

아트로핀 및 팜 함유 다중챔버 단일주사기 및 KMARK-1: 비글개를 이용한 단회 근육투여 비교 생체이용률 연구

이근우^{*,1)} · 안서연¹⁾ · 권태근¹⁾ · 정인홍¹⁾ · 김동연¹⁾

¹⁾ 삼양화학공업(주) 기술연구소

A Multi-chambered Single Autoinjector and KMARK-1 Containing Atropine and 2-PAM: Comparative Bioavailability Studies Using Single Intramuscular Injection with Beagle Dogs

Keunwoo Lee^{*,1)} · Seoyeon An¹⁾ · Taekeun Kwon¹⁾ · Inhong Jung¹⁾ · Dongyeon Kim¹⁾

¹⁾ Samyang Chemical Research Institute of Technology Development, Korea

(Received 20 January 2017 / Revised 7 April 2017 / Accepted 30 June 2017)

ABSTRACT

In this study, multi-chambered single autoinjector(2in1) and KMARK-1 containing atropine and 2-PAM(pyridine-2-aldoxime methylchloride) were administered to the beagle's muscle, and blood samples were taken for a certain period of time to compare and evaluate the pharmacokinetic profiles of the two drugs. Male beagles were used and classified into two test groups(G1, G2), and crossover pharmacokinetic studies were performed in two test groups. Blood samples were collected from the jugular vein for analysis after administration. The 90 % confidence interval(CI) for log transformed data indicated that the Cmax for both atropine(log 0.9683 ~ log 1.113) and 2-PAM(log 0.9453 ~ log 1.214) was within the limits of bioequivalence criteria, but the AUC for atropine(log 1.1786 ~ log 1.3238) failed to meet this criteria. This is expected as the amount of atropine dose is 25 % higher for the test as compared to the reference formulation.

In summary, in view of the ATNAA(antidote for nerve agent of US) authorization, the Cmax equivalence was more important than AUC equivalence, so in this study, we also focused on verifying the equality of Cmax between the two autoinjectors.

Key Words : Antidote(해독제), Autoinjector(자동주사기), Pharmacokinetics(약물동태학), Bioavailability(생체이용률)

* Corresponding author, E-mail: leekw@samyangchem.com
Copyright © The Korea Institute of Military Science and Technology

1. 서론

유기인계 화합물(organophosphorus compounds)인 신

경작용제(nerve agent)는 무색, 무취로 액체, 증기 또는 에어로졸 상태로 매우 광범위하게 살포되어 호흡기나 피부 등 경로를 통하여 인체와 접촉하게 되며, 신경계(nervous system) 중독현상을 발현한다¹⁻³. 널리 알려진 유기인(organophosphate, OP) 계열의 대표적인 신경작용제는 GA(tabun), GB(sarin), GD(soman), GF(cyclosarin) 및 VX(V-agent) 등이 있다. 이들 신경작용제는 화학작용제 중 가장 맹독성이며, 소량의 노출에도 빠른 시간 내 치명적인 독성을 발현하기 때문에 신속한 해독제 투여가 요구된다. 유기인계 화합물에 의한 급성 신경작용제 중독 증상에 대한 해독은 항콜린제(anticholinergics)인 아트로핀(atropine)과 신경작용제에 의해 억제된 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase, AChE)를 재활성화 시킬 수 있는 옥심(oximes)계 약물의 복합투여로 증상 완화 및 치료효과를 달성할 수 있다⁴.

현재 세계 여러 나라의 효과적인 신경작용제 해독제는 항콜린제(anticholinergics)인 아트로핀과 저해된 아세틸콜린에스테라제(AChE)를 재활성화 시킬 수 있는 옥심(oximes)계 약물인 오비독심(obidoxime) 등을 순차적으로 병용 투여 할 수 있는 자동주사기 형태로 구성되어 있으며, 이들 약물의 병용 투여는 상호 탁월한 상승작용을 나타낸다^{5,6}.

한국군은 1980년대 국방과학연구소 주도로, 아트로핀 자동주사기 및 팜(pyridine-2-aldoxime methyl chloride, 2-PAM) 자동주사기를 키트화한 미국의 MARK-1을 모방 개발하여, 아트로핀 자동주사기는 1981년에, 팜 자동주사기는 1987년에 식품의약품안전처(Ministry of Food and Drug Safety, MFDS. 이하 ‘식약처’로 약칭)의 허가를 획득하고 2개의 자동주사기를 키트화한 KMARK-1을 전력화 하였다(Fig. 1)⁷.



Fig. 1. Antidote, KMARK-1(cited from ref. 7)

KMARK-1은 해독 처치 시 스프링의 활성 압력을 이용하여 아트로핀 주사제 및 팜 주사제를 순차적으로 자가 근육 투여할 수 있도록 자동주사기 형태로 설계되어 있다.

효과적인 해독처치를 위하여 유효한 두 가지 해독 약물을 수 분 이내 순차적으로 신속하게 투여하여야 하나, 현재 운용 중인 KMARK-1은 해독 처치 시 2개의 자동주사기를 각각 투여해야 하기 때문에 투여시간 지연으로 인한 해독효과 저하 및 일부 신경계통이 손상된 환자의 자가 투여가 어려울 수 있다는 문제가 제기되었다. 이러한 단점을 보완하고 신속한 약물투여로 해독효과를 극대화하고자 미군은 육군 주도하여 MARK-1의 두 종류의 자동주사기를 1개의 자동주사기로 단일화한 ATNAA(Antidote Treatment Nerve Agent Auto-injector)를 개발하여, 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, 이하 ‘FDA’로 약칭)으로부터 ‘의약품 품목허가’(NDA 21-175, 2002. 1. 17)를 획득하여 MARK-1을 대체하고 있다(Fig. 2)⁸.

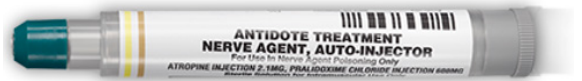


Fig. 2. Antidote, ATNAA(cited from ref. 8)

미군은 ATNAA의 ‘의약품 품목허가’ 획득을 위해 FDA에 총 27종의 자료를 제출하였다(Table 1).

Table 1. Organization of submission for ATNAA approval

순번	목록
Volume 1.1	Application Form (FDA Form 356h), cover letter, Index (item 1), labeling (item 2), Overall Summary (item 3) and Letters of Cross Reference.
Volume 1.2-1.11	Chemistry, Manufacturing, and Controls Information (item 4.A)
Volume 1.12-1.13	Methods Validation Package (item 4.C)
Volume 1.14	Statements and Certifications including the Environmental Impact Assessment, Samples Statement (item 4.B), Patent Certification (item 14), Field Copy Certification (Item 17), and four copies of the draft labeling (item 2)
Volume 1.15-1.27	Human Pharmacokinetic and Bioavailability information (item 6)

이들 자료 중 ‘Human Pharmacokinetic and Bioavailability information’은 두 자동주사기 간의 주성분의 비교 생체이용률 연구(Comparative bioavailability studies)에 관한 것으로, 임상시험을 실시하여 두 자동주사기의 주성분의 체내 농도가 동일함을 입증하였다⁹⁾.

본 연구팀의 선행 연구 논문¹⁰⁾에서 이와 관련한 내용을 상세히 기술하였다. 선행 연구 논문 내용을 간략하게 요약하면, MARK-1의 주사액을 시간 간격을 두어 순차적으로 투여하였을 때와 ATNAA의 주사액을 연속적으로 투여하였을 때 생체이용률 연구의 주요 파라미터(parameter)인 주성분의 최고혈중농도(maximum drug concentration, 이하 ‘Cmax’로 약칭) 및 혈중농도-시간반응곡선하면적(area under the plasma concentration-time curve, 이하 ‘AUC’로 약칭) 등을 관찰한 후 그 결과를 통계 처리하여 신뢰도를 평가하였다(Table 2). 최고혈중농도 도달시간(time of maximum concentration, Tmax)은 주요 변수로 고려하지 않았다.

Table 2. The confidence intervals for two different autoinjector delivery systems in healthy volunteers(cited from ref. 9)

성분	Cmax (90% CI)*	AUC (90% CI)
아트로핀	1.08 ~ 1.23	1.27 ~ 1.35
팜	1.02 ~ 1.22	0.87 ~ 1.00

* CI : Confidence interval

MARK-1과 비교하여 주성분의 Cmax를 동일하게 유지시키기 위해 ATNAA의 아트로핀 농도를 1.67 mg/0.7 mL에서 2.1 mg/0.7 mL로 25 % 증량하였으며, 그 결과 주성분 간의 Cmax가 동일하게 유지되었다.(팜의 농도는 600 mg/2.0 mL로 동일하다.) 비록 시험결과를 로그(log) 변환하여 통계 처리한 값이 아트로핀의 AUC는 90 % 신뢰구간을 벗어난 값을 보였지만 Cmax가 중요 평가 변수임을 고려하였을 때 그 값이 90 % 신뢰구간 이내이므로 MARK-1과 ATNAA가 생체이용률(bioavailability) 면에서 동등함이 입증되어 FDA의 허가를 획득하였다.

미국 FDA의 ‘성분별 생동성시험 지침’에 따르면 생물학적 동등성 기준을 90 % 신뢰구간(CI)에서 log 0.8 ~ log 1.25로 규정하고 있다.

본 연구팀에서도 운용의 편의성을 극대화하고, 유효한 신경작용제 해독약물인 아트로핀 및 팜의 두 가지

해독제를 1회 조작으로 신속하게 해독 처치할 수 있는 수단인 다중챔버 단일주사기(2in1)를 개발하였다(Fig. 3)¹¹⁾. ATNAA와 동일하게 다중챔버 단일자동주사기(2in1)의 아트로핀 농도를 KMARK-1의 아트로핀 농도보다 25 % 증량하여 Cmax가 동일하도록 하였다.



Fig. 3. Multi-chambered single autoinjector(2in1)

본 연구의 목적은 다중챔버 단일주사기(2in1)와 기존주사기(KMARK-1)의 생체 이용률을 비교하기 위한 것이다. 이를 위해 실험동물을 이용한 교차약물동태시험(crossover pharmacokinetics study)을 실시하여 생체이용률이 동일함을 입증하고자 한다. 나아가 추후 임상시험을 통해 다중챔버 단일주사기(2in1)의 ‘의약품 품목허가’를 획득하고, 최종적으로 한국군의 화생방전 전력을 보장하는 데 있다.

‘의약품 품목허가’를 위한 시험규정에 의하면, 미국 FDA와 동일하게 한국의 식약처도 「의약품동등성시험기준」(식약처 고시 제2016-135호, 2016. 12. 8) 제17조(평가) ③호에 “Tmax를 제외한 대조약과 시험약의 비교평가항목치를 로그변환하여 통계처리 하였을 때, 로그변환한 평균치 차의 90 % 신뢰구간이 log 0.8에서 log 1.25 이내이어야 한다” 라고 명시하고 있다. 이에 따라 아트로핀 및 팜 함유 다중챔버 단일주사기(2in1)와 KMARK-1를 비글개의 근육투여경로(intramuscular injection)로 단회 투여한 후 일정시간 간격을 두어 혈액시료를 채취, 분석하여 약물동태(pharmacokinetics, PK) 프로파일(profile)을 비교·평가하고, 추후 ‘의약품 품목허가’ 획득을 위한 임상시험의 참고자료로 본 연구의 시험결과를 활용하고자 한다.

2. 본 론

2.1 시험물질 및 제형

약물동태학 연구를 위해 사용한 시험물질은 아래와 같으며 삼양화학공업(주)에서 제조하였다.

2.1.1 시험물질 1

- 명칭 : 다중챔버 단일주사기(2in1)
아트로핀(2.1 mg/0.7 mL) +
팜(600 mg/2.0 mL) 주사기
- Batch/Lot Number : 삼양-16-MA-001
- 외관 및 성상 : 약제를 충전한 자동주사기
- 순도(성분) : 아트로핀 99.36 %, 팜 104.46 %
- 보관조건 : 실온보관(15 ~ 30 °C)
- 취급시 주의사항 : 얼리지 말고 보관하며,
충격과 화기를 피함

2.1.2 시험물질 2

- 명칭 : 기존주사기(KMARK-1)
아트로핀(1.67 mg/0.7 mL) +
팜(600 mg/2.0 mL) 주사기
- Batch/Lot Number : 삼양-15마986-168
- 외관 및 성상 : 약제를 충전한 자동주사기
- 순도(성분) : 아트로핀 99.86 %, 팜 104.94 %
- 보관조건 : 실온보관(15 ~ 30 °C)
- 취급시 주의사항 : 얼리지 말고 보관하며,
충격과 화기를 피함

2.2 시험동물 및 사육관리

시험동물의 사육관리 및 혈액 채취는 ㈜노터스에서 실시하였다. 본 연구를 위해 새로이 입수한 수컷 비글 개 11마리(naive dog)와 시험기관의 Stock Colony에서 사육관리 중인 건강한 수컷 비글 개 3마리(체중범위 : 15 ~ 18 kg, 총 14마리)를 시험에 공시하였다. 투여 직 전 체중을 측정하고 외형적 이상 유무를 확인한 후 가 급적 유사한 체중으로 선발하여 군을 구성하였다.

시험동물은 시험기관의 중동물 사육실에서 사육하였으며, 시험기간 중 동물실 환경은 온도 20 ~ 24 °C, 습도 40 ~ 60 %, 환기횟수 시간 당 최소 10회 및 12시간 자동조명(조명 08:00 ~ 20:00, 조도 150 ~ 300 Lux)으로 유지하였으며, 시험의 결과에 영향을 줄 만한 환경요인은 없었던 것으로 판단되었다. 시험 중인 동물은 스테인레스 재질의 개 사육상자[800W × 900L × 800H (mm)]를 이용하여 각각 1마리씩 수용하여 관리하였다. 오전 사육관리 시 사육상자 바닥판의 분, 뇨를 처리하였다. 사료는 바이오피아로부터 ㈜카길에그리퓨리나에서 생산하는 실험동물용 개사료를 공급받아 개체 별로 약 300 g씩 급이하였다. 음수는 사육상자 내부의 자동급수장치를 통하여 공급하였다. 사료에 대하여는

사료 구입 시 첨부된 로트별 시험성적서를 통하여 일 반성분의 조성과 오염물질 유무를 확인하였고, 물에 대해서는 “먹는물 수질기준 및 검사 등에 관한 규칙”에서 정한 바에 따라 분석을 의뢰하여 시험의 결과에 영향을 미치지 않는 것을 확인하고 사용하였다. 동물 공급원으로부터 새겨진 문신을 이용하여 동물을 식별 하였다.

2.3 시험방법

2.3.1 시험물질 취급

투여시간 중 조제물은 실온에서 취급하였다.

2.3.2 조제물 분석

조제물의 농도는 제조 후 분석한 완제품 시험성적서를 바탕으로 하였다.

2.3.3 투여경로 및 선정근거

본 시험물질은 사람에서의 적용경로를 고려하여 근육투여로 시험을 실시하였다.

2.3.4 시험군 구성 및 투여용량

시험군은 2군으로 구성하였고, 각 군당 수컷 비글 개 7마리를 사용하였으며 교차약물동태시험을 실시하였다 (Table 3).

Table 3. Test group for PK study of autoinjector

1st PK)

군	주사기	투여 농도 (mg/head)	투여 용량 (mL/head)	동물 수
G1	다중챔버 단일주사기(2in1)	2.1 + 600	0.7 + 2.0	7
G2	기존주사기 (KMARK-1)	1.67 + 600	0.7 + 2.0	7

2nd PK)

G1	기존주사기 (KMARK-1)	1.67 + 600	0.7 + 2.0	6*
G2	다중챔버 단일주사기(2in1)	2.1 + 600	0.7 + 2.0	7

* : 1차 PK-G1, 1레에서 임상증상 관찰 후 사망

2.3.5 투여방법

각각의 자동주사기는 안전침 부분이 위쪽으로 향하도록 하여 손바닥으로 감싸듯 잡았다(Fig. 4).

G1군의 경우 보조자가 개를 편안히 안듯이 감싸서 보정하였고, 투여자는 접종 전 70 % 알코올 솜으로 주사부위를 소독하고 한 손으로 개의 뒷다리를 보정한 후 대퇴근육에 단일주사기를 수직으로 대고 작동이 될 때까지 세게 누른 후 10초 정도 기다리는 방식으로 근육투여를 실시하였다.

G2군의 경우 아트로핀 자동주사기를 먼저 키트에서 뽑아서 대퇴 근육에 자동주사기를 수직으로 대고 작동이 될 때까지 세게 누른 후 10초 동안 기다렸다. 아트로핀 투여 직후(5초 이내)에 팜 자동주사기를 아트로핀 투여 부위에서 2 cm 정도 떨어진 곳에 상기와 동일한 방법으로 근육 투여를 실시하였다(Fig. 5). 주사 부위에 투여 물질액이 유출되는지 확인하였으며, 투여 일을 시험 1일(Study Day 1)로 정의하였다.

2차 시험은 1차 시험의 마지막 채혈 후 7일간의 휴지기를 거친 다음 1차 시험과 동일한 방법으로 주사제를 투여하고 채혈을 실시하였다.

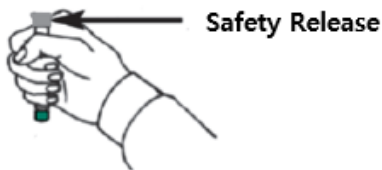


Fig. 4. Method of place the autoinjector

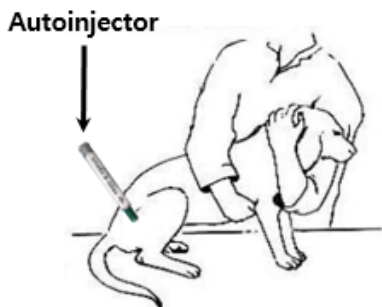


Fig. 5. Method of use the autoinjector

2.4 관찰방법

2.4.1 사망여부 및 임상증상 관찰

시험기간 동안 모든 동물에 대하여 최소 1일 1회 사망동물 및 빈사동물 발생여부를 관찰하고 임상증상

(중독사, 괴사, 마비, 경련, 강직 등의 중독증상이나 현저한 체중감소 및 기타 이상한 증상) 및 사료, 음수의 정상섭취 여부(정성적 관찰)를 개체 별로 관찰하였다. 단, 투여당일은 투여 후 1시간까지는 지속적으로 관찰하였고, 그 후부터는 1시간 간격으로 4시간 동안 관찰하였다. 또한 투여부위에서 이상증상이 관찰될 경우 상세히 기록하였다.

2.4.2 체중측정

투여 직전(Day 1) 및 시험기간 중 주 1회, 마지막 채혈 완료 후 개체별 체중을 측정하였다.

2.4.3 혈액채취 및 혈장분리

투여 후 항응고제(heparine Na) 처리된 1회용 주사기(1 mL, 23 G needle)를 이용하여 투여 전(0시간), 투여 후 5, 10, 20, 30분, 1, 2, 4, 8, 12, 24시간(총 11포인트) 경과 시 비글개의 경정맥에서 채혈(약 1.5 ~ 2.0 mL)을 실시하였다(Fig. 6).



Fig. 6. Blood collection from the jugular vein

채혈 후 혈액은 10,000 ~ 13,000 rpm에서 1 ~ 2분간 원심 분리하여 혈장을 분리한 후 분리된 혈장을 시험구분, 동물번호 및 채혈시간이 표시된 3개의 tube에 각각 약 200 μ L/tube씩 담아 초저온 냉동고(약 -70 $^{\circ}$ C)에 보관하였다. 혈장은 배송상자에 드라이아이스를 넣어 포장한 후 4시간 이내에 시료 분석기관으로 이송하였다.

2.4.4 약물동태분석

혈액 중 약물의 분석은 (주)한국의약품연구소에서 두 사용 약물에 대해 분석법 밸리데이션을 실시하여 검증한 후 실시하였다. 분석 장비로는 HPLC(Waters(Acquity UPLC system), Waters, USA) 및 MS/MS(Waters(Xevo

TQ-S), Waters, USA)를 사용하였고, Hector-A C18(2.1 × 50 mm, 3 um particle size, RS tech) 컬럼으로 분석하였다. 표준물질로 아트로핀(C₁₇H₂₃NO₃(289.369), 99 %, Sigma-Aldrich) 및 팜(C₇H₉N₂OCl(172.612), 100 %, Sigma-Aldrich)을 사용하였으며, Levobupivacaine hydro-chloride (C₁₈H₂₈N₂O·HCl(324.889), 100 %, Sigma-Aldrich) 및 Carbamazepine(C₁₅H₁₂N₂O(236.269), 100 %, Sigma-Aldrich)을 아트로핀 및 팜 분석용 내부 표준물질로 사용하였다. 검량선은 아트로핀의 농도가 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 500 ng/mL가 되도록 표준혈장을 만들어 사용하였으며, 팜은 농도가 100, 200, 1000, 5000, 25000, 100000, 150000 ng/mL가 되도록 표준혈장을 만들어 사용하였다. 농도별로 제조한 표준시료용액을 분석장비에 주입하여 얻은 크로마토그램으로부터 내부 표준물질의 피크 면적에 대한 아트로핀 및 팜의 피크 면적비를 가지고 작성하였다. 검량선 검증은 항응고제가 heparine Na인 비글개의 공혈장에 농도를 알고 있는 표준물질을 희석하여 제조한 표준혈장을 사용하였다. 시료의 분석은 -70 °C에 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 30초 간 vortex mixing 한 다음 이 혈장 시료 50 µL를 취하여 전처리 후 분석 장비에 주입하여 크로마토그램을 얻었다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 아트로핀 및 팜의 피크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 두 성분의 농도를 계산하였다. 생체이용률 파라미터(bioavailability parameter)는 각 개체에서 시험물질 및 대조물질을 투여한 후 구한 시간별 혈장 중 약물 농도를 계산 프로그램(BA Calc 2007, ver 1.1.0)을 이용하여 산출하였다. 시험결과와 통계처리는 생물학적 동등성 통계처리용 프로그램(K-BE Test 2007, ver 1.1.0)을 이용하여 Tmax를 제외한 각 파라미터를 로그변환한 값에 대하여 대조약과 시험약의 로그변환한 평균치 차의 90 % 신뢰구간을 구하였다^[12].

2.4.5 검체검증분석

혈장 시료의 약물동태분석을 종료한 후 분석법의 정확성 및 신뢰성을 평가하기 위하여 검체검증분석(Incurred Sample Reanalysis, ISR)을 실시하였다. 전체 혈장 시료의 10 %에 해당하는 수만급 검체를 선정하였다. 검체검증분석 대상 검체는 C_{max} 및 소실기 부근에서 무작위 추출하여 분석하였고, 검체검증분석 결과와 최초분석 결과를 비교하였다. 분석법은 약물동태 분석의 분석법 밸리데이션 및 혈장 시료 분석법과 동

일하게 실시하였다.

검체검증분석 결과와 최초분석 결과간의 편차는 다음의 수식에 따라 구하였다^[13].

$$\text{편차(\%)} = \frac{\text{검증분석값}-\text{최초분석값}}{\text{검증분석값과 최초분석값의 평균값}} \times 100$$

2.5 시험결과 및 고찰

2.5.1 사망여부 및 임상증상

1, 2차 약물동태시험에서 시험물질 투여당일(Day 1)에 모든 시험군에서 개체별로 정도의 차이는 있으나 발작, 경련, 유연, 기립불능, 포말성 구토 및 심박수와 호흡수 증가 등이 주로 관찰되었다(Table 4).

Table 4. Mortality and clinical observation

1st PK)

군	주사기	임상증상	사망률 (%)
G1	다중챔버 단일주사기 (2in1)	Convulsion, Seizure, Astasia, Irregular Respiration, Frothy Vomitus, Decrease in Locomotor Activity, Death	1/7 (14.3)
G2	기존주사기 (KMARK-1)	Convulsion, Seizure, Astasia, Irregular Respiration, Frothy Vomitus, Decrease in Locomotor Activity	0/7 (0)

2nd PK)

G1	기존주사기 (KMARK-1)	Diarrhea, Convulsion, Astasia, Irregular Respiration, Frothy Vomitus	0/6 (0)
G2	다중챔버 단일주사기 (2in1)	Convulsion, Astasia, Frothy Vomitus, Ataxic Gait, Irregular Respiration, Decrease in Locomotor Activity	0/7 (0)

이러한 임상증상은 투여 후 2시간 이후부터는 회복되기 시작하여 3시간 경과 시에는 임상증상이 관찰된 대부분의 개체가 회복되었다. 1차 시험에서 단일주사기 투여군(G1)에서 위에 기술한 임상증상이 관찰된 후 ‘개체특이성’으로 인해 사망개체 1례가 발생하였다.

2.5.2 체중측정

시험 전·후 체중변화는 관찰되지 않았다(Table 5).

Table 5. Body weights

1st PK)

군	주사기		체중 (kg)
G1	다중챔버 단일주사기 (2in1)	Mean	16.36
		SD	0.78
		N	7
G2	기존주사기 (KMARK-1)	Mean	16.36
		SD	0.73
		N	7

2nd PK)

G1	기존주사기 (KMARK-1)	Mean	16.43
		SD	0.79
		N	6
G2	다중챔버 단일주사기 (2in1)	Mean	16.39
		SD	0.60
		N	7

2.5.3 분석방법 밸리데이션

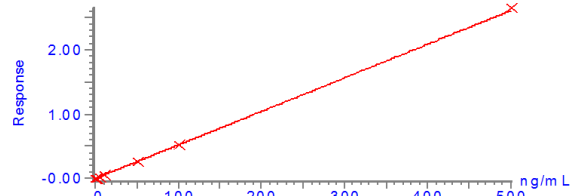
혈장 시료로부터 구한 두 약물의 검량선에서 변동계수(r^2)는 0.99 이상이었으며, 아트로핀은 0.5 ~ 500 ng/mL 범위에서, 팜은 100 ~ 150000 ng/mL 범위에서 양호한 직선성을 나타내었다(Fig. 7).

2.5.4 약물동태분석

아트로핀의 단일주사기 투여군 및 기존주사기 투여군의 통계처리 결과 AUC의 경우 대조약과 시험약의 로그변환한 평균치 차의 90 % 신뢰구간이 $\log 1.1786 \sim \log 1.3238$ 으로 $\log 0.8 \sim \log 1.25$ 이내이어야 한다

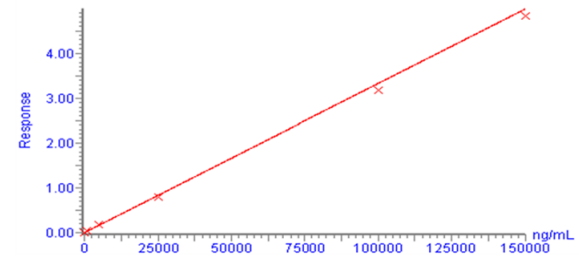
는 「의약품동등성시험기준」을 벗어났으나, C_{max} 는 $\log 0.9683 \sim \log 1.1130$ 으로 「의약품동등성시험기준」을 충족하였다(Fig. 8, Table 6, 7).

Compound name: Atropine
Correlation coefficient: $r = 0.999644, r^2 = 0.999288$
Calibration curve: $0.00521168 * x + 7.60221e-006$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



(a) Atropine

Compound name: Pralidoxime
Correlation coefficient: $r = 0.998497, r^2 = 0.996997$
Calibration curve: $3.32732e-005 * x + 0.000225684$
Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: $1/x^2$, Axis trans: None



(b) 2-PAM

Fig. 7. Calibration curve of atropine and 2-PAM

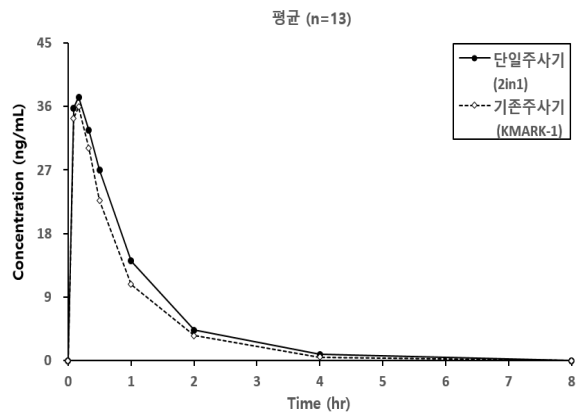


Fig. 8. Mean atropine plasma level on G1 and G2 (0 ~ 8h)

Table 6. Statistical analysis of atropine for AUC

시험제제	Atropine		
Parameter	AUC		
Transform	1		
Test / Ref	1.249	균간 N수 차이=	1
	Geometric Mean	e ^σ (mean-SD)	e ^σ (mean+SD)
기준주사기 (KMARK-1)	31.305	24.502	39.998
단일주사기 (2in1)	39.103	34.025	44.938
제1시기	37.172	30.849	44.79
제2시기	32.931	25.597	42.367
ANOVA	Mean Squares	F value	F table
Group or Sequence	0.306	7.074	4.844
Subjects/Group	0.043225	6.401	2.818
Drug(adjusted)	0.32	47.332	4.844
Period(adjusted)	0.09481	14.04	4.844
Residual	0.006753		
90% 신뢰구간			
하한, 0.8			상한, 1.25
	1.1786	시험제제 / 대조제제	1.3238
추정 1 - beta	> 0.9		
최소검출차(%)-추정	10.462	ANOVA-CV %	8.2177

Table 7. Statistical analysis of atropine for Cmax

시험제제	Atropine		
Parameter	Cmax		
Transform	1		
Test / Ref	1.038	균간 N수 차이=	1
	Geometric Mean	e ^σ (mean-SD)	e ^σ (mean+SD)
기준주사기 (KMARK-1)	36.582	32.749	40.863
단일주사기 (2in1)	37.976	33.275	43.342
제1시기	39.027	34.951	43.578
제2시기	35.597	31.662	40.02
ANOVA	Mean Squares	F value	F table
Group or Sequence	0.021231	1.348	4.844
Subjects/Group	0.015751	1.62	2.818
Drug(adjusted)	0.009041	0.93	4.844
Period(adjusted)	0.054696	5.626	4.844
Residual	0.009722		
90% 신뢰구간			
하한, 0.8			상한, 1.25
	0.9683	시험제제 / 대조제제	1.113
추정 1 - beta	> 0.9		
최소검출차(%)-추정	12.681	ANOVA-CV %	9.8599

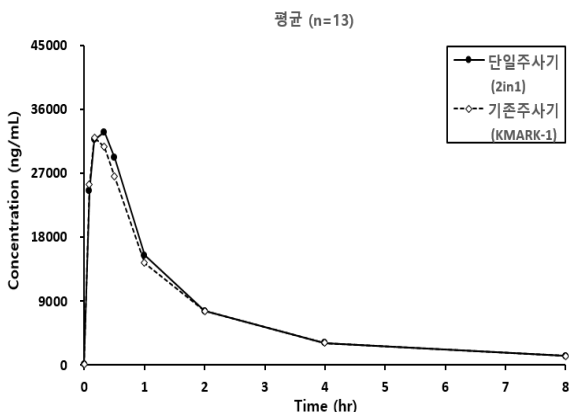


Fig. 9. Mean 2-PAM plasma level on G1 and G2 (0 ~ 8h)

팜의 단일주사기 투여군 및 기준주사기 투여군의 통계처리 결과 AUC는 대조약과 시험약의 로그변환한 평균치 차의 90 % 신뢰구간이 log 1.0076 ~ log 1.1451이었고, Cmax는 log 0.9453 ~ log 1.2140으로 「의약품동등성시험기준」을 충족하였다(Fig. 9, Table 8, 9).

Table 8. Statistical analysis of 2-PAM for AUC

시험제제	Pralidoxime		
Parameter	AUC		
Transform	1		
Test / Ref	1.074	균간 N수 차이=	1
	Geometric Mean	e ^σ (mean-SD)	e ^σ (mean+SD)
기준주사기 (KMARK-1)	60040.41	46242.803	77954.852
단일주사기 (2in1)	64494.292	57476.845	72368.51
제1시기	68292.617	59167.393	78825.2
제2시기	56701.059	45872.919	70085.143
ANOVA	Mean Squares	F value	F table
Group or Sequence	0.372	14.221	4.844
Subjects/Group	0.026176	3.196	2.818
Drug(adjusted)	0.033087	4.04	4.844
Period(adjusted)	0.224	27.296	4.844
Residual	0.00819		
90% 신뢰구간			
하한, 0.8			상한, 1.25
	1.0076	시험제제 / 대조제제	1.1451
추정 1 - beta	> 0.9		
최소검출차(%)-추정	11.581	ANOVA-CV %	9.0501

Table 9. Statistical analysis of 2-PAM for Cmax

시험제제	Pralidoxime		
Parameter	Cmax		
Transform	1		
Test / Ref	1.071	균간 N수 차이=	1
	Geometric Mean	e ^σ (mean-SD)	e ^σ (mean+SD)
기준주사기 (KMARK-1)	30957.341	22018.902	43524.285
단일주사기 (2in1)	33163.598	28126.597	39102.64
제1시기	37408.45	31905.689	43860.272
제2시기	27444.516	21124.356	35655.594
ANOVA	Mean Squares	F value	F table
Group or Sequence	0.259	5.818	4.844
Subjects/Group	0.044526	1.421	2.818
Drug(adjusted)	0.030623	0.977	4.844
Period(adjusted)	0.62	19.78	4.844
Residual	0.031338		
90% 신뢰구간			
하한, 0.8			상한, 1.25
	0.9453	시험제제 / 대조제제	1.214
추정 1 - beta	0.663	균량 최소피형자-추정	8.5
최소검출차(%)-추정	23.906	ANOVA-CV %	17.7026

요약하면, 단일주사기(2in1) 및 기준주사기의 두 유효약물의 약물동태분석 결과는 Table 10과 같다.

Table 10. The confidence intervals for two different autoinjector delivery systems in dog plasma

성분	Cmax (90% CI)	AUC (90% CI)
아트로핀	0.9683 ~ 1.1130	1.1786 ~ 1.3238
팜	0.9453 ~ 1.2140	1.0076 ~ 1.1451

아트로핀의 AUC에 대해 두 자동주사기 간 비동등성은 두 가지 원인으로 분석된다. 첫 번째 원인은 ATNAA의 임상시험 결과에서 알 수 있듯이 Cmax를 동등하게 유지시키기 위해 단일주사기(2in1)의 아트로핀 농도를 KMARK-1의 아트로핀 농도보다 25 % 증량하였기 때문이고, 두 번째 원인은 기존주사기(KMARK-1)와 달리 단일주사기(2in1)는 아트로핀 주사액이 체내로 투여되고 연속하여 팜 주사액이 투여되어 두 약물 간의 삼투압에 의해 아트로핀의 흡수가 지연되는 것으로 추정된다.

2.5.5 검체검증분석

별도 보관하였던 검체검증분석용 시료(각 39개)를 분석하여 최초분석 결과와 비교하였다. 그 결과 모두 편차가 ±20 % 이내였으며, 적합률은 100 % 였다(Table 11, 12).

이상의 비교약물동태 시험결과를 요약하면, 아트로핀 및 팜 함유 다중챔버 단일주사기(2in1)와 기존주사기(KMARK-1)의 비교약물동태분석에서, 단일주사기(2in1)의 아트로핀의 25 % 함량 증량 및 두 약물의 연속투여로 인한 삼투압에 의해 아트로핀의 흡수가 지연되어 아트로핀의 AUC는 「의약품동등성시험기준」을 벗어났다. Cmax는 기준을 충족하였다. 팜은 AUC 및 Cmax 모두 「의약품동등성시험기준」을 충족하였다.

Table 11. ISR of atropine

시간 (h)	시료수 (개)	최초분석 (ng/mL)	검증분석 (ng/mL)	편차 (%)
0.08	7	24.80 ~ 38.01	21.70 ~ 34.24	-12.0 ~ 10.5
0.17	6	29.70 ~ 42.89	29.28 ~ 38.34	-11.2 ~ 4.3
0.33	4	27.23 ~ 32.83	25.78 ~ 32.59	-10.8 ~ 5.0
0.5	9	20.89 ~ 30.86	21.59 ~ 27.43	-14.3 ~ 15.7
1	7	7.03 ~ 18.85	6.03 ~ 16.92	-15.4 ~ 1.0
2	1	2.68	2.62	-2.1
4	5	0.53 ~ 1.45	0.50 ~ 1.31	-13.4 ~ 2.6

Table 12. ISR of 2-PAM

시간 (h)	시료수 (개)	최초분석 (µg/mL)	검증분석 (µg/mL)	편차 (%)
0.08	2	26.61 ~ 33.79	26.50 ~ 33.43	-0.4 ~ -1.1
0.17	5	26.89 ~ 41.85	28.93 ~ 41.80	-7.2 ~ 4.6
0.33	3	29.81 ~ 39.52	29.82 ~ 38.80	-1.8 ~ 0.1
0.5	2	28.02 ~ 29.91	28.57 ~ 29.07	-3.0 ~ 2.0
1	6	10.93 ~ 17.69	10.78 ~ 17.38	-2.8 ~ 8.1
2	6	4.92 ~ 10.81	4.80 ~ 10.44	-8.2 ~ -1.7
4	6	0.12 ~ 0.28	0.10 ~ 0.27	-9.7 ~ 8.0

3. 결론

의약품 개발은 많은 시간과 비용이 소요될 뿐만 아니라 정확한 유효성을 입증하기 위하여 인간을 대상으로 임상시험을 실시하여야하기 때문에 위험성도 내포하고 있다. 이러한 시간과 비용 및 위험성을 최소화하여 성공적으로 개발을 완료하기 위해서는 많은 선행 연구결과를 참고하여야 한다.

본 연구팀은 미군의 신경작용제 해독제인 MARK-1을 단일화한 ATNAA의 FDA 허가 자료 중 두 자동주사기의 생체이용률 연구에 관한 자료인 ‘Human Pharmacokinetic and Bioavailability information’을 참고하여, 한국군의 신경작용제 해독제인 KMARK-1과 본 연구팀에서 개발한 다중챔버 단일주사기(2in1)에 대하여 식약처의 ‘의약품 품목허가’를 위한 임상시험의 참고자료로 활용하고자 비교 생체이용률 연구를 실험동물인 비글개를 이용하여 진행하였다. 다중챔버 단일주사기(2in1)는 ATNAA의 생체이용률 결과를 참고하여 아트로핀 함량을 KMARK-1 대비 25 % 증량하여 Cmax를 동일하게 유지하고자 하였다. 시험결과, 미군의 ATNAA와 동일하게 다중챔버 단일주사기(2in1) 중 아트로핀의 AUC가 log 1.1786 ~ log 1.3238으로 「의약

품동등성시험기준」을 벗어났다.

미군은 ATNAA 개발 및 FDA 허가 과정 중 비록 MARK-1과 ATNAA 간 아트로핀의 AUC 결과가 비동등성 즉, 생체이용률이 다르게 나타났지만 신경작용제 중독 시 해독제로서 아트로핀의 C_{max}가 ATNAA의 운용에 더 중요한 요소임을 인지하여 화생방전 대비 응급의약품으로 FDA의 ‘의약품 품목허가’를 획득하여 전력화 하였다.

본 연구의 실험동물을 이용한 비교 생체이용률 결과와 ATNAA의 FDA의 허가자료를 바탕으로 추후 진행 예정인 단일주사기(2in1)의 임상시험에 대한 결과 및 허가과정을 예상해 보면, 두 자동주사기 간 아트로핀의 AUC는 비록 생체이용률이 다르지만, 식약처의 「의약품의 품목허가·신고·심사 규정」 제2조(정의) 및 ‘별표 1 의약품의 종류 및 제출자료의 범위’에 따라 단일주사기(2in1)는 ‘3. 유효성분의 새로운 조성(복합제)’ 및 ‘5. 새로운 용법·용량 의약품’에 해당하는 ‘안정성·유효성심사 자료제출의약품’에 해당하므로 식약처로부터 ‘의약품 품목허가’를 획득하는데는 어려움이 없을 것으로 예상된다. 그러나 단일주사기(2in1)의 원활한 ‘의약품 품목허가’ 획득을 위해서는 연구결과에 대한 식약처의 ‘사전검토’ 및 ATNAA에 대한 허가사례 연구가 충분히 이루어져야 할 것이다.

동물을 이용한 본 연구는 동물보호법(제정 1991년 05월 31일 법률 제 4379호, 일부개정 2015년 01월 20일 법률 제 13023호)에 근거하여 ㈜노터스 동물실험윤리위원회에서 승인되었다(승인번호: KNOTUS IACUC-16-KE-183).

후 기

본 연구는 2014년도 국방과학연구소 민·군기술협력사업(Civil-Military Technology Cooperation)인 “아트로핀-팜 단일주사기 개발(과제번호 : 14-CM-EB-07, 협약번호 : UM14302RD3)” 과제의 지원으로 수행되었습니다.

References

[1] Shih, T. M., “Time Course Effects of Soman on Acetylcholine and Choline Levels in Six Discrete Areas of the Rat Brain,” *Psychopharmacology*, Vol.

78, pp. 170-175, 1982.

[2] Lim, D. K., Lee, Porter, A. B., Hoskins, B. Ho, I. K., “Changes in ACh Levels in the Rat Brain During Subacute Administration of Diisopropylfluoro-phosphate,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 90, pp. 477-489, 1987.

[3] Marino MT, Schuster BG, Brueckner RP, Lin E, Kaminskis A, Lasseter KC. “Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pyridostigmine Bromide for Prophylaxis Against Nerve Agents in Humans,” *J. Clin. Pharmacol.*, Vol. 38, pp. 227-235, 1998.

[4] Dunn, M. A. Sidell, F. R., “Progress in Medical Defence Against Nerve Agents,” *JAMA*, Vol. 262, pp. 649-652, 1989.

[5] Loomis, T. A., Salafsky, B., “Antidotal Action of Pyridinium Oximes in Anticholinesterase Poisoning ; Comparative Effects of Soman, Sarin, and Neostigmine on Neuromuscular Function,” *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, Vol. 5, pp. 685-701, 1963.

[6] Berman, H. A., Decker, M. M., “Kinetic, Equilibrium, and Spectroscopic Studies on Dealkylation(“aging”) of Alkyl Organophosphonyl Acetylcholinesterase,” *J. Biol. Chem.*, Vol. 261, pp. 10646-10652, 1986.

[7] KMARK-1, <http://www.samyangchem.com>

[8] ATNAA, <http://meridianmeds.com>

[9] ATNAA, “Clinical Pharmacology and Biopharmaceutics review(s),” <http://www.fda.gov>

[10] Keunwoo Lee, Seoyeon An and Byungil Hur, “A Case Study on the FDA Approval of Medical Treatments against Nerve Agent Poisoning,” *Journal of the Korea Institute of Military Science and Technology*, Vol. 19, No. 1, pp. 119-126, 2016.

[11] Seoyeon An, Keunwoo Lee, Taekeun Kwon and Dongyeon Kim, “A Multi-chambered Single Autoinjector: Design and Performance Assessment,” *Journal of the Korea Institute of Military Science and Technology*, Vol. 20, No. 2, pp. 170-180, 2017.

[12] “Standard on Pharmaceutical Equivalence Study,” Ministry of Food and Drug Safety, 2016.

[13] “Guideline on Bioanalytical Method Validation,” Ministry of Food and Drug Safety, 2013.