

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0098965
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 49/00 (2006.01) C01B 21/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 49/0076 (2013.01)
A61K 49/0019 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0016759
(22) 출원일자 2019년02월13일
심사청구일자 2019년02월13일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
박성진
서울특별시 서초구 잠원로4길 34-11 (잠원동, 녹원한신아파트) 102동 707호
김동욱
인천광역시 연수구 아트센터대로97번길 75 (송도동, 더샵 하버뷰13단지) 1308동 402호
(74) 대리인
이원희

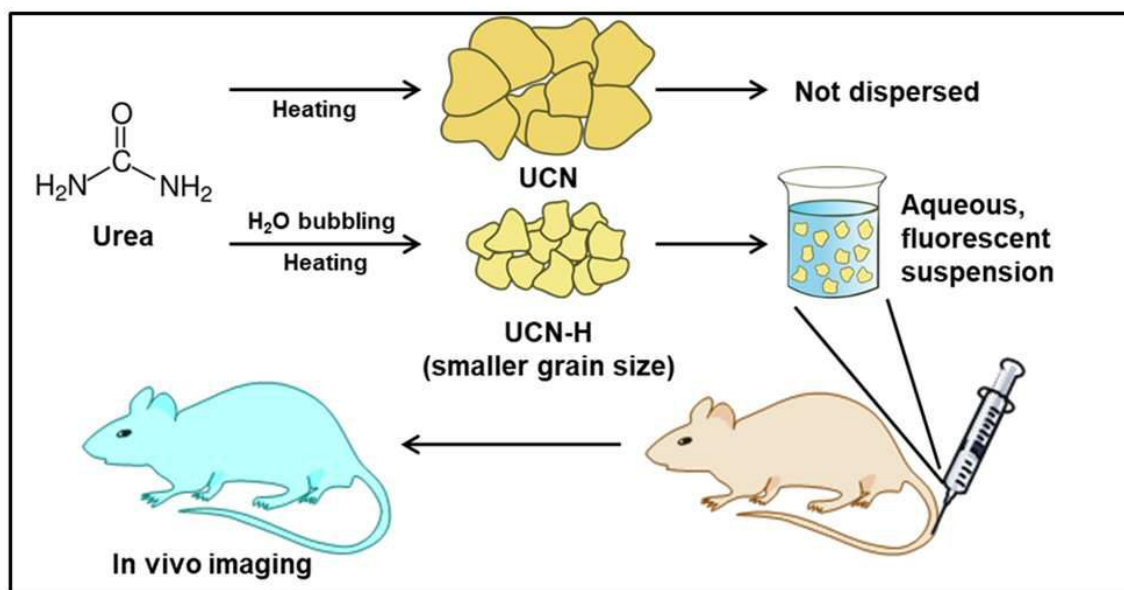
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드 소재를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드 소재를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따라 제조된 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드는 고분산성 및 고안정성의 분산액으로 제조될 수 있어, 시험관 내(In vitro) 형광 이미징뿐 아니라, 특히, 종래 기술로는 사실상 불가능했던 생체 내(In vivo) 형광 이미징을 구현할 수 있는 바, 질병 진단용 조영제, 세포 추적용 조영제 등의 조영제 의약품이 제공될 수 있는 유용한 효과가 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

C01B 21/0605 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

C01P 2002/30 (2013.01)

C01P 2006/22 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711117180

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래소재 디스커버리(선기획)

연구과제명 탄소-닉토젠 공유결합기반 생체친화 발광소재군 설계 및 개발

기 여 율 1/1

주관기관 인하대학교

연구기간 2020.04.29 ~ 2020.08.28

명세서

청구범위

청구항 1

그래피틱 카본 나이트라이드 전구체를 준비하는 단계;

상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계; 및

상기 1차 열처리 단계 후, 불활성 분위기에서 2차 열처리하는 단계;를 포함하는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법으로부터 제조되는, 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드를 포함하는 조영제 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체는 요소(Urea), 싸이오요소(Thiourea), 다이시안 다이아마이드(dicyandiamide), 시안아마이드(cyanamide), 멜라민(Melamine) 및 중 적어도 하나인, 조영제 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드의 크기는 10 내지 1000nm인, 조영제 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드의 비표면적은 10 내지 300 m²/g인, 조영제 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드는 s-트리아진 구조를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조영제 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조영제 조성물은, 질병 진단용 또는 세포 추적용인 것을 특징으로 하는, 조영제 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 조영제 조성물은 암 또는 암 전이의 진단용 또는 암세포 추적용인, 조영제 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

형광 영상화(fluorescence imaging), 광학 영상화(optical imaging), 방사선 영상화, 컴퓨터 단층(CT) 촬영 또는 MRI(magnetic resonance imaging) 영상화에 사용되기 위한 것인 조성물.

청구항 9

질병의 발병 또는 진행상황을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 제1항에 따른 조영제 조성물을 사용하여 조직을 영상화하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 방법은 인 비보(in vivo)에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드 소재를 포함하는 조영제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 질화탄소(C_3N_4)는 탄소와 질소가 교대로 배열되면서 육각형 고리가 2차원으로 펼쳐진 구조를 갖는 물질로서, 이론상 다이아몬드보다 더 큰 강도를 가지는 소재로 알려져 있으며, 다이아몬드를 대체할 물질로서 많은 연구자로부터 연구되어 왔다. 이 과정에서 질소를 많이 함유한 유기 화합물이 좋은 산화력과 더불어 높은 열적 안정성 등의 특성을 나타내는 것이 발견되어, 최근에는 질화탄소(C_3N_4)가 내마모성이 요구되는 각종 부품류뿐만 아니라 전자방출재료, 변환 밴드갭 반도체재료 등 그 응용범위가 매우 다양할 수 있음이 보고되고 있다.

[0005] 그래피틱 질화탄소(graphitic Carbon Nitride, $g-C_3N_4$)는 sp^2 C-N 결합이 층층이 쌓인 구조로 매우 안정한 삼차원 구조를 하고 있다. 이러한 그래피틱 질화탄소($g-C_3N_4$)는 낮은 밴드갭 (2.7eV) 과 높은 열적 안정성(약 600℃) 및 촉매활성을 가져 획기적인 신소재로 각광받고 있는 물질이다.

[0007] 한편, C_3N_4 기반 물질들은 가시광선 영역에서 형광 특성을 보여주는 것으로 알려져 있는데, 기존 연구들은 대부분 3차원 파우더들을 이용한 광촉매, 흡착제, 형광 센서 연구이다.

[0009] C_3N_4 기반 물질들은 비금속 소재이기 때문에 생체에서 저독성 및 생체적합성(biocompatibility)이 좋을 것이라 생각되어서 본 발명자들은 암세포등에 대한 형광 생체조영제로 이용하고자 한다.

[0011] 먼저, 생체 내에서 형광 조영제로 쓰기 위해서는 생체 매질에서 발광체들이 안정하게 분산되어 있는 소재의 합성이 중요한데, 기존 3차원 소재들은 분산성이 매우 떨어지기 때문에 조영제로 사용하기에 적합한 분산액 확보가 사실상 불가하였다.

[0013] 최근에 화학 개질법등을 통해 수십 nm 크기의 C_3N_4 양자점(nanodot)의 분산액을 확보하고 세포내에서 in-vitro 이미징 결과를 보고한 예들이 있으나, 역시 낮은 분산성과 낮은 발광 효율 때문에 동물 실험(in vivo)에서 이미징을 성공한 예는 아직까지 전무하다.

[0015] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 새로운 C_3N_4 합성법 개발을 통해 안정한 분산액을 제조하고, 이를 in vitro와 in vivo에서 세포 및 암세포의 형광 영상화를 성공하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0017] (비특허문헌 0001) Biosens Bioelectron. 2017 Mar 15;89(Pt 1):411-416.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명의 목적은 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드 소재를 포함하는 조영제 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 다른 목적은 상기 조영제 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0023] 본 발명의 일 측면에서,

[0024] 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체를 준비하는 단계;

[0025] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계; 및

[0026] 상기 1차 열처리 단계 후, 불활성 분위기에서 2차 열처리하는 단계;를 포함하는 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법으로부터 제조되는, 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드를 포함하는 조영제 조성물이 제공된다.

[0028] 본 발명의 다른 측면에서,

[0029] 질병의 발병 또는 진행상황을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 상기 조영제 조성물을 사용하여 조직을 영상화하는 방법이 제공된다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따라 제조된 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드는 고분산성 및 고안정성의 분산액으로 제조될 수 있어, 시험관 내(In vitro) 형광 이미징뿐 아니라, 특히, 종래 기술로는 사실상 불가능했던 생체 내(In vivo) 형광 이미징을 구현할 수 있는 바, 질병 진단용 조영제, 세포 추적용 조영제 등의 조영제 의약품이 제공될 수 있는 유용한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0033] 도 1의 (a)는 본 발명 제조예에 따른 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 제조방법의 개략도이고, (b)는 제조에 사용되는 기기의 사진이고, (c)는 제조된 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 SEM 이미지이다.
- 도 2의 (a)는 본 발명 제조예 UCN-H 및 비교예 UCN의 XRD 패턴을 나타낸 그래프이고, (b)는 ^{13}C SSNMR 스펙트럼이고, (c)는 트리-s-트리아진과 s-트리아진의 화학 구조식이며, (d)는 XPS N1s 그래프를 도시한 것이다.
- 도 3의 (a)는 본 발명 실시예 UCN-H 분산액의 사진이고, (b)는 본 발명 실시예 UCN-H 분산액의 형광 사진이며, (c)는 UCN-H의 2D TEM 이미지이고, (d)는 AFM 이미지, (e)는 UV-vis, (f)는 PL 그래프이다.
- 도 4의 (A)는 본 발명 UCN-H 분산액을 세포에 각 0 - 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 투여시 세포 생존률(%) 그래프이고, (B)는 본 발명 UCN-H 분산액의 세포 내 형광 조영제로서 각 25 $\mu\text{g/mL}$, 50 $\mu\text{g/mL}$, 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에 따른 성능을 확인한 이미지이다.
- 도 5의 (A)는 정상 누드 마우스에 본 발명 UCN-H 분산액을 주입하였을 때, 나타나는 농도별(0 - 100 $\mu\text{g/mL}$) 형광 이미지이고, (B)는 이의 형광 강도를 그래프로 도시한 것이다.
- 도 6의 (A)는 암세포 발현 마우스(종양모델)에 본 발명 UCN-H 분산액을 주입한 후, 시간 경과별(1h - 24h) 형광 변화를 관측한 사진(화살표 표시)이며, (B)는 간, 비장, 신장, 종양, 림프절에서의 형광 사진과 그래프이며, (C)는 본 발명 UCN-H 와 비교예 OCN의 형광 비교 사진(화살표 표시)이다.
- 도 7의 (A)는 본 발명 UCN-H 처리, DAPI 또는 merge 염색으로부터 나타나는 형광 이미지(x200, x400)를 비교하여 나타낸 사진이다.
- 도 8은 본 발명 UCN-H를 사용한 생체 내(In Vivo) 이미징 실험의 개략도를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0036] 본 발명의 일 측면에서,
- [0037] 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체를 준비하는 단계;
- [0038] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계; 및
- [0039] 상기 1차 열처리 단계 후, 불활성 분위기에서 2차 열처리하는 단계;를 포함하는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법으로부터 제조되는, 고분산성 그래피틱 카본 나이트라이드를 포함하는 조영제 조성물이 제공된다.
- [0041] 이에 제한되지 않으나, 본 발명의 상기 조영제 조성물은 포함되는 그래피틱 카본 나이트라이드가 종래 기술로는 달성할 수 없었던 특성, 즉, 용매 중에서의 고분산성, 장시간 경과에도 고안정성의 특성을 달성한다.
- [0042] 또한 이에 제한되지 않으나, 상기 조영제 조성물은 종래에 일반적으로 우레아를 열처리하여 삼차원 C_3N_4 소재를 제조한 것과는 다른 방법으로, 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)를 제조하는 것으로부터, 상기한 고분산성 및 고안정성의 특성이 달성되는 것으로 이해될 수 있다.
- [0043] 나아가, 특정 이론에 제한되지 않으나, 우레아를 열처리하여 다중 축합(polycondensation)이 이루어질 때 CO_2 가스가 생성되는데, 이러한 CO_2 가스는 결정의 성장을 방해할 수 있으며, 특히 본 발명의 방법에 따라 물의 증기를 흘려주며 합성하는 경우, CO_2 가스의 기능이 커져 보다 작은 크기(grain size)의 카본 나이트라이드가 생성되고, 이후 질소 가스를 이용하여 한번 더 열처리를 진행함으로써 안정한 상태의 카본 나이트라이드를 얻는다. 이 방법은 화학적 처리가 필요가 없기에 간단하며 친환경적인 방법이다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예로서, 상기 본 발명의 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법은, 다음과 같은 제조방법일

수 있다.

[0046] **그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법**

[0047] 도 1의 (a)는 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 제조방법의 개략도이다.

[0048] 도 1 (a)를 참조하면, 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법은, 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체를 준비하는 단계; 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계; 및 상기 1차 열처리 단계 후, 불활성 분위기에서 2차 열처리하는 단계;를 포함한다.

[0050] 이하, 본 발명의 실시 예를 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법을 각 단계별로 상세히 설명한다.

[0052] 먼저, 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법의 첫 번째 단계는 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체를 준비하는 단계이다.

[0054] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체는 요소(Urea), 싸이오요소(Thiourea), 다이시안 다이아마이드(dicyandiamide), 시안아마이드(cyanamide) 및 멜라민(Melamine) 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게 요소(Urea)일 수 있다.

[0056] 다음으로, 본 발명의 실시 예를 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법의 두 번째 단계는 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계이다.

[0058] 상기 1차 열처리 온도는 300 내지 600℃, 350 내지 600℃, 400 내지 600℃, 450 내지 600℃, 500 내지 600℃, 520 내지 580℃, 또는 540 내지 560℃의 범위에서 수행될 수 있고, 또는 약 550℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0059] 상기 열처리의 온도가 300℃ 미만이면, 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 전구체가 그래피틱 카본 나이트라이드로 합성되지 않을 수 있다. 상기 열처리의 온도가 600℃를 초과하면 합성된 그래피틱 카본 나이트라이드의 구조가 불안정해질 수 있고, 분해될 수 있다.

[0061] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계에서, 수분을 공급함으로써 이에 의해 준비되는 그래피틱 카본 나이트라이드의 표면적을 넓힐 수 있고, 입자 크기를 작고 균일하게 형성할 수 있다.

[0062] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하는 방법은 예를 들어 하기와 같은 방법으로 수행될 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0063] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 전구체에 수분을 공급하면서 1차 열처리하는 단계에서 수분을 공급하기 위해, 공기 주입구 및 공기 배출구를 포함하는 가스세척병과 같은 용기를 사용하여 수행될 수 있다. 상기 가스세척병에 일정 높이 증류수를 채우고, 상기 공기 주입구에 에어펌프를 이용하여 공기를 주입하고, 이때 물이 버블링되면서 공기와 함께 기체 형태로 공기 배출구로 배출되고 상기 그래피틱 카본 나이트라이드가 형성되는 반응에 공급할 수 있다.

[0065] 본 발명에 따라 수분이 공급되어 제조되는 UCN-H는 종래 열처리 방법의 UCN 대비 표면적이 크고 분산성이 좋은 것으로 이해될 수 있고, 예를 들어 100 - 200 m²/g, 110 - 190 m²/g, 110 - 180 m²/g, 100 - 160 m²/g, 120 - 150 m²/g, 또는 약 140 - 160 m²/g의 표면적을 가질 수 있다.

[0066] 한편, 상기 수분과 그래피틱 카본 나이트라이드의 질량비는 0.1:1 - 0.5:1, 0.15:1 - 0.5:1, 0.2:1 - 0.5:1, 0.3:1 - 0.5:1, 또는 0.35:1 - 0.45:1일 수 있고, 또는 약 0.4:1일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아

니다.

- [0067] 상기 수분과 그래피틱 카본 나이트라이드의 질량비는 0.1:1미만인 경우에는 충분한 기공이 생성되지 않아서, 그래피틱 카본 나이트라이드의 비표면적이 낮을 수 있다. 상기 수분과 그래피틱 카본 나이트라이드의 질량비는 0.5:1을 초과하는 경우에는, 과다한 기공의 생성으로 메조 기공 그래피틱 카본 나이트라이드가 형성될 수 있다.
- [0069] 다음으로, 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법의 세 번째 단계는 상기 1차 열처리 후, 불활성 분위기에서 2차 열처리하는 단계이다. 상기 불활성 분위기는 특별히 제한되는 것은 아니지만, 바람직하게 질소(N₂)분위기일 수 있다.
- [0071] 앞선 단계에서 공급된 수분이 그래피틱 카본 나이트라이드의 표면에 흡착되어 불순물로 작용할 수 있다. 이에 대한 영향을 배제하기 위해 불활성 분위기에서 열처리하여 이를 제거할 수 있다. 또한, 상기 2차 열처리를 수행함으로써, 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 표면적이 상승할 수 있다.
- [0073] 상기 2차 열처리 온도는 400 내지 600℃, 450 내지 600℃, 500 내지 600℃, 520 내지 580℃, 또는 540 내지 560℃의 범위에서 수행될 수 있고, 또는 약 550℃의 온도에서 수행될 수 있다.
- [0074] 상기 열처리의 온도가 400℃ 미만이면, 불안정한 불순물이 충분히 제거되지 않을 수 있다. 상기 열처리의 온도가 600℃를 초과하면 상기 합성된 그래피틱 카본 나이트라이드의 구조가 불안정해질 수 있고, 분해될 수 있다.
- [0076] 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법에 의해 준비된 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 비표면적은 10 내지 300, 10 내지 250, 10 내지 200, 10 내지 150, 10 내지 100, 또는 10 내지 50 m²/g일 수 있다.
- [0077] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 비표면적은 10m²/g 미만인 경우 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 경도 또는 단단한 정도가 상승할 수 있고, 분산을 위한 용액에 분산이 어려울 수 있다. 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 비표면적이 300m²/g 을 초과하는 경우에는 상기 그래피틱 카본 나이트라이드에 존재하는 미세 세공에 의한 캐필러리 효과에 의해 상기 미세 기공에 흡착된 불순물의 제거가 어려울 수 있다.
- [0079] 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드의 제조방법에 의해 준비된 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 입자의 크기는 10 내지 1000nm, 10 내지 800nm, 10 내지 600nm, 10 내지 500nm, 10 내지 300nm, 10 내지 200nm, 20 내지 150nm, 20 내지 120nm, 20 내지 100nm, 또는 30 내지 60nm일 수 있고, 또는 20 내지 40nm 일 수 있다.
- [0080] 이에 제한 되지 않으나, 본 발명 UCN-H의 나노닷의 두께는 2 nm 이하일 수 있고, 또는 0.2 - 2 nm, 0.3 - 1.8 nm, 0.4 - 1.6 nm, 0.5 - 1.4 nm, 또는 0.6 - 1 nm일 수 있다.
- [0081] 상기 그래피틱 카본 나이트라이드 입자의 크기가 10nm미만이면 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 미세기공에 잔존하는 불순물의 제거가 어려울 수 있고, 상기 그래피틱 카본 나이트라이드의 크기가 1000nm를 초과하면 유기 용매에 분산성이 저하될 수 있다.
- [0083] 본 발명의 다른 측면에서,
- [0084] 상기 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드는 s-트리아진 구조를 포함하는 것일 수 있다. 특히, 종래의 제조방법으로는, 트리-s-트리아진 구조를 포함하는 그래피틱 카본 나이트라이드가 제조되었던 반면, 본 발명 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드는 트리-s-트리아진 구조와 s-트리아진 구조를 모두 갖는 것으로 확인되었다.

- [0085] 본 발명이 특정 이론으로 제한되는 것은 아니나, 상기와 같이 구조 차이를 나타내는 것은 본 발명의 신규한 제조방법에 따라 도출되는 효과로서 이해될 수 있고, 이로부터 고분산성과 고안정성의 분산액, 즉 본 발명의 조영제 조성물이 제조되는 것으로 이해될 수 있다.
- [0087] 본 발명의 또 다른 측면에서,
- [0088] 상기 본 발명의 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드를 포함하는 조영제 조성물은, 이에 제한되지 않으나, 상기 그래피틱 카본 나이트라이드가 1종 이상의 용매에 분산되어 있는 현탁액 또는 분산액을 포함하는 것으로 이해될 수 있다.
- [0089] 여기서, 상기 용매는, 예를 들어, 상기 본 발명의 그래피틱 카본 나이트라이드의 적어도 일부가 분산 또는 현탁될 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않고 본 발명에 포함되고, 다른 예를 들어, 상기 본 발명의 그래피틱 카본 나이트라이드가 상기 용매 중에 분산 또는 현탁되어 조영제로서 기능할 수 있는 용매라면 본 발명에 제한 없이 포함되고, 또 다른 예를 들어, 상기 본 발명의 그래피틱 카본 나이트라이드의 적어도 일부가 분산 또는 현탁되는 것이되, 생체 적합한 용매일 수 있다.
- [0090] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 용매는 일반적으로 조영제 의약품에 적용될 수 있는 용매일 수 있고, 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제에 사용되는 용매일 수 있다. 또한, 선택적으로 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면, 트윈 80) 및 현탁화제를 더 사용할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사용액 또는 현탁액(예를 들면, 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일을 사용할 수 있다.
- [0092] 한편, 상기 본 발명의 조영제 조성물은 특히 고분산성 및 고안정성의 그래피틱 카본 나이트라이드의 특성으로부터, 시험관내 이미징뿐 아니라, 종래 기술로는 달성이 어려웠던, 생체 내(In-vivo) 이미징이 구현 가능한 효과가 달성된다.
- [0093] 이에, 본 발명 조영제 조성물은, 조영제 의약품으로서 사용될 수 있고, 예를 들어, 질병 진단용 또는 세포 추적용으로 사용될 수 있다.
- [0094] 여기서, 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들어, 암 또는 암 전이의 진단용으로 본 발명의 조영제 조성물을 사용할 수 있다.
- [0095] 또한, 특별히 제한되지는 않으나, 예를 들어, 암세포 추적용 조영제 조성물로서 사용될 수 있다.
- [0097] 한편, 상기 조영제 조성물은 형광 영상화(fluorescence imaging), 광학 영상화(optical imaging), 방사선 영상화, 컴퓨터 단층(CT) 촬영 또는 MRI(magnetic resonance imaging) 영상화에 사용되기 위한 것일 수 있다.
- [0099] 일 측면에서, 상기 본 발명의 조영제 조성물은, 특히 본 발명 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드를 통하여 이미징되는 것이되, 선택적으로, 무기 또는 유기 염료(dye), 형광체, 동위원소, 자성체, 상자성 나노입자 또는 초상자성 나노입자로 표지된 것일 수도 있다.
- [0100] 예를 들어, 상기 무기 또는 유기 염료는 기존의 염료를 포함하여 형광 또는 광학 영상, 컴퓨터 단층(CT) 촬영과 같은 방사선 영상화, 초음파 또는 MRI와 같은 비방사선 영상화에 있어서 영상의 대조도를 증가시키기 위하여 사용되는 것으로서, 예컨대 디아트리지오에이트(Diatrizoate), 메트리조에이트(Metrizoate), 이옥사글레이트(Ioxaglate), 이오파미돌(Iopamidol), 이오헥솔(Iohexol), 이옥실란(Ioxilan), 이오프로미드(Iopromide), 이오딧산올(Iodixanol), 바륨 설페이트와 같은 바륨계 염료, 가스트로그라핀(Gastrografin)®등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0101] 상기 형광 표지자로는, 예컨대 인도시아닌, NIR(근적외선) 염료, 플루오레신(fluorescein), 피코에리트린(phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), Cy3, Cy5(Pharmacia), 발색단, 화학발광단, 매스 표지, 전자밀

집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스래디쉬 퍼옥시다아제) 등을 사용할 수 있으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0102] 한편, 방사성 동위 원소로 표지될 수도 있는데, 사용 가능한 방사성 동위 원소의 예는 ^{10}C , ^{11}C , ^{12}N , ^{13}N 가 있다.
- [0104] 본 발명의 조영제 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있고, 상기 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0105] 본 발명의 조영제 조성물은 비경구 또는 경구 방식으로 투여될 수 있다. 비경구 투여를 하는 경우, 정맥내 주입, 근육내 주입, 관절내(intra-articular) 주입, 활액내(intra-synovial) 주입, 수막강내 주입, 간내(intrahepatic) 주입, 병변내(intralesional) 주입 또는 두개강내(intracranial) 주입 등으로 투여할 수 있다.
- [0106] 본 발명의 조영제 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.
- [0108] 본 발명의 또 다른 측면에서,
- [0109] 질병의 발병 또는 진행상황을 진단하기 위한 정보를 제공하기 위하여, 제1항에 따른 조영제 조성물을 사용하여 조직을 영상화하는 방법이 제공된다.
- [0110] 본 발명의 조영제 조성물은 고분산성과 고안정성을 가지는 본 발명 제조방법에 따르는 그래피틱 카본 나이트라이드를 포함하기 때문에, 시험관내 이미징뿐 아니라, 특히 종래 그래피틱 카본 나이트라이드로는 불가능했던, 인 비보(in vivo) 이미징, 예를 들어 생체 조직 이미징에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0112] 본 발명의 일 측면에서, 본 발명에 따라 증기를 이용한 카본 나이트라이드(UCN-H, $149 \text{ m}^2/\text{g}$)는 기존 우레아에 질소를 흘려 만든 카본나이트라이드($40 \text{ m}^2/\text{g}$)보다 표면적이 약 375 % 가량 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0113] 또한, 본 발명 UCN-H는 XPS, FT-IR 등의 분석을 이용해 크기(grain size)가 줄어들었고, 단위 구조의 개수가 작아지면 그만큼 에지(edge)의 NHx 작용기의 수가 커지기 때문에 분산성 또한 증가하였다.
- [0114] 분산성이 좋은 본 발명 UCN-H 파우더는 소니케이터를 통한 분산을 통해 균일한 2차원 나노닷 분산액이 형성된다. UCN-H 2D 나노닷은 20-40 nm 크기로 확인되며, 두께는 0.6-1 nm로 확인된다.
- [0115] 본 발명 2차원 UCN-H 나노닷은 기존에 연구되어 왔던 화학적 박리를 통한 카본 나이트라이드보다 PL(광발광) 효율이 증가하는 것으로 확인되었다.
- [0116] 본 발명 UCN-H 나노닷은 향상된 침투 및 유지 효과(EPR)를 통하여 수동 종양 표적에 의해 종양 부위에 축적된다.
- [0118] 본 발명은 XRD, XPS, FT-IR 및 SSNMR을 이용하여 UCN-H 분말의 화학 분석 결과 물/증기 처리가 C_3N_4 네트워크의 입자 크기를 줄이는 데 효과적이라는 사실을 규명하였다.
- [0119] 이는 수성 매질에서 2D UCN-H 나노닷의 매우 안정한 현탁액(분산액) 제조를 가능하게 하며, 가시 영역에서 3.6 %의 PLQE의 우수한 PL 특성을 나타낸다.
- [0120] 본 발명 UCN-H 나노닷은 비독성이며, 동물 모델을 이용한 생체 내 및 외 실험 모두에서 생물학적 영상 탐침으로서 우수한 성능을 확인하였다.
- [0121] 일 측면의 종양 보유 마우스를 사용한 생체 내 형광 이미징 연구에서, 2D UCN-H 나노닷은 EPR 효과를 통해 종양

부위에 축적된 후 중앙 영역에서 지속적으로 강한 형광 신호를 제공한다. 특히, 본 발명 2D UCN-H 나노닷의 우수한 PL 및 수 분산성은 라벨링 공정 없이 2D C_3N_4 를 사용한 최초의 생체 내 광학 이미징 사례이다.

[0123] 이하 본 발명을 제조예, 실시예, 및 실험예를 통하여 상세히 설명한다. 단, 하기 제조예, 실시예, 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0125] <제조예> 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 제조

[0126] 커버가 있는 원형 석영 도가니에 요소(Urea) 5g 및 물 2 ml을 함께 배치하였다. 상기 요소와 물이 배치된 알루미늄 도가니를 전기로에 넣고 550℃까지 약 5℃/min의 온도로 승온하고, 4시간 동안 유지하여 그래피틱 카본 나이트라이드($g-C_3N_4$) 입자를 제조하였다.

[0127] 다음으로, N_2 분위기로 유지된 전기로에 그래피틱 카본 나이트라이드 입자를 배치하고, 550℃에서 약 4시간의 2차 열처리를 수행하였다.

[0128] 이를 통해, 목적하는 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 파우더가 수득되었다.

[0130] <비교예> 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN)의 제조

[0131] 상기 제조예와는 달리 종래 잘 알려진 바와 같이, Urea를 열처리하여 삼차원 C_3N_4 소재(UCN)를 합성하였다.

[0133] <실험예 1> 그래피틱 카본 나이트라이드 분석

[0134] (1) 주사전자현미경 관찰

[0135] 상기 제조예에 의해 준비된 그래피틱 카본 나이트라이드의 표면 형상을 관찰하기 위해 주사전자현미경(SEM)으로 관찰하였고, 그 결과를 도 1의 (c)에 나타내었다.

[0136] 도 1의 (c)를 참조하면, 제조예에 의해 준비된 그래피틱 카본 나이트라이드는 많은 숫자의 작은 기공(다공성)이 형성된 것을 알 수 있고, 다층 구조의 그래피틱 카본 나이트라이드가 적층된 형태인 것을 알 수 있다.

[0138] (2) XRD 분석

[0139] 도 2의 (a)는 상기 제조예에 의해 준비된 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H))와, 종래의 일반적인 제조방법으로 준비된 비교예(UCN)를 분석한 XRD 스펙트럼이다.

[0141] (3) ^{13}C NMR 분석

[0142] 상기 제조예(UCN-H)와 비교예(UCN)의 ^{13}C NMR 분석을 수행하였고 이를 도 2의 (b)에 나타내었다.

[0144] (4) XPS 분석

[0145] 상기 제조예(UCN-H)와 비교예(UCN)의 XPS 분석을 수행하였고 이를 도 2의 (d)에 나타내었다.

[0147] 상기한 구조 분석을 통하여, 단위구조체의 크기(즉 결정크기)가 더 작은 C_3N_4 물질이 만들어지며 일반적인 트리-s-트리아진 구조뿐 아니라 도 2의 (c)에 도시된 바와 같이, s-트리아진 구조도 섞여서 만들어지는 것을 확인하였다.

[0149] <실시예> 그래피틱 카본 나이트라이드(2D UCN-H)의 분산액의 제조

[0150] 상기 제조예에서 얻어진 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)를 탈이온수가 채워진 바이알에 첨가한후, 소니케이 터(POWERsonic 410, Hwa-Shin Instrument Co., South Korea)로 200분 동안 현탁시켜, 도 3의 (a)와 같이 분산 액을 제조하였다.

[0152] <실험예 2> UCN-H 분산액 분석

[0153] (1) 분산도 분석

[0154] 제조예에 의해 준비된 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 용매(물)에 대한 분산도를 분석하기 위해, 물 (10mL)가 담긴 바이알에 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분말(1mg)을 투입하고, 초음파를 이용하여 분산시 킨 후 약 5분 경과 후 디지털 카메라로 촬영하고 이를 도 3의 (a)에 도시하였다.

[0155] 도 3의 (a)를 참조하면, 실시예에 의해 준비된 분산액은 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 뭉침 또는 침전 없이 고르게 분산되는 것을 알 수 있다.

[0157] 도 3의 (b)는 앞선 실험에서 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분말(1mg)을 물(10mL)에 분산시킨 분산액에 UV 램프 파장을 변화시키면서 조사한 후 이의 발광 현상을 디지털 카메라로 촬영한 것이다.

[0159] (2) 투과전자현미경 관찰

[0160] 2D UCN-H를 투과전자현미경(TEM)으로 관찰하였고, 그 결과를 도 2의 (c)에 나타내었다.

[0161] 도 2의 (c)를 참조하면, 실시예에 의해 준비된 분산액 중 분산된 입자의 크기는 약 30 - 50nm(약 40 nm)인 것으 로 관찰되어, 작은 입자의 형상으로 분산액 중에 입자가 잘 분산되어 있음을 알 수 있다.

[0163] (3) AFM 관찰

[0164] 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 입자 크기 및 표면 조도 분석을 위해, 상기 그래피틱 카본 나이 트라이드(UCN-H)를 용매(물)에 분산시킨 실시예 분산액을 날장으로 박리시켜 AFM 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 2의 (d)에 나타내었다.

[0165] 도 2의 (d)를 참조하면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)의 두께는 0.4 내지 0.8nm인 것을 알 수 있 다.

[0167] (4) UV-VIS 및 PL 형광 분석

[0168] 2D UCN-H 및 3D UCN-H를 적외선 가시광선(UV-VIS) 분광 분석 및 형광(PL) 분석을 실시하였고, 파장에 따른 흡광 도를 측정하여 이를 도 2의 (e) 및 (f)에 나타내었다.

[0169] 도 2의 (e)를 참조하면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(2D UCN-H)는 200 내지 400nm 파장에서 높은 흡광 도를 나타내었고, 실시예 분산액(3D UCN-H)은 약 300nm에서 피크를 보이는 것을 확인하였다.

[0170] 또한, 도 2의 (f)를 참조하면, 2D UCN-H 및 3D UCN-H는 약 500nm에서 피크를 보이는 것을 확인하였다.

[0172] 이를 통해, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드 분산액은 조영제의 발광 물질로 사용될 수 있음을 알 수 있다.

[0174] <실험예 3> 시험관내(In-vitro) 이미징

[0175] (1) 세포 독성 평가

[0176] 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액(실시예)의 세포 독성을 평가하였다.

[0177] 구체적으로, 실시예 분산액의 농도를 0, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 RAW 264.7 세포(한국세포주은행)에 처리하여, 각각 24시간 경과 또는 48시간 경과 후의 세포 생존력(viability, %)를 측정하여, 도 4의 (A)에 그래프로 도시하였다.

[0179] 도 4의 (A)를 살펴보면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액은 세포 독성이 거의 없는 것을 확인할 수 있고, 시험관내 또는 생체내 이미징을 위한 조영제로서 사용 가능함을 알 수 있다.

[0181] (2) 세포 이미징

[0182] 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액(실시예)의 농도를 0, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 로 RAW 264.7 세포(한국세포주은행)에 처리한 후, 나타나는 형광이미지를 laser-scanning confocal microscope (LSM710, CarlZeiss MicroImaging, Jena, Germany)로 관찰하여 도 4의 (B)에 나타내었다.

[0184] 도 4의 (B)를 살펴보면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액은 세포내로 endocytosis를 통해 흡수되어, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리 모두 세포질(cytoplasm)에서 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 자체로부터 얻어지는 형광이 관찰되었고, 이로부터 세포를 타깃한 조영제로서 사용 가능함을 알 수 있다.

[0186] <실험예 4> 생체내(In-vitro) 이미징

[0187] (1) 종양 동물 모델 준비

[0188] 인간 유방 선암종 MDA-MB-231 세포(1×10^7) (한국세포주은행)를 6주령 BALB/c 암컷 누드 마우스(나라바이오텍)의 오른쪽 대퇴부에 피하 주사하고, 종양을 대략 2 주 동안 발육시켜 MDA-MB-231 종양이식 동물모델을 준비하였다.

[0190] (2) 정상 동물모델에서 농도에 따른 생체 이미징 (in vivo imaging)

[0191] 정상 동물 모델인 6주령 BALB/c 암컷 누드 마우스(나라바이오텍)에 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액(실시예)을 0, 25, 50 또는 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 피하 투여하하고 1시간 후, 동물용 광학영상기기 (Maestro In Vivo Imaging System, Caliper Life science Inc, Massachusetts, USA, excitation = 455 nm, emission = 490 nm)를 사용하여, 형광이미징을 관찰하였고, 그 결과를 도 5의 (A)에 사진 및 (B)에 농도별 신호강도 그래프로 도시하였다.

[0193] 도 5의 (A) 및 (B)를 살펴보면, 정상 누드마우스 피하조직에서 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 투여 농도에 따라 관측되는 형광 강도가 상승됨을 알 수 있다.

[0195] (3) 종양 모델에서 종양 부위의 시간 경과에 따른 변화 관찰

[0196] 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액(실시예) 100 $\mu\text{g/mL}$ 를 상기 (1)의 동물 모델에 투여 후, 시간 경과별 관측되는 형광이미징의 변화를 관찰하여, 도 6의 (A)에 사진으로 나타내었다.

[0198] 도 6의 (A)를 살펴보면, 투여 후 1시간 경과 시점과 투여 후 24시간 경과 시점에서 모두 암세포 부분에서 일정한 형광 강도가 확인된다.

- [0199] 따라서, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액은 생체내 이미징 조영제로서 장시간 경과에도 안정적인 형광을 구현할 수 있어 유용하다.
- [0201] (4) 종양 표적 ex vivo 이미징의 관찰
- [0202] 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액(실시예)을 (100 μ g/mL)로 상기 (1)의 동물 모델에 투여 후, 생체내 각 주요 기관 또는 조직(간, 비장, 신장, 림프절 등) 중에서 종양(암세포) 표적 이미징을 관찰하여, 각 기관(또는 조직) 및 종양에서의 형광 강도를 비교 평가하였고, 그 결과를 도 6의 (B)에 사진과 형광 강도 그래프로 도시하였다.
- [0204] 도 6의 (B)를 살펴보면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액은 종양에 대한 형광 강도가 가장 높은 것으로 확인되는 바, 종양(암세포)에 대한 표적능이 우수한 조영제임을 알 수 있다.
- [0205] 따라서, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액은 암 또는 암의 전이의 진단용 조영제, 또는 암세포 추적용 조영제로서 제공될 수 있음을 알 수 있다.
- [0207] 한편, 이 생체 내 광학 이미징 결과는, 라벨링 과정 없이 "중금속 없이" 2D 카본 나이트라이드 나노 물질 (그래핀 유도체 포함)을 사용하여 얻은 첫 번째 사례이다.
- [0208] 반면, 종래의 UCN 나노당은 주입 후 3 시간에 마우스 모델의 종양 병변에 형광 신호를 제공할 수 없다.
- [0209] 본 발명의 UCN-H 나노당은 UCN에 비해 우수한 PL과 수 분산성으로 인해 높은 형광 신호 강도로 종양 부위를 성공적으로 시각화 할 수 있다.
- [0211] (4) OCN(optically active carbon nanoparticle)과의 비교 평가
- [0212] 기존의 OCN(optically active carbon nanoparticle)과 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액의 이미징 성능을 비교 평가하기 위하여, 다음과 같이 실험하였다.
- [0213] 구체적으로, 상기 (1)의 동물모델 2마리에, 각각 OCN 및 본 발명 UCN-H를 100 μ g/mL로 투여 3시간 경과 후 관측되는 형광이미징 사진을 도 6의 (C)에 나타내었다.
- [0215] 도 6의 (C)를 살펴보면, 본 발명에 따른 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H) 분산액의 경우, 암세포 부분에서 강한 형광을 나타내는 반면, OCN의 경우 암세포 부분에서 형광이 전혀 관측되지 않는다.
- [0216] OCN의 양자 효율이 매우 낮아 측정될 수 없는 것인 반면, 본 발명 UCN-H의 경우, OCN 대비 양자 효율이 우수하여, 형광 관측에 매우 적합함을 알 수 있다.
- [0218] (5) 면역형광 염색
- [0219] 종양 조직을 optimal cutting temperature (OCT) 화합물로 덮고 -20 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동결시켰다. 종양 절편을 cryosta (Cryocut 1950, Leica, Wetzlar, Germany)를 사용하여 5 μ m 슬라이스로 절단하고 폴리 라이신으로 코팅 된 현미경 슬라이드 상에 놓았다. 슬라이드를 4', 6-디아미디논-2 페닐인돌 디히드로클로라이드 (DAPI) (Sigma) 와 함께 25 $^{\circ}$ C에서 3 분 동안 배양 하였다. 행균 후 슬라이드를 수성 실장 배지(Dako, Carpinteria, CA)로 장착하고 디지털 현미경 카메라 시스템 (Olympus DP71, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 관찰 하였고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0221] 도 7을 살펴보면, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)가 종양 조직 절편에서 관찰됨을 확인할 수 있고, 또한 DAPI로 염색된 이미지는 종양 조직 핵의 위치를 보여 주었고, 또한, 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)

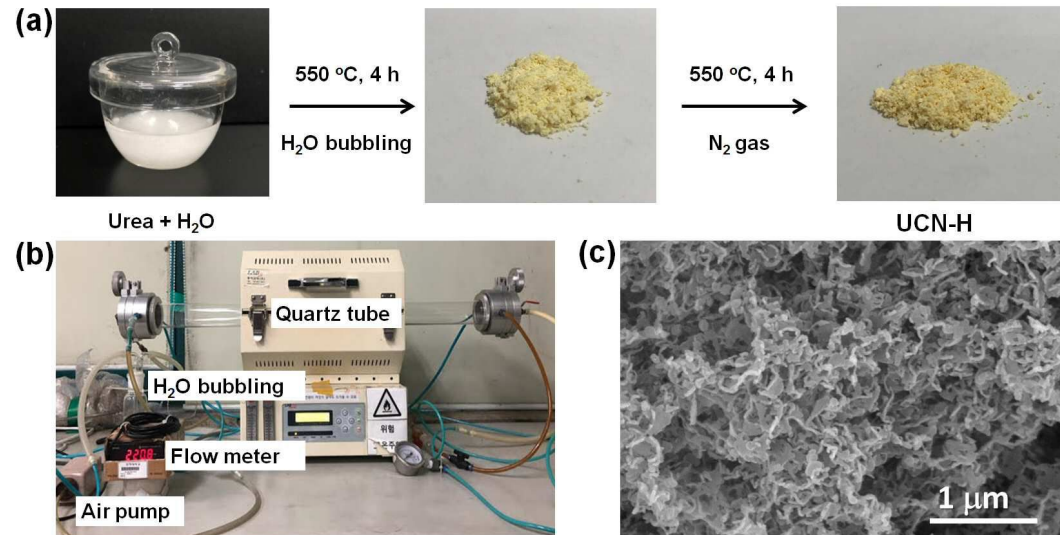
및 DAPI로 염색한 후 동일 조직에서 병합된 이미지가 정확하게 매칭되는 것으로 확인되었다.

[0222]

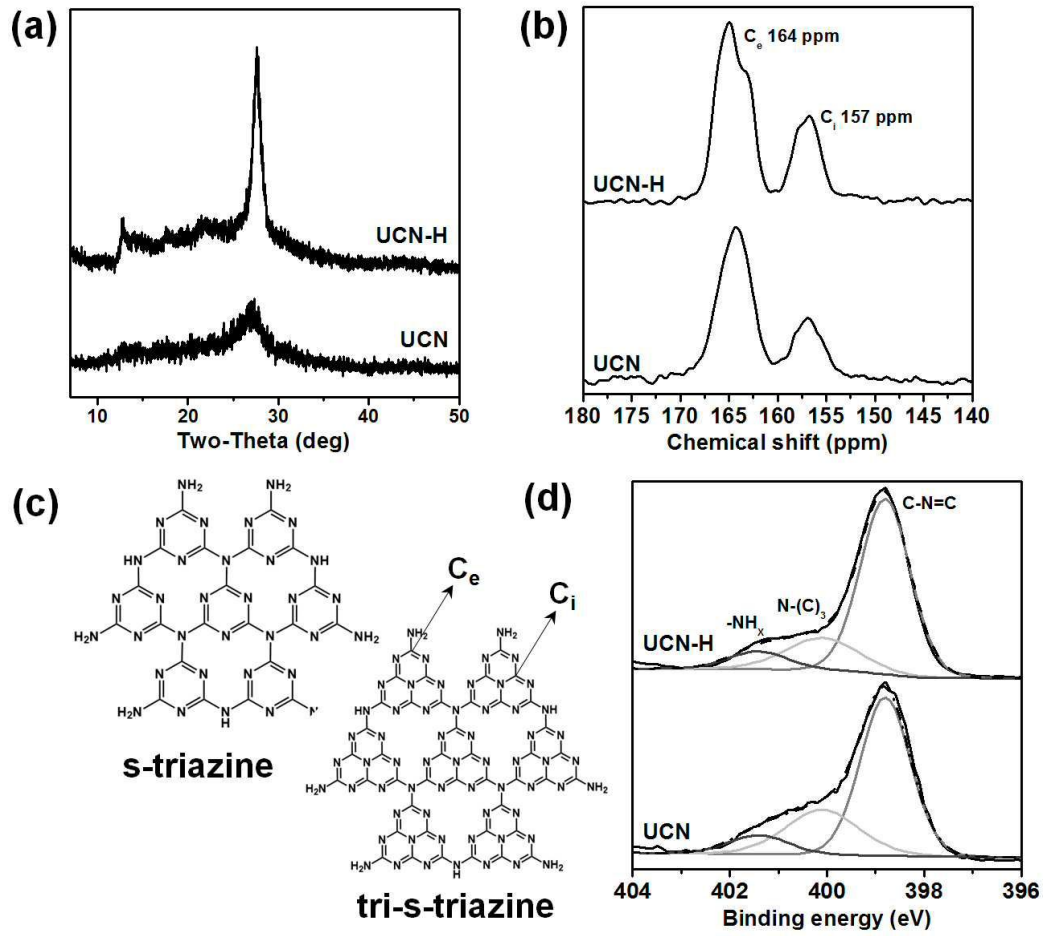
따라서, 본 발명 그래피틱 카본 나이트라이드(UCN-H)는 종양에서 잘 축적되어 이미징할 수 있는 바, 시험관 내(In vitro) 이미징뿐 아니라, 생체 내(In vivo) 형광 이미징을 구현하여, 질병(예를 들어 암) 진단용 조영제, 또는 세포(예를 들어 암세포) 추적용 조영제 등의 조영제 의약품으로 제공될 수 있다.

도면

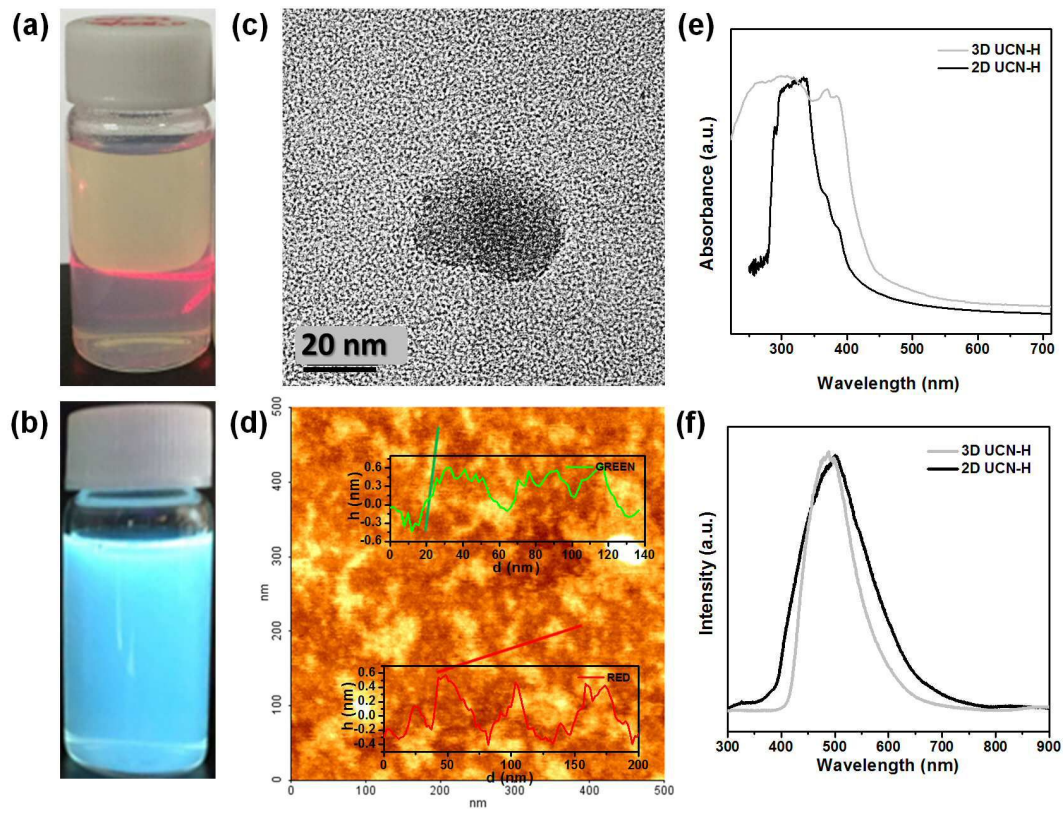
도면1



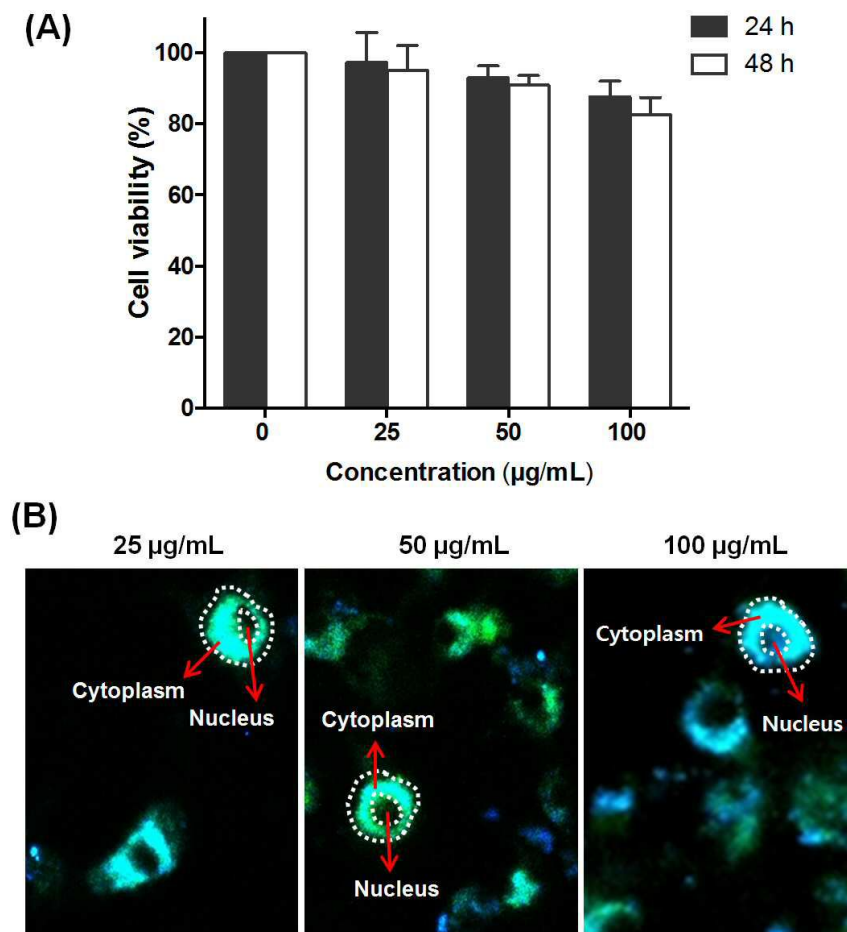
도면2



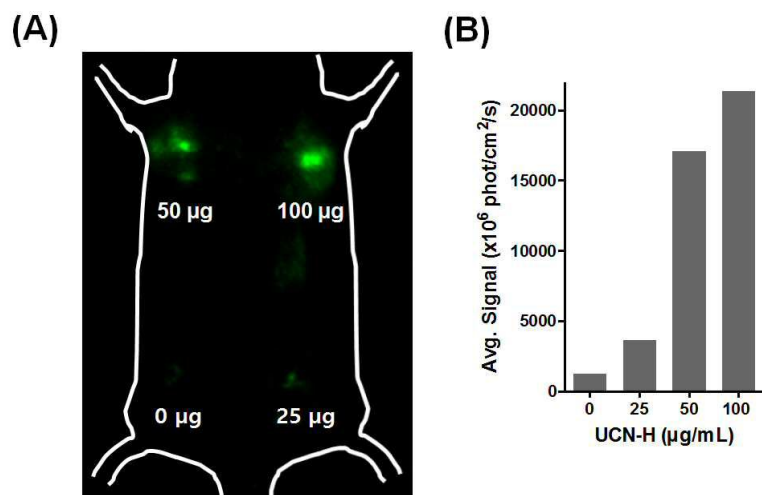
도면3



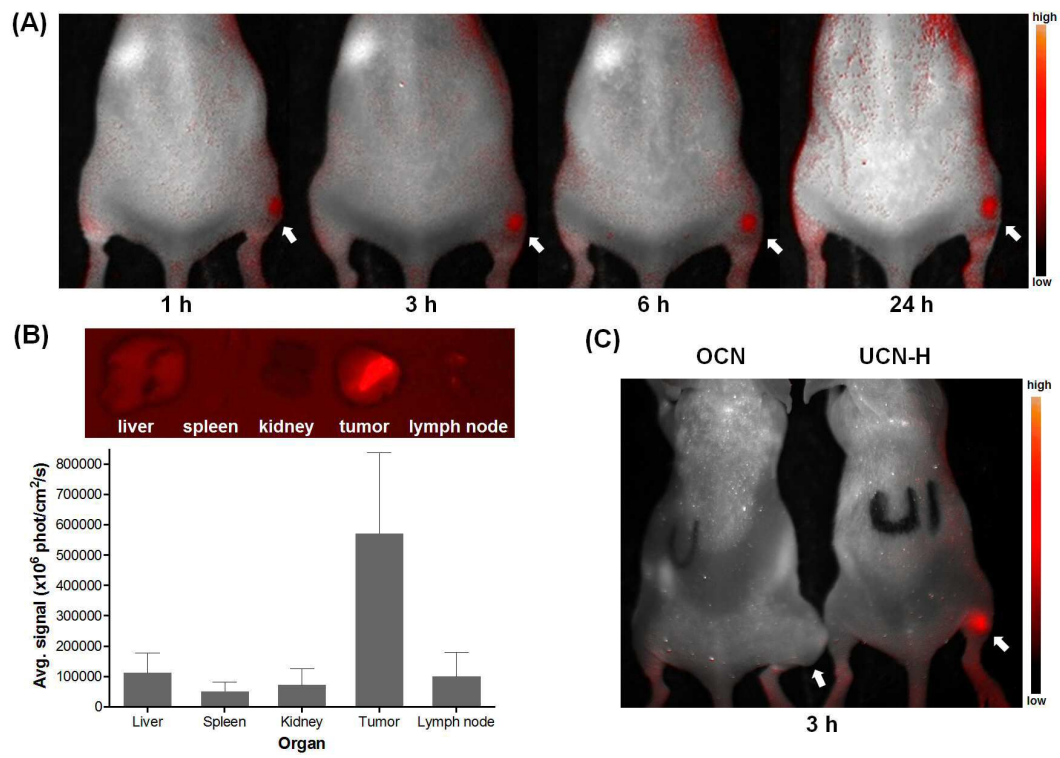
도면4



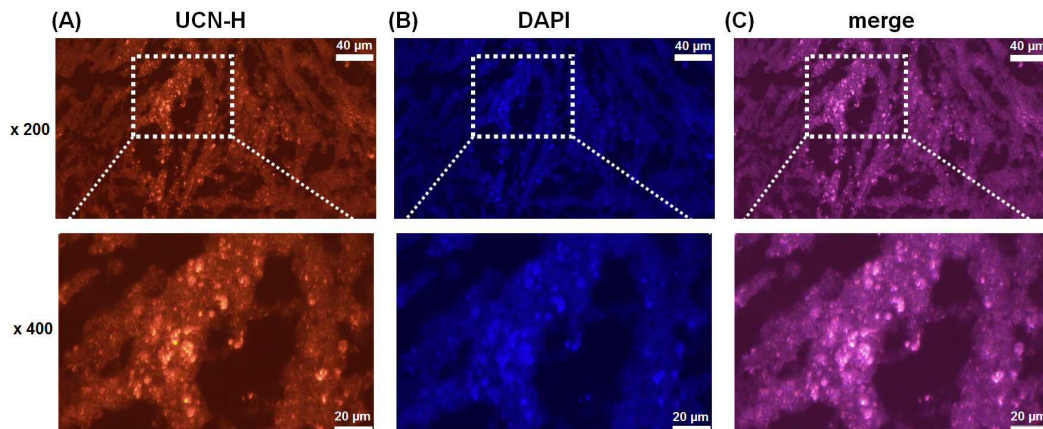
도면5



도면6



도면7



도면8

