

<https://doi.org/10.22643/JRMP.2018.4.2.115>

Radiolabeled 2D graphitic nanomaterials and their possibility for molecular imaging applications

Seok Min Kang, Chul Hee Kim and Dong Wook Kim*

Department of Chemistry and Chemical Engineering, Inha University, 100 Inha-ro, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea.

ABSTRACT

In recent years, many researchers have attempted to make use of 2D nanoparticles as molecular imaging probes since extensive investigations proved that 2D nanoparticles in the body tends to accumulate certain lesions by enhanced permeability and retention (EPR) effect. For example, graphene and carbon nitride which have high surface area and modifiable properties showed good biocompatibility and targetability when it used as imaging probes. However, poor dispersibility in physiological mediums and its uncontrolled size limited its usage in bio-application. Therefore, oxidation process and mechanical exfoliation have been developed for overcoming these problems. In this paper, we highlight the several major methods to synthesize biocompatible 2D nanomaterials like graphene and carbon nitride especially for molecular imaging study including positron emission tomography (PET).

Key Word: 2D nanomaterial, Graphene, Carbon nitride, Positron emission tomography, Molecular imaging probes, Exfoliation.

Introduction

그래핀 (graphene)은 탄소의 sp^2 결합으로 이루어진 판상형 구조를 가지고 있고 그 두께는 원자 한 개의 크기를 가지고 있다(Figure 1A, B). 이는 좋은 결정성, 전기적 성질을 가지고 있어 반도체 소재를 비롯한 재료 과학 분야에서 많은 관심을 받아왔다(1,2). 그래핀은 2004년에 처음 보고되었으며 micromechanical cleavage라는 기술을 통해 흑연 (graphite) 으로부터 추출되었다. 이 방법을 통해 높은 결정성을 가진 그래핀이 쉽게 생산되었으며 이에 대한 다양한 활성 및 응용사례에 대한 연구가 진행되었다. 그래핀의 개발을 시작으로, 그래핀의 산화된 형태인 그래핀 옥사이드 (graphene oxide)도 새롭게 합성되었다(3,4). 그래핀 옥사이드는 흑연의 산화반응으로 합성할 수 있으며 이를 다시 환원시키면 그래핀을 합성할 수 있어 그래핀의 전구체로 많

이 사용되고 있다. 그래핀 옥사이드의 구조는 정확하게 밝혀 지지는 않았지만 산소원자로 이루어진 다양한 작용기를 가지고 있어 기존 그래핀과는 다른 전기적, 물리적, 그리고 전기화학적 특성을 지니고 있고 물에 분산성 좋은 친수성 (hydrophilic) 성질을 가지고 있어 추가적인 공정에서도 유리한 장점이 있다.

카본 나이트라이드(Carbon nitride)는 sp^2 탄소와 질소만으로 이루어진 반복 단위를 구조체로 하는 물질로, 여러 동소체가 있지만 그 중 그래피틱(graphitic)한 2D 구조를 지닌 tri-s-triazine 구조가 열역학적으로 가장 안정하다고 알려져 있다(5). 그래피틱 카본 나이트라이드(Figure 1C, D)는 독특한 전기적 성질과 광학적 활성을 지닌 물질로 광촉매, oxygen reduction reaction 촉매 등으로 활용되고 있으며 (6), 최근에는 이러한 성질을 이용하여 생체에 적합한 나노 입자로서의 응용이 보고되고 있다. 그래피틱 카본 나이트라

Received: December 16, 2018/ Revised: December 20, 2018/ Accepted: December 22, 2018

Corresponding Author : Prof. Dong Wook Kim, Department of Chemistry, Inha University, 100 Inha-ro, Nam-gu, Incheon 402-751, Korea. Tel: +82-32-860-7679, FAX: +82-32-867-5604, E-mail: kimdw@inha.ac.kr

Copyright©2018 The Korean Society of Radiopharmaceuticals and Molecular Probes

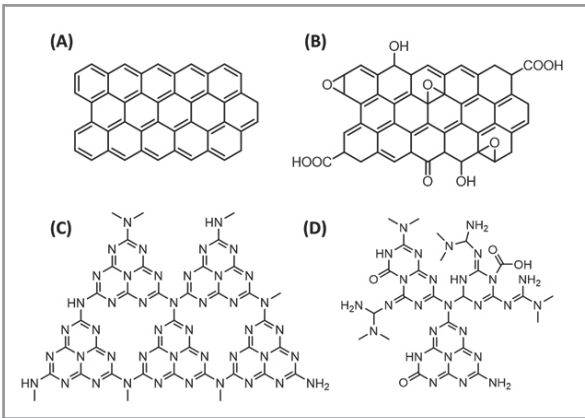


Figure 1. Proposed structures of various 2D materials. (A) Graphene, (B) Graphene oxide, (C) Carbon nitride (g-C₃N₄), (D) Oxidized carbon nitride (OCN).

이드는 합성 방법과 조건에 따라 그 활성이 좌우되는데, 본 논문에서는 이러한 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자가 어떠한 방식으로 생체에 적합한 나노 입자로 활용 될 수 있는 지에 관하여 조명하고자 한다.

양전자 방출 단층촬영 (positron emission tomography, PET), 단일광자 단층촬영 (single photon emission computed tomography, SPECT)은 원하는 프로브 (probe)에 방사성동위원소를 표지하여 살아 있는 생체 내에서 벌어지는 분자수준의 변화나 물질대사 같은 생리학적 현상들을 비 침투적으로 볼 수 있는 분자영상(molecular imaging) 기법이다(7). 이러한 분자영상 기법은 높은 민감도를 가지고 있기 때문에 어떤 병리현상이 체내에 발생하였을 때 초기단계에 이상징후를 발견할 수 있다는 점에서 의학 분야에서 중요한 기술로 대두되고 있다. PET이나 SPECT 기술에는 방사성동위원소가 표지 된 방사성추적자 (radiotracer)를 필수적으로 체내에 도입하여야 하고 그 방사성추적자의 종류에 따라 관찰할 수 있는 체내 부위가 달라지게 된다. 저분자의약품(small molecule drug), 고분자(polymer), 나노 입자(nanoparticles) 등이 방사성추적자로 사용되는 플랫폼이며 fluorine-18 (F-18, $t_{1/2} = 109.8$ min), copper-64 (Cu-64, $t_{1/2} = 12.7$ hours), carbon-11 (C-11, $t_{1/2} = 20$ min)와 같은 방사성동위원소를 표지하여 사용한다. 본문에서는 방사성동위원소가 표지 된 그래핀이나 카본나이트라이드 같은 이차원 물질 분자영상 활용 가능성에 대해 소개하고자 한다.

그래핀 옥사이드의 방사성동위원소 표지를 통한 분자영상 활용가능성

나노 크기를 갖고 있는 그래핀 옥사이드는 내피세포 층 (endothelial cell layers)을 통과할 수 있으며 다양한 조직들과 서로 상호 작용을 할 수 있다. 특히 악성종양 근처의 혈관 구조는 일반 조직에 비해 엉성하기 때문에 방사성동위원소가 표지 된 나노 사이즈를 가지고 있는 그래핀 옥사이드가 쉽게 침투하여 지속적으로 머물러 악성종양 부근의 이미지를 오랜 시간 동안 얻을 수 있고 이를 EPR (enhanced permeability and retention) effect 라고 한다.

그래핀 옥사이드가 방사성추적자로 활용되기 위한 다양한 방사성동위원소 표지 방법이 개발되었다(8,9). 첫 번째로는, 그래핀 옥사이드의 산화된 부분인 에폭사이드(epoxide)가 친 전자체로 작용하여 F-18 음이온이 친핵성 치환반응을 통해 표지 하는 방법이다(10). F-18으로 표지를 하기 전에 생체 안정성과 분산능력을 증진시키기 위해 그래핀 옥사이드의 말단에 있는 카르복실기에 amine-terminated PEG (poly ethylene glycol, 10kDa)와 N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimide (EDC)를 이용해 공유결합으로 연결된 PEG 를 도입하게 된다. 이 과정에서 강한 초음파를 가하게 되면 PEG가 붙음과 동시에 그래핀 옥사이드가 생체 적합한 나노 사이즈로 줄어들게 된다(Figure 2). 기존의 금속형태의 방사성동위원소를 chelation 하는 방식에서는 연결부위가 끊어지거나 금속이 decomplexation 되어 떨어져 나가는 문제들이 생길 가능성이 있지만 이 연구와 같이 F-18을 강한 결합인 공유결합으로 연결하게 되면 생체 환경에서도 안정적으로 표지화 상태가 유지되게 된다.

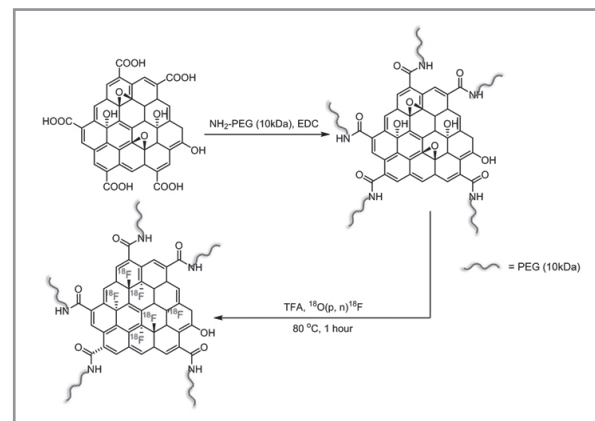


Figure 2. Illustration of ¹⁸F-labelled graphene oxide by nucleophilic fluorination.

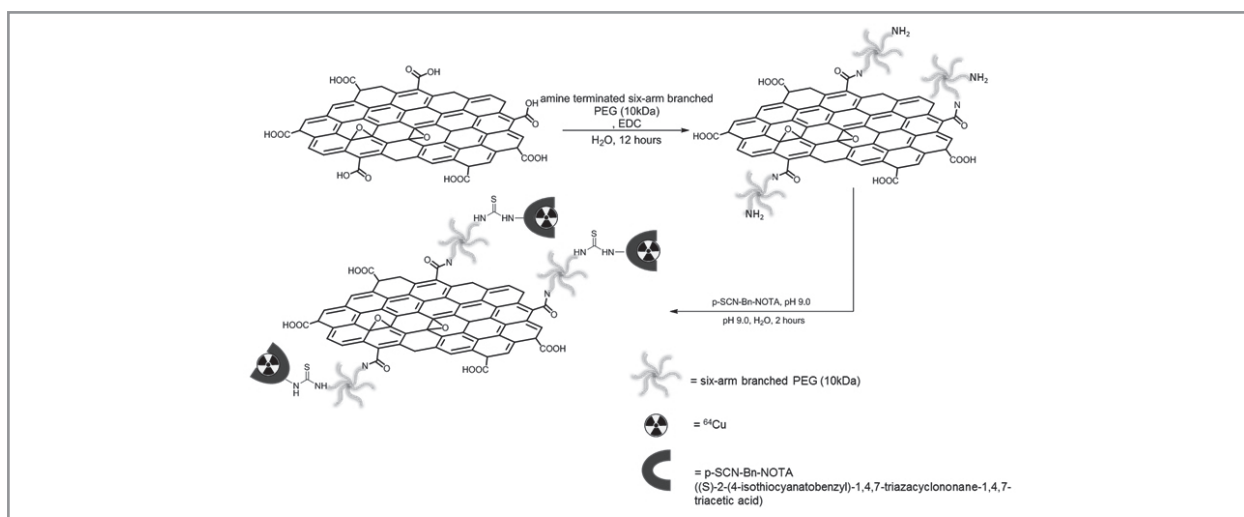


Figure 3. Illustration of ^{64}Cu -chelated nanographene conjugates.

두 번째 방법으로는, PET 이미지에 사용되는 방사성동위원소 중 특정한 chelator에 의해 표지 될 수 있는 금속을 이용한 방법이다(11,12). 그래핀 옥사이드의 말단부분에 있는 카르복실기를 EDC로 활성화시키고 chelator를 포함하는 분자를 연결한다. Figure 3의 예시에서 사용된 동위원소는 Cu-64이고 이를 효율적으로 chelation 시킬 수 있는 NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid)가 그래핀 옥사이드에 연결되었다. 이 방법의 장점은 상대적으로 반감기가 긴 Cu-64 ($t_{1/2} = 12.7$ hours)을 표지 할 수 있어 오랜 시간 동안 이미지를 관찰할 수 있고 원하는 금속을 chelation 할 수 있는 ligand 를 도입할 수 있다.

마지막은, π 전자를 많이 가지고 있는 그래핀 옥사이드의 특성을 이용한 방법이다. 그래핀 옥사이드는 탄소의 sp^2 결합으로 이루어져 있고 넓은 표면적을 가지고 있어 원하는 물질을 흡착시켜 다양한 응용분야에 활용될 수 있다(13). Figure 3의 방법과 마찬가지로 방사성동위원소를 chelation 시킬 수 있는 분자를 그래핀 옥사이드에 고정화 시키는 방법이고 이 경우에는 $\pi - \pi$ 상호작용이 이용된다 (Figure 4). 본 연구에서 사용된 방사성 핵종은 In-111이고 이는 SPECT 영상에 사용될 수 있는 방사성동위원소이다. 그래핀 옥사이드는 표면적이 넓기 때문에 효율적인 $\pi - \pi$ 상호작용을 할 수 있고 따라서, 높은 비방사능(molar activity) 를 기대 할 수 있다. 본 연구에서는 95% 이상의 radiolabeling efficiencies 를 보여주었고 그래핀 옥사이드의 말단에 항체를 연결하여 targeting ability 도 부여하였다.

생체 적합성을 지닌 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자의 합성

최근 그래핀과 다르게 헤테로 원소(질소나 산소등)가 포함된 2D 나노구조로 이루어진 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 구조가 반도체 재료로 각광을 받고 있으며 몇몇 연구팀에서 분자영상 분야에 적용하려는 시도가 이루어 지고 있다(5). 이러한 그래피틱 카본 나이트라이드는 일반적으로 고온에서 melamine, urea, dicyandiamide 등과 같은 전구체를 열처리하여 얻어지는 2D material로서 적층 구조를 형성한다. 2D material과 같이 적층 구조를 형성하는 물질의 경우 체내에서 aggregation되어 나노 입자로서 기능을 할 수 없는 경우가 많고, 열처리하여 합성하는 경우 그 입자의 크기가 나노 입자보다 훨씬 큰 사이즈를 지녀 biomaterial로 적합하지 않다. 따라서 그래피틱 카본 나이트라이드를 생체 적합성이 있는 나노 입자로서 활용하기 위해서는 Top-down 방식으로 입자의 크기를 줄임과 동시에 적층 구조를 박리시켜 물에 대한 분산도(dispersibility)를 높여야 하는 것이 주된 쟁점이다. 최근에는 이러한 그래피틱 카본 나이트라이드의 생체 적합성을 높이기 위한 시도가 보고되고 있다. 이온을 인터칼레이터로 하여 그래피틱 카본 나이트라이드의 층상 간 거리를 확장시키고 열처리하여 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자를 합성할 수 있음이 보고되었다(14). 또한 물리적인 방법으로 ultrasonication을 사용하면 입자의 사이즈를 줄이거나 효과적으로 층상을 박리할 수 있음이 보고되었다(15, 16). 하

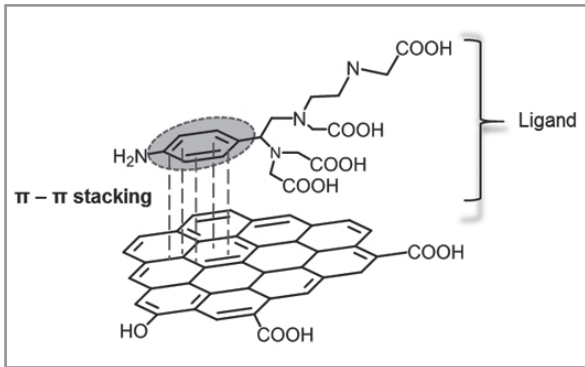


Figure 4. Illustration of DTPA-graphene oxide complex by π - π stacking.

지만 나노 입자의 특성상 높은 표면장력에 의하여 박리된 입자들이 시간이 지남에 따라 다시 aggregation 되는 문제는 결정적으로 생체에 적합한 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자를 합성하는 데에 있어서 큰 문제점 이었다. 따라서 근래에는 그래피틱 카본 나이트라이드에 $KMnO_4$ 와 같은 산화제를 사용하여 산화된 그래피틱 카본 나이트라이드를 합성하였고 -COOH, -NHx, -OH와 같은 말단의 잔기들이 표면에 존재하게 됨에 따라 electro-stabilization되어 aggregation이 되는 것을 방지 할 수 있다는 고무적인 내용이 보고되었다(16). 또한 산화된 그래피틱 카본 나이트라이드 표면의 노출된 작용기에 hexaethylene glycol을 functionalization하여 물에 대한 분산도를 크게 높임과 동시에 생체조건에서 나노 입자의 안전성도 높일 수 있다는 내용이 보고 되었다(17).

이러한 생체 적합성을 지닌 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자와 그 유도체가 연구됨에 따라 향후 그래피틱 카본 나이트라이드의 특성을 이용한 분자 영상 프로브로서의 활용이 가능할 것으로 기대되고 있다.

그래피틱 카본 나이트라이드를 이용한 형광 이미징

그래피틱 카본 나이트라이드가 높은 형광 세기를 보이며 생체에 적합한 나노 입자로서 제조가 가능해짐에 따라 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자를 이용한 in vitro 수준에서의 세포 형광 이미징이 조명 받고 있다 (14,15). 특히 본 연구진에 의해 개발된 산화 카본 나이트라이드 나노 입자(oxidized carbon nitride; OCN)는 MTT assay를 통하여 HeLa cell이 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자 $600 \mu g mL^{-1}$ 의 농도에서도 높은 cell viability를 보이며 형광 이미징에서 cell의 morphology 변화 없이 푸른색의 형광이 cell membrane 내로 관찰됨이 보고 되었다(17). 그러나 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자는 물에 대한 분산성이 부족하여 분자영상 분야에 적용하는데 한계가 있다. 이에 따라 Figure 5A에서와 같이 OCN에 PEGylation을 하여 획기적으로 물에 대한 분산성을 높일 수 있었으며, 또한 Figure 5B에서 PEGylation된 산화된 그래피틱 카본 나

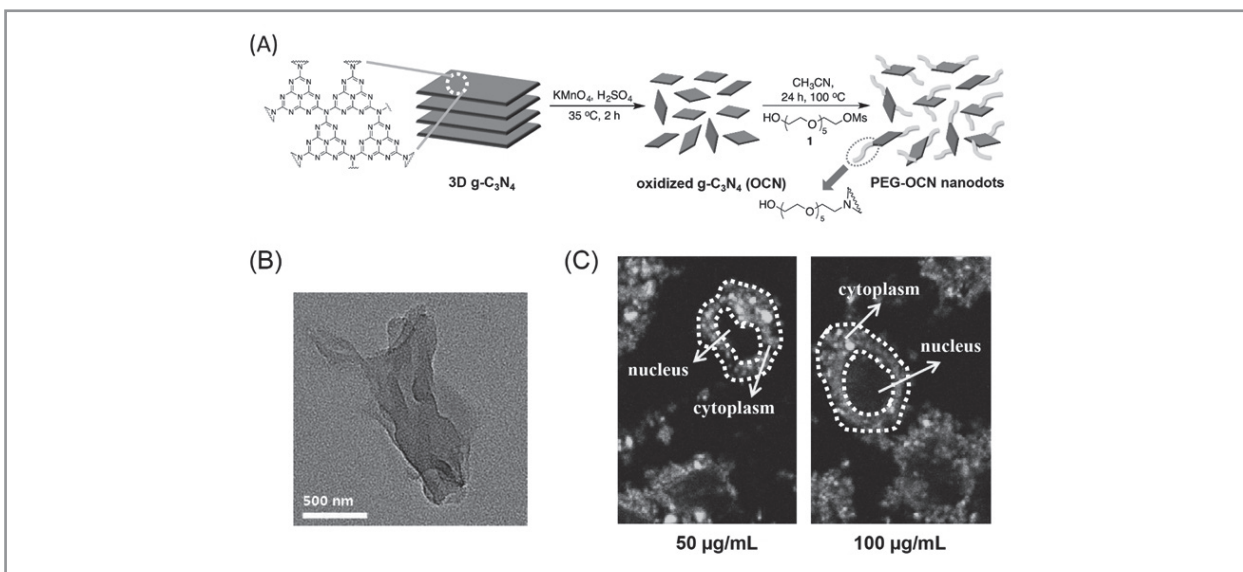


Figure 5. (A) Illustration of synthesis of PEG-OCN. (B) TEM image of water-dispersed PEG-OCN nano-material. (C) Confocal fluorescence microscopic image of RAW264.7 cells using PEG-OCN nanodots after incubation with different concentrations (50 and 100 $\mu g/mL$).

트라이드(PEG-OCN)가 직경 50nm 크기를 지닌다는 것을 확인하고 이를 이용한 RAW 264.7 cell에 대한 형광 세포 영상 연구에 적용하였다. Figure 5C에서 볼 수 있듯이 cell의 cytoplasm에서만 선택적으로 푸른색의 형광이 관찰되어 cell study가 가능함을 밝혔다(18). 그러나 그래피틱 카본 나이트라이드 나노 입자와 그 유도체가 in vivo 조건에서 이미징에 활용되기는 아직까지 넘어야 할 한계가 많다. 첫 번째로 방출되는 형광의 파장이 체내에서 나타나는 형광 파장(auto-fluorescence)과 비슷하여 명확한 이미징이 불가능하다는 점이다. 두 번째로는 방출되는 형광이 가시광선 영역에 속하기 때문에 체내 여러 조직을 뚫고 검출기에 도달하기 힘들다는 점이다. 따라서 이러한 한계에 영향을 받지 않는 PET 이미징에 대한 나노 입자로 활용이 된다면 그래피틱 카본 나이트라이드가 지니는 높은 생체 적합성을 이용한 PET 영상 진단의 새로운 패러다임을 제시 할 수 있을 것이라 기대된다.

Conclusion

지난 몇 년 간 나노 입자가 생체 내에서 보이는 특별한 거동이 규명되면서 나노 입자를 PET 분자영상 프로브로 사용하기 위한 노력은 꾸준히 계속되어 왔다. 특히 2D materials을 나노 입자로 활용하려는 시도는 단 원자 두께의 층상을 지닌 구조적 특성으로 인한 넓은 표면적, 다양한 functionalization이 가능한 표면에 노출된 작용기, 높은 생체 적합성 등으로 인해 그 가치가 입증되고 있다. 생체 적합성이 우수한 2D 나노 입자를 제조하기 위해 그래핀과 카본 나이트라이드 모두 산화 단계와 sonication과 같은 이화학적 방법을 통해 그 입자의 크기를 줄이고 표면에 노출된 친수성 작용기들이 용매화를 통해 분산의 정도를 높인다는 사실이 보고되었다. 본 총설에서는 이러한 접근을 통해 2D materials를 PET 이미징에 대한 프로브로 사용한 연구 사례에 대하여 기술하였다. 다양한 방사선택종을 이러한 2D material에 표지 할 수 있다는 연구들은 앞으로 PET 이미징을 통해 분자 수준의 생리적 변화와 병변 진단에 있어 선구적인 역할로 자리매김 할 수 있다는 가능성을 보여준다.

Acknowledgments

This work was supported by the Basic Science Research Program (grant code: NRF-2017R1A2A2A10001451) and by the MOTIE(Ministry of Trade, Industry & Energy (project number: 10080450) and KSRC(Korea Semiconductor Research Consortium) support program for the development of the future semiconductor device.

References

1. Choi W, Lahiri I, Seelaboyina R, Kang YS. Synthesis of graphene and its applications: A Review. *Crit Rev Solid State Mater Sci* 2010;35:52-71.
2. Yang K, Feng L, Hong H, Cai W, Liu Z. Preparation and functionalization of graphene nanocomposites for biomedical applications. *Nat Protoc* 2013;8:2392-2403.
3. Chen D, Feng H, Li J. Graphene Oxide: Preparation, functionalization, and electrochemical applications. *Chem Rev* 2012;112:6027-6053.
4. Chabot V, Higgins D, Yu A, Xiao X, Chen Z, Zhang J. A review of graphene and graphene oxide sponge: material synthesis and applications to energy and the environment. *Energy Environ Sci* 2014;7:1564-1596.
5. Yew YT, Lim CS, Eng AYS, Oh J, Park S, Pumera M. Electrochemistry of layered graphitic carbon nitride synthesised from various precursors: searching for catalytic effects. *ChemPhysChem* 2016;17:481-488.
6. Zhu J, Xiao P, Li H, Carabineiro SAC. Graphitic carbon nitride: synthesis, properties, and applications in catalysis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2014;6:16449-16465.
7. Phelps ME. Positron emission tomography provides molecular imaging of biological processes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:9226-9233.
8. Yang K, Wan J, Zhang S, Zhang Y, Lee S-T, Liu Z. In vivo pharmacokinetics, long-term biodistribution, and toxicology of PEGylated graphene in mice. *ACS Nano* 2010;5:516-522.

9. Fazaeli Y, Akhavan O, Rahighi R, Aboudzadeh MR, Karimi E, Afarideh H. In vivo SPECT imaging of tumors by ^{198}Au -labeled graphene oxide nanostructures. *Mater Sci Eng C* 2014;45:196–204.
10. Jang SC, Kang S, Lee JY, Oh SY, Vilian ATE, Lee I, Han Y, Park JH, Cho WS, Roh C, Huh YS. Nano-graphene oxide composite for in vivo imaging. *Int J Nanomedicine* 2018;13:221–234.
11. Hong H, Zhang Y, Engle JW, Nayak TR, Theuer CP, Nickles RJ, Barnhart TE, Cai W. In vivo targeting and positron emission tomography imaging of tumor vasculature with ^{66}Ga -labeled nano-graphene. *Biomaterials* 2012;33:4147–4156.
12. Hong H, Yang K, Zhang Y, Engle JW, Feng L, Yang Y, Nayak TR, Goel S, Bean J, Theuer CP, Barnhart TE, Liu Z, Cai W. In vivo targeting and imaging of tumor vasculature with radiolabeled, antibody-conjugated nanographene. *ACS Nano* 2012;6:2361–2370.
13. Cornelissen B, Able S, Kersemans V, Waghorn PA, Myhra S, Jurkshat K, Crossley A, Vallis KA. Nanographene oxide-based radioimmunoconstructs for in vivo targeting and SPECT imaging of HER2-positive tumors. *Biomaterials* 2013;34:1146–1154.
14. Zhan Y, Liu Z, Liu Q, Huang D, Wei Y, Hu Y, Lian X. A facile and one-pot synthesis of fluorescent graphitic carbon nitride quantum dots for bio-imaging applications. *New J Chem* 2017;41:3930–3938.
15. Zhang X, Wang H, Wang H, Zhang Q, Xie J, Tian Y, Wang J, Xie Y. Single-layered graphitic-C₃N₄ quantum dots for two-photon fluorescence imaging of cellular nucleus. *Adv Mater* 2014;26: 4438–4443.
16. Oh J, Yoo RJ, Kim SY, Lee YJ, Kim DW, Park S. Oxidized carbon nitrides: water-dispersible, atomically thin carbon nitride-based nanodots and their performances as bioimaging probes. *Chem Eur J* 2015;21:6241–6246.
17. Kim JK, Park S, Yoo RJ, et al. Thin PEGylated carbon nitrides: water-dispersible organic nanodots as bioimaging probes. *Chem Eur J* 2018;24:3506–3511.
18. Zhang X, Xie X, Wang H, Zhang J, Pan B, Xie Y. Enhanced photoresponsive ultrathin graphitic-phase C₃N₄ nanosheets for bioimaging. *J Am Chem Soc* 2012;135:18–21.