

폐 전이 암에 대한 Lipid Coated Polymeric Nanoparticles에 관한 연구

박준영^{1*}, 박상효^{2*}, 조예림¹, 정민지², 김인우², 강원준¹, 이재홍²

¹연세대학교 의과대학 신촌세브란스병원 핵의학과 · ²연세대학교 보건과학대학 의공학부

Study of Lipid Coated Polymeric Nanoparticles for Lung Metastasis

Junyoung Park^{1*}, Sanghyo Park^{2*}, Yerim Jo¹, Minji Jeong²,
Inwoo Kim², Wonjun Kang¹ and Jaehong Key²

¹Department of Nuclear Medicine, Severance Hospital, Yonsei University College of Medicine

²Department of Biomedical Engineering, College of Health Sciences, Yonsei University

(Manuscript received 29 March 2018 ; revised 28 May 2018 ; accepted 26 June 2018)

Abstract: Lung cancer and pulmonary metastasis are the leading cause of cancer mortality worldwide. Survival for patients with lung metastases is about 5%. Nanoparticles have been developed for the imaging and treatment of various cancers, including pulmonary malignancies. In this work, we report lipid coated polymeric nanoparticles (LPNs) with an average diameter of 154 nm. In vivo performance of LPNs was characterized using optical imaging system. We expect this nanoparticle can be used for finding lung cancer or lung metastasis. Eventually loading therapeutic drug with the nanoparticle will be utilized for cancer diagnosis and effective therapy at the same time.

147

Key words: Lung cancer, Lung metastasis, Lipid coated polymeric nanoparticles, Imaging

1. 서 론

미세먼지, 과체중, 신체 활동 부족, 흡연 및 고령화 사회로 인해 전세계적으로 암 발생률 및 사망률이 증가하고 있다. 그 중에서도 특히 폐암의 발생률은 전체 암 발생률 중, 남성은 1위(16%), 여성은 3위(8.8%)이고, 사망률은 남성은 1위(23.6%), 여성은 2위(13.8%)로 매우 높은 수치를 나타낸다[1]. 폐암은 증상이 초기에 나타나지 않아 조기 진단이 어렵고, 폐암 전이가 진행됨에 따라 효과적인 치료방법이 없어 진단과 치료에 많은 어려움이 있다 [2]. 암 치료의 주된 방법은 외과적 치료, 방사선 치료, 항암화학요법이 주를 이

루고 있다. 가장 대표적인 항암 화학제의 경우 정상세포와 암세포의 구분없이 비특이적으로 체내에 분포함으로써 암세포를 죽일 수 있는 충분한 양의 약물 농도를 얻기 어려우며 동시에 정상세포에 미치는 독성으로 인해 부작용이 발생해 효과적인 치료가 이루어지지 못하고 있다[3,4]. 이러한 문제점을 개선시키기 위해 나노 입자를 이용한 약물전달시스템이 활발히 연구되고 있다[5]. 나노 입자를 활용하면 항암제만 투여했을 때 보다 특정 세포에 특이적으로 약물을 전달할 수 있기 때문에 충분한 양의 약물 농도를 얻어 효과적으로 치료가 가능하며 부작용도 줄일 수 있다[6]. 예를 들어, Huan Meng et al. 의 연구는 대표적인 항암제 Doxorubicin을 단독으로 투여하는 것보다 나노 입자에 적재하여 투여하는 것이 치료 효과가 더 높은 것으로 보고하였다[7]. 또한, 나노 입자를 활용하면 약물의 안정성 향상, 친유성 및 친수성 약물 모두를 운반 할 수 있다는 장점이 있으며, 현재 나노 입자를 활용해 임상에서 치료용으로 사용하고 있다[8,9]. 나노 입자가 암세포에 전달되는 메커니즘은 Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect로 설명되어진다[10]. EPR effect란 Solid tumor에서의 신생 혈관의 높

*Contributed equally to this work.

Corresponding Author : Jaehong Key

Department of Biomedical Engineering, Yonsei University,
1 Yonseidaegil, Wonju, Gangwon-do, 220-710, South Korea
TEL: +82-33-760-2587

E-mail: jkey@yonsei.ac.kr

이 연구는 2017년도 정부(미래창조과학부)의 재원으로 한국연구재단(No. 2018R1D1A1B07042339), 바이오의료기술개발사업(2016-M3A9B4919711), 2018학년도 연세대학교 원주캠퍼스 미래선도연구사업(2018-62-0054)의 지원을 받아 수행된 연구임.

은 혈관 밀도와 tumor의 혈관벽에 존재하는 내피세포의 간극이 넓은 특성에 따라 macromolecule의 축적이 용이한 특성을 나타낸다. 이를 이용하면 나노 입자를 활용한 anticancer therapy가 가능하게 된다[11]. 한편, 20-200 nm의 크기인 나노 입자가 이러한 EPR effect에 효과적이라고 보고되어 있다[12]. 본 연구팀에서 보고한 lipid nanoparticle은 이러한 EPR effect를 이용하여 암세포 주변에 효과적으로 축적될 수 있고, 암 진단 및 치료용으로 활용될 수 있는 가능성을 보고하였다[13-15]. 한편, 이러한 입자가 폐 전이 암 모델에서의 활용도에 대해 평가된 적이 없다. 따라서 본 연구에서는 폐 전이 암 모델에서의 lipid nanoparticle의 활용 가능성에 관해 실험하였다.

본 연구에서는 Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA)를 이용하여 나노 입자를 합성하였고, positron emission tomography (PET) 진단에 사용되는 zirconium-89 (⁸⁹Zr, t_{1/2} = 78.41 h)을 표지하기 위하여 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-deferoxamine (DFO-DSPE)를 사용하였다 [16]. 이러한 입자의 체내 분포와 폐 전이 암에 대한 약물 전달체로서의 가능성을 평가하기 위해서 Cyanine 5.5 (Cy5.5)를 입자에 로딩하였다. 입자의 안정한 정도와 입자가 얼마나 균일하게 형성되었는지를 나타내는 지표인 polydispersity index (PDI)를 통해 입자의 안정성을 평가하였다[17]. 이외에도 생성한 나노 입자가 실제 암 조직에 축적이 되는지 알아보기 위해 squamous cell carcinoma 7-green fluorescent protein (SCC7-GFP) 편평 상피 암세포를 이용하여 폐 전이 암 모델을 준비하였고, 입자의 축적률을 평가하였다.

II. 연구방법

1. Materials

입자를 구성하는 Resomer RG 504 H, Poly (D,L-lactide-co-glycolide) (PLGA) (acid terminated, lactide:glycolide 50:50, Mw 38,000-54,000) (719900 ALDRICH, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA), Poly (ethylene glycol) dimethacrylate (PEG) (average Mn 750) (437468 ALDRICH, SIGMA-ALDRICH Co, Saint Louis, MO, USA), 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine-deferoxamine (DFO-DSPE), Cyanine 5.5 NHS ester (Cy5.5) (27020, LUMIPROBE Co, Hunt Valley, FL, USA)를 구매하여 합성을 진행하였다.

2. DFO-LPNs 생산공정

나노 입자는 Nanoprecipitation method를 활용하여 합성하였다[15]. PEG solution (1.33 mM, 증류수 용매), DFO-DSPE solution (133 mM, CHCl₃+MeOH 용매),

water 2.5ml을 혼합한 후 probe type sonicator를 사용하여 homogenization하였다. 이러한 혼합액에 PLGA solution (3.23μM, CHCl₃ 용매)을 drop-let 방식으로 넣었다. 이 혼합물을 상온에서 교반하면서 유기 용매를 증발시킨 후, 나노 입자를 염색하기 위해 Cy5.5를 추가하였다. Overnight 교반 후, 원심 분리시켜 상층액을 제거하여 불순물과 나노 입자를 분리하였다.

3. DFO-LPNs의 특성 분석

이 연구에서 Zeta sizer (Nano zs90, Malvern Instruments, UK)를 이용하여 나노 입자의 평균 크기, 표면 전하(zeta potential), PDI 를 측정하였다. 이러한 특성 외에도 Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR)을 이용하여 PLGA, PEG, DFO-DSPE가 실제로 합성한 나노 입자에 존재하는지 알아보았으며, Transmission electron microscopy (TEM)을 이용하여 DFO-DSPE가 실제로 합성한 나노 입자의 표면에 존재하는지 알아보았다.

4. SCC7-GFP 세포 및 배양

암세포 배양은 10% fetal bovine serum (FBS, GibcoBRL Co., USA)과 1%의 페니실린-스트렙토마이신, minimal essential medium (MEM) (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) 을 혼합하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

5. 실험동물

본 연구에서 실시한 동물실험은 연세의료원 동물실험 윤리위원회의 승인(승인번호: 2015-0046)을 받았으며, 실험동물의 관리와 사용에 관한 관리규정을 준수하였다. 실험 동물은 7주령의 암컷 Balb/c 누드마우스를 (주)오리엔트(성남, 한국)으로부터 구입하였다. 실험동물실에서 1주일동안 사육하여 안정화 시킨 후 상태가 양호한 5마리를 선별하여 실험하였다. SCC7-GFP 세포를 1 × 10⁷ 개/ml로 희석한 후 30 gauge 1/2 바늘을 이용하여 Balb/c 누드마우스의 꼬리정맥 내에 0.1 ml를 주사하였다. 종양세포 주입 후 14일째 미세 전산화단층촬영(micro-computed tomography, micro-CT) (NFR Polaris-G90, NanoFocus Ray Co., JeonJu, Korea)을 이용하여 종양의 해부학적 위치를 확인하였다. 통계적 유의성을 위해 모든 경우에 대하여 3회 반복 실험하였다.

6. 소동물 광학 생체영상

폐 전이 종양 마우스에서의 광학 생체 영상은 IVIS® spectrum imaging systems (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA)을 사용하여 획득하였다. 폐 전이 종양 마우스를 2% isoflurane으로 호흡 마취시킨 후, 1 mg/

ml으로 희석된 Cy5.5-DFO-LPNs 100 μ l (n = 3)를 꼬리 정맥을 통하여 주사하였다. 주사 후 6시간 및 24시간 경과 후, 마우스에서 혈액, 간, 심장, 폐, 비장, 신장, 근육을 적출한 후 발광 영상을 획득하였다. 획득한 영상자료는 Living Imaging Software version 4.4 (Caliper Life Science)를 이용하여 분석하였다. 정량분석을 위하여 각 장기 별로 관심 영역(Region of interest)을 설정 한 후, 관심 영역 내에서 발생하는 광자방출량을 radiant efficiency ($[\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{sr}]/[\mu\text{W}/\text{cm}^2]$)로 측정하여 분석하였다.

III. 연구결과 및 고찰

1. DFO-LPNs의 물리적 특성

그림 1A는 합성한 나노 입자가 어떤 구조로 결합되어 있는지를 나타내는 모식도이다. 일반적으로 PLGA와 PEG는 자기 조립(self-assembly) 형태로 결합하며, sonication을 해주는 이유는 물과 유기용매를 잘 혼합하기 위함이다. 또, 이 모든 과정은 water 상에서 진행하기 때문에 DFO-DSPE의 hydrophilic 성질을 띠고 있는 head 부분이 바깥 쪽을 향하며, 반대로 hydrophobic 성질을 띠고 있는 tail 부

분은 안쪽을 향하게 된다. 그림 1B는 DFO-LPNs 나노 입자의 평균 크기 및 분포도와 zeta potential, PDI 값의 크기를 나타내었다. DFO-LPNs의 평균 크기는 154.1nm, zeta potential은 -30.1 mV로 음전하를 띠고 PDI는 0.191

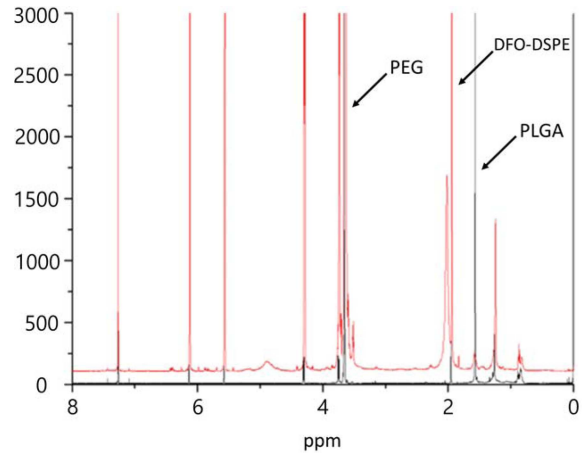


그림 2. NMR 결과 (빨간 선 : DFO-LPNs, 검은 선 : LPNs).
Fig. 2. Result of NMR (red line : DFO-LPNs, black line : LPNs).

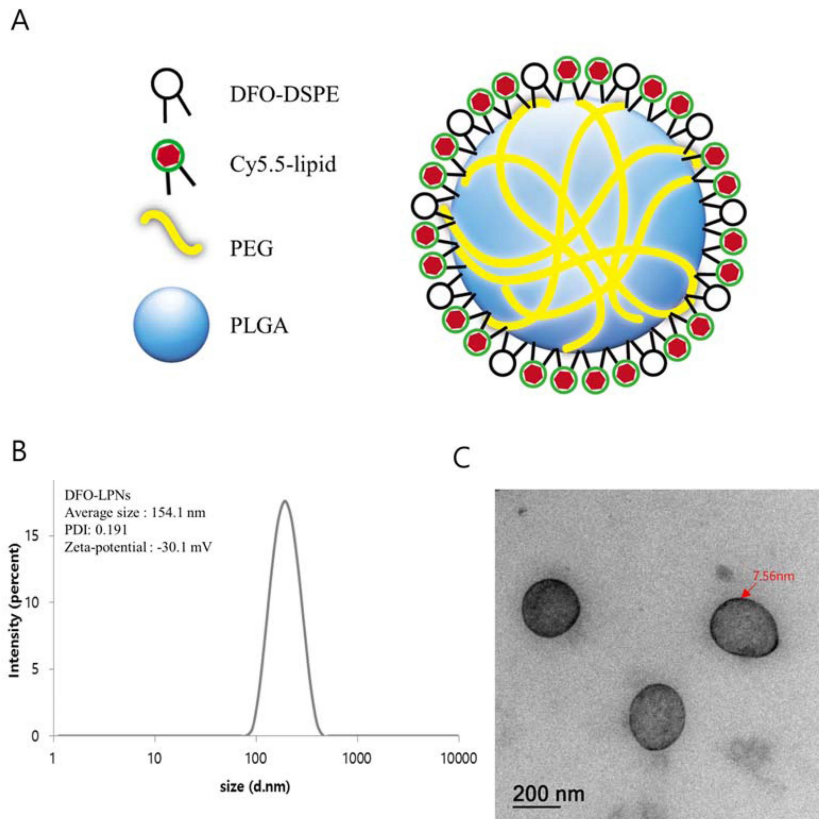


그림 1. 나노 입자의 크기 분석(A. 나노 입자의 모식도, B. Dynamic light scattering (DLS) 결과, C. TEM 결과).
Fig. 1. Size analysis of DFO-LPNs (A. schematic illustration of DFO-LPNs, B. result of Dynamic light scattering (DLS), C. result of TEM).

이다. PDI가 0.1 이하에 대해서는 입자가 monodisperse하다고 정의하고, 0.1 이상에서는 polydisperse하다고 알려져 있다. 예를 들어, Masarudin et.al의 연구에서 PDI가 작을 수록 균일하게 분포된 나노 입자를 Atomic Force Microscopy (AFM) 에서 관찰하였고, PDI값이 0.5이상이면 aggregated nanoparticles로 보고하였다 [17]. 따라서 DFO-LPNs는 균일하게 분포하고 안정적으로 합성되었음을 알 수 있다. 그림 1C는 입자의 TEM 사진이다. DFO-DSPE가 나노 입자를 7.56nm의 두께로 코팅하고 있는 것을 확인할 수 있다.

그림 2는 DFO-LPNs의 NMR spectrum을 나타내었다. 그래프에서 PLGA는 1.6 ppm, PEG는 3.65 ppm, DFO-DSPE는 2.0 ppm에서 피크가 나타난다. 따라서, DFO-LPNs는 나노 입자를 구성하는 PLGA, PEG, DFO-DSPE를 모두 함유하고 있는 것으로 확인되었다.

2. 폐 전이 종양 마우스 모델

꼬리 정맥 내 SCC7-GFP 세포를 주입한 후 14일의 사육 후 micro-CT를 이용하여 종양의 해부학적 위치를 확인한 결과 대조군에서는 전혀 종양 형성이 이루어지지 않았으나, SCC7-GFP 세포를 주입한 실험군에서는 폐 내 종양의

형성을 관찰할 수 있었다(그림 3). 타 장기로의 전이 여부를 확인하기 위하여 안락사 시킨 후 해부를 시행하여 주요 장기를 채취 후 IVIS® spectrum을 이용하여 GFP의 발현(Excitation: 465/Emission: 520)을 획득 하였다. Ex vivo 영상에서 혈액, 간, 심장, 비장, 신장, 근육에서는 GFP 발현이 관찰되지 않았으나 폐에서만 GFP 발현이 관찰되었다. 정상 마우스모델과 비교하였을 때 폐 전이 종양 마우스모델에서만 폐에서 GFP 발현이 관찰되어 폐 전이가 성공적으로 진행된 것을 확인할 수 있었다(그림 4).

3. DFO-LPNs의 생체분포

폐 전이 종양 모델을 이용하여 DFO-LPNs의 생체 분포를 평가하였다. DFO-LPNs에 Cy5.5를 표지 후 폐 전이 종양 마우스에 100 µg의 Cy5.5-DFO-LPNs를 정맥 내 주사하였고, 6시간과 24시간 경과 후 주요 장기를 적출하여 광학 영상을 획득하였다(그림 5A). 주요 장기의 ex vivo imaging에서 Cy5.5-DFO-LPNs는 간에 가장 많이 축적되었다는 것을 확인할 수 있었다. 폐에서의 광자방출량을 radiant efficiency ($[\text{photons}/\text{sec}/\text{cm}^2/\text{sr}]/[\mu\text{W}/\text{cm}^2]$)로 변환하여 측정된 결과에서는 투여 후 6시간에 8.2 ± 2.5 에서 24시간 후 6.5 ± 1.7 로 감소하였으나, 간에서의 형광량은 투여 후 6시간에 30.5 ± 4.5 에서 24시간 후 41.7 ± 5.6 으로 증가하였다(그림 5B). 비장에서는 투여 후 6시간에 3.1 ± 0.2 에서 24시간 후에도 2.9 ± 0.1 로 큰 변화 없이 일정량을 유지하였다.

Cy5.5-DFO-LPNs 투여 후 24시간에 IVIS® spectrum을 이용하여 폐에서의 GFP의 발현과 Cy5.5의 형광(Excitation: 675/Emission: 720) 영상을 획득 후 Living Imaging Software의 spectral unmixing tools를 활용하여 융합하였다(그림 6). 융합영상에서 GFP의 발현과 축적된 Cy5.5-DFO-LPNs에서 방출되는 Cy5.5의 형광의 분포가 유사한 것을 확인할 수 있었다.

IV. 결 론

본 연구에서는 긴 반감기를 가진 방사선 동위원소 ^{89}Zr 을 적재하기 위한 DFO-LPNs를 생산하였다. 합성한 나노 입자의 기본적인 특성인 평균 크기, 표면 전하, 안정성 정도를 측정된 결과 DFO-LPNs의 평균 크기는 154.1 nm로 EPR effect에 적합한 크기이고, zeta potential은 -30.1 mV, PDI는 0.191 이었다. 또한 NMR spectrum 분석을 통해 합성한 나노 입자가 PLGA, PEG, DFO-DSPE로 구성되었다는 점을 확인하였고, TEM의 영상에서 DFO-DSPE가 나노 입자에 7.56 nm의 두께로 코팅된 것을 확인하였다.

폐 전이 종양 마우스모델을 micro-CT를 통해 종양의 형성

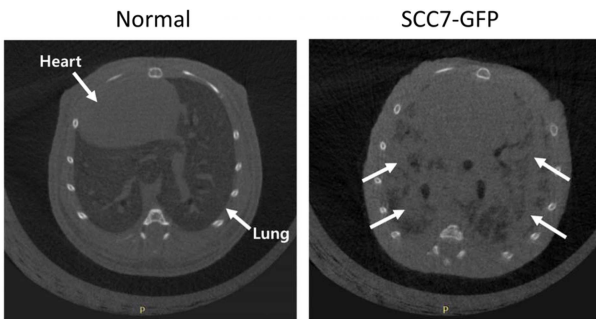


그림 3. Micro-CT를 이용한 정상 폐와 폐 전이 암의 영상.
Fig. 3. Normal lung and lung metastasis image by micro-CT.

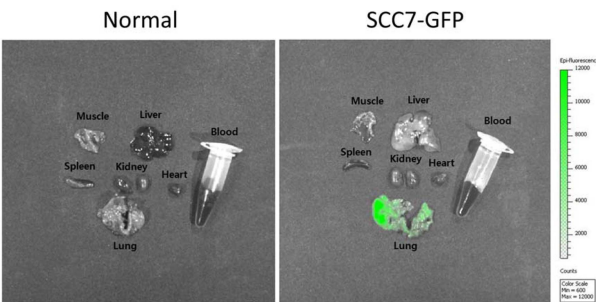


그림 4. IVIS® 스펙트럼을 이용한 정상 및 암 전이 주요장기들의 GFP 발현 영상.
Fig. 4. GFP expression image in major organs using the IVIS® spectrum.

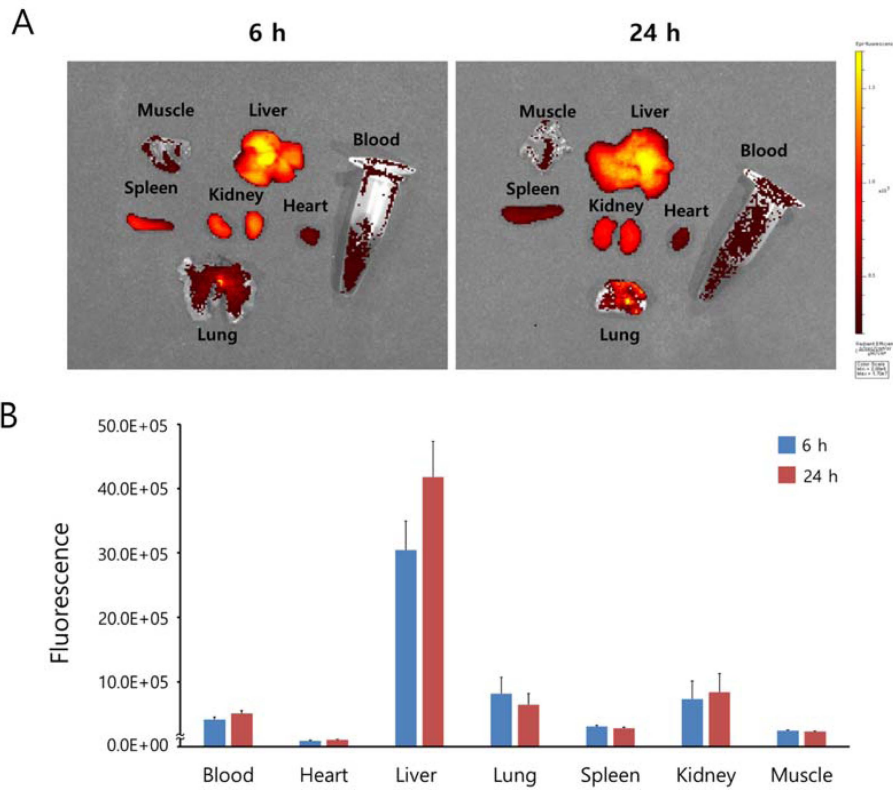


그림 5. SCC7-GFP 종양을 가진 마우스의 절개된 기관에 대한 체외 광학 영상 (A. Cy5.5-DFO-LPNs 정맥 주사 후 6시간, 24시간 후 마우스의 절개된 기관에 대한 IVIS® 영상, B. 절개된 기관의 형광 정량화).
 Fig. 5. Ex vivo optical imaging of SCC7-GFP tumor-bearing mice (A. Representative IVIS® images at 6 h and 24 h after intravenous injection of Cy5.5-DFO-LPNs, B. Fluorescence quantification, expressed as the radiant efficiency ± standard deviation (SD)).

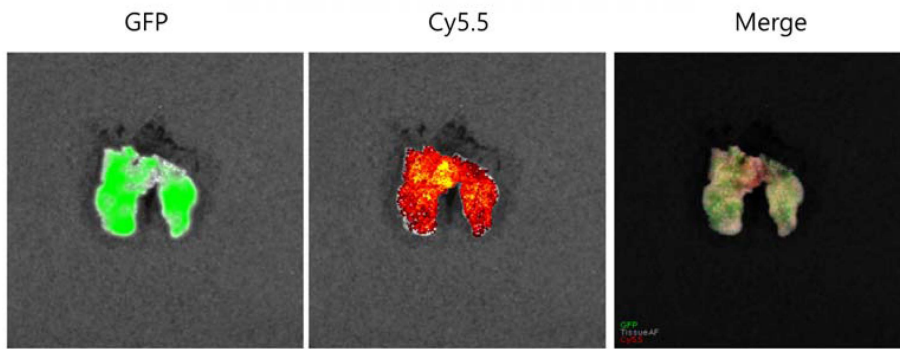


그림 6. Cy5.5-DFO-LPNs 주입 6시간 후의 해부된 폐 조직의 체외 광학 영상.
 Fig. 6. Representative ex vivo optical imaging of lung tissue 6h after intravenous injection of Cy5.5-DFO-LPNs.

을 관찰하였다. 타 장기로의 전이 여부를 IVIS® spectrum을 이용해 GFP의 발현을 확인해 본 결과 혈액, 간, 심장, 비장, 신장, 근육에서는 GFP 발현이 관찰되지 않았으며 폐에서만 GFP 발현이 관찰되어 폐 전이 종양 마우스모델이 확립되었음을 확인할 수 있었다.

폐 전이 종양 마우스모델에 Cy5.5-DFO-LPNs를 투여 후 6시간과 24시간 경과 후 주요 장기를 적출하여 영상을 확

득하였다. 주요 장기 중 간에 가장 많이 축적이 된 것을 확인할 수 있었다. 폐에서는 6시간 후에 8.2 ± 2.5 에서 24시간 후 6.5 ± 1.7 로 감소하였으나, 간에서의 형광량은 투여 후 6시간에 30.5 ± 4.5 에서 24시간 후 41.7 ± 5.6 으로 증가하였다. IVIS® spectrum을 이용하여 관찰한 영상을 보면 폐의 암 조직에서 발현하는 GFP와 Cy5.5-DFO-LPNs에서 발현하는 Cy5.5의 위치가 유사한 것을 확인할 수 있었다.

기존 나노 입자에 관한 선행 연구에 따르면 Free Cy5.5 역시 암 주변에 축적되는 것으로 보고되어 있지만 나노 입자를 통해 전달된 Cy5.5의 경우, EPR effect로 인하여 약 3.8배에서 13배 더 많은 양이 암 주변 및 암세포에 축적된 것으로 보고되었다[18,19]. 또한, 본 연구팀의 선행 연구에서 폐 전이 암이 형성되지 않은 모델과 본 연구에서의 폐 전이 암 모델의 실험결과를 바탕으로 비교하였을 때, 간 대비 폐의 축적률이 약 7.6% 더 높은 것을 확인할 수 있었다[13,14]. 따라서, 본 연구의 LPNs는 Lung metastasis에 대한 약물 전달체로서의 활용 가능성을 나타내었다.

따라서 본 연구결과를 바탕으로 DFO-LPNs는 방사선 영상을 이용한 폐 질환 진단 및 치료를 위한 나노 입자로 평가될 계획이다.

참고문헌

- [1] L.A. Torre, F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal, "Global cancer statistics, 2012," *CA Cancer J Clin*, vol. 65, pp. 87-108, 2015.
- [2] F.R. Hirsch, W.A. Franklin, A.F. Gazdar, and P. A. Bunn, Jr., "Early detection of lung cancer: clinical perspectives of recent advances in biology and radiology," *Clin Cancer Res*, vol. 7, pp. 5-22, 2001.
- [3] L. Brannon-Peppas and J.O. Blanchette, "Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, pp. 206-212, 2012.
- [4] S.S. Feng and S. Chien, "Chemotherapeutic engineering: Application and further development of chemical engineering principles for chemotherapy of cancer and other diseases," *Chemical Engineering Science*, vol. 58, pp. 4087-4114, 2003.
- [5] T.M. Allen and P. R. Cullis, "Drug delivery systems: entering the mainstream," *Science*, vol. 303, pp. 1818-22, 2004.
- [6] O.C. Farokhzad and R. Langer, "Impact of nanotechnology on drug delivery," *ACS Nano*, vol. 3, pp. 16-20, 2009.
- [7] H. Meng, M. Xue, T. Xia, Z. Ji, D.Y. Tarn, J.I. Zink, et al., "Use of size and a copolymer design feature to improve the biodistribution and the enhanced permeability and retention effect of doxorubicin-loaded mesoporous silica nanoparticles in a murine xenograft tumor model," *ACS Nano*, vol. 5, pp. 4131-44, 2011.
- [8] M.E. Davis, Z.G. Chen, and D.M. Shin, "Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer," *Nat Rev Drug Discov*, vol. 7, pp. 771-82, 2008.
- [9] V. Jennings, A. Gysler, M. Schafer-Korting, and S. H. Gohla, "Vitamin A loaded solid lipid nanoparticles for topical use: occlusive properties and drug targeting to the upper skin," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 49, pp. 211-218, 2000.
- [10] H. Maeda, J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura, and K. Hori, "Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review," *J Control Release*, vol. 65, pp. 271-84, 2000.
- [11] J. Fang, H. Nakamura, and H. Maeda, "The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect," *Adv Drug Deliv Rev*, vol. 63, pp. 136-51, 2011.
- [12] F. Danhier, "To exploit the tumor microenvironment: since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine?," *Journal of Controlled Release*, vol. 244, pp. 108-121, 2016.
- [13] S. Aryal, J. Key, C. Stigliano, J.S. Ananta, M. Zhong, and P. Decuzzi, "Engineered magnetic hybrid nanoparticles with enhanced relaxivity for tumor imaging," *Biomaterials*, vol. 34, pp. 7725-32, 2013.
- [14] S. Aryal, J. Key, C. Stigliano, M.D. Landis, D.Y. Lee, and P. Decuzzi, "Positron emitting magnetic nanoconstructs for PET/MR imaging," *Small*, vol. 10, pp. 2688-96, 2014.
- [15] C. Stigliano, J. Key, M. Ramirez, S. Aryal, and P. Decuzzi, "Radiolabeled Polymeric Nanoconstructs Loaded with Docetaxel and Curcumin for Cancer Combinatorial Therapy and Nuclear Imaging," *Advanced Functional Materials*, vol. 25, pp. 3371-3379, 2015.
- [16] G. Fischer, U. Seibold, R. Schirmmayer, B. Wängler, and C. Wängler, "89Zr, a radiometal nuclide with high potential for molecular imaging with PET: chemistry, applications and remaining challenges," *Molecules*, vol. 18, pp. 6469-6490, 2013.
- [17] M.J. Masarudin, S.M. Cutts, B.J. Evison, D.R. Phillips, and P.J. Pigram, "Factors determining the stability, size distribution, and cellular accumulation of small, monodisperse chitosan nanoparticles as candidate vectors for anticancer drug delivery: application to the passive encapsulation of [14C]-doxorubicin," *Nanotechnology, science and applications*, vol. 8, p. 67, 2015.
- [18] Y. Hao, Y. Huang, Y. He, J. Peng, L. Chen, X. Hu, et al., "The evaluation of cellular uptake efficiency and tumor-targeting ability of MPEG-PDLLA micelles: effect of particle size," *RSC Advances*, vol. 6, pp. 13698-13709, 2016.
- [19] S.S. Pedrosa, P. Pereira, A. Correia, and F.M. Gama, "Targetability of hyaluronic acid nanogel to cancer cells: In vitro and in vivo studies," *Eur J Pharm Sci*, vol. 104, pp. 102-113, 2017.