

대해서는 2배 더 큰 항균활성을 갖는다(Fernandes등, 1988; Hardy등, 1988). 또한 두 화합물을 혼합했을 때 in vivo 활성은 상승작용을 나타낸다. 따라서 클래리스로마이신 단독으로 통상의 감수성 시험이나 동물효력시험시 *influenzae*에 대한 효력이 과소 평가될 수 있다(Dwight등, 1990).

본 실험에서는 (주)이연제약에서 클래리스로마이신의 제제개발 일환으로 연구 중인 이연 클래리스로마이신 정과 대조약인 클래리시드[®]정 (한국 애보트 주식회사)의 생물학적 동등성 시험을 수행하였다.

시험방법

시약 및 기기

한천평판배지는 Heart Infusion Agar(HIA)를 사용하였고 균주로는 *Micrococcus luteus* ATCC9341 균주를 사용하였다. 헤파린은 중의 헤파린나트륨주(1,000 IU, 중의제약)를 사용하였다. 시험약으로는 (주)이연제약에서 제공한 이연 클래리스로마이신 정(클래리스로마이신으로서 250 mg을 함유하는 정제)을, 대조약으로는 한국 애보트사에서 시판하고 있는 클래리시드 정(클래리스로마이신으로서 250 mg을 함유하는 정제)을 구입하여 사용하였다.

피험자 선정

서울대학교 약학대학 및 대학원에 재학중인 건강한 남성으로서 과거에 소화기계, 간장, 신장 및 혈액질환의 병력이

없고 현재 타 약물을 복용하고 있지 않은 지원자를 지원자 모집공고를 통해 모집하였다. 본 시험에 관한 설명회를 개최하여 시험의 의의와 수반될 수 있는 모든 문제점들에 대하여 설명하고, 이들 중 전문의사의 건강진단을 실시하여 건강인으로 판정된 자 16명을 선정하였으며, 지원자들로부터 서면동의서를 받았다. 시험에 앞서 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소에 구성된 생물학적 동등성 심사위원회에서 시험계획서를 심의하여 승인을 받은 후 시험을 수행하였다. 본 시험에 지원한 피험자의 연령은 23-28세(평균 24.9세)이었으며, 신장은 165-183 cm(평균 173.9 cm), 체중은 57.7-75.5 kg(평균 65.2 kg)이었다. 각 피험자의 신체사항 및 건강진단검사 결과는 Table I에 요약하였다.

투약 및 채혈

이 시험은 16명의 피험자를 대상으로 하여 라틴 방격법을 이용하여 2기×2제의 교차시험을 시행하였다. 지원자 16명을 무작위로 8명씩 2군으로 나누어 시험하였으며

Table II. Dosing schedule to 16 volunteers

Group	Subject	Period	
		I	II
1	1-8	Test*	Reference**
2	9-16	Reference**	Test*

*ReYon Clarithromycin tablets (ReYon)

**Klaricid tablets (Abbott Korea)

Table I. Informations and the results of physical examinations of sixteen volunteers

Subject No.	Age	Height (cm)	Weight (kg)	HT* (%)	RBC* ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	GOT* (IU/l)	GPT* (IU/l)	Glucose (mg/dl)	CHOL* (mg/dl)	TP* (g%)	ALB* (g%)	BP* (mmHg)
NR***				41-53	4.0-6.3	8-40	5-35	70-105	130-230	6.8-8.0	3.3-5.2	$\geq 140/90$
1	25	165	57.7	45	5.16	25	18	88	206	7.9	4.5	120/80
2	23	183	68	42	4.83	23	8	100	177	7.8	4.9	120/80
3	23	172.3	60.5	43	5.22	30	12	91	134	8.1	4.8	130/80
4	25	173.8	62.3	41.2	4.62	25	25	92	135	7.4	4.7	110/70
5	23	177.3	75.5	42.1	5.08	26	19	93	174	7.2	4.5	130/90
6	26	169.5	62.3	43.4	4.99	22	8	95	170	7.6	4.7	120/80
7	22	173	69.4	42.9	4.60	20	9	91	138	7.1	4.5	110/70
8	26	177.4	75.4	43.6	4.99	17	13	93	172	7.3	4.3	130/80
9	23	171.4	59.1	45	5.02	29	14	96	138	6.7	4.5	130/80
10	28	166	60	46.6	5.15	27	25	78	161	7.2	4.5	110/70
11	26	180	65.9	40.9	4.68	21	10	88	165	7.0	4.3	110/70
12	25	177	62.9	43.1	4.95	17	11	97	168	7.4	4.5	130/80
13	25	172	59	45	5.12	20	11	94	162	6.8	4.3	130/80
14	25	167	64	45.5	4.98	21	13	68	259	7.5	4.3	120/80
15	25	172	70	41.7	4.65	30	30	92	160	7.4	4.5	130/80
16	28	173.6	71.4	40.9	4.96	19	17	93	180	7.1	4.4	130/80

*Abbreviations: HT (hematocrit), RBC (red blood cell), GOT (glutamic oxalacetic transaminase), GPT (glutamic pyruvic transaminase), CHOL (cholesterol), TP (total protein), ALB (albumin), NR (normal range), BP (blood pressure)

**Represents the normal range of each blood chemistry examination.

(Table II) 휴약기간은 클래리스로마이신의 반감기를 충분히 고려하여 3주일로 하였다. 시험전날 동일한 저녁식사와 간식을 취하고, 오후 10시 이후(투약전 11시간)로는 물 이외의 어떠한 종류의 음식도 금하였다. 시험당일에는 공복시에 각각 클래리스로마이신 250 mg을 함유한 이연 클래리스로마이신정 또는 클래리스드정을 1인당 1정씩 약 200 ml의 물로 1회 경구투여하고, 예비시험 결과를 근거로 하여 채혈간격을 결정한 후 약물투여 직전 및 투여후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24시간에 해파린으로 처리한 주사기로 좌 또는 우측 팔로부터 약 10 ml의 정맥혈을 채취하였다. 약물을 투여하고 약물 투여 후 4시간까지는 일체의 음식과 음료를 금하고, 약물투여 4 시간째에 피험자 전원이 동일한 식사를 하도록 하였다.

경시적으로 채혈한 5 ml의 혈액은 시험관에 넣고 1시간 이상 방치한 후 응고시켰다. 혈병이 형성되면 약 3000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 다음 상정액인 혈청(serum)만 취하여 멸균된 2 ml Eppendorf tube에 옮기고 드라이아이스를 사용하여 냉동시켰다. 채혈이 모두 끝난 후에는 -24℃ 이하로 유지되는 냉동고에 넣어 분석시까지 보관하였다.

혈청 중 약물 농도 측정

혈청 중의 약물의 역가를 Girard 등(1987), Simon 등(1970), 水島裕 (1988)과 Hanson 등(1987)이 사용한 방법(modified agar well diffusion bioassay)으로 측정하였다.

클래리스로마이신 표준품 4 mg을 정밀히 달아 메탄올에 녹인 후 공혈청(blank serum)으로 희석하여 적당한 농도로 표준액을 조제하여 검량선 작성에 사용하였다.

Agar plate에서 자란 *Micrococcus luteus* ATCC 9341 균주를 McFarland(BioMerieux사)를 이용해 10⁹ cells/ml 농도로 준비한 후 130 ml의 HIA agar와 130 μl의 준비된 균주를 섞어(1000배 희석) 10⁶ cells/ml의 농도로 맞추었다. 이것을 4각형 멸균배양상자(Nunc사)에 골고루 펼쳐 실온에서 굳혔다. 배지가 다 굳은 후 지름 4 mm puncture로 구멍을 뚫어 혈청 시료를 가하기 위한 sample well을 만들었다.

시간별로 채취된 혈청과 희석된 표준용액을 평판배지의 sample well에 100 μl씩 시간별 또는 농도별로 표시된 평판배지에 흡입시킨 후 4℃ 냉장고(cold chamber)에서 1시간 동안 preincubation한후 37℃에서 18시간 배양하였다. 다음날 성장 억제 영역(growth inhibition zone)을 측정하였다.

약물속도론적 분석

최고 혈청 중 농도(C_{max}) 및 최고 혈청농도 도달시간(T_{max})은 혈청 중 약물농도-시간곡선으로부터 직접 읽었다. 24시간까지의 혈청 중 약물농도-시간 곡선 하 면적(AUC_{0-24h})을 사다리꼴 공식(Gibaldi, 1991)에 의해 구하였으며, 무한대까지의 AUC_{0-∞}는 식 (1)에 따라 AUC_{0-24h}, 24시간째의 혈청 클래리스로마이신 농도(C₂₄) 및 겉보기 소실속도 정수(k_e)로

부터 구하였다.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-24h} + C_{24}/k_e \tag{1}$$

여기서 k_e값은 terminal phase의 직선부분을 직선회귀한 기울기로부터 구하였다.

통계해석

모든 측정치와 계산치는 산술평균±표준편차(S.D.)로 표시하였으며, 각 군간의 차이에 관한 검정은 paired Student's t-test를 행하여 p<0.05인 경우 유의성이 있다고 판정하였다. 두 제제의 생물학적 동등성은 식품의약품안전본부 고시 제96-16호(1996년 10월 31일 개정)에 따라 통계적 검정을 행하였다. 즉 우선 분산분석을 행한 검출력(1-β), 최소검출차(Δ) 등에 의해 판정하였다.

결 과

분석법 검증 및 검량선 작성

검량선은 메탄올 표준액 적당량을 혈청에 첨가한 후 시료와 동일한 방법으로 성장 억제 영역(growth inhibition zone)을 측정하여 작성하였다(Fig. 2). 본 분석방법의 정밀도 C.V.%는 7.10%(0.03 μg/ml) 이하였으며 정량성을 갖는 검출한계는 0.03 μg/ml이었다. Fig. 2에 보는 바와 같이 회귀분석을 하였을 때 0.03-2.23 μg/ml범위에서 양호한 직선성을 나타내었다(r²=0.9948).

혈청 중 약물 농도

평균 혈청 중 약물농도-시간 곡선은 Fig. 3에 나타내었다. 클래리스로마이신의 흡수정도 및 흡수되는 패턴은 개체차가 있다. 이 혈청 중 농도로부터 계산한 약물속도론적 매개변수(pharmacokinetic parameter)는 Table III와 같다.

생물학적 동등성 평가

본 실험에서 두 제제의 약물속도론적 매개변수들을 분산

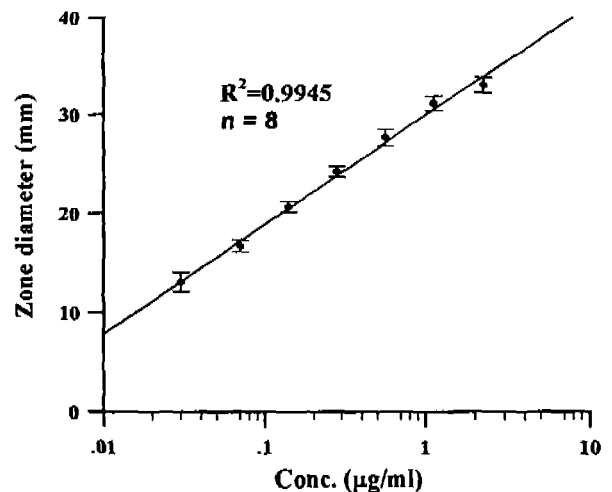


Fig. 2. Calibration curve for clarithromycin.

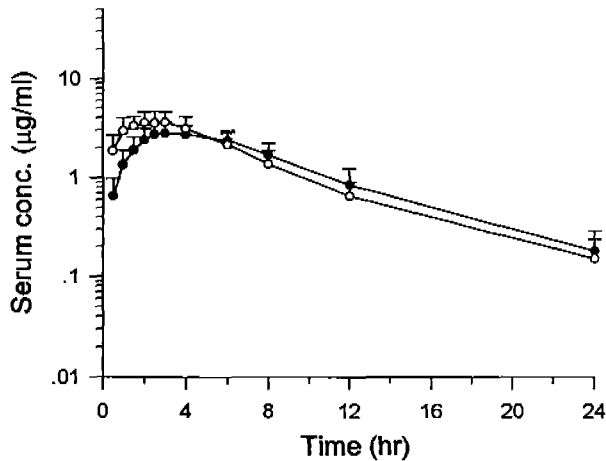


Fig. 3. Clarithromycin concentration in human serum-time curves of sixteen volunteers after oral administration of two clarithromycin products. Key: ●, Reference drug; ○, Test drug.

Table III. Statistical analysis of pharmacokinetic parameters of two clarithromycin products

	AUC _{0-24 hr} ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)	AUC _{0-∞} ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$)	C _{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	T _{max} (hr)
Reference	8.10±1.26	8.61±1.28	0.87±0.22	2.69±0.48
Test Drug	8.22±1.62	8.84±1.71	0.88±0.19	2.56±0.51
t-value	-0.2612	-0.4706	-0.4202	0.6742

All pharmacokinetic parameters of test drug were not significantly different ($p>0.05$) from those of reference drug.

분석한 결과는 Table IV에 표시한 것과 같으며, 이를 바탕으로 $\alpha=0.05$ 에서 분산을 검정하였다. Table III의 실험결과 및 통계처리결과를 종합하여 시험약과 대조약의 생물학적 동등성 여부를 평가하였다. 평가방법은 식품의약품안전본부 고시 제 96-16(1996년 10월 31일 개정)의 기준에 따라 행하였다.

두 제제의 약물속도론적 매개변수들을 분산분석한 결과는 Table IV에 기재한 것과 같다. 이를 바탕으로 $\alpha=0.05$ 에

Table V. Results of the bioequivalence test from two clarithromycin A products (2×2 Latin square method)

	AUC _{0-24 hr}	C _{max}	T _{max}
BA difference of test product from reference product	1.44%	1.36%	4.65%
Minimum detectable difference	15.99%	18.72%	15.44%
Noncentrality	3.77	3.22	3.90
Minimum subject number	8	8	8
Confidence limits of BA difference	$-9.94\% \leq$	$-11.94\% \leq$	$-6.34\% \leq$
	$\leq 12.82\%$	$\leq 14.72\%$	$\leq 15.65\%$
Bioequivalence ?	Yes	Yes	Yes

서 분산을 검정하면 모든 비교항목의 F_{group} 값이 F분포표의 값 ($F(1,14)=4.3$)보다 작아서 교차시험이 성립하였다. 생물학적 동등성 평가 결과는 Table V과 같다. 결과를 종합적으로 판정해 보면, 식품의약품 안전본부고시에 의한 비교항목(AUC_{0-24 h}, C_{max}, T_{max})의 평균치의 차이는 각각 1.44, 1.39, 4.65%로서 AUC_{0-24 h}, C_{max}와 T_{max}가 모두 $\pm 20\%$ 이내에 들어 생물학적 동등성 판정기준의 제 2항을 만족시켰다. 또한 AUC_{0-24 h}, C_{max}와 T_{max}는 검출력 $1-\beta \geq 0.8$, 최소 검출차 $\Delta \leq 0.2$ 의 범위를 만족시키고 신뢰한계가 각각 $-9.94 \sim 12.82\%$, $-11.94 \sim 14.72\%$ 와 $-6.34 \sim 15.65\%$ 로서 AUC_{0-24 h}, C_{max}와 T_{max} 모두 $\pm 20\%$ 범위안에 들어 통계적으로 동등한 것으로 판정되었다. 따라서 분산분석 결과와 합쳐 종합적으로 평가할 때 생물학적으로 동등한 것으로 판정되었다.

고 찰

생물학적 동등성시험은 약물이 제제상의 차이 때문에 체내에서의 이용률이 다르고, 극단적인 경우에는 거의 흡수되지 않고 체외로 배설되는 일이 있기 때문에 약효를 기대할 수 없는 경우가 존재한다. 따라서 생물학적 동등성 시험은 임상효과가 확인된 약물의 제제를 대조약으로 하여 시험제제(시험약)가 대조약과 생물학적으로 동등하다는 것을

Table IV. ANOVA table of the pharmacokinetic parameters obtained from two clarithromycin products (2×2 Latin square method)

Variation Sources	df	AUC		C _{max}		T _{max}	
		MS	(F)	MS	(F)	MS	(F)
Between Subjects	15	2.5944	1.75	0.0653	2.81	0.2167	0.22
Between Groups	1	4.7212	1.93	0.0269	0.39	0.1250	0.13
Subject/Group	14	2.4425	1.65	0.0681	2.93	0.2232	0.22
Intra Subject Variation							
Period	1	3.8538	2.61	0.0093	0.40	2.0000	2.00
Drug	1	0.1086	0.07	0.0012	0.05	0.1250	0.13
Residual	14	1.4786		0.0232		0.1518	0.15

$F_{\text{group}}(1,14)=4.3$, $F_{\text{subject/group}}(14,14)=2.35$, $F_{\text{period}}(1,14)=4.3$ and $F_{\text{drug}}(1,14)=4.3$ at $\alpha=0.05$ $p>0.05$.

증명하여 의약품 제제가 서로 생물학적 동등성을 유지하고 있는 것을 보증하기 위해 실시된다. 생물학적으로 동등하다는 것이 반드시 치료효과에서도 동등하다는 것을 반영하는 것은 아니지만 그 전제조건은 될 수가 있다(佐久間昭).

생체시료 중 약물 및 그 대사체를 정량하기 위해 도입되는 분석법들을 생체내 이용률, 생물학적 동등성 및 체내속도론적인 데이터를 평가하고 해석하는데 중요한 역할을 한다. 이러한 분석법이나 분석기술들은 첨단기술에 속하며 계속해서 향상되고 있다. 이러한 분석기술에는 (i) 크로마토그래피(GC, HPLC)법 및 mass spectrometry(MS)법 (direct MS, MS-MS 및 GC-MS, LC-MS와 같은 조합기술)을 이용하는 화학적 분석법, (ii) 면역학적 분석법(RIA, EMIT, ELISA)에 기초한 생물학적 분석법 및 미생물학적 분석법 등이 있다. 이러한 분석기술들은 약물에 따라 다른 그 나름대로의 특징을 가지고 있다. 더우기 각 분석법들이 어떤 약물에 대해 적절한가 하는 것은 연구의 궁극적인 목적에 따라 달라질 수 있다.

생물학적 동등성 시험의 경우, 그 기준에서, 분석방법은 분석대상약물 즉, 체액 또는 요 중의 유효성분 또는 이들과 비례관계가 인정되는 대사산물의 실제 농도를 정확하게 측정할 수 있는 충분한 감도를 가진 방법을 이용해야 한다(식품의약품안전본부고시 제96-16호). 본 시험대상 약물인 클래리스로마이신은 항생제로서 클래리스로마이신 그 자체도 항균활성을 갖지만 그 주 대사체인 14-히드록시-클래리스로마이신도 그 이상의 항균활성을 가지고 있다(Fernandes 등, 1988; Hardy 등, 1988). 따라서 생물학적 동등성 시험시 분석법에는 클래리스로마이신 자체 및 그 대사체를 각각 HPLC와 같은 화학적 분석법에 의해 분석하여 동등성을 평가할 수 있지만 생체시료 중의 항균활성을 갖는 물질의 동등성을 역가시험(bioassay)을 통해서도 평가할 수도 있다. 그러나 앞서서도 언급한 바와 같이 생물학적 동등성 시험의 궁극적 목적은 두 제제간의 약효발현이 동등하다는 것(치료효과에서의 동등성)을 입증하기 위한 것이다. 따라서 표준물질을 클래리스로마이신 단독으로 사용할 수밖에 없기 때문에 bioassay법에 의한 역가는 과대평가(overestimation) 될 수 있음에도 불구하고 클래리스로마이신처럼 주 대사체의 항균작용이 모 약물에 비해 동등 내지 더 큰 약물의 경우 생체 내에서 동등한 항균작용을 나타낸다는 것을 입증하기 위하여 작용에 중점을 둔 bioassay법으로 역가의 동등성을 검증하는 것이 타당하다고 사료된다.

이와 같이 bioassay법에 의해 역가의 동등성을 평가하기 위하여 각 제제의 체내속도론적 매개변수를 측정된 결과 Table III에 나타난 바와 같이 대조약과 시험약이 각각 AUC_{0-24h} 는 8.10 ± 1.26 과 $8.22 \pm 1.62 \mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{ml}$ 이었고 C_{max} 는 0.87 ± 0.22 와 $0.88 \pm 0.19 \mu\text{g}/\text{ml}$ 이었으며 T_{max} 는 2.69 ± 0.48 과 $2.56 \pm 0.51 \text{ hr}$ 이었다.

통계처리 결과, 비교항목(AUC_{0-24h} , C_{max} , T_{max})은 모두 식품의약품 안전본부고시에 의한 생물학적 동등성 판정기준을 만족시켜 통계적으로 동등한 것으로 판정되었다. 따라서 분산분석 결과와 합쳐 종합적으로 평가할 때 생물학적으로 동등한 것으로 판정된다.

감사의 말씀

이 연구는 서울대학교 약학대학 부속 종합약학연구소의 연구지원으로 수행되었으며 이에 감사드린다. 또한 본 시험에 협조해 주신 피험자, 간호사 및 물리약학 연구실 대학원생들에게 감사드린다.

참고문헌

- Cachet, T., Roets, E., Hoogmartens, J. and Vanderhaeghe, H. (1987). Separation of novel derivatives from commercial erythromycin samples by thin-layer chromatography, *J. Chromatogr.*, **403**, 343-349.
- Fernandes, P. B., Ramer, N., Rode, R. A., and Freiberg, L. A. (1988). Bioassay for A-56268 (TE-031) and identification of its major metabolite, 14-hydroxy-6-O-methyl erythromycin. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **7**, 73-76.
- Ferrero, J. L., Bopp, B. A., Marsh, K. C., Quigley, S. C., Johnson, M. J., Anderson, D. J., Lamm, J. E., Tolman, K. G., Sanders, S. W., Cavanaugh, J. H. and Sonders, R. C. (1990). Metabolism and disposition of clarithromycin in man, *Drug Metab. Dispos.*, **18**, 441-445.
- Fuji, R. and Nishimura, T. (1988). Pharmacokinetics and clinical evaluation of clarithromycin (TE-031); a new macrolide antibiotic in padiatrics, 28th Interscience Conf. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Los Angeles, CA, October, 23-26.
- Gibaldi, M. (1991). *Biopharmaceutics and Clinical Pharmacokinetics*, 4th Ed., Lea & FEBiger, Philadelphia, USA, pp. 146-175.
- Girard, A. E., Girard, D., English, A. R. (1987). Pharmacokinetic and in vivo studies with azithromycin (CP-62, 993), a new macrolide with an extended half-life and excellent tissue distribution, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **31**, 1948-1954.
- Hanson, C. W., Bailer, R., Gade, E., Rode, R. A., and Fernandes, P. B. (1987). Regression analysis, proposed interpretative zone size standards, and quality control guidelines for a new macrolide antimicrobial agent, A-56268 (TE-031), *J. Clin. Microbiol.*, **25**, 1079-82.
- Hardy, D. J., Hensey, D. M., Beyer, J. M., Vojtko, C., McDonald, E. J., and Fernandes, P. B. (1988). Comparative in vitro activities of new 14-, 15-, and 16-membered macrolides, *Antimicrob. Agents Chemother.* **32**, 1710-1719.
- Hardy, D. J., Swanson, R. N., Rode, R. A., Marsh, K., Shipkowitz, N. L., and Clement, J. J. (1990). Enhancement of the in vitro and in vivo activities of clarithromycin against *Haemophilus influenzae* by 14-hydroxy- clarithromycin, its

- major metabolite in humans, *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 1407-1413.
- Kohno, Y., Yoshida, H., Suwa, T., & Suga, T. (1989). Comparative pharmacokinetics of clarithromycin (TE-031), a new macrolide antibiotic, and erythromycin in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **33**, 756-6.
- Nakagawa, Y., Itai, S., Yoshida, T. and Nagai, T. (1992). Physicochemical properties and stability in the acidic solution of a new macrolide antibiotic, clarithromycin, in comparison with erythromycin, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 725-728.
- Simon, H. J. and Yin, E. J. (1970). Microbioassay of antimicrobial agents, *Appl. Microbiol.* **19**: 573-579.
- 水島裕 平塚秀雄. (1988). TE-031 第一相 臨床試験, *Chemotherapy*, pp. 452-499, Vol. 36 S-3.
- 식품의약품안전본부고시 제96-16호 생물학적동등성시험기준, 식품의약품안전본부(1996. 10. 31 개정).
- 佐久間昭. (1991). 일본의 생물학적 동등성 시험방법에 대한 해설, 생물약제학과 약물속도론, 이민화, 구영순 편역, 신광출판사, 서울, pp 470-491.