

분주 베바시주맙의 무균성과 안정성

Stability and Sterility of Bevacizumab after Withdrawal into a Syringe and Refrigeration or Freezing

노광명¹ · 김수영² · 남기엽¹ · 이승욱¹ · 김영호³ · 이상준¹

Gwang Myung Noh, MD¹, Soo Young Kim, MD², Ki Yup Nam, MD, PhD¹, Seung Uk Lee, MD, PhD¹,
Young Ho Kim, PhD³, Sang Joon Lee, MD, PhD¹

고신대학교 의과대학 안과학교실¹, 밝은눈안과², 고신대학교 의과대학 분자생물학교실³

Department of Ophthalmology, Kosin University College of Medicine¹, Busan, Korea

BGN Eye Care Center², Busan, Korea

Department of Molecular Biology, Kosin University College of Medicine³, Busan, Korea

Purpose: The aim of this study was to evaluate the stability and sterility of bevacizumab (Avastin, Genentech, Inc., San Francisco, CA, USA) after withdrawal into multiple doses from single-use vials.

Methods: Bevacizumab was repeatedly and aseptically drawn from new vials into 1 cc plastic syringes and refrigerated in the dark at 4°C for 0, 3, 6, 12, 28, 38, 46, 52, or 63 weeks or at -10°C for 0, 3, 6, 12, 38, 46, or 52 weeks. The stability of bevacizumab was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and compared with that of controls (0 weeks). The contents of the fractionated bevacizumab syringes were analyzed for microbial growth.

Results: When we assessed the relative stability of the bevacizumab stored at 4°C, there was no concentration change for up to 12 weeks. However, concentration decreased by less than 2% between 28 weeks and 46 weeks. Samples stored at -10°C were stable up to 52 weeks. All of the fractionated syringes maintained >90% stability compared with controls for up to one year in both the refrigerated group and the frozen group. The microbial study showed no significant positive results for up to 12 weeks. After intravitreal bevacizumab injection, the statuses of all patients improved, with no signs of intraocular infection. We observed no cases of intraocular infection or complications among the patients.

Conclusions: Fractionating and storing smaller amounts from single-use vials is a safe method for intravitreal bevacizumab injection.

J Korean Ophthalmol Soc 2014;55(10):1499-1503

Key Words: Avastin, Bevacizumab, Intravitreal injection, Stability, Sterility

베바시주맙(Avastin, Genentech, Inc., San Francisco, CA, USA)은 IgG1에 대한 재조합 인간화 단일클론항체(recombinant

humanized monoclonal antibody)로서 생물학적으로 활성화된 형태의 모든 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF)와 결합하여 억제작용을 나타낸다. 베바시주맙은 미국 식약청에서 전이성 대장암의 치료제로서 승인을 받았기 때문에 안과적으로는 식약청 승인 없이 처방(off-label)되며 혈관내피성장인자와 연관된 맥락막신생혈관, 망막 정맥폐쇄, 증식성 당뇨망막병증, 홍채혈관신생 등의 질환에 사용되고 있다.¹⁻⁵

시중에 유통되는 형태는 100 mg/4 mL, 400 mg/16 mL

■ Received: 2014. 1. 17. ■ Revised: 2014. 5. 6.

■ Accepted: 2014. 8. 29.

■ Address reprint requests to Sang Joon Lee, MD, PhD

Department of Ophthalmology, Kosin University Gospel Hospital, #262 Gamcheon-ro, Seo-gu, Busan 602-702, Korea
Tel: 82-51-990-6140, Fax: 82-51-990-3026

E-mail: hhiatus@gmail.com

© 2014 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

두 종류로 보존제 없이 일회용 용기(single-use vial)에 담겨 있다. 유리체 주입술을 위해 사용되는 일반적인 용량은 1.25 mg/0.05 mL로 대장암 치료에 사용되는 것에 비해 그 양이 훨씬 적어 단회 유리체 주사에 베바시주맵 한 병을 사용하게 되면 비용 효율이 좋지 않게 된다. 이러한 이유로 일부 안과의사들은 조제약국에서 작은 용량으로 분주한 베바시주맵을 사용하여 비용을 줄이거나 한 병의 약을 개봉하여 다수의 환자들이 한꺼번에 베바시주맵 주입술을 받을 수 있도록 스케줄을 조정하기도 한다. 본원에서는 이와 유사한 방식으로 당뇨망막병증, 망막정맥폐쇄 혹은 연령관련 황반변성과 같이 베바시주맵 주입술이 필요한 환자들에게 4°C에서 보관된 분주 베바시주맵을 사용하여 왔다.

제조사사의 안내서에 따르면 각각의 약제는 일회용으로 만들어졌으며 보존제가 없기 때문에 정맥주사를 위해 희석하면 2-30°C에서 48시간 동안 물리화학적으로 안정하지만 미생물학적 측면을 고려하여 희석 후 즉시 사용할 것을 권하고 있다.⁶ 최근 연구에 따르면 냉장 보관된 베바시주맵은 효능(efficacy)의 소실 없이 4°C에서 3주간 보관될 수 있으며 6개월까지 무균성(sterility)이 유지된다고 하였다.⁷ 그러나 6개월 이상의 기간 동안 베바시주맵의 안정성과 무균성이 유지되는지에 대한 보고는 아직까지 없다. 그러므로 저자들은 분주된 베바시주맵의 안정성과 무균성이 4°C와 -10°C에서 1년까지 얼마나 유지되는지 알아보려고 하였다.

대상과 방법

분주 방법(Fractionating method)

베바시주맵 분주는 경험 많은 약사와 간호사들에 의해 무균실험대(clean bench)에서 이루어졌다. 이전에 개봉되지 않은 새로운 약병에서 26-gauge 바늘을 이용하여 무균상태의 1 mL 플라스틱 주사기에 약을 나누어 담았다. 베바시주맵을 뽑기 전 용기의 고무마개 부분을 이소프로필알콜(isopropyl alcohol)로 소독하였다. 각각의 분주된 베바시주맵 주사기를 무균 안전 마개로 닫은 후 4°C에서 0, 3, 6, 12, 28, 38, 46, 52, 63주, -10°C에서 0, 3, 6, 12, 38, 46, 52주 동안 보관하였으며 제조사의 안내지침에 따라 차광하였다(Fig. 1).

무균성 분석(Sterility assay)

한 병의 베바시주맵을 여러 개의 작은 용량으로 분주할 때마다 주사기 하나를 무작위로 선택하였고 표준평판법(standard plating technique)으로 세균 배양검사를 시행하였다. 또한 분주되어 4°C에서 2, 4, 9, 12주 동안 보관된 베바시주맵으로 유리체내 주입술을 시행한 후 주사기 내에 남아 있는 약제에 대해서도 세균배양 검사를 시행하였다. 세

균배양에는 맥콘키(MacConkey), 혈액천천(Blood agar), 사브로드(Sabouraud) 배지가 사용되었다.

안정성 분석(Stability assay)

냉장 또는 냉동 보관된 분주 베바시주맵의 안정성은 효소면역측정법을 사용하여 평가하였다. Human IgG1 subclass profile ELISA kit (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA)를 사용하였으며 이는 겨자무과산화효소 감지 시스템(horseradish peroxidase detection system)을 사용한 샌드위치 형태(sandwich type)의 효소면역측정법이다. 코팅된 미세적정 판(microtiter plate)이 다양한 인간 IgG 하위그룹(human IgG subclass)에 특이적인 단일클론 시약(monoclonal reagent)을 찾아내고 차례로 단일클론 시약이 인간 IgG 하위그룹을 찾아내게 된다. 발견된 인간 IgG는 겨자무과산화효소 항-인간 IgG (horseradish-peroxidase anti-human IgG) 시약에 의해 표식(labeling)이 되게 되고 인간 하위그룹 항체(human subclass antibody)의 양에 비례하여 감지 신호가 발생하게 된다.

안정성에 대한 평가 실험은 다음과 같은 순서에 따라 시행되었다. 최종적인 결과는 1:2500 희석이였다. (1) 저자들은 각각의 코팅된 마이크로웰(microwell)에 세척 완충액(wash buffer) 200 μ L를 나누어 담고 손가락으로 가볍게 튕겨 완충액을 개수대로 흘려보낸 뒤 종이 수건으로 가볍게 치며 물기를 제거하였다. (2) 희석된 베바시주맵 샘플을 50 μ L씩 나누어 표준(read-to-use standard)과 대조군(ready-to-use control)으로 각각의 웰에 바로 사용할 수 있도록 하였다. 그리고 50 μ L의 단일클론 항-인간 IgG (monoclonal anti-human IgG)를 빈 곳을 제외한 각각의 웰에 첨가하였다. 비어 있는 웰에는 희석된 베바시주맵 50 μ L를 나누어 담고 샘플 희석액 50 μ L를 각각의 웰에 첨가하였다. (3) 마이크로웰 평판은 30분 동안 실온에서 배양되었다. (4) 마이크로웰의 내용물을 손가락으로 가볍게 튕겨 개수대로 흘려보낸 후 과정 (1)을 3번 반복하였다. (5) 각각의 웰에 희석된 공액용액(conjugate solution)을 나누어 담았다. (6) 마이크로웰 평판은 30분 동안 실온에서 배양되었다. (7) 내용물을 손가락으로 가볍게 튕겨 개수대로 흘려보낸 후 과정 (1)을 3번 반복하였다. (8) 테트라메틸벤지딘(tetramethylbenzidine, TMB) 기질 100 μ L를 각각의 웰에 나누어 담았다. (9) 마이크로웰 평판은 10분 동안 실온에서 배양되었다. (10) 정지시약(stopping reagent) 50 μ L를 각각의 웰에 재빨리 나누어 담고 수초간 웰을 흔들어 주었다. 청색에서 황색까지 드러마틱한 색의 변화가 예상되었다. (11) 450 nm, 550 nm 기준 파장(Emax[®] microplate reader, Molecular Devices, Inc., Downingtown, PA, USA)에서 흡광도를 즉시 판독하였다.

광학밀도(optical density)는 1시간 동안 안정적으로 남아있을 것으로 예상되었다. (12) 각각 샘플과 대조군의 IgG 하위 그룹 농도는 각각의 상대적인 광학밀도를 사용하여 표준 곡선으로부터 산출하였다. 모든 샘플에 대해 개개 평가를 반복 시행하였으며 각각의 평가도 최소 2번 이상 반복하였다.

결 과

총 44개의 베바시주맙 샘플이 무균성 평가에 사용되었다. 베바시주맙을 분주한 직후 35개의 샘플이 세균배양을 위해 보내졌으며 이들 중 어떤 샘플에서도 세균이 발견되지 않았다. 유리체내 주입술 후 주사기에 남은 9개 베바시주맙 샘플에 대해서도 세균배양 검사를 시행하였다. 이 샘플들은 분주된 후 4℃에서 2, 4, 9, 12주 동안 보관된 것이었는데 이 중 2개의 샘플에서 배양 5일째 coagulase- negative Staphylococcus가 배양되었다. 저자들은 환자들이 받았던 모든 안과검사기록과 의무기록을 꼼꼼히 검토하였으

며 이 환자들이 주입술을 받은 후 안내염증의 징후나 합병증이 전혀 없었다는 것을 발견하였다. 또한 베바시주맙 주입술 후 모든 환자들의 상태가 호전되었다.

Table 1은 4℃에서 0, 3, 6, 12, 28, 38, 46, 52, 63주 또는 -10℃에서 0, 3, 6, 12, 38, 46, 52주간 보관된 베바시주맙 샘플(1:2500 희석)의 IgG 농도(optical density, OD)를 보여준다. 효소면역측정법을 통한 안정성 분석의 결과를 보았을 때 4℃에 보관한 샘플의 경우 12주까지는 베바시주맙 농도변화를 보이지 않았고 28주에서 46주까지는 2% 미만의 농도 감소를 보였다. 4℃에서 0-52주간 보관된 분주 베바시주맙의 상대적인 안정성은 기저치와 비교하였을 때 90% 이상으로 나타났다. 한편 -10℃에 보관한 샘플의 경우 52주까지 농도변화를 보이지 않았다.

고 찰

유리체내 베바시주맙 주입술은 혈관내피성장인자를 매

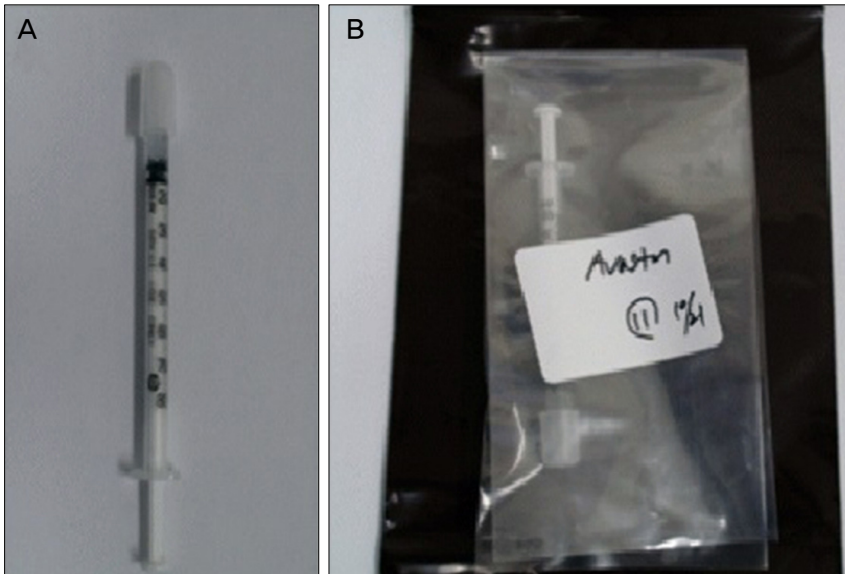


Figure 1. (A) The fractionated bevacizumab syringes were sealed with sterile safety caps. (B) For protection from light, the stored bevacizumab syringes were placed in brown plastic bags.

Table 1. Mean bevacizumab concentration (optical density, OD), decreasing rate bevacizumab concentration for each sample

Length of storage (weeks)	Mean bevacizumab concentration (OD, mg/mL)		Decreasing rate of bevacizumab concentration (OD) (%)	
	Stored at 4℃	Stored at -10℃	Stored at 4℃	Stored at -10℃
0	23.5	23.5	0.0	0.0
3	26.4	24.6	0.0	0.0
6	25.3	28.1	0.0	0.0
12	28.9	25.6	0.0	0.0
28	23.1	*	1.7	*
38	23.2	24.3	1.3	0.0
46	23.1	24.9	1.7	0.0
52	22.7	23.7	3.4	0.0
63	22.1	*	5.6	*

The decreasing rate of bevacizumab concentration as compared with that at 0 weeks.

*No sample.

개로 하는 맥락막신생혈관, 망막정맥폐쇄, 증식성 당뇨망막 병증, 홍채신생혈관 등의 질환에 효과적인 치료방법이다.

상업적으로 이용 가능한 베바시주맵 용기에는 보존제가 들어있지 않으며 제조사에서는 약제가 단회 사용 목적으로 만들어졌기 때문에 개봉 후 8시간 내에 사용하여야 한다고 권고하고 있다.⁶ 그러나 베바시주맵은 고가의 약이며 유리 체내 주입술에 사용되는 가장 흔한 용량은 단지 1.25 mg/0.05 mL에 불과하다. 이런 이유로 본원에서는 보통 베바시주맵을 분주하여 4°C에서 차광 보관하고 후에 안과적 검사에 따라 베바시주맵 주입술이 필요한 환자에게 사용하였다. 저자들은 약제의 안정성이나 무균성에 영향을 주지 않고 베바시주맵 샘플이 주사기에 보관될 수 있는 기간이 얼마나 되는지 알기 위해 노력하였다. Bakri et al⁸은 주사기로 옮겨진 베바시주맵이 4°C 혹은 -10°C에서 6개월까지는 최소한으로 분해된다고 보고하였다. 심온동결(deep freezing) 후 해동한 베바시주맵은 한 번도 얼리지 않은 베바시주맵에 비해 맥락막 내피세포에 대한 항투과효과가 감소하였으나 이러한 활동성의 소실은 다른 연구에서는 유의하지 않은 것으로 보여졌다.⁹ 본원의 연구에서 베바시주맵의 구조적 안정성은 63주까지 유지되었다. 그러므로 4°C 혹은 -10°C에서 저장된 분주 베바시주맵은 1년 이상 구조적 쇠퇴 없이 보관될 수 있다.

Ornek et al¹⁰은 베바시주맵 한 병에서 여러 개로 분주하여 보관한 베바시주맵에서 2주 후 세균의 오염이 발생하지 않았다고 보고하였으며 Chen et al⁷은 4°C에서 보관한 베바시주맵 샘플에서 6개월 내에 세균배양이 관찰되지 않았다고 보고하였다. 본 연구에서는 44개의 샘플 중 2개에서 배양 5일째 coagulase negative Staphylococcus가 관찰되었다. 하지만 두 약을 주입 받은 환자들에서 안내감염의 징후나 합병증이 나타나지 않았으므로 이러한 세균 배양은 남은 베바시주맵을 배지로 옮기는 과정에서 발생한 오염일 가능성이 높다. 결론적으로 유리체내 주입술을 위해 주사기에 분주된 베바시주맵은 4°C 혹은 -10°C에서 1년까지 구조적 안정성이 유지되며 무균성은 4°C에서 12주 동안 유지된다. 분주 베바시주맵 시스템은 몇 가지 이점이 있다. 첫째로 외래에 기반한 주입술을 가능하게 한다. 둘째로는 주입술이

요구될 때 환자의 상태가 바뀌기 전 즉각적으로 주입술을 시행할 수 있다는 장점이 있다. 세 번째는 치료의 지연이 없어 시력과 눈의 구조적인 회복에 좀 더 좋은 결과를 보일 수 있다. 마지막으로 베바시주맵 한 병을 개봉하기 위해 환자들의 스케줄을 조절할 필요가 없기 때문에 환자가 주입술을 위해 다시 병원을 방문하지 않아도 된다는 장점이 있다. 유리체내 주입술을 위해 베바시주맵을 분주하여 보관하는 것은 안전한 방법일 뿐만 아니라 결과적으로 환자의 편의성이 증대되는 이점이 있어 유용한 방법이라 할 수 있다.

REFERENCES

- 1) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
- 2) Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina* 2006;26:999-1005.
- 3) Jorge R, Costa RA, Calucci D, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) for persistent new vessels in diabetic retinopathy (IBEPE study). *Retina* 2006;26:1006-13.
- 4) Iturralde D, Spaide RF, Meyerle CB, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) treatment of macular edema in central retinal vein occlusion: a short-term study. *Retina* 2006;26:279-84.
- 5) Yoganathan P, Deramo VA, Lai JC, et al. Visual improvement following intravitreal bevacizumab (Avastin) in exudative age-related macular degeneration. *Retina* 2006;26:994-8.
- 6) Roche Pharma (Schweiz), G.I.U., Avastin® (bevacizumab), information for patients. 2013.
- 7) Chen YH, Wu PC, Shiea J, et al. Evaluation of the sterility, stability, and efficacy of bevacizumab stored in multiple-dose vials for 6 months. *J Ocul Pharmacol Ther* 2009;25:65-9.
- 8) Bakri SJ, Snyder MR, Pulido JS, et al. Six-month stability of bevacizumab (Avastin) binding to vascular endothelial growth factor after withdrawal into a syringe and refrigeration or freezing. *Retina* 2006;26:519-22.
- 9) Peters S, Julien S, Heiduschka P, et al. Antipermeability and antiproliferative effects of standard and frozen bevacizumab on choroidal endothelial cells. *Br J Ophthalmol* 2007;91:827-31.
- 10) Ornek K, Karahan ZC, Ergin A, et al. Bevacizumab sterility in multiple doses from a single-use vial. *Ann Pharmacother* 2008;42:1425-8.

= 국문초록 =

분주 베바시주맙의 무균성과 안정성

목적: 한 병에서 여러 개의 주사기에 분주한 베바시주맙(Avastin, Genentech, Inc., San Francisco, CA, USA)을 냉장 및 냉동 보관하였을 때의 구조적 안정성(stability)과 무균성(sterility)에 대해 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 한 병의 베바시주맙을 무균적 방법으로 여러 개의 1 cc 플라스틱 주사기에 분주하여 차광주머니에 넣은 후 4℃에서 0, 3, 6, 12, 28, 38, 46, 52, 63주, -10℃에서 0, 3, 6, 12, 38, 46, 52주 동안 보관하였다. 베바시주맙의 안정성은 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 사용하여 기저치(0주)와 비교 평가하였다. 무균성은 최대 12주까지 보관한 분주된 실린지에 든 베바시주맙 검체로 세균 배양검사를 실시하여 무균성을 알아보았다.

결과: 효소면역측정법을 통한 안정성 분석의 결과를 보았을 때 4℃에 보관한 샘플의 경우 12주까지는 베바시주맙 농도변화를 보이지 않았고 28주에서 46주까지는 2% 미만의 농도 감소를 보였다. -10℃에 보관한 샘플의 경우 52주까지 농도변화를 보이지 않았다. 분주된 베바시주맙은 4℃ 및 -10℃ 보관 상태에서 1년 동안 90% 이상의 구조적인 안정성을 보였다. 세균 배양검사상 분주된 주사액의 무균성은 12주 동안 유지되었다. 분주된 베바시주맙 주입술 후 환자들의 상태는 호전되었으며, 환자들에게서 안내염증 징후나 합병증을 관찰할 수 없었다.

결론: 유리체내 베바시주맙 주입술을 위해 적절한 방법으로 분주하여 보관하는 것은 최소 4개월까지 안전하였고, 1년까지 구조적인 안정성을 나타내었다.

〈대한안과학회지 2014;55(10):1499-1503〉
