

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일

2017년 10월 26일 (26.10.2017) WIPO | PCT



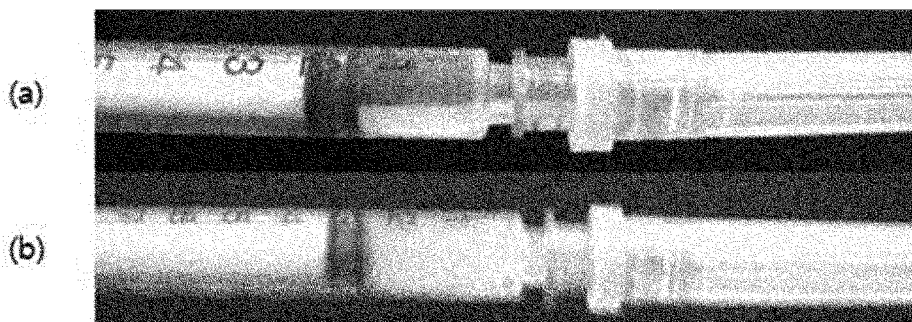
(10) 국제공개번호

WO 2017/183946 A1

- (51) 국제특허분류: *G01N 33/58* (2006.01) *A61K 49/00* (2006.01)  
*G01N 33/60* (2006.01) *A61K 51/12* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2017/004302
- (22) 국제출원일: 2017년 4월 21일 (21.04.2017)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2016-0049425 2016년 4월 22일 (22.04.2016) KR  
10-2017-0050971 2017년 4월 20일 (20.04.2017) KR
- (71) 출원인: 국립암센터 (NATIONAL CANCER CENTER)  
[KR/KR]; 10408 경기도 고양시 일산동구 일산로 323,  
Gyeonggi-do (KR).
- (72) 발명자: 김석기 (KIM, Seok Ki); 03095 서울시 종로구 지  
봉로 87, 101동 1504호(창신동, 창신이수아파트), Seoul  
(KR). 박인수 (PARK, Insoo); 07525 서울시 강서구 허준  
로 139, 305동 1407호(가양동, 강변아파트), Seoul (KR).  
노진희 (NOH, Jin Hee); 10372 경기도 고양시 일산서  
구 후곡로 55, 206동 505호(일산동, 후곡마을2단지아파  
트), Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 다나 (DANA PATENT LAW FIRM);  
06242 서울시 강남구 역삼로 3길 11, 광성빌딩 신관 4~6  
층, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국  
내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,  
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,  
CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC,  
EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU,  
ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA,  
LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN,  
MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE,  
PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE,  
SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT,  
TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역  
내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE,  
LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,  
ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유  
럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,  
FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,  
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

(54) Title: INJECTION COMPOSITION FOR LABELING LESION

(54) 발명의 명칭: 병변 표지용 주사제 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to an injectable composition for labeling a lesion and a method for providing the information on the position of the lesion using the injectable composition. More specifically, the injectable composition for labeling a lesion according to the present invention can include a second composition comprising a biocompatible viscous material in a first composition comprising a complex containing an active ingredient to resolve a problem of the rapid settling of the complex. Additionally, in particular, the injection composition for labeling a lesion according to the present invention can have an effect of allowing a certain amount of a complex to be injected by resolving the problem of the rapid settling of the complex during injection preparations, allowing a certain amount of the complex to be injected, and an effect capable of a convenient and stable use thereof for clinical purposes by resolving the problems of injecting an excessive amount of the complex and the quick spread thereof to the periphery.

[다음 쪽 계속]



WO 2017/183946 A1

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

---

**(57) 요약서:** 본 발명은 병변 표지용 주사제 조성물 및 상기 주사제 조성물을 이용하여 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 병변 표지용 주사제 조성물은 활성성분을 함유하는 복합체를 포함하는 제1조성에 생체적합성 점성물질을 포함하는 제2조성을 포함함으로써, 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있다. 또한, 특히, 본 발명에 따른 병변 표지용 주사제 조성물은 주사 준비 중에 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결하여 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있도록 하는 효과를 갖고, 과량의 복합체가 주사되는 문제 및 복합체가 주변으로 너무 빨리 퍼지는 문제를 해결함으로써 임상적으로 편리하고 안정적으로 사용될 수 있는 효과를 갖을 수 있다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 병변 표지용 주사제 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 병변 표지용 주사제 조성물 및 상기 주사제 조성물을 이용하여 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 일반적으로, 항암치료의 경우, 다양한 항암제를 이용하는 방법이 개발되고 있으나, 아직까지는 외과수술적인 방법을 통해 암세포를 제거하는 방법이 가장 많이 사용되고 있다.
- [3] 그러나, 외과수술적인 방법을 사용할 경우, 수술 후 환자의 건강 및 복지를 위하여 수술 중에 수술범위를 최소화하는 기술이 필수적이다. 특히 유방암의 경우, 유방이 작은 국내여성의 수술시 절제하는 병변이 다른 나라에 비해 적어야 유방보존적 치료법의 목표를 달성할 수 있다.
- [4] 한편, 수술범위는 병변과 병변주위의 가장자리여분부위로 결정된다. 집도의가 병변 부위와 범위를 정확히 알지 못하면 병변주위의 가장자리 여분을 크게 두지 않을 수 없다. 왜냐하면 무작정 수술범위를 줄이다가는 종양이 절제면에 남을 수도 있기 때문이다.
- [5] 그런데, 실제 임상수술에서는 수술집도의가 수술중에 병변을 정확하게 실시간으로 확인하기 위한 방법이 많지 않다. 매우 정밀한 진단방법이 개발되었음에도 이러한 진단방법은 수술중에는 사용하지 못해 실제 수술 중에는 주로 수술자의 촉감이나 시각에 의존하게 되는데 이 경우 병변이 뚜렷하게 구별되는 경우는 드물다.
- [6] 특히, 병변이 작은 경우는 더욱 구별되지 않는다. 미세침습수술 및 보존적 수술의 목적을 달성하기 위하여, 수술자에게 병변을 수술 중에 실시간으로 알려주는 기술이 필요하다.
- [7] 종래의 종양제거 수술, 특히 유방암 수술시에는 환자의 미세병변의 위치를 수술 전에 초음파, 맘모그라피, 혹은 자기공명영상으로 확인하고, 확인된 병변의 위치를 표시한 다음, 표시된 부위의 조직을 제거하게 되는데, 확인된 병변의 위치를 표시하는 방법으로는 피부표면에 그림을 그리는 방법, 와이어를 이용하는 방법, 차콜(charcoal)과 같은 검은 색소를 주사하는 방법 등이 사용되고 있다.
- [8] 그러나, 병변위치를 표시하기 위하여 피부위에 펜을 이용하여 그림으로 그리는 방법은, 매우 유연한 유방조직의 특성상, 진단할 때와 수술장에서 유방의 모양이 많이 변화한다는 점, 유방심부의 병변인 경우에는 피부표면에 표시한 것만으로는 불충분하다는 점 등 때문에, 가장 용이하게 사용할 수 있지만 정확도가 가장 낮다는 단점이 있다.

- [9] 다음으로, 와이어를 이용하여 유방병변에 찌르는 방법은, 본래 와이어를 피부표면으로 수직으로 삽입시켜야 하지만, 초음파 탐침에 영향을 줄 수 있기에 부득이하게 사선으로 삽입시켜야 한다는 점, 와이어의 위치가 유방의 움직임에 따라 이동할 수 있다는 점 등 때문에 예상보다 낮은 정확도를 나타내고, 삽입된 와이어는 수술에 방해가 되며, 와이어의 삽입부위를 추가로 절제하는 기술이 수행되어야 한다는 단점이 있다. 끝으로, 차콜과 같은 색소를 주사하는 방법은, 주사된 색소가 병변에 결합하여 병변의 위치를 정확히 표시할 수 있다는 장점이 있는 반면, 유방심부의 병변인 경우 외부에서는 흑색의 색소를 확인할 수 없고, 색소에 의하여 수술부위가 오염될 수도 있다는 단점이 있다. 상기 열거한 단점은 유방암 이외의 암조직을 제거하기 위한 외과적 수술시에도 공통적으로 적용될 수 있다.
- [10] 이처럼 현재까지 개발된 기술로는 외과적으로 병변, 특히 암병변을 제거하기 위한 수술범위를 정밀하게 결정하기 어렵기 때문에 아직까지는 외과적으로 암병변을 제거할 경우에는 절제범위가 필요이상으로 확대될 수 밖에 없고, 수술후에도 병변이 정상적으로 제거되었는지를 확인하기 위한 검사가 수반되어야만 한다.
- [11] 이러한 문제를 해결하기 위해, 대한민국 등록특허 제10-1552138호에 따르면, 대응집알부민에 생체조직 염색용 색소, 방사성 동위원소 또는 이들의 조합이 결합된 복합체를 포함하는 암 병변 표지용 조성물을 개시함으로써, 표지자가 암의 병변에 효과적으로 흡착되어 병변의 위치를 정확히 표시할 수 있고, 상기 색소를 실시간으로 추적하여 제거하고자 하는 병변의 범위를 정확하게 확인할 수 있도록 하였다.
- [12] 한편, 대한민국 등록특허 제10-1552138호에 개시된 복합체의 수용액 형태는 단수색소형태에 비해 조직에서의 확산이 적어 수술용 표지자로 유리하나, 실제 적용시, 주사 준비 중에 이미 가라앉아 일정한 양이 주사되지 못하는 문제가 발생하였다.
- [13] 또한, 대한민국 등록특허 제10-1552138호에 개시된 복합체의 수용액 형태는, 점도가 낮아 주사시에 과량 혹은 소량으로 주사되는 경향이 있었다. 따라서 주사 경험이 적은 경우나 주사가 어려운 임상상황에서 일정한 대응집알부민 양이 주사되지 못하였다. 주사준비중에 주사기 내에서 가라앉는 경우 덩어리진 채 주사가 되어 표시부위가 일정하지 않은 경우가 관찰되었다. 또한 주사량이 많거나 주사되는 조직이 단단한 경우(반흔조직, 근육조직), 주사된 용액이 느슨한 조직으로 조직과 조직 사이의 막이나 근육만 부위 등을 따라 넓게 퍼지는 경우도 있었다.
- [14] 즉, 근육의 경우 근막을 따라서 넓게 퍼질 수 있고 반흔조직의 경우 반흔조직의 섬유조직의 결을 따라 길게 퍼질 수 있다. 이를 방지하기 위해 비교적 굵은 바늘을 이용하고 소량을 천천히 주사하여야 하지만, 이러한 방식은 임상적으로 사용하는 데에 있어서 매우 불편한 측면이 있다.

- [15] 따라서, 주사제 내에 포함되는 복합체가 덩어리져서 주사바늘을 막거나, 일정한 양으로 주사되지 못하는 문제나 주변 조직으로 너무 빨리 퍼지는 문제를 해결할 수 있는 주사제 조성물 등이 필요한 실정이다.

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [16] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 주사제 조성물 내에 점도를 조절할 수 있는 조성을 추가하여 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있는 병변 표지용 주사제 조성물을 제공하고자 한다.
- [17] 특히, 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결하여, 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있으며, 주변 조직으로 너무 빨리 퍼지는 문제점을 해결할 수 있는 병변 표지용 주사제 조성물을 제공하고자 한다.
- [18] 아울러, 상술한 병변 표지용 주사제 조성물을 이용하여, 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.

#### 과제 해결 수단

- [19] 상기한 목적을 달성하기 위하여,
- [20] 본 발명은 일실시예에서,
- [21] 활성성분을 함유하며, 평균 밀도가 1.1 내지 1.4g/ml인 복합체를 포함하는 제1조성; 및
- [22] 평균 분자량이 0.5 내지 3.0 MDa 인 제2조성; 을 포함하며,
- [23] 상기 제2조성은 상온에서 24 내지 1500cps 의 점도를 갖는 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물을 제공한다.
- [24] 또한 본 발명은 일실시예에서,
- [25] 하기 단계를 포함하는, 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [26] (a) 상기의 주사제 조성물을 개체에서 발생된 병변에 투여하는 단계; 및
- [27] (b) 상기 개체로부터 활성성분의 신호가 발생되어 병변의 위치를 확인하는 단계.

#### 발명의 효과

- [28] 본 발명에 따른 병변 표지용 주사제 조성물은 활성성분을 함유하는 복합체를 포함하는 제1조성에 생체적합성 점성물질을 포함하는 제2조성을 포함함으로써, 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있다.
- [29] 특히, 본 발명에 따른 병변 표지용 주사제 조성물은 주사 준비 중에 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결하여 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있도록 하는 효과를 갖고, 과량의 복합체가 주사되는 문제 및 복합체가 주변으로 너무 빨리 퍼지는 문제를 해결함으로써 임상적으로 편리하고 안정적으로 사용될 수 있는 효과를 갖을 수 있다.
- [30] 또한, 본 발명의 주사제 조성물에 히알루론산 또는 콜라겐 등과 같은 생체적합성 점성 물질이 일정량 첨가됨으로써, 근육조직, 지방조직, 피하조직,

피부조직 등과 같은 여러 조직에 같은 양을 주사하는 경우 상기 점성 물질이 포함되지 않는 경우에 비해 훨씬 일정하게 주사되는 효과를 나타낼 수 있으며, 주사를 빠르게 하는 경우에도 상기 점성 물질이 포함되지 않는 경우에 비해 훨씬 덜 번지는 효과를 나타낼 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [31] 도 1은 ICG-MAA 의 밀도를 추정하기 위한 선형회귀식에 대한 그래프이다.
- [32] 도 2는 ICG와 MAA의 농도변화에 따른 ICG-MAA 복합체의 근적외선형광 신호세기 변화를 나타내는 그래프이다.
- [33] 도 3은 HA 농도가 서로 다른 2개의 MAA를 비교한 사진이다 ((a) 0.1% HA, (b) 0.5% HA).
- [34] 도 4는 HA 가 존재하는/존재하지 않는 MAA 수용액의 명시야 이미지(bright field image)를 나타낸다.
- [35] 도 5는 다양한 MAA 의 농도에서, 5  $\mu$ M 의 ICG 로부터의 형광 신호를 측정하는 것을 나타낸다.
- [36] 도 6은 닭가슴살과 닭모래주머니에 주사한 후 절개전 혹은 절개후에 촬영한 NIRF (Near-Infrared Fluorescent)이미지를 나타낸다.
- [37] 도 7은 주사 바늘 경로에 따라 주사된 닭가슴살을 절개한 후의 가시화된 절단면의 명시야 및 NIRF 이미지를 나타낸다.
- [38] 도 8은 내시경용 주사기(endoscopic catheter)를 이용하여 위암 수술에서의 ICG-MAA-HA 혼합물의 적용성을 실험한 것을 나타낸다.
- [39] 도 9는 히알루론산의 유무에 따라 형광 신호를 측정하는 결과를 나타낸 도면이다((a) 히알루론산이 첨가되지 않음, (b) 0.1% 의 히알루론산 첨가).

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [40] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다.
- [41] 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것을 이해되어야 한다.
- [42] 본 발명에서, “포함한다” 또는 “가지다” 등의 용어는 명세서상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [43] 본 발명은 병변 표지용 주사제 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 주사제 조성물 내에 점도를 조절할 수 있는 조성을 추가하여 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있는 병변 표지용 주사제 조성물에 관한 것이다.
- [44] 특히, 본 발명에 따른 병변 표지용 주사제 조성물은 상기 점도를 조절할 수 있는

조성을 추가하여 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있으며, 이에 따라 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있는 효과가 있다.

- [45] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [46] 본 발명은 일실시예에서,
- [47] 활성성분을 함유하며, 평균 밀도가 1.1 내지 1.4g/ml인 복합체를 포함하는 제1조성; 및
- [48] 분자량에 0.5 내지 3.0 MDa 인 제2조성;을 포함하며,
- [49] 상기 제2조성은 상온에서 24 내지 1500cps 의 점도를 갖는 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물을 제공한다.
- [50] 보다 구체적으로, 대응집알부민에 활성성분이 결합된 복합체는 평균 밀도가 1.1 내지 1.4g/mL 로 비교적 높은 밀도를 갖고 있어, 상기 복합체는 주사 준비중에 주사기 내에서 가라앉는 문제가 발생하였다.
- [51] 따라서, 본 발명은 주사 준비 중에 복합체가 빠르게 가라앉는 문제점을 해결하기 위한 것으로, 상술한 제1조성에 평균 분자량이 0.5 내지 3.0MDa 인 제2조성을 추가하여 점도를 조절한 것을 특징으로 한다.
- [52] 먼저, 이하에서는 본 발명의 제1조성에 대해서 상세히 설명하도록 한다.
- [53] 본 발명의 일실시예에서 제1조성은 대응집알부민(macroaggregated albumin, MAA)에 활성성분이 결합된 조성을 포함할 수 있다.
- [54] 본 발명에서 "대응집알부민(macroaggregated albumin, MAA)"이란, 사람의 혈청알부민을 가열하여 응고시켜서 제조된 직경 10 내지 50 $\mu$ m의 단백질성 입자를 의미한다.
- [55] 한편, 직경이 10nm 미만인 인혈청 알부민과 비교하여 그 구조 및 물리적 특성이 상이할 수 있으며, 상기 MAA는 정맥주사할 경우 약 8 $\mu$ m의 폐모세관에 체류하여 미소색전(微小塞栓)을 일으킬 수 있는 특성을 나타내므로, 상기 특성을 이용하여, 방사성 동위원소로 표지된 MAA는 폐신티그램(폐색전, 폐혈전, 고안병, 폐렴, 폐암 등의 폐혈류 이상이나 우·좌 산트나 폐정맥압항진의 진단)이나 정맥스캔(그 부위에서 중추의 정맥혈진단)이나 정맥스캔(파자병등 말초동맥 혈류이상의 진단) 등에 사용되어 왔다. 본 발명의 MAA는 암 병변조직에 주입하여, 암 병변조직에 표지물질을 결합시키기 위한 매개체로 사용될 수 있다.
- [56] 아울러, 본 발명의 MAA는 제조합 HSA를 이용하여 합성할 수 있고, 자기유래가 아닌 HSA를 이용하여 합성할 수도 있다. 또한, 상업적으로 이용 가능한 것을 구입하여 사용할 수도 있다. 본 발명의 MAA는 암 병변조직에 주입하여, 암 병변조직에 표지물질을 결합시키기 위한 매개체로 사용되는데, 상기 매개체는 표지물질을 흡착시켜서 상기 표지물질이 암 병변조직으로 확산되는 것을 방지하는 역할을 수행할 수 있다.
- [57] 아울러, 본 발명의 일실시예에 있어서, "활성성분"은 복사에너지의 흡수, 방전, 입자살 충격 따위에 의하여 분자, 원자이온 따위의 에너지를 높여 화학반응을

일으키기 쉬운 상태로 되는 성분을 의미하는 것으로, 활성성분은 생체조직 염색용 색소, 방사성 동위원소 또는 이들의 조합을 의미할 수 있다.

[58] 본 발명의 일시시에 있어서, 상기 생체조직 염색용 색소는 육안으로 확인가능한 색소 또는 형광색소일 수 있다.

[59] 상기 육안으로 확인가능한 색소는 중성적, 나일청, 비스마르크브라운, 리튬 카민, 트리판블루, 야누스그린, 메틸 바이올렛, 오-라민, 마라가이트 그린, 사프라닌, 에오신, 콩고레드, 에리스로신, 니그로신, 알시안블루 헤마톡실린, 아닐린블루, 라이트그린 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[60] 본 발명의 일시시에 있어서, 상기 형광색소는 근적외선 형광색소일 수 있으며, 상기 근적외선 형광색소는 인도시아닌그린(indocyanine green, ICG)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[61] 본 발명의 용어 "생체조직 염색용 색소"란, 생체조직에 결합하여 결합된 위치를 표지함으로써, 표지된 위치를 육안으로 또는 검출용 도구를 사용하여 확인할 수 있게 하는 물질을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 생체조직 염색용 색소는 암조직에 결합되어 암 발생부위를 표지하는 용도로 사용될 수 있는 표지물질이 될 수 있는데, 바람직하게는 육안으로 확인가능한 색소, 결합부위에서 형광을 발생시켜서 형광 카메라 등의 장비를 사용하여 검출할 수 있는 형광색소 등을 단독으로 또는 조합하여 사용할 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[62] 본 발명의 용어 "육안으로 확인가능한 색소"란, 생체조직에 결합한 표지물질이 가시광선 영역의 색을 나타내어 표지된 부위를 육안으로 확인할 수 있도록 하는 색소의 일종을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 육안으로 확인가능한 색소는 암이 발생된 부위에 주사하여 외과 수술적인 방법으로 암을 제거할 경우, 절제할 암병변을 명확히 확인할 수 있도록 하여, 암수술의 성공율을 향상시키는 역할을 수행할 수 있다. 상기 육안으로 확인가능한 표지물질은 바람직하게는 중성적, 나일청, 비스마르크브라운, 리튬카민, 트리판블루, 야누스그린, 메틸 바이올렛, 오-라민, 마라가이트 그린, 사프라닌, 에오신, 콩고레드, 에리스로신, 니그로신, 알시안블루 헤마톡실린, 아닐린블루, 라이트그린 등을 단독으로 또는 혼합하여 사용할 수 있으나, 암병변 조직을 확인할 수 있게 하는 목적을 달성할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지는 않는다.

[63] 본 발명의 용어 "형광색소"란, 일정 파장의 빛을 흡수하여 여기상태를 형성한 후, 빛의 침투거리가 최대가 되고, 수분에 의한 오류신호를 최소화 할 수 있는 형광을 발생하는 유기화합물을 의미하는데, 바람직하게는 700nm 내지 3000nm, 바람직하게는 750nm 내지 900nm의 근적외선 파장의 형광을 발생하는 유기화합물인 근적외선 형광색소가 될 수 있다. 상기 근적외선 형광색소로부터 발생하는 근적외선 파장의 형광은 형광 카메라, 형광 센싱 프로브(PCT/KR2011/009271) 등의 장비를 이용하여 사진형태로 촬영하거나 실시간 모니터링할 수 있다. 본 발명의 근적외선 파장의 형광은 생체내에서의

흡수가 다른 과장대에 비해 상대적으로 적어 비교적 생체내의 깊은 부위에서 발생하는 근적외선도 생체외부에서 검출이 가능하다. 본 발명의 목적상 상기 근적외선 영역 형광색소는 암이 발생된 부위에 주사하여 외과 수술적인 방법으로 암을 제거할 경우, 절개하기 전에 암의 병변부위를 정확하게 확인할 수 있도록 하여, 암 수술의 성공율을 향상시키는 역할을 수행할 수 있다. 특히, 상기 육안으로 확인가능한 색소와는 달리, 절개하여 직접적인 병변을 확인하기 전에 체외에서도 병변의 위치를 검출할 수 있으므로, 신속하고 정확한 암수술의 수행을 도모할 수 있게 한다. 상기 근적외선 형광색소로는 바람직하게는 인도시아닌그린 등을 사용할 수 있으며, 인체에 사용가능한 근적외선 형광색소인 한, 본 발명의 범위에 포함될 수 있다.

- [64]     상기 근적외선 형광색소가 MAA에 결합된 복합체는 종양에 축적되는 것으로 알려진 다른 물질에 근적외선 형광색소가 결합된 복합체에 비하여 검출되는 형광신호의 안정성 및 정확성이 우수하다는 장점을 나타내므로, 미세병변을 발견할 수 있는 비율이 높고, 병변 절제 정확도를 향상시킬 수 있다.
- [65]     본 발명의 용어 "인도시아닌그린(indocyanine green, ICG)"이란, 생물학 또는 의학분야에서 널리 사용되는 근적외선 영역의 형광 영상용 염료를 의미하는데, 인체에 주입된 후 한 시간 정도 지나면 분해되어 없어지거나 대소변으로 배출되는 특성이 있어 인체에 사용 가능한 형광염료로 임상적 적용에 유리하다. 실제로, 인도시아닌그린을 이용하여 인체에 적용한 사례는 여러 논문에 보고된 바 있고, 일례로 유방암환자 18명에서 안전하게 임상적으로 사용하였음이 보고되었다(T. Kitai, et al., Breast Cancer, 12:211-215, 2005). 아울러, 상기 근적외선 형광색소를 흡착결합시키는 것은, 본 발명의 MAA에 근적외선 형광색소를 혼합시키는 단계를 통하여 달성할 수 있다.
- [66]     본 발명의 일 실시예에 의하면, MAA에 ICG가 결합된 복합체(ICG-MAA)의 제조시 높은 수준의 근적외선 형광신호를 나타내는 복합체를 제조하기에 적합한 혼합비율은 0.23mg/ml의 MAA에 대하여는 3.9 $\mu$ M의 ICG, 2.3mg/ml의 MAA에 대하여는 6.5 $\mu$ M의 ICG 및 11.5mg/ml의 MAA에 대하여는 6.5 $\mu$ M의 ICG임을 확인하였다. 생체 내에 주사하는 경우는 생체 내에서의 확산 등으로 농도가 변화하므로 주사시점에 정확한 농도를 정할 수 없으나 실험적으로 주사주입이 용이한 2 내지 4 mg/ml의 MAA에 대하여 6.5 $\mu$ M의 ICG에서 가장 형광이 높은 값을 나타냄을 확인하였으므로, 바람직하게는 2 mg/ml의 MAA에 대하여 6.5 $\mu$ M의 ICG를 사용할 수 있다.
- [67]     본 발명의 용어 "방사성 동위원소"란, 원자번호가 같지만 원자량이 상이하고 방사능을 발산할 수 있는 원소를 의미하는데, 감마선이나 다른 아원자 입자를 방출하여 방사성 감쇠를 하는 특성을 이용하여 일반적으로 질병을 진단하는데 중요한 표지자로 사용되기도 한다. 본 발명의 목적상 상기 방사성 동위원소는 근적외선 형광색소에서 발생하는 형광이 검출되지 않은 정도의 심부조직에 암이 발생된 부위에 주사하여 외과 수술적인 방법으로 암을 제거할 경우,

절개하기 전에 암의 병변부위를 정확하게 확인할 수 있도록 하여, 암 수술의 성공율을 향상시키는 역할을 수행할 수 있다. 상기 방사성 동위원소는 암의 병변에 결합할 수 있는 MAA에 표지할 수 있는 특성을 나타내는 것이라면 특별히 제한되지 않으나, 바람직하게는 H-3, C-14, P-32, S-35, Cl-36, Cr-51, Co-57, Co-58, Cu-64, Fe-59, Y-90, I-124, I-125, Re-186, I-131, Tc-99m, Mo-99, P-32, CR-51, Ca-45, Ca-68 등이 될 수 있고, 보다 바람직하게는 의학적으로 사용되는 I-124, I-125, I-131, Cu-64, Tc-99m, Mo-99, CR-51, Ca-45, Ca-68 등이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 Tc-99m을 사용할 수 있다.

- [68] 본 발명의 용어 "Tc-99m"란, 테크네튬(technetium, Tc)의 방사성 동위원소로서, 6시간의 짧은 반감기를 가지고, 감마선을 발생시켜 영상용으로 사용되며, 피폭량이 매우 적고, 조직투과도가 우수하며, 일부 색소에서 나타나는 알레르기 반응도 일어나지 않기 때문에, 의학연구에 널리 사용된다.
- [69] 본 발명의 용어 "개체"란, 암이 발병하여 병변을 나타낼 수 있고, 본 발명의 암 병변 표지용 복합체 또는 조성물이 투여될 수 있는 살아있는 유기체를 의미한다.
- [70] 본 발명에서 제공하는 병변 표지용 주사제 조성물을 생체내의 암 병변조직에 투여할 경우, 투여된 암 병변에 결합되어 병변의 위치를 색깔, 근적외선 형광, 방사능 또는 이들의 조합을 통하여 표지할 수 있고, 상기 표지를 검출함으로써 암 병변의 위치, 크기 등을 수술중에 실시간으로 검출할 수 있으므로, 외과적인 암 병변의 제거시 정확성을 향상시킬 수 있고, 정상조직의 과다한 손실을 방지할 수 있다.
- [71] 아울러, 본 발명의 주사제 조성물에 포함된 복합체는 다른 물질에 생체조직 염색용 색소를 결합시킨 복합체에 비하여, 생체내의 암 병변에서 장기간 동안 잔류할 수 있으므로, 암 병변의 외과적인 절개시 뿐만 아니라, 외과적인 시술에 의한 암 병변 절제의 정확도를 용이하게 확인할 수 있다. 예를 들어, 초음파 등을 통하여 수술전 미세병변의 위치를 확인한 후, 본 발명의 복합체를 병변부위에 주입하고, 수 시간 후 수술 중에도 안정하고 정확하게 병변부위를 확인할 수 있다.
- [72] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 MAA 는 완충액에 대하여 1 내지 8 mg/ml 의 농도로 사용되는 것이 바람직하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [73] 본 발명의 일실시예에 있어서, 1 내지 8 mg/ml 의 MAA 에 대하여 상기 ICG는 4 내지 250 $\mu$ M 이 사용되는 것이 바람직하다. MAA의 용해도를 고려할 때 더욱 바람직하게는, 2 내지 4 mg/ml 의 MAA 에 대하여 ICG 6.5  $\mu$ M 이 사용될 수 있다. 하지만 체내의 주사 후 조건에 따라 최대의 형광세기를 보이도록 실시예에서는 기술한 범위내에서 적절한 MAA와 ICG의 농도는 조정이 가능하다.
- [74] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방사성 동위원소는 H-3, C-14, P-32, S-35, Cl-36, Cr-51, Co-57, Co-58, Cu-64, Fe-59, Y-90, I-124, I-125, Re-186, I-131, Tc-99m, Mo-99, P-32, CR-51, Ca-45, Ca-68 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

- [75] 다음으로, 이하에서는 본 발명의 일실시예에 따른 제2조성에 대해서 상세히 설명하도록 한다.
- [76] 본 발명의 일실시예에 따른 제2조성은 분자량이 0.5 내지 3.0MDa 이고, 생체적합성 점성물질을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [77] 특히, 제2조성은 소정의 점도를 갖고 있어, 병변 표지용 주사제 조성물에 추가함으로써, 제1조성에 포함되는 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있으며, 이에 따라 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있는 효과가 있다.
- [78] 상기 제2조성의 분자량은 0.5 내지 3.0MDa 일 수 있으며, 또는 1.0 내지 2.0MDa 일 수 있다. 제2조성은 비교적 작은 분자량과 소정의 점도를 가지고 있어, 제1조성에 포함되는 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 있다.
- [79] 여기서, 분자량의 단위 "Da"은 질량을 표시하는 단위로서, 산소원자 질량의 1/16을 1dalt on 이라 할 수 있다.
- [80] 아울러, 제2조성은 상온에서 5 내지 1500cps 의 점도를 갖을 수 있으며, 100 내지 900cps를 갖을 수 있으며, 바람직하게는 100 내지 350cps 의 점도를 갖을 수 있다.
- [81] 보다 구체적으로, 상온에서 제2조성의 점도가 5cps 미만인 경우에는 점도가 작아서, 제1조성에 포함되는 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결할 수 없으며, 1500cps 를 초과하는 경우에는 점도가 매우 높아, 조직에 주사시 높은 압력에 의해서 주사가 힘들어지는 어려움을 겪을 수 있다.
- [82] 본 발명의 일실시예에 있어서, 제2조성은 생체적합성 점성 물질을 포함할 수 있으며, 상기 생체적합성 점성 물질은 히알루론산(Hyaluronic acid, HA) 또는 콜라겐일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [83] 바람직하게는 상기 생체적합성 점성 물질은 히알루론산일 수 있다.
- [84] 본 발명의 일실시예에 있어서, 제2조성은 전체 주사제 조성물에 대하여 0.2 %(w/v) 내지 1 %(w/v) 로 첨가될 수 있다.
- [85] 보다 구체적으로, 제2조성이 전체 주사제 조성물에 대하여, 0.2%(w/v) 미만으로 포함되는 경우, 주사제 조성물의 현탁성 유지 시간이 짧아 복합체가 빠르게 가라앉아 조직에 일정한 양으로 주사시키기 어려울 수 있으며, 특히, 조직 내 주사시 한꺼번에 과량이 주사되거나 주변으로 너무 빨리 퍼지는 문제가 발생할 수 있다.
- [86] 또한, 전체 주사제 조성물에 대하여, 상기 제2조성이 1%(w/v)를 초과하게 되면, 제2조성의 농도에 의하여 점도가 높아져 주사시 높은 압력이 가해져 맨손으로는 주사하기 어려울 수 있다.
- [87] 하나의 양태로서, 주사제 조성물을 18 내지 26G 바늘을 포함하는 주사기에 담지된 상태에서 0.2 %(w/v) 내지 1 %(w/v) 로 첨가될 수 있으며, 다른 양태로서, 내시경용 주사기를 이용하는 경우 0.2 내지 0.5%(w/v)를 포함할 수 있다.
- [88] 한편, 본 발명의 일실시예에 따른 주사제 조성물은
- [89] 상온에서 측정시, 하기 수학적 1을 만족하는 병변 표지용 주사제 조성물을

제공하는 것을 특징으로 한다.

[90] [수학식 1]

[91]  $|T_2 - T_1| < 15\%$

[92]  $T_1$ 은 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm에 대한 투과도(%)이고,

[93]  $T_2$ 는 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm에 대한 투과도(%)이다.

[94] 여기서, 투과도라 함은 물질층을 빛이 통과하는 정도, 물질층에 대한 입사광의 세기를  $I_1$ , 이것을 통과하여 나온 빛의 세기를  $I_2$ 라 할 때,  $T = I_2/I_1$ 을 투과도라 할 수 있다.

[95] 아울러, 투명 용기는 가로×세로×높이가  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$ 일 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[96] 또한, 용기 높이의 1/4 지점이라 함은 상기 용기의 바닥면에서 1/4 해당하는 지점을 의미할 수 있다.

[97] 하나의 예로, 0.4%(w/v)의 히알루론산을 첨가하여 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서, 상기 용기의 1/4 지점에서 측정한 550nm에 대한 투과도( $T_1$ )가 0.4%일 수 있으며, 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 상기 용기의 1/4 지점에서 측정한 550nm에 대한 투과도( $T_2$ )는 78.71%일 수 있다.

[98] 즉, 주사제 조성물 내에 점도를 조절할 수 있는 제2성분을 첨가함으로써, 현탁성 유지시간이 길어지게 되어,  $|T_2 - T_1| < 15\%$ 일 수 있다.

[99] 이에 더하여, 본 발명의 일실시예에 따른 주사제 조성물은 상온에서 측정시, 하기 수학식 2를 만족하는 병변 표지용 주사제 조성물을 제공할 수 있다.

[100] [수학식 2]

[101]  $|F_2 - F_1| < 20\text{gf}$

[102]  $F_1$ 은 제조된 주사제 조성물을 26G 바늘이 결합된 주사기에 담지된 상태에서 주사 시작시 측정한 활주력이고,

[103]  $F_2$ 는 제조된 주사제 조성물을 26G 바늘을 포함하는 주사기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 주사할 때의 주사 시작시 측정한 활주력이다.

[104] 여기서, 활주력의 단위인 "gf"는 힘의 크기를 의미하는 것으로, g중(gravitational force)를 의미할 수 있으며, 1g중은 0.0098N을 나타낸다.

[105] 아울러, "활주력"이라 함은 조성물을 주사기 내에 담지시킨 상태에서 주사기로 주사시 손가락에 걸리는 힘(gliding force) 의미할 수 있다.

[106] 한편, 26G(Gauge)는 바늘내경이 0.241mm인 주사기를 의미할 수 있다.

[107] 특정 양태로서, 상기 수학식 2에 따라 측정된 활주력은 5gf 이하일 수 있다. 즉,  $|F_2 - F_1|$ 은 5gf 이하일 수 있다.

[108] 특히,  $|F_2 - F_1|$ 에 대한 수치 값이 적게 나온다는 것은 주사제 조성물을 소정시간

방치한 후 주사시작과 주사할 때의 중간 기점의 압력이 차이가 작다는 것을 의미하며, 이는 120분 방치하여도 주사제 조성물의 현탁성이 유지된 것을 의미하며, 특히, 주사제 조성물 내에서 복합체의 침강속도가 늦춰진 것을 의미한다.

- [109] 아울러, F<sub>2</sub>는 120 내지 165gf의 활주력을 갖는 것을 특징으로 하며, 보다 구체적으로, 제2조성이 전체 주사제 조성물에 대하여 0.2 %(w/v) 내지 1 %(w/v) 포함될 때, F<sub>2</sub>는 120 내지 165gf 일 수 있다.
- [110] 즉, 본 발명의 주사제 조성물에 히알루론산 또는 콜라겐 등과 같은 생체적합성 점성 물질을 일정량 첨가함으로써, 주사 준비 중에 복합체가 빠르게 가라앉는 문제를 해결하여 일정한 양의 복합체가 주사될 수 있도록 하는 효과를 갖고, 과량의 복합체가 주사되는 문제 및 복합체가 주변으로 너무 빨리 퍼지는 문제를 해결할 수 있다. 또한, 본 발명의 주사제 조성물에 히알루론산 또는 콜라겐 등과 같은 생체적합성 점성 물질이 일정량 첨가됨으로써, 근육조직, 유방조직, 피하조직, 피부조직 등과 같은 여러 조직에 같은 양을 주사하는 경우 상기 점성 물질이 포함되지 않는 경우에 비해 훨씬 덜 번지는 효과를 나타낼 수 있으며, 주사를 빠르게 하는 경우에도 상기 점성 물질이 포함되지 않는 경우에 비해 훨씬 덜 번지는 효과를 나타낼 수 있다.
- [111] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 병변은 암 병변일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [112] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 암은 전립선암, 유방암, 자궁암, 피부암, 자궁경부암, 폐암, 뇌종양, 위장관 종양, 간암, 연조직육종, 림프종 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 고형암일 수 있다.
- [113] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명에 따른 주사제 조성물은 암 제거수술중에 실시간으로 상기 암 병변 조직의 크기 및 위치를 확인하는데 사용될 수 있다.
- [114] 또한 본 발명은, 하기 단계를 포함하는, 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다:
- [115] (a) 본 발명에 따른 주사제 조성물을 개체에서 발생된 병변에 투여하는 단계; 및
- [116] (b) 상기 개체로부터 활성성분의 신호가 발생되어 병변의 위치를 확인하는 단계를 포함한다.
- [117] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [118] <제조예>
- [119] 제조예 1: 대응집알부민(macroaggregated albumin, MAA)의 제조
- [120] 대응집알부민(macroaggregated albumin, MAA)를 제조하기 위하여, 0.1 M 아세트이트 완충액(pH 5.4, Sigma Aldrich, Korea)에 희석된 2% 인혈청알부민

10ml(SK플라즈마)을 염화주석 50mg(Sigma Aldrich, Korea)과 혼합하고 10분간 실온에서 강하게 교반한 다음 70°C에서 20분간 추가로 교반하여 반응시켰다.

[121] 그리고, 반응이 종료된 후 추가 응집을 막기 위하여, 상기 반응물을 얼음에 넣어 급속 냉각시켰다.

[122] 다음으로, 냉각시킨 반응물에 20% 인혈청알부민 0.35ml을 추가한 다음(인혈청으로 70 mg) 실온에서 10분간 교반하였으며, 상기 반응물을 MAA기준 1, 2, 4, 8mg씩 유리바이알에 분주하고 동결건조하여, 동결건조된 MAA 키트를 제조하였다.

[123] 최종적으로 MAA키트에는 동결건조된 MAA가 각각 1, 2, 4, 8 mg이 포함되어었다.

[124] 상술한 바와 같이 기술한 것처럼 MAA를 제조할 때 아세트이트 완충액이 제조과정 중에 사용되고 동결건조된 MAA키트에는 주사용수 혹은 HA가 포함된 주사용수로 녹여 사용된다.

[125] 제조예 2: 인도시아닌그린(ICG)이 결합된 MAA 기반 표지자의 제조

[126] 제조예 2-1: ICG와 MAA의 혼합비율 결정

[127] 근적외선형광을 나타내는 MAA 기반 표지자를 제조하기 위하여, 실시예 1에서 제조한 MAA에 근적외선형광을 나타내는 인도시아닌그린(Indocyanine green, ICG, 제일약품, 디아그노그린주)을 결합하여, 복합체(ICG-MAA)를 제조하였다.

[128] 이 때, 가장 강한 근적외선형광을 나타낼 수 있는 ICG와 MAA의 혼합비를 결정하기 위하여, 1.3 내지 1032 $\mu$ M의 ICG와 0 내지 11.5mg/ml의 MAA를 다양한 비율로 반응시켜서 각각의 ICG-MAA 복합체를 제작하였다.

[129] 그리고, 제작된 각각의 ICG-MAA 복합체에서 나타나는 근적외선형광의 신호세기를 측정하였다(표 1 및 도 2).

[130] 도 2는 ICG와 MAA의 농도변화에 따른 ICG-MAA 복합체의 근적외선형광 신호세기 변화를 나타내는 그래프이다.

[131] [표1]

| ICG( $\mu$ N)    | MAA (mg/ml)  |               |               |               |
|------------------|--------------|---------------|---------------|---------------|
|                  | 0            | 0.23          | 2.3           | 11.5          |
| 1.33.96.59.012.9 | 181202122893 | 4252383227128 | 2384244564443 | 5309319799429 |
| 25.838.751.664.  | 634664253993 | 7131623301366 | 4225516210175 | 1556336628024 |
| 577.4103258516   | 743322891397 |               | 553916221     | 418294602094  |
| 7741032          | 13930        |               |               |               |

[132] 표 1과 도 2를 참조하면, MAA를 처리하지 않은 경우에는 25.8 $\mu$ M의 ICG가 가장 높은 값의 근적외선형광 신호세기를 나타내었고, 0.23mg/ml의 MAA를 처리한 경우에는 3.9 $\mu$ M의 ICG가 가장 높은 값의 근적외선형광 신호세기를 나타내었다.

[133] 아울러, 2.3mg/ml의 MAA를 처리한 경우에는 6.5 $\mu$ M의 ICG가 가장 높은 값의

근적외선헤광 신호세기를 나타내었고, 11.5mg/ml의 MAA를 처리한 경우에도 7.5 $\mu$ M의 ICG가 가장 높은 값의 근적외선헤광 신호세기를 나타낸 것을 확인할 수 있었다.

[134] 한편, 생체에 주사하는 경우는 생체 내에서의 확산 등에 의해서 MAA와 ICG의 농도가 변할 수 있어 주사시점에 정확한 농도를 정할 수 없으나 실험적으로 2 mg/ml의 MAA에 대하여 6.5 $\mu$ M의 ICG에서 가장 형광이 높은 값을 나타냄을 확인하였다.

[135] **제조예 2-2: ICG가 결합된 ICG-MAA 복합체의 제조**

[136] MAA 농도가 1, 2, 4, 8 mg/ml 인 ICG-MAA 복합체를 제조하였다. ICG-MAA 복합체 제조 반응은 상온에서 진행하였다.

[137] 보다 구체적으로, 1, 2, 4, 8 mg의 MAA 동결건조 키트에 각각 13 $\mu$ M ICG 0.5ml씩을 가하고 약 1분간 가볍게 흔들어 반응시켰다. 이어 각각 증류수 0.5ml을 가하여 약 5분간 가볍게 흔들어 MAA 농도가 상이한 6.5 $\mu$ M ICG-MAA 복합체를 제조하였다.

[138] <실시예>

[139] **실시예 1: ICG-MAA-HA 제조**

[140] MMA 농도가 1, 2, 4, 8 mg/ml 이고 ICG 6.5  $\mu$ M, 히알루론산(hyaluronic acid, HA, Shandon Focuschem Biotech Co.)의 농도가 0.5% 인 ICG-MAA-HA 주사제 조성물을 제조하였다.

[141] 보다 구체적으로, 1, 2, 4, 8 mg의 MAA 동결건조 키트에 각각 13 $\mu$ M ICG 0.5ml씩을 가하고 약 1분간 가볍게 흔들어 반응시킨다. 이어 미리 용해된 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 2, 4, 8 % (w/v) HA (1,448 kDa)를 각각 0.5ml 첨가한 후 약 5분간 강하게 교반하여 골고루 혼합이 되게 하였다.

[142] 결과적으로 최종 조성비율로 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 4 % (w/v)의 HA가 각각 함유된 ICG 농도가 6.5 $\mu$ M인 MAA 1, 2, 4, 8 mg/ml 인 ICG-MAA-HA 주사제 조성물 총 32가지를 제조하였다.

[143] 참고로, ICG-MAA-HA 제조공정은 상온에서 진행하였다.

[144] <실험예>

[145] **실험예 1. ICG-MAA 복합체의 밀도 측정**

[146] ICG-MAA 복합체의 밀도를 측정하였다.

[147] ICG-MAA 복합체는 생체물질 등의 형태를 손상하지 않고 수용액 상태에서 실제 사용형태로 밀도를 직접측정하기는 어려워서 간접적으로 농도에 따른 밀도의 변화를 참고로 하여 ICG-MAA 복합체의 밀도를 측정하였다.

[148] 상기에서 제조한 MMA 농도가 2mg/ml 이고 ICG 6.5  $\mu$ M의 ICG-MAA 복합체를 이용하여 밀도를 측정하였으며, 20mg/ml ~ 200mg/ml(2 ~ 20%(w/v) 농도의 ICG-MAA 복합체를 이용하여, 하기와 같이 ICG-MAA의 밀도를 측정하였다.

[149] 보다 구체적으로, 상온에서, 투명용기에 20mL의 증류수를 채운 후, 상술한 ICG-MAA 복합체를 투여하여, 상기 ICG-MAA 복합체를 포함하는 증류수의

변화되는 밀도를 측정하였으며, 특히, ICG-MAA 복합체의 농도에 따라 변화되는 밀도를 측정하였다.

[150] 참고로, ICG-MAA 복합체를 증류수에 투여하여 용해하고 나니, 증류수가 백색의 현탁성을 띄는 것을 확인할 수 있었다.

[151] 표 2는 ICG-MAA 복합체를 포함하는 증류수에 대한 밀도를 나타낸 표이며, ICG-MAA 복합체가 포함되는 농도별로 기술하였다.

[152] [표2]

| ICG-MAA 복합체 % (w/v) | 밀도(g/ml) |
|---------------------|----------|
| 20                  | 1.0616   |
| 12                  | 1.0395   |
| 10                  | 1.0338   |
| 8                   | 1.0283   |
| 6                   | 1.0228   |
| 4                   | 1.0177   |
| 2                   | 1.0118   |

[153] 표 2를 참조하여 선형회귀분석으로 선형회귀식을 구하였으며, 외삽으로 100%일 때의 밀도를 측정하였다 ( $0.2757 \times 100 + 1.0064 = 1.2821$ ).

[154] 그 결과, 회귀식에 따라 ICG-MAA 복합체의 밀도는 1.2821g/mL 로 추정되었다(도 1).

[155] 아울러, 20분 후 증류수에 ICG-MAA 복합체를 용해한 증류수를 확인하여 보니, 용기 아래부분에 하얀색의 현탁액이 가라앉아있는 것을 확인할 수 있었다.

[156] 결과적으로, ICG-MAA 복합체의 밀도는 1.2821g/mL 로 상온에서의 증류수의 밀도(0.99821g/mL) 보다 높다는 것으로 판단하였다.

[157] 실험예 2. 주사제 조성물의 유용성 평가

[158] 실험예 2-1: 주사제 조성물로서의 ICG-MAA-HA 의 유용성-1

[159] 주사제 조성물로서의 ICG-MAA-HA의 유용성을 판단하기 위하여, HA의 농도에 따른 ICG-MAA-HA의 현탁성 유지 시간을 측정하였다. 참고로, MAA는 2mg/ml 의 농도를 이용하였으며, ICG-MAA-HA 최종 주사물은 MAA와 ICG가 완전히 용해되면 연한 녹색의 현탁액의 성상을 보인다.

[160] 보다 구체적으로, ICG-MAA-HA 주사물이 제조된 후에 현탁성을 유지하는 시간을 측정하였으며, 추가되는 HA의 농도에 따른 현탁성을 유지하는 측정하였다. 여기서, 현탁성은 500nm 빛의 투과도 20% 를 기준으로 가라앉은 부위와 부유부위가 구분되는 기준이 보이는 시점으로 현탁성 유지시간을 정의하였다.

[161] 그리고, 그 결과를 표 2에 기술하였다.

[162] 표 2는 ICG-MAA-HA 주사물이 제조된 후에 현탁성이 유지되는 시간을 HA 용제의 농도별로 나타낸 표이다.

[163] [표3]

| HA 용제의 농도(% w/v)                                                          | 현탁성 유지 시간 |
|---------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 0% (단순 주사용수)                                                              | 10분 이내    |
| 0.1%                                                                      | 30분 이내    |
| 0.2%                                                                      | 2시간 이내    |
| 0.3%                                                                      | 8시간 이내    |
| 0.4%                                                                      | 14시간 이내   |
| 0.5%                                                                      | 24시간 이내   |
| * 가볍게 교반하는 경우, 강하게 기계식교반기로 교반하는 경우 용해시간은 단축되거나 교반하는 강도에 따라 용해시간이 일정하지 않음. |           |

[164] 표 3를 참조하면, HA가 첨가되지 않은 주사제 조성물은 HA를 첨가한 조성물보다 현탁성 유지 시간이 비교적 짧았으며, HA가 첨가되는 비율이 증가할수록 현탁성 유지 시간이 길어지는 것을 확인할 수 있었다.

[165] 한편, 0.1%의 HA가 주사제 조성물에 첨가되었을 때, 현탁성 유지 시간이 30분 이내로 증가하였으나, HA의 농도가 0.2% (w/v)부터 현탁성이 2시간을 넘었으며, HA의 농도가 0.3% (w/v)부터는 현탁성이 8시간을 넘는 것을 확인하였다.

[166] 즉, 0.2% (w/v)부터 실제 주사용 제제로 효과적인 것으로 판단되었다.

[167] 도 3은 HA 농도가 서로 다른 2개의 MAA를 비교한 사진을 나타낸다.

[168] 보다 구체적으로, 상기에서 제조한 ICG-MAA-HA 주사제를 30분이 지난 후에 촬영한 사진으로, 도 3(a)는 0.1%의 HA가 첨가된 MAA의 사진이며, 도 3(b)는 0.5%의 HA가 첨가된 MAA의 사진이다.

[169] 도 3을 참조하면, 0.1%의 HA가 첨가된 주사제 조성물은 빠르게 가라앉는데 반해, 0.5%의 HA가 첨가된 주사제 조성물은 장시간동안 가라앉지 않음을 알 수 있었다. 즉, 도 3로부터, ICG-MAA에 0.5%의 HA가 첨가된 ICG-MAA-HA는 주사 준비 중에 빠르게 가라앉지 않을 것이므로, 주사제 조성물로서 매우 유용하다는 것을 알 수 있다.

[170] 실험예 2-2: 주사제 조성물로서의 ICG-MAA-HA의 유용성-2

[171] 실험예 2-2에서는 히알루론산(HA)의 농도에 따라 주사시 손가락에 걸리는 힘(gliding force)을 여러 조건에서 측정하고, 주사제 조성물로서 ICG-MAA-HA의 유용성을 판단하였다.

[172] 보다 구체적으로, 최종 제조된 주사물을 주사제로 사용하는 경우 주사의 용이성을 18G, 21G, 22G, 23G, 26G 바늘을 각각 장착한 1cc 일회용 주사기를 이용하여 평가하였다.

- [173] 한편, 조성물의 특성으로 주사기로 주사시 걸리는 부하는 18 Gauge (바늘내경: 0.838mm), 21G (바늘내경: 0.495mm), 22G (바늘내경: 0.394mm), 23G (바늘내경: 0.318mm), 26G (바늘내경: 0.241mm) 별로 조사하였다.
- [174] 아울러, 1.8m 의 연결도관이 있는 내시경 주사기(7 Fr, 길이 180 cm, MTW, Germany)를 용하여 저항성(주사시 손가락에 걸리는 힘)을 측정하였다.
- [175] 그리고, 그 결과를 아래의 표 4에 기술하였다.
- [176] [표4]

| gf  | 주<br>사<br>기 | 물    | 히알루론산 (% (w/v)) |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|-----|-------------|------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|     |             |      | 0.10            | 0.20  | 0.30  | 0.40  | 0.50  | 0.60  | 0.70  | 0.80  | 0.90  | 1.00  | 2.00  | 3.00  |
| 26G | 79          | 91   | 107.5           | 110.0 | 115.0 | 120.0 | 125.0 | 131.0 | 136.0 | 142.0 | 146.0 | 152.5 | 253.2 | 주사불가  |
| 23G | 82.6        | 81   | 97.5            | 100.0 | 102.0 | 104.0 | 107.0 | 112.0 | 120.0 | 128.0 | 132.0 | 138.0 | 240.6 | 주사불가  |
| 22G | 72.5        | 72.5 | 92.5            | 93.0  | 95.0  | 97.0  | 99.0  | 110.0 | 115.0 | 118.0 | 120.0 | 124.0 | 223.8 | 690.4 |
| 21G | 67          | 72.5 | 87.5            | 93.0  | 90.0  | 91.0  | 92.5  | 97.0  | 102.0 | 105.0 | 110.0 | 114.0 | 220.5 | 650.2 |
| 18G | 62          | 75   | 78              | 81.0  | 83.0  | 85.0  | 87.5  | 91.0  | 95.0  | 99.0  | 102.0 | 104.0 | 208.9 | 640.3 |
| 7Fr |             | 145  | 280             | 380   | 490   | 600   | 631   | 780   | 주사불가  | 주사불가  | 주사불가  | 주사불가  | 주사불가  | 주사불가  |

- [177] 일반적으로, 임상에서 사용하는 주사바늘을 이용하는 경우 60에서 140gf 의 힘이 주사시에 가해졌다. 히알루론산(HA) 1% 농도까지는 주사시 저항이 크지 않아 사용에 어려움이 없었다.
- [178] 반면, 도관의 길이가 길어 저항이 많이 걸리는 내시경용 주사기 바늘(7Fr, 180cm)을 이용하는 경우, 물은 140gf 의 힘이 들었고, HA 의 농도가 0.6%(w/v) 일 경우는 780gf 의 힘이 걸려서 현저히 높은 압력이 가해져야 주사가 가능하였다.
- [179] 개인차가 있지만 700gf 의 gliding force 가 걸리면 조직에 주사하는 것이

어려움을 느껴 정밀하게 주사하는 것은 어렵다. 한편, 내시경용 주사기 바늘(7Fr, 180cm)을 이용하였을 때, HA 0.60%은 780gf의 힘이 걸려서 현저히 높은 압력이 가해져야 주사가 가능하였으며, HA 0.70% 부터는 저항이 커져 맨손으로는 주사할 수 없었다.

[180] 즉, 히알루론산은 일반적인 주사조건에서는 1%(w/v)까지 가능하였으며, 바늘이 길고 주사기에서 바늘까지 가는 도관으로 연결된 특수주사기(내시경 주사기)의 경우에는 0.5%(w/v) 까지 손으로 주사할 수 있었다.

[181] 한편, 조직과 직접적으로 맞닿는 일반적인 주사기(26G ~ 18G)를 이용하는 경우에는 조직에 부드럽게 주사하는 것이 바람직하여, 200gf 미만의 힘이 걸리는 것이 이상적이며, 히알루론산의 경우 1%(w/v) 까지는 200gf 미만의 힘으로 주사가 가능한 것을 확인할 수 있었다.

[182] 실험예 3. ICG-MAA-HA의 침강에 따른 주사기 압력의 변화

[183] 실험예 3-3: ICG-MAA-HA 의 침강에 따른 주사기 압력의 변화-1

[184] 실시예 3-3에서는 히알루론산이 첨가되는 주사제 조성물을 바로 주사하는 경우의 압력(A)과 상기 주사제 조성물을 120분 방치한 후 조성물이 침강한 다음 주사기에 걸리는 압력(B)을 측정하여 아래의 표에 기술하였다.

[185] 이때, 주사기는 26G를 사용하여 주사기의 활주력(gliding force)을 측정하였다.

[186] 아울러, 활주력의 단위는 gf으로, g중(1g중=0.0098N)을 나타낸다.

[187] [표5]

| HA(%) | 0   | 0.1   | 0.2   | 0.3   | 0.4   | 0.5   | 0.6   | 0.7   | 0.8   | 0.9   | 1.0   |
|-------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| A     | 91  | 107.5 | 110.0 | 115.0 | 120.0 | 125.0 | 131.0 | 136.0 | 142.0 | 146.0 | 152.5 |
| B     | 400 | 310   | 125   | 126   | 130   | 140   | 144   | 152   | 160   | 155   | 165   |
| B-A   | 309 | 202.5 | 15    | 11    | 10    | 15    | 13    | 16    | 18    | 9     | 12.5  |

[188] 표 5를 참조하면, 히알루론산이 첨가되는 주사제 조성물을 바로 주사하는 경우의 압력(A)과 상기 주사제 조성물을 120분 방치한 후 조성물이 침강한 다음 주사기에 걸리는 압력(B)은 히알루론산의 농도가 높아질수록, 압력(A, B)이 높아지는 것을 확인할 수 있었다.

[189] 아울러, 히알루론산의 농도가 높아질수록 주사제 조성물을 120분 방치한 후에 주사기에 걸리는 압력(B)과 주사제 조성물을 바로 주사하는 경우의 압력(A)과 차이가 많이 나지 않았다. 특히, 히알루론산의 농도가 0.2% (w/v)일 때부터 1.0% (w/v) 일 때까지 평균 B-A 값은 13.27778gf 이었으며, 이에 따른 표준편차는 2.969755이었다.

[190] 실험예 3-3: ICG-MAA-HA 의 침강에 따른 주사기 압력(gliding force)의 변화-2

[191] 일반적으로, 히알루론산의 농도에 따라 26G 의 주사기에 걸리는 압력은 약 20gf(0.1% HA)에서 70gf(1.0% HA) 증가한다. 주사제 내에 히알루론산 외에

주사제 조성물에 따라 주사기에 걸리는 압력은 증가하며, 일 예로 8mg/ml의 경우 약 15gf의 힘이 더 가해진다.

[192] 따라서, 실험예 3-3에서는 히알루론산이 첨가되는 주사제 조성물을 바로 주사하는 경우와 상기 주사제 조성물을 120분 방치한 후 조성물이 침강한 다음 주사기에 걸리는 압력을 측정하여 아래의 표에 기술하였다.

[193] 참고로, 표 6의 (A)는 주사제 조성물을 바로 주사하는 경우를 나타내며, (B)는 주사제 조성물을 120분 방치한 후, 주사 시작시 압력을 나타낸다. 아울러, (C)는 주사제 조성물을 120분 방치한 후, 주사할 때의 중간 기점의 압력(손가락에 걸리는 힘, gliding force)을 나타낸다.

[194] [표6]

| HA(%) | 0   | 0.1 | 0.2 | 0.3   | 0.4   | 0.5   | 0.6   | 0.7   | 0.8   | 0.9   | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
|-------|-----|-----|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| A     | 115 | 120 | 123 | 127.5 | 132.5 | 137.5 | 143.5 | 148.5 | 154.5 | 158.5 | 165 | 252 | 721 |
| B     | 400 | 310 | 125 | 126   | 130   | 140   | 144   | 152   | 160   | 155   | 165 | 257 | 711 |
| C     | 110 | 120 | 125 | 128   | 138   | 138   | 142   | 150   | 155   | 160   | 170 | 253 | 718 |

[195] 표 6을 참조하면, 히알루론산이 들어있지 않은 경우 2시간 방치후에 주사 시작시, 압력이 400gf 이 넘어간 것을 확인할 수 있다. 이는 주사제 내의 조성물에 의해서 주사바늘이 막힌 것을 의미한다.

[196] 그리고, 조성물에 의해 막힌 바늘이 뚫리면서 120gf 으로 압력이 감소하였다.

[197] 히알루론산이 0.2%(w/v) 이상인 경우는 120분 방치한 후에도 주사제 내의 조성물에 의해서 주사바늘이 막히지 않아서, 바로 주사하는 경우와 같이 작은힘(200gf) 으로도 주입이 가능하였다.

[198] 즉, 히알루론산을 적정량(0.2% 이상) 첨가함으로써, 침강속도를 늦출 수 있었으며, 침강된 조성물에 의해 주사바늘이 막혀 과도한 힘을 가해야 주사가 시작되는 단점을 해결할 수 있었다.

[199] 한편, 히알루론산의 농도가 1%(w/v)를 초과하는 경우에는 히알루론산의 점도 때문에 주사시 저항감이 심하였다.

[200] 실험예 3. ICG-MAA-HA의 침강에 따른 투과도의 변화

[201] 실시예 1에서 제조된 주사제 조성물을 이용하여, 시간에 따른 흡광도의 변화를 측정하였다. 참고로, MAA는 2mg/ml를 포함하는 주사제 조성물을 이용하여 흡광도의 변화를 측정하였다.

[202] 아울러, 투과도는 UV 분광계(TECAN. infinite M200PRO)을 이용하여 가시광선 투과도를 측정하였다.

[203] 보다 구체적으로, 주사제 조성물을 1×1×3 cm<sup>3</sup> 크기의 투명 용기에 담지된 상태에서 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 UV 분광계로 투과도 측정시, 550nm 에

대하여 투과도를 측정하였다.

- [204] 이때,  $T_1$ 은 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm 에 대한 투과도(%)이고,  $T_2$ 는 제조된 주사제 조성물을  $1 \times 1 \times 3 \text{ cm}^3$  크기의 투명 용기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm 에 대한 투과도(%)이다.

- [205] [표7]

| HA(%)         | 0.0   | 0.2   | 0.4   | 0.6   | 0.8   | 1.0   | 1.2   | 1.4   | 1.6   | 1.8   | 2.0   |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| $T_1$         | 77.76 | 78.76 | 78.53 | 78.61 | 78.78 | 78.65 | 78.48 | 78.18 | 77.97 | 77.69 | 77.65 |
| $T_2$         | 87.88 | 87.95 | 78.71 | 78.77 | 78.65 | 78.71 | 78.56 | 78.20 | 78.11 | 77.81 | 77.73 |
| $ T_2 - T_1 $ | 10.12 | 9.19  | 0.18  | 0.16  | 0.13  | 0.06  | 0.08  | 0.02  | 0.14  | 0.12  | 0.08  |

- [206] 표 7을 참조하여, ICG-MAA-HA 의 침강에 따른 투과도의 변화를 살펴보면, 히알루론산이 첨가되지 않았을 때에 처음 측정한 투과도가 77.76% 였으며, 120분이 지난 후에는 87.88% 로 투과도가 증가하였다.
- [207] 이는 처음에 주사제 조성물 내에 ICG-MAA 가 용해되어 주사제 조성물이 현탁해 졌다가, 120분이 지난 후에 ICG-MAA 의 입자가 높은 밀도 때문에 아래로 가라앉음으로써, 용기 바닥으로부터의 1/4 지점에서의 투과도는 높아진 것이다.
- [208] 아울러, 히알루론산(HA)이 0.4% (w/v)이상부터는 처음에 측정한 투과도( $T_1$ )와 120분 방치한 후에 측정한 투과도( $T_2$ )의 차이는 1% 미만으로 그 차이가 크지 않았다.
- [209] 이는 ICG-MAA-HA를 주사제 조성물에 포함됨으로써 시간이 지나도 현탁성이 유지되는 것을 의미한다.
- [210] 결과적으로, 주사제 조성물에 히알루론산(HA)을 첨가하면서, ICG-MAA 복합체의 점도를 제어함으로써, 주사제 조성물에 있어서, 상기 복합체를 빠르게 가라앉는 것을 방지할 수 있다는 것을 알 수 있었다.
- [211] 한편, 히알루론산 0.2% (w/v) 일 때,  $T_1$ 과  $T_2$ 의 차이가 9.19% 로 차이가 있어, 상기 복합체가 2시간 이내에 가라앉았다는 것을 확인할 수 있으나, 통상적으로, 주사제 조성물로 사용시 제조 후 30분 이내에 투여하기 때문에 ICG-MAA의 복합체에 0.2% 의 히알루론산(HA)을 첨가하였을 때도 실제 주사용 조성물로 사용 가능한 것으로 판단하였다.
- [212] 실험예 4. HA 의 적용 여부에 따른 ICG-MAA 의 명시야 이미지
- [213] 도 4은, 0.5% (w/v) HA, 6.5  $\mu\text{M}$  ICG, 2, 4, 8 mg/ml MAA가 포함된 ICG-MAA-HA와 6.5  $\mu\text{M}$  ICG, 2, 4, 8 mg/ml MAA가 포함된 ICG-MAA 주사물의 명시야 이미지(bright field image)를 나타낸다. MAA 입자 분포는 혈구계가 있는

광학현미경을 사용하여 가시화되었다. 각 정사각형은  $0.05 \text{ mm}^2$  을 나타낸다. 상부 행 (도 4-1,2,3)은 HA 가 함유되지 않은 ICG-MAA 를 나타내고, 하부 행 (도 4-4,5,6) 은 0.5 % HA (w/v) 가 함유된 ICG-MAA-HA 를 나타낸다. MAA 농도는 각각 하기와 같다: 도 4의 1 & 4: 2 mg/ml; 도 4의 2 & 5: 4 mg/ml; 도 4의 3 & 6: 8 mg/ml. 상부행에서 MAA 입자는 모두 가라앉아 명시야에서 모두 초점이 맞아 선명한 영상을 얻었으나 하부행에서는 MAA 입자가 가라앉고 주사물내에서 부유하고 있어 일부입자는 초점이 맞아 선명한 영상을 얻었고 일부 입자는 초점이 맞지 않는 양상을 보였다.

[214] 실험예 5. ICG-MAA-HA 에서의 형광 유지 특성

[215] 도 5는, 다양한 MAA 의 농도에서,  $5 \mu\text{M}$  의 ICG 와 0.5% HA 가 첨가된 ICG-MAA-HA 로부터의 형광 신호를 측정된 것을 나타낸다. 도 5-A는 명시야 이미지를 나타내고, 도 5-B는 NIRF 이미지를 나타낸다. 도 5-A 및 5-B의 좌측에서부터, MAA 농도는 0 mg/ml, 1 mg/ml, 2 mg/ml, 4 mg/ml 및 8 mg/ml 이다. NIRF 이미지는 740 nm 의 피크 파장을 갖는 17 개의 2 mA NIR LED 를 발광시킴으로써 수득되었다. 상기 이미지는 하기 카메라 설정에 따라 AVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies) 에 의해 촬영되고 가시화되었다: 노출 시간: 200 ms; 게인: 200; 타겟 게조치: 125; 밝기: 16.

[216] 도 5-A 및 5-B의 사이에서, 물에 존재하는 MAA 는 에펜도르프 튜브(ependorf tubes)의 벽에 매우 빠르게 가라앉기 때문에 본 발명자들이 명시야 이미지를 촬영한 후 각 튜브를 혼합하고 다시 위치시킴으로써 튜브 위치의 작은 변화가 발생하였다.

[217] 도 5-C는 다양한 농도의 MAA 에 존재하는  $5 \mu\text{M}$  ICG 의 형광 발광 스펙트럼을 나타낸다. 상대 형광 세기(relative fluorescence intensity)(a.u: arbitrary unit)가 컴퓨터로 조절된 형광 마이크로플레이트 리더(computer-controlled fluorescence microplate reader)(Safire II; Tecan, Durham, NC)를 이용하여 수득되었다. ICG 에 대한 여기(excitation) 파장은 760 nm 이었고, 발광 파장은 790 내지 850 nm 이었다.

[218] 즉, 도 5-A 내지 5-C 로부터, ICG-MAA-HA 에서도 형광이 유지됨을 알 수 있다.

[219] 실험예 6. 닭가슴살에 ICG-MAA-HA 를 주사한 결과

[220] 도 6은, HA 0.5% (w/v) 첨가에 따른 차이를 보이는 실험결과이다. 또한 일반적인 조직강도를 보이는 닭가슴살과 치밀한 조직강도를 보이는 닭모래주머니를 이용하여 조직 강도에 따른 차이를 확인하였다. ICG-MAA-HA와 ICG-MAA  $50 \mu\text{l}$ 를 닭가슴살, 닭모래주머니에 5 mm 깊이로 각각 5번씩 천천히 주사하였다. NIRF 이미지는 740 nm 의 피크 파장을 갖는 17 개의 2 mA NIR LED 를 발광시킴으로써 수득되었다. 상기 이미지는 하기 카메라 설정에 따라 AVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies) 에 의해 촬영되고 가시화되었다: 노출 시간: 195 ms; 게인: 170; 타겟 게조치: 125; 밝기: 16. 주사를 준비하고 주사하기 까지 약 2-3분의 시간이 소요되었다. ICG-MAA 는 닭가슴살

5번중 2번, 닭모래주머니 5번중 3번에서 ICG-MAA 입자가 가라앉아 주사바늘이 막혀 주사가 힘들었다. 주사가 힘든 경우 다시 주사기를 흔든 후, 빠른 시간에 다시 주사하였다. 이에 반해 ICG-MAA-HA는 10번 시도중 주사가 잘 되지 않는 경우는 없었다.

- [221] 도 6-1과 6-2는 닭가슴살에 0.5% HA가 포함된 ICG-MAA-HA를 주사하고 촬영한 절개전 및 절개후 NIRF 이미지이다. 표시가 적절히 잘 분포되어 있음을 볼 수 있다. 도 6-3과 6-4는 닭모래주머니에 0.5% HA가 포함된 ICG-MAA-HA를 주사하고 촬영한 절개전 및 절개후 NIRF 이미지이다. 역시 표시가 적절히 분포되어 있음을 볼 수 있다. 도 6-5와 6-6은 닭가슴살에 0.5% HA가 포함되지 않은 ICG-MAA를 주사하고 촬영한 두 번의 NIRF 이미지이다. 도 6-5는 적절히 표시가 되었지만 도 6-6은 전체 주사량은 동일함에도, 주사중에 ICG-MAA 입자가 가라앉으면서 적은 양이 주사된 것으로 판단된다. 도 6-7과 6-8은 닭모래주머니에 0.5% HA가 포함되지 않은 ICG-MAA를 주사하고 촬영한 절개전 및 절개후 NIRF 이미지이다. ICG-MAA가 주사 트랙을 따라 역류하는 등 표시가 제대로 되지 않았다.
- [222] 도 7은, 주사 바늘 경로에 따라 주사된 닭가슴살을 절개한 후의 가시화된 절단면의 명시야 및 NIRF 이미지를 나타낸다. ICG-MAA-HA 가 주사된 부위가 명시야 이미지에서 하얀색 원으로 표시되어 있다. NIRF 이미지는 740 nm의 피크 파장을 갖는 17 개의 2 mA NIR LED를 발광시킴으로써 획득되었다. 상기 이미지는 하기 카메라 설정에 따라 AVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)에 의해 촬영되고 가시화되었다: 노출 시간: 195 ms; 게인: 170; 타겟 게조치: 125; 밝기: 16.
- [223] 이로부터, ICG-MAA-HA가 조직(닭가슴살)에 주사된 경우, 형광 특성을 잘 유지할 뿐만 아니라, 번짐성이 매우 덜한 것을 알 수 있다. 즉, ICG-MAA-HA를 사용함으로써 ICG-MAA 복합체가 주변으로 너무 빨리 및 너무 많이 퍼지는 문제가 해결된 것을 확인할 수 있다.
- [224] 실험예 7. 내시경용 주사기를 이용하여 닭가슴살에 ICG-MAA-HA를 주사한 결과
- [225] 도 8은, 내시경용 주사기(endoscopic catheter)를 이용하여 위암 수술에서의 ICG-MAA-HA 혼합물의 적용성을 실험한 것을 나타낸다. 도 8-1 내지 8-3 및 8-5는 명시야 이미지를 나타내고, 도 8-4 및 8-6은 NIRF 이미지를 나타낸다;
- [226] 도 8-1: 폐기가능한 내시경용 주사기를 이용하여 닭가슴살의 한쪽에 ICG-MAA-HA 혼합물[6.5  $\mu$ M ICG, 2 mg/ml MAA, 및 0.5% HA (w/v)]의 주사함;
- [227] 도 8-2: 닭가슴살의 제 2 부위에 상기 혼합물을 주사함;
- [228] 도 8-3: 2 개의 화살표는 주사 부위를 나타냄;
- [229] 도 8-4: 위 벽 안쪽에 있는 것과 같은 주사 부위들의 NIRF 이미지를 나타냄;
- [230] 도 8-5: 주사된 닭가슴살을 뒤집은 이미지를 나타냄;
- [231] 도 8-6: 뒤집혀진 닭가슴살 상의 주사 부위들의 NIRF 이미지를 나타내며, 상기

주사 부위들은 외부 NIR 공급원(sources)을 이용하여 보일 수 있음.

- [232] 상기 NIRF 이미지들은 740 nm의 피크 파장을 갖는 17개의 2 mA NIR LED를 발광시킴으로써 획득되었다. 상기 이미지들은 하기 카메라 설정에 따라 AVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)에 의해 촬영되고 가시화되었다: 노출 시간: 195 ms; 게인: 170; 타겟 게조치: 125; 밝기: 16.
- [233] 이로부터, ICG-MAA-HA가 내시경용 주사기를 이용하여 조직(닭가슴살)에 주사된 경우, 형광 특성을 잘 유지할 뿐만 아니라, 번짐성이 매우 덜한 것을 알 수 있다. 즉, 닭가슴살에서와 마찬가지로 위암 등의 수술을 하는 경우에서도, ICG-MAA-HA를 사용함으로써, 형광 특성을 잘 유지하면서도 ICG-MAA 복합체가 주변으로 너무 빨리 및 너무 많이 퍼지지 않도록 할 수 있음을 알 수 있다.
- [234] 실험예 8. ICG-MAA-HA의 일정한 농도 효과
- [235] 침강속도 증가에 따라 주사시 일정량이 주사되는 효과를 알아보기 위하여, 히알루론산이 첨가되지 않은 ICG-MAA와 0.1%(w/v)의 HA가 첨가된 ICG-MAA-HA 주사제 조성물의 주사량을 100 $\mu$ l씩 연속적으로 튜브에 주사하여, 형광 신호를 측정하였다.
- [236] 한편, 형광 신호는 튜브에 주사하고 5분동안 침강시킨 후 측정하였다.
- [237] 참고로, ICG-MAA 주사제 조성물은 2mg/ml의 MAA의 농도에서, 1.5 $\mu$ M(약 0.001mg)의 ICG가 첨가되었으며, 상기 ICG-MAA에 0.1%(w/v)의 HA가 첨가되었다.
- [238] 도 9는 히알루론산의 유무에 따라 형광 신호를 측정한 결과를 나타낸 도면이다(좌측부터 최초 100 $\mu$ l, (a) 히알루론산이 첨가되지 않음, (b) 0.1%의 히알루론산 첨가).
- [239] 도 9의 NIRF(근적외선 형광) 이미지는 740nm의 피크 파장을 갖는 17개의 2 mA NIR LED를 발광시킴으로써 획득되었다. 상기 이미지는 하기 카메라 설정에 따라 AVT UniCam viewer software (Allied Vision Technologies)에 의해 촬영되고 가시화되었다: 노출 시간: 200 ms; 게인: 200; 타겟 게조치: 125; 밝기: 16.
- [240] 도 9를 참조하면, 히알루론산이 첨가되지 않은 주사제 조성물의 경우, 주사조성물의 용량의 CV(표준편차/평균)가 28%였다.
- [241] 특히, 도 9(a)를 참조하여 형광세기를 비교하여 보면, 좌측과 우측의 형광세기의 차이가 많이 나는 것을 보아 ICG-MAA가 초반에는 많이 주입되고, 뒤로 갈수록 적게 주입되어 일정하게 주사되지 않은 것으로 판단되었다.
- [242] 반면, 도 9(b)를 참조하면, 주사제 조성물에 히알루론산을 첨가한 경우 ICG-MAA가 침강되는 속도가 느려져서 결과적으로 일정한 양의 ICG-MAA가 주사가 가능하다는 것을 알게되었다.
- [243] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을

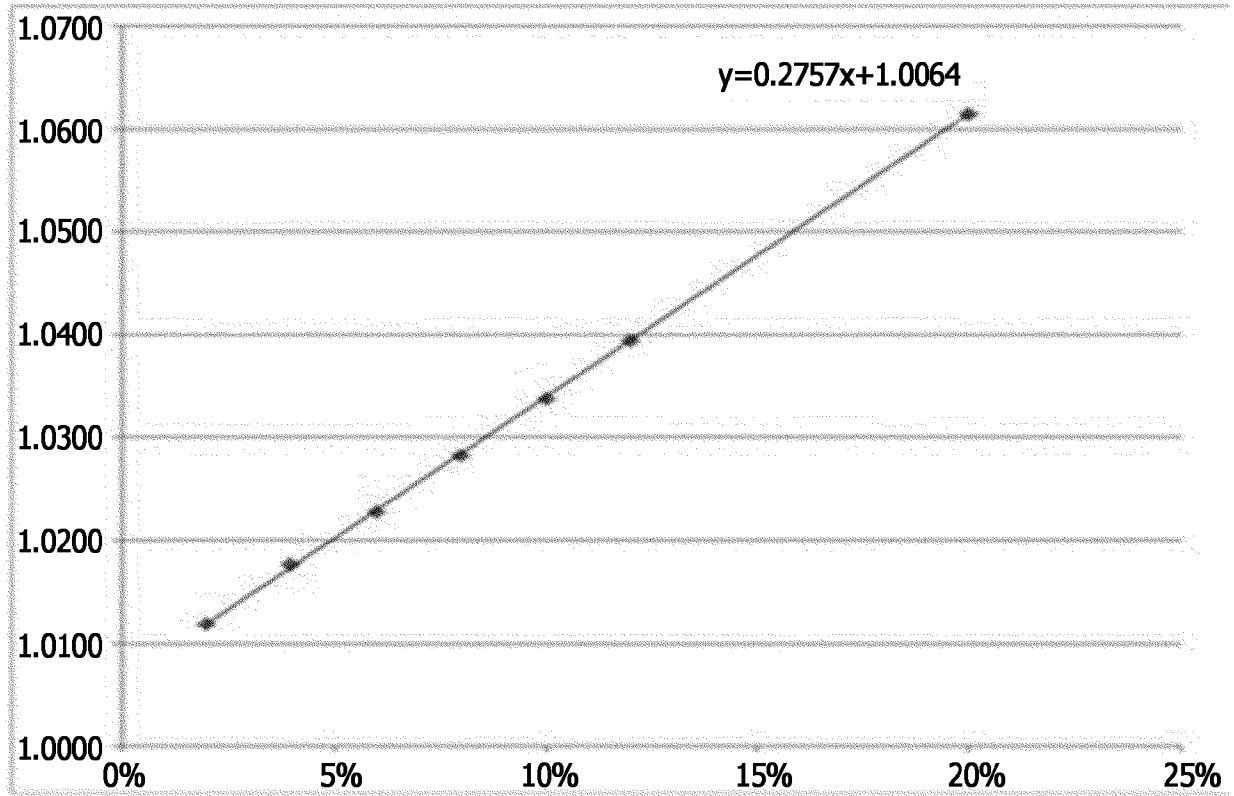
이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 청구범위

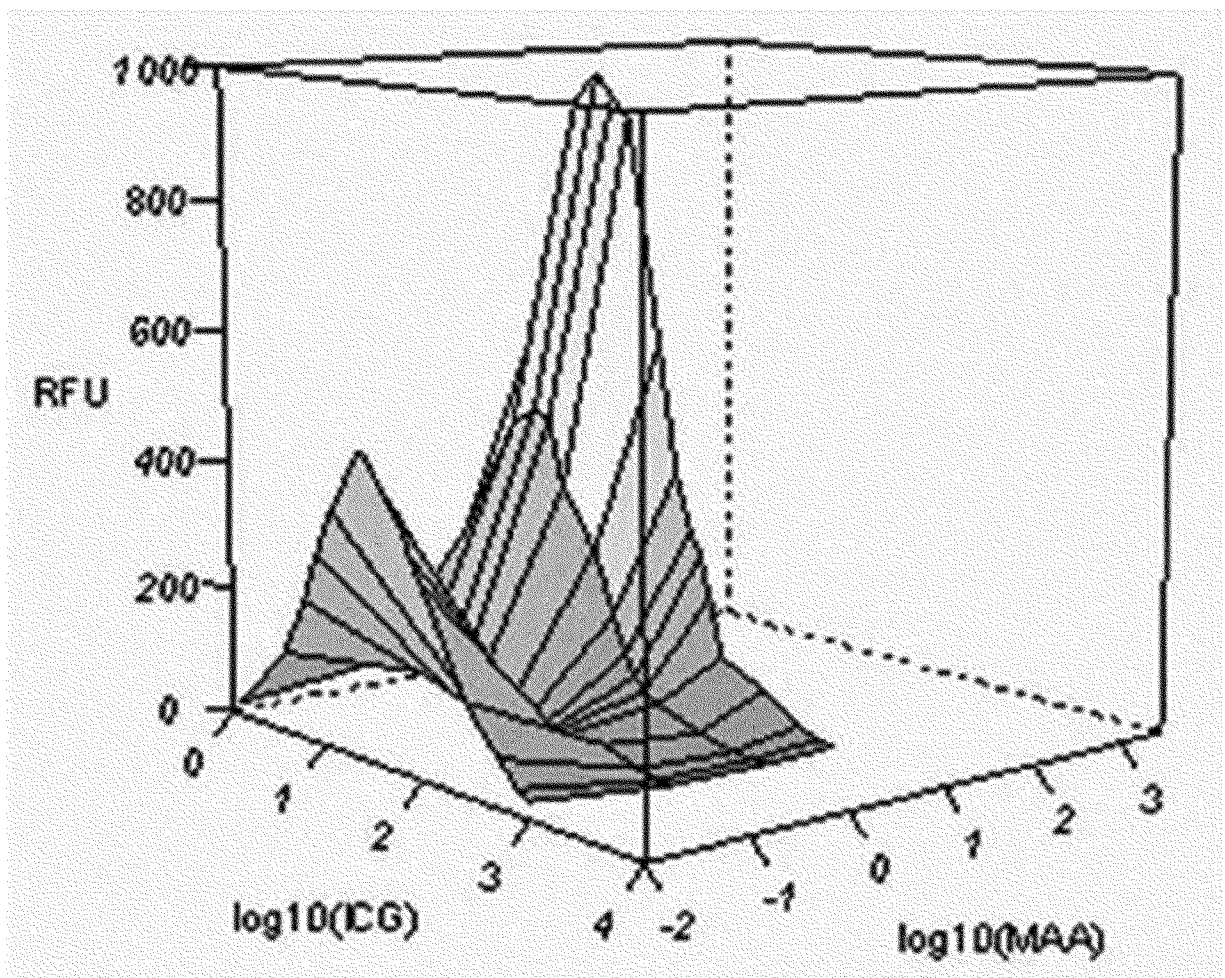
- [청구항 1] 활성성분을 함유하며, 평균 밀도가 1.1 내지 1.4g/ml인 복합체를 포함하는 제1조성; 및  
평균 분자량이 0.5 내지 3.0 MDa 인 제2조성; 을 포함하며,  
상기 제2조성은 상온에서 24 내지 1500cps 의 점도를 갖는 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,  
상기 주사제 조성물은  
상온에서 측정시, 하기 수학식 1을 만족하는 병변 표지용 주사제 조성물:  
[수학식 1]  
 $|T_2 - T_1| < 15\%$   
 $T_1$  은 제조된 주사제 조성물을 1×1×3 cm<sup>3</sup> 크기의 투명 용기에 담지된 상태에서, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm 에 대한 투과도(%)이고,  
 $T_2$  는 제조된 주사제 조성물을 1×1×3 cm<sup>3</sup> 크기의 투명 용기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 상기 용기 높이의 1/4 지점에서 측정한 550nm 에 대한 투과도(%)이다.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,  
상기 주사제 조성물은  
상온에서 측정시, 하기 수학식 2를 만족하는 병변 표지용 주사제 조성물:  
[수학식 2]  
 $|F_2 - F_1| < 20gf$   
 $F_1$  은 제조된 주사제 조성물을 26G 바늘이 결합된 주사기에 담지된 상태에서 주사 시작시 측정한 활주력이고,  
 $F_2$  는 제조된 주사제 조성물을 26G 바늘을 포함하는 주사기에 담지된 상태에서 120분 방치한 후, 주사할 때의 주사 시작시 측정한 활주력이다.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,  
상기 수학식 2에 따라 측정된 활주력은 15gf 이하인 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,  
상기  $F_2$  는  
120 내지 165gf 의 활주력을 갖는 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,  
상기 제1조성은  
대응집알부민(macroaggregated albumin, MAA)에 생체조직 염색용 색소, 방사성 동위원소 또는 이들의 조합이 결합된 복합체를 포함하는 것을

- 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,  
 상기 생체조직 염색용 색소는 육안으로 확인가능한 색소 또는 형광색소이며,  
 상기 방사성 동위원소는 H-3, C-14, P-32, S-35, Cl-36, Cr-51, Co-57, Co-58, Cu-64, Fe-59, Y-90, I-124, I-125, Re-186, I-131, Tc-99m, Mo-99, P-32, CR-51, Ca-45, Ca-68 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 주사제 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,  
 상기 제2조성은  
 히알루론산(Hyaluronic acid; HA) 또는 콜라겐인 주사제 조성물.
- [청구항 9] 제1항에 있어서,  
 제2조성은  
 전체 주사제 조성물에 대하여 0.2 내지 1%(w/v) 포함되는 것을 특징으로 하는 병변 표지용 주사제 조성물.
- [청구항 10] (a) 제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 주사제 조성물을 개체에서 발생된 병변에 투여하는 단계; 및  
 (b) 상기 개체로부터 활성성분의 신호가 발생되어 병변의 위치를 확인하는 단계;를 포함하는 병변의 위치에 대한 정보를 제공하는 방법.

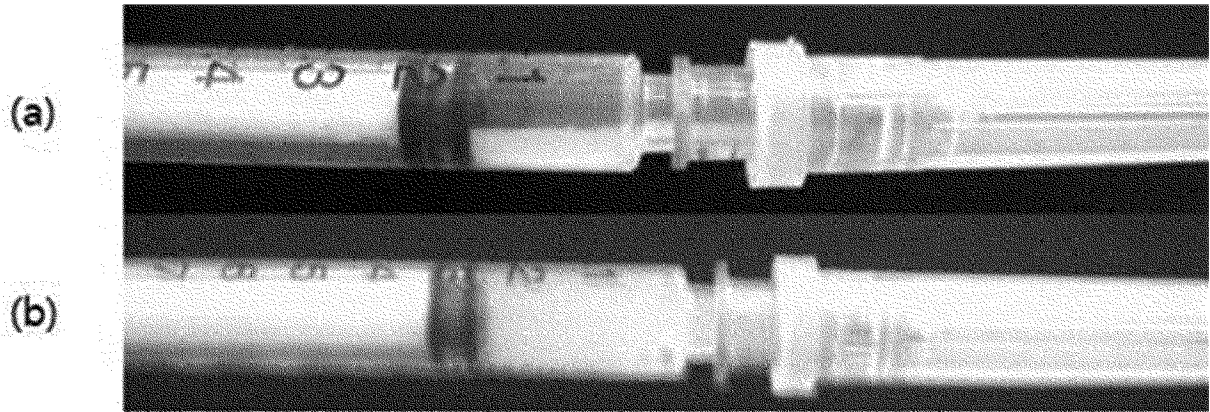
[도1]



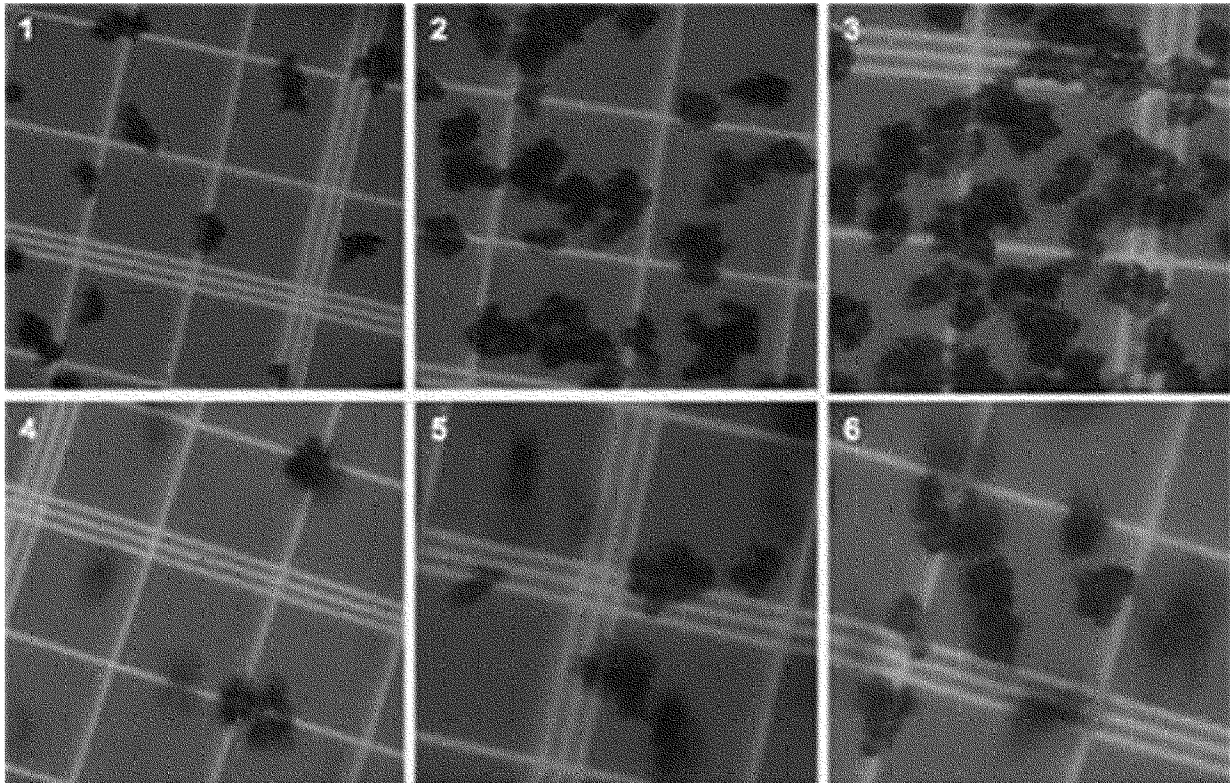
[도2]



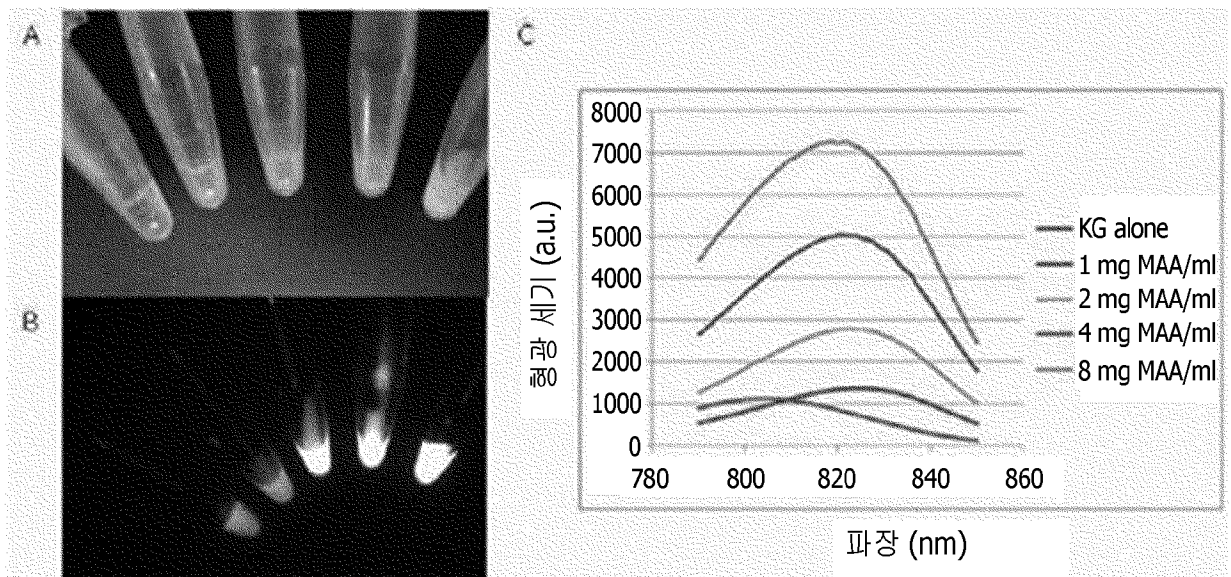
[도3]



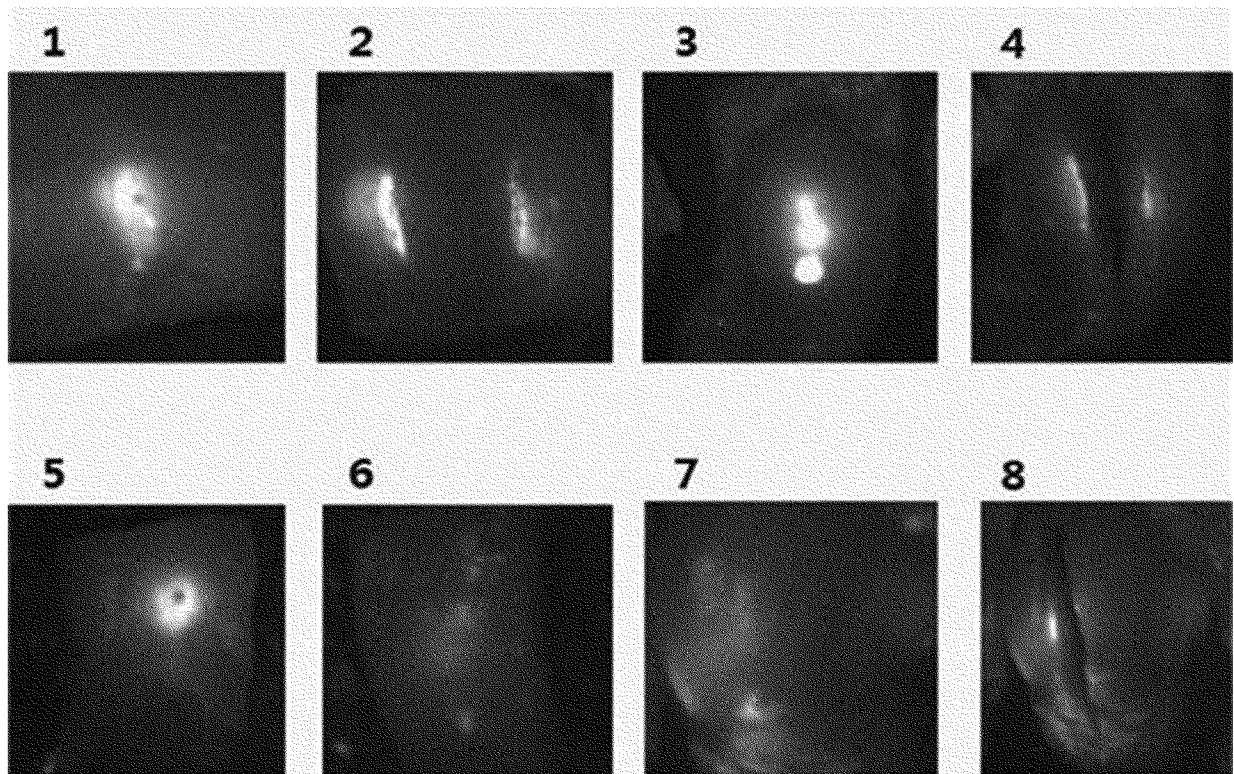
[도4]



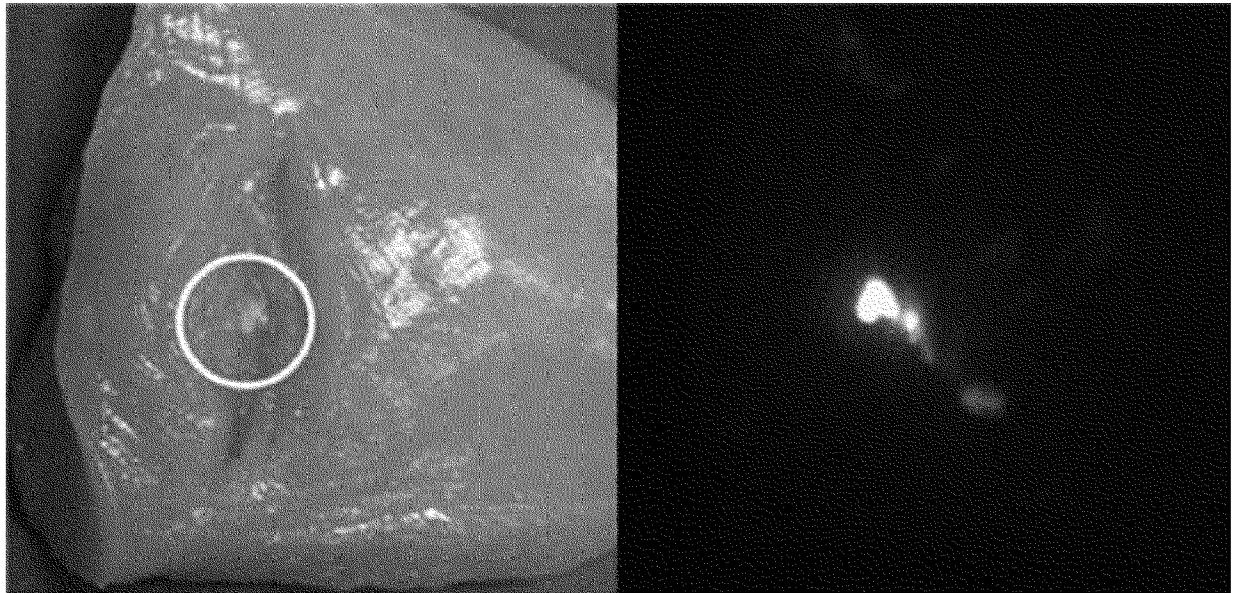
[도5]



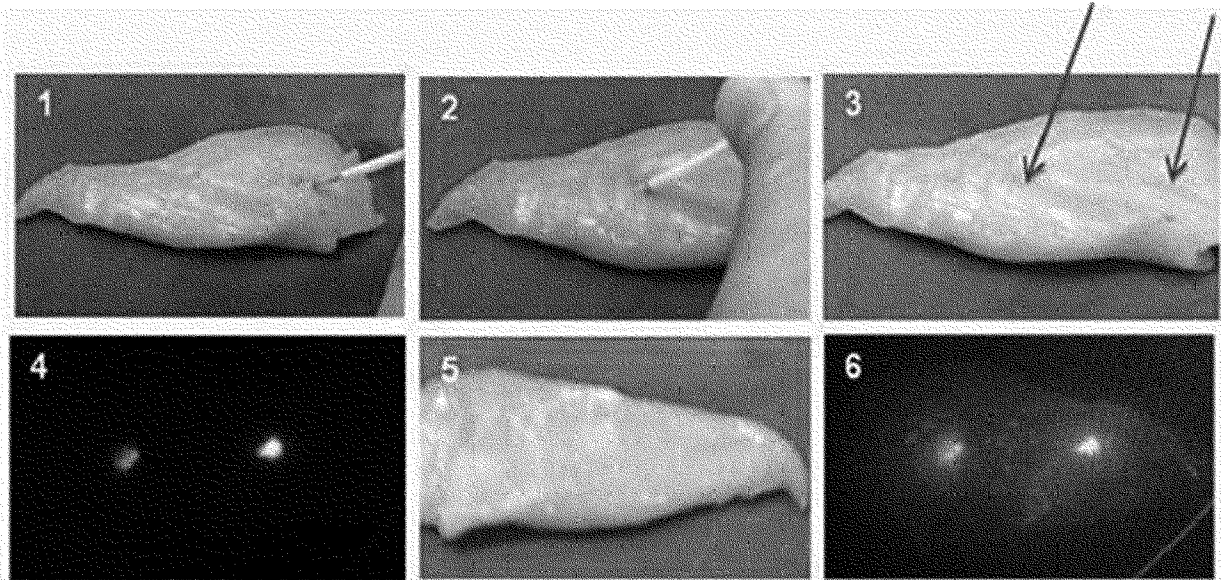
[도6]



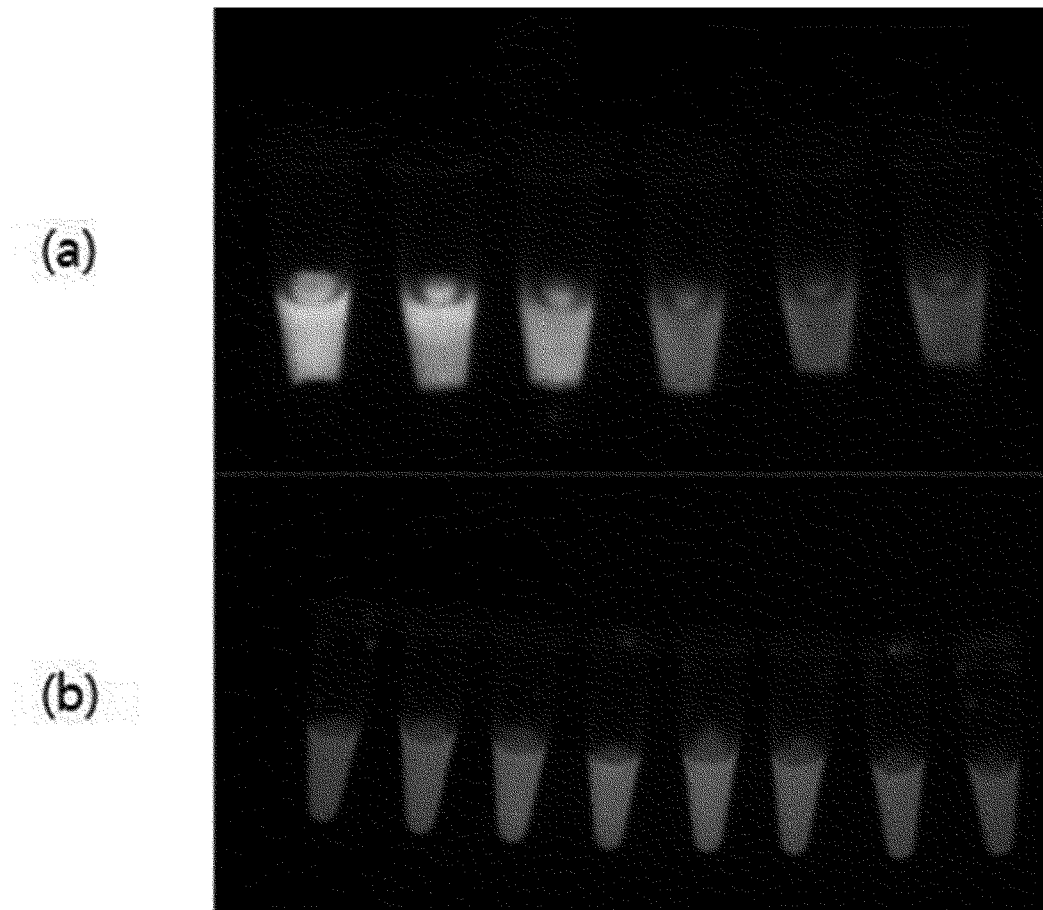
[도7]



[도8]



[도9]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004302

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

*G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/60(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61K 51/12(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 33/58; A61B 1/05; A61M 5/42; G01N 21/64; G01N 33/60; G01N 33/50; A61K 49/00; A61K 51/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) &amp; Keywords: injection for marking lesion, gliding force, precipitation prevention, density, molecular weight, viscosity

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                                                                                                                                 | Relevant to claim No. |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | KANEKO, M. et al., "Positive Scintigraphy of Tumor by Means of Intra-arterial Injection of Radioiodinated Macroaggregated albumin (MAA)", American Journal of Roentgenology, January 1968, vol. 102, no. 1, pages 81-87<br>See page 81, paragraphs [2]-[3] in the right column.                                                                                    | 1-9                   |
| A         | KR 10-2014-0083727 A (NATIONAL CANCER CENTER) 04 July 2014<br>See the entire document.                                                                                                                                                                                                                                                                             | 1-9                   |
| A         | BROUWER, O. R. et al., "Comparing the Hybrid Fluorescent-radioactive Tracer Indocyanine Green-99mTc-nanocolloid with 99mTc-nanocolloid for Sentinel Node Identification: a Validation Study Using Lymphoscintigraphy and SPECT/CT", The Journal of Nuclear Medicine, [Electronic publishing] 29 May 2012, vol. 53, no. 7, pages 1034-1040 See the entire document. | 1-9                   |
| A         | WO 2014-014956 A1 (THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA) 23 January 2014<br>See the entire document.                                                                                                                                                                                                                                | 1-9                   |



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 JULY 2017 (25.07.2017)

Date of mailing of the international search report

25 JULY 2017 (25.07.2017)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office  
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,  
Republic of Korea

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

**PCT/KR2017/004302**

| C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |                                                                                    |                       |
|-------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Category*                                             | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A                                                     | US 2008-0147038 A1 (HOFFMAN, G. T.) 19 June 2008<br>See the entire document.       | 1-9                   |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/004302

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **10**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claim 10 pertains to a method for treatment of the human body by surgery, and thus pertains to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17 (2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/KR2017/004302**

| Patent document<br>cited in search report | Publication<br>date | Patent family<br>member | Publication<br>date |
|-------------------------------------------|---------------------|-------------------------|---------------------|
| KR 10-2014-0083727 A                      | 04/07/2014          | CA 2896464 A1           | 03/07/2014          |
|                                           |                     | CN 104919319 A          | 16/09/2015          |
|                                           |                     | EP 2940474 A1           | 04/11/2015          |
|                                           |                     | EP 2940474 A4           | 30/11/2016          |
|                                           |                     | JP 2016-511745 A        | 21/04/2016          |
|                                           |                     | KR 10-1552138 B1        | 10/09/2015          |
|                                           |                     | KR 10-2015-0042170 A    | 20/04/2015          |
|                                           |                     | RU 2015-131003 A        | 30/01/2017          |
|                                           |                     | RU 2619556 C2           | 16/05/2017          |
|                                           |                     | US 2015-0328345 A1      | 19/11/2015          |
|                                           |                     | WO 2014-104605 A1       | 03/07/2014          |
| WO 2014-014956 A1                         | 23/01/2014          | US 2015-0185151 A1      | 02/07/2015          |
| US 2008-0147038 A1                        | 19/06/2008          | NONE                    |                     |

**A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))**

G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/60(2006.01)i, A61K 49/00(2006.01)i, A61K 51/12(2006.01)i

**B. 조사된 분야**

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

G01N 33/58; A61B 1/05; A61M 5/42; G01N 21/64; G01N 33/60; G01N 33/50; A61K 49/00; A61K 51/12

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC  
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 병변 표지용 주사제, 활주력, 침전 방지, 밀도, 분자량, 점도

**C. 관련 문헌**

| 카테고리* | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 관련 청구항 |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| A     | KANEKO, M. 등, 'Positive scintigraphy of tumor by means of intra-arterial injection of radioiodinated macroaggregated albumin (MAA)', American Journal of Roentgenology, 1968.01, 102권, 1호, 페이지 81-87<br>페이지 81, 우측 컬럼의 단락 2-3 참조.                                                                                      | 1-9    |
| A     | KR 10-2014-0083727 A (국립암센터) 2014.07.04<br>전체 문헌 참조.                                                                                                                                                                                                                                                                   | 1-9    |
| A     | BROUWER, O. R. 등, 'Comparing the hybrid fluorescent-radioactive tracer indocyanine green-99mTc-nanocolloid with 99mTc-nanocolloid for sentinel node identification: a validation study using lymphoscintigraphy and SPECT/CT', The Journal of Nuclear Medicine, [전자공개] 2012.05.29, 53권, 7호, 페이지 1034-1040<br>전체 문헌 참조. | 1-9    |
| A     | WO 2014-014956 A1 (THE ARIZONA BOARD OF REGENTS ON BEHALF OF THE UNIVERSITY OF ARIZONA) 2014.01.23<br>전체 문헌 참조.                                                                                                                                                                                                        | 1-9    |

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

\* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2017년 07월 25일 (25.07.2017)

국제조사보고서 발송일

2017년 07월 25일 (25.07.2017)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청  
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,  
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

박정민

전화번호 +82-42-481-3516



| C(계속). 관련 문헌 |                                                             |        |
|--------------|-------------------------------------------------------------|--------|
| 카테고리*        | 인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재                                  | 관련 청구항 |
| A            | US 2008-0147038 A1 (HOFFMAN, G. T.) 2008.06.19<br>전체 문헌 참조. | 1-9    |

**제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)**

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 10  
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,  
청구항 10은 사람의 수술에 의한 처치방법에 관한 것이므로 PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:  
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:  
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

**제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)**

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에  
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

| 국제조사보고서에서<br>인용된 특허문헌 | 공개일        | 대응특허문헌                                                                                                                                                                                                            | 공개일                                                                                                                                                    |
|-----------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| KR 10-2014-0083727 A  | 2014/07/04 | CA 2896464 A1<br>CN 104919319 A<br>EP 2940474 A1<br>EP 2940474 A4<br>JP 2016-511745 A<br>KR 10-1552138 B1<br>KR 10-2015-0042170 A<br>RU 2015-131003 A<br>RU 2619556 C2<br>US 2015-0328345 A1<br>WO 2014-104605 A1 | 2014/07/03<br>2015/09/16<br>2015/11/04<br>2016/11/30<br>2016/04/21<br>2015/09/10<br>2015/04/20<br>2017/01/30<br>2017/05/16<br>2015/11/19<br>2014/07/03 |
| WO 2014-014956 A1     | 2014/01/23 | US 2015-0185151 A1                                                                                                                                                                                                | 2015/07/02                                                                                                                                             |
| US 2008-0147038 A1    | 2008/06/19 | 없음                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                        |