

## 항암제 doxifluridine의 생물학적동등성 연구방안

김경일<sup>1</sup> · 권광일<sup>2</sup> · 강원구<sup>1</sup>

<sup>1</sup>약물/독성동태 연구실, 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소

<sup>2</sup>충남대학교 약학대학 임상약학실

### Strategy for Bioequivalence of Doxifluridine

Jin Qing Ri<sup>1</sup>, Kwang-il Kwon<sup>2</sup>, Wonku Kang<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Pharmacokinetics/Toxicokinetics, Korea Research Institute of Chemical Technology,

Korea Institute of Toxicology (KIT)

<sup>2</sup>Clinical pharmacy, College of Pharmacy, Chungnam National University

This study was designed to establish a strategy for the bioequivalence study of doxifluridine, an anticancer drug, in dogs instead of cancer patients. Although the results from animals may not occur in the same manner from human, those would be worth enough in terms of the bioequivalence. As for critically ill population such as cancer patients, bioequivalence studies in animals bring many advantages. Six healthy Beagle dogs were selected on the basis of hematology and blood chemistry test. After an over night fast, 200 mg of doxifluridine was orally administered, and blood was serially taken up to 12 hours. Plasma concentration of doxifluridine was measured using a newly validated bioanalytical method by a HPLC coupled tandem mass spectrometry. Time course of plasma doxifluridine concentration was analyzed with non-compartmental and compartmental approaches. Consequently, we represented hematology and blood chemistry database for the selection of healthy Beagle dogs, and suggested a sensitive and validated analytical method of doxifluridine, as well as a study design for the bioequivalence of doxifluridine in dogs.

□ **Key words** – bioequivalence, dog, doxifluridine

특히 만료에 따라 시판 예정인 generic 약물의 original 약물에 대한 약효 동등성 평가를 위해 건강한 성인을 대상으로 한 생물학적 동등성 시험이 실시되고 있다. 이 시험은 두 약물이 동등한 양 및 속도로 혈중으로 이행하는지의 여부를 통계학적인 방법을 이용하여 평가하는 것으로 약력학적 동등성(pharmacodynamic equivalence)은 약동학적 동등성(pharmacokinetic equivalence)에 근거한다는 것을 전제로 하고 있다.

이들 동등성 시험의 실시에 앞서 시험 시 발생할 수 있는 부작용을 최소화하기 위해 지원자들의 건강상태를 사전에 확인하고 약물에 과민반응의 기왕력이 있는 지원자들은 배제시키게 된다. 투여하는 약물의 양의 결정에 있어서도 그 약물의 약동학적인 양상을 잘 파악할 수 있을 정도의 충분한 감도를 가지는 혈중 약물분석법 개발을 진행하고 있고 그에

따라 최소한의 양을 투여하도록 하고 있다. 이러한 노력에도 불구하고 많은 부작용이 나타나고 특히 정신과 영역에서 사용되는 약물인 경우는 그 정도가 더 심하다.

항암제 역시 부작용이 매우 심한 약물들로 생물학적 동등성 평가에 건강한 성인들을 포함시킬 수 없으며 환자들을 대상으로 하거나 동물을 이용한 시험이 권해지고 있다. 하지만 이들 시험에 관한 구체적인 사안들은 정해져 있지 않으며 타 약물들의 시험에 준하여 시행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 비글 견(Beagle dog)을 이용한 항암제 독시플루리딘(doxifluridine, 5'-deoxy-5-fluoridine)의 생물학적 동등성 시험 방안을 모색하고자 한다. 첫째, 건강한 비글 견의 혈액학, 혈액생화학 검사의 정상 범위 및 판단 기준 확립, 둘째, 개의 혈장 중 독시플루리딘 분석법의 확립, 셋째, 예비시험을 통한 생물학적 동등성 시험 디자인의 제안 등 크게 3가지 부분에서 비글 견을 이용한 독시플루리딘의 생물학적동등성 시험안을 제시하고자 한다.

불화 피리미딘(fluorinated pyrimidine) 핵산 유도체들은 매우 좋은 항암활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 그 중 5-fluorouracil은 가장 효과가 좋은 항종양제 중 하나로 유방암, 대장암 및 직장암 등에 널리 사용되고 있다. 이 약

Correspondence to : 강원구  
안전성평가연구소  
대전광역시 유성구 장동 100,  
유성우체국 사서함 123  
Tel: +042-610-8231, Fax: +042-610-8172  
E-mail: kang@kitox.re.kr

물의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 1-(2-tetrahydrofuryl)-5-fluorouracil, 1-hexylcarbamoyl-5-fluorouracil, 5'-deoxy-5-fluorouridine 등 여러 유도체들이 합성되었다.<sup>1-4)</sup> 독시플루리딘은 5-fluorouracil의 prodrug으로 구조중의 deoxy-ribofuranosil 부분이 중앙 조직 내로의 침투를 용이하게 한다. 독시플루리딘은 암세포 내에서 마우스인 경우는 uridine phosphorylase에 의해서, 사람의 경우는 thymidine phosphorylase에 의해서 5-fluorouracil로 대사되어 항암활성을 나타내게 된다.<sup>5-9)</sup>

## 연구방법

### 비글 건의 혈액학/혈액생화학 및 뇨 분석자료

비글 건의 혈액학, 혈액생화학 및 뇨 분석자료는 한국화학연구원 부설 안전성평가연구소에서 사용된 동물로부터 얻어졌다. 2003년부터 2004년까지 안전성평가연구소의 안전성평가연구동에서 시험을 위해 4주간의 검역 및 순화 기간을 거친 비글 건들로부터 채취된 혈액 및 뇨의 분석을 통해 얻어진 자료를 이용하였다. 순화기간 동안 체중의 증가추세 및 담당 수의사의 검진을 통한 내과적 이상 유무에 따라 자료의 채택 여부를 결정하였다. 동물은 Marschall Farm으로부터 5.5개월 된 비글 건을 구입하여 사용하였다.

### 개의 혈장 중 독시플루리딘 분석법

#### 재료 및 시약

독시플루리딘은 신평제약으로부터 공급받았고 내부표준물질로 사용한 5-chlorouracil은 Sigma사로부터 구입하였다. 아세토니트릴과 메탄올 등 유기용매는 Merck 사로부터 (Darmstadt, Germany) 구입하였으며 모든 시약들은 highest analytical grade로 사용하였다.

#### 표준용액의 제조 및 표준시료

독시플루리딘과 내부표준 물질을 각각 메탄올에 녹여 1 및 0.1 mg/ml의 표준용액을 제조하여 냉장 보관하면서 사용하였다. 독시플루리딘 표준 시료는 20%메탄올에 의해 계열 희석된 표준용액을 공혈장에 넣어 제조하였다. 공혈장 90 µl에 계열 희석된 표준용액 10 µl 씩을 가하여 최종농도가 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1 및 5 µg/ml인 검량선 작성용 시료를 만들었다. 검량선은 농도에 따른 독시플루리딘과 내부표준물질의 피이크 면적비로부터 계산되었다.

표준시료는 최저정량한계농도(5 ng/ml)를 포함한 저농도, 50 및 200 ng/ml 용액의 중농도와 고농도인 5 µg/ml 혈장용액을 제조하여 일내 및 일간 정확성과 정밀성을 측정하였다. 혈액시료 및 분석기간 중의 안정성을 확보하기 위해 표준원액 안정성, 혈장 시료의 상온보관 안정성, 추출 후 안정성, 냉, 해동 안정성 및 장기 냉동 안정성을 시험하였다.

### 분석방법

혈장 중 독시플루리딘의 농도를 측정하기 위해 LC/MS-MS를 이용하였다. 분석용 칼럼으로는 (Zorvax eclipse XDB-C<sub>18</sub>, 2.1 × 100 mm, 3.5 µm; Agilent, DE, USA)를 사용하였으며 이동상으로는 20% 메탄올 수용액을 0.2 ml/min의 속도로 흘렸다. 검출기로는 ABI Applied Biosystems/MDS SCIEX API 4000™ LC/MS/MS System (Sciex Division of MDS Inc., Toronto, Canada)을 이용하였다. Turboion spray interface가 장착되어 있으며 4500V, 550°C에서 negative mode를 사용하였고 분석에 필요한 질소가스의 압력 및 유속은 다음과 같다. Nebulizing gas flow는 1.04 l/min, auxiliary gas flow 및 curtain gas는 각각 4.0 및 16 l/min였다. Orifice voltage는 80V, ring voltage는 400V, collision gas (nitrogen) pressure는 3.58 × 10<sup>-5</sup> Torr였다. 정량을 위해서는 독시플루리딘과 내부표준물질의 protonated precursor 이온과 product 이온을 동시에 측정하는 multiple reaction monitoring (MRM)을 실시하였다. 독시플루리딘과 5-chlorouracil의 [M-H]<sup>-</sup> 이온의 mass transition은 각각 m/z 244.859 (collision energy 20 eV, dwell time 150 ms) 및 144.859 (collision energy 20 eV, dwell time 150 ms)이었다.

### 비글 건에서 독시플루리딘의 약물동태 연구

#### 투약 및 혈액채취

시험실시 1주일 전에 혈액학 및 혈액생화학 결과와 내과적 진찰소견을 통해 건강한 것으로 판정된 수컷 6마리(6.5개월령, 5.5~7 kg) 비글 건을 시험에 사용하였다. 12시간 절식 후 후트론캡슐 200mg을 1회 경구 투여 하였고 투여 전 및 투여 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6시간에 약 1ml의 혈액을 반복적으로 취하였다. 혈액은 헤파린이 처리된 튜브에 담아 냉장 원심분리기를 이용하여 13200 rpm에서 3분간 원심분리하여 혈장 시료를 얻었고 분석 시까지 -80°C에 보관하였다. 본 연구는 안전성평가연구소 내 국제 실험동물위원회 (International Animal Use and Care Committee)로부터 사전승인을 받은 후 실시하였다.

#### 시료전처리

혈장시료 100 µl에 내부표준물질 1 µg/ml 용액 0.1 ml와 0.05N HCl 1 ml를 가한 후 ethylacetate와 2-propanol (90:10 %, v/v) 혼합용액 5 ml로 독시플루리딘과 내부표준물질을 추출하였다. 원심분리 후 유기층을 다른 튜브에 옮겨 증발 건조 후 100 µl의 이동상에 녹였으며 10 µl를 LC/MS-MS에 주입하였다.

#### 약동학적 분석

모델비의존형방법 (non-compartmental analysis)과 모델의존형방법 (compartmental analysis)을 사용하여 독시플루리딘의 비글 건에서의 약동학적 parameter들을 산출하였다. 시간

별 혈중농도 곡선으로부터 최고혈중농도 ( $C_{max}$ )와 최고혈중농도 도달시간 ( $T_{max}$ )을 얻었고 시간별 농도곡선하면적은 사다리꼴법칙을 이용하여 구하였다. 소실속도상수 ( $k_e$ )로부터 약물의 반감기 ( $t_{1/2}=0.693/k_e$ )를 산출하였다.

Compartmental analysis를 위해 Winnonlin을 이용하였고 모델 library 내의 one-compartment model을 설정하였으며 first-order absorption 및 elimination, lag time등의 parameter들을 포함시켰다. 가중치 (weighting factor)를 변화시키면서 시간별 혈중농도추이를 가장 잘 설명하는 모델을 찾았다. 모델 선택의 기준은 fitting된 그래프의 visual examination, sum of square of the residual, 각 parameter들의 coefficient of variance, Akaike's information criteria (AIC)등이 종합적으로 고려되어 선택되었다. AIC값의 차이는 3.84이상의 차이를 보일 때 유의성 있는 ( $p<0.05$ ) 것으로 판단하였다.

## 결 과

### 비글 건의 혈액학, 혈액생화학 및 뇨 검사 자료

건강한 비글 건의 혈액학 및 혈액생화학 분석자료를 Table 1에 나타내었다.

### 개의 혈장 중 독시플루리딘 분석법

#### Mass Spectra

Tandem mass-spectrometry의 조건확립을 위해 독시플루리딘과 5-chlorouracil의 표준용액 1 µg/ml 메탄올 용액을 10 µl/min의 속도로 주입하였다. Electrospray ionization source를 이용하여 양이온 모드에서 생성된 수소 이온화된 각 물질을 scanning하였다. 독시플루리딘과 5-chlorouracil은 각각 244.8, 및 144.8의 [M-H]<sup>+</sup> 분자들이 가장 많이 생성되었다. Q2에서

**Table 1. Hematology and blood chemistry of Beagle dogs**

Parameters	Female	Male	n
White blood cell ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	9.83 ± 1.85	9.44 ± 2.15	86
Red blood cell ( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )	6.77 ± 0.57	6.55 ± 0.54	86
Hemoglobin concentration (g/dl)	15.40 ± 1.04	14.87 ± 1.12	86
Hematocrit (%)	44.02 ± 4.19	41.96 ± 4.67	86
Mean corpuscular volume (fl)	65.00 ± 4.20	63.79 ± 4.62	86
Mean corpuscular hemoglobin (pg)	22.72 ± 0.97	22.67 ± 0.95	86
Mean corpuscular hemoglobin concentration (g/dl)	35.01 ± 1.90	35.59 ± 2.39	86
Platelet ( $\times 10^3/\text{mm}^3$ )	373.4 ± 91.9	355.3 ± 78.6	86
Reticulocyte count (%)	1.19 ± 0.48	1.21 ± 0.44	86
Prothrombin time (min)	6.13 ± 0.19	6.12 ± 0.19	86
Neutrophil (%)	57.26 ± 5.09	56.90 ± 7.22	86
Lymphocyte (%)	31.99 ± 5.20	31.66 ± 6.54	86
Monocyte (%)	6.24 ± 1.24	6.78 ± 1.39	86
Eosinophil (%)	2.12 ± 1.31	2.65 ± 1.22	86
Basophil (%)	1.72 ± 1.11	1.70 ± 0.99	86
Leucocyte (%)	0.49 ± 0.18	0.42 ± 0.19	86
Aspartate aminotranferase (IU/l)	34.05 ± 6.04	34.57 ± 7.27	86
Alanine aminotransferase (IU/l)	28.39 ± 5.93	29.59 ± 10.71	86
Alkaline phosphatase (IU/l)	440.9 ± 116.9	457.4 ± 92.0	86
Blood urea nitrogen (mg/dl)	16.67 ± 4.63	14.90 ± 4.32	86
Creatinine (mg/dl)	0.68 ± 0.08	0.68 ± 0.10	86
Glucose (mg/dl)	104.6 ± 9.2	101.5 ± 8.7	86
Total cholesterol (mg/dl)	137.1 ± 23.8	144.8 ± 26.6	86
Albumin globulin ratio	1.76 ± 0.24	1.68 ± 0.22	86
Total protein	5.80 ± 0.28	5.79 ± 0.29	86
Albumin	3.68 ± 0.14	3.63 ± 0.17	86
Creatinine phosphokinase	296.5 ± 94.7	358.9 ± 148.0	86
Triglyceride	42.74 ± 15.11	38.48 ± 14.35	86
Phospholipid	297.0 ± 44.8	302.5 ± 43.1	86
Total bilirubin	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.02	86

각 이온들에 충돌에너지를 가하여 생성된 분자량 59의 product 이온들을 Q3에서 scanning하여 정량에 이용하였다. 두 물질의 mass spectra를 Fig. 1에 표시하였다.

**혈장 중 doxifluridine 농도분석**

독시플루리딘과 내부표준물질은 칼럼에 주입 후 각각 2.65 및 1.7분에 나타났고 내인성물질에 의한 간섭은 없었다. Fig. 2에 전형적인 크로마토그램을 나타내었다. 2A와 2B는 각각 공혈장 및 200 ng/ml 혈장 시료에 100 ng/ml 내부표준물질 100 µl를 가한 후 얻은 크로마토그램이며 2C는 약물투여 후 비글 견으로부터 얻은 시료의 크로마토그램이다. 추출과정에서 포화된 ammonium sulfate 용액을 사용해 보았으나 염산을 가한 후 추출한 것에 비해 효율은 높지 않았다. 본 시험법의 검출한계는 signal to noise 비율 5에서 1 ng/ml이었다.

혈장표준용액의 농도로서 5 ng/ml에서 5 µg/ml의 범위에서 검량선을 작성하였다. 고농도로 갈수록 내부표준물질에 대한 doxifluridine의 비율은 hyperbolic하게 나타나 4-parameter logistic curve를 이용하여 검량선을 작성하였으며 다음과 같은 식을 얻었다.

$$Y=0.0094+29.2385/[1+(X/9.8649)^{-1.0499}]$$

분석법의 일내 및 일간 정확성과 정밀성을 Table 2와 3에 각각 나타내었다. 일내 및 일간 정밀성은 각각 6.4 및 9.4% 미만이었으며, 모든 농도에서 90.2% 이상의 정확성을 나타내었다. 추출효율은 85%이상이었으며 독시플루리딘은 혈장 중에

**Table 2. The precision and accuracy of the intra-day doxifluridine assay (n=5)**

Added (ng/ml)	Measured (ng/ml) (mean ± S.D.)	CV (%)	Accuracy (mean%)
5	5.1 ± 0.3	2.2	101.4
50	49.2 ± 0.32	6.4	98.9
200	201.1 ± 1.5	4.1	106.1
5000	4906.0 ± 72.9	1.5	98.1

**Table 3. The precision and accuracy of the inter-day doxifluridine assay (n=5)**

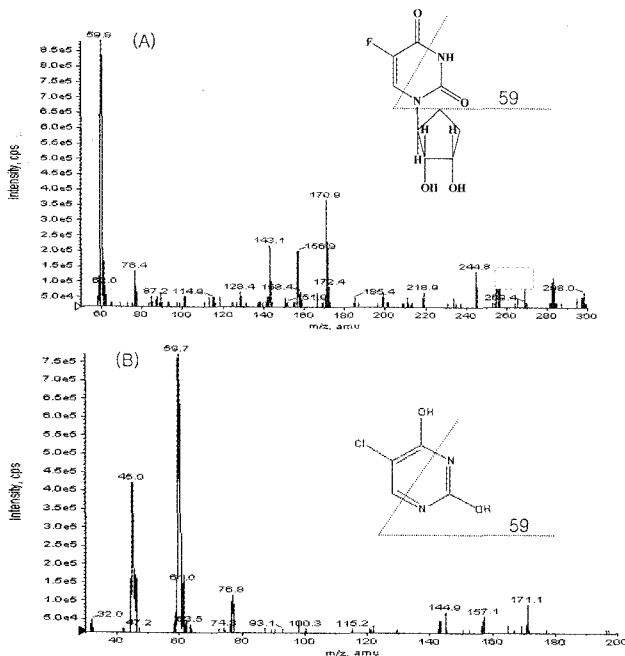
Added (ng/ml)	Measured (ng/ml) (mean ± S.D.)	CV (%)	Accuracy (mean%)
5	4.5 ± 0.2	4.4	90.2
50	50.9 ± 3.8	7.5	101.8
200	200.7 ± 18.4	9.2	100.3
5000	4749.7 ± 444.7	9.4	95.0

6시간동안 상온 방치시, 추출 후 상온 6시간 방치시, 냉해동 3회 반복시 모두 안정한 것으로 판단되었으며 장기 안정성에서는 3주까지는 안정하였다.

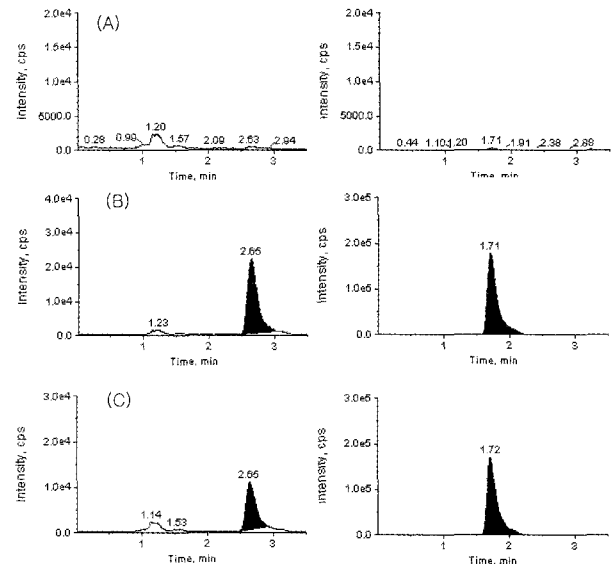
**비글 견에서 독시플루리딘의 약물동태 연구**

**Non-compartmental analysis**

시간에 따른 혈중 doxifluridine의 농도변화는 Fig. 3에, 주요 약동학적 파라미터들은 Table 4에 각각 표시하였다. 후트론 200 mg을 단회 경구투여 한 후 혈장 중 미변화체인 doxifluridine의 최고혈중농도는 투여 후 약 1시간에 4.41±2.6



**Fig. 1. Mass-mass spectra of doxifluridine (A) and 5-chloruracil (B) using electrospray ionization mode.**



**Fig. 2. Chromatograms of doxifluridine (left) and 5-chloruracil (right). A: blank plasma, B: plasma spiked with 0.2 µg/ml doxifluridine and 5-chloruracil, C: plasma sample equivalent to 0.12 µg/ml from a dog 0.5 h after the oral dose.**

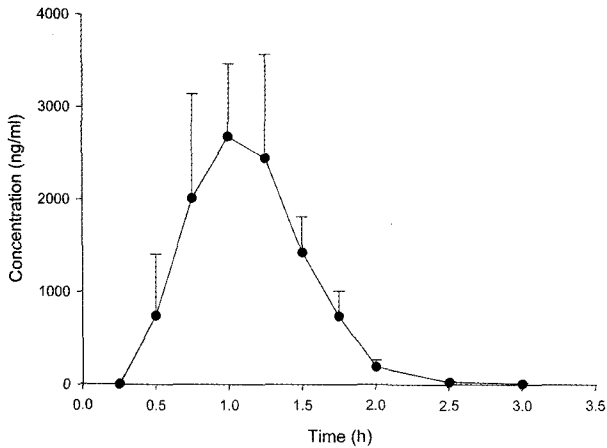


Fig. 3. Time course of the plasma doxifluridine concentration in Beagle dog after a single 200-mg oral dose. Each point represents the mean  $\pm$  S.D. (n=6).

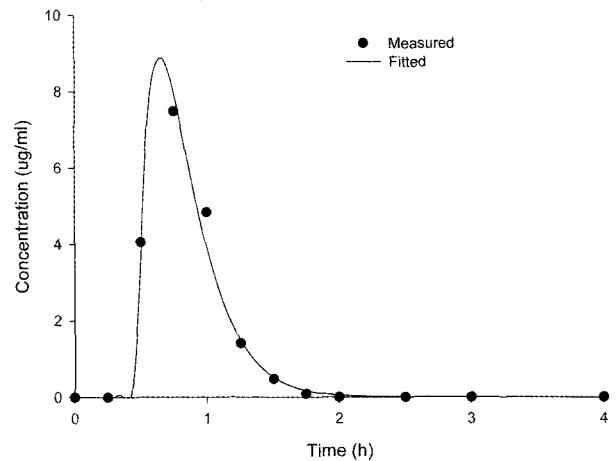


Fig. 4. Representative model fit of the plasma doxifluridine concentration in Beagle dog.

Table 4. Pharmacokinetic parameters of doxifluridine in 6 Beagle dogs after a single 200-mg oral dose

Non-compartmental analysis		Compartmental analysis	
Parameters	mean $\pm$ S.D.	Parameters	mean $\pm$ S.D.
$C_{max}$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	$4.4 \pm 2.6$	$k_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$3.7 \pm 1.2$
$T_{max}$ (h)	$1.2 \pm 0.3$	$k_c$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$3.7 \pm 1.1$
$AUC_{last}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{h/ml}$ )	$2.6 \pm 1.3$	Vd(l)	$36.9 \pm 26.3$
$t_{1/2}$ (h)	$0.2 \pm 0.1$	$\tau$ (h)	$0.6 \pm 0.2$

$\mu\text{g/ml}$ 를 나타내었으며 혈중 소실 반감기는  $0.17 \pm 0.05$  시간이었다. 6시간까지의 시간별 농도 곡선하 면적 ( $AUC_{6hr}$ )은  $2.59 \pm 1.33 \text{ g h/ml}$ , 무한시간까지의 시간별 농도 곡선하 면적( $AUC_{inf}$ )은  $2.60 \pm 1.34 \mu\text{g h/ml}$ 이었다.

Compartmental analysis

독시플루리딘의 비글 견에서의 혈중농도변화를 가장 잘 설명하기 위한 모델은 1차 흡수 및 소실 상수를 갖는 1-compartment model이었고 흡수에 지연(lag time)을 나타내었다. Weighted least square법에 의해 fitting한 결과 가중치 1/y에서 가장 적절한 약물동태 parameter들을 얻었고 산출된 각 값들(estimated parameter)의 coefficient of variation도 가장 적은 정밀한 값을 얻었다. 모델링 결과 산출된 각 parameter들은 Table 4에 대표적인 fit은 Fig. 4에 나타내었다. Lag time은  $0.64 \pm 0.20 \text{ min}$ 이었고 흡수속도 상수 및 배설속도 상수는 각각  $3.66 \pm 1.19$  및  $3.72 \pm 1.11 \text{ h}^{-1}$ 이었으며 Vd는  $36.9 \pm 26.3 \text{ L}$ 였다.

고 찰

사람을 대상으로 하는 항암제의 생물학적 동등성 평가는 건강한 성인들을 대상으로 하는 것이 불가능하기 때문에 대

상 약물을 투여 받고 있는 환자들로부터 동의를 얻은 후 시행할 수 있다. 하지만 이를 위해서는 우선 환자들로부터 동의를 얻어야 하는데 생명의 위협 하에 있는 환자들에게 동등성이 입증되지 않은 약물을 시험하기 위해 시험대상으로서의 동의를 얻어내야 하는 어려움이 있으며, 이미 입원 후 검사 등을 위해 수 차례의 채혈을 경험해온 암 환자들로부터의 잦은 채혈은 윤리적 및 심리적인 측면에서 신중을 기해야 할 것이다.

환자 개개인의 병세에 따른 생리학적인 변화는 대조 약물 및 시험 약물의 약물동태에 변이를 초래할 수 있으며 병용투여되는 약물들에 의한 영향 역시 고려되어야 한다. 단독으로 투여하는 요법을 실시하는 환자들을 대상으로 하는 경우 충분한 지원자들의 확보에도 어려움이 있을 수 있다. 또한 암 환자들의 특성상 시험 중간에 질병의 악화 및 사망 등으로 인해 시험을 지속할 수 없는 경우의 발생도 예상될 수 있다. 이 경우 일부 얻어진 자료로부터 동등성을 입증하기 위한 통계적 처리는 교차시험 후 실시하도록 하는 현행 규정을 적용할 수 없다.

따라서 동물을 이용한 항암제의 생물학적 동등성의 고찰은 이러한 현실적인 어려움을 극복하기 위한 대체 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다. 물론 동물에서의 자료를 사람에게 직접 사용하는 것은 무리가 있을 수 있으나 동등성의 측면에서 대조약에 대한 시험약의 비교시험 결과를 통한 평가는 시험의 목적에 충분히 부합되는 것으로 판단된다.

Table 1에 나타난 개에서의 혈액학, 혈액생화학적 수치 및 뇨 검사 값들은 비단 동등성 시험 뿐 아니라 여러 형태의 비글 견을 이용한 시험에서 건강한 시험동물의 여부를 결정하는 중요한 기준이 될 것이다.

랫드, 토끼 및 사람의 혈장에서의 독시플루리딘 분석법은 대부분 HPLC를 이용하여 자외선 검출기로 정량하여 왔다.<sup>10-11)</sup> 개 혈장에서의 분석법은 이번 보고가 처음이며 최근 널

리 사용되고 있는 tandem mass spectrometer를 사용하여 개발된 매우 감도가 좋은 방법이다. 기존의 방법에서는 혈장시료를 10배 이상 농축했을 때 50 ng/ml의 감도를 나타낸 반면 본 연구에서의 감도는 1 ng/ml로 약 50배의 향상을 가져왔으며 농축이 안된 점을 고려하면 sensitivity는 그 이상이 될 것이다. 매회 채혈에 따른 비글 견의 혈액학적 변화를 최소화하기 위해 1 ml의 혈액을 취했으며 이중 0.1 ml의 혈장이 사용되었는데 암환자들을 대상으로 한 다른 시험의 경우보다 많은 양의 혈장을 사용한다면 농축비율에 따른 감도를 더 향상시킬 수 있을 것으로 예측된다. 일내 및 일간 정밀성 및 정확성에서도 기준범위를 모두 만족시켜 얻어진 혈중농도 자료에 신뢰성을 확보하였다.

$C_{max}$  및 AUC에 있어서는 동물 간에 큰 차이를 보여 두 파라미터의 산술평균 값에 대한 표준편차의 비율이 각각 59 및 52%를 나타내었다. 생물학적 동등성 시험에서 대조약과 시험약의  $C_{max}$ 와 AUC 두 항목을 로그 변환하여 통계처리 하였을 때, 로그변환한 평균치 차의 90% 신뢰구간이  $\log 0.8$ 에서  $\log 1.25$ 이내이어야 동등성을 입증 받을 수 있는 현행 기준을 고려하면 이론적으로 필요한 동물 수는 군당 53마리 이상으로 계산될 수 있다. 하지만 이는 편차만을 고려하여 산출한 확률론적인 수치이며 최소검출력을 0.8 이상으로 했을 경우에 필요한 수로 본 시험에서 충분히 많은 수의 동물을 사용할 수 없음도 감안해야 할 것으로 사료된다. 또한 사람을 대상으로 한 동등성 시험과는 달리 일정한 사육조건에서 환경적인 요인이 잘 조절되는 점을 고려해야 할 것이다. 반감기가 0.2시간으로 짧아 휴약기를 길게 둘 필요는 없을 것으로 보이지만 구토, 설사 등의 부작용 및 손상된 체혈부위 혈관의 회복을 위해서 2주의 휴약기를 두는 것이 적절할 것으로 보인다. 격리된 일정한 조건에서 사육되는 점을 감안하면 투약 시기에 따른 변화는 무시될 수 있을 것으로 사료된다.

## 결 론

항암제로 사용되고 있는 doxifluridine 제제의 생물학적 동등성의 평가를 위해서는 비글 견을 사용할 경우 시험 전 혈액학 및 혈액생화학 검사를 실시하여 건강한 개를 선택한다. 20마리의 비글 견을 두 군으로 나눈 후 대조약 및 시험약 200 mg 1캡셀을 경구 투여하고 투여 전 및 투여 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.25, 1.5, 1.5 1.75, 2, 2.5, 3, 4, 6시간에 채혈한다. 2주간의 휴약기를 둔 후 교차로 투여하며 혈장 doxifluridine의 농도는 HPLC/UV 혹은 LC/MS-MS를 이용하여 정량한다.

## 감사의 말씀

본 연구는 식약청의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Duschinsky R, Plevan E, Oberhansli W. Synthesis of 5-fluoropyrimidine metabolites. *Acta Unio Int Contra Cancrum* 1960; 16: 599-604.
2. Koizumi W, Kurihara M, Sasai T, Yoshida S, Morise K, Imamura A, Akazawa S, Betsuyaku T, Ohkubo S, Takahashi H, et al. A phase II study of combination therapy with 5'-deoxy-5-fluorouridine and cisplatin in the treatment of advanced gastric cancer with primary foci. *Cancer* 1993; 72: 658-62.
3. Takiguchi N, Nakajima N, Saitoh N, Fujimoto S, Nakazato H. A phase III randomized study comparing oral doxifluridine and oral 5-fluorouracil after curative resection of gastric cancer. *Int J Oncol* 2000; 16: 1021-7.
4. Kondo K, Sakamoto J, Nakazato H, Koike A, Kitoh T, Hachisuka K, Saji S, Yura J, Nimura Y, Hamajima N, Katoh K, Yamaguchi A, Miya KI, Yamauchi M, Mizuno I, Nagino M, Takagi H. A phase III randomized study comparing doxifluridine and 5-fluorouracil as supportive chemotherapy in advanced and recurrent gastric cancer. *Oncol Rep* 2000;7:485-90.
5. Cook AF, Holman MJ, Kramer MJ, Trown PW. Fluorinated pyrimidine nucleosides. Synthesis and antitumor activity of a series of 5'-deoxy-5-fluoropyrimidine nucleosides. *J Med Chem* 1979; 22: 1330-5.
6. Ishitsuka H, Miwa M, Takemoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama HB. Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* 1980; 71: 112-23.
7. Suzuki S, Hongu Y, Fukazawa H, Ichihara S, Shimizu H. Tissue distribution of 5'-deoxy-5-fluorouridine and derived 5-fluorouracil in tumor-bearing mice and rats. *Gann* 1980; 71: 238-45.
8. Armstrong RD, Diasio RB Improved measurement of thymidylate synthetase activity by a modified tritium-release assay. *Cancer Res* 1981; 41: 4891-4.
9. Hamada A, Fukushima S, Morinaga A, Saneyoshi M, Kawaguchi T, Nakano M. Differential effects of acyclothyridine, a potent pyrimidine nucleoside phosphorylase inhibitor, on the pharmacokinetics of doxifluridine in rabbits via oral administration. *Biol Pharm Bull* 1993; 16: 1297-300.
10. Guerrieri A, Palmisano F, Zambonin PG, De Lena M, Lorusso V Solid-phase extraction of fluoropyrimidine derivatives on a copper-modified strong cation exchanger: determination of doxifluridine, 5-fluorouracil and its main

metabolites in serum by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection. *J Chromatogr* 1993; 617: 71-7.

11. Schaaf LJ, Ferry DG, Hung CT, Perrier DG, Edwards IR

Analysis of 5'-deoxy-5-fluorouridine and 5-fluorouracil in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 342: 303-13.