

방사면역치료(I): 방사면역접합체 개발

원자력의학원 핵의학연구소
최태현 · 임상무

Radioimmunotherapy (I): Development of Radioimmunoconjugates

Tae Hyun Choi, PhD. and Sang Moo Lim, M.D., PhD.

Nuclear Medicine Laboratory, Korean Institute of Radiological & Medical Science, Seoul, Korea

Monoclonal antibodies are designed to bind specifically to certain antigen, give therapeutic effect to the target and to be produced in large scale with homogeneity. The monoclonal antibodies conjugated with radionuclide can deliver therapeutic irradiation to the target, and showed successful results in certain malignancies, which is known as radioimmunotherapy. The target-to-background ratio depends on the antigen expression in the target and normal tissues, which is related to the therapeutic efficacy and toxicity in radioimmunotherapy. For the solid tumor beta-ray energy should be high, but lower beta energy is better for the hematological malignancies. I-131 is widely used in thyroid cancer with low cost and high availability. Labeling monoclonal antibody with I-131 is relatively simple and reproducible. Some preclinical data for the I-131 labeled monoclonal antibodies including acute toxicity and efficacy are available from already published literatures. In KIRAMS, physician sponsored clinical trial protocols using Rituximab, KFDA approved anti-CD20 chimeric monoclonal antibody and I-131 were approved by KFDA and currently are ongoing. (Nucl Med Mol Imaging 2006;40(2):66-73)

Key Words : radioimmunotherapy, radio isotope, monoclonal antibody, clinical trial

서 론

종양관련항원(tumor-associated antigens)은 종양세포에서 강하게 발현되는 특이항원을 말하며 이 특이항원에 대한 항체를 대량으로 생산하여 종양치료에 이용할 수 있다.¹⁾

항체와 관련하여 일어날 수 있는 치료반응은 1) apoptosis 2) CDC (complement-dependent cytotoxicity) 3) ADCC (antibody-dependent cellular cytotoxicity 4) 전리방사선에너지 네가지로 요약하여 볼 수 있다.²⁻⁵⁾ 이 중에서 방사면역치료는 전리방사선의 에너지를 이용하는 방법으로 여기에 사용되는 방사면역접합체(radio-immunoconjugate)는 특정 항원에 대하여 선택성이 있는 항체와 방사선을 방출하는 방사성 동위원소를 결합시킨 것이다.⁶⁾ 이러한 방사면역접합체는 진단과 치료에 이용될 수 있는데 선택적으로 표적부위에 집적되고 표적 이외의 부분에는 집적을 최소화시켜야 목적

을 달성할 수 있다.⁷⁾ 그러나, 진단을 목적으로 하는 여러가지 방사면역접합체는 20년전부터 제품화되었지만, (Table 1) 치료를 위한 목적으로 제품화된 것은 최근에 이르러서야 가능하게 되었다.(Table 2)⁸⁻¹¹⁾

영상을 목적으로 하는 경우 표적하는 항원과 백그라운드와의 결합비가 최대화 되는 시기에 영상을 획득하게 되고, 방사능이나 항체에 의한 독성이 크지 않다. 치료가 목적인 경우에는 투여된 항체가 혈류를 따라 이동하며 표적항원이 존재하는 세포나 조직에 결합이 이루어진 뒤 치료효과가 나타나나, 혈액 방사능, 정상조직에서의 비특이적 결합등에 의한 독성이 회복 가능한 투여량을 결정짓는 요소가 된다.(Fig. 1)¹²⁾

치료에서 표적장기 섭취가 오래 지속되는 것은 치료효과가 증가하는 것을 의미하나 혈액 내 반감기가 느리다는 의미는 골수 괴독의 증가를 의미한다.¹³⁾

항체의 선택

방사면역치료를 위한 항체는 IgG1, IgG2, IgG4로 설계하여 혈중내의 긴 반감기를 부여하고 ADCC나 CDC 반응이 나타나지 않도록 되어있는 것이 좋다.

항체의 선택에 있어서는 새로운 항체를 개발하여 사용하는 것이 연구성과로서는 가장 좋은 방향이지만, 새로운 항체

• Received: 2006. 4. 11. • Accepted: 2006. 4. 17.
• Address for reprints: Sang Moo Lim, M.D., PhD., Nuclear Medicine Laboratory, Korean Institute of Radiological & Medical Science, #215-4, Gongneung-dong, Nowon-gu, Seoul 139-706, Korea
Tel: 82-2-970-1341, Fax: 82-2-970-1341
E-mail: smlim328@kcch.re.kr

Table 1. Radioimmunoconjugates Developed for In Vivo Diagnostic Use

Antibody	Indication	Radionuclide
CEAScan	Colorectal cancer	Tc-99m
LeukoScan	Infection/Inflammation	Tc-99m
OncoScint CR/OV	Ovarian/Colon cancer	Tc-99m
Myoscint	myocardial infarction	In-111
ProstaScint	Prostate cancer	In-111
RIGSCAN CR49	Colorectal, Breast, Ovarian cancer	I-125
Verluma	SCLC	Tc-99m

Table 2. Radioimmunoconjugates on Clinical Trial

Antibody	Target	RI	Indication	Status
Oncolym	HLA-DR10	I-131	Diffuse large B-cell lymphoma	Phase I/II
Cotara (TNT)	Histone+DNA	I-131	Glioblastoma multiforme	Phase III
Epratuzumab	CD22	Y-90	B-NHL	Phase I/II
CEA-Cide	CEA	Y-90	Colorecta/pancreatic cancer	Phase I/II
CEA-Cide	CEA	I-131	Metastatic colorectal cancer	Phase II
Theragyn	PEM (polymorphic epithelial mucin)	Y-90	Ovarian and gastric cancer	Phase II/III

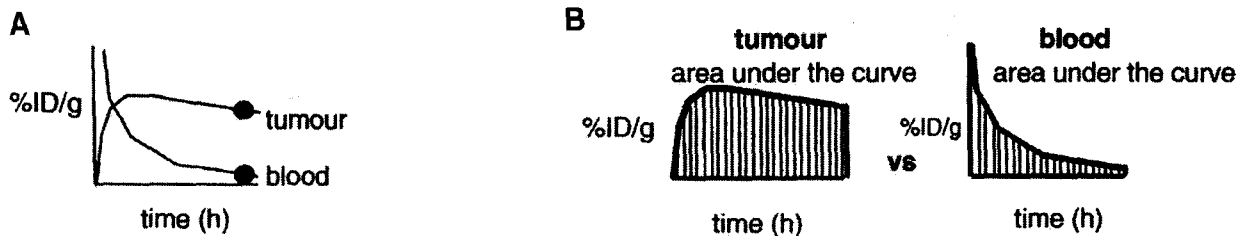


Fig. 1. Principles of Radioimmunoscintigraphy (A) and Radioimmunotherapy (B).

를 개발한다는 것은 쉽지 않다. 또한 상업화된 항체 회사들이 단일클론항체를 상업적으로 개발하여 특허를 받을 때 방사성동위원소를 항체에 표지하여 실제로 얻은 비임상, 임상 시험 결과가 없더라도 개연성을 가지고 청구항에 삽입하고 있어 한국 내에 있는 항체개발회사와 항체 개발초기에서부터 방사면역치료제 개발을 포함하지 않는다면 국내 신약으로서의 방사면역치료제의 개발은 어려운 상황이다. 현재 시점에서 방사면역치료제로서 실제로 임상에 적용 가능한 방법은 상업적으로 개발된 항체 (Table 3)와 치료용 방사성 동위원소의 방사면역접합체를 개발하여 비임상시험 결과를 얻고 방사면역치료제로서의 유효성 자료를 얻어 제품화 목적보다는 제한된 범위의 연구자임상시험 승인을 받는 것이 가능성이 크다 할 수 있다. 이러한 과정도 안정성과 유효성을 입증하기 위한 과정이 필요하다. 상업화된 항체 자체만으로 안전성이 확보되어 있다 하더라도, 항체의 특성에 따라 방사성동위원소 표지 후의 방사면역접합체의 독성이 항체 자체가 가지는 것과 동일할 수 없기 때문이다.

상업화된 항체의 종류

마우스 단일클론 항체 (murine monoclonal antibody)는 일반적으로 인간 작동체 기능이 결여되는데, 예를 들면 항체의 의존 세포 독성 또는 Fc-수용체 중재의 식균작용을 통한 상보성 의존 세포 용해 (ADCC) 또는 인간 표적 세포 용해 (CDC)를 조절할 수 없으며, 게다가 인간 면역체계에 의해 외부 단백질로 인지될 수 있으며, 이러한 외부 항체의 반복 주사는 유해한 과민증 (hypersensitivity) 반응을 유도하는 면역 반응의 도입을 유도할 수 있다. 마우스 유래된 단일클론 항체에서 인간 항-마우스 항체 (HAMA) 반응으로 불리는 반응이 종종 발생하는데¹⁴⁾ 키메라 항체의 사용은 마우스 유래 항체로 인한 강한 HAMA 반응을 도출하지 않기 때문에 보다 바람직하다. (Fig. 2)

면역요법에 사용되는 상업화된 항체는 다음과 같다. Rituximab은 대부분의 B-cells에 존재하는 CD20 항원에 결합하고, Herceptin은 일부 종양세포에서 발현되는 성장인자

Table 3. Commercialized Antibody as Drugs

	Antibody	Target	Indication	FDA Approved date
Chimeric Antibody	ReoPro	Platelet	Ischemic cardiac complications	1994
	Remicade	TNF-alpha	Crohn s disease & Rheumatoid arthritis	1998
	Rituxan	CD20	Non-Hodgkin s lymphoma	1997
	Erbitux	EGFR	EGFR-expressing, metastatic colorectal cancer	2003
Humanized Antibody	Herceptin	HER-2	Metastatic breast cancer	1998
	Synagis	RSV	RSV infection	1998
	Zenapax	IL2 R-alpha	Kidney transplantation rejection	1997
	Mylotarg	CD33	Relapsed CD33-positive AML	2000
	Campath	CD52	B cell CLL	2001
	Enbrel	TNF	Rheumatoid arthritis	1998
	Xolair	IgE	Asthma	2003
Raptiva	CD11-alpha	Psoriatic arthritis	2003	
HumanAntibody	Humira	TNF	Rheumatoid arthritis	2002

Table 4. Comparison of I-131 and Y-90 Radioimmunoconjugates

	I-131 tositumomab (Bexxar)	Y-90 ibritumomab fluxetan (Zevalin)
Gamma emission	Yes	No
Beta emission	0.81 MeV	2.3 MeV
Path length	0.8 mm	5 mm
Half-life	8.0 d	2.7 d
Radioisotope clearance	Rapid	Slower
Nontumor distribution	Thyroid	Bone
Imaging	Yes	No
Dosing determination	Dosmetry Whole body clearance	Per body weight Baseline platelet count
US FDA approval	2003	2002
Cost per patient	\$ 22,230	\$ 23,976

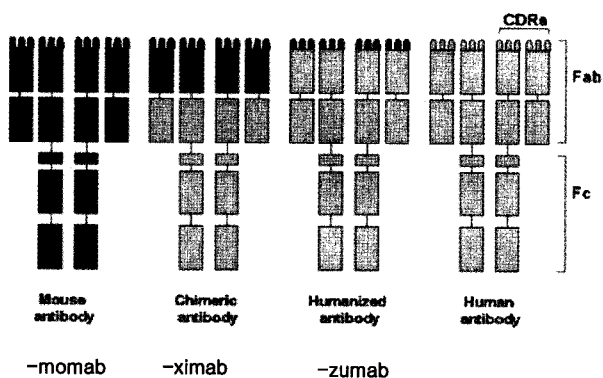


Fig. 2. Classification of recombinant antibodies

수용체인 HER2 항원에 결합한다. Alemtuzumab은 chronic lymphocytic leukemia의 백혈구의 표면에 발현하는 CD52 항원에 결합한다. Lym-1은 조직적합성 항원의 일종인 HLA-DR에 결합한다. Bevacuzumab은 VEGF (vascular endothelial growth factor)에 결합하여 신생혈관생성을 막는 역할을 한다.¹⁵⁾ Cetuximab (Erbitux)은 HER1에 결합한다.(Table 3)^{16, 17)}

Chemotherapy의 문제점은 세포분열을 하는 모든 조직세포에 무작위적으로 작용한다는 점이다. 이러한 단점을 극복

하고자 약물, 독소 또는 방사성 동위원소를 위와 같은 항체에 결합하여 사용하여 부작용을 최소화 시키고자 하는 시도가 있다. 현재 방사면역치료제로 임상시험이 진행 중인 Table 5와 같은 것이 있으며, 대표적인 방사면역치료제로 현재 제품화 된 것으로는 Bexxar와 Zevalin이 있다.(Table 4) 이 중에서 Zevalin은 Rituximab과 같은 CD20항원으로 표적으로 하지만 Rituximab과 같은 인간화 항체가 아닌 마우스 유래의 항체이며 In-111과 Y-90과 같은 방사성 동위원소가 표지가 가능하도록 킬레이트를 합성한 것이 다르다.¹⁸⁾

Bexxar의 경우 CD20 항원은 표적으로 하지만, 표지된 방사성동위원소로 I-131이 사용된 점이 구별되는 부분이다.^{19,20)}

Mylotarg은 최초로 상품화된 면역독소 결합체로 AML 종양세포에 발현되는 CD33에 결합하는 항체에 DNA의 이중 나선 구조를 파괴시키는 oligosaccharide인 calicheamicin과의 복합체이다.

BL22는 일부 leukemia와 lymphoma의 표면항체에 존재하는 CD22에 결합하는 항체에 세포의 단백질합성을 막는 박테리아 산물인 pseudomonas exotoxin의 접합체이다.

면역항체치료는 특히 혈액 악성종양에서 효과가 더욱 크게 나타나는데 그 이유는 혈액 종양세포에서 특이 표면항체

Table 5. Radionuclides of Current Interest in Radioimmunotherapy

Radionuclide	Half-life (h)	Radiation energy c (KeV)	haracteristics
I-131	193	beta-610(max), 192(mean) gamma-362(82%)	dehalogenation simple labeling chelator required
Sm-153	46	beta-810(max), 720(mean) gamma-103(28%)	no imaging
Y-90	64	beta-2,250(max), 930(mean) chelator required	generator system chelator required chelator required
Re-188	17	beta-120(max), 800(mean) gamma-155(10%)	
Re-186	90	beta- 1,076(max), 362(mean) gamma-137(9%)	

Table 6. Radionuclide Comparison of I-131 and Y-90

	I-131		Y-90	
	Advantage	Disadvantage	Advantage	Disadvantage
Energy	Gamma (0.36 MeV) Beta (0.6 MeV) Inexpensive Commonly available	Risk of gamma exposure Weak eta energy	Beta (2.3 MeV) No gamma radiation exposure	Expensive Less available Cannot be used for imaging
Path length	1~2 mm (beta) Useful in small volume disease	Less effective for bulk tumors	5~10 mm (beta) Better for large bulk tumors	Bystander effect Possible damage to normal tissues
Administration	Inpatient	Radiation risks	Outpatient	None
Half life	192h	More prolonged exposure	64h Less prolonged radiation exposure	May be difficult for central labeling facility
Radioimmunoconjugate stability	Variable Simple iodination techniques	In vivo dehalogenation Dosimetry required	48~75h stable chelate	Complex chelation chemistry

들이 잘 규명되어져 있기 때문이다.^{21,22)}

방사성동위원소의 선택

항체를 생체내 진단과 치료에 이용하기 위해서는 방사성 동위원소의 표지가 필수적이며, 항체의 방사성 동위원소 표지과정에서 항체에 손상을 적게 주는 것이 중요하다. 치료용 방사성 동위원소로 연구가 되고 있는 것은 여러가지가 있으나 국내에서 사용이 가능하거나 연구되고 있는 것은 제한적이다(Table 5). 일반적으로 널리 사용되는 I-123, I-131 등의 방사성옥소가 표지된 항체를 이용한 방사면역치료와 방사면역 신티그라피의 경우에 있어서는 dehalogenases 효소에 빠르게 dehalogenation이 일어나 신장을 통해 체외로 배출된다.²³⁻²⁹⁾ Radiometal을 항체에 표지할 경우 방사성옥소에 비해 안정되게 유지되는 것으로 보고되었다.³⁰⁻³²⁾ Y-90, Sm-153, Tc-99m이나 Re-188 등과 같은 radiometal을 표지하는 방법으로는 직접표지, bifunctional chelate의 사용, prelabelled ligand법 등이 있다.³³⁻⁴¹⁾ 직접표지는 그 과정이 간단하나 면역활성과 안정성에서 불규칙성의 단점을 가지고, bifunctional group을 단백질과 반응시켜 방사성 동위원소로 표지하는 방법은 실험과정에 항체의 손상을 주는 단점

이 있다.^{25,42-44)}

고형암의 경우에서 Y-90은 보다 짧은 반감기와 높은 beta energy로 I-131과 비교하여 dose rate가 10배 이상 암조직에 전달할 수 있으며, Y-90은 베타에너지 2.3 MeV와 투과거리 5-10 mm로 I-131의 0.8 MeV와 1-2 mm보다 적은 방사능으로 crossfire 효과를 통해 종양치료 효과가 좋을 것이다. 그러나 이러한 crossfire 효과는 종양크기가 작아질수록 효율이 떨어지기 때문에 짧은 투과거리의 베타에너지를 가지는 I-131의 에너지로도 micrometastasis나 지름 1 cm 이하의 림프종에서 효과적인 방사면역치료가 가능하다.(Table 6)^{42,45,46)}

감마선 방출이 없는 Y-90은 영상이 불가능하지만 본인 외의 다른 사람들에게 주는 피폭위험이 낮아 외래환자로 투여받을 수 있어 입원실이 필요없다. I-131의 장점은 Y-90 보다 긴 물리적 반감기와 저렴한 생산단가 그리고 표지방법이 간단하여 연구용과 임상시험용으로 국내사용이 가능하다는 것이다.^{47,48)}

특히, 표지방법이 간단하다는 것은 방사면역치료제를 원내 조제해야 하는 현재 국내상황에서 굉장히 중요한 장점이 다. 치료용 방사성동위원소로 많은 연구가 수행되었던 Re-188과 Re-186의 경우 방사면역치료제로 개발하기 위한 노력 중에서 가장 어려운 부분이 표지방법이 복잡하다는 것

이다.⁴⁹⁾ 직접표지 방법을 사용할 경우, 항체내의 -SH 기를 환원시키기 위하여 항체의 변형이 불가피하고,^{50,51)} 간접표지 방법의 경우는 그 과정이 여러 단계로 복잡하고 최종적으로 분리 정제 과정을 거쳐야 하기 때문에 별도의 시설을 요구한다. 비임상 시험에서는 큰 문제가 되지 않으나 임상 적용시에는 해결해야 할 많은 문제들이 발생한다.

Re-188, Sm-153 등과 같은 임상사용을 허가 받지 못한 방사성 동위원소나, 신개발된 항체를 방사면역치료제로 임상시험에 적용하기 위해서는 I-131 Rituximab과는 다른 과정을 거쳐야 할 것이다. Re-188을 사용하기 위해서는 Re-188 generator의 의약품허가가 우선되어야 할 것이고, Sm-153 등과 같은 원자로 생산핵종은 원내조제나 판매를 위해서 원료의약품이나 품목허가가 이루어져야 할 것이다. 허가받지 않은 항체는 항체 자체의 비임상시험자료가 확보되어야 임상시험승인이 가능할 것이다. 방사면역치료제로서 독성시험 자료는 핵종분석과 동물모델의 영상분석을 이용한 dosimetry로 제출할 수 있고, 효력시험은 In vitro 시험과 소 동물영상을 자료로 제출 할 수 있을 것이다. 방사면역치료제를 위한 연구자임상시험의 비임상시험자료는 상품화를 위한 임상시험과는 달리 합리적인 시험자료로 식약청승인이 가능할 것으로 생각된다.

Bexxar와 Zevalin 그리고 Rituximab

Bexxar는 tositumomab이라는 이름의 CD20 항원을 표적으로 하는 murine IgG2a lambda monoclonal antibody이다. 분자량은 약 150kDa으로 mammalian cell에서 생산된다.^{52,53)}

Zevalin은 ibritumomab이라는 이름의 CD20 항원을 표적으로 하는 murine IgG1 kappa monoclonal antibody에 tiuxetan이라는 킬레이터 [N-[2-bis(carboxymethyl)amino]-3-(p-isothiocyanatophenyl)-propyl]-[N-[2-bis(carboxymethyl)amino]-2-(methyl)-ethyl]glycine이 연결되어 있어 In-111이나 Y-90의 표지가 가능하도록 제조되었다.⁵⁴⁾ 분자량은 약 148 kDa으로 chinese hamster ovary (CHO) cell에서 생산된다.

과거 murine IgG 항체는 Kohler와 Milstein에 의해 착안된 단일클론항체 제작방법에 의해 마우스의 림프구와 마우스의 myeloma 세포의 융합 세포인 하이브리도마(hybridoma)로부터 생산되었으나,¹⁾ 2004년 현재 허가를 거쳐 시판중인 모든 항체 제품은 동물세포를 숙주 (host cell)로 이용하여 생산된 것이다.

Rituximab의 경우는 그 분자량은 약 145 kD이다. 키메라 마우스/사람 anti-CD20 항체는 마우스의 light- 및 heavy-

chain variable regions과 사람의 gamma 1 heavy-chain 및 kappa light-chain constant regions을 포함하는 chimeric IgG1 kappa 면역글로불린이다

앞서 서술한대로, Bexxar와 Zevalin에 사용되는 항체는 마우스 단일클론항체이고, rituximab은 키메라 마우스/사람 항체이다. 마우스 단일클론 항체를 사용한 보고에서도 HAMA는 약 7% 정도로 크지 않았고, 키메라 항체에 의한 HACA도 유사하다.⁵⁵⁾

Rituximab은 상품으로 구입이 가능하여 적절한 방사성 동위원소 표지로 연구와 임상시험 사용이 편리하다. 이러한 이유로 Rituximab에 I-131을 표지하여 임상시험을 한 연구가 보고되고 있다.⁵⁶⁻⁵⁹⁾

임상시험 승인을 위한 비임상시험 기준

비임상시험의 목적은 합법적인 의약품 임상시험 승인을 받거나 최종적으로 품목허가를 취득하기 위한 것이다. 방사성의약품의 경우 현재까지 신약의 제출자료와 관련하여 많은 독성시험들 중에서 단회투여독성시험자료 외의 다른 시험은 면제되며 약리작용에 관한 자료 제출에서도 흡수 분포 대사 및 배설시험자료 외에는 면제가능 시험으로 분류되어 있다.

임상시험계획 승인을 위한 제출자료의 범위에서 규정하는 생물학적제제, 유전자재조합의약품, 세포배양의약품, 유전자치료제, 세포치료제 및 식품의약품안전청장이 임상이 필요하다고 인정하는 의약품에 해당되는 경우에 비임상시험 성적에 관한자료 전체와 임상시험성적에 관한 자료 제출이 의무사항이 아닌 “제출자료의 범위는 개개 의약품의 특성에 따라 판단한다”라고 정하고 있다.

이러한 조항의 해석을 방사면역치료제에 적용하여 연구자임상시험 승인시 식약청규제가 합리적으로 적용될 수 있다.

현재 미국 FDA의 논의내용에 따르면 생물학적 제제의 의약품 사용(biopharmaceutical)에 관련하여 규제 내용을 논의하고 있으며 대부분의 내용은 international conference on harmonization (ICH)의 regulation을 반영하고 있다. 그 내용 중에서 진단용 방사성의약품과 치료용 방사성의약품은 임상시험을 위하여 안전성자료를 구별지어 요구하고 있다.

임상시험승인의 예(원자력의학원)

현재 원자력의학원은 2004년 12월 27일자로 “I-131 Rituximab을 이용한 악성 B 림프종 치료”의 제목으로 임상

시험의 단계 중에서 연구자임상(의약품안전과-23067호)으로 식품의약품안전청의 승인을 받아 임상시험을 실시하고 있다.

I-131 Rituximab의 경우는 I-131과 Rituximab 조제에 필요한 두 가지 성분이 이미 품목허가를 받아 판매되고 또한 외국에서 Bexxar와 Zevalin 등의 방사면역치료제가 공식적으로 판매되고 있기 때문에 승인을 받기가 용이하였다.

그러나 임상시험승인 과정에서 가장 어려웠던 부분은 Rituximab이 Mabthera라는 상품명으로 품목허가를 받고 판매되고 있고, I-131도 감상선치료제로 허가를 받은 약품이었으나, I-131의 경우 경구투여제 품목허가인 것을 주사제로 사용하는 것과 Rituximab의 경우 림프종치료제라는 동일한 적응증 대상이나 I-131은 그 적응증이 감상선종양으로 달라 I-131 Rituximab 치료제 자체에 대해 새로운 품목허가를 요구받았다. 특히 I-131을 Rituximab에 표지하는 과정을 화학적 구조가 달라지는 것으로 해석하여, 조제가 아닌 새로운 의약품을 만드는 제조로 보고자하는 부분의 이해를 얻는데 시간이 소요되었다. 아래는 임상시험승인을 받는 과정 중에 임상시험약의 조제 및 품질관리에 대한 자료의 요약 내용이다.

I-131 Rituximab 조제 및 품질관리

시험약의 물성에 관한 자료로는 I-131 Rituximab이 산화치환반응후 측정되는 비방사능(10 mCi/mL)을 계산하였고, 보관상의 안정성은 박종크로마토그래피법으로 측정확인하였다. 혈액에서의 안정성은 미국에서 판매되고 있는 The Bexxar therapeutic regiment을 인용하고 정상 마우스에서 투여 후 3 일까지의 장기분포실험 자료와 SCI 논문상에서 보여주는 환자에서 I-131 Rituximab의 혈중 반감기 자료와 비교하여 입증하였다. 독성자료는 SCI 논문의 보고를 인용하고 약리작용자료는 Bexxar, 약물동태는 SCI 문헌을 인용하였다. I-131 Rituximab의 조제 및 품질관리는 기존에 사용되고 있는 방사성의약품의 기시험법을 인용하여 작성하였다.

자가기준 및 시험방법

• 제법

Rituximab의 방사성 옥소화 (radioiodination)

Rituximab 10 분자(약 150,000)당 방사요오드 1 원자의 비율로 표지하기 위하여 Rituximab을 I-131과 iodo-bead 또는 iodogen이 들어있는 tube에 넣고 실온에서 1시간 방치한다. 이렇게 표지된 I-131 Rituximab의 비방사능(specific

activity)은 10 mCi/mg이다.

표지반응이 완료된 I-131 Rituximab을 1-4mg/mL의 농도가 되도록 생리식염수를 사용하여 희석한 다음 주사제의 제법에 따라 만든다.

• 품질관리

성상

이 약은 무색의 맑은 액이다.

• pH

4.5~8.0

• 확인 및 순도시험

• 방사화학 시험

이 약을 Acetone을 전개용매로 하여 여지 크로마토그래프법에 따라 전개하여 시험할 때 원점부근 이외의 방사능은 총 방사능의 10% 이하이다.

• 방사핵종 시험

이 약을 가지고 감마선측정법의 감마선스펙트로미터에 의한 스펙트럼측정법에 따라 방사능을 측정할 때 시험 당시 표시된 I-131 이외의 방사능은 총방사능의 0.3% 이하이다.

• 정량법

이 약을 가지고 감마선측정법의 전리함에 의한 정량법에 따라 시험한다.

• 엔도톡신 시험법

LAL (Limulus amebocyte lysate test) 검사법

Limulus Amebocyte Lysate (PYROTELL, Cape Cod사) single test vial을 사용하여 겔형성을 관찰하는 방법으로 시험하였다. 환자에 주입되는 I-131 Rituximab 주사약 0.2 mL를 vial에 넣고 37도에서 1 시간동안 반응한 다음 겔형성 여부를 관찰하였다.

• 무균 시험

대한약전 일반시험법 무균시험법에 따라 시험한다. 무균 시험법은 직접 배양법으로 증식되는 미생물(세균 또는 진균)의 유무를 시험한다. 세균 성장 관찰을 위하여 FTM (Fluid Thioglycolic Medium과 진균 성장관찰을 위하여 TSB (Tryptic Soy Bean Medium)에 I-131 Rituximab 주사제 0.1 mL를 각각 접종하고, 30-35°C와 20-25°C에서 14일 이

상 배양하고 3-5일째에 1 회, 7-9 일째에 1 회 및 배양최종일 까지 모두 3 회, 균의 발육의 유무를 관찰한다.

References

1. Stone MJ. Monoclonal antibodies in the prehybridoma era: a brief historical perspective and personal reminiscence. *Clin Lymphoma* 2001;2:148-54.
2. Wurflein D, Dechant M, Stockmeyer B, Tutt AL, Hu P, Repp R, et al. Evaluating antibodies for their capacity to induce cell-mediated lysis of malignant B cells. *Cancer Res* 1998;58:3051-8.
3. Macklis RM, Kaplan WD, Ferrara JL, Kinsey BM, Kassis AIBurakoff SJ Biodistribution studies of anti-Thy 1.2 IgM immunoconjugates: implications for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1988;15:383-9.
4. Nishihara T, Sawada T, Yamamoto A, Yamashita Y, Ho JJ, Kim YS, et al. Antibody-dependent cytotoxicity mediated by chimeric monoclonal antibody Nd2 and experimental immunotherapy for pancreatic cancer. *Jpn J Cancer Res* 2000;91:817-24.
5. Buske C, Dreyling M, Unterhalt M, Hiddemann W [Monoclonal antibody therapy for malignant lymphoma]. *Med Klin (Munich)* 2005;100:14-24.
6. Buchsbaum DJ, Lawrence TS. New trends in the use of radioimmunoconjugates for the therapy of cancer. *Targeted Diagn Ther* 1990;3:215-55.
7. DeNardo GL, Raventos A, Hines HH, Scheibe PO, Macey DJ, Hays MT, et al. Requirements for a treatment planning system for radioimmunotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1985;11:335-48.
8. Fink-Bennett DM, Thomas K. ⁹⁰Y-ibritumomab tiuxetan in the treatment of relapsed or refractory B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med Technol* 2003;31:61-8; quiz 69-70.
9. Goldenberg DM. The role of radiolabeled antibodies in the treatment of non-Hodgkin's lymphoma: the coming of age of radioimmunotherapy. *Crit Rev Oncol Hematol* 2001;39:195-201.
10. Wiseman GA, White CA, Stabin M, Dunn WL, Erwin W, Dahlbom M, et al. Phase I/II ⁹⁰Y-Zevalin (yttrium-90 ibritumomab tiuxetan, IDEC-Y2B8) radioimmunotherapy dosimetry results in relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med* 2000;27:766-77.
11. Gregory SA. Selecting patients for treatment with ⁹⁰Y ibritumomab tiuxetan (Zevalin). *Semin Oncol* 2003;30:17-22.
12. Reilly RM, Sandhu J, Alvarez-Diez TM, Gallinger S, Kirsh J, Stern H. Problems of delivery of monoclonal antibodies. Pharmaceutical and pharmacokinetic solutions. *Clin Pharmacokinet* 1995;28:126-42.
13. Lee YC, Washburn LC, Sun TT, Byrd BL, Crook JE, Holloway EC, et al. Radioimmunotherapy of human colorectal carcinoma xenografts using ⁹⁰Y-labeled monoclonal antibody CO17-1A prepared by two bifunctional chelate techniques. *Cancer Res* 1990;50:4546-51.
14. Mirick GR, Bradt BM, Denardo SJ, Denardo GL. A review of human anti-globulin antibody (HAGA, HAMA, HACA, HAHA) responses to monoclonal antibodies. Not four letter words. *Q J Nucl Med Mol Imaging* 2004;48:251-7.
15. van Laarhoven HW, Punt CJ. Systemic treatment of advanced colorectal carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004;16:283-9.
16. Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 2004;5:292-302.
17. Adams GP, Weiner LM. Monoclonal antibody therapy of cancer. *Nat Biotechnol* 2005;23:1147-57.
18. Cilley J, Winter JN. Radioimmunotherapy and autologous stem cell transplantation for the treatment of B-cell lymphomas. *Haematologica* 2006;91:113-20.
19. Stern M, Herrmann R. Overview of monoclonal antibodies in cancer therapy: present and promise. *Crit Rev Oncol Hematol* 2005;54: 11-29.
20. Lewington V. Development of ¹³¹I-tositumomab. *Semin Oncol* 2005;32:S50-6.
21. Illidge TM, Brock S. Radioimmunotherapy of cancer: using monoclonal antibodies to target radiotherapy. *Curr Pharm Des* 2000;6:1399-418.
22. Illidge TM, Johnson PW. The emerging role of radioimmunotherapy in haematological malignancies. *Br J Haematol* 2000;108:679-88.
23. Anderson WT, Strand M. Radiolabeled antibody: iodine versus radiometal chelates. *NCI Monogr* 1987;149-51.
24. Kobayashi H, Kao CH, Kreitman RJ, Le N, Kim MK, Brechbiel MW, et al. Pharmacokinetics of ¹¹¹In- and ¹²⁵I-labeled antiTac single-chain Fv recombinant immunotoxin. *J Nucl Med* 2000;41:755-62.
25. DeNardo GL, Kukis DL, Shen S, DeNardo DA, Meares CF, DeNardo SJ. ⁶⁷Cu-versus ¹³¹I-labeled Lym-1 antibody: comparative pharmacokinetics and dosimetry in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 1999;5:533-41.
26. Choi CW, Lang L, Lee JT, Webber KO, Yoo TM, Chang HK, et al. Biodistribution of ¹⁸F- and ¹²⁵I-labeled anti-Tac disulfide-stabilized Fv fragments in nude mice with interleukin 2 alpha receptor-positive tumor xenografts. *Cancer Res* 1995;55:5323-9.
27. Behr TM, Sgouros G, Vougiokas V, Memtsoudis S, Gratz S, Schmidberger H, et al. Therapeutic efficacy and dose-limiting toxicity of Auger-electron vs. beta emitters in radioimmunotherapy with internalizing antibodies: evaluation of ¹²⁵I- vs. ¹³¹I-labeled CO17-1A in a human colorectal cancer model. *Int J Cancer* 1998;76:738-48.
28. Behr TM, Behe M, Lohr M, Sgouros G, Angerstein C, Wehrmann E, et al. Therapeutic advantages of Auger electron- over beta-emitting radiometals or radioiodine when conjugated to internalizing antibodies. *Eur J Nucl Med* 2000;27:753-65.
29. Sharkey RM, Behr TM, Mattes MJ, Stein R, Griffiths GL, Shih LB, et al. Advantage of residualizing radiolabels for an internalizing antibody against the B-cell lymphoma antigen, CD22. *Cancer Immunol Immunother* 1997;44:179-88.
30. DeNardo GL, O'Donnell RT, Shen S, Kroger LA, Yuan A, Meares CF, et al. Radiation dosimetry for ⁹⁰Y-2IT-BAD-Lym-1 extrapolated from pharmacokinetics using ¹¹¹In-2IT-BAD-Lym-1 in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *J Nucl Med* 2000;41:952-8.
31. Blend MJ, Greager JA, Atcher RW, Brown JM, Brechbiel MW, Gansow OA, et al. Improved sarcoma imaging and reduced hepatic activity with indium-111-SCN-Bz-DTPA linked to MoAb 19-24. *J Nucl Med* 1988;29:1810-6.
32. DeNardo GL, DeNardo SJ, O'Donnell RT, Kroger LA, Kukis DL, Meares CF, et al. Are radiometal-labeled antibodies better than iodine-131-labeled antibodies: comparative pharmacokinetics and dosimetry of copper-67-, iodine-131-, and yttrium-90-labeled Lym-1 antibody in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Lymphoma* 2000;1:118-26.
33. Fani M, Xanthopoulos S, Archimandritis SC, Stratis N, Bouziotis P, Loudos G, et al. Biodistribution and scintigraphic studies of ¹⁵³Sm-labeled anti-CEA monoclonal antibody for radioimmunoscintigraphy and radioimmunotherapy. *Anticancer Res* 2003;23:

- 2195-9.
34. Fani M, Vranjes S, Archimandritis SC, Potamianos S, Xanthopoulos S, Bouziotis P, et al. Labeling of monoclonal antibodies with ¹⁵³Sm for potential use in radioimmunotherapy. *Appl Radiat Isot* 2002;57:665-74.
 35. Lewis MR, Zhang J, Jia F, Owen NK, Cutler CS, Embree MF, et al. Biological comparison of ¹⁴⁹Pm-, ¹⁶⁶Ho-, and ¹⁷⁷Lu-DOTA-biotin pretargeted by CC49 scFv-streptavidin fusion protein in xenograft-bearing nude mice. *Nucl Med Biol* 2004;31: 213-23.
 36. Crudo JL, Edreira MM, Obenaus ER, Chinol M, Paganelli Gde Castiglia SG Optimization of antibody labeling with rhenium-188 using a prelabeled MAG3 chelate. *Int J Pharm* 2002;248:173-82.
 37. Izard ME, Boniface GR, Hardiman KL, Brechbiel MW, Gansow OA, Walkers KZ. An improved method for labeling monoclonal antibodies with samarium-153: use of the bifunctional chelate 2-(p-isothiocyanatobenzyl)-6-methyldiethylenetriaminepentaacetic acid. *Bioconjug Chem* 1992;3:346-50.
 38. Stimmel JB, Kull FC, Jr. Samarium-153 and lutetium-177 chelation properties of selected macrocyclic and acyclic ligands. *Nucl Med Biol* 1998;25:117-25.
 39. van Gog FB, Visser GW, Stroemer JW, Roos JC, Snow GBvan, Dongen GA. High dose rhenium-186-labeling of monoclonal antibodies for clinical application: pitfalls and solutions. *Cancer* 1997;80:2360-70.
 40. Visser GW, Gerretsen M, Herscheid JD, Snow GBvan, Dongen G. Labeling of monoclonal antibodies with rhenium-186 using the MAG3 chelate for radioimmunotherapy of cancer: a technical protocol. *J Nucl Med* 1993;34:1953-63.
 41. Yoo TM, Chang HK, Choi CW, Webber KO, Le N, Kim IS, et al. Technetium-99m labeling and biodistribution of anti-TAC disulfide-stabilized Fv fragment. *J Nucl Med* 1997;38:294-300.
 42. Koppe MJ, Bleichrodt RP, Soede AC, Verhofstad AA, Goldenberg DM, Oyen WJ, et al. Biodistribution and therapeutic efficacy of (¹²⁵/¹³¹)I-, (¹⁸⁶)Re-, (⁸⁸/⁹⁰)Y-, or (¹⁷⁷)Lu-labeled monoclonal antibody MN-14 to carcinoembryonic antigen in mice with small peritoneal metastases of colorectal origin. *J Nucl Med* 2004;45: 1224-32.
 43. Kraeber-Bodere F, Mishra A, Thedrez P, Faivre-Chauvet A, Bardies M, Imai S, et al. Pharmacokinetics and biodistribution of samarium-153-labelled OC125 antibody coupled to CITCDTPA in a xenograft model of ovarian cancer. *Eur J Nucl Med* 1996;23:560-7.
 44. Najafi A, Alauddin MM, Sosa A, Ma GQ, Chen DC, Epstein AL, et al. The evaluation of ¹⁸⁶Re-labeled antibodies using N2S4 chelate in vitro and in vivo using tumor-bearing nude mice. *Int J Rad Appl Instrum B* 1992;19:205-12.
 45. Press OW, Rasey J. Principles of radioimmunotherapy for hematologists and oncologists. *Semin Oncol* 2000;27:62-73.
 46. Juweid ME, Sharkey RM, Behr T, Swayne LC, Dunn R, Siegel J, et al. Radioimmunotherapy of patients with small-volume tumors using iodine-131-labeled anti-CEA monoclonal antibody NP-4 F(ab')₂. *J Nucl Med* 1996;37:1504-10.
 47. Weadock KS, Sharkey RM, Varga DC, Goldenberg DM. Evaluation of a remote radioiodination system for radioimmunotherapy. *J Nucl Med* 1990;31:508-11.
 48. Behr TM, Gotthardt M, Becker W, Behe M. Radioiodination of monoclonal antibodies, proteins and peptides for diagnosis and therapy. A review of standardized, reliable and safe procedures for clinical grade levels kBq to GBq in the Gottingen/Marburg experience. *Nuklearmedizin* 2002;41:71-9.
 49. Griffiths GL, Goldenberg DM, Knapp FF, Jr., Callahan AP, Chang CH, Hansen HJ. Direct radiolabeling of monoclonal antibodies with generator-produced rhenium-188 for radioimmunotherapy: labeling and animal biodistribution studies. *Cancer Res* 1991;51:4594-602.
 50. John E, Thakur ML, DeFulvio J, McDevitt MR, Damjanov I. Rhenium-186-labeled monoclonal antibodies for radioimmunotherapy: preparation and evaluation. *J Nucl Med* 1993;34:260-7.
 51. Hamby CV, Chinol M, Manzo C, Ferrone S. Purification by affinity chromatography with anti-idiotypic monoclonal antibodies of immunoreactive monoclonal antibodies following labeling with ¹⁸⁸Re. *Hybridoma* 1997;16:27-31.
 52. Friedberg JW, Fisher RJ. Iodine-131 tositumomab (Bexxar): radioimmunotherapy for indolent and transformed B-cell non-Hodgkin's lymphoma. *Expert Rev Anticancer Ther* 2004;4: 18-26.
 53. Davies AJ. A review of tositumomab and I(131) tositumomab radioimmunotherapy for the treatment of follicular lymphoma. *Expert Opin Biol Ther* 2005;5:577-88.
 54. Chinn PC, Leonard JE, Rosenberg J, Hanna N, Anderson DR. Preclinical evaluation of ⁹⁰Y-labeled anti-CD20 monoclonal antibody for treatment of non-Hodgkin's lymphoma. *Int J Oncol* 1999;15:1017-25.
 55. DeNardo GL, Mirick GR, Kroger LA, Bradt BM, Lamborn KR, DeNardo SJ. Characterization of human IgG antimouse antibody in patients with B-cell malignancies. *Clin Cancer Res* 2003;9: 4013S-21S.
 56. Turner JH, Martindale AA, Boucek J, Claringbold PG, Leahy MF. ¹³¹I-Anti CD20 radioimmunotherapy of relapsed or refractory non-Hodgkin's lymphoma: a phase II clinical trial of a nonmyeloablative dose regimen of chimeric rituximab radiolabeled in a hospital. *Cancer Biother Radiopharm* 2003;18:513-24.
 57. Boucek JA, Turner JH. Validation of prospective whole-body bone marrow dosimetry by SPECT/CT multimodality imaging in ¹³¹I-anti-CD20 rituximab radioimmunotherapy of non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2005;32:458-69.
 58. Scheidhauer K, Wolf I, Baumgartl HJ, Von Schilling C, Schmidt B, Reidel G, et al. Biodistribution and kinetics of (¹³¹)I-labelled anti-CD20 MAB IDEC-C2B8 (rituximab) in relapsed non-Hodgkin's lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2002;29:1276-82.
 59. Behr TM, Griesinger F, Riggert J, Gratz S, Behe M, Kaufmann CC, et al. High-dose myeloablative radioimmunotherapy of mantle cell non-Hodgkin lymphoma with the iodine-131-labeled chimeric anti-CD20 antibody C2B8 and autologous stem cell support. Results of a pilot study. *Cancer* 2002;94:1363-72.