



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년01월04일  
(11) 등록번호 10-1935497  
(24) 등록일자 2018년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 9/51 (2006.01) A61K 31/137 (2006.01)  
A61K 47/48 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 9/5153 (2013.01)  
A61K 31/137 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2016-0175777  
(22) 출원일자 2016년12월21일  
심사청구일자 2016년12월21일  
(65) 공개번호 10-2018-0072326  
(43) 공개일자 2018년06월29일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR1020140057414 A  
US20070190160 A1\*  
World Journal of Gastroenterology. 2014.  
Vol.20, No.45, pp.17092-17099.\*  
Anticancer Research. 2013. Vol.33,  
pp.2425-2434.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
건국대학교 글로컬산학협력단  
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로컬캠퍼스)  
동국대학교 산학협력단  
서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)  
(72) 발명자  
한희동  
충청북도 청주시 흥덕구 덕암로47번길 52, 401호 (봉명동, 한마음빌라)  
노주원  
서울특별시 양천구 목동남로4길 6-23, 207동 302호 (신정동, 목동2차우성아파트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인이룸리온

전체 청구항 수 : 총 1 항

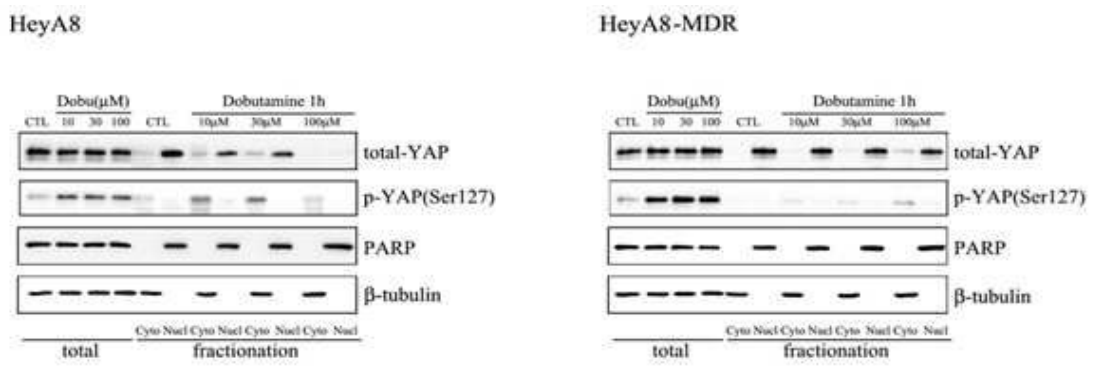
심사관 : 허명숙

(54) 발명의 명칭 다중약물내성 암세포에 유용한 항암제

(57) 요약

본 발명은 도부타민을 탑재한 PLGA 나노입자 및 이를 포함하는 암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 도부타민을 탑재한 PLGA 나노입자는 나노에멀전 형태로서 수성 용매에 대한 용해성 및 분산성을 현저히 개선시키며, 암세포에 선택적인 전달효율이 우수하다. 또한, 심혈관 치료제로 사용하고 있는 도부타민의 신규 적용증을 확대함과 동시에, 뚜렷한 치료방법이 부재한 항암화학제 내성 난치암에 대한 신규 치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 47/61 (2017.08)

A61K 47/6937 (2017.08)

(72) 발명자

**박영민**

서울특별시 은평구 통일로 780, 3동 702호(불광동,  
미성아파트)

**김가희**

서울특별시 성동구 금호로16길 17 (금호동1가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A2B2007327

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 (1차) 항암화학제 내성 악성 난소암 치료용 항암화학제-siRNA 복합 나노입자 치료제 개발

기여율 25/100

주관기관 건국대학교글로벌산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2017.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016R1A5A2012284

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초의과학분야(MRC)

연구과제명 (1차) 톨유사수용체 기반 질병 연구 센터

기여율 25/100

주관기관 건국대학교글로벌산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2016.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711038888

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 PLGA 다중 약물 나노입자를 이용한 YAP-관련 항암제 내성의 극복: 난치성 부인암의 새로운 전략

기여율 50/100

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

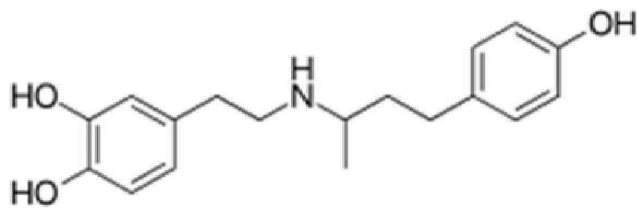
삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

하기 화학식 1로 표시되는 도부타민 및 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))을 포함하는 나노입자 표면에 히알루론산을 결합시킨 나노입자 복합체를 유효성분으로 포함하는 항암제에 대한 다중약물 내성을 가지고 CD 44의 높은 발현을 나타내는 난소암 억제용 주사제 조성물;



청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

**청구항 13**

삭제

**청구항 14**

삭제

**청구항 15**

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 심혈관치료제로 활용되는 도부타민을 항암치료제로 적용하는 신규방법을 제시하는 것으로서, 난치성 암종에서 항암화학제에 내성을 보이는 다중약물내성 억제용 조성물에 관한 것이다. 자세하게는 암세포로의 전달 효율을 향상시키기 위해 상기 도부타민을 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))에 탑재한 나노입자의 발명에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] Yes-associated protein (YAP)은 배아발달과 생체 기관의 성장을 조절하는 데 매우 중요한 Hippo pathway의 핵심 분자이다. Hippo pathway는 비교적 최근에 신호전달체계가 밝혀졌으며, 정상적으로는 배아의 발생과 장기의 성장을 적절할 크기에서 멈추게 하는 역할을 하나, 성인에서는 생리적 작용이 비교적 미미한 것으로 알려져 있으며, 반면에 간암, 위암, 식도암, 난소암 등 여러 가지 악성종양에서 비정상적인 발현이 관찰되었고, 전이, 재발, 치료 저항성 등의 불량한 예후와도 관련이 있음이 보고되었다. 또한 실험실적으로 YAP의 발현을 억제할 경우 종양세포의 성장이 억제됨이 여러 차례 보고되었으며, 이로 인해 최근 YAP 발현억제가 분자생물학적 치료법의 주목받는 목표물이 되고 있다.

[0003] 도부타민은 심부전 치료제로서 일반적으로 사용되고 있는 화합물 중에 하나이다. 그러나 본 발명자들은 도부타민이 YAP 유전자를 효과적으로 억제한다는 사실을 알아냈고, 이를 이용하여 도부타민이 암의 치료, 특히 다중약물내성 암,에 효과가 있음을 알아내었다. 본 발명자들은 도부타민을 항암조직으로 효율적으로 전달 하기 위하여 나노입자 시스템을 도입하였다. 이때 수용성 도부타민의 최적 탑재 조건을 평가하였으며, 상기의 조건을 바탕으로 만들어진 PLGANANO입자를 마우스를 대상으로 투여하여, PLGANANO입자의 항암효능을 평가하였다.

[0004] PLGA 고분자는 생체친화성이 좋으며, 체내에서 생분해되는 특성이 있다. 또한, PLGA 고분자는 미국 FDA의 허가를 득한 생체친화적 고분자로서 체내주입에 대하여 독성이 없다. PLGA 고분자로 제형을 제조 시에, 고분자의 말단기에 리간드등의 생접합이 유리하며, 리간드를 생접합 시킬 경우, 표적하는 암세포에서 특이적으로 발현하는 리셉터에 대한 결합효율을 증가시켜 표적화 약물 전달을 가능하게 한다.

[0005] 본 발명에서는 CD44의 리간드인 히알루론 산을 PLGA 나노입자 표면에 생접합 시켜 도부타민이 탑재된 PLGA 나노입자의 암세포 선택적인 전달 효율을 증가시켰다.

[0006] 한편, 보통 '종양(tumor)'은 신체 조직의 자율적인 과잉 성장에 의해 비정상적으로 자라난 덩어리를 의미하며, 양성종양(benign tumor)과 악성종양(malignant tumor)으로 구분할 수 있다. 양성종양이 비교적 성장 속도가 느리고 전이(metastasis; 종양이 원래 발생한 곳에서 멀리 떨어진 곳으로 이동함)되지 않는 것에 반해 악성종양은 주위 조직에 침윤하면서 빠르게 성장하고 신체 각 부위에 확산되거나 전이되어 생명을 위협하게 된다. 악성종양은 암과 동일한 의미로 생각할 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위하여 연구를 거듭한 결과 도부타민이 탑재된 나노입자 주사제형을 개발하였고, 이의 항암화학제에 내성을 보이는 난치성 암종에서 현저한 암치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

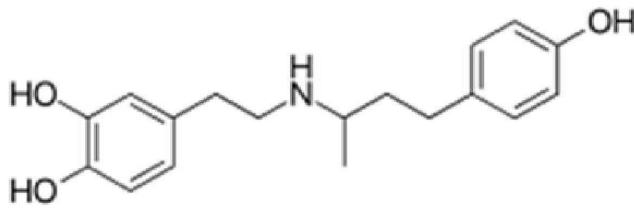
**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명의 목적은 심혈관 치료제인 도부타민을 적용하여 신규 항암치료제를 개발하는 것으로서 뚜렷한 치료방법이 없는 항암화학제 내성 난치암의 치료제 개발에 목적이 있다. 상기 도부타민을 종양조직으로 효율적으로 전달하기 위하여 나노입자에 탑재하였으며, 나노입자의 표면에는 히알루론산을 결합하여 종양조직으로 선택적으로 전달이 가능하게 하였다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 화학식 1로 표시되는 도부타민 및 고분자를 포함하는 나노입자를 제공할 수 있다.

[0010] [화학식 1]



- [0012] 상기 도부타민은 수용성 이다.
- [0013] 상기 도부타민은 수용성 이다.
- [0014] 상기 고분자는 리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide), 폴리프로필렌옥사이드(poly(propylene oxide), 엔-옥틸트리에틸렌글라이콜에테르(n-octyltriethylene glycol ether, 8E3) 및 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명은 또한, 상기 나노입자의 표면에 히알루론산을 결합시킨 나노입자 복합체를 제공 할 수 있다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 나노입자 또는 나노입자 복합체를 유효성분으로 포함하는 함암제에 대한 다중약물내성 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0017] 상기 나노입자 또는 나노입자 복합체는 정제, 과립제, 환제, 캡셀제, 액제, 주사제, 연고제, 좌제 및 산제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형으로 제형화될 수 있다.
- [0018] 상기 나노입자 또는 나노입자 복합체는 일반적인 암세포 및 다중약물내성 암세포에서 세포독성을 나타낼 수 있다.
- [0019] 상기 다중약물내성 암세포는 항암제 구조에 상관없이 비 특이적인 내성을 획득한 암세포일 수 있다.
- [0020] 상기 암세포는 대장암(colon cancer), 방광암(bladder cancer), 난소암(ovarian cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer), 전립선암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer) 및 대장직장암(colorectal cancer)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명은 또한, 하기의 단계를 포함하는 나노 입자의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0022] i) 도부타민 및 고분자를 균일하게 혼합하여 1차 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0023] ii) 상기 1차 에멀전을 양친매성 고분자와 혼합하여 2차 에멀전을 형성하는 단계;
- [0024] 상기 도부타민은 수용성 일 수 있다.
- [0025] 상기 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide), 폴리프로필렌옥사이드(poly(propylene oxide), 엔-옥틸트리에틸렌글라이콜에테르(n-octyltriethylene glycol ether, 8E3) 및 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다 .
- [0026] 상기 고분자는 유기상용매에 용해되어 있을 수 있다.
- [0027] 상기 양친매성 고분자는 소듐 콜레이트(sodium cholate), 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), Span

20(Sorbitan Monolaurate), Span 60(Sorbitan Monostearate), Span 80(Sorbitan Monooleate), Tween 20(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate), Tween 60(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monostearate), Tween 80(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate) 및 DPG(dipotassium glycyrrhizinate)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0028] 상기 ii)단계의 나노분자의 표면에 히알루론산을 결합시키는 단계를 추가할 수 있다.

**발명의 효과**

[0029] 본 발명에 따른 도부타민 나노입자는 도부타민의 전신 확산을 방지하고, 암세포로의 전달 효율을 향상시켜 암 치료에 유용하게 사용될 수 있으며, 나노입자의 표면에 히알루론산을 결합하여 종양조직으로 선택적으로 전달이 가능하게 한다.

**도면의 간단한 설명**

[0030] 도 1은 본 발명에서 개발된 도부타민이 탑재된 나노입자의 물리적인 특성을 나타낸다. A는 나노입자의 크기, B는 나노입자에 탑재된 도부타민의 양, C는 나노입자의 표면전하, 그리고 D는 나노입자의 형태를 나타낸다.

도 2는 PLGA 나노입자의 표면에 히알루론산을 결합시켜 종양세포 표면에서 발현되는 CD44 수용체에 선택적인 결합을 나타낸다. A는 난소암세포주 (A2780)으로서 CD44 수용체의 발현이 적은 negative expression을 나타낸다. B는 난소암세포주 (HeyA8)으로서 CD44 수용체의 발현이 높은 positive expression을 나타낸다. C는 CD44 negative cell line (A2780)에서 PLGA 나노입자의 결합능력을 나타낸다. D는 CD44 positive cell line (HeyA8)에 대해서 PLGA 나노입자의 선택적인 결합능력을 나타낸다.

도 3은 항암화학제 민감성 (HeyA8)과 항암화학제 내성 (HeyA8-MDR, MDR; multi-drug resistance) 세포에 대해서 도부타민 농도에 따른 종양세포의 독성을 나타낸다.

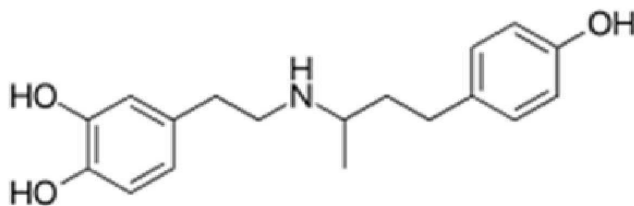
도 4는 항암화학제 민감성 (HeyA8)과 항암화학제 내성 (HeyA8-MDR, MDR; multi-drug resistance) 세포에 대해서 도부타민 농도에 따른 종양세포내의 YAP 유전자 억제를 나타낸다.

도 5는 도부타민이 탑재된 PLGA 나노입자를 주사 후에 항암치료 효능을 나타낸 도이다. IP는 복강주사, IV는 정맥주사를 나타내고, A는항암화학제 민감성 (HeyA8)의 항암치료 효능을 나타낸 것이고, B는 항암화학제 내성 (HeyA8-MDR, MDR; multi-drug resistance)의 항암치료 효능을 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0031] 본 발명은 화학식 1로 표시되는 도부타민 고분자를 포함하는 나노입자를 제공한다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0035] 상기 도부타민은 심장박동의 출력을 단기적으로 증가시키기 위하여 쓰는 교감 신경 흥분제로 심부전으로 인한 충격의 응급 치료시에 쓰이는 약물제제로서, 무색 내지 미황색의 투명한 액이든 무색 투명한 앰플 주사제이다. 본 발명에서 사용하는 도부타민은 수용성 일 수 있다.

[0037] 상기 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide), 폴리프로필렌옥사이드(poly(propylene oxide), 엔-옥틸트리에틸렌글라이콜에테르(n-octyltriethylene glycol ether, 8E3) 및 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 가장 바람직하게는 락타이드와 글라이콜라이드의 단량체의 공중합체로 구성된 고분자인, PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))일 수 있다.

[0039] 상기 도부타민 및 고분자를 포함하는 나노입자에 히알루론산을 결합시킨 나노입자 복합체를 제공할 수 있다.

- [0041] 본 발명의 나노 복합체는 계면활성제와 같은 양친매성 고분자를 이용하여 나노-유화 약물 전달 시스템(nanoemulsifying drug delivery system(NEDDS))의 방법으로 제조할 수 있으며, 상기 양친매성 고분자는 소듐콜레이트(sodium cholate), 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), Span 20(Sorbitan Monolaurate), Span 60(Sorbitan Monostearate), Span 80(Sorbitan Monooleate), Tween 20(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate), Tween 60(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monostearte), Tween 80(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate) 또는 DPG(dipotassium glycyrrhizinate)일 수 있으며, 바람직하게는 PVA (Polyvinyl alcohol)이다.
- [0043] 본 발명은 상기 나노 입자 또는 나노 복합체를 유효성분으로 포함하는 함암제에 대한 다중약물내성 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0045] 상기 나노입자 또는 나노입자 복합체는 정제, 과립제, 환제, 캡셀제, 액제, 주사제, 연고제, 좌제 및 산제로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 제형으로 제형화 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 주사제형일 수 있다.
- [0047] 상기 나노입자 또는 나노입자 복합체는 일반적인 암세포 및 다중약물내성 암세포에서 세포독성을 나타낼 수 있다.
- [0049] 본 발명의 나노 입자 또는 나노 복합체는 YAP의 비활성화를 유도하고, 이에 따라 YAP의 비활성화됨에 따라 각종 종양형성 유전자를 촉진시키는 현상을 감소시키는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0051] 상기 다중약물내성 암세포는 항암제 구조에 상관없이 비 특이적인 내성을 획득한 암세포인 것일 수 있다.
- [0053] 상기 암세포는 대장암(colon cancer), 방광암(bladder cancer), 난소암(ovarian cancer), 위암(gastric cancer), 폐암(lung cancer), 전립선암(prostate cancer), 췌장암(pancreatic cancer) 및 대장직장암(colorectal cancer)으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 것일 수 있으며, 가장 바람직하게는 난소암 일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 조성물은 암의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0057] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 나노입자의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0058] i) 도부타민 및 고분자를 균일하게 혼합하여 1차 에멀전을 형성하는 단계; 및
- [0059] ii) 상기 1차 에멀전을 양친매성 고분자와 혼합하여 2차 에멀전을 형성하는 단계;
- [0060] 상기 도부타민은 수용성이다.
- [0061] 상기 고분자는 폴리에틸렌글리콜(polyethyleneglycol, PEG), 폴리에틸렌옥사이드(poly(ethylene oxide), 폴리프로필렌옥사이드(poly(propylene oxide), 엔-옥틸트리에틸렌글라이콜에테르(n-octyltriethylene glycol ether, 8E3) 및 PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상 일 수 있으며, 가장 바람직하게는 락타이드와 글라이콜라이드의 단량체의 공중합체로 구성된 고분자인, PLGA(Poly(lactic acid-co-glycolic acid))일 수 있다.
- [0063] 상기 고분자는 유기상용매에 용해되어 있을 수 있으며, 상기 유기상용매는 클로로포름일 수 있다.
- [0065] 본 발명의 나노 복합체는 계면활성제와 같은 양친매성 고분자를 이용하여 나노-유화 약물 전달 시스템(nanoemulsifying drug delivery system(NEDDS))의 방법으로 제조할 수 있으며, 상기 양친매성 고분자는 소듐콜레이트(sodium cholate), 소듐 디옥시콜레이트(sodium deoxycholate), Span 20(Sorbitan Monolaurate), Span 60(Sorbitan Monostearate), Span 80(Sorbitan Monooleate), Tween 20(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate), Tween 60(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monostearte), Tween 80(Polyoxyethylene(20) Sorbitan Monolaurate) 또는 DPG(dipotassium glycyrrhizinate)일 수 있으며, 바람직하게는 PVA (Polyvinyl alcohol)이다.
- [0067] 본 발명은 상기 ii)단계의 나노분자의 표면에 히알루론산을 결합시키는 단계를 추가할 수 있다.
- [0068]
- [0069] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험 예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0071] **실시예 1. 도부타민 나노입자의 제조**

[0073] 도부타민 나노입자를 제조하기 위하여, W/O/W의 2차 에멀전 방법으로 제작되며 유기용매를 증발시켜 나노입자를 제조한다. 첫 번째 물상인 도부타민 용액 (50mg/ml, 5%)을 PLGA (50 : 50, 2.5 mg/ml, Sigma Aldrich)가 용해되어 있는 클로로포름 (>99.5 %, 2ml, Bio basic) 유기용매상과 섞어 초음파분쇄기 (Time : 30 sec, purse on : 5 sec, purse off : 3 sec, AMP : 20%) 를 이용하여 물상과 유기 용매상을 균일하게 섞어 1차 에멀전을 형성한다. 형성된 1차 에멀전(W/O)을 히알루론산 (10 mg/ml, TOKYO CHEMICAL INDUSTRY)이 용해되어 있는 폴리비닐알콜 (PVA\_hyaluronic acid) 1% 수용액에 섞어 초음파 분쇄기를 이용해 2차 에멀전을 제조한다. 형성된 2차 에멀전을 증발기를 이용하여 클로로포름을 증발시킨다. 증발 후 남은 나노입자를 원심분리기를 이용하여 모으고 이를 물로 2번 세척하여 준다. 그 후 남은 pellet을 수용액에 섞어서 이용한다.

[0075] **실험예 1. 도부타민 나노입자의 물리적 특성**

[0077] 상기 실시예 1에서 제조한 도부타민 나노입자의 크기를 광산란장치를 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 1A에 나타내었다. 도 1A에 나타난 바와 같이, 도부타민 나노입자의 크기는 250nm임을 확인하였다. 또한, 나노입자에 담지된 도부타민의 적재효율(loading efficiency)을 UV 분광 광도계를 이용하여 280 nm의 흡광 파장에서 측정하고 이를 도 1B에 나타내었다.

[0079] **실험예 2. 도부타민 나노입자의 세포내 전달효율**

[0081] PLGA 나노입자의 표면에 히알루론산을 결합시켜 종양세포 표면에서 발현되는 CD44 수용체에 선택적인 결합을 나타내는 도이다. 도 2A는 난소암세포주 (A2780)으로서 CD44 수용체의 발현이 적은 negative expression을 나타낸다. 도 2B는 난소암세포주 (HeyA8)으로서 CD44 수용체의 발현이 높은 positive expression을 나타낸다. 도 2C는 CD44 negative cell line (A2780)에서 PLGA 나노입자의 결합능력을 나타낸다. 도 2D는 CD44 positive cell line (HeyA8)에 대해서 PLGA 나노입자의 선택적인 결합능력을 나타낸다. 유세포 분석기와 공초점 레이저 분석기를 통하여 측정하여 CD44 양성 발현 세포에서 히알루론산이 결합되어 있는 PLGA 나노입자의 세포내로의 높은 전달력을 확인한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0083] **실험예 3. 도부타민의 세포 독성 확인**

[0085] 본 발명의 도부타민이 암세포의 생존에 미치는 영향을 확인하기 위하여 도부타민을 인간 난소암 세포주인 HeyA8, HeyA8-MDR에 각각 10  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 30  $\mu$ M 및 100  $\mu$ M씩 처리하고, 24 시간마다 MTT 분석을 통하여 세포 독성을 측정하였으며, 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에 나타난 바와 같이, 도부타민의 농도가 증가할수록 세포 독성이 증가하며, 항암 효과가 높아지는 경향을 확인하였다.

[0087] **실험예 4. 종양세포에서 도부타민의 YAP발현 억제 확인**

[0089] 종양세포에서 도부타민의 YAP의 활성을 조절하는지 알아보기 위해, 세포를 nucleus 및 cytosol로 분리한 뒤 각각 웨스턴 블랏을 실행하였다. 그 결과, 종양세포주인 HeyA8, HeyA8-MDR 세포에 도부타민을 처리하면, YAP의 phosphorylation을 유도하고, 이에 의해 핵에서 세포질로의 이동을 촉진하고, 결과적으로 Yap의 비활성화를 유도한다는 것을 확인한 하였다 (도 4).

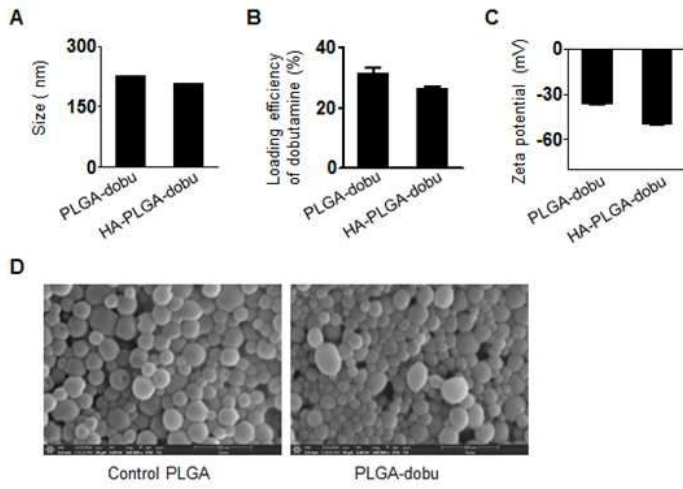
[0091] **실험예 5. 도부타민 나노입자의 항암 치료 효과 확인**

[0093] 도부타민의 항암 치료 효과를 확인하기 위하여, 인간 난소암 세포주인 HeyA8과 HeyA8-MDR을 누드마우스에 직접 주사하여 종양모델을 제작하고, 상기 도부타민 200 $\mu$ g이 탑재되어있는 나노입자를 마우스에 정맥 또는 복강에 주사하였다. 실험 종료 시점은 대조군 마우스가 죽기 직전으로 하였다. 실험 종료 시점에 각각의 마우스의 무게와 종양 조직을 적출하여 무게를 측정하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 도부타민을 탑재한 PLGA 나노입자가 종양의 크기를 감소시키는 것을 확인하여 치료효과가 있는 것을 확인하였다. 또, 마우스의 체중에 변화가 없는 것을 통해 생체적합한 나노입자라는 것을 확인 할 수 있었다.

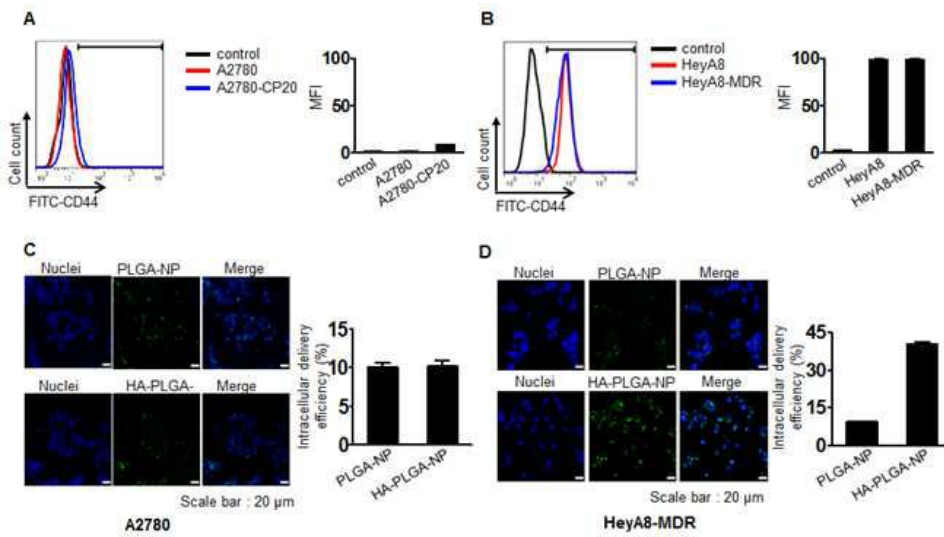


도면

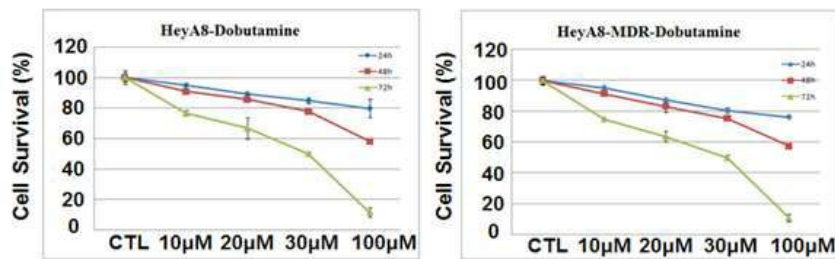
도면1



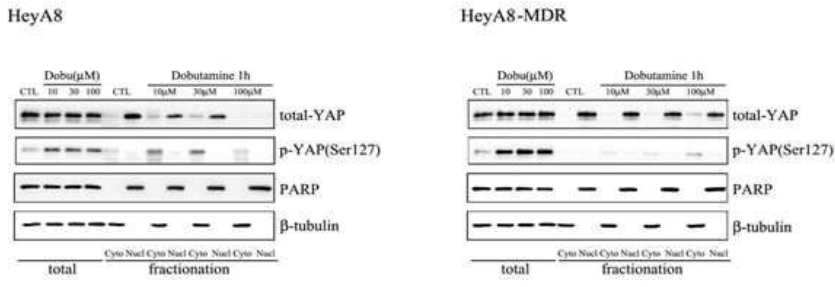
도면2



도면3



도면4



도면5

