

유리체내 베바시주맙과 라니비주맙 주입술이 전신 순환에 미치는 영향

Effects of Intravitreal Injection of Bevacizumab or Ranibizumab on Systemic Circulation

윤명헌 · 김영준 · 이소영 · 이강원 · 진희승

Myung Hun Yoon, MD, Young Jun Kim, MD, So Young Lee, BD, Kang Won Lee, MD, Hee Seung Chin, MD, PhD

인하대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, Inha University School of Medicine, Incheon, Korea

Purpose: The purpose of this study was to evaluate the systemic effects of ranibizumab and bevacizumab by examining the plasma levels of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) and VEGF before and after a single intravitreal injection.

Methods: Twenty-eight eyes of 28 patients with various retinal diseases were enrolled. Seventeen eyes received an injection of intravitreal bevacizumab, and 11 eyes received an injection of ranibizumab. Blood samples were collected just before and 1 day, 1 week, and 1 month after injection. Concentrations of anti-VEGF and VEGF in plasma were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Results: In the bevacizumab group, anti-VEGF concentration before the injection was 91.0 ng/mL, while those at 1 day, 1 week, and 1 month post-injection increased to 153.6, 196.3, and 140.3 ng/mL, respectively ($p < 0.05$ for all). VEGF concentration before the injection was 93.9 pg/mL, while those 1 day, 1 week, and 1 month post-injection were reduced to 40.1, 24.7, and 33.5 pg/mL, respectively ($p < 0.05$ for all). However, in the ranibizumab group, no significant reductions in anti-VEGF concentration were observed. The anti-VEGF concentration before the injection was 177.6 ng/mL, while those at 1 day, 1 week, and 1 month post-injection were 177.5, 160.7, 175.3 ng/mL, respectively ($p > 0.05$ for all). VEGF level also showed no significant change. VEGF concentration before the injection was 80.9 pg/mL, while those at 1 day, 1 week and 1 month post-injection were 96.7, 106.3, 106.1 pg/mL, respectively ($p > 0.05$ for all).

Conclusions: Contrary to ranibizumab, intravitreal bevacizumab significantly lowers plasma VEGF level in patients with various retinal diseases. The study suggests the consideration of the systemic effects of intravitreal bevacizumab injection.

J Korean Ophthalmol Soc 2016;57(3):429-437

Keywords: Anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF), Bevacizumab, Ranibizumab, Vascular endothelial growth factor (VEGF)

혈관내피생성인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)

- Received: 2015. 7. 10. ■ Revised: 2015. 10. 2.
- Accepted: 2015. 12. 9.
- Address reprint requests to **Hee Seung Chin, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Inha University Hospital, #27
Inhang-ro, Jung-gu, Incheon 22332, Korea
Tel: 82-32-890-2400, Fax: 82-32-890-2417
E-mail: hschin@inha.ac.kr

는 많은 신생혈관성 안질환을 일으키는 주요한 원인들 중 하나로 알려져 있다. 비록 안구의 정상적인 구조와 기능을 유지하기 위해서는 VEGF가 필수적이지만,¹ VEGF의 과도한 생성은 오히려 여러 신생혈관성 안질환들을 일으키며,^{1,2} 습성 연령관련 황반변성이나 병적 근시에서 나타나는 맥락막 신생혈관^{3,4}과 당뇨망막병증,^{5,6} 망막정맥폐쇄⁶ 등에서 VEGF 농도의 상승이 관찰된다.

그러므로 이러한 VEGF와 관련된 안질환들에 대한 치료로 bevacizumab (Avastin[®], Genetech Inc., San Francisco, CA, USA)이나 ranibizumab (Lucentis[®], Novartis Pharma AG, Basel, Switzerland and Genetech Inc.)과 같은 항혈관 내피생성인자(anti-VEGF)의 유리체내 주입술이 널리 사용되고 있다.

VEGF는 전신적으로 광범위하고 다양한 신체 활동에서 필수적인 성장 인자로서 작용한다. 전신의 많은 장기 및 조직의 미세 혈관 구조를 유지하고⁷⁻⁹ 신경 세포의 생존을 유지하며¹⁰ 안구 조직의 유지에 필수적이다.¹¹⁻¹³ 또 혈관내피세포의 증식과 생존, 이동에 관여하고 심근경색이나 뇌졸중 후 신생혈관 형성을 촉진하며 혈관 확장과 혈관 투과성, 상처 치유 과정에 관여하는 등 전신적으로 다양하고 중요한 기능을 가진다.¹ 그러므로 VEGF를 차단하면 전신적인 합병증이 나타날 가능성이 예상된다. Bevacizumab은 원래 미국 식품의약청(Food and Drug Administration, FDA)으로부터 전이성 대장 직장암에 정맥 주사로 사용하는 것이 승인되었기 때문에 전신적인 투여에서 발생할 수 있는 심각한 전신 부작용이 이미 보고되어 있으며, 보고된 전신 부작용으로는 고혈압, 단백뇨, 출혈, 그리고 혈전색전증 등이 있다.^{14,15} 하지만 ranibizumab의 경우에는 원래 유리체내로 투여하도록 디자인 되어 있어 전신적인 영향이나 부작용에 대한 자료는 미흡한 실정이다.

Anti-VEGF 약제를 유리체내로 투여하는 치료는 약제 용량이 적고 혈액-망막 장벽이 약제의 전신적인 흡수를 막기 때문에 전신적인 영향이 적을 것으로 예상되지만 약물동태학 연구에서 약제들이 혈액에서도 검출된 경우가 있기 때문에¹⁶⁻²¹ 전신적인 영향을 배제할 수는 없다. 그럼에도 불구하고 인간을 대상으로 유리체내 anti-VEGF 투여 후 혈액에서 직접 VEGF나 anti-VEGF를 확인한 연구는 아직 많지 않아서 전신적인 안전성에 대한 결론은 명확하게 정립되지 않았다. 소수의 인원을 대상으로 유리체내 anti-VEGF 주입술 후 인간의 혈액에서 VEGF 농도만을 측정한 연구가 몇 개 있을 뿐이고²²⁻²⁴ 유리체내 투여된 bevacizumab과 ranibizumab 모두에 대하여 인간의 혈액에서 anti-VEGF와 VEGF 모두를 동시에 측정하여 혈중 anti-VEGF 농도 변화와 그에 따른 VEGF 농도 변화를 비교 분석한 경우는 최근에 소수의 연령관련 황반변성 환자를 대상으로 한 개의 논문이 보고되었을 뿐이다.²¹ 따라서 아직 추가 연구들을 통해 이들 결과의 재확인이 필요하고 한국인에서도 비슷한 경향을 보이는지 확인할 필요가 있다. 이에 본 저자들은 최초로 한국인을 대상으로 bevacizumab 또는 ranibizumab을 유리체내로 주입 후 전신 순환에서 이들 약제가 검출되는지, 검출된다면 시간에 따라 농도가 어떻게 변화하는지, 그리고 이에 따

라 혈중 VEGF 농도에도 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다.

대상과 방법

대상

이 연구는 헬싱키 선언을 준수하였고 인하대학교 의과대학 부속병원 임상시험심사위원회(institutional review board, IRB)의 심의를 통과한 후 수행하였다. 또한 모든 환자로부터 충분한 설명에 근거한 사전 동의를 구한 후 임상 시험을 진행하였다.

본 연구는 전향적, 비무작위, 단일기관의 탐색연구(pilot study)로서 인하대학교병원 안과 외래 환자들 중에서 습성 연령관련 황반변성에 의한 맥락막 신생혈관, 근시성 맥락막 신생혈관, 당뇨 황반부종, 망막정맥폐쇄에 의한 황반부종 환자 중 임상적으로 유리체내 anti-VEGF 주입술의 적응이 되는 환자들을 연구 대상으로 선정하였다. 그러나 외상 또는 다른 안과적 질환에 의한 매체 혼탁으로 황반부검사가 불가능한 환자, 선정 기준에 해당하는 질환 외에 다른 망막 또는 맥락막 질환도 같이 갖고 있는 환자, 최근 6개월 내에 안과적 수술을 시행한 환자, 최근 6개월 내에 유리체내 anti-VEGF 주입술을 받았거나 전신적인 anti-VEGF를 투여 받은 환자, 안내 레이저 광응고술 치료를 받은 환자, 그 외에 전신적인 VEGF 농도에 영향을 줄 수 있는 다른 질환-약성 신생물, 뇌경색, 심근경색 등-을 가진 환자는 연구에서 제외하였다.

유리체내 anti-VEGF 주입술 방법

Anti-VEGF 약제인 bevacizumab과 ranibizumab을 유리체내로 주입하는 기술은 임상에서 일반적으로 사용하는 방법을 사용하였다. 간단히 요약하면, 모든 유리체내 주입술은 인하대학교병원 안과 외래 전용의 수술실에서 무균법으로 시행되었다. 먼저 대상안을 proparacaine hydrochloride 0.5% (Alcaine[®], Alcon Laboratories Inc., Fort Worth, TX, USA)로 점안 마취한 뒤 10% povidone-iodine으로 눈 주위를 소독하였다. 개검기로 눈꺼풀을 벌려 놓고 5% povidone-iodine으로 결막 및 결막낭을 소독하고 생리식염수로 세척하였다. 1 mL 주사기에 1.25 mg (0.05 mL)의 bevacizumab (Avastin[®] 100 mg/4 mL) 또는 0.5 mg (0.05 mL)의 ranibizumab (Lucentis[®] 3 mg/0.3 mL)을 담아 뾰족한 30게이지 주사바늘을 이용하여 유수정체안은 각막 윤부에서 3.5 mm, 인공 수정체안은 각막 윤부에서 3.0 mm 떨어진 섬모체 평면부를 통해 유리체내로 천천히 주입하였다. 주사 후에는 주사바늘을 조심스럽게 빼내고 멸균된 면봉을 이용하여 주

사 부위를 살짝 눌러주어 약물의 역류 및 누출을 방지하였다. 주입술 후에는 levofloxacin 0.5% (Cravit®, Santen, Osaka, Japan)를 하루에 4번, 3일 동안 주입술을 시행 받은 눈에 점안하게 하였다.

혈액 샘플 채취

혈액 샘플은 환자의 정맥에서 유리체내 bevacizumab 또는 ranibizumab 주입술 직전과 주입술 하루 후, 1주일 후, 그리고 1달 후에 채취하였다. 채취된 혈액 샘플은 EDTA 튜브에 담아 채취 즉시 냉장 보관하였다. 이후 최대한 빠른 시간 내에 원심분리(3,000 rpm, 20분)를 통해 혈소판결핍혈청(platelet-poor plasma)을 분리하여 -80℃로 냉동 보관하였다.

Anti-VEGF assay

인간 재조합 VEGF의 165 이형 아미노산(the 165 amino

acid of variant human recombinant VEGF; R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 1×phosphate buffered saline (PBS)에 1.0 µg/mL 농도로 희석하여 Immuno 96 MicroWell Solid Plate (Nunc, Wiesbaden, Germany)에 각 well당 100 µL 씩 분주하여 고정하였다. 이후 4℃에서 16시간 incubation한 뒤 plate를 1×PBS로 1번 세척하고 10% fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT, USA) in 1×PBS로 4℃에서 4시간 동안 blocking하였다. 그 후 1×PBS로 3번 세척한 후 plate를 4℃에서 보관하며 건조시켰다.

혈청 샘플은 10% fetal bovine serum (FBS), 1×PBS로 100배 희석하여 사용하였다. 준비된 혈청 샘플을 한 샘플 당 3개의 well에 100 µL씩 분주하여 상온(room temperature, 25℃)에서 3시간 반응시켰다. 각각의 개별 assay에 대해서 standard curve는 bevacizumab 또는 ranibizumab을 10% FBS, 1×PBS로 희석하여 구해진 농도를 이용하여 bevacizumab은 0.0625 ng/mL-4 ng/mL의 범위로, ranibizu-

Table 1. Demographic data

Case	Sex	Age (years)	Retinopathy	VEGF	Drug	Laterality
1	M	60	CNV d/t AMD	46.5	Ranibizumab	OS
2	M	75	CNV d/t AMD	27.1	Ranibizumab	OD
3	M	74	CNV d/t AMD	30.5	Ranibizumab	OD
4	M	67	CNV d/t AMD	97.1	Ranibizumab	OD
5	M	61	CNV d/t AMD	72.4	Ranibizumab	OD
6	M	62	CNV d/t AMD	59.2	Ranibizumab	OS
7	F	71	DR	127.4	Bevacizumab	OS
8	M	88	CNV d/t AMD	38.3	Ranibizumab	OS
9	F	56	DR	17.8	Bevacizumab	OS
10	M	37	CRVO	174.6	Bevacizumab	OD
11	M	71	CNV d/t AMD	22.0	Ranibizumab	OD
12	F	77	DR	240.6	Bevacizumab	OS
13	F	55	DR	57.7	Bevacizumab	OS
14	F	34	Myopic CNV	27.3	Bevacizumab	OD
15	F	57	Myopic CNV	154.3	Bevacizumab	OD
16	F	31	Myopic CNV	121.8	Bevacizumab	OS
17	F	24	Myopic CNV	27.7	Bevacizumab	OS
18	F	39	Myopic CNV	17.0	Bevacizumab	OD
19	M	45	BRVO	34.8	Bevacizumab	OD
20	M	45	DR	280.1	Bevacizumab	OD
21	M	62	BRVO	54.7	Bevacizumab	OD
22	M	84	CNV d/t AMD	39.2	Ranibizumab	OS
23	M	63	BRVO	70.0	Bevacizumab	OS
24	M	50	DR	32.0	Bevacizumab	OS
25	F	73	CNV d/t AMD	221.0	Ranibizumab	OS
26	F	62	CNV d/t AMD	236.9	Ranibizumab	OS
27	F	43	PDR	44.0	Bevacizumab	OD
28	F	49	BRVO	116.0	Bevacizumab	OS

Concentrations of VEGF are in picograms of VEGF per milliliter (pg/mL).

VEGF = vascular endothelial growth factor; M = male; F = female; CNV = choroidal neovascularization; d/t = due to; AMD = age-related macular degeneration; OS = oculus sinister; OD = oculus dexter; DR = diabetic retinopathy; CRVO = central retinal vein occlusion; BRVO = branch retinal vein occlusion; PDR = proliferative diabetic retinopathy.

mab은 0.3125 ng/mL-20 ng/mL의 범위로 설정하였다. 첫 incubation 후 0.05% Tween-20[®] (Sigma-Aldrich corporation, St. Louis, MO, USA), 1×PBS로 3번 세척하였다.

부착된 bevacizumab 또는 ranibizumab은 peroxidase로 표지된 F(ab')₂ Fragment가 부착된 anti-human IgG antibody (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 검출하였다. 표지된 anti-human IgG를 10% FBS, 1×PBS에 2,000배 희석하여 각 well에 100 µL씩 분주하고 상온에서 1 시간 반응시켰다. 그 후 0.05% Tween-20[®], 1×PBS로 3번 세척하였다.

이후 Tetramethylbenzidine (TMB) substrate solution (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)을 각 well에 50 µL씩 분주하였다. 상온에서 30분 반응 후 stop solution으로 Sulfuric acid 1 M (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 각 well에 50 µL씩 분주하였다. 이후 각 well에서 생성된 화학발광(chemiluminescence)을 ELISA reader로 450 nm, reference 540-570 nm의 파장에서 측정하였다.

VEGF assay

혈중 VEGF의 농도는 ELISA Kit (Quantikine VEGF ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 제조사의 설명서대로 실험하여 측정하였다. 이 assay 방법은 정량적 sandwich enzyme immunoassay technique을 사용한다. VEGF의 농도는 450 nm에서 ELISA reader로 흡광도를 측정하고 측정값을 표준 희석 용액에서 측정된 값들과 비교하여 구하였다.

통계 분석

통계는 상업적 통계 소프트웨어 SPSS version 19 (IBM Corporation, Armonk, NY, USA)를 사용하여 계산하였다.

비모수인 독립된 두 집단 사이의 비교는 Mann-Whitney U-test를 사용하였고 비모수인 대응된 두 집단 사이의 비교는 Wilcoxon Signed Ranks Test를 사용하였다. 통계적 유의수준은 *p*값이 0.05 미만일 때로 정의하였다.

결 과

인구 통계 자료(demographic data)

대상 환자들의 인구 통계 자료는 다음과 같다(Table 1). 28명의 환자의 28안이 연구 대상으로 선정되었다. 이 중 습성 연령관련 황반변성 환자는 11명, 당뇨 황반부종 환자는 7명, 근시성 맥락막 신생혈관 환자는 5명, 망막정맥폐쇄 환자는 5명이었다. 그중 17명 환자의 17안에 유리체내 bevacizumab 주입술을 시행하였고 11명 환자의 11안에 대해서는 유리체내 ranibizumab 주입술을 시행하였다.

Bevacizumab 투여군의 VEGF 기저 농도 평균은 93.9 ± 80.0 pg/mL, 중위수 57.7 pg/mL이고 ranibizumab 투여군의 VEGF 기저 농도 평균은 80.9 ± 76.4 pg/mL, 중위수 46.5 pg/mL이며 두 군 사이에 VEGF 기저 농도의 평균은 통계적으로 유의한 차이는 없었다(*p*=0.724).

Bevacizumab 투여군

유리체내 bevacizumab 주입 전 혈중 anti-VEGF 농도는 91.0 ± 67.3 ng/mL였고 이는 주입 후 1일에 153.6 ± 94.4 ng/mL (*p*=0.001), 주입 후 1주에 196.3 ± 89.7 ng/mL (*p*<0.001)로 통계적으로 유의하게 증가하였으며, 주입 후 1달까지도 140.3 ± 82.8 ng/mL (*p*=0.001)로 주입 전에 비해 통계적으로 유의하게 높은 수치를 유지하였다. 혈중 VEGF 농도는 유리체내 bevacizumab 주입 전에 93.9 ± 80.0 pg/mL에서 주입 1일 후 40.1 ± 39.6 pg/mL로 줄어들었고(*p*=0.006), 주

Table 2. Plasma concentrations of anti-VEGF and VEGF in the bevacizumab group

	N	Mean	SD	Percentile		<i>p</i> -value*
				25th	75th	
Anti-VEGF						
Before	17	91.0	67.3	40.2	107.6	
After 1 day	17	153.6	94.4	82.0	221.6	0.001
After 1 week	17	196.3	89.7	127.1	249.1	0.000
After 1 month	17	140.3	82.8	93.5	159.7	0.001
VEGF						
Before	17	93.9	80.0	29.8	140.8	
After 1 day	17	40.1	39.6	13.4	57.2	0.006
After 1 week	17	24.7	12.4	13.4	31.4	0.001
After 1 month	17	33.5	31.9	10.6	38.8	0.002

Concentrations of anti-VEGF are in nanograms of anti-VEGF per milliliter (ng/mL). Concentrations of VEGF are in picograms of VEGF per milliliter (pg/mL).

VEGF = vascular endothelial growth factor; N = number; SD = standard deviation.

*Wilcoxon's Signed Ranks Test. *p*-values are for comparisons of values before versus after injection.

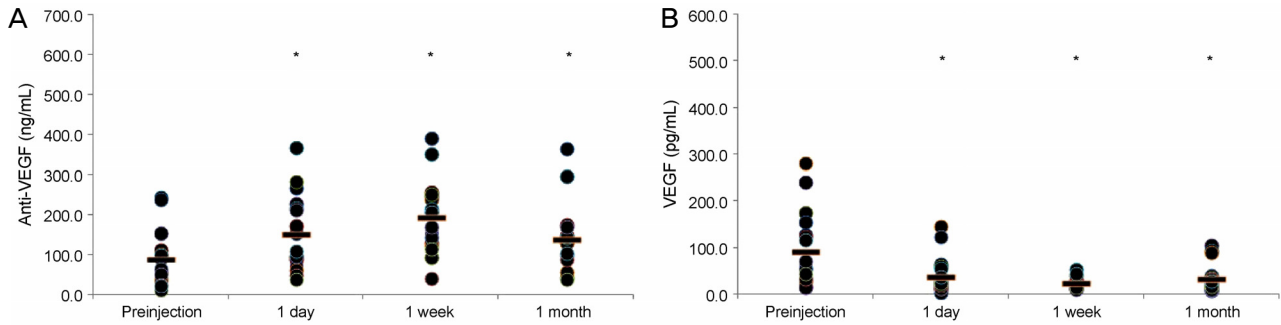


Figure 1. Plasma levels of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF before and after an intravitreal injection of bevacizumab. (A) Anti-VEGF concentrations before and 1 day, 1 week, and 1 month after injection were; 91.0, 153.6, 196.3, and 140.3 ng/mL ($p = 0.001, 0.000, 0.001$, respectively). (B) VEGF concentrations before and 1 day, 1 week, and 1 month after injection were 93.9, 40.1, 24.7, 33.5 pg/mL ($p = 0.006, 0.001, 0.002$, respectively). * $p < 0.05$.

Table 3. Plasma concentrations of anti-VEGF and VEGF in the ranibizumab group

	N	Mean	SD	Percentile		<i>p</i> -value *
				25th	75th	
Anti-VEGF						
Before	11	177.6	76.5	129.1	220.8	
After 1 day	11	177.5	73.6	139.8	205.4	0.646
After 1 week	11	160.7	82.5	97.6	225.5	0.110
After 1 month	11	175.3	62.2	139.2	207.4	0.477
VEGF						
Before	11	80.9	76.4	30.5	97.1	
After 1 day	11	96.7	137.6	21.0	102.2	0.504
After 1 week	11	106.3	82.1	28.4	131.9	0.328
After 1 month	11	106.1	89.0	27.1	190.7	0.203

Concentrations of anti-VEGF are in nanograms of ranibizumab per milliliter. Concentrations of VEGF are in picograms of VEGF per milliliter. VEGF = vascular endothelial growth factor; N = number; SD = standard deviation.

*Wilcoxon's Signed Ranks Test. *p*-values are for comparisons of values before versus after injection.

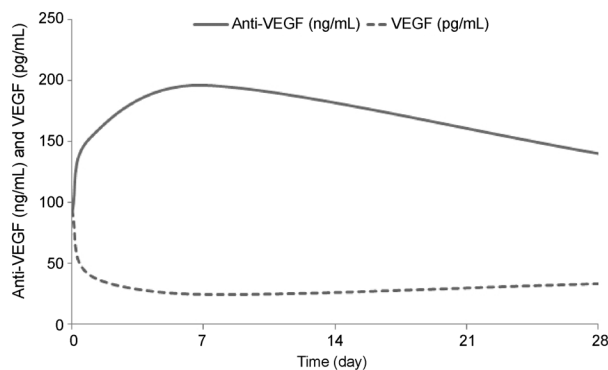


Figure 2. Schematic graphs of plasma levels of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF before and over 1 month after an intravitreal injection of bevacizumab. As anti-VEGF level increased, VEGF level decreased.

입 후 1주에는 24.7 ± 12.4 pg/mL ($p=0.001$)로 역시 유의하게 감소하였으며 주입 후 1달까지도 33.5 ± 31.9 pg/mL ($p=0.002$)로 주입 전보다 유의하게 감소된 수치를 유지하였다(Table 2, Fig. 1, 2).

Ranibizumab 투여군

유리체내 ranibizumab 주입 전 혈중 anti-VEGF 농도는 177.6 ± 76.5 ng/mL였고, 주입 후 1일에 177.5 ± 73.6 ng/mL ($p=0.646$)로 주입 전과 유의한 차이가 없었으며 주입 후 1주에 160.7 ± 82.5 ng/mL ($p=0.110$)였고 주입 1달 후에는 175.3 ± 62.2 ng/mL ($p=0.477$)로 전 기간에 걸쳐 주입 전과 유의한 차이가 없었다. 혈중 VEGF 농도는 유리체내 ranibizumab 주입 전에 80.9 ± 76.4 pg/mL에서 주입 1일 후 96.7 ± 137.6 pg/mL ($p=0.504$), 주입 1주 후 106.3 ± 82.1 pg/mL ($p=0.328$), 그리고 주입 한 달 후에는 106.1 ± 89.0 pg/mL ($p=0.203$)로 역시 전 기간 동안 통계적으로 유의한 변화가 없었다(Table 3, Fig. 3, 4).

고 찰

Bevacizumab은 분자량 약 149 kD의 재조합 인간 단일 클론 IgG1 항체(recombinant humanized monoclonal IgG1 antibody)로 생물학적 활성을 갖는 인간 VEGF-A에 결합하

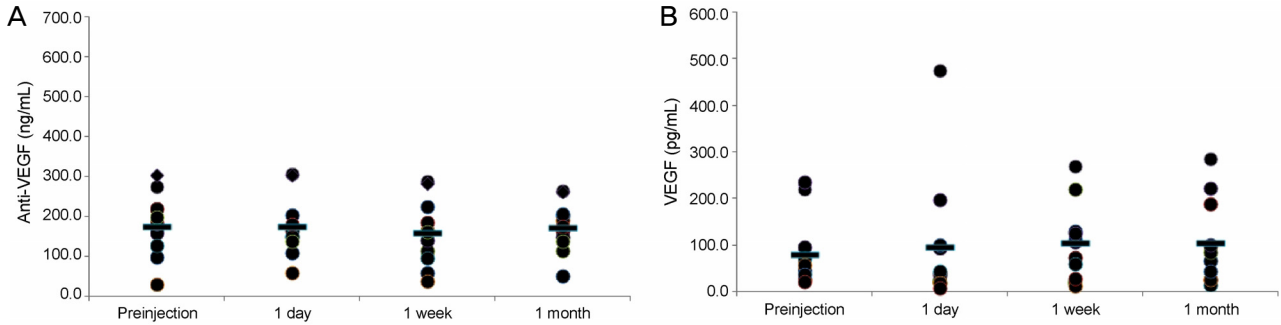


Figure 3. Plasma levels of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF before and after an intravitreal injection of ranibizumab. (A) Anti-VEGF concentrations before injection and 1 day, 1 week, and 1 month after injection were 177.6, 177.5, 160.7, and 175.3 ng/mL ($p = 0.646, 0.110, 0.477$, respectively). (B) VEGF concentrations before injection and 1 day, 1 week, and 1 month after injection were 80.9, 96.7, 106.3, and 106.1 pg/mL ($p = 0.504, 0.328, 0.203$, respectively).

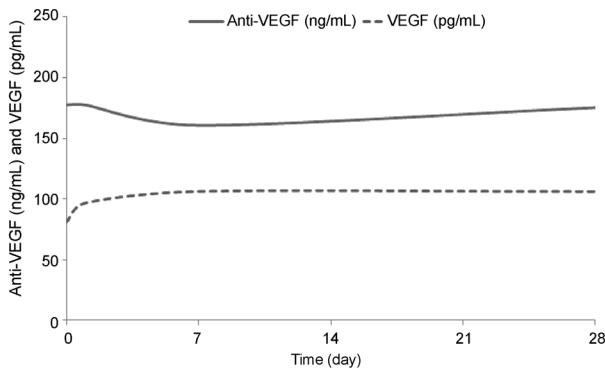


Figure 4. Schematic graphs of plasma levels of anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF before and for one month after an intravitreal injection of ranibizumab. No significant change is observed in anti-VEGF or VEGF levels.

여 이를 억제한다. Ranibizumab은 bevacizumab과 작용 기전은 비슷하나 항체의 항원결합분절(recombinant humanized IgG1 kappa isotype monoclonal antibody fragment)이므로 분자량이 약 48 kD으로 bevacizumab보다 훨씬 작아 이론적으로 망막색소상피층을 잘 통과하고 VEGF에 대한 친화력이 20배 이상 높은 것으로 알려져 있으며, 반감기가 짧고 빠른 전신적인 제거와 향상된 안전성을 보인다.^{16,19,20} 두 약제의 이러한 분자구조적인 차이점 때문에 전신적인 영향이 다를 가능성이 있다.

동물 실험을 통한 bevacizumab과 ranibizumab의 약물동태학 연구들을 살펴보면 bevacizumab을 토끼의 유리체내로 주입하였을 때 방수와 유리체에서 모두 bevacizumab이 검출되었고 유리체내에서의 반감기는 4.32일이었으며 혈액과 약물을 투여하지 않은 다른 눈에서도 소량이 검출되었다.²⁵ 같은 저자에 의한 ranibizumab을 토끼의 유리체내로 주입한 실험에서는 ranibizumab이 방수와 유리체에서 검출되었으나 혈액과 반대쪽 눈에서는 검출되지 않았고 유리체

내 반감기는 2.88일로 bevacizumab보다 짧아 전신적인 영향이 더 적은 것으로 나타났다.¹⁶ 그러나 토끼나 원숭이를 이용한 다른 실험에서는 ranibizumab도 유리체내 투여 후 혈액에서 검출되었다.^{17,18}

한쪽 눈에 anti-VEGF 약제를 투여한 후 다른 눈의 질환의 변화를 관찰함으로써 유리체내 anti-VEGF 약제의 전신적인 영향을 간접적으로 분석한 연구들도 있다. 187명의 한쪽 눈에 유리체내 ranibizumab 주입술을 시행 받은 환자들을 후향적으로 분석한 연구에서는 치료 받지 않은 다른 쪽 눈의 중심와하 흉터가 대조군에 비해 임상적인 호전이 있었다고 한다.²⁶ 양안 증식성 당뇨망막병증 환자들에서 한쪽 눈을 유리체내 bevacizumab 주입술로 치료한 경우 치료 받지 않은 눈에도 치료 효과가 나타났다는 보고도 있다.^{27,28} 이 외에도 2형 특발성 황반 모세혈관확장증(type 2 idiopathic macular telangiectasia)²⁹, 포도막염에 의한 낭성 황반부종(uveitic cystoids macular edema)³⁰ 등 다양한 질환에서 한쪽 눈에 유리체내 bevacizumab 주입술을 시행하였을 때 치료 받지 않은 눈에 효과가 나타난 경우들이 보고되었다. 그러나 양안 당뇨 황반부종 환자에서 한쪽 눈에 시행한 유리체내 bevacizumab 주입술이 반대쪽 치료 받지 않은 눈에 의미 있는 치료 효과를 가져오지 못했다는 연구도 있고,³¹ 양안 연령관련 황반변성 환자에서 유리체내 ranibizumab 주입술을 한쪽 눈에 시행하였을 때, 마찬가지로 치료 받지 않은 반대쪽 눈에 의미 있는 치료 효과가 없었다는 보고도 있어³² 이에 대해서는 명확히 결론 내리기가 어렵다.

이렇듯 동물 및 사람을 대상으로 한 여러 연구들이 있음에도 불구하고 유리체내 anti-VEGF 주입술이 전신 순환에 미치는 영향을 사람의 혈액에서 직접적으로 확인한 연구는 매우 적다. Matsuyama et al²²의 연구에서는 당뇨 환자를 대상으로 1회의 유리체내 bevacizumab 주입술을 시행하였을 때 혈중 VEGF 농도는 주입술 전보다 주입술 후 1일, 1주,

1달에서 모두 유의하게 낮아 유리체내로 투여된 bevacizumab이 전신 순환에 영향을 미친다는 결론을 제시하였다. Carneiro et al²³의 연구에서는 연령관련 황반변성 환자를 대상으로 유리체내 bevacizumab 또는 ranibizumab을 1달 간격으로 3회 투여한 뒤 첫 주입술 직전과 3번째 주입술 1달 후에 혈중 VEGF 농도를 비교한 결과 bevacizumab 투여군은 혈중 VEGF 농도가 유의하게 감소하였으나 ranibizumab 투여군은 혈중 VEGF의 유의한 농도 변화가 관찰되지 않아 ranibizumab이 bevacizumab보다 전신적인 영향이 더 적을 가능성을 제시하였다. 또한 연령관련 황반변성과 당뇨망막병증 환자를 대상으로 bevacizumab, ranibizumab pegatanib을 유리체내 1회 투여한 뒤 7일과 1달 후 혈중 VEGF 농도를 측정 한 연구에서도 bevacizumab 투여 후에는 혈중 VEGF 농도가 전 기간 동안 유의하게 감소하였으나 ranibizumab 또는 pegatanib을 투여한 군에서는 혈중 VEGF 농도에 유의한 변화가 없었다.²⁴ 최근에는 인간을 대상으로도 ranibizumab의 약물동태학 연구가 보고되었는데 망막정맥 폐쇄, 당뇨황반부종, 연령관련 황반변성 환자들에게 유리체내 ranibizumab을 투여한 경우 전신순환에서 소량이 검출되었고 빠르게 제거되므로 전신적인 영향은 크지 않을 것이라고 하였다.^{19,20} 연령관련 황반변성 환자를 대상으로 한 ranibizumab, bevacizumab, aflibercept 주입술 후 약물동태학에 대한 연구를 보면 세 약제 모두 전신 순환으로 들어가나 bevacizumab과 aflibercept가 ranibizumab보다 청소율이 낮고 혈중 VEGF 농도를 훨씬 더 낮춘다고 하였다.²¹ 또한 한 대규모 임상시험³³에서는 연속적인 유리체내 bevacizumab 또는 ranibizumab 주입술 후 1년째에 VEGF 농도가 bevacizumab군에서 ranibizumab군보다 더 낮았다는 결과를 보여주었다. 이러한 연구들을 통해 비록 대상 질환이나 약물 투여 횟수, 혈액에서의 검출 시점이 다르긴 하지만 대체적으로 유리체내 투여한 bevacizumab이 ranibizumab보다 혈중 VEGF를 더욱 감소시키는 경향이 있다는 것을 알 수 있으며 본 연구에서도 이와 비슷한 결과가 나와 한국인을 대상으로도 이를 재확인할 수 있었다. 거기에 덧붙여 본 연구에서는 인간의 혈액에서 직접적으로 VEGF뿐만 아니라 anti-VEGF의 농도도 측정하였는데 bevacizumab은 유리체내로 투여한 후 1일, 1주, 1달 전 기간에 걸쳐 혈중 anti-VEGF 농도가 투여 전보다 상승해 있는 반면에 ranibizumab은 전 기간 동안 anti-VEGF 농도에 유의한 변화가 없었다. 이러한 결과를 통해 본 연구뿐만 아니라 앞서 기술한 다른 여러 연구에서도 나타난 bevacizumab이 ranibizumab보다 혈중 VEGF를 더 감소시키는 현상의 원인을 잘 설명할 수 있다.

이렇게 수많은 동물실험과 임상시험, 그리고 본 연구를

종합적으로 고려해 보면 대체로 bevacizumab에 비해 ranibizumab이 전신 순환에서 검출이 적고 전신적인 영향이 더 적은데, 그 이유는 앞서 서술하였듯이 ranibizumab은 full-length의 단일클론 항체인 bevacizumab과 달리 Fc domain을 갖지 않기 때문에 분자량이 작고 망막을 더 빨리 통과한 후 전신 순환에서 더 빨리 청소되기 때문으로 보인다. 실제로 Comparison of AMD Treatments Trials (CATT) research group의 대규모 다기관 무작위 임상 시험^{34,35}에서는 비록 유리체내 bevacizumab 투여 후 전신투여에서는 볼 수 없었던 전신 부작용도 나타나 제한적인 결론이긴 하지만 심각한 전신 부작용(serious systemic adverse events)에 의한 primarily hospitalization이 1년째와 2년째 모두 ranibizumab군보다 bevacizumab군에서 더 많이 나타났다고 하였다. 본 연구는 이러한 대규모 임상 시험 결과에 대해서 이론적으로 뒷받침해 줄 수 있는 논리를 제공하는 데에 도움이 될 것이다.

본 연구의 한계는 다음과 같다. 첫째, bevacizumab 투여군과 ranibizumab 투여군 사이에 인구 통계가 상이하다. 9명의 습성 연령관련 황반변성 환자와 5명의 당뇨 황반부종 환자, 5명의 근시성 맥락막 신생혈관 환자, 3명의 망막정맥 폐쇄 환자 등 총 22명의 환자를 대상으로 연구를 수행하였는데, ranibizumab군은 9명 모두 습성 연령관련 황반변성 환자인 반면, 그 외의 다른 질환들은 모두 bevacizumab군에 포함되어 있다. 따라서 집단 간의 직접적인 비교보다는 각각의 집단 내에서 개별적으로 유리체내 anti-VEGF 주입술 후 전신순환에서 anti-VEGF와 VEGF의 농도 변화가 어떻게 나타나는지 관찰하는 데 주안점을 두어야 할 것이다. 둘째, 연구 대상 환자의 표본 크기가 너무 작다. 이는 연구의 정확도를 높이기 위해 외상 또는 다른 안과적 질환에 의한 매체 혼탁으로 황반부 검사가 불가능한 환자, 선정 기준에 해당하는 질환 외에 다른 망막 또는 맥락막 질환도 같이 갖고 있는 환자, 최근 6개월 내에 안과적 수술을 시행한 환자, 최근 6개월 내에 유리체내 anti-VEGF 주입술을 받았거나 전신적인 anti-VEGF를 투여 받은 환자, 안내 레이저 광응고술 치료를 받은 환자, 그 외에 전신적인 VEGF 농도에 영향을 줄 수 있는 다른 질환들을 가진 환자들을 연구 대상에서 제외하였기 때문이다. 그럼에도 불구하고 bevacizumab은 투여 후 anti-VEGF의 혈중 농도가 크게 상승하고 ranibizumab은 투여 후에도 anti-VEGF의 혈중 농도변화가 거의 없다는 전반적인 경향의 차이가 대단히 뚜렷하며 여기에 상응하여 혈중 VEGF 농도가 bevacizumab군에서만 약물 투여 후 크게 감소하고 ranibizumab군에서는 투여 전후에 차이가 없다는 결과가 이를 뒷받침하기 때문에 전체적인 결과를 해석하고 결론을 도출하는 데에 큰 무리는 없을

것으로 보인다.

한편, anti-VEGF가 약제를 유리체내로 투여하기 이전에 채취한 혈액 샘플에서도 소량이지만 검출되었는데 이에 대한 원인으로는 이 실험이 microplate에 코팅된 인간 재조합 VEGF에 결합하는 anti-VEGF를 측정하는 방식이기 때문에 VEGF에 교차 반응하는 어떠한 물질이 사람의 혈액 내에 존재함에 따라 항원-항체 간의 비특이적인 반응을 일으켰을 가능성이 있을 것으로 예상된다.

결론적으로 bevacizumab은 유리체내로 투여한 후 혈액 내에서도 anti-VEGF가 유의하게 상승하는 것이 확인되었고 그에 상응해서 혈중 VEGF의 농도도 유의하게 감소하였으나 ranibizumab은 유리체내로 투여 후 혈중 농도에 유의한 변화가 없었고 이에 따라 혈중 VEGF 농도에도 유의한 영향을 주지 못하였다. 그러므로 심혈관계 위험 인자를 가진 환자에게 있어 bevacizumab을 사용할 때에는 전신적인 영향에 대한 고려와 함께 환자에게 잠재적인 위험성에 대한 충분한 설명이 필요할 수 있다.

REFERENCES

- 1) Tolentino M. Systemic and ocular safety of intravitreal anti-VEGF therapies for ocular neovascular disease. *Surv Ophthalmol* 2011; 56:95-113.
- 2) Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev* 2004;25:581-611.
- 3) Tong JP, Chan WM, Liu DT, et al. Aqueous humor levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor in polypoidal choroidal vasculopathy and choroidal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 2006;141:456-62.
- 4) Ng EW, Adamis AP. Targeting angiogenesis, the underlying disorder in neovascular age-related macular degeneration. *Can J Ophthalmol* 2005;40:352-68.
- 5) Adamis AP, Miller JW, Bernal MT, et al. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 1994;118:445-50.
- 6) Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG, et al. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994;331:1480-7.
- 7) Baffert F, Le T, Sennino B, et al. Cellular changes in normal blood capillaries undergoing regression after inhibition of VEGF signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H547-59.
- 8) Kamba T, Tam BY, Hashizume H, et al. VEGF-dependent plasticity of fenestrated capillaries in the normal adult microvasculature. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H560-76.
- 9) Lee S, Chen TT, Barber CL, et al. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. *Cell* 2007;130:691-703.
- 10) Storkbaum E, Lambrechts D, Carmeliet P. VEGF: once regarded as a specific angiogenic factor, now implicated in neuroprotection. *Bioessays* 2004;26:943-54.
- 11) Blaauwgeers HG, Holtkamp GM, Rutten H, et al. Polarized vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;155:421-8.
- 12) Marneros AG, Fan J, Yokoyama Y, et al. Vascular endothelial growth factor expression in the retinal pigment epithelium is essential for choriocapillaris development and visual function. *Am J Pathol* 2005;167:1451-9.
- 13) Nishijima K, Ng YS, Zhong L, et al. Vascular endothelial growth factor-A is a survival factor for retinal neurons and a critical neuro-protectant during the adaptive response to ischemic injury. *Am J Pathol* 2007;171:53-67.
- 14) Scappaticci FA, Skillings JR, Holden SN, et al. Arterial thromboembolic events in patients with metastatic carcinoma treated with chemotherapy and bevacizumab. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99:1232-9.
- 15) Gordon MS, Cunningham D. Managing patients treated with bevacizumab combination therapy. *Oncology* 2005;69 Suppl 3:25-33.
- 16) Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal ranibizumab (Lucentis). *Ophthalmology* 2007;114:2179-82.
- 17) Gaudreault J, Fei D, Beyer JC, et al. Pharmacokinetics and retinal distribution of ranibizumab, a humanized antibody fragment directed against VEGF-A, following intravitreal administration in rabbits. *Retina* 2007;27:1260-6.
- 18) Gaudreault J, Fei D, Rusit J, et al. Preclinical pharmacokinetics of ranibizumab (rhuFabV2) after a single intravitreal administration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:726-33.
- 19) Xu L, Lu T, Tuomi L, et al. Pharmacokinetics of ranibizumab in patients with neovascular age-related macular degeneration: a population approach. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2013;54:1616-24.
- 20) Zhang Y, Yao Z, Kaila N, et al. Pharmacokinetics of ranibizumab after intravitreal administration in patients with retinal vein occlusion or diabetic macular edema. *Ophthalmology* 2014;121:2237-46.
- 21) Avery RL, Castellarin AA, Steinle NC, et al. Systemic pharmacokinetics following intravitreal injections of ranibizumab, bevacizumab or aflibercept in patients with neovascular AMD. *Br J Ophthalmol* 2014;98:1636-41.
- 22) Matsuyama K, Ogata N, Matsuoka M, et al. Plasma levels of vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor before and after intravitreal injection of bevacizumab. *Br J Ophthalmol* 2010;94:1215-8.
- 23) Carneiro AM, Costa R, Falcão MS, et al. Vascular endothelial growth factor plasma levels before and after treatment of neovascular age-related macular degeneration with bevacizumab or ranibizumab. *Acta Ophthalmol* 2012;90:e25-30.
- 24) Zehetner C, Kirchmair R, Huber S, et al. Plasma levels of vascular endothelial growth factor before and after intravitreal injection of bevacizumab, ranibizumab and pegaptanib in patients with age-related macular degeneration, and in patients with diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol* 2013;97:454-9.
- 25) Bakri SJ, Snyder MR, Reid JM, et al. Pharmacokinetics of intravitreal bevacizumab (Avastin). *Ophthalmology* 2007;114:855-9.
- 26) Rouvas A, Liarakos VS, Theodosiadis P, et al. The effect of intravitreal ranibizumab on the fellow untreated eye with subfoveal scarring due to exudative age-related macular degeneration. *Ophthalmologica* 2009;223:383-9.
- 27) Avery RL, Pearlman J, Pieramici DJ, et al. Intravitreal bevacizumab (Avastin) in the treatment of proliferative diabetic retinopathy. *Ophthalmology* 2006;113:1695.e1-15.
- 28) Sawada O, Kawamura H, Kakinoki M, Ohji M. Vascular endothelial growth factor secretion by human retinal pigment epithelium and localization of vascular endothelial growth factor receptors on the inner choriocapillaris. Evidence for a trophic paracrine relation. *Am J Pathol* 1999;155:421-8.

- lial growth factor in fellow eyes of eyes injected with intravitreal bevacizumab. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 2008;246:1379-81.
- 29) Charbel Issa P, Finger RP, Holz FG, Scholl HP. Eighteen-month follow-up of intravitreal bevacizumab in type 2 idiopathic macular telangiectasia. Br J Ophthalmol 2008;92:941-5.
- 30) Al-Dhibi H, Khan AO. Bilateral response following unilateral intravitreal bevacizumab injection in a child with uveitic cystoid macular edema. J AAPOS 2009;13:400-2.
- 31) Velez-Montoya R, Fromow-Guerra J, Burgos O, et al. The effect of unilateral intravitreal bevacizumab (avastin), in the treatment of diffuse bilateral diabetic macular edema: a pilot study. Retina 2009;29:20-6.
- 32) Gamulescu MA, Helbig H. Lack of therapeutic effect of ranibizumab in fellow eyes after intravitreal administration. J Ocul Pharmacol Ther 2010;26:213-6.
- 33) IVAN Study Investigators, Chakravarthy U, Harding SP, et al. Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial. Ophthalmology 2012;119:1399-411.
- 34) CATT Research Group, Martin DF, Maguire MG, et al. Ranibizumab and bevacizumab for neovascular age-related macular degeneration. N Engl J Med 2011;364:1897-908.
- 35) Comparison of Age-related Macular Degeneration Treatments Trials (CATT) Research Group, Martin DF, Maguire MG, et al. Ranibizumab and bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration: two-year results. Ophthalmology 2012;119:1388-98.

= 국문초록 =

유리체내 베바시주맙과 라니비주맙 주입술이 전신 순환에 미치는 영향

목적: 유리체내 항혈관내피성장인자 주입술 전후로 항혈관내피성장인자와 혈관내피성장인자의 혈중 농도가 어떻게 변화하는지 알아 보았다.

대상과 방법: 총 28명의 망막 질환 환자를 대상으로 하여 17명에게 bevacizumab 1.25 mg을, 11명에게 ranibizumab 0.5 mg을 유리체 내로 주입하였다. 주입 직전과 주입 후 1일, 1주, 1달에 혈액 샘플을 채취하여 혈중 anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) 농도와 VEGF 농도를 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다.

결과: Bevacizumab 투여 전 anti-VEGF 농도는 91.0 ng/mL에서 1일, 1주, 1달 후 각각 153.6, 196.3, 140.3 ng/mL로 증가하였고(각각 $p < 0.05$), VEGF 농도는 투여 전 93.9 pg/mL에서 1일, 1주, 1달 후 각각 40.1, 24.7, 33.5 pg/mL로 감소하였다(각각 $p < 0.05$). Ranibizumab 투여 전 anti-VEGF 농도는 177.6 ng/mL에서 1일, 1주, 1달 후 각각 177.5, 160.7, 175.3 ng/mL로 유의한 변화가 없었고(각각 $p > 0.05$), VEGF 농도도 투여 전 80.9 pg/mL에서 1일, 1주, 1달 후 각각 96.7, 106.3, 106.1 pg/mL로 유의한 변화가 없었다(각각 $p > 0.05$).

결론: Ranibizumab과 달리 bevacizumab은 유리체내 주입술 후 혈중 VEGF 농도를 유의하게 낮췄다. 따라서 유리체내 bevacizumab 주입술의 전신적인 영향에 대한 고려가 필요할 수 있다.

〈대한안과학회지 2016;57(3):429-437〉