

## 3×3 라틴 방격법 모델에 따른 생물학적 동등성 시험의 통계 해석 : 온단세트론 제제에 대한 적용 예

이영주 · 이명길 · 정석재 · 이민화 · 심창구<sup>†</sup>

서울대학교 약학대학  
(1998년 2월 12일 접수)

### Statistical Analysis of Three Sequence-Three Periods Bioequivalence Study : Application to Bioequivalence Test of Ondansetron Formulations

Young-Joo Lee, Myung-Gull Lee, Suk-Jae Chung, Min-Hwa Lee and Chang-Koo Shim<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea  
(Received February 12, 1998)

A 3×3 Latin square crossover study for the bioequivalence of three ondansetron formulations was conducted. Test products were Vomiron<sup>®</sup> 8 mg and Vomiron<sup>®</sup> 4 mg tablets and reference product was Zofran<sup>®</sup> tablet. Twenty one healthy Korean male subjects received each formulation at the ondansetron dose of 8 mg and plasma concentrations of ondansetron were monitored by HPLC for over a period of 12 hr after the oral administration. Statistical procedure for bioequivalence evaluation of AUC (e.g., analysis of variance (ANOVA), multiple comparison and confidence intervals) was carried out. There were no significant differences in AUC among the formulations. The confidence intervals for the AUC of Vomiron<sup>®</sup> 8 mg and Vomiron<sup>®</sup> 4 mg were between -0.24 and 15.54% and between -2.41 and 13.36% respectively, within a range that proposed by the Korea Food and Drug Administration Guidelines for Bioequivalence. These statistical procedure could be standardized and generally applicable for the assessment of bioequivalence for multiple (more than two) formulations.

**Keywords**—Latin square method, Bioequivalence, Multiple comparison, ANOVA, Ondansetron

생물학적으로 동등하다는 것은 비슷한 조건 아래서 서로 다른 제제를 같은 용량 사람에게 투여했을 경우 각 제제의 흡수의 속도와 양(bioavailability)이 유의성 있는 차이를 보이지 않을 경우를 말한다.<sup>1)</sup> 현재 국내에서는 1989년 1월 1일 이후에 신약으로 허가된 전문의약품과 동일한 품목(제형이 다른 동일 투여경로 품목을 포함한다)의 경우 및 패취제제 등 제형의 특수성이 인정되는 제제의 경우 품목허가를 받기 위해서는 반드시 생물학적 동등성 시험자료를 제출하여 안전성, 유효성 관련사항을 심사받도록 하고 있다.<sup>2)</sup> 지금까지 오메프라졸,<sup>3)</sup> 테오필린,<sup>4)</sup> 나부메톤<sup>5)</sup> 등 다양한 약물에 대하여 생물학적 동등성 시험이 진행되었는데, 이들은 모두 대조약과 시험약 각 1종씩을 피험자에게 교차 반

복투여하여 생물학적 이용률을 비교하는 2×2 라틴방격법 모델(2×2 모델)에 따라 생물학적 동등성을 비교하였다.<sup>6)</sup>

그러나 최근 동일한 유효성분을 가지면서 용량만이 다른 제제의 개발이 증가함에 따라 3가지 이상의 제제에 대한 생물학적 동등성 시험의 필요성이 대두되었고, 최근 중앙약심에서는 한 회사에서 개발된 제품으로서 동일한 유효성분을 함유하면서 용량이 다른 2가지 시험약에 대하여 동시에 시험을 행할 경우에 한하여 3×3 라틴방격법에 의한 생물학적 동등성 시험을 인정하기로 합의하였다. 이에 따라 1997년 온단세트론 8 mg과 4 mg제제에 대하여 3×3 라틴방격법 모델(3×3 모델)에 따른 국내 최초의 생물학적 동등성 시험이 수행된 바 있다.

현재까지 2×2 모델에 대한 생물학적 동등성의 통계

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

학적 해석은 김병수,<sup>7)</sup> 심창구<sup>8)</sup> 등에 의하여 이미 잘 고찰된 바 있으나 아직까지 3×3 라틴방격법에 의한 생물학적 동등성 시험에 대해서는 국내 규정에 적합한 모델이나 이에 대한 자세한 통계해석에 대한 논의가 전무한 실정이었다. 따라서 본 연구에서는 국내에서 처음으로 3×3 모델에 의해 생물학적 동등성 시험이 행해진 온단세트론 제제 실험을 예로 3×3 모델에 따른 생물학적 동등성 시험의 통계해석 과정을 고찰하여 장차 국내에서 수행될 3×3 모델에 따른 생물학적 동등성 시험 통계해석의 이해를 돕고 나아가 3×3 모델에 의한 생물학적 동등성 판정의 표준모델로 제시하고자 하였다.

**실험방법**

**생물학적 동등성 파라미터**

본 연구에는 이명걸<sup>8)</sup> 등에 의한 온단세트론 제제의 생물학적 동등성 시험의 AUC 파라미터를 예로 이용 3×3 모델에서의 생물학적 동등성을 고찰하였다. 이 시험에서 대조약으로는 조프란정 4 mg(한국글락소웰컴사, 염산온단세트론 이수화물 5 mg 정제)를 사용하였고 시험약으로는 보미논정 8 mg(시험약 1)과 4 mg(시험약 2) 정제(동아제약주식회사, 각각 염산온단

세트론 이수화물 10 mg, 5 mg 정제)를 사용하였다. 피험자 총 21 명을 식품의약품안전본부고시 제96-16호의 규정에 따라 선정하여 군 당 7명씩 무작위로 분할한 후 Table I에서와 같이 3기에 걸쳐 대조약과 시험약 1, 2를 서로 교차하여 복용하도록 한 일반적 라틴방격법 모델에 따라 시험을 실시하였다.

**통계해석**

생물학적 동등성의 판정은 식품의약품안전본부고시 제 96-16호 생물학적 동등성 시험기준<sup>2)</sup>에 따라 행하였다. 즉 1. 대조약과 시험약의 비교항목의 평균치 차이는 대조약의 20% 이내 이어야 한다. 그리고 2. 분산분석은 원칙적으로 유의수준  $\alpha = 0.05 \sim 0.1$ 로 하고, 그 때의 정도는 검출력(1- $\beta$ )은 0.8로 최소검출차 $\Delta$ 는 0.2이하로 함이 바람직하고 의약품의 종류에 따라 최소검출차의 의미를 고찰할 필요가 있으며, 3. 또한 두 제제의 생체 이용률의 차의 신뢰한계를 구해 2의 결과와 합쳐 평가한다에 의거 각 항목별로 3×3 모델에 적합한 통계적 수법을 적용하였다.<sup>9)</sup>

먼저 각 피험자들의 생체내 이용률(bioavailability, BA) 파라미터를 Table II와 같은 형식으로 정리하였다. 현재까지 이용되어 온 2×2 모델의 종합식은 Table II에서 k=2로 고정된 경우이다. 대조약과 시험약의 비교항목의 평균치의 차이는 Table III과 같은 공식에 의해 계산하였다. 그리고 Table IV의 분산분석 공식을 이용하여 분산분석표를 작성하고 순서효과(seuence effects)를 검증한 후, 각 변동요인간의 유의성 여부를 검토하였다. 또한 이 과정에서 유의적인 변동요인이 존재 할 경우 다중비교 기법을 이용하여 (Table V) 처리(treatment)간 유의적 조합을 검출하였다. 검출력(power)과 최소검출차(minimum detectable difference)를 구하는 과정은 Table VI에 요약되어 있다.<sup>9)</sup> 이 때 비심도로부터 1- $\beta$ 를 구하는 과정에서 2×2 모델은 비심 t-분포를 이용하고 3×3 모델은 비심 F-분포를 이용한다는 점에 유의하여야 한다. BA의 차의 신뢰한계는 2×2 모델의 경우 5% 유의수준에서의 two-one sided t-tests<sup>10)</sup> 또한 90% 신뢰구간(90% shortest confidence intervals)<sup>11)</sup>에 입각하여 계산하는 반면 3×3 모델에서는 Dunnett의 다중비교에 입각하여 각 시험약과 대조약간의 차의 신뢰구간을 계산하게 된다(Table VII).<sup>9)</sup> 이상의 과정은 4 가지 이상의 제제에 대해서도 라틴방격법 모델을 따라 생물학적 동등성 시험을 행한 경우에도 공통적으로 적용될 수 있다. 단 이 때 각 Table의 k 값은 시험한 제제의

**Table I—Common Latin Square Method of Dosing Schedule**

Subject No.	Period I	Period II	Period III
A1			
A2			
A3			
A4	Ref.	Test 1	Test 2
A5			
A6			
A7			
B1			
B2			
B3			
B4	Test 2	Ref.	Test 1
B5			
B6			
B7			
C1			
C2			
C3			
C4	Test 1	Test 2	Ref.
C5			
C6			
C7			

**Table II**— Typical Presentation of Bioavailability Data in 3×3 Latin Square Design

Group	Subject	Period			Sum
		I	II	III	
1	1	x <sub>111</sub>	x <sub>122</sub>	x <sub>133</sub>	S <sub>1</sub>
	·	·	·	·	·
	i	x <sub>i11</sub>	x <sub>i22</sub>	x <sub>i33</sub>	S <sub>i</sub>
	·	·	·	·	·
	n	x <sub>n11</sub>	x <sub>n22</sub>	x <sub>n33</sub>	S <sub>n</sub>
Subtotal		x. 11	x. 22	x. 33	G <sub>1</sub>
2	n+1	x <sub>(n+1)31</sub>	x <sub>(n+1)12</sub>	x <sub>(n+1)23</sub>	S <sub>(n+1)</sub>
	·	·	·	·	·
	·	·	·	·	·
	2n	x <sub>(2n)31</sub>	x <sub>(2n)12</sub>	x <sub>(2n)23</sub>	S <sub>(2n)</sub>
Subtotal		x. 31	x. 12	x. 23	G <sub>2</sub>
3	2n+1	x <sub>(2n+1)21</sub>	x <sub>(2n+1)32</sub>	x <sub>(2n+1)13</sub>	S <sub>(2n+1)</sub>
	·	·	·	·	·
	·	·	·	·	·
	3n	x <sub>(3n)21</sub>	x <sub>(3n)32</sub>	x <sub>(3n)13</sub>	S <sub>(3n)</sub>
Subtotal		x. 21	x. 32	x. 13	G <sub>3</sub>
Sum of period		W <sub>1</sub>	W <sub>2</sub>	W <sub>3</sub>	X
Sum of drug		T <sub>1</sub> =(x. 11+x. 12+x. 13)	T <sub>2</sub> =(x. 21+x. 22+x. 23)	T <sub>3</sub> =(x. 31+x. 32+x. 33)	
Average of drug		$\frac{T_1}{k \times n}$	$\frac{T_2}{k \times n}$	$\frac{T_3}{k \times n}$	

X<sub>ijk</sub>: Bioavailability parameter for *i*th subject *j*th formulation and *k*th period  
 n=Number of group  
 S<sub>i</sub>=x<sub>i(j)1</sub>+x<sub>i(j)2</sub>+x<sub>i(j)3</sub>

**Table III**— Acceptable Range of Bioavailability (BA) Parameters

2×2 model	3×3 model
$\frac{(\bar{X}_T - \bar{X}_R)}{\bar{X}_R} \times 100 \leq 20(\%)$	$\frac{(\bar{X}_{T1} - \bar{X}_R)}{\bar{X}_R} \times 100 \leq 20(\%),$ $\frac{(\bar{X}_{T2} - \bar{X}_R)}{\bar{X}_R} \times 100 \leq 20(\%)$

$\bar{X}_R$ : Mean bioavailability of reference formulation  
 $\bar{X}_T$ : Mean bioavailability of test formulation  
 $\bar{X}_{T1}$ : Mean bioavailability of test formulation 1  
 $\bar{X}_{T2}$ : Mean bioavailability of test formulation 2

수로 치환된다.

**결 과**

**생물학적 동등성의 판정**

3기에 걸쳐 지원자 21명에게 각 제제를 1회 경구투

여한 후의 혈장 중 농도를 정리하면 Table VIII과 같다. 또 각 시험대상자의 AUC 자료를 피험자별, 시기 별로 정리하여 각 시기별 피험자별 합계를 구하고 제 제별 AUC의 평균치를 구하였다(Table IX). 그리고 이 평균치를 사용하여 Table III의 공식에 따라 대조약 과 시험약 1, 대조약과 시험약 2 간의 AUC의 평균치 의 차를 구하였다.

시험약 1

$$\frac{|14396.2 - 13372.7|}{13372.7} \times 100 = 7.65(\%) \quad (1)$$

시험약 2

$$\frac{|14104.8 - 13372.7|}{13372.7} \times 100 = 5.48(\%) \quad (2)$$

(1), (2) 식에서와 같이 대조약에 대한 시험약 1과 시험약 2의 AUC 차이는 각각 모두 20% 미만이었으

**Table IV**—A Typical Presentation of ANOVA Results in  $k \times k$  Latin Square Model

Source of variation	Degree of freedom		Sum of squares		Mean squares		F	
<b>Inter-subjects</b>								
Sequence	$df_G$	$k-1$	$SS_G$	$\left[ \sum_{i=1}^k G_i^2/kn \right] - CF$	$MS_G$	$SS_G/df_G$	$F_G$	$MS_G/MS_{S/G}$
Subject/Group	$df_{S/G}$	$k(n-1)$	$SS_{S/G}$	$SS_S - SS_G$	$MS_G$	$SS_{S/G}/df_{S/G}$	$F_{S/G}$	$MS_{S/G}/MS_R$
<b>Intra-Subjects</b>								
Period	$df_P$	$K-1$	$SS_P$	$\left[ \sum_{i=1}^k W_i^2/kn \right] - CF$	$MS_P$	$SS_P/df_P$	$F_P$	$MS_P/MS_R$
Drugs	$df_D$	$K-1$	$SS_D$	$\left[ \sum_{i=1}^k T_i^2/kn \right] - CF$	$MS_D$	$SS_D/df_D$	$F_D$	$MS_D/MS_R$
Residual	$df_R$	$(kn-2) \times (k-1)$	$SS_R$	$SS_T - SS_S - SS_D - SS_P$	$MS_R$	$SS_R/df_R$		
Total	$df_T$	$kkn-1$	$SS_T$	$\left[ \sum_{i=1}^N \sum_{j=1}^k x_{ik}^2 \right] - CF$				

$X_{ik}$ =Bioavailability parameter of  $i$ th subject at  $k$ th period  
 $CF=X^2/kkn$

Other symbols were described in Table II.

**Table V**—Comparison of Calculation of Critical Value for Multiple Comparisons. Dunnett Method is Adapted in a Typical Bioequivalence Test

Dunnett method	Tukey method
$L\delta_\alpha = d_{(\alpha, k-1, v_2)} \times \sqrt{\frac{2MS_R}{N}}$	$L\delta_\alpha = q_{(\alpha, k-1, v_2)} \times \sqrt{\frac{MS_R}{N}}$

$L\delta_\alpha$ =Critical value of statistical significance  
 $d(\alpha, k-2, v_2)$ =Value for Dunnett's multiple comparison at significance  $\alpha$  and degree of freedom of  $k-2$  and  $v_2$ .  
 $v_2$ =Identical to that described in Table VI.  
 $q(\alpha, k-2, v_2)$ =Value for Tukey's multiple comparison at significance  $\alpha$  and degree of freedom of  $k-2$  and  $v_2$ .  
 $N=k \times n$ , Number of total subjects  
 $MS_R$ =Mean square of residual in ANOVA table

므로 생물학적 동등성의 판정 조건 1항을 만족하였다.

따라서 유의수준  $\alpha=0.05$  조건에서 분산분석(Table IV)을 실시하였는데 이 때의 결과는 Table X에 요약되어 있다. 먼저 구간 변동(Sequence)에 의한 유의적 차이가 인정되지 않아 순서효과(sequence effects)를 부정할 수 있었다. 이와 대조적으로 피험자간 변동(subjects/group)에는 유의적 차이가 존재함으로써 교차시험이 잘 설계, 진행되었음이 확인되었다.<sup>12)</sup> 다만 시기별 효과(period)가 유의적인 것으로 나타났으나 분산분석에서 이러한 수준의 시기효과는 흔히 찾아볼 수 있는 것으로 동등성의 해석여부에 큰 의미를 지니지 않는다.<sup>11)</sup> 반면 제제별 차이(drug)에 대한 유의성은 인정되지 않

**Table VI**—Comparison of Calculation of Power and Minimum Detectable Difference( $\Delta$ ) in  $2 \times 2$  Latin Square and  $k \times k$  Latin Square Models

$2 \times 2$ model	$k \times k$ model ( $k=3$ at $3 \times 3$ model)
$\lambda_{(v_1, \alpha)} = \frac{\delta^*}{\sigma/\sqrt{n}}$	$\Psi_{(v_1, v_2, \alpha)} = \frac{(\sigma^*)^2}{\sigma^2} \times \frac{\sqrt{k \times n}}{\sqrt{2 \times (k-n)}}$
$\Delta = \frac{\sigma \times \lambda_{(v_1, \alpha, 1-\beta=0.8)}}{\mu_1 \times \sqrt{n}}$	$\Delta = \frac{\sigma \times \Psi_{(v_1, v_2, \alpha, 1-\beta=0.8)}}{\mu_1} \times \frac{\sqrt{2 \times (k-n)}}{\sqrt{k \times n}}$

$\lambda_{(v_1, \alpha)}$ ,  $\Psi_{(v_1, v_2, \alpha)}$ =Noncentrality  
 $\alpha$ =Level of significance (0.05 or 0.1)  
 $1-\beta$ =Power  
 $\delta^*$ =Detectable difference of BA at power=0.8, equal to  $(0.2 \times \bar{X}_R)$   
 $n$ =Number of subjects in each group  
 $\sigma^2$ =Population mean of BA, substituted by  $MS_R$  in ANOVA table at this condition.  
 $\mu_1$ =Population mean of BA, substituted by  $\bar{X}_R$  at this condition.  
 $v_1, v_2$ =Degree of freedom,  $v_1=2(n-1)$  in  $2 \times 2$  model and  $v_1=k-1, v_2=(kn-2)(k-1)$  in  $3 \times 3$  model.  $v_1$  in  $2 \times 2$  model and  $v_2$  in  $3 \times 3$  model were equal to degree of freedom for residual(error) in ANOVA  
 $\lambda_{(v_1, \alpha, 1-\beta=0.8)}$ =Noncentral t-distribution at Power=0.8, degree of freedom  $v_1$  and level of significance  $\alpha$   
 $\Psi_{(v_1, v_2, \alpha, 1-\beta=0.8)}$ =Noncentral F-distribution at Power=0.8, degree of freedom  $v_1, v_2$  and level of significance  $\alpha$

음으로써 귀무가설에 따른 시험약들과 대조약간에 통계학적 차이는 유의성이 없음을 보여 주었다. 그러나 만약 분산분석 결과, 제제별 차이가 인정되었다면 Dunnett

**Table VII**—Comparison of Calculation of Confidence Intervals in 2×2 Latin Square Model and k×k Latin Square Model

2×2 model	k×k model (k=3 at 3×3 model)
$\bar{X}_T - \bar{X}_R \pm t_{(\alpha, n1+n2-2)} \times \hat{\sigma}_d \times \sqrt{\frac{1}{n1} + \frac{1}{n2}}$	$ \bar{X}_{T1} - \bar{X}_R  \pm d_{(\alpha, k-1, v2)} \times \sqrt{\frac{2 \times MS_R}{N}}$
	$ \bar{X}_{T2} - \bar{X}_R  \pm d_{(\alpha, k-1, v2)} \times \sqrt{\frac{2 \times MS_R}{N}}$

$\bar{X}_T, \bar{X}_R$ =Mean AUC for the test and reference formulations

$\bar{X}_{T1}, \bar{X}_{T2}$ =Mean AUC for the test 1 and test 2 formulations

$t_{(\alpha, n1+n2-2)}$ =T-distribution at significance  $\alpha$  and degree of freedom  $n1+n2-2$

$n1, n2$ =Number of subjects in each group.

$N=k \times n$ . Number of total subject

$d_{(\alpha, k-1, v2)}$ =Value for Dunnett's multiple comparison at significance  $\alpha$  and degree of freedom  $k-1$  and  $v2$ .

$MS_R$ =Mean square of residual in ANOVA table

$\hat{\sigma}_d$ =Pooled sample variance of period difference from both sequences, which is equal to  $\sqrt{\frac{MS_R}{2}}$  at this condition.

**Table VIII**—Mean Plasma Ondansetron Concentration(ng/ml) Following Single Oral Administration of Ondansetron Tablets to 21 Subjects at the Dose of 8 mg

Zofran <sup>®</sup> 4 mg×2									
Time(h)	0.5	1	1.5	2	3	4	6	9	12
N(LOQ)	14	21	21	21	21	21	21	21	21
Geom. mean	9.9	30.3	33.0	33.1	28.2	25.0	17.5	11.0	7.1
$e^{\text{mean}+\text{SD}}$	23.0	53.7	49.3	46.1	36.5	32.9	23.4	15.2	10.7
$e^{\text{mean}-\text{SD}}$	4.3	17.1	22.0	23.7	21.9	19.0	12.1	8.0	4.7
N	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Median	10.8	39.6	34.8	33.5	29.2	26.6	18.5	10.6	7.9
Min	<2	6.4	8.6	15.3	16.4	12.8	9.6	6.6	4.0
Max	28.4	67.8	57.9	69.4	41.8	41.0	28.9	21.7	15.6

#### Vomiton<sup>®</sup> 8 mg

Time(h)	0.5	1	1.5	2	3	4	6	9	12
N(LOQ)	15	21	21	21	21	21	21	21	21
Geom. mean	7.3	29.5	36.4	35.8	28.5	26.2	18.2	12.0	7.3
$e^{\text{mean}+\text{SD}}$	20.6	48.3	53.5	47.3	38.4	35.8	25.5	17.6	11.2
$e^{\text{mean}-\text{SD}}$	2.6	17.9	24.8	27.1	21.2	19.2	13.0	8.2	4.8
N	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Median	7.1	30.1	41.0	35.6	29.0	26.0	17.8	11.2	7.2
Min	<2	11.2	11.2	16.6	13.4	12.8	8.3	5.4	2.9
Max	62.3	70.4	60.5	55.5	47.0	41.5	33.1	25.9	19.6

#### Vomiton<sup>®</sup> 4 mg×2

Time(h)	0.5	1	1.5	2	3	4	6	9	12
N(LOQ)	13	21	21	21	21	21	21	21	21
Geom. mean	7.2	23.6	37.2	36.3	31.0	26.5	18.7	11.9	7.4
$e^{\text{mean}+\text{SD}}$	25.7	48.0	53.6	48.8	43.9	36.6	26.4	17.9	12.9
$e^{\text{mean}-\text{SD}}$	2.0	11.6	25.9	27.0	21.9	19.2	13.3	7.9	4.2
N	21	21	21	21	21	21	21	21	21
Median	7.8	24.9	37.8	34.8	32.0	26.9	20.1	12.5	6.8
Min	<2	5.0	19.9	21.8	11.7	13.8	9.3	6.0	2.2
Max	36.5	76.7	62.9	57.4	51.7	42.3	36.7	23.9	22.8

LOQ=Limit of quantitation (2 ng/ml)

N(LOQ)=Number of data above LOQ

$e^{\text{mean}+\text{SD}}$ =Upper limit of mean: mean and SD were obtained from logarithmically transformed data

$e^{\text{mean}-\text{SD}}$ =Lower limit of mean: mean and SD were obtained from logarithmically transformed data

N=Total number of observation

Table IX—Summary of AUC Values for ANOVA in 3×3 Latin Square Design

Group	Subject	Period			Sum			
		I	II	III				
1	A1	12176	11424	14319	37919			
	A2	10913	12114	11640	34667			
	A3	11004	11802	11234	34040			
	A4	Ref.	Test 1	Test 2	14377	15322	13700	43399
	A5				15110	18308	18598	52016
	A6				21644	23917	24176	69737
	A7				11367	10524	13224	35115
Subtotal		96591	103411	106891	306893			
2	B1	12153	9771	12794	34718			
	B2	14121	12292	18396	44809			
	B3	6339	7860	7907	2106			
	B4	Test 2	Ref.	Test 1	20062	17667	23253	60982
	B5				12306	17170	15114	44590
	B6				19123	15472	17058	51653
	B7				20043	15816	19540	55399
Subtotal		104147	96048	114062	314257			
3	C1	8261	11015	9030	28306			
	C2	16785	15493	19305	51583			
	C3	14847	13936	12399	41182			
	C4	Test 1	Test 2	Ref.	6692	6938	7677	21307
	C5				11060	13337	12348	36745
	C6				13196	11538	12685	37419
	C7				14008	12906	14744	41658
Subtotal		84849	85163	88188	258200			
Sum of period		285587	284622	309139	86933.8			
Sum of drug		T1	T2	T3	280827	302322	296201	
Average of drug		Ref	Test 1	Test 2	13372.7	14396.3	14104.8	

Table X—Analysis of Variance for AUC

Source of variation	dF	Sum of squares	Mean squares	F-test
Inter-subjects				
Sequence	2	88374808	44187404	0.904(n.s.)
Subject/group	18	88.241152	48902288	22.057(P<0.05)
Intra-subjects				
Period	2	18362856	9181428	4.141(P<0.05)
Drugs	2	11679744	5839872	2.634(n.s.)
Residual	38	84251160	2217135	

n.s.=Non-significant at  $\alpha=0.05$ 

dF=Degree of freedom

법이나 Tukey법 등의 다중비교기법을 이용하여 BA의 차의 한도값을 계산하여 대조약과 각 시험약간의 차이와 비교하여 시험약 1, 2 중 어느 것이 대조약과 유의적 차이를 나타내는지를 알아보아야 한다.<sup>9)</sup> 생물학적 동등성 시험의 경우와 같이 대조군이 분명히 정의된 경우 다

중비교법으로 주로 Dunnett법을 이용하게 되는데, Table V의 식에 따라  $\delta_a$ 를 계산한 후 대조약과 각 시험약간의 평균치의 차이와 비교해야 한다. 이 때 평균치의 차이가  $\delta_a$ 보다 큰 경우, 대조약과 시험약 간에는 유의적 차이가 있음을 뜻한다.

Table XI—Summary of Bioequivalence Test Results for AUC

	Test 1 formulation	Test 2 formulation
Difference in mean AUC from the reference	7.65(%)	5.48(%)
ANOVA		non significant
Power		>0.99
Confidence intervals	-0.24%~15.54%	-2.41%~13.36%

검출력은 Table VI의 식에 의해 계산된다.

$$\text{비심도} : \Psi_{(v_1, v_2, \alpha)} \\ = \frac{(13372.7 \times 0.2)}{\sqrt{2217135}} \times \frac{\sqrt{3 \times 7}}{\sqrt{2 \times (3-1)}} = 4.116 \quad (3)$$

(3)식에서와 같이 비심도는 4.116 이었으므로, 유의수준  $\alpha=0.05$ , 제 1의 자유도 2, 제 2의 자유도 38 조건에서  $1-\beta$ 를 비심 F-분포표(부록 참조)를 이용, 역산하면 0.99 이상으로 계산된다. 따라서 이 시험에서의 검출력은 현행 기준을 만족하였고 정밀한 시험이 진행되었음을 확인할 수 있었다. 한편 최소검출차의 경우,  $\alpha=0.05$ , 제 1의 자유도 2, 제 2의 자유도 38,  $1-\beta=0.8$  조건에서의 비심 F-분포표를 참조하면 비심도가 2.280로 나타나므로 이를 Table VI의 식에 대입하면

$$\text{최소검출차} : \Delta \\ = \frac{\sqrt{2217135} \times 2.280}{13372.7} \times \frac{\sqrt{2(2-1)}}{\sqrt{3 \times 7}} \\ = 0.1108 = 11.08\% \quad (4)$$

가 된다. 이 역시 기준치 20%를 넘지 않았다.

대조약과 각 시험약들 간의 BA 차의 신뢰구간은 Table VII에서와 같이 다중비교에서 사용된 통계치를 이용하여 계산한다. 분산분석에서와 마찬가지로 Dunnett법을 기준으로 계산하면 시험약 각각에 대하여 대조약과의 BA차의 신뢰구간은

$$\text{시험약 1} \\ |14396.2 - 13372.7| \pm 2.296 \times \sqrt{\frac{2 \times 2217135}{21}} \\ = -31.55 \sim 2078.55 \quad (5)$$

$$\text{시험약 2} \\ |14104.8 - 13372.7| \pm 2.296 \times \sqrt{\frac{2 \times 2217135}{21}} \\ = -322.95 \sim 1787.15 \quad (6)$$

로 계산되며 이를 대조약에 대한 %로 계산할 경우 각각

$$\text{시험약 1} : -0.24\% \sim 15.54\% \quad (7)$$

$$\text{시험약 2} : -2.41\% \sim 13.36\% \quad (8)$$

로 나타나 시험약 1, 2 모두 규정에 적합하였다.

따라서 AUC 측면에서 3 가지 제제는 1. 대조약과 시험약간의 BA의 평균의 차이가 대조약의 20% 미만이었으며(7.65%, 5.48%), 2. 분산분석 결과 순서효과는 기각되었으며 또한 제제간 유의적 차이는 없었고 ( $p>0.05$ )  $\alpha=0.05$  유의수준에서 검출력  $1-\beta$  또한 기준치 0.8 이상이었으며( $>0.99$ ) 최소검출차 또한 20% 미만이었다(11.08%). 3. 대조약과 각 시험약 간의 신뢰구간은 대조약의 20% 미만(-0.24%~15.54%, -2.41%~13.36%)으로서 규정을 만족하였다. 이상의 결과를 종합 검토해 볼 때 AUC 측면에서 두 가지 온단세트론 시험약은 대조약과 모두 생물학적으로 동등함을 확인할 수 있었다(Table XI).

## 고 찰

생물학적 동등성 시험의 목적은 서로 상호 호환 사용하게 될 것이 예상되는 제제들이 서로 생물학적으로 동등하다는 것을 보증하는 데에 있다.<sup>11)</sup> 생물학적으로 동등하다는 것은 치료 효과 면에서 반드시 동등하다는 것을 의미하지는 않지만 경제학적 현실을 고려할 때 신규 제제의 안전성과 유효성의 평가를 생물학적 동등성의 입증을 통하여 대체검증할 수 있다는 점에서 큰 의미를 가진다.<sup>13)</sup>

최근까지의 생물학적 동등성 시험은 기준에 널리 사용되었던 대조약 1종과 이에 대한 모방약인 시험약 1종의 생물학적 동등성을 입증하기 위한 2×2 라틴 방격법에 따른 생물학적 동등성 시험이 주종을 이루었고, 드물게 긴 시험기간등으로 지원자의 탈락이 불가피했던 경우, unbalanced 2×2 교차시험법에 의한 생물학적 동등성 시험이 행해지기도 하였다.<sup>5)</sup> 이렇듯 2×2 교차 실험 모델의 경우 2 종의 제제에 대해서만 동등성을 고찰할 수 있다는 단점에도 불구하고 국내에서 생물학적 동등성 시험의 표준 모델로 널리 받아들여져 왔다.

그러나 3 가지 이상의 제제에 대해서도 3×3 라틴방격법 혹은 확률화 불완전 블록 계획법(randomized

incomplete block design) 등을 이용하면 서로에 대해 생물학적 동등성의 고찰이 가능하다는 점에서<sup>7,11)</sup> 이를 잘 활용하면 동일한 유효성분 가지면서 서로 용량이 다른 제제를 개발하고자 할 경우, 개발에 드는 비용을 획기적으로 줄이는 것이 가능하다. 따라서 본 연구에서 고찰한 온단세트론 이외의 많은 약물들에 대해 3×3 라틴방격법에 의한 생물학적 동등성 시험이 활발히 실시될 전망이다.

3×3 모델에 의한 생물학적 동등성 시험의 통계해석 과정은 기존 2×2 모델과 기본 논리면에서는 크게 다르지는 않으나 몇 가지 점에서 주의를 기울여야 한다. 먼저 현재 3×3 모델의 경우 순서효과가 unbiased 된 상태가 아니므로<sup>11)</sup> 분산분석을 통해 반드시 순서효과(변동요인에서 sequence항)를 검증하여 유의적인 순서효과가 존재하지 않음을 확인하여야 한다. 또한 분산분석 과정에서 유의적 변동요인이 존재할 경우 반드시 다중비교를 실시하여 유의적 차이를 나타내는 조합을 검출하여야 한다. 아울러 비심도 시험에서도 2×2 모델에서와는 달리 비심도 F-분포표를 이용하여야 한다. 아울러 시험약과 대조약간의 BA의 차의 신뢰구간을 구함에 있어서도 다중비교 통계치를 이용하여 각 시험약과 대조약 간의 BA의 차의 신뢰구간을 구하여야 한다.

본 연구는 앞으로 3×3 라틴방격법에 의한 생물학적 동등성 시험의 해석에 많은 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되며 아울러 본 연구에서 설명한 이상의 통계해석 절차는 국내에서 실시될 3 제제 이상의 생물학적 동등성 시험에 포괄적으로 적용될 표준 판정절차로 자리잡을 수 있을 것으로 기대된다.

그러나 국내의 생물학적 동등성 시험 규정이 가지고 있는 전반적 문제 즉 파라미터의 로그변환 여부<sup>14,15)</sup> 및  $T_{max}$  파라미터에 대한 비모수적 검정<sup>16)</sup> 등의 문제는 3×3 모델에서의 통계해석에도 여전히 존재하며 교차시험시 Williams design의 적용여부 및 확률화 불완전 블록 계획법의 채택여부 등은 학계와 당국이 심도 깊게 논의하여 할 것이다.<sup>11)</sup>

### 감사의 말씀

본 연구는 서울대학교 신의약품 개발연구센터를 통한 한국과학재단 우수연구센터 지원금에 의한 것입니다. 아울러 본 연구를 위한 자료정리에 도움을 주신 이홍선생께도 감사드립니다.

## 문헌

- 1) 약제학분과회, 제제학, 한림원, 서울, pp.545-552 (1995).
- 2) 식품의약품안전본부고시 제96-16호, 생물학적 동등성 시험기준, 식품의약품안전본부(1996. 10. 31.).
- 3) C.K. Kim, J.E. Jeong, E.J. Lee, H.J. Shin and W.K. Lee, Bioequivalence of enteric-coated omeprazole products, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **23**, 41-49 (1993).
- 4) C.K. Shim, H.L. Kwon, C.K. Lee, I.S. Han and K.S. Choi, Bioequivalence test of slow-release theophylline dosage forms using saliva samples, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **19**, 191-194 (1989).
- 5) Y.J. Lee, E.J. Jang, J.U. Lee, Y.H. Han, S.J. Chung, M.H. Lee and C.K. Shim, Bioequivalence study of nabumetone tablets in man, *Arch. Pharm. Res.*, **18**, 340-345 (1995).
- 6) 김병수, 생물학적 동등성 시험의 실험설계 및 데이터 해석, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **25**, 71-76 (1995).
- 7) 김병수, 서우중, 생물학적 동등성 기법에 활용되는 통계적 기법, *Pharmacoon*, **23**, 3-14 (1993).
- 8) 이명걸, 윤우현, 보미는 정 4mg 및 보미는 정 8mg의 생물학적 동등성 시험, 서울대학교 신의약품 개발 연구센터, (1997).
- 9) H. Okada and M. Samezima, 醫藥品のバイオアベイラビリティと生物學的同等性試験, 藥業時報社 pp.25-26 (1989).
- 10) D.J. Schuirmann, A comparison of the two one-sided tests procedure and the power approach for assessing the equivalence of average bioavailability, *J. Pharmacokin. Biopharm.*, **15**, pp.657-680 (1987).
- 11) J.P. Liu and S.C. Chow, *Design and analysis of bioavailability and bioequivalence studies*, Marcel Dekker, Inc., New York, pp.23-125 (1992).
- 12) A. J. Jackson, *Generics and Bioequivalence*, CRC Press, Florida, pp.1-28 (1994).
- 13) 이민화, 심창구, 정석재, 약제학실험, 한림원, 서울, pp.208-229 (1997).
- 14) APV *Studies on bioavailability and bioequivalence (APV guideline)*, Drugs made in Germany 30, pp.161-166 (1987).
- 15) CPMP(Committee for Proprietary Medicinal Products) Working Party in the Efficacy of Medicinal Products 1991 Note for guidance : Investigation of bioavailability and bioequivalence.
- 16) D. Hauschke, V.W. Steinjans and E. Diletti, A distribution-free procedure for the statistical analysis of bioequivalence studies, *Int. J. Clin. Pharmacol.*, **28**, pp.72-78 (1990).