

## 기관고유연구사업 결과 보고

결	과제책임자	과 장	부 장
재	김석기	김석기	김인후

※ 협조 : 진단검사센터장 이 건 국

본인이 수행한 2010 년도 기관고유연구사업 과제 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.

과제명	다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발
과제책임자 (소속, 성명)	분자영상치료연구과 김 석 기
총연구비	80,000 천원 (2010년 : 1년)
총연구기간	2010 년 01 월 01 일 ~ 2010 년 12 월 31 일

붙임 : 기관고유연구사업 최종보고서 1부

2010 년 12월 31일

과제책임자 김 석 기

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1010030-1)

다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발

Development of Multimodal Sentinel Lymph  
Molecular Imaging Node Seeker

과제책임자 : 김 석 기

국 립 암 셴 터

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="247 1037 1120 1601" data-label="List-Group"><ol style="list-style-type: none"><li>1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.</li><li>2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.</li></ol><p data-bbox="534 1496 833 1541">(14 pont, 고딕체)</p></div>	<p data-bbox="1204 347 1260 481">↑ 5cm ↓</p> <p data-bbox="1204 582 1236 1344">다 중 모 드 감 시 림 프 절 분 자 영 상 표 지 자 개 발</p> <p data-bbox="1204 1444 1236 1691">국 립 암 센 터</p> <p data-bbox="1204 1747 1260 1870">↑ 3cm ↓</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

↑  
6cm ↓

# 제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010 . 12 . 31 .

국립암센터

과제책임자 : 김석기

연구원 : 강세훈

                  "                  : 김서일

# 목 차

## < 요약 문 >

(한글) 다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발

(영문) Development of Multimodal Sentinel Lymph Molecular Imaging Node Seeker

<u>1. 연구의 최종목표</u>	-----	5
<u>2. 연구의 내용 및 결과</u>	-----	5
<u>3. 연구결과 고찰 및 결론</u>	-----	43
<u>4. 연구성과 및 목표달성도</u>	-----	45
<u>5. 연구결과의 활용계획</u>	-----	47
<u>6. 참고문헌</u>	-----	48
<u>7. 첨부서류</u>	-----	50

## < 요약 문 >

연구분야(코드)	I-1	과제번호	1010030-1
과제명	다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일	80,000
	1차년도	2010년 01월 01일 ~ 2010년 12월 31일	80,000
과제책임자	성명	김 석 기	주민등록번호
	전화번호	031-920-1731	전자우편
			skkim@ncc.re.kr
색인단어	국문	감시림프절, 다중모드, 표지자, 융합영상	
	영문	Sentinel lymph node, Multimodal, Tracer, Seeker, Fusion image	

### ◆ 연구목표

<최종목표>

암 관련 다중모드 감시림프절 분자영상 표지자의 개발  
 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 다중모드 림포신티그래피 영상법 개발

<당해년도 목표>

인형알부민을 플랫폼으로 하는 형광-방사성 표지자 개발  
 다중모드 형광-방사성 감시림프절 표지자를 이용한 림포신티그래피 영상법 기초기술개발

### ◆ 연구내용 및 방법

#### 연구배경

다중모드 감시림프절 표지자의 필요성

- 현재 임상적으로 사용되는 감시림프절 표지자는 단일모드 표지자임.
- 대표적인 단일모드 감시림프절 표지자는 색소와 방사성교질이다.
- 현재 널리 사용되는 방사성교질은 림프절을 표지자로서 이상적이지만 외과의사가 수술장에서 나안이나 영상으로 수술중에 직접 확인하며 수술을 할 수는 없음. 색소는 수술장에서의 이용이 편리하기는 하나 림프절 표지자로서 기본적인 물성이 적합하지 못함.
- 인체에 사용가능한 재료를 이용하여 색소와 방사성교질의 장점을 모두 가지는 다중모드 림프절 표지자를 개발하면 임상적으로 도움이 됨.

감시림프절 생검을 위한 다중모드 융합영상법

- 감시림프절 생검은 이미 여러 종양의 최소침습 수술법에 임상적으로 널리 사용되고 있음.
- 감시림프절 생검에 핵심적인 기술은 감시림프절을 표지하는 기술임.
- 다중모드 감시림프절 표지자를 이용하여 영상을 획득하기 위한 장비, 획득한 영상을 표현하기 위한 기본적인 영상법의 개발이 필요함.
- 여러 영상을 융합하는 영상법이 필요하며 생검 중에 실시간으로 참조가 가능하여야 함.

**연구내용 및 방법**

인형알부민을 플랫폼으로 하는 형광,방사성 표지자 개발

- 표지자의 화학적 안정성 및 체내(혈청내) 안정성 검증
- 표지자의 독성 검증
- 표지자의 체외 및 동물모델에서 다중모드 특성 검증
- 표지자의 키트 제작기술 개발 (대량제작 기반기술 개발)

다중모드 융합영상법의 기초기술 개발

- 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 림프신티그래피 융합영상법 기초기술 개발
- 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 감시림프절 영상 및 영상안내기술 개발
- 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 감시림프절 생검보조 영상장비의 시험제작

**◆ 연구성과**

< 정량적 성과 >

구분	달성치/목표치 <sup>1)</sup>	달성도(%)
SCI 논문 편수	1(투고)/ 1	0 (100) %
IF 합	6.6 / 2	100 %
기타 성과	특허1건/특허1건	100 %

< 정성적 성과 >

- 임상적용이 가능한 국내최초의 감시림프절용 다중모드 표지자의 개발하였음.
- 감시림프절 생검이 기술적으로 용이해지고 정확도가 향상됨.
- 다중모드 표지자의 키트 제작 및 개발함.
- 기존의 감시림프절 림프신티그래피에도 도움이 되는 기술을 확보함.
- 감시림프절 생검 이외에도 다양한 용도로 이용할 수 있는 기초기술을 확보함.

**◆ 참여연구원  
(최종연도 참여인원)**

성 명	김석기, 강세훈, 김서일
주민등록번호	*****-*****, *****-*****, *****-*****

## Project Summary

<b>Title of Project</b>	Development of Multimodal Sentinel Lymph Molecular Imaging Node Seeker
<b>Key Words</b>	Sentinel lymph node, Multimodal, Tracer, Seeker, Fusion image
<b>Project Leader</b>	Kim Seok-ki (Ph.D., Molecular Imaging and Therapy Branch)
<b>Associated Company</b>	National Cancer Center
<p>◆ Aims</p> <p>Development of multimodal sentinel lymph node seeker  Development of fluorescent and radioactive sentinel lymph node seeker which was based on Human serum albumin(HSA)  Experimental development of multimodal sentinel node imaging</p> <p>◆ Methods</p> <p>Production of fluorescent and radioactive sentinel lymph node seeker using HSA</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Verification of chemical safety of node seeker</li> <li>- Verification of node seeker property in vitro and in vivo</li> <li>- Verification of cellular toxicity and internal safety</li> <li>- Development of radioactive isotope synthesis method</li> <li>- Development of kit system for large scale production of node seeker</li> </ul> <p>Development of experimental fusion imaging of multimodal signals from the agent,  Development of experimental imaging system supporting sentinel node biopsy</p> <p>◆ Results</p> <p>[Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA as multimodal sentinel lymph node seeker  Kit system for [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA  Experimental imaging system for sentinel lymph node biopsy using fusion technique</p>	



## 1. 연구의 최종목표

- 암관련 다중모드 감시림프절 분자영상 표지자의 개발
- 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 림프신티그라피 영상법 개발

## 2. 연구의 내용 및 결과

### 인혈알부민을 플랫폼으로 하는 색소, 형광, 방사성 표지자 개발

#### 가) 플랫폼의 선택

나노 플랫폼으로 사용된 인혈청알부민은 그 크기가 6~8 nm로서 일반적으로 사용되는 콜로이드형 방사성의약품보다는 크기가 작아 림프절 섭취가 빠르고, 반대로 작은 분자단위의 염색제 같이 감시림프절을 그냥 통과하지 않고 잘 축적되기에 그 활용도가 크다 할 수 있다.

#### 나) 색소계열의 선택

Evans blue (청색색소), ICG (근적외선형광색소) - 임상적으로 사용되는 청색색소와 근적외선색소 중에서 알부민에 결합하는 색소를 선택함.

#### 다) [99mTc]EB-ICG-HSA 키트의 개발과정

##### (1) [Tc-99m]Tc-HSA-ICG (형광-방사성 다중모드 표지자 플랫폼 개발)

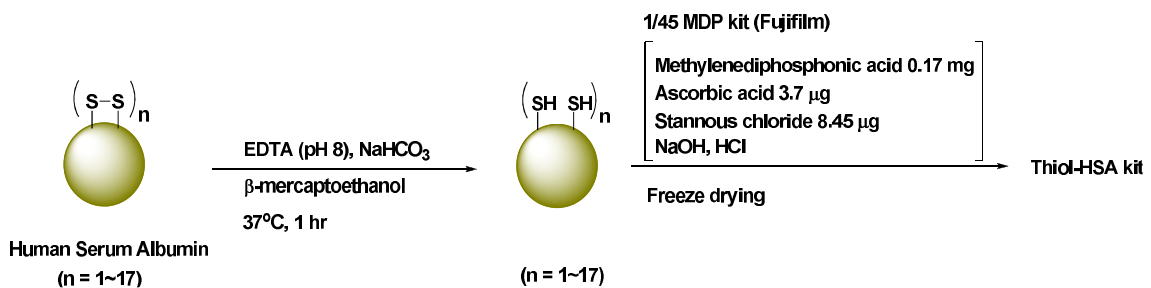
기존 인혈청알부민에 존재하는 17개의 디설파이드 작용기(-S-S-)를 환원시킴으로써 적개는 2개부터 최대 34개의 티올(-SH)을 생성할 수 있게 된다. 이 티올기는 방사성동위원소인 [Tc-99m]Tc와 결합하기 위한 작용기이기 때문에 생성이 필수적이다. 하나의 [Tc-99m]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup>는 SnCl<sub>2</sub>를 거쳐 티올 4개가 배위결합 할 수 있도록 환원되기에 최대 8개가 표지 가능하다. 티올기를 사용하는 이유는 [Tc-99m]Tc를 결합시키기 위하여 티올보다 비교적 덩치가 큰 MAG3, Hynic 등의 킬레이트를 별도로 붙여주는 합성과정 없이 간단히 인혈청알부민의 디설파이드를 환원시켜 생성시킴으로써 사용할 수 있기 때문에 인혈청알부민 구조의 변화를 최소화 시키고, 결과적으로 인혈청알부민의 체내 물리적 작용기능의 변화 또한 최소화 할 수 있기 때문이다.

1) 티올 인혈청알부민 키트의 제조

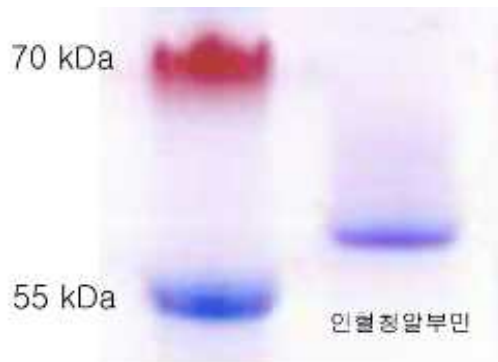
0.3 M EDTA 40  $\mu$ L, 1 M NaHCO<sub>3</sub> 40  $\mu$ L 그리고 1.5 M 2-머캅토에탄올 50  $\mu$ L를 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL 용액으로 묽힌 20 % 인혈청알부민 0.030 mL (6 mg) 용액에 첨가하였고, 이 혼합용액을 다시 37 °C에서 한 시간 동안 교반하여 디설파이드 결합을 티올로 환원시켰다. 반응 종료 후 다시 한번 PD-10 컬럼을 이용하여 정제를 실시하였고, 얻어진 티올 인혈청 알부민을 감압 증류시킨 후 다시 증류수 1 mL로 묽혀졌다. 이렇게 묽혀진 용액에 메틸렌디포스포닉산 0.17 mg, 아스코르브산 3.7  $\mu$ g, 염화제1주석 8.45  $\mu$ g을 첨가해 주고 NaOH 및 HCl을 이용하여 pH를 6으로 맞춰주었다. 이렇게 완성된 용액을 유리병에 넣었고, 섭씨 -80 °C에서 24 시간 동안 냉동시킨 후 동결건조법을 이용하여 건조시켜 1회용 키트 형태의 결과물을 얻을 수 있었다(그림 1-1). 티올 인혈청 알부민 키트의 합성수율은 BCA 단백질 정량 결과 91.8 %의 합성수율을 확인할 수 있었다. 또한, 티올 인혈청 알부민의 티올기량을 확인하기 위해 Ellman's reagent (sulfhydryl assay reagent)를 사용하였고 그 결과 티올 인혈청 알부민 하나당 15.2개의 티올기가 생성되었음을 확인할 수 있었다.



시작물질로 사용한 시판중인 인혈청알부민(왼쪽)과 자체 제작된 인혈청알부민 키트(오른쪽)



(그림 1-1) [Tc-99m]Tc를 표지하기 위한 티올 인혈청알부민의 제조



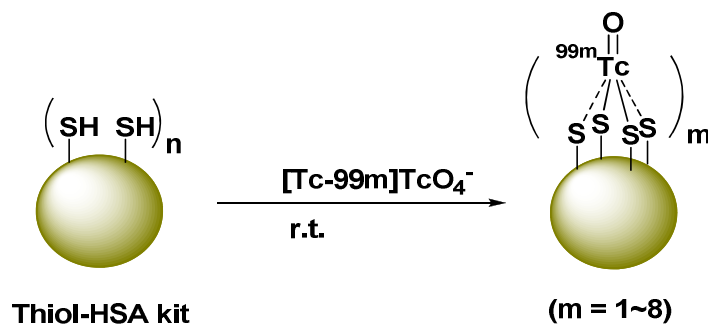
(그림 1-2) 인혈청알부민의 전기영동 결과

2) 인도시아닌그린 및 에반스블루 키트의 제조

인도시아닌그린을 1.5 mL 용량의 차광튜브에 0.4 mg 담아놓는다. 에반스블루는 1.5 mL 용량의 차광튜브에 6 mg 담아놓는다.

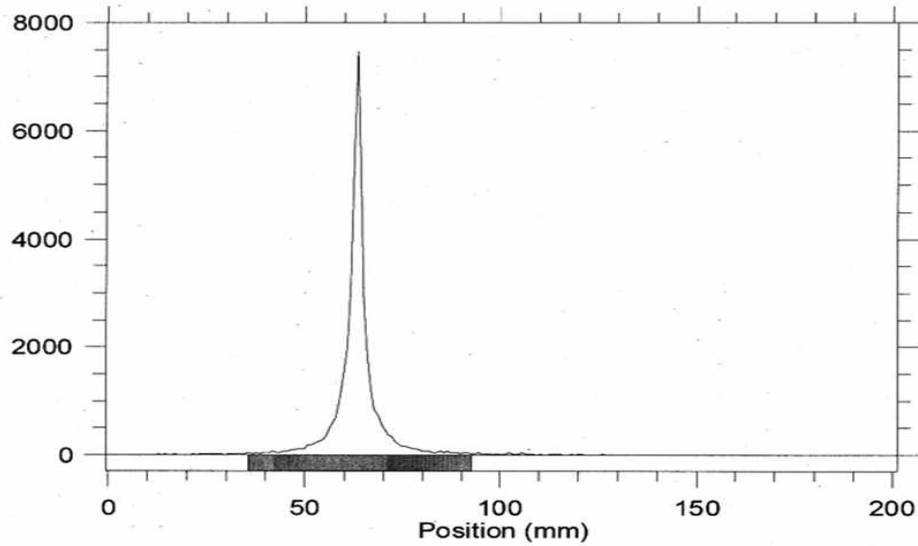
3) 티올 인혈청알부민 키트를 이용한 [Tc-99m]Tc 표지 화합물의 제조

앞서 준비한 티올 인혈청알부민 키트에 [Tc-99m]TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> 20 mCi/2 mL 을 첨가한 후 10분간 실온에서 반응시켰다(그림 1-3). 합성 종료 후 0.45 μm 무균필터를 통과시켰으며 합성 결과는 ITLC (Instant thin layer chromatography)를 에탄올 : 10 % 암모늄 아세테이트 = 1 : 1 용액으로 전개함으로써 확인할 수 있었고, 표지율은 > 99 %임을 확인할 수 있었다(그림 1-4).



(그림 1-3) [Tc-99m]Tc 표지된 인혈청알부민 합성도

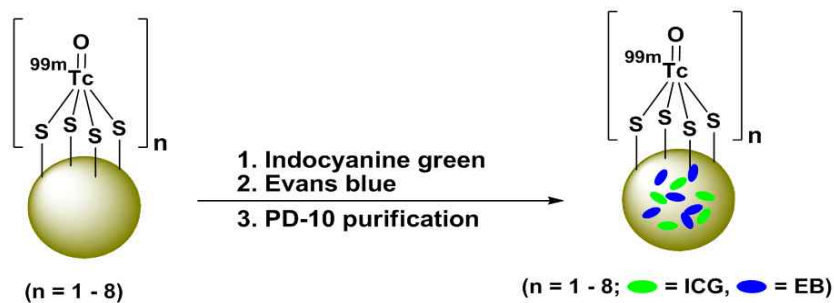
Reg	(mm) Start	(mm) Stop	(mm) Centroid	RF	Region Counts	Region CPM	% of Total	% of ROI
Rgn 1	35.8	92.5	63.3	0.316	41133.0	20566.5	96.56	100.00
1 Peaks					41133.0	20566.5	96.56	100.00



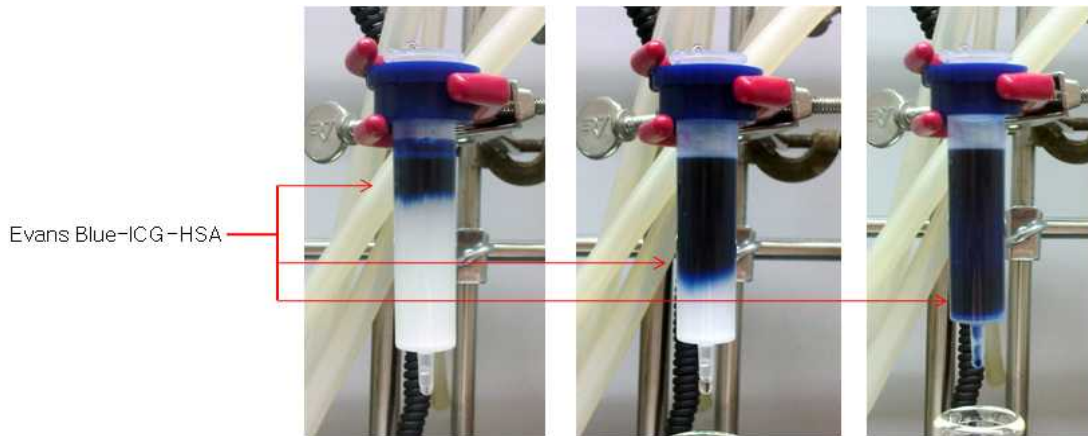
(그림 1-4) [Tc-99m]Tc 표지된 인혈청알부민의 ITLC 결과

#### 4) [Tc-99m]Tc 표지된 인도시아닌그린-에반스블루-인혈청알부민의 제조

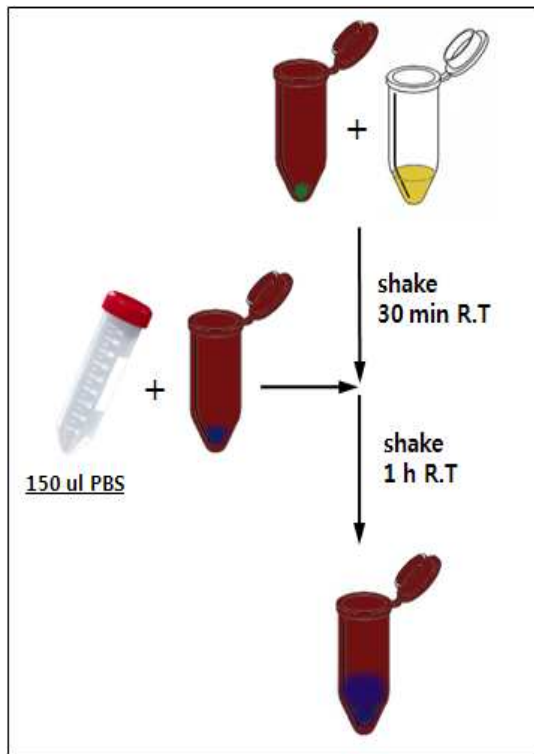
인도시아닌그린 튜브에 1 mL의 PBS 용액을 넣어준 후 30초 이상 흔들어 완전히 녹이고 마찬가지로, 에반스블루 튜브도 PBS 1 mL를 넣어준 후 30초 이상 흔들어 완전히 녹여서 준비해 놓는다. 앞서 준비한 [Tc-99m]Tc-HSA에 ICG 용액을 넣어준 후 실온의 차광조건에서 30분간 흔들어주었다. 1차 흡착이 종료된 후에 EB 용액을 [Tc-99m]Tc-ICG-HSA 용액에 첨가한 후 1시간 동안 실온 차광조건에서 다시 흔들어주었다. 모든 흡착결합 반응이 끝난 후 PD-10 정제로 [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA를 얻을 수 있었다(그림 1-5).



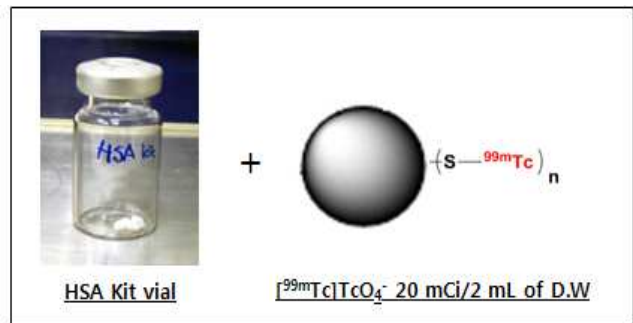
(그림 1-5) [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA의 제조법



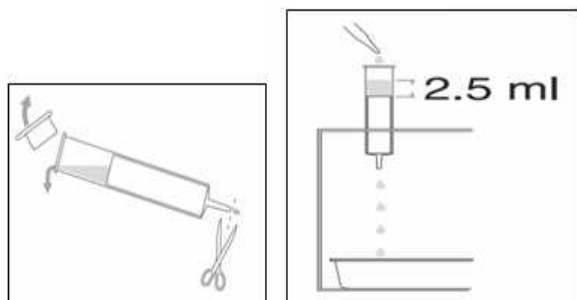
(그림 2) EB-ICG-HSA의 PD-10 정제과정



1<sup>st</sup> Step : ICG-EB-HSA preparation



2<sup>nd</sup> Step : <sup>99m</sup>Tc-HSA preparation



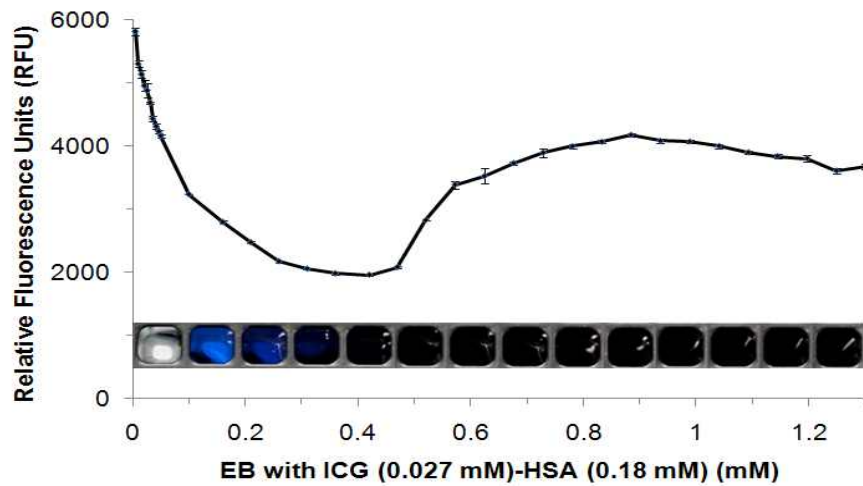
3<sup>rd</sup> Step : Pre-conditioning of PD-10 column and <sup>99m</sup>Tc-ICG-EB-HSA preparation

(그림 3) [<sup>99m</sup>Tc-EB-ICG-HSA] 키트 제작과정

## 표지자의 최적화

가) 형광방출 측면에서 최적화된 EB-ICG-HSA 농도 결정과정

0.027 mM ICG 와 0.18 mM HSA를 기반으로, EB 농도 변화에 따른 최적화된 EB-ICG-HSA 농도를 관찰하였다(n=3) (그림 4). 그 결과, 0.027 mM ICG 와 0.18 mM HSA 기반으로, 0.88 mM EB 가 in vitro상에서 가시광선-형광 시그널을 발생하는 최적화된 농도임을 확인하였다.



(그림 4) [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA의 농도 관찰

나) In vivo 상에서 육안식별가능 농도 (청색색소의 농도 최적화)

ICG	주사량	육안 (popliteal LN)	형광
20 mg/ml (ICG로서)	50ul	+++	-
2 mg/ml		+++	++
0.2 mg/ml		+	+++
0.02 mg/ml		-	+
0.002 mg/ml		-	-

HSA-ICG	주사량	육안 (popliteal LN)	형광
20 mg/ml (ICG로서)	50ul	+++	-
2 mg/ml		+++	++
0.2 mg/ml		+	+++
0.02 mg/ml		-	++
0.002 mg/ml		-	-

EB-HSA-ICG	주사량	육안 (popliteal LN)	형광	방사성동위원소 [Tc-99m]Tc
0.2 mg/ml	50ul	+++	+++	-
0.02 mg/ml		+++	-	x
0.002 mg/ml		+++	-	x

## 화학적 안정성 및 체내(혈청내) 안정성 검증

### 가) 농도별 형광강도 평가

#### (1) HSA-ICG의 810 nm에서 시간에 따른 농도별 Fluorescence emission 변화

ICG 1 mg을 15 uL HSA와 85 uL 0.05 M PBS buffer가 섞인 용액에 첨가하였다. 이를 30분간 차광된 실온에서 교반시켜주었다. 이렇게 ICG 흡착된 HSA 용액을 1/2씩 뉘히면서 20개의 용액을 만든 후 각 용액의 30 uL씩을 Safire II 장비를 이용하여 fluorescence emission 변화를 측정하였다(표 1). 이때 측정된 emission 파장은 700~850 nm 영역이었다. 측정은 0, 2, 4, 6, 8, 24 시간별로 측정하였다. 가장 높은 fluorescence 값을 보인 파장 및 ICG 농도는 810 nm, 0.025 mM 이었다.

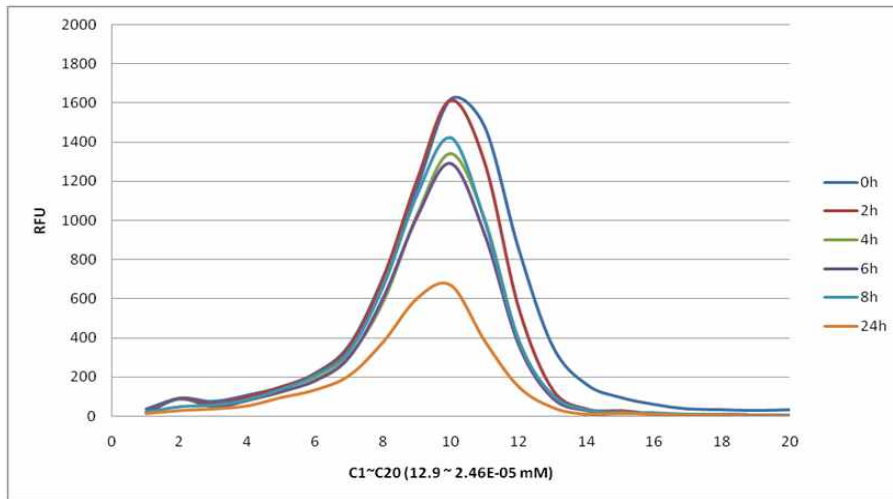
	ug	uL	umole	mM
C1	1000	100	1.290389181	12.90389181
C2	500	100	0.645194591	6.451945907
C3	250	100	0.322597295	3.225972953
C4	125	100	0.161298648	1.612986477
C5	62.5	100	0.080649324	0.806493238
C6	31.25	100	0.040324662	0.403246619
C7	15.625	100	0.020162331	0.20162331
C8	7.8125	100	0.010081165	0.100811655
C9	3.90625	100	0.005040583	0.050405827
C10	1.953125	100	0.002520291	0.025202914
C11	0.9765625	100	0.001260146	0.012601457
C12	0.48828125	100	0.000630073	0.006300728
C13	0.244140625	100	0.000315036	0.003150364
C14	0.122070313	100	0.000157518	0.001575182
C15	0.061035156	100	7.87591E-05	0.000787591
C16	0.030517578	100	3.93796E-05	0.000393796
C17	0.015258789	100	1.96898E-05	0.000196898
C18	0.007629395	100	9.84489E-06	9.84489E-05
C19	0.003814697	100	4.92244E-06	4.92244E-05
C20	0.001907349	100	2.46122E-06	2.46122E-05

(표 1) ICG-HSA에서 ICG의 농도변화표

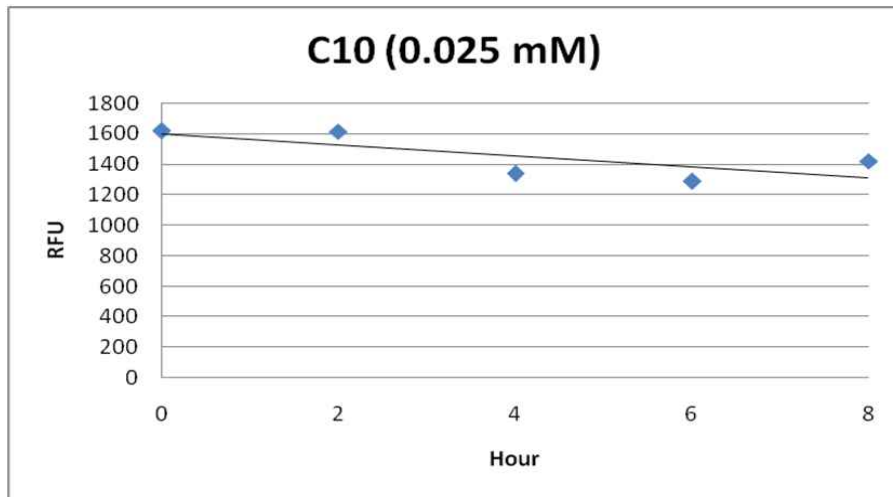
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20
0h	38	91	76	107	149	219	364	714	1175	1619	1477	852	357	161	97	60	38	32	28	31
2h	21	92	63	101	149	218	356	709	1213	1615	1295	553	133	36	27	12	8	8	5	6
4h	17	87	48	83	123	189	309	586	1034	1340	1005	390	102	30	20	11	7	6	5	4
6h	16	90	47	80	128	183	303	608	1023	1289	928	363	92	30	19	13	6	8	5	3
8h	20	48	55	85	139	208	335	664	1134	1422	997	388	107	34	19	17	10	8	6	5
24h	13	29	37	54	94	133	207	382	605	670	386	150	43	11	12	11	5	6	3	3

(표 2) ICG-HSA에서 시간에 따른 ICG 농도별 Fluorescence emission (810 nm) 결과.





(그림 5) 810 nm에서의 농도 및 시간별 Fluorescence emission 변화

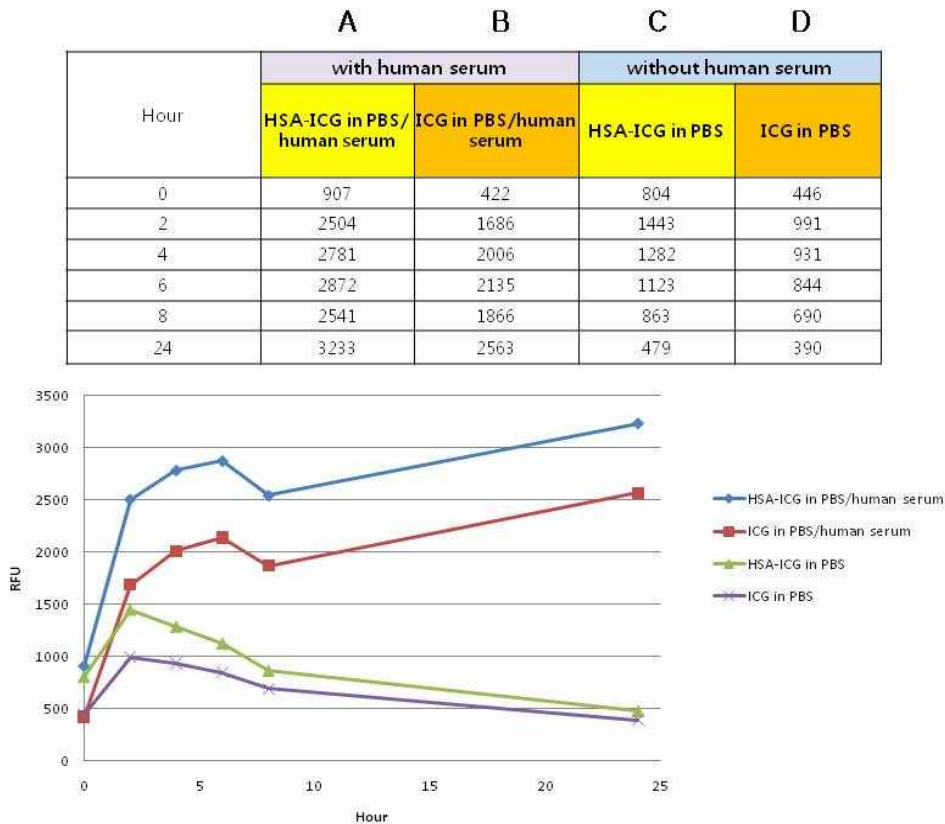


(그림 6) 0.025 mM, 810 nm에서의 시간별 Fluorescence emission 변화

나) 안정성 평가

(1) HSA-ICG 및 ICG의 PBS 및 Human serum 내 안정성 평가

ICG 2 mg을 0.4 mL PBS buffer에 녹여서 준비한 후 이를 0.1 mL (ICG 0.5 mg)씩 A, B, C, D 4개의 tube로 나누었다. 이 중 A, C tube에는 각각 7.5 uL 인혈청 알부민을 첨가해 주었고, B, D tube에는 각각 7.5 uL PBS buffer를 첨가하여 주었다. 4개의 tube 모두 30분간 차광된 실온에서 교반시켜 주었고, 교반이 끝난 후 모든 tube에 499 uL의 PBS buffer를 넣어서 묽혀주었다. 30 uL씩의 A, B 용액은 각각 30 uL의 human serum과 혼합시켰고, 30 uL씩의 C, D 용액은 각각 30 uL의 PBS buffer와 혼합시켜 준 다음 Safire II 장비를 이용하여 fluorescence를 측정 하였다. 이때 측정에 사용된 emission 파장은 810 nm 이었다. 그 결과 ICG 용액 보다는 HSA-ICG 형광 값이 시간에 따라 더 안정화 되는 것을 볼 수 있었다. 또한 ICG 및 HSA-ICG 용액 모두 PBS buffer에서는 ICG의 aggregation에 의한 self-quenching에 의하여 형광값이 시간에 따라 감소하는 것을 보인 반면, human serum 내에서는 시간이 흐름에 따라 점차 더 안정화됨을 확인할 수 있었다 (그림 7).



(그림 7) HSA-ICG 및 ICG의 PBS 및 Human serum 내 안정성 평가

다) EB와 ICG가 이중 흡착된 HSA

(1) 810 nm에서 시간에 따른 농도별 Fluorescence emission 변화

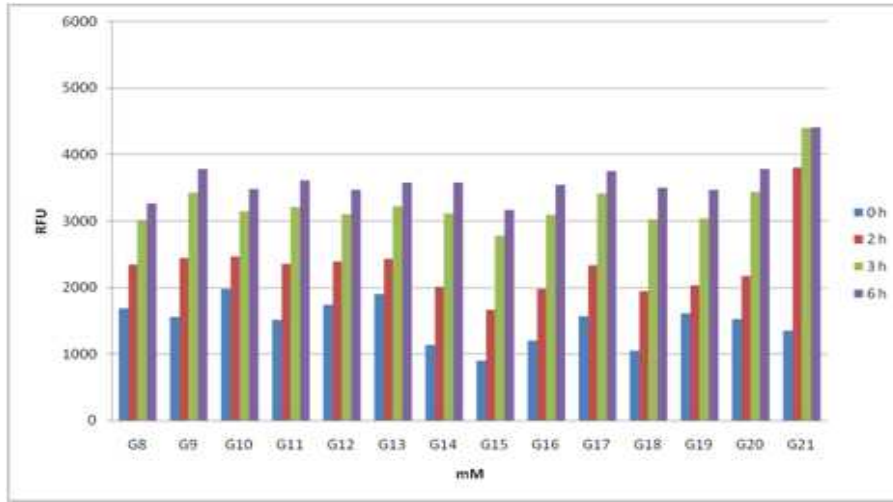
ICG-HSA 0.013 mM를 30 uL씩 G8~G21 well에 넣어주었다. EB는 0.5 mg/100 uL (5.204 mM) 농도로 제작한 후, 이 용액을 1/2씩 물히면서 30 uL씩 높은 농도에서 낮은 농도 순으로 ICG-HSA가 담겨있는 G8~G21 well에 넣어주었다(표 3). Signal 크기를 비교하기 위하여, ICG-HSA 0.013 mM 30 uL와 PBS buffer 30 uL를 섞어준 well도 함께 측정하였다. 이들 용액은 Safire II 장비를 이용하여 fluorescence emission 변화를 측정할 수 있었다. 이때 측정된 emission 파장은 700~850 nm 영역이었다. 측정은 0, 2, 4, 6 시간별로 측정하였다. 결과적으로, 모든 EB 농도 영역에서 ICG의 fluorescence emission signal quenching은 일어나지 않았다. 특히, 높은 농도의 EB를 섞어준 G8~G10 well에서는 ICG의 fluorescence emission signal 및 EB에 의한 나안관찰도 가능하였다(표 4).

	ug	uL	umole	mM	umole (30 uL)
F1	1000	100	1.040777669	10.40777669	0.312233301
F2	500	100	0.520388835	5.203888345	0.15611665
F3	250	100	0.260194417	2.601944173	0.078058325
F4	125	100	0.130097209	1.300972086	0.039029163
F5	62.5	100	0.065048604	0.650486043	0.019514581
F6	31.25	100	0.032524302	0.325243022	0.009757291
F7	15.625	100	0.016262151	0.162621511	0.004878645
F8	7.8125	100	0.008131076	0.081310755	0.002439323
F9	3.90625	100	0.004065538	0.040655378	0.001219661
F10	1.953125	100	0.002032769	0.020327689	0.000609831
F11	0.9765625	100	0.001016384	0.010163844	0.000304915
F12	0.48828125	100	0.000508192	0.005081922	0.000152458
F13	0.244140625	100	0.000254096	0.002540961	7.62288E-05
F14	0.122070313	100	0.000127048	0.001270481	3.81144E-05
F15	0.061035156	100	6.3524E-05	0.00063524	1.90572E-05
F16	0.030517578	100	3.1762E-05	0.00031762	9.5286E-06
F17	0.015258789	100	1.5881E-05	0.00015881	4.7643E-06
F18	0.007629395	100	7.9405E-06	7.9405E-05	2.38215E-06
F19	0.003814697	100	3.97025E-06	3.97025E-05	1.19108E-06
F20	0.001907349	100	1.98513E-06	1.98513E-05	5.95538E-07

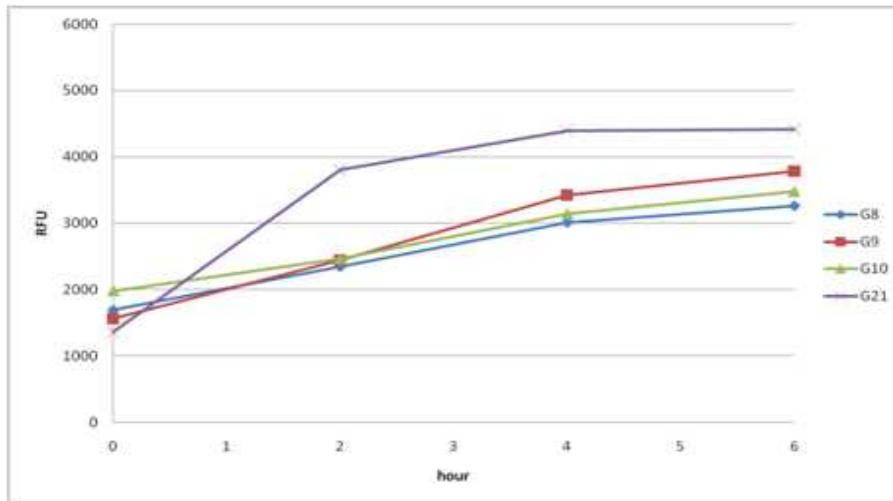
(표 3) EB-HSA에서 EB의 농도변화표

810 nm	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21
hour	G8	G9	G10	G11	G12	G13	G14	G15	G16	G17	G18	G19	G20	G21
0	1690	1560	1980	1520	1746	1899	1137	901	1207	1570	1047	1610	1524	1353
2	2344	2446	2463	2361	2387	2432	2011	1665	1985	2336	1944	2032	2175	3807
4	3012	3426	3142	3213	3108	3221	3110	2784	3091	3411	3025	3042	3439	4398
6	3265	3785	3481	3605	3472	3574	3573	3168	3544	3749	3501	3468	3781	4413

(표 4) EB-ICG-HSA 용액의 시간에 따른 ICG 농도별 Fluorescence emission (810 nm) 및 육안관찰 결과.



(그림 8) 810 nm에서의 EB 농도 및 시간별 ICG Fluorescence emission 변화



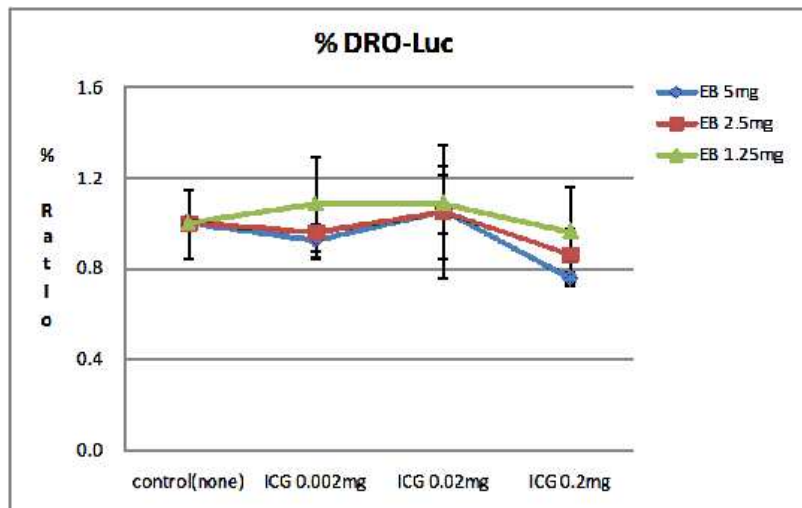
(그림 9) 810 nm에서의 시간별 G8~G10 및 standard G21의 Fluorescence emission 변화

## 표지자의 독성평가

### 가) 세포독성 평가

#### (1) CCK-8 Kit을 이용한 Cell Viability 측정

- 세포주: 갑상선암 세포주 (DRO\_Luc)
- 처리시료: 표지자로써 ICG, HSA-ICG 및 EB-HSA-ICG
- 처리농도: ICG로써 0.2 mg/ml, 0.02 mg/ml, 0.002 mg/ml 및 HSA 6mg, Evans Blue 5 mg
- 실험방법: 배양한 세포주를 well 당  $1 \times 10^4/100$  ul로 96-well plate에 깔아주고 24시간 배양한다. 희석한 시료 용액을 농도별로 10 ul씩 넣고 5시간 동안 배양한 후 시료를 PBS로 3번 씻어내고 24시간 재배양한다. Cell Counting Kit-8 solution을 10 ul씩 처리하고 약 1시간 후 450 nm 흡광도로 측정하여 농도별로 세포에 준 영향을 비교한다.
- 실험결과



(그림 10) 림프절 표지자 농도에 따른 Cell viability

나) 간이 동물독성 평가

[Tc-99m]Tc-HSA-ICG의 마우스를 이용한 단회 피하투여와 단회 정맥주사 투여에 의한 독성 시험의 정보를 얻기 위하여 실시하였다. (식품의약품안전청 고시 제 2005-30호 "의약품등의 독성 시험 기준"에 준함)

(1) 실험내용 요약

시험물질 [Tc-99m]Tc-HSA-ICG의 단회 피하투여와 단회 정맥투여에 의한 독성을 조사하기 위하여 시행하였다. 비 임상시험은 단회투여(급성독성실험)로 진행하였고, 진단용으로 사용될 목적이고 예비실험결과 독성이 거의 없을 것으로 판단되는 약제이어서 LD50과 최대용량은 구하지 못하는 것으로 판단된다. 투여경로는 피하(SC), 정맥주사(IV)로 정하였다.

BALB/c 계통 ICR 마우스에 암수 각각 0 및 2000 mg/kg의 용량으로 3마리씩 1회 피하투여하고 28일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다. BALB/c 계통 ICR 마우스에 암수 각각 0 및 2000 mg/kg의 용량으로 3마리씩 1회 0 및 2000 mg/kg의 용량으로 정맥주사하고 28일간의 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견을 관찰하였다.

그 시험결과는 다음과 같다.

- ① 시험물질에 의한 사망 예는 암수의 모든 시험군에서 시험기간 동안 관찰되지 않았다.
- ② 일반증상의 경우 암수의 모든 시험군에서 관찰기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.
- ③ 체중변화의 경우 암수의 모든 시험군에서 정상적인 체중증가를 나타내었다.
- ④ 계획도살 부검소견의 경우 암수의 모든 시험군에서는 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

따라서 암수동물에 대한 본 시험물질의 LD50값은 암수 모두 2000 mg/kg을 상회할 것으로 사료된다.

(2) 시험물질 및 매체

1. 시험물질 (첨부자료 No. 1)

- 1) 명 칭 : [Tc-99m]Tc-HSA-ICG
- 2) 시험기관내 코드번호 :

- 3) 로트번호 :
- 4) 입 수 일 : 2010년 2월 일
- 5) 입 수 량 : g
- 6) 외관 및 성상 : 흰색의 동결 건조된 분말
- 7) 보관조건 : 냉장보관

2. 매체

- 1) 명 칭 : [Tc-99m]Tc pertechnate sodium 수용액
- 2) Lot No. :
- 3) 보관조건 : 실온보관
- 4) 공 급 처 : Daich

(3) 재료 및 방법

1. 시 험 계

1) 종 및 계통

BALB/c 계통의 특정병원균 부재(SPF) ICR 마우스

2) 공급원

중앙실험동물(SLC)

주 소 : 서울시 서초구 우면동 66 동강빌딩3층

3) 시험계의 선택이유

마우스는 독성시험에 적당한 실험동물로서 급성독성시험에 널리 사용되고 있다. 본 계통의 마우스는 풍부한 시험 기초자료가 축적되어 있어서, 시험결과와 해석 및 평가 시에 이러한 자료를 이용하는 것이 가능하다.

4) 주령 및 체중범위

	수 컷	암 컷
입수시 주령	5주령	5주령
입수시 동물수	10마리	10마리
입수시 체중	17-19 g	17-19 g
투여개시시 주령	6주령	6주령
투여개시시 동물수	6마리 (IV 3, SC 3)	6마리 (IV 3, SC 3)
투여개시시 체중	18-20 g	18-20 g

5) 검역 및 순화 (첨부자료 2)

동물입수 후 외관을 육안적으로 검사한 후 7일간 시험을 실시하는 동물

실에서 순화시킨 후 일반증상을 관찰하여 건강한 동물만을 시험에 제공하였다.

## 2. 사육환경

### 1) 환경조건

본 시험은 온도  $23\pm 3^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 15\%$ , 조명 시간 12시간(오전 8시 ~ 오후 8시) 및 조도 150~300 Lux로 설정된 국립암센터 연구소 6층 실험동물실 IS실에서 실시되었다. 시험자들은 모두 고압증기멸균( $121^{\circ}\text{C}$ , 20분)된 작업복, 두건, 마스크 및 장갑 등을 착용하고 작업을 실시하였다.

### 2) 사육환경 모니터링 (첨부자료 3)

시험기간 중 동물실의 온습도는 개별환기사육상자(IVC Rack)에서 정확하게 조절되었으며, 조도 등의 환경조건은 정기적(3개월에 1회)으로 측정되었다. 환경측정의 결과, 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다.

### 3) 사육밀도 및 사육 상자

식별시험 기간 동안 개별환기사육상자를 이용하여 순화기간에는 5마리씩, 투여와 관찰기간 중에 5마리씩을 수용하였다. 시험기간 중 사육 상자에는 시험번호 및 동물번호를 기입한 개체식별카드(색상구별 or 표식지)를 사용하여 구별하였다.

### 4) 사료 및 물

① 사료의 급여방법(첨부자료) : 사료는 실험동물용 고품사료를 방사선( $2.0\text{ Mrad}$ ) 멸균하여 자유섭취 시켰다. 또한 당 연구소 실험동물실과 사료 판매업체에서 제공한 미생물 모니터링 결과물에서 미생물 및 오염물질 확인시험을 실시한 바, 본 시험에 영향을 미칠만한 요인은 발견되지 않았다.

② 물의 급여방법 및 오염물질의 확인(첨부자료) : 물은 상수도수를 자외선살균기로 소독시킨 후 자유섭취 시켰다. 물에 대하여는 주기적으로 일반수질검사를 실시하였다. 물중의 오염물질 분석에 있어서 시험에 영향을 미치는 요인은 발견되지 않았다.

## 3. 투여량 및 시험군의 구성

### 1) 투여량 설정

본 시험물질은 예비시험결과 한계용량인  $2000\text{ mg/kg}$ 의 용량에서 사망동물이 관찰되지 않아 한계용량시험의 일환으로 최고용량을  $2000\text{ mg/kg}$ 으로 하고, 매체를 투여하는 매체대조군만을 두었다.



2) 시험군의 구성, 투여농도 및 용량

- 피하주사 실험

군	Vehicle	Control	T1	
성별	Male	Female	Male	Female
동물수 (마리)	3	3	3	3
동물번호	1~3	4~6	7~9	10~12
투여액량 (ul)	100 ul 500 uCi Tc-99m	100 ul 생리식염수	100 ul (0.4 mg/ul)	100 ul (0.4 mg/ul)
투여량 (mg/kg)	0	0	2000 (40mg/20g)	2000 (40mg/20g)

- 정맥주사 실험

군	Vehicle	Control	T1	
성별	Male	Female	Male	Female
동물수 (마리)	3	3	3	3
동물번호	1~3	4~6	7~9	10~12
투여액량 (ul)	100 ul 500 uCi Tc-99m	100 ul 생리식염수	100 ul (0.4 mg/ul)	100 ul (0.4 mg/ul)
투여량 (mg/kg)	0	0	2000 (40mg/20g)	2000 (40mg/20g)

3) 군 분리 및 동물식별

동물의 군 분리는 다음과 같이 실시하였다. 우선, 순화기간 중 건강하다고 판정된 동물의 체중을 측정 후 0.5 g 간격으로 구분시켜 두었다. 그리고 암수 각각의 평균체중에 가까운 개체를 암수 각각 6마리씩을 선택하였다. 0.5 g 간격으로 구분되어 선택된 암수 각 6마리를 암수 각 군에 3마리씩 균등히 들어가도록 체중을 이용한 무작위법을 이용하여 분배하였다. 동물의 개체식별은 ear tag로 표시하였다.

4. 시험물질의 투여

1) 투여액의 조제법

- 피하주사 : 최소 6시간 이상의 절식을 한다. 투여직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 2000 mg/5ml/Kg 으로 조제하였다. 매체대조군 (vehicle control)의 동물에는 매체인 0.5 % 생리식염수만을 투여하였다.

- 정맥주사 : 최소 6시간 이상의 절식을 한다. 투여직전에 주사용 생리식염수를 매체로 하여 시험물질을 2000 mg/5ml/Kg 으로 조제하였다. 매

체대조군 (vehicle control)의 동물에는 매체인 0.5 % 생리식염수만을 투여하였다.

2) 투여경로 및 투여방법

투여 전 별다른 조치를 가하지 않고 투여일에 주사기를 통해 피하주사 또는 정맥 주사하였다.

3) 투여경로 선택이유

임상예정 경로로 피하 투여를 선택하였다.

임상예정 시 실수로 정맥 주사될 경우를 상정하여 정맥투여를 선택하였다.

4) 투여횟수 및 투여기간

투여당일 오전에 개체별로 단회 투여하였다.

5) 투여액량 계산

투여당일의 측정된 체중을 기준으로 하여 투여액량 (5 ml/Kg)을 계산하였다.

5. 관찰 및 검사항목

1) 일반증상 및 사망동물의 관찰

투여당일은 투여 직후, 투여일로부터 14일까지는 매일 1회 이상씩 일반 증상 및 사망동물의 유무를 관찰하였다.

2) 체중측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 투여개시전과 투여 후 1, 3, 7 및 14일에 체중을 측정하였다.

3) 부검소견

진 생존동물을 CO<sub>2</sub>가스 마취 후 개복하여 방혈 치사시킨 후 육안적으로 모든 내부 장기를 관찰하였다.

6. 통계학적 방법

한국화학연구소 안전성연구센터의 SOP 및 Labcat module (Innovative Programming Associates, Inc., U.S.A.)에 따르는 통계처리를 실시하였다.

(4) 결 과

1. 사망률 및 LD<sub>50</sub>값 (Tables 1,2, Appendices 1,2)

암수의 매체대조군 및 2000 mg/kg 투여군에서 시험기간을 통하여 사망동물은 관찰되지 않았으며, 암수동물에 대한 본 시험물질의 LD50값은 각각 2000 mg/kg을 상회할 것으로 사료된다.

2. 일반증상 (Tables 3, 4, Appendices 1, 2)

수컷, 2000 mg/kg투여군의 1레에서 투여 후 1일째에 피모의 더럽혀짐(soiled fur)이 관찰되었는데, 이는 시험물질의 투여에 따른 소견이라기보다는 투여 후 2일째부터는 증상이 소실된 것으로 보아 동물의 개체 차이에 의해 발생한 일시적인 현상으로 사료된다. 이 이외의 암수 모든 시험군에서는 관찰기간동안 어떠한 이상증상도 관찰되지 않았다.

3. 체중변화 (Tables 5, 6, Appendices 1, 2)

암수의 모든 시험군에서 투여 후 1, 3, 7 및 14일째 정상적인 체중증가가 관찰되었다.

4. 부검소견 (Tables 7, 8, Appendices 1, 2)

암수의 모든 시험군에서 육안적으로 이상이 있는 부검소견은 관찰되지 않았다.

(5) 고찰 및 결론

시험물질 [Tc-99m]Tc-HSA-ICG에 대한 단회 피하 및 정맥투여 독성시험을 암수 SD계통의 랫트를 이용하여 실시한 결과, 시험기간 동안 사망률, 일반증상, 체중변화 및 부검소견에 있어서 시험물질의 투여에 기인한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 암수동물에 대한 본 시험물질의 LD50값은 각각 2000 mg/kg을 상회할 것으로 사료된다.

(6) 참고문헌

1. 대한민국 식품의약품안전청 : 의약품 비임상시험 가이드라인
2. OECD GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS

(7) 예비독성 시험 결과

1. 준 비

- 기 간 : 2010.3.9 -16 (1주일간)
- 평가물질 : [Tc-99m]Tc-HSA-ICG (이하 평가물질)
- 실험동물 마리당 평가물질에 포함된 구성물질의 조성  
HSA: 5.82 mg, ICG: 0.36 mg/0.1 mL(4.645 mM), [Tc-99m]Tc: 0.73 mCi
- 사용설치류 : BALB/c nu/- mouse
- 내 용 : 평가물질의 독성검사의 기준 용량 설정을 위한 간이독성검사를 진행

- 방 법 : 2마리의 BALB/c nu/- mouse에 각각 평가물질을 IV와 SQ를 이용하여 투여 후 1주일간 관찰

## 2. 결 과

### IV injection mouse

날짜	0309(inject)	0311	0313	0316
외관상태	.	.	.	.
체중변화(g)	31	31.3	31.8	32.5
기타특이사항	.	.	.	.

### SQ injection mouse

날짜	0309(inject)	0311	0313	0316
외관상태	활동량 적음	.	.	.
체중변화	29.8	30.6	31	31.25
기타특이사항	.	.	.	.



### 1) 실험 방법

- 각 군당 3 heads를 사용
- S.Q. : Vehicle control, Control, Test1, Test2
- I.V. : Vehicle control, Control, Test1, Test2
- 체중변화와 상태변화에 중점을 두었다.

	x10	x2
ICG	2	0.4
HSA	30 ul	6 ul
Vol	1 ml	1 ml
T1/T2는 50 ul씩 injection		

- 각 mouse에 injection된 용량은 아래의 표에 설명 하였다.

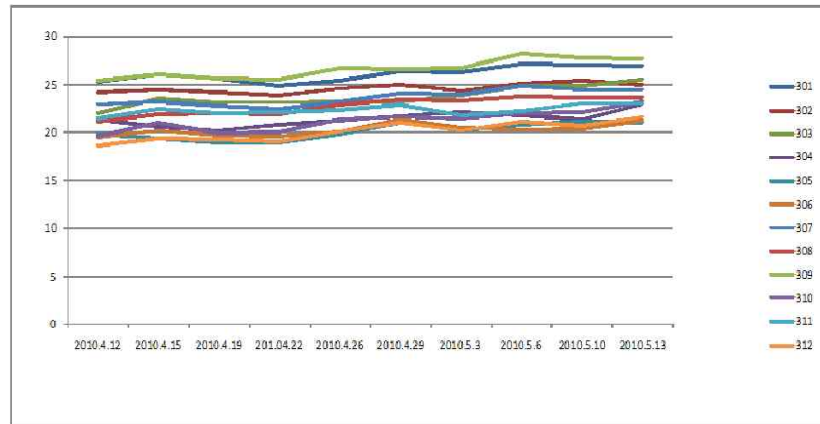
S.Q.	
vehicle control	control
1000ul cell line	1000ul PBS

I.V.	
vehicle control	control
200 ul cell line	200 ul PBS

## 2) 체중변화 그래프

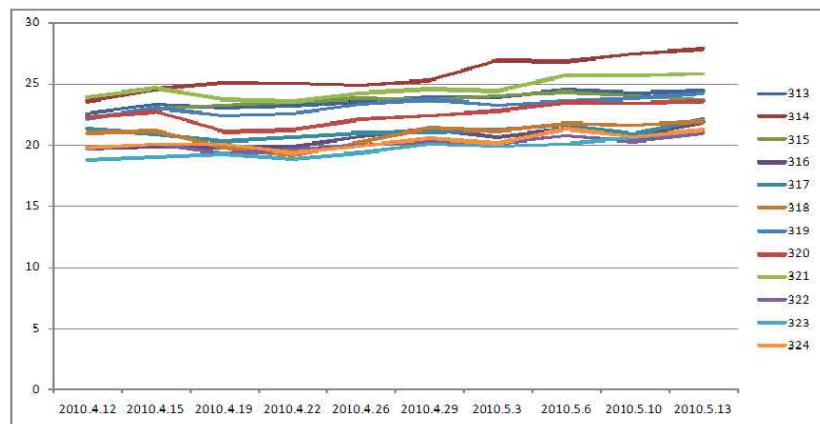
### S.Q. Test

- 301~303 : vehicle control
- 304~306 : control
- 307~309 : Test 1(2X)
- 310~312 : Test 2(10X)



### I.V test

- 313~315 : vehicle control
- 316~318 : control
- 319~321 : Test 1(2X)
- 322~324 : Test 2(10X)



3) 실험 사진

- S.Q.

Vehicle control photo



Control photo



Test 1 photo(2X)



Test 2 photo (10X)



- I.V.

Vehicle control photo



Control photo



Test 1 photo (2X)



Test 2 photo (10X)



4) 최종 부검 및 염색 사진

- S.Q

Vehicle control



Control



Male



Female



- I.V

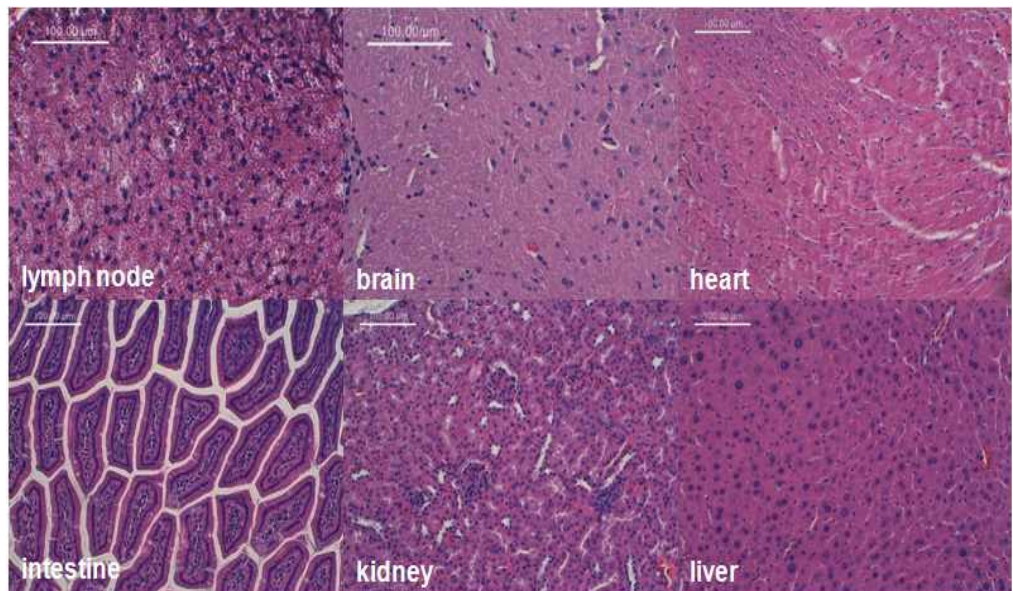
Male



Female

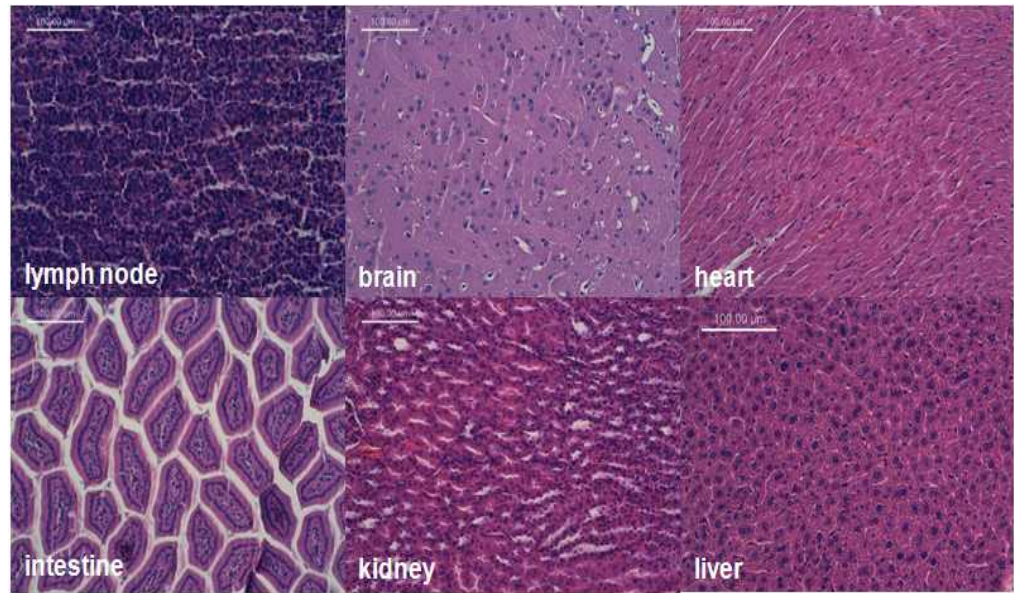


대조군(control)





실험군



## 동물모델에서 다중모드 림프절표지자 성능 검증

### 가) 근적외선 형광방출 성능 검증

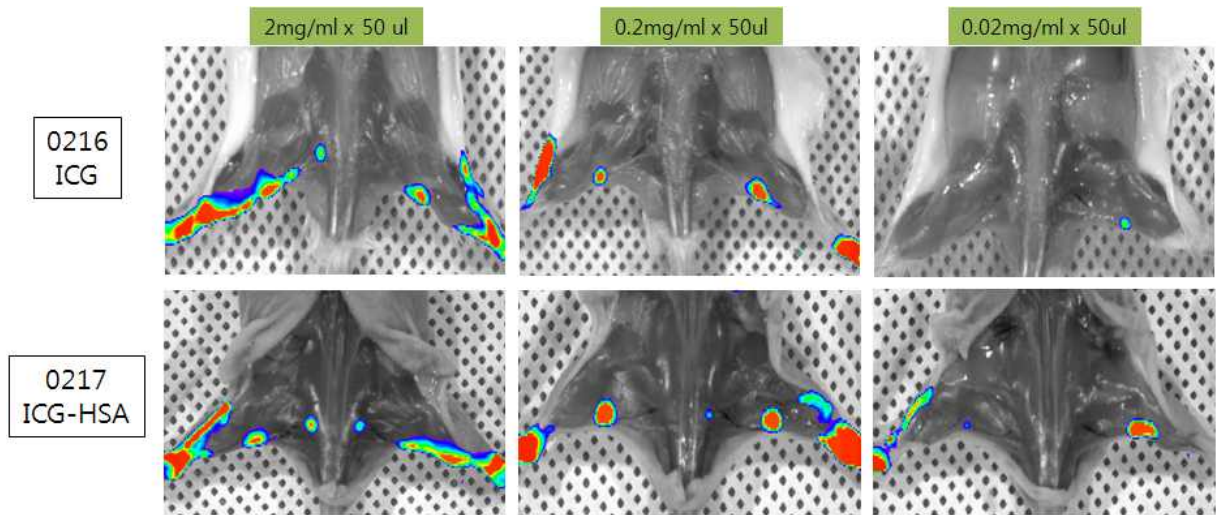
#### (1) ICG 및 HSA-ICG의 동물모델 적용

형광 염료인 ICG 및 HSA에 흡착시킨 ICG를 마우스 뒷발바닥에 주사하여 node의 위치를 육안 및 형광으로 관찰하였다. 녹색을 띄는 ICG의 육안관찰은 농도가 높을수록 용이한 반면 형광 시그널은 오히려 감소하였다(그림 11-1). 반복실험 결과, 형광 시그널과 동시에 육안 관찰이 가장 용이한 농도는 0.2 mg/ml 이었다(그림 11-2). 형광 영상은 IVIS Imaging System을 이용하여 얻었다.

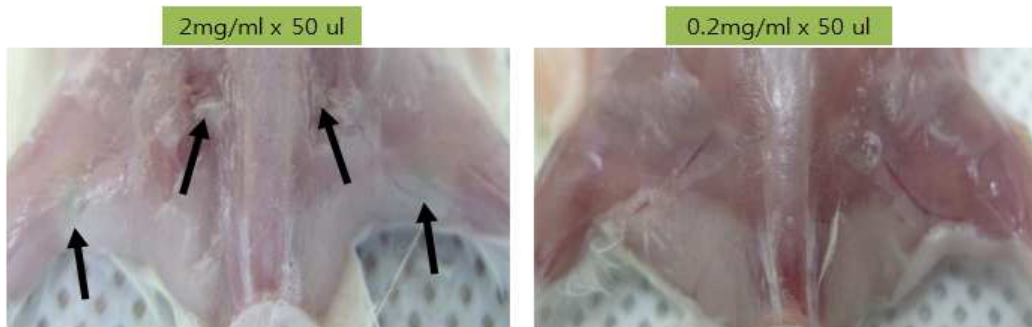
#### \*\* 림프절 표지자 동물실험 방법

- ① 마우스의 뒷발바닥을 온수로 따뜻하게 덥혀주고 주사기 구멍이 위를 향하게 하여 피부를 얇게 떼서 찢어 넣은 후 ICG-HSA (2 mg/ml) 50 ul를 주사하고 60초 정도 마사지 해준다.  
(방향은 몸 쪽에서 발끝 방향으로)
- ② 약 30분 후에 주사한 위치에서 가까운 노드 부위에 나타나는 형광 이미지를 확인한다.





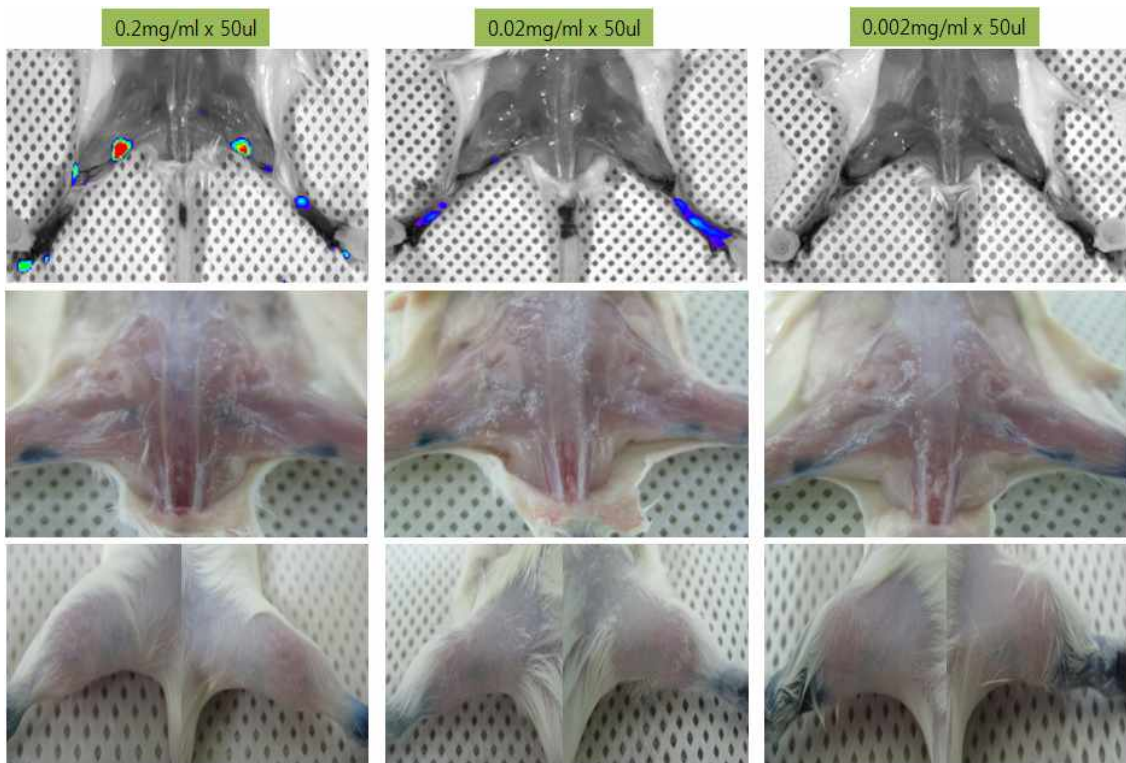
(그림 11-1) ICG 및 ICG-HSA에 의한 농도별 형광영상



(그림 11-2) ICG 및 ICG-HSA에 의한 육안관찰

(2) EB-HSA-ICG의 동물모델 적용

Evans Blue (EB)를 첨가한 표지자를 사용했을 때, HSA-ICG의 경우와 같이 가장 적합한 농도인 0.2 mg/ml에서 형광 시그널을 보였으며 그 이하의 농도에서는 약하거나 거의 시그널이 없었다. EB를 사용했을 때의 육안관찰은 희석한 농도에서 모두 용이하여 HSA-ICG의 경우보다 더 유리하였다(그림 11-3).

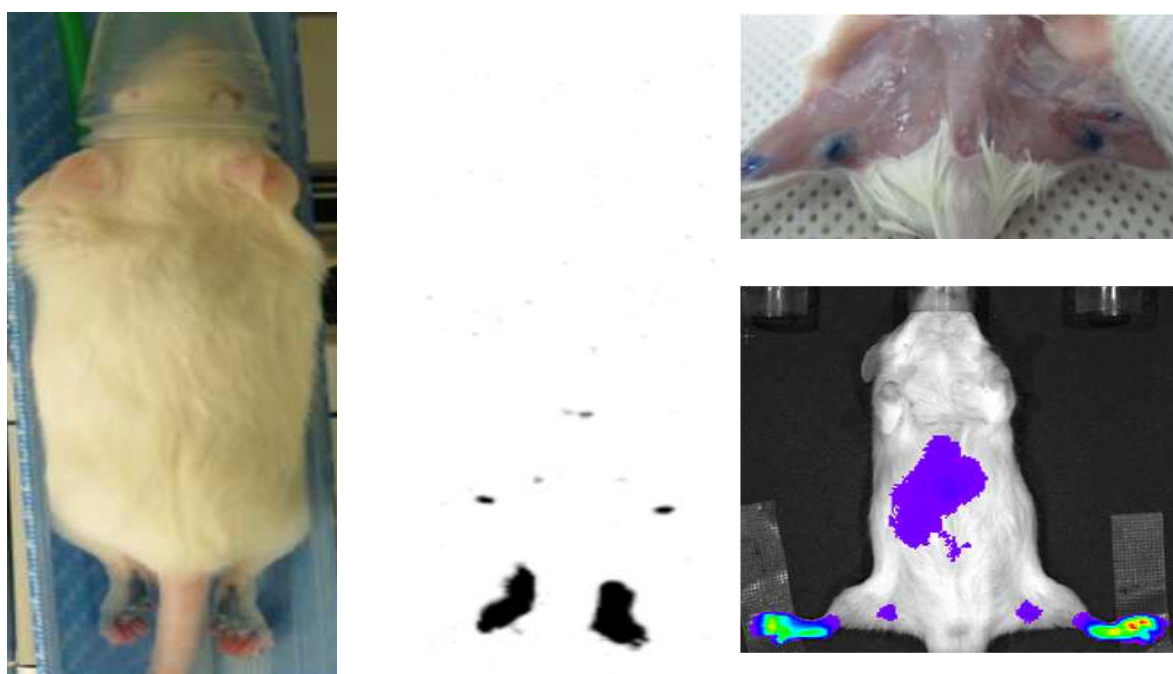


(그림 11-3) EB-HSA-ICG에 의한 형광영상 및 육안관찰

나) 방사성 표지자를 이용한 성능 검증

(1) [Tc-99m]Tc을 이용한 림프절 영상

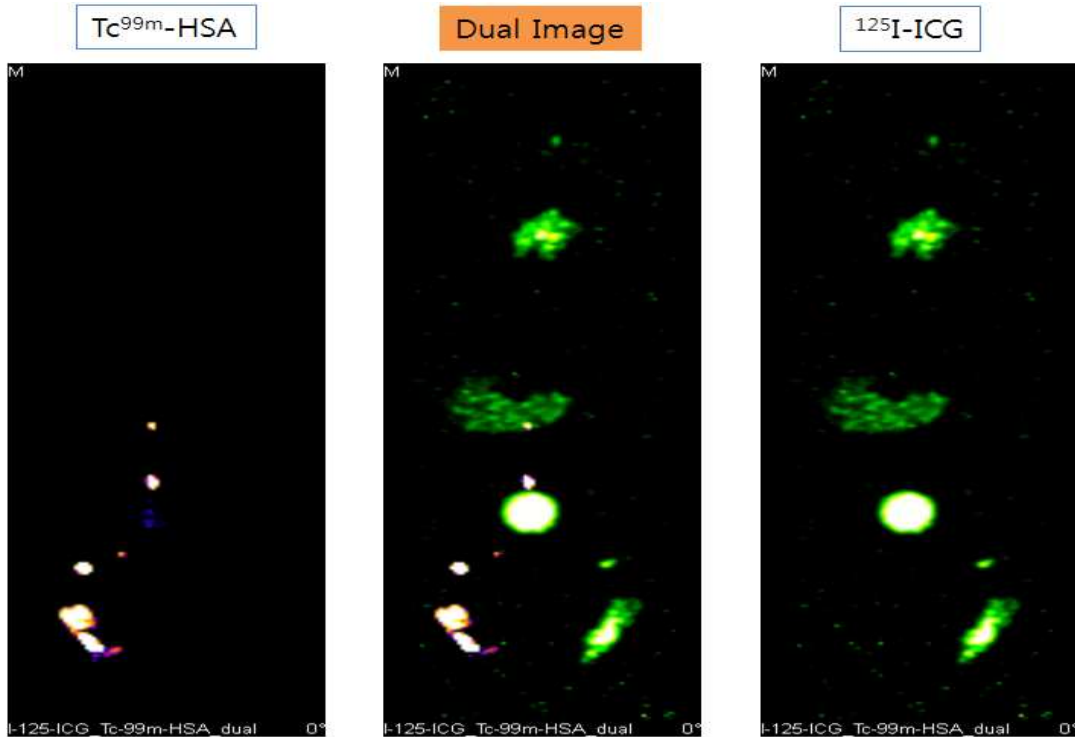
림프절 표지자에 [Tc-99m]Tc을 표지하여 [Tc-99m]Tc-ICG-HSA-EB를 제작하고 마우스 뒷발에 주사 후 1시간 뒤의 감마 영상을 ICG에 의한 형광 영상과 비교하였다. 주사한 부위를 제외하고 node에서 표지자의 축적에 의한 위치 확인이 가능하였다 (그림 12-1).



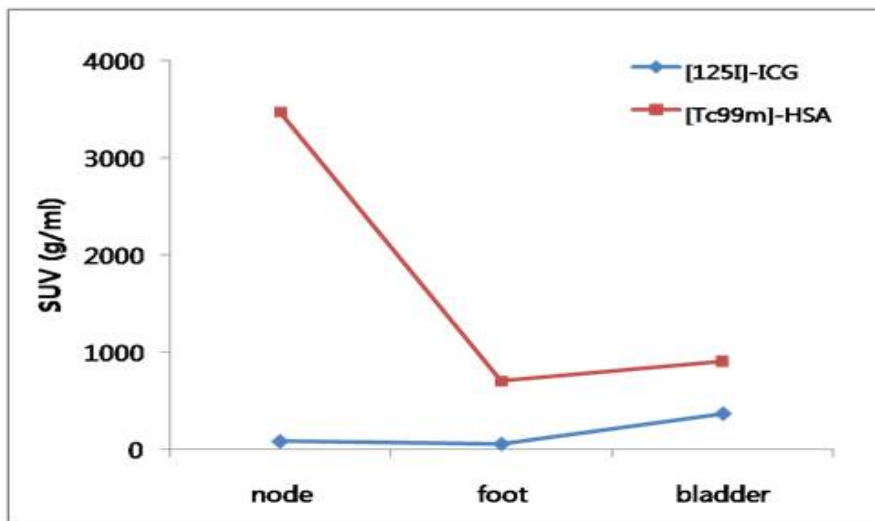
(그림 12-1) [Tc-99m]Tc-ICG-HSA-EB에 대한 감마영상 및 형광영상

(2) [Tc-99m]Tc-HSA 및 [I-125]I-ICG를 이용한 Dual Image

림프절 표지자에 사용한 HSA와 ICG의 주사 후 이동 및 분포 양상을 알기 위해 [Tc-99m]Tc-HSA와 [I-125]I-ICG를 각각 왼쪽과 오른쪽 뒷발에 주사하고 1시간 뒤에 영상을 얻어 사용된 방사성 표지자에 따른 분포 차이를 비교하였다.



(그림 12-2) [Tc-99m]Tc-HSA 및 [I-125]I-ICG에 대한 감마영상



(그림 12-3) [Tc-99m]Tc-HSA 및 [I-125]I-ICG의 주요 장기별 섭취

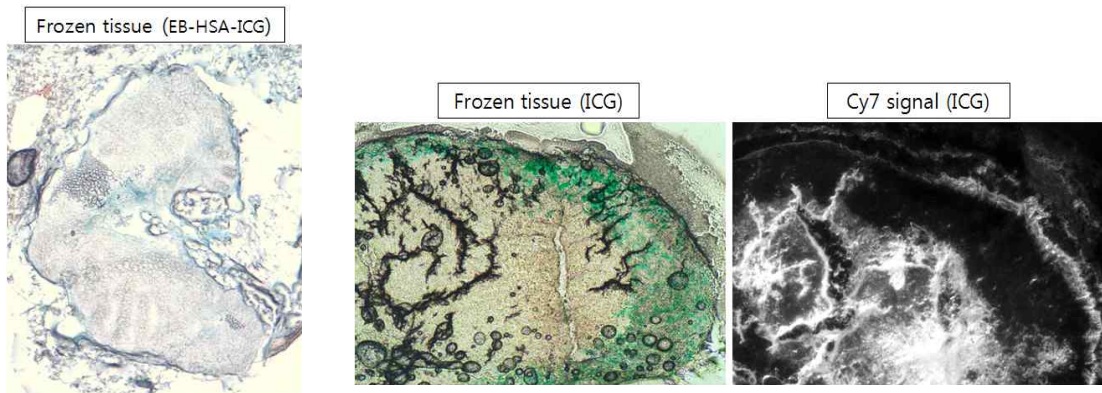
## 생검조직의 병리적 검증

### 가) 감시림프절 면역염색 및 H&E

표지자로 사용한 3 종류의 시료 (ICG, ICG-HSA, EB-HSA-ICG) 처리로 염색이 된 림프절 중, 각각의 popliteal node를 마우스 희생 후 적출하여 동결조직 (Frozen tissue) 박편 관찰 및 면역염색 (IHC)과 H&E 염색을 실시하였다.

#### (1) 동결조직 (Frozen tissue) 박편 관찰

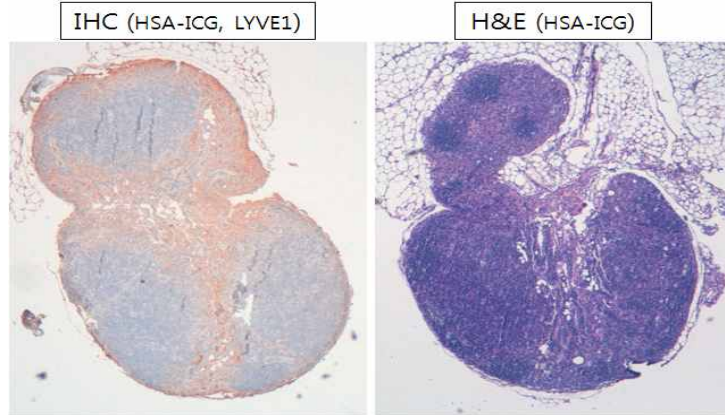
표지자를 마우스 뒷발바닥을 통해 주입한 후, 염색되어 육안으로 위치가 확인된 node를 적출해 O.C.T compound로 동결조직 박편을 제작하였으며, 형광현미경 (Filter Cy7)으로 시료가 node에 염색된 양상을 확인하였다(그림 13-1).



(그림 13-1) 동결조직 박편에서 관찰되는 표지자의 염색 부위

#### (2) LYVE-1를 이용한 면역염색 (IHC) 및 H&E

적출한 node로 파라핀 박편을 제작하여 H&E 염색 및 Lymph node에 많이 존재하며 lymph vessel 표지자로 알려진 LYVE-1 (Lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1)로 면역염색을 실시하여 node 조직세포의 분포를 관찰하였다 (그림 13-2).



(그림 13-2) 면역염색 및 H&E 염색

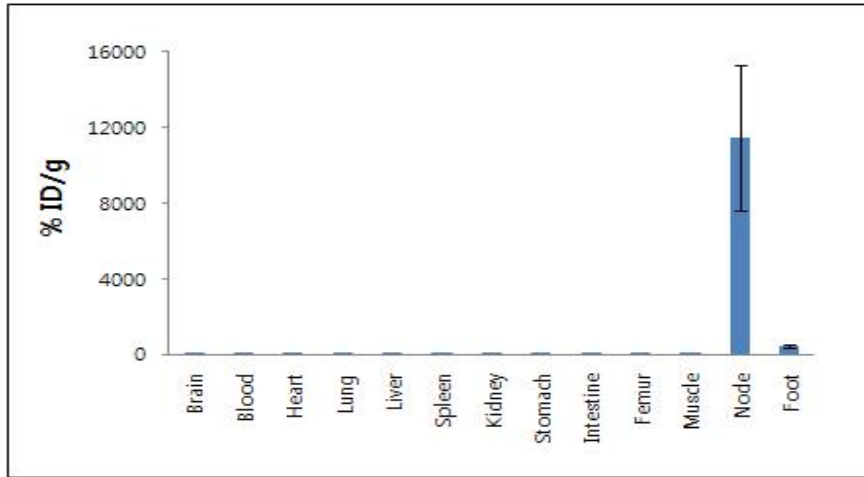
나) 감시림프절표지자의 조직내 분포양상의 평가

(1) 실험방법 및 결과

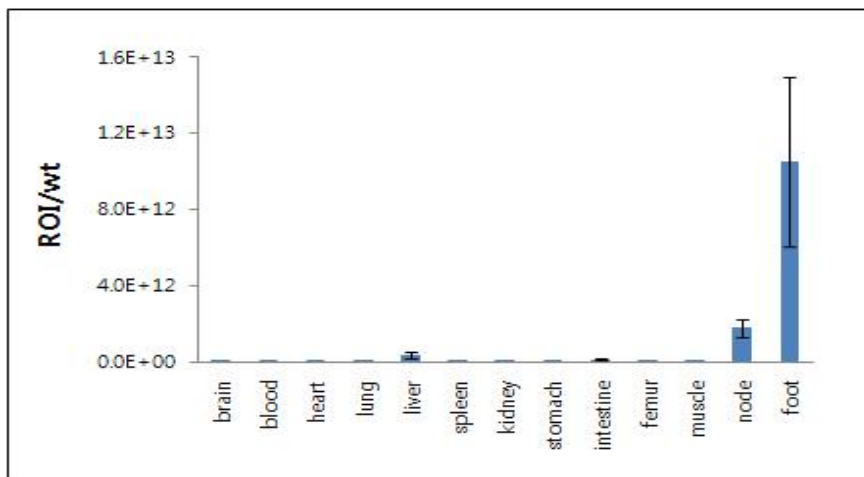
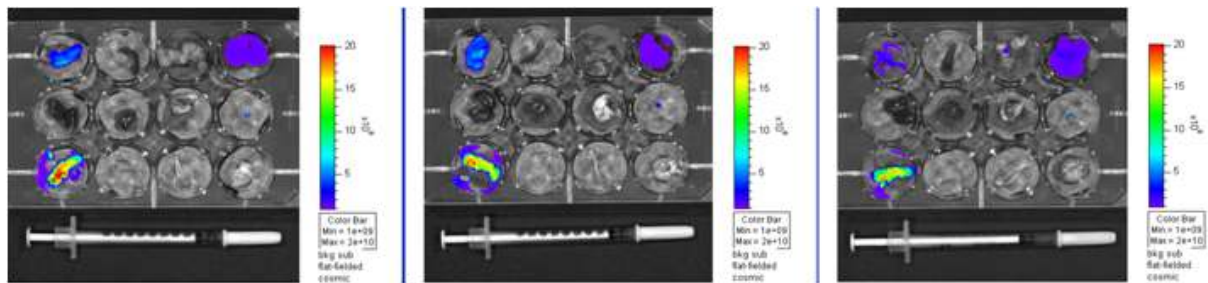
림프절 표지자인 ICG-HSA-EB에 방사성 표지자로써 [Tc-99m]Tc을 표지하고 이를 마우스 뒷발을 통해 주입한 후, 1 시간 뒤에 각 장기별로 ICG에 의한 IVIS 영상 및 [Tc-99m]Tc의 Uptake 정도를 비교하였다. [Tc-99m]Tc의 장기별 Uptake를 비교하면, 목적인 node에서 가장 높은 축적율을 보였다(그림 14-1). ICG의 시그널이 node가 아닌 주사부위인 뒷발에서 높게 나온 것은 node에 축적된 ICG간의 간섭에 의한 형광 시그널의 소멸 때문인 것으로 보인다(그림 14-2).

%ID/g	Brain	Blood	Heart	Lung	Liver	Spleen	Kidney	Stomach	Intestine	Femur	Muscle	Node	Foot
Mouse #1	0.01042	0.14911	0.0731	0.13009	5.36195	3.95606	0.97589	0.08476	0.1437	0.34474	0.02881	15900.5	424.679
Mouse #2	0.01822	0.12247	0.09627	0.26383	7.86045	4.57686	1.02668	0.15288	0.13339	0.37588	0.08101	9110.89	595.919
Mouse #3	0.01581	0.18589	0.10907	0.25807	9.03078	6.49118	1.19905	0.11436	0.12726	0.66921	0.10444	9474.9	377.471
Mean	0.01482	0.15249	0.09281	0.21733	7.41773	5.00803	1.06721	0.11733	0.13478	0.46328	0.07142	11495.4	466.023
SD	0.004	0.03185	0.01823	0.0756	1.87405	1.32142	0.11697	0.03416	0.00831	0.17902	0.03872	3819.22	114.942





(그림 14-1) [Tc-99m]Tc에 의한 장기별 Biodistribution



(그림 14-2) ICG에 의한 장기별 형광영상 및 ROI 결과

## 다중모드 감시립프절 표지자를 이용한 융합영상법 기초기술 개발

### 가) 감시립프절 근적외선 영상을 위한 생체영상기기 구축

다중모드 감시립프절 표지자의 임상 적용을 위해서는 영상화가 필요하다. 형광 표지자로 사용한 ICG는 근적외선 (Near-Infrared) 영역대인 790~800 nm에서 흡수 스펙트럼을 갖는 물질이므로, 우리는 영상화를 위해 근적외선 형광영상 시스템을 만들고 감시립프절 표지자를 적용한 소동물에서 감시립프절을 영상화 하고 생검에 적용하였다.

#### (1) NIR(근적외선) 형광영상 시스템 제작

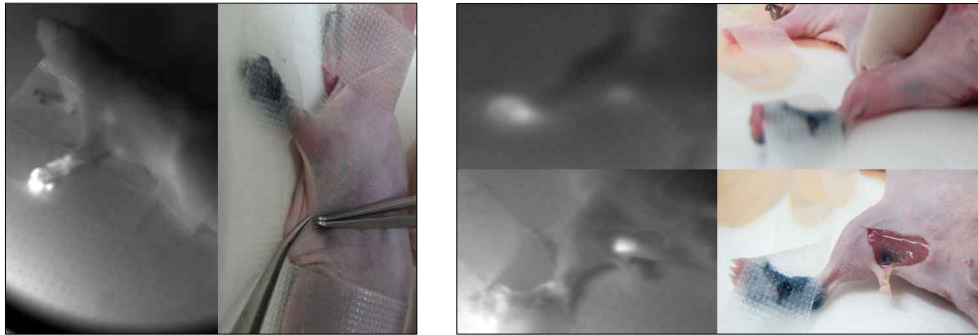
- Light Source: 740 nm LED Area Light
- Bandpass Filter: Emission 750 nm/ Excitation 820 nm
- CCD Camera: WAT-902H2 Ultimate (1/2" format)



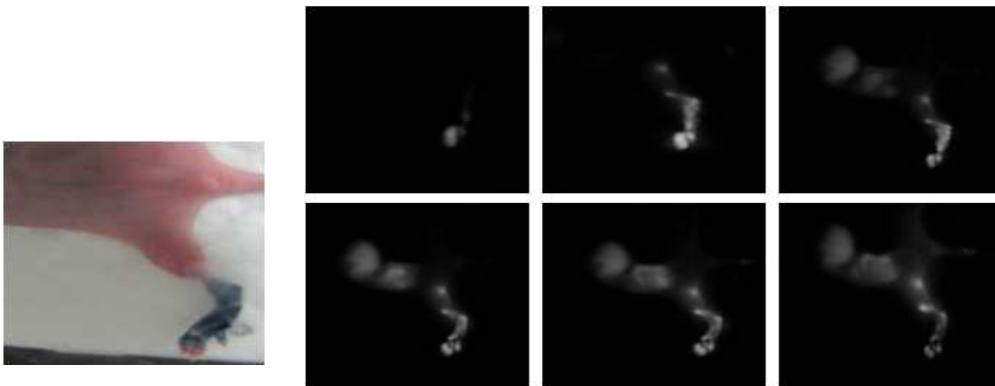
(그림 15-1) 형광영상 시스템 및 관련 부품

(2) 감시림프절 생검에의 적용

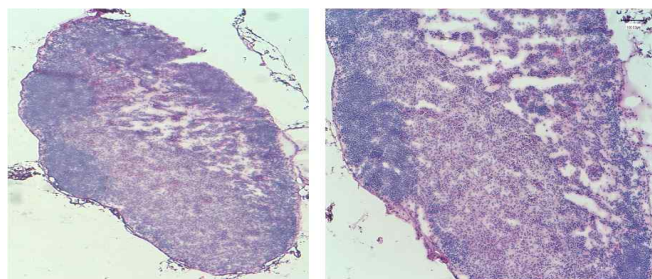
1) 마우스 모델



(그림 15-2) EB-HSA-ICG를 이용한 림프절 육안관찰

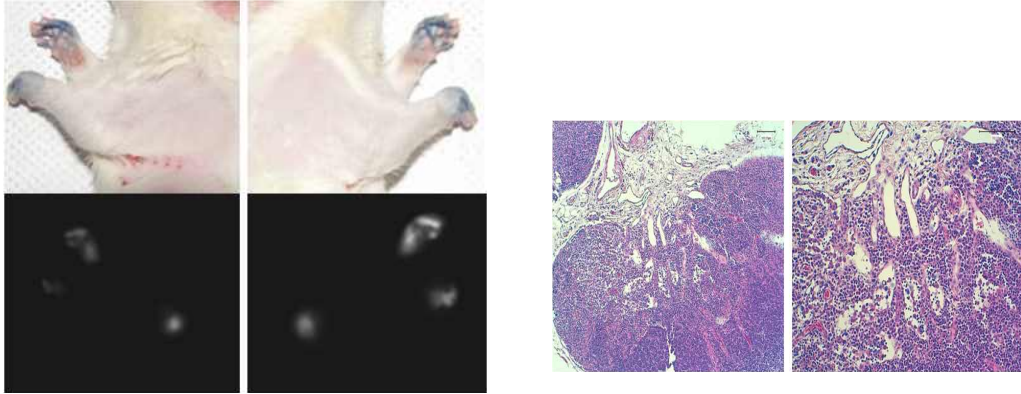


(그림 15-3) 형광영상 시스템으로 관찰한 림프절 표지자 영상



(그림 15-4) 생검한 마우스 림프절의 HE 염색 결과

## 2) 랫트 모델



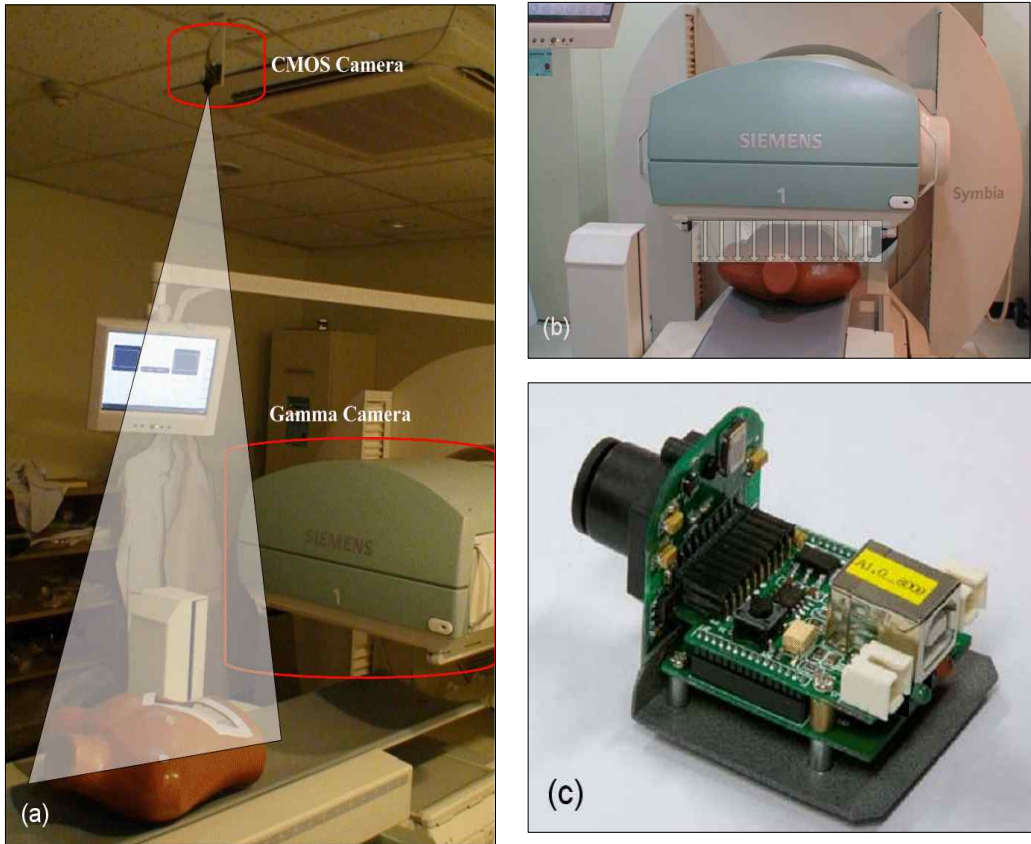
(그림 15-5) 형광영상 시스템으로 관찰한 림프절 형광영상 및 HE 결과

### 나) 다중모드 융합영상 기초기술의 개발 (감시림프절 생검보조 영상장비)

#### (1) 감시림프절 표지자를 이용한 림프신티그래피 영상법 기초기술 개발

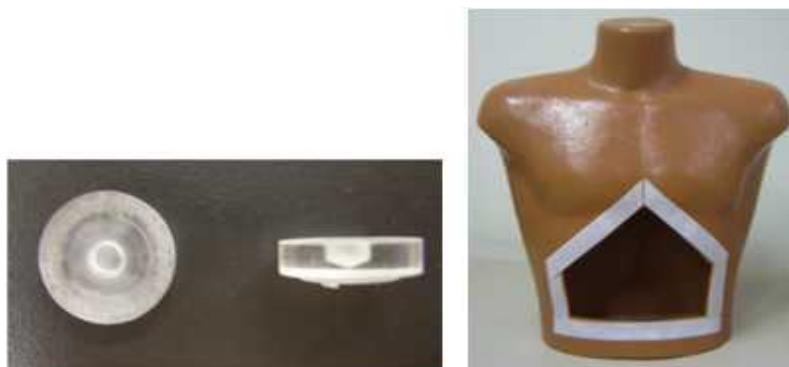
감마카메라로 촬영된 림프신티그래피 영상은 감시림프절의 방사성 교질 분포와 대략적 위치를 육안으로 확인하고 감마선 검출기의 소리 및 검출 수치로 감시림프절을 검출하는데 활용된다. 그러나 환자의 해부학적 정보를 얻을 수 없기 때문에 수술자가 생검에 필요한 감시림프절의 위치를 확인하는데 한계가 있다. 다중모드는 검출모드에 따라 여러 가지 영상이 한꺼번에 생성되며 이들의 강점을 활용하기 위해서는 융합영상을 만들 필요가 있다.

#### (2) 림프신티그래피 영상과 CMOS 카메라영상 획득



(그림 16-1) (a) 감마카메라와 CMOS 카메라의 설치환경과 CMOS 카메라가 실사영상을 획득하는 방법, (b) 감마카메라가 림포신티그라피를 촬영하는 방법, (c) CMOS 카메라

(3) 감마영상/형광영상과 실사영상의 합성 알고리즘 개발과 프로그램개발 및 등록



(a)표지자의 윗면/측면 사진

(b) 실험용 인체 모형

(그림 16-2) 흉부 모형을 이용한 융합영상의 평가방법 예시



### 3. 연구결과 고찰 및 결론

#### (1) 다중모드 감시림프절 표지자의 성공적 개발과 기능을 확인

기존에 사용되던 각 방법, 색소, 형광, 방사성콜로이드의 장단점과 이들 방법을 단순히 혼합하여 사용하는 방법의 단점을 보완할 방법으로 이들을 결합한 다중모드표지자를 제안함. 연구계획상으로 이중모드표지자 색소-방사성콜로이드를 제안하였으나 발전적으로 색소-형광-방사성콜로이드 형태의 삼중모드표지자를 성공적으로 개발함.

색소-형광-방사성콜로이드는 기존의 연구결과를 참조하여 인형혈청알부민, 에반스블루색소, 인도시아닌그린 색소를 기본 물질로 선택하였음.

조기 임상적용을 위하여 성분물질을 선택하였고 제형도 새로운 물질로 판정되는 공유결합이 아니라 특정조성의 혼합, 흡착을 이용하는 제법을 고안함.

제작된 새로운 표지자의 감시림프절 표지자로서의 기능은 동물실험을 통하여 확인함.

#### 이상적인 임상적용을 위한 감시림프절 표지자의 조건

- 첫째, 체내사용에 대한 독성이 없을 것,
- 둘째, 비침습 영상을 얻기에 유리하도록 침투력과 투과력이 좋을 것,
- 셋째, 감시림프절에 대한 높은 감도를 나타낼 것,
- 넷째, 감시림프절에서 저류시간이 길 것

#### (2) 독성평가를 통한 안정성 확인

마우스를 통한 단회독성 시험을 자체적으로 실시하였음.

초기에 기획한 대로 마우스에 대한 독성은 전혀 찾을 수 없었음.

### (3) 유용성 - 다른 표지자와 비교

개발된 다중모드의 감시림프절 표지자는 임상적용에 있어 유용성이 많음.

일반적으로 한가지 모드의 장단점이 뚜렷하기 때문에 적절히 각 모드의 장점만을 모으는 방법으로 다중모드 방법을 고안한다면 임상적으로 유리함.

다중모드 방법의 임상적 유용성은 표적유도수술과 최소침습수술에서 두드러 진다. 즉 진단시에 발견된 병변만을 수술적 방법으로 정밀하게 절제하는 데 유용하기 때문이다. 방사성방법은 현존하는 방법중 가장 민감하고 특이적인 방법이지만 수술자의 오감으로 관찰할 수 없는 제한점이 있으며 이는 색소로 어느 정도 보상됨. 하지만 조직절개를 하기 전에는 관찰할 수 없기 때문에 방사성물질과 색소 사이를 매워주는 방법이 필요하며 형광이 가장 적절한 방법이다.

수술자가 현존하는 방사성콜로이드나 색소를 이용하여 감시림프절 생검술을 시행하기 위해서는 일반적으로 적어도 20~30명 내외의 환자들에 대한 림프절 절제 경험이 필요하다. 학습기간이 필요한 주요한 이유는 수술자가 수술중에 수술부위를 직접 관찰할 수 없기 때문이다. 다중모드 감시림프절 표지자는 이 횡수를 줄이는데 도움을 줄 수 있음.

개발된 다중모드 감시림프절 표지자 [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA 는 비용이 낮고 임상에 사용가능한 안전한 물질들로 구성되어 있음. 테크네슘 ([Tc-99m]Tc)은 가장 널리 쓰이고 있는 방사성 의약품 중 하나이며, 인혈청알부민 (HSA)은 혈액내 혈장에 많이 존재하고 있는 단백질 성분으로써, 체내 적용에 안전하여 약물 전달 등의 치료 및 진단의 다양한 부분에 적용가능한 기반 물질로 널리 사용되고 있음. 근적외선 (NIR) 계열 형광 물질로 사용한 인도시아닌그린 (ICG)은 근래 각광받고 있는 Quantum dot과 같이 독성에 대한 잠재적 우려요인이 없으며 혈관조영이나 간기능 검사 등의 임상에 이미 적용되고 있는 물질임. 또한 최근에는 감시림프절 탐색을 위한 형광영상에 ICG의 적용사례들이 종종 보고되고 있음. ICG는 육안으로도 관찰 가능한 염료는 아니기 때문에 형광과 함께 육안관찰이 동시에 가능토록 하기 위해 파란색을 띄는 에반스블루 (EB)가 염료로써 사용되었음. EB는 질소를 함유한 화합물이며 체내 수분비율 측정 등에 사용되는 등 역시 인체 적용이 가능하고 감시림프절 탐색에 대한 임상적인 이용이 보고된 바 있음.

### (4) 전망 및 추가개발/ 발전가능성/ 후속연구의 필요성과 최적 후속연구에 대한 개관

형광을 이용한 검사법은 현재 활발하게 연구되고 있어 이 연구의 타당성을 간접적으로 지지하고 있음. 우리의 방법은 감시림프절이외에도 다양한 최소침습수술이나 표적유도수술에 적용가능함.

추가적으로 종양을 표적하는 능력등 좀더 특이적인 성질을 포함한다면 전혀 다른 용도로도 적용이 가능함. 예를 들어 최근 다양한 능동적인 감시림프절 표지자의 연구가 진행되고 있음. 감시림프절의 면역세포에 있는 만노즈 수용체에 특이적으로 결합하는 방사성 표지자 개발의 경우, DTPA 나 MAG3 등의 양쪽성 킬레이트제를 만노즈-텍스트란에 결합한 후 [Tc-99m]Tc을 표지한 화합물, 그리고 만노즈-폴리라이신에 DTPA를 붙임으로써 [Tc-99m]Tc을 결합한 화합물 등이 D. R. Vera, et. al.에 의해 발표되었음. 그러나 위에서 기술한 것처럼 텍스트란 또는 폴리라이신과 같은 운반체에 DTPA나 MAG3 와 같은 양쪽성 킬레이트를 먼저 붙여놓지 않으면 [Tc-99m]Tc을



표지할 수 없음. 따라서 운반체의 구조 변경에 따른 면역반응성의 유도 등의 문제를 야기 시킬 수 있음. 이후 이 같은 단점을 극복하기 위하여 새로운 만노즈 수용체 특이적인 방사성표지자가 개발되었는데, 이는 만노즈-인형알부민으로, 종래 방사성표지자와는 다르게 양쪽성 킬레이트가 없이도 방사성 동위원소의 표지가 용이하였음. 우리가 제안하는 감시림프절 표지자는 유방암이나 위암 등에서 과발현되는 엽산수용체 같은 다양한 종양 특이적으로 결합 가능한 능동적 감시림프절 추적자이며 이에 더하여, 다중모드의 감시림프절 추적자로 개발하였으므로 임상 적용 시 매우 높은 정확성을 보여 줄 것이라 예상됨.

우리의 연구에서 표지자의 장점을 잘 살리기 위해 영상을 융합하는 방법을 일부 개발하였음. 감시림프절 표지자의 성능을 극대화하기 위해 전용프로그램이나 영상하드웨어등의 개발도 필요하며 이러한 접근은 시너지효과를 발휘할 것으로 판단됨.

#### (6) 감시림프절 표지자 개발의 결론 및 활용

본 연구에서 개발된 감시림프절 표지자는 림프절에 오래 저류하는 특성 및 다중모드영상을 가능하게 하는 특성이 있으므로 위음성 판단 가능성을 감소시키고 감시림프절 생검의 정확도를 향상시킬 뿐만 아니라 장비에 대한 의존도를 감소시킴. 따라서 본 발명의 감시림프절 표지자는 유방암, 흑색종 등의 기존의 적응증은 물론이고 다른 다양한 종양에서의 감시림프절 생검이나 내시경, 복강경, 로봇 수술에서의 감시림프절 생검에 활용될 수 있음. 추가적인 임상시험을 포함하는 후속연구를 통하여 임상적용을 서둘러야 겠음.

### 4. 연구성과 및 목표달성도

#### (1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 <sup>1)</sup> )	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 <sup>2)</sup>	지원과제번호 <sup>3)</sup>
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with visible dye, near infrared fluorescent dye and radioisotope	Se Hun Kang, Seo-il Kim, Young Sang Kim, Nam Suk Baek, Seok-ki Kim	Biomaterials (6.6)	투고함	국외SCI	

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 <sup>1)</sup>	지원과제번호

다. 산업재산권

구분 <sup>1)</sup>	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알루미늄을 포함하는 감시림프절 표지자	국립암센터 (김석기, 강세훈, 김서일, 김영상, 백남석, 노진희)	대한민국	제10-2010-0078330 호
프로그램 등록	감마카메라영상과 실사영상의 합성 프로그램	저작자: 정창부, 김광기, 김태성, 김석기	대한민국	등록번호: 2010-01-18 6-006071

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
다중모드 감시림프절 분자영상 표지자의 개발	1차 년도	인형알부민을 플랫폼으로 하는 형광-방사성 표지자 개발	감시림프절용 다중모드 표지자의 개발 및 키트 제작	1	100
		다중모드 형광-방사성 감시림프절 표지자를 이용한 림포신티그래피 영상법 기초 기술개발	감시림프절 영상 및 영상 안내 기술 개발 및 생검 보조 영상장비 시험제작		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
인형알부민을 플랫폼으로 하는 형광-방사성 표지자 개발	100% 개발함.
다중모드 형광-방사성 감시림프절 표지자를 이용한 림포신티그래피 영상법 기초기술개발	100% 기술 개발함.

## 5. 연구결과의 활용계획

### (1) 연구종료 2년 후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 투고	1-3	Biomaterials, Journal of nuclear medicine 등.
산업재산권 등록	1	1. 방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광 색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자 (국내특허 등록 및 PCT출원) 2. 형광 프루브 특허 (국내특허 등록 및 PCT출원)
프로그램 등록	1	감마카메라영상과 실사영상의 합성 프로그램

### (2) 연구성과의 활용계획

#### 가. 기대효과

- 국내기술로 다중모드 감시림프절 표지자 개발.
- 임상적으로 사용할 수 있는 수준의 표지자 개발.
- 다양한 용도로 사용할 생체적합 플랫폼의 역할을 함.
- 새로 개발된 다중모드 감시림프절 표지자를 임상적 사용을 촉진함.
- 기존 감시림프절 영상에도 적용이 가능함.

#### 나. 활용방안

- 유방암, 위암 감시림프절 생검에 사용함.
- 다중모드 림프절표지자를 이용하는 생검에서 사용함.

## 6. 참고문헌

1. Wallacea AM, Hoh CK, Limmerra KK, Darrah DD, Schulteise G, Vera DR. Sentinel lymph node accumulation of lymphoseek and Tc-99m-sulfur colloid using a “2-day” protocol. *Nucl Med Biol* 2009;36:687-92.
2. Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol* 2003;7:626 - 34.
3. Lim YT, Kim S, Nakayama A, Stott NE, Bawendi MG, Frangioni JV. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol Imaging* 2003;2:50 - 64.
4. Zhang C, Wang S, Xiao J, Tan X, Zhu Y, Su Y, Cheng T, Shi C. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. *Biomaterials* 2009;31:1911-7.
5. Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee J, Kang JH, Lee DS, Chung JK, Lee MC. Development of <sup>99m</sup>Tc-neomannosyl human serum albumin (<sup>99m</sup>Tc-MSA) as a novel receptor binding agent for sentinel lymph node imaging. *Nucl Med Commun* 2004;25:1211-7.
6. Dykewicz MS, Orfan NA, Sun W. In vitro demonstration of IgE antibody to folate-albumin in anaphylaxis from folic acid. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:386-9.
7. Morton DL, Wen DK, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, Foshag LJ, Cochran AJ. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. *Arch Surg* 1992;127:392-9.
8. Giuliano AE, Dale PS, Turner MR, Morton DL, Evans SW, Krasne DL. Improved axillary staging of breast cancer with sentinel lymphadenectomy. *Ann Surg* 1995;222:394-401.
9. Giuliano AE, Barth AM, Spivack B, Beitsch PD, Evans SW. Incidence and predictors of axillary metastasis in T1 carcinoma of the breast. *J Am Coll Surg* 1996;183:185-9.
10. Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. *Environ Health Perspect*. 2006;114:165 - 72.
11. Shi C, Zhu Y, Cerwinka WH, Zhou HE, Marshall FF, Simons JW, Nie S, Chung LW. Quantum dots: emerging applications in urologic oncology. *Urol Oncol* 2008;26:86 - 92.
12. Raabe A, Beck J, Gerlach R, Zimmermann M, Seifert V. Near-infrared indocyanine green video angiography: a new method for intraoperative assessment of vascular flow.

Neurosurgery 2003;52:132 - 9.

13. Tajima Y, Yamazaki K, Masuda Y, Kato M, Yasuda D, Aoki T, Kato T, Murakami M, Miwa M, Kusano M. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging in gastric cancer. *Ann Surg* 2009;249:58 - 62.
14. Tsujino Y, Mizumoto K, Matsuzaka Y, Niihara H, Morita E. Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel nodes in extramammary Paget's disease and squamous cell carcinoma. *J Dermatol* 2009;36:90 - 4.
15. Bobin JY, Zinzindohoue C, Isaac S, Saadat M, Roy P. Tagging sentinel lymph nodes: a study of 100 patients with breast cancer. *Eur J Cancer* 1999; 35:569-73.
16. Lim YT, Noh YW, Han JH, Cai QY, Yoon KH, Chung BH. Biocompatible polymer-nanoparticle-based bimodal imaging contrast agents for the labeling and tracking of dendritic cell. *Small* 2008; 4:1640-5.

## 7. 첨부서류

### (1) 특허등록증 사본

#### 출원번호통지서

출원일자 : 2010.08.13

특기사항 : 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 : 10-2010-0078330 (접수번호 1-1-2010-0522566-56)

출원인명칭 : 국립암센터(1-2000-036786-6)

대리인성명 : 손민(9-1999-000420-6)

발명자성명 : 김석기 강세훈 김서일 김영상 백남석 노진희

발명의명칭 : 방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자

#### 특허청장

- 출원 이후 진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니, <출원번호통지서>는 출원 절차가 종료될 때까지 잘 보관하시기 바랍니다.
- 주소, 전화번호 등 변경사항이 있을 경우 <출원인코드정보변경(경정), 정정신고서>를 반드시 제출하여야 각종 통지서를 적시에 제대로 받으실 수 있습니다.
- 특허(실용신안등록)출원은 등록결정 전까지(심사관이 의견서 제출기간을 정한 경우는 그 기간 내) 출원서에 최초로 첨부된 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 범위 안에서 명세서 또는 도면을 보정하실 수 있습니다.
- 특허출원은 출원일로부터 5년(실용신안등록출원은 3년) 이내에 심사청구 하지 않으면 그 출원은 출원 취하된 것으로 간주합니다.
- 특허(실용신안등록, 디자인등록, 상표등록)출원에 대해 조기에 심사받기를 원하시면 “우선심사제도”를 이용하실 수 있습니다. 특허(실용신안등록)출원에 대해 늦게 심사받기를 원하시면 “심사유예신청 제도”를 이용하실 수 있습니다.
- 해당 산업재산권이 출원상태임을 표시하실 때에는 아래 예와 같이 하여야 하며, 이를 위반할 경우 관련 법규에 따라 처벌받을 수 있습니다. 예) 특허출원 10-2010-0000001, 실용신안등록출원 20-2010-0000001, 디자인등록출원 30-2010-0000001, 상표등록출원 40-2010-0000001, 서비스표등록출원 제41-2010-0000001호
- 기타 문의사항이 있으시면 특허고객상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

## 특 허 출 원 서

【출원구분】 특허출원

【출원인】

【명칭】 국립암센터

【출원인코드】 1-2000-036786-6

【대리인】

【성명】 손민

【대리인코드】 9-1999-000420-6

【포괄위임등록번호】 2005-068620-5

【발명의 국문명칭】 방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자

【발명의 영문명칭】 Sentinel lymph nodes marker comprising albumin labeled with a radioisotope, a near infrared fluorescent dye, and a visible dye

【심사청구】 청구

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 1010031-1

【부처명】 보건복지부

【연구관리전문기관】 국립암센터

【연구사업명】 기관고유연구사업

【연구과제명】 다중모드 감시림프절 분자영상 표지자 개발

【기여율】 1/2

【주관기관】 국립암센터

【연구기간】 2010.01.01 ~ 2010.12.31

【이 발명을 지원한 국가연구개발사업】

【과제고유번호】 2010-0002209

【부처명】 교육과학기술부

【연구관리전문기관】 한국연구재단

【연구사업명】 미래유망 융합기술 파이오니어사업

【연구과제명】 중앙 모델을 이용한 바이오스위치 기술의 전임상 적용 플랫폼 구축

【기여율】 1/2

【주관기관】 국립암센터

【연구기간】 2010.03.01 ~ 2011.02.28

