



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2010-0000562

(43) 공개일자

2010년01월06일

(51) Int. Cl.

A61K 33/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01) C06B 27/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2008-0060110

(22) 출원일자

2008년06월25일

심사청구일자

2008년06월25일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

이종무

경기도 고양시 일산동구 정발산동 1354 밤가시 마을 건영 912-303

김호형

충남 천안시 성정동 한도아파트 1206호

홍찬석

인천 남구 학익동 동아풍림아파트 115-701

(74) 대리인

이원희

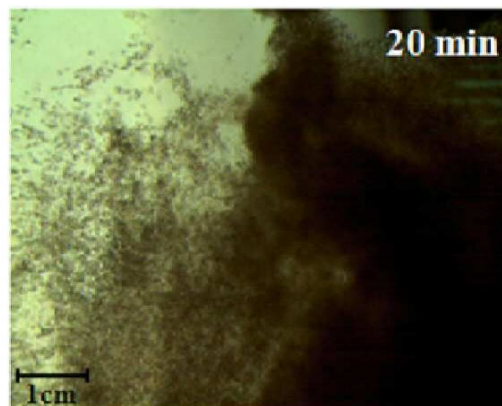
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 근적외선 조사에 의하여 폭발을 일으키는 다공성 실리콘나노폭탄, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 근적외선 조사에 의하여 폭발을 일으키는 다공성 실리콘 나노폭탄, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄은 낮은 조사 강도의 근적외선을 사용하여 열 및 폭발을 일으켜 정상 세포에 손상을 가하지 않고 암을 반복적으로 치료할 수 있는 치료제로 사용될 수 있고, 다공성 실리콘 자체는 생체적합성 및 생분해도가 우수하여 다른 치료제보다 부작용이 적고, 독성이 없는 치료제로 사용될 수 있다.

대표도 - 도6b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 36378-1

부처명 인하대학교

연구사업명 국가지정연구실

연구과제명 나노다공성 실리콘 기반 차세대 암진단 및 치료기술

주관기관 한국과학재단

연구기간 2007년7월01일~2012년 6월30일

특허청구의 범위

청구항 1

근적외선 조사에 의하여 열 또는 폭발을 일으키는 다공성 실리콘 나노폭탄.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 근적외선의 조사 강도는 100 내지 400 mW/cm²의 범위인 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 근적외선은 0.78 내지 1.4 μ m 파장 범위의 다색광인 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄.

청구항 4

결정질 실리콘 표면에 전기화학적 에칭법에 의해서 다공성 실리콘층을 형성하는 단계(단계 1);

상기 다공성 실리콘층을 분쇄하여 200 nm 이하의 크기로 다공성 실리콘 입자를 만드는 단계(단계 2); 및

상기 다공성 실리콘 입자의 기공에 산화제가 함입되도록 다공성 실리콘 입자와 산화제를 혼합하는 단계(단계 3);

을 포함하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 단계 1에서의 전기화학적 에칭법은 불화수소(HF)와 에탄올(C₂H₅OH) 1:1 혼합용액 내에서 수행되는 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 단계 1에서 형성된 다공성 실리콘층에는 원통형의 마크로 기공(macropore)과 구조형의 마이크로 기공(micropore)이 존재하는 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 단계 2에서의 다공성 실리콘 입자는 다공성 실리콘층을 물속에서 초음파진동기로 진동시켜 분쇄하여 형성되는 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 단계2에서의 다공성 실리콘 입자에는 나노 크기의 마이크로 기공들만 존재하는 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 단계 3에서의 산화제는 Gd(NO₃)₃ · 6H₂O, 유황(S), 및 NaClO₄ · 1H₂O로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법.

청구항 10

제1항의 다공성 실리콘 나노폭탄을 암세포가 존재하는 종양 부위에 축적시킨 후 종양 부위에 근적외선을 조사하여 상기 다공성 실리콘 나노폭탄을 폭발시킴으로써 암세포를 제거하는 것을 특징으로 하는, 다공성 실리콘 나노폭탄을 포함하는 암치료제.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 근적외선은 0.78 내지 1.4 μ m 파장 범위의 다색광인 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘

나노폭탄을 포함하는 암치료제.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 근적외선의 조사 강도는 100 내지 400 mW/cm²의 범위인 것을 특징으로 하는 다공성 실리콘 나노폭탄을 포함하는 암치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 근적외선 조사에 의하여 폭발을 일으키는 다공성 실리콘 나노폭탄, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 더욱 구체적으로 본 발명은 근적외선 조사에 의해 암세포를 선택적으로 파괴할 수 있는, 근적외선 조사에 의하여 폭발을 일으키는 다공성 실리콘 나노폭탄, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 열을 이용한 암치료법은 통상의 외과적 수술방법을 대체할 수 있는 침습성이 극히 적은 치료기술이다. 침습성이 적은 점 외에도 이러한 열 치료법은 시술 방식이 비교적 간단하기 때문에 회복기간도 짧다. 또한 이러한 열 치료법은 화학약물치료법이나 방사선치료법에 비해 문제점이 더 적으며 일반적으로 이 두 치료법을 합친 것에 해당한다. 열 치료법은 반복 치료해도 부작용이 쌓이지 않는다. 열 치료법(또는 열박리 치료법)으로는 레이저 치료법, 마이크로웨이브 라디오 주파수(Radio Frequency:RF) 박리법, 자기적 열박리법, 집중초음파법 등이 있다. 이 치료법들은 대부분 손상 부위의 경계가 불분명할 뿐 아니라 치료기간이 긴 단점이 있다. 그러나 또 다른 한 열치료법은 세포조직 내에 산화물 나노입자들을 집어넣은 다음 교류자장을 사용하여 그것들을 가열하는 방법이다. 위에 열거한 치료법들과는 달리 이 자기적 열적 치료법은 충분한 가열효과를 얻는 위해 다량의 철이 필요하다는 단점이 있지만 산화철을 집어넣은 세포조직만을 선별하여 가열할 수 있다.
- <3> 최근 나노셸(nanoshell)과 단일벽 탄소나노튜브(Single Wall Carbon Nanotube : SWCNT)를 근적외선 조사기술과 결합시킨 치료법이 암세포를 더욱 선택적으로 파괴할 수 있는 새로운 암 치료 기술로서 초미의 관심을 끌고 있다. 이 기술들은 표적인 암세포조직을 선택적으로 파괴하기 위하여 약제(광감응제 또는 발열제)와 빛을 동시에 사용한다는 점에서 현재 임상에서 암 치료에 사용되고 있는 광역동법(Photodynamic Therapy : PDT)과 유사하다.
- <4> 이 두 기술은 모두 나노셸과 SWCNT를 가열하기 위하여 매우 높은 전력을 사용한다. 나노셸의 경우에는 근적외선 조사 강도가 무려 35 W/cm²이어서 인체에 적용하기 어려운 단점이 있다(L. R. Hirsch, J. Stafford R, J. A. Bankson, S. R. Serksen, B. Rivera, R. E. Price, J. D. Hazle, N. J. Halas, J. L. West, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, **100**, 13549.). SWCNT의 경우에는 1 - 4 W/cm²의 조사 강도를 사용한다. 암치료시 이와 같은 높은 광원의 전력을 사용하는 경우, 주위의 정상세포들이 나노셸이나 SWCNT와 같은 발열체에 아주 가까이 있지 않더라도 광원에 의하여 발생한 열에 의하여 손상을 입을 수 있다. 또 다른 한 연구팀은 최근 SWCNT를 PBS 용액에 분산시킴으로써 SWCNT를 암세포를 죽일 수 있을 정도로 충분히 높은 온도로 가열하는데 요구되는 근적외선 조사 강도를 PDT에서 통상 사용되는 조사강도의 수준으로 낮출 수 있음을 보고하였다(T. Seki, M. Wakabayashi, T. Nakagawa, M. Imamura, T. Tamai, A. Nishimura, N. Yamashiki, A. Okamura & K. Inoue, *Cancer (Philadelphia)*, 1999, **85**, 1694.).
- <5> 또한, 2006년에 보고된 탄소나노튜브를 주입하고 근적외선을 조사하여 발생하는 열이나 폭발을 이용하여 종양을 제거하는 기술(B. Panchapakesan, S. Lu, K. Sivakumar, K. Teker, G. Gesarone and E. Wickstrom, *Nanobiotechnology*, 2005, **1**, 133. 및 N. W. S. Kam, M. O'connell, J. A. Wisdom and H. Dai, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2005, **102**, 11600)에서는 인체에 유해한 활성산소가 발생할 뿐만 사용되는 탄소나노튜브 역시 인체에 유해한 것으로 보고되고 있다.
- <6> 이에, 본 발명인들은 생체적합성, 생분해도가 우수한 다공성 실리콘에 근적외선을 조사하는 경우 탄소나노튜브 만큼 높고 빠르게 온도가 올라갈 수 있다는 것을 발견하여, 기존의 열을 이용한 암 치료법보다 암세포만을 파괴하는 선택성이 우수하고, 부작용이 적고, 인체에 무해한 물질로 분해될 수 있는 암 치료용 다공성 실리콘 나노

폭탄, 이의 제조방법 및 이의 용도를 개발하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명의 목적은 낮은 조사 강도로 근적외선을 조사하여 충분한 열을 방출하여 암을 치료하면서도 정상세포를 해치지 않고 암세포만 파괴하는 선택성이 우수하고, 부작용이 적고, 독성이 없으며, 인체에 무해한 물질로 분해될 수 있는 다공성 실리콘 나노폭탄, 이의 제조방법 및 암치료제로서의 용도를 제공하는데 있다.

과제 해결수단

- <8> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 결정질 실리콘에 전기화학적 에칭처리를 하여 형성된 다공성 실리콘층을 입자 상태로 만든 후 산화제와 혼합하여 제조된, 생체적합성, 생분해도가 우수한 다공성 실리콘 나노폭탄, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 암치료제를 제공한다.

효 과

- <9> 본 발명은 낮은 조사 강도의 근적외선으로 제어되는 다공성 실리콘 나노폭탄을 제공함으로써, 암세포만 선택적으로 파괴하고, 부작용이 적고, 독성이 없으며, 인체에 무해한 상기 다공성 실리콘 나노폭탄을 이용하여 암을 반복적으로 치료할 수 있게 하는 효과를 갖는다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <10> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <11> 본 발명은 근적외선 조사에 의하여 열 또는 폭발을 일으키는 다공성 실리콘 나노폭탄을 제공한다. 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄은 근적외선 조사시 나노셀 또는 탄소나노튜브만큼 높고 빠르게 온도가 상승하여 충분한 열을 방출하거나 폭발을 일으킬 뿐만 아니라(실험예 2 및 도 4 참조), 탄소나노튜브와 달리 다공성 실리콘 나노폭탄 자체는 생체적합성과 생분해도가 우수하여 독성이 없고, 부작용 또한 없다.
- <12> 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄은 100 내지 400 mW/cm^2 범위의 근적외선 조사 강도에 의해 가열될 수 있다. 근적외선 조사 기술과 결합시킨 암치료법에 사용되는 종래의 나노셀과 탄소나노튜브를 가열하기 위한 조사 강도는 각각 35 W/cm^2 와 1 내지 4 W/cm^2 로서 높은 수치를 나타내나, 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄을 가열하기 위한 조사 강도는 100 내지 400 mW/cm^2 의 범위로 상기 나노셀과 탄소나노튜브에 비해 100분의 1 수준이므로 상대적으로 낮은 강도의 근적외선 조사 강도에 의해 가열될 수 있다.
- <13> 상기 근적외선의 파장의 범위는 0.78 내지 1.4 μm 이다. 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄에 조사되는 빛은 1) 다공성 실리콘 나노폭탄에 잘 흡수될 것 및 2) 인체를 잘 투과할 것이라는 두 가지 중요한 조건을 만족시켜야 한다. 다공성 실리콘에 의한 흡수도가 가장 높은 빛의 파장이 인체조직에 대한 투과도가 가장 높은 빛의 파장과 일치한다면 열 치료법에서는 레이저와 같은 적정 파장의 단색광을 사용하는 것이 이상적일 것이다. 그러나 불행히도 이 둘은 불일치한다. 다공성 실리콘의 광흡수계수가 파장에 따라 변하는 양상은 결정질 실리콘과 유사하다. 단지 310 내지 1220 nm의 파장 범위에서 다공성 실리콘의 광흡수계수가 결정질 실리콘의 광흡수계수보다 1 또는 2 차수(order) 더 작을 뿐이다. 다공성 실리콘의 광흡수계수는 적외선과 가시광선 영역에 걸친 파장 범위에서 빛의 파장에 따라 서서히 감소하는 경향을 나타낸다.
- <14> 한편, 인체를 포함한 생물체는 700 내지 1100 nm 파장 범위의 근적외선에 대해 투과도가 높은 것으로 알려져 있다. 파장 808 nm 근처에서 투과도가 최대가 되지만, 이 파장대에서는 크게 변하지 않는다. 다공성 실리콘의 광흡수성질과 인체를 잘 투과하는 성질을 함께 고려하여 근적외선이 다공성 실리콘을 이용하는 열 치료법에 적합하지만, 그 근적외선이 반드시 단색광일 필요는 없다고 말할 수 있다. 다색광의 한 가지 장점은 그 광원의 가격이 단색광을 방출하는데 사용되는 고전력의 레이저 다이오드 가격보다 훨씬 더 싸다는 것이다. 따라서, 암세포의 파괴 효율면에서는 단색광에 비해 약간 떨어지지만 이상에서 기술한 이유들 때문에 본 발명에서는 근적외선 영역에 해당하는 0.78 내지 1.4 μm 파장 범위의 다색광이 사용되는 것이 바람직하다.
- <15> 또한, 본 발명은 결정질 실리콘 표면에 전기화학적 에칭법(Anodization)에 의해서 다공성 실리콘층을 형성하는 단계(단계 1); 상기 다공성 실리콘층을 잘게 분쇄하여 200 nm 이하의 크기로 다공성 실리콘 입자를 만드는 단계

(단계 2); 및 상기 다공성 실리콘 입자의 기공에 산화제가 함입되도록 다공성 실리콘 입자와 산화제를 혼합하는 단계(단계 3)를 포함하는 다공성 나노폭탄의 제조방법을 제공한다.

<16> 이하 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조방법을 단계별로 상세히 설명한다.

<17> 먼저, 상기 단계 1은 결정질 실리콘 표면에 다공성 실리콘층을 형성하는 단계이다. 상기 다공성 실리콘층을 형성하는 단계는 전기화학적 에칭법을 이용하여 수행될 수 있다. 이 경우 결정질 실리콘의 단편의 비저항의 범위는 5-10 Ωcm 인 것이 바람직하다. 상기 결정질 실리콘 단편을 불화수소(HF)와 에탄올($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)의 비가 1 : 1인 혼합용액 내에 첨가하고, 전류밀도를 20 내지 70 mA/cm^2 로 하여 10 내지 30 분간 전기화학적으로 에칭시켜 표면에 다공성 실리콘층을 형성할 수 있다. 실리콘의 전기화학적 에칭처리에 사용한 셀(cell)은 도 1과 같다. 이와 같이 형성된 다공성 실리콘층 내에는 직경 수 μm , 깊이 수십 μm 되는 원통형의 마크로 기공(macropore)과 직경 수 nm의 구조형인 마이크로 기공(micropore)과 같은 두 종류의 기공이 존재한다(도 2 참조).

<18> 다음으로, 상기 단계 2는 상기 단계 1에서 형성된 다공성 실리콘층을 분쇄하여 다공성 실리콘 입자를 만드는 단계이다. 단계 2는 초음파진동기를 이용하여 수행된다. 보다 구체적으로 상기 단계 1에서 형성된 결정질 실리콘 조각 위에 형성된 다공성 실리콘층을 물속에 넣고 초음파진동기로 진동시킴으로써 다공성 실리콘층을 작은 입자 상태로 분쇄할 수 있다. 이후, 분쇄된 다공성 실리콘 입자를 200 nm급 멤브레인을 사용하여 필터링함으로써 크기 200 nm 이하의 다공성 실리콘 입자들을 형성한다. 상기 다공성 실리콘 입자들 내에는 마크로 기공은 존재하지 않으며 나노 크기의 마이크로 기공들만 존재한다.

<19> 다음으로, 상기 단계 3은 상기 단계 2에서 제조된 다공성 실리콘 입자들을 산화제와 혼합하여 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄을 제조하는 단계이다. 상기 단계 3에서 사용될 수 있는 산화제로는 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 유황(S), $\text{NaClO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$ 등이 있으나 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 를 사용하는 것이 바람직하다. 보다 구체적으로 에탄올($\text{C}_2\text{H}_5(\text{OH})_2$)에 산화제 분말을 용해시켜 만든 용액 내에 단계 2에서 제조된 다공성 실리콘 입자들을 1 내지 10 시간 동안 침지시켜 그 용액들이 다공성 실리콘 입자들의 마이크로 기공들 속에 스며들게 한다. 그리고 나서, 용액을 제거하고 용기 속에 다공성 실리콘 입자들만 남게 한 다음 오븐을 사용하여 1 내지 5 시간 동안 건조시킨다. 이렇게 건조된 다공성 실리콘 입자들의 기공들 속에는 고체 성분의 $\text{Gd}(\text{NO}_3)_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 만 남게 된다.

<20> 일반적으로 산화제는 단백질과 반응할 수 있으므로 인체에 이롭지 못하다. 그러나 본 발명에서 사용되는 산화제는 고체분말 상태의 다공성 실리콘의 미세한 기공 내에 들어가 있는 상태로 체내에 주입되는 데다 그 양이 극히 적고 (수 μg 수준) 주입한 다음 수십 분 내에 근적외선 조사로 폭발을 일으켜 날아가 버리기 때문에 인체에 대한 해는 극히 미미하다.

<21> 본 발명은 또한 상기 다공성 실리콘 나노폭탄을 암세포가 존재하는 종양 부위에 축적시킨 후 종양 부위에 근적외선을 조사하여 상기 다공성 실리콘 나노폭탄을 폭발시킴으로써 암세포를 제거하는 것을 특징으로 하는, 다공성 실리콘 나노폭탄을 포함하는 암치료제를 제공한다. 상기 근적외선은 0.78 내지 1.4 μm 파장 범위의 다색광을 사용하는 것이 바람직하고, 조사 강도는 100 내지 400 mW/cm^2 인 것이 바람직하다.

<22> 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄을 포함하는 암치료제의 경우, 종래의 나노셀과 탄소나노튜브와 달리 낮은 조사 강도의 근적외선을 사용하여 정상 세포를 손상시키지 않고 암을 치료할 수 있다.

<23> 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 상기 암치료제는 다공성 실리콘 입자를 식염수 및 엽산과 교반하여 분산시킴으로써 제조되고, 주사기를 사용하여 암 환자에게 정맥을 통하여 투여된다. 엽산이 코팅된 실리콘 입자들이 암세포가 있는 종양 부위로 이동하게 된다. 이때 종양이 있는 부위를 근적외선으로 조사하면 다공성 실리콘이 폭발하여 종양을 산산조각으로 날려 버림으로써 암세포를 제거하게 된다. 본 발명에 따른 다공성 실리콘 나노폭탄을 포함하는 암치료제의 치료효과를 알아보기 위해 실험(실험예 1)한 결과, 표 1에 나타난 바와 같이 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄을 암세포에 처리하고 근적외선을 조사한 경우(E 및 F)에는 암세포의 생존율이 3.7 % 미만이었으며, 이는 본 발명의 암치료제가 치료 효과에 있어서 우수하다는 것을 보여준다.

<24> 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다. 단 하기 실시예는 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<25> <실시예> 다공성 실리콘 나노폭탄의 제조

<26> 크기가 대략 $2.5\text{ cm} \times 2.5\text{ cm} \times 0.05\text{ cm}$ 이고 비저항의 범위가 약 10 Ωcm 인 결정질 실리콘 단편을 불화수소

(HF)와 에탄올(C_2H_5OH)의 비가 1 : 1인 혼합용액 내에서 전류밀도를 50 mA/cm^2 로 하여 10 분간 전기화학적으로 에칭시켰다. 무게 측정법으로 측정 한 이 다공성 실리콘의 기공율과 두께는 각각 73 %와 $55 \mu\text{m}$ 이었다. 이와 같이 형성한 다공성 실리콘층 내에는 원통형의 마크로 기공과 구조형인 마이크로 기공이 형성되었다(도 2 참조).

<27> 그 다음 결정질 실리콘 단편 위에 형성된 다공성 실리콘층을 물속에 넣고 초음파진동기로 진동시킴으로써 다공성 실리콘층이 깨어져 작은 입자 상태로 실리콘 기관층으로부터 분리되었다. 이어서 200 nm 급 멤브레인을 사용하여 필터링함으로써 크기 200 nm 이하의 다공성 실리콘 입자들을 얻었다.

<28> 이후, 에탄올($C_2H_5(OH)_2$)에 $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 분말을 용해시켜 만든 용액 내에 이 다공성 실리콘 입자들을 6 시간 동안 침지시켜 그 용액들이 다공성 실리콘 입자들의 마이크로 기공들 속에 스며들게 하였다. 용액을 모두 따라 내고 용기 속에 다공성 실리콘 입자들만 남게 한 다음 50°C 의 오븐 속에 넣고 2 시간 동안 건조시켰다. 이렇게 건조된 다공성 실리콘 입자들의 기공들 속에는 고체 성분의 $Gd(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$ 만 남게 하여 다공성 실리콘 나노폭탄을 제조하였다.

<29> <실험예 1> 다공성 실리콘 나노폭탄을 이용한 암치료제의 치료 효과 실험

<30> 실시예에서 제조한 다공성 실리콘 나노폭탄을 9% 식염수와 혼합하여 $PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액을 만들었다. 한편, 유방암세포(SK-BR3)를 세포배양액 DMEM(Dulbeco's Modified Eagle's Medium) 내에서 배양하였다. 18 시간 동안 암세포를 시딩(seeding)한 다음 24-웰의 플레이트 내에 1×10^5 개의 SK-BR3 암세포들을 넣고 37°C , 5 % CO_2 의 분위기 하에서 배양하였다. 배양 후 웰로부터 세포배양액을 제거하고 PBS용액으로 암세포들을 세척한 후 각 웰 내에 세포배양액 DMEM을 다시 보충하였다. 이와 같이 준비된 유방암세포 시료들에 근적외선 램프(모델 IF-9900 Gold, Hasell CO., USA, 파장 = $0.718 - 1.4 \mu\text{m}$, 조사 강도 = 300 mW/cm^2)를 사용하여 근적외선을 조사하는 실험을 하기와 같은 6종류로 실시하여 표 1과 도 3 및 6에 나타내었다.

<31> A. 암세포 샘플들에 아무 처리도 하지 않음(현탁액도 뿌리지 않고 근적외선도 조사하지 않음).

<32> B. 암세포 샘플들에 $PSi/NaCl$ 현탁액을 뿌림.

<33> C. 암세포 샘플들에 $PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액을 뿌림.

<34> D. 암세포 샘플들에 아무런 현탁액도 뿌리지 않은 상태에서 근적외선만 20분 동안 조사함.

<35> E. 암세포 샘플들에 $PSi/NaCl$ 현탁액을 뿌린 다음 근적외선을 20분 동안 조사함.

<36> F. 암세포 샘플들에 $PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액을 뿌린 다음 근적외선을 20분 동안 조사함.

표 1

테스트 종류	처 리	세포 생존율 (%)			
		1회	2회	3회	4회
A	아무런 처리도 하지 않음	104.4	97.6	103.1	101.7
B	$PSi/NaCl$ 현탁액 처리	96.3	100.8	98.7	98.6
C	$PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액 처리	103.7	98.7	95.5	99.3
D	근적외선 조사	95.2	98.4	94.7	96.1
E	$PSi/NaCl$ 현탁액 처리 후 근적외선 조사	5.4	4.5	1.2	3.7
F	$PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액 처리 후 근적외선 조사	0.9	3.1	1.4	1.8

<37> 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 아무런 처리도 하지 않은 경우(A)(도 3a) 세포 생존율이 거의 100 %인 것은 당연하지만, $PSi/NaCl$ 현탁액만 처리한 경우(B)와 $PSi/NaCl/Gd(NO_3)_3$ 현탁액만 처리한 경우(C)(도 3b)에도 생존율

이 각각 98.6 %와 99.3 %로서 거의 100 %이다. 또한, 근적외선만 조사한 경우(D)에도 생존율이 96.1 %로서 거의 100 %에 가깝다. 이 결과는 어느 한 종류의 처리만으로는 세포를 죽일 수 없음을 보여주는 것이다. 그러나 PSi/NaCl 현탁액을 뿌린 다음 근적외선을 조사한 경우(E)(도 3c)와 PSi/NaCl/Gd(NO₃)₃ 현탁액을 뿌린 다음 근적외선을 조사한 경우(F)(도 3d)는 생존율이 각각 3.7 %와 1.8 %로 현저히 낮아졌는데, 이것은 이와 같은 처리에 의하여 세포들이 거의 다 파괴되었음을 의미하는 것이다. 즉, 이는 본 발명의 다공성 실리콘 나노폭탄을 암세포에 처리한 후, 근적외선을 조사하는 경우 암세포 치료에 있어 우수한 효과가 있다는 것을 나타내는 결과이다.

<39> 한편, 도 6은 PSi/NaCl/Gd(NO₃)₃ 현탁액을 뿌린 다음 근적외선을 20 분 동안 조사하기 전(도 6a)과 조사한 후(도 6b)의 유방암 세포에 대한 현미경 사진이다. 도 6b는 도 6a에 비해 매우 극적이다. 바닥에 있는 세포들은 산산조각이 되어 날아가고 남아있는 세포들은 검게 타버린 것으로 보인다. 또 그 세포들도 덩어리로부터 떨어져 나간 것으로 보인다. 죽은 세포의 형태는 폭발이 세포 덩어리의 중심부에서 시작되었으며 기포들은 모든 것들이 주위로 날아갔음을 말해준다. 죽은 세포들 주위에 보이는 기포들은 NaCl 용액이 심하게 끓어 다공성 실리콘 입자들을 파괴했기 때문이다. 이 결과는 NaCl 용액 내에서 다공성 실리콘이 폭발할 때 국부적인 온도가 NaCl 용액의 끓는점보다 더 높ی 올라갔음을 암시하는 것이다.

<40> <실험예 2> 낮은 근적외선 조사 강도를 적용한 경우의 다공성 실리콘 나노폭탄의 열방출 효과 실험

<41> 실시예에서 제조한 다공성 실리콘 입자들을 9 % 식염수와 12 시간 동안 교반하여 만든 PSi/NaCl-현탁액 샘플; 실리콘 단결정 기판 표면에 형성되어 파괴되지 않고 다공성 실리콘층(Psi 층) 샘플; 다공성 실리콘 입자들을 세포 배양액에 분산시켜 만든 PSi-현탁액 샘플; 및 아무 처리도 하지 않은 대조군 샘플에 대해 300 mW/cm² 강도의 근적외선을 20 분간 조사할 때 근적외선 조사 시간에 따른 상기 샘플들의 온도를 측정하여 도 4에 나타내었다.

<42> 도 4에 나타난 바와 같이, 상기 샘플들은 모두 근적외선 조사 시간이 증가함에 따라 온도가 포물선적으로 증가하는 경향을 나타낸다. PSi/NaCl-현탁액 샘플의 온도는 3 분 후에 55 °C, 15 분 후에는 74 °C 까지 증가하였다. 한편, 아무 처리하지 않은 대조군 샘플의 경우에는 3 분 후에는 31 °C, 20 분 후에는 39 °C 까지만 온도가 상승하였다. 20 분 후의 이 두 샘플의 온도차 ($\Delta T = \Delta T_1 + \Delta T_2 + \Delta T_3 + \Delta T_4$)는 37 °C 이며, 이것은 PSi/NaCl-현탁액의 순수한 가열 효과에 해당한다. 또한, 이 온도차는 Hirsch 등이 나노셀에 조사 강도 35 W/cm²의 근적외선을 조사하여 얻은 온도차 ($\Delta T = 37.4$ °C)와 거의 같은 결과이다. 이 결과는 나노셀을 다공성 실리콘(Psi)으로 교체함으로써 암 세포를 파괴하는 데 필요한 충분한 가열 효과를 얻는데 필요한 근적외선 조사 강도를 실제 임상에서 적용할 수 있는 현저히 낮은 강도(300 mW/cm² 수준)로 낮출 수 있다는데 중요한 의의를 갖는 것이다.

<43> PSi/NaCl-현탁액, PSi-현탁액 및 대조군 샘플의 세 가지의 온도 곡선을 비교하면, 근적외선을 20 분 동안 조사한 후의 PSi의 순 가열 효과($\Delta T_{\text{Psi}} = \Delta T_1 + \Delta T_2$)와 NaCl의 순 가열 효과 ($\Delta T_{\text{NaCl}} = \Delta T_3 + \Delta T_4$)는 각각 18 °C와 19 °C 이고, 근적외선을 3 분 조사한 후의 PSi의 순 가열효과와 NaCl의 순 가열효과는 각각 9 °C와 13 °C이다. 또한 근적외선 조사시간이 0 분일 때와 20 분일 때의 대조군 샘플의 온도차 (ΔT)는 16 °C로써, 이는 근적외선 조사강도 300 mW/cm²에서의 근적외선 소스로부터 방출되는 열에 의한 것이다. 대조군 샘플은 세포 배양액 DMEM만으로 구성되어 있으며 근적외선의 흡수에 의한 자체 가열 효과는 거의 없는 것으로 생각되기 때문이다.

<44> <실험예 3> 다공성 실리콘 나노폭탄의 폭발성 실험

<45> 실시예에서 산화제로 Gd(NO₃)₃ · 6H₂O를 사용하여 제조한 다공성 실리콘 나노폭탄 샘플 및 산화제로 NaClO₄ · 1H₂O를 사용한 것 이외에 실시예와 동일한 방법으로 제조한 다공성 실리콘 나노폭탄 샘플 각각을 플레이트에 배치한 후, 300 mW/cm²의 조사 강도로 근적외선을 조사하였고, 이후 일어나는 폭발을 캡처한 사진을 도 5에 나타내었다.

<46> 도 5에 나타난 바와 같이, 산화제로 Gd(NO₃)₃ · 6H₂O를 사용한 경우(도 5a)가 NaClO₄ · 1H₂O를 사용한 경우(도 5b)보다 좀 더 큰 규모로 일어났다.

<47> <실험예 4> 다공성 실리콘 나노폭탄의 암세포에 대한 선택성 실험

<48> 실시예에서 제조한 다공성 실리콘 나노폭탄을 9 % 식염수와 혼합한 PSi/NaCl/Gd(NO₃)₃ 현탁액을 실험예 1에서와 같이 동일하게 준비된 유방암세포(SK-BR3) 시료가 담겨있는 플레이트 위의 큰 세포덩어리의 중앙부에 살포하였다. 조사 강도 300 mW/cm²의 근적외선을 조사할 때 세포들이 파란색으로 변하기 시작하여 세포막이 Trypan

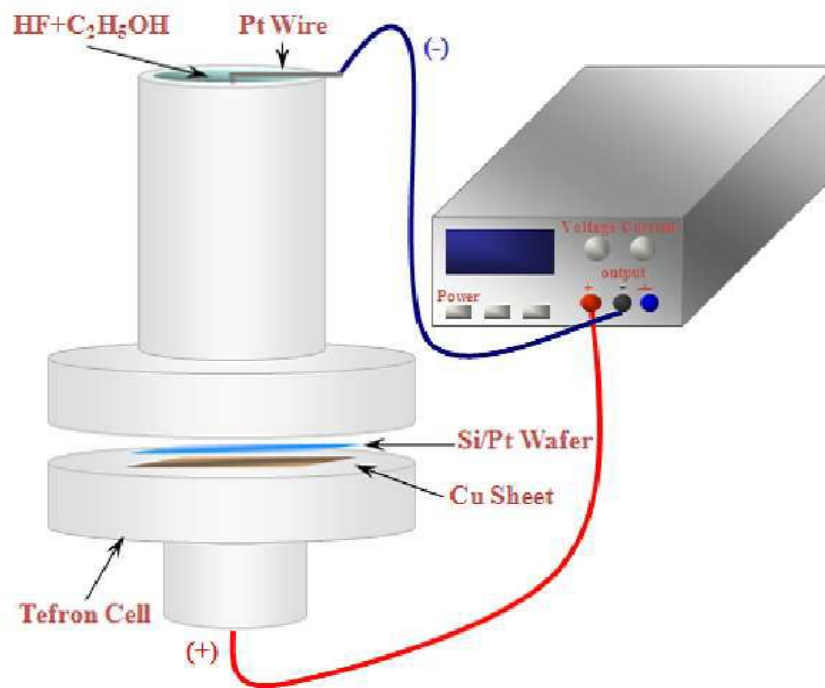
blue 염료에 의하여 침투되었음을 보여 주었다. 도 7a는 근적외선을 조사하기 전에 살아있는 세포를 나타내며, 도 7b는 근적외선 조사 후의 동일 지역을 나타낸 것이다. PSi/NaCl/Gd(NO₃)₃ 현탁액을 뿌린 중앙부만 근적외선 조사 시에 파란색으로 변했는데, 이 결과는 이 기술이 암 세포를 선택적으로 파괴함을 입증하는 것이다.

도면의 간단한 설명

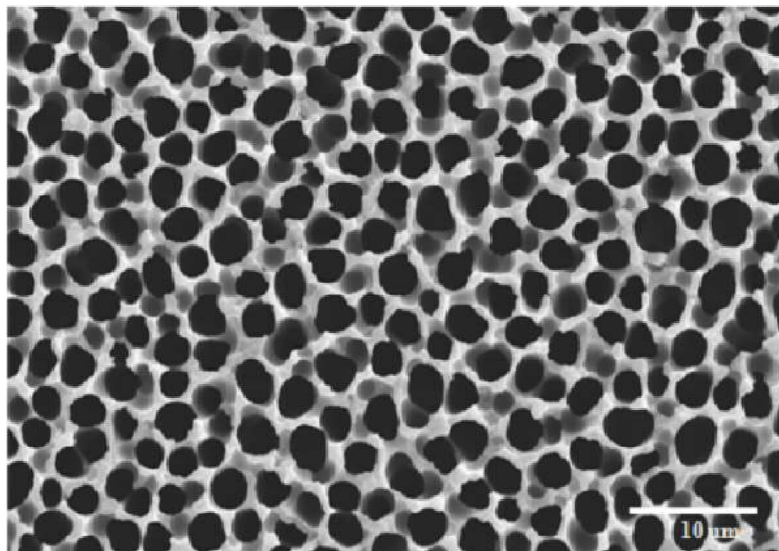
- <49> 도 1은 나노다공성 실리콘 제조를 위한 전기화학적 양극산화 장치(cell)의 개략도이다.
- <50> 도 2a는 나노다공성 실리콘의 SEM 사진(상면도)이다.
- <51> 도 2b는 나노다공성 실리콘의 SEM 사진(측면도)이다.
- <52> 도 3a는 세포배양액(DMEM)을 300 mW/cm² 강도의 근적외선으로 20 분간 조사한 후 DMEM의 광학현미경 사진이다.
- <53> 도 3b는 크기 200 nm 이하의 다공성 실리콘 입자들을 DMEM와 12시간 동안 교반한 후 300 mW/cm² 강도의 근적외선을 20 분간 조사한 후의 다공성 실리콘 분산액에 대한 현미경 사진이다.
- <54> 도 3c는 크기 200 nm 이하의 다공성 실리콘 입자들을 9 % 식염수와 12시간 동안 교반 한 후 300 mW/cm² 강도의 근적외선을 20 분간 조사한 후의 다공성 실리콘 분산액에 대한 현미경 사진이다.
- <55> 도 3d는 크기 200 nm 이하의 나노다공성 실리콘 입자들과 산화제(Gd(NO₃)₃ · 6H₂O)분말을 섞은 다음 다시 9 % 식염수와 12시간 교반한 후 300 mW/cm² 강도의 근적외선을 20 분간 조사한 후의 다공성 실리콘 분산액에 대한 현미경 사진이다.
- <56> 도 4는 다공성 실리콘 입자들을 9 % 식염수와 12 시간 동안 교반하여 만든 PSi/NaCl-현탁액 샘플; 실리콘 단결정 기판 표면에 형성되어 파쇄되지 않고 다공성 실리콘층(PSi 층) 샘플; 다공성 실리콘 입자들을 세포 배양액에 분산시켜 만든 PSi-현탁액 샘플; 및 아무 처리도 하지 않은 대조군 샘플 각각에 대해 300 mW/cm² 강도의 근적외선을 조사할 때의 각 샘플들의 온도를 근적외선 조사 시간의 함수로 나타낸 것이다.
- <57> 도 5a는 산화제로 Gd(NO₃)₃ · 6H₂O를 처리한 다공성 실리콘을 근적외선을 조사했을 때 일어나는 폭발을 캡처한 사진이다.
- <58> 도 5b는 산화제로 NaClO₄ · 1H₂O를 처리한 다공성 실리콘을 근적외선을 조사했을 때 일어나는 폭발을 캡처한 사진이다.
- <59> 도 6a는 근적외선을 20 분간 조사하기 전의 유방암 세포에 대한 현미경 사진이고, 도 6b는 근적외선을 20 분간 조사한 후의 유방암 세포에 대한 현미경 사진이다.
- <60> 도 7a는 산화제 처리한 다공성 실리콘을 뿌리고 Trypan Blue 염색액으로 처리한 암세포에 강도 300 mW/cm²의 근적외선을 조사하기 전의 고배율 광학현미경 사진이고, 도 7b는 상기 암세포에 300 mW/cm²의 근적외선을 조사한 후의 고배율 광학현미경 사진이다.

도면

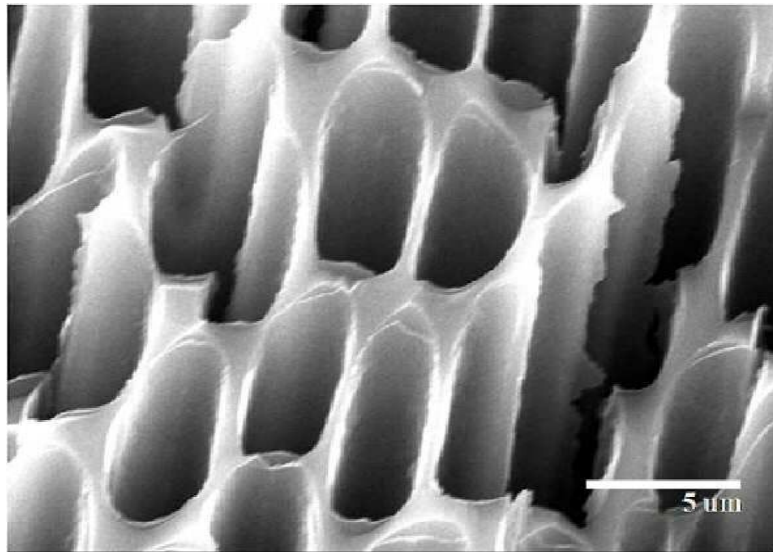
도면1



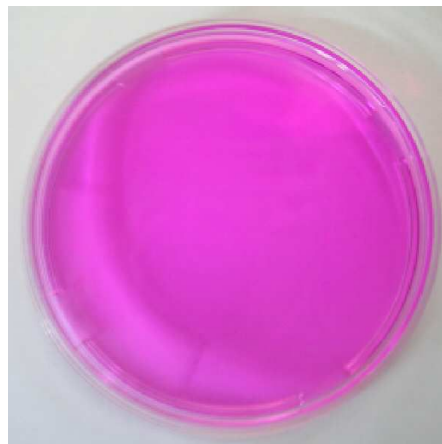
도면2a



도면2b



도면3a



도면3b



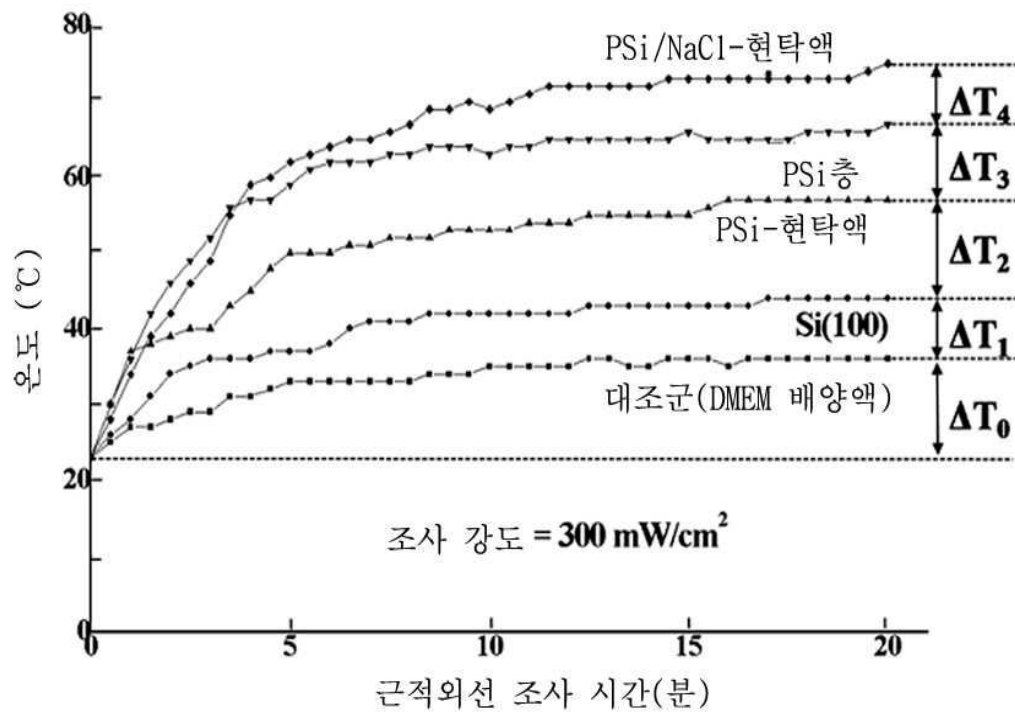
도면3c



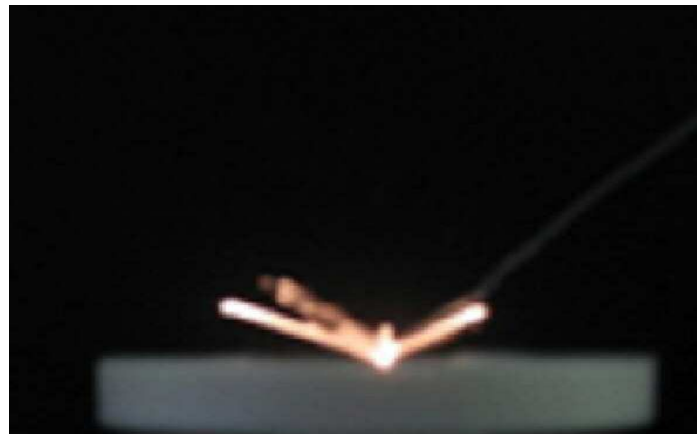
도면3d



도면4



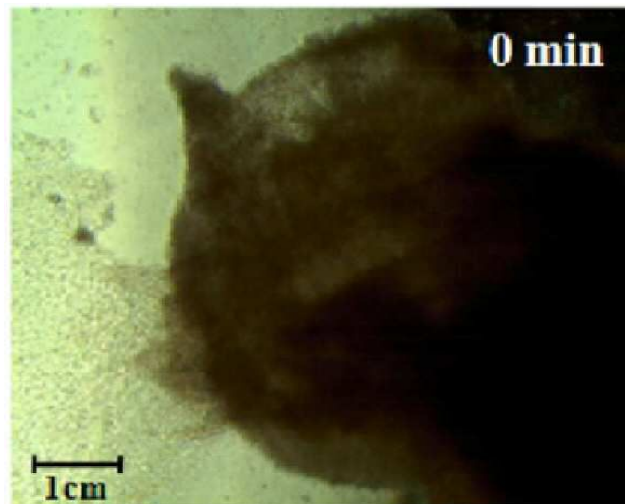
도면5a



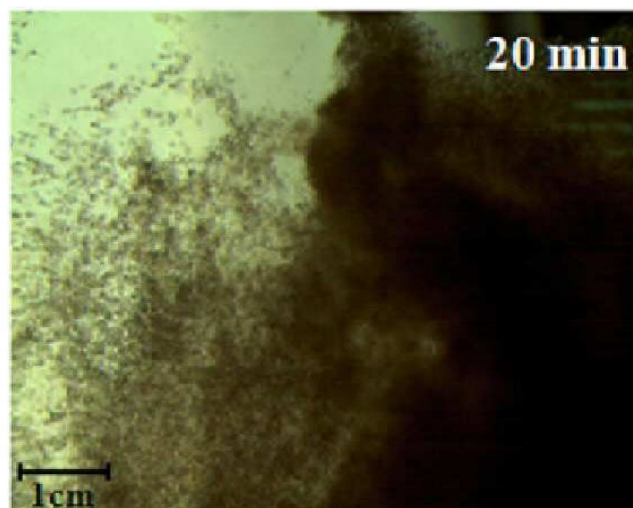
도면5b



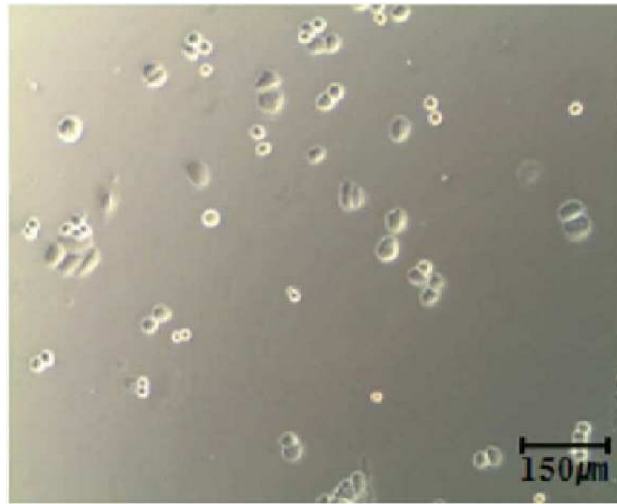
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

