



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0149181
(43) 공개일자 2016년12월27일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 31/352</i> (2006.01) <i>A61K 47/48</i> (2006.01)
 <i>A61K 9/00</i> (2006.01) <i>A61K 9/51</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 31/352</i> (2013.01)
 <i>A61K 47/482</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2016-0173983(분할)
 (22) 출원일자 2016년12월19일
 심사청구일자 2016년12월19일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2014-0158669
 원출원일자 2014년11월14일
 심사청구일자 2014년11월14일</p> | <p>(71) 출원인
 한림대학교 산학협력단
 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)</p> <p>(72) 발명자
 이상수
 강원도 춘천시 지석로 97, 109동 1402호 (석사동, 현진에버빌1차)</p> <p>남주석
 강원도 춘천시 마장길 58, 103동 1002호 (사농동, 춘천 롯데캐슬 더 퍼스트 1단지)</p> <p>(74) 대리인
 김지형</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 2 항

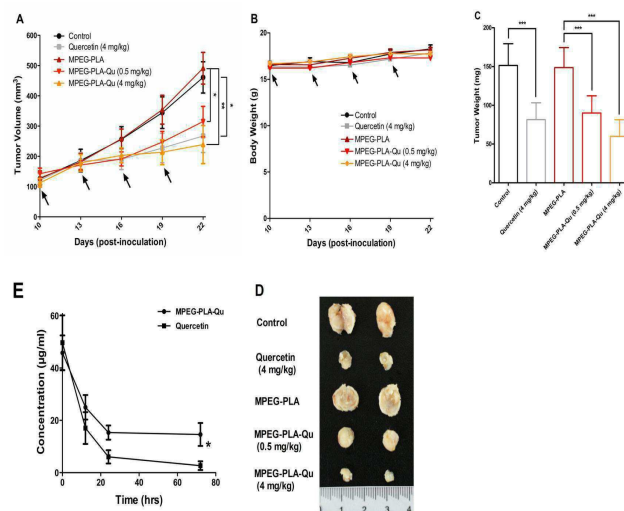
(54) 발명의 명칭 **퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는, 퀘세틴 또는 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노입자인 것을 특징으로 하는 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

또한, 본 발명은 바이오플라보노이드인 퀘세틴과 MPEG-PLA 나노제형에 캡슐화되어 제조된 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 암조직주변으로 주입하여 암조직의 성장을 억제하는 효과가 있으며, 세포사를 유발시켜 유방암 치료제로서의 효과가 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)

A61K 9/51 (2013.01)

A61K 9/5192 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A121370

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 골형성 유도능 향상을 위한 나노캡슐화 플라보노이드의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.11.01 ~ 2015.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조방법에 있어서,

상기 유방암 치료 조성물의 제조방법은 퀘세틴 또는 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴(MPEG-PLA-Qu) 나노입자를 제조하는 것으로 상기 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴(MPEG-PLA-Qu) 나노입자는,

메톡시폴리에틸렌글리콜, 퀘세틴을 1.8 ~ 2.2 : 0.9 ~ 1.2의 중량비율로 아세토나이트릴 0.09 ~ 0.12의 중량비로 혼합하여 녹이는 단계;

상기 녹인 유기 용제를 수성용제에 녹여 3 ~ 4시간 녹이고 유기 용제를 증발시키는 단계;

상기 유기 용제가 증발된 것을 1500rpm에서 1시간 원심분리하여 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 얻는 단계; 및

상기 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 동결건조하여 보관하는 단계; 로 구성하되,

PEG-PLA 블록 공중합체(sigma-Aldrich)(MPEG-PLA block copolymer)는 퀘세틴을 캡슐화하기 위한 공중합체로 사용하였으며,

상기 공중합체는 2종 이상의 단량체로 형성된 폴리머로 코폴리머 분자의 일부분으로 다수의 구성 단위로 형성되고, 인접하는 다른 부분과 화학 구조상 혹은 입체 배치상 다른 것을 블록이라고 하며, 복수의 블록이 선상으로 연결하여 구성된 폴리머가 블록 중합체이며, 그 중 2 종류 이상의 단량체로 형성된 것을 블록 공중합체라 하고,

상기 PEG-PLA 블록 공중합체인 MPEG-PLA 10mg과 퀘세틴 5mg을 1ml의 아세토나이트릴(acetonitrile)에 녹인 후 상기 유기 용제를 수성인 0.25% pluronic F-68(sigma-Aldrich)에 한 방울씩 떨어뜨리고 1시간 동안 잘 휘저어 섞어준 다음, 나노제형이 잘 분산될 수 있도록 3 ~ 4시간 동안 휘저어 섞어주면서 남아있는 유기 용제를 증발시키고, 1500rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 얻은 후 이것을 3차 증류수로 3번 세척한 후, 동결건조하여 보관한 다음, 퀘세틴이 포함되어 있지 않은 MPEG-PLA 나노제형을 제조한 다음, MPEG-PLA-Qu 나노제형 제조에 있어 10 μ g의 Nile red 단독으로 또는 퀘세틴과 동시에 10mg의 MPEG-PLA과 섞어 Nile red가 포함된 나노제형을 제조하는 것을 특징으로 하는 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조방법

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 퀘세틴 및 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 종양부근주사법으로 유방암을 예방 및 치료하는 것을 특징으로 하는 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조방법

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는, 퀘세틴 또는 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노입자인 것을 특징으로 하는 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 유방암은 전세계적으로 발생하는 암중에 두번째로 많이 발병하는 질환이다. 세계 보건기구에 따르면 2012년 거의 1백 60만건에 육박하는 새로운 유방암 사례들이 보고되었고, 이 중 사망한 사례는 552,000건에 이르는 것으로 보고되었다. 현재의 전 세계의 여성들 사이에서 유방암의 발병율은 증가하는 추세이고, 외과수술, 화학요법, 방사선치료, 호르몬치료 등과 같은 기존의 치료방법의 부작용을 줄인 새로운 chemopreventive formulations과 표적치료(targeted therapy)가 요구되고 있다.
- [0004] 퀘세틴(Quercetin; 3,5,7,3',4'-pentahydroxy flavone)은 야채나 과일로부터 얻을 수 있는 가장 널리 알려진 바이오플라보노이드 중의 하나이다. High number of hydroxyl groups and conjugated p-orbital를 갖고 있어 퀘세틴을 강력한 free-radical scavenging 항산화 물질로 보고있다. 게다가 퀘세틴은 염증, 죽상경화증, 출혈, 알러지, 부종 등에 효능이 있는 것으로 보고되었다.
- [0005] 최근 퀘세틴은 정상세포나 비형질전환세포에 비해 암세포에서 항증식작용 또한 밝혀져 떠오르는 항암물질로 주목을 받고 있다. 현재까지 알려진 항암효과로는 암세포의 세포사 유도, 암세포의 항암제 저항성의 억제, 암세포 증식 억제, 혈소판 응집 억제를 통한 암전이 억제 등이 있다. 이러한 유망한, chemopreventive agent로서의 퀘세틴의 적용은 퀘세틴이 가지는 지용성의 성질로 인해 그 쓰임에 제한적이다. 선행 연구들은 생체내에서의 짧은 퀘세틴의 반감기 역시 보고한 바 있다. 이러한 제한점들은 퀘세틴을 생분해성 복합체 안에 캡슐화 함으로써 수용성의 약품을 만드는 것으로 극복할 수 있다.
- [0006] 지난 십수년간 지용성의 항암제의 수용성, 항암작용의 효율성, 암특징적 작용성, 약물전달력과 방출 조절을 향상시키기 위하여 다양한 생분해성 복합체들이 캡슐화에 사용되었다. 몇몇의 생분해성 복합체에 캡슐화된 의약품들이 임상실험 중이거나 이미 시판되었다. Polylactic acid(PLA)는 미 식품의약국이 승인한 생분해성 복합체로 소수성 항암제를 캡슐화하는 연구가 널리 진행중이다. PLA는 에스테르 결합 절단을 통해 무독성의 hydroxyl-carboxylic acid로 가수분해되고, 시트르산 회로를 거쳐 결과적으로 물과 이산화탄소로 대사작용된다. 퀘세틴이 캡슐화된 PLA 나노입자를 제조하는 것은 이미 제안되었다. PLA가 갖고 있는 여러 장점에도 불구하고, PLA 나노입자는 전신 주입 후 순환계에 의해서 빠르게 사라지기 때문에 약물에 대해 기대했던 효과가 줄어들었다. 나노입자의 표면을 조절하여 혈류에서 망상내피계(reticuloendothelial system, RES)에 의한 PLA 캡슐화된 약물이 제거를 피할 수 있다는 것이 예전에 보고된 바 있다.
- [0007] PLA와 polyethylene glycol(PEG)를 공중합하여 친수성(hydrophilicity), 유연성(flexibility), 대식세포에 대한 항식균작용(antiphagocytosis), 면역인식에 대한 저항성, 단백질과의 비결합 그리고 나노입자의 생결합성을 향상시키는 것이 정립되어있다. 게다가 PLA 복합체의 PEGylation은 음성의 나노입자 표면을 중성으로 변환 시킬 수 있으며, Polymeric 나노입자와 세포막의 결합을 용이하게 하고, 종양세포에 보다 효과적으로 나노입자 안에 담긴 약물을 투여할 수 있다. 생체 내 분포 및 PEG로 도포된 나노입자의 흡수의 차이점은 입체 반발력(steric repulsion forces)에 기여하며, 이것은 옹소닌작용 메카니즘의 포식 세포특이적 옹소닌단백질 주도를 지연시켜 흡수를 방지한다. 따라서 유방암의 치료효과를 거두기 위해서는 PEG-PLA에 캡슐화된 퀘세틴 나노입자가 적합한 약물 전달 체계가 될 수 있도록 한다. 더욱이 또 다른 문제점은 낮은 약물표적화를 갖는 화학적 보호 제제와 연관이 있고, 약물의 종양 국소 부위의 종양부근주사(peritumoral injection)는 저농도일 경우 종양내에서 제거될 수 있다. 일찍이 연구들은 활성화된 타소입라즐 유방암의 국소적 화학요법을 사용하여 약물을 종양부근주사(peritumoral injection) 후 약물을 흡수시켜 종양주변 부근이나 림프절 내에 약물의 농도를 증가시키는 것을 제안해 왔다. 이러한 시도는 종양부위에 쉽게 접근할 수 있는 효과적인 방법으로 생각되었다. 또한 국부적으로 주사된 나노입자가 종양주변의 간극 공간(interstitial spaces)을 통해 침투하여 림프계에 서서히 흡수된 것으로 밝혀졌다. 따라서 약물이 담긴 나노입자의 종양주변영역을 통한 국소주사는 림프관을 표적으로 하고 암전이를 막는 좋은 방법으로 사용될 수 있다. 최근의 연구들은 퀘세틴 캡슐화 중합체의 항암성의 가능성에 대해 다양한 종류의 암세포주에서 분석되었다. 하지만 퀘세틴 캡슐화 중합체 나노입자 시스템의 유방암 억제에 대한 효과는 좀처럼 연구되지 않았다. 따라서 퀘세틴 캡슐화 중합체의 유방암 주변 주사에 의한 항암효과는 흥미로운 연구일 것이다.
- [0008] 국내등록특허공보 제10-0749957호(퀘세틴과 비타민 C 함유 항산화 조성물 및 이를 함유한 기능성 식품)는 퀘세틴과 비타민 C를 함께 사용함으로써 상승 효과를 얻을 수 있어 이를 통상의 유제품, 음료, 건강보조식품, 피부미용 팩, 의료용 밴드, 껌 등에 적용할 경우 자유 라디칼의 소거제(항산화제)로 사용하는 것에 관한 것으로, 상기 종래의 발명은 퀘세틴을 이용하여 항산화 조성물을 제조하는 것으로 치료 조성물로 사용하기에는 아쉬움이 있다.

[0009] 국내등록특허공보 제10-0790589호(암 치료용 조성물 및 치료방법)는 암의 치료 또는 예방에 사용될 수 있는 탈리도마이드 및 또 다른 항암 약물을 포함하는 조성물에 관한 것으로, 상기 종래의 발명은 퀘세틴을 이용하여 유방암을 치료 조성물로 사용하고 있지 않아 아쉬움이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) KR 10-0749957 B1 (2007. 08. 09)

(특허문헌 0002) KR 10-0790589 B1 (2007. 12. 24)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 상기의 문제점을 해결하기 위해 본 발명은 바이오플라보노이드인 퀘세틴과 퀘세틴을 MPEG-PLA 나노제형에 캡슐화하여 제조한 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 제조하여 종양부근주사하여 효과적인 유방암 치료제를 제공하는 데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서 본 발명에 따른 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 있어서, 상기 유방암 치료 조성물은 퀘세틴 또는 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노입자인 것을 특징으로 한다.

[0014] 또한, 상기 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노입자는, 메톡시폴리에틸렌글리콜, 퀘세틴을 1.8 ~ 2.2 : 0.9 ~ 1.2의 중량비율로 아세트나이트릴 0.09 ~ 0.12의 중량비로 혼합하여 녹이는 단계, 상기 녹인 유기 용제를 수성용제에 녹여 3 ~ 4시간 녹이고 유기 용제를 증발시키는 단계, 상기 유기 용제가 증발된 것을 1500rpm에서 1시간 원심분리하여 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 얻는 단계 및 상기 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 동결건조하여 보관하는 단계로 이루어지는 것을 특징으로 한다.

[0015] 또한, 상기 퀘세틴은 지용성 퀘세틴인 것을 특징으로 한다.

[0016] 또한, 상기 퀘세틴 및 퀘세틴이 함유된 메톡시폴리에틸렌글리콜-폴리락티드-퀘세틴 나노제형을 이용한 종양부근주사법을 하는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명은 바이오플라보노이드인 퀘세틴과 MPEG-PLA 나노제형에 캡슐화되어 제조된 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 암 조직주변으로 주입하여 암조직의 성장을 억제하는 효과가 있으며, 세포사를 유발시켜 유방암 치료제로서의 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 본 발명에 따른 MPEG-PLA-Qu 나노입자 합성 모식도.

도 2는 본 발명에 따른 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 성질을 분석한 결과를 나타낸 그래프 및 상태도.

도 3은 본 발명에 따른 퀘세틴의 시험관내 약물 방출 실험 결과를 나타낸 그래프.

도 4는 본 발명에 따른 MDA-MB-231 유방암 세포에서의 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자에 대한 생존력과

독성 실험결과를 나타낸 그래프.

도 5는 본 발명에 따른 생쥐에 약물처리 72시간 후 세포용출액에 남아있는 퀘세틴 정량을 나타낸 그래프.

도 6은 본 발명에 따른 Nile Red 및 MPEG-PLA-Qu-NR 나노입자의 공촛점 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 상태도.

도 7은 본 발명에 따른 동물 모델에서의 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 항암 효과를 나타낸 그래프 및 상태도.

도 8은 본 발명에 따른 종양조직에서 사멸세포를 TUNEL assay로 분석한 결과를 나타낸 그래프 및 상태도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명은 퀘세틴이 함유된 유방암 예방 및 치료를 위한 약제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 이하에서 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.
- [0024] 또한, 도 1은 본 발명에 따른 MPEG-PLA-Qu 나노입자 합성 모식도, 도 2는 본 발명에 따른 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 성질을 분석한 결과를 나타낸 그래프 및 상태도, 도 3은 본 발명에 따른 퀘세틴의 시험관내 약물 방출 실험 결과를 나타낸 그래프, 도 4는 본 발명에 따른 MDA-MB-231 유방암 세포에서의 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자에 대한 생존력과 독성 실험결과를 나타낸 그래프, 도 5는 본 발명에 따른 생쥐에 약물처리 72시간 후 세포용출액에 남아있는 퀘세틴 정량을 나타낸 그래프, 도 6은 본 발명에 따른 Nile Red 및 MPEG-PLA-Qu-NR 나노입자의 공촛점 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 상태도, 도 7은 본 발명에 따른 동물 모델에서의 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 항암 효과를 나타낸 그래프 및 상태도, 도 8은 본 발명에 따른 종양조직에서 사멸세포를 TUNEL assay로 분석한 결과를 나타낸 그래프 및 상태도이다.
- [0026] 본 발명은 항암물질로 주목되고 있는 퀘세틴을 자연 상태의 퀘세틴인 지용성 퀘세틴과 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드 나노제형에 캡슐화한 퀘세틴 나노입자를 제조하여 유방암 치료 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 이하 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드는 MPEG-PLA라 하며, 메톡시폴리에틸렌 글리콜-폴리락티드-퀘세틴은 MPEG-PLA-Qu라고 명시한다.
- [0029] 실시예 1 : 세포배양
- [0030] 생쥐 유방암 세포주 4T1(ATCC, CRL-2539)는 RPMI 1640 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 사람 유방암 세포주 MDA-MB-231(ATCC, HTB-26)은 DMEM(Corning, USA)배지에서 배양하였다. 두 배지 모두 10%의 우태아혈청(FBS)와 100U/ml의 스트렙토마이신을 첨가하여 37℃, 5% 이산화탄소 농도의 항온항습배양기에서 배양하였다.
- [0032] 실시예 2 : MPEG-PLA-Qu 나노입자 합성
- [0033] PEG-PLA 블록 공중합체(sigma-Aldrich)(MPEG-PLA block copolymer)는 퀘세틴을 캡슐화하기 위한 공중합체로 사용하였다.
- [0034] 상기 공중합체는 2종 이상의 단량체로 형성된 폴리머로 코폴리머라고도 한다. 상기 블록 공중합체는 폴리머 분자의 일부분으로 다수의 구성 단위로 되고 그 부분에 인접하는 다른 부분과 화학 구조상 혹은 입체 배치상 다른 것을 블록이라고 하며, 복수의 블록이 선상으로 연결하여 구성된 폴리머가 블록 중합체이고, 그 중 2 종류 이상의 단량체로 형성된 것을 블록 공중합체라 한다.
- [0035] 상기 PEG-PLA 블록 공중합체인 MPEG-PLA 10mg과 퀘세틴 5mg을 1ml의 아세토나이트릴(acetonitrile)에 녹인다. 상기 유기 용제를 수성인 0.25% pluronic F-68(sigma-Aldrich)에 천천히 한 방울씩 떨어뜨리고 1시간 동안 잘

회저어 섞어준다. 나노제형이 잘 분산될 수 있도록 3 ~ 4시간 동안 회저어 섞어주면서 남아있는 유기 용제를 증발시킨다. 1500rpm에서 1시간 동안 원심분리하여 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 얻은 후 이것을 3차 증류수로 3번 세척한 후, 동결건조하여 보관한다. 퀘세틴이 포함되어 있지 않은 MPEG-PLA 나노제형 역시 위의 방법과 동일한 방법으로 제조하여 보관한다. 세포 섭취 연구(cellular uptake study)를 위해서 MPEG-PLA-Qu 나노제형 제조에 있어 10 μ g의 Nile red 단독으로 또는 퀘세틴과 동시에 10mg의 MPEG-PLA과 섞어 상기 제조 방식에 따라 Nile red가 포함된 나노제형을 제조하였다.

[0036] 상기 Nile red는 Nile blue 염료의 산 가수 분해하여 제조된 것으로 친지질성 염색을 한다. 대부분의 극성 용매에서 형광을 나타내지 않으나 지질이 풍부한 환경에서는 강력한 옐로우 글드를 방출하며 진한 적색에서 다양한 색상 및 강력한 형광을 나타낼 수 있다. 일반적으로 485nm에서 방출하며 용매에 의존하여 색이 나타내게 된다.

[0038] 실험예 1 : MPEG-PLA-Qu 나노입자의 성질분석

[0039] 나노제형의 크기 및 분포패턴은 electrophoretic light scattering spectrophotometer (Photal ELS-8000, Otsuta Electronics, Japan)기기를 이용하여 25℃의 온도에서 90°의 분산 각도로 측정하였다. 상기 기기는 MPEG-PLA-Qu 나노제형의 전기 영동 이동성을 측정하기 위한 제타포텐셜(zeta-potential) 측정에도 사용하였다. 측정에 앞서 1mg의 MPEG-PLA-Qu을 적절하게 3차 증류수에 희석하고, 크기 분석과 제타포텐셜 분석을 위해 KCl(1mM)을 첨가하였다. 분석은 그 정확성을 위해 두번씩 반복하였다.

[0040] MPEG-PLA-Qu 나노제형의 모양 및 표면의 형태 분석을 위해서 전자현미경(Transmission electron microscope)(TEM; JEM-2100F, JEOL, Japan)을 120kV의 가속전압(accelerating voltage)을 사용하였다. 200 mesh carbon coated copper TEM grid 위에 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 옮긴 후, 1% 알칼린 포스포텅스틱 에시드(alkaline phosphotungstic acid)로 1분 염색하여 샘플을 준비하였다.

[0041] 또한, MPEG-PLA-Qu의 표면 형태를 관찰하기 위해서 원자현미경(AFM; Bruker Multimode 8)과 Nanoscope V controller(Bruker AXS Inc., Madison, WI, USA)를 사용하였다. 분석을 위해서 나노제형이 녹아있는 용액을 실리콘 표면에 떨어뜨린 후 자연건조 하였다. 현미경 사진은 AFM의 tapping mode를 사용하여 얻었다.

[0042] 본 발명의 실험예 1의 나노제형의 크기를 측정한 결과 도 2a에 나타난 바와 같이 MPEG-PLA 나노제형의 경우 평균 142.1 $\pm$ 2.8nm, MPEG-PLA-Qu 나노입자의 경우 155.3 $\pm$ 3.2nm의 크기를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 상기 MPEG-PLA-Qu 나노제형이 더 큰 이유는 MPEG-PLA 나노입자 안에 퀘세틴이 포함되어 있기 때문이다. 또한, 다분산 지수(PDI)는 0.2 $\pm$ 0.05로 좁게 분포되어있음을 확인할 수 있다.

[0043] 본 발명의 실험예 1의 나노제형의 제타포텐셜을 측정한 결과 도 2b에 나타난 바와 같이 합성된 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 제타포텐셜은 -3.14mV를 보여주고 있으며, 이는 종래에 보고된 다른 PLA 또는 PLGA 입자들의 -50mV 보다 높다.

[0044] 본 발명의 실험예 1의 나노제형의 TEM과 AFM 결과는 도 2c, 도 2d에 나타난 바와 같다. MPEG-PLA-Qu 나노입자의 TEM 사진은 나노입자가 단분산되어있고, 구형의 형태이며 100~200nm의 범위에서 크기가 분포하고 있음을 확인할 수 있다. MPEG-PLA-Qu 나노입자의 AFM 사진은 실리콘 표면에 평균 <150nm의 나노입자들이 여러층으로 증착되어 있음을 확인할 수 있다. 상기 TEM 및 AFM으로 확인한 입자들의 크기는 항상 ELS로 확인한 크기보다 작게 나타났으며, 그 이유는 TEM 및 AFM은 입자들이 건조된 상태에서 확인하는 반면에 ELS는 hydrodynamic 영역을 분석하기 때문에 그 용제의 효과 때문이다. 이러한 현상은 건조과정에서 PEG chain의 폴딩과 나노입자들의 엉킴 때문에 일어나며, 주로 polymeric wall의 두께에 의존적이다. 합성한 MPEG-PLA 나노입자의 약물 부하비율과 캡슐화 효율의 정량은 미리 농도를 알고 있는 퀘세틴 용액을 흡광도 380nm파장에서 그 값을 읽어 생성한 검정곡선으로 정량화된다. 또한, MPEG-PLA 나노입자에 캡슐화된 퀘세틴의 약물부하 수준은 5.3 $\pm$ 1.1%이며, 그것의 퀘세틴 캡슐화 정도는 62.8 $\pm$ 2.9%이다. MPEG-PLA-Qu 나노입자의 물리화학적 특성은 나노약물 전달체계에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0046] 실험예 2 : MPEG-PLA-Qu 나노입자의 시험관내 퀘세틴 방출

[0047] 15mg의 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 2mL의 phosphate buffer saline(PBS; pH 7.4) 또는 sodium acetate buffer(pH 5)에 녹인 후 투석 관(dialysis tube)에 옮긴다. 이 투석 관을 MPEG-PLA-Qu 나노제형이 녹아있는 동일한 버퍼용액 1000mL이 담긴 비커에 넣은 후 37℃의 온도에서 회저어 주면서 시간 때(0, 6, 12, 24, 48, 72, 120, 168,

216 시간) 별로 투석 관에서 샘플링한다. 상기와 같이 샘플링 한 샘플을 동일한 양의 에틸알코올을 넣고 잘 섞어준다.

[0048] 퀘세틴의 방출량을 측정하기 위해서 MPEG-PLA-Qu 나노제형 안에 남아있는 퀘세틴의 총량을 380nm의 파장에서 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 측정한다. 동일한 상태에서 실험을 진행하기 위해 투석 관이 담겨있는 버퍼용액을 6시간 마다 새로운 버퍼용액으로 교체하였다. 약물 방출 비율을 계산하는 식은 하기와 같다.

[0049] 퀘세틴 방출비율($t=n$, %)= $M(t=0)-M(t=n)/M(t=0) \times 100$

[0050] (퀘세틴의 양=M, 측정시간 때=t)

[0051] 본 실험 예2를 실시한 결과 도 3에서 나타난 바와 같은 그래프를 확인할 수 있었다. 상기 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 크기는 100 ~ 200nm 범위에서 정렬되어 있어, 퀘세틴의 종양세포에 대한 수동적 타겟팅을 기대할 수 있게 한다. 따라서 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 시험관내 방출 패턴을 생리학적 조건인 pH7.4에서 연구하여, 나노입자로부터 방출되는 약물의 장기적인 지속 방출 패턴을 확인할 수 있다. 초기 24시간 동안 약 35%의 퀘세틴이 나노입자로부터 방출되었다. 이것은 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 방출 패턴은 초기에 대량으로 약물을 방출하고, 그 후에 장시간에 걸쳐 서서히 약물을 방출하는 형태임을 알 수 있다.

[0053] 실험예 3 : MDA-MB-231 유방암 세포에서의 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자에 대한 생존력 및 독성실험

[0054] MDA-MB-231 암세포주에서의 MPEG-PLA-Qu 나노입자 항암효과를 알아보기 위하여 세포 생존능력 실험, 젯산 탈수소 효소 실험, 세포사멸 분석을 실시하였다.

[0055] 상기 세포 생존능력 실험을 실시하기 위하여 MDA-MB-231 세포를 96-well plate에 한 well 당 2×10^4 개의 세포를 심은 후 24시간 후, 대조군으로 0.16% DMSO, 실험군으로 퀘세틴($13.5 \mu\text{g/ml}$; $40 \mu\text{M}$), 또는 각각 $3.375 \mu\text{g/ml}$, $6.75 \mu\text{g/ml}$, $13.5 \mu\text{g/ml}$ 의 퀘세틴이 캡슐화 되어있는 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 처리한 후 37°C 의 온도, 5%의 이산화탄소 농도의 항온항습배양기에서 96시간 배양하였다. 블록공중합체의 이후 독성을 관찰하기 위해 비어있는 MPEG-PLA 나노제형을 MPEG-PLA-Qu 나노제형과 동일한 양으로 처리하였다. $10 \mu\text{l}$ MTT($5 \mu\text{g/ml}$)시약을 모든 well에 처리한 후 2시간 동안 37°C 의 온도에서 배양한 후, 96-well plate안의 모든 배양액을 제거하고, well 당 DMSO $200 \mu\text{l}$ 를 처리하여 미토콘드리아 숙신산탈수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 만들어진 보라색의 불용성 formazan crystal을 녹인 후, 흡광도는 570nm의 파장에서 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 측정하였다.

[0056] 상기 젯산 탈수소 효소 실험은 MPEG-PLA-Qu 나노제형에 대한 세포 독성을 알아보기 위한 것으로 세포독성 검출 키트(Takara BioInc., Shiga, Japan)를 제조사의 수행법에 따라서 실시하였다. 세포를 96-well plate에 심고, 24시간 동안 안정화 시킨 후 상기 세포 생존능력 실험과 동일한 방법으로 과정을 수행하였다. 처리 96시간 후 각 well당 $10 \mu\text{l}$ 의 세포 배양액을 새로운 96-well plate에 옮긴 후 각각 $40 \mu\text{l}$ 의 PBS를 더 첨가하였다. 이후 각 well 당 $50 \mu\text{l}$ 의 LDH 시약을 첨가하여 25°C 의 온도로 어두운 곳에서 45분간 반응시킨 후 $50 \mu\text{l}$ 의 반응 종료 용액을 첨가하고, 490nm의 파장에서 UV-visible spectrophotometer를 사용하여 측정하였으며, 세포사에 대한 양성대조군으로 세포의 용해액을 사용하였다.

[0057] 상기 세포 사멸 분석 실험은 MDA-MB-231 세포의 초기 및 후기의 세포 사멸의 변화를 분석한 것으로 이를 위해 Annexin V-FITC/PI 동시 염색 kit(BD Pharmingen, San Diego, CA)를 사용하였다. 세포에 각각 $3.375 \mu\text{g/ml}$, $6.75 \mu\text{g/ml}$, $13.5 \mu\text{g/ml}$ 의 MPEG-PLA-Qu 나노제형을 72시간 동안 처리하였다. 그 후에 1×10^6 의 세포를 얻은 후 PBS로 2번 세척하여 살아있는 세포, 자연사 세포 및 괴사한 세포의 정량화를 위해서 $400 \mu\text{l}$ 의 $1 \times$ binding buffer ($5 \mu\text{l}$ 의 annexin V-FITC와 PI를 첨가)에 잘 섞어주었다. 상기 annexin V 가 표지된 포스파티딜세린(phosphatidylserine)은 자연사한 세포의 표면에 위치하여 annexin V 염색으로 직접적으로 자연사 세포를 셀 수 있다. 상온의 어두운 곳에서 15분간 반응시킨 후 flow-cytometer(BDFACASCalibur)를 이용하여 annexin V-FITC, PI 양성반응 세포의 수를 세어 검출하였다.

[0058] 본 실험예 3의 MDA-MB-231 세포에 다른 용량의 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 처리한 결과는 도 4a에 나타나는 바와 같이 용량 의존적으로 세포의 생존율이 감소하고, 세포독성은 증가한 것을 알 수 있다. 구체적으로 지용성 퀘세틴($13.5 \mu\text{g/ml}$)과 나노입자 내에 함유된 퀘세틴($13.5 \mu\text{g/ml}$)은 처리 96시간 후 세포 생존율이 대조군에 비해 34%, 38% 하락한 것을 확인할 수 있다.

- [0059] 또한, 본 실험에 3의 세포독성 실험결과는 도 4b에 나타나는 바와 같이 퀘세틴($13.5\mu\text{g}/\text{ml}$)과 나노입자 내에 함유된 퀘세틴($13.5\mu\text{g}/\text{ml}$) 양쪽 군 모두 대조군에 비해 17%의 세포독성을 나타내는 것을 확인할 수 있으며, 세포가 비어있는 MPEG-PLA 나노입자를 처리한 것은 독성이 다른 실험군에 비해 나타나지 않은 것을 확인할 수 있다. 상기와 같은 세포독성 효과는 MPEG-PLA 나노입자에 함유된 퀘세틴에 의한 것으로 이는 지용성 퀘세틴과 유사한 용량($13.5\mu\text{g}/\text{ml}$)에서 처리 96시간 후 거의 동일한 효과가 있음을 나타내고 있다.
- [0060] 또한, 본 실험에 3의 세포사멸 효과를 확인하기 위해서 세포를 Annexin V-FITC와 PI로 염색한 후 유세포분석법을 실시한 결과 도 4c에서 나타난 바와 같이 annexin V-FITC와 PI 양성 세포들이 용량 의존적으로 증가하였다. 상기 실험을 실시한 세포사의 비율의 결과 비어있는 MPEG-PLA 나노입자 대비 퀘세틴이 $3.375\mu\text{g}/\text{ml}$, $6.75\mu\text{g}/\text{ml}$, $13.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 함유되어 있는 나노입자를 처리한 세포군에서 각각 22.41%, 29.84%, 31.109%씩 증가하였다. 상기 실험의 결과로 처리용량이 증가됨에 따라서 세포사의 비율이 현저하게 증가되는 것을 확인할 수 있다.
- [0062] 실험예 4 : 세포용출액 내의 퀘세틴 정량화
- [0063] MDA-MB-231 세포 내 잔존하는 퀘세틴의 양을 정량화하기 위해서 spectrophotometry를 사용하였다. 1×10^6 개수의 세포에 퀘세틴 $13.5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($40\mu\text{M}$), MPEG-PLA-Qu 나노제형 $3.375\mu\text{g}/\text{ml}$, $6.75\mu\text{g}/\text{ml}$, $13.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 각각 72시간 동안 처리하였다. 그 후 세포를 PBS로 2번 세척하고 radioimmunoprecipitation buffer(RIPA; 20mM Tris-HCl(pH 7.5), 200mM NaCl, 1% Triton X-100, 1mM dithiothreitol; T&I, Korea)로 세포를 용해시켰다. 이 세포 용해액을 12000rpm에서 20분간 원심분리 한 후에 에틸아코올에 녹인 후 잘 vortex하여 에틸아코올에 녹는 부분만 따로 추출하여 모은다. 에틸알코올에 녹아있는 퀘세틴의 함량을 380nm의 파장에서 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 측정한다.
- [0064] 상기 본 발명의 실험예 4의 결과 도 5에 나타난 바와 같이 MDA-MB-231세포에서 각 처리군 간에 퀘세틴의 함량이 현저한 차이를 나타내는 것을 확인할 수 있다. 세포에 처리한 캡슐화된 퀘세틴의 함량에 의존적으로 세포내의 퀘세틴의 용량이 증가함을 보인다. 캡슐화된 퀘세틴과 지용성 퀘세틴을 같은 용량($13.5\mu\text{g}/\text{ml}$)을 세포에 처리한 결과에서 보듯이 세포에서 검출되는 퀘세틴의 양은 지용성 퀘세틴을 처리한 군에서 적게 검출되는 것을 확인할 수 있다.
- [0066] 실험예 5 : MPEG-PLA-Qu-NR 나노입자의 세포내 흡수 및 세포내 위치
- [0067] MPEG-PLA-Qu 나노입자의 세포내 흡수와 세포내 위치를 확인하기 위해서 24well plate에 세포를 심은 후 24시간 동안 배양하였다. 세포에 Nile Red($0.3\mu\text{g}$) 또는 퀘세틴과 동량의 Nile Red가 캡슐화된 MPEG-PLA 나노입자(MPEG-PLA-Qu-NR)를 처리한다. 측정시간은 1, 3, 6, 72시간으로 상기 측정 시간때 별로 세포를 고정하고 핵과 소포체를 각각 녹색 염색시약인 ER tracker™(invitrogen)와 파란색 염색시약인 4'-diamidino-2-phenylindole(DAPI;KPL, Gaithersburg, MD, USA)를 제조사의 방법에 따라 염색하였으며, 공초점현미경(Carl Zeiss LSM710, Germany)을 사용하여 MPEG-PLA 나노입자의 세포내 흡수와 세포 내 위치를 확인하였다.
- [0068] 상기 본 발명의 실험예 5의 결과는 도 6a, 도 6b와 같이 나타났다. 도 6a는 6시간 동안 처리한 것으로 세포내의 Nile Red의 위치는 적색 형광으로 나타났으며, MPEG-PLA-Qu-NR 나노입자와 소포체의 동일한 위치는 녹색 형형광과 적색형광이 겹쳐져 노란색 점으로 나타나는 것을 확인할 수 있다. 도 6b는 상기 Nile Red와 MPEG-PLA-Qu-NR 나노입자를 MDA-MB-231 유방암 세포에 처리하고 시간(1, 3, 6, 72시간)때 별로 찍은 공초점 현미경 사진으로 나노입자의 세포내 흡수를 보여주며, 나노입자를 처리한 후 1시간 이내에 세포로 유입되기 시작하며 72시간 뒤에도 세포내에 존재하고 있음을 확인할 수 있다. 이와는 반대로 세포에 Nile Red 시약만을 처리하였을 경우에는 세포외부 표면에 적색형광이 나타나는 것을 확인할 수 있다.
- [0070] 실험예 6 : 이종이식 동물모델에서의 MPEG-PLA-Qu 나노입자 항암효과
- [0071] 이종이식 동물 모델에서 MPEG-PLA-Qu 나노입자 항암효과를 알아보기 위하여 한림대학교의 실험동물 윤리 위원회의 승인과 지침을 따라 진행하였다. 실험동물은 평균 생육 조건인 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 온도, $50 \pm 10\%$ 습도, 12시간 주기로 하여 밤과 낮을 관리하고 실험에 들어가기 전 일주일간 적응 기간을 두었다. 이종 이식 모델(xenograft model)을 확립하기 위해서 5~6주령의 암컷 BALB/c 생쥐(SAMTACO, Osan, Korea)의 오른쪽 옆구리(flank)에 $1 \times$

105의 4T1 암세포를 피하 주사하였다. 약물 치료는 암세포의 피하 주사 후 10일째 되는 날 암조직의 평균 부피가 100~200mm³이 되는 시점에 시작하였다. 생쥐들을 7마리씩 다섯 그룹으로 나누고, 종양 부근 주사법으로 saline, MPEG-PLA 나노입자, 퀘세틴, MPEG-PLA-Qu 나노입자를 saline에 녹여 3일에 한번씩 주사하여 19일째까지 처방하였다. 종양 크기의 측정은 vernier caliper를 사용하여 3일에 한번씩 22일까지 측정하였으며, 종양의 최종부피(V)는 다음의 공식으로 계산하였다. 부피(V)=(I×b²)/2로 상기 공식에서 I는 종양의 가장 두꺼운 부분의 지름이며, b는 I와 직각을 이루는 부분의 지름이다. 모든 실험 동물은 22일째 되는 날 해부하여 종양을 적출하였다. 또한, 그룹간 종양의 무게를 측정하여 항암작용을 비교하였으며, 실험 동물의 몸무게를 모니터링 하면서 처리 약물의 독성 가능성을 파악하였다.

[0072] 상기 본 발명의 실험에 6을 실시한 결과는 도 7a, 도 7b, 도 7c, 도 7d와 같이 나타났다. 상기 도 7a, 도 7c는 종양의 크기 및 무게를 그래프로 나타낸 것으로 대조군에 비해 MPEG-PLA-Qu를 투여한 이중 이식 동물 모델에서 종양의 크기 변화가 작았으며, 종양의 무게 또한 대조군에 비해 작은 것을 확인할 수 있다.

[0073] 상기 종양의 크기가 100 ~ 200mm³에 도달한 후 MPEG-PLA-Qu 나노입자의 퀘세틴 0.5mg/kg, 4mg/kg, 지용성 퀘세틴 4mg/kg을 종양을 유발시킨 BALB/c 암컷 생쥐에 처리하였다. 대조군에 비하여 지용성 퀘세틴과 MPEG-PLA-Qu 나노입자 처리군은 용량에 의존적으로 종양의 성장이 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있다. 또한, 4T1 세포 주입 22일 후 지용성 퀘세틴 처리군의 평균 종양의 무게는 81.4mg, MPEG-PLA-Qu 나노입자 처리군은 각각 90mg, 60mg으로 측정되었다. 상기의 결과는 MPEG-PLA 나노입자에 캡슐화된 퀘세틴이 비슷한 용량의 지용성 퀘세틴에 비하여 종양의 크기와 무게를 더 줄였을 알 수 있으며 8배나 적은 용량의 캡슐화된 퀘세틴이 지용성 퀘세틴과 비슷한 정도의 종양의 성장을 억제한 것을 알 수 있다. 상기 실험이 진행되는 동안 실험동물의 몸무게는 모든 처리군간 일정하게 유지하였으며, 이것은 약물과 중합체의 처리에 대한 동물의 내성을 나타낸다. 도 7d는 본 실험 종료 후의 각 처리군의 종양 상태이다.

[0075] 실험예 7 : MPEG-PLA-Qu 나노입자의 종양주변 주입 후 약물동력학 연구

[0076] 종양주변에 처리한 MPEG-PLA-Qu나노입자의 약물동력학을 평가하기 위해서 암컷 BABL/c 생쥐에 4T1 세포를 주입하고 11일 째 되는 날 종양주변에 지용성 퀘세틴 및 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 각각 4mg/kg수준으로 주사하였다. 그 후 0, 12, 24, 72시간 때 별로 혈액샘플을 5마리 생쥐의 안와정맥총에서 채혈로 얻은 후 4℃의 온도에서 2500rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 또한 종양조직을 적출하여 RIPA 버퍼에서 분쇄하였다. 혈장샘플과 조직균질액에 실험적 기준물질로 kaempferol (Sigma)을 섞고, 0.583 mol/l의 아세트산으로 산성화 시켰다. 다음으로 퀘세틴과 글루코코니드의 결합을 깨기 위해서 0.1ml 혈장샘플과 0.5ml 조직균질액에 β-Glucuronidase(4U/μl; Sigma)을 첨가 후 37℃의 배양기에서 2시간 반응시켰다. 혈장샘플과 조직균질액의 추출물을 얻기 위하여 그것의 5배 부피의 초산 에틸을 첨가 후 상층액을 얻은 후 이를 증발시켜 건조하였다. 상기 과정을 3번 반복하여 건조물을 획득하였다. 상기 획득한 건조물을 메틸알코올에 녹여 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)에 25μl의 샘플을 주입하였다. 상기 HPLC를 이용하여 퀘세틴의 양을 354nm의 파장에서 측정하였다.

[0077] 또한, 증류수 : 메틸알코올 : 아세트니트릴의 부피비가 50 : 45 : 5인 mobile phase를 사용하였으며, 유속은 1 ml/min로 유지하였다. 약물동력학의 parameters는 농도-시간 결과에 따라 결정하였다. 농도 곡선하 면적(the area under the concentration-time curve)은 선형 사다리꼴 법칙을 이용하여 계산하였다. 또한, 제거속도상수(elimination rate constant, Ke)는 농도-시간 곡선상의 최종단계 경사면에서 계산하였으며, 제거 반감기는 제거속도상수에 의해 0.693으로 계산되었다.

[0078] 도 7e는 종양부위에서 퀘세틴의 수준이 이상성(biphasic) 방식으로 감소하는 것을 나타내고 있다. MPEG-PLA 나노입자에 캡슐화된 퀘세틴의 농도 수준(~40%)은 주입 후 12시간 안에 퀘세틴을 초기에 대량방출하며, 이후 72시간까지 서서히 방출(~64%)하는 것을 확인할 수 있다.

표 1

구분	C _{last} (μg/ml)	T _{last} (hrs)	t _{1/2} (hrs)	AUC ₀₋₇₂ (μgh/ml)
Quercetin	2.7±1.6	72	16±2.4	740.9±149.6
MPEG-PLA-Qu np	14.6±2.5	72	43.32±3.3	1385±153.9

- [0080] Clast : last measured concentration
- [0081] Tlast : last time at which concentration was measured
- [0082] t1/2 : half life
- [0083] AUC : area under curve

[0085] 상기 표 1에서 나타나는 바와 같이 나노입자가 퀘세틴의 느린방출에 기여함을 알 수 있다. 반면 나노입자가 아닌 자연상태의 지용성 퀘세틴을 처리한 생쥐이세 적출한 종양에서는 종양부위에서 퀘세틴이 빠르게 방출됨을 알 수 있으며, 약물처리 72시간 후에는 검출 최저치에 도달하였다. 상기 지용성 퀘세틴은 종양부근에서 짧은 반감기를 나타내고 있으며, MPEG-PLA-Qu 나노입자가 지용성 퀘세틴에 비해 현저하게 높은 농도의 캡슐화된 퀘세틴이 72시간 후에 검출되었다. 농도 곡선하 면적 또한 MPEG-PLA-Qu 나노입자 처리군에서 증가하였으며, 이것은 종양 내에서 퀘세틴이 긴시간 동안 유지되고 있음을 알 수 있는 것이다.

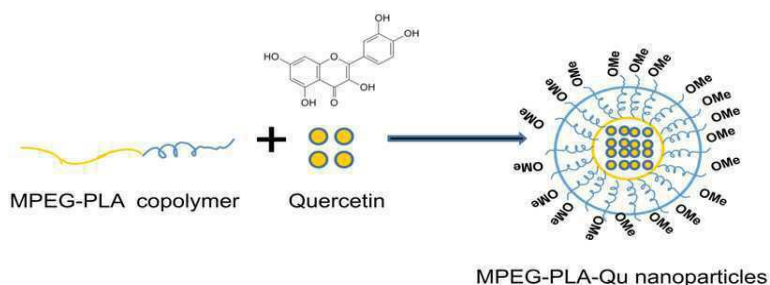
[0087] 실험예 8 : 세포사멸의 연구를 위한 종양의 조직학적 분석

[0088] 종양조직을 분리하고, 2% paraformaldehyde로 고정 후, optimal cutting temperature(OCT) compound에 박아 넣었다. 그 다음 7 μ m의 동결 절편으로 자른 후 TUNEL(terminal deoxynucleotidyl transferased UTP nick-end labeling) assay를 In situ apoptosis detection kit(Takara Bio. Inc., MK500, Japan)를 사용하여 제조사에서 제공한 방법으로 본 실험을 수행하였다. 조직내의 peroxidase는 메틸아코올과 permeabilisation buffer의 첨가로 비활성화된다. 조직절편슬라이드를 1시간 동안 37℃의 항습배양기에서 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT) enzyme을 처리한 후 반응시킨다. 다음으로 종양조직을 세척하고, 항체를 반응시켜 diaminobenzidine으로 염색한다. 슬라이드를 역상현미경상에서 200배의 배율로 DNA가 절단된 사멸세포를 관찰한다.

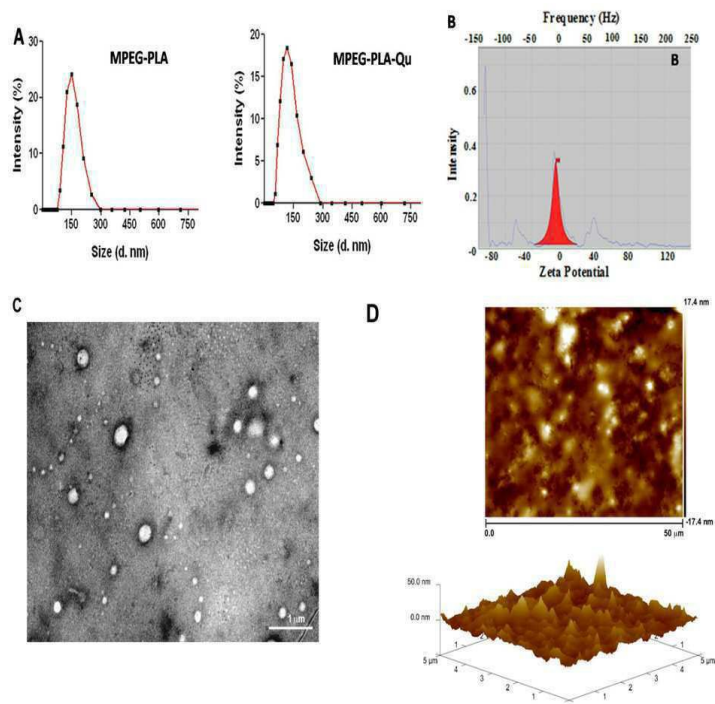
[0089] MPEG-PLA-Qu 나노입자 처리에 의한 종양조직에서의 세포사멸의 증가를 TUNEL assay로 확인한 결과는 도 8a 및 도 8b와 같이 나타났다. 종양절편의 사진은 세포사멸의 발생을 최대한 보여주기 위하여 종양조직의 표면에 가깝게 찍었으며, 종양 절편에서 어두운 갈색으로 염색된 세포들이 파괴된 핵을 나타낸다. 본 실험으로 지용성 퀘세틴에 비하여 비슷한 용량의 MPEG-PLA-Qu 나노입자를 처리하였을 때 현저히 증가된 TUNEL 양성의 사멸된 세포의 결과를 확인 할 수 있다.

도면

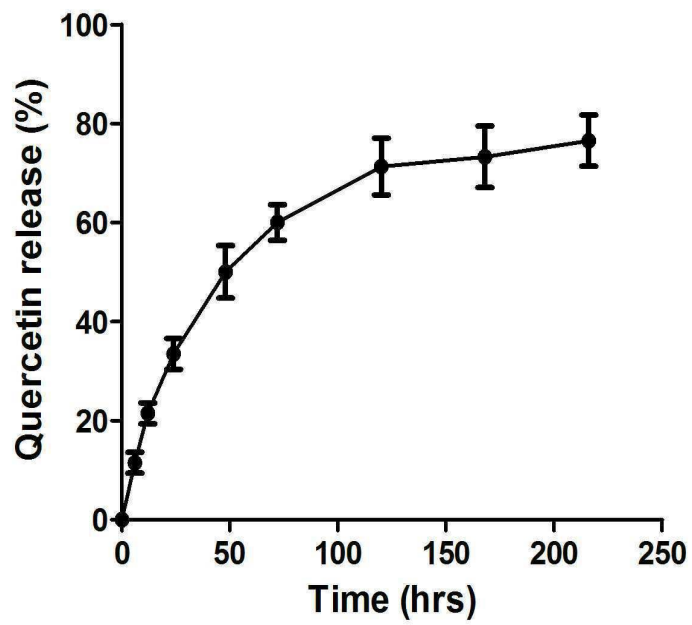
도면1



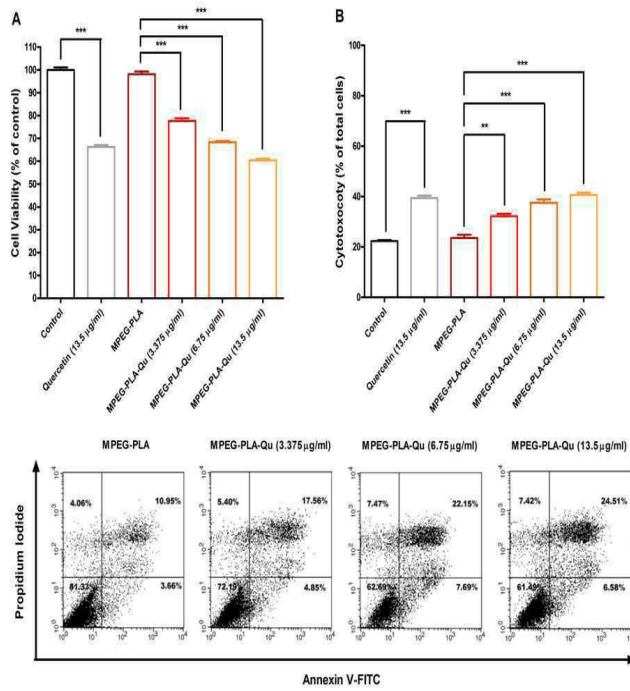
도면2



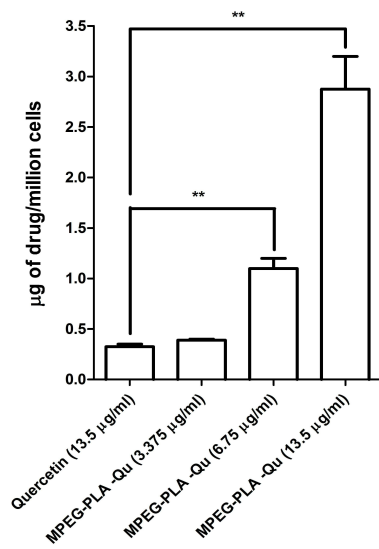
도면3



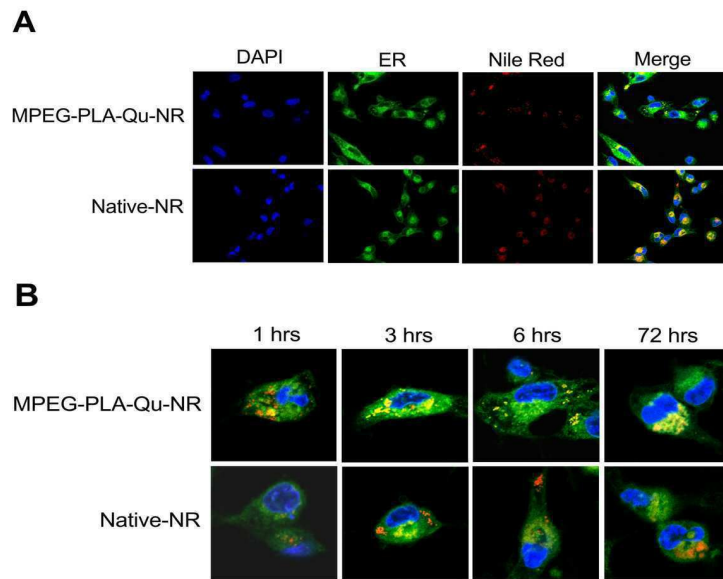
도면4



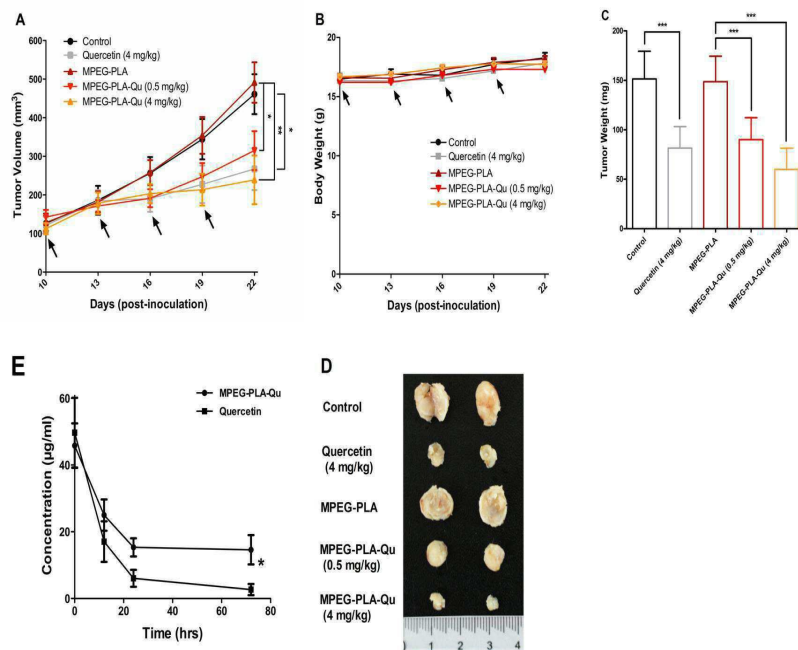
도면5



도면6



도면7



도면8

