



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0118496
(43) 공개일자 2017년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C01B 31/04 (2006.01) *A61K 51/04* (2006.01)
B01J 19/10 (2006.01) *C07C 31/20* (2006.01)
G21H 5/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C01B 32/23 (2017.08)
A61K 51/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0046358

(22) 출원일자 2016년04월15일

심사청구일자 2016년04월15일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동)

(72) 발명자

장성찬

대전광역시 서구 도산로 11, 107동 301호 (도마동, 효성타운아파트)

허윤석

인천광역시 연수구 해돋이로84번길 30, 101동 1002호 (송도동, 송도금호어울림아파트)

노창현

대전광역시 유성구 은구비남로 56, 905동 601호 (노은동, 열매마을9단지)

(74) 대리인

김순웅

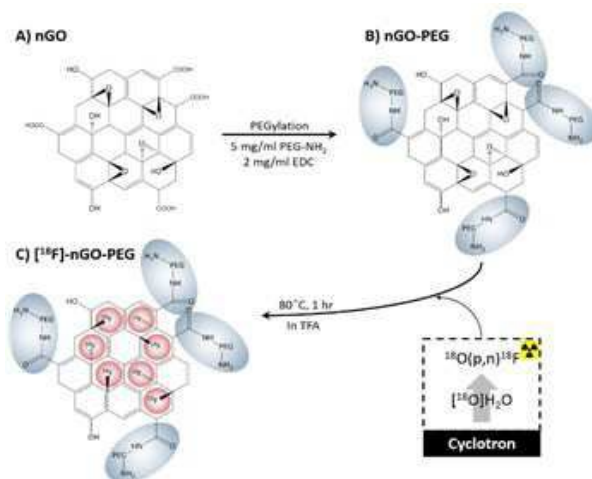
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 방사성 표지된, 고분자로 개질된 산화 그래핀 복합체 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 방사성 표지된, 고분자로 개질된 산화 그래핀 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 ^{18}F 로 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체는 생체 내 암세포에 특이적으로 흡수되며 생체 내에서 우수한 안정화 효과가 있다. 따라서, 상기 복합체는 종양 검출 및 암 진단을 위한 양전자방출단층촬영(PET; Positron Emission Tomography)과 같은 생체 내 핵의학 검사에 유용하게 이용할 수 있다. 또한 본 발명의 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체의 제조방법은 리간드를 사용하지 않고 직접적으로 그래핀에 방사성 핵종을 화학적으로 표지하는 바, 합성 단계가 간략하며 리간드에 의해 야기할 수 있는 부정적 효과를 방지하는 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 51/0474 (2013.01)

B01J 19/10 (2013.01)

C07C 31/20 (2013.01)

G21H 5/02 (2013.01)

C01P 2004/64 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711026896

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 대형연구시설공동이용활성화지원분야

연구과제명 방사성 할라이드 표지형 산화 그래핀 개발 및 이를 이용한 생물학적 평가

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방사성 표지는 ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N 및 ^{15}O 으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 방사성 표지는 ^{18}F 인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 산화그래핀은 나노입자 형태인 것을 특징으로 하는 복합체.

청구항 5

(1) 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 나노입자를 제조하는 단계; 및

(2) 상기 (1)단계의 나노입자를 방사성 표지하는 단계;를 포함하는,

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체의 제조 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 (1)단계는 초음파 처리에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (2)단계는 60~100℃의 온도에서 수행하는 것을 특징으로 하는 복합체의 제조방법.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 복합체를 포함하는, 핵의학 검사용 조영제.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 핵의학 검사용은 양전자방출단전자촬영(PET)용인 것을 특징으로하는 조영제.

청구항 10

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 복합체를 포함하는 종양검출용 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 종양은 혈액암, 대장암, 뇌암, 신경교종, 신경교육종, 역형성성상세포종, 수모세포종, 위암, 폐암, 소세포 폐암종, 자궁경부암종, 결장암, 직장암, 척삭종, 인후암, 카포시육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 결직장암, 자궁내막암, 난소암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 신장세포암종, 간암종, 담관암종, 음모막암종, 정상피종, 고환 종양, 율름종양, 유잉종양, 방광암종, 혈관육종, 내피육종, 선암종, 한선암종, 피지선암종, 유두암종, 유두선육 종, 낭선육종, 기관지암종, 수질암종, 비만세포종, 중피종, 활막종, 흑색종, 평활근종, 횡문근종, 신경모세포종, 망막모세포종, 췌지교종, 청신경종, 혈관모세포종, 수막종, 송과체종, 상의세포종, 두개인두종, 상피암종, 배아암종, 편평세포암종, 기저세포암종, 섬유육종, 점액종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육 종 및 백혈병으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 12

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 따른 복합체를 포함하는 종양검출용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 방사성 표지된, 고분자로 개질된 산화 그래핀 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적 으로는 ^{18}F 로 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

암은 주된 사망원인 중 하나로써, 암 치료를 위해 수술, 방사성 치료 및 화학 치료와 같은 다양한 치료 방법이 널리 사용되고 있다. 또한, 진단 방법으로 핵의학 검사 방법이 사용되기 시작했으며, 특히, 종양촬영용 양전자 방출단층촬영(PET; Positron Emission Tomography)은 제약회사의 신약제조뿐 아니라 높은 감도와 정량적인 정밀 도를 기반으로 임상 종양학에서 진단을 위해 널리 사용되고 있다. PET는 환자에게서 생화학적인 과정을 정량화 하기 위한 조영제로서 양전자를 방출하는 방사성 핵종으로 표지된 생활성 입자를 이용한다. 다만, PET 스캐너의 수요가 증가함에 따라 조영제의 생산이 수반되어야 하나, 고전적인 방법으로 합성되는 조영제는 생체 내에서 안정적이지 못해 PET 사용 수요를 만족시키지 못하는 실정이다. 따라서, 최근 PET를 이용한 암 진단에 이용할 개 선된 조영제에 대한 연구가 지속적으로 있어 왔다.

[0004]

그래핀은 흥미로운 물리적 특정을 가진 2차원 물질로, 2차 그래핀과 그의 나노 물질들은 PET촬영을 위한 조영제 를 포함하여 최근에 다양한 분야에서 관심의 대상이 되었다. 다만, 그래핀은 지용성 물질로 생체 내에서 잘 녹 지 않아 이를 보완하는 그래핀 산화물(graphene oxide)을 이용한 조영제 연구가 대두되었다.

[0005] 한편, 그래핀 산화물 연구를 통해 합성한 조영제는 생체 내 진단 이미징에 적용할 때 몇 가지 주의할 사항이 있다. 첫째, 수용성으로서 체내에서 잘 녹아야 하고, 둘째, 조영제로 사용되는 나노입자의 물리화학적 특징이 라디오메탈 킬레이터와 결합했을 때 변형되지 않으며, 셋째, 생체 내에서 금속 코어로부터 리간드가 해체되거나 금속이 생물적 유체들로 킬레이트화되는 것을 통해 라디오메탈 킬레이터와 나노입자와의 분리로 방사성 핵종과 나노물질 사이의 잘못된 결합을 유도하지 않고, 넷째, 생체 밖에서 형성된 결합이 생체 내에서도 계속 유지되어야 한다는 점이다.

[0006] 본 발명자들은 상기와 같은 사항을 고려하여 PET 촬영을 위한 새로운 조영제에 대한 연구를 계속하던 중, 안정적인 생체 내 이미징 적용을 위해 리간드에 의존하지 않는 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 제조하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국 특허 출원번호 제10-2010-0060373호
(특허문헌 0002) 한국 특허 출원번호 제10-2013-0110282호
(특허문헌 0003) 한국 특허 출원번호 제10-2014-0023295호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 핵의학 검사용 조영제를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 중앙검출용 조성물 및 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 (1) 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 나노입자를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 (1)단계의 나노입자를 방사성 표지하는 단계;를 포함하는, 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 핵의학 검사용 조영제를 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 중앙검출용 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 중앙검출용 키트를 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체는 생체 내 암세포에 특이적으로 흡수되며 생체 내에서 우수한 안정화 효과가 있다. 따라서, 상기 복합체는 종양 검출 및 암 진단을 위한 양전자방출 단층촬영(PET; Positron Emission Tomography)과 같은 생체 내 핵의학 검사에 유용하게 이용할 수 있다. 또한 본 발명의 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체의 제조방법은 리간드를 사용하지 않고 직접적으로 그래핀에 방사성 핵종을 화학적으로 표지하는 바, 합성 단계가 간략하며 리간드에 의해 야기할 수 있는 부정적 효과를 방지하는 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 그래핀 기본 골격에 산소가 결합된 형태(A; nGO), nGO가 PEG와 개질된 형태(B; nGO-PEG) 및 사이클로트론 장치에 의해 제조된 [^{18}F]-nGO-PEG의 구조(C)를 통해 [^{18}F]-nGO-PEG의 제조과정을 나타내는 도이다.

도 2는 nGO와 nGO-PEG의 주사투과전자현미경(TEM) 이미지를 나타내는 도이다.

도 3은 nGO와 [^{18}F]-nGO-PEG의 프리에변환 적외분광 분석(FTIR) 결과를 나타내는 도이다.

도 4는 nGO와 [^{18}F]-nGO-PEG의 X선 광전자 분광(XPS) 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 nGO와 nGO-PEG를 증류수, PBS, DMEM에 녹인 후 10^4 rpm으로 원심분리 시킨 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 nGO와 nGO-PEG가 세포 내 ROS 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 7은 MTT 분석법을 통하여 nGO-PEG 처리에 의한 MCF-7 암 세포의 세포 생존율 변화를 나타낸 도이다.

도 8은 쥐에서 정맥으로 [^{18}F]-nGO-PEG를 주입한지 15분이 경과한 후, CT-26 종양이 형성된 쥐의 PET 이미징을 통해 [^{18}F]-nGO-PEG의 생물학적 적용결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 제공한다.

[0023] 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명에 있어서, 그래핀은 탄소원자들이 2차원 상에서 sp^2 결합에 의한 벌집 모양의 배열을 이루면서 원자 한 층의 두께를 가지는 반금속성 나노 물질로, 일반적인 탄소 구조체에 비하여 넓은 비표면적($2,630 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$)을 가지고 있다. 또한, 본 발명에 있어서 산화그래핀은 그래핀을 산화시킨 물질로서, 본 발명의 일 실시예에 따라 변형된 휴머스 방법 등을 이용하여 제조될 수 있으며, 기존의 그래파이트보다 매우 큰 표면적을 가지며, 높은 전기전도도 및 강력한 기계적 강도를 가지는 물질이다.

[0025] 본 발명에 있어서 방사성 표지는 산화그래핀에 방사성 핵종을 표지하는 것을 말하며, 상기 방사성 핵종은 방사성 활성 붕괴(즉, 양전자 방출)를 나타내는 동위원소 및 방사성 활성 동위원소를 포함하는 방사성 표지제를 포함한다. 상기 방사성 동위원소는 바람직하게는 유기 용매, 예컨대, 극성 양성자성(aprotic) 용매에 용해될 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 방사성 표지는 ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O 등을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 ^{18}F 를 이용할 수 있다.

[0027] 상기 ^{18}F 는 109.7분의 반감기, I_{β^+} 는 97%, E_{β^+} 는 0.63 MeV인 물리적 성질을 가지고 있으며 낮은 β^+ 에너지는 고해상도의 스캔을 가능하게하고 상대적으로 낮은 반감기는 약물의 측정뿐 아니라 수백만 킬로미터를 넘어 ^{18}F -표지된 방사성물질의 수송을 가능하게 한다.

[0028] 본 발명에 있어서 산화그래핀은 나노입자 형태인 것이 바람직하다.

[0029] 본 발명에 따른 산화그래핀 복합체는 종양 세포를 이미징하는 방사성 핵종으로 표지하기 위해 생체적합적 중합

체인 폴리에틸렌 글리콜(PEG)로 개질되어 있는 바, 높은 안정성을 나타낸다.

- [0030] 본 발명에 있어서 PEG 또는 이의 유도체는 직선형 또는 가지형인 것을 사용할 수 있으며, 예를 들어 메톡시폴리에틸렌 글리콜 숙신이미딜 프로피오네이트(methoxyPEG succinimidyl propionate, mPEG-SPA), 메톡시폴리에틸렌 글리콜 N-히드록시숙신이미드(methoxyPEG N-hydroxysuccinimide, mPEG-NHS), 메톡시폴리에틸렌 글리콜 알데히드(methoxyPEG aldehyde, mPEG-ALD), 메톡시폴리에틸렌 글리콜 말레이미드(methoxyPEG maleimide, mPEG-MAL), 다중가지형 PEG 등이 포함되나, 이에 한정되지 않는다.
- [0031] 본 발명에 있어서 상기 PEG의 분자량은 1,000 ~ 40,000의 범위에서 선택되며, 바람직하게는 5,000 ~ 40,000의 범위에서 선택된 것을 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 본 발명은 또한, (1) 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 나노입자를 제조하는 단계; 및 (2) 상기 (1) 단계의 나노입자를 방사성 표지하는 단계;를 포함하는, 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 상기 (1) 단계는 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 나노입자를 제조하는 단계이다. 구체적으로는, 변형된 휴머스 방법에 의해 제조된 산화그래핀 나노입자를 폴리에틸렌글리콜(PEG)-NH₂와 반응시켜 수행될 수 있다. 상기 반응은 초음파 처리에 의해 수행되는 것이 바람직하다.
- [0035] 상기 (2) 단계는 (1) 단계에서 제조된 나노입자를 방사성 표지하는 단계이다. 구체적으로는 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 및 방사성 핵종을 60~100℃의 항온기에서 반응시켜 수행될 수 있다. 상기 방사성 핵종으로는 ¹⁸F, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O 등을 이용할 수 있으며 ¹⁸F를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0036] 본 발명에 따른 [¹⁸F]-nGO-PEG의 제조방법은 리간드의 도움 없이 방사성 표지된 입자들을 형성하면서 ¹⁸F 이온과 산화 그래핀을 단순히 혼합하는 방식으로, 합성 단계가 간략하며 리간드에 의해 야기할 수 있는 부정적 효과를 방지하는 장점이 있다.
- [0037] 본 발명의 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체는 생체 내 암세포에 특이적으로 흡수되며 생체 내에서 우수한 안정화 효과가 있어, 양전자방출단층촬영(PET; Positron Emission Tomography)과 같은 생체 내 핵의학 검사를 위한 조영제, 종양검출을 위한 조성물 등으로 이용될 수 있다.
- [0039] 따라서, 본 발명은 상기 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 핵의학 검사용 조영제를 제공한다.
- [0040] 상기 핵의학 검사의 종류는 이에 제한되지 않으나, 단일광자단층촬영(SPECT; Single Photon Emission Computed Tomography) 또는 양전자방출단층촬영(PET; Positron Emission Tomography) 등일 수 있으며, 양전자방출단층촬영인 것이 바람직하다.
- [0041] 상기 양전자방출단층촬영(PET)은 사이클로트론에서 생성된 동위 원소를 사용하는 정확하고 정교한 기술이다. 보다 구체적으로 양전자를 방출하는 방사성 핵종이 보통 주입에 의해 도입되고 표적 조직에 축적되는데, 그것이 붕괴됨에 따라 양전자를 방출하며, 이는 신속하게 근처의 전자와 결합하여 2개의 확인 가능한 감마선을 반대 방향으로 동시 방출한다. 이들이 PET 카메라에 의해 검출되어 이들의 기원에 대한 매우 정확한 정보를 제공한다. PET은 대부분의 암을 검출하고 평가하는 가장 정확한 비침습적 방법인 것으로 입증되었으므로 본 발명과 같이 방사성 표지제, 예를 들어 ¹⁸F를 추적자로 사용하는 그의 가장 중요한 임상적 역할은 종양학에 있다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 용어 "조영제"는 생체 내/외 표적을 검출하거나, 영상화할 수 있는 물질로 정의된다.
- [0043] 본 발명의 조영제는 인체에 대한 이미징에 매우 유용하다. 이미징 과정은 인간에게 조영제의 진단학적 유효량을 투여한 다음 가시적 이미지를 얻기 위하여 이미징을 실시하여 인체를 스캐닝함으로써 이루어진다.
- [0044] 본 발명의 조영제는 약제학적으로 허용되는 담체와 함께 투여될 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로오스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로오스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미

네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences(19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0045] 본 발명의 조영제는 비경구 방식으로 투여되는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육 내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있으며 더욱 바람직하게는, 정맥 내 주입으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조영제의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0046] 예를 들어, 본 발명의 조영제는 주사제로서 제제화될 수 있으며, 주사제로 제제화될 경우 혈액과 등장인 무독성 완충용액을 희석제로서 포함할 수 있으며, 예를 들어 pH 7.4의 인산완충용액 등이 있다. 상기 약제학적 조성물은 완충용액 이외에 기타 다른 희석제 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 이러한 주사제에 부가될 수 있는 부형제 및 첨가제는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 하기 문헌을 참조하면 알 수 있다(Dr. H.P. Fiedler "Lexikon der Hilfsstoffe für Pharmazie, Kosmetik und angrenzende Gebiete" [Encyclopaedia of auxiliaries for pharmacy, cosmetics and related fields])

[0048] 또한, 본 발명은 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는, 종양검출용 조성물 및 키트를 제공한다.

[0049] 상기와 같이 본 발명에 따른 방사성 표지된 본 발명의 산화그래핀 복합체는 EPR 효과(Enhanced Permeability and Retention; 일반 세포에 비해 암세포의 성장이 빨라 세포벽이 느슨한바, 이를 통해 암세포에 특정 물질이 많이 축적되는 원리)에 의해 여러 종양에 특이적으로 흡수가 되므로 체내에 들어가 종양을 영상화하여 예방, 진단 또는 치료에 이용되는 조성물 및 키트로 사용할 수 있다.

[0050] 상기 조성물은 또한 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체에 다른 화합물, 및 제약상 허용되는 담체 또는 희석제와 혼합된 것을 특징으로 한다.

[0051] 상기 조성물은 상기 조영제와 같이 비경구 방식으로 투여되는 것이 바람직하다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥 내 주입, 근육 내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두 개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있으며 더욱 바람직하게는, 정맥 내 주입으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0052] 상기 조성물은 또한 상기 조영제와 같이 주사제로서 제제화될 수 있으며, 주사제로 제제화될 경우 혈액과 등장인 무독성 완충용액을 희석제로서 포함할 수 있으며, 예를 들어 pH 7.4의 인산완충용액 등이 있다. 상기 약제학적 조성물은 완충용액 이외에 기타 다른 희석제 또는 첨가제를 포함할 수 있다. 이러한 주사제에 부가될 수 있는 부형제 및 첨가제는 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 공지되어 있다.

[0053] 상기 키트는 샘플을 담은 구획된 캐리어 수단, 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함하는 용기를 포함한 하나 이상의 용기를 포함할 수 있으며, 바람직하게는 ^{18}F 로 표지된 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 포함할 수 있다. 상기 캐리어 수단은 병, 튜브와 같은 하나 이상의 용기를 함유하기에 적합하고, 각 용기는 본 발명의 방법에 사용되는 독립적 구성 요소들을 포함하며, 당해 분야의 통상의 지식을 가진 자는 용기 중의 필요한 제제를 손쉽게 분배할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용자 안내서를 추가로 포함할 수 있다. 안내서는 키트 사용법, 예를 들면, 방사성 표지된, 폴리에틸렌글리콜로 개질된 산화그래핀 복합체를 이용해 PET 촬영하는 방법, 제시되는 반응 조건 등을 설명하는 인쇄물이다. 안내서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는 정보를 포함한다.

[0054] 상기 검출 대상이 될 수 있는 종양은 혈액암, 대장암, 뇌암, 신경교종, 신경교육종, 역형성성상세포종, 수모세포종, 위암, 폐암, 소세포폐암종, 자궁경부암종, 결장암, 직장암, 척삭종, 인후암, 카포시육종, 림프관육종, 림프관내피육종, 결직장암, 자궁내막암, 난소암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 신장세포암종, 간암종, 담관암종, 용

모막암종, 정상피종, 고환종양, 율름종양, 유잉종양, 방광암종, 혈관육종, 내피육종, 선암종, 한선암종, 피지선암종, 유두암종, 유두선육종, 낭선육종, 기관지암종, 수질암종, 비만세포종, 중피종, 활막종, 흑색종, 평활근종, 횡문근종, 신경모세포종, 망막모세포종, 췌장교종, 청신경종, 혈관모세포종, 수막종, 송과체종, 상의세포종, 두개인두종, 상피암종, 배아암종, 편평세포암종, 기저세포암종, 섬유육종, 점액종, 점액육종, 지방육종, 연골육종, 골원성육종 및 백혈병 등일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0056] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예 및 실험예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예 및 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0058] 실시예 1. nGO-PEG의 제조 및 기능화(functionalization)

[0059] 먼저, 미국 그래핀 슈퍼마켓(Graphene supermarket)에서 구입한 나노 크기의 그래핀 분말(Nano G-400)을 변형된 휴머스 방법(modified Hummer's method)에 따라 화학적으로 벗겨내 nGO(nano Graphene Oxide)를 얻었다. 그 후, nGO 용액(10 mg/mL) 10 mL에 NaOH 1.8g을 첨가하고 그 혼합물을 55 °C에서 4시간 동안 가열한 후, 중화를 위해 4 mL의 37 % (vol/vol) HCl 용액을 첨가하였다. 염의 제거를 위해 희석액으로 4번 세척하였고, 13,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하여 그 결과물을 모았다.

[0060] 상기에서 얻은 nGO의 안정성을 증가시키기 위해 카르복실산기를 PEG-아민에 연결하였고, nGO 나노수송체를 기능화하기 위해 화학반응을 통해 염기상태에서 아민기로 끝나는 PEG를 도입하였다. 보다 구체적으로는 25 mL 바이알에서 상기 결과물인 5 mL nGO 용액(10 mg/mL)에 폴리에틸렌글리콜(PEG)-NH₂ 50 mg을 첨가하였다. 그 후, 실온에서 15분 동안 초음파 처리하고, 촉매인 에틸렌 다이클로라이드(Ethylene dichloride, EDC) 10 mg을 첨가하였고, 다시 실온에서 30분 동안 초음파 처리한 후, EDC 10 mg을 첨가하였다. 그 후, 30분 동안 추가적인 초음파 처리를 수행한 후, 하룻밤 동안 반응 용액을 교반하였다. 초과 PEG와 EDC를 완벽하게 제거하기 위해 수득한 nGO-PEG 용액을 원심분리하고 상등액을 제거한 뒤 다시 물을 붓는 단계를 5~6번 반복하였다.

[0061] 상기 nGO-PEG의 제조과정을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

[0063] 실시예 2. [¹⁸F]-nGO-PEG의 제조

[0064] 낮은 β⁺ 에너지를 가져 고해상도의 스캔이 가능하고 상대적으로 낮은 반감기를 가져 방사능 표지의 이동범위를 넓게 하는 ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O 및 ¹⁸F가 PET에 이용될 수 있다. 한편, 그 중에서도 상대적으로 긴 반감기를 가지나 ¹²⁵I과 ⁶⁴Cu보다는 짧은 ¹⁸F 동위원소는 상기와 같은 장점을 가지면서 동시에 이미징 분석 후에 방사성 약물 노출에 의한 부정적 효과를 최소한으로 줄일 수 있다. 따라서 상기 실시예 1에 따라 수득한 nGO-PEG를 고에너지 원자빔으로 [¹⁸O]과 반응하는 ¹⁸O(p,n)¹⁸F 핵 반응으로 ¹⁸F를 수득한 뒤 클로라민-T 산화 방법(Chloramine-T oxidation method)을 이용하여 방사성핵종 ¹⁸F(한국 KAERI)로 표지하였다.

[0065] 구체적으로는, 이를 제조하기 위해 80°C 항온기에서 1 mL nGO-PEG(1 mg/mL)의 용액에 100 μCi의 ¹⁸F와 TFA 0.1 mL를 첨가하여 1시간 동안 반응시켰고, 이 후 그 혼합물을 산성용액으로 만들기 위해 추가적으로 상온에서 1시간 동안 10 %의 TFA 용액(pH5.5)으로 반응시켰다. TFA 용액으로 반응시킨 용액에서 초과 ¹⁸F는 0.2 μm 원심 분리 필터를 통해 제거하였고, 필터 용액에서 방사활성이 분리되지 않을 때까지 증류수로 여러 번 세척했다.

[0066] 상기 [¹⁸F]-nGO-PEG의 제조과정을 도 1에 개략적으로 나타내었다.

[0068] 실험예 1. TEM을 통한 nGO와 nGO-PEG의 형태 확인

[0069] nGO와 nGO-PEG의 형태를 관찰하기 위하여 가속 전압 300 kV으로 Tecnai G2(FEI, 네덜란드) 현미경을 사용하여 투과전자현미경(TEM) 분석을 수행하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0070] 도 2에 나타난 바와 같이, nGO의 크기는 약 50~100 nm인 것으로 나타났으며, 단일화된 디스크 형태로 보여지는 nGO 시트 내 nGO의 크기는 약 30 nm인 것으로 나타났다. 또한, 아민기로 끝나는 PEG의 도입으로 NH₂ 기능기가 양으로 하전되어 나노입자의 제타포텐셜이 미묘하게 증가함으로써, PEG 기능화된 nGO(nGO-PEG)의 평균 지름이 더 커졌음을 확인하였다.

[0072] 실험예 2. XRD를 통한 nGO와 PEG의 결합 관찰

[0073] nGO와 nGO-PEG의 결정구조 관찰을 통한 nGO와 PEG의 결합관계 해석을 위해 Cu K_α radiation DMAX-2500(Rigaku)으로 X-선 회절(XRD) 패턴을 수집하였다.

[0074] 그 결과 nGO의 XRD 패턴은 2D nGO 층들과 직각인 단일 nGO층의 준주기 쌓임과 같은 방식으로 nGO의 002 회절과 상응하여 2θ=11.521°로 나타났고, 이는 PEG가 추가됨에 따라 내부층 공간이 더욱 커짐을 통해 nGO와 PEG의 결합이 존재함을 나타내는 것이다.

[0076] 실험예 3. FTIR과 XPS를 통한 구조분석

[0077] nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG 구조 파악을 위한 구조 내 작용기 도출을 위해 Jasco FT/IR-6600을 이용하여 적외선 흡수 분광법(FT-IR) 측정을 수행하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0078] 도 3에 나타난 바와 같이, nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG의 적외선 스펙트럼에서 nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG 모두 카보닐 결합(C=O)을 나타내는 1600 cm⁻¹ 신호가 나타났고, nGO에서 C-H와 C-O 결합을 나타내는 2800 cm⁻¹ 및 1100 cm⁻¹ 신호가 나타났다. 또한 nGO에서 [¹⁸F]-nGO-PEG이 되면서 카복실산이 아마이드가 되면서 카보닐 결합의 신호가 약해졌다. 상기 결과를 통해 도 1에 기재된 구조와 같은 nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG의 작용기를 각각 도출하였다.

[0079] 한편, nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG의 화학결합 상태 확인을 위해 Al X-ray의 Thermo Scientific사의 K_α 전자 분광기를 사용하여 X-선 광전자 분광법(XPS) 측정을 수행하였고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0080] 도 4에 나타난 바와 같이, nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG의 XPS 결과로 nGO와 [¹⁸F]-nGO-PEG의 002p1/2와 2p2/3과 관련된 약 725와 710 eV에서 두 개의 주 신호가 나타남을 확인하였고, 이를 통해 도 1에서 묘사된 [¹⁸F]-nGO과 nGO-PEG 사이의 화학결합 상태를 확인하였다.

[0082] 실험예 4. 다양한 배지에서 [¹⁸F]-nGO-PEG의 안정성 측정

[0083] [¹⁸F]-nGO-PEG의 방사화학적 안정성을 확인하기 위하여 인산 완충 식염수(PBS, pH 7.4)를 포함하는 다양한 배지 및 세포 배양 배지를 이용하였다. 보다 구체적으로 nGO(A)와 nGO-PEG(B)를 다양한 배지에 녹인 후, 5분 동안 10⁴ rpm으로 원심분리 하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0084] 도 5에 나타난 바와 같이, nGO는 물에 잘 녹지만 정전하의 스크리닝과 nGO 단백질의 비특이적 결합 때문에 PBS 버퍼와 DMEM(세포 배지)와 같은 단백질이나 고농도 염으로 된 용액에서는 잘 녹지 않고 응집됨을 확인하였다. 이는 nGO가 생체 내에서는 잘 녹지 않고 불안정함을 나타낸다. 이에 반해, 본 발명의 nGO-PEG는 PBS버퍼와 DMEM을 포함하는 다양한 용액에서 모두 안정성을 나타내었다. 이는 [¹⁸F]-nGO-PEG가 방사화학적 안정성이 있음을 나타낸다.

[0086] 실험예 5. nGO-PEG가 세포 내 ROS 활성화에 미치는 영향 확인

[0087] UV-vis 스펙트럼을 Jasco V-770으로 기록하였으며, 높은 형광 디클로로플루오레세인(dichlorofluorescein)을 형성하기 위해 활성산소종(ROS)과 반응하는 분자 프로브인 DCF-DA(dichloro-dihydro-fluorescein diacetate,

시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입)를 사용해서 ROS를 측정하였다. 보다 구체적으로 30분 동안 100 μ L의 DCF-DA(10 μ M)을 암실에서 4 ml의 NaOH(0.02 N)로 처리한 후, 5분 동안 초음파 처리하였고, 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 플레이트의 각 웰에 CCK-8 용액의 10 μ L를 추가한 후, 인큐베이터에서 3시간 동안 배양한 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0088] 도 6에 나타난 바와 같이, 환경적인 스트레스가 있는 동안에는 ROS의 수준이 급격하게 증가하였으며, nGO에 DCF-DA를 24시간 동안 처리한 경우 ROS의 수준이 DCF-DA를 처리하지 않은 대조군에 비해 2.6배 증가하였다. 그러나, 본 발명의 nGO-PEG를 처리한 경우는 대조군과 비교하여 세포 내 ROS의 수준에 크게 변화가 없었으며 이를 통해 본 발명의 nGO-PEG는 세포 내 스트레스로 작용하지 않음을 확인하였다.

[0090] 실험예 6. MTT 분석법을 통한 nGO-PEG의 세포 독성 확인

[0091] nGO-PEG의 성능 확인을 위한 추가적인 생체 내 실험(실험예 7)을 하기 전에 유방암 세포(MCF-7)에서 24시간 동안 nGO와 nGO-PEG를 처리한 후 공지된 MTT 분석법(Gerlier, D., & Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, 94(1-2), 57-63.)을 이용하여 세포 독성 확인 실험을 수행하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0092] 도 7에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG를 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 높은 농도로 처리했을 경우에도 세포 생존율이 감소하지 않았으며, 이에 반해 nGO는 동일한 농도에서도 nGO-PEG보다 낮은 세포 생존율을 나타내었다. 이는 nGO에 비해 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG가 더 우수한 생체 내 안정성이 있음을 나타낸다.

[0094] 실험예 7. PET 이미징을 통한 종양 검출

[0095] PET 이미징은 microPET(Genesys4, SOFIE Biosystems)과 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG를 정맥 주입한 종양이 자란 쥐(누드마우스, CAnN.Cg-Foxnlnu/CrlCrlj 4w F, 10주된 암컷(25-30 g), 일본)를 이용하여 수행하였다. 한편, 형질주입(transfection) 실험에 필요한 CT-26 종양세포는 10 %의 소 태아 혈청(미국 FBS, Gibco사)을 보충한 항생물질들을 포함하는 하이클론 세포배양 배지(미국 Thermo scientific사의 4 mM L-글루타민, 4500 mg/L 피루브산 나트륨)에서 37 $^{\circ}\text{C}$ 의 5 % CO_2 의 조건이 유지되는 인큐베이터에서 2일 동안 배양하였고, 이 후 혈청 함유 배지를 제거한 후 PBS 버퍼로 대체하였다.

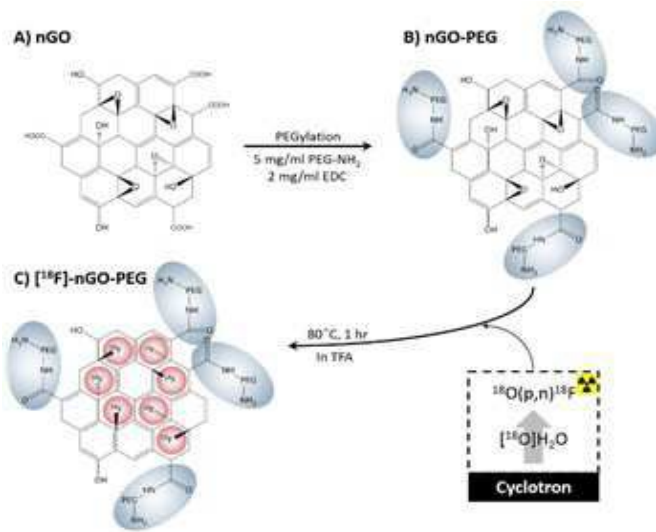
[0096] 100 μL PBS에 포함된 10^7 개의 CT-26 종양세포들을 누드마우스의 피하층에 주입하였고 CT-26 종양들은 그 쥐(20~25 g)의 오른쪽 대퇴부에서 자랐다. 종양들이 10~15 mm의 지름으로 자랐을 때, 100 μL 의 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG 또는 100 μCi 의 $[^{18}\text{F}]$ 용액을 정맥 주입하였고, 시간대별 마이크로 PET 시스템(Genesys⁴ PET, SOFIE biosciences, 미국)으로 PET 스캐닝과 X 선 이미징을 수행하였다.

[0097] $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG의 명확한 종양 흡수는 15분이 경과한 후까지 나타나는 바, $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG 주입 15분 후, 종양세포를 관찰하기 위해 추적용 자유 ^{18}F 로 처리된 대조군 쥐와 비교하였다. 그 결과를 도 8에 나타내었다.

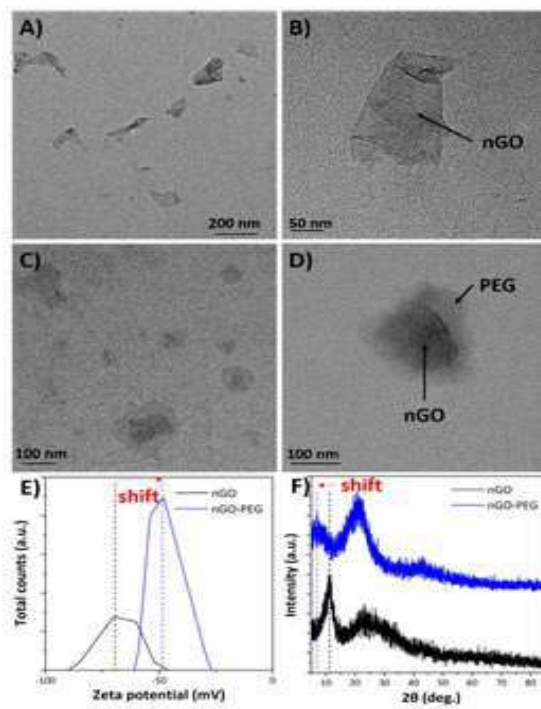
[0098] 도 8에 나타난 바와 같이, 본 발명의 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG의 효율적인 종양 흡수가 나타났다. CT-26이 생체 외에서 초기 엔도솜과 CT26 종양 세포들의 라이소솜으로 흡수됨을 확인한 바와 같이, 생체 내에서도 역시, CT-26 종양이 자란 쥐의 말단 정맥으로 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG의 정맥 주입 후에 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG는 생체 내 엔도라이소솜으로 빠르게 축적되었고, 이는 특정 크기의 분자(전형적으로 리포솜, 나노입자 및 거대분자인 약)가 일반적인 신체 조직들보다 종양 조직으로 더 쉽게 축적되는 성질인 EPR(Enhanced Permeability and Retention) 효과를 통해 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG가 수동적으로 종양으로 축적됨을 나타낸다. 이는 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG가 종양으로 흡수가 잘되며 생체 내에서 안정한 물질로 방사화학적 안정성을 가짐을 나타낸다. 궁극적으로는 본 발명의 $[^{18}\text{F}]$ -nGO-PEG는 핵의학 검사를 위한 조영제로써의 응용을 기대할 수 있고, 바람직하게는 양전자방출단전자촬영(PET)을 위한 조영제로 응용을 기대할 수 있다. 또한, 종양 검출 또는 암 진단에 널리 응용될 수 있다.

도면

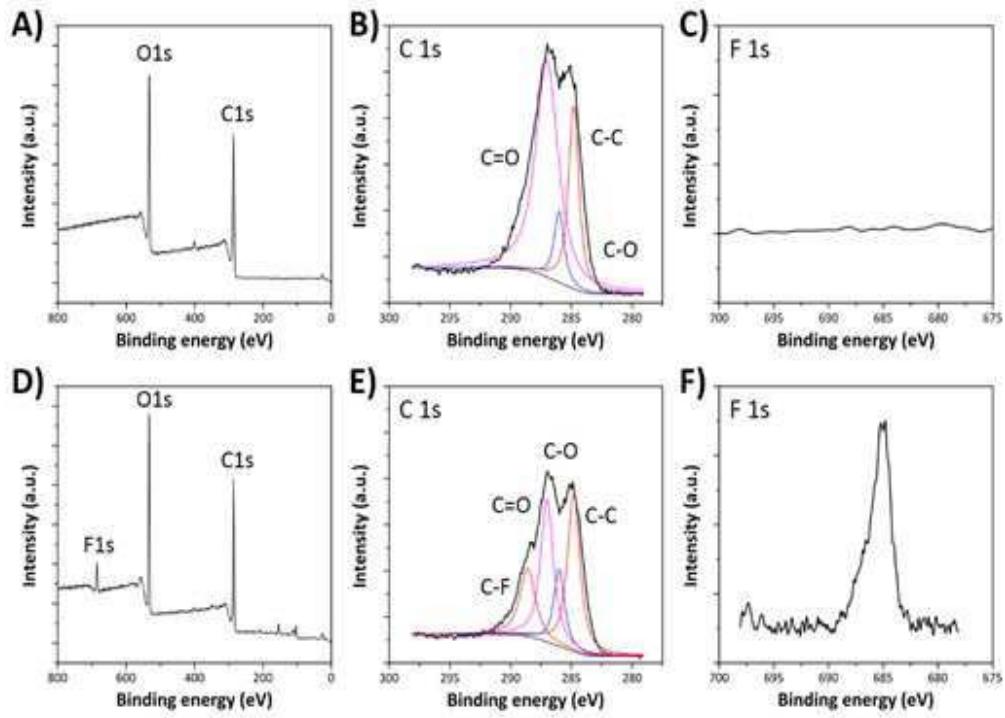
도면1



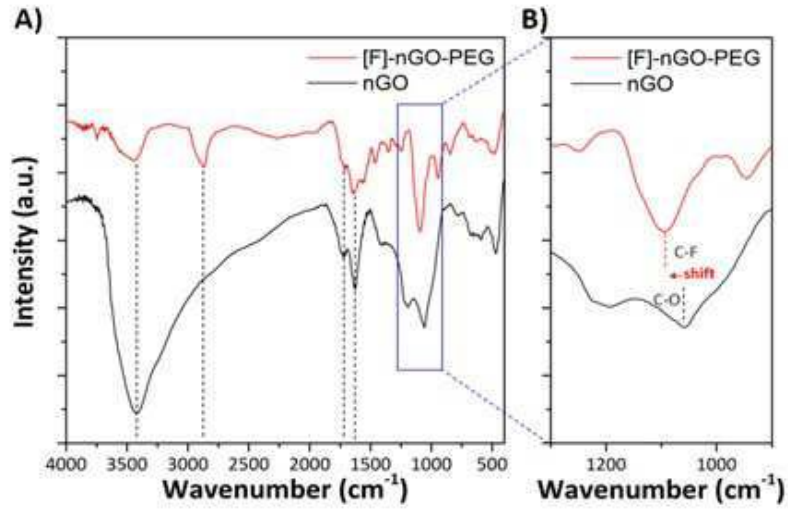
도면2



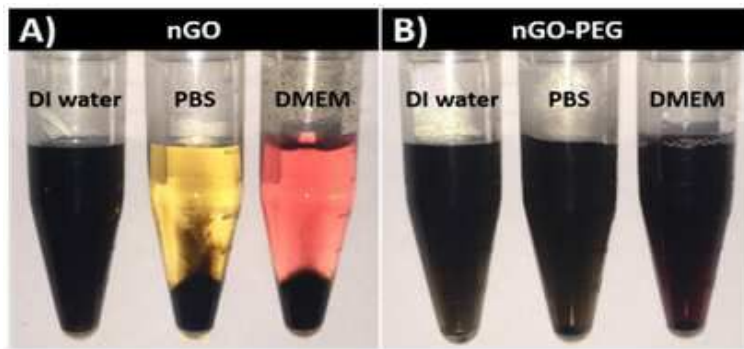
도면3



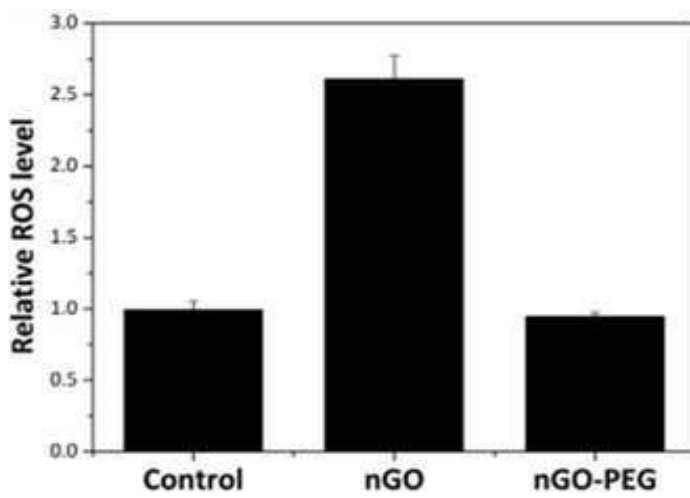
도면4



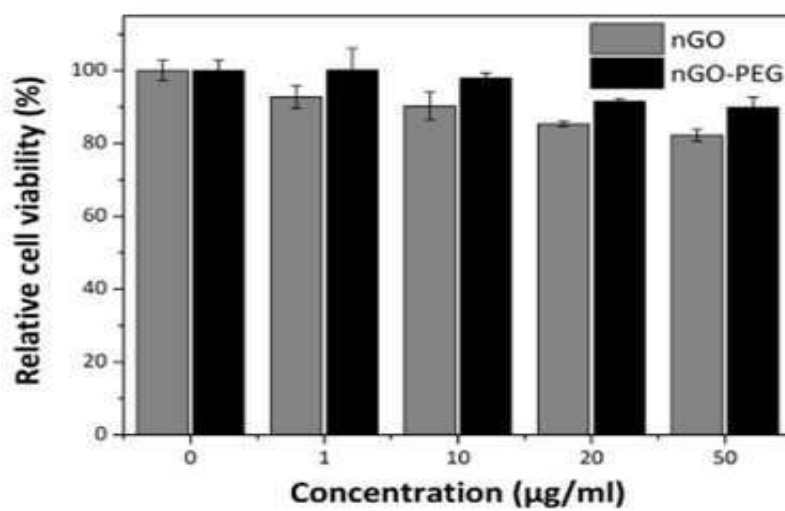
도면5



도면6



도면7



도면8

