

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1110210)

다중모드 감시림프절 표지자의 유방암 임상적용
Clinical Application of Multimodal Sentinel Lymph Node
Seeker in Breast Cancer

과제책임자 : 김 석 기

국 립 암 셴 터

(뒷면)

(측면)

↑
5cm
↓
다
중
모
드
감
시
림
프
절
표
지
자
의
유
방
암
임
상
적
용
국
립
암
셴
터
↑
3cm
↓

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
6cm
↓

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “다중모드 감시림프절 표지자의 유방암 임상적용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 11. 07.

국립암센터

과제책임자 : 김석기, 정소연

연구원 : 김태성, 김광기, 강세훈, 김서일,
윤혜진, 이은성, 이은숙, 김석원,
이시연, 권영미, 신윤정

제1세부과제명(과제책임자) :
유방암용 다중모드 감시림프절 표지자의 임상적용을 위한 개발 및 생산 (김석기)

제2세부과제명(과제책임자) :
다중모드 감시림프절 표지자의 유방암에서의 임상적 적용 (정소연)

I. 총괄과제

총괄과제명 : 다중모드 감시림프절 표지자의 유방암 임상적용
총괄과제책임자(성명/소속) : 김석기 / 분자영상치료연구과

< 요약 문 >

목 차

< 요약 문 >

(한글) 다중모드 감시림프절 표지자의 유방암 임상적용

(영문) Clinical Application of Multimodal Sentinel Lymph Node

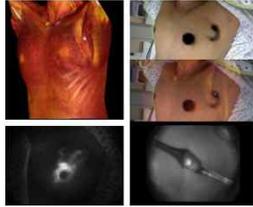
Seeker in Breast Cancer

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

연구분야(코드)		과제번호	1110210
과제명	다중모드 감시림프절 표지자의 유방암 임상적용		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 01월 01일 ~ 2012년 12월 31일	160,000
	1차년도	2011년 01월 01일 ~ 2011년 12월 31일	80,000
	2차년도	2012년 01월 01일 ~ 2012년 12월 31일	80,000
과제책임자	성명	김 석 기	
	소속	분자영상치료연구과	
책임단어	국문	감시림프절, 다중모드, 유방암	
	영문	Sentinel lymph node, Multimodal, Breast cancer	
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - 다중모드 유방암 감시림프절 표지자를 감시림프절 생검수술에 임상적으로 적용한다. <p><당해년도 목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험을 위한 다중모드 약제의 생산 - 차세대 표적 다중모드 림프절표지자의 감시림프절 검출능 평가 - 개발된 다중모드 표지자를 이용하여 유방암의 감시림프절 임상 시험을 수행 <p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p><제 1 세부과제></p> <p>다중모드 감시림프절 표지자 임상적용 최종점검 및 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험에 사용할 [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA 약제 생산 및 품질관리의 지속 - 차세대 표적 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 감시림프절 검출능 평가 - 핵의학과/수술장 시스템 장비유지 및 개선 - 다중모드 감시림프절 표지자의 근적외선 형광카메라 및 검출시스템 개발 및 성능검사 			
			

Project Summary

Title of Project	Clinical Application of Multimodal Sentinel Lymph Node Seeker in Breast Cancer
Key Words	Sentinel lymph node, Multimodal, Breast cancer
Project Leader	Kim Seok-ki (MD PhD, Molecular Imaging and Therapy Branch)
Associated Company	National Cancer Center
<p>◆ Aims</p> <ul style="list-style-type: none"> Clinical application of multimodal breast cancer sentinel lymph node seeker in biopsy surgery Production of multimodal sentinel lymph node seekers Assessment of next generation multimodal sentinel lymph node seekers Clinical study in breast cancer sentinel lymph node biopsy <p>◆ Methods</p> <ol style="list-style-type: none"> Examination of clinical application of multimodal sentinel lymph node seekers <ul style="list-style-type: none"> Maintenance of [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA kit production and quality control Assessment of next generation multimodal sentinel lymph node seekers Managing and improvement of clinical imaging device and system for sentinel biopsy Clinical study in breast cancer sentinel lymph node biopsy <ul style="list-style-type: none"> Result analysis of sentinel biopsy clinical study Comparison of biopsy time and small part resection ratio In phase-II randomized study, 86 patients with clinically node negative breast cancer were randomized to receive periareolar injection of the mixture including ICG fluorescence, RI and blue dye or the only RI for SLN biopsy <p>◆ Results</p> <ul style="list-style-type: none"> Production of multimodal sentinel lymph node seekers Clinical system arrangement using the developed multimodal sentinel lymph node seekers Preparation of clinical and experimental study basis using near infra-red fluorescence Clinical trials were done with 86 patients Sentinel lymph nodes were identified in all patients of both groups (100% in the multimodal group vs 100% in the RI group) <ul style="list-style-type: none"> The average number of SLN in the mixture group was more than that of the RI group (3.4 ±1.37 vs 2.3 ± 1.04 p<0.001). The time to excise the first SLN was similar in each group (6.5 ± 5.16 min vs 8.0 ± 4.35 min p=0.13). In multimodalgroup, percutaneous lymphatic drainage was visualized by fluorescent imaging in 90.7% (39 of 43 patients) and all of the first SLN were detected by both ICG fluorescent and RI. After operation, there was no complication including skin staining or necrosis. 	



<그림> 기존 방사성동위원소 검출 시스템과 새로운 근적외선 형광 검출시스템이 함께 적용된 예

<제 2세부과제>

- 임상시험을 위한 준비
- 감시립프절 표지자를 이용한 감시립프절 생검법 임상시험
- 다중모드 감시립프절 표지자를 투여할 장소인 핵의학과의 준비, 임상시험에 필요한 핵의학과 장비 및 인력의 준비
- 수술장에서의 임상시험 준비/ 환자선정
- 임상시험중에 감시립프절 표지자의 주사 및 감마영상촬영, 융합영상 촬영
- 다중모드 표지자를 이용한 유방암의 감시립프절 임상 시험 후 interim analysis를 시행
- 다중모드 표지자를 이용한 유방암 감시립프절 임상 시험 마무리
- 감시립프절 수술 시간 및 국소화율의 비교

◆ 연구성과

- 정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/2	0
IF 합	0/4	0
기타 성과:	학술대회발표	국외: 6, 국내 1

* 논문 submission: 2건

* 발명특허: 국내 출원 1건, PCT국제출원 1건

- 정성적 성과

- 근적외선 형광을 이용한 연구 및 진료기반 마련
- 감시립프절 표지자의 임상시험을 위한 토대 마련
- 임상시험을 위한 IRB 승인
- 다중모드 표지자의 생산, 주사, 촬영에 대비한 촬영실, 주사실 장비 등의 정비
- 임상적용을 위한 유도수술용 카메라 시스템 개발
- 임상시험 (유방암에서 인도시아닌그린, 청색색소 및 방사성교질 혼합액을 이용한 감시립프절 수술의 성적 평가)을 시작하여 현재 86명의 환자가 임상시험에 참여, 종료함.

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)

성명	김석기, 정소연, 김태성, 김광기, 강세훈, 김서일, 윤혜진, 이은성, 이은숙, 김석원, 이시연, 권영미, 신윤정
----	---

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표

- 다중모드 유방암 감시리프절 표지자를 감시리프절 생검수술에 임상적으로 적용한다.

2. 연구의 내용 및 결과

1) 감시리프절 트레이서 전용 생산시설과 환자주사시설 준비 및 유지.

- 기존 방사성의약품 생산 및 조제시설 내에 임상용 준 GMP 전용시설 설치.



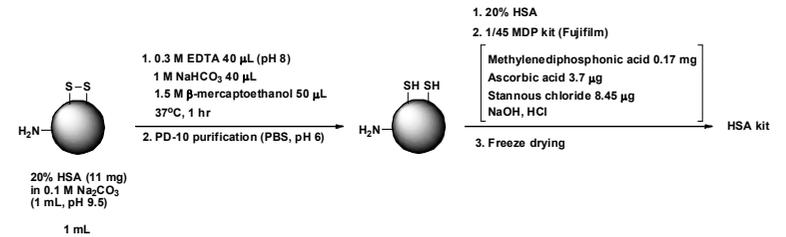
(그림1) 준 GMP 전용시설

2) 다중모드 트레이서 키트의 혼합 조제 표준 절차

가) 다중모드 표지자 혼합/조제법

모든 절차는 무균조작을 기본으로 하며, 조제에 사용된 약품의 사용기록을 남김. 또한 불순물이 포함되는 것을 최소화하기 위하여 방사성약제생산시설/준 GMP 시설에서 모든 조제과정을 시행함.

- 디설파이드 환원형 티올 Human serum albumin(HSA) 키트의 준비



<HSA Kit>

- Indocyanine Green(ICG) 및 Evans Blue(EB) 키트의 준비 (DSS)

ICG는 디아그노그린주 (25 mg, Daiichi sankyo-제일약품)을 준비하고, EB는 20 mL 용량의 유리 바이알에 120 mg 담는다.

- Human serum albumin(HSA) 용액 바이알의 준비 (HSS)

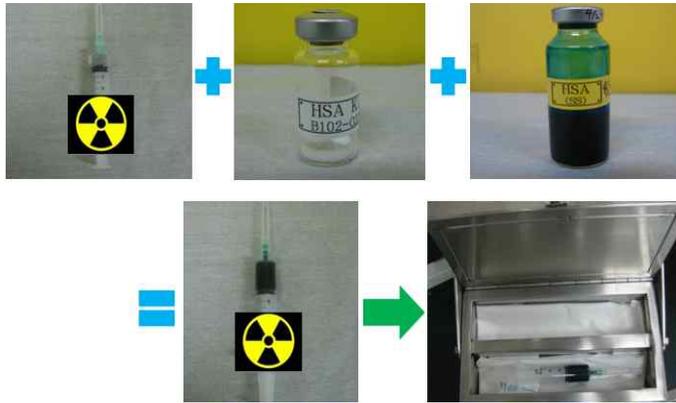
20% HSA 0.5 mL (0.1 g)을 20 mL 용량의 유리 바이알에 담는다.

- Human serum albumin(HSA)의 Tc-99m 방사성동위원소 표지 (radiolabeling of Tc-99m)

HSA 1 분자당 Tc-99m 4 원자의 비율로 표지하기 위하여 디설파이드 환원형 티올 HSA 키트에 Tc-99m 10 mCi/0.5 mL 을 넣고 실온에서 10 분간 흔들어 준다.

- [Tc-99m]Tc-ICG-EB-HSA의 조제

디아그노그린주에 주사용수 20.8 mL 주입 후 잘 녹인다. 이후, EB 120 mg 들어있는 바이알에 디아그노그린주 10 mL을 넣고 잘 흔들어 섞어 준다 (Dye Stock Solution, DSS). 다음으로, HSA 용액 바이알에 주사용수 9.5 mL을 넣고 잘 붙혀 준다 (HSA Stock Solution, HSS). 앞서 만들어진 DSS와 HSS를 각각 5 mL씩 섞어서 총 10 mL의 Stock Solution (SS)을 만들어 준다. 이렇게 완성된 SS 용액 1 mL을 [Tc-99m]Tc-HSA 10 mCi/0.5 mL 바이알에 넣어준 다음, 마지막으로 2% 리도케인 용액 0.5 mL을 추가로 가해준다.

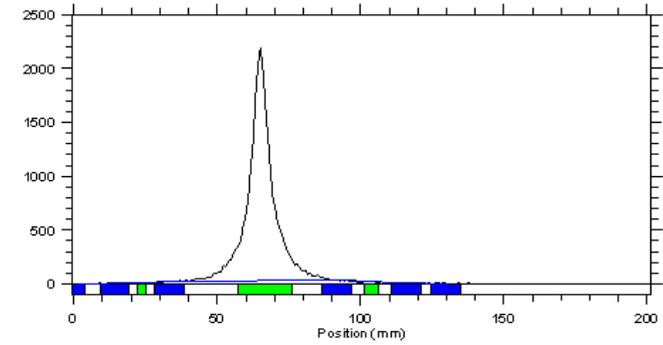


(그림2) 다중모드 키트의 혼합조제 및 준비의 예

3) 다중모드 트레이서 조제 및 주사전 위생 및 성능평가

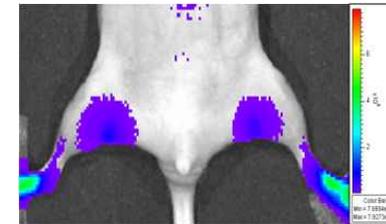
품 명	년도별 제조현황	총 제조횟수	총 제조수량	품질관리(Q.C)		
				Pyrogen	Bacteria	Size
HSA Kit	2011. 9 ~ 12	16	160	pass	pass	<10nm
	2012. 1 ~ 현재	25	250	pass	pass	<10nm

- 표준검사결과 엔도톡신(pyrogen)과 박테리아가 검출되지 않음을 확인함.
- 제조된 인형알부민의 키트의 particle size가 적정 수준을 유지하는지 제타사이저로 확인함.
- 방사화학 시험/방사해종 시험
Tc-99m의 표지효율은 모두 99% 이상이었음. 또한 Tc-99m이외의 방사능은 총방사능의 0.3% 이하여서 임상사용에 적합함.
- 표지 안전성
[Tc-99m]TcO₄⁻ 10 mCi/2 mL을 첨가한 후 실온에서 10 분간 반응시켜 [Tc-99m]Tc 표지된 HSA Kit을 합성하고, 합성 결과는 ITLC를 아세톤에 전개하여 확인하였을 때 99% 이상의 표지율을 확인할 수 있었다.



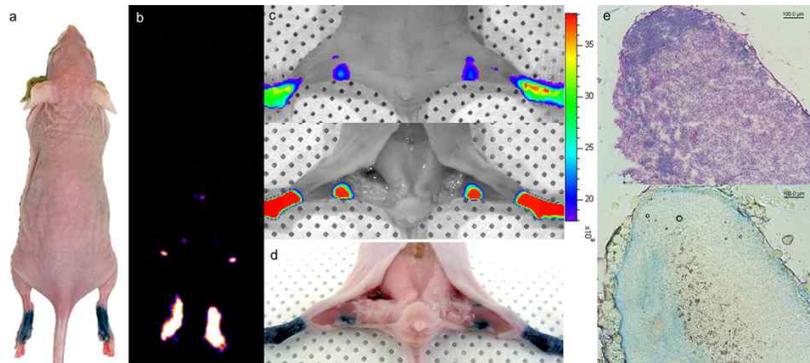
(그림3) 표준제형의 방사성표지 안정성 확인 예

- 최종적으로 사용전 동물 실험을 통한 점검



(그림4) 표준제형의 트레이서를 이용해 근적외선형광이 림프절에 보인 예.

- 무작위 추출된 표준제형의 트레이서를 이용하여 마우스에서 시험하여 색소/ 근적외선형광/ 방사성으로 림프절을 다중모드로 확인 가능함을 확인함.



(그림5) $[Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA$ 을 이용한 마우스의 다중모드 영상 및 조직검사 결과. (a) 마우스 사진 (b) SPECT 영상 (c) 근적외선 형광 영상 (d) 육안 영상 (e) 영상을 통해 쉽게 얻어진 SLN의 조직검사 결과

4) 다중모드 표지자의 주사

- 주사부위 inspection 한다.
- 따뜻한 거즈로 약 30 초 데운다. (화상에 주의)
- 알코올 소독 후 Peri-areolar single injection (약 400 uL) 한다.
(주사바늘을 뺄 때 음압을 걸어 주변으로 주사액이 튀지 않도록 조심하고, 주사 시 피부표면에 청색색소가 가늘게 퍼지는 것이 보일 정도로 얇게 주사)
- Injection 부위를 따뜻한 거즈를 덮고 2 min 정도 문지른다.
(Warming 거즈: 비닐에 싸인 젖은 스폰(냉장실 보관)을 전자레인지에 30 초 데움)
- Aseptic technique으로 시행한다.

5) 다중모드 표지자를 수술장에서 감지하는 시스템의 구축

가) 방사성

이미 확립되어 있는 감마프루브를 이용함. 감마프루브의 수술중 사용방법과 주의점은 이미 임상적으로 확립되어 있어 구축에 어려움이 없었음.

나) 근적외선 형광

상품화된 턴키방식의 수술장용 형광감지시스템은 현재 국내에 없음.

근적외선형광카메라와 적절한 광원모듈을 결합하여 방사성 감마프루브의 사용방법에 준하여 구축함.

- 형광용 광원 : 안전성을 고려하여 고출력의 레이저를 이용하지 않고 740 nm 파장의 LED모듈을 개발함. 최종적으로 100여개의 LED 다이오드를 이용한 모듈을 이용함.

- 형광 카메라 모듈: 적외선구간에 감도가 높은 형광카메라를 선택하였고 가격대 성능비에 중심을 두었음. 또한 해상도나 temporal resolution보다는 임상적으로 중요한 약한 빛에 대한 민감도에 중점을 두었음. 여러 카메라를 이용하여 시제품을 제작하였고 적절한 형광카메라를 구입하여 시스템을 구축함.

- 형광 카메라 지지대 구축: 수술장에서 사용하기 편하도록 무거운 형광 카메라를 안전하게 지지 가능한 형광 카메라 지지대를 새로 구축함.

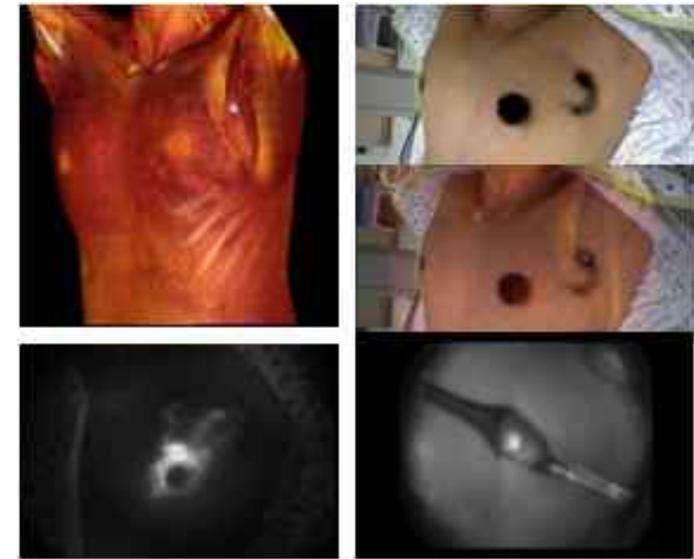




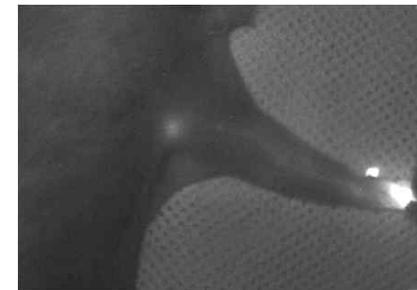
Visual Navigator (NIRF) 2011년

Excitation: 740 nm LED
Emission: 820 nm
Minimum illumination: 0.00002 lx
F1.4
Frame integration system
Shutter speed: 1/25 ~ 1/2000 sec

Visual Navigator (NIRF) 2012년



(그림7) 기존 방사성동위원소 검출시스템과 새로운 근적외선 형광 검출시스템이 함께 적용된 예



(그림8) 새로운 근적외선 형광 검출시스템으로 마우스의 림프절 추적에 적용한 예

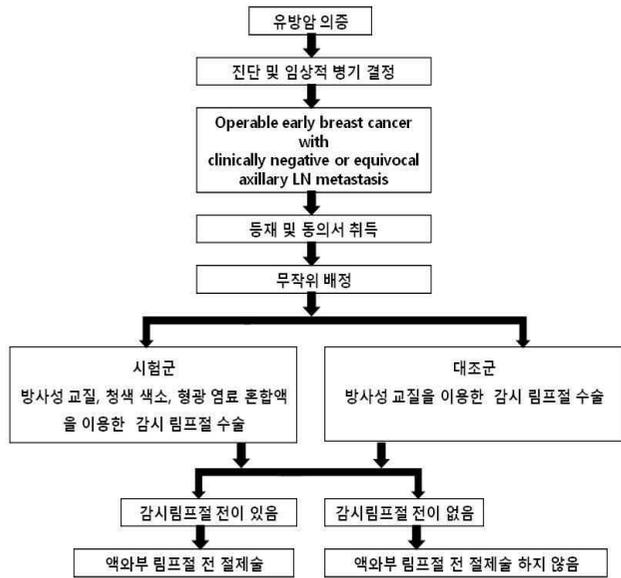
(그림6) 수술장에서 사용하기 편하도록 무거운 형광 카메라를 안전하게 지지 가능한 형광 카메라 지지대 및 새롭게 구축된 근적외선 형광 검출 카메라 시스템

- 현재 구축된 방사성동위원소 검출시스템과 근적외선 검출시스템의 성능

6) 임상시험 - 유방암환자에서 감시림프절 생검

가) 임상시험 준비

- 임상시험을 위한 IRB 승인 받음
- 임상시험에 필요한 핵의학과 및 수술장의 장비 및 인력의 준비



나) 임상시험 시행

- 임상시험 단계 : Phase II
- 중재모형 : Double-arm (다중모드 감시림프절 표지자 vs. 기존의 방사선 교질 표지자)
- 눈가림 : Single blinding
- 배정 : 무작위배정 (Randomized controlled trial)
- 연구의 관점 : prospective
- 참여기관 : single institute
- 대상 환자: 수술 가능한 조기 유방암 환자로 확진 된 경우로서 임상적으로 액와림프절 전이의 증거가 없거나 미약하여 감시림프절 생검이 필요하다고 판단되는 환자
- 대상 인원: 총 86명 시행 (시험군 43명, 대조군 43명)
- 평가항목 (Endpoint): 감시 림프절 수술의 수술 시간 비교, 감시 림프절의 발견율(국소화율)

다) 임상시험 결과

① 임상시험 참여 환자의 분포 및 수술명

- 시험군 (다중모드 감시 림프절 수술) : 43명
BCS with SLNB(sentinel lymph node biopsy) : 32명
Simple mastectomy with SLNB followed by axillary lymph node dissection (12명)

- 대조군 (방사선 동위원소를 이용한 감시림프절 수술) : 43명
Breast conserving surgery with sentinel lymph node biopsy (33명)
Simple mastectomy with sentinel lymph node biopsy (10명)

② 감시림프절 수술 결과에 대한 분석

- 시험군과 대조군에서 감시림프절의 국소화율은 100%로 동일하였고, 시험군에서 확인된 평균 감시 림프절 개수가 상대적으로 많이 나타났다. (시험군, 3.4 ± 1.37개 vs 대조군 2.3 ± 1.04개, $p < 0.001$) 첫 번째 감시림프절을 생검하는데 걸린 평균시간은 각각 6.5 ± 5.16분, 8.0 ± 4.35분 ($p = 0.13$)으로 유의한 차이의 없었다. (표 1)

표1. 시험군, 대조군에서 감시림프절의 국소화율 비교

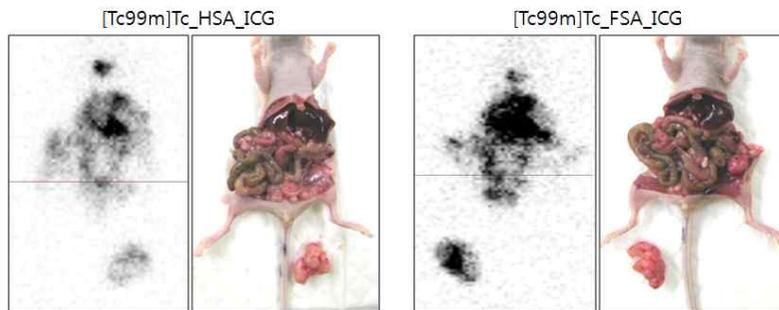
	시험군 (환자수=43)	대조군 (환자수=43)	P
국소화율 (%)	100	100	1.00
환자 1인당 확인된 감시림프절수 (평균 ± 표준편차)	3.4 ± 1.37	2.3 ± 1.04	<0.001
첫 번째 감시림프절 생검까지 도달 시간 (분, 평균 ± 표준편차)	6.5 ± 5.16	8.0 ± 4.35	0.13
감시림프절 생검에 걸린 총 시간 (분, 평균 ± 표준편차)	17.6 ± 7.10	15.0 ± 7.58	0.09
감시림프절 1개 생검에 걸린 평균 시간 (분, 평균 ± 표준편차)	6.0 ± 3.61	7.3 ± 3.95	0.12

- 시험군에서 살펴본 각 방법에 따른 감시림프절 국소화율을 비교했을 때 방사선 교질과 인도시아니 그린 형광법을 청색색소를 이용한 방법에 비해 국소화율이 높게 나타났다. (표 2)

표2. 시험군, 대조군에서 감시림프절의 국소화율 비교

(NanoSPECT, Bioscan)로 확인하였다. 종양 특이적 섭취 확인을 위한 엽산결합 인혈청 알부민 표지자 복강 주사후의 마우스 animal SPECT planar 영상 및 감시킴프절 영상을 확인하였다.

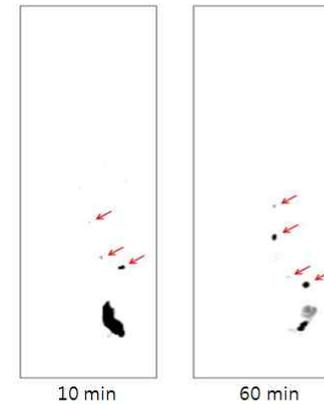
먼저 엽산 수용체 발현율이 높은 자궁암 세포주인 2774 cell line을 마우스 복강내에 3×10^6 cells 양으로 주입하여 종양모델을 형성하였고, [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민 2 mCi/0.5 mL를 복강에 주사한 후 1일 후에 SPECT planar 영상을 촬영하였다. 그 결과, 대조군으로 촬영한 인혈청 알부민에 비하여 엽산결합 알부민을 적용한 마우스의 감마영상에서 복부 내에 형성된 종양에 더 강한 표지가 이루어진 것을 확인할 수 있었다.



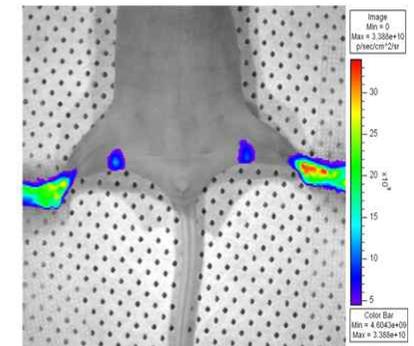
(그림9) 종양 특이적 섭취 확인을 위한 엽산결합 인혈청 알부민 표지자 복강 주사후의 마우스 animal SPECT planar 영상

기존의 인혈청 알부민 처럼, 엽산결합 인혈청 알부민 표지자 또한 체내에 사용하기에 매우 안전한 감시킴프절 표지자이기에 체내 영상을 얻는데 아무런 독성 문제가 없고, 특히 그 크기가 적절하여 10 분 내의 시간 안에 약물의 킴프절 섭취를 확인할 수 있었다. 또한 감시킴프절에 머무는 시간이 60 분까지도 유지되므로 저류시간이 길어 감시킴프절을 발견하는 비율이 높고, 감시킴프절에 대한 신호강도가 증가하여 감시킴프절 생검의 정확도가 우수한 감시킴프절 표지자로서 유리한 특성을 가진다. 따라서, 이러한 엽산을 결합한 표지자를 사용하면 더 능동적이고 종양특이적인 표지가 가능하다.

a) SPECT 영상



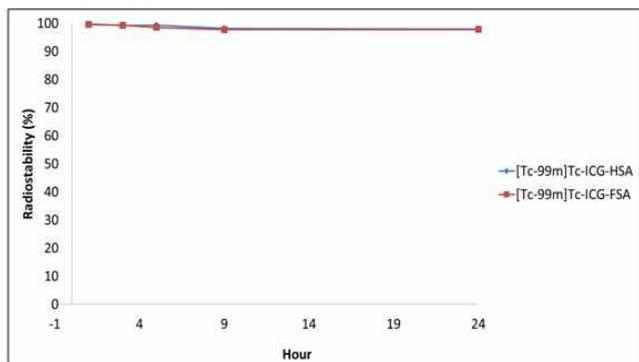
b) 근적외선 형광 영상



(그림10) 엽산결합 인혈청 알부민 표지자를 사용한 SPECT 및 근적외선 형광영상

라) 엽산표지 다중모드 감시킴프절 표지자의 체내 안전성

- [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민과 시판된 키트로 제작한 [Tc-99m]인혈청 알부민이 사람혈액 내에서 얼마나 방사성 동위원소 표지가 안정적으로 유지되는지 안정성을 비교하였다. 그 결과, 99.7 %로 시작된 [Tc-99m]인혈청 알부민의 방사성 순도는 24 시간까지 97.9 %로 유지되었고, 99.5 %로 시작된 [Tc-99m]엽산결합 인혈청 알부민은 동일한 조건에서 97.8 %로 유지됨을 확인함으로써 두 표지자 모두 인혈 내에서 안정함을 확인할 수 있었다.

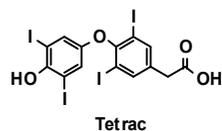


Time (h)	1	3	5	9	24
[Tc-99m]Tc-ICG-HSA (%)	99.7	99.2	99.3	98.1	97.9
[Tc-99m]Tc-ICG-FSA (%)	99.5	99.3	98.5	97.7	97.8

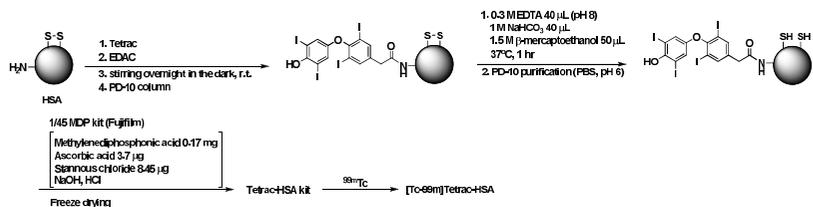
8) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자 (Tetrac Serum Albumin) 개발

가) 테트라 결합 감시림프절 표지자

- 갑상선 호르몬의 탈아미노화 형태인 테트라 (Tetrac, tetraiodothyroacetic acid)은 인테그린 αvβ3 수용체에 결합하여 종양증식 및 신생혈관생성 억제 기능을 갖는다. 이러한 테트라의 메카니즘을 이용하면 알부민의 종양 특이적, 능동적 표지 능력을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 기대 된다.



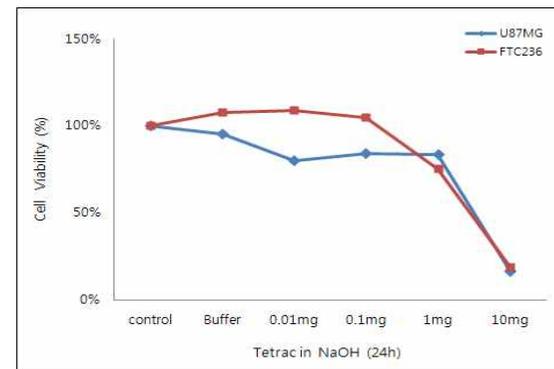
나) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자의 개발



다) SPECT 영상용 테트라 표지 감시림프절 표지자의 특이적 결합

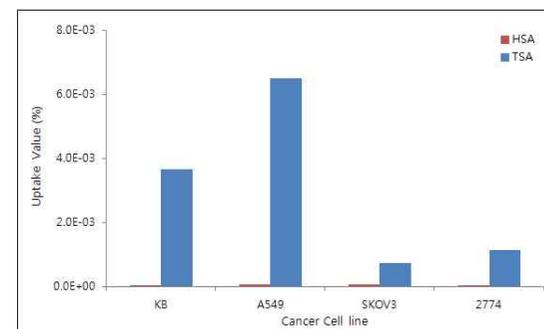
① 세포주에 대한 독성 실험

- 먼저 테트라결합 인혈청 알부민의 세포주에 대한 독성을 확인하였다. 준비된 세포주에 농도별로 처리하고 표지자로 사용 가능한 안정 범위 (1 mg 이내)를 분별할 수 있었다.



② 세포주에 대한 결합 실험

- [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 각 세포주에 처리하여 결합정도를 섬취율로 비교하였다. 세포주별로 섬취율에 차이를 보였으나 기존의 인혈청 알부민과 비교하였을 때 테트라결합 인혈청 알부민의 섬취율이 더 높게 나타난 것으로 보아 상대적으로 훨씬 더 높은 표지효율을 보임을 확인할 수 있었다.

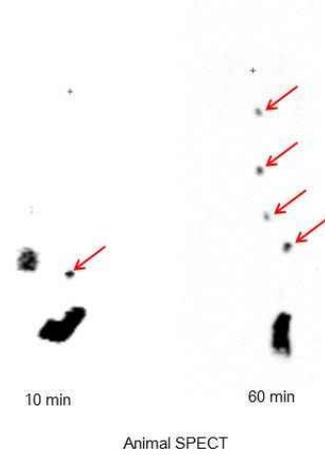


③ 동물 모델에서 테트라 표지 다중모드 감시림프절 표지자의 확인

- [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 이용하여 소동물의 감마영상을 Animal

SPECT (NanoSPECT, Bioscan)로 확인하였다.

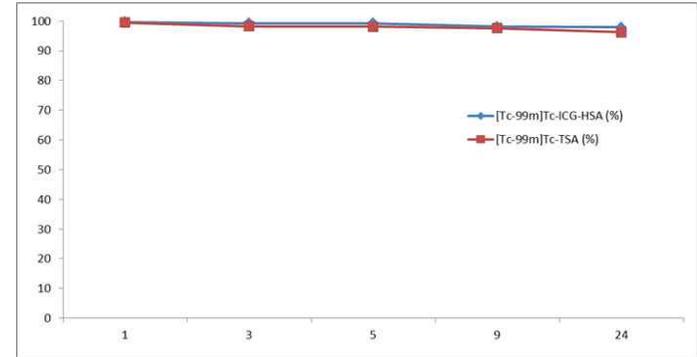
우선, 마우스의 오른쪽 뒷발바닥에 [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 100 uCi/50 uL 주사한 후 10분 및 60분에 SPECT 영상을 촬영하였다. 그 결과 10분만에 림프절 섭취를 확인할 수 있었고, 60분 후에도 다른 장기의 섭취를 보이지 않으면서 주사부위 및 림프절만이 더욱 강하게 섭취되어 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 테트라결합 인혈청 알부민을 이용한 경우도 체내에 사용하기에 안전한 감시림프절 표지자이기에 체내 영상을 얻는데 아무런 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 특히 그 크기가 적절하여, 10 분의 적절히 빠른 시간 안에 약물의 림프절 섭취를 확인할 수 있었으며, 감시림프절에 머무는 시간이 60 분에도 유지되어, 감시림프절에 머무르는 시간이 길어 감시림프절을 발견하는 비율이 높고, 감시림프절에 대한 신호강도가 증가하여 감시림프절 생검의 정확도가 우수한 감시림프절 표지자로서 유리한 특성을 가짐을 확인할 수 있었다.



(그림11) [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 이용한 마우스의 animal SPECT 림프절 영상

라) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자의 체내 안전성

- [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민과 시판된 키트로 제작한 [Tc-99m]인혈청 알부민이 사람혈액 내에서 얼마나 방사성 동위원소 표지가 안정적으로 유지되는지 안정성을 비교하였다. 그 결과, 99.7 %로 시작된 [Tc-99m]인혈청 알부민의 방사성 순도는 24 시간까지 97.9 %로 유지되었고, 99.5 %로 시작된 [Tc-99m]테트라결합 인혈청 알부민은 동일한 조건에서 96.2 %로 유지됨을 확인함으로써 두 표지자 모두 인혈 내에서 95% 이상 안정함을 확인할 수 있었다.



Time (h)	1	3	5	9	24
[Tc-99m]Tc-ICG-HSA (%)	99.7	99.2	99.3	98.1	97.9
[Tc-99m]Tc-TSA (%)	99.5	98.2	98.1	97.6	96.2

3. 연구결과 고찰 및 결론

(1) 다중모드 감시림프절 표지자의 제조시설 및 관리시스템 구축

- 다중모드 감시림프절 표지자의 지속적인 생산을 위해, 인혈청알부민 키트를 제조할 수 있는 준 GMP 수준의 제조시설을 갖추어 가동 중이며 현재까지 지속적으로 생산, 관리하고 있다. 무균 상태로 제조하며 제조 후에도 무균 상태를 점검하여 임상시험에 적합한 상태를 유지하고 있다.

임상적용에 있어서, 실제 환자의 수술시에는 병원내 핵의학과에서 염료 및 동위원소를 표지하여 환자에 주사할 다중모드 표지자를 완성, 제조하여 사용한다.

또한, 수술장 환경에 최적화 하여 사용할 수 있도록 수술 시 사용하는 형광영상 장비에 대한 개선 및 유지관리도 지속적으로 이루어지고 있다.

(2) 차세대 감시림프절 표지자의 개발

- 인혈청알부민의 이점을 토대로 하여 표지의 능동성과 특이성을 향상시킨 차세대 감시림프절 표지자를 지속적으로 개발하였다.

엽산결합 티올인혈청알부민은 엽산 수용체에 강력하게 결합하고 림프절에 축적이 됨을 확인하였다. 따라서 이를 방사성 동위원소 및 형광염료를 표지하여 사용하면 엽산발현이 많은 질환의 림프계를 다중모드로 영상화 할 수 있는 중앙 특이적 림프절 표지자로 사용할 수 있었다. 특히, 인혈청 알부민의 크기가 6~8 nm로서 일반적으로 사용되는 콜로이드형 방사성의약품보다 크기가 작아 림프절 섭취가 빠르고, 환원제에 의한 인혈청알부민에 부착된 티올기로 인해 DTPA나 MAG3 와 같은 양쪽성 킬레이트를 사용하지 않아 그로 인해 발생하는 등전점의 변화 또는 면역반응성의 유도 등의 문제점을 해결할 수 있었다.

테트라결합 티올인혈청알부민은 angiogenesis 진단제로서의 가능성이 검토되는 단계의 물질인 테트라를 이용한 표지자이다. 테트라는 인테그린 중 $\alpha\beta3$ 수용체에의 표적성이 높은 물질로 알려져 있다. 그러나 이러한 표적성에도 불구하고 테트라를 이용한 분자영상체제는 아직 국내외적으로 발표되어지지 않았다. 현재 angiogenesis 영상화에 주로 고가의 RGD peptide가 사용되는데, 테트라 표지자의 개발에 따른 저가의 angiogenesis 영상 표지자로서의 대체가 가능할 것이라 예상된다.

(3) 감시림프절 표지자에 대한 임상시험의 성공적인 적용

- 임상적으로 림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 수술의 기본 술식인 감시 림프절 생검의 방법에 있어 기존의 방법과 인도시아닌그린, 청색색소 및 방사성괴질 혼합액을 이용한 다중모드 감시림프절을 이용한 방법의 효과와 안정성을 비교하였다. 그 결과, 총 86명의 환자에게 진행된 임상시험에서 평균 감시림프절의 수가 의미 있게 증가하는 결과를 보였다.

(4) 전망 및 발전가능성/ 후속연구에 대한 개관

- 최근 다양한 능동적인 감시림프절 표지자의 연구가 진행되고 있다.

감시림프절의 면역세포에 있는 만노즈 수용체에 특이적으로 결합하는 방사성 표지자 개발의 경우, DTPA 나 MAG3 등의 양쪽성 킬레이트제를 만노즈-텍스트란에 결합한 후 $[Tc-99m]Tc$ 을 표지한 화합물, 그리고 만노즈-폴리라이신에 DTPA를 붙임으로써 $[Tc-99m]Tc$ 을 결합한 화합물 등이 D. R. Vera, et. al.에 의해 발표되었다. 그러나 위에서 기술한 것처럼 텍스트란 또는 폴리라이신과 같은 운반체에 DTPA나 MAG3 와 같은 양쪽성 킬레이트를 먼저 붙여놓지 않으면 $[Tc-99m]Tc$ 을 표지할 수 없다. 따라서 운반체의 구조변경에 따른 면역반응성의 유도 등의 문제를 야기시킬 수 있다. 이후 이 같은 단점을 극복하기 위하여 새로운 만노즈 수용체 특이적인 방사성표지자가 개발되었는데, 이는 만노즈-인혈청알부민으로, 종래 방사성표지자와는 다르게 양쪽성 킬레이트가 없이도 방사성 동위원소의 표지가 용이하였다.

우리가 제안하는 감시림프절 표지자는 유방암이나 위암 등에서 과발현되는 엽산수용체 같은 다양한 중앙 특이적으로 결합 가능한 능동적 감시림프절 추적자이며, 이에 더하여 다중모드의 감시림프절 추적자로 개발하였으므로 임상 적용 시 매우 높은 정확성을 보여 줄 것이라 예상된다.

우리의 연구에서 표지자의 장점을 잘 살리기 위해 영상을 융합하는 방법을 일부 개발하였다. 감시림프절 표지자의 성능을 극대화하기 위해 전용프로그램이나 영상하드웨어 등의 개발도 필요하며 이러한 접근은 시너지효과를 발휘할 것으로 판단된다.

(5) 감시림프절 표지자 개발의 결론 및 활용

- 본 연구에서는 개발된 다중모드 감시림프절 표지자의 림프절에 오래 저류하는 특성 및 다중모드영상을 가능하게 하는 특성을 이용한 임상시험을 진행하였다. 이를 위해 다중모드 표지자의 무균화 조제시설을 마련하고 생산 및 관리를 성공적으로 진행하였으며, 임상시험에 사용할 표지자 추적 영상장비 시스템을 구축할 수 있었다.

임상 시험에 있어서 유방암 환자 87명에 대한 수술장내 임상시험을 수행한 결과, 시간적인 이점은 보이지 않으나 harvest된 림프절의 수는 의미 있게 증가하였으며, 그 결과 감시림프절 생검이 더 용이하였다. 따라서 본 연구 결과에서 기존 술식과 비교하여 다중 모드를 이용한 감시 림프절 술식이 수술 시간 및 림프절 확인에 있어 통계학적으로 not inferior 함을 보여준 연구로 향후 다기관 연구를 통한 임상적 유용성을 뒷받침할 수 있을 것으로 판단된다. 그리고 감시림프절 술식이 익숙하지 않은 수련의(Trainee Surgeon)이나 경험이 적은 유방암 수술의가 감시림프절 생검을 좀 더 용이하게 할 수 있는 방법으로 적용 가능할 것으로 기대된다.

또한 감시림프절 표지 외에도 종양에 대한 표적 표지 및 영상화에 유용하게 사용될 가능성이 있는 차세대 감시림프절 표지자를 개발하여 표지능을 확인하였다.

따라서 감시림프절 표지자는 유방암, 흑색종 등의 기존의 적응증은 물론이고 다른 다양한

종양에서의 감시림프절 생검이나 내시경, 복강경, 로봇 수술에서의 감시림프절 생검에 활용될 수 있을 것이다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial	So-Youn Jung	Breast Cancer Research and Treatment (4.43)	submission	국외 SCI	1110210
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with visible dye, near infrared fluorescent dye and radioisotope	Se Hun Kang	Biomaterials (7.404)	submission	국외 SCI	1110211

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원 과제번호
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with a visible dye, a near infrared fluorescent dye and a radioisotope	강세훈, 김서일, 김영상, 백남석, 김석기	ISRS 2011	국외	1110211
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with visible dye, near infrared fluorescent dye and radioisotope	강세훈, 김서일, 김성만, 백남석, 김석기	SNM 2011	국외	1110211
Cancer Specific Sentinel Lymph Node Mapping Using [Tc99m]Tc-ICG-Folate Human Serum Albumin	강세훈, 백남석, 김서일, 김성만, 김석기	ASIASENSE 2011	국내	1110211
Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal seedings using intraperitoneal staining with folate-human serum albumin-indocyanine green conjugates in a mouse tumor model	김철환, 김서일, 김성만, 강세훈, 하승균, 이은성, 김태성, 김석기	SNM 2012	국외	1110211
[Tc99m]Tc-ICG-Folate Human Serum Albumin Kit for Cancer Specific Sentinel Lymph Node Mapping	강세훈, 백남석, 김서일, 김석기	WMIC 2012	국외	1110211
Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial	정소연	2012 San Antonio Breast Cancer Symposium	국외	1110212
Prediction of the non sentinel metastasis in patients who received neoadjuvant chemotherapy for clinically axillary node metastasis	이시연	2011 American Society of Clinical Oncology annual meeting	국외	1110212

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	다중모드 영상화가 가능한 감시림프절 표지자	김석기 외 5인	PCT 국제출원	PCT/KR2011/ 005994
발명특허	방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자	김석기 외 5인	대한민국	제10-2010- 0078330호

라. 기타 연구성과

1) 특허 (다른 과제 성과로 등록되었으나, 현 과제와 밀접한 관련이 있는 성과)

① 국내출원. 종양 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 염산 결합 인혈청 알부민.

(10-2011-0056922)

② PCT 국제출원. 종양 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 염산 결합 인혈청 알부민

(LABELLED FOLIC ACID CONJUGATE COMPOUND SPECIFIC TO CANCER AND SENTINEL LYMPH NODE) (PCT/KR2011/004306)

2) 2011년 화순광학분자영상심포지엄 발표, Initial step of multimodal image-guided sentinel lymph node biopsy in NCC, Korea

3) 2012년 한국 유방암 학회 외과 술기 위원회 발표, Multi-mode sentinel lymph node biopsy

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)		
			연차	최종	
다중모드 유방암 감시림프절 표지자의 생검수술 임상적용	1차년도	- 다중모드 표지자의 임상적용을 위한 최종점검 및 개선	- 최종점검과 개선을 마치고 임상시험을 시행중임	1	100
		- 임상시험용 다중모드 표지자 약제 생산을 위한 준비	- 임상시험 수행을 위한 IRB 승인		
		- 다중모드표지자용 수술장용 카메라 시스템 구축	- 시스템 구축하였음		
		- 차세대 표적 다중모드 림프절 표지자 개발	- 엽산수용체 표적 다중모드림프절 표지자를 개발하였음		
		- 임상 시험 수행을 위한 IRB 승인	- 2011년 8월 승인 받음		
		- 감시림프절 생검과정에 필요한 장비 점검 및 준비 (수술장에서의 준비)	- 감시 림프절 생검에 필요한 장비 (Visual navigator) 를 수술방에 설치함		
	2차년도	- 다중모드 표지자를 이용하는 감시림프절 생검수술과 관련된 임상시험의 일부 수행	- 2011년 10월 24일 임상 시험을 시작하여 2011년 11월 11일 현재 12명의 환자가 임상 시험에 참여함		
		- 임상시험을 위한 다중모드 약제의 생산	- 임상시험에 사용될 다중모드 표지자 [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA 약제의 지속적 생산 중		
		- 차세대 표적 다중모드 림프절표지자의 감시림프절 검출능 평가	- 다중모드 표지자의 임상적용을 위한 QC관리 시스템을 마련함		
		- 개발된 다중모드 표지자를 이용하여 유방암의 감시림프절 임상 시험을 수행	- 엽산결합 다중모드 표지자의 개발 및 in vitro/in vivo 평가 완료		
			- 테트라결합 다중모드 표지자의 개발 및 in vitro/in vivo 평가 완료		
			- Interim analysis 시행한 결과 기존 방법과 혼합액에 의한 감시림프절의 국소화율 모두 100%임		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

(제 1 세부)

평가의 착안점	자 체 평 가
- 식약청 연구자주도 임상시험 및 기관 IRB 관련조치 시행하였나?	- IRB 통과후 임상시험 진행중
- 표지자의 생산이 이루어 졌는가?	- 임상시험에 사용되는 표지자의 조제(생산)됨.
- 생산관리 표준절차서를 마련하였나?	- 표준절차서 마련하였음
- 표지자의 주사, 촬영 등이 원활하게 이루어지도록 준비되었는가?	- 핵의학과의 인력/물적 시스템 확립
- 수술용 가시광선-형광 카메라시스템이 구축되었는가?	- 수술장의 협조와 진행 시스템 확립
- 새로운 표적 가시광선-형광-방사성 다중모드 표지자를 개발하였는가?	- 수술용 카메라시스템 설치하여 구축함
- 표지자의 생산이 원활히 이루어졌는가?	- 엽산표적 다중모드표지자 개발함
- 장비가 임상시험 진행에 지장이 없도록 유지되었는가?	- 표지자 생산용 준 GMP 설비가 준비되어 생산이 지속적으로 이루어지고 있음
- 시스템의 보수 혹은 개선이 있었나?	- 임상 시 사용될 형광장비가 마련되어 실제 임상 시험에 유용하게 사용되었음
- 목표환자수를 달성하였는가?	- 수술장에서 더 효율적으로 사용할 수 있도록 개선하였음
- 결과를 분석하였는가?	- 목표 환자수를 달성하였음

(제 2 세부)

평가의 착안점	자 체 평 가
- 임상 시험 수행을 위한 IRB 승인	- 2011년 8월 승인 받음. 심사 과정을 통하여 임상 시험 design이 더 좋은 방향으로 수정되었음
- 감시림프절 생검과정에 필요한 장비 점검 및 준비 (수술장에서의 준비)	- 감시림프절 생검에 필요한 장비 (Visual navigator)를 수술방에 설치함
- 다중모드 표지자를 이용하는 감시림프절 생검수술과 관련된 임상시험의 일부 수행	- 2011년 10월 24일 임상 시험을 시작하여 2011년 11월 11일 현재 12명의 환자가 임상 시험에 참여함

<ul style="list-style-type: none"> - 전체 환자가 50%에 이르게 되면 혼합액을 이용한 감시립프절 국소화율 (시험군)이 기존의 방법인 방사선 교질을 이용한 대조군의 감시립프절 국소화율 비교함 	<ul style="list-style-type: none"> - Interim analysis 시행한 결과 기존 방법과 혼합액에 의한 감시립프절의 국소화율 모두 100%
<ul style="list-style-type: none"> - 다중모드 표지자를 이용한 유방암 감시 립프절 임상 시험을 시행하여 결과를 분석 	<ul style="list-style-type: none"> - 임상시험 대상자 86명 실시 후 결과 분석 완료함

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년 후 예상 연구 성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	<ul style="list-style-type: none"> - Breast Cancer Research and Treatment (4.43) - Biomaterials (7.404)
산업재산권 등록	2	- PCT국제 특허 및 국내 특허 등록
기 타		

(2) 연구 성과의 활용계획

가. 기대효과

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

나. 활용방안

- 유방암 이외에 위암 등의 기타 암에도 감시립프절 표지자를 사용함
- 다중모드 표지자를 이용한 종양 타겟 표지 및 영상화에 사용함
- 다중모드 방법을 유방암 감시립프절 생검에 일상적으로 사용할 수 있는 토대를 마련함
- 선행 항암 치료 후 수술하는 환자에서 감시립프절 생검에 적용하여 추가 연구를 시행할 수 있음
- 수련의(Trainee Surgeon)이나 경험이 적은 유방암 수술의가 감시립프절 생검을 좀 더 용이하게 할 수 있는 방법으로 적용 가능함
- 다중모드를 이용한 감시립프절 생검 기술에 대해 다기관 연구로의 확대가 가능함

다. 후속 연구

6. 참고문헌

(세부과제부분에 첨부함.)

7. 첨부서류

(세부과제부분에 첨부함.)

II. 제1세부과제

세부과제명 : 유방암용 다중모드 감시림프절 표지자의 임상적용을
위한 개발 및 생산

세부과제책임자(성명/소속) : 김석기 / 분자영상치료연구과

< 요약 문 >

목 차

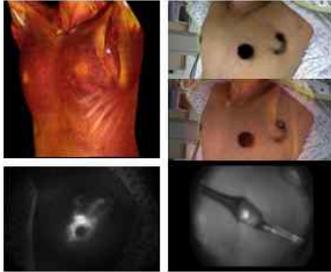
< 요약 문 >

(한글) 유방암용 다중모드 감시림프절 표지자의 임상적용을 위한
개발 및 생산

(영문) Development and production of Multimodal Sentinel Lymph
Node Seeker for Breast Cancer

1. 연구의 최종목표
2. 연구의 내용 및 결과
3. 연구결과 고찰 및 결론
4. 연구성과 및 목표달성도
5. 연구결과의 활용계획
6. 참고문헌
7. 첨부서류

연구분야(코드)		과제번호	1110211												
과제명	유방암용 다중모드 감시림프절 표지자의 임상적용을 위한 개발 및 생산														
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 01월 01일 ~ 2012년 12월 31일	120,000												
	1차년도	2011년 01월 01일 ~ 2011년 12월 31일	60,000												
	2차년도	2012년 01월 01일 ~ 2012년 12월 31일	60,000												
과제책임자	성명	김 석 기													
	소속	분자영상치료연구과													
책임단어	국문	감시림프절, 다중모드, 유방암													
	영문	Sentinel lymph node, Multimodal, Breast cancer													
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - 다중모드 유방암 감시림프절 표지자의 임상적용을 위해 표지자를 생산하며, 유방암 환자에서 감시림프절 생검수술에 필요한 장비와 시스템을 구축한다. - 차세대 표적 다중모드 감시림프절 표지자를 개발한다. <p><당해년도 목표></p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험을 위한 다중모드 약제의 생산 - 차세대 표적 다중모드 림프절표지자의 감시림프절 검출능 평가 															
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>1) 다중모드 감시림프절 표지자 임상적용 최종점검 및 개선</p> <ul style="list-style-type: none"> - 임상시험에 사용할 [Tc-99m]Tc-EB- ICG-HSA 약제 생산 및 품질관리의 지속 - 차세대 표적 다중모드 감시림프절 표지자를 이용한 감시림프절 검출능 평가 - 핵의학과/수술장 시스템 장비유지 및 개선 - 다중모드 감시림프절 표지자의 근적외선 형광카메라 및 검출시스템 개발 및 성능검사 															
<table border="1" style="margin-top: 10px;"> <tr> <td>Excitation</td> <td>740 nm LED</td> </tr> <tr> <td>Emission</td> <td>820 nm</td> </tr> <tr> <td>Minimum illumination</td> <td>0.00002 lx</td> </tr> <tr> <td>FLX</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Frame integration system</td> <td></td> </tr> <tr> <td>Shutter speed</td> <td>1/25 ~ 1/2000 sec</td> </tr> </table>				Excitation	740 nm LED	Emission	820 nm	Minimum illumination	0.00002 lx	FLX		Frame integration system		Shutter speed	1/25 ~ 1/2000 sec
Excitation	740 nm LED														
Emission	820 nm														
Minimum illumination	0.00002 lx														
FLX															
Frame integration system															
Shutter speed	1/25 ~ 1/2000 sec														



<그림> 기존 방사성동위원소 검출시스템과 새로운 근적외선 형광 검출시스템이 함께 적용된 예

◆ 연구성과

- 정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	0/2	0
IF 합	0/4	0
기타 성과:	학술대회발표	국외: 4, 국내 1

* 논문 submission: 1건

* 발명특허: 국내 출원 1건, PCT국제출원 1건

- 정성적 성과

- 1) 근적외선 형광을 이용한 연구 및 진료기반 마련
- 2) 감시립프절 표지자의 임상시험을 위한 토대 마련
- 3) 임상시험을 위한 IRB 승인
- 4) 다중모드 표지자의 생산, 주사, 촬영에 대비한 촬영실, 주사실 장비 등의 정비
- 5) 임상적용을 위한 유도수술용 카메라 시스템 개발

◆ 참여연구원
(최종연도 참여인원)

성 명

김석기, 김태성, 김광기, 강세훈, 김서일, 윤혜전, 이은성

Project Summary

Title of Project	Development and production of Multimodal Sentinel Lymph Node Seeker for Breast Cancer
Key Words	Sentinel lymph node, Multimodal, Breast cancer
Project Leader	Kim Seok-ki (MD PhD, Molecular Imaging and Therapy Branch)
Associated Company	National Cancer Center
◆ Aims	<p>Clinical application of multimodal breast cancer sentinel lymph node seeker in biopsy surgery</p> <ul style="list-style-type: none"> - Production of multimodal sentinel lymph node seekers - Assessment of next generation multimodal sentinel lymph node seekers
◆ Methods	<p>Examination of clinical application of multimodal sentinel lymph node seekers</p> <ul style="list-style-type: none"> - Maintenance of [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA kit production and quality control - Assessment of next generation multimodal sentinel lymph node seekers - Managing and improvement of clinical imaging device and system for sentinel biopsy
◆ Results	<p>Production of multimodal sentinel lymph node seekers</p> <p>Clinical system arrangement using the developed multimodal sentinel lymph node seekers</p> <p>Preparation of clinical and experimental study basis using near infra-red fluorescence</p>

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표

- 다중모드 유방암 감시림프절 표지자를 감시림프절 생검수술에 임상적으로 적용한다

2. 연구의 내용 및 결과

1) 감시림프절 표지자의 전용 생산시설과 환자주사시설 준비 및 유지

- 기존 방사성의약품 생산 및 조제시설내에 준 GMP 전용시설 설치



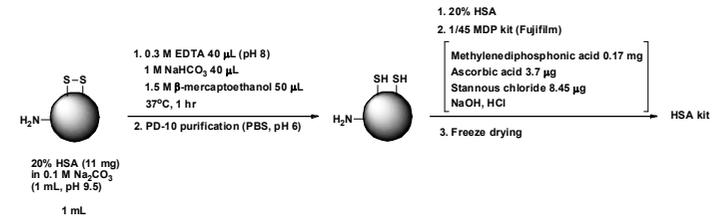
(그림1) 준 GMP 전용시설

2) 다중모드 트레이서 키트의 혼합 조제 표준 절차

가) 다중모드 트레이서 혼합/ 조제법

모든 절차는 무균조작을 기본으로 하며, 조제에 사용된 약품의 사용기록을 남김. 또한 불순물이 포함되는 것을 최소화하기 위하여 방사성약제생산시설/준 GMP 시설에서 모든 조제과정을 시행함.

- 디설파이드 환원형 티올 Human serum albumin(HSA) 키트의 준비



<HSA Kit>

- Indocyanine Green(ICG) 및 Evans Blue(EB) 키트의 준비 (DSS)

ICG는 디아그노그린주 (25 mg, Daiichi sankyo-제일약품)을 준비하고, EB는 20 mL 용량의 유리 바이알에 120 mg 담는다.

- Human serum albumin(HSA) 용액 바이알의 준비 (HSS)

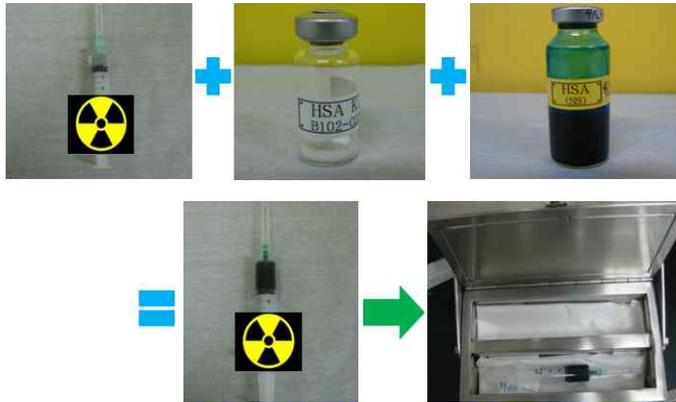
20% HSA 0.5 mL (0.1 g)을 20 mL 용량의 유리 바이알에 담는다.

- Human serum albumin(HSA)의 Tc-99m 방사성동위원소 표지 (radiolabeling of Tc-99m)

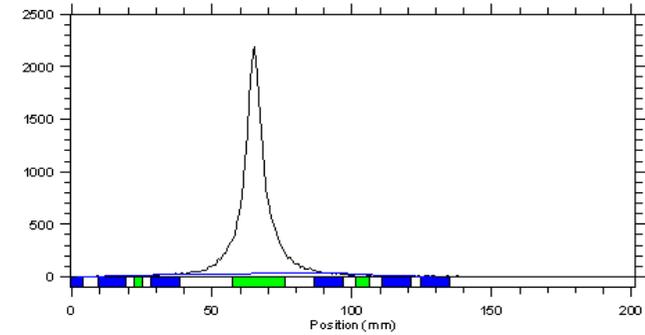
HSA 1 분자당 Tc-99m 4 원자의 비율로 표지하기 위하여 디설파이드 환원형 티올 HSA 키트에 Tc-99m 10 mCi/0.5 mL 을 넣고 실온에서 10 분간 흔들어 준다.

- [Tc-99m]Tc-ICG-EB-HSA의 조제

디아그노그린주에 주사용수 20.8 mL 주입 후 잘 녹인다. 이후, EB 120 mg 들어있는 바이알에 디아그노그린주 10 mL을 넣고 잘 흔들어 섞어 준다 (Dye Stock Solution, DSS). 다음으로, HSA 용액 바이알에 주사용수 9.5 mL을 넣고 잘 흔들어 준다 (HSA Stock Solution, HSS). 앞서 만들어진 DSS와 HSS를 각각 5 mL씩 섞어서 총 10 mL의 Stock Solution (SS)을 만들어 준다. 이렇게 완성된 SS 용액 1 mL을 [Tc-99m]Tc-HSA 10 mCi/0.5 mL 바이알에 넣어준 다음, 마지막으로 2% 리도케인 용액 0.5 mL을 추가로 가해준다.



(그림2) 다중모드 키트의 혼합조제 및 준비의 예



(그림3) 표준제형의 방사성표지 안정성 확인 예

- 최종적으로 사용전 동물 실험을 통한 점검

3) 다중모드 트레이서 조제 및 주사전 위생 및 성능평가

품 명	년도별 제조현황	총 제조횟수	총 제조수량	품질관리(Q.C)		
				Pyrogen	Bacteria	Size
HSA Kit	2011. 9 ~ 12	16	160	pass	pass	<10nm
	2012. 1 ~ 현재	25	250	pass	pass	<10nm

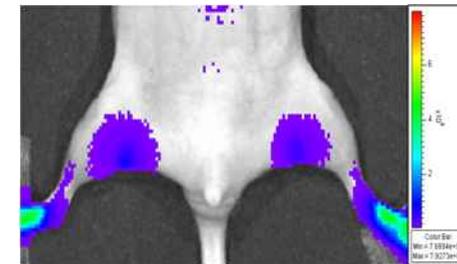
- 표준검사결과 엔도톡신(pyrogen)과 박테리아가 검출되지 않음을 확인함.
- 제조된 인형알부민의 키트의 particle size가 적정 수준을 유지하는지 제타사이저로 확인함.

- 방사화학 시험/ 방사해중 시험

Tc-99m의 표지효율은 모두 99% 이상이었음. 또한 Tc-99m이외의 방사능은 총방사능의 0.3% 이하이어서 임상사용에 적합함.

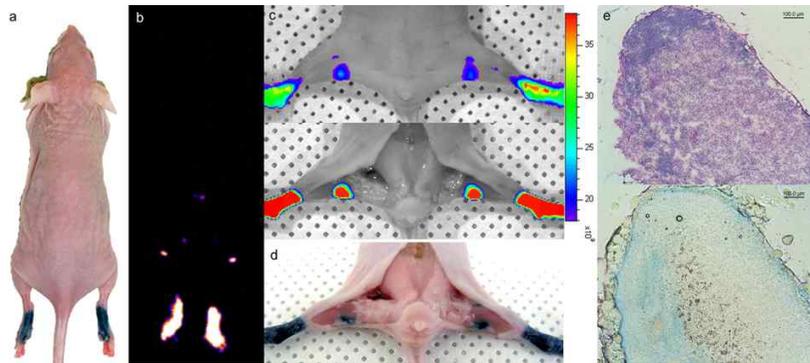
- 표지 안전성

[Tc-99m]TcO₄⁻ 10 mCi/2 mL을 첨가한 후 실온에서 10 분간 반응시켜 [Tc-99m]Tc 표지된 HSA Kit을 합성하고, 합성 결과는 ITLC를 아세톤에 전개하여 확인하였을 때 99%의 표지율을 확인할 수 있었다.



(그림4) 표준제형의 트레이서를 이용해 근적외선형광이 림프절에 보인 예

- 무작위 추출된 표준제형의 트레이서를 이용하여 마우스에서 시험하여 색소/ 근적외선형광/ 방사성로 림프절을 확인 가능함을 확인함.



(그림5) [Tc-99m]Tc-EB-ICG-HSA을 이용한 마우스의 다중모드 영상 및 조직검사 결과. (a) 마우스 사진 (b) SPECT 영상 (c) 근적외선 형광 영상 (d) 육안 영상 (e) 영상을 통해 쉽게 얻어진 SLN의 조직검사 결과

4) 다중모드 표지자의 주사

- 주사부위 inspection 한다.
- 따뜻한 거즈로 약 30 초 데운다. (화상에 주의)
- 알코올 소독 후 Peri-areolar single injection (약 400 ul) 한다.
(주사바늘을 뺄 때 음압을 걸어 주변으로 주사액이 튀지 않도록 조심하고, 주사 시 피부표면에 청색색소가 가늘게 퍼지는 것이 보일 정도로 얇게 주사)
- Injection 부위를 따뜻한 거즈를 덮고 2 min 정도 문지른다.
(Warming 거즈: 비닐에 싸인 젖은 스폰(냉장실 보관)을 전자레인지에 30 초 데움)
- Aseptic technique으로 시행한다.

5) 다중모드 표지자를 수술장에서 감지하는 시스템의 구축

가) 방사성

이미 확립되어 있는 감마프루브를 이용함. 감마프루브의 수술중 사용방법과 주의점은 이미 임상적으로 확립되어 있어 구축에 어려움이 없었음.

나) 근적외선 형광

상품화된 턴키방식의 수술장용 형광감지시스템은 현재 국내에 없음.

근적외선형광카메라와 적절한 광원모듈을 결합하여 방사성 감마프루브의 사용방법에 준하여 구축함.

- 형광용 광원 : 안전성을 고려하여 고출력의 레이저를 이용하지 않고 740 nm 파장의 LED모듈을 개발함. 최종적으로 100여개의 LED 다이오드를 이용한 모듈을 이용함.

- 형광 카메라 모듈: 적외선구간에 감도가 높은 형광카메라를 선택하였고 가격대 성능비에 중점을 두었음. 또한 해상도나 temporal resolution보다는 임상적으로 중요한 약한 빛에 대한 민감도에 중점을 두었음. 여러 카메라를 이용하여 시제품을 제작하였고 적절한 형광카메라를 구입하여 시스템을 구축함.

- 형광 카메라 지지대 구축: 수술장에서 사용하기 편하도록 무거운 형광 카메라를 안전하게 지지 가능한 형광 카메라 지지대를 새로 구축함.

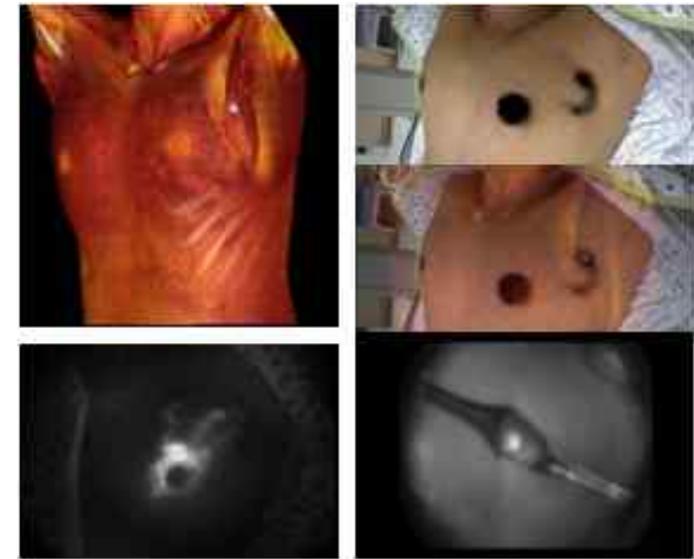




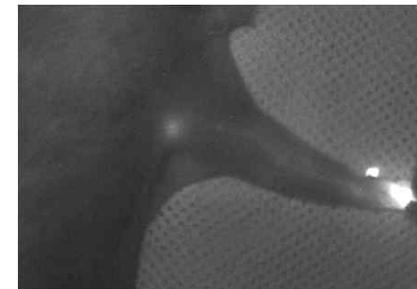
Visual Navigator (NIRF) 2011년

Excitation: 740 nm LED
Emission: 820 nm
Minimum illumination: 0.00002 lx
FL4
Frame integration system
Shutter speed: 1/25 ~ 1/2000 sec

Visual Navigator (NIRF) 2012년



(그림7) 기존 방사성동위원소 검출시스템과 새로운 근적외선 형광 검출시스템이 함께 적용된 예



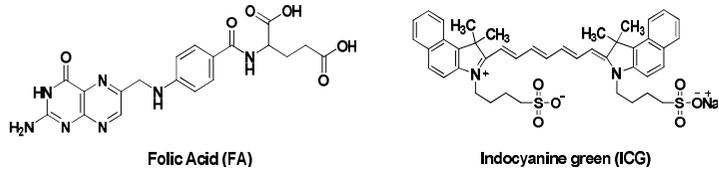
(그림8) 새로운 근적외선 형광 검출시스템으로 마우스의 림프절 추적에 적용한 예

(그림6) 수술장에서 사용하기 편하도록 무거운 형광 카메라를 안전하게 지지 가능한 형광 카메라 지지대 및 새롭게 구축된 근적외선 형광 검출 카메라 시스템

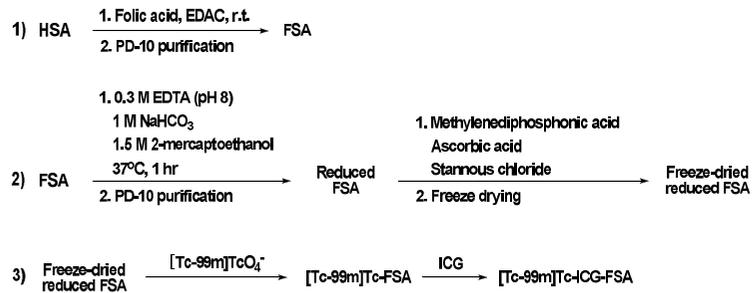
- 현재 구축된 방사성동위원소 검출시스템과 근적외선 검출시스템의 성능

6) 엽산표지 다중모드 감시림프절 표지자 (Folate Serum Albumin) 개발

가) 엽산 결합 감시림프절 표지자



나) 엽산표지 다중모드 감시림프절 표지자 개발

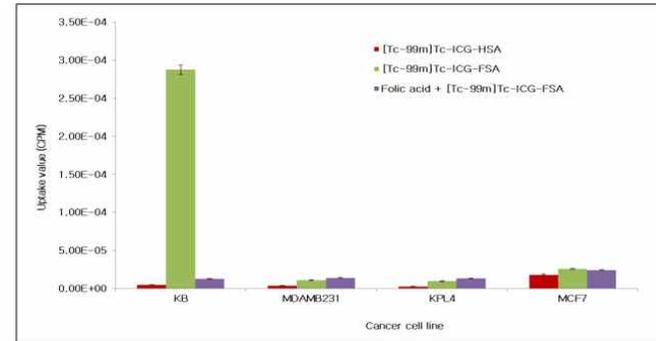


다) 엽산표지 다중모드 감시림프절 표지자의 특이적 결합

① 엽산 수용체 과발현 세포주에 대한 결합

- [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민이 엽산수용체 과발현 세포와 특이적으로 결합하는 비율을 엽산이 결합되지 않은 [Tc-99m]Tc 인혈청 알부민과 비교하였다.

그 결과, 엽산 과발현 세포주인 비인두암세포 (KB)에서만 [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민에 대한 세포내 섭취가 보이며, 100 μM의 엽산과 함께 처리한 대조군에서는 세포내 섭취가 크게 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

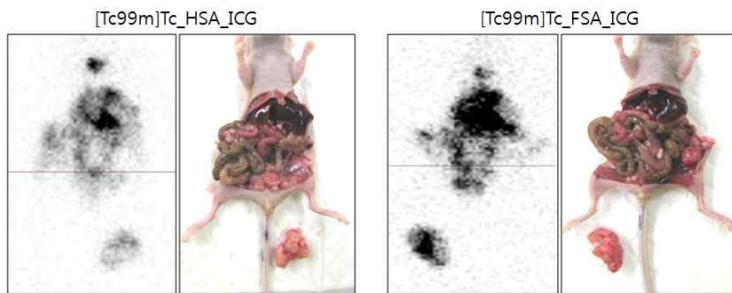


Cell line	KB	MDAMB231	KPL4	MCF7
[Tc-99m]Tc-ICG-HSA	4.56 x 10 ⁻⁰⁶	3.69 x 10 ⁻⁰⁶	2.67 x 10 ⁻⁰⁶	1.80 x 10 ⁻⁰⁵
[Tc-99m]Tc-ICG-FSA	2.88 x 10 ⁻⁰⁴	1.09 x 10 ⁻⁰⁵	9.70 x 10 ⁻⁰⁶	2.58 x 10 ⁻⁰⁵
Folic acid + [Tc-99m]Tc-ICG-FSA	1.26 x 10 ⁻⁰⁵	1.41 x 10 ⁻⁰⁵	1.32 x 10 ⁻⁰⁵	2.43 x 10 ⁻⁰⁵

② 동물 모델에서 엽산표지 다중모드 감시림프절 표지자의 확인

- [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민을 이용하여 소동물의 감마영상을 Animal SPECT (NanoSPECT, Bioscan)로 확인하였다. 종양 특이적 섭취 확인을 위한 엽산결합 인혈청 알부민 표지자 복강 주사한 후의 마우스 animal SPECT planar 영상 및 감시림프절 영상을 확인하였다.

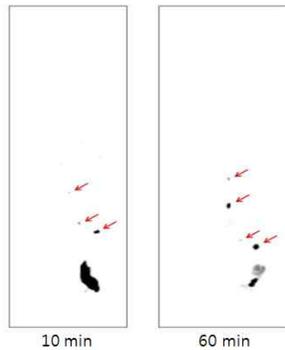
먼저 엽산 수용체 발현율이 높은 자궁암 세포주인 2774 cell line을 마우스 복강내에 3x10⁶ cells 양으로 주입하여 종양모델을 형성하였고, [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민 2 mCi/0.5 mL를 복강에 주사한 후 1일 후에 SPECT planar 영상을 촬영하였다. 그 결과, 대조군으로 촬영한 인혈청 알부민에 비하여 엽산결합 알부민을 적용한 마우스의 감마영상에서 복부 내에 형성된 종양에 더 강한 표지가 이루어진 것을 확인할 수 있었다.



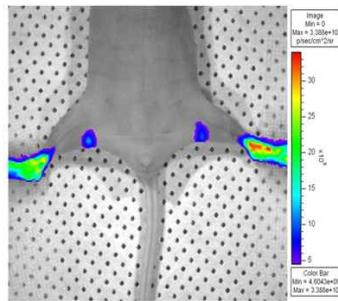
(그림9) 종양 특이적 섭취 확인을 위한 엽산결합 인혈청 알부민 표지자 복강 주사한 후의 마우스 animal SPECT planar 영상

기존의 인혈청 알부민을 이용한 경우, 체내에 사용하기에 매우 안전한 감시림프절 표지자 이기에 체내 영상을 얻는데 아무런 독성 문제가 없고, 특히 그 크기가 적절하여 10 분 내의 시간 안에 약물의 림프절 섭취를 확인할 수 있었다. 또한 감시림프절에 머무는 시간이 60 분까지도 유지되므로 저류시간이 길어 감시림프절을 발견하는 비율이 높고, 감시림프절에 대한 신호강도가 증가하여 감시림프절 생검의 정확도가 우수한 감시림프절 표지자로서 유리한 특성을 가진다. 따라서, 이러한 인혈청 알부민 표지자의 장점을 모두 가진 엽산결합한 표지자를 사용하면 더 능동적이고 종양특이적인 표지가 가능하다.

a) SPECT 영상



b) 근적외선 형광 영상

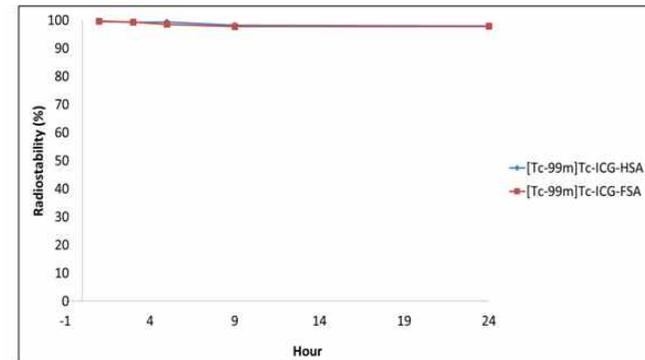


(그림10) 엽산결합 인혈청 알부민 표지자를 사용한 SPECT 및 근적외선 형광영상

라) 엽산표지 다중모드 감시림프절 표지자의 체내 안전성

- [Tc-99m]Tc 엽산결합 인혈청 알부민과 시판된 키트로 제작한 [Tc-99m]인혈청 알부민이

사람혈액 내에서 얼마나 방사성 동위원소 표지가 안정적으로 유지되는지 안정성을 비교하였다. 그 결과, 99.7%로 시작된 [Tc-99m]인혈청 알부민의 방사성 순도는 24시간까지 97.9%로 유지되었고, 99.5%로 시작된 [Tc-99m]엽산결합 인혈청 알부민은 동일한 조건에서 97.8%로 유지됨을 확인함으로써 두 표지자 모두 인혈 내에서 안정함을 확인할 수 있었다.

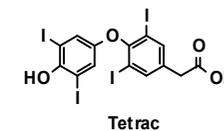


Time (h)	1	3	5	9	24
[Tc-99m]Tc-ICG-HSA (%)	99.7	99.2	99.3	98.1	97.9
[Tc-99m]Tc-ICG-FSA (%)	99.5	99.3	98.5	97.7	97.8

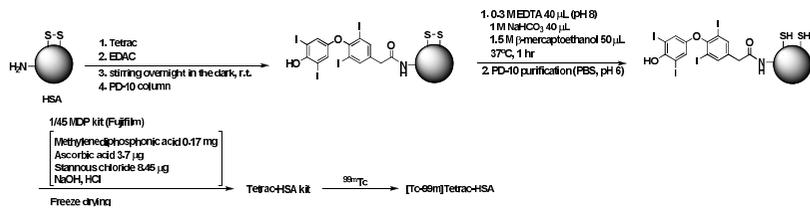
7) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자 (Tetrac Serum Albumin) 개발

가) 테트라 결합 감시림프절 표지자

- 감상선 호르몬의 탈아미노화 형태인 테트라 (Tetrac, tetraiodothyroacetic acid)은 인테그린 αvβ3 수용체에 결합하여 종양증식 및 신생혈관생성 억제 기능을 갖는다. 이러한 테트라의 메커니즘을 이용하면 알부민의 종양 특이적, 능동적 표지 능력을 더욱 향상시킬 수 있을 것으로 기대 된다.



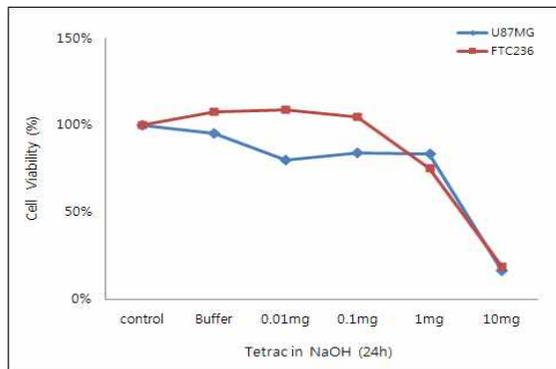
나) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자의 개발



다) SPECT 영상용 테트라 표지 감시림프절 표지자의 특이적 결합

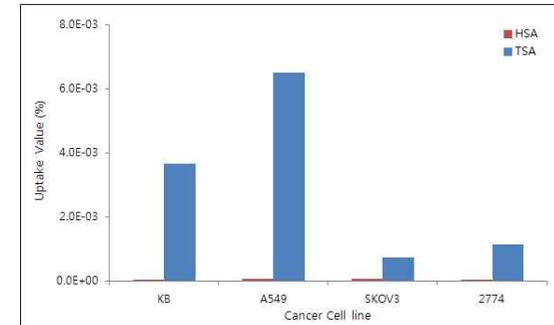
① 세포주에 대한 독성 실험

- 먼저 테트라결합 인혈청 알부민의 세포주에 대한 독성을 확인하였다. 준비된 세포주에 농도별로 처리하고 표지자로 사용 가능한 안정 범위 (1 mg 이내)를 분별할 수 있었다.



② 세포주에 대한 결합 실험

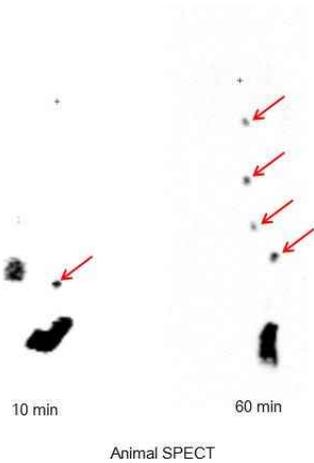
- [^{99m}Tc]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 각 세포주에 처리하여 결합정도를 섭취율로 비교하였다. 세포주별로 섭취율에 차이를 보였으나 기존의 인혈청 알부민과 비교하였을 때 테트라결합 인혈청 알부민의 섭취율이 더 높게 나타난 것으로 보아 상대적으로 훨씬 더 높은 표지효율을 보임을 확인할 수 있었다.



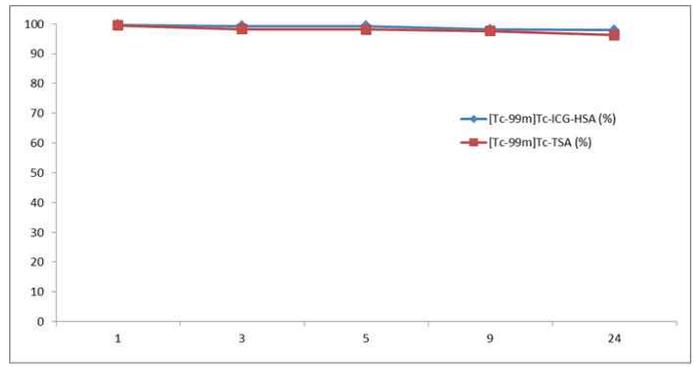
③ 동물 모델에서 테트라 표지 다중모드 감시림프절 표지자의 확인

- [^{99m}Tc]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 이용하여 소동물의 감마영상을 Animal SPECT (NanoSPECT, Bioscan)로 확인하였다.

우선, 마우스의 오른쪽 뒷발바닥에 [^{99m}Tc]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 100 uCi/50 μ L 주사한 후 10분 및 60분에 SPECT 영상을 촬영하였다. 그 결과 10분만에 림프절 섭취를 확인할 수 있었고, 60분 후에도 다른 장기의 섭취를 보이지 않으면서 주사부위 및 림프절만이 더욱 강하게 섭취되어 있음을 확인할 수 있었다. 즉, 테트라결합 인혈청 알부민을 이용한 경우도 체내에 사용하기에 안전한 감시림프절 표지자이기에 체내 영상을 얻는데 아무런 문제가 없음을 확인할 수 있었다. 특히 그 크기가 적절하여, 10 분의 적절히 빠른 시간 안에 약물의 림프절 섭취를 확인할 수 있었으며, 감시림프절에 머무는 시간이 60 분에도 유지되어, 감시림프절에 머무르는 시간이 길어 감시림프절을 발견하는 비율이 높고, 감시림프절에 대한 신호강도가 증가하여 감시림프절 생검의 정확도가 우수한 감시림프절 표지자로서 유리한 특성을 가짐을 확인할 수 있었다.



(그림11) [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민을 이용한
마우스의 animal SPECT 림프절 영상



Time (h)	1	3	5	9	24
[Tc-99m]Tc-ICG-HSA (%)	99.7	99.2	99.3	98.1	97.9
[Tc-99m]Tc-TSA (%)	99.5	98.2	98.1	97.6	96.2

라) SPECT 영상용 테트라표지 감시림프절 표지자의 체내 안전성

- [Tc-99m]Tc 테트라결합 인혈청 알부민과 시판된 키트로 제작한 [Tc-99m]인혈청 알부민이 사람혈액 내에서 얼마나 방사성 동위원소 표지가 안정적으로 유지되는지 안정성을 비교하였다. 그 결과, 99.7 %로 시작된 [Tc-99m]인혈청 알부민의 방사성 순도는 24 시간까지 97.9 %로 유지되었고, 99.5 %로 시작된 [Tc-99m]테트라 결합 인혈청 알부민은 동일한 조건에서 96.2 %로 유지됨을 확인함으로써 두 표지자 모두 인혈 내에서 95% 이상 안정함을 확인할 수 있었다.

3. 연구결과 고찰 및 결론

(1) 다중모드 감시림프절 표지자의 제조시설 및 관리시스템 구축

- 다중모드 감시림프절 표지자의 지속적인 생산을 위해, 인혈청알부민 키트를 제조할 수 있는 준 GMP 수준의 제조시설을 갖추어 가동 중이며 현재까지 지속적으로 생산, 관리하고 있다. 무균 상태로 제조하며 제조 후에도 무균 상태를 점검하여 임상시험에 적합한 상태를 유지하고 있다.

임상적용에 있어서, 실제 환자의 수술시에는 병원내 핵의학과에서 염료 및 동위원소를 표지하여 환자에 주사할 다중모드 표지자를 완성, 제조하여 사용한다.

또한, 수술장 환경에 최적화 하여 사용할 수 있도록 수술 시 사용하는 형광영상 장비에 대한 개선 및 유지관리도 지속적으로 이루어지고 있다.

(2) 차세대 감시림프절 표지자의 개발

- 인혈청알부민의 이점을 토대로 하여 표지의 능동성과 특이성을 향상시킨 차세대 감시림프절 표지자를 지속적으로 개발하였다.

엽산결합 티올인혈청알부민은 엽산 수용체에 강력하게 결합하고 림프절에 축적이 됨을 확인하였다. 따라서 이를 방사성 동위원소 및 형광염료를 표지하여 사용하면 엽산발현이 많은 질환의 림프계를 다중모드로 영상화 할 수 있는 종양 특이적 림프절 표지자로 사용할 수 있었다. 특히, 인혈청 알부민의 크기가 6~8 nm로서 일반적으로 사용되는 콜로이드형 방사성의약품보다 크기가 작아 림프절 섭취가 빠르고, 환원제에 의한 인혈청알부민에 부착된 티올기로 인해 DTPA나 MAG3 와 같은 양쪽성 킬레이트를 사용하지 않아 그로 인해 발생되는 등전점의 변화 또는 면역반응성의 유도 등의 문제점을 해결할 수 있었다.

테트라결합 티올인혈청알부민은 angiogenesis 진단제로서의 가능성이 검토되는 단계의 물질인 테트라를 이용한 표지자이다. 테트라를 인테그린 중 $\alpha v\beta 3$ 수용체에의 표적성이 높은 물질로 알려져 있다. 그러나 이러한 표적성에도 불구하고 테트라를 이용한 분자영상체제는 아직 국내외적으로 발표되어지지 않았다. 현재 angiogenesis 영상화에 주로 고가의 RGD peptide가 사용되는데, 테트라 표지자의 개발에 따른 저가의 angiogenesis 영상 표지자로서의 대체가 가능할 것이라 예상된다.

(3) 전망 및 발전가능성/ 후속연구에 대한 개관

- 최근 다양한 능동적인 감시림프절 표지자의 연구가 진행되고 있다.

감시림프절의 면역세포에 있는 만노즈 수용체에 특이적으로 결합하는 방사성 표지자 개발의 경우, DTPA 나 MAG3 등의 양쪽성 킬레이트제를 만노즈-텍스트란에 결합한 후 $[Tc-99m]Tc$ 을 표지한 화합물, 그리고 만노즈-폴리라이신에 DTPA를 붙임으로써

$[Tc-99m]Tc$ 을 결합한 화합물 등이 D. R. Vera, et. al.에 의해 발표되었다. 그러나 위에서 기술한 것처럼 텍스트란 또는 폴리라이신과 같은 운반체에 DTPA나 MAG3 와 같은 양쪽성 킬레이트를 먼저 붙여놓지 않으면 $[Tc-99m]Tc$ 을 표지할 수 없다. 따라서 운반체의 구조변경에 따른 면역반응성의 유도 등의 문제를 야기시킬 수 있다. 이후 이 같은 단점을 극복하기 위하여 새로운 만노즈 수용체 특이적인 방사성표지자가 개발되었는데, 이는 만노즈-인혈청알부민으로, 종래 방사성표지자와는 다르게 양쪽성 킬레이트가 없이도 방사성 동위원소의 표지가 용이하였다.

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 예상된다.

우리의 연구에서 표지자의 장점을 잘 살리기 위해 영상을 융합하는 방법을 일부 개발하였다. 감시림프절 표지자의 성능을 극대화하기 위해 전용프로그램이나 영상하드웨어 등의 개발도 필요하며 이러한 접근은 시너지효과를 발휘할 것으로 판단된다.

(4) 감시림프절 표지자 개발의 결론 및 활용

- 본 연구에서는 개발된 다중모드 감시림프절 표지자의 림프절에 오래 저류하는 특성 및 다중모드영상을 가능하게 하는 특성을 이용한 임상시험을 진행하였다. 이를 위해 다중모드 표지자의 무균화 조제시설을 마련하고 생산 및 관리를 성공적으로 진행하였으며, 임상시험에 사용할 표지자 추적 영상장비 시스템을 구축할 수 있었다.

또한 감시림프절 표지 외에도 종양에 대한 표적 표지 및 영상화에 유용하게 사용될 가능성이 있는 차세대 감시림프절 표지자를 개발하여 표지능을 확인하였다.

따라서 감시림프절 표지자는 유방암, 흑색종 등의 기존의 적응증은 물론이고 다른 다양한 종양에서의 감시림프절 생검이나 내시경, 복강경, 로봇 수술에서의 감시림프절 생검에 활용될 수 있을 것이다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial	So-Youn Jung	Breast Cancer Research and Treatment (4.43)	submission	국외 SCI	1110210
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with visible dye, near infrared fluorescent dye and radioisotope	Se Hun Kang	Biomaterials (7.404)	submission	국외 SCI	1110211

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with a visible dye, a near infrared fluorescent dye and a radioisotope	강세훈, 김서일, 김영상, 백남석, 김석기	ISRS 2011	국외	1110211
Sentinel lymph node mapping using tri-modal human serum albumin conjugated with visible dye, near infrared fluorescent dye and radioisotope	강세훈, 김서일, 김성만, 백남석, 김석기	SNM 2011	국외	1110211
Cancer Specific Sentinel Lymph Node Mapping Using [^{99m} Tc]-ICG-Folate Human Serum Albumin	강세훈, 백남석, 김서일, 김성만, 김석기	ASIASENSE 2011	국내	1110211
Intraoperative fluorescence imaging of peritoneal seedings using intraperitoneal staining with folate-human serum albumin-indocyanine green conjugates in a mouse tumor model	김철한, 김서일, 김성만, 강세훈, 하승균, 이은성, 김태성, 김석기	SNM 2012	국외	1110211
[^{99m} Tc]-ICG-Folate Human Serum Albumin Kit for Cancer Specific Sentinel Lymph Node Mapping	강세훈, 백남석, 김서일, 김석기	WMIC 2012	국외	1110211

다. 산업재산권

구분	특허명	출원인	출원국	출원번호
발명특허	다중모드 영상화가 가능한 감시림프절 표지자	김석기 외 5인	PCT 국제출원	PCT/KR2011/005994
발명특허	방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자	김석기 외 5인	대한민국	제10-2010-0078330호

라. 기타 연구성과

- 1) 특허 (다른 과제 성과로 등록되었으나, 현 과제와 밀접한 관련이 있는 성과임)
 - ① 국내출원. 중앙 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 엽산 결합 인혈청 알부민. (10-2011-0056922)
 - ② PCT 국제출원. 중앙 및 감시림프절에 특이적인 [Tc-99m] Tc 표지된 엽산 결합 인혈청 알부민 (LABELLED FOLIC ACID CONJUGATE COMPOUND SPECIFIC TO CANCER AND SENTINEL LYMPH NODE) (PCT/KR2011/004306)
- 2) 2011년 화순광학분자영상심포지엄 발표, Initial step of multimodal image-guided sentinel lymph node biopsy in NCC, Korea
- 3) 2012년 한국 유방암 학회 외과 술기 위원회 발표, Multi-mode sentinel lymph node biopsy

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
	연차	최종		연차	최종
- 다중모드 유방암 감시림프절 표지자의 임상적용을 위해 표지자를 생산하며, 유방암 환자에서 감시림프절 생검수술에 필요한 장비와 시스템을 구축한다	1차 년도	- 다중모드 표지자의 임상적용을 위한 최종점검 및 개선	- 최종점검과 개선을 마치고 임상시험을 시행중임 - 임상시험 수행을 위한 IRB 승인	1	100
		- 임상시험용 다중모드 표지자 약제 생산을 위한 준비	- 임상시험용 다중모드 표지자 약제를 조제할 수 있는 시설을 준비하여 이미 임상시험을 시행중임		
		- 다중모드표지자용 수술장용 카메라 시스템 구축	- 시스템 구축하였음		
		- 차세대 표적 다중모드 림프절 표지자 개발	- 엽산수용체 표적 다중모드림프절 표지자를 개발하였음		
- 차세대 표적 다중모드 감시림프절 표지자를 개발한다	2차 년도	- 임상시험을 위한 다중모드 약제의 생산	- 임상시험에 사용될 다중모드 표지자의 지속적 생산 중임 - 다중모드 표지자의 임상적용을 위한 QC관리 시스템을 마련함	2	100
		- 차세대 표적 다중모드 림프절표지자의 감시림프절 검출능 평가	- 엽산결합 다중모드 표지자의 개발 및 in vitro/in vivo 평가 완료 - 테트라결합 다중모드 표지자의 개발 및 in vitro/in vivo 평가 완료		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
- 식약청 연구자주도 임상시험 및 기관 IRB 관련조치 시행하였나? - 표지자의 생산이 이루어 졌는가? - 생산관리 표준절차서를 마련하였나?	- IRB 통과후 임상시험 진행중 - 임상시험에 사용되는 표지자의 조제(생산)됨. - 표준절차서 마련하였음
- 표지자의 주사, 촬영 등이 원활하게 이루어지도록 준비되었는가?	- 핵의학과의 인력/물적 시스템 확립 - 수술장의 협조와 진행 시스템 확립
- 수술용 가시광선-형광 카메라시스템이 구축되었는가?	- 수술용 카메라시스템 설치하여 구축함
- 새로운 표적 가시광선-형광-방사성 다중모드 표지자를 개발하였는가?	- 업산표적 다중모드표지자 개발함
- 표지자의 생산이 원활히 이루어졌는가?	- 표지자 생산용 준 GMP 설비가 준비되어 생산이 지속적으로 이루어지고 있음
- 장비가 임상시험 진행에 지장이 없도록 유지되었는가? - 시스템의 보수 혹은 개선이 있었나?	- 임상 시 사용될 형광장비가 마련되어 실제 임상 시험에 유용하게 사용되었음 - 수술장에서 더 효율적으로 사용할 수 있도록 개선하였음
- 목표환자수를 달성하였는가?	- 목표 환자수를 달성하였음
- 결과를 분석하였는가?	- 임상시험 결과를 정리하여 분석하였음

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년 후 예상 연구 성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	Breast Cancer Research and Treatment (4.43) Biomaterials (7.404)
산업재산권 등록	2	PCT국제 특허 및 국내 특허 등록
기 타		

(2) 연구 성과의 활용계획

가. 기대효과

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

나. 활용방안

- 유방암 이외에 위암 등의 기타 암에도 감시림프절 표지자를 사용함
- 다중모드 표지자를 이용한 종양 타겟 표지 및 영상화에 사용함
- 다중모드 방법을 유방암 감시림프절 생검에 일상적으로 사용할 수 있는 토대를 마련함
- 선행 항암 치료 후 수술하는 환자에서 감시림프절 생검에 적용하여 추가 연구를 시행할 수 있음
- Trainee 나 경험이 적은 유방암 수술의가 감시림프절 생검을 좀 더 용이하게 할 수 있는 방법으로 적용 가능함
- 다중모드를 이용한 감시림프절 생검 기술에 대해 다기관 연구로의 확대가 가능함

다. 후속 연구

6. 참고문헌

- 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;36:687-692.
- Frangioni JV. In vivo near-infrared fluorescence imaging. Curr Opin Chem Biol 2003;7:626-634.
- 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.
- Zhang C, Wang S, Xiao J, Tan X, Zhu Y, Su Y, et al. Sentinel lymph node mapping by a near-infrared fluorescent heptamethine dye. Biomaterials 2009;31:1911-1917.
- Jeong JM, Hong MK, Kim YJ, Lee J, Kang JH, Lee DS, et al. Development of 99mTc-neomannosylhumanserumalbumin(99mTc-MSA)asanovelreceptorbindingagentforsentinel lymphnodeimaging.NuclMedCommun2004;25:1211-1217.
- 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;106:386-389.
- Morton DL, Wen DK, Wong JH, Economou JS, Cagle LA, Storm FK, et al. Technical details of intraoperative lymphatic mapping for early stage melanoma. Arch Surg 1992;127:392-399.
- 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.
- 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;183:185-189.
- Hardman R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. Environ Health Perspect. 2006;114:165-172.
- Shi C, Zhu Y, Cerwinka WH, Zhou HE, Marshall FF, Simons JW, et al. Quantum dots: emerging applications in urologic oncology. Urol Oncol 2008;26:86-92.
- 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;52:132-139.
- Tajima Y, Yamazaki K, Masuda Y, Kato M, Yasuda D, Aoki T, et al. Sentinel node mapping guided by indocyanine green fluorescence imaging in gastric cancer. Ann Surg 2009;249:58-62.
- 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;36:90-94.

- 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;35:569-573.
- 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; 4:1640-1645.

7. 첨부서류

관인생략 출원번호통지서

출원 일자 2010.08.13
 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
 출원 번호 10-2010-0078330 (접수번호 1-1-2010-0522566-56)
 출원인 명칭 국립알센터(1-2000-036786-6)
 대리인 성명 손민(9-1999-000420-6)
 발명자 성명 김석기 강세훈 김서일 김영상 백남석 노진희
 발명의 명칭 방사성 동위원소가 표지되고 근적외선 영역의 형광색소 및 가시광선 영역의 색소가 결합된 알부민을 포함하는 감시림프절 표지자

특 허 청 장

- 출원 이후 진행 상황 등을 확인하실 때에는 출원번호가 필요하오니, <출원번호통지서>는 출원결과가 결정될 때까지 잘 보관하시기 바랍니다.
- 주소, 전화번호 등 변경사항이 있을 경우 <출원인코드정보변경(경정), 경정신고서>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.
- 당당 산업재산권이 출원상대임을 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 특허고려상담센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.kipo.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.

특허협력조약
(PATENT COOPERATION TREATY)

PCT/KR2011/005994

PCT



국제출원번호 및 국제출원일 통지서
(PCT 규칙 20.2(c))

발신:수리관청

수신:
손민
서울 강남구 삼성동 159-9 도성공화타워 6층 한일국제특허사무소 135-973 대한민국

발송일 (일/월/년) 2011년 08월 23일 (23.08.2011)

출원인 또는 대리인의 서류참조기호 OPA11113PCT **중요통지사항**

국제출원번호	국제출원일 (일/월/년)	우선일 (일/월/년)
PCT/KR2011/005994	2011년 08월 16일 (16.08.2011)	2010년 08월 13일 (13.08.2010)

출원인 **국립암센터 등**

발명의 명칭
다중모드 영상화가 가능한 감시캠프렌 표지자

1. 이 국제출원은 위에 기재된 바와 같이 국제출원번호와 국제출원일이 부여되었습니다.

2. 이 국제출원의 기록원본은:

_____ 자로 국제사무국에 송부되었습니다.

아래의 사유로 인하여 아직 국제사무국에 송부되지 않았으며, 이 통지서의 사본은 국제사무국에 송부되었습니다*:

국가안전보장에 필요한 허가를 얻지 못했음

기타 (이유를 상술):

* 국제사무국은 수리관청에 의한 기록원본의 송달을 감시하고 그 정수사실을 출원인에게 통지합니다. (서식 PCT/IB/301). 국제사무국은 우선일부터 14일이 경과할 때까지 기록원본을 수령하지 않은 때에는 출원인에게 이를 통지합니다. (규칙 22.1(c)).

수리관청명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
302-701 대전광역시 서구 정사로 189,
청주대전지사
팩스번호: 82-42-472-7140

특허청장
전화번호: 82-42-481-8552



서식 PCT/RO/105 (2008년 7월)

II. 제2세부과제

세부과제명 : 다중모드 감시 캠프렌 표지자의 유방암에서의 임상적 적용

세부과제책임자(성명/소속) : 정소연/유방암센터

< 요약 문 >

연구분야(코드)				과제번호	1110212
과제명	다중모드 감시림프절 표지자의 유방암에서의 임상적 적용				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 1 월 ~ 2012년 12 월		40,000	
	1차년도	2011년 1 월 ~ 2011년 12 월		20,000	
	2차년도	2012년 1 월 ~ 2012년 12 월		20,000	
과제책임자	성명	정소연			
	소속	유방암센터			
색인단어	국문	감시림프절, 다중모드, 유방암			
	영문	Sentinel lymph node, multimodal, breast cancer			
◆ 연구목표 <최종목표> - 다중모드 유방암 감시림프절 표지자를 감시림프절 생검에 적용하기 위하여 임상시험을 시행한다 <당해년도 목표> 개발된 다중모드 표지자를 이용하여 유방암의 감시림프절 임상 시험을 수행 - 다중모드 표지자를 이용한 유방암의 감시림프절 임상 시험을 진행하여 interim analysis를 시행 - 다중모드 표지자를 이용한 유방암 감시림프절 임상 시험 마무리					
◆ 연구내용 및 방법 연구배경 - 감시림프절 생검은 유방암의 수술 패러다임을 바꾼 혁신적인 수술법임. 유방암에서 환자의 액와림프절 전이유무에 따라 수술범위를 결정하는 지능적인 수술법을 임상에 도입할 수 있도록 한 최소침습 수술법임. - 현재 진단되는 유방암 중 임파선 전이가 없는 유방암의 비율이 점차 증가되어 수술의 범위를 줄일 수 있는 감시 림프절 수술의 중요성은 증가되고 있음. - 선행과제에서 개발된 다중모드 표지자는 유방암 수술에 있어 감시 림프절 수술의 성공률을 증가시킬 것으로 예상됨. - 감시림프절을 표지하고 최소한의 절개를 통해 절제해내는 수술과정 전체에 다중모드 표지자는 유용하게 사용될 수 있어 기존의 표지자에 비해 첫째, 조직을 절개하기 전 피부 밑에 위치하는 감시림프절이 영상 등의 방법으로 확인이 가능하여 정확한 수술부위를 정할 수 있고 둘째, 수술과정 중에도 수술자가 직접 표지된 감시림프절을 확인할 수 있어서 임상적으로 매우 유용할 것으로 판단됨. - 선행과제에서 인형알부민을 플랫폼으로 하는 색소-형광-방사성 다중모드 표지자를 성공적으로 개발하였고 이를 유방암환자에서 적용하여 연구개발성과를 임상적으로 적용하고자 함.					

연구내용 및 방법 - 임상시험을 위한 준비 다중모드표지자의 임상시험을 위한 IRB 준비 감시림프절 표지와 생검이 이루어지는 전과정 (핵의학과-수술장)에 대한 준비 - 감시림프절 표지자를 이용한 감시림프절 생검법 임상시험 감시림프절 표지자는 기존의 표준방법인 방사성콜로이드, 색소, 형광염료 방법을 포함하는 방법임. 감시림프절 표지자 군만을 대상 2011년 8월 ~ 2012년 12월 까지 86명을 대상 - 다중모드 감시림프절 표지자를 투여할 장소인 핵의학과에서의 준비. 임상시험에 필요한 핵의학과 장비 및 인력의 준비 - 수술장에서의 임상시험 준비/ 환자선정 - 임상시험중에 감시림프절 표지자의 주사 및 감마영상촬영. 융합영상 촬영			
◆ 연구성과 -정량적 성과			
	구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
	SCI 논문 편수	0/1	0
	IF 합	0/2	0
	기타 성과	학술대회발표	국외: 2
* 논문 submission: 1건 * 학회 발표: 2건 - 2011 American Society of Clinical Oncology annual meeting, Poster presentation (Prediction of the non sentinel metastasis in patients who received neoadjuvant chemotherapy for clinically axillary node metastasis) - 2012 San Antonio Breast Cancer Symposium, Poster presentation (Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial)			
-정성적 성과 1) 임상시험을 위한 IRB 승인 2) 다중모드 표지자의 생산, 주사, 촬영에 대비한 촬영실, 주사실 장비등의 정비 3) 임상적용을 위한 유도수술용 카메라 시스템 개발 4) 임상시험 (유방암에서 인도시아닌그린, 청색색소 및 방사성고질 혼합액을 이용한 감시림프절 수술의 성적 평가)을 시작하여 현재 86명의 환자가 임상시험에 참여, 종료함			
◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성명	정소연, 이은숙, 김석원, 이시연, 권영미, 신윤정	

Project Summary

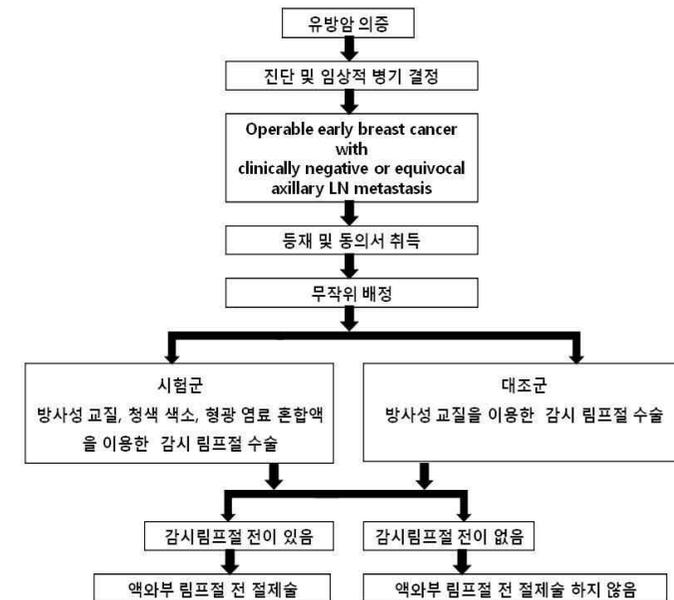
Title of Project	Assessment of sentinel lymph node operation using the mixture of indocyanine green, blue dye and radio-colloid in the breast cancer patients
Key Words	Sentinel lymph node, Multimodal, Breast cancer
Project Leader	So-Youn Jung
Associated Company	National Cancer Center
<p>Purpose: Sentinel lymph node (SLN) biopsy is a standard surgery for axillary staging of early breast cancer. This study aimed to evaluate the identification rate and surgery time of SLN biopsy with the multi-modal method using the mixture of indocyanine green (ICG) fluorescence, RI and blue dye as a new method, in comparison with the RI, in clinically node negative breast cancer patients.</p> <p>Methods: In this phase-II randomized study, 86 patients with clinically node negative breast cancer were randomized to receive periareolar injection of the mixture including ICG fluorescence, RI and blue dye or the only RI for SLN biopsy. We compared the identification rate, the number of SLN, and detections time of SLN biopsy between these two groups.</p> <p>Results: The mean age of the multimodal group and the only RI group was 48.2 years and 51.0 years (p=0.12), respectively. There were no differences of histopathologic factors including tumor size, node positivity, hormone receptor positivity and HER2 positivity between two groups. Sentinel lymph nodes were identified in all patients of both groups (100% in the multimodal group vs 100% in the RI group). The average number of SLN in the mixture group was more than that of the RI group (3.4 ± 1.37 vs 2.3 ± 1.04 p<0.001). The time to excise the first SLN was similar in each group (6.5 ± 5.16 min vs 8.0 ± 4.35 min p=0.13). In multimodal group, percutaneous lymphatic drainage was visualized by fluorescent imaging in 90.7% (39 of 43 patients) and all of the first SLN were detected by both ICG fluorescent and RI. After operation, there was no complication including skin staining or necrosis.</p> <p>Conclusions: This study is the first randomize trial which compared the multimodal method using the mixture of ICG fluorescence, RI and blue dye and the conventional RI method for SLN biopsy. The multimodal method is an available method for SLN biopsy, which allows percutaneous visualization of lymphatic vessels and intraoperative lymph node detection.</p>	

1. 연구의 최종목표

- 다중모드 유방암 감시림프절 표지자를 감시림프절 생검에 적용하기 위하여 임상시험을 시행한다.

2. 연구의 내용 및 결과

가. 임상시험의 개요



나. 임상시험 시행

- 임상시험 단계 : Phase II
- 중재모형 : Double-arm (다중모드 감시림프절 표지자 vs. 기존의 방사선 교질 표지자)
- 눈가림 : Single blinding
- 배정 : 무작위배정 (Randomized controlled trial)
- 연구의 관점 : prospective

- 참여기관 : single institute

다. 대상 기준

- Inclusion Criteria:

- 1) 수술 가능한 조기 유방암 환자로 확진 된 경우로서 임상적으로 액와림프절 전이의 증거가 없거나 미약하여 감시림프절 생검이 필요하다고 판단되는 환자
- 2) 동의서를 문서상으로 작성한 20세 이상의 환자.

- Exclusion Criteria :

- 1) 유방암의 과거력
- 2) 국소 진행성 유방암, 전이성 유방암
- 3) 확진되는 액와림프절, 영상의학적 검사상 액와림프절 전이가 분명한 경우
- 4) 액와부 절제 및 절개생검 (excisional or incisional biopsy) 또는 액와절제술 (axillary dissection) 의 과거력
- 5) 선행보조항암화학요법(neoadjuvant chemotherapy)의 과거력
- 6) 임신
- 7) 시험에 동의하지 않는 자
- 8) 20세 미만의 환자

라. 필요 환자수의 추정

- 참여 환자수

임상적으로 감시림프절 생검이 필요하다고 판단되는 조기 유방암 환자 86명

- 선정 근거

현재의 유방암에 대한 동측 액와부 감시림프절 수술은 최소 침습 수술의 대표적인 수술 방법이다. 그러나 유방암에서 동측 액와부에 시행하는 감시림프절에 대하여 현재 시행하는 방사성 교질을 이용한 수술 방법은 눈으로 확인하지 못하고 감마프루브라는 탐촉자를 통하여 그 소리나 시그날의 수치를 이용하여 찾게 되므로 수술 과정 중에서 감시림프절 주위의 조직에 대하여 불필요한 조직손상을 발생시킬 수 있다. 그러나 수술 과정 중에 발생하는 수술의 범위를 측정하는 것은 실제로 불가능한 항목이므로, 감시림프절을 정확하게 국소화함에 대한 성적 평가를 위해서는 비교의 항목으로 색소와 형광염료와 방사성 교질의 혼합액을 이용한 감시림프절의 수술 시간과 기존의 방법인 방사성 교질을 이용한 감시림프절의 수술 시간을 비교하게 되었다.

감시림프절 수술 시간은 액와부 피부에 절개창을 가하고 감시림프절을 절제하여 몸 바깥으로 감시림프절을 채취하는데 걸리는 시간을 의미한다. 현재 사용하는 방사성 교질을 이용한 감시림프절 수술의 소요시간은 대체로 10~50분 정도로 소요된다. 방사성 교질을 이용한 기존의 방법에 비하여 방사성교질과 색소와 형광염료의 혼합액을 이용한 감시림프절 수술의 방법이 더 수술적으로 용이함을 보여주기 위하여 현재 시행하는 방법인 방사성 교질의 방법을 대조군으로 선정하였고, 이는 있을 수 있는 집도의 간의 bias를 줄여 그 신뢰도를 높이고자 함이다.

이에 따라서 본 연구는 기존의 방법인 방사성 교질을 이용한 감시림프절 수술을 받는 환자를 대조군으로 하고, 방사성 교질과 색소와 형광염료의 혼합액을 이용한 감시림프절 수술을 받는 환자군 시험군으로 설계한 randomized phase II 연구이다. 이 연구에서 두 그룹의 결과가 감시림프절 국소화율의 차이를 보이지 않으면서 시험군의 수술 시간이 대조군의 수술시간에 비하여 통계학적으로 의미 있게 감소시킨다는 것을 보일 수 있다면, 이 연구는 최종적인 연구가 아니라 앞으로 방사성 동위원소 사용을 줄이는 방법으로 가는 중간단계이다.

현재 기준에 시행하는 방사성 교질을 이용한 감시림프절 수술의 소요 시간은 짧은 경우에는 10분에서 길게는 40-50 분 정도 소요되는 수술로서, 그 평균은 25-30분이다. 이러한 수술시간을 10분 줄이기 위하여 표준 편차(standard deviation)를 15분으로 하였을 때 그 효과의 크기(effect size)는 10/15, 즉 0.67이다. 이 수술의 소요 시간의 범위는 10분에서 50분으로 그 평균 시간은 약 25-30분으로서 15-22분의 표준편차는 매우 크게 선정된 편이다.

환자군의 수를 결정하는데 있어서 90%의 power로 효과의 크기(effect size) 0.67 이상의 유의성을 보이기 위해서는 환자는 각각의 group에서 39명이 계산되어진다. 탈락자의 수가 거의 없을 것으로 예상하나 불가피한 5%의 탈락자를 고려하여 각 group에서 43명의 환자를 연구할 것이다. 이 연구는 Randomized phase II 연구 이므로 일종의 오류는 10% 양측 검정으로 계산하였다.

중간단계의 모니터링(interim monitoring)을 위하여 전체 환자가 50%에 이르게 되면 감시림프절 국소화율이 기존의 방법인 control group에 비하여 5% 이상 낮게 평가가 되면, 이 연구는 중단되게 된다. 이러한 모니터링은 수술의 시간을 비교하는 primary endpoint를 확인하는 것이 아니므로 최종 결과 분석에 있어서 type I error를 보정할 필요가 없게 된다.

수술자는 4명이 참여할 것이고, surgeon 별로 수술 시간이나 다른 요소의 변동이 크기 때문에 surgeon을 층화 변수로 하여 permuted block randomization을 시행할 것이다.

마. 환자 accrual rate

- 2년의 연구기간 중 국립암센터에 내원하는 조기유방암 환자의 수는 상기 86명을 크게 상회함.

바. 평가 항목

1) 감시림프절 수술 시간 - 1차 연구목적

i. 감시림프절 수술을 위한 피부 절개부터 감시림프절을 몸 바깥으로 채취까지의 시간을 측정

2) 혼합액에 의한 감시림프절 국소화율 (발견율: identification rate) - 2차 연구목적

i. 방사성 + 형광 + 색소 국소화율 = 방사성 or 인도시아닌그린 or 청색색소에 의하여 감시림프절이 국소화된 (발견된) 환자수 / 혼합액을 사용하여 감시림프절을 수술한 환자수

3) 기존의 방법인 방사성 교질에 의한 국소화율 - 2차 연구목적

i. 방사성 교질에 의한 국소화율 = 방사성 교질에 의하여 감시키프절이 국소화된 (발견된) 환자수 / 방사성 교질만을 사용하여 감시키프절을 수술한 환자수

4) 혼합액에 의한 감시키프절 수술환자에서 각각의 방법에 의한 감시키프절 국소화율 - 2차 연구목적

i. 방사성 교질 국소화율 = 방사성 교질에 의하여 감시키프절 국소화된 환자수 / 혼합액을 사용하여 감시키프절 수술한 환자수

ii. 형광 국소화율 = 인도시아닌그린에 의하여 감시키프절 국소화된 환자수 / 혼합액을 사용하여 감시키프절 수술한 환자수

iii. 색소 국소화율 = 청색 색소에 의하여 감시키프절 국소화된 환자수 / 혼합액을 사용하여 감시키프절 수술한 환자수

3. 연구결과 고찰 및 결론

본 연구는 임상적으로 림프절 전이가 없는 유방암 환자에서 수술의 기본 술식인 감시키프절 생검의 방법에 있어 기존의 방법과 인도시아닌그린, 청색색소 및 방사성교질 혼합액을 이용한 감시키프절을 이용한 방법의 효과와 안정성을 비교하고자 하였다.

2011년 9월부터 2012년 12월 까지 총 86명의 환자가 본 연구에 참여하였고, 무작위 배정을 통해 시험군 (인도시아닌그린 형광, 청색색소 및 방사성교질 혼합액을 이용한 감시키프절 수술군) 43명과 대조군 (방사성 교질을 이용한 감시키프절 수술군) 43명으로 배정되어 수술을 받았다.

시험군과 대조군에서 감시키프절의 국소화율은 100%로 동일하였고, 시험군에서 확인된 평균 감시키프절 개수가 상대적으로 많이 나타났다. (시험군, 3.4 ± 1.37 개 vs 대조군 2.3 ± 1.04 개, $p < 0.001$) 첫 번째 감시키프절을 생검하는데 걸린 평균시간은 각각 6.5 ± 5.16 분, 8.0 ± 4.35 분 ($p = 0.13$)으로 유의한 차이의 없었다. (표 1)

표1. 시험군, 대조군에서 감시키프절의 국소화율 비교

	시험군 (환자수=43)	대조군 (환자수=43)	P
국소화율 (%)	100	100	1.00
환자 1인당 확인된 감시키프절수 (평균 ± 표준편차)	3.4 ± 1.37	2.3 ± 1.04	<0.001
첫 번째 감시키프절 생검까지 도달 시간 (분, 평균 ± 표준편차)	6.5 ± 5.16	8.0 ± 4.35	0.13
감시키프절 생검에 걸린 총시간 (분, 평균 ± 표준편차)	17.6 ± 7.10	15.0 ± 7.58	0.09
감시키프절 1개 생검에 걸린 평균 시간 (분, 평균 ± 표준편차)	6.0 ± 3.61	7.3 ± 3.95	0.12

시험군에서 살펴본 각 방법에 따른 감시키프절 국소화율을 비교했을 때 방사성 교질과 인도시아닌그린 형광법이 청색색소를 이용한 방법에 비해 국소화율이 높게 나타났다. (표2)

표2. 시험군, 대조군에서 감시키프절의 국소화율 비교

	총 환자		방사성 교질		인도시아닌그린형광		청색색소	
	환자수	환자수	%	환자수	%	환자수	%	
첫번째 감시키프절 국소화된 환자	43	43	100	43	100	39	90.7	
두번째 감시키프절 국소화된 환자	42	42	100	40	95.3	24	55.8	
세번째 감시키프절 국소화된 환자	34	34	100	34	100	10	29.4	
네번째 감시키프절 국소화된 환자	16	16	100	16	100	5	11.6	

시험군에서 사용된 청색색소는 피부의 색소침착이나 피부 괴사와 같은 합병증이 보고되는 경우가 있으나 본 연구에서는 수술 직후 피부 괴사의 경우는 없었고, 수술 후 3개월, 6개월의 추적검사를 통한 합병증 유무의 확인을 통한 안정성 평가 결과에서도 이차적인 피부 변화나 합병증은 없었다.

4. 연구 성과 및 목표달성도

(1) 연구 성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾
Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial	So-Youn Jung	Breast Cancer Research and Treatment (4.43)	submission	국외 SCI	1110210

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Comparison of sentinel lymph node biopsy guided by the multi-modal method of indocyanine green fluorescence, radioisotope and blue dye versus the radioisotope in breast cancer; A randomized phase II trial	So-Youn Jung et al.	2012 San Antonio Breast Cancer Symposium	국외	1110212
Prediction of the non sentinel metastasis in patients who received neoadjuvant chemotherapy for clinically axillary node metastasis	Seeyoun Lee et al.	2011 American Society of Clinical Oncology annual meeting	국외	1110212

다. 기타 성과

- 2012년 한국 유방암 학회 외과 술기 위원회 발표, Multi-mode sentinel lymph node biopsy

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
- 다중모드 유방암 감시림프절 표지자를 감시림프절 생검에 적용하기 위하여 임상시험을 시행한다	1차년도	- 임상시험 수행을 위한 IRB 승인	1	100
		- 감시림프절 생검과정에 필요한 장비점검 및 준비(수술장에서의 준비)	1	100
		- 다중모드 표지자를 이용하는 감시림프절 생검에 적용하기 위하여 임상시험을 시행한다	1	100
	2차년도	- 개발된 다중모드 표지자를 이용하여 유방암의 감시림프절 임상 시험을 수행	2	100

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
- 임상 시험 수행을 위한 IRB 승인	- 2011년 8월 승인 받음. 심사 과정을 통하여 임상 시험 design이 더 좋은 방향으로 수정되었음
- 감시림프절 생검과정에 필요한 장비 점검 및 준비 (수술장에서의 준비).	- 감시림프절 생검에 필요한 장비 (Visual navigator) 를 수술방에 설치함
- 다중모드 표지자를 이용하는 감시림프절 생검수술과 관련된 임상시험의 일부 수행	- 2011년 10월 24일 임상 시험을 시작하여 2011년 11월 11일 현재 12명의 환자가 임상 시험에 참여함
- 전체 환자가 50%에 이르게 되면 혼합액을 이용한 감시림프절 국소화율 (시험군)이 기존의 방법인 방사선 교질을 이용한 대조군의 감시림프절 국소화율 비교함	- Interim analysis 시행한 결과 기존 방법과 혼합액에 의한 감시림프절의 국소화율 모두 100%
- 다중모드 표지자를 이용한 유방암 감시림프절 임상 시험을 시행하여 결과를 분석	- 임상시험 대상자 86명 실시 후 결과 분석 완료함

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년 후 예상 연구 성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Breast Cancer Research and Treatment (4.43)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구 성과의 활용계획

가) 연구 성과

- 감시림프절에 소요되는 시간과 수술의 범위를 줄일 수 있어서, 점차 늘어나는 초기 유방암 환자들에게 최소 침습적 수술을 현실화 할 수 있는 유방암의 표준 감시림프절 표지자로 이용된다.
- 국제계약업체와의 협조로 제품화된다.

나) 활용계획

- 다중모드 방법을 유방암 감시림프절 생검에 일상적으로 사용할 수 있는 토대를 마련한다.
- 선행 항암 치료 후 수술하는 환자에서 감시림프절 생검에 적용하여 추가 연구를 시행할 수 있다.
- 수련의(Trainee Surgeon)이나 경험이 적은 유방암 수술의가 감시림프절 생검을 좀 더 용이하게 할 수 있는 방법으로 적용 가능하다.
- 다중모드를 이용한 감시림프절 생검 기술에 대해 다기관 연구로의 확대가 가능하다.

6. 참고문헌

- 1) Noguchi M: Sentinel lymph node biopsy and breast cancer. *Br J Surg* 2002, 89(1):21-34.
- 2) Krag D: Current status of sentinel lymph node surgery for breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91(4):302-303.
- 3) Giuliano AE: Lymphatic mapping and sentinel node biopsy in breast cancer. *JAMA* 1997, 277(10):791-792.
- 4) Bostick P, Essner R, Glass E, Kelley M, Sarantou T, Foshag LJ, Qi K, Morton D: Comparison of blue dye and probe-assisted intraoperative lymphatic mapping in melanoma to identify sentinel nodes in 100 lymphatic basins. *Arch Surg* 1999, 134(1):43-49.

- 5) Krag DN, Weaver DL, Alex JC, Fairbank JT: Surgical resection and radiolocalization of the sentinel lymph node in breast cancer using a gamma probe. *Surg Oncol* 1993, 2(6):335-339; discussion 340.
- 6) Sandrucci S, Casalegno PS, Percivale P, Mistrangelo M, Bombardieri E, Bertoglio S: Sentinel lymph node mapping and biopsy for breast cancer: a review of the literature relative to 4791 procedures. *Tumori* 1999, 85(6):425-434.
- 7) Hung WK, Chan CM, Ying M, Chong SF, Mak KL, Yip AW: Randomized clinical trial comparing blue dye with combined dye and isotope for sentinel lymph node biopsy in breast cancer. *Br J Surg* 2005, 92(12):1494-1497.
- 8) Sardi A, Spiegler E, Colandrea J, Frishberg D, Sing H, Regan P, Totoonchie A, Merchant D, Hochuli S, Setya V *et al*: The benefit of using two techniques for sentinel lymph node mapping in breast cancer. *Am Surg* 2002, 68(1):24-28.
- 9) Kitai T, Inomoto T, Miwa M, Shikayama T: Fluorescence navigation with indocyanine green for detecting sentinel lymph nodes in breast cancer. *Breast Cancer* 2005, 12(3):211-215.
- 10) Murawa D, Hirche C, Dresel S, Hunerbein M: Sentinel lymph node biopsy in breast cancer guided by indocyanine green fluorescence. *Br J Surg* 2009, 96(11):1289-1294.
- 11) Ogasawara Y, Ikeda H, Takahashi M, Kawasaki K, Doihara H: Evaluation of breast lymphatic pathways with indocyanine green fluorescence imaging in patients with breast cancer. *World J Surg* 2008, 32(9):1924-1929.