

생물학적 동등성 시험의 실제*

이 용 복

전남대학교 약학대학

생체이용율이란 치료상의 동등성을 보장하기 위해 흡수 속도와 양의 두 가지 측면에서 흡수의 효율성을 정량적으로 평가하고자 하는 것으로서 그에 관한 각국의 정의는 첫째, 생체내 어느 부위에서의 이용성을 문제로 삼는가? 와 둘째, 어떤 약물 분자종을 검토의 대상으로 하는가? 이 두 조건에 따라 그 내용이 변화하고 있다. 우리나라에서는 “생체이용율이란 투여된 의약품의 유효성분량에 대한 전신순환혈에 이행한 약물량의 비율 및 약물의 이행속도”라고 규정하여 전신순환혈에서의 이용성을 기준으로 하고 있으며 “검토대상 약물 분자종을 유효성분 또는 이들과 비례관계가 인정된 대사산물로 규정”하고 있어 미변화체나 생체내 변화과정을 통한 대사체 모두 약리효과를 나타내는 경우 생물학적 동등성 시험의 목적인 약효의 동등성을 입증하기 위해 어떤 분자종을 검토의 대상으로 삼아야할지 그 규정이 모호할 뿐 아니라 “생물학적 동등성 평가기준 항목도 원칙적으로 혈중농도-시간곡선하면적(AUC), 최고혈중농도(C_{max}) 및 최고혈중농도 도달시간(T_{max})으로 규정”하여 명확하지 않다. 특히, 생체이용율의 양과 속도는 그 자체로 편차가 있는 값이며 피험자간 및 피험자내 변동으로 인하여 제제간의 차를 검출하기 어려운 경우가 많다. 더욱이, 생물학적 동등성 시험은 이러한 여러 가지 변동요인을 고려한 통계해석방법을 사용하여 제제간의 생체이용율 차이가 없다는 것을 보이는 시험일 뿐만 아니라 동등하다는 것을 적극적으로 주장하는 시험으로 이는 과학적이거나 절대적 기준이라기보다는 하나의 행정적 기준으로서의

성격이 강하기 때문에 그 규정의 명확성을 필요로 하고 있다.

본 연구자는 생물학적 동등성 시험의 가이드라인을 제공할 목적으로 이제까지 국내에 발표된 20여 편의 생물학적 동등성 시험 예를, ① 비용의 효율성 측면에서 피험자의 수는 적당하였는가? ② 미변화체와 그 대사체도 모두 약효를 나타내는 약물인 경우 측정대상을 무엇으로 하고 있는가? ③ 실험 이상값이나 결손값을 어떻게 처리하고 있는가? ④ 1회 1투여단위(1개의 정제나 1개의 캡셀 등) 투여로 유효성분의 혈중약물농도를 정확하게 측정할 수 없거나 서방형 제제의 경우 어떻게 처리하고 있는가? 등 생물학적 동등성 시험계획에 대해 검토하였다.

실험 방법

피험자수 결정

생체이용율 측정에 있어서 의미있는 검정영역내에서 생물학적 동등성을 확보하기 위해서 피험자수를 몇명으로 하여야 할 것인가? 는 통계적인 처리 문제에서 뿐만 아니라 비용과 시간의 효율성 및 피험자의 안전성 측면에서도 모든 연구자에게 관심있는 문제이다. 이 문제에 관해 검토하기 위해 먼저 표준 2기 2제 교차시험법에 있어서 동등성 입증을 위한 가설에 입각하여 이제까지 국내에 발표된 20여 편의 생물학적 동등성 시험예에서의 최적 피험자수를 점추성(point hypothesis)에 근거한 다음 식에 따라 계산하여 보았다.

$$n_c \leq 2[t(\alpha/2, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [\hat{\sigma}_d/\Delta]^2 \quad (1)$$

*본 논문은 제 24회 한국약제학회 총회 및 학술대회의 심포지움 “생물학적 동등성 시험의 실제와 문제”에서 발표된 것임.

이때, $n_c = n$ 으로 각 군의 수이고 α 와 β 는 동등성 가설에 있어서 제 1종 과오와 제 2종 과오의 출현확률을 각각 의미하며 $\hat{\sigma}_R^2$ 는 σ_R^2 의 불편추정치로써 잔차의 평균평방(MS_R)을 2로 나눈 값과 같다.

한편, 우리 나라에서 채택하고 있는 생물학적 동등성 판정의 기준이 되는 80/20 규칙에 의하면 각 군의 피험자 수(n_c)는 미지의 대조평균의 최소한 20%의 검출차(최소검출차, Δ)를 검증하기 위해서는 80%의 검출력을 제공하기에 충분히 큰 수이어야 한다. 따라서, 이와 같은 조건에서 (1)식은 다음 (2)식과 같이 표현할 수 있다.

$$n_c \leq [t(\alpha/2, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)]^2 [CV/20]^2 \quad (2)$$

이때, $CV = 100\sqrt{2\hat{\sigma}_R^2}/U_R = 100\sqrt{MS_R}/U_R$ 으로 U_R 은 대조약의 총평균값을 의미한다. 따라서, 2기2제 교차시험법에서 요구된 피험자의 총수(N)는 $2n_c$ 가 된다. 한편, 상기 (1), (2)식에서 $t(\alpha/2, 2n-2)$ 와 $t(\beta, 2n-2)$ 는 t-분포표의 값들이고 이 두 값들을 더한 값 $t(\alpha/2, 2n-2) + t(\beta, 2n-2)$ 은 비삼도(λ)를 의미하며 모두 자유도($\nu = 2n-2$)를 모르기 때문에 n_c 를 구하기 위해서는 수치반복과정을 거쳐야 한다.

측정대상 약물 분자종

구미 선진국을 비롯하여 일본, 우리 나라에서도 치료상의 동등성을 보장하기 위한 수단으로 생물학적 동등성 시험을 행하고 있지만 생체이용율에 관한 정의를 달리함으로써 그 시험범위 및 시험대상을 한정하고 있다. 우리 나라에서의 생체이용율은 전신 순환혈에서의 이용성을 기준으로 하여 검토대상 약물 분자종도 유효성분 또는 이들과 비례관계가 인정된 대사산물로 규정하고 있다. 따라서, 이제까지 국내에서 발표된 20여 편의 생물학적 동등성 시험 예에서의 대상 약물 분자종을 미변화체나 대사체 모두 약효를 나타내는 경우 약효의 동등성 확보라는 측면에서 그 처리방법을 검토하였다.

실험 이상값(outlier)이나 결손값의 처리

표준 2기2제 교차실험 계획법에 의하여 두 제제간의 생물학적 동등성을 평가하기 위해서 통상 다음과 같은 통계 모형이 이용되고 있다.

$$Y_{ijk} = \mu + S_{ik} + F_{(j,k)} + C_{(j-1,k)} + P_j + e_{ijk} \quad (3)$$

$$(i=1,2,\dots, n_k; j=1,2; k=1,2)$$

$$(\sum P_j = 0, \sum F_{(j,k)} = 0, \sum C_{(j-1,k)} = 0)$$

이때, Y_{ijk} 는 j 번째 시기, k 번째 차례, i 번째 피험자의 반응값을, μ 는 총평균을, S_{ik} 는 k 번째 차례, i 번째 피험자의 변량효과(random effect)를, P_j 는 j 번째 시기의 모수효과(fixed effect)를, $F_{(j,k)}$ 는 j 번째 시기에 투여된 제제의 k 번째 차례에서의 직접적인 모수효과를, $C_{(j-1,k)}$ 는 $(j-1)$ 번째 시기에 투여된 제제의 k 번째 차례에서의 1차 모수 이월효과(fixed first order carry-over effect)를, e_{ijk} 는 Y_{ijk} 의 변량오차(random error)를 의미한다. 또한, 상기 통계모형은 다음과 같은 정규성 가정을 내포하고 있다.

① $\{S_{ik}\}$ 는 평균이 0이고 분산이 σ_s^2 으로 독립적이고 동등하게 정규분포되어 있다.

② $\{e_{ijk}\}$ 는 평균이 0이고 분산이 σ_e^2 으로 독립적이고 동등하게 정규분포되어 있다.

③ $\{S_{ik}\}$ 와 $\{e_{ijk}\}$ 는 상호 독립적이다.

그러나, 대부분의 생체이용을 시험에서 상기 가정들이 지켜져 나타나지 않는다. 특히 상기 가정들의 입증은 두 제제간의 평균 생체이용율로 생물학적 동등성을 평가하는데에 큰 영향을 미치기 때문에 매우 중요하다. 더구나, 생체이용을 시험에서 자주 접하게 되는 문제들중의 하나인 극히 크거나 작은 몇몇 관측치 즉, 이상치들을 포함한 데이터의 조합이 때때로 나타나는 경우에는 이들 이상치들이 생물학적 동등성 시험에 극적인 즉, 실험 이상치들을 포함한 결과와 포함하지 않는 결과가 완전히 반대로 나타나는 영향을 미치기 때문에 더욱 중요하다. 따라서, 이들 이상치들을 상기 통계모형의 가정에 따라 주의 깊게 처리할 필요가 있다.

한편, 이러한 실험 이상치들은 기본적으로 다음과 같은 세 가지 종류로 구분할 수 있다.

① 혈장(액)중 농도-시간 곡선상에 예기치 않게 출현한 관측치나 결손값

② 동일 제제를 투여하였을 때 과도하게 크거나 작게 나타난 반응값

③ 대조약에 비하여 과도하게 높거나 낮은 생

Table I—Calculated Optimal Sample Size for Point Hypothesis in the Reported Bioequivalence Tests

| Tested Drugs | Volunteers | Sampling | | Evaluated Items | | | |
|---------------|------------|----------|-------|-----------------|------------------|------------------|--|
| | | Numbers | Times | AUC | C _{max} | T _{max} | Others |
| Theophylline | 10 | 15* | 48 | N=6 | X | △=38, N=30 | |
| Enalapril | 12 | 14 | 23 | ∨, NA | NA | ∨, NA | AUC _m |
| Omeprazole | 16 | 13 | 8 | N=14 | ∨, N=16 | △=34, N=44 | MRT |
| Diltiazem | 14 | 11 | 12 | N=10 | N=12 | X | AUC _m (△=21, N=16) AUC _p +AUC _m (N=16) |
| Rifampicin | 16 | 8* | 12 | N=14 | ∨, N=16 | △=22, N=20 | |
| DDB | 20 | 7 | 8 | N=8 | N=8 | N=8 | |
| Ofloxacin | 12 | 13 | 24 | ∞, N=6 | △=24, N=18 | △=49, N=60 | |
| Ciprofloxacin | 12 | 13 | 12 | N=10 | △=22, N=14 | X | |
| CMT | 10 | 8* | 12 | ∞, N=6 | N=8 | NA | |
| Trimebutine | 10 | 12* | 48 | | | | AUC _m (N=8), C _{m,ma} x(X), T _m , max(X) |
| Ranitidine | 12 | 13* | 8 | N=12 | N=8 | NA | 2nd Peak |
| Propranolol | 12 | 9 | 8 | ∨, N=10 | (N=10) | △=21, N=16 | |
| Norfloracin | 12 | 12 | 12 | (△=25, N=18) | (N=12) | (△=29, N=24) | |
| Cephadrine | 12 | 10 | 8 | N=10 | △=29, N=22 | △=40, N=38 | |
| Praziquantel | 18 | 11 | 8 | (△=22, N=22) | X | X | |
| Eperisone | 12 | 9 | 8 | N=8 | ∨, N=12 | ∨, N=12 | |

*; not include zero time sampling, ∞; AUC^{0-∞}, (); α=0.1, △; the minimum difference of the formulations, ∨; not satisfied with confidence intervals, X; different from the reference drug over 20%, NA; not available.

체이용율을 나타낸 비정상적인 개체의 출현

따라서, 본 실험에서는 이제까지 국내에 발표된 20여 편의 생물학적 동등성시험 예에 나타난 실험 이상치들을 상기 세가지 부류로 분류하여 보았으며 이러한 이상치들을 실제 시험 예에서는 어떻게 처리하고 있는가를 검토하였다.

투여단위의 설정

우리 나라에서는 생물학적 동등성 시험시의 투여량은 임상상용량을 1회 투여하는 것을 원칙으로 하고 다만 1회 투여로 약물농도를 정확히 측정할 수 없을 경우 투여량을 증량할 수 있으며 서방형 제제나 1회 투여용량으로 유효성분 또는 그 대사산물의 혈중농도가 너무 낮아 정확히 측정할 수 없는 경우 반복투여하여 정상상태 농도에 도달시켜 시험할 수 있도록 규정하고 있다. 이와 같이 규정상 상호 상충될 수 있는 내용이 포함되어 있기에 이제까지 국내에서 발표된 생물학적 동등성 시험 예에서의 투여단위 설정방법을 검토하여 보았다.

결과 및 고찰

피험자수 결정

이제까지 국내에 발표된 20여 편의 생물학적 동등성시험은 동등성 입증을 위해 모두 표준 2기2제 교차시험법을 이용하였기에 최적 피험자 총수(N)를 점추정(point hypothesis)에 근거한 상기 (2)식을 이용하여 구하여 Table I에 나타내었다.

한편, 80/20 규칙에 의한 검출력 검증은 동등성 평가를 위해서 통계적으로 합당하게 만족되지 않을 수 있는 특수한 목적을 위한 방법이기 때문에 실제 이와 같이 구한 최적 피험자 총수는 충분한 검출력을 제공할 만큼의 큰 수가 아닐 수 있다. 특히 Schuirmann의 두개의 편측검정법(two one-sided test procedure)과 같은 다른 구간추정(interval hypothesis)법들에서라면 충분한 검출력을 제공할 만큼의 큰 수가 될 수 없다. 따라서, 제시된 최적 피험자 총수는 동등성 입증을 위한

Table II—Analytical Drug Moieties for the Reported Bioequivalence Tests

| Tested Drugs | Specimen | Analytical | |
|---------------|--------------|------------|--------------------------|
| | | Mode | Moieties |
| Theophylline | Saliva | HPLC | P |
| Enalapril | Plasma/Urine | UV/VIS | P,M(enalaprilat) |
| Omeprazole | Plasma | HPLC | P |
| Diltiazem | Plasma | HPLC | P,M(desacetyldiltiazem) |
| Rifampicin | Plasma | HPLC | P |
| DDB | Plasma | HPLC | P |
| Ofloxacin | Plasma/Urine | HPLC | P |
| Ciprofloxacin | Plasma/Urine | HPLC | P |
| CMT | Plasma | HPLC | P(salicylic acid) |
| Trimebutine | Plasma | HPLC | P,M(N-monodesmethyl TMB) |
| Ranitidine | Plasma | HPLC | P |
| Propranolol | Plasma | HPLC | P |
| Norfloracin | Plasma | HPLC | P |
| Cephadrine | Plasma | HPLC | P |
| Praziquantel | Plasma | GC/NPD | P |
| Eperisone | Plasma | GC/MS | P |

P; parent, M; metabolite.

최소한의 피험자수로서 고려되어야 할 것으로 사료된다.

측정대상 약물 분자종

이제까지 국내에서 발표된 20여 편의 생물학적 동등성 시험 예에서의 측정대상 약물 분자종을 검토하여 Table II에 표시하였다. 국내에서는 미변화체나 대사체가 모두 약효를 나타내거나 대사체만이 약효를 나타내는 경우에서도 미변화체의 측정이 가능한 미변화체를 그 측정대상으로 하고 있음을 알 수 있었다. 이는 생물학적 동등성 시험의 목적인 약효의 동등성 확보라는 측면에서 앞으로 재고되어야 할 것으로 사료된다.

실험 결론치나 이상값 처리

이제까지 국내에 발표된 생물학적 동등성 시험 예에 있어서 실험 결론치나 이상값의 처리방법에 대하여 검토하여 Table III에 나타내었다. 실험 결론치나 이상값이 생물학적 동등성 검증에 대단히 큰 영향을 미침에도 불구하고 이에 대한 처리법에 관해 거의 언급됨이 없음을 알 수 있었다. 따라서, 실험 결론치나 이상치에 대한 처리법에 충분히 유의할 필요가 있다고 사료된다.

Table III—Determining Methods of Dose Unit and Outliers in the Reported Bioequivalence Tests

| Tested Drugs | Formulation | | | Dose Unit | Types | |
|---------------|-------------|------|------------|-----------------|---------|---------|
| | Reference | Test | Evaluation | | Omitted | Outlier |
| Theophylline | C(s) | T(s) | o | 200 mg/192.5 mg | o(t) | x |
| Enalapril | T | T | x | 10 mg | NA | NA |
| Omeprazole | C(e) | T(e) | o | 20 mg | NA | NA |
| Diltiazem | T(s) | T(s) | o | 30 mg | x | x |
| Rifampicin | C | C | o | 150 mg×3 | x | x |
| DDB | T | T | x | 25 mg×8 | NA | NA |
| Ofloxacin | T | T | x | 200 mg×2 | x | x |
| Ciprofloxacin | T | T | x | 250 mg×2 | x | x |
| CMT | T | T | x | 500 mg | NA | NA |
| Trimebutine | T(i) | T(s) | o | 100 mg×3/300 mg | x | x |
| Ranitidine | T | T | o | 150 mg | o(t) | x |
| Propranolol | T | T | o | 40 mg | o(t) | x |
| Norfloracin | T | T | o | 100 mg | o(t) | x |
| Cephadrine | C | C | o | 500 mg | o(t) | x |
| Praziquantel | T | T | o | 600 mg×3 | NA | NA |
| Eperisone | T | T | x | 50 mg×3 | o(t) | x |

C; capsule, T; tablet (i); immediate-release, (s); sustained-release, (e); enteric coated, NA; not available, o(t); t=o, o(c); c=0, x; none.

투여단위의 설정

이제까지 국내에 발표된 생물학적 동등성 시험 예에 있어서의 투여단위를 검토하여 Table III에 나타내었다. 국내에서는 1회 1투여단위 투여시 혈중농도를 정확히 측정하기가 어려운 경우 대부분 투여량을 증량하여 투여하고 있음을 알 수 있었다. 더욱이, 서방성 제제인 경우에서도 투여단위나 반복투여를 고려하여 실험한 예를 찾아 볼 수 없었다. 따라서, 투여단위와 반복투여에 대한 명확한 규정의 제정이 필요할 것으로 사료된다.

결 론

이제까지 국내에 발표된 20여 편의 생물학적 동등성시험 예를 첫째, 비용의 효율성과 통계적 및 피험자의 안전성 측면에서 최적 피험자의 수는 어떠하였는가? 둘째, 약효의 동등성 확보라는 측면에서 측정대상 약물 분자종은 무엇으로 하고 있는가? 셋째, 생물학적 동등성 검증에 지대한 영향을 미치는 실험 이상값이나 결손값의 처리 방법은 명확하였는가? 넷째, 1회 1투여단위(1개의 정제나 1개의 캡슐 등) 투여로 유효성분의 혈중 약물농도를 정확하게 측정할 수 없거나 서방형 제제의 경우 약물 투여 실험 계획법은 어떠하였는가? 등 생물학적 동등성 시험계획에 대해 검토하였다.

그 결과 생물학적 동등성 시험의 목적인 약효의 동등성 확보를 위하여 약효를 나타내는 대사체의 동시정량 등 면밀한 시험계획을 수립할 필요가 있고 동등성 검증에 영향을 미치는 실험 결손값이나 이상값에 대한 명확한 처리방법을 제시할 필요가 있으며 투여단위에 대한 규정의 재검토가 필요한 것으로 사료되었다.

문 헌

- 1) 심창구, 권혁노, 이창기, 한익수, 최광식, 타액 시료를 이용한 지속성 테오필린 제제의 생물학적 동등성 시험, 약제학회지, **19**, 191-194 (1989).
- 2) 장일효, 범진필, 최준식, 리팜피신 제제의 생

물학적 동등성 시험(제 2보), 약제학회지, **24**, 49-55 (1994).

- 3) 김종국, 정은주, 이은진, 신희중, 이원근, 오메프라졸 장용성제제에 대한 생물학적 동등성 평가, 약제학회지, **23**, 41-49 (1993).
- 4) 김성윤, 성기욱, 김정진, 조영진, 김옥녀, 이상복, 경구 투여한 Ofloxacin 두정제의 생체이용률의 비교, 임상약리학회지, **2**, 32-40 (1994).
- 5) 김성윤, 조영진, 성기욱, 김정희, 김옥녀, 이상복, 고속액체 크로마토그래피를 이용한 Ciprofloxacin 두제제의 생물학적 동등성 시험, 감염, **23**, 271-278 (1991).
- 6) 한상수, 함성호, 손동환, 김재백, 비페닐디메틸디카르복실레이트 제제의 생물학적 동등성 시험, 약제학회지, **24**, 67-72 (1994).
- 7) In-Jin Jang, Byung-Soo Jang, Sang-Goo Shin, Jae-Gook Shin, Il-Kun Rho, Kyeong Hun Lee, Chan Woong Park, Comparison of enalapril maleate tablets on bioavailability and the time course of inhibition of plasma angiotensin-converting enzyme, *korean J. pharmacology*, **26**, 219-226 (1990).
- 8) 이용복, 고익배, 서세민, 윤형중, 시판 염산 달티아젠 서방형 정제의 생물학적 동등성, 한국임상약학회지, **3**, 79-88 (1993).
- 9) 박경호, 신현택, 이민화, 고영율, 건강한 지원자를 대상으로 한 시판 choline magnesium trisalicylate 정제의 생물학적 동등성 평가, 약제학회지, **22**, 229-235 (1992).
- 10) 이민화, 이종원, 박경호, 양민열, trimebutine maleate 서방정제(300mg/정)의 약물동태학적 평가, 서울대학교 약학대학 종합연구소 (1991).
- 11) 이창기, 한익수, 최광식, 김재백, 이학중, 심창구, 의약품의 생물학적 동등성시험에 관한 연구(I), 국립보건안전연구원 (1988).
- 12) 이창기, 문화희, 김재백, 이학중, 심창구, 신상구, 의약품의 생물학적 동등성시험에 관한 연구(II), 국립보건안전연구원 (1989).
- 13) 박종세, 김동현, 김명완, 김동현, 정봉철, 염산 에페리손 제제(에페신)의 생물학적 동등성 시험 결과서, 한국과학기술연구원 도평콘트롤센터 (1993).
- 14) 국립보건안전연구원 고시 제 94-1호, 생물학적 동등성 시험 기준, 국립보건안전연구원,

1994. 2. 7.
- 15) S. Bolton, *Phrmaceutical statistics-practical and clinical applications-*, Marcel Dekker, New York, pp. 394-399 (1984).
- 16) S. Anderson and W.W. Hauck, Consideration of individual bioequivalence, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **18**, 259 (1990).
- 17) M. Rowland, Bioavailability assessment and pharmacologic response; Impact of first-pass loss when both drug and metabolites are active, *ibid*, **16**, 573 (1988).
- 18) Shein-Chung Chow and Jen-Pei Liu, *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*, Marcel Dekker, New York, pp. 126-252(1992).