



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116898981 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 20

(21) 申请号 202310016886.8

A61K 47/24 (2006.01)

(22) 申请日 2023.01.06

A61K 47/26 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 45/00 (2006.01)

10-2022-0046023 2022.04.13 KR

A61K 31/704 (2006.01)

10-2022-0097806 2022.08.05 KR

A61K 31/58 (2006.01)

A61K 49/06 (2006.01)

(71) 申请人 高丽大学校算学协力团

A61L 27/04 (2006.01)

地址 韩国首尔

A61L 27/54 (2006.01)

(72) 发明人 姜熙敏 金柳里 裴健杰 李城主

姜奈延 闵善泓 金成悦

(74) 专利代理机构 北京金宏来专利代理事务所

(特殊普通合伙) 11641

专利代理师 刘慧红

(51) Int.Cl.

A61K 47/02 (2006.01)

C12N 5/00 (2006.01)

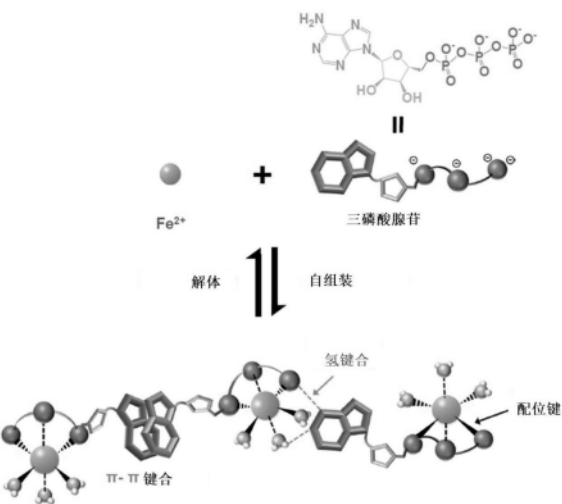
权利要求书2页 说明书11页 附图12页

(54) 发明名称

含有铁离子的自组装复合物

(57) 摘要

本发明公开了一种含有铁离子的自组装复合物,其包括:铁离子;以及至少一种配体,其中铁离子和配体可逆地自组装或自解体。铁离子和配体自组装以形成其至少部分是圆形的组装结构。



1. 一种含有铁离子的自组装复合物,包括:
铁离子;和
至少一种配体,
其中所述铁离子和所述配体可逆地自组装或自解体,
其中所述铁离子和所述配体自组装以形成其至少部分是圆形的组装结构。
2. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,还包括活性成分,
其中所述活性成分被负载在所述自组装复合物中。
3. 根据权利要求2所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述活性成分是选自由以下组成的组的至少任何一种:腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷、阿霉素、药物、蛋白质、有机酸、有机碱、香料和染料。
4. 根据权利要求2所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述活性成分通过所述自组装复合物的自解体而释放,
所述活性成分在释放时间内连续释放。
5. 根据权利要求4所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述释放时间是1至90天。
6. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述配体包括磷酸根和膦酸根中的至少任何一种。
7. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述配体是选自由以下组成的组的至少任何一种:AMP、ADP、ATP、TMP、TDP、TTP、CMP、CDP、CTP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP、DNA、IPA2211KR1436
RNA、AEP (2-氨基乙基膦酸)、TNA (苏糖核酸)、GNA (乙二醇核酸)、HNA (1,5-脱水己糖醇核酸)、ANA (1,5-脱水atritol核酸)、FANA (2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸) 和CeNa (环己烯基核酸)。
8. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述配体包括AMP和ATP的组合,其中以2:1至1:2的摩尔浓度比包括所述AMP和所述ATP。
9. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中当所述配体包括ADP和ATP中的至少任何一种时,所述自组装复合物是亲水性的,
其中当所述配体包括AMP时,所述自组装复合物是疏水性的。
10. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述配体是选自由以下组成的组的至少任何一种:AMP、ADP、ADP和ATP的混合配体、以及AMP和ATP的混合配体,
其中所述自组装复合物是球形的,
其中多个所述自组装复合物粘在一起形成二维板结构或三维聚集体。
11. 根据权利要求10所述的含有铁离子的自组装复合物,其中当所述二维板结构放置于施加的磁场中时,所述二维板结构自旋。
12. 根据权利要求10所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述三维聚集体包括在其中形成的孔。
13. 根据权利要求10所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述二维板结构和所述三维聚集体中的至少任何一个其中负载有细胞,使得能够递送所述细胞至活体中。
14. 根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述自组装复合物通过以下形成:所述配体之间的 π - π 相互作用和氢键中的至少任IPA2211KR1436

何一种;或所述铁离子和所述配体之间的配位键。

15.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中以5:1至1:1的摩尔浓度比包括所述铁离子和所述配体。

16.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中自解体的速率根据所述配体的类型而变化。

17.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述自组装复合物在1至90天内自解体。

18.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中自解体在具有螯合剂、强酸和强碱中的至少任何一种的条件下被加速,

其中强酸条件具有2至5的pH,

其中强碱条件具有9至12的pH。

19.根据权利要求15所述的含有铁离子的自组装复合物,其中自解体被加速至具有0.5秒至1分钟的持续时间。

20.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述自组装复合物是顺磁性的,

其中磁矩随着所述自组装复合物的尺寸的增加而增加。

21.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中当磁场在体内或体外施加于所述自组装复合物时,所述自组装复合物越大,其扩散得越快。

22.根据权利要求1所述的含有铁离子的自组装复合物,其中所述自组装复合物用作选自以下的至少任何一种:物质递送载体、细胞培养基、T2造影剂和人工骨。

含有铁离子的自组装复合物

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年4月13日和2022年8月5日向韩国知识产权局提交的韩国专利申请第10-2022-0046023号和第10-2022-0097806号的优先权和权益,该韩国专利申请的完整内容通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明涉及含有铁离子的自组装复合物,并且特别涉及其中铁离子和配体可以可逆自组装和自解体的含有铁离子的自组装复合物。

背景技术

[0004] 药物递送系统(DDS)被定义为通过最小化现有药物的副作用并优化治疗物质的功效和效果,以治疗疾病所需的最小量有效递送治疗物质的制剂。

[0005] 药物输送系统领域能够在短时间内以低成本开发现有药物的新配方,并被公认为下一代生物产业的核心。因此,正在积极开展利用具有各种功能和性能的生物聚合物和合成聚合物开发新型药物递送系统的研究。

[0006] 传统的药物递送系统使用人工合成的材料,例如使用以下的自组装复合物:二磷酸盐和金属离子,这是人体中没有的合成材料,或者 Fe_3O_4 ,这会导致人体中毒风险。

[0007] 这种传统的药物递送系统由于使用人体中未发现的物质而存在毒性问题,涉及生长因子、蛋白质等的递送,最终无法实现良好的价格竞争力,并且不允许在控制下持续释放,因此它们仅限于短时间内的药物递送。

[0008] 此外,药物递送系统应在延长的或给定的时间段内将药物递送到期望的作用靶点,以减少药物的副作用并将功效提高到最大。

[0009] 因此,需要开发一种药物递送系统,该药物递送系统通过使用人体中发现的天然物质而相对于现有技术无害且毒性小,允许药物、分子或活性成分在控制下持续释放,并且能够将药物有效地递送到期望的作用靶点。

发明内容

[0010] 技术问题

[0011] 本发明的一个目的是提供一种含有铁离子的自组装复合物。自组装复合物能够通过可逆的自组装和自解体将活性成分递送到活体中的期望的作用靶点。

[0012] 技术方案

[0013] 在本发明的一个方面,本发明的实施方案可以包括含有铁离子的自组装复合物,该自组装复合物包括:铁离子;以及至少一种配体,其中铁离子和配体可逆地自组装或自解体。铁离子和配体可以自组装以形成其至少部分为圆形的组装结构。

[0014] 在一个实施方案中,自组装复合物可以另外包括活性成分,其中活性成分可以被负载在自组装复合物中。

[0015] 在一个实施方案中,活性成分可以是选自由以下组成的组的至少任何一种:腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷、阿霉素、药物、蛋白质、有机酸、有机碱、香料和染料。

[0016] 在一个实施方案中,活性成分可以通过自组装复合物的自解体而释放,活性成分在释放时间内连续释放。

[0017] 在一个实施方案中,释放时间可以是1至90天。

[0018] 在一个实施方案中,配体可以包括磷酸根(phosphate)和膦酸根(phosphonate)中的至少任何一种。

[0019] 在一个实施方案中,配体可以是选自由以下组成的组的至少任何一种:AMP、ADP、ATP、TMP、TDP、TTP、CMP、CDP、CTP、GMP、GDP、GTP、UMP、UDP、UTP、DNA、RNA、AEP(2-氨基乙基膦酸)、TNA(苏糖核酸)、GNA(乙二醇核酸)、HNA(1,5-脱水己糖醇核酸)、ANA(1,5-脱水atritol核酸)、FANA(2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸)和CeNa(环己烯基核酸)。

[0020] 在一个实施方案中,配体可以包括AMP和ATP的组合,其中以2:1至1:2的摩尔浓度比包括AMP和ATP。

[0021] 在一个实施方案中,当配体包括ADP和ATP中的至少任何一种时,自组装复合物可以是亲水性的;并且当配体包括AMP时,自组装复合物可以是疏水性的。

[0022] 在一个实施方案中,配体可以是选自由以下组成的组的至少任何一种:AMP、ADP、ADP和ATP的混合配体、以及AMP和ATP的混合配体。自组装复合物可以是球形的,并且多个自组装复合物可以粘在一起形成二维板结构或三维聚集体。

[0023] 在一个实施方案中,二维板结构可以在施加的磁场中自旋。

[0024] 在一个实施方案中,三维聚集体可以包括在其中形成的孔。

[0025] 在一个实施方案中,二维板结构和三维聚集体中的至少任何一个可以在其中负载有细胞,使得能够递送细胞至活体中。

[0026] 在一个实施方案中,自组装复合物可以通过以下形成:相邻配体之间的 π - π 相互作用和氢键中的至少任何一种;或铁离子和配体之间的配位键。

[0027] 在一个实施方案中,可以以5:1至1:1的摩尔浓度比包括铁离子和配体。

[0028] 在一个实施方案中,自解体的速率可以根据配体的类型而变化。

[0029] 在一个实施方案中,自组装复合物可以在1至90天内自解体。

[0030] 在一个实施方案中,自解体可以在具有螯合剂、强酸和强碱中的至少任何一种的条件下被加速。强酸条件可以具有2至5的pH,并且强碱条件可以具有9至12的pH。

[0031] 在一个实施方案中,自解体可以被加速至具有0.5秒至1分钟的持续时间。

[0032] 在一个实施方案中,自组装复合物可以是顺磁性的,其中磁矩随着自组装复合物的尺寸的增加而增加。

[0033] 在一个实施方案中,当磁场在体内或体外施加于自组装复合物时,自组装复合物越大,其扩散得越快。

[0034] 在一个实施方案中,自组装复合物可以用作选自以下的至少任何一种:物质递送载体、细胞培养基、T2造影剂和人工骨。

[0035] 发明效果

[0036] 根据如上所述的本发明,可以提供含有铁离子的自组装复合物。自组装复合物能够通过可逆的自组装和自解体将活性成分递送到活体中。

附图说明

- [0037] 图1是显示根据本发明实施方案的Fe-ATP自组装复合物的形成的示意图。
- [0038] 图2、图3和图4分别显示了Fe-ATP自组装复合物、Fe-ADP自组装复合物和Fe-AMP自组装复合物的特性的分析结果。
- [0039] 图5显示了铁离子和ATP自组装的图像。
- [0040] 图6显示了自组装复合物在EDTA条件下自解体的观察结果。
- [0041] 图7显示了自组装复合物的特性的分析结果,其中自组装复合物的尺寸由铁离子和ATP的浓度调节。
- [0042] 图8是显示Fe-ADP自组装复合物的可逆磁性(顺磁性)的图。
- [0043] 图9显示了自组装复合物在施加永磁体的方向上移动。
- [0044] 图10显示了具有2D板结构的自组装复合物在施加的磁场中自旋。
- [0045] 图11显示具有3D支架结构的自组装复合物在施加的磁场中移动。
- [0046] 图12显示了运动速度随着置于施加的磁场中的自组装复合物的尺寸的函数而变化。
- [0047] 图13显示了Fe-ATP自组装复合物作为MRI造影剂的性能的实验结果。
- [0048] 图14显示了引入到活体中然后放置在从活体外部施加的磁场中的自组装复合物的磁性的分析结果。
- [0049] 图15和图16显示了在体内或体外使用EDTA的条件下自组装复合物的自解体的实验结果。
- [0050] 图17显示了在EDTA条件下具有2D板结构的自组装复合物的自解体的实验结果。
- [0051] 图18是显示铁离子、ATP和阿霉素(DOX)的自组装的示意图。
- [0052] 图19显示了负载在自组装复合物中的阿霉素的释放时间的观察结果。
- [0053] 图20是显示铁离子、ATP和药物分子(曲安奈德(triamcinolone acetonide))的自组装的示意图。
- [0054] 图21显示了负载在自组装复合物中的药物分子(曲安奈德)的释放时间的观察结果。

具体实施方式

- [0055] 其他实施方案的细节包括在详细描述和附图中。
- [0056] 本发明的优点和特征以及实现这些的方法将从以下结合附图的详细描述中更清楚地理解。然而,本发明不限于以下公开的实施方案,而是可以以各种不同的形式实现。除非在以下描述中另有规定,否则表示本发明中的组分、反应条件和组分含量的所有数字、值和/或表达式在所有情况下都用术语“约”来修饰,因为这些数字尤其地本质上是反映由获得这些值而引起的测量的各种不确定性的近似值。此外,在本说明书中公开数值范围时,除非另有规定,否则这些范围是连续的,并且包括从最小值到最大值的所有值。此外,当此类范围涉及整数时,除非另有规定,否则包括从最小值到最大值的所有整数。
- [0057] 当为本发明中的变量限定范围时,该变量将被理解为包括限定范围内的所有值,包括所述范围的所述端点。例如,“5到10”的范围包括5、6、7、8、9和10的值,以及任何子范围,例如6到10、7到10、6到9和7到9。它还将被解释为包括适合于定义范围的范围的整数之

间的任何值,例如5.5、6.5、7.5、5.5至8.5和6.5至9。例如,“10至30%”的范围包括10%、11%、12%、13%等值以及所有不超过30%的整数,以及任何子范围,例如10至15%、12至18%和20至30%,以及定义范围的范围内合理整数之间的任何值,例如10.5%、15.5%和25.5%。

[0058] 图1是示出根据本发明实施方案的含有铁离子的自组装复合物的示意图。

[0059] 图1以示意性方式显示了铁离子(Fe^{2+})和三磷酸腺苷(ATP)的自组装和自解体。铁离子可以与ATP的磷酸根部分及水形成配位键,以生成金属复合物。腺嘌呤部分的芳香环形成 π - π 相互作用。此外,腺嘌呤部分的氮和与铁离子结合的水分子可以形成氢键。

[0060] 以这种方式,自组装复合物可以形成为包括配位键、 π - π 相互作用和氢键,其中至少一种可以用于形成自组装复合物。

[0061] 在本发明的一个方面,本发明的实施方案可以包括含有铁离子的自组装复合物,该自组装复合物包括铁离子;以及至少一种配体,其中铁离子和配体可逆地自组装或自解体。配体和铁离子可以自组装以形成其至少部分为圆形的组装结构。

[0062] 自组装复合物可以进一步包括活性成分,并且活性成分可以被负载在自组装复合物中。在自组装复合物的自组装期间,活性成分可以被负载在自组装复合物内。

[0063] 自组装复合物可以在其自解体时释放活性成分。因此,可以通过调节自组装复合物的自解体时间来控制活性成分的释放时间和速率。自组装复合物的自解体速率可随配体的类型而变化。自组装复合物可以从其表面以限定的速率顺序自解体,这允许活性成分在自组装复合物的自解体时间内连续释放。换句话说,活性成分可以在释放时间内以持续的方式释放。

[0064] 自组装复合物的自解体时间,即活性成分的释放时间可以在1天至90天的范围内。在促进自组装复合物自解体的环境中,活性成分的释放时间可以在0.5秒至1分钟;或0.5秒至10秒的范围内。

[0065] 活性成分可以是能够被负载在自组装复合物中并在自组装复合物的自解体过程中释放的物质。例如,活性成分可以是选自腺苷、鸟苷、尿苷、胞苷、阿霉素、药物、蛋白质、有机酸、有机碱、香料和染料中的至少任何一种。药物可能是曲安奈德(triamcinolone acetonide)。

[0066] 配体可以是能够与铁离子形成配位键并参与自组装的物质。两个相邻配体之间可能发生键合,以形成金属复合物。

[0067] 配体可以包括磷酸根(phosphate)和膦酸根(phosphonate)中的至少任何一种。磷酸根或膦酸根可以是能够与铁离子形成配位键的部分。

[0068] 例如,配体可以是选自由以下组成的组的至少任何一种:一磷酸腺苷(AMP)、二磷酸腺苷(ADP)、三磷酸腺苷(ATP)、一磷酸胸苷(TMP)、二磷酸胸苷(TDP)、三磷酸胸苷(TTP)、一磷酸胞苷(CMP)、二磷酸胞苷(CDP)、三磷酸胞苷(CTP)、一磷酸鸟苷(GMP)、二磷酸鸟苷(GDP)、三磷酸鸟苷(GTP)、一磷酸尿苷(UMP)、二磷酸尿苷(UDP)、三磷酸尿苷(UTP)、DNA、RNA、2-氨基乙基膦酸(AEP)、苏糖核酸(TNA)、乙二醇核酸(GNA)、1,5-脱水己糖醇核酸(HNA)、1,5-脱水atritol核酸(1,5-anhydroatritol nucleic acid,ANA)、2'-脱氧-2'-氟阿拉伯糖核酸(FANA)和环己烯基核酸(CeNA)。

[0069] 铁离子可以与富电子部分(例如配体的磷酸根部分)形成配位键,以形成金属复合

物。

[0070] 自组装复合物的至少一部分可以是圆形的。此外,自组装复合物可以是球形的。自组装复合物可以通过多个铁离子和配体之间的键合形成。铁离子和配体可以在5:1至1:1、优选1:1的摩尔浓度比下形成键。

[0071] 自组装复合物可以是球形或至少部分圆形,通过铁离子和彼此相邻的配体之间的配位键、 π - π 相互作用和氢键中的至少任一种形成。在自组装复合物中,铁离子和配体可以通过相互作用或键合而紧密地彼此粘附。因此,自组装复合物可以通过铁离子和配体的密集聚集形成。

[0072] 根据配体的类型和混合比,自组装复合物可以更密集或更松散地形成。混合比可以是摩尔浓度比。

[0073] 一种或两种配体可用于形成自组装复合物。

[0074] 当配体包括例如二磷酸(diphosphate)或三磷酸(triphosphate)时,自组装复合物可以是亲水性的。当配体包括三磷酸时,自组装复合物可能带2价负电荷。对于包括二磷酸的配体,自组装复合物可以带1价负电荷。当配体包括二磷酸或三磷酸时,这可能意味着配体是ADP、ATP、TDP、TTP、CDP、CTP、GDP、GTP、UDP和UTP中的至少任一种。

[0075] 当配体包括例如单磷酸(monophosphate)时,自组装复合物可以是疏水性的。当配体包括单磷酸时,自组装复合物可能是中性的。当配体包括单磷酸时,这可能意味着配体是AMP、TMP、CMP、GMP和UMP中的至少任一种。

[0076] 此外,配体可以包括AMP和ATP的组合,在这种情况下,自组装复合物可以是亲水性的。对于包括AMP和ATP的组的配体,可以以2:1至1:2、优选1:1的摩尔浓度比包含AMP和ATP。

[0077] 当配体是ATP时,自组装复合物可以形成具有均匀直径的球体形状。在这种情况下,自组装复合物可能不会聚集。自组装复合物的直径可随配体和铁离子的浓度而变化,但在配体和铁浓度相同的情况下,其直径可能是均一的。

[0078] 当配体是AMP、AMP和ADP的混合配体或AMP和ATP的混合配体时,自组装复合物可以形成球形。此外,自组装复合物可以形成聚集体。自组装复合物的聚集体可以不具有特定形状。在这种情况下,多个自组装复合物可以形成具有三维形状的聚集体。

[0079] 自组装复合物可以自发的方式自解体。至于自解体,自组装复合物可以在体内或体外在1至90天内自解体。随着自组装复合物自解体,它可以释放铁离子或配体以及活性成分(在活性成分被负载在自组装复合物中的情况下)。

[0080] 自组装复合物可以持续释放的方式释放活性成分。

[0081] 自组装复合物的自解体速率可随配体的类型而变化。自组装复合物的电荷和性质可随配体的类型和混合比而变化。该特性可决定自组装复合物的自组装程度。因此,可以通过调节配体的类型和混合比来控制解体速率。

[0082] 例如,当配体是AMP时,一个磷酸基团与铁离子(Fe^{2+})形成配位键,以使自组装复合物中性。在这方面,铁离子可以另外与水分子结合。由于其疏水性,中性自组装复合物可能填充得更紧密,在这种情况下,自解体可能进行得更慢。

[0083] 例如,当配体是ADP时,两个磷酸基团与一个铁离子形成配位键,使自组装复合物带1价负电荷。但是,这种情况可能会导致复合物堆积得更松散(具有更低的密度),因为其

化合价比带2价负电荷的自组装复合物的情况低。此外,与使用AMP作为配体的情况相比,这种情况可能导致形成堆积的更松散的复合物。因此,具有ADP作为配体的自组装复合物可以更快地自解体。

[0084] 例如,当配体是AMP、ADP、ATP和AMP+ATP的混合配体时,自解体的速率可以按AMP、ATP、AMP+ATP和ADP的顺序增加。

[0085] 自解体速率可对应于活性成分、铁离子和配体中的至少任一种的释放速率。

[0086] 自组装复合物可在1至90天内自解体。但是,在体内发生自解体的情况下,自组装复合物自解体可能需要不到3天。

[0087] 此外,当自组装复合物放置在特定条件下时,自解体可能进行得更快。自组装复合物可在螯合剂、强酸和强碱中的至少任一种的条件下经历加速的自解体。

[0088] 螯合剂可以代替配体与铁离子形成键,以促进自组装复合物的自解体。螯合剂可以是对铁离子具有比配体更高亲和力的物质,并且包括例如EDTA。

[0089] 具有强酸或强碱的条件也可以加速铁离子和配体之间的键的断裂,从而也可以加速自组装复合物的自解体。例如,强酸可以是盐酸(HCl),强碱可以是氯化钠(NaCl)。

[0090] 例如,具有强酸的条件可以具有2至5的pH,具有强碱的条件可以具有9至12的pH。优选地,具有强酸的条件可以具有3至4的pH,并且具有强碱的条件可以具有10至11的pH。

[0091] 自组装复合物的加速自解体可能需要0.5至10秒。

[0092] 由于其中含有铁离子,所以自组装复合物可具有顺磁性。磁矩可以随着自组装复合物的尺寸的增加而增加。因此,自组装复合物越大,由施加到自组装复合物的磁场引起的吸引力(或排斥力)越大。换言之,当在体内或体外将磁场施加到自组装复合物上时,较大的自组装复合物可能被迫更快地扩散。

[0093] 此外,由于自组装复合物仅在向其施加外部磁场的情况下具有磁性,因此易于在体内和体外控制自组装复合物。

[0094] 由于顺磁性,所以自组装复合物可以用作MRI造影剂(contrast agent),优选作为T2造影剂。

[0095] 当配体为AMP时,自组装复合物可以更紧密地形成,并且组装得更牢固,从而具有三维形式。当配体为AMP时,自组合复合物可以组装成二维板结构或三维支架结构,因此可以用作人工骨的材料。

[0096] 与自组装复合物一样,由自组装复合物制成的二维或三维结构可以表现出自组装/解体和顺磁性质。当置于磁场中时,由于其顺磁性,二维结构可以自旋。

[0097] 二维板结构或三维支架结构可以包含在其中形成的孔。这些孔可以负载细胞、药物和待递送的其他物质中的至少任何一种。因此,通过体内结构的识别,可以将诸如细胞的物质递送到活体中。

[0098] 例如,使用PMMA颗粒制作模具,并在熔化时移除。然后,去除PMMA的空隙可以填充待递送的物质,因此模具可用作将物质递送到活体中的载体。

[0099] 自组装复合物可以用作物质递送载体、细胞培养基、T2造影剂和人工骨中的至少任一种。

[0100] 在下文中,将给出关于本发明的实施例和比较例的描述。提供以下实施例仅用于说明本发明的优选实施方案,而不能解释为限制本发明的范围。

[0101] [实施例]

[0102] 1. 实施例1 (Fe-AMP)

[0103] 如下制备Fe-AMP自组装复合物。

[0104] 使用去离子(DI)水分别制备20mM FeCl_2 溶液和20mMAMP溶液。

[0105] 将1mL FeCl_2 溶液添加到1mLAMP溶液(相同浓度)中,并在涡流混合器上混合两种溶液。将由此获得的混合溶液在37℃下孵育12小时。

[0106] 一旦发生自发自组装,将含有Fe-AMP自组装颗粒的溶液以10,000rpm离心5分钟。

[0107] 为了除去未反应的试剂,丢弃溶液的上清液,将剩余的溶液与额外的DI水混合并离心。此过程重复两次。

[0108] 洗涤后,将如此收集的Fe-AMP自组装颗粒分散在2mL DI水中。

[0109] 2. 实施例2 (Fe-ADP)

[0110] 如下制备Fe-ADP自组装复合物。

[0111] 使用去离子(DI)水分别制备20mM FeCl_2 溶液和20mMADP溶液。将1mL FeCl_2 溶液添加到1mLADP溶液(相同浓度)中,并在涡流混合器上混合两种溶液。将由此获得的混合溶液在37℃下孵育12小时。一旦发生自发自组装,将含有Fe-ADP自组装颗粒的溶液以10,000rpm离心5分钟。

[0112] 为了除去未反应的试剂,丢弃溶液的上清液,将剩余的溶液与额外的DI水混合并离心。此过程重复两次。

[0113] IPA2211KR1436

[0114] 洗涤后,将如此收集的Fe-ADP自组装颗粒分散在2mL DI水中。

[0115] 3. 实施例3 (Fe-ATP)

[0116] 如下制备尺寸可控制的Fe-ATP自组装复合物。

[0117] 使用去离子(DI)水,制备不同浓度的 FeCl_2 溶液和ATP溶液。具有100nm、300nm、1,000nm、1,500nm和3,000nm尺寸的Fe-ATP自组装颗粒可由 FeCl_2 和ATP溶液(其各自的浓度分别为2.5mM、5mM、10mM、20mM和30mM)制备。

[0118] 将1mL FeCl_2 溶液添加到1mLATP溶液(相同浓度)中,并在涡流混合器上混合两种溶液。将由此获得的混合溶液在37℃下孵育12小时。一旦发生自发自组装,将含有Fe-ATP自组装颗粒的溶液以10,000rpm离心5分钟。

[0119] 为了除去未反应的试剂,丢弃溶液的上清液,将剩余的溶液与额外的DI水混合并离心。此过程重复两次。

[0120] 洗涤后,将如此收集的Fe-ATP自组装颗粒分散在2mL DI水中。将100 μL 100mM EDTA溶液轻轻加入分散溶液中。在几秒钟内,观察到Fe-ATP颗粒的自解体。

[0121] [表1]

[0122]

	铁离子浓度	ATP浓度	颗粒尺寸
实施例3-1	2.5mM	2.5mM	100nm
实施例3-2	5mM	5mM	300nm
实施例3-3	10mM	10mM	1,000nm
实施例3-4	20mM	20mM	1,500nm
实施例3-5	30mM	30mM	3,000nm

[0123] 4. 实施例4 (Fe- (AMP+ATP))

[0124] 如下制备Fe- (AMP+ATP) 自组装复合物。

[0125] 使用去离子(DI) 水分别制备各自浓度为10mM的FeCl₂溶液、AMP溶液和ATP溶液。

[0126] 将1mL FeCl₂溶液、1mLAMP溶液和1mLATP溶液在涡流混合器上混合。将由此获得的混合溶液在37℃下孵育12小时。

[0127] 一旦发生自发自组装,将含有Fe- (AMP+ATP) 自组装颗粒的溶液以10,000rpm离心5分钟。

[0128] 为了除去未反应的试剂,丢弃溶液的上清液,将剩余的溶液与额外的DI水混合并离心。此过程重复两次。

[0129] 洗涤后,将如此收集的Fe- (AMP+ATP) 自组装颗粒分散在2mL DI水中。

[0130] [实验方法]

[0131] 1. 扫描电子显微镜(SEM) 成像

[0132] 进行SEM(FEI,Quanta 250FEG) 成像以确定自组装复合物的形态学性质。收集制备的自组装复合物,在室温下在真空烘箱中干燥,并镀铂90秒,然后进行SEM成像。

[0133] 2. 振动样品磁强计(VSM) 测量

[0134] 为了分析自组装复合物的磁性,通过在室温下施加-190000e和190000e之间的磁场来进行VSM(Tecnai 20,FEI,USA) 测量。在对样品的干重进行归一化之后,通过可逆磁滞回线提供了在样品上感应的磁矩。

[0135] 3. 透射电子显微镜(TEM) 成像和能量色散X射线光谱(EDS) 绘图

[0136] 进行TEM成像和EDS绘图(Tecnai 20,FEI,USA) 以确定自组装复合物的尺寸和元素组成。

[0137] 4. 原位光学显微成像

[0138] 进行原位光学显微镜成像(Nikon Eclipse Ts2) 以观察自组装复合物的自发自组装或自解体,并确定自组装复合物在施加磁场中的移动速度和方向。

[0139] 5. 合成2D Fe-AMP板

[0140] 制备20mL的在去离子水中含有500mMAMP的溶液、20mL的在去离子水中含有500mM FeCl₂的溶液和20mL的在去离子水中含有罗丹明(罗丹明6G,CAS:989-38-8,Sigma-Aldrich)的溶液,用于合成2D Fe-AMP板。

[0141] 首先,向20mL 500mM FeCl₂溶液中加入2mL罗丹明溶液。加入20mL 500mMAMP溶液后,将混合溶液在室温下在涡流混合器上混合1小时。在收集其中负载有罗丹明的Fe-AMP自组装复合物时,将混合溶液以12,000rpm离心10分钟,并丢弃上清液。为了除去未反应的试剂,将400mL DI水加入40mL负载罗丹明的Fe-AMP自组装复合物中,然后以12,000rpm离心10分钟。此过程重复四次。

[0142] 随后,将负载罗丹明的Fe-AMP自组装复合物在37℃的烘箱中干燥5天。收集干燥的自组装复合物并使用研钵研磨。使用手动压机,将约10mg自组装复合物压入2D Fe-AMP板(直径13mm,高度1mm)中。

[0143] 将2D板置于PBS溶液中,然后施加磁场以观察板。使用光学荧光显微镜(Nikon Eclipse Ts2) 观察2D板根据永磁体的位置的移动以及通过添加1mL去离子水引起的2D板的自解体。

[0144] 6.2D Fe-AMP细胞片的制备

[0145] 进行了在2D Fe-AMP上培养细胞的实验。

[0146] 在接种细胞之前,将上述实验5中制备的2D Fe-AMP板切成块并放入48孔细胞培养板中。将细胞培养板置于50 μ L高糖DMEM(Dulbecco的改良eagle培养基)培养基中,该培养基含有10%热灭活胎牛血清、4mM L-谷氨酰胺和50U/mL青霉素/链霉素,并在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂条件下培养24小时。培养基每8小时更新一次。

[0147] 随后,将人骨髓间充质干细胞(hMSCs,Lonza,PT-2501,第5代)以约 2×10^5 个细胞/cm²的密度接种在20个Fe-AMP板上并培养48小时,然后收集2D Fe-AMP细胞板(2D Fe AMP板,其上附着有细胞)。将如此收集的2D Fe-AMP细胞板翻转并置于PBS溶液中。在将2D Fe-AMP细胞板置于1mL的在DI水中含有1M EDTA的溶液之后,2D Fe-AMP细胞板立即自解体,这通过光学荧光显微镜(Nikon Eclipse Ts2)观察到。

[0148] 7.制备3D Fe-AMP骨支架

[0149] 采用聚(甲基丙烯酸甲酯)(PMMA)浸出法合成3D Fe-AMP大孔骨支架。

[0150] 首先,将300mg PMMA(直径125~150 μ m;Bangs Laboratories,BB05N)填充在圆柱形聚乙烯模具(直径8mm)中。向模具中加入200 μ L的在DI水中含有2M FeCl₂的溶液,然后在涡流混合器上轻柔混合5分钟。将含有所得混合物的模具密封并在25 $^{\circ}$ C下保持一天。

[0151] 之后,将3D Fe-AMP聚集体从模具中分离,并在振荡条件(100rpm)下浸入50mL二氯甲烷(DCM)中3天,以沥滤PMMA。DCM每24小时更新一次。3天后,将3D Fe-AMP聚集体浸入50mL DI水中30分钟,然后干燥。

[0152] 将3D Fe-AMP聚集体切割至1至1.5cm的高度,并在其用于骨愈合治疗之前通过UV辐射消毒30分钟。

[0153] 8.阿霉素释放实验

[0154] 进行了阿霉素释放实验,以评估自组装复合物的物质递送性能。制备FeCl₂、ATP、ADP或AMP在DI水中的溶液(各自具有100mM的相同浓度),用于分别合成含有阿霉素(Boryung Pharmaceutical,Adimycin,Item Standard Cod:199001007)的Fe-ATP、Fe-ADP、Fe-AMP或Fe-(ATP+AMP,1:1)自组装复合物。

[0155] 将2mL的100mMATP(或ADP/AMP/ATP+AMP)溶液和2mL的100mM FeCl₂溶液添加到6mL的阿霉素溶液(浓度为2g/L)中,然后在涡流混合器上混合。为了除去未反应的试剂,丢弃上清液,并加入去离子水。然后将剩余的溶液离心两次。

[0156] 洗涤后,收集Fe-ATP、Fe-ADP、Fe-AMP或Fe-(ATP+AMP,1:1)自组装颗粒,并将其分散在1mL PBS溶液(pH 7.4)中。将分散的溶液转移到透析袋(SnakeSkinTM Dialysis Tubing,7kDa MWCO)中。将含有Fe-ATP、Fe-ADP、Fe-AMP或Fe-(ATP+AMP,1:1)自组装复合物的透析袋置于小瓶中,并向小瓶中加入4mLPBS溶液(pH 7.4)至总体积为5mL。在第1、3和7天,从具有含有Fe-ATP、Fe-ADP、Fe-AMP或Fe-(ATP+AMP,1:1)自组装复合物的透析袋的小瓶中取出上清液,并测量释放的阿霉素的浓度。

[0157] 如有必要,向小瓶中添加额外的PBS溶液以保持总体积为5mL。通过0.5 μ m注射器过滤器(Advantec)过滤样品溶液,并通过UV-Vis光谱法分析上清液。

[0158] 9.实验成分

[0159] 上述实验中使用的物质如下。

[0160] ATP:腺苷5'-三磷酸二钠盐水合物(99%,Sigma-Aldrich,5g,目录号A26209)

[0161] AMP:腺苷-5'-单磷酸二钠盐(J61643,AlfaAesar)

[0162] ADP:腺苷5'-二磷酸钠盐(A2754,Sigma-Aldrich)

[0163] FeCl_2 :氯化铁(II)(97%,Sigma-Aldrich,25g,目录号372870)

[0164] EDTA:乙二胺四乙酸(EDTA,99.5%,Junsei,500g,目录号17385S0401)

[0165] 罗丹明:罗丹明6G(CAS:989-38-8,Sigma-Aldrich)

[0166] PMMA:PMMA(直径125至150 μm ;Bangs Laboratories,BB05N)

[0167] 阿霉素:Boryung制药,阿迪霉素(Item Standard Cod:199001007)

[0168] [实验例]

[0169] 1.形态学分析

[0170] 图2、图3和图4是分别分析Fe-AMP、Fe-ADP和Fe-ATP自组装复合物的形状和组分的图。对铁(Fe)和磷(P)元素进行EDS绘图。

[0171] 图2上部的SEM图像显示Fe-ATP自组装复合物具有均一的尺寸。如TEM和EDS图像所示,复合物含有铁(Fe)和磷(P)元素(在图2的右下部),也以1:1的比率含有铁离子(Fe^{2+})和ATP。

[0172] 图3是Fe-ADP自组装复合物的图,显示该复合物含有铁(Fe)和磷(P),并且以1:1的比率含有铁离子和ADP。从TEM和EDS图像可以看出,自组装复合物有少量三维聚集体。

[0173] 图4是Fe-AMP自组装复合物的图,显示该复合物包含铁(Fe)和磷(P),并且以1:1的比率包含铁离子和AMP。然而,根据TEM和EDS图像,自组装复合物存在大量三维聚集体。

[0174] 2.观察自组装和自解体

[0175] 观察到铁离子和配体的自组装和自解体,其中配体是ATP。

[0176] 参照图5,由于铁离子和ATP自发自组装,自组装颗粒在约3分钟内开始出现,并且自组装复合物在10分钟内快速形成。参照图6,在EDTA的条件下自组装复合物解体,并在10秒内全部消失。

[0177] 3.分析作为尺寸函数的自组装复合物的性质

[0178] 参考图7,通过调节铁离子和ATP的浓度来制备其尺寸变化的自组装复合物,然后分析其性质。不同尺寸的Fe-ATP自组装复合物显示出不同的磁性(顺磁性),并在施加磁场中以不同的速度移动。图8显示了Fe-ADP自组装复合物的可逆磁性(顺磁性)。

[0179] 根据图7的SEM图像,球形自组装复合物的尺寸随着铁离子和ATP浓度的增加而增加。但是,当铁离子和ATP浓度恒定时,自组装复合物的尺寸几乎恒定。从VSM测量结果可以看出,磁矩随着自组装复合物尺寸的增加而增加。

[0180] 此外,自组装复合物的尺寸越大,自组装复合物被永磁体吸引的速度越快。这是因为磁矩随着自组装复合物尺寸的增加而增加。

[0181] 参考图9、图10和图11,自组装复合物或其结构在施加永磁体的方向上移动,这意味着自组装复合物是顺磁性的。图10给出了Fe-AMP的2D板结构的实验结果,显示2D板在施加的磁场中旋转。图11显示了Fe-AMP的3D支架结构的实验结果,显示3D支架结构是顺磁性的,而与自组装复合物的形状和尺寸无关。

[0182] 图12提供了显示自组装复合物被吸引到永磁体的速度的比较的图像,其中自组装复合物具有1.5 μm 、2 μm 、3 μm 或3.5 μm 的尺寸。当比较尺寸差异最大的1.5 μm 和3.5 μm 的自组装

复合物之间的移动速度时,3.5 μm 尺寸的自组装复合物的移动速度至少是1.5 μm 尺寸的自组装复合物的两倍高。从该结果可以看出,磁矩随着自组装复合物尺寸的增加而增加。

[0183] 4. 作为MRI造影剂的性能

[0184] 进行实验以评估Fe-ATP自组装复合物作为MRI造影剂的性能。实验结果示于图13中。实验在Fe-ATP和Fe-ATP+EDTA的条件下进行,其中用水作为对照。

[0185] 在T1图像中未观察到Fe-ATP自组装复合物,但在T2图像中显示出MRI信号。在EDTA存在下,自组装复合物解体,导致图像中没有T2信号。在没有EDTA的情况下,自组装复合物显示出铁和ATP作为T2造影剂的性能。

[0186] 参照图13,示出了将自组装复合物注射到小鼠中,与对照(箭头所指绿色圆圈)相比,含Cy5.5的自组装复合物(箭头所指红色圆圈)导致T2图像出现。因此,证实了自组装复合物在体内稳定地起作用。

[0187] 5. 体内自组装复合物性质的评估

[0188] 在体内注射自组装复合物后,外部施加磁场以评估自组装复合物的磁性。结果示于图14中。这里,自组装复合物的配体是ATP,并使用全身荧光显微镜拍摄图像。从图像中,红色部分(中间深色部分)表示自组装复合物的位置,可以看出自组装复合物随着逐渐向永磁体移动而扩散。因此,可以通过外部施加磁场来控制体内自组装复合物的作用位点。

[0189] 图15和图16显示了在体内自组装复合物解体的实验。实验使用Cy5包封的Fe-ATP自组装复合物在有和没有EDTA的条件下进行。Fe-ATP复合物仅在EDTA注射存在下随着自解体而扩散(图15)。根据注射了Fe-ATP复合物的小鼠的生物发光图像,尽管无论EDTA是否存在都显示出荧光,但由于Fe-ATP自组装复合物的分散,在注射EDTA的条件下在更宽的范围内观察到荧光的出现(图16)。

[0190] 图17显示了在EDTA注射条件下经历快速自解体的含罗丹明的Fe-AMP自组装复合物的二维板结构。在EDTA注射后约1分钟自组装复合物大部分解体,并在注射后5分钟消失。

[0191] 6. 药物递送实验

[0192] 对自组装复合物中负载的药物的释放进行了实验。实验过程和结果示于图18至图21中。

[0193] 图18和图19显示了使用阿霉素的实验的示意图和结果。示意图显示了在铁离子和配体的自组装过程中,负载的阿霉素渗透到自组装复合物的致密结构中。图19是显示根据配体类型的阿霉素释放时间的曲线图。除配体类型以外的条件都是相同的。最紧密堆积的Fe-AMP复合物中阿霉素的累积释放量最少,而最松散堆积的Fe-ADP复合物中的阿霉素释放最快。因此,可以通过调节配体的类型来控制药物在体内的释放时间。

[0194] 图20和图21示出了使用曲安奈德的实验的示意图和结果。随着自解体的进展,自组装复合物释放曲安奈德,导致药物的累积释放量甚至在约70天后增加,这可以从图中看出。

[0195] 对于本发明的本领域技术人员明显的是,在不脱离本发明的构思或基本特征的情况下,许多修改和变化是可能的。因此,上述实施例仅被解释为说明性的,而非限制本发明。本发明的范围由后附权利要求而不是本发明的详细描述来限定,并且应当被解释为包括从权利要求及其等同物的含义和范围导出的所有改变或变型。

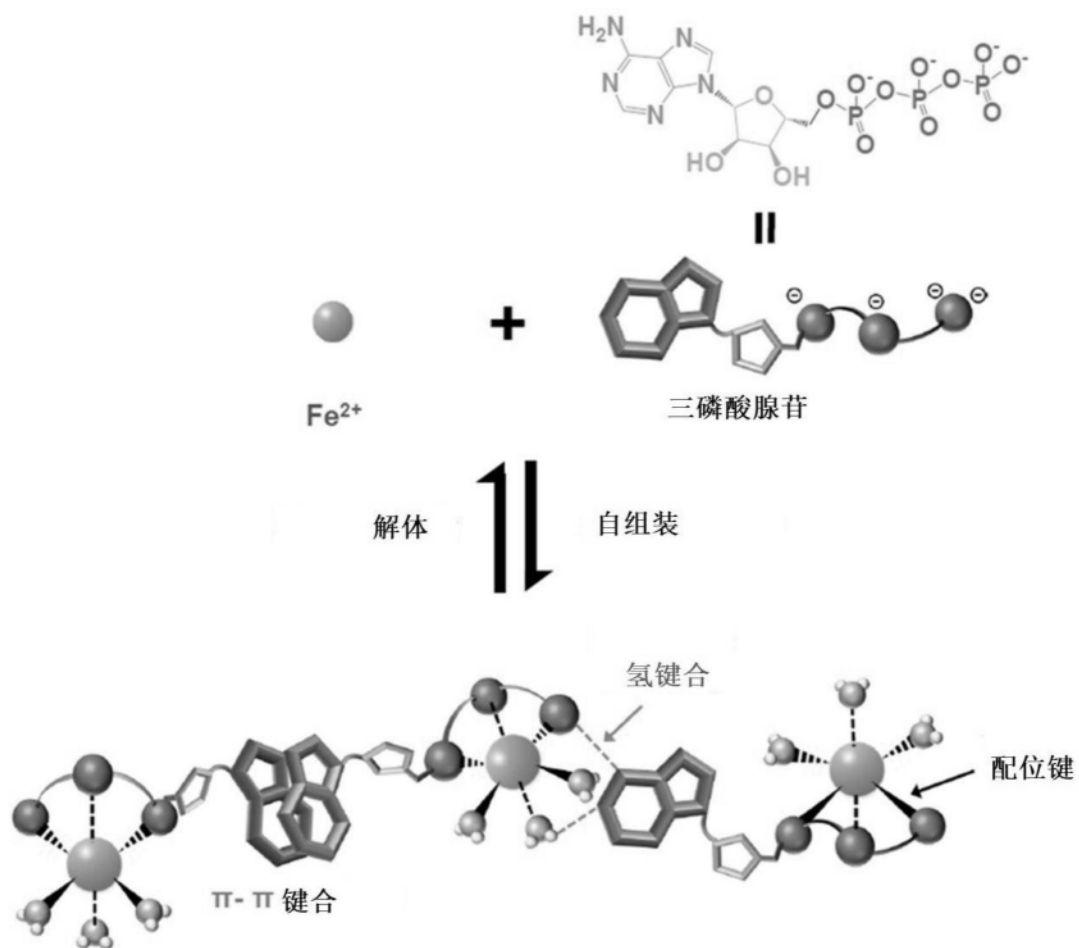


图1

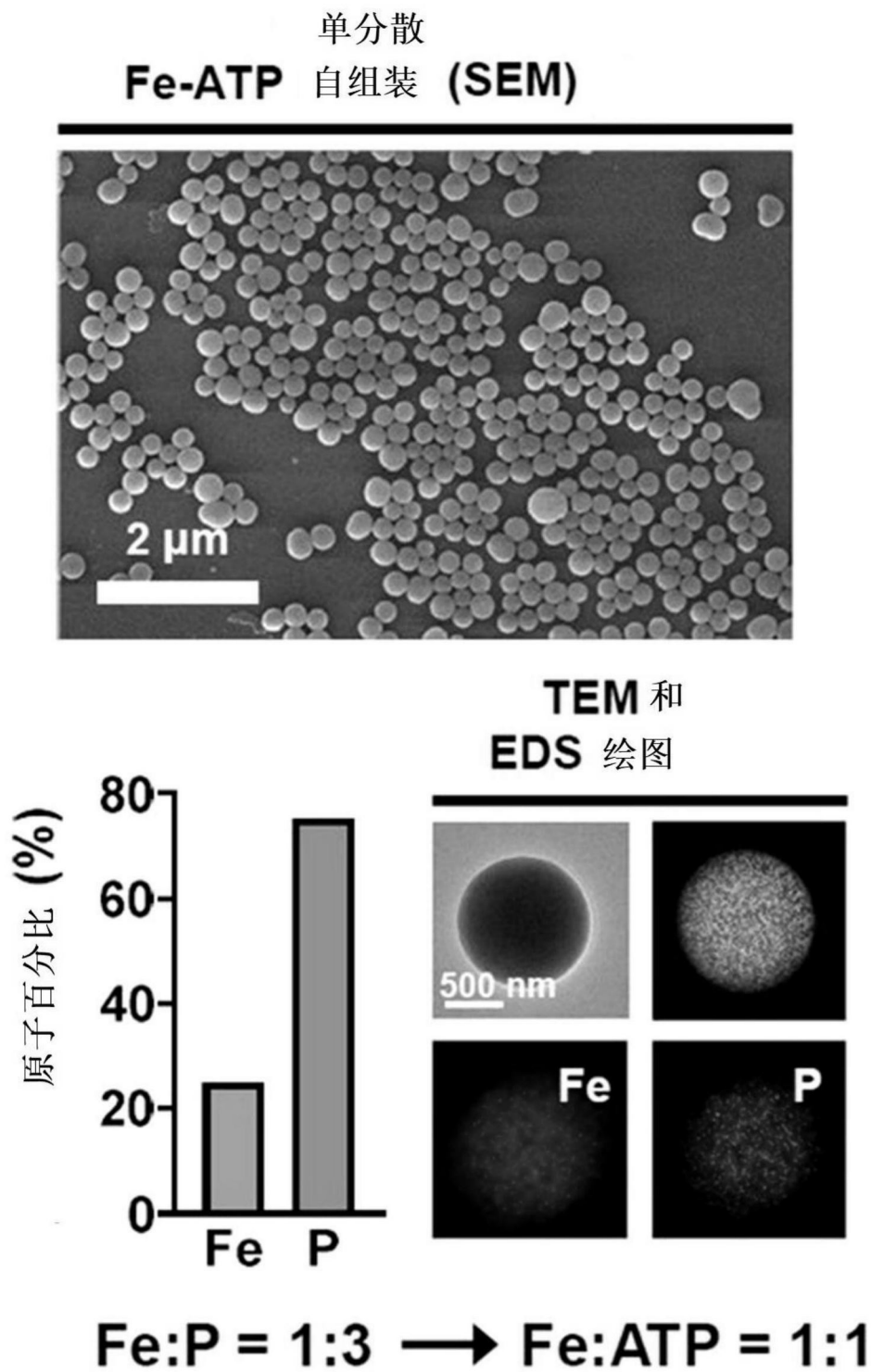


图2

TEM 和 EDS 绘图 Fe-ADP 自组装

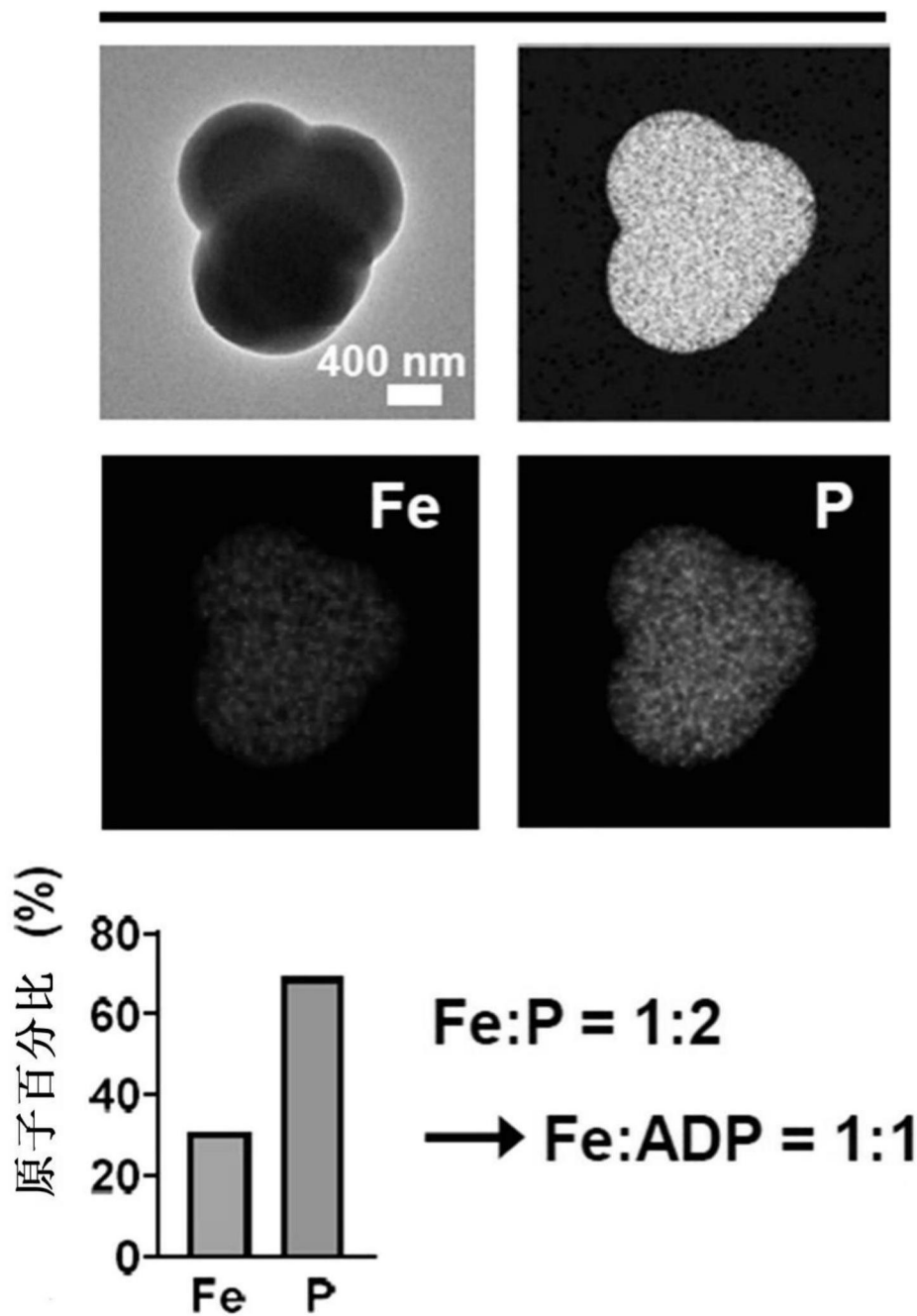
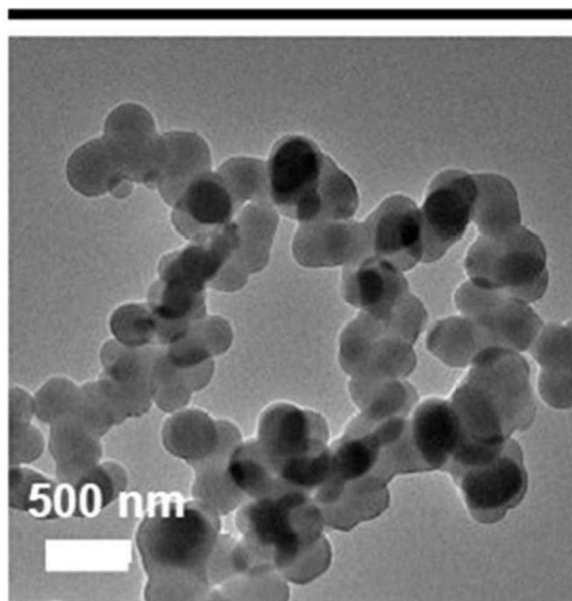
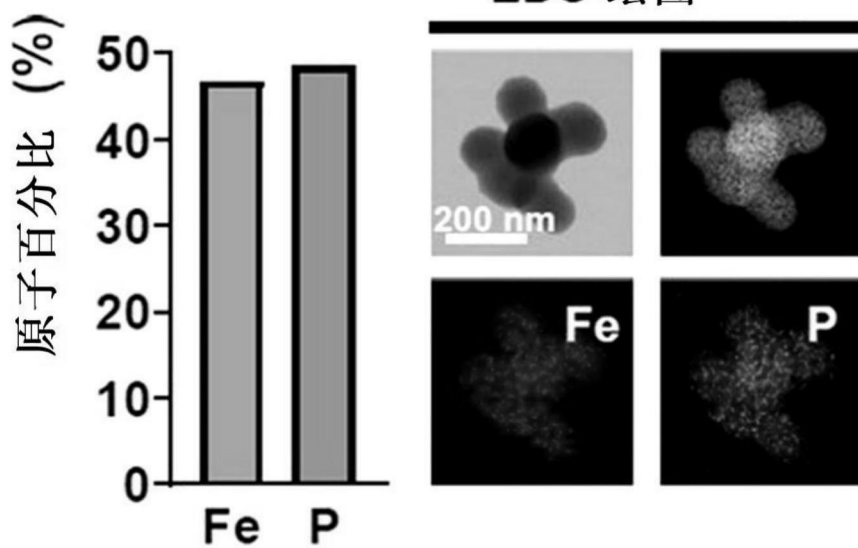


图3

聚集的
Fe-AMP 自组装



TEM 和
EDS 绘图



$\text{Fe:P} = 1:1 \rightarrow \text{Fe:AMP} = 1:1$

图4

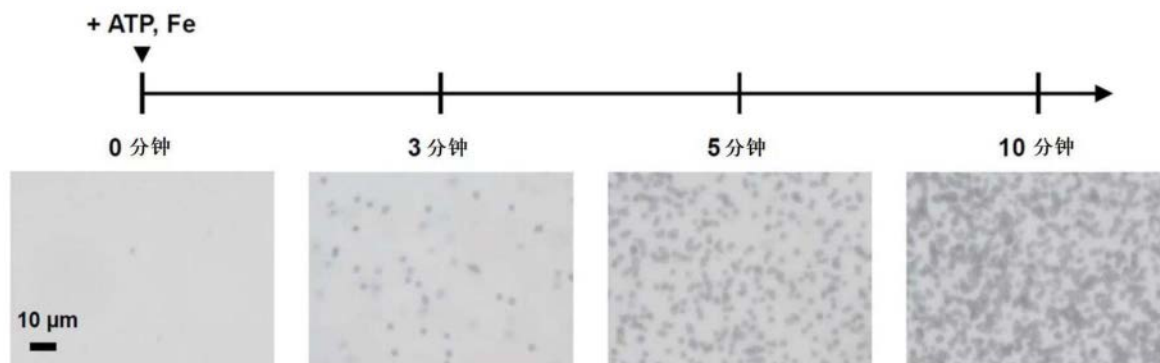


图5

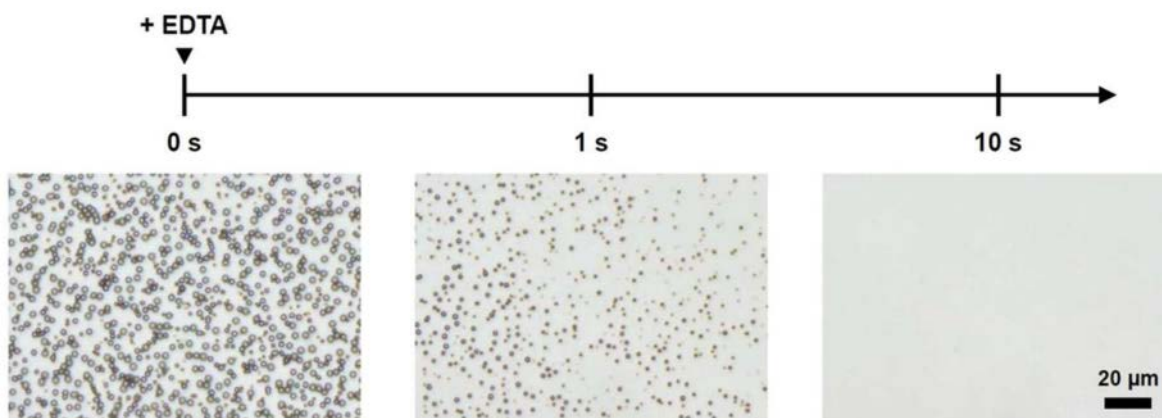


图6

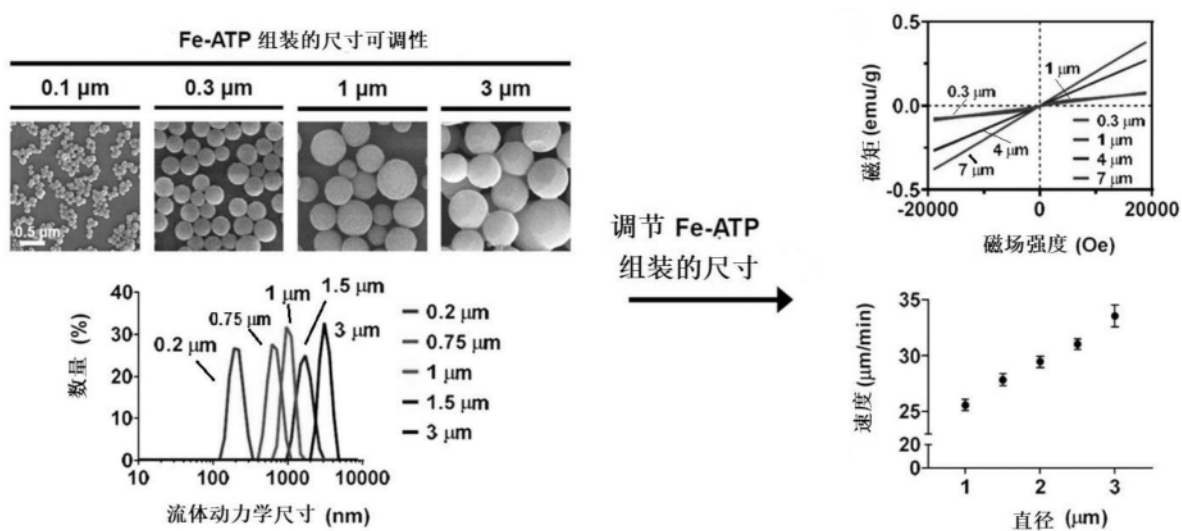


图7

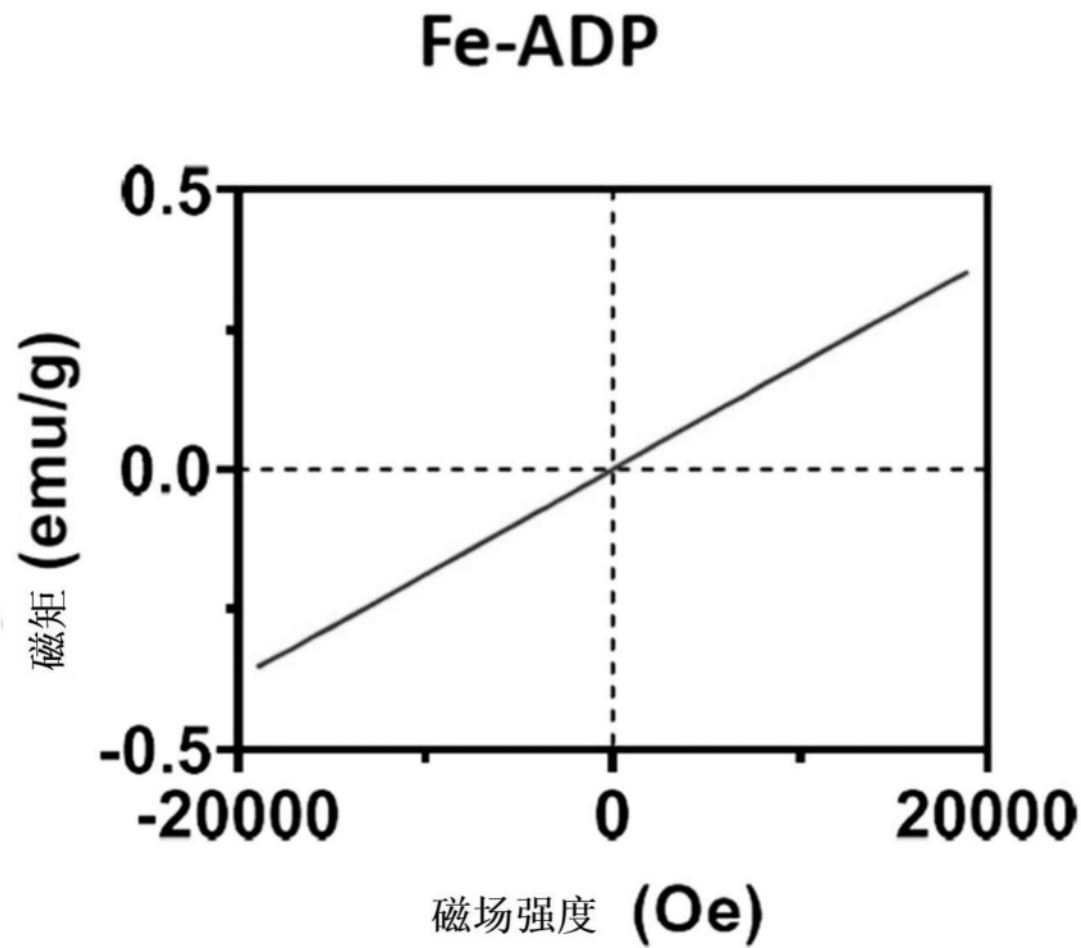


图8

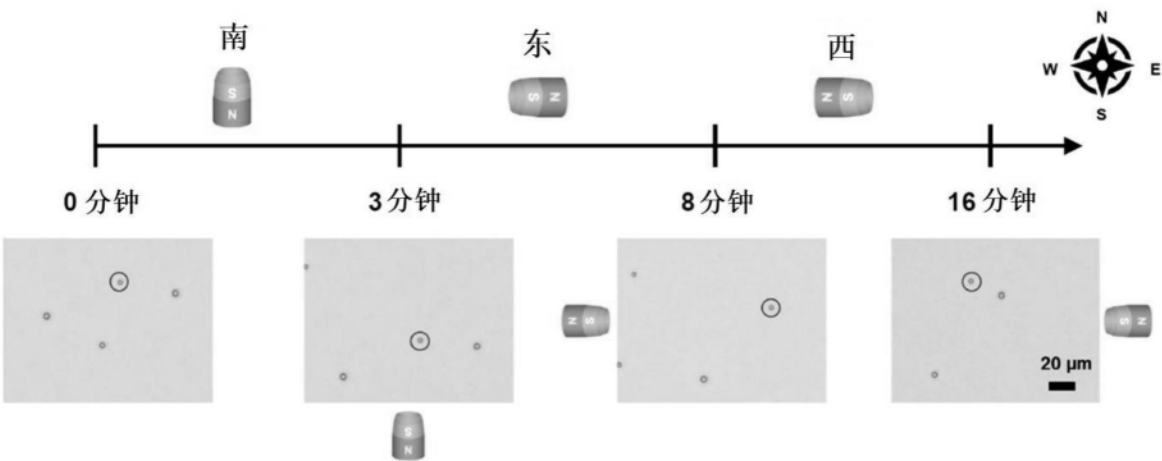


图9

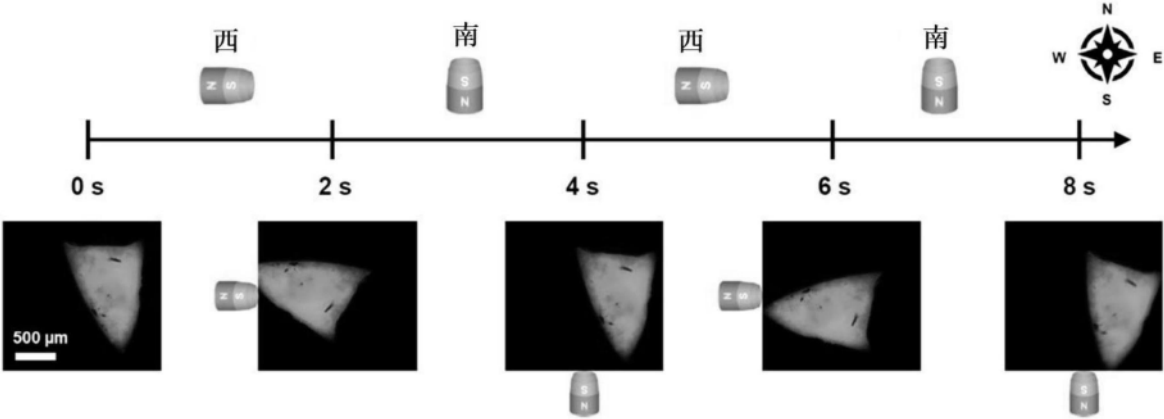


图10

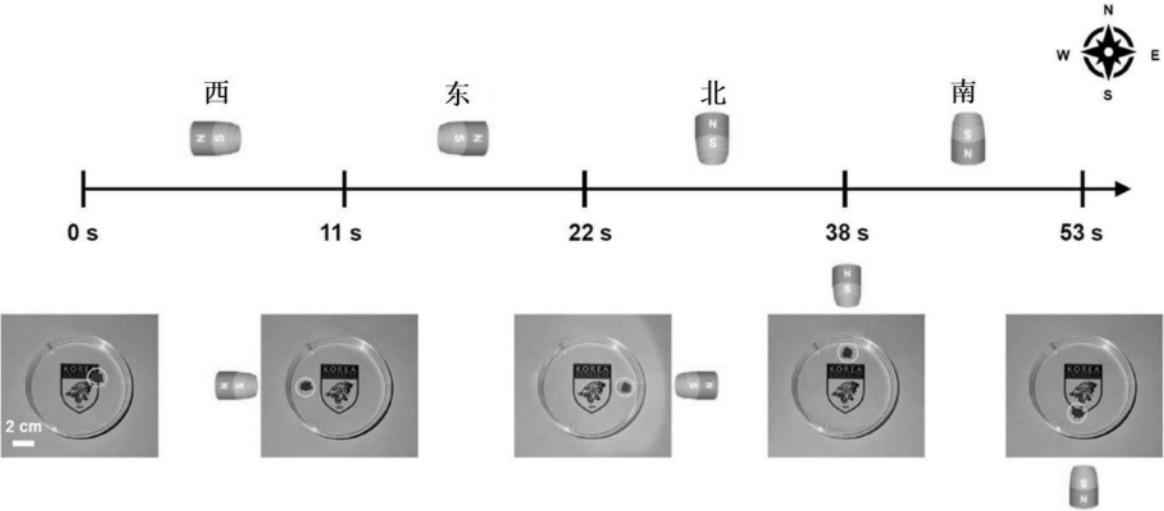


图11

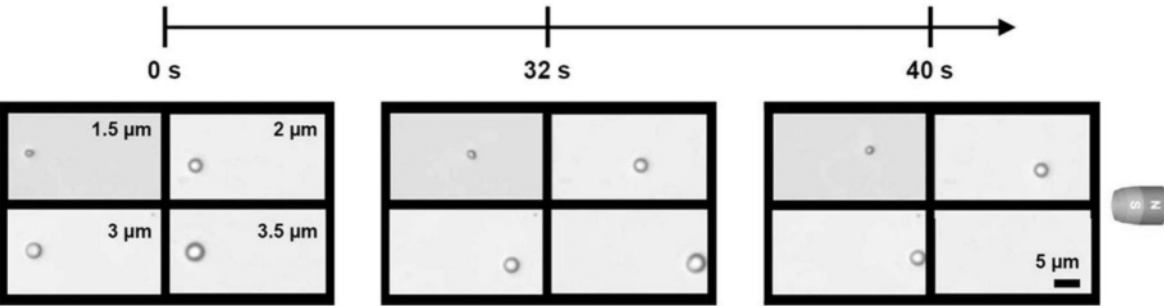


图12

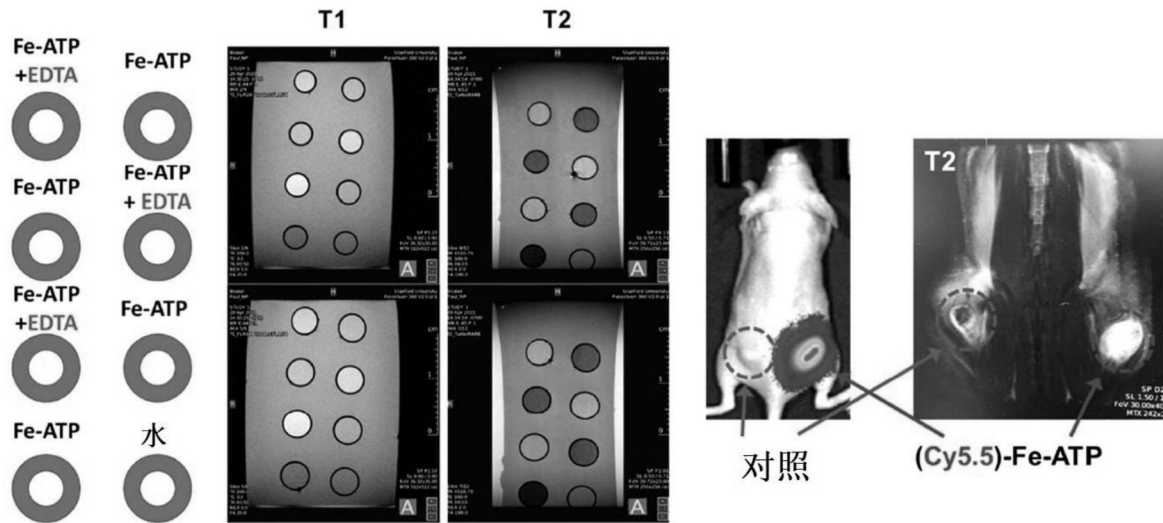


图13

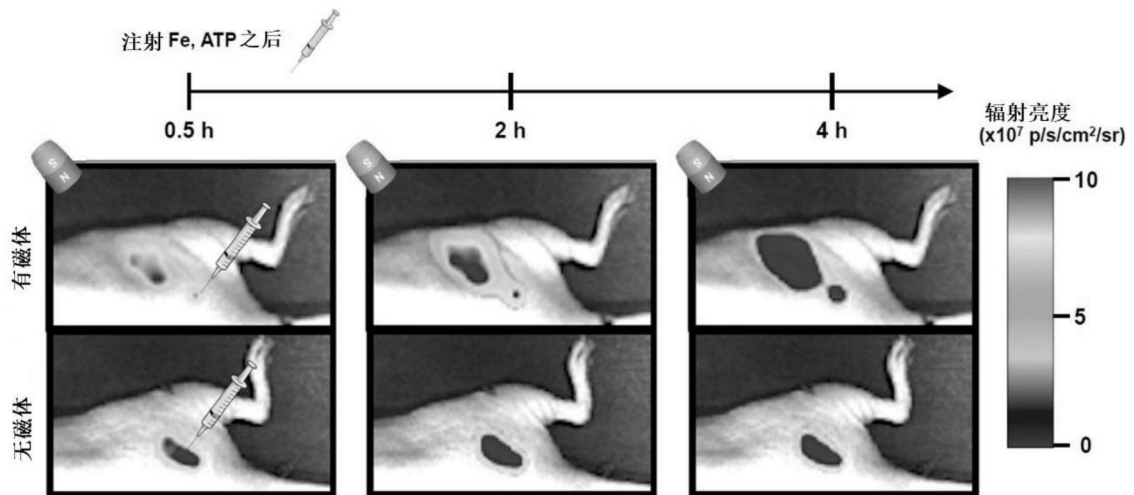


图14

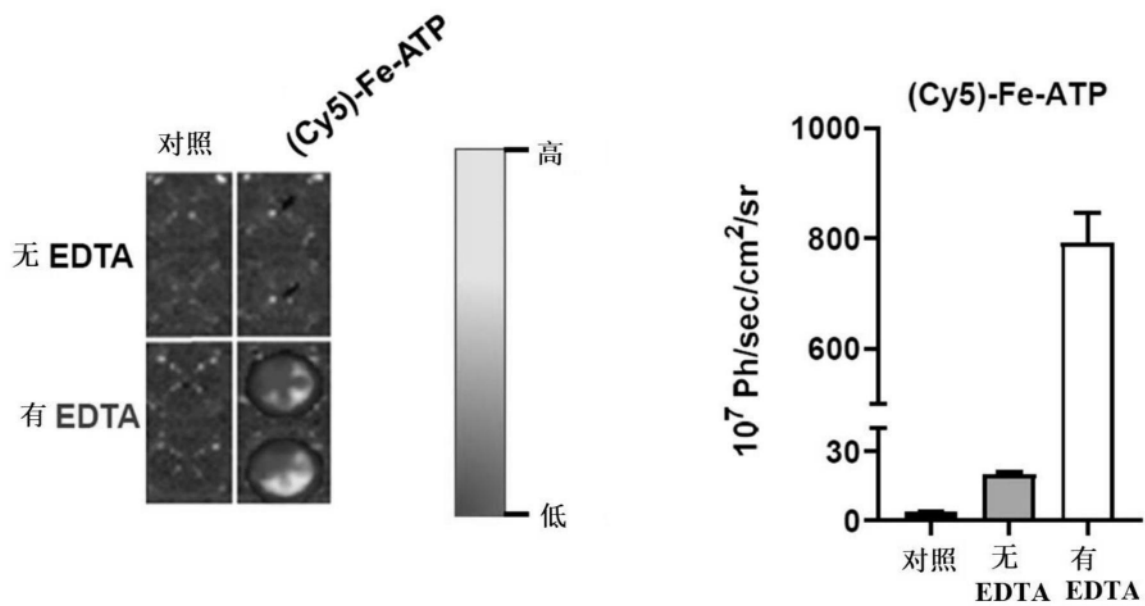


图15

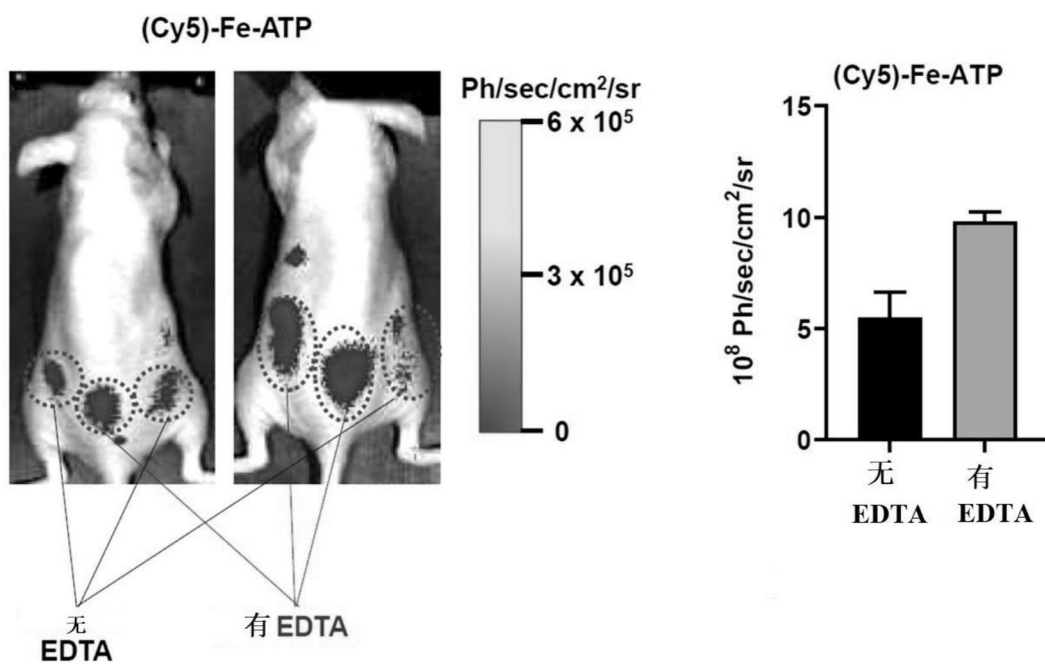


图16

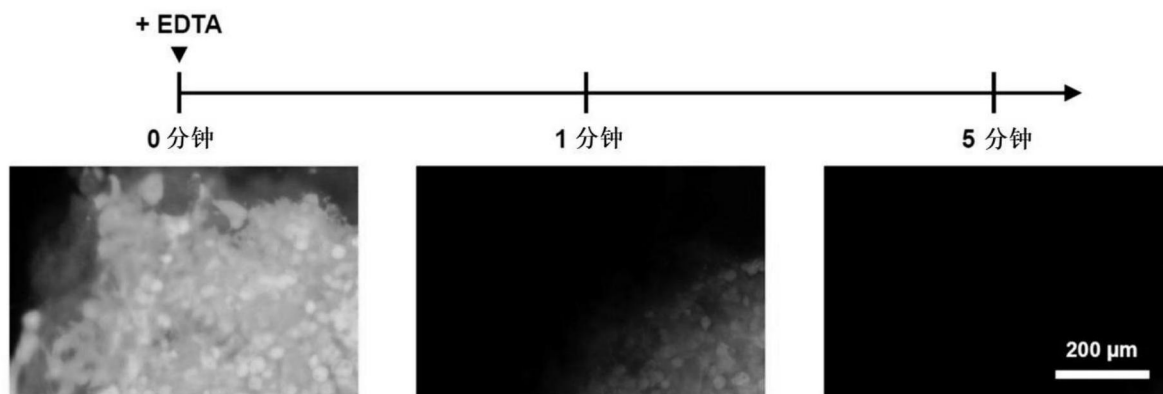


图17

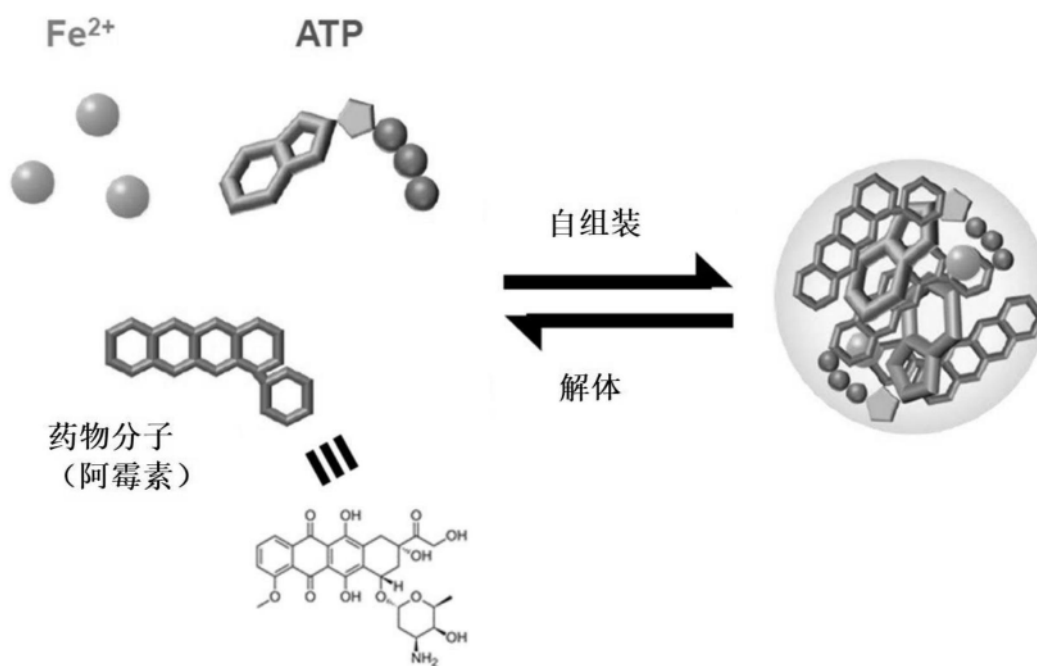


图18

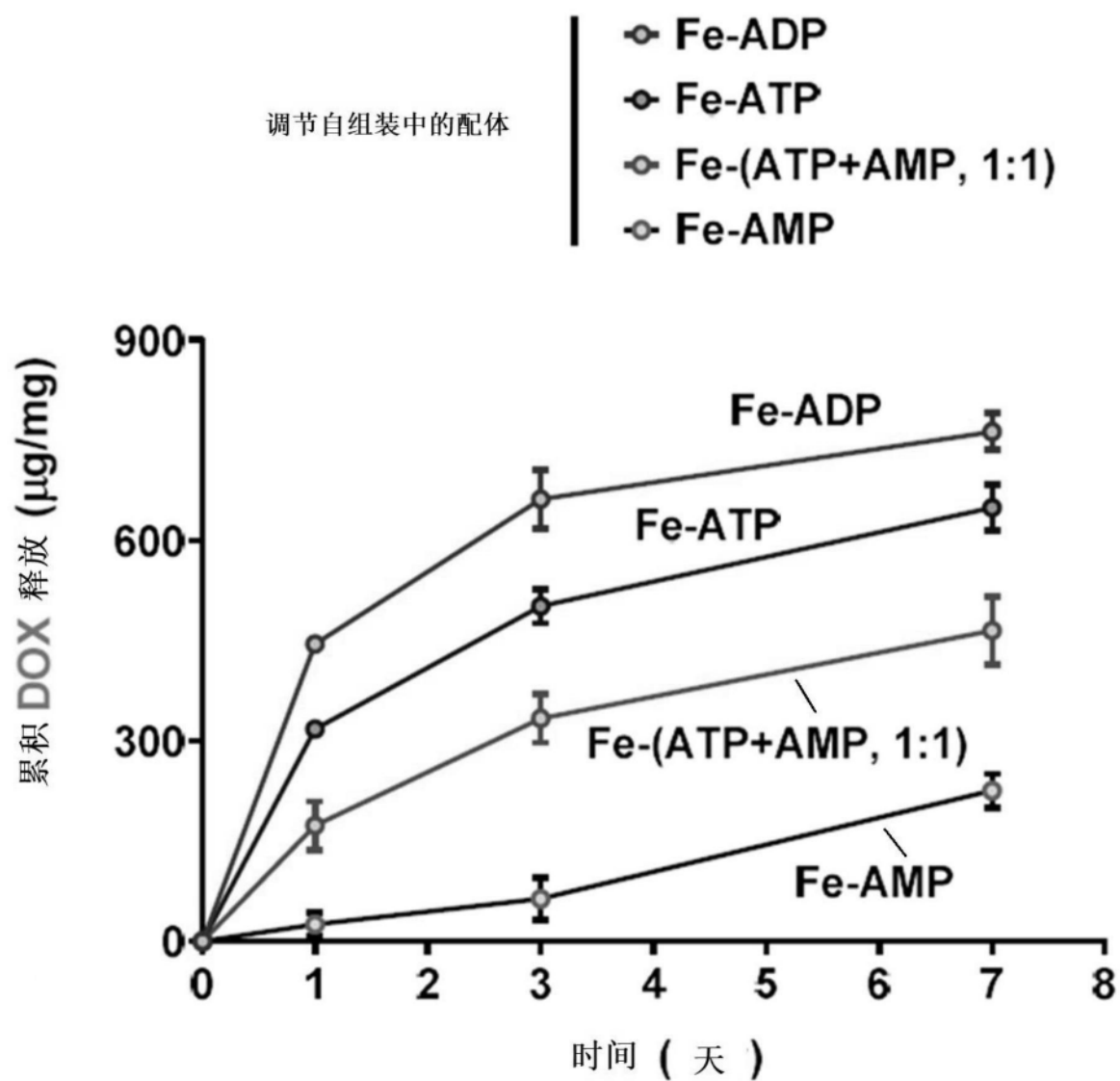


图19

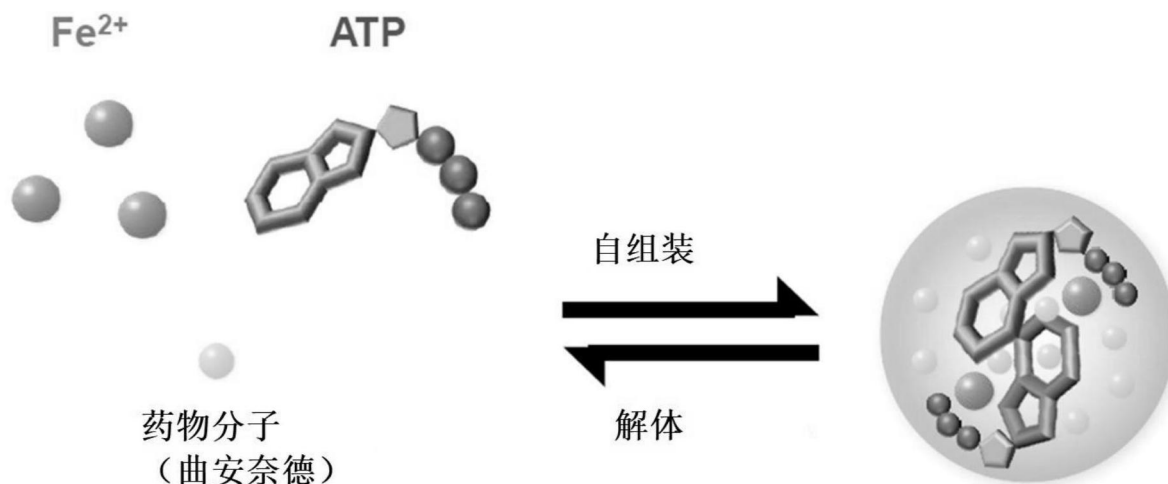


图20

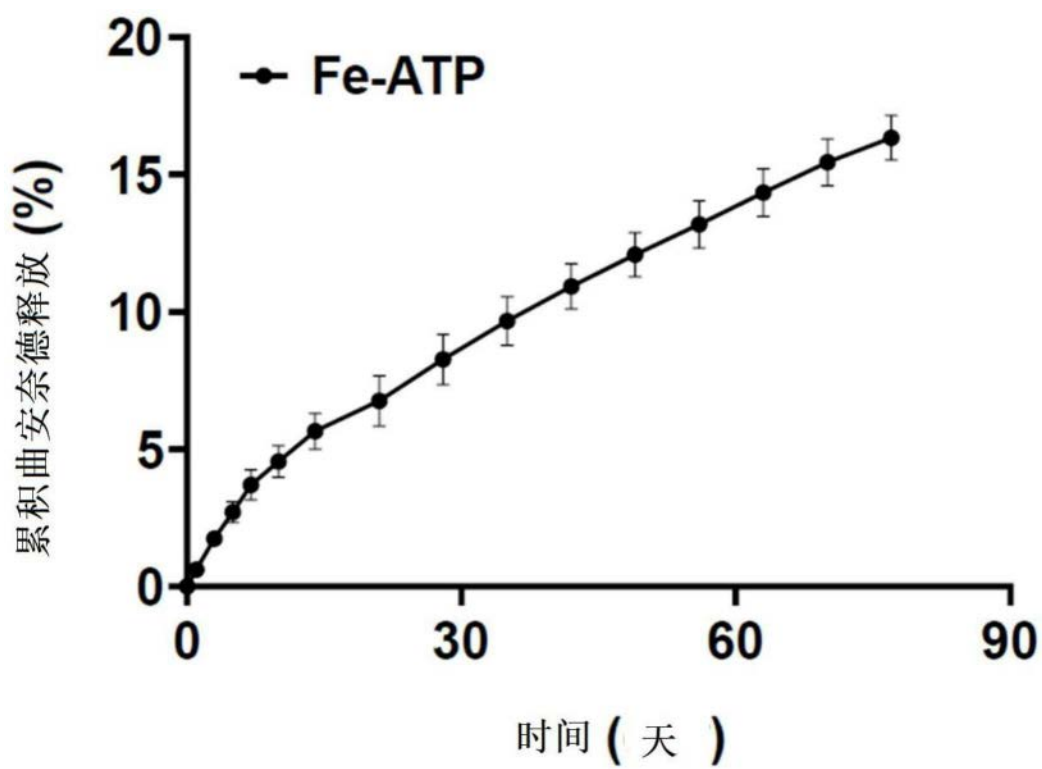


图21