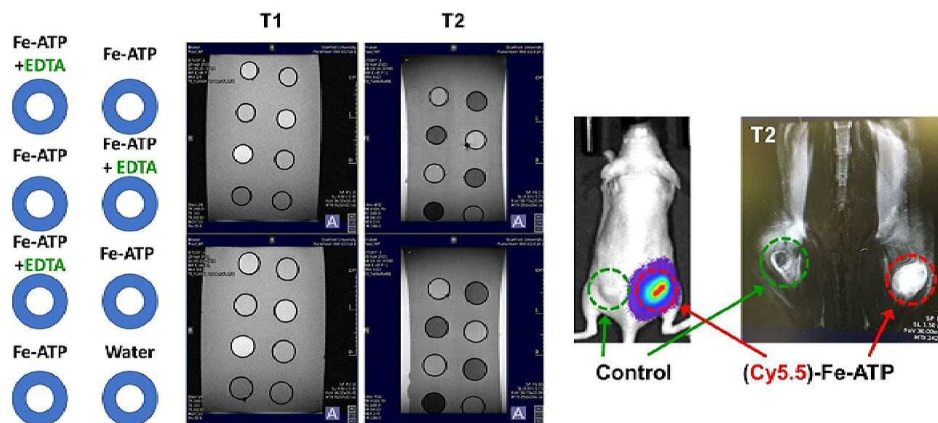
도면11



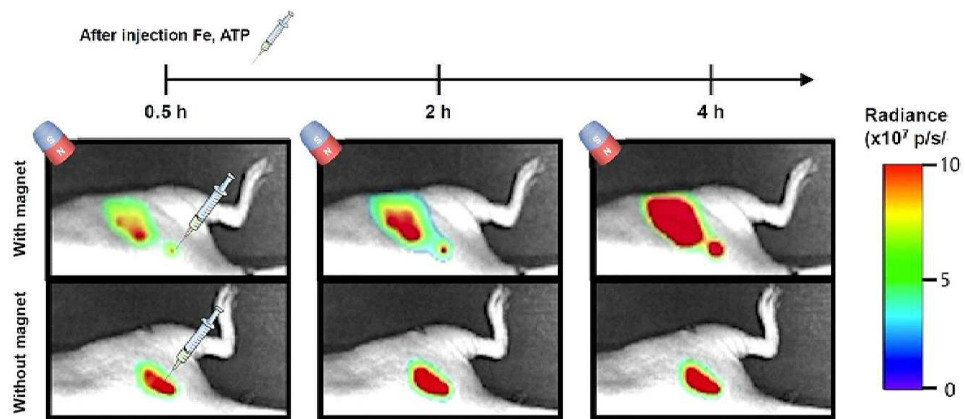
도면12



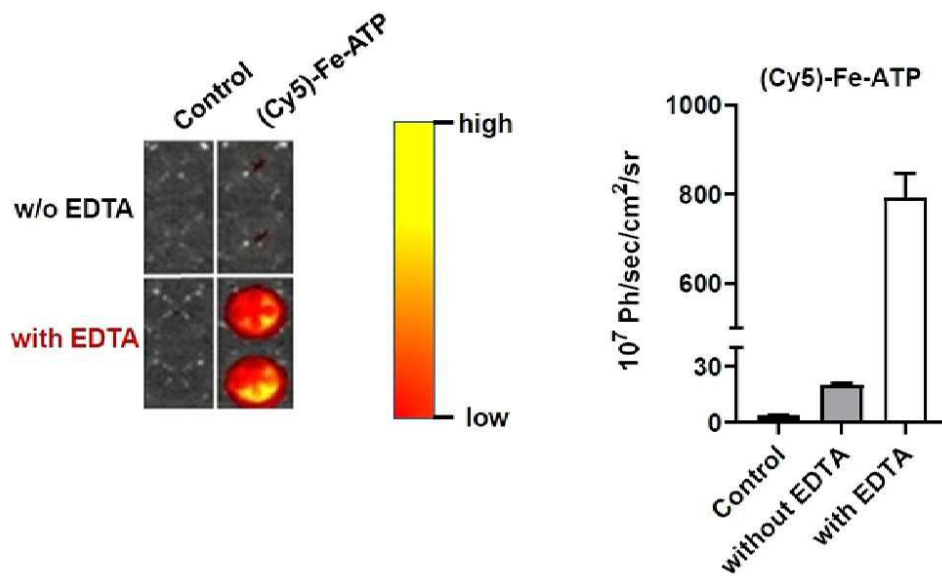
도면13



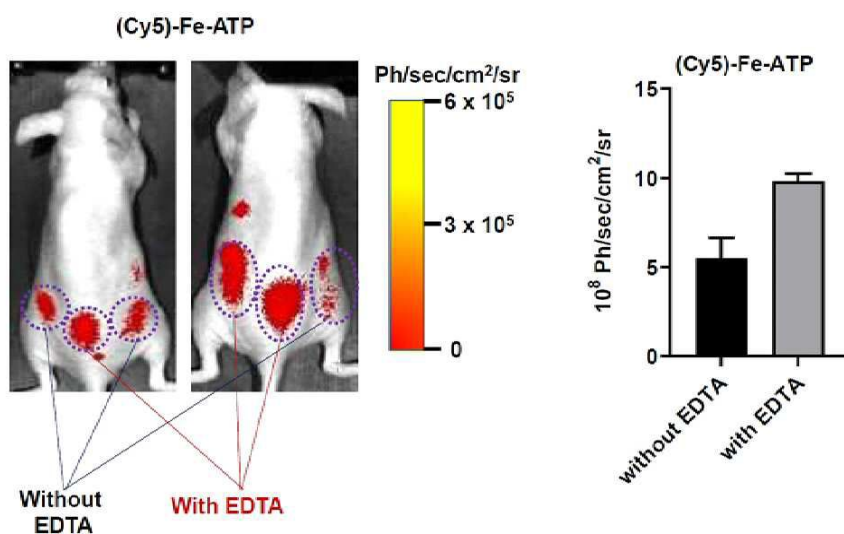
도면14



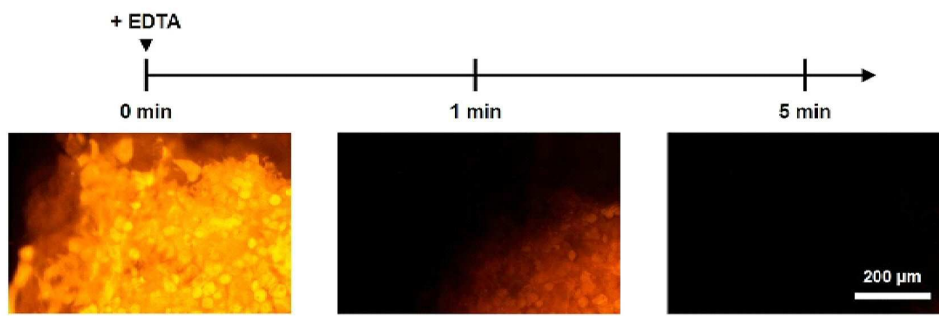
도면15



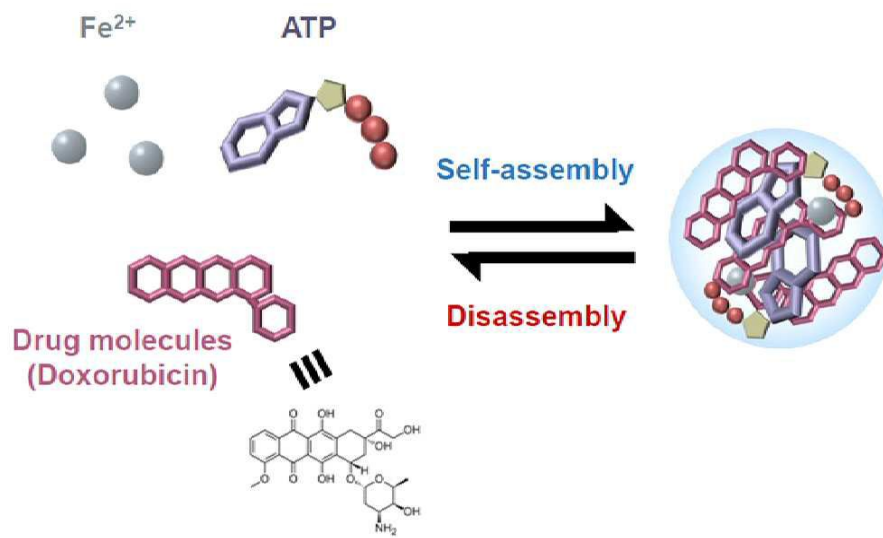
도면16



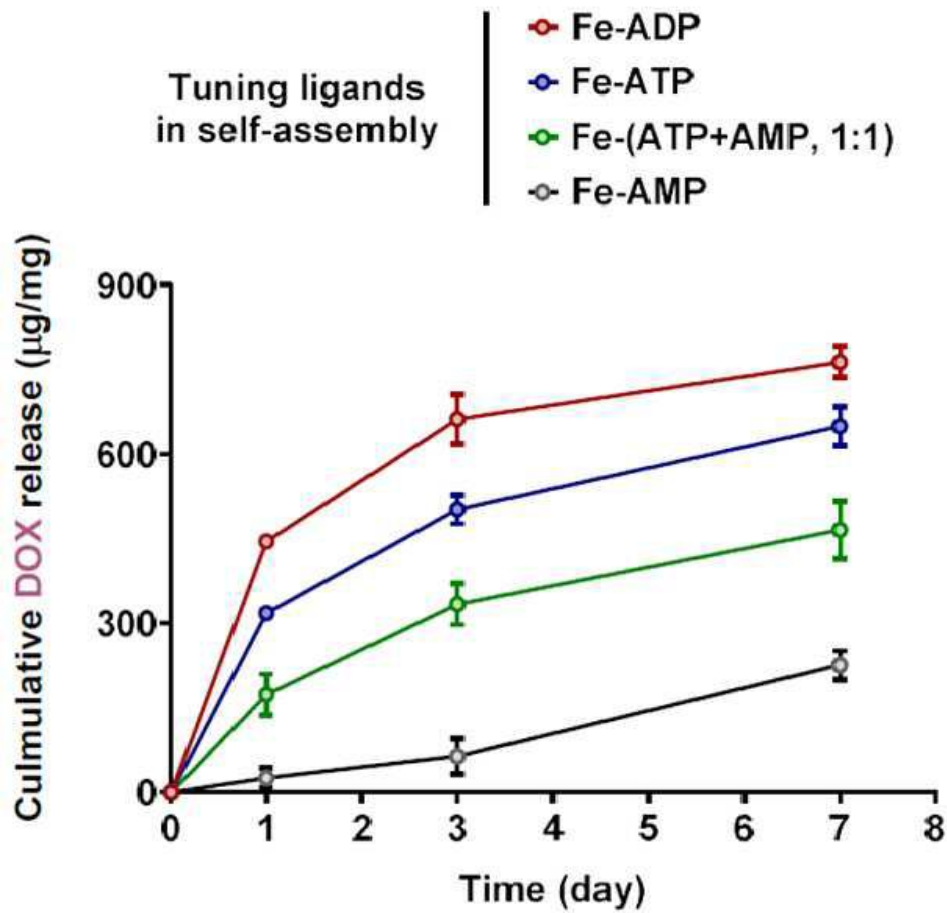
도면17



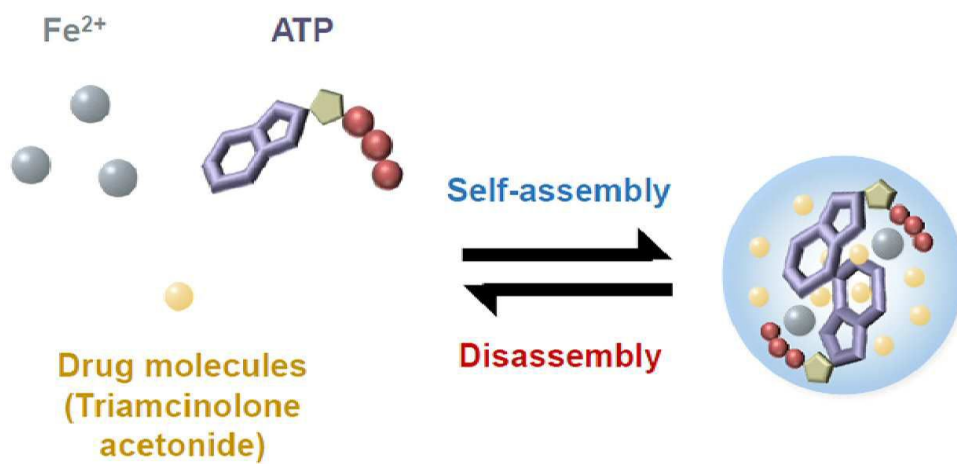
도면18



도면19



도면20



도면21

